(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0129630
(43) 공개일자 2010년12월09일

(51) Int. Cl.
C12N 5/04 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0048291
(22) 출원일자 2009년06월01일
심사청구일자 2009년06월01일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이호정
서울특별시 강동구 상일동 고덕주공5단지아파트 511동 503호
홍석환
광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 농업생명과학대학
호세인, 악타르
서울시 성북구 안암동1가 356
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 레몬 밤 마디 절편으로부터 재분화된 식물체의 대량 증식 방법

(57) 요 약

본 발명은 레몬 밤 마디 절편으로부터 재분화된 식물체의 대량 증식 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 멸균처리한 레몬 밤 식물로부터 마디 절편을 분리하는 단계, 분리된 마디 절편을 재분화 배지에서 배양하여 신초를 재분화시키는 단계, 재분화된 신초를 신장 배지에서 배양하여 신초를 신장시키는 단계, 상기 신장된 신초를 발근 배지에서 배양하여 발근을 유도시키는 단계, 및 발근된 신초를 토양에서 순화시켜 완전히 재분화된 레몬 밤 식물체를 대량으로 증식하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 107100-03-1-SB010
부처명 농림기술관리센터
연구관리전문기관
연구사업명 농림기술개발과제
연구과제명 피부미용 고기능성 허브(레몬밤) 확보, 기능성 평가 및 제품화
기여율
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2007 년 5 월 30 일~ 2010 년 5 월29 일

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 멸균처리한 레몬 밤 (Lemon Balm) 식물로부터 마디 절편 (node explant)을 분리하는 단계;

(b) 상기 분리한 마디절편을 0.5-2.0 mg/l 6-BA (6-benzylaminopurine) 를 포함하는 신초 (shoot) 재분화 배지에서 배양하여 신초를 재분화시키는 단계;

(c) 상기 재분화된 신초를 0.2-0.5 mg/l BA를 포함하는 신초 신장 배지에서 배양하여 신초를 신장시키는 단계;

(d) 상기 신장된 신초를 0.5-1.0 mg/l IBA(Indole-3-butyric acid)를 포함하는 신초 발근 배지에서 배양하여 신초 발근을 유도하는 단계; 및

(e) 상기 발근된 신초를 토양에서 순화시키는 단계를 포함하는, 레몬 밤의 대량 증식 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 사용하는 재분화 배지는 0.2-0.5 mg/l NAA(Naphtalene acetic acid)를 추가로 포함하는 것인 레몬 밤의 대량 증식 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 사용하는 신초 신장 배지는 0.2 mg/l NAA를 추가로 포함하는 것인 레몬 밤의 대량 증식 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 사용하는 재분화 배지는 1.0 mg/l BA를 포함하는 것인 레몬 밤의 대량 증식 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 사용하는 재분화 배지는 1.0 mg/l 및 0.2 mg/l NAA를 포함하는 것인 레몬 밤의 대량 증식 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b) 단계는 암조건인 재분화 단계를 포함하는 레몬 밤의 대량 증식 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계에 사용하는 신초 발근 배지는 1.0 mg/l IBA를 포함하는 것인 레몬 밤의 대량 증식 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 레몬 밤 마디 절편으로부터 재분화된 식물체의 대량 증식 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 멸균처리한 레몬 밤 식물로부터 마디 절편을 분리하는 단계, 분리된 마디 절편을 재분화 배지에서 배양하여 신초를 재분화시키는 단계, 재분화된 신초를 신장 배지에서 배양하여 신초를 신장시키는 단계, 상기 신장된 신초를 발근 배지에서 배양하여 발근을 유도시키는 단계, 및 발근된 신초를 토양에서 순화시켜 완전히 재분화된 레몬 밤 식물체를 대량으로 증식하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 레몬 밤(Lemon Balm, *Melissa officinalis* L.; Lamiaceae)은 널리 사용되는 다년생의 허브로 중앙 및 남부 유럽 및 소아시아에서 자라며, 또한 요리 용도로서 전세계에 걸쳐 재배되고 있다. 레몬 밤의 잎들은 양념 및 향신료의 목적으로 음식의 원료로 사용되고, 음료 및 피부손질 제품에 사용된다. 레몬 밤은 다양한 의학적 용도로 잘 알려져 있다. 식물체의 기생 부분(aerial part)은 높은 수준의 페놀 화합물(phenolic compound)을 함유하고 있고, 강한 항산화기능을 갖고 있다. 이러한 항산화기능으로 항균성, 항바이러스, 항진균성, 항암, 항 HIV-1, 항염증 및 면역 증강의 기능을 나타낸다. 레몬 밤은 종양세포에서 단백질 생합성을 억제하는 물질을 함유하고 있다고 보고되고 있다. 게다가, 알츠하이머 질환(Alzheimer's diseases)의 완화 및 중추 신경계의 조절에도 긍정적인 기능이 있음이 보고되었다. 레몬 밤의 생물학적, 약용 및 다른 사용 용도들 때문에, 이 종에 대한 관심이 증가되고 있으며, 따라서 레몬 밤은 약학 및 분자생물학 분야의 기본연구에 있어서 흥미로운 도구가 되고 있다.

[0003] 다른 한편으로는, 미세증식(micropropagation)법은 가치 있는 식물 유래의 의약 제품의 시장개척용으로, 약용 및 방향 식물들의 효율적인 기내 증식의 입증된 방법으로 여겨지고 있다 (Bajaj et al. 1988; Purohit et al. 1994; Pattnaik and Chand 1996; Rout 2002; Faisal et al. 2005). 식물의 유전적 형질전환을 포함하는 약학 및 분자생물 양쪽의 연구를 위해서는, 병원성의 오염이 없는 질 좋은 식물체의 대량생산을 위한 영양 및 환경의 변이가 필요하다. 식물체의 기내 재분화를 통한 대량증식은 이러한 목적을 위한 가장 적합한 선택중의 하나다.

[0004] 비록 식물의 재배와 이용은 고대부터 알려져 왔지만, 식물의 재분화 특히 기내에서의 재분화에 대한 정보는 매우 드물다. 세포배양의 확립과 유지 (Gbolade and Lockwood 1989, 1992; Schultze et al. 1993), 10일령의 유묘 (seedling)의 자엽 절편 (cotyledonary explant)으로부터 다신초 (multiple shoot) 형성 (Tavares et al. 1996) 또는 토양에서 자란 신초 말단 (shoot tip)(M'esz'aros et al. 2005) 및 레몬 밤의 신초 말단 증식을 통한 미세증식에서의 트리아콘타놀 (triacontanol)의 효과 (Tantos et al. 1999)와 같은 논문은 매우 적게 보고 되고 있으며, 이 종의 기내 증식에 있어서의 성공에 대한 자세한 정보는 여전히 부족하다. 일반적으로, 액아(auxillary bud) 형성을 통한 기내 증식은 무성 번식의 묘목 (clonal plantlet)의 형성에 유용한 기술이다. 부정아 (adventitious bud) 유도를 통한 식물 재분화는 변이 탐구, 작물학 가치에 새로운 특징을 도입하고 유전학적 형질전환을 통해 새로운 변이를 발전시키는 데 유용한 도구이다 (Corredoira et al. 2008). 비록 다른 종에서 마디 절편으로부터 부정아 형성 및 다신초 형성에 대한 몇몇 논문이 보고되고 있지만, 현재까지 레몬 밤의 마디 절편 배양에서 기내 재분화 및 증식에 대한 정확한 정보는 없다. 세포나 분자 생물학적 방법의 이용에서 가장 문제가 되는 것은 식물체의 재분화이지만, 여전히 재분화율이 낮고 재분화는 품종 및 계통에 따라서 재분화 정도에 차이가 있고, 재분화를 위한 조건이 복잡하며, 대체적으로 재분화 빈도가 낮기 때문에 이에 대한 연구에 노력들이 집중되고 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 레몬 밤의 마디 절편으로부터 식물체 재분화에 적합한 배지, 성장 조절제의 종류와 농도 및 광환경을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 레몬 밤의 재분화, 신장, 발근 및 순화단계에 효율적이고 재현성이 높은 조건을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문이 참조되고 그 인용은 괄호내에 표시된다. 인용된 논문의 개시 내

