

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0024767 (43) 공개일자 2014년03월03일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A01H 5/00</i> (2006.01) <i>C12N 5/04</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0091413 (22) 출원일자 2012년08월21일 심사청구일자 2012년08월21일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 이아칸누시바네산 경상남도 진주시 내동면 내동로219번길 15-2 1층 5호 정병룡 경상남도 진주시 신안들말길10번길 15 (74) 대리인 김종석

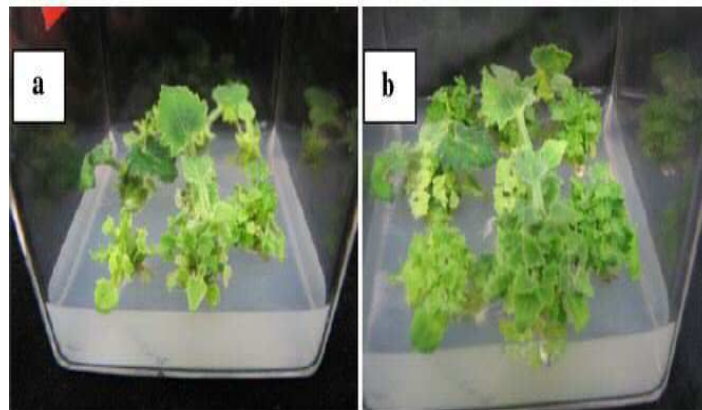
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법에 관한 것으로, 그 구성은, 질산 암모늄(NH_4NO_3)를 제거한 MS배지에서 시네라리아 절편체를 배양하고, 상기 배양은, 10℃ 내지 20℃에 이루어지며, 상기 MS배지에, 1.5 내지 2.5mg/L 6-벤질아데닌(benzyladenine(BA))와 0.1 내지 1.0mg/L α -나프탈렌 아세트릭 엑시드(naphthalene acetic acid(NAA))을 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

질산암모늄(NH_4NO_3)를 제거한 MS배지에서 시네라리아 절편체를 배양하는 것을 특징으로 하는 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 배양은,

10℃ 내지 20℃의 온도에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 MS배지에,

조절제로,

1.5 내지 2.5mg/L 6-벤질아데닌(benzyladenine(BA))를 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 MS배지에,

조절제로,

0.1 내지 1.0mg/L α -나프탈렌 아세트릭 애시드(naphthalene acetic acid(NAA))를 더 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 시네라리아에서의 청색 변이식물체의 유도 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 시네라리아 배양배지를 개량하여 시네라리아에서 청색 변이식물체를 유도하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 시네라리아는 지중해 카나리섬 원산의 국화과 초화로서 원산지에서는 다년초이지만 재배습성상 추파 일년초로 취급한다.

[0003] 꽃에 향기는 없지만 수십개의 꽃이 한꺼번에 피어 1개월정도 지속된다. 재배기간이 비교적 짧고 저온에서 잘 자라는 분화식물로서 주로 화분상태로 관상하지만 화분을 한곳에 집결시켜 평면적으로 선이나 원을 그리며 배치하면 새로운 분위기를 창출한다.

[0004] 잎은 머위잎을 닮은 넓은 난형이며 줄기는 곧게 자라고 그 끝에 꽃대가 분지되어 핀다. 원종은 자주빛이 나는 붉은 꽃이었으나 품종개량에 의해 현재는 적색, 분홍색, 보라색, 백색 등 여러가지 색이 있으며 또 꽃잎의 끝에 색갈이 있고 기부는 흰색으로 된 굵은 고리모양의 무늬를 이루고 있는 것도 있다.

[0005] 그러나, 시네라리아는 관상가치가 높은 식물이며, 특히 청색의 시네라리아는 지금까지 보고된 바가 없는 희귀한 것인데, 이를 대량으로 유도하는 기술이 없는 문제점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 목적은 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 유전자조작을 하지 않고 청색 변이식물체를 대량으로 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명인 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도 방법은 질산암모늄(NH_4NO_3)을 제거한 MS배지에서 시네라리아 절편체를 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 그리고, 상기 배양의 온도는, 10℃ 내지 20℃인 것을 특징으로 한다.

[0009] 그리고, 상기 MS배지에, 1.5 내지 2.5mg/L 6-벤질아데닌(benzyladenine(BA))와 0.1 내지 1.0mg/L α -나프탈렌 아세트릭 애시드(naphthalene acetic acid(NAA))를 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명인 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도방법에서는 다음과 같은 효과가 있다.

