

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2011-0014262 2011년02월10일
(51)	Int. Cl.	(71)	출원인
	<i>C12N 5/04</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) <i>A01H 4/00</i> (2006.01)		경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900
(21)	출원번호	(72)	발명자
	10-2011-0009115(분할)		이병현
(22)	출원일자		경남 진주시 금산면 장사리 금산 아이파크
	심사청구일자		111-1401호
(62)	원출원		박충훈
	원출원일자		부산광역시 동래구 사직2동 로얄아파트 2차 4동
	심사청구일자		102호
		(74)	대리인
			김순웅

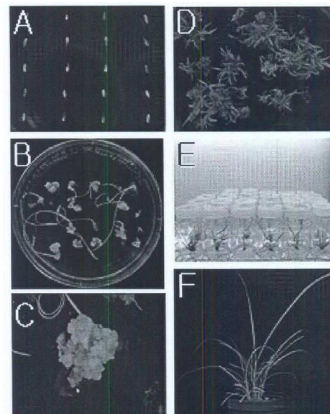
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 억제 성숙종자로부터의 식물체 재분화 방법

(57) 요약

본 발명은 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 25~35 g/L 수크로스, 700~800 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 1~3 g/L 젤라이트(gelrite)와, 1~3 mg/L 2,4-D 및 1.5~2.5 mg/L BA를 조합으로, 또는 1~3 mg/L kinetin을 단독으로 함유하는 MS 배지로 이루어진 식물체 재분화용 배지를 이용하여 배발생 캘러스로부터 식물체를 재분화하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

억새의 성숙종자로부터 유도된 배발생 캘러스를, 25~35 g/L 수크로스, 700~800 mg/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 1~3 g/L 젤라이트와, 1~3 mg/L 2,4-D 및 1.5~2.5 mg/L BA를 조합으로 또는 1~3 mg/L 키네티 (kinetin)을 단독으로 포함하는 MS 배지로 이루어진 식물체 재분화용 배지에 배양시켜 재분화를 유도하는 단계를 포함하는 식물체로의 재분화를 증가시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 식물체 재분화용 배지에서 수크로스 대신에 글루코오스를 포함하거나, 상기 MS 배지 대신에 N6 배지를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 식물체 재분화용 배지는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 2 g/L 젤라이트와, 1 mg/L 2,4-D 및 2 mg/L BA를 조합으로 또는 2 mg/L 키네티 (kinetin)을 단독으로 포함하는 MS 배지로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

22~26℃의 온도에서, 14~16시간 낮/8~10시간 밤 조건으로, 3~5 주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

25~35 g/L 수크로스, 700~800 mg/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 1~3 g/L 젤라이트와, 1~3 mg/L 2,4-D 및 1.5~2.5 mg/L BA를 조합으로, 또는 1~3 mg/L 키네티 (kinetin)을 단독으로 포함하는 MS 배지로 이루어진, 억새의 배발생 캘러스로부터 식물체로의 재분화용 배지.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 수크로스 대신에 글루코오스를 포함하거나, 상기 MS 배지 대신에 N6 배지를 포함하는 것을 특징으로 하는 배지.

청구항 7

제 5항에 있어서,

30 g/L 수크로스, 750 mg/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 2 g/L 젤라이트와, 1 mg/L 2,4-D 및 2 mg/L BA를 조합으로 또는 2 mg/L 키네티 (kinetin)을 단독으로 포함하는 MS 배지로 이루어진 것을 특징으로 하는 배지.

명세서

기술분야

본 발명은 억새 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 본

[0001]