용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술분야의 수준 및 본 발명의 요지가 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 (a) 멸균처리한 레몬 밤 (Lemon Balm) 식물로부터 마디 절편 (node explant)을 분리하는 단계; (b) 상기 분리한 마디절편을 0.5-2.0 mg/l 6-BA (6-benzylaminopurine) 를 포함하는 신초 (shoot) 재분화 배지에서 배양하여 신초를 재분화시키는 단계; (c) 상기 재분화된 신초를 0.2-0.5 mg/l BA를 포함하는 신초 신장 배지에서 배양하여 신초를 신장시키는 단계; (d) 상기 신장된 신초를 0.5-1.0 mg/l IBA(Indole-3-butyric acid)를 포함하는 신초 발근 배지에서 배양하여 신초 발근을 유도하는 단계; 및 (e) 상기 발근된 신초를 토양에서 순화시키는 단계를 포함하는, 레몬 밤의 대량 증식 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 하나의 양태로서, 본 발명은 레몬 밤 마디 절편으로부터 재분화된 식물체의 대량 증식 방법에 관한 것이다.

[0009] 더욱 상세하게는 대량 증식 방법은 (a) 멸균처리한 레몬 밤 (Lemon Balm) 식물로부터 마디 절편 (node explant)을 분리하는 단계; (b) 상기 분리한 마디절편을 0.5-2.0 mg/l 6-BA (6-benzylaminopurine) 를 포함하는 신초 (shoot) 재분화 배지에서 배양하여 신초를 재분화시키는 단계; (c) 상기 재분화된 신초를 0.2-0.5 mg/l BA를 포함하는 신초 신장 배지에서 배양하여 신초를 신장시키는 단계; (d) 상기 신장된 신초를 0.5-1.0 mg/l IBA(Indole-3-butyric acid)를 포함하는 신초 발근 배지에서 배양하여 신초 발근을 유도하는 단계; 및 (e) 상기 발근된 신초를 토양에서 순화시키는 단계로 이루어진다.

[0010] 본 발명에서 사용된 용어 '레몬 밤(Lemon Balm, *Melissa officinalis* L.)'이란, 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로서, '멜리사(Melissa)' 라고도 불리며 예로부터 밀원 식물로 유명하다. 그리스어로는 '밀봉(蜜蜂)' 이라는 의미인데 줄기는 곧추서고 가지는 사방으로 무성하게 퍼지며, 잎은 마주나고 길고 둥글며 끝은 뾰족하다. 파종시기는 4~6월, 9~10월이며, 햇볕이 잘 들고 잘 경운된 비옥한 흙에서 자라고, 6월 중순부터 9월 초순까지 잎자루에 하얗고 작은 꽃이 3~7개씩 줄기 밑에서부터 위로 올라가면서 차례로 핀다. 씨앗 뿌리기, 꺾꽂이, 포기나누기로 번식한다. 레몬과 유사한 향이 있으며, 이 향은 감정을 편안하게 진정시켜 주며 심장 박동수를 낮추고 혈압을 낮추는 역할을 한다. 전갈이나 독거미에 물렸을 때 해독작용이 있고 설사를 완화시키며 바이러스를 막는 데 큰 효과가 있다. 천연두에도 효능이 있고 치통이 있을 때 입가심용으로 사용해 왔다. 독버섯 해독, 복통, 위궤양, 생리통 억제, 생리 촉진에 사용해 왔으며 예로부터 방향요법(향기요법)에 필수적으로 사용해 왔다. 잎과 가지에서 추출한 기름은 탈모방지, 목욕제 등으로 이용되며 차는 진정,건위, 강장, 신경 고양 등에 효능이 있으며, 기분을 상쾌하게 하기 위하여도 마신다. 샐러드나 수프, 소스, 오믈렛, 육류나 생선요리 등의 맛을 내는 데도 이용된다.

[0011] 상기 레몬 밤의 마디 절편으로부터 재분화된 식물체의 대량 증식 방법의 첫번째 단계인 단계 (a)는 멸균처리한 레몬 밤 식물로부터 마디 절편을 분리하는 단계이다.

[0012] 본 발명에서 사용된 용어 '마디 (node)'란, 식물의 줄기에 잎 또는 싹이 발달하거나 부착되는 위치를 의미하며, 절이라고도 한다. 길이생장과 비슷한 양상이 줄기 끝에서도 생기는데, 주기적으로 여기에서 잎이 나오며 이 부분이 마디이다. 일반적으로 종자식물의 마디에는 액아가 형성되며, 마디와 마디 사이를 절간이라고 한다. 정아에서의 절간은 대단히 짧지만 잎은 매우 빨리 자란다. 새로운 분열조직인 측아는 잎이 붙어 있는 바로 윗점인 마디에서 자란다. 측아가 발달될 때 분열조직은 새로운 줄기 조직을 만들고 가지를 형성한다. 마디의 구조는 윗마디 사이와 아랫마디 사이를 이어주는 관다발과 잎으로 이어지는 엽흔이나 가지에 연결되는 지흔으로 되어 있다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어 '절편 (explant)'이란, 조직배양에 이용하기 위한 식물체의 일부분, 또는 절편체들을

의미하며, 뿌리, 잎 같은 기관 또는 화분이나 배유 같은 세포 형태를 의미하며, 절편의 크기, 나이, 식물체에서의 위치, 극성 같은 조건이 조직배양 성공에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

[0014] 멸균처리한 레몬 밤 식물로부터 마디 절편의 분리 단계에 있어서, 마디 절편의 크기, 나이, 위치 등에 의해 재분화 과정의 효율에 차이가 많이 나기 때문에, 신초 정단으로부터 첫번째와 두번째 마디만을 분리하여 나이의 다양성에 의한 차이를 막고, 크기는 신초에서 대략 1 cm 이하, 바람직하게는 3-5 mm 길이의 외마디를 분리하여 절편으로 만들 수 있다. 멸균처리는 당업계의 공지의 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 레몬 밤에서 1 cm 이하 길이의 신초 말단을 분리하여 70% 에탄올로 씻어주고, Tween 20이 포함된 염화제2수은 ($HgCl_2$)의 수화용액에 첨지시켜 멸균시킨 후, 호르몬을 포함하지 않은 MS기본 배지에서 23±0.2℃에서 16h/8h의 명/암 조건으로 배양하여 멸균상태로 자란 레몬 밤 식물 모주를 확보한 후 신초에서 3-5 mm 길이의 외마디 절편을 분리하였다.

[0015] 다음으로, 단계 (b)는 상기에서 분리한 마디절편을 0.5-2.0 mg/l 6-BA (6-benzylaminopurine) 를 포함하는 신초 (shoot) 재분화 배지에서 배양하여 신초를 재분화시키는 단계이다.

