

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0061073 (43) 공개일자 2011년06월09일
(51) Int. Cl. <i>C12N 5/04</i> (2006.01) <i>A01H 4/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0117603 (22) 출원일자 2009년12월01일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 이현화 광주광역시 남구 진월동 한신아파트 201-1003 (74) 대리인 황주명, 성정현, 위병갑	

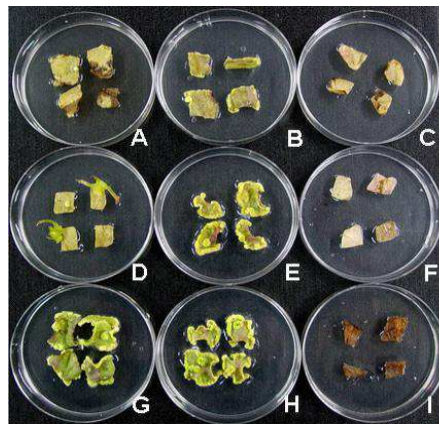
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법

(57) 요약

본 발명은 조직배양 기술을 이용하여 흰민들레를 대량생산하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 조직배양 기술을 이용하여 흰민들레의 조직에서 바로 기관형성을 유도함으로써 흰민들레를 대량생산하는 방법 및 상기 방법으로 재분화된 흰민들레 식물체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 흰민들레의 대량생산 방법은 흰민들레로부터 잎을 채취한 후, 옥신 또는 사이토키닌이 함유된 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시키고, 분화된 신초는 식물생장 조절제를 함유하는 배지 상에서 배양하여 신초의 발근을 유도시킨 다음, 이를 토양이 채워진 분(pot)에 이식하여 성장시키는 단계를 포함하는 것으로서, 단시간에 안정적이면서 또한 저렴한 비용으로 흰민들레를 대량생산할 수 있는 최적의 조건을 확립함에 따라 각종 약리성분이 다량 함유되어 있는 우리나라 고유의 재래종인 흰민들레를 식품산업 및 의약산업 등 각종 산업에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

흰민들레의 유식물체로부터 잎을 채취하여 절단한 후, 옥신 0.1~2mg/L 또는 사이토키닌 1~5mg/L이 함유된 MS의 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시키는 단계;

상기 유도되어 분화된 신초는 2,4-D 0.1~1mg/L, NAA 0.1~1mg/L, IAA 0.1~1mg/L 및 IBA 0.1~1mg/L으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 MS 배지 상에 배양하여 신초의 발근을 유도시키는 단계; 및

상기 유도된 신초의 발근이 5cm 이상으로 자라면 상기 신초를 0.5~1.5%의 히포넥스(huponex)에 10~40분간 침지시킨 다음, 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)가 혼합된 분(pot)에 이식하여 배양 및 생장시키는 단계를 포함하는, 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 흰민들레의 종자를 60~80%의 에탄올 및 3~5%의 차아염소산 나트륨(NaOCl)으로 표면 살균한 후, 증류수로 세척한 다음, 2~4%의 수크로스와 0.2~0.5%의 겔라이트(gelite) 또는 0.5~0.7% 피토아가(phytoagar)가 함유된 MS 배지에 파종하여 발아시킨 후, 계대 배양을 통해 수득하는 것을 특징으로 하는 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 발아 후 7 내지 10주째 자란 흰민들레의 잎인 것을 특징으로 하는 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 직경이 5~10mm가 되도록 절단하는 것을 특징으로 하는 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)는 각각 3:1:1의 혼합비로 혼합된 것을 특징으로 하는 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배양은 20~27℃의 온도, 5000~15000 lux의 광도 및 12~16시간의 광주기와 8~12시간의 암주기 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 조직배양 기술을 이용하여 흰민들레를 대량생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 재분화된 흰

민들레 식물체에 관한 것이다.

