

GOVP1200627880
T0009490

T000 9490

최 종
연구보고서

생물반응기를 활용한 쪽파 우량종구 대량생산 기술

Mass Production Technique of the Superior wakegi
(*Allium wakegi*) by the Application of Bioreactor

연구기관
충남농업기술원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생물반응기를 활용한 쪽파 우량종구 대량생산 기술” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 10 월 일

주관연구기관명 : 충남농업기술원

총괄연구책임자 : 우 인 식

세부연구책임자 : 우 인 식

연 구 원 : 박 상 규

세부연구책임자 : 조 만 현

연 구 원 : 함 인 기

협동연구기관명 : 단 국 대 학 교

협동연구책임자 : 안 병 준

연 구 원 : 김 선 기

연 구 원 : 맹 성 주

요 약 문

I. 제 목

생물반응기를 활용한 쪽파 우량종구 대량생산 기술

II. 연구개발의 목적 및 필요성

쪽파의 증식은 인경번식에 의존하나, 그 증식율이 매우 낮고 재배시 종구 소요량이 많아 쪽파 종구의 안정적인 공급이 요구되는 실정이므로, 이를 위하여 효율적인 쪽파 기내 유식물체 획득방법과 생물반응기를 이용한 대량배양체계, 우량종구 포장생산기술 등을 확립할 필요가 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 순원기 배양을 통한 기내 자구 생산 기술 개발

- 1) 무병주 획득 및 순원기 유도
 - 가) 무병주 쪽파의 기내 유도
 - 나) 항바이러스 물질처리에 의한 무병주 생산 조건 구명
 - 다) 다신초 유도에 미치는 성장조절제 처리효과
 - 라) 삼투조절제가 기내 쪽파 신초의 투명화에 미치는 효과
- 2) 순원기 급속증식 및 기내인경 비대
 - 가) 쪽파 신초 증식에 미치는 성장조절제와 삼투압조절제의 상호작용
 - 나) 액체배양을 통한 다신초 및 다아체의 급속 증식

- 다) Sucrose 농도 및 광 조건이 쪽파 자구 비대에 미치는 영향
- 라) 한천 농도 및 옥신이 쪽파 자구 비대에 미치는 영향
- 마) 생장억제제가 쪽파 다신초 clump의 자구 유도 및 구 형성에 미치는 영향

3) 기내 인경 대량생산

- 가) 쪽파의 체세포배 발생 켈러스 유도를 위한 적정 성장조절제 및 농도 구명
- 나) 쪽파 체세포배 켈러스 배양을 통한 급속 순원기 재분화 유도

나. 생물반응기에 의한 쪽파의 대량배양 시스템 개발

1) 경제성이 있는 생물반응기의 개발

- 가) 15리터용 액체배양용기의 개발
- 나) 오염을 감소방법 연구(air, filtration)
- 다) 배양대로부터 배양용기에 주입할 공기의 배분 장치개발
- 라) 콤프레샤로부터 배양대에 주입할 공기의 배분 장치
- 마) 대량배양을 위한 공기 주입장치의 개발

2) 효율적인 쪽파의 대량배양방법 개발

- 가) 쪽파의 대량배양방법 개발
- 나) 생물반응기에서 증식된 순원기로부터 신초형성
- 다) 광조건에 따른 쪽파의 대량배양
- 라) 식물호르몬 처리에 의한 자구비대
- 마) 공기주입량에 따른 증구증식 및 비대 효율
- 바) Antivitrification을 위한 chemical 처리

다. 우량 종구 포장 생산기술

1) 기내 자구의 순화 및 비대를 위한 온실 및 포장재배 기술 체계화

- 가) 기내자구 순화를 위한 온실 재배 조건 구명

- 다) 순화과정 육묘시스템 확립
- 2) 무병종구 생산을 위한 포장 생산성 시험
 - 가) 조직배양묘의 포장 생산력 검정
 - 나) 종구 저장조건에 따른 출현율 비교

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 순원기 배양을 통한 기내 자구 생산 기술 개발

- 1) 무병주 획득 및 순원기 유도
 - 가) MS 배지내 2-ip 첨가 농도가 증가할수록 신초수 증가
 - 나) Sorbitol, PEG, 및 NaCl 등과 같은 삼투조절제 첨가로 유리화 억제 가능
 - 다) 배지내 PEG 첨가 농도가 높을수록 신초수 증가
 - 라) MS 배지내 rivavirin 10mg/L 첨가 배양으로 무병주 유도 가능
- 2) 순원기 급속증식 및 기내자구 비대
 - 가) 쪽파 다신초 유도에는 MS 배지에 3 mg/ℓ 2-ip, 0.2M sorbitol 및 3% PEG 첨가가 효율적임.
 - 나) 자구 비대에는 24시간 광조건하에서 MS배지에 9% sucrose 및 0.9% gelite 첨가가 효과적임
 - 다) 자구직경은 MS배지에 100mg/ℓ C.C.C. 첨가시 가장 큼.
- 3) 기내 자구 대량생산
 - 가) 0.5 ~ 1.0 mg/ℓ 의 2,4-D 나 picloram을 첨가한 MS배지에서 경정 배양시 체세포배 발생 캘러스 유도
 - 나) Picloram 처리에서 유도된 캘러스에서 배지내 3mg/ℓ BA 첨가로 신초 유도

나. 생물반응기에 의한 쪽파의 대량배양 시스템 개발

1) 경제성이 있는 생물반응기의 개발

가) 15리터용 액체배양용기의 개발

- 효율적인 생물반응기의 선발 및 용기의 제작

나) 오염을 감소방법 연구(air, filtration)

- 공기 주입식 membrane filter 적용
- 공기정화 장치의 개발

다) 배양대로부터 배양용기에 주입할 공기의 배분 장치개발

- 저가의 공기조절장치를 사용하여 배양기마다 공기조절장치를 설치

라) 콤프레서로부터 배양용기에 주입할 공기의 배분 장치

- 배양대 각각에 공기 분배장치 설치
- 주입 공기압 조절장치의 개발

마) 대량배양을 위한 공기 주입장치의 개발

- 무소음 콤프레서 설치
- 공기정화용 filter 추가 및 air dry 설치

2) 효율적인 쪽파의 대량배양방법 개발

가) 쪽파의 대량배양방법 개발

- 15 L 액체 배양계의 확립

나) 생물반응기에서 증식된 순원기로부터 신초형성

- 고체배양에서 왕성한 신초형성 조건 확립

다) 광조건에 따른 쪽파의 대량배양

- 광의 유무에 따른 증식 및 생장을 검토

라) 식물호르몬 처리에 의한 자구비대

- 호르몬 처리에 의한 자구비대의 효과 검토

마) 공기주입량에 따른 종구증식 및 비대 효율

- 공기 주입세기를 조절(0.5-3.0 bar)

바) Antivitrification을 위한 chemical 처리

다. 기내 자구를 이용한 우량종구 포장 생산기술

- 1) 기내 자구의 순화 및 비대를 위한 온실 및 포장재배 기술 체계화
 - 가) 쪽파 기내배양묘는 25℃, 60% 차광, 저면관수로 비닐터널에서 순화
 - 나) 유식물체 전체를 플러그트레이 이용 순화하는 것이 편리
 - 다) 순화 용토에 따른 생육차이는 없음

- 2) 무병종구 포장 생산성 시험
 - 가) 양액재배에 의한 종구생산시 17.5 × 15cm 이상의 재식밀도와 5개월 이상 재배하는 것이 유리함
 - 나) 종구 단기저장시 저장조건에 따른 신초 출현율 차이 없음.

2. 활용에 대한 건의

가. 15L 배양기의 실용화

- 쪽파 뿐 만이 아니라 영양번식 작물의 기내 대량배양계 생산연구

나. 무병 우량 쪽파 종구 생산 및 보급

- 무병 우량 종구 대량생산을 위한 지속적인 표준화 연구, 무병 우량 종구의 분양

SUMMARY

I. Title of the Project

Mass Production Technique of the Superior wakegi (*Allium wakegi*) by the Application of Bioreactor

II. Objectives of the Study

Wakegi is by using bulb propagation. However, when it is cultivated, because it's multiplication rate is very low, they need lots of seed bulb. In order to supply stable seed bulb, we need to establish technique of high quality seed production at field and mass culture system through bioreactor and acquirement method of in vitro shoots.

III. The Scope of the Study

A. Development of production technique for in vitro bulblet by using shoot tip culture.

- 1) Induce of multiple shoots and disease-free stocks
 - a) In vitro virus free inducement of wakegi.
 - b) Production condition establishment of virus free plant by anti-virus chemicals.
 - c) Effect of plant growth regulators on multiple shoot inducement
 - d) Effect of osmotic regulator on in vitro shoot vitrification of wakegi.

- 2) Rapid propagation of shoot tip and enlargement of in vitro bulb
 - a) Interaction of plant growth regulator and osmotic regulator on shoot propagation of wakegi.
 - b) Rapid propagation of multiple shoot and buds through suspension culture.
 - c) Effect of sucrose concentration and light condition on bulblet enlargement in wakegi.
 - e) Effect of agar and auxin concentration on bulblet enlargement.
 - f) Effect of growth retardants on bulblet inducement and bulb formation in wakegi.

- 3) Mass production of in vitro bulb
 - a) Study on optimal plant growth regulators and concentration for embryogenic callus induction in wakegi.
 - b) Rapid redifferentiation induction of shoot tip through embryogenic callus in wakegi.

B. Development of bioreactor system for mass production of wakegi plantlets

- 1) Development of the bioreactor with the economical efficiency
 - a) Development of 15 L liquid bioreactor
 - b) Investigation of the reducing method of the culture contamination (air, filtration)
 - c) Development of the air apparatus for air injection into the bioreactor from the culture system
 - d) Development of the air apparatus for air injection into the bioreactor from the compressor system
 - e) Development of the air apparatus for mass culture of wakegi plantlet

- 2) Development of the effective method for mass culture of the wakegi plantlet

in the 15 L bioreactor

- a) Development of the mass culture method of wakegi plantlets
- b) Plantlet formation from the wakegi primordium cultured in the 15 L bioreactor
- c) Mass culture of the wakegi primordium under the light irradiation
- d) Effect on the primordium growth of phytohormone
- e) Effect on the primordium growth of the air injection strength
- f) Chemical treatment for antivitrification

C. Field production technique of high quality seed bulb by using in vitro bulblet

- 1) Systematized technique of greenhouse and field culture for acclimatization and enlargement of in vitro bulblet.
 - a) Study on greenhouse culture condition for acclimatization of in vitro bulblet.
 - b) Establishment of growing seedling system and acclimatization process
- 2) Field performance test of virus free seed bulb
 - a) Field performance test of in vitro seed bulb cultured.
 - b) Comparison of emergence rate according to storage condition of seed bulb.

IV. Results and Possible Application of the Study

1. Results

A. Development of production technique for in vitro bulblet by using shoot tip culture.

- 1) Induce of multiple shoots and disease-free stocks

Multiple shoots induction was increased when grown in MS medium supplemented 2-ip concentration was increased. Shoot vitrification was suppressed by osmotic regulator as sorbitol, PEG(MW:8000), NaCl. Number of shoots were increased by PEG concentration was increased. Virus-free stock production was investigated when grown in MS medium supplement with 10mg/L ribavirin.

2) Mass production of multiple shoots and bulblet growth *in vitro*

Multiple shoot primordium formation were increased when grown in MS medium supplemented 3mg/L 2-ip, 0.2M sorbitol, and 3% PEG(MW:8000).

Bulblet formation from scale segments culture was more at the culture in MS medium supplemented with 9% sucrose, 0.9% gelite under 24h light illumination. Bulblet diameter was highest at cultured on MS medium supplemented with 100mg/L C.C.C.

3) Mass proliferation of bulb

Highest rates of somatic embryogenesis resulted from apical meristem cultured on MS medium supplemented with 0.5-1.0mg/L 2,4-D or picloram. Friable embryogenic callus were induced from apical meristem cultured on MS medium supplemented with picloram. Plantlet regeneration was obtained when friable embryogenic callus line #5 was transferred to MS medium supplemented with 1.0mg/L BA.

B. Development of bioreactor system for mass production of wakegi plantlets

1) Development of the bioreactor with the economical efficiency

a) Development of 15 L liquid bioreactor

- Development of the bioreactor attached an vent and sparger system prepared from the water bottle with a wide mouth

- Development of various spargers for the efficient air injection.
 - b) Investigation of the reducing method of the culture contamination (air, filtration)
 - Development of an apparatus of air cleanup and sparger attached membrane used for reducing contamination of bioreactor
 - c) Development of the air apparatus for air injection into the bioreactor from the culture system
 - Development of a cheap and efficient apparatus of air distribution to the culture set
 - d) Development of the air apparatus for air injection into the bioreactor from the compressor system
 - e) Development of the air apparatus for mass culture of wakegi plantlet
- 2) Development of the effective method for mass culture of the wakegi plantlet in the 15 L bioreactor
- a) Development of the mass culture method of wakegi plantlets
 - Establishment of liquid culture in 15 L bioreactor of wakegi primordia
 - b) Plantlet formation from the wakegi primordium cultured in the 15 L bioreactor
 - Observation of vigorous plantlet formation on agar medium of the wakegi primordia cultured in 15 L bioreactor
 - c) Mass culture of the wakegi primordium under the light irradiation
 - Investigation of the light irradiation effect on the wakegi growth
 - d) Effect on the primordium growth of phytohormone
 - Investigation of the phytohormone effect on the wakegi growth
 - e) Effect on the primordium growth of the air injection strength
 - f) Chemical treatment for antivitrification

C. Field production technique of high quality seed bulb by using in vitro bulblet

Wakegi was grown at plastic house to determine the effect of acclimatization of in vitro bulblet, technique systematization of greenhouse and field culture for bulb enlargement and performance test of virus-free seed bulb on the field production technique of high quality seed bulb by using in vitro bulblet. The grow and development of in vitro bulblet was very healthy at 25 °C, 60 % shade, and bottom watering in plastic tunnel culture. Whole plant is well on acclimitization by using plug tray. There was no difference according to bed soil. Over 17.5 cm × 15 cm planting density and over 5 months of culture was good on seed bulb production by using hydroponic culture. There was no difference on emergence rate of shoots according to storage condition in short storage of seed bulb.

2. Possible Application of the Study

- 1) Pratical application of the developed 15 L bioreactor
 - We will apply to this 15 L bioreactor for culture of other plants.

- 2) Production and supply of the virus free wakegi
 - We will produce the virus free wakegi plantlet and supply to farmer using the developed 15 L bioreactor and continuously improve the bioreactor system

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Chapter 1. Synopsis Of This Project | 15 |
| 1-1. Research objects | 15 |
| 1-2. Research necessity | 15 |
| 1-3. Research scope | 17 |
| Chapter 2. Domestic and Foreign Present Situation | 20 |
| 2-1. Domestic situation | 20 |
| 2-2. Foreign situation | 21 |
| 2-3. Future prospect | 21 |
| 2-4. Validity of the introduction of technology | 21 |
| Chapter 3. Contents and Results of This Project | 23 |
| 3-1. Development of production technique for in vitro bulblet by using shoot tip culture. | 23 |
| 3-2. Development of bioreactor system for mass production of wakegi plantlets | 44 |
| 3-3. Field production technique of high quality seed bulb by using in vitro bulblet | 58 |
| Chapter 4. Achievement of the Goals and Contribution to Related Fields | 69 |
| 4-1. Achievement of the goals | 69 |
| 4-2. Contribution to related fields | 70 |
| Chapter 5. Plans for Practical Application of the Research Results | 72 |
| Chapter 6. Foreign Science Technical Information Acquired during This Project | 73 |
| Chapter 7. References | 74 |

목 차

| | | |
|-------|------------------------------|----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 15 |
| 제 1 절 | 연구개발의 목적 | 15 |
| 제 2 절 | 연구개발의 필요성 | 15 |
| 제 3 절 | 연구개발의 범위 | 17 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 20 |
| 제 1 절 | 국내기술의 현황 | 20 |
| 제 2 절 | 외국기술의 현황 | 21 |
| 제 3 절 | 앞으로 전망 | 21 |
| 제 4 절 | 기술도입의 타당성 | 21 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | 23 |
| 제 1 절 | 순원기 배양을 통한 기내 자구 급속 증식 기술 개발 | 23 |
| 제 2 절 | 생물반응기에 의한 쪽과의 대량배양 시스템 개발 | 44 |
| 제 3 절 | 기내 자구를 이용한 우량종구 포장 생산기술 | 58 |
| 제 4 장 | 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 69 |
| 제 1 절 | 연구개발 목표의 달성도 | 69 |
| 제 2 절 | 관련분야에 기여도 | 70 |
| 제 5 장 | 연구개발결과의 활용계획 | 72 |
| 제 6 장 | 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 73 |
| 제 7 장 | 참고문헌 | 74 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

쪽파는 파(*A. fistulosum* L.)와 분구형 양파(*A. ascalonicum* L.)의 중간 교잡종 작물로서 종자 불임성 때문에 인경번식에 의존하는데 반하여 그 증식율이 대단히 낮을 뿐만 아니라 영농시 종구 소요량도 많아 과도한 영농비 투하요인이 되고 있어 종구의 안정적인 공급이 요구되고 있는 실정이다. 그러나 쪽파 우량종구의 안정적인 공급을 위한 대량증식체계에 관한 연구는 국내외를 막론하고 거의 전무한 형편이어서 기내 재분화 시스템의 확립, 효율적인 대량배양 시스템, 그리고 기내에서 생산된 자구를 이용하여 우량종구 포장생산기술이 필요하게 된다.

쪽파 우량종구를 안정적으로 대량공급하기 위해서는 조직배양기술이 매우 유용하게 사용될 수 있으며, 이를 위해서는 우선 기내 재분화 시스템이 확립되어야만 한다. 따라서 본 연구에서는 쪽파 순원기를 이용하여 다신초 형성에 효과적인 배양 조건과 기내 인경 비대 및 캘러스 유도를 통한 다신초 재분화 조건 등을 검토하였다.