[0016] 본 발명에서 사용된 용어 '재분화 (regeneration)'란, 식물 세포는 한 번 분화가 되어서 어떤 조직의 일부가 되어도 특정 조건이 갖춰지면 다시 재분화하여 다른 조직으로 만들어질 수 있으며, 이런 경우를 재분화라 한다. 이는 식물 세포가 동물 세포와는 달리 전체형성능 (totipotency)의 성질이 있어서, 한 번 분화가 되어 어떤 조직의 특성을 나타내게 되면 다시 다른 조직으로 분화될 수 없는 동물 세포와는 달리 다시 재분화할 수 있기 때문이다. 이런 식물의 잎이나 줄기, 뿌리 등의 일부분을 잘라서 그 표면을 살균한 후, 영양분이 들어 있는 시험관 내에서 무균적인 상태로 배양하면 새로운 식물체를 재생시킬 수 있고, 식물체의 이러한 재분화 능력을 이용하여 식물체 조직의 세포로부터 완전한 식물체를 분화시키는 기술을 조직배양이라고 한다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어 '신초 (shoot)'란, 그 해에 자라난 가지를 의미하며, 줄기의 선단을 적심했을 때 측아로부터 자라나온 가지, 숨은 눈이나 윗 쪽 또는 등어리에 위치한 눈에서 자라나온 가지와 같이 세력이 좋은 가지를 가리키는 경우가 많다. 잎과 줄기를 포함한 지상부를 의미하기도 한다.

[0018] 신초 재분화 단계에 있어서, 재분화 효율이 가장 좋은 광환경 및 성장 조절제가 포함된 재분화 배지를 사용할 수 있다. 성장 조절제는 옥신류 (auxins) 및 사이토키닌류 (cytokines)의 조합 또는 단독으로 사용할 수 있다. 옥신류의 종류로는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 이하 2,4-D라 함), 나프탈렌아세틱에시드 (Naphtalene acetic acid, 이하 NAA라 함), IBA를 사용할 수 있고, 사이토키닌류로는 BA, 티지아주론 (Thidiazuron, 이하 TDZ라 함)을 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용된 용어 '옥신'이란, 줄기의 신장에 관여하는 식물 생장 호르몬의 일종을 말한다. 옥신은 세포벽을 느슨하게 만들어 그에 의하여 세포가 흡수 성장할 수 있게 한다. 그 밖에 옥신은 세포막의 투과성을 높이고, 세포분열, 부정근형성, 화아형성 등을 촉진하고, 측아 성장을 억제한다. 제초, 낙화방지, 휴면-저장의 조절 등에 합성 옥신이 쓰이고 있다. 세포의 신장 생장에서 옥신은 줄기와 자엽초의 신장 생장을 일으킨다. 신장효과를 보이는 옥신의 최적 농도보다 더 높은 농도에서는 신장 생장이 저해되는데 높은 농도의 옥신이 세포 신장을 저해하는 에틸렌의 합성을 촉진하기 때문이다. 뿌리의 세포들도 역시 낮은 농도의 옥신에 반응하여 신장이 일어나지만 옥신의 농도가 높을 때는 오히려 신장이 억제된다. 옥신은 또한 잎맥의 신장도 촉진시킨다. 즉 적절한 옥신의 종류 및 농도의 결정은 재분화 등에 있어서 중요한 지표이다.

[0020] 본 발명에서 사용된 용어 '2,4-D'란, 합성 옥신의 일종으로 무색의 가루 모양 물질로 페놀 냄새가 난다. 녹는 점은 140.5℃, 증기압은 0.4 mmHg (160℃)이다. 물 (25℃)에는 620 mg/l 정도 녹으며 알칼리용액이나 알코올·다이에틸에테르에는 녹으나 석유에는 녹지 않는다. 2,4-D는 페녹시계의 호르몬형 침투이행성 제초제로서 그 사용량에 따라 살초 작용과 성장 조절제적인 역할을 하는 것으로 사용량에 의해서 옥신과 같은 기능을 하기 때문에 옥신류라 부른다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어 'NAA'란, 합성 옥신의 일종으로 파인애플에 살포하면 개화를 촉진하는 역할을 한다.

[0022] 본 발명에서 사용된 용어 'IBA'란, 합성 옥신의 일종으로 고농도의 옥신은 뿌리의 신장 생장은 억제하지만, 측근의 형성과 내초에서의 세포분열을 촉진하여 줄기나 잔가지 또는 캘러스에서의 부정근의 발달을 촉진하므로 삽목시 NAA나 IBA를 사용하여 부정근의 형성을 촉진시킨다. 천연 옥신류에 비해 합성 옥신은 식물체내에서 효소에 의한 분해가 쉽게 일어나지 않기 때문에 처리 후 오랜 기간 동안 효과를 유지할 수 있는 것으로 생각되고 있

다.

[0023] 본 발명에서 사용된 용어 '사이토키닌'이란, 뿌리와 줄기의 생장을 균형있게 하는 식물 호르몬의 일종이다. 사이토키닌은 식물체내에서 분화를 촉진시키는 역할을 하고, 식물의 조직을 배양할 때 생장점을 떼어내어 배양하면 미분화된 세포덩어리인 캘러스를 만드는데 이때 사이토키닌을 처리하면 뿌리, 줄기, 잎으로 분화가 이루어진다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어 'BA'란, 사이토키닌의 한 종류로 조직 분열에서 신초 형성까지 과정에서의 여러 반응과 체세포 배 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 발근 억제와 신초 재분화 촉진의 상호 작용을 일으킨다. TDZ에 의한 재분화 촉진은 칼슘 유도에 의한 반응에 의한다.

[0025] 재분화 배지는 전량 MS, 반량 MS, N6, B5, LS등과 같은 영양 기본 배지, 에너지원, 그리고 비타민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 에너지원은 바람직하게는 당류이고, 보다 바람직하게는 수크로스이다. 상기 비타민은 바람직하게는 니코틴산, 티아민 및 피리독식 등을 포함한다. 한편 본 발명의 재분화 배지는 고체 지지체로서 아가 또는 피타겔 (phytagel)을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는 3% 수크로스, 0.3% 피타겔 (pH 5.8)을 포함하는 반량 MS 배지를 재분화 배지로 사용할 수 있다.

[0026] 상기 재분화 단계에서의 재분화 배지에 포함되는 재분화 효율이 높은 성장 조절제의 종류와 농도는 0.5-2.0 mg/l BA, 바람직하게는 0.5-2.0 mg/l BA 및 0.2-0.5 mg/l NAA, 더욱 바람직하게는 1.0 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA, 더더욱 바람직하게는 1.0 mg/l BA를 포함시킬 수 있다.

[0027] 또한 재분화 단계에서의 재분화 효율이 높은 광환경은 표준 광주기인 16h 명/8h 암조건이며, 바람직하게는 명조건 또는 암조건, 더욱 바람직하게는 암조건이다.

[0028] 본 발명자들은 다음과 같은 방법으로 옥신류 및 사이토키닌류의 성장 조절제의 종류 및 농도의 조합 및 광환경을 결정하였다. 레몬 밤의 마디 절편을 BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/l), NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l), 2,4-D (0.1 및 0.2 mg/l) 및 TDZ (2.0 및 4.0 mg/l)의 다양한 조합을 포함하는 재분화 배지에서 표준 명이나 암조건에서 배양하여 재분화, 신초의 수, 신초의 길이의 백분율로 가장 적합한 조합 및 조건을 평가하였고, 그 결과 암조건의 BA (1.0 및 2.0 mg/l) 및 NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l)를 포함하는 배지에서 재분화 효율이 가장 높은 것을 알았다 (표 1 및 도 1). 이에 더 정확한 농도를 결정하기 위해 암조건에서 BA (1.0 및 2.0 mg/l) 및 NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l)를 포함하는 배지에서 배양하여, 그 결과 1.0 mg/l BA가 가장 높고 (재분화 효율이 100%, 신초 수가 9.8, 신초 길이가 0.84), 1.0 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA가 그 뒤를 따르는 것 (재분화 효율이 100%, 신초 수가 8.13, 신초 길이가 0.88)을 발견하여 (표 2), 이러한 성장 조절제의 조합 및 암조건이 가장 재분화에 좋은 조건임을 알 수 있었다.

