

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0124492 (43) 공개일자 2014년10월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A01H 4/00</i> (2006.01) <i>C12N 5/04</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0042061 (22) 출원일자 2013년04월17일 심사청구일자 2013년04월17일	(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

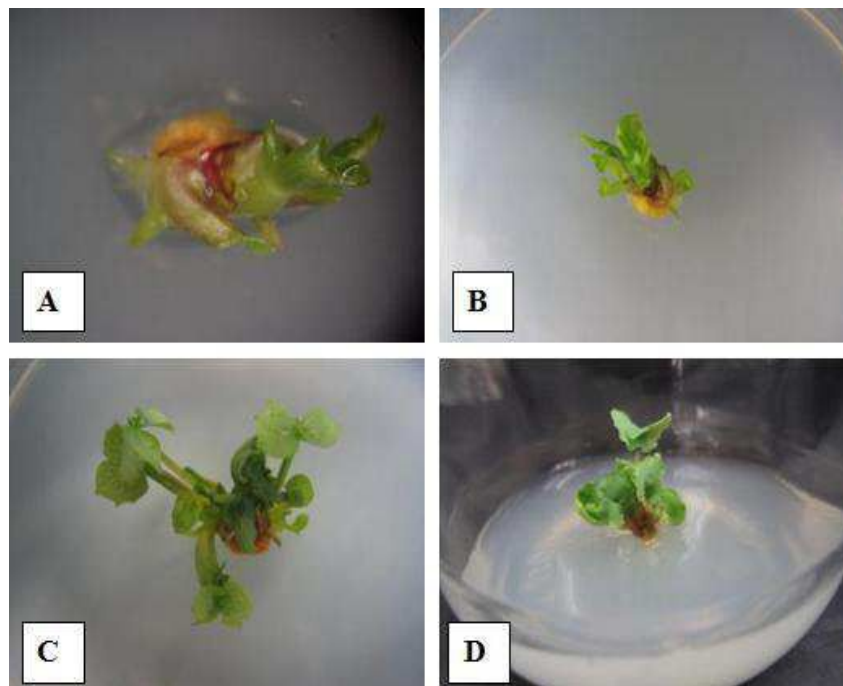
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **깽깽이풀의 기내번식 방법**

(57) 요약

본 발명은 깽깽이풀의 기내번식 방법에 관한 것으로, 그 구성은, 멸균처리한 깽깽이풀의 동지아로부터 절편체를 분리하는 제 1단계와, 상기 분리된 절편체를 나프탈렌 아세트릭 애시드(Naphthalene acetic acid, NAA)와, 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)가 첨가된 N6배지에 치상하여 신태로 배양하는 제 2단계를 포함하여 구성될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

평균처리한 깻깻이풀의 동지아로부터 절편체를 분리하는 제 1단계; 및

상기 분리된 절편체를 나프탈렌 아세트릭 애시드(Naphthalene acetic acid, NAA)와, 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)가 첨가된 N6배지에 치상하여 신허로 배양하는 제 2단계;를 포함하여 구성되는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

제 2단계에서,

상기 나프탈렌 아세트릭 애시드(Naphthalene acetic acid, NAA)는 0.1mg/L 이고, 상기 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)는 0.25 내지 2.0mg/L인 것을 특징으로 하는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

청구항 3

평균처리한 깻깻이풀의 떡잎으로부터 절편체를 분리하는 제 1단계; 및

상기 분리된 절편체를 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)가 첨가된 N6배지에 치상하여 신허로 배양하는 제 2단계;를 포함하여 구성되는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 제 2단계에서,

상기 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)는 0.25 내지 1.00mg/L인 것을 특징으로 하는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

청구항 5

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

0.1 내지 4.0mg/L의 지베렐린(gibberellic acid, GA₃)가 포함된 N6 배지에서 신허를 신허시키는 제 3단계를 더 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

0.1 내지 0.5mg/L의 나프탈렌 아세트릭 애시드(Naphthalene acetic acid, NAA)가 첨가된 AM배지, MS배지, N6배지 및 WPM배지 중 어느 하나의 배지에서 발근시키는 제 4단계를 더 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 배지는 N6배지인 것을 특징으로 하는 깻깻이풀의 기내번식 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 깻깻이풀의 기내번식 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 신허 재분화와 기내발근을 위한 식물생장