배정 기술

- [0002] 전 세계적으로 분포되어 있는 민들레는 오랜 시간 동안 약용식물로 사용되어져 왔으며, 특히 흰민들레 (*Taraxacum coreanum* Nakai.)는 우리나라의 각처에서 낮은 지대의 양지쪽에 자라는 고유종 민들레이다. 이러한 흰민들레는 노랑민들레와 비슷하지만 꽃이 흰색으로 ‘조선포공영’, ‘백화 포공영’ 또는 ‘조선민들레’ 등으로 불리우기도 한다.(Kang et al., 2001). 한방에서는 일반적으로 노랑민들레(*T. mongolicum*), 쯔민들레(*T. hallaisanense*), 산민들레(*T. ohwianum*), 서양민들레(*T. officinale*), 흰민들레(*T. coreanum*) 등을 통칭하여 지상부를 말린 것을 포공영(浦公英)이라하며, 완하제, 강장제, 건위제 등의 약제로 사용되고 있다. 또한, 지상부의 15배가 넘는 뿌리 부위를 말린 것을 포공영근(浦公英根)이라고 하며 해열, 이뇨, 거담, 해독제로 사용하고 있어 민들레는 그 부위에 따라 쓰임새도 각기 다르다.
- [0003] 특히, 뿌리에는 타락사스테롤(taraxasterol), 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 시그마스테롤(stigmasterol) 등 많은 식물 스테로이드 화합물이 함유되어 있고, 그 밖에도 클로제닉(chlorogenic), 카페닉(caffeic), 페룰릭(ferulic), 치코릭산(chicoric acid) 등의 페놀릭 화합물들을 함유하고 있다(Akashi et al., 1994; Katrin et al., 2006; Wolbis et al., 1993). 또한, 잎과 꽃을 포함한 지상부에는 히드록시시나믹산(hydroxycinnamic acid) 류의 페놀릭 화합물들이 풍부하게 함유되어 있으며, 지하부와는 달리 칼륨, 칼슘 및 철 등의 무기질과 항산화제인 비타민 C와 토코페롤의 함량이 매우 높다. 또한, 건조된 잎과 줄기에는 각각 4.89% 및 7.73%의 높은 함량으로 칼륨이 함유되어 있는 것으로 밝혀진 바 있다(Kang et al., 2000; Williams et al., 1996; Wilman and Derrick, 1994).
- [0004] 따라서 민들레는 이러한 유효성분들에 의해 이뇨제, 항염증, 항산화, 항암, 항당뇨 등 다양한 생리활성 효능을 가지고 있으며, 또한 항균 작용 뿐만 아니라 장내세균의 증식도 억제하는 효과가 우수한 것으로 알려져 있다.
- [0005] 나아가 민들레는 약재로서의 용도 뿐만 아니라 식용으로도 사용되어져 왔는데, 어린 잎은 얇고 부드러워 중국과 일본에서는 오래 전부터 쌈채소나 나물로 식용해 왔고, 일부 지역에서는 뿌리를 볶아 커피 대용으로 사용하기도 하였다.
- [0006] 그러나 민들레는 알려진 효능에 비해 각 품종별 특성과 차이점 및 함유 성분에 따른 다양한 기능성을 완전히 활용하지 못한 채 방치되고 있는 유용식물이라고 할 수 있다. 더욱이 우리나라의 토종 흰민들레는 서양민들레의 높은 번식력과 자생력에 밀려 그 분포지가 날로 줄어들고 있으며, 봄 한철 개화와 년 단위의 일회번식으로 인해 채집과 대량 채취가 힘들다는 문제점이 있다. 따라서 각종 생리활성이 우수한 흰민들레를 자원으로 이용하기에 계절적, 지리적 영향을 벗어나 새로운 기술을 통한 대량생산이 요구되고 있다.
- [0007] 한편, 식물은 많은 수의 세포들이 모여서 조직을 구성하고, 여러 조직들이 모여서 기관을 형성하며, 형태와 기능이 각기 다른 여러 기관들이 모여서 유기적으로 통체된 식물체를 형성하는데, 식물의 조직배양은 이러한 식물체로부터 기관, 조직 및 세포를 적출 분리하여 기내에서 영양분이 함유되어 있는 배지에 무균적으로 배양함으로써 캘러스(callus)나 단세포의 집단을 유도하거나 완전한 기능을 가진 식물체로 재생시키는 기술을 말하며, 일명 식물의 '기내배양(器內培養)'이라고 불리기도 한다.
- [0008] 조직배양에 사용되는 재료로는 식물의 잎, 줄기, 뿌리, 엽병, 화경, 자엽 및 인편 등의 각종 기관이나 조직, 종자의 일부분인 배와 배유, 소포자 및 원형질체 등이 있어 있으며, 식물의 배양형태는 식물재료의 분화 정도에 따라 일반적으로 다음과 같이 크게 세 가지로 구분할 수 있다, 즉, 첫째로는 배나 종자 등과 같이 특별한 유기적 구조를 가진 기관화된 식물재료를 배양하는 경우가 있고, 둘째로는 캘러스처럼 탈분화되어 비기관화된 재료를 배양하는 경우가 있으며, 셋째로는 이들의 중간적인 형태로 분리된 기관이나 조직을 배양하게 되면 세포가 탈분화되어 캘러스를 형성하고, 형성된 캘러스는 재분화하여 뿌리나 줄기와 같은 기관 또는 완전한 개체로 발달하는 경우가 있다.
- [0009] 이와 같이 식물의 조직배양은 배양조건에 따라 식물체로부터 적출한 조직이나 세포로부터 캘러스라고 하는 부정형의 세포괴(細胞塊)를 만들게 할 수도 있고 새로운 기관이나 식물체를 재생시킬 수도 있다.
- [0010] 나아가 오늘날 식물의 조직배양 기술은 식물의 생리 생화학적 조절기구 및 유전자 발현 기작을 밝히고, 생물 공학적 기법을 이용한 유용물질의 대량생산을 위한 좋은 도구가 되고 있으며, 과채류나 임목 및 화해류의

경우, 조직배양을 이용한 대량번식을 통해 분주나 삽목으로 얻기 힘든 무병의 동일한 식물체를 생산하기도 한다.