[0029] 다음으로, 상기 (c) 단계인 신초 신장 단계에 있어서, 신장 효율이 가장 좋은 성장 조절제가 포함된 신장 배지를 사용할 수 있다. 성장 조절제는 옥신류 및 사이토키닌류의 조합 또는 단독으로 사용할 수 있다. 신장 배지는 전량 MS, 반량 MS, N6, B5, LS등과 같은 영양 기본 배지, 에너지원, 그리고 비타민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 에너지원은 바람직하게는 당류이고, 보다 바람직하게는 수크로스이다. 상기 비타민은 바람직하게는 니코틴산, 티아민 및 피리독신 등을 포함한다. 한편 본 발명의 신장 배지는 고체 지지체로서 아가 또는 피타겔을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는 3% 수크로스, 0.6% 아가 (pH 5.8)를 포함하는 반량 MS 배지를 신장 배지로 사용할 수 있다.

[0030] 상기 신장 단계에서 신장 배지에 포함되는 신장 효율이 높은 성장 조절제의 종류와 농도는 0.2-0.5 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA, 바람직하게는 0.2 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA, 더욱 바람직하게는 0.2 mg/l BA를 포함시킬 수 있다.

[0031] 발근 배지에 심기엔 신초의 길이가 작아서 신초의 신장 단계를 거치는 데, 재분화된 신초 덤불은 캘러스 부분을 포함하는 두개의 작은 덤불로 잘라서 신장을 시킨다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어 '캘러스 (callus)'란, 식물체에 상처를 낸다든지 접목을 하면 절단면의 형성층 부분에서 활발한 세포분열이 일어나 부정형의 세포덩어리가 형성되는데, 이 부정형의 세포덩어리를 캘러스라고 부른다. 캘러스에서는 세포가 활발히 분열 및 증식하고 있어 생장점과 마찬가지로 바이러스가 적고, 이 캘러스를 배지에서 배양하여 식물체를 육성하면 바이러스 무병개체가 되는 예가 많다.

[0033] 본 발명자들은 다음과 같은 방법으로 가장 좋은 옥신류 및 사이토키닌류인 성장 조절제의 종류 및 농도의 조합

을 결정하였다. 재분화된 신초 덤불 (shoot clump)은 마디 절편에서 생성된 캘러스 부분을 포함하는 두 개의 작은 덤불로 자르고, 신초 신장을 위해 다양한 조합의 BA (0, 0.2, 0.5 mg/l) 및 NAA (0, 0.2, 0.5 mg/l)를 포함하는 신장 배지로 옮겨서 길이가 1 cm 이상 자란 신초의 수 및 평균 길이의 신초의 수를 측정하여, 0.2 mg/l BA에서 가장 크고, 0.2 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA가 그 뒤를 따르고, 0.5 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA가 가장 낮은 것을 알았다 (도 3).

[0034] 다음으로, 상기 (d) 단계인 발근 유도 단계에 있어서, 발근 효율이 가장 좋은 성장 조절제가 포함된 발근 배지를 사용할 수 있다. 성장 조절제는 옥신류 및 사이토키닌류의 조합 또는 단독으로 사용할 수 있다. 발근 배지는 전량 MS, 반량 MS, N6, B5, LS등과 같은 영양 기본 배지, 에너지원, 그리고 비타민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 에너지원은 바람직하게는 당류이고, 보다 바람직하게는 수크로스이다. 상기 비타민은 바람직하게는 니코틴산, 티아민 및 피리독신 등을 포함한다. 한편 본 발명의 발근 배지는 고체 지지체로서 아가 또는 피타겔을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는 3% 수크로스, 0.6% 아가 (pH 5.7)를 포함하는 전량 MS 배지를 발근 배지로 사용할 수 있다.

[0035] 상기 발근 유도 단계에서, 발근 배지에 포함되는 발근 유도 효율이 높은 성장 조절제의 종류와 농도는 0.5-1.0 mg/l IBA, 바람직하게는 1.0 mg/l IBA를 포함시킬 수 있다.

[0036] 본 발명자들은 다음과 같은 방법으로 옥신류 및 사이토키닌류인 성장 조절제의 종류 및 농도의 조합을 결정하였다. 재분화된 신초들은 0, 0.5 또는 1.0 mg/l IBA 또는 NAA를 포함하는 발근 배지에 심었고, 신초 뿌리 발달의 백분율, 뿌리 개수, 뿌리 및 신초의 평균 길이 및 10개의 대표 유식물체의 뿌리 및 신초의 건조 중량을 측정하여 발근 능력을 측정하였다. 그 결과 1.0 mg/l IBA를 함유하는 배지에서 가장 높았고, 뒤를 이어 0.5 또는 1.0 mg/l IBA를 포함하는 배지에서였고, 가장 낮은 경우는 1.0 mg/l NAA를 함유하는 배지에서 임을 확인하여 (표 4), 상기와 같은 조건을 확립하였다.

[0037] 마지막으로, 상기 (e) 단계인 순화 단계에 있어서, 뿌리가 잘 발달된 기내 재분화된 레몬밤 식물체를 흐르는 물로 씻어 뿌리에 부착된 배지를 제거하고, 토양에 이식하여, 수분 유지를 위해 플라스틱 비닐로 3일 정도 덮은 순화과정을 거친 후 온실로 옮겨 생장시켜 레몬 밤을 대량 생산하게 된다 (도 4).

[0038] 이 때 순화과정에서 이용한 토양은 버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1로 혼합한 상토나 버미큘라이트, 피트모스, 상토를 1 : 1 : 1로 혼합시킨 토양 등 동업자에게 자명한 토양은 그 제한이 없다. 바람직하게는 포트 혼합물을 사용할 수 있다.

효 과

[0039] 본 발명은 레몬 밤의 외마디 절편으로부터 효율적인 기내 재분화 방법인 식물체의 대량 증식 방법을 확립하여, 효율적인 재분화 방법, 신장, 발근 및 순화 조건을 확립하였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실시예**

[0042] **실험 재료 및 실험 방법**

[0043] 1. 시험관 배양 시작

[0044] 컨테이너 흙에서 자란 레몬 밤에서 한 쌍의 작은 잎을 가진 대략 1 cm 길이의 부드러운 신초 말단을

잘랐다. 자른 신초들을 즉시 멸균수에 첨지시켜, 외부의 먼지를 제거하고 건조를 막았다. 절편들을 70% 에탄올로 1분간 살균하고, 멸균수로 2회 씻은 후, 상용표백제인 4% 수산화나트륨의 30% 수화용액 (v/v)에서 20분간 때때로 교반시켰다. 그 후, 멸균수로 5회 씻어준 후, Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA)을 한 방울 첨가한 $HgCl_2$의 0.1% (w/v) 수화 용액에 5분간 첨지시킨 후 멸균수로 반복해 씻어줬다. 멸균필터 종이로 절편에 붙어 있는 여분의 물방울을 제거시켰다. 절편들을 줄기 및 잎꼭지의 base를 제거하여 길이가 1 cm 이하가 되도록 잘라줬다. 그 후 호르몬을 포함하고 있지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) (4 g/l MS, 20 g/l 수크로스, 6 g/l 아가, 고압살균전의 pH 5.7, 121℃에서 15 psi로 20분간 고압살균) 배지에 절편들을 심었다.