조절제를 구명하여 희귀한 관상용 식물인 갯쟁이풀의 기내번식 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 갯쟁이풀은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 매자나무과(Berberidaceae)의 여러해살이풀로 뿌리가 노란색이어서 황련 또는 조선허련이라고도 한다. 꽃은 홍자색으로 4~5월에 꽃이 피는데 아주 관상용으로 가치가 높은 토속식물이다. 또한 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라 다양한 질병을 치료하는데 사용되는 약용식물로서 이용되므로 부가가치가 높다.
- [0003] 갯쟁이풀은 한국과 동남아시아가 원산지이며 현재 멸종 위기식물로 지정하여 보호하고 있다. 서식지 보호를 통하여 멸종을 예방하는 한편 멸종위기의 토속식물을 인공적으로 번식하는 것은 매우 중요한 일이다. 인공증식을 통한 종의 보존을 지속하고자 조직배양 방법을 이용한다.
- [0004] 멸종위기식물은 무분별하게 채취, 반출, 유통이 금지되어 있으므로 식물재료 자체를 공급받기 매우 어려운 상황이었다. 특히 지상부 생육기간이 약 4개월 정도 매우 짧기 때문에 더더욱 식물재료를 확보하는데 많은 어려움이 따랐다.
- [0005] 갯쟁이풀은 종자나 근경의 분열에 의해 일반적으로 번식되는데 영양번식물은 매우 느리며 자연 서식지에서 종자 발아 또한 형태생리학적인 휴면 때문에 매우 부족하다. 그러므로 효율적인 번식 방법은 희귀한 관상용 식물을 보존하기 위해서 필요하다고 본다. 최근 기내배양에서는 희귀한 식물의 보존을 위해 대안책으로 떠올랐다. 몇몇 보고는 매자나무과의 기내번식에 관해서 이용 가능하지만 갯쟁이풀의 기내번식에 관해서는 아직 연구가 이루어지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 따라서, 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 목적은 신초 재분화와 기내발근을 위한 식물생장 조절제를 구명하여 효율적인 갯쟁이풀의 기내번식 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명인 갯쟁이풀의 기내번식 방법의 구성은, 멸균처리한 갯쟁이풀의 동지아로부터 절편체를 분리하는 제 1단계와, 상기 분리된 절편체를 나프탈렌 아세트 에시드(Naphthalene acetic acid, NAA)와, 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)가 첨가된 N6배지에 치상하여 신초로 배양하는 제 2단계를 포함하여 구성될 수 있다.
- [0008] 제 2단계에서, 상기 나프탈렌 아세트 에시드(Naphthalene acetic acid, NAA)는 0.1mg/L 이고, 상기 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)는 0.25 내지 2.0mg/L인 것을 특징으로 한다.
- [0009] 본 발명인 갯쟁이풀의 기내번식 방법의 다른 실시예의 구성은, 멸균처리한 갯쟁이풀의 떡잎으로부터 절편체를 분리하는 제 1단계와, 상기 분리된 절편체를 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)가 첨가된 N6배지에 치상하여 신초로 배양하는 제 2단계를 포함하여 구성될 수 있다.
- [0010] 상기 제 2단계에서, 상기 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)는 0.25 내지 1.00mg/L인 것을 특징으로 한다.
- [0011] 그리고, 0.1 내지 4.0mg/L의 지베렐린(gibberellic acid, GA₃)가 포함된 N6 배지에서 신초를 신장시키는 제 3단계를 더 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 그리고, 0.1 내지 0.5mg/L의 나프탈렌 아세트 에시드(Naphthalene acetic acid, NAA)가 첨가된 AM, MS, N6 및 WPM 중 어느 하나의 배지에서 발근시키는 제 4단계를 더 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 상기 배지는 N6배지인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명인 갯쟁이풀의 기내번식 방법에서는 다음과 같은 효과가 있다.
- [0015] 희귀한 관상용 식물인 갯쟁이풀을 효율적으로 번식시킬 수 있어, 갯쟁이풀의 멸종을 억제할 수 있을 뿐만 아니

