



등록특허 10-2242581



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월20일

(11) 등록번호 10-2242581

(24) 등록일자 2021년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 4/00 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A01H 4/005 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2018-0165010

(22) 출원일자 2018년12월19일

심사청구일자 2018년12월19일

(65) 공개번호 10-2020-0076167

(43) 공개일자 2020년06월29일

(56) 선행기술조사문헌

KR1019990031523 A*

KR1020090070753 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

대한민국

(72) 발명자

양은영

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

박은준

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 유진오

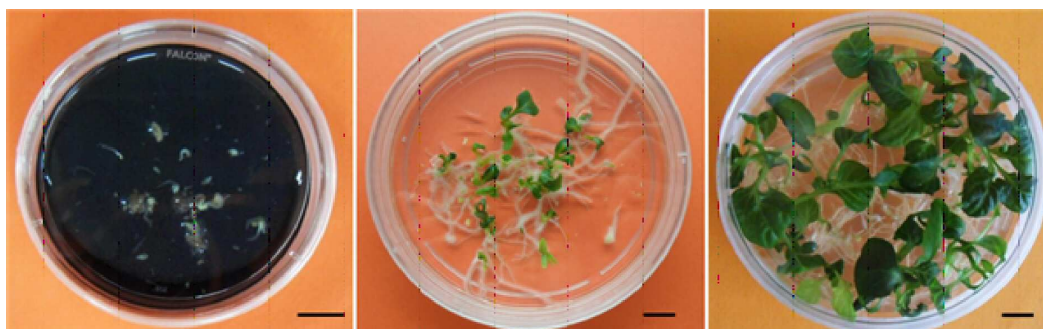
(54) 발명의 명칭 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 소포자 유래 반수체 또는 배가반수체 식물체를 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의해 재분화율을 높여 식물체를 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 2-step 재분화에 의해 식물체를 생산하는 방법은 재분화 배지에 옮긴 다음 다시 한번 새로운 재분화 배지에 옮겨서 배양하는 2-step 재분화에 의해 자엽의 전개 및 본엽의 정상적 발달을 확실하게 유도하여 재분화율을 상승시키는 효과가 있으며, 이로부터 소포자 유래 반수체 및 배가반수체를 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01H 4/001 (2021.01)

A01H 4/008 (2013.01)

C12N 5/0025 (2013.01)

(72) 발명자

채수영

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

조명철

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

남춘우

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

이선영

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

문지혜

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

김상규

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

이옥진

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

김대현

전라북도 완주군 이서면 농생명로 100

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213003-05-2-SBd10

부처명 농식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 GSP 채소종자사업단

연구과제명 고추 육종 효율성 향상을 위한 육종소재 개발 및 보급

기 여 율 1/1

과제수행기관명 국립원예특작과학원

연구기간 2017.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a). 고추 꽃봉오리에서 채취한 약을 치상하고 배양하는 과정 중 터져나온 소포자가 발달하여 얻어진 소포자 유래의 배를 재분화 배지(1)에 이식하여 2주간 암배양하므로 정상 자엽배를 획득하는 제1단계 재분화와,
- b). 상기 제1단계 재분화에서 배의 발달 형태가 심장형 자엽배 형태가 되었을 때, 심장형 자엽배를 재분화 배지(2)에 옮겨 6주간 배양하여 식물체를 생산하는 제2단계 재분화를 포함하는 것을 특징으로 하는 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 식물체 생산방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 배지(1)과 배지(2)가 각각 1/2MS+2% sucrose+0.4% Phatagel 로 조성되는 것을 특징으로 하는 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 식물체 생산방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 제1단계 재분화는 배지(1)의 배양용기가 100x20mm 인 것을 특징으로 하는 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 식물체 생산방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 제2단계 재분화는 배지(2)의 배양용기가 100x40mm인 것을 특징으로 하는 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 식물체 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 고추 shed 소포자 배양을 이용한 식물체 생산방법에 관한 것이며, 구체적으로는 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의해 재분화물을 얻어 소포자 유래 반수체 또는 배가 반수체 식물체를 생산하는 방법에 관한 것이다