조직배양기술에 의하여 경제성이 높은 영양번식 작물들의 기내(*in vitro*) 재분화시스템이 확립되면 산업화를 위해서는 저렴하면서도 효율적이고 안정적으로 대량생산을 할 수 있는 대량배양시스템이 필요하게 되는데, 이때 생물반응기(bioreactor)를 이용하여 대량 번식의 가능성 여부를 확인하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있으며 이를 위해서는 각종 배양기의 타입, 크기, 스파자의 종류 및 밴트시스템, 그리고 오염을 최소화하기 위한 여러 가지 방법 등이 조사되어야 한다. 또한 기내에서 생산된 종구를 이용하여 우량종구를 생산 보급하고자 할 경우에는 이에 알맞은 포장생산기술 역시 검토되어야만 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 가. 식물조직배양기술을 이용하면 불임으로 인하여 번식이 어려운 경제적으로 가치있는 작물들의 기내증식을 통하여 우량 종묘를 대량으로 단기간에 생산할 수 있다. 현재 감자, 마늘, 화훼류 등의 다양한 영양번식 작물들이 기내식물조직배양 기술로 우량 종묘가 대량으로 생산되고 있다.
- 나. 기내배양은 완전한 무균상태로 배양되기 때문에 병원균의 오염이나 기타 다른 불순물질들의 혼입을 최소화할 수 있어 우량 종묘나 종구를 생산하는데 있어서 최적 조건이라고 할 수 있다. 또한 대량배양의 경우 저렴하고 안정적으로 필요한 시기에 대량으로 생산이 가능하며 종묘나 종구의 생산표준화를 기할 수 있는 장점이 있다.
- 다. 쪽파는 독특한 향을 지니고 있어 다양한 요리에 부재료로 사용되고 있으며 봄철에는 일반 파가 굳어져 단경기가 될 때 수요가 증가하는 경향이 있는데 최근에는 파전등의 음식에 사용되는 등 그 수요량이 점차 확대되고 있다. 그러나 쪽파는 중간 교잡 작물로서 종자 불임성 때문에 인경번식에 의존하고 있어 그 증식율이 현저히 낮고 영양번식에 따른 바이러스 및 연작에 의한 재래종 쪽파의 특성이 점차 퇴화되어 품질과 생산성이 저하되고 있다. 쪽파는 10a당 120kg의 종구량이 소요되는데 현재까지 무병묘 기내 대량증식 방법이 확립되어 있지않아 우량종구의 공급이 수요를 따르지 못하고 있어 재배농민들의 과도한 영농비 투입의 주요한 원인이 되고 있는 실정이다.
- 라. 본 연구팀에서는 그 동안 생수물통을 개량하여 식물세포 및 조직을 대량배양할 수 있는 시스템을 개발하여 연구를 수행하여 왔으며, 자체적인 실험결과로는 실용화 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다. 본 시스템은 탱크를 이용한 배양기 시스템보다 설치비가 매우 저렴하고 실험실 수준에서의 대량배양연구에도 아주 적합하며, 가격이 저렴하기 때문에 과도한 투자비없이 시스템을 설치할 수 있어 안정적으로 우량종구의 생산과 공급이 가능하다. 또한 일반 농가에도 큰 부담 없이 본 시스템을 보급할 수 있어 기술적인 지원을 한다면 농민이 자체적으로 우량종구의 직접 생산도 가능할 것으로 기대된다. 우리나라의 식물조직배양기술과 생명공학기술은 세계적 수준에 근접하여 있기 때문에 지속적인 연구비의 투자와 함께 관련

분야 전문가들의 공동연구 수행을 통하여 성공적인 연구와 개발이 이루어져야만 앞으로 그 성장가능성이 무한한 세계의 생물산업시장에서 국제 경쟁력을 갖추게 될 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 순원기 배양을 통한 기내 자구 생산 기술 개발

가. 무병주 획득 및 순원기 유도

- 1) 무병주 쪽파의 기내 유도
- 2) 항바이러스 물질처리에 의한 무병주 생산 조건 구명
- 3) 다신초 유도에 미치는 성장조절제 처리효과
- 4) 삼투조절제가 기내 쪽파 신초의 투명화에 미치는 효과

나. 순원기 급속증식 및 기내자구 비대

- 1) 쪽파 신초 증식에 미치는 성장조절제와 삼투압조절제의 상호작용
- 2) 액체배양을 통한 다신초 및 다아체의 급속 증식
- 3) Sucrose 농도 및 광 조건이 쪽파 자구 비대에 미치는 영향
- 4) 한천 농도 및 오옥신이 쪽파 자구 비대에 미치는 영향
- 5) 생장억제제가 쪽파 다신초 clump의 자구 유도 및 구 형성에 미치는 영향

다. 기내 자구 대량생산

- 1) 쪽파의 체세포배 발생 캘러스 유도를 위한 적정 성장조절제 및 농도 구명
- 2) 쪽파 체세포배 캘러스 배양을 통한 급속 순원기 재분화 유도

2. 생물반응기에 의한 쪽파의 대량배양 시스템 개발

가. 경제성이 있는 생물반응기의 개발

- 1) 15리터용 액체배양용기의 개발
 - 효율적인 생물반응기의 선발 및 용기의 제작
- 2) 오염을 감소방법 연구(air filtration)
 - 공기 주입식 membrane filter의 적용
 - 공기정화 장치의 개발
- 3) 배양대로부터 배양용기에 주입할 공기의 배분 장치개발
- 4) 콤프레샤로부터 배양대에 주입할 공기의 배분 장치
 - 배양대에 따른 공기분배장치의 개발
 - 주입 공기압 조절장치의 개발
- 5) 대량배양을 위한 공기 주입장치의 개발
 - 무소음 공기 콤프레샤 적용
 - 공기정화 filter의 추가도입

나. 효율적인 쪽파의 대량배양방법 개발

- 1) 쪽파의 대량배양방법 개발
 - 개발된 15 L 배양기에서 액체배양 체계 확립
- 2) 생물반응기에서 증식된 순원기로부터 신초형성
 - 고체 및 액체 배지에서 신초형성 검토
- 3) 광조건에 따른 쪽파의 대량배양
 - 광의 유무에 따른 증식 및 성장율의 검토
- 4) 식물호르몬 처리에 의한 자구비대
 - 호르몬 처리에 의한 자구비대의 효과 검토
- 5) 공기주입량에 따른 종구증식 및 비대 효율
- 6) Antivitrification을 위한 chemical 처리

3. 기내 자구를 이용한 우량종구 포장 생산기술

가. 기내 자구의 순화 및 비대를 위한 온실 및 포장재배 기술 체계화

- 1) 기내자구 순화를 위한 온실 재배 조건 구명
- 2) 순화과정 육묘시스템 확립

나. 무병종구 포장 생산성 시험

- 1) 조직배양묘의 포장 생산력 검정
- 2) 종구 저장조건에 따른 출현율 비교

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술의 현황

가. 쪽파의 기내조직배양을 통한 대량증식체계에 관한 연구는 국내외를 막론하고 거의 전무실정이다. 최근 쪽파의 수요가 증가하면서 재배 면적도 확대되고 있으나 우량 종구의 수급문제가 심각해지면서 이에 대한 연구가 예산 축소쪽파를 대상으로 생산성 및 품질 향상을 목적으로 충남농업기술원 주관하에 지역농업 개발과제로 수행된 바 있다.

나. 조직배양에 의한 쪽파 대량증식 연구가 이루어지지 않아 관련기술도 확립되지 못한 실정이다. 양파의 경우 영양체를 증식시키는 방법으로 화구의 소화경을 절단한 후 화두에 착생하는 주아와 폐구 주위에 착생되는 자구등을 이용할 수 있으나 주아나 자구수가 적은 단점이 있어 조직배양에 의한 대량증식기술의 개발이 요구된다.

다. 현재까지 양파의 구 아래부분에 위치한 단축경과 화경의 선단에 형성되는 화구를 배양하여 대량증식이 가능하다는 보고와 엽원기 1~2매가 부착된 경정조직을 배양하여 식물체를 유도 시켰다는 보고들이 있으나 아직까지 대량배양을 통한 실용화에는 이르지 못하고 있다.

라. 마늘의 경우에는 동양물산에서 성장점으로부터 캘러스를 유도한 다음 여기서 다신초를 만들어 일부는 계대배양하고 나머지는 기내소구 씨마늘 생산에 이용하여 일부 상업화에 성공하였다. 또한 충남농업기술원에서 화기, 꽃받침 및 미숙주아가 포함된 총포를 이용하여 신초를 유도하고 이로부터 기내소구 씨마늘을 생산하는 총포배양법이 개발되었다.

제 2 절 외국기술의 현황

- 가. 일본 신닛본세이테쯔 주식회사에서는 생장점으로부터 미분화 신초덩어리를 유도하여 이것을 증식한 다음 다수의 신초를 만들어 저온에서 기내소구 씨마늘을 생산대량으로 생산하여 상용화하고 있다.
- 나. 식물조직배양을 통한 영양번식 작물들의 종묘 및 종구의 생산에 대한 연구는 우리나라에서도 식물조직배양기술과 생명공학기술이 세계적 수준에 근접하여 있는 실정으로 지속적인 연구비 투자가 이루어지면 국제적인 경쟁력을 갖추게 될 것이다.

제 3 절 앞으로 전망

- 가. 쪽파의 소비가 꾸준히 증가추세에 있으나 종구의 공급이 이를 바쳐주지 못하고 있어 앞으로 식물조직배양을 통한 우량종구의 대량생산이 성공적으로 이루어지게 된다면 농가의 새로운 소득작물로서 각광받게 될 것이며 이로 인해 다른 영양번식작물들의 우량 종묘 및 종구생산도 활성화 되게 될 것이다.
- 나. 우리나라의 재래종 쪽파는 현재 거의 수출실적이 없으나 독특한 향신채소를 선호하는 미국이나 유럽 등 해외에서도 각광받을 수 있는 채소로서 육종이 되고 우량종구가 대량 생산된다면 그 수출가능성은 무한하여 국부창출에도 기여할 것이다.

제 4 절 기술도입의 타당성

- 현재 대량배양을 통한 종묘의 대량생산을 위해서는 설치비가 많이 드는 단점이 있다. 그러나 본 연구에서 개발되는 대량배양 시스템은 가격이 저렴하고 효율적으로 식

물조직 및 세포를 배양할 수 있기 때문에 최적 배양조건 및 배양용기가 개발이 된다면 현재의 고가 장비 시장을 대체할 수 있으며, 일부는 본 시스템을 해외로 수출할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 순원기 배양을 통한 기내 자구 급속 증식 기술 개발

1. 서 언

쪽파는 파(*A. fistulosum* L.)와 분구형 양파(*A. ascalonicum* L.)의 중간 교잡종 작물로써 인경으로 번식되나 그 증식율은 대단히 낮다. 영양번식에 따라 shallot latent virus 등의 바이러스 감염이 문제가 되지만 수량 감소, 품질 저하 등 그 피해 정도는 확인되지 않고 있다. 또한 연작에 의한 재래 쪽파 특성이 점차 퇴화되고 품질과 생산성이 저하되고 있다.

쪽파는 10a당 120kg의 종구가 필요하여 과도한 영농비 투하요인이 되고 있지만 다른 작물과는 달리 아직까지 무병묘 기내 증식 등 우량종묘 생산 방법이 밝혀져 있지 않아 우량종구의 안정적 공급이 절실한 실정이다

양파의 경우 구 아래 부분에 위치한 단축경과 화경의 선단에 형성되는 화구를 배양하면 대량증식이 가능하며 엽원기 1~2매가 부착된 경정조직을 배양하여 식물체를 유도시켰다고 보고하였다(정 등 1997). 또 미성숙 배 배양을 통해 체세포 배발생 및 재분화시킨 연구 결과와(Eady & Lister 1998) 화기에서 직접 체세포 배를 유도하였음이 보고되었다(Luthar et al. 1999). 마늘에서는 경정에서 다신초를 유도(성 등 1996)하거나 미분화된 신초덩어리를 유도하여 증식한 다음 다수의 신초를 만들어 저온에서 기내소구 씨마늘을 생산하는 방법이 개발된 바 있으며, 국내에서도 경정에서 캘러스를 유도한 다음 여기서 다신초를 형성시켜 씨마늘을 생산하는 기술이 개발되었는데, 다신초 형성율이 매우 높고 배양기간도 짧아 생산성이 매우 높은 것으로 밝혀지고 있지만 포장 발아율 등 개선해야할 부분이 잔존하는 것으로 알려져 있다.

본 시험은 쪽파 무병주로부터 유도된 순원기를 공정 생산을 통해 급속 대량증식하는 공정을 개발하기 위한 연구의 일환으로 쪽파의 다신초 형성에 효과적인 배양 조건과 기내 인경 비대 및 캘러스 유도를 통한 다신초 재분화로 기내 인경 대량 생산에 관한 연구를 수행하였다.

2. 무병주 획득 및 순원기 유도

가. 재료 및 방법

1) 무병주 쪽과의 기내 유도

바이러스 무병성 우량묘를 대량 증식하기 위하여 쪽과의 기부를 실체현미경을 이용하여 정단분열조직을 0.1-0.2mm 크기로 절취하여 MS 기본배지(호르몬 무첨가, 3% sucrose, 0.3% Phytigel, pH 5.8)를 분주한 페트리디쉬에 치상하였다. 배양 용기당 10개의 성장점을 치상하였으며 배양환경은 23℃로 조절된 배양실에서 24시간 광조건하에서 배양하였다.

2) 항바이러스 물질 처리에 의한 무병주 생산 조건 구명

Ribavirin과 Amantadine과 같은 항바이러스 물질은 경정배양시 바이러스에 의한 감염을 억제 할 수 있는 물질로 알려져 있다. 이 중 항바이러스 물질로 널리 알려진 Ribavirin을 이용하여 쪽과 무병주 생산을 위한 항바이러스 물질로 이용하였으며 및 적정 농도 구명을 위하여 MS 배지(3% sucrose, 0.2M sorbitol, 2-ip 0.1mg/L, 0.3% phytigel 첨가)에 ribavirin을 5수준 (0, 5, 10, 20, 40mg/L)처리하여 쪽과의 생육에 미치는 영향과 무병주 형성정도를 조사하였다.

3) 다신초(multiple shoots) 유도에 미치는 성장조절제 처리효과

쪽과의 경정배양시 다신초 유도에 미치는 cytokine류 성장조절제 처리효과를 알아보았다. MS 기본배지(p-gel 0.3%, sucrose 2%를 첨가)에 2-ip(0.25, 0.5, 1, 2, 3mg/L)와 BA, TDZ(1, 3mg/L)를 첨가한 배지에 1-2 mm 크기로 절취한 쪽과의 경정을 치상하였다.

4) 삼투압조절제가 기내 쪽과 신초의 투명화에 미치는 효과

쪽과의 성장점 배양을 통해 유도에 된 신초는 기내 배양으로 과수화 되어 투명화 현상이 심하게 일어난다. 이런 현상은 기내 배양 신초의 생리, 형태적 변화를 일으켜 우량묘 생산에 문제가 된다. 따라서 삼투압조절제가 기내 배양 신초의 투명화 억제에 미치는 효과를 알아보려고 MS배지에 2-ip 1mg/L, phytigel 0.2%, sucrose 2%를 첨

가한 배지를 기본배지로 하고, sorbitol 4수준(0.1, 0.2, 0.3, 0.4M), PEG(MW 8000) 3수준(3, 6, 9%), NaCl 4수준(0.2, 0.4, 0.6, .09%)처리한 배지에 쪽과의 경정을 1-2mm 크기로 잘라서 치상하고 배양하며 유도된 싹들의 성장정도 및 투명화정도를 조사하였다. 투명화는 건물중 대 생체중의 비율을 비교함으로써 조사하였으며 형태적으로 캘러스의 형성 정도나 조직의 연화 및 투명화 정도를 가시적으로 판단하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 무병주 쪽과의 기내 유도

쪽과의 정단분열조직을 0.1-0.2mm 크기로 절취하여 MS 기본배지(호르몬 무첨가, 3% sucrose, 0.3% Phytigel, pH 5.8)를 분주한 페트리디쉬에 치상하였다. 배양체는 500개 이상을 치상하였으며, 25℃ 배양실에서 24시간 광조건으로 4-6주 배양하면 정상적인 기내 식물체로 발달하였다. 이들 식물체 일부를 상토에 식재하여 재배하며 기존의 조직배양을 하지 않은 식물과 생장을 비교하고 있으며, 또한 기내 무병 식물체들은 기내 급속증식 실험을 위한 재료로 이용하였다.

2) 항 바이러스 물질처리에 의한 무병주 생산 조건 구명

경제적인 쪽과 무병주 생산을 위한 적정 항바이러스 물질 및 농도 구명을 위한 실험결과 항바이러스 물질인 ribavirin을 고농도로 처리시 쪽과의 생육이 떨어지는 경향을 보였으나, 10mg/L 농도 처리시 싹수가 증가하고, 전반적으로 발근이 일어남을 확인 할 수 있었다(표 1).