라, 깻깻이풀의 생산성 향상에 기여할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명에 의한 깻깻이풀이 티디아주론(TDZ)와 나프탈렌아세트산(NAA)이 첨가된 N6배지에서 배양된 신초를 보인 도면(TDZ농도: 0.5mg/L, NAA농도: 0.1mg/L, A: 7일후, B: 14일후, C: 28일 후, D: 신초신장).
- 도 2는 본 발명에 의한 깻깻이풀의 떡잎이 티디아주론(TDZ)이 첨가된 N6배지에서 직접적 배분화 신초의 성장을 보인 도면(TDZ농도 0.25mg/L, A: 2주후, B: 3주후, C: 4주후, D: 5주후)
- 도 3은 본 발명에 의한 깻깻이풀의 신초가 지베렐린(GA₃)이 첨가된 N6배지에서 4주 후의 신초의 성장을 보인 도면(A: GA₃농도가 1.0mg/L, B: GA₃의 농도가 2.0mg/L)
- 도 4는 본 발명에 의한 깻깻이풀이 나프탈렌아세트산(NAA)이 첨가된 1/2배 N6배지에서 발근모습을 보인 도면(NAA농도: 0.5mg/L, A: 4주후, B: 6주후)
- 도 5는 본 발명에 의한 깻깻이풀이 기외에서 순화하는 모습을 보인 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하 본 발명에 의한 깻깻이풀의 기대번식 방법을 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명에 의한 깻깻이풀의 기대번식 방법은, 깻깻이풀 동지아를 이용한 기내 재분화와 깻깻이풀 떡잎을 이용한 직접적 부정신초 재분화하는 방법으로 구분할 수 있으며, 먼저, 깻깻이풀 동지아를 이용하여 기내 재분화하는 방법에 대해 설명한다.
- [0019] 제 1단계; 멸균처리한 깻깻이풀로부터 절편체를 분리
- [0020] 깻깻이풀의 동지아를 배양을 위한 멸균처리한 후 겹질을 제거한 후 절편체를 배지에 치상한다.
- [0021] 제 2단계; 신초로 배양하는 단계
- [0022] 상기 절편체를 나프탈렌 아세트산(Naphthalene acetic acid, NAA)와 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)이 첨가된 N6배지에 치상하여 신초로 배양한다. 이때, 상기 나프탈렌 아세트산은 0.1mg/L이 첨가되고, 상기 티디아주론(TDZ)은 0.25 내지 2.0mg/L이 첨가될 수 있다.
- [0023] 제 3단계: 신초를 신장시키는 단계
- [0024] 상기 신초를 지베렐린(Gibberellic acid, GA₃)이 첨가된 N6배지에 배양한다. 이때, 상기 지베렐린(GA₃)은 0.1 내지 4.0mg/L의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0025] 제 4단계; 신초를 발근시키는 단계
- [0026] 상기 신초로 유도된 절편체가 2 내지 3cm 정도 신장되면, AM배지, MS배지, N6배지, WPM배지 중 어느 하나의 배지에서 배양할 수 있다. 이때, 상기 신초는 발근이 이루어진다.
- [0027] 보다 발근을 용이하게 이루어지도록 하기 위해, 나프탈렌 아세트산(NAA)을 첨가할 수 있으며, 상기 나프탈렌 아세트산(NAA)은 0.1 내지 0.5mg/L를 첨가할 수 있다.
- [0028] 한편, 본 발명의 다른 실시예인 깻깻이풀 떡잎을 이용한 직접적 부정신초 재분화하는 방법에 대해 설명한다.
- [0029] 제 1단계; 멸균처리한 깻깻이풀의 떡잎으로부터 절편체를 분리

- [0030] 깻깻이풀을 배양을 위한 멸균처리한 후 떡잎의 껍질을 제거한 후 절편체를 배지에 치상한다.
- [0031] 제 2단계; 신토로 배양하는 단계
- [0032] 상기 절편체를 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)이 첨가된 N6배지에 치상하여 신토로 배양한다. 이때, 상기 티디아주론(TDZ)은 0.25 내지 1.00mg/L의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0033] 제 3단계: 신토를 신장시키는 단계
- [0034] 상기 신토를 지베렐린(Gibberellic acid, GA₃)가 첨가된 N6배지에 배양한다. 이때, 상기 지베렐린(GA₃)는 0.1 내지 4.0mg/L의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0035] 제 4단계; 신토를 발근시키는 단계
- [0036] 상기 신토로 유도된 절편체가 2 내지 3cm 정도 신장되면, AM배지, MS배지, N6배지, WPM배지 중 어느 하나의 배지에서 배양할 수 있다. 이때, 상기 신토는 발근이 이루어진다.
- [0037] 보다 발근을 용이하게 이루어지도록 하기 위해, 나프탈렌 아세트 애시드(NAA)를 첨가할 수 있으며, 상기 나프탈렌 아세트 애시드(NAA)는 0.1 내지 0.5mg/L를 첨가할 수 있다.
- [0038] 아래에서는 상술한 깻깻이풀의 기내번식 방법을 구체적으로 실험예를 통하여 상세하게 설명한다.
- [0039] [실험예 1] - 깻깻이풀 동지아를 이용하여 기내 재분화
- [0040] 1. 실험재료 및 멸균 소독방법
- [0041] 깻깻이풀은 멸종위기식물로 보호를 받고 있으므로 식물재료의 확보가 매우 어렵다. 멸종위기식물의 서식지와 보전기관으로 활동하고 있는 기청산식물원에 공식적으로 깻깻이풀을 구매하여 경상대학교 부속온실에서 유지 재배하였다. 무균식물체를 획득하기 위하여 깻깻이풀의 동지아를 채취하여 수돗물에 20분 동안 세척하고 멸균수를 이용하여 2~3회 행구고 무균배양을 위해 70%(v/v) 에탄올(EtOH)에 2분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5% 차아염소산나트륨(NaOCl)에 트윈(Tween) 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 3회 세척하여 멸균 하고 겨울눈의 껍질 2겹을 벗겨냈다. 다시 70%(v/v) 에탄올(EtOH)에 2분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5% 차아염소산나트륨(NaOCl)에 트윈(Tween) 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 3회 세척한 후 남아 있는 2~3겹의 껍질을 제거한 다음 2-이소펜틸 아데닌(2-isopentyl adnine, 2-iP), 벤질아데닌(Benzyladenine, BA), 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)가 여러 가지 농도로 들어 있는 배지에 치상하여 배양하였다.
- [0042] 2. 배양배지
- [0043] Anderson's 배지(AM), Murashige and Skoog 배지(MS), Chu's 배지(N6), 그리고 Woody Plant 배지(WPM)와 같은 여러 가지 배지에 수크로스(sucrose) 3% (w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, 아가(agar) 0.8% (w/v)를 첨가한 후 121에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다. 티디아주론(TDZ)는 필터링후 고압멸균을 실시한 배지에 첨가하였다. 다른 식물생장조절제는 pH를 조절하기 전에 배지에 첨가하였다.
- [0044] 3. 배양환경
- [0045] 배양온도는 25℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 $45 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로