배경 기술

- [0002] 반수체 식물의 유전자는 쌍으로 존재하지 않으므로 우성과 열성의 관계가 없어지고 모든 형질이 그대로 나타나므로 이러한 반수체 식물체로부터 돌연변이체나 형질전환체를 선발하게 되면 우성-열성관계로 나타나지 못하던 유용한 열성인자를 가진 식물체를 선발할 수 있다.
- [0003] 종래에는 반수체를 획득하는 방법으로 주로 약배양(꽃밥배양, anther culture)이 이용되어 왔으며 각 연구기관 및 종묘회사 자체적으로 배양법을 확립하여 현재 약배양을 이용한 상업용 품종 보급이 이루어지고 있으나 고추의 경우 효율이 낮고 체세포 유래 2배체 형성이 많다는 것이 가장 큰 문제라고 할 수 있다. 한편 유채에서 소포자 배양에 의해 다량의 배를 획득하는 것이 가능해지면서 많은 식물에서 소포자 배양(microspore culture)에 관한 연구들이 이루어지고 있다.
- [0004] 소포자 배양(microspore culture)으로부터 얻어진 배(embryo)는 재분화에 의해 식물체로 전환되는데 배의 질(embryo quality)에 따라 재분화 비율이 달라지며 고추 shed 소포자 배양시 유기된 배로부터 식물체가 재분화되는 과정에서 자엽이 전개되거나 본엽이 발달하는 정상적인 과정을 거치지 못하고 배가 비대해지면서 노화되는 현상이 반복되는 문제점이 발생하고 있다.
- [0005] 고추의 경우 소포자 유래의 배와 식물체를 획득하기 위한 방법에 관한 선행기술로 예를 들면, 최근에는 shed-microspore culture를 통해 다수의 배와 식물체를 획득할 수 있게 되었으며(Supena et al. 2006), 비특허문헌1

에는 고추의 정상 배아 생산을 증가시키기 위한 shed - 소포자 배양에 대한 개선점을 기재하고 있으며, 특허문헌1에는 고추의 소포자를 배양함에 있어서, 고추 꽃봉오리에서 채취한 약을 블랜딩한 후 볼텍싱하여 소포자를 나출시키고, 나출된 소포자에서 체세포조직 파편들을 제거한 후 원심분리하여 소포자만을 수확한 다음, 상기 수확된 소포자를 전처리 배지에 치상하여 32℃에서 3일간 전처리하고, 상기 전처리된 소포자를 NLN 배지에 80,000~100,000 소포자/㎖의 밀도로 치상하고 난 1일 후, NLN 배지를 새로이 첨가하고 27℃의 암상태에서 3~4주 배양하여 배를 획득하는 방법에 의한 고추의 정상 배 생산방법을 개시하고 있다.

[0006] 또 특허문헌2에는 고추의 소포자 배양(microspore culture)으로부터 얻어진 성숙 또는 미성숙 자엽배(cotyledonary embryo)를 재분화 배지에 이식하여 배양하는 단계를 포함하는 고추의 소포자 배로부터 식물체를 생산하는 방법으로서, 상기 재분화 배지는 성숙 자엽배의 경우 2% 수크로스가 포함되어 있으며, phytigel 0.4%가 첨가된 1/2MS 또는 NN 배지를 사용하고, 미성숙 자엽배의 경우 2% 수크로스가 포함되어 있으며, phytigel 0.4%가 첨가된 1/2 MS 배지를 사용하며, 미성숙 자엽배의 재분화 배지로의 이식은 소포자배양 후 3 주 된 배를 이식하며, 상기 재분화 배지는 재분화 용기에 포함되며, 상기 재분화 용기는 지름x높이가 10x4 cm인 배양 접시를 사용하는 것을 특징으로 하는 고추의 소포자 배로부터 식물체를 생산하는 방법을 개시하고 있다.

[0007] 본 발명의 발명자는 고추 shed 소포자 배양시 유기된 배로부터 식물체가 재분화되는 과정에서 자엽이 전개되거나 본엽이 발달하는 정상적인 과정을 거치지 못하고 배가 비대해지면서 노화되는 현상이 반복되는 문제점을 해결하고, 재분화율이 상승하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-0736150 B

(특허문헌 0002) KR 10-0952103 B

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) E.D.J. Supena. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper. Scientia Horticulturae Volume 130, Issue 4, 31 October 2011, Pages 769-774

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 고추 shed 소포자 배양에 의해 식물체를 생산하는 방법의 제공에 관한 것이며, 보다 상세하게는 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의해 재분화율을 높여 소포자 유래 반수체 또는 배가 반수체 식물체를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에서 과제의 해결수단으로 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 식물체 생산방법은 고추 꽃봉오리로부터 채취한 약을 배양하여 나출된 소포자 유래 배를 재분화 배지(1)에서 배양한 다음, 다시 재분화 배지(2)에 옮겨 배양하는 2-step 재분화에 의해 식물체를 생산하는 것을 포함하며 이로부터 소포자 유래 반수체 또는 배가 반수체 식물체를 생산하는 것으로 이루어진다.