[0011] 그러나 앞서 기술한 바와 같이 각종 유용한 생리활성 물질을 가지고 있는 우리나라 고유 재래종인 흰민들레의 경우, 이를 대량생산하기 위한 방법으로서 아직까지 조직배양 기술을 이용한 예가 없었다.

[0012]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 다양한 생리활성을 가지고 있는 흰민들레를 대량생산하기 위해 식물의 조직에서 바로 기관 형성을 유도하고 재분화 시간을 단축할 수 있는 조직배양 기술을 통한 흰민들레의 대량생산 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명에 따른 흰민들레의 대량생산 방법으로 생산되어 재분화된 흰민들레 식물체를 제공하는 것이다.

[0015]

과제 해결수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은,

[0017] 흰민들레의 유식물체로부터 잎을 채취하여 절단한 후, 옥신 0.1~2 mg/L 또는 사이토키닌 1~5 mg/L이 함유된 MS의 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시키는 단계;

[0018] 상기 유도되어 분화된 신초는 2,4-D 0.1~1 mg/L, NAA 0.1~1 mg/L, IAA 0.1~1 mg/L 및 IBA 0.1~1 mg/L 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 MS 배지 상에 배양하여 신초의 발근을 유도시키는 단계; 및

[0019] 상기 유도된 신초의 발근이 5cm 이상으로 자라면 상기 신초를 0.5~1.5%의 히포넥스(huponex)에 10~40분간 침지시킨 다음, 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)가 혼합된 분(pot)에 이식하여 배양 및 생장시키는 단계를 포함하는, 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 흰민들레의 종자를 60~80%의 에탄올 및 3~5%의 차아염소산 나트륨(NaOCl)으로 표면 살균한 후, 증류수로 세척한 다음, 2~4%의 슈크로스 및 0.2~0.5%의 겔라이트(gelite) 또는 0.5~0.7% 피토아가(phytoagar)가 함유된 MS 배지에 과중하여 발아시킨 후, 계대 배양을 통해 수득할 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 발아 후 7~10주째 자란 흰민들레의 잎일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 직경이 5~10mm가 되도록 절단할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)는 각각 3:1:1의 혼합비로 혼합될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배양은 20~27℃의 온도, 5000~15000 lux의 광도 및 12~16시간의 광주기와 8~12시간의 암주기 조건 하에서 수행할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 조직배양을 이용한 흰민들레의 대량생산 방법에 의해 생산된 재분화 흰민들레의 식물체를 제공한다.

[0025]

효 과

[0026] 본 발명에 따른 흰민들레의 대량생산 방법은 흰민들레로부터 잎을 채취한 후, 옥신 또는 사이토키닌이 함유된 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시키고, 분화된 신초는 식물생장 조절제를 함유하는 배지 상에서 배양하여 신초의 발근을 유도시킨 다음, 이를 토양에 채워진 분(pot)에 이식하여 생장시키는 단계를

포함하는 것으로서, 단시간에 안정적이면서 또한 저렴한 비용으로 흰민들레를 대량 생산할 수 있는 최적의 조건을 확립함에 따라 각종 약리성분이 다량 함유되어 있는 우리나라의 고유의 재래종인 흰민들레를 식품산업 및 의약산업 등 각종 산업에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

본 발명은 흰민들레를 대량 생산하기 위해 식물의 조직에서 바로 기관 형성을 유도하고 재분화 시간을 단축할 수 있는 조직배양을 통한 흰민들레의 대량생산 방법을 제공하는데 그 특징이 있다.

상기 본 발명에 따른 조직배양을 통한 흰민들레의 대량생산 방법은, 흰민들레의 유식물체로부터 잎을 채취하여 절단한 후, 옥신 0.1~2mg/L 또는 사이토키닌 1~5mg/L이 함유된 MS의 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시키는 단계; 상기 유도되어 분화된 신초는 2,4-D 0.1~1mg/L, NAA 0.1~1mg/L, IAA 0.1~1mg/L 및 IBA 0.1~1mg/L으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상을 함유하는 MS 배지 상에 배양하여 신초의 발근을 유도시키는 단계; 및 상기 유도된 신초의 발근이 5cm 이상으로 자라면 상기 신초를 0.5~1.5%의 히포넥스(huponex)에 10~40분간 침지시킨 다음, 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)가 혼합된 분(pot)에 이식하여 배양 및 성장시키는 단계를 포함할 수 있다.