는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

4. 결과

깻깻이풀의 신초 재분화를 위해서 Anderson's 배지(AM), Murashige and Skoog 배지(MS), Chu's 배지(N6), 및 Woody Plant 배지(WPM)에 2-iP, BA, 그리고 티디아주론(TDZ)을 각각 0, 0.25, 0.50, 1.0 및 2.0 mg/L의 농도로 처리 후 멸균된 깻깻이풀의 동지아를 치상하였다. 4주 후 각 처리배지에서 신초 발생율과 절편체당 신초 발생수를 조사하였다(표 1).

표 1

(배지와 시토키닌이 깻깻이풀의 동지아로부터 신초발생율과 신초발생수에 미치는 영향)

농도 (mg · L ⁻¹)		신초발생율 (%)				절편체당 신초 발생수		
		2-iP	BA	TDZ		2-iP	BA	TDZ
AM	0.00	13.2 d ^z	13.2 e	13.2 d		1.0 a	1.0 b	1.0 c
	0.25	15.7 cd	24.4 d	42.6 c		1.0 a	1.0 b	1.0 c
	0.50	18.0 c	30.0 c	56.2 b		1.0 a	1.0 b	1.8 ab
	1.00	40.2 b	47.7 b	60.3 ab		1.0 a	1.0 b	2.0 a
	2.00	46.8 a	59.0 a	62.4 a		1.2 a	1.6 a	1.4 b
MS	0.00	9.8 d	9.8 c	9.8 e		1.0 a	1.0 a	1.0 c
	0.25	10.7 d	14.4 bc	27.6 d		1.0 a	1.0 a	1.0 c
	0.50	16.2 c	19.2 b	53.2 a		1.0 a	1.0 a	1.2 b
	1.00	26.8 b	23.7 a	41.0 b		1.0 a	1.0 a	1.8 a
	2.00	33.0 a	25.2 a	38.0 c		1.0 a	1.2 a	1.6 ab
N6	0.00	24.4 e	24.4 e	24.4 e		1.0 b	1.0 c	1.0 c
	0.25	36.2 d	27.0 d	49.7 d		1.0 b	1.0 c	2.2 b
	0.50	40.0 c	32.4 c	66.3 c		1.0 b	1.0 c	3.8 a
	1.00	48.7 b	54.6 b	78.0 a		1.2 b	1.6 b	3.6 a
	2.00	63.2 a	70.8 a	73.0 b		1.5 a	2.0 a	2.7 b
WPM	0.00	11.0 e	11.0 d	11.0 d		1.0 a	1.0 b	1.0 b
	0.25	16.7 d	19.4 c	24.2 c		1.0 a	1.0 b	1.0 b
	0.50	21.3 c	33.2 b	60.4 a		1.0 a	1.0 b	1.6 a
	1.00	27.8 b	51.6 a	49.4 b		1.2 a	1.2 ab	1.3 ab
	2.00	39.4 a	53.0 a	0.0 f		1.3 a	1.4 a	0.0 d

Means followed by same letters within a column are not significantly different(P≤0.05)

신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수를 조사한 결과 사용한 모든 배지 중 N6 배지에서 가장 높았고, MS배지에서 가장 낮았다. 식물생장조절제 종류별로 살펴보면 티디아주론(TDZ), 벤질아데닌(BA), 2-이소펜틸아데닌(2-iP) 순으로 높게 나타났고, 농도가 높을수록 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수가 높게 나왔다.

하지만 티디아주론(TDZ)를 2.00 mg/L로 처리한 처리구에서는 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수가 줄어든 것을 볼 수 있었는데, 이러한 결과는 티디아주론(TDZ)의 독성 때문에 나타난 것으로 판단된다. 결론적으로 깻깻이풀의 동지아를 절편체로 이용하는 경우 신초 재분화를 위한 배지는 N6배지에 티디아주론(TDZ)를 1.00 mg/L으로 처리한 것이 가장 바람직함을 알 수 있었다.

깻깻이풀의 동지아 절편체를 이용하여 재분화 된 신초를 대량으로 증식하고자 실험을 하였다. 실험 배지는 N6배지에 티디아주론(TDZ)를 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 mg/L의 농도로 넣은 후 각 배지에 0.1 mg/L의 타프탈렌아세틱애시드(NAA)를 첨가 하여 배양하였다.