[0011] 질산암모늄을 제거한 MS 배지에서 절편체를 배양하여, 시네라리아에서 청색 변이식물체를 대량으로 증식시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 의한 배지에 의해 시네라리아의 신초가 유도된 모습을 보인 것으로 a는 2주간 배양된 모습을 나타내고, b는 4주간 배양된 모습을 보인 도면.

도 2는 본 발명에 의한 배지에 의해 시네라리아의 신초가 유도된 모습을 보인 것으로 a는 3주간 배양된 모습을 나타내고, b는 5주간 배양된 모습을 보인 도면.

도 3은 본 발명에 의한 배지에 의해 시네라리아의 신초의 변화가 유도된 모습을 보인 도면.

도 4는 본 발명에 의한 배지에 0.1mg/L의 α -나프탈렌 아세트릭 애시드(naphthalene acetic acid(NAA))를 포함시켜 4주 배양한 후의 모습을 보인 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하 본 발명에 의한 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')에서 청색 변이식물체의 유도방법을 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명에 의한 상록성 진달래의 조직배양에 의한 대량 증식방법은, 시네라리아의 신초를 배양시 배지에서 질산암모늄(NH_4NO_3)을 제거하고, 온도를 조절하여 유도할 수 있다.

[0015] 보다 구체적으로 설명하면, 시네라리아의 신초를 배양하는 배지를 MS배지((Murashige-Skoog medium)로 사용할 수 있다. 상기 MS배지는 일반적인 식물세포 배양배지이다.

[0016] 상기 MS배지에서 질산암모늄(NH_4NO_3)을 제거할 수 있다. 그리고, 상기 MS배지에 조절제로 1.5 내지 2.5mg/L 6-벤질아데닌(benzyladenine(BA))를 첨가할 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 6-벤질아데닌(benzyladenine(BA))을 2.0mg/L를 첨가할 수 있다.

[0017] 상기 6-벤질아데닌(benzyladenine(BA))는 식물생장조절물질(plant growth regulator)로서 유기물로 된 화학적 정보전달체로서 식물의 생장과 노화를 제어하는 역할을 한다.

[0018] 그리고, 상기 MS배지에 조절제로 0.1 내지 1.0mg/L α -나프탈렌 아세트릭 애시드(naphthalene acetic acid(NAA))를 첨가할 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 α -나프탈렌 아세트릭 애시드(naphthalene acetic acid(NAA))를 0.5mg/L를 첨가할 수 있다.

[0019] 상기 α -나프탈렌 아세트릭 애시드(naphthalene acetic acid(NAA))는 식물의 신장에 관여하는 식물생장조절물질의 일종으로, 줄기 및 뿌리의 성장을 촉진하고 식물의 굴광성에 영향을 주는 역할을 한다.

[0020] 그리고, 상술한 바와 같이 조절된 MS배지에 본 발명의 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')의 절편체를 치상한다. 그리고, 상기 배양배지를 10℃ 내지 20℃의 온도에서 배양한다. 보다 바람직하게는 상기 배양배지를 15℃에서 배양할 수 있다.

[0021] 이상과 같은 방법으로 배양하면, 시네라리아의 잎과 줄기는 청색으로 변화고, 최대 67.5%의 변이율을 나타낸다.

[0022] [실험예]

[0023] 살균단계

[0024] 시네라리아(품종명 '도쿄 다루마')의 종자를 70%(v/v) 에탄올에 30초 동안 세척한다. 그리고 2.0%(v/v) 하이포염소산나트륨에 10분 동안 세척한다. 그리고, 증류수에 4번 정도 세척한다.

[0025] 배양단계

[0026] 상기 세척된 종자를 3%(w/v) 수크로스와 0.8%(w/v)를 포함하는 MS배지에 치상하여, 24℃ 내지 26℃의 온도에서 16시간의 광주기로 배양한다. 그리고, 15일 성장한 종자에서 절편을 채취한다.

[0027] 신초 배양 단계

[0028] 절편을 MS배지에서 배양한다. 상기 배지는 0, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0mg/L 2-이소펜틸 아데닌(2-iP), 6-벤질아데닌(BA) 및 키네티ن(Kn) 중 하나 또는 둘 이상의 혼합에 0.1, 0.5mg/L α -나프탈렌아세트릭 애시드(NAA)를 혼합물이 더 포함되어 있다.