발명에 의해 특정된 식물생장 호르몬을 지정된 농도로 함유하는 배지를 이용함으로써 억새 성숙종자로부터 배발생 캘러스를 유도하고 이 캘러스로부터 식물체를 재분화하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 억새(*Miscanthus sinensis*)는 우리나라 전 지역에 걸쳐 널리 분포하고 있는 다년생 초본으로서 30~35℃에서 최대의 광합성 효율을 나타내고 생장속도는 7~8월 사이에 가장 빠르다. 그리고 억새는 생활력이 강하여 폭풍우, 산불, 벌목, 경작 등 자연적, 인위적 교란에 의해 기존의 식생이 파괴된 자리에 다시 잘 발달하여 이차천이식생을 이루는 대표적인 식물 중 하나이다. 더욱이 예로부터 소나 말의 중요한 조사료로서 널리 이용되어 왔을 뿐만 아니라, 억새 뿌리와 건조한 환경조건에서 잘 자라는 특성 때문에 산지토양의 유실을 방지하는 피복식물로서도 많이 이용되어 왔다.
- [0003] 최근 세계적인 바이오 에너지 개발 열풍으로 인해 바이오 에탄올 원료 작물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 중에서 국내에 자생하고 있는 우리나라 억새는 생산량이 많고, 전국 각지의 다양한 환경에 잘 자라는 특성으로 인해 아주 우수한 잠재성을 가진 바이오 에탄올 원료작물 중에 하나이다. 억새는 광합성, 수분, 영양분 이용 면에서 아주 효율적이기 때문에 1년에 1ha 당 수량이 40톤 정도로 아주 높은 편이다. 또한, 옥수수과 사탕수수과 달리 비식용 작물이기 때문에 바이오 에너지 원료 작물로 개발될 경우 식량이나 사료를 원료로 개발한다는 윤리적인 문제를 피할 수 있는 측면에서도 그 잠재성은 더욱 크다.
- [0004] 억새와 같은 셀룰로스계 원료 작물로부터 바이오 에탄올을 제조함에 있어서 가장 중요한 것은 단위 면적당 수량이 많은 원료 작물을 확보하는 것과 효율적인 당화 및 발효 공정의 개발이라 할 수 있다. 따라서, 무엇보다 수량성이 높은 작물을 개발하는 것과 당화 및 발효 효율이 높은 원료 작물을 개발하는 것은 매우 중요하다.
- [0005] 원료 작물의 구성성분 중 바이오에탄올로 이용 가능한 것은 셀룰로스와 헤미셀룰로스이다. 따라서 당화가 불가능하고 셀룰로스나 헤미셀룰로스의 당화 반응도 저해하는 저해물질인 리그닌의 함량을 획기적으로 줄인 신품종을 개발하는 연구가 이루어져야 할 것이다.
- [0006] 리그닌의 함유량을 감소시킨 신품종 억새의 개발을 위해서 전통적인 육종법과 분자육종법을 사용할 수 있다. 전통적인 육종법에 의한 신품종 육종에는 많은 시간과 노력 및 공간이 필요하고 도입 가능한 유전형질의 제한 등 여러 가지 단점이 있다. 따라서, 형질전환과 같은 분자육종법에 의한 신품종 개발이 빠른 시간 내에 경쟁력을 확보할 수 있다. 신품종 분자육종을 위해서는 우선 효율적인 조직배양 체계와 형질전환 체계가 필수적으로 확립되어야 한다. 더욱이 유용 유전자를 가장 경제적이고 효율적으로 도입하기 위해 아그로박테리움 형질전환 기법이 가장 많이 이용되고 있으며, 이를 위해서는 먼저 고효율 재분화시스템이 확립되어야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명에서는 우리나라 전지역에 걸쳐 널리 분포하고 있는 억새를 아그로박테리움 형질전환기법을 통한 신품종 개발을 목적으로 우선 억새의 성숙종자로부터 배발생능이 높은 캘러스를 유도하고 이로부터 식물체를 재분화시키는 체계를 확립하고자 한다.
- [0008] 본 발명자는 억새 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 g/L 젤라이트(gelrite)가 함유된 MS 배지에 3 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지가 가장 효율적이며, 상기 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 g/L 젤라이트(gelrite)가 함유된 MS 배지에 1 mg/L의 2,4-D와 2 mg/L의 BA를 첨가한 배지가 가장 효율적이라는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 한 관점으로서, 억새 성숙종자를 25~35 g/L 수크로스, 700~800 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 1~3 g/L 젤라이트(gelrite)와, 2~4 mg/L의 2,4-D를 함유한 MS 배지로 이루어진 배발생 캘러스 유도용 배지에서 배양함으로써 억새 성숙종자로부터 배발생 캘러스로 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0010] 상기 배발생 캘러스 유도용 배지에서 MS 배지는 상업적으로 입수하거나, 당업계에 공지된 성분과 농도

등을 참조하여 제조할 수도 있다. 수크로오스를 포함하지 않은 MS 배지를 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 MS 배지는 아래 표 1과 같은 조성으로 구성되는 것이 바람직하다.