[0045] 4개의 절편들을 각각 100 ml의 배지를 넣은 290 ml 용량의 투명한 플라스틱 컨테이너에 심고, 60 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ 형광 (florescence)이 있는 성장방 (growth room)에서 23±0.2℃에서 16 h/8h의 명/암 조건으로 배양하였다. 절편들은 호르몬이 없는 배지에 심은 6일 후 뿌리가 발달하기 시작하고, 3주 안에 증식이 될 준비가 되었다. 그러나 식물체들은 실험에 필요한 충분한 모주 (stockplant)의 수를 확보하기 위해서, MS 배지에서 뿌리절단에 의해 반복하여 증식시켰다.

[0046] 2. 부정 신초(adventitious shoot) 생성을 위한 절편의 제조

[0047] 멸균상태로 자란 레몬밤 식물들을 본 실시예에 사용하였다. 신초에서 3-5 mm 길이의 외마디 (도 1a)를 절편으로 삼아서 신초 생성 능력을 조사하였다. 절편들을 즉시 다양한 조합의 식물 성장 조절제와 400 μl/l 비타민 혼합제 (Gamborg's Vitamin Solution 1000X, Sigma, St. Louis, USA)가 포함된 재분화 배지에 옮겼다. 신초 분열조직 (meristem)이나 말단은 실험에 사용하지 않았다. 연령의 다양성을 막기 위해, 신초 정단으로부터 첫번째와 두번째의 마디만을 조사를 위한 절편으로 삼았다 (도 1 A).

[0048] 3. 배지와 배양조건

[0049] 3% 수크로스와 121℃에서 15 psi로 20분간 고압살균전에 pH 5.8로 맞춘 0.3% 피타겔을 포함하는 반량 MS 배지 (half strength MS media)를 재분화, 신초 재분화 및 증식을 위해 사용하였다. 신초 신장 배지는 피타겔 대신 0.6%의 아가를 사용하였다. 3% 수크로스와 0.6% 아가 (pH5.7)를 포함하는 전량 MS 배지 (full strength MS media)는 발근 유도를 위해 사용하였다. 모든 실험은 백색 형광램프에 의한 60 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$의 빛 강도 (light intensity)의 표준 광주기 (16h 명 및 8h 암) 및 25±2℃에 의해 조절되는 환경 (다른 언급이 되어 있는 것을 제외)에서 수행하였다. 암주기의 배양 플레이트와 병 (jar)은 알루미늄 호일로 포장하였다.

[0050] 4. 재분화를 위한 성장 조절제와 광환경 (light environment)의 결정

[0051] 기내의 절편체로부터 부정 신초 생성 (adventitious shoot generation)의 효율은 배양 동안의 배양 배지, 성장 조절제, 광주기 등의 여러 인자에 의해 영향을 받는다. 따라서, 신초 생성을 위한 효율적인 성장조절제 및 조합을 결정하기 위해, 마디 절편 (node explant)들을 BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/l), NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l), 2-4-D (0.1 및 0.2 mg/l) 및 TDZ (2.0 및 4.0 mg/l)의 다양한 조합을 포함하는 재분화 배지에서 배양하였다. 1개의 복제에 25 ml의 배지가 있는 배양 플레이트 (90 mm x 15 mm)에 20개의 절편들을 심었다. 5개의 복제 플레이트를 각각의 처리에 사용하였다. 따라서 각각의 처리를 위한 절편의 총 수는 100개이다. 절편들이 있는 배양 플레이를 표준 명이나 암에서 배양하여 신초의 재분화에 대한 빛의 영향을 조사하였다. 배양 3주 후, 각 처리의 효능을 뿌리의 발달, 각각의 절편들로부터 생성된 신초의 수 및 신초들의 평균 길이를 절편들의 백분율로 기록하여 평가하였다.

[0052] 5. 신초 재분화

[0053] 상기 실험에서 신초 재분화의 효율 (반응한 절편들의 백분율 및 절편당 생성된 신초의 수, 표 1 및 도 1)은 암조건에서 BA (1.0 및 2.0 mg/l) 및 NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l)를 포함하는 배지에서 두드러지게 높은 재분화 능력이 나타났다. 따라서, 본 발명자들은 재분화 및 신초 증식에 최적의 조건인 성장조절제의 특정한 조합을 결정하기 위해 암조건에서 BA (1.0 및 2.0 mg/l) 및 NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l)를 포함하는 재분화 배지의 또 다른 실험 조건을 세웠다. 알루미늄 호일로 싸서 암조건을 만든 190 ml 용량의 유리병 (Magenta, Sigma, St. Louis, USA)에 각각 50 ml의 배지를 넣고, 외절편 (single explant)들을 심었다. 6개의 복제에 총 60개의 절편들을 조사를 위한 각각의 처리에 사용하였다. 6주 후, 재분화 백분율, 각각의 절편들로부터 0.5 cm 길이이상으로 자란 신초의 수 및 각각의 처리에 3개의 복제 플레이트로부터의 평균 신초 길이를 측정하여 재분화효율을 결정하였다. 남은 절편들은 신초 신장 분석(shoot elongation assay)를 위해 신초 신장 배지(shoot elongation media)로 옮겼다.

[0054] 6. 신초 신장(Shoot elongation)

[0055] 새롭게 재분화된 신초 덤불은 마디 절편에서 생성된 캘러스 부분을 포함하는 두개의 작은 덤불로 자르고, 신초 신장을 위해 다양한 조합의 BA (0, 0.2 및 0.5 mg/l) 및 NAA (0, 0.2 및 0.5 mg/l)를 포함하는 신장 배지(elongation media)로 옮겼다. 신장 덤불 각 부분을 암조건에서 190 ml 용량의 유리병에 50 ml의 신장 배지를 넣고 심었다. 3일 후, 신초들은 알루미늄 호일을 제거하여 점차적으로 빛에 노출시켰다. 배지에 신초 덤불을 옮긴 3주 후, 대부분의 신초들이 1 cm 이상의 길이가 되었다. 그리고 나서 각각의 처리에서 신초의 신장 효율은 평균 높이가 1 cm 이상이 되는 신초의 수를 기록하여 평가하였다.

[0056] 7. 신장된 신초의 발근 유도 및 유식물체(plantlet)의 토양에서의 순화

[0057] 대략 정단으로부터 2 cm 길이를 자른, 상기 재분화된 신초들을 0, 0.5 또는 1.0 mg/l 의 IBA 또는 NAA를 포함하는 발근 배지에 심었다. 50 ml의 발근 배지를 함유한 각각의 유리병에 심고 명조건에 정치했다. 길이가 1 cm 이하인 신초들은 더 성장시키고, 두 번 이상의 증식을 위해 모절편 (mother explant)으로 남겼다. 발근 배지에서 절편들은 1주일 안에 뿌리가 발달하기 시작하였다. 발근 배지에 심은 2주 후, 뿌리가 잘 발달된 유식물체들을 뿌리채 뽑아서, 흐르는 물로 씻은 후, 플라스틱 컨테이너에 포트 혼합물(pot mix (Sungrow, Canada))를 넣고 심었다. 포트 혼합물에 심기 전, 유식물체는 각각의 처리에 대한 발근 능력을 평가하였다. 모든 유식물체 신초의 뿌리 발달 백분율, 뿌리 개수, 뿌리 및 신초의 평균 길이 및 10개의 대표 유식물체의 뿌리 및 신초의 건조 중량을 발근 능력을 측정하기 위해 기록하였다.