치상하고 4주 후 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수를 조사하였다. 티디아주론(TDZ)의 농도가 0.50 일 때

가장 높은 신초 발생률(96.2%)과 절편체당 발생된 신초수(7.3개)가 가장 높게 나타났고, 농도가 더 높아질수록 감소하는 경향을 보였다(표 2, 도 1). 그 이유는 역시 TDZ의 독성 때문이라고 생각된다.

표 2

[0054] (TDZ와 NAA의 농도가 N6배지에서 배양된 깽깽이풀의 동지아 절편체로부터 신초발생율과 신초발생수에 미치는 영향)

TDZ (mg/L)	신초발생율 (%)	절편체당 신초발생수
0.25	61.4 d ^z	3.9 c
0.50	96.2 a	7.3 a
1.00	90.0 b	5.7 b
2.00	88.7 c	2.6 d

[0055] Means followed by same letters within a column are not significantly different ($P \leq 0.05$).

[실험예 2]- 깽깽이풀의 떡잎을 이용한 직접적 부정아 재분화

[0057] 1. 실험재료 및 멸균 소독방법

[0058] 깽깽이풀은 멸종위기식물로 보호를 받고 있으므로 식물재료의 확보가 매우 어렵다. 깽깽이풀의 종자는 경기도 한택식물원에서 중습성의 조건에서 자란 온전한 식물체로부터 수집하였다. 종자는 캡슐을 제거하고, 3일 동안 실온($25 \pm 3^\circ\text{C}$)에 건조하였으며 2주간 5°C 에 저장하였다. 형태생리학적인 휴면을 타파하기 위해, 종자는 24시간 동안 실온에서 1000 mg/L 지베렐린(GA_3)에 침지한 후 실온에 건조하였다. 종자를 암배양 30일 동안 $15/6^\circ\text{C}$ 온도 조건에서 명기 12시간/암기 12시간 광주기로 하여 유지하였고, 그 후 90일 동안 5°C 에 두었다. 처리된 종자는 70%(v/v) 에탄올(EtOH)에 1분간 표면살균한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5%(v/v) 차아염소산나트륨(NaOCl)에 트윈(Tween) 20 1-2방울을 첨가하여 15분 동안 침지 후 0.01%(w/v) HgCl_2 에 10분 동안 침지하고 멸균수로 3회 세척하였다. 접합자배는 종자로부터 적출하여 2-이소펜틸 아테닌(2-iP), 벤질아테닌(BA), 및 티디아주론(TDZ)가 여러 가지 농도로 들어 있는 배지에 치상하여 배양하였다.

[0059] 2. 배양배지

[0060] Murashige and Skoog 배지(MS)와 Chu' s 배지(N6)에 2-iP, BA, 그리고 TDZ를 각각 0, 0.25, 0.50, 1.0 또는 2.0 mg/L의 농도로 처리 후 슈크로스(sucrose) 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, 아가(agar) 0.8%(w/v)를 첨가한 후 121°C 에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다. 티디아주론(TDZ)는 필터링 후 고압멸균을 실시한 배지에 첨가하였다. 다른 식물생장조절제는 pH를 조절하기 전에 배지에 첨가하였다.

[0061] 3. 배양환경

[0062] 배양온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 12시간 동안 $45 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

[0063] 4. 결과

[0064] 기내에서 멸균된 종자를 과종하여 100% 무균식물체를 얻었다. 배양 5주 후 각 처리배지에서 신초 발생률과 절편체당 발생된 신초수를 조사하였다.

[0065] 그 결과 MS 배지에서는 0.5-2.0 mg/L의 티디아주론(TDZ)가 첨가되었을 때 신초가 아닌 캘러스만 형성되었다. N6 배지에서는 티디아주론(TDZ)의 농도가 0.25 mg/L일 때 신초 발생률(72.1%)과 절편체당 발생된 신초수(10.5개)가 가장 높았고 티디아주론(TDZ)의 농도가 높아질수록 신초의 발생률이 낮아졌다.

표 3

[0066] (깻깻이풀의 떡잎으로부터 직접적 부정아 재분화에 대한 배지와 TDZ의 영향)

TDZ (mg/L)	신초발생율 (%)			절편체당 신초 발생수	
	MS	N6		MS	N6
0.00	-	-		-	-
0.25	-	72.1±3.8 a ^z		-	10.5±1.6 a
0.50	Callus	66.3±2.6 b		Callus	8.0±1.0 b
1.00	Callus	60.0±3.0 c		Callus	5.6±1.4 c
2.00	Callus	Callus		Callus	Callus

[0067] ^z Means±SE within a column followed by the same letters are not significantly different(P≤0.05).

[0068] 부정아 발생은 N6 배지에서 성공하였는데 이는 적은 양분과 질소 함량 때문인 것으로 판단된다. 또한 기본으로 첨가되는 양분의 형태가 MS와 N6 배지에서 다르긴 하지만 이에 관한 결정적인 요인은 암모늄과 질산이온의 비율이라고 볼 수 있다. MS와 N6 배지에 관한 질산태질소와 암모늄태질소의 비율은 각각 66:34, 80:20이었다. 결론적으로 깻깻이풀의 떡잎을 이용하여 부정아를 유도하기 위한 배지의 경우는 N6 배지에 티디아주론(TDZ)을 0.25 mg/L의 농도로 처리한 것이 가장 좋게 나타났음을 알 수 있다.