[0029] 상기 배지의 pH는 5.7로 유지하다가, 121℃에서 15분동안 오토클레이빙한다. 그리고, 15 또는 24 내지 26℃에서 16시간 동안 배양한다. 이때 백색광을 이용한다. 그러면, 증식하기 시작하는데, 신초로 번식하기 시작하는 유도율과, 5주 후의 신초의 수를 기록하였다.

표 1

농도(mg/L)	신초 유도			신초의 수		
	2-iP	BA	Kn	2-iP	BA	Kn
0	62.0c	62.0e	62.0d	1.0d	1.0e	1.0c
0.5	68.0b	73.6d	60.4d	2.8c	7.8c	4.2b
1.0	73.8ab	79.4c	66.2c	5.3b	10.3b	5.0b
2.0	77.3a	90.0a	73.8b	7.4a	13.5a	5.5b
4.0	72.4ab	87.0b	79.4a	6.0ab	4.5d	7.0a

[0031] (시토키닌의 신초유도와 신초의 수에 대한 영향)

[0032] 표 2에서 보는 바와 같이, 2-이소펜틸 아데닌(2-iP)이 0.5에서 2.0mg/L으로 농도가 증가할 때는 신초유도율도 높아지는 것을 알 수 있지만, 그 보다 농도가 높아지면 감소하는 것을 알 수 있다.

[0033] 그리고, 6-벤질아데닌(BA)은 2.0mg/L 일 때, 신초유도율이 90%로 최고로 높으며, 이때 신초의 수가 13.5개씩 나타난다. 한편, 6-벤질아데닌(BA)이 4.0mg/L로 높아지면, 신초유도율과 신초의 수가 줄어드는 경향을 나타낸다.

[0034] 그리고, 키네티(Kn)의 농도가 높아질수록, 신초유도율과 신초의 수는 함께 증가하는 것을 알 수 있다.

[0035] 결과적으로, 표 1에서는 6-벤질아데닌(BA)의 농도의 변화가 신초유도율과 신초의 수의 변화에 지대한 영향을 미치므로, 6-벤질아데닌(BA)와 α -나프탈렌아세트 에시드(NAA)의 농도 사이의 상관관계를 표 2에서 살펴보았다.

표 2

농도(mg/L)		신초유도(%)	신초의 수
BA	NAA		
1.0	0.1	86.4c	17.8d
2.0	0.1	93.0b	28.0c
1.0	0.5	92.6b	32.8b
2.0	0.5	98.4a	42.3a

[0037] (BA와 NAA의 농도를 달리했을 때, 신초유도와 신초의 수에 대한 영향)

[0038] 상기 표 2에서는 6-벤질아데닌(BA)과 α -나프탈렌아세트 에시드(NAA)의 농도를 달리했을 때, 신초유도와 신초의 수의 변화를 나타낸 것으로, 6-벤질아데닌(BA)의 농도가 2.0mg/L이고, α -나프탈렌아세트 에시드(NAA)의 농도가 0.5mg/L일 때, 신초유도율은 98.4%이고, 신초의 수는 42.3개씩으로 도 1의 a와 b에서와 같이 최고의 값을 나타낸다.

[0039] 염화암모늄의 농도에 따른 영향

[0040] 계대 배양시 MS배지에 2.0mg/L BA, 0.5mg/L NAA 를 포함시키고, 염화암모늄(NH_4NO_3)을 0, 412.5, 825, 1650mg/L 를 포함하여 각각 배양하였다. 이 배양은 15 또는 24 내지 26℃에서 16시간 동안 배양한다. 이때 백색광을 이용한다. 그러면, 증식하기 시작하는데, 청색으로 변형되어 번식하기 시작하는 변이율과, 5주 후의 청색으로 변형되어 번식하는 수를 표 3에서와 같이 기록하였다.

표 3

NH_4NO_3 (mg/L)	체세포 변이	변이신초의 수
0	67.5a	3.0a
412.5	32.7b	1.8b
825.0	13.2c	1.5b
1650	0d	0c

[0042] (NH_4NO_3 의 농도를 달리했을 때 청색변이에 대한 영향)

[0043] 표에서는 나타나지 않았지만, 염화암모늄(NH_4NO_3)의 농도가 작아질수록 신초의 수는 작아지는 것을 알 수 있다. 그러나, 25℃가 아닌 15℃에서의 배양에서 체세포 변이가 발생되는 것을 확인할 수 있다.