표 1. Ribavirin이 쪽과 다싹초 생육에 미치는 영향

| Ribavirin (mg/L) | Number of shoots (ea) | Fresh weight (g) | Rooting (%) |
|---------------------|--------------------------|---------------------|----------------|
| 0 | 5.2 b | 0.34 abc | 42.8 |
| 5 | 8.9 a | 0.35 abc | 63.1 |
| 10 | 7.7 ab | 0.39 a | 47.3 |
| 20 | 5.7 ab | 0.30 bc | 47.6 |
| 40 | 3.5 b | 0.29 c | 15.2 |

2) 다신초(multiple shoots) 유도에 미치는 생장조절제 처리효과

MS 기본배지(phytagel 0.3%, sucrose 2%를 첨가)에 2-ip(0.25, 0.5, 1, 2, 3mg/L)와 BA, TDZ(1, 3mg/L)를 첨가한 배지에 1-2 mm 크기로 절취한 쪽과의 경정을 배양한 결과, BA와 TDZ의 경우 농도와 관계없이 신초수의 증가는 생장조절제를 첨가하지 않은 대조구와 차이가 없었다. 반면에 2-ip 처리구에서는 경정이 생장하며 비대한 기부로부터 다신초가 형성되었는데, 신초수 증가는 농도와 비례적으로 증가하여 3mg/L에서 신초수가 4주만에 평균 14개가 되었다(표 2).

기내 쪽과 배양시 묘의 투명화가 비교적 심하게 발생하는 것이 확인되었으며, 특히 생장조절제 농도가 증가할수록 심해지는 경향을 보였다.

표 2. 쪽과의 multiple shoots 유도에 미치는 생장조절제 처리효과

| Treatment | Number of shoots | Number of roots | Length of shoots(cm) | Diameter of bulb(cm) | Fresh weight(g) |
|---------------|------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| None | 2.0b | 3.0bcd | 9.08ab | 0.27d | 0.12c |
| 2-ip 0.25mg/L | 3.2b | 6.6a | 8.76abc | 0.37bcd | 0.25bc |
| 2-ip 0.5mg/L | 1.4b | 5.8ab | 9.98a | 0.26d | 0.12c |
| 2-ip 1mg/L | 6.2b | 5.4abc | 9.96a | 0.44bcd | 0.59ab |
| 2-ip 2mg/L | 6.2b | 4.8abc | 6.98bcd | 0.45bcd | 0.30bc |
| 2-ip 3mg/L | 14.0a | 2.2dc | 6.12cde | 0.74a | 0.80a |
| BA 1mg/L | 2.6b | 0.0d | 6.06cde | 0.30cd | 0.09c |
| BA 3mg/L | 2.2b | 0.0d | 3.54ef | 0.50a-d | 0.33bc |
| TDZ 1mg/L | 4.4b | 1.0d | 4.28def | 0.56ab | 0.31bc |
| TDZ 3mg/L | 2.2b | 0.8d | 3.04f | 0.53abc | 0.28bc |

3) 삼투압조절제가 기내 쪽과 신초의 투명화에 미치는 효과

삼투압조절제가 기내 배양 신초의 투명화 억제에 미치는 효과를 알아보하고자 MS배

지에 2-ip 1mg/L, phytigel 0.2%, sucrose 2%를 첨가한 배지를 기본배지로 하고, sorbitol 4수준(0.1, 0.2, 0.3, 0.4M), PEG 3수준(3, 6, 9%), NaCl 4수준(0.2, 0.4, 0.6, 0.9%)으로 처리한 배지에 쪽과의 경정을 1-2mm 크기로 잘라서 치상하고 배양하며 유도된 싹들의 생장정도 및 투명화 정도를 조사하였다. 투명화는 건물중 대 생체중의 비율을 비교함으로써 조사하였으며, 형태적으로 캘러스의 형성 정도나 조직의 연화 및 투명화 정도를 가시적으로 판단하였다.

삼투압조절제 처리 종류에 따라 기내식물의 생장은 크게 달라져 sorbitol의 경우 농도가 증가함에 따라 식물체 생장이 억제되는 반면에 투명화는 덜 일어나는 경향을 보였다. 생장이 억제되어 초장이 감소한 식물들은 기부가 더 비대하여 자구형성이 촉진되었다. PEG와 NaCl의 경우 처리에 따른 투명화의 억제나 식물의 생장억제 현상은 덜 뚜렷하였다. 투명화 억제와 달리 PEG의 경우에는 싹의 증가를 촉진하는 경향을 보여 PEG를 첨가하지 대조구에 비해 4배 이상의 다싹수가 증가하는 결과를 보여 주었다(표 3).

표 3. 삼투압조절제가 기내 쪽과경정배양시 싹수 증가 및 생장에 미치는 효과.

| Treatment | Number of shoots | Number of roots | Length of shoots(cm) | Diameter of bulb(cm) | Fresh weight(g) |
|---------------|------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| control | 4.3d | 6.0a | 10.26abc | 0.50bc | 0.42def |
| sorbitol 0.1M | 3.3d | 5.6a | 12.81a | 0.38cd | 0.40def |
| sorbitol 0.2M | 9.0bcd | 6.5a | 8.21b-e | 0.51bc | 0.54cde |
| sorbitol 0.3M | 2.1d | 6.3a | 10.98ab | 0.51bc | 0.38def |
| sorbitol 0.4M | 2.1d | 3.0abc | 5.73efg | 0.50bc | 0.21ef |
| PEG 3% | 13.5abc | 3.8ab | 6.91d-g | 0.63ab | 1.01ab |
| PEG 6% | 16.8ab | 3.5abc | 3.66hg | 0.72ab | 0.93abc |
| PEG 9% | 19.16a | 3.0abc | 4.0fgh | 0.65ab | 0.77a-d |
| NaCl 0.2% | 6.0cd | 1.6bc | 7.01c-f | 0.65ab | 1.14a |
| NaCl 0.4% | 5.8cd | 5.3a | 8.55b-e | 0.66ab | 0.69bcd |
| NaCl 0.8% | 2.1d | 3.0abc | 9.53a-d | 0.76a | 0.72bcd |
| NaCl 1.6% | 1.0d | 0.0c | 1.05a | 0.15d | 0.01f |

* 배지: MS기본배지에 2-ip 3mg/L 첨가

3. 순원기 급속증식 및 기내인경 비대

가. 재료 및 방법

1) 쪽과 신초 증식에 미치는 성장조절제와 삼투압조절제의 상호작용

다신초 증식 실험결과 성장조절제 처리와 관련하여 투명화를 억제하기 위해 첨가한 삼투압조절제가 신초 증식에 길항적 작용을 하는 것이 예비실험 결과 확인되었다. 이들의 상호작용 효과를 구체적으로 구명하기 위하여 MS 기본배지에 2-ip를 첨가하고 여기에 sorbitol(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6M)과 PEG(MW 8000)(0, 1, 2, 3, 6, 9%)를 조합 처리하여 투명화를 억제하고 신초증식에 효과적인 처리 조건을 규명하였다.

2) 액체배양을 통한 다신초 및 다아체의 급속 증식

MS 기본배지에 2-ip(0, 0.3, 1.0, 3mg/L), sorbitol(0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4M), PEG (0, 1, 3, 5%)를 각각 처리한 액체배지를 250 ml flask에 10ml씩 분주하고 다신초 형성배지(MS 기본배지, 3 mg/L 2-ip, 0.2M sorbitol, 3% PEG, Phytigel 0.3%, 3% sucrose, pH 5.8)에서 3주간 배양하여 다신초 형성이 확인된 기내 쪽과의 기부를 5mm 크기로 잘라서 flask 당 5개씩을 넣어 진탕회전배양(110 rpm)하며 배양체 형태, 생체중, 캘러스, 뿌리 발생, 다아체 증식 정도 및 재분화시의 투명화 정도를 조사하고자 하였다.

3) Sucrose 농도 및 광 조건이 쪽과 자구 비대에 미치는 영향

쪽과 다신초로부터 신초의 성장 및 자구 비대 미치는 sucrose 농도 및 광의 효과를 알아보았다. MS 배지에 NAA 0.1mg/L, 0.2M sorbitol, 0.3% phytigel을 첨가한 기본배지에 sucrose를 4가지 농도(3, 6, 9, 12%)로 처리하였고, 쪽과 다신초를 3~4개씩 분할하여 치상하였다. 24시간 명 또는 암조건에서 배양하며 자구비대에 미치는 sucrose와 광 조건의 영향을 조사하였다.

옥신의 종류 및 농도효과를 조사하기 위하여 MS 기본배지 (9% sucrose, 0.2M sorbitol, 2-ip 0.1mg/L, 0.3% p-gel 첨가)에 NAA와 IAA를 각각 0.5, 1.0mg/L 첨가한 배지에 다신초 유도된 쪽과의 순원기를 3 ~ 4개의 신초로 분할하여 치상하였다.

4) 한천 농도 및 옥신이 쪽과 자구 비대에 미치는 영향

다신초에서 유래된 자구의 비대와 기내자구의 투명화를 억제하기 위한 한천 농도를 알아보았다. MS 배지(9% sucrose, 0.2M sorbitol, 2-ip 0.1mg/L 첨가)에 NAA와 IAA를 각 0.5mg/L 첨가하고 한천은 0.3, 0.6, 0.9% 로 처리하여 기내 자구의 구 비대 및 투명화 정도를 조사하였다.

5) 생장억제제가 쪽과 다신초 clump의 자구 유도 및 구 형성에 미치는 영향

쪽과의 기내 유도된 순원기로부터 기내 자구생산 효율을 높이기 위해 식물생장억제제 종류 및 농도가 배양환경에 따라 쪽과 순원기의 자구 유도 및 구형성에 미치는 영향을 조사하였다. MS배지에 9% sucrose, 3% PEG, 0.2M sorbitol, 0.1mg/L NAA, 0.3% phytigel을 첨가한 기본배지에, 쪽과 다신초를 3~4개씩 분할하여 치상하였다. MS 액체 배지에 식물생장억제제 C.C.C. 와 ABA를 각 3수준 (1.0, 10, 100mg/L와 0.05, 0.1, 1.0mg/L) 처리하였고, box당 10ml씩 3주 간격으로 3회 분주하였다. 24시간 명 또는 암조건에서 배양하며 자구비대에 미치는 식물생장억제제 종류와 농도의 영향을 조사하였다. 배양 9주 후 쪽과 clump의 초장 및 구직경, 생체중 등을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 쪽과 신초 증식에 미치는 생장조절제와 삼투압조절제의 상호작용

위의 다신초 증식 실험 과정에서 투명화를 억제하기 위해 첨가한 삼투압조절제가 신초 증식에 길항적 작용을 하는 것이 확인되었기 때문에 이들의 상호작용 효과를 구체적으로 구명하기 위하여 MS 기본배지에 2-ip를 첨가하고 여기에 sorbitol(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6M)과 PEG(MW 8000)(0, 1, 2, 3, 6, 9%)를 조합처리하여 투명화를 억제하고 신초증식에 효과적인 처리 조건을 규명하고자 하였다(표4).

표 4. 삼투압조절제가 기내 쪽과경정배양시 투명화 억제, 신초수 증가 및 생장에 미치는 효과.

| Treatment | | Number of shoots | Length of shoots(cm) | Dry weight(A) (g) | Fresh weight(B) (g) | B/A |
|--------------|---------|------------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------|
| sorbitol (M) | PEG (%) | | | | | |
| 0 | 0 | 13.0ab | 9.0ab | 0.083ab | 1.175a | 14.13 |
| 0 | 3 | 16.5a | 6.7a-d | 0.058abc | 0.720abc | 12.50 |
| 0 | 6 | 14.5ab | 9.4a | 0.061abc | 0.462bc | 7.54 |
| 0 | 9 | 12.2ab | 9.0ab | 0.041bc | 0.284bc | 6.86 |
| 0.2 | 0 | 11.3ab | 8.5abc | 0.099a | 0.829abb | 8.41 |
| 0.2 | 3 | 13.8ab | 5.5cde | 0.068abc | 0.397bc | 5.87 |
| 0.2 | 6 | 9.6ab | 6.1b-e | 0.040bc | 0.173c | 4.38 |
| 0.2 | 9 | 5.4ab | 3.3ef | 0.030bc | 0.117c | 3.87 |
| 0.4 | 0 | 4.0b | 3.7def | 0.061abc | 0.291bc | 4.79 |
| 0.4 | 3 | 1.3b | 2.2f | 0.034bc | 0.126c | 3.76 |
| 0.4 | 6 | 1.0b | 2.3f | 0.036bc | 0.127c | 3.58 |
| 0.4 | 9 | 1.1b | 1.5f | 0.029c | 0.096c | 3.32 |
| 0.6 | 0 | 1.0b | 2.0f | 0.060abc | 0.256c | 4.27 |
| 0.6 | 3 | 1.0b | 1.9f | 0.053abc | 0.171c | 3.23 |
| 0.6 | 6 | 1.0b | 2.1f | 0.025c | 0.074c | 3.04 |
| 0.6 | 9 | 1.0b | 1.7f | 0.020c | 0.070c | 3.42 |

* 배지: MS기본배지에 2-ip 3mg/L 첨가

Sorbitol의 경우 0.2M 첨가시 초장이 감소한 반면에 뿌리와 신초수가 증가하는 경향을 보였으며, 생체중도 다른 처리에 비해 증가하는 것이 확인되었다. PEG의 경우에는 3, 6, 9% 농도 모두에서 대조구에 비해 생체중이 3-4배 증가하였으나 농도간에 유

의차는 확인되지 않은 반면에 초장 신장 억제가 가장 덜하여 3% 농도가 적정함을 확인하였다(그림 1, 2). NaCl의 경우도 신초수의 증가에 영향을 미치지만 통계적 유의차는 확인되지 않았고, 오히려 고농도에서는 초장 신장을 크게 억제하고 있는 것으로 밝혀졌다.



그림 1. 기내 유도된 쪽파 다신초.(배지: MS + 3mg/L 2-ip, 0.2M sorbitol, 3% PEG)



그림 2. PEG 농도에 따른 신초 증가. 왼쪽부터 PEG의 농도: 0, 3, 6, 9%.(배지 : MS + 3mg/L 2-ip, 0.2M sorbitol)

2) 액체배양을 통한 다신초 및 다아체의 급속 증식

기내 다신초 급속증식 조건이 밝혀짐에 따라 이들 다신초를 액체진탕배양하며 다신초 내지는 다아체를 대량급속증식하는 방법을 개발하고자 하였으며, 이를 대규모 배양을 위한 생물반응기배양에 활용하고자 하였다.

MS 기본배지에 2-ip(0, 0.3, 1.0, 3mg/L), sorbitol(0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4M), PEG (0, 1, 3, 5%)를 각각 처리한 액체배지를 250 ml flask에 10ml씩 분주하고 다신초 형성배지(MS 기본배지, 3 mg/L 2-ip, 0.2M sorbitol, 3% PEG, Phytigel 0.3%, 3% sucrose, pH 5.8)에서 3주간 배양하여 다신초 형성이 확인된 기내 쪽과의 기부를 5mm 크기로 잘라서 flask 당 5개씩을 넣어 진탕회전배양(110 rpm)하며 다아체 증식 정도를 시험하였다. 2-ip를 3mg/L, 그리고 성장조절제로서 sorbitol을 0.2M, PEG8000을 3% 첨가한 액체진탕배양 실험에서 다신초가 2주에 2배정도 급속증식하는 것이 확인되었으나, 투명화 정도가 일부 나타나 액체배양의 최적화가 반드시 필요함을 확인하였다.

3) Sucrose 농도 및 광 조건이 쪽과 자구 비대에 미치는 영향

쪽과의 자구 비대를 위한 sucrose 농도 및 광 조건 구명을 위한 실험에서 sucrose 농도에 따라 자구의 생육에 현저히 차이가 있었다. 자구의 비대는 sucrose의 농도와 광 환경의 교호작용에 의하여 영향을 받으며, 9% sucrose 첨가된 배지에 치상한 쪽과의 분얼체를 24시간 명배양하는 것이 자구의 비대에 효과적임을 알 수 있었다(표 5). 9% sucrose 첨가된 배지에서 8주간 배양시 우량한 형태의 자구가 형성됨을 확인 할 수 있었다(그림 3).

Sucrose 농도에 따른 기내 쪽과의 생육 특성은 3% sucrose 처리시 신초수, 초장, 생체중이 각 15.28개, 35.0mm, 1.31g 으로 다른 농도 처리구에 비해 현저히 증가하였다(표 6).

표 5. Sucrose 농도 및 광 조건이 쪽파 자구 비대에 미치는 영향

| | Sucrose (%) | Number of shoots (ea) | Length of shoot (mm) | Fresh weight (g) | Diameter of bulb (mm) | Rooting (%) |
|-------------------|-------------|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-------------|
| Light | 3 | 15.7 | 32.2 | 1.4 | 3.6 | 59.2 |
| | 6 | 10.6 | 26.2 | 1.1 | 3.8 | 37.0 |
| | 9 | 7.3 | 20.4 | 0.8 | 4.0 | 22.2 |
| | 12 | 4.7 | 13.9 | 0.5 | 3.3 | 7.4 |
| Average | | 9.57 b | 22.51 a | 0.95 a | 3.67 a | |
| Dark | 3 | 14.9 | 38.4 | 1.2 | 3.1 | 76.9 |
| | 6 | 10.8 | 23.6 | 0.8 | 3.2 | 30.7 |
| | 9 | 9.6 | 17.8 | 0.7 | 3.4 | 62.9 |
| | 12 | 11.3 | 16.3 | 0.6 | 3.7 | 40.7 |
| Average | | 11.65 a | 23.45 a | 0.82 a | 3.35 b | |
| LSD | | 3.10 | 6.84 | 0.31 | 0.29 | |
| Light (L) | | * | ns | ns | ** | |
| Concentration (C) | | ** | ** | ** | ns | |
| L x C | | * | ns | ns | ** | |

ns, *,** Nonsignificant and significant at P = 0.05 or 0.01, respectively.