[실험예 3]- 깻깻이풀의 떡잎을 이용한 직접적 부정아 재분화

[0070] 1. 재료 및 방법

[0071] 1. 배양배지

[0072] 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0 mg/L의 지베렐린(GA₃)가 첨가된 Chu's 배지(N6)에 수크로스(sucrose) 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, 아가(agar) 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

[0073] 2. 배양환경

[0074] 배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m⁻²·s⁻¹ PPF의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

[0075] 3. 결과

[0076] 지베렐린(GA₃)가 재분화된 깻깻이풀의 신초 신장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0 mg/L의 지베렐린(GA₃)가 첨가된 N6 배지에 치상하였다.

[0077] 배양 6주 후 절편체로부터 발생된 multiple shoot는 티디아주론(TDZ) 단용 또는 티디아주론(TDZ)와 나프탈렌 아세트 애시드(NAA)의 혼용 처리에서 신초를 신장하는데 실패하였다. GA₃의 농도가 0.1-2.0 mg/L으로 높아질수록

초장은 증가하였고, 4.0 mg/L일 경우 초장은 감소하였다(표 4).

표 4

(깻깻이풀에 신초신장에 대한 GA₃의 효과)

GA ₃ (mg/L)	신초의 길이 (cm)
0.0	2.6 d ^z
0.1	2.8 cd
0.5	3.4 c
1.0	4.0 b
2.0	5.3 a
4.0	3.6 bc

^z Means±SE within a column followed by the same letters are not significantly different(P≤0.05).

신초 신장은 지베렐린(GA₃)의 농도가 2.0 mg/L일 때 가장 효과적이었다(도 3). 초장은 N6 배지에 지베렐린(GA₃)을 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 또는 4.0 mg/L 농도로 첨가하였을 때 각각 2.6, 2.8, 3.4, 4.0, 5.3 및 3.3이었다.

[실험예 4]- 옥신이 깻깻이풀의 기내발근에 미치는 영향

1. 배양배지

0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 및 10.0 mg/L의 인돌-3-아세트릭 애시드(IAA), 인돌뷰트릭애시드(IBA), 및 나프탈렌 아세트릭 애시드(NAA)를 첨가한 Anderson's 배지(AM)에 수크로스(sucrose) 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, 아가(agar) 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

2. 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m⁻²·s⁻¹ PPFD의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

3. 결과

옥신이 깻깻이풀의 기내발근에 미치는 영향을 조사하기 위하여 재분화된 신초가 2-3cm 정도 되었을 때 1/2배액 N6 배지에 다양한 농도의 옥신을 처리 후 치상하였다(표 5).

표 5

(깻깻이풀의 발근에 대한 옥신의 효과)

Conc. (mg/L)	발근율 (%)				신초당 발생된 뿌리수				근장 (cm)		
	IAA	IBA	NAA		IAA	IBA	NAA		IAA	IBA	NAA
0.0	-	-	-		-	-	-		-	-	-
0.1	-	-	92.4 b		-	-	4.0 b		-	-	2.8 b
0.5	-	-	100.0 a		-	-	5.8 a		-	-	6.3 a

1.0	-	-	Callus		-	-	Callus		-	-	Callus
5.0	38.4 b ^z	78.6 b	Callus		2.3 b	3.7 b	Callus		1.6 b	3.2 b	Callus
10.0	52.2 a	83.0 a	Callus		3.0 a	4.3 a	Callus		4.0 a	4.8 a	Callus

- no response.

^zMeans followed by the same letters within a column are not significantly different ($P \leq 0.05$).

배양 6주 후 각 처리별 발근된 신초 발생률, 신초당 발생된 뿌리수 및 근장을 조사하였다. 옥신이 첨가되지 않은 배지에서는 신초가 발생되지 않았고, 뿌리는 옥신이 첨가된 발근 배지에 이식하여 2주 후 신초 끝부분에서 발생하였으며 발근률은 다양한 옥신의 농도에 따라 달랐다. 낮은 농도인 인돌-3-아세트에시드(IAA) 또는 인돌뷰트릭에시드(IBA)가 높은 농도에서는 뿌리를 발생시키지 않았다.

신초의 약 83%는 N6 배지에 인돌뷰트릭에시드(IBA)를 10.0 mg/L의 농도로 첨가하였을 때 뿌리를 발생시켰다. 나프탈렌 아세트에시드(NAA)의 농도가 0.5 mg/L일 때 발근율(100%), 신초당 발생된 뿌리수(5.8개) 및 근장(6.3cm)은 가장 높았고, 나프탈렌 아세트에시드(NAA)의 농도가 높아질수록 신초당 발생된 뿌리수는 감소하였으며 캘러스가 형성되었다. 또한 나프탈렌 아세트에시드(NAA)를 0.1 mg/L의 농도로 첨가하였을 때 많은 뿌리를 얻었다.