보다 구체적으로, 본 발명에 따른 조직배양에 의한 흰민들레의 대량생산 방법을 각 단계별로 설명하면 다음과 같다.

제1단계: 캘러스 또는 신초 유도 단계

흰민들레의 종자를 살균처리 한 후, 식물의 고체배지에 파종하여 발아시킨 다음, 발아된 유식물체로부터 조직, 바람직하게는 잎을 채취하여 절단한 후, 이를 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도한다.

이때 상기 흰민들레의 종자는 당업계에서 공지된 방법으로 살균처리 할 수 있으며, 바람직하게는 60~80%의 에탄올 및 3~5%의 차아염소산 나트륨(NaOCl)으로 표면 살균처리 할 수 있다.

또한, 살균처리된 상기 종자는 증류수로 세척한 다음, 2~4%의 수크로스 및 0.2~0.5%의 젤라이트(gelite) 또는 0.5~0.7%의 피토아가(phytoagar)가 함유된 MS 배지에 파종하여 발아를 유도할 수 있는데, 이때 발아 유도를 위한 배양은 20~27℃의 온도, 5000~15000 lux의 광도 및 12~16시간의 광주기와 8~12시간의 암주기 조건 하에서 배양할 수 있으며, 바람직하게는 23~25℃의 온도로 조절되는 배양실에서 10000 lux의 광도 및 16시간의 광주기와 8시간의 암주기 조건으로 배양할 수 있다.

상기 방법에 따라 종자로부터 발아를 유도하고 2주 간격으로 계대 배양을 통해 성장한 유식물체의 잎은 적절한 크기로 절단하여 절편체를 만들 수 있는데, 절편체의 크기는 5~10mm의 크기가 되도록 한 후, 옥신인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.1~2mg/L 또는 사이토키닌인 BA(banzyadenine) 1~5mg/L가 함유된 MS의 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시킬 수 있다. 바람직하게는, 5~7mm 크기의 절편체를 사이토키닌인 BA가 단독으로 1.5~2.5mg/L의 양으로 함유된 MS의 고체배지 상에 치상하여 캘러스 또는 신초를 유도시킬 수 있다.

본 발명에서 상기 MS의 고체배지는 조직배양을 위해 당업계에서 사용되고 있는 일반적인 MS 고체배지라면 모두 사용가능하고, 바람직하게는 2~4%의 수크로스 및 0.2~0.5%의 젤라이트(gelite) 또는 0.5~0.7% 피토아가(phytoagar)가 함유된 pH 5.8의 고체배지일 수 있다.

또한, 본 발명에서 상기 흰민들레의 유식물체로부터 채취한 잎은 발아 후 7~10주째 자란 흰민들레의 잎을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 7주째 자란 잎을 사용할 수 있다.

한편, 상기 제1단계에서 유의할 점은 잎 절편체의 절취시기 및 크기에 따라 신초의 재분화율이 크게 영향을 받을 수 있으므로 가능한 정확한 시기와 크기로 절편체를 제작하여야 한다.

제2단계: 발근 유도 단계

제1단계에서 신초가 유도되고 신장되면 신초의 하단을 절취하여 식물생장 조절물이 첨가되지 않거나 또

는 옥신 호르몬이 단독 또는 혼합 처리된 배지로 옮겨 발근을 유도한다.

[0042] 이때 상기 발근 유도를 위한 신초는 분화된 신초 하단의 약 1.0~2.0cm, 바람직하게는 약 1.5cm 길의 신초만을 잎 절편체로부터 분리하여 발근을 유도할 수 있으며, 분리된 신초는 식물생장 조절물이 첨가되지 않거나 또는 2,4-D 0.1~1mg/L, NAA 0.1~1mg/L, IAA 0.1~1mg/L 및 IBA 0.1~1mg/L으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 옥신 호르몬을 함유하는 MS 배지 상에 배양하여 발근을 유도할 수 있으며, 바람직하게는 NAA가 단독으로 0.4~0.6mg/L, 더욱 바람직하게는 0.5mg/L이 첨가된 배지에서 배양하여 발근을 유도할 수 있다.

[0043] 또한, 발근 유도를 위한 배양은 상기 제1단계의 발아 유도를 위한 배양과 동일한 조건, 즉, 20~27℃의 온도, 5000~15000 lux의 광도 및 12~16시간의 광주기와 8~12시간의 암주기 조건 하에서 2~6주간 배양할 수 있다.