[0011]

표 1

바람직한 MS 배지의 조성

다량원소 (macro elements)		
성분	함량(mg/L)	농도(mM)
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
미량원소 (micro elements)		
성분	함량(mg/L)	농도(μM)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91
비타민 (vitamins)		
성분	함량(mg/L)	농도(μM)
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	0.50	4.06
Pyridoxine HCl	0.50	2.43
Thiamine HCl	0.10	0.30

[0012]

또한, 상기 배발생 캘러스 유도용 배지에서 기본 배지인 MS 배지는 N6 배지로 대체할 수 있다. 또한, 탄소원인 수크로오스도 글루코오스로 대체 가능하다.

[0013]

상기 배발생 캘러스 유도용 배지는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L MgCl₂ · 6H₂O 및 2 g/L 젤라이트(gelrite)와, 3 mg/L의 2,4-D를 함유하는 MS 배지로 이루어진 것이 보다 바람직하다.

[0014]

아울러, 역세 성숙종자를 상기 배발생 캘러스 유도용 배지에서 배양하여 배발생 캘러스로 유도함에 있어서, 온도는 22~26℃로, 광 조건은 40~60 μE/m² · s, 바람직하게는 50 μE/m² · s로, 배양 기간은 3~5 주간, 바람직하게는 4주간 설정한다.

[0015]

더 나아가, 본 발명은 역세 성숙종자를 배발생 캘러스로 유도하기 위하여 이용된 상기된 캘러스 유도용 배지에 관한 것이다. 여기서, 기본배지인 MS 배지는 상기 표 1에 나타난 조성으로 이루어지는 것이 바람직하고, N6 배지로 대체할 수도 있다. 또한, 탄소원인 수크로오스도 글루코오스로 대체 가능하다.

[0016]

본 발명은 다른 관점으로서, 역세 성숙종자로부터 유도된 배발생 캘러스를 25~35 g/L 수크로스, 700~800 mg/L MgCl₂ · 6H₂O 및 1~3 g/L 젤라이트(gelrite)와, 1~3 mg/L 2,4-D 및 1.5~2.5 mg/L BA를 함유한 MS 배지로 이루어진 식물체 재분화용 배지에 배양함으로써 배발생 캘러스로부터 식물체로 재분화하는 방법에 관

한 것이다. 상기 배지에서 1~3 mg/L 2,4-D 및 1.5~2.5 mg/L BA 대신에 1~3 mg/L kinetin을 이용할 수도 있다.

[0017] 또한, 상기 식물체 재분화용 배지에서 기본 배지인 MS 배지는 상기 표 1에 나타난 조성으로 이루어지는 것이 바람직하고, N6 배지로 대체할 수 있다. 또한, 탄소원인 수크로스도 글루코오스로 대체 가능하다.

[0018] 상기 식물체 재분화용 배지는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 2 g/L 젤라이트(gelrite)와, 1 mg/L 2,4-D 및 2 mg/L BA를 함유하는 MS 배지로 이루어진 것이 보다 바람직하다. 상기 배지에서 1 mg/L 2,4-D 및 2 mg/L BA 대신에 2 mg/L kinetin 단독을 이용할 수도 있다.

[0019] 아울러, 배발생 캘러스를 상기 식물체 재분화용 배지에서 배양하여 식물체로 재분화함에 있어서, 온도는 22~26℃로, 광 조건은 14~16시간 낮(light)/8~10시간 밤(dark) 조건으로, 바람직하게는 16시간 낮/8시간 밤 조건으로, 배양 기간은 3~5 주간, 바람직하게는 4주간으로 설정한다.

[0020] 더 나아가, 본 발명은 배발생 캘러스를 식물체로 재분화하기 위하여 이용된 상기된 식물체 재분화용 배지에 관한 것이다. 여기서, 기본배지인 MS 배지는 상기 표 1에 나타난 조성으로 이루어지는 것이 바람직하고, N6 배지로 대체할 수 있다. 또한, 탄소원인 수크로스도 글루코오스로 대체 가능하다.