그림 3. 쪽파의 자구비대용 배지(MS 9% sucrose, NAA 0.1mg/L, sorbitol 0.2M, 0.3% phytigel)에서 8주간 배양된 쪽파의 모습

표 6. Sucrose 농도에 따른 기내 쪽과 비대의 생육 특성

| Sucrose (%) | Number of shoots (ea) | Length of shoot (mm) | Fresh weight (g) | Diameter of bulb (mm) |
|-------------|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------------|
| 3 | 15.28 a | 35.0 a | 1.31 a | 3.35 b |
| 6 | 10.66 b | 24.3 b | 0.94 b | 3.50 ab |
| 9 | 8.46 bc | 18.3 c | 0.73 bc | 3.73 a |
| 12 | 8.05 c | 14.3 c | 0.56 c | 3.48 b |

4) 한천 농도 및 옥신이 쪽과 자구 비대에 미치는 영향

쪽과 자구 비대에 미치는 한천 농도 및 옥신의 효과는 교호작용에 의한 효과 보다 한천농도에 의한 단일 효과가 있음을 확인하였다(표 7). 한천농도에 의한 쪽과 자구의 비대는 0.9% 한천을 첨가한 배지에서 자구직경 3.8mm로 가장 우수하였다(표 8).

5) 옥신 및 광 환경에 따른 쪽과의 자구 비대 조건 구명

쪽과의 자구 비대에 미치는 광 조건은 암배양시 명배양에 비해 쪽과의 신초수가 많고 초장이 길어 유의차가 인정되었으나, 자구 비대 및 생체중 증가에는 차이가 없었다(표 9).

자구 비대는 광조건에 영향을 받지 않고 옥신과 옥신 농도의 교호작용에 의해 영향을 받았는데(표 9) IAA보다는 NAA가 효과적이었고, 광조건에 관계없이 sucrose 9% 첨가된 배지에 NAA 0.5mg/L 처리시 자구 직경 가장 큰 경향이였다(표 9, 표 10).

6) 생장억제제가 쪽과 다신초 clump의 자구 유도 및 구 형성에 미치는 영향

생장 억제제가 쪽과 다신초 clump의 자구 유도 및 구 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, 신초수는 광조건보다 식물 생장억제제 종류에 영향을 받았으나, 초장은 생장 억제제보다 광조건에 따른 영향이 커 암배양시 35.4mm로 명배양시 27.4mm 보다 초장이 길었다. 그리고 다신초 clump의 생체중은 식물생장억제제와 농도에 의한 교호작용이 있음을 확인하였다(표 11).

표 7. 한천 농도 및 옥신이 쪽파 자구비대에 미치는 영향

| Auxin (mg/L) | Conc. of agar (%) | Number of shoots (ea) | Length of shoot (mm) | Fresh weight (g) | Diameter of bulb (mm) | Rooting (%) |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-------------|
| NAA 0.5 | 0.3 | 11.9 | 18.3 | 0.52 | 2.73 | 14.8 |
| | 0.6 | 12.0 | 16.3 | 0.45 | 2.82 | 14.8 |
| | 0.9 | 11.1 | 13.2 | 0.41 | 3.66 | 19.4 |
| Average | | 11.62 a | 15.63 a | 0.46 a | 2.93 a | |
| IAA 0.5 | 0.3 | 8.4 | 12.9 | 0.34 | 2.73 | 18.5 |
| | 0.6 | 12.3 | 12.5 | 0.39 | 2.80 | 25.9 |
| | 0.9 | 14.2 | 14.7 | 0.46 | 3.53 | 19.4 |
| Average | | 11.60 a | 12.43 b | 0.39 a | 3.02 a | |
| LSD | | 2.91 | 2.96 | 0.09 | 0.68 | |
| Auxin (A) | | ns | * | ns | ns | |
| Concentration of Agar(C) | | ns | ns | ns | * | |
| A x C | | ns | ns | ns | ns | |

ns, *,** Nonsignificant and significant at P = 0.05 or 0.01, respectively.

표 8. 한천 농도가 기내 쪽파 자구의 비대에 미치는 영향

| Concentration of agar(%) | Diameter of bulb(mm) |
|--------------------------|----------------------|
| 0.3 | 2.52 b |
| 0.6 | 2.81 b |
| 0.9 | 3.61 a |

표 9. 옥신 및 광 환경에 따른 쪽파의 자구 비대

| Light | Auxin (mg/L) | Number of shoots (ea) | Length of shoot (mm) | Fresh weight (g) | Diameter of bulb (mm) | Rooting (%) | |
|-------------------|--------------|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-------------|------|
| Light | NAA | 0.5 | 7.1 | 14.6 | 0.4 | 3.3 | 25.9 |
| | | 1.0 | 5.6 | 15.4 | 0.3 | 2.8 | 11.1 |
| | IAA | 0.5 | 6.1 | 11.2 | 0.4 | 2.9 | 5.5 |
| | | 1.0 | 6.4 | 12.5 | 0.5 | 2.9 | 7.4 |
| | Average | | 6.29 b | 12.72 b | 0.38 a | 2.96 a | |
| Dark | NAA | 0.5 | 9.2 | 24.5 | 0.4 | 3.6 | 40.7 |
| | | 1.0 | 10.2 | 31.7 | 0.6 | 3.0 | 19.2 |
| | IAA | 0.5 | 8.4 | 27.1 | 0.4 | 2.7 | 25.9 |
| | | 1.0 | 10.5 | 26.8 | 0.6 | 2.9 | 3.7 |
| | Average | | 9.54 a | 26.74 a | 0.50 a | 3.05 a | |
| LSD | | 3.26 | 5.33 | 0.22 | 0.43 | | |
| Light (L) | | ** | ** | ns | ns | | |
| Auxin (A) | | ns | ns | ns | * | | |
| Concentration (C) | | ns | ns | ns | * | | |
| L x A | | ns | ns | ns | ns | | |
| A x C | | ns | ns | ns | ** | | |
| L x C | | ns | ns | ns | ns | | |
| L x A x C | | ns | ns | ns | ns | | |

ns, *,** Nonsignificant and significant at P = 0.05 or 0.01, respectively.

표 10. 옥신 및 농도에 따른 기내 쪽파의 자구 비대에 미치는 영향

| Auxin (mg/L) | Diameter of bulb(mm) | |
|--------------|----------------------|---------|
| NAA | 0.5 | 3.32 a |
| | 1.0 | 2.97 ab |
| IAA | 0.5 | 2.76 b |
| | 1.0 | 2.98 ab |

표 11. 생장억제제 및 광 환경이 쪽과 clump의 자구형성 및 구 비대에 미치는 영향

| Light | PGR ^Z (mg/L) | Number of shoots (ea) | Length of shoot (mm) | Fresh weight (g) | Diameter of bulb (mm) | |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|--------|
| Light | C.C.C. | 1 | 17.0 | 30.0 | 0.8 | 2.6 |
| | | 10 | 14.3 | 27.7 | 1.1 | 3.2 |
| | | 100 | 16.7 | 27.2 | 1.4 | 3.2 |
| | ABA | 0.05 | 15.0 | 30.0 | 1.0 | 2.2 |
| | | 0.1 | 10.5 | 26.0 | 1.0 | 2.6 |
| | | 1.0 | 9.4 | 24.1 | 0.9 | 2.6 |
| | Average | | 13.82 a | 27.47 b | 1.01 a | 2.75 a |
| Dark | C.C.C. | 1 | 15.1 | 36.2 | 0.8 | 2.9 |
| | | 10 | 17.2 | 33.3 | 1.0 | 3.1 |
| | | 100 | 16.4 | 40.8 | 1.2 | 3.6 |
| | ABA | 0.05 | 11.3 | 33.3 | 0.8 | 2.9 |
| | | 0.1 | 11.4 | 33.0 | 1.0 | 2.9 |
| | | 1.0 | 9.5 | 36.0 | 0.8 | 2.9 |
| | Average | | 13.50 a | 35.43 a | 0.94 a | 3.07 a |
| LSD | | 1.63 | 2.90 | 0.12 | 0.36 | |
| Light (L) | | ns | ** | ns | ns | |
| PGR (A) | | ** | ns | * | * | |
| Concentration (C) | | ns | ns | * | ns | |
| L x P | | ns | ns | ns | ns | |
| L x C | | ns | ns | ns | ns | |
| P x C | | ns | ns | * | ns | |
| L x P x C | | ns | ns | ns | ns | |

^Z plant growth retardant

ns, *,** Nonsignificant and significant at P = 0.05 or 0.01, respectively.

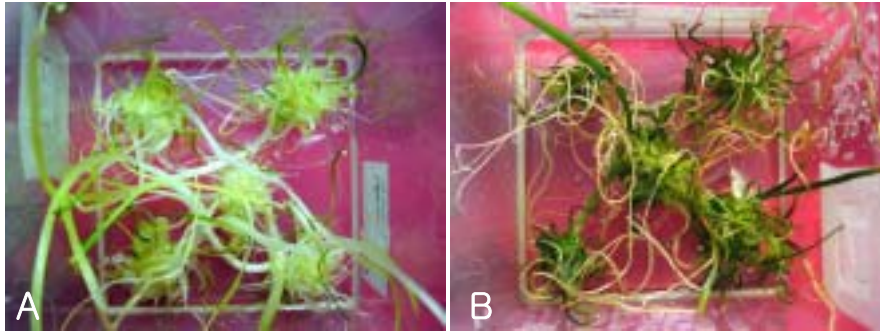


그림 4. 생장억제제 3차 처리 이후 3주 배양한 쪽파 clump의 구형성 및 비대된 모습
(A: C.C.C. 100mg/L, 암 배양, B: C.C.C. 100mg/L, 24시간 명 배양)

쪽파 clump의 자구 비대에 미치는 식물생장억제제의 영향은 C.C.C. 100mg/L 처리 시 자구직경 3.43mm로 다른 처리구에 비해 가장 우수하였다. ABA는 처리 농도의 증가에도 불구하고 쪽파 다신초의 자구 비대에 영향이 없었다(표 12). 이는 마늘의 기내 종구 생산에 처리한 결과와 동일한 결과를 나타내었다.

표 12. 생장억제제 종류 및 농도에 따른 기내 쪽파의 자구 비대에 미치는 영향

| PGR ^Z (mg/L) | | Diameter of bulb(mm) |
|-------------------------|------|----------------------|
| C.C.C. | 1 | 2.75 b |
| | 10 | 3.16 ab |
| | 100 | 3.43 a |
| ABA | 0.05 | 2.58 b |
| | 0.1 | 2.78 b |
| | 1.0 | 2.76 b |

^Zplant growth retardant

4. 기내 인경 대량생산

가. 재료 및 방법

1) 쪽파의 체세포배 발생 캘러스 유도를 위한 적정 성장조절제 및 농도 구명

쪽파의 기내 급속 대량 생산을 위한 체세포배 캘러스유도를 위하여 2,4-D, picloram, dicamba를 MS 기본배지에 각각 0.25, 0.5, 1.0, 2.0mg/L 첨가하고, 쪽파의 성장점 부위를 약 3mm 크기로 잘라 치상하였다. 각 처리별 callus 유도율, 배발생 캘러스 유도율 및 식물체 재분화 정도를 조사하였다.

2) 쪽파 체세포배 캘러스 배양을 통한 급속 순원기 재분화 유도

쪽파 성장점에서 유도된 체세포배 캘러스로부터 급속 대량 쪽파 순원기 유도에 미치는 cytokine 종류 및 농도의 효과와 체세포배 캘러스 라인별 재분화 능력을 조사하였다. MS배지에 3% PEG(MW 8000), 0.2M sorbitol, 3% sucrose, 0.5% phytigel을 첨가한 배지에 BA와 2-ip를 각 3가지 농도(0.1, 0.5, 1.0mg/L)로 처리하였다.

체세포 배 발생 캘러스는 MS 배지에 2,4-D 또는 picloram이 각 0.5mg/L 첨가된 배지에서 유래되었으며, auxin에 따라 달리 유도된 캘러스는 각각 동일한 농도의 auxin이 첨가된 MS 액체 배지에서 진탕배양하였다. 진탕배양 3주후 auxin의 농도를 0.1mg/L로 낮추고 2주 간격으로 4회 계대배양하였다.

각 체세포배 캘러스 cell 라인은 MS 액체 배지에 1주일간 pre-culture 후 캘러스 덩어리를 메스로 잘게 썰어(Ø1~2mm), 약 10ml을 배지에 분주하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 쪽파의 체세포배 발생 캘러스 유도 위한 적정 성장조절제 및 농도 구명

쪽파의 기내 급속 대량 생산을 위한 체세포배 캘러스유도를 위하여 2,4-D, picloram, dicamba를 MS 기본배지에 첨가하고, 쪽파의 체세포배 발생 캘러스 유도 정도를 조사하였다(표 13). 2,4-D와 picloram 처리구에서 5주간 배양시 성장점의 저반 부내에 캘러스가 증가하여 비대해 짐을 관찰할 수 있었으며, 이를 적출하여 동일한

배지에 계대배양하여 현미경으로 관찰한 결과 2,4-D 와 picloram 유래 캘러스의 형태적 차이가 있었다(그림 5. A, B, C, D).

2,4-D 유래 캘러스는 작고 조밀한 형태(그림 5. B, D)를 나타내었고, 이에 반해 picloram 유래 캘러스는 크고 단단한 형태를 나타내었다. 캘러스 유도는 2,4-D 와 picloram 모두 0.5mg/L이상에서 형성되었으며, 1.0mg/L에서 캘러스 유도가 잘되었다. 2,4-D 와 picloram에서 유도된 캘러스는 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 재분화를 유도하였으며(그림 5. E, F), 신초가 발생하는 것을 관찰함으로써 쪽과의 대량증식을 위한 체세포배 발생 callus가 유도됨을 확인하였다.

추후 체세포배 발생 캘러스 증식을 위한 배지 선발 및 효율적인 재분화율을 높이기 위한 적정 계대배양 시기와 배지에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

표 13. 쪽과 체세포 배 발생 callus 유도 위한 생장조절제 선발

| PGR (mg/L) | Callus weight per petridish (g) | Rating of induction callus (%) | |
|------------|---------------------------------|--------------------------------|------|
| 2,4-D | 0.25 | 1.05 b | 23.3 |
| | 0.5 | 2.09 a | 67.5 |
| | 1.0 | 1.93 a | 100 |
| | 2.0 | 1.68 a | 95.8 |
| Picloram | 0.25 | 0.96 b | 88.9 |
| | 0.5 | 1.77 a | 66.7 |
| | 1.0 | 1.84 a | 85.7 |
| | 2.0 | 2.01 a | 95.2 |
| Dicamba | 0.25 | 0 c | 0 |
| | 0.5 | 0 c | 0 |
| | 1.0 | 0 c | 0 |
| | 2.0 | 0 c | 0 |

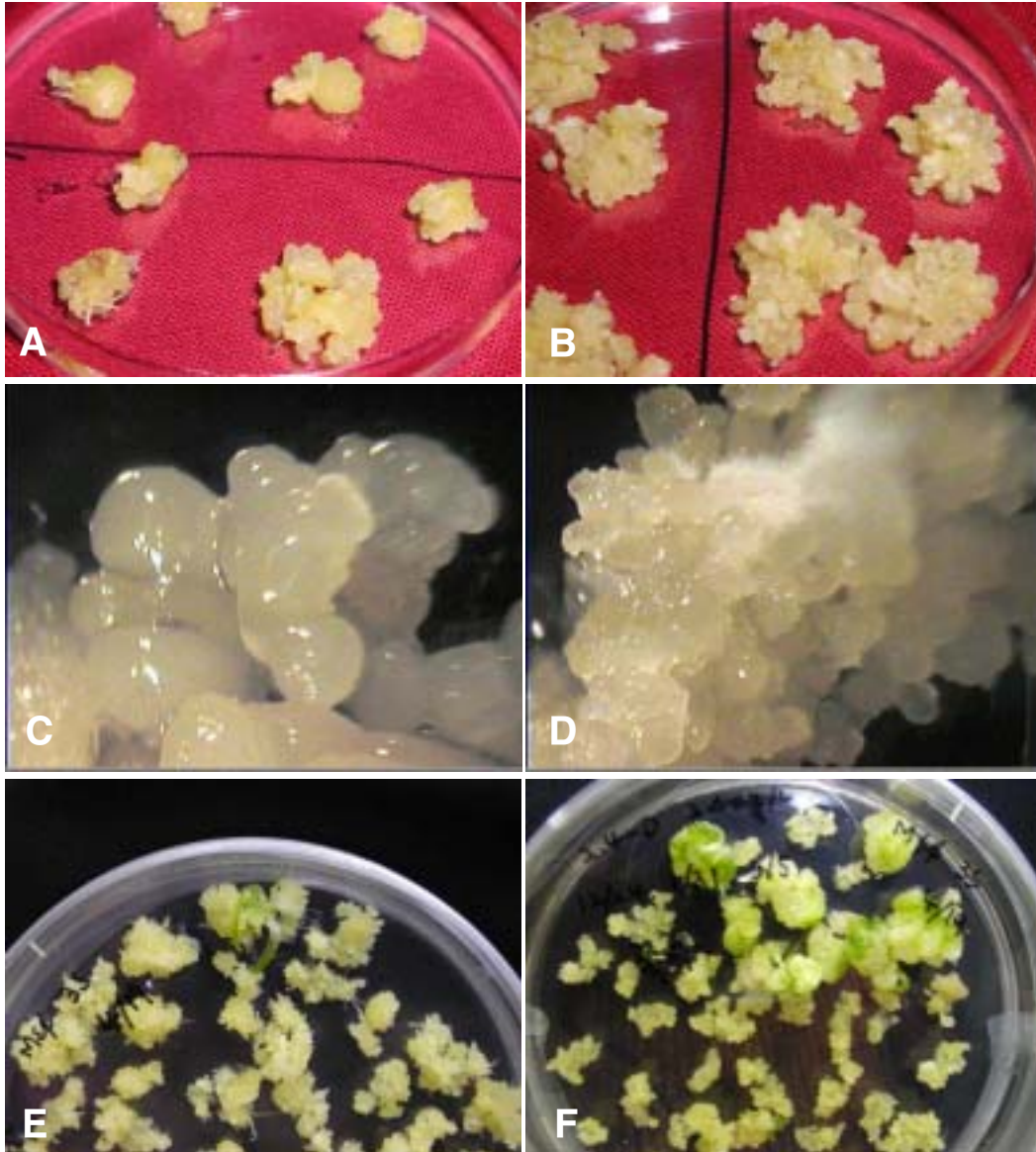


그림 5. 성장조절제에 따른 쪽파의 다양한 형태의 callus 유도과 재분화(A: picloram 1.0mg/L 처리, B: 2,4-D 1.0mg/L 처리, C: picloram 1.0mg/L 처리, D: 2,4-D 1.0mg/L 처리, E,F: 쪽파의 체세포배 발생 callus의 다양한 재분화 모습)

2) Callus 재분화에 미치는 cytokinin류의 영향

쪽파를 2,4-D와 picloram으로 각각 유도한 캘러스는 형태별로 다른 모습을 보여주었다(그림 5. C, D). 표 14 에서 보는 바와 같이 성장점에서 유도된 체세포배 캘러스의 재분화정도는 초기 캘러스 유도시 사용한 옥신 종류 및 캘러스 라인에 따라 차이가 있음을 확인할 수 있었다. Picloram으로 유도한 캘러스 라인은 신초발생이 12.5개로 2,4-D로 유도한 캘러스 라인의 신초수 1.3개 보다 월등히 높았으며, 발근율은 46.2%, 52.3%로 비슷한 수준이었다. 이와 같은 결과는 쪽파의 성장점으로부터 재분화 능력이 높은 캘러스를 유도하는데 있어서 picloram을 첨가하는 것이 중요하다는 것을 보여주었다.