[0044] 제3단계: 분(pot) 이식 단계

[0045] 상기 제2단계까지 기내에서의 발근 유도과정이 완료되고, 신초의 발근 생장이 잘 이루어지는 것으로 판단되면, 기내로부터 뿌리 생장이 이루어진 신초를 꺼내어 기존의 배지 성분을 완전히 제거한 다음, 토양에 이식하고 생육시켜 완전히 재분화된 식물체를 수득할 수 있다.

[0046] 이식을 위한 상기 신초는 신초 말단으로부터 뿌리 생장이 충분히 이루어진 신초를 선택하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 5cm 이상의 뿌리 생장이 이루어진 신초를 사용할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 신초는 기존의 배지 성분을 완전히 제거하기 위해 흐르는 물로 씻은 다음, 물에 녹여 사용하는 화학성 비료 성분, 바람직하게는 0.5~1.5%의 히포넥스(huponex)에 10~40분간 침지시킨 후, 분(pot)에 이식하여 생육시킴으로써 완전한 모양을 갖춘 흰민들레의 식물체를 생산할 수 있다.

[0048] 이때, 상기 분(pot)에는 이식을 위한 토양이 채워진 분을 사용할 수 있는데, 상기 토양은 시중에서 판매되는 멸균된 인공토양 또는 마사토를 모두 사용할 수 있으며, 바람직하게는 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)가 혼합된 혼합토를 사용할 수 있다.

[0049] 더욱 바람직하게, 상기 혼합토는 피트모스(peatmoss), 펄라이트(perlite) 및 버미큘라이트(vermiculite)가 각각 3:1:1의 혼합비로 혼합된 것을 사용할 수 있다.

[0050] 그러므로 본 발명은 상기 기술된 방법을 통해 조직배양을 통한 흰민들레의 대량생산 방법을 제공할 수 있으며, 또한, 상기 방법으로 생산되어 재분화된 흰민들레 식물체를 제공할 수 있다.

[0051] 한편, 민들레를 포함한 다양한 식물의 경우, 종에 따라 신초의 재분화 조건에 서로 다른 차이를 보이는 것으로 알려져 있는데, 예컨대 딸기에 대해 7가지의 서로 다른 품종의 잎, 줄기 및 뿌리 조직으로부터 식물체의 재분화를 조사한 결과, 품종간의 차이가 있음이 보고된 바 있다. 또한, 담배의 경우에도 58종의 기관 재분화 실험에서 16종의 오스트레일리아 자생종 및 28종의 남미 자생종들이 북아메리카 자생종보다 동일한 조건하에서 더 높은 분화율을 보이고 있다는 내용이 보고된 바 있다(Li. B et.al., Plant Cell Rep., 22, 4, 231~238, 2003).

[0052] 그러므로 식물조직으로부터 기관을 형성하는 것은 각 식물체의 품종 및 자생지에 따라 서로 다른 차이를 보이고 있기 때문에 국내에서 자생하는 민들레, 특히 우리나라 고유종인 재래종이며 각종 질병의 치료 및 예방에 우수한 효과를 가지고 있는 민들레인 흰민들레에 대한 최적의 재분화 조건을 확립하는 것은 매우 중요한 일이다.

[0053] 따라서 본 발명에서는 이러한 흰민들레를 조직으로부터 바로 기관을 형성하는 과정을 통해 높은 효율로 흰민들레의 재분화 조건을 최적화 하였으며, 이러한 조건을 통해 흰민들레를 대량생산하는 방법을 제공하였다는 점에 특징이 있다.

[0054]

[0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] <실시예 1>

원민들레의 종자로부터 발아 유도

원민들레(*Taraxacum coreanum* Nakai.)는 동신대학교 종자은행에서 분양 받아 사용하였으며, 종자는 관모(갓털)를 제거한 후, 70% EtOH에 3분, 4% NaOCl 용액에 10분간 표면 살균 한 다음, 멸균된 증류수로 5분간 세척하였다. 이후, 멸균한 종자는 MS 배지(3% 수크로즈, 0.4% 젤라이트(gelite), pH 5.8)에 과중하여 발아를 유도 하였다. 이때 배양은 25± 2℃로 조절되는 배양실에서 10000 lux의 16시간 광주기와 8시간 암주기로 배양하여 발아시킨 후, 2주 간격으로 계대 배양하였다.