[실험예 5] - 배양배지가 깽깽이풀의 기내발근에 미치는 영향

1. 배양배지

재분화된 신초는 나프탈렌 아세트에시드(NAA) 0.5 mg/L를 첨가한 1배액과 1/2배액 Anderson's 배지(AM), Murashige and Skoog 배지(MS), Chu's 배지(N6), 그리고 WPM 배지에 수크로스(sucrose) 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, 아가(agar) 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

2. 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD의 광 조건하에서 배양하였다. 광 원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

3. 결과

재분화된 신초가 2~3cm 정도 되었을 때 1배액과 1/2배액 AM, MS, N6, 그리고 WPM 배지에 나프탈렌 아세트에시드(NAA) 0.5 mg/L의 농도로 처리 후 치상하였다. 배양 6주 후 각 처리배지에서 발근된 신초를, 신초당 발생된 뿌리수 및 근장을 조사하였다(표 6).

표 6

(깽깽이풀의 발근에 대한 배지농도의 효과)

Culture medium	발근율 (%)		B	신초당 발생된 뿌리수			근장 (cm)	
	Full strength	Half strength		Full strength	Half strength		Full strength	Half strength
AM	61.0 c ^z	87.2 c		2.6 ab	5.4 ab		1.8 c	4.8 bc

N6	68.4 b	100.0 a		3.0 a	5.8 a		2.7 b	6.3 a
MS	27.2 d	66.4 b		2.4 b	4.0 c		3.0 ab	3.9 c
WPM	80.4 a	100.0 a		1.8 c	5.2 b		3.6 a	5.2 b

[0101] ^zMeans followed by the same letters within a column are not significantly different ($P \leq 0.05$).

[0102] 뿌리수는 1배액 AM, MS, N6, 그리고 WPM 배지에 나프탈렌 아세트 에시드(NAA) 0.5 mg/L의 농도로 첨가하였을 때 각각의 1/2배액 배지보다 감소하였고, N6, AM, MS, WPM 순으로 좋았다.

[0103] 가장 높은 발근률(100%)은 신초가 1/2배액 N6 배지와 WPM 배지에서 배양하였을 때 얻었다. 6주 후 1/2배액 N6 배지에서 신초당 발생된 뿌리수(5.8개)와 근장(6.3cm)이 가장 높았다. 따라서 갱쟁이풀의 기내발근을 위해서는 낮은 농도의 식물생장조절제가 필요하다.

[0104] [실험예 6] - 기내에서 발근된 갱쟁이풀의 기외 순화

[0105] 1. 실험재료

[0106] 식물체의 기외 순화를 위해서 재분화된 식물체의 뿌리 부분을 멸균수로 세척하여 아가(agar)를 완전히 제거하였다. 식물체는 높은 상대습도를 요하는 순화박스에 코이어, 피트모스, 펄라이트와 버미큘라이트로 구성된 토실이상토를 채워 이식하였다. 2일에 한번씩 1/4배액 양액을 공급하였고, 온실에서 유지하였다. 4주 후 순화된 식물은 토실이상토를 채운 포트에 옮겨졌다.