표 14. 쪽파 체세포배 캘러스 유도시 옥신 종류에 따른 재분화 정도

| Origin of callus | Line of callus | Number of shoots(ea) | Rooting(%) |
|------------------|----------------|----------------------|------------|
| Picloram | #3, #4, #5 | 12.5 a | 46.2 |
| 2,4-D | #1, #2, #2-1 | 1.3 b | 52.3 |

사이토키닌의 종류 및 농도에 따른 신초 재분화의 빈도를 조사한 결과 캘러스 cell 라인에 따라 재분화 정도가 차이가 있었으며, cytokinin 종류에 상관없이 농도가 높아질수록 신초수가 증가하는 경향을 보여주었다(그림 7). 쪽파 #5 캘러스 cell 라인이 BA 1.0mg/L 처리시 53개 신초가 재분화 되었으며, 이후 정상적인 모습으로 자라는 모습을 관찰할 수 있었다(그림 8. B).

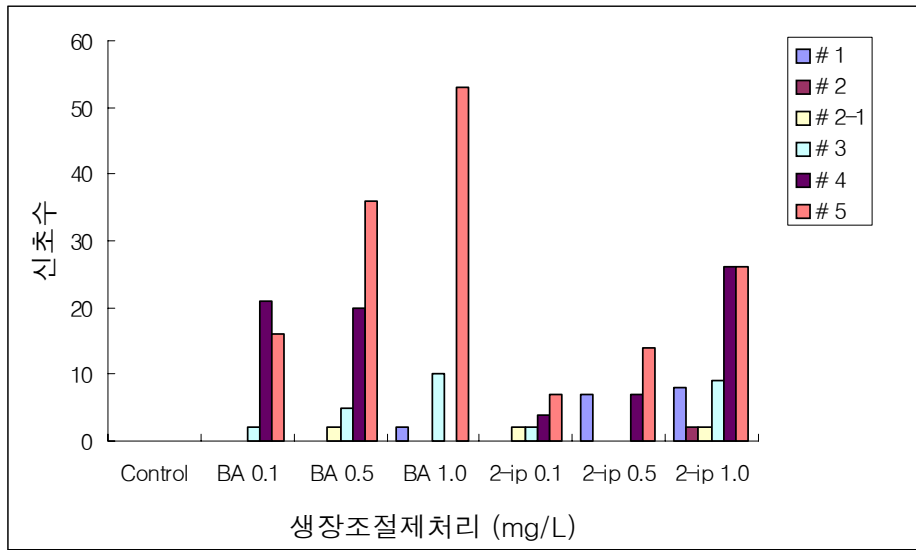


그림 6. 쪽파 체세포배 캘러스 cell 라인별 재분화 정도

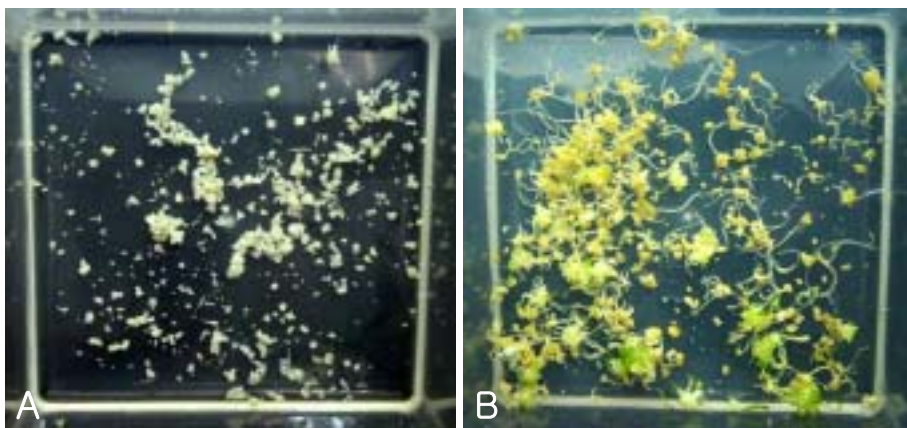


그림 7. 성장조절제 구성에 따른 쪽파 체세포배 캘러스 라인(# 5 cell line)의 재분화의 차이(A: MS 배지, 성장조절제 무첨가, B: MS 배지, BA 1.0mg/L 첨가)

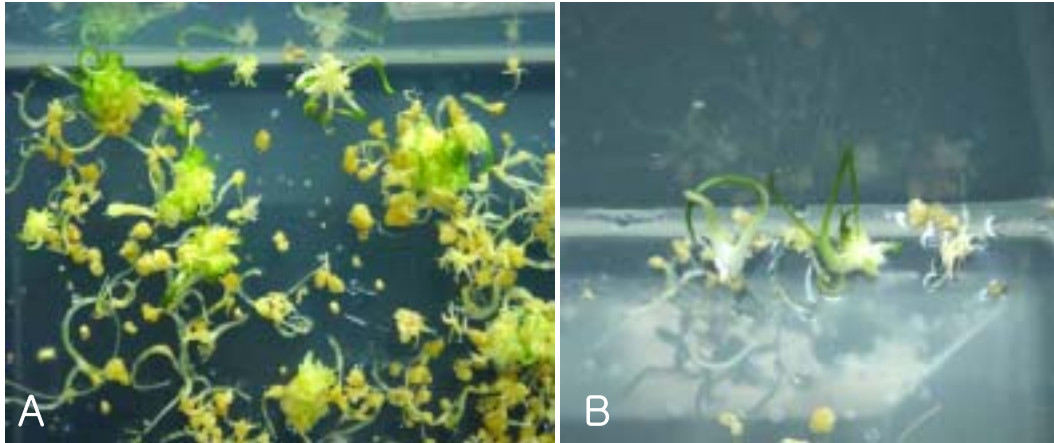


그림 8. 쪽과 체세포배 발생 켈러스(#5 cell line)의 순원기 재분화 및 신초 형성

제 2절. 생물반응기에 의한 쪽과의 대량배양 시스템 개발

1. 서언

조직배양에 의한, 특히 경제성 있는 영양번식 작물의 하여 식물체 생산 기술은 그 활용이 점차 확대되어 가고 있으나, 일반적인 조직배양에서는 용량이 작은 배양용기와 반고체상태의 배지를 사용하여 소규모적으로 이루어지는 경우가 대부분이어서 대량생산에는 경비가 많이 소요되는 단점이 있다.

조직배양기술에 의하여 경제성이 높은 영양번식 작물들의 기내(*in vitro*) 재분화시스템이 확립되면 산업화를 위해서는 저렴하면서도 효율적이고 안정적으로 대량생산을 할 수 있는 대량배양시스템이 필요하게 되는데, 이 경우 액체배지를 이용한 생물반응기(bioreactor)가 노동력이나 생산원가를 절감시킬 수 있는 유용한 수단으로 고려될 수 있다.

생물반응기는 최적생장에 필요한 조건을 제공하여 주는 장치로서 주로 미생물의 대량 배양에 이용되어 왔으나, 최근에는 식물조직배양에도 이를 적용코자 하는 연구들이 진행되어 생물반응기의 조절 시스템 개발에 관한 연구(Fowler 1987)와 기관발생 배양이나 체

세포 형성 배양에 이용한 결과들이 보고된 바 있다(Reub 1994, Stuart etc 1987, Xiaolig 1995).

식물조직배양에 이용되는 생물반응기는 공기의 흐름을 이용하여 교반하는 경우와, 기계적으로 교반하는 방식, 그리고 회전 필터를 이용하는 방식 등으로 구별할 수 있는데 공기 흐름을 이용하는 공기부양식 생물반응기가 산업적으로 가장 많이 이용되기도 하며 식물배양에도 효과가 크다.

이러한 생물반응기를 쪽파 종구의 대량생산에 이용하여 대량 번식의 가능성 여부를 확인하고, 값싼 생물반응기 시스템을 구축하기 위하여 배양기의 타입, 크기, 스파자의 종류 및 밴트 시스템, 그리고 오염을 최소화하기 위한 여러 가지 방법 등을 검토하였다.

2. 경제성이 있는 생물반응기의 개발

가. 15리터용 액체배양용기의 개발

쪽파의 기내 배양조건이 확립되면 실용화를 위해서는 대량배양이 절대적으로 필요하다. 따라서 생물배양기를 사용하여야 하는데 현재 사용되는 생물배양기의 경우에는 시스템 설치비가 고가이기 때문에 값싸고 쉽게 활용할 수 있는 배양기의 개발이 절실이 요구된다. 본 연구에서는 현재 시중에서 판매되고 있는 20리터 생수물통을 구입하여 이를 배양기로 만든 후에 15리터의 배양액을 넣어 대량으로 배양할 수 있는 배양 시스템을 개발하고자 하였다.

그러나, 현재 사용되는 생수통은 입구가 너무 작기 때문에(그림 9-B) 일반 식물 callus 등의 배양은 가능하였지만, 쪽파와 같이 식물체를 유도하여 사용할 경우에는 사용이 매우 어려운 단점이 있어 입구의 크기가 넓은 새로운 배양기(그림 9-A)를 활용하였다.

입구가 넓은 생수통의 뚜껑에 매우 간단하면서도 효율 좋게 공기를 공급할 수 있는 스파자 시스템(그림 10-A)을 부착하였고, 무균적으로 주입된 공기를 배출할 수 있는 밴트시스템(그림 10-B)을 만들었다. 이 밴트 시스템은 배양기의 하부에 구멍을 뚫고 이곳에 스텐레스 관(직경12mm)을 끼운 실리콘마개(9호)를 부착하고 실리콘튜브(직경 10mm)에 솜을 충전한 후 알루미늄 호일로 싸고 배양기에 부착하는 형태의 새로운 배양기를 개발하였다.



그림 9. 쪽파의 대량배양에 활용될 생수물통의 모습. A; 입구가 넓어 쪽파의 배양에 활용이 가능한 배양기. B; 현재 사용되고 있는 생수통.



그림 10. 입구가 큰 생수통을 이용하여 스파자시스템과 밴트시스템을 부착한 배양기 (A)에서 쪽파가 자라고 있는 모습(B)

또한, 가장 효율적으로 배양기내에서 쪽파의 종구를 부유시키면서 생장량이 가장 좋은 스파자를 개발하기 위하여 다양한 종류의 스파자를 제작하였다. 유리섬유로 되어 있는 스파자(그림 11-A)의 경우에는 뚜껑의 한 가운데에서 공기가 나오는 시스템으로 공기가 한곳으로 몰리며 스파자의 가격이 비싼 단점이 있다. 원가 절감 및 효율성을 증대시키기 위하여 기존의 값싼 제품을 사용하여 스파자를 제작하였는데, 열심자형태(그림 11-B)로 만들거나, 공기의 퍼짐을 최대화하기 위해서 사각 및 팔자형(그림 11-C, D), 가운데 부분에 공기의 주입이 어려워 다시 가운데에 서로 다른 스파자를 부착한 시스템(그림 11-E,F) 등 다양한 모양의 스파자 시스템을 개발하여 배양기에 부착 사용하였다. 열심자 형태의 경우는 만들기가 다소 복잡하고, 사각 및 팔자형의 경우에는 스파자 가운데에 배양물이 다소 침적되는 경향을 보였다.

나. 오염을 감소방법 연구(air, filtration)

공기를 주입하여 air-lift식으로 사용되는 본 생수통 배양기는 뚜껑에 스파자를 고정하기 위하여 실리콘 튜브에 유리스파자를 끼우고 실리콘 튜브를 연결한 후 공기 주입식 membrane filter(0.2 μm , Satorius)를 부착하여 오염원이 배양기내로 혼입되지 않도록 설계하였다(그림 12-A). 그러나 membrane filter만으로는 강하게 주입되는 공기의 흐름을 막기 어려워 오염율이 높아 다시 중간에 공기를 정화할 수 있는 시스템을 부착하였다(그림 12-B). 본 공기정화장치는 2개의 스테인레스관을 사용하여 2중으로 면숨을 충전하여 filtering하였으며, 다시 중간에 생수통을 설치하여 콤프레샤의 필터를 거쳐서 들어오는 공기 중에서 수분을 제거하여 다시 한번 공기를 정화하도록 설계되었다. 이렇게 이중으로 공기를 정화하는 시스템을 설치함으로써 콤프레샤에 부착되어 있는 냉각기(cooler)에서 발생하는 수분의 유입을 최소화 할 수 있었으며, 결과적으로 곰팡이, 세균 등의 오염을 줄일 수 있었다.

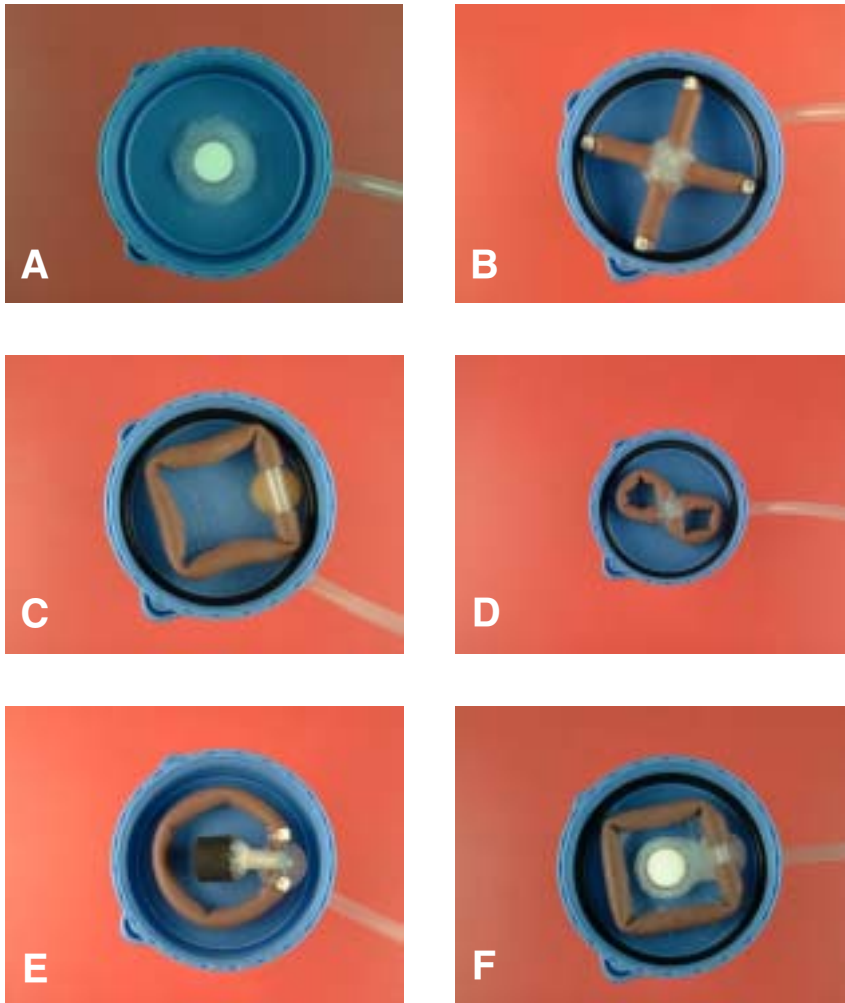


그림 11. 효율적인 공기주입을 위한 개발된 각종 스파자 시스템. A : 뚜껑의 한 가운데에서 공기가 나오는 스파자 시스템, 공기가 한곳으로 몰리며 스파자의 가격이 비쌈. B : 값싼 스파자를 이용하여 열십자형태로 만들(만들기가 다소 복잡함). C-D : 공기의 퍼짐을 최대화하기위해서 사각 및 팔자형으로 만들. E-F : C-D의 경우 가운데에서 공기의 주입이 어려워 다시 가운데에 서로 다른 스파자를 부착한 시스템.