[0044] MS 배지(2.0mg/L BA, 0.5mg/L NAA 를 포함)에서 염화암모늄(NH_4NO_3)을 최대로 제거했을 때, 표 3에 나타난 바와

같이, 67.5%의 수율을 나타낸다. 이때, 변이신초의 수는 3.0개씩으로 나타났다. 이는 도 3의 a와 b에서 알 수 있다.

[0045] **계대 배양 및 발근 단계**

[0046] 다수개의 신초 중 마이크로신초를 분리하여 MS 배지에 성장과 발근을 위한 계대 배양을 한다. 이때 상기 배지에는 0, 0.1, 1.0 mg/L α -나프탈렌아세트산(NAA)이 포함된다. 이 배양은 15 또는 24 내지 26℃에서 16시간 동안 배양한다. 이때 백색광을 이용한다. 그리고, 발근을 시작할 때 신초의 길이와 신초들의 개수를 기록하고, 4주 후에 신초 당 뿌리의 수를 기록하여 표 4에서와 같다.

표 4

[0047]

NAA(mg/L)	신초의 길이	발근유도	발근/신초의 수	뿌리의 길이
0	3.0b	87.3b	6.3b	3.6b
0.1	4.1a	100a	10.8a	6.2a
1.0	3.9a	100a	3.1c	3.0b

[0048] (NAA의 농도를 달리했을 때, 신초의 성장과 발근에 대한 영향)

[0049] 표 4에서와 같이, α -나프탈렌아세트산(NAA)의 농도가 신초의 성장과 발근에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 발근의 길이와 유도율의 최고치는 α -나프탈렌아세트산(NAA)의 농도가 0.1mg/L일 때이다.

[0050] 그리고, α -나프탈렌아세트산(NAA)의 농도가 1.0mg/L일 때, 신초의 발근의 수가 작아지고, 신초에 캘러스를 유도한다.

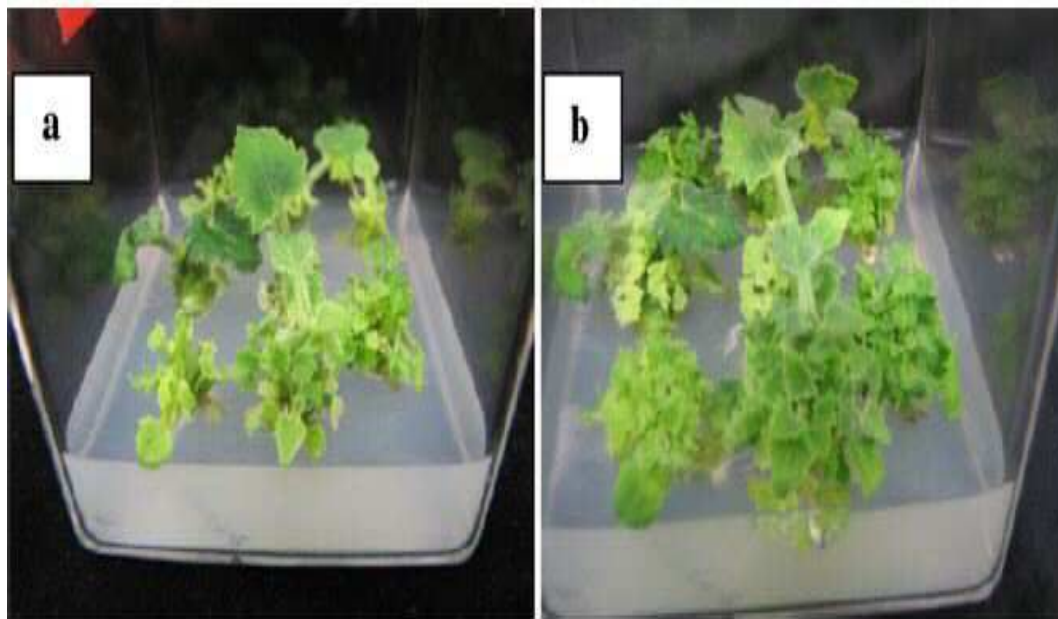
[0051] **순화단계**

[0052] 그리고, 발근이 이루어지면, 증류수로 세척 후 분에 옮겨 심고, 격일로 1/4배의 MS 배지에 관개되도록 한다. 그리고, 4주 후에 생존한 식물의 개수를 기록한다. 그리고, 4주 후에 플랜트렛(plantlet)들의 99%는 도 5의 b에서와 같이 모두 생존해 있으며, 다른 형태적인 변화는 보이지 않는다.