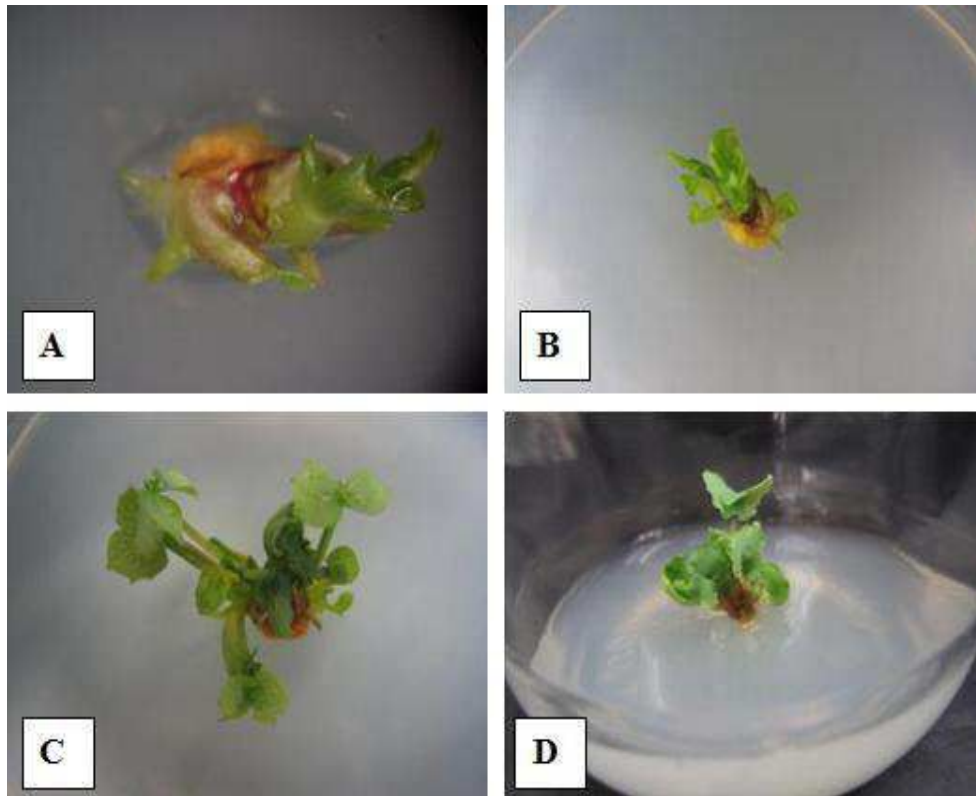
[0107] 2. 결과

[0108] 기내에서 발근된 식물체의 기외 순화체계를 확립하고자 실험을 수행하였다. 4주 후 식물체는 86%의 생존률을 보이며 성공적으로 순화하였다(도 5). 3주 후 식물체는 새로운 잎이 발생하였고, 토실이상토가 채워진 포트에 옮겨 온실에서 순화하였다. 미세 번식된 식물은 형태적과 생장 특성에 문제없이 잘 자랐다.

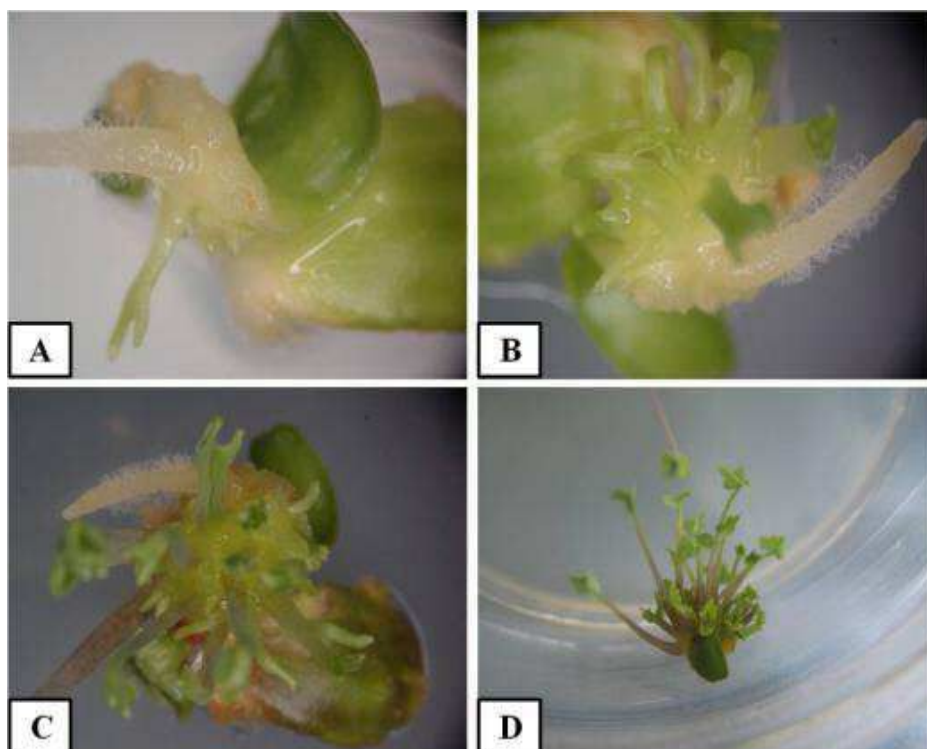
[0109] 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

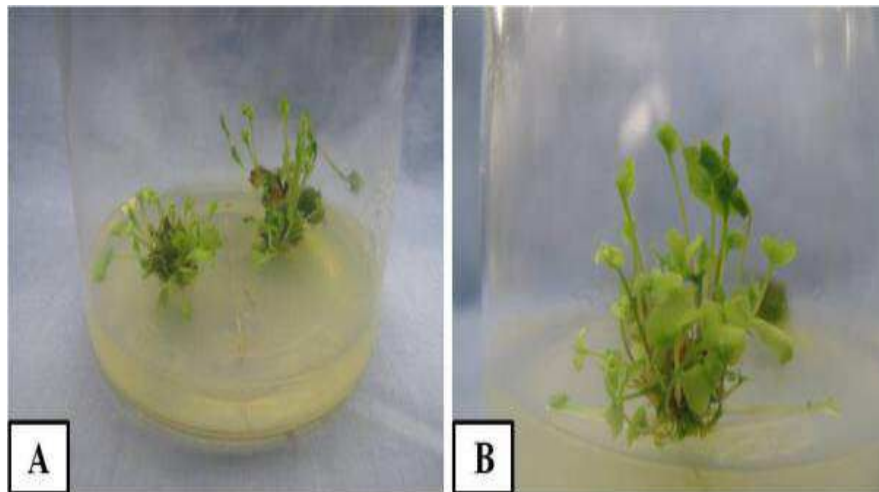
도면1



도면2



도면3



도면4



도면5