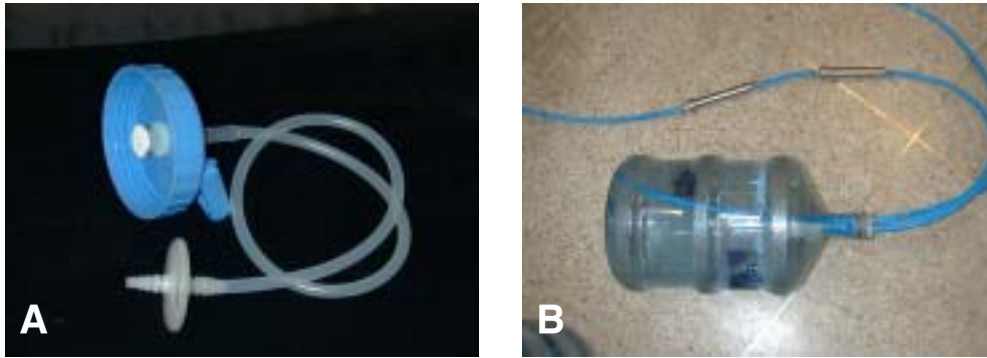


그림 12. 배양기의 오염율을 줄이기 위해서 사용된 membrane 부착 스파자 시스템(A) 과 공기의 정화장치(B).

다. 배양대로부터 배양용기에 주입할 공기의 배분 장치개발

본 연구에서 개발된 생수통을 이용한 15리터 배양용기가 값싸고 효율적으로 사용이 가능할 경우 대량으로 생산하기 위해서는 배양용기를 set화할 필요가 있다. 따라서 한정된 공간에서 배양용량을 극대화하고 효율적으로 사용하기 위해서 배양대를 3층으로 설계하였으며 이들을 필요에 따라서는 이동할 수 있게 바퀴를 설치하였고, 또한 공기 유입을 조절하기 위해서 이에 따른 부수적인 공기주입조절 부착기를 설치하였다(그림 13). 배양대에는 개발된 배양기를 18개(270 L 배양액) 설치할 수 있고, 각각의 배양기에는 공기조절밸브를 설치하여 각각 공기의 유입량을 조절할 수 있게 설치하였다. 또한 배양대 층별로 각각 공기유입을 On-Off할 수 있는 밸브를 따로 설치하여 손쉽게 조절할 수 있게 설계를 하였다. 본 배양대에서 사용한 밸브는 기존의 상용화 되어있는 비싼 flowmeter를 사용하지 않고도 효율적으로 공기를 배분할 수 있게 하였다.



그림 13. 대량배양시 사용하기 위해서 배양 셋트에 공기를 분배할 수 있는 장치.

라. 콤프레샤로부터 배양용기에 주입할 공기의 배분 장치

쪽파를 기내에서 대량으로 배양하기 위해서는 각각의 배양기에 적절한 양의 공기를 주입하여야 한다. 그러기 위해서는 공기를 생산하는 콤프레샤로부터 각각의 배양대에 알맞은 정도의 공기를 분배하는 시스템의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 쪽파의 대량배양을 위한 배양대(그림 14-A) 및 효율적인 공기 주입 장치(그림 14-B~E), 공기주입장치 고장시 압력에 의해서 다른 장치가 가동될 수 있도록 설치한 센서(그림 14-C), 각각의 배양대 별로 공기주입을 조절할 수 있게 조절 밸브를 설치하였으며(그림 14-D), 또한 배양대 별로 공기를 조절하여 주입할 수 있는 조절기가 설치되어 있다(그림 14-E). 특히 본 장치는 유사시 공기공급장치가 고장이 생기더라도 바로 다른 장치가 가동할 수 있도록 공기 압력 센서가 도입되어 있어 일시적인 기계고장이 발생하더라도 다른 예비 공기주입장치로 전환되어 공기를 주입할 수 있도록 설계하였다.

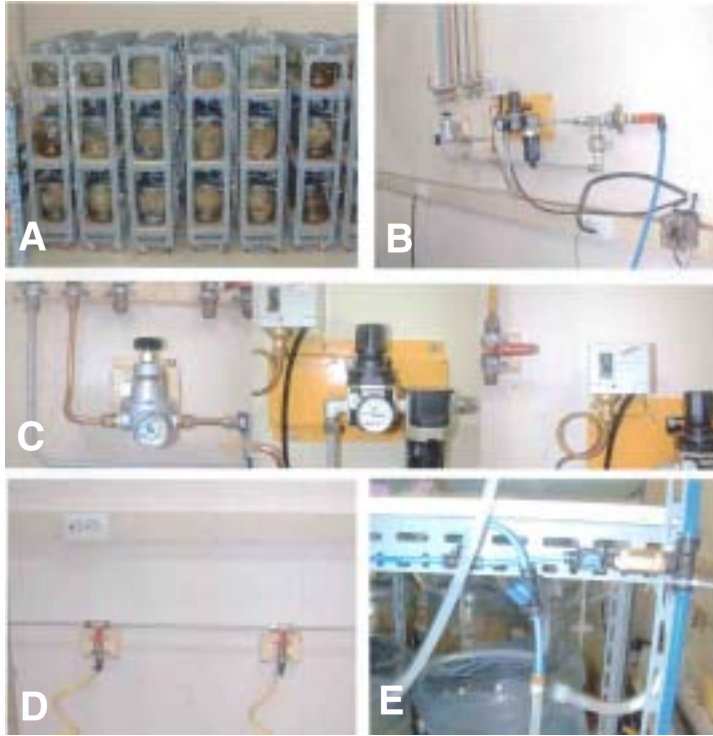


그림 14. 쪽파의 대량배양을 위한 공기분배장치. A : 배양대, B~E : 효율적인 공기 주입장치, C : 공기주입장치고장시 압력에 의해서 다른 장치가 가동될수 있도록 설치한 센서, D : 여러대의 배양대에 공기를 주입하는 조절기, E : 배양기에 공기유입을 조절하여 주입할 수 있는 조절기

마. 대량배양을 위한 공기 주입장치의 개발

상기 실험에서 대량 배양할 수 있는 생물반응기가 개발되었으므로 이에 알맞은 공기 주입장치가 필요하다. 특히 공기주입시 공기의 상태가 매우 중요하므로 가능한 한 공기의 세균이나 곰팡이 포자 같은 미생물에 대한 오염이 없어야 한다. 따라서 공기 발생기에서 나오는 여러 가지 수분 및 오일 등을 제거하고 깨끗한 공기를 공급하기 위해서 그림 15와 같이 여러 단계의 필터를 사용하였던 바, 거의 오염이 없이 쪽파를 배양할 수 있었다.



그림 15. 쪽파의 대량배양을 위해서 개발된 공기정화 장치. A ; 공기 발생기와 오일 등을 제거할 수 있는 필터시스템, B : 공기 발생기에서 나오는 더운공기를 차갑게 하는 cooler 시스템과 dryer 및 filter system.

3. 효율적인 쪽파의 대량배양방법 개발

가. 쪽파의 대량배양방법 개발

쪽파의 무균 배양계를 우선 소형 유리 배양기에서 안정화한 후에 5주 간격으로 계대배양하여 세포주를 유지하였다(그림 16-A). 고체배양된 쪽파의 세포덩어리를 액체 배양계에 순화시키기 위해서 삼각플라스크(250ml)에 우선 접종하여 4주 간격으로 계대배양을 하면서 여러세대를 거쳐 액체배양계를 안정화시켰다(그림 16-B). 이들을 개발된 배양기에 15리터 배양배지를 첨가하고 여기에 삼각플라스크 2개를 접종하여 배양한 결과 성공적으로 쪽파의 세포덩어리들이 왕성하게 생육하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 16-C).

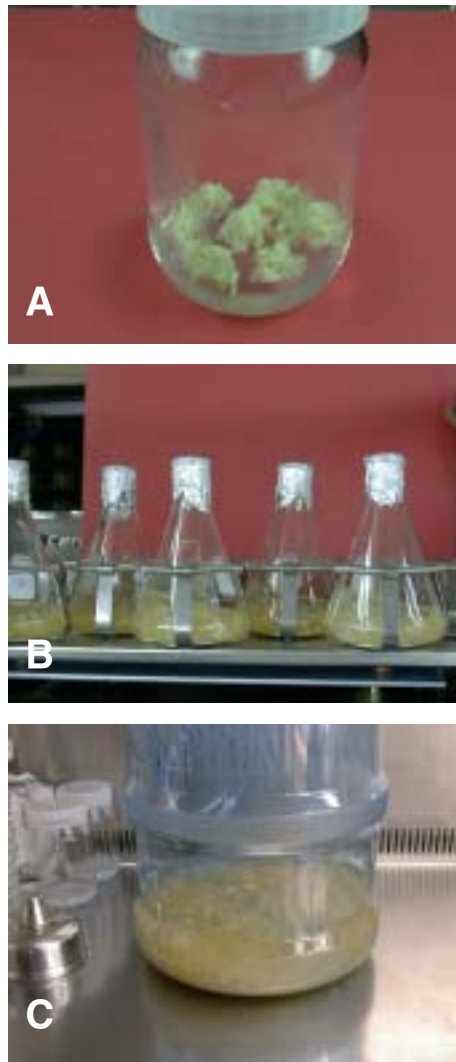


그림 16. 쪽과의 고체 및 액체배양계의 확립. A : 고체배양, B : 삼각플라스크에서 현탁배양, C : 15리터 배양기에서 대량배양

쪽과의 기내배양을 위해서 생물반응기를 값싸고 생산하고자 현재 시중에서 사용되고 있는 20리터 생수물통에 15리터의 배양액을 넣어 대량으로 배양할 수 있는 배양시스템을 개발하였으며(그림 9), 효율적인 배양을 위해서는 공기를 주입할 수 있는 스파자 시스템이 매우 중요한 요인이 됨으로 여러 형태의 스파자 시스템을 개발하였다.

효율적인 스파자 시스템을 확인하고자 생장 및 각종 조작방법을 비교한 결과 배양에 차이가 많이 났는데 그 중 중앙에서 공기가 주입이 되면서 그 주위에서 공기가 공급되는 시스템(그림 11-E, F)에서 비교적 생장이 양호한 경향을 보였다. 이러한 연구 결과를 토대로 하여 개발된 15 L 배양기를 활용하여 쪽과의 우량종구를 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 일차적으로 개발하였다.

나. 생물반응기에서 증식된 순원기로부터 신초형성

배양기에서 배양된 쪽과의 세포덩어리들을 고체배지에 옮겨서 배양한 결과 shoot을 형성할 수 있는 원기가 많이 형성되었다. 그러나 액체배양을 기간 중에는 캘러스만 왕성하게 증식되어 현탁배양에 의한 shoot의 형성조건을 구명하여야 할 것이다.

다. 광조건에 따른 쪽과의 대량배양

삼각플라스크에서 여러 세대를 거쳐서 안정화된 쪽과의 액체 배양계를 개발된 생수통 15 L 배양기에 접종한 후 배양조건을 달리하여 생장량의 차이를 관찰하였다. 쪽과 세포의 배양은 광과 암상태에서 배양을 수행하였던 바, 캘러스의 증식은 두 조건에서 공히 양호하였다(그림 17).

특히 광조건에서는 암조건에 비해 조직이 단단한 경향을 보였으며, 약간 밝은 형태를 보였고 shoot가 형성될 기미를 보였다. 반면에 암조건에서 배양한 캘러스의 경우에는 암갈색을 띄우고 있었으며 조직의 활력이 약해 보였다. 15 L 배양기를 이용한 액체배양 방법은 스파자에 의한 공기부양식 방법으로 공기의 량과 세기가 약하여 쪽과의 조직들이 깨지지 않고 뭉쳐있는 상태로 자라는 현상을 보였으며, 고체배지에서는 shoot가 나오는 조건인데도 불구하고 동일한 배지를 사용하여 배양기에서 배양한 결과 두 조건 모두에서 신초의 형성을 관찰할 수 없었다.

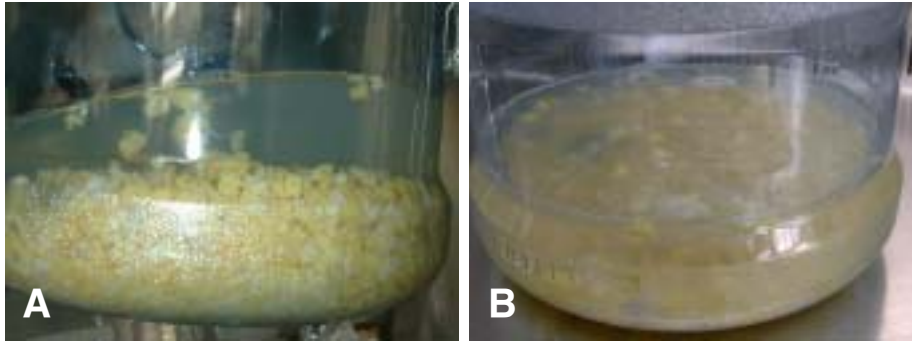


그림 17. 쪽파의 성장에 미치는 암(A) 및 광(B)의 영향

라. 식물호르몬 처리에 의한 자구비대

쪽파의 세포덩어리의 증식을 위해서 배지는 MS배지를 기본으로 사용하였으며, 식물 성장조정제 2,4-D를 0.1 mg/l 첨가하여 계대배양을 하면서 세포계를 유지하였다. 식물 성장조정제가 쪽파의 자구 비대에 미치는 영향을 조사하기 위하여 auxin계 성장조정제인 NAA, 2,4-D, IBA와 cytokinin계 성장조정제인 kinetin을 조합처리하여 자구 비대에 미치는 효과를 관찰하였다. 그 결과 오옥신 단독으로 처리한 경우에 농도가 증가할수록 쪽파의 자구비대 현상이 관찰되었으나, 조직이 연화되어 쉽게 부스러지는 경향이 성장조정제의 농도가 증가할수록 뚜렷하게 나타났다. Kinetin(0.1 mg/l)를 오옥신과 조합처리한 경우에는 쪽파의 자구가 비대되면서 조직의 연화현상이 오옥신 단독 처리구보다는 약한 것으로 관찰되었으며, kinetin의 농도를 증가시킨 경우에는 자구의 비대가 다소 억제되고 세포덩어리의 강도가 증가되는 경향을 나타내었다. 따라서 오옥신 단독처리 보다는 kinetin 등 cytokinin계 호르몬을 혼합처리하는 것이 자구비대와 신초형성을 위해서는 바람직한 것으로 사료되었다.

마. 공기주입량에 따른 종구증식 및 비대 효율

개발된 생수통 배양기는 공기주입을 통한 부양식 배양기로 콤프레샤에서 생산되는 공기를 oil과 수분을 제거한 후 membrane filter(0.2 μ m)를 최종적으로 통과하여 배양기 안으로 유입된다. 공기의 주입량을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 bar의 세기로 각각 처

리하였다. 15 L 배양기에 접종 후 4주간 처리하여 쪽파의 종구의 증식 및 비대를 측정
한 결과 공기의 주입량에 따른 큰 차이는 인정되지 않았다. 다만 2.0 bar 이상의 세
기에서는 배지의 배출량이 증가하여 4주 후에 배양기에 남아있는 배지의 양이 다른
처리구에 비해서 20% 정도 더 감소되어 있었고 성장량도 공기의 유입량이
2.0>2.5>3.0 bar 순으로 공기의 유입세가 클수록 오히려 성장량은 유의성있게 조금
씩 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 15 L 배양기를 이용하여 쪽파의 자구
를 배양할 때는 2.0 이하의 세기로 유지하는 것이 바람직하다고 사료된다.

바. Antivitrification을 위한 chemical 처리

Vitrification를 막기 위해서 Sigma(A-0807)에서 나오는 antivitrifying agent EM2를
5 g/l 첨가하여 배양한 결과 shoot의 형성을 위한 원기가 다소 형성되는 경향을 보였
으며, 또한 세포 덩어리 자체가 커다랗게 자란 것이 잘게 나누어지는 경향을 보였다
(그림 18).



그림 18. Antivitrifying agent EM2 첨가에 의한 쪽파의 대량배양.

또한 항산화효과를 보기 위해서 ascorbic acid를 0.01 mM첨가한 배지에서는 무첨가

배지와 거의 차이가 없었다. 따라서 본 생물반응기에서 쪽과의 대량생산이 가능할 것으로 사료됨에 따라서 보다 효율적인 새로운 생물반응기의 제작 필요성을 위해서 그림 19과 같이 도면을 그렸다. 본 배양기는 원통형으로 밑부분에 공기주입용 스파자를 위치하게 함으로서 배지내에서의 순환효율을 증대시키고 작업능률을 높일수 있게끔 설계하였다. 특히 새로이 설계된 본 배양기를 이용할 경우 기내에서 embryo를 대량으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라 유식물체도 생산할 수 있을 것이다.



그림 19. 새로운 생물반응기의 제작 모형

제 3절. 기내 자구를 이용한 우량종구 포장 생산기술

1. 서 언

쪽파(*Allium wakegi* Araki)는 파(*Allium fistulosum* L.)와 분구형 양파(*A. ascalonicum* L.)를 교잡친으로 하는 백합과 식물로서 염색체수 $2n=16$ 이다. 인경채소인 쪽파는 감수분열이상으로 종자가 형성되지 않아 종자번식을 하지 못하고 인경으로 번식하는데 재배기간이 짧고 연작에 의한 생리장해가 적어 시설내 윤작에 유리하고 부가가치가 높은 채소이다. 쪽파재배는 대개 9월에 파종하여 이듬해 봄에 걸쳐 이루어지며 여름에는 인경이 형성되어 휴면에 들어간다. 드물게 추대하는 경우도 있으나 화기는 퇴화하여 결실하지 않으므로 쪽파의 번식은 이 시기에 형성된 인경의 분구에 의해 이루어지고 있다.

우리나라 쪽파 종구는 대부분 제주도에서 생산하여 남해안과 서해안 그리고 일부 내륙지방의 재배단지에 공급하고 있으나 단일 생산지인 제주도의 자연재해나 재배면적 감소 등으로 인하여 종구 수급이 불안정한 실정이다. 이러한 문제점을 해소하기 위한 방안으로 고품질 종구 생산을 위하여 대량으로 생산된 기내자구를 포장에 파종하여 종구를 생산하는 기술을 확립하는 것이 시급한 실정이다.