[0012] 본 발명에 따른 일 실시형태로 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의한 식물체 생산방법은 a). 고추 꽃봉오리에서 채취한 약을 치상하고 배양하는 과정 중 터져나온 소포자가 발달하여 얻어진 소포자 유래의 배를 재분화 배지(1)에 이식하여 정상 자엽배를 획득하는 제1단계 재분화와 b). 상기 제1단계에서 획득한 배를 재분화 배지(2)에 옮겨 배양하는 제2단계 재분화에 의해 식물체를 생산하는 것을 포함하는 것으로 이루어진다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 2-step 재분화에 의해 식물체를 생산하는 방법은 소포자 유래 배 발생 후 재분화 배지에 옮기고 배지의 교체없이 배양하는 기존의 방법에 비해, 재분화 배지에 옮긴 다음 다시 한번 새로운 재분화 배지에 옮겨서 배양하는 2-step 재분화에 의해 자엽의 전개 및 본엽의 정상적 발달을 확실하게 유도하여 재분화율을 상승시키는 효과가 있으며, 이로부터 소포자 유래 반수체 및 배가반수체를 대량으로 생산하는 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 2-step 재분화 방법에 의한 식물체의 영상물
 도 2는 본 발명의 2-step 재분화 방법과 기존 1-step 재분화방법에 의한 식물체의 영상물
 도 3은 고추 소포자 유래 반수체 및 배가반수체 식물체의 영상물

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하에서는 실시를 위하여 구체적인 내용, <실시예> 및 <비교예>를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하기로 하며 아래 기재된 사항에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 상기한 본 발명에 따른 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의해 식물체를 생산하는 방법은 a). 고추 꽃봉오리에서 채취한 약을 치상하고 배양하는 과정 중 터져나온 소포자가 발달하여 얻어진 소포자 유래의 배를 재분화 배지(1)에 이식하여 정상 자엽배를 획득하는 제1단계 재분화와 b). 상기 제1단계 재분화에서 획득한 배를 재분화 배지(2)에 옮겨 배양하여 식물체를 생산하는 제2단계 재분화를 포함하는 것으로 이루어진다.
- [0017] 본 발명에 따른 상기 제1단계 재분화는 고추 꽃봉오리에서 채취한 약을 배양한 후 열개된 약으로부터 배지로 터져 나온 소포자를 6주 정도 배양하여 배를 얻는 고추 shed 소포자 배양방법(shed- microspore culture)에 의해 수득한 배를 1차적으로 재분화 배지(1)에서 배양하는 재분화단계이다.
- [0018] 상기 shed 소포자 배양방법(shed-microspore culture)는 꽃봉오리에서 채취한 약을 배양하여 소포자를 나출시키고 나출된 소포자를 배지에서 6주 배양하여 배 수득하는 방법으로써 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 기술로 쉽게 채용할 수 있으므로 구체적인 설명은 생략한다.
- [0019] 본 발명의 1차적으로 재분화 배지(1)에서 배양하는 재분화 단계는 약을 배양하여 나출시킨 소포자를 액체배지에서 6주 배양하여 얻어진 소포자유래 배를 재분화배지(1)가 수용된 100x20mm의 배양용기에 옮긴 후, 액체배지를 제거하고 2주 배양하는 것으로 이루어지며, 상기 본 발명에 따른 재분화 배지(1)은 1/2MS+2% sucrose+0.4% Phatagel로 조성된다.
- [0020] 상기 shed-소포자 배양은 소포자 배양기간이 6주이며, 비교적 긴 액체배지에서 오랜 시간 소포자 또는 소포자유래 배가 침지된 상태로 배양이 되기 때문에 재분화에 영향을 미칠 수 있으므로 Shed-소포자 배양 유래의 배를 정상 식물체로 재분화시키기 위해서는 배양용기 크기가 기존에 사용하던 100x40mm의 용기는 적합하지 않다.
- [0021] 본 발명에서는 6주 배양 후 발생한 소포자 배를 기존의 용기에 비하여 크기가 작은 100x20mm의 배양용기에서 배양하고, 2-step 재분화를 병용함으로써 재분화율의 상승효과를 달성한다.
- [0022] 본 발명에 따른 상기 제1단계 재분화에서 획득한 배를 재분화 배지(2)에 옮겨 배양하여 식물체를 생산하는 제2단계 재분화는 상기 제1단계 재분화에서 배가 자엽이 전개되거나 심장형, 자엽배의 형태로 변화하면 기립된 배를 선발하여 재분화 배지(2)가 수용된 100x40mm의 배양용기에 옮겨 6주 배양하는 것을 포함하여 정상 식물체로 발달하는 것으로 이루어지며, 상기 재분화배지(2)는 1/2MS+2% sucrose +0.4% Phatagel로 조성된다.
- [0023] 그리고 본 발명에 따른 고추재배방법은 상기 제2단계 재분화에 의해 발달된 식물체를 멸균된 상토에 이식하고, 25℃에서 광상태로 1 ~ 2주 적응시킨 후, 조금씩 공기를 순환시켜 주고 점차 개방하면서 6주 동안 생육하며 순화한 후, 순화를 마친 식물체는 25cm직경의 화분에 옮겨 온실에서 생육하는 것으로 이루어진다.
- [0024] 아래에서는 <실시예> 및 <비교예>를 통하여 본 발명의 고추 shed 소포자 배양에 의해 얻어진 배로부터 2-step 재분화에 의해 식물체 생산방법과 고추를 생산하는 방법에 대하여 보다 구체적으로 설명한다.
- [0025] <실시예 1> Shed-소포자 배양