<실시예 2>

신초의 유도

상기 실시예 1의 기내에서 무균 발아된 유식물체의 잎 신초 형성 및 캘러스 형성을 조사하였다. 이를 위해 먼저, 상기 발아된 유식물체로부터 잎을 채취하고 채취한 잎을 직경 7mm의 크기로 절단한 다음, 옥신의 한 종류인 2,4-D 또는 사이토키닌의 한 종류인 BA를 각 농도별로 처리한 MS배지(3% 수크로즈, 0.3% 젤라이트(gelite), pH 5.8)에 치상하였으며, 상기 처리된 2,4-D와 BA의 농도는 하기 표 1에 기재된 바와 같다. 4주 후 신초 형성 및 캘러스 형성에 영향을 미치는 옥신과 사이토키닌의 농도를 조사하였고, 성장량에 따른 건중량과 생중량을 조사하였다. 또한, 잎 조직의 상태에 따른 신초 형성율의 조사는 BA 2.0 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 기내 발아 후 5주, 6주, 7주, 8주, 9주 된 잎을 사용하여 실험하였으며, 이때 배양조건은 상기 실시예 1의 배양 조건과 동일 조건하에서 수행하였다.

[표 1]

처리한 2,4-D와 BA의 농도(단위:mg/L)

처리물질	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2,4-D	0	0.1	1	0	0.1	1	0	0.1	1
BA	0	0	0	2	2	2	4	4	4

그 결과, 식물생장조절제가 첨가되지 않은 기본 MS 배지에 치상한 절편체의 경우, 배양 2주후 까지는 아무런 변화를 나타내지 않았으나 시간이 지남에 따라 엽록소가 파괴되어 절단면을 따라 서서히 갈변화 되는 것으로 나타났으며(도 1a). 2,4-D가 단독으로 0.1mg/L 첨가된 절편체의 경우에는 배양 2주 후부터 절단면을 중심으로 서서히 캘러스가 유도되는 듯 보였으나, 더 이상의 성장을 보이지는 않았고 서서히 갈변화 되는 것으로 나타났다(도 1b). 반면, 1 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지조건에서는 어떠한 성장도 보이지 않았고 단지 서서히 갈변화 되었으며, BA와의 혼합 처리 시에는 그 경향이 더욱 두드러지는 것으로 나타났다. 1 mg/L의 2,4-D에 2 또는 4 mg/L BA를 혼합 처리한 경우는 BA의 농도가 높아질수록 갈변화 반응은 더 신속히 진행되어 배양 3주째 모든 절편체에서 조직의 괴사를 관찰할 수 있었다 (도 1c, 1f 및 1i). 또한, BA의 단독처리 시 2,4-D의 단독 처리와는 달리 조직의 갈변화 현상은 나타나지 않았고, BA가 2 mg/L로 첨가된 배지에서는 캘러스 형성이 이루어지지 않고 곧바로 부정아가 형성되었으며(도 1d 및 3b 참조), BA가 4 mg/L 첨가된 배지에서는 절편체가 비후되면서 캘러스가 유기되는 것으로 나타났고, 이러한 현상은 2,4-D와 BA를 혼합 처리한 경우에서도 관찰되는 것으로 나타났다(도 1e, 1g 및 1h).

또한, BA 2.0 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 기내 발아 후 5주, 6주, 7주, 8주, 9주 된 잎의 성장에 따른 건중량과 생중량을 조사한 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 건중량과 생중량 모두 7주째의 잎이 가장 많은 중량을 가지는 것으로 나타났다.

<실시예 3>

성장시기별 잎에 따른 부정아 형성율 조사

기내에서의 식물체 재분화는 식물생장조절제의 종류 및 식물체의 생리적인 상태에 따라 큰 차이를 보이는 것으로 알려진 바 있다. 따라서 본 발명자달은 본 발명에 따른 원민들레의 재분화 효율을 증진시키기 위해 상기 실시예 1의 방법으로 발아된 이후 성장시기별(5주, 6주, 7주, 8주 및 9주째의 잎)로 원민들레의 잎을 채취

하였고, 이를 2 mg/L BA이 첨가된 MS 배지에 치상한 다음, 육안으로 형성된 부정아 및 부정아 형성율을 조사하였다.

[0071] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 기내 발아 후 7주째의 흰민들레 잎은 잎 절편체에서 부정아 형성이 약 86%로 다른 시기의 잎에 비해 가장 높았으며, 절편체당 발생하는 신초의 갯수도 제일 많은 것으로 나타났다(도 3d 참조). 한편, 5주 이내의 흰민들레 잎의 경우에는 약 58%의 부정아가 발생되기는 했지만 잎의 면적이 작아 다수의 절편체가 확보되기 어려웠고, 7주째에 비해 발생한 신초의 갯수도 적은 것으로 나타났다(도 3c 참조). 또한, 8주째 조직에서 잎 절편체당 발생하는 부정아의 형성율은 약 45%로 5-6주에 비해 효율은 낮았으나, 신초의 수는 7주와 비슷한 것으로 나타났다. 기내에서 잎 면적의 증가가 더 이상 이루어지지 않는 9주 이상 된 절편체의 경우에는 부정아의 형성율이 매우 낮았으며, 시간이 경과함에 따라 절편체 가장자리로부터 서서히 갈변화 되는 것으로 나타났다(도 2 참조).