[0058] 기내에서 자란 식물체들은 높은 영양분, 식물 성장 조절제, 탄소원 및 습도가 일정하게 조절되는 성장조건에 노출되었었기 때문에, 곧바로 토양에 옮기는 갑작스런 변화는 생존에 맞지 않게 된다. 따라서, 토양조건에 점차적인 순화 (acclimatization) 단계가 필요했다. 그러므로, 포트 혼합물이 있는 컨테이너의 유식물체들은 심은 직후 적절한 광과 습도를 유지하기 위해 깨끗한 플라스틱 비닐로 덮었다. 3일 후, 커버를 점차적으로 제거하여 외부 환경에 순화시켰다. 생존 백분율은 유식물체를 포트 혼합물에 이식 후 15일째부터 결정하였다.

[0059] 8. 실험 설계와 통계학적 분석

[0060] 완전 무작위 실험 설계는 충분한 복제를 위한 배양 플레이트 또는 병 및 절편들을 정치하여 하였다. 각각의 실험은 적어도 3번을 반복하여 방법의 재현성을 확인하였다. 백분율로 표시된 데이터는 아크사인 변형

(arcsine transformation)을 하였다. 데이터는 SPSS (13.00 버전; SPSS Incorporation, Chicago, U.S.A.)로 통계학적으로 분석하였다. 분산분석 (Analysis of variance, ANOVA) 및 던칸의 다중범위검증 (Duncan's Multiple Range Test, DMRT)을 수행하여 $p<0.05$ 수준에서 가능한 처리의 변동 (variation)을 측정하였다.

[0061] **실험 결과**

[0062] 1. 신초의 재분화에서 성장 조절제 및 광환경의 효과

[0063] 기내에서 절편의 신초 재분화에는 식물 성장 조절제 및 광 (light)을 포함하는 인자가 영향을 미친다. 배양 배지에서 절편들은 각각 다른 성장 조절제 단독이나 조합 조건에 다르게 반응한다. 따라서, 최적의 성장 광 조건 및 부정 신초 생성 (adventitious shoot generation)에 더욱 효율적인 특정한 성장 조절제를 결정하기 위해서, 마디 절편들을 16개 조합의 시토키닌 (BA 및 TDZ) 및 옥신 (NAA 및 2-4-D)을 함유한 재분화 배지 및 두 개의 광체계 (light regime (표준 명 및 암조건))에서 조사하였다. 본 발명의 실시예에서 본 발명자들은 대조구인 성장 조절제가 없는 배지 및 암조건에서 배양된 절편들은 5일 안에 첫 신초가 생성되는 것을 알았고, 그 후 배지에 정치시킨 후 뒤이어 명조건에서 같은배지를 사용하였다. 캘러스 생성이 없는 각각의 절편으로부터 단지 1개 또는 2개의 신초만이 긴 뿌리가 발달하였다. 신초는 양 광체계의 배지에서 빠르게 자랐고, 신초의 신장은 명보다 암조건에서 더 빨랐다 (표 1 및 도 1 B 및 C). 그러나, 대조구인 MS 배지에서 신초들은 같은 배지나 신초 증식 배지 (shoot multiplication media)로 옮긴 후, 증식에 실패하였다. 다양한 농도의 성장 조절제를 함유한 배지에서 배양한 절편들 중, 빠른 재분화는 4.0 mg/l의 TDZ 및 0.1 또는 0.2 mg/l의 NAA를 함유한 배지에서 관찰되었고, 뒤이어 암조건의 0.5 mg/l의 BA 및 0.2 mg/l의 NAA 또는 NAA가 없는 1.0 mg/l BA를 함유한 배지가 그 뒤를 따랐다. 절편 중 가장 느린 재분화는 명조건의 4.0 mg/l BA를 함유한 배지였다. 광뿐 아니라 성장 조절제도 절편들에서 부정 신초의 생성에 유의적 ($p<0.001$)으로 영향을 미쳤다 (표 1). 절편들의 신초 재분화 백분율은 각 처리 간에 57.3에서 100의 범위 내였다. 재분화 빈도는 양 광체계에서 0.2 mg/l NAA 및 1.0 mg/l BA를 포함하는 배지 또는 1.0 mg/l BA 단독만을 포함하는 배지, 명조건에서 0.5 mg/l NAA 및 1 mg/l BA를 포함하는 배지, 암조건에서 0.2 mg/l NAA 및 2.0 mg/l BA 또는 0.1 mg/l 2-4-D 및 2.0 mg/l BA를 포함하는 배지 및 암조건에서 0.2 mg/l NAA 및 4.0 mg/l TDZ를 포함하는 배지에 접종한 절편들에서 100%였다. 가장 낮은 재분화 백분율 (57.3)은 명조건에서 4.0 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA를 포함한 배지에서 배양된 절편이었다. 절편당 생성된 신초의 평균 수는 성장 조절제 조합들의 전체에서 명조건에서 자란 쪽보다 암조건에서 자란 쪽이 유의적으로 ($p<0.001$) 높았다. 배지 정치 3주 후, 암조건에서 NAA가 없이 1.0 mg/l BA단독 또는 0.2 mg/l NAA 및 1.0 mg/l BA을 포함한 배지에서 절편당 신초의 수 (2.83)가 가장 컸다. 가장 낮은 쪽 (1.19)은 명조건에서 4.0 mg/l BA를 포함한 배지였다 (표 1 및 도 1d 및 e). 4.0 mg/l BA 단독 또는 4.0 mg/l BA 및 NAA를 포함하는 배지 및 NAA가 없거나 있는 2.0 또는 4.0 mg/l TDZ를 포함한 배지에서는 신초 증식 빈도는 비교적 낮았고, 절편당 생성된 신초의 수도 비교적 적었다. 암조건에서 생성된 신초들은 모든 조합의 성장 조절제에서, 명조건에서 자란 쪽보다 길이가 더 길었다 (표 1). 절편들 중 가장 높은 길이의 신초는 성장 조절제가 없는 배지에서 자란 쪽이고, 뒤이어 암조건의 4.0 mg/l의 TDZ 및 0.2 mg/l NAA를 포함한 배지에서 자란 쪽이고, 가장 낮은 길이 (0.54 cm)는 명조건에서 4.0 mg/l BA 및 0.5 mg/l NAA를 포함한 배지에서 자란 쪽이다. 게다가, 1.0 또는 2.0 mg/l BA 및 0.2 또는 0.5 mg/l NAA 또는 4.0 mg/l TDZ 및 0.2 mg/l NAA를 포함한 배지에서 신초 재분화와 더불어 캘러스도 형성되었다. 재분화 백분율을 고려해 볼 때, 절편당 생성된 신초의 수 및 캘러스 형성은 실험한 성장 조절제들 중 BA 단독 또는 NAA의 조합이 더 효율적이었다.