[0026] -꽃봉오리 채취 및 멸균

[0027] 후기 1핵성 소포자에서 초기 2핵성 화분이 포함된 고추 약의 상태는 꽃받침과 꽃잎이 1:1 비율을 갖는다. 적정 단계의 HSM003과 HSM005 고추품종의 꽃봉오리를 열어 약의 착색 정도를 확인하고, 50%가 보라색으로 변한 꽃봉오리를 채취하여 4℃에서 하루 동안 보관한 꽃봉오리를 2% NaOCl 용액의 멸균수에 10분간 침지시킨 후 멸균수로 꽃봉오리를 3회 세척하여 꽃봉오리를 멸균하였다.

[0028] -약치상 및 전처리

[0029] 60x15mm petridish를 사용하여 상기 멸균된 꽃봉오리를 절개하고 꽃잎을 벗긴 후 약을 적출하여 Maltose가 2% 포함된 NN 고체배지에 치상한 다음, NN 액체배지 1.5ml를 분주한다. 이후 전처리로 9℃에서 1주일 저온처리 한다(배지조성은 아래 [표 1] 참조).

[0030] -약 배양

[0031] 상기 전처리 한 다음, 액체배지 1.5ml를 추가하고, 배양실로 옮겨 28℃에서 6주간 암배양하였다.

표 1

고체배지	액체배지
Nitsch medium+2% maltose+1% activated charcoal+0.4% Phatagel pH 5.8로 조정 후 고압멸균	Nitsch medium + 2% maltose, pH 5.8로 조정 후 필터 멸균

[0033] <실시예 2> 제1 및 제2단계 재분화

[0034] -제1단계 재분화

[0035] 상기 <실시예 1>에서 6주 배양하여 수득한 배를 1/2MS+2% sucrose+0.4% Phatagel 로 조성된 배지(배지1)가 25 ml 수용된 100x20mm의 배양용기에 옮겨 액체배지를 제거하고, 2주동안 암배양하여 정상자엽배로 발달시킨다.

[0036] -제2단계 재분화

[0037] 상기 제1단계 재분화에서 배의 발달형태가 심장형, 자엽배 형태로 변화하면 1/2MS+2% sucrose+ 0.4% Phatagel 로 조성된 배지(배지2)가 100ml 수용된 100x40mm의 배지용기에 의해 6주간 배양하여 제2단계 재분화에 따라 식물체로 발달시키며, 고추 shed-소포자 배양 후 2-step 재분화 방법을 이용한 정상식물체로 발달한 결과를 [도 1]으로 나타내었다.

[0038] <비교예 1>

[0039] 본 발명에 따른 2-step 재분화방법에 대한 재분화율의 비교를 위하여 HSM003과 HSM005 고추품종을 대상으로 배양 6주된 소포자 배를 일반적인 재분화 배양용기(100x40mm)에 이식하여 1-step방법으로 재분화하는 기존의 방법과 상기 <실시예 2>에 기재된 2-step 재분화방법에 따라 재분화를 실시하고 재분화율을 비교한 결과를 아래 [표 2] 및 [도 2]으로 나타내었다.

<실시예 2>와 <비교예>의 배양한 총 기간은 14 주로 동일하다.