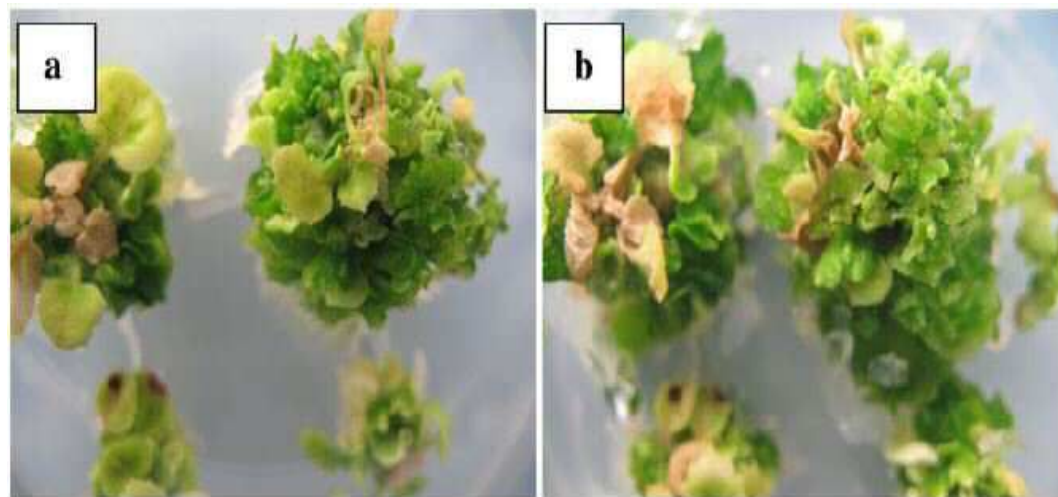
[0053] 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

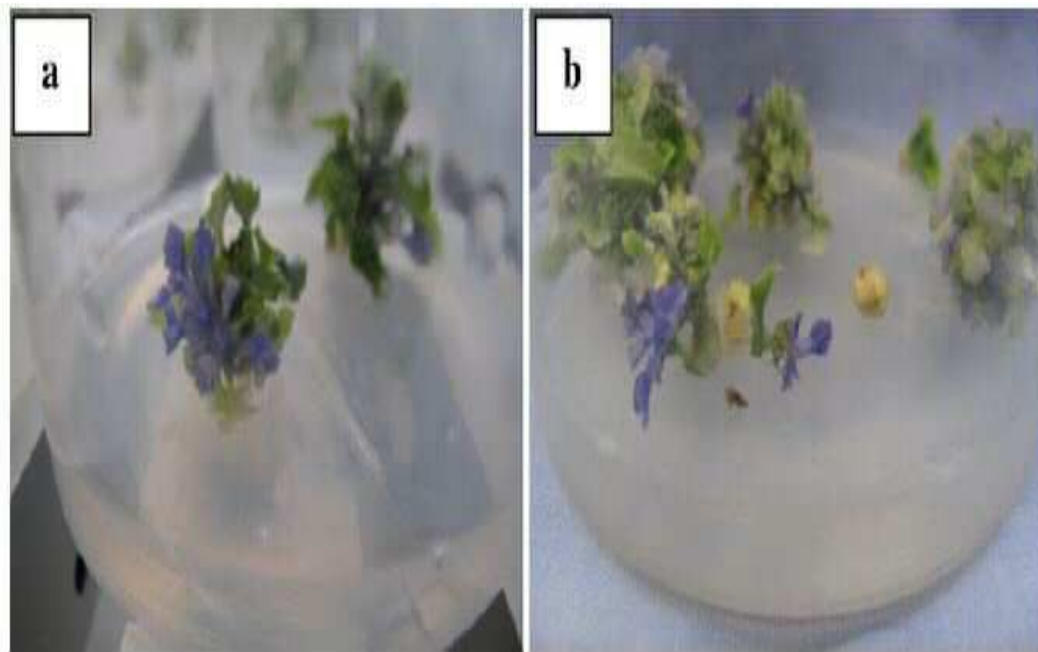
도면1



도면2



도면3



도면4