[0072] 따라서 상기 결과를 통해 잎 절편체로부터의 부정아 형성은 성숙한 조직보다는 미성숙한 조직의 효율이 더 높은 것으로 나타났고, 성숙한 잎 조직의 경우, 기관 형성율이 급격히 떨어지고 너무 어린 잎 조직도 신초의 형성율이 낮은 것을 알 수 있었으며, 대체적으로 7주째의 잎이 신초 및 부정아 형성 정도가 가장 우수한 것을 알 수 있었다.

[0073] <실시예 4>

[0074] 발근 유도 및 분(pot)의로의 이식

[0075] 상기 실시예 2에서 분화된 신초는 약 1.5cm 길이의 신초만을 잎 절편체로부터 분리하여 발근을 유도하였다. 이를 위해 2mg/L BA가 첨가된 배지에 상기 분화된 신초를 2주간 배양하여 발근을 유도하였고, 상기 발근 유도는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 기본 배지 또는 소량의 옥신(auxin)류, 즉, NAA, IBA, IAA 및 2,4-D를 단독 또는 2,4-D를 단독으로 각 농도별 처리하였으며, 4주 후 각 처리군의 발근율을 조사하였으며, 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0076] 이식 과정은 신초 말단으로부터 5cm 이상 뿌리 생장이 이루어진 신초를 시험관으로부터 꺼내어 배지 성분을 완전히 제거한 다음, 1%의 하이포넥스(hyponex사, 미국)에 30분간 침지한 다음, 피트모스(peatmoss):펄라이트(perlite):버미큘라이트(vermiculite)가 3:1:1의 혼합비로 혼합된 혼합토와 마사토에 각각 이식함으로써 완전한 식물체로 재분화시켰다.

[0077] [표 2]

[0078] 발근 유도 4주 후 각 식물생장조절제에 따른 발근 형성 빈도를 측정 결과

옥신(mg/L)		발근 형성 빈도율(%)
대조군		13.3 ± 4.4
2,4-D	0.1	6.7 ± 3.3
2,4-D	0.5	0 ± 0
2,4-D	1.0	0 ± 0
IBA	0.1	16.7 ± 3.3
IBA	0.5	0 ± 0
IBA	1.0	20.0 ± 2.9
IAA	0.1	6.7 ± 4.4
IAA	0.5	38.3 ± 3.3
IAA	1.0	26.7 ± 3.3
NAA	0.1	15.0 ± 2.9
NAA	0.5	86.7 ± 4.4
NAA	1.0	43.3 ± 8.8

[0080] 그 결과, 배양 3주 후부터 발근이 이루어졌으며 호르몬이 첨가되지 않는 1/2 MS배지에서는 발근율이 5% 미만으로 거의 발근이 이루어지지 않은 것으로 나타났으며(결과 미도시), 2,4-D를 처리한 경우, 0.5 mg/L 및

1.0 mg/L의 양으로 첨가된 배지에서는 발근이 이루어지지 않았고 절단면이 비후되면서 캘러스가 형성되는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 IBA가 0.5 mg/L로 첨가된 배지에서도 동일하게 관찰되었다. 또한, IAA가 1 mg/L의 양으로 첨가된 배지에서는 50%이상 싹들이 점점 시들어 배양 4주째는 고사되는 것으로 나타났으며, 반면 NAA가 0.5 mg/L로 첨가된 배지에서는 85% 이상의 높은 발근율을 나타내었다(도 3e 참조).

[0081] 또한, 이식하여 완전한 식물체로 재분화를 유도한 결과, 혼합토 뿐만 아니라 마사토에서도 모두 100%의 높은 생존율을 나타내었으며(도 3f 참조), 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 기내에서 유도된 흰민들레 유식물체를 인공토양에서의 순화단계를 거치지 않고도 바로 포장에 이식할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0082]