표 2

Genotype	Redifferentiation method	No. of Embryo	No. of Redifferentiated plantlet	Redifferentiation rate(%)
HSM003	1-step	26.7±4.9	1.0±1.7	3.3±5.8
	2-step	117.0±36.8	72.0±39.6	59.1±15.3
HSM005	1-step	27.3±0.6	2.7±0.6	9.8±2.3
	2-step	159.0±66.9	127.3±71.0	77.4±10.1

[0041] 상기 [표 2]에 나타난 바와같이 을 통한 식물체 생산시 품종 간에 차이는 있지만 HSM003, HSM005 두 품종 모두 재분화율이 매우 높아지는 것을 알 수 있으며, HSM003 품종은 기존 1-step 재분화 배양방법에 따른 재분화율이 3.3%인데 비하여, 2-step 재분화 배양방법에 따른 재분화율은 59.1%이고, HSM005 품종은 기존 1-step 재분화 배양방법에 따른 재분화율이 9.8%인데 비하여, 2-step 재분화 배양방법에 따른 재분화율이 77.4%인 것을 알 수 있

으므로 본 발명에 따른 2-step 재분화방법에 의한 재분화 효율이 크게 상승한 것을 확인할 수 있다.

[0042]

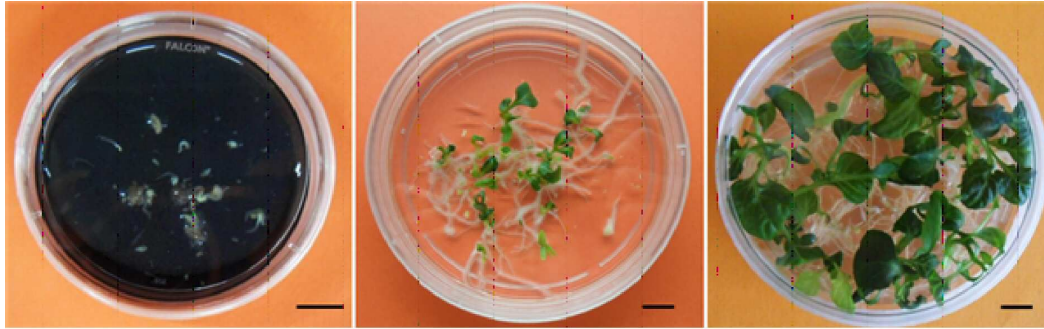
<실시예 3> 고추재배

[0043]

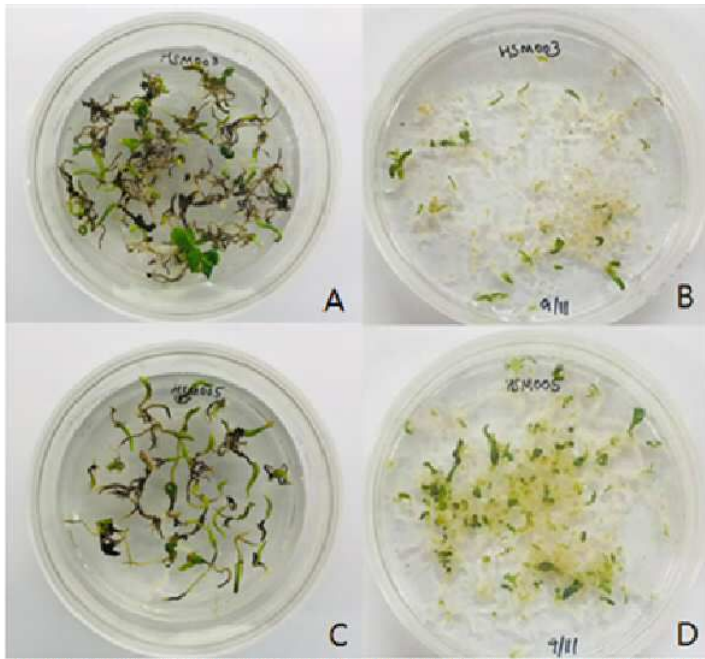
상기 <실시예 2>에 따른 식물체를 멸균된 상토에 이식한 다음, 25℃에서 1 ~ 2주 적응기간 후 조금씩 공기순화를 해제하고 점차 개방하여 6주동안 생육하며 순화하고, 기 순화를 마친 식물체를 직경 25cm의 화분에 옮겨 온실에서 생육하였다

도면

도면1



도면2



A: HSM003 기존방법 재분화 배양, B: HSM003, 2-Step 재분화 배양
C: HSM005 기존방법 재분화 배양, D: HSM005, 2-Step 재분화 배양

도면3