최근 쪽파의 연구는 분자·세포학적 연구(Iwasa 1964, Tashiro 1984), 인경의 발달과 휴면생리가 체내물질의 변화에 미치는 영향(Yamazaki 등, 1995, 2001), 재배환경이 쪽파 인경비대에 미치는 영향(Okubo 등, 1999; Yamazaki 등, 2000), 쪽파의 인경형성에 미치는 온도전력의 영향(Yamazaki 등, 2003) 등의 연구결과가 보고되고 있지만 조직배양 종구의 특성이나 종구 생산에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

본 연구는 우량종구를 대량생산하여 농가소득증대에 기여하고자 조직배양으로 생산된 쪽파 기내 유식물체를 포장에 식재하여 순화정도, 재식밀도, 출현율, 생산력 등을 조사해서 우량종구 생산체계를 확립코자 수행하였다.

2. 자구 순화 및 비대를 위한 온실 및 포장재배기술 체계화

가. 재료 및 방법

1) 기내자구의 순화를 위한 온실재배조건 구명

Sucrose 3%, Zip 2 mg/L 그리고 phytagel 0.3%를 첨가한 MS배지(pH 5.8)에 정아를 배양했다. 16시간 일장, 25±1℃의 온도범위로 배양환경을 조절하였으며, 기내에서 발생한 다신초는 9% sucrose가 첨가된 배지로 옮겨 기내구로 비대시켰다.

기내에서 배양된 유식물체를 배양실에서 순화하우스로 옮겨 1주일간 적응기간을 거친 후 배양병에서 꺼내 흐르는 물에 한천을 씻어 내었다. 기내 유식물체의 소독을 위해 벤레이트 1,000배액에 5분간 침지한 후 40공 플러그트레이에 시판되는 원예용 상토(코코피트 70, 피트모스 10, 질석 10, 제올라이트 4, 펄라이트 6%)를 사용하여 이식하였다. 처리별 순화환경 조절을 위하여 온도처리는 생육상을 이용, 15℃, 25℃, 35℃로 맞추고 차광처리는 4월 중순 순화하우스내 자연환경 조건하에서 순화상위에 30% 차광망을 1~3겹으로 씌워 차광율을 달리하였다. 또한 습도조절은 저면관수배드에서 미스트분무를 하는 방법과 비닐피복을 하는 방법으로 80% 이상의 습도가 유지되도록 하였으며 5주후 초장, 발근정도 등 생육조사를 하였다.

2) 순화과정 육묘시스템 확립

기내에서 배양된 유묘를 배양실에서 순화하우스로 옮겨 1주일간 적응기간을 거친 후 배양용기에서 꺼낸 유묘를 선별하여 흐르는 물에 한천을 씻어내었다. 벤레이트 1,000배액에 5분간 침지 소독한 후 시험재료로 사용하였으며, 순화상의 비닐피복 유무와 기내 유식물체의 지상부 제거 유무 등 순화방법이 생육에 미치는 영향을 검토하기 위해서 비닐하우스내에서 피트모스 : 펄라이트 : 버미큘라이트(1:1:1, v/v/v)로 혼합한 인공상토를 이용하여 40공 플러그 트레이에 4주간 순화한 후생육상태를 조사하였다.

순화과정을 좀더 단순화하기 위하여 아무런 진처리 없이 비닐하우스내에서 펄라이트:버미큘라이트(1:1, v/v)로 혼합한 인공상토를 이용하여 40공 플러그 트레이에 순화한 경우와 노지포장에 직접 순화한 경우의 초장 및 생체중 등 생육상태를 순화 4주 후에 조사하였다.

또한 대량으로 기내 유식물체 유도가 가능한 배상체 캘러스(embryogenic callus)를

이용하여 이로부터 유도된 기내 유식물체의 순화용기 및 적정 순화용도를 선별할 목적으로 양액베드와 40공 플리그트레이에 인공상토와 원예용 상토를 사용하였다. 양액베드(W 35cm × H 21 cm × L 120 cm)에는 인공상토(피트모스 : 펄라이트 : 버미큘라이트 = 1:1:1, v/v/v)를 이용하여 재식거리 15.5 cm × 5 cm로 식재하였고, 플리그트레이에는 인공상토와 원예용 상토(바이오상토 1호)를 이용 2002년 2월 6일 식재하여 3주 후 생육상태를 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 기내자구의 순화를 위한 온실재배조건 구명

조직배양에 의해 생산된 쪽파 기내자구의 적정 순화조건을 구명하고자 온도, 차광율, 습도조건을 각각 달리하여 각 순화조건들이 쪽파 조직배양묘 순화에 미치는 영향을 조사하였다. 온도가 쪽파 순화에 미치는 영향을 조사한 결과, 표 15에서와 같이 생존율은 모든 처리에서 97% 이상으로 큰 차이가 없었으나, 생육에 있어서는 다소 차이를 나타내어 온도가 낮을수록 생육이 떨어지는 경향을 나타내었으며, 고온에서는 잎끝이 타서 마르는 증세가 관찰되었다. 그러나 저온에서도 거의 생존하여 저온에 매우 강한 특성을 나타냈으며, 25℃에서 초장, 발근 등 생육상태가 가장 좋아 생존율이 100% 였다.

표 15. 온도가 쪽파 기내묘 순화에 미치는 영향.

| 온도 (℃) | 생 장 정 도 ^Z | | | 발근 정도 ^Z | 생존율(%) |
|-----------|----------------------|--------|---------|-----------------------|--------|
| | 초장(cm) | 엽폭(mm) | 생체중(mg) | | |
| 15 | 2.1 | 0.8 | 240 | + | 97 |
| 25 | 4.8 | 7.0 | 990 | +++ | 100 |
| 35 | 3.1 | 4.1 | 670 | ++ | 98 |

^Z 순화 전과 순화 후의 생장 차이

^Y + : 보통, ++ : 양호, +++ : 아주 양호

차광율이 쪽과 순화에 미치는 영향은 표 15와 같다. 30% 차광에서 가장 가장 발근이 잘되었으나 과도한 광에 의해 잎 끝이 타는 현상이 관찰되는 등 지상부 생육이 좋지 않았고, 90% 차광에서는 도장하는 경향으로 묘가 연약하게 자랐으며, 60% 차광조건에서 생존율 98%로 생육상태가 전반적으로 가장 좋았다.

표 16. 차광율이 쪽과 기내묘 순화에 미치는 영향.

| 차광율 (%) | 생 장 정 도 ^Z | | | 발근 정도 ^Y | 생존율(%) |
|---------|----------------------|--------|---------|--------------------|--------|
| | 초장(mm) | 엽장(mm) | 생체중(mg) | | |
| 30 | 5.9 | 5.0 | 220 | +++ | 91 |
| 60 | 6.9 | 7.0 | 490 | ++ | 95 |
| 90 | 8.7 | 5.4 | 310 | ++ | 95 |

^Z 순화 전과 순화 후의 생장 차이

^Y ++ : 양호, +++ : 아주 양호

순화율 향상에 가장 중요한 영향을 미치는 습도를 80% 이상으로 유지하기 위하여 저면관수 베드시스템에 위에서 미스트 분무를 하는 방법과 순화상을 비닐로 피복하여(비닐터널) 포화습도에 가깝게 조절하는 방법을 비교하였다. 습도조절방법에 따른 순화상태를 조사한 결과는 표 17과 같이 저면관수에 미스트 분무한 경우보다 비닐피복으로 습도를 유지시킨 경우가 잎 끝이 타는 현상이 없었으며, 초장, 발근정도, 생체중 등 모든 생육상태가 양호하였고 생존율도 100%에 달하였다. 그러나 한낮의 고온과 환기에 유의해야 하였으며 과습으로 인한 물러짐 등 병 발생 방지에 세심한 주의를 기울여야 했다.

표 17. 습도조절방법이 쪽과 기내묘 순화에 미치는 영향

| 습도 조절 방법 | 초 장(cm) | 발근정도 ^z | 생체중(g) | 생존율(%) |
|---------------|---------|-------------------|--------|--------|
| · 대조구 | 15.22 | + | 1.02 | 67 |
| · 저면관수 + 미스트 | 25.57 | ++ | 1.07 | 96 |
| · 저면관수 + 비닐피복 | 28.37 | +++ | 1.94 | 100 |

^z + : 보통, ++ : 양호, +++ : 아주 양호

2) 순화과정 육묘시스템 확립

순화상의 비닐피복 유무와 기내 유식물체의 지상부 제거 유무 등 순화방법이 생육에 미치는 영향을 검토한 결과는 표 18와 같다. 기내유식물체의 지상부를 제거하지 않은 경우가 제거한 경우보다 생육이 우수하였고, 지상부가 유지된 상태로 순화시킬 경우 습도 유지를 위하여 비닐피복 처리가 생육면에서 유리하였다. 그러나 지상부 유지 식물체와 기내소구 모두 별도의 순화과정 없이 4주 이내에 100% 발아하였으며 노지포장에 정식한 후에도 활착에는 문제가 없었으며, 기내 유식물체의 순화작업에는 플러그트레이를 이용하는 것이 작업의 편리성과 공간 이용면에서도 유리하였다(그림 20, 21).

표 18. 순화방법이 발아 및 생육에 미치는 영향

| 구 | 분 | 경 수(개) | 초장(cm) | 근장(cm) | 생체중(g) |
|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 비닐피복 | 지상부제거 | 1.2 | 9.3 | 2.1 | 1.08 |
| | 지상부유지 | 1.5 | 11.2 | 4.3 | 1.87 |
| 무 피 복 | 지상부제거 | 1.1 | 8.8 | 2.2 | 1.06 |
| | 지상부유지 | 1.3 | 8.4 | 3.2 | 1.46 |

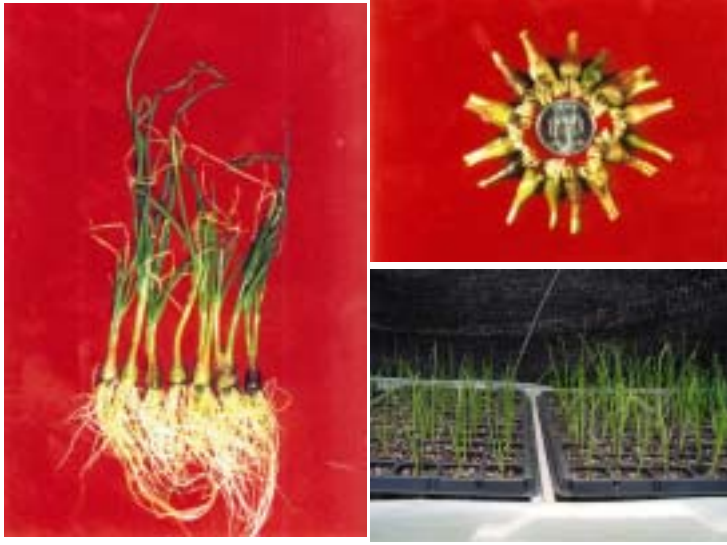


그림 20. 기내 육성된 쪽파 조직배양묘(좌), 수확한 소자구(우,상), 순화중인 유묘(우,하)

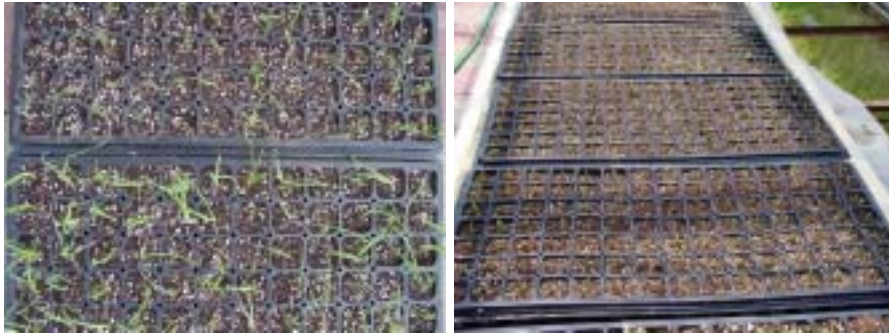


그림 21. 플러그트레이에 의한 순화과정 간소화

조직배양에 의해 생산된 쪽파 기내자구의 순화과정을 좀더 단순화하기 위하여 아무런 진처리 없이 비닐하우스내에서 40공 플러그트레이에 순화한 경우와 노지 포장에 직접 순화한 경우의 초장 및 생체중 등 생육상태를 조사한 결과는 표 19와 그림22과 같다. 순화묘의 생육에 있어서는 토경재배형태로 순화한 경우보다 플러그트레이를 이

용 순화한 경우가 다소 좋았으나 큰 차이는 없어 노지에 토경 재배 방식으로도 순화가 가능하리라 판단되었다.

표 19. 토경과 프리그에 의한 순화묘의 생육차이

| 구분 | 초장 (cm) | 엽장 (cm) | 엽초장 (cm) | 엽수 | 근장 (cm) | 근수 | 분얼수 | 생체중(mg) | | |
|-----|------------|------------|-------------|-----|------------|------|-----|---------|-----|-----|
| | | | | | | | | 근 | 경엽 | 총 |
| 토경 | 14.3 | 11.3 | 0.9 | 2.8 | 10.3 | 15.2 | 3.0 | 135 | 682 | 817 |
| 프리그 | 14.7 | 11.9 | 0.8 | 3.0 | 10.0 | 15.2 | 3.0 | 147 | 677 | 824 |



그림 22. 토경(좌)과 프리그(우) 순화 모습

배상체 캘러스(embryogenic callus)로 부터 유도된 기내 유식물체의 순화용기 및 적정 순화용토를 선발할 목적으로 양액베드와 40공 플러그트레이에 인공상토와 원예용상토를 사용한 결과는 표 20과 같다.

3주 순화 후의 쪽파 초장이나, 엽초장, 엽장의 경우 양액베드에 인공상토를 사용했을 때(A) 플러그트레이를 이용한 경우(B와 C)보다 다소 좋았으나, 그 외는 통계적인

유의성이 없었고, 특히 bulb의 생체중에 차이가 없었던 것으로 미루어 쪽과 조직배양묘의 순화에는 용토 및 용기에 관계없이 잘 되는 것으로 판단되었다.

표 20. 배상체 켈리스 유래 쪽과 순화시 생육조사 (3주 뒤)

| 구분 | 초장 (cm) | 엽초경 (cm) | 엽초장 (cm) | 구경 (cm) | 엽수 (개) | 엽장 (cm) | 근수 (개) | 근장 (cm) | 생체중(g) | | |
|----------------|--------------------|-------------|-------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|--------|-------|-------|
| | | | | | | | | | shoot | bulb | root |
| A ^Z | 17.5a ^Y | 0.2a | 2.0a | 0.3a | 3.6a | 15.0a | 2.0a | 4.2a | 0.3a | 0.03a | 0.02a |
| B | 13.0b | 0.1a | 1.4b | 0.2a | 3.4a | 11.2b | 2.6a | 2.9a | 0.1a | 0.03a | 0.04a |
| C | 15.8ab | 0.1a | 2.0ab | 0.3a | 3.6a | 13.3ab | 2.2a | 3.7a | 0.2a | 0.03a | 0.03a |

^Z A : 양액베드(피트모스 : 펠라이트 : 버미큘라이트 = 1:1:1, v/v/v)(15.5 cm×5 cm)

B : 40공 플러그트레이(피트모스 : 펠라이트 : 버미큘라이트 = 1:1:1, v/v/v)

C : 40공 플러그트레이(바이오상토 1호)

^Y Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

3. 무병종구 생산을 위한 포장 생산성 시험

가. 재료 및 방법

1) 조직배양묘의 포장생산력 검정

무병종구 생산을 위한 효율적인 포장 재배방법을 검토하기 위하여 기내 배양묘를 재식밀도를 달리하여 양액재배 하였다. 사용된 양액베드의 규격은 W 35cm × H 21 cm × L 120 cm 이였고, 펠라이트와 버미큘라이트 및 피트모스를 1:1:1(v/v/v)로 섞은 인공상토에 재식밀도를 17.5 cm × 5 cm, 17.5 cm × 10 cm, 17.5 cm × 15 cm, 그리고 17.5 cm × 20 cm로 2002년 12월 14일 식재하여 한국원시표준액(표 21)을 주기적으로 관주하고 5개월까지 재배한 후 생육상태를 조사하였다.

표 21. 한국원시 배양액의 조성 및 비료의 소요량^z.

| 비료명 | 함유량 (me/L) | 성분 | |
|---|---------------|--------------------|------------|
| | | 성분명 | 함유량 (me/L) |
| KNO ₃ | 5 | NO ₃ -N | 14 |
| Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 8 | NH ₄ -N | 1 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | Ca | 8 |
| NH ₄ NO ₃ | 1 | PO ₄ -P | 3 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 4 | Mg | 4 |
| | | SO ₄ -S | 4 |
| | | K | 6 |

^z EC: 2.3 mS/cm, pH: 6.5.

2) 종구 저장조건에 따른 출현율 비교

생산된 종구의 적정 저장조건을 검토하고자 조직배양묘를 2002년 12월 14일 파종하여 4월 15일 수확한 종구를 10℃(저온 저장고 이용, 향온), 15℃(저온 인큐베이터 이용, 향온), 그리고 30℃(자연저장, 비닐하우스내에서 매달아서 저장, 변온)에서 70일간 저장하였다. 저장 후 6월 21일 양액베드(W 42.5cm × H 24.5 cm × L 116 cm)에 인공상토(피트모스 : 펄라이트 : 버미큘라이트 = 1:1:1, v/v/v)를 사용하여 17.5 cm × 10 cm 간격으로 파종하여 파종 5일 후 출현율을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 조직배양묘의 포장 생산력 검토

무병종구 생산을 위한 효율적인 포장 재배방법을 검토하기 위하여 기내 배양묘를 재식밀도를 달리하여 5개월 까지 양액재배한 결과는 그림 22와 표 22와 같다. 양액 재배 4개월까지는 재식밀도에 관계없이 충실한 구의 비대가 이루어지지 않았고(그림 22, 좌), 5개월 재배 후에야 완전히 구로 비대되었다(그림 22, 우).