[0083] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

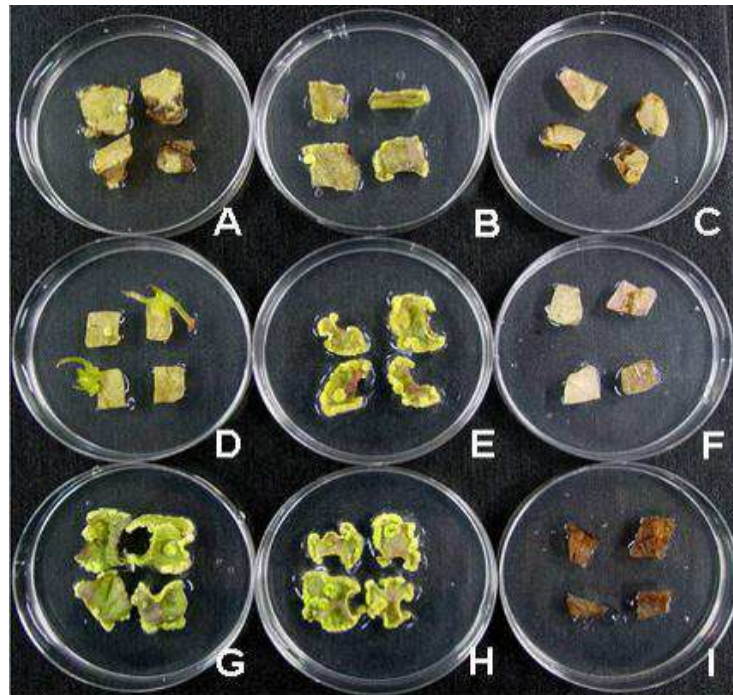
[0084] 도 1은 무균으로 조직배양된 흰민들레의 싹을 절단하여 2,4-D 또는 BA를 각 농도별로 단독 또는 혼합처리한 배지 상에 치상한 후 상기 각 싹으로부터 형성된 캘러스 및 싹을 나타낸 사진이며, A는 아무것도 처리하지 않은 대조군, B는 2,4-D만 0.1mg/L, C는 2,4-D만 1mg/L으로 처리한 것이며, D는 BA만을 2mg/L 처리한 것이고, E는 2,4-D 0.1mg/L과 BA 2mg/L, F는 2,4-D 1mg/L과 BA 2mg/L를 혼합 처리한 것이며, G는 BA만을 4mg/L, H는 2,4-D 0.1mg/L과 BA 4mg/L를 혼합 처리한 것이고, I는 2,4-D 1mg/L과 BA 4mg/L를 혼합 처리한 것을 나타낸 것이다.

[0085] 도 2는 본 발명의 조직배양 기술에 의해 흰민들레의 종자로부터 발아된 후 5주, 6주, 7주, 8주, 9주 된 잎에서 형성된 싹의 수, 싹형성율, 건조중량 및 생중량을 각각 비교하여 나타낸 그래프이다.

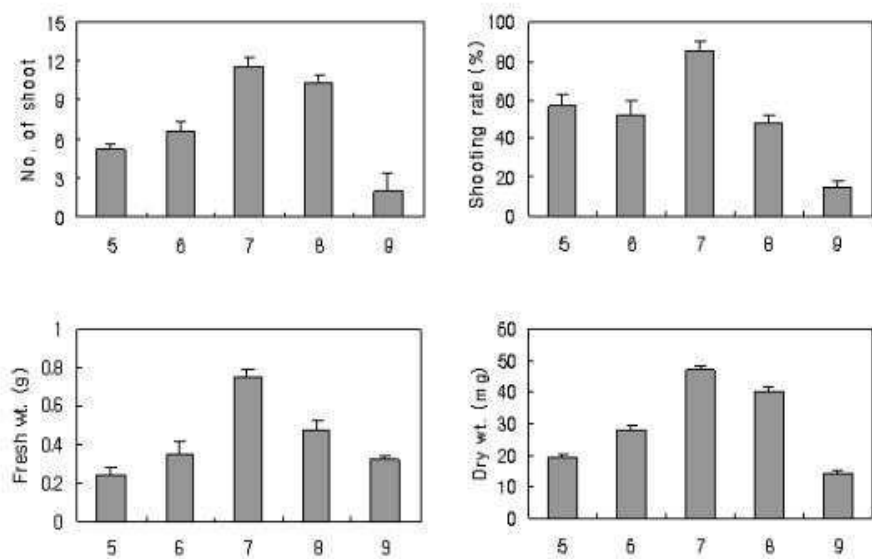
[0086] 도 3은 본 발명의 방법에 따라 형성된 싹, 뿌리 및 분으로 재분화된 민들레의 식물체 모습을 나타낸 사진으로서, A는 흰민들레의 싹조직으로부터 형성된 싹을 나타낸 것이며, B는 BA 2mg/L를 첨가한 배지에서 형성된 싹을 나타낸 것이고, C는 5주 된 잎에서 형성된 싹, D는 7주된 잎에서 형성된 싹을 나타낸 것이며, E는 0.5mg/ml NAA가 첨가된 배지에서 4주 동안 성장된 뿌리의 모습을 나타낸 것이고, F는 본 발명의 방법으로 분(pot)으로 이식하여 생육한 재분화된 흰민들레의 식물체 모습을 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