[0064] (표 1 : 레몬 밤 마디 절편의 부정 신초 생성에 있어서 식물 성장 조절제 및 광환경의 다양한 조합의 효과)

표 1

PGRs (mg l⁻¹)		Regeneration percentage		Shoot number		
		Light	Dark	Light	Dark	L
Control		91.7 ± 1.7	96.7 ± 3.3	.61 ± 0.04	1.24 ± 0.03	2.24
BA	NAA					
0.5	0.0	85.0 ± 2.9	98.3 – 1.7	1.68 – 0.05	2.12 + 0.14	1.23
1.0	0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	1.90 = 0.05	2.82 ± 0.04	0.85
1.0	0.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	1.95 = 0.06	2.73 ± 0.04	0.76
1.0	0.5	100.0 ± 0.0	98.5 = 1.5	1.70 = 0.03	2.30 ± 0.09	0.89
2.0	0.0	95.6 ± 2.5	98.4 = 1.6	1.58 = 0.06	2.37 ± 0.06	0.66
2.0	0.2	97.1 ± 2.9	100.0 ± 0.0	1.70 = 0.06	2.28 ± 0.04	0.72
2.0	0.5	92.3 ± 4.3	96.5 = 2.6	1.44 = 0.14	2.15 ± 0.08	0.72
4.0	0.0	62.2 ± 7.1	62.3 = 2.8	1.19 = 0.05	1.45 ± 0.03	0.55
4.0	0.2	57.3 ± 1.5	66.7 ± 3.8	1.29 ± 0.04	1.49 ± 0.05	0.54
4.0	0.5	66.4 + 3.4	76.8 – 4.9	1.25 – 0.03	1.43 + 0.05	0.54
BA	2-4-D					
2.0	0.1	98.7 ± 3.3	100.0 ± 0.0	1.47 = 0.02	2.05 ± 0.03	0.68

[0065]

[0066] 2. 마디 절편의 신초 재분화에 있어서 BA 및 NAA의 영향

[0067] 상기 실험에서 (표 1 및 도 1), 본 발명자들은 반응한 절편들의 백분율 및 절편당 생성된 신초의 평균 수에 관하여, 암조건에서 0.5-2.0 mg/l BA 단독 또는 NAA가 함께 포함된 배지에서 더 좋은 재분화가 일어난다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명자들은 암조건에서 절편들의 신초 재분화 능력에 관한 BA 및 NAA 농도를 조사하였다. 하나의 외마디 절편을 7가지 조합의 BA 및 NAA를 포함한 배지 50 ml을 넣은 190 ml 용량의 유리병에 심어서, 마디 절편 전체의 재분화에 가장 적절한 특정 성장 조절제의 조합을 결정하였다. BA 및 NAA의 조합은 절편들의 신초 재분화능력에 유의적으로 영향을 줬다. 이는 각 절편들로부터 발달된 신초의 수 (길이가 5cm이상 자람) 및 재분화 백분율로 판단하였다. 가장 높은 신초의 재분화 빈도는 100%이고, 이는 1.0 또는 2.0 mg/l BA 단독 또는 0.2 mg/l의 NAA가 함께 포함된 배지에서였다. 뒤를 이어, 0.5 mg/l의 BA를 포함한 배지이고, 가장 낮은 쪽 (86.7)이 2.0 mg/l BA 및 0.5 mg/l NAA를 포함한 배지였다. 유사하게 신초의 가장 높은 수 (9.8)는 NAA 없이 1.0 mg/l의 BA 단독만을 포함한 배지에서였다 (표 2 및 도 2b). 신초의 수는 BA 및 NAA 농도가 배지에서 증가할수록 줄어들었다. 1.0 mg/l BA 와 0.2 및 0.5 mg/l NAA를 포함한 배지에서, 절편당 신초의 평균 수는 각각 8.13 및 5.98이었다. 절편당 신초의 수는 2.0 mg/l BA 및 0.5 mg/l NAA를 함유한 배지에서 6주 후 5.25였다. 가장 높은 신초의 길이 (1.10 cm)는 0.5 mg/l BA 단독 또는 2.0 mg/l BA 및 0.5 mg/l NAA를 포함한 배지였고, 뒤를 이어서 1.0 mg/l BA 및 0.5 mg/l NAA를 포함한 배지였다. 재분화된 신초의 평균길이는 NAA 농도 및 양 BA 농도가 증가할 수 록 증가하였다 (표 2).

[0068] (표 2 : 레몬 밤 마디 절편의 신초 재분화에 있어서 다양한 농도의 BA 및 NAA의 효과)

표 2

PGRs (mg l⁻¹)		Regeneration percentage	Shoot number	Shoot length (cm)
BA	NAA			
0.5	0.0	94.4 ± 2.9 ^{ab}	5.93 ± 0.37 ^{c}	1.10 ± 0.03 ^{a}
1.0	0.0	100.0 ± 0.0 ^{a}	9.80 ± 0.35 ^{a}	0.84 ± 0.02 ^{d}
1.0	0.2	100.0 ± 0.0 ^{a}	8.13 ± 0.24 ^{b}	0.88 ± 0.02 ^{b}
1.0	0.5	93.3 ± 6.7 ^{ab}	5.98 ± 0.13 ^{c}	0.93 ± 0.02 ^{b}
2.0	0.0	100.0 ± 0.0 ^{a}	7.73 ± 0.24 ^{b}	0.82 ± 0.04 ^{b}
2.0	0.2	100.0 ± 0.0 ^{a}	7.27±0.27 ^{b}	0.81 ± 0.06 ^{b}
2.0	0.5	86.7 ± 6.7 ^{b}	5.25±0.28 ^{c}	1.08 ± 0.09 ^{a}

[0069]

[0070] 3. 재분화된 신초의 신장

[0071] 상기 재분화 배지에서 자란 절편에서 발달 되는 대부분의 신초들은 길이가 1 cm 이하로 작아서, 분리가 안 되고, 발근 배지로 심기에 적당하지 않다. 따라서, base에 캘러스를 포함한 두 개의 작은 송이인 다량의 신초 송이로 잘라낸 후, 신초 신장 분석을 위해 6개의 조합으로 이루어진 성장 조절제 (BA 및 NAA)를 함유한 신초 신장 배지로 옮겼다. 배지상의 BA의 낮은 농도는 신초가 발근 유도에 적당한 길이로 신장시켰다. 도 3는 아무런 성장 조절제가 없는 배지에서도 신초의 신장이 가능한 것을 보여준다. 그러나 가장 좋은 신장은 신장 배지에 정치 3주 후, NAA가 포함 되지 않은 0.2 mg/l의 BA 단독 또는 0.2 mg/l의 NAA 및 0.2 mg/l의 BA를 포함하는 배지에서 관찰되었다 (도 3 및 4 A). 신초의 신장은 비교적 높은 농도인 BA (0.5 mg/l) 단독 또는 NAA 및 BA (0.5 mg/l)가 포함된 배지에서 배양할 때에 줄어들었다. 비록 대조구 배지 및 0.2 mg/l BA를 포함하는 배지에서의 신초의 신장은 눈에 띄는 차이가 없었지만, 1 cm 길이 이상의 신초의 수는 성장 조절제가 포함된 배지보다 대조구 배지에서 눈에 띄게 적었다 (도 3). 게다가 대조구 배지에서 자란 신초들은 성장 조절제가 함유된 배지에서 자란 신초들과 비교하여 매우 얇았다. 이는 건강한 신초의 발달에 BA 및 NAA가 기여를 한다는 점을 나타낸다.

[0072] 4. 신장된 신초로부터 발근 유도

[0073] 상기 신장 배지에서 자란 신초 중 대략 2 cm 길이의 신초를 선택하여, 0, 0.5 또는 1.0 mg/l IBA 또는 NAA를 포함하는 발근 배지에서 그들의 발근 능력 (rooting ability)을 조사하였다. 신장된 신초는 MS 배지 단독 또는 발근 호르몬 (rooting hormone, 표 3 및 도 4c)을 포함하는 MS 배지에 심었을 때, 뿌리가 유도된다. 그러나, 신초의 발근 능력은 IBA 또는 NAA의 다양한 농도에 의해 영향을 받았다. 0.5 또는 1.0 mg/l 농도의 IBA에서 신초의 발근 능력은 증가하고, 반면에 대조구 및 0.5 mg/l의 NAA사이에서는 신초의 발근에서 눈에 띄는 차이가 없었다. 그러나, 더 높은 1.0 mg/l 의 NAA 농도는 신초의 뿌리 형성에 있어서 부정적인 영향을 미쳤다. 발근 빈도는 심은 16일 후의 0.5 또는 1.0 mg/l IBA를 포함하는 배지에 신초를 심었을 때 가장 높은 100% 였고, 뒤를 이어서 대조구 또는 0.5 mg/l의 NAA를 포함한 배지였고, 가장 낮은 (93.3%) 경우는 1.0 mg/l의 NAA를 포함하는 배지에서였다. 신초 당 생성된 뿌리의 평균 수는 최대 (11.2)가 1.0 mg/l IBA를 포함하는 배지였고, 뒤를 이어 0.5 mg/l의 IBA 를 포함하는 배지였다. 1.0 mg/l IBA를 포함하는 배지에서 발근된 신초는 가장 긴 뿌리를