양액재배 4개월까지는 재식밀도에 따라 초장에서 차이 보여 밀식한 경우 상대적으로 초장이 작았으나(그림 22, 좌), 5개월 재배 후의 생육상태를 보면(표 22) 초장에는 큰 차이가 없었다. 또한 재식밀도에 따른 차이는 있으나 모든 처리구에서 종구 중이 3g 이상으로 구비대가 완전히 이루어 졌다. 그러나 충실한 종구의 생산을 위해서는 재식밀도 $17.5 \times 15\text{cm}$ 이상으로 5개월 이상 재배하는 것이 유리할 것으로 판단된다.



그림 22. 조직배양묘 양액재배 4개월 후(좌) 및 5개월 후(우)의 쪽파(좌에서 우로 재식 거리 17.5×5 , 17.5×10 , 17.5×15 , $17.5 \times 20\text{cm}$)

표 22. 한국재래종 쪽과의 재식밀도에 따른 생육 비교(5개월 재배 후)

| 재식밀도(cm) | 초장(cm) | 분구수 ^Z | 구중(g/주) |
|-----------|--------------------|------------------|---------|
| 17.5 × 5 | 45.8a ^Y | 24ab | 3.3b |
| 17.5 × 10 | 43.8a | 19b | 3.7ab |
| 17.5 × 15 | 46.3a | 23ab | 5.1a |
| 17.5 × 20 | 48.2a | 28a | 5.2a |

^Z 조직배양묘 1주로부터 분화된 구

^Y Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

2) 종구 저장조건에 따른 출현율 비교

조직배양묘를 이용하여 생산된 쪽과 종구의 효율적이고 간편한 저장조건을 검토하기 위하여 저온 저장고에 10℃로, 인큐베이터를 이용하여 15℃로, 그리고 비닐하우스 내에서 매달아서 70일간 저장한 후 파종하여 출현율을 조사한 결과는 표 23과 같다. 모든 저장조건에서 차이 없이 모두 신초가 잘 출현되는 것으로 미루어 당년도에 생산된 종구를 사용할 경우 어떠한 저장조건에 저장하든 큰 문제가 되지 않는 것으로 판단된다.

표 23. 저장조건에 따른 신초 출현율 비교

| 저 장 조 건 | 식재수 | 신초 출현개체 | 신초 출현율(%) |
|----------------|-----|---------|-----------|
| 10℃(저온저장고, 향온) | 80 | 80 | 100 |
| 15℃(인큐베이터, 향온) | 80 | 80 | 100 |
| 30℃(비닐하우스, 변온) | 80 | 80 | 100 |

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발 목표의 달성도

1. 순원기 배양을 통한 기내 자구 생산 기술 개발

무병주 획득하고 순원기를 유도하기 위하여 항바이러스 물질처리에 의한 무병주 생산 조건, 다신초 유도에 미치는 성장조절제 처리효과, 삼투조절제가 기내 쪽파 신초의 투명화에 미치는 효과를 구명하였고, 순원기 급속증식을 위하여 쪽파 신초 증식에 미치는 성장조절제와 삼투압조절제의 상호작용과 액체배양을 통한 다신초 및 다아체의 급속 증식 방법을 개발하였다. 또한 기내인경 비대에 미치는 sucrose 농도 및 광 조건, 한천 농도 및 옥신, 생장억제제의 영향을 검토하여 최적비대 조건을 구명하였으며, 기내 인경 대량생산을 위하여 체세포배 발생 켈러스 유도를 위한 적정 성장조절제처리방법과 쪽파 체세포배 켈러스 배양을 통하여 재분화를 유도시키는 등 소기의 목표를 달성하였다.

2. 생물반응기에 의한 쪽파의 대량배양 시스템 개발

경제성이 있는 생물반응기를 개발하고자 오염을 감소방법, 공기의 배분 장치, 대량 배양을 위한 공기 주입장치등을 개발하였으며, 효율적인 쪽파의 대량배양방법을 위하여 광조건에 따른 쪽파의 대량배양, 식물호르몬 처리에 의한 자구비대, 공기주입량에 따른 종구증식 및 비대 효율, Antivitrification을 위한 chemical 처리 등을 검토하였다.

이와 같은 여러 요인들을 검토하여 저렴한 생물반응기를 이용한 쪽파의 대량배양 시스템을 개발하였다.

3. 우량 종구 포장 생산기술

기내 자구의 순화 및 비대를 위한 온실 및 포장재배 기술 체계화를 위하여 온도, 차

광정도, 관수 및 습도 유지 방법 등 최적 조건을 구명하였고, 플러그트레이에 비닐터널 형태의 순화과정 시스템 확립하였다. 또한 무병종구 생산을 위한 포장 생산성을 검토하여 양액재배시의 적정 재식밀도 및 재배기간을 구명하였고, 종구 저장방법에 따른 신초 출현율을 조사하는 등 우량 종구의 포장 생산기술을 확립하였다.

그러나 무병 종구의 보급이라는 측면에서 본다면 년차별 무병종구 사용에 의한 바이러스 이병 정도 조사하여 종구 갱신년차 구명하는 것이 필요하리라 사료된다.

제 2절. 관련분야에 기여도

1. 기술적 측면

본 연구를 통하여 개발된 15 L 배양용기는 식물세포 및 조직을 대량배양할 수 있는 시스템으로 자체적인 실험결과로는 식물세포뿐만이 아니라 세균이나 유용버섯의 균사체 배양까지 응용할 수 있는 실용화 가능성이 매우 높다. 이 배양 시스템은 탱크를 이용한 배양기 시스템보다 설치비가 매우 저렴하고 실험실 수준에서의 대량배양연구에도 아주 적합하며, 가격이 저렴하기 때문에 과도한 투자비없이 배양 시스템을 설치할 수 있어 안정적으로 쪽과의 우량종구 생산과 공급이 가능하다. 또한 대학이나 일반 기업체의 실험실 등에서 다양한 실험을 위한 기자재로서도 그 유용성이 있다고 할 수 있다. 큰 부담없이 대량배양을 위한 기초연구자료의 결과 도출에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 경제·산업적 측면

쪽과는 독특한 향을 지니고 있어 다양한 요리에 주·부재료로 사용되고 있는 중요한 작물 중의 하나로 최근에는 파전 등의 음식에 사용되는 등 그 수요량이 점차 확대되고 있다. 그러나 쪽과는 중간 교잡 작물로서 종자 불임성 때문에 인경번식에 의존하고 있어 그 증식율이 현저히 낮고 영양번식에 따른 바이러스 및 연작에 의한 재래종 쪽과의 특성이 점차 퇴화되어 품질과 생산성이 저하되고 있다. 이러한 쪽과의 무병묘 기내 대량증식 방법이 확립된다면 새로운 농민들의 소득작물로서 농민의 소득향

상에 크게 기여할 것이다.

또한, 우리나라의 식물조직배양기술과 생명공학기술은 세계적 수준에 근접하여 있으나 지속적인 연구비의 투자와 함께 관련분야 전문가들의 공동연구 수행없이는 그 성장가능성이 무한한 세계의 생물산업시장에서 국제 경쟁력을 갖추기 어려울 것이다. 본 연구를 통하여 개발된 15 L 배양기가 미래 유망사업 중의 하나인 인체의 유용단백질 생산 등 고부가가치의 유용물질 생산을 위한 유용한 기자재 및 생산시스템으로서도 활용되어 국제 경쟁력을 갖추는데 있어서 일조할 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 15L 배양기의 실용화

- 1) 대학 및 기업 연구실에 염가에 보급하여 기초 및 응용연구의 진흥에 기여
- 2) 쪽파 뿐 만이 아니라 영양번식 작물의 기내 대량배양계 생산연구
예) 인삼 부정근 배양, 산삼 부정근 배양, 오가피 배배양 등

나. 무병 우량 쪽파 종구 생산 및 보급

- 1) 무병 우량 종구 대량생산을 위한 표준화 연구
- 2) 종묘업체와 시군 농업기술센터를 연계한 쪽파 종구 생산 전문화
 - 종묘업체 : 기내 자구 대량 생산
 - 유관기관 또는 전문 종구생산농가 : 종구 포장 생산 및 공급
- 3) 우량 종구 재배를 통한 쪽파 상품의 품질 개선
 - 국내 종묘업체 및 유관기관을 통한 농민 계약재배 유도
 - 선도농가 선정 시험재배 및 기술지도

다. 우량 종구의 해외 수출 가능성 모색

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- Abo El-Nil M.M. 1977. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Sci Lett* 9:259-264
- Ayabe M, Taniguchi K, Sumi S. 1995. Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 15:17-21
- Ayabe M, and Sumi S. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Report* 17(10):773-779.
- Ayabe M, Taniguchi K, and Sumi S. 1995. Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Report* 15(1-2):17-21.
- Barandarian X, Martin N, Rodriguez-Conde MF, DiPietro A, Martin J. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 18:434-437
- Barandarian X, Martin N, Rodriguez-Conde MF, Di Pietro A, and Martin J. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Report* 18(5):434-437.
- Barandarian X, Martin N, Rodriguez-Conde MF, Di Pietro A, and Martin J. 1999. An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *HortScience* 34(2):348-349.
- Barandarian X, Martin N, Rodriguez-Conde MF, Di Pietro A, and Martin J. 1999. An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *HortScience* 34(2):348-349.
- Eady CC and Lister CE. 1998. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo derived cultures. *Plant Cell report* 18(1-2):117-121.
- Eady CC, and Lister CE. 1998. A comparison of four selective agents for use with

- Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo derived cultures. Plant Cell report 18(1-2):117-121.
- Eady CC, Butler RC, and Suo Y. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo culture of onion(*Allium cepa* L.). Plant Cell Report 18(1-2):111-116.
- Fletcher PJ, Fletcher JD, and Lewthwaite SL. 1998. In vitro elimination of onion yellow dwarf and shallot latent viruses in shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum* L.). New Zealand Journal of Crop & Horticultural Science 26(1):23-26.
- Fowler MW. 1987. Process systems and approaches for large scale plant cell culture. In : Green C.E., Somers D.H., Hackett W.P., and Biesboer D.D.(Eds) Plant Tissue and Cell Culture(pp 459-471) Alan R. Liss, Inc, New York
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158
- Ghosh DK, Ahlawat YS, and Gupta MD. 1997. Production of virus-free garlic(*Allium sativum*) plant by thremotherapy and meristem-tip culture. Indian Journal of Agricultural Science 67(12):591-593.
- Haque MS, Wada T, and Hattori K. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. Plant Cell Tissue & Organ Culture 50(2):83-89. 1997.
- Hong W, Debergh P. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. Plant Cell Tissue Organ Cult 43:21-28
- Hui-min Xue, Hajime Araki, Ling Shi and Toshiro Yakuwa. 1991. Somatic embryogenesis and regeneration in basal plate and receptacle derived-callus culture of garlic(*Allium sativum* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60(3):627-634.
- Ikeda-Y, Imoto-M. 1991. Production of virus-free plants of *Allium wakegi* Araki of shoot apex culture and its efficiency. Bulletin-of-the-Hiroshima-

- prefectural-Agricultural Experiment Station. No. 54: 41-46
- Iwasa S. 1964. Cytogenetic studies in the *Wakegi Allium fistulosum* var. *caespitosum*. J. Fac. Agr. Kyushu Univ. 13:165-177.
- Jakse M, Bohance B, and Ihan A. 1996. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. Plant Cell Reports 15(12):934-938.
- 정해봉, 1994. 양파의 순원기 배양에 의한 기내 대량증식. 서울대학교 대학원 박사학위논문.
- 정해봉, 조미애, 하상희, 강광윤. 1998. 양파의 미성숙 화퇴 배양에 의한 식물체 재분화 및 기내 대량증식. RDA journal of Horticulture science. 40(1):78-82.
- 정해봉, 박호근. 1997. Plant Redifferentiation and Vitro Multiplication of Onion by Shoot Primordium Culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(2):123-128.
- Kehr AE, Schaeffer GW. 1976. Tissue culture and differentiation of garlic. HortScience 11 : 422 423
- Kil Sun Yoo, Leonard M. Pike, and Greg Cobb B. 1990. Promotion of in vitro leaf growth of inner scales excised from dormant onion bulbs. HortScience 25(2):228-229.
- 김원배, 김정기, 이은애, 김병현, 김정간, 임학태. 1996. 산마늘 인경조직으로부터 식물체 재분화, Korean J. Plant Tissue Culture 23(2):123-127.
- 이은모, 김현숙, 함인기, 이영복. 1996. 우량마늘 유식물체 재분화시 배지 물리성 및 성장조절물질의 효과. Korean J. Plant Tissue Culture 23(6):333-337.
- Luthar Z, and Bohance B. 1999. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. Plant Cell Reports 18(10):797-802.
- Mohamed MF, Coyne DP, and Read PE. 1993. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolous vulgaris* L.). J Am Soc Hortic Sci 118 : 158 162
- Myers JM, Simon PW. 1998. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plants. Plant Cell Rep 17 :726 730

- Nagasawa A, Finer J. 1988. Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic. HortScience 23 :1068-1070
- Novak FJ. 1980. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. Z Pflanzenzuecht 84: 250-260
- Novak FJ. 1990. *Allium* tissue culture. In: Rabinowitch HD, Brewster JL (eds) Onion and allied crops, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 233-250
- Okubo H, Sugiharo AN, and Miho N. 1999. Bulbing response of shallot (*Allium cepa* L., var. *ascalonicum* Backer) and *Allium wakegi* Araki to daylength and temperature. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 68:283-285.
- Pandey JG, Suprasanna P, and Rao PS. 1996. Tissue culture and differentiation of garlic (*Allium sativum* L.). Physiol Mol Bio Plant 2 : 179-182
- Phillips GC, Luteyn KJ. 1983. Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures. J Amer Soc Hort Sci 108:948-953
- Pooler MR, Simon PW. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. Euphytica 68 :121-130
- Robert U, Zel J, and Ravnikar M. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic—influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. Scientia Horticulturae 73(4):193-202.
- Robert U, Zel J, and Ravnikar M. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic—influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. Scientia Horticulturae 73(4):193-202.
- Rueb W, Leneman RA, Schilperoort, Hensgens LAM. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oriza sativa* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36:259-264.
- 서상기, 박효근. 1995. Plant regeneration from the culture of garlic root explants. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36(1):31-37.
- 성문석, 한영희, 유창재. 1996. 순원기 배양법에 의한 마늘 기내 다량번식 시험. 경기도농촌진흥원 시험연구보고서. p.428-435.

- Stuart D, Strickland S, and Wallker K. 1987. Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. *HortScience* 22:800-803.
- Shahin EA, Kaneko K. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. *HortScience* 21(2):294-295.
- Tashiro, Y. 1984. Genome analysis of *Allium wakegi* Araki. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 52:399-407.
- Tsuyoshi Tanikawa, Masatoshi Takagi, Masahiko Ichii. 1998. Varietal Differences in Plant Regeneration from Solid and Suspension Cultures in Onion(*Allium cepa* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67(6) : 856-861
- van der Valk P, Scholten OE, Verstappen F, Jansen RC, and Dons JJM. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 30:181-191
- Walkey DGA, Webb MJW, Bolland CJ, and Miller A. 1987. Production of virus-free (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of Horticulture Science* 62(2):211-220.
- Walkey DGA, Webb MJW, Bolland CJ, and Miller A. 1987. Production of virus-free (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of Horticulture Science* 62(2):211-220.
- Xiaoling Y, Barbara MR. 1995. A micropropagation system for hazelnuts(*Corylus* species). *HortScience*. 30(1):120-123.
- Yamazaki H, Hamano M, Yamato Y, and Miura H. 2003. Bulbing response of *Allium* × *wakegi* Araki to temperature experienced prior to bulb formation. *J. Jpn. Soc. Hort. Soc. Hort. Sci.* 72:69-74.
- Yamazaki H, Oi R, Hamano M, Yamato Y, and Miura H. 2000. Inhibition of bulb development of *Allium wakegi* Araki by covering with far-red-intercepting film in summer. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 69:250-254.
- Yamazaki H, Nishijima T, and Koshioka M. 1995. Changes in abscisic acid content and water status in bulbs of *Allium wakegi* Araki through the year. *J. Jpn. Soc. Hort. Soc. Hort. Sci.* 64:589-598.

- Yamazaki H, Nishijima T, Koshioka M, and Miura H. 2001. Changes in carbohydrate concentration in basal leaf sheaths *Allium wakegi* Araki in the relation to bulb development and dormancy. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 70:353-359.
- Yasseen Mohamed-Yasseen, Walter E Splittstoesser, and Richard E. Litz. 1993. In vitro bulb formation and plant recovery from onion inflorescences. HortScience 28(10):1052.
- Yoshikawa T, Asada Y, and Furuya T. 1993. Continuous production of glycosides by a bioreactor using ginseng hairy root culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 460-46.
- Zhang Song and Zhang Qipei. 1995. Studies on propagation in vitro using immature leaf on welsh onion. Acta Horticulture Sinica. 22(2):161-165.
- Zheng SJ, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Krens FA, and Kik C. 1998. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. Plant Cell Tissue & Organ Culture 53(2):99-105.
- Zheng SJ, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Krens FA, and Kik C. 1998. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. Plant Cell Tissue & Organ Culture 53(2):99-105.
- Zheng SJ, Henken B, Sofiari E, Keizer P, Jacobsen E, Kik C, and Krens F. 1999. Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures *Allium cepa* L. Euphytica 108(2):83-90.
- Zheng SJ, Henken B, Sofiari E, Keizer P, Jacobsen E, Kik C, and Krens F. 1999. Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures oc *Allium cepa* L. Euphytica 108(2):83-90.