생성하였고 (2.22 cm), 뒤를 이어 0.5 mg/l의 IBA를 포함하는 배지였고, 가장 길이가 짧은 경우는 1.0 mg/l의 NAA를 포함하는 배지였다. 뿌리 형성 후 대조구와 IBA 처리 간에 평균 신초 길이는 눈에 띄는 차이가 없었다 (표 3 및 도 4). 그러나, 뿌리 형성과정에서 양 농도에서 NAA는 눈에 띄게 신초의 신장을 줄였다. 발근된 신초에 있어서 신초의 건조 중량, 뿌리의 건조 중량 및 유식물체 당 총 건조 중량은 1.0 mg/l 의 IBA를 함유하는 배지에서 가장 높았고 뒤를 이어 0.5 또는 1.0 mg/l의 IBA를 포함하는 배지 에서였고, 가장 낮은 경우는 1 mg/l 의 NAA를 함유하는 배지에서였다.

[0074] (표 3 : 기내에서 재분화된 신초들의 발근 유도에 있어서 다양한 농도의 NAA 및 IBA의 효과)

표 3

PGRs (mg l⁻¹)		Regeneration percentage	Shoot number	Shoot length (cm)
BA	NAA			
0.5	0.0	94.4 ± 2.9 [ab]	5.93 ± 0.37 [e]	1.10 ± 0.03 [a]
1.0	0.0	100.0 ± 0.0 [a]	9.80 ± 0.35 [a]	0.84 ± 0.02 [d]
1.0	0.2	100.0 ± 0.0 [a]	8.13 ± 0.24 [b]	0.88 ± 0.02 [b]
1.0	0.5	93.3 ± 6.7 [ab]	5.98 ± 0.13 [e]	0.93 ± 0.02 [b]
2.0	0.0	100.0 ± 0.0 [a]	7.73 ± 0.24 [c]	0.82 ± 0.04 [b]
2.0	0.2	100.0 ± 0.0 [a]	7.27±0.27 [b]	0.81 ± 0.06 [b]
2.0	0.5	86.7 ± 6.7 [b]	5.25±0.28 [c]	1.08 ± 0.09 [a]

[0075]

[0076] 5. 발근된 신초의 토양에서의 순화

[0077] 기내에서 자란 식물체는 높은 영양분, 식물 성장 조절제, 탄소원 및 습도가 일정하게 조절되는 성장환경에 노출되어 있었다. 따라서, 외부 환경조건에 점차적인 순화가 필수적이다. 포트 혼합체가 들어있는 컨테이너의 유식물체를 깨끗한 플라스틱 비닐로 덮어서 적절한 빛 및 습도를 유지시켰다. 심은 3일 후, 커버를 점차적으로 제거하여, 외부 환경에 순화시켰다. 온실 조건하에서 포트 혼합체에 심은 15일 후, 대략 100%의 식물체가 생존하였다. 다른 발근 배지에서 뿌리 내린 식물체들간에 생존 백분율은 차이가 없었다.

산업이용 가능성

[0078] 본 발명에 따른 레몬 밤의 외마디 절편으로부터 효율적인 기내 재분화 방법인 식물체의 대량 증식 방법을 이용하여, 멸균 식물체를 제공하여 약학적 가치가 있는 약용식물의 약학 공장에서의 사용과 분자 생물학 연구에 있어서의 증가하는 요구에 부흥할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 다양한 식물 성장 조절제 및 광체계의 조합 조건에서 레몬 밤 마디 절편으로부터 부정 신초 (adventitious shoot)의 생성을 보여주는 사진이다. (A) 재분화 배지에서의 마디 절편; (B) 명조건의 성장 조절제가 없는 배지에서 배양 3주 후의 절편으로부터 신초 생성; (C)암조건의 성장 조절제가 없는 배지에서 배양 3주 후의 절편으로부터 신초 생성; (D) 1.0 mg/l BA 단독만을 포함한 배지에서 절편으로부터 재분화; (E) 1.0 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA를 포함한 배지에서 절편으로부터 재분화; (F) 4.0 mg/l TDZ 및 0.2 mg/l NAA를 포함

한 배지에서 절편으로부터 재분화.

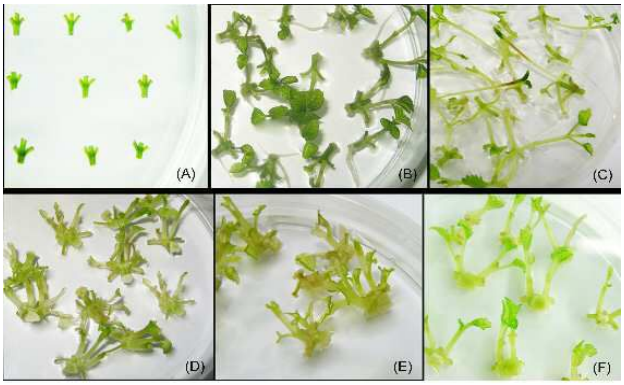
[0080] 도 2는 레몬 밤 마디 절편으로부터 부정 신초 재분화를 나타내는 사진이다. (A) 0.5 mg/l BA를 포함한 배지에서 배양 10일 후 재분화 시작; (B) 암조건의 1.0 mg/l BA를 포함한 배지에서 배양 6주후 다신초의 재분화; (C) 암조건의 1.0 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA를 포함한 배지에서 배양 6주 후 다신초의 재분화.

[0081] 도 3은 다양한 BA 및 NAA 의 농도 및 조합에서 다신초의 신장을 나타내는 그래프이다. 길이가 1 cm 이상 자란 신초의 수 (빈 막대) 및 평균 길이의 신초의 수 (줄 막대)를 막대 그래프로 나타내고, 0.2 mg/l BA가 포함된 신장 배지에서 가장 높은 신장 효율을 나타내다.

[0082] 도 4는 신초의 신장, 발근 및 발근 된 식물체의 온실 조건에서 순화를 나타내는 사진이다. (A) 0.2 mg/l BA 및 0.2 mg/l NAA를 포함하는 신장 배지에서 다신초를 심은 3주 후 신초의 신장; (B) 처음 신초를 자른 3주 후, 재분화되고 신장된 신초; (C) 심은 16일 후, 다양한 농도의 NAA 및 IBA를 포함하는 발근 배지에서 신초의 발근; (D) 뿌리가 난 식물체를 옮기고 깨끗한 비닐로 덮은 후 순화 단계; (E) 포트 혼합물에 심은 10일 후, 식물의 확립.

도면

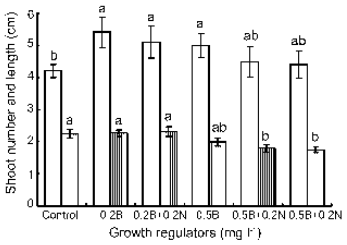
도면1



도면2



도면3


Shoot number and length (cm)
Control
0.2B
0.2B+0.2N
0.5B
0.5B+0.2N
0.5B+0.2N
Growth regulators (mg l⁻¹)

도면4


(A)
(B)
(D)
Control
0.5 NAA
1.0 NAA
0.5 IBA
1.0 IBA
(C)
(E)