발명의 효과

[0021] 바이오 연료의 중요성이 증대되고 있는 가운데 역새는 이러한 요구를 충족하는 큰 잠재력을 가진 바이오매스이다. 따라서, 바이오매스가 많은 품종, 당화 저해 물질인 리그닌 등의 함량을 줄인 품종 등과 같은 신품종 역새 개발은 이루어져야 한다. 이를 위하여 먼저 역새로부터 캘러스를 유도하고 이 캘러스로부터 식물체를 재분화하는 기술이 확립되어야 한다.

[0022] 본 발명에 의하면 역새의 성숙종자를 캘러스 유도용 배지에서 배양함으로써 높은 효율로 역새의 성숙종자로부터 배발생 캘러스를 유도할 수 있다.

[0023] 또한, 상기 역새의 성숙종자로부터 유도된 배발생 캘러스를 본 발명의 식물체 재분화용 배지에서 배양함으로써 높은 효율로 배발생 캘러스로부터 식물체를 재분화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 역새 종자 유래 캘러스로부터 식물체 재분화 과정을 나타낸 것이다(A: 캘러스 유도 배지 상에 놓인 역새의 성숙종자, B: 캘러스 유도 배지에서 4주간 배양된 성숙종자 유래 캘러스, C: 종자로부터 형성된 배발생 캘러스, D: 재분화 배지에서 4주간 배양된 배발생 캘러스로부터의 식물체 재분화, E: 발근 배지에서 배양된 소식물체, F: 온실하에서 화분에서 성장한 전체 식물).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0026] <실시예 1: 식물재료 및 종자살균>

[0027] 식물재료로는 국내산 역새의 성숙종자를 이용하였다. 종피를 제거한 성숙종자를 70% 에탄올에 1분간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후 30% 하이포염소산 나트륨 용액을 첨가하여 1시간 동안 교반하면서 표면살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 5회 이상 세정한 다음 멸균된 필터 종이로 옮겨 물기를 제거한 후, 캘러스 유도 배지에 치상하였다.

[0028] <실시예 2: 배발생 캘러스 유도>

[0029] 성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L $MgCl_2$

· 6H₂O, 2 g/L 젤라이트(gelrite) 및 여러 가지 농도의 식물생장 호르몬이 함유된 MS 배지를 사용하였다. 캘러스 유도에 있어서 식물생장 호르몬의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도 효율을 조사하기 위하여 상기의 유도배지에 옥신(2,4-D, dicamba, NAA)과 사이토키닌(BA, kinetin)을 단독 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2℃의 생장실에서 약광조건 (50 μE/m² · s)으로 4주간 배양한 후, 캘러스 유도효율을 조사하여 비교하였다.

[0030] 종자를 2,4-D, dicamba, NAA가 각각 0, 3, 5, 7, 10 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양한 결과, 종자로부터의 캘러스 유도율은 3 mg/L의 2,4-D가 76%로 가장 높게 나타났고 5 mg/L의 dicamba가 54%로 두 번째로 효율이 높았다. NAA의 경우, 가장 높은 유도효율인 10 mg/L가 5.3%라는 것을 볼 때 NAA는 역새 캘러스 유도에 있어서 적당하지 않다는 것을 알 수 있었다(표 2).

[0031]

표 2

성숙종자로부터 캘러스 유도에 대한 옥신의 영향

성장 조절인자	농도(mg/L)	캘러스 유도율 (%)
2,4-D	3	76.0
	5	70.6
	7	67.3
	10	56.0
dicamba	3	50.6
	5	54.0
	7	50.6
	10	51.3
NAA	3	2.0
	5	1.3
	7	2.6
	10	5.3

[0032] 한편, 옥신(2,4-D, dicamba)과 사이토키닌(BA, kinetin)을 혼용 처리하였을 경우는 3 mg/L의 2,4-D에 0.1 mg/L의 kinetin을 첨가하여 배양하였을 때 28%로 가장 높았다(표 3).

[0033]

표 3

성숙종자로부터 캘러스 유도에 대한 옥신과 사이토키닌의 영향

성장 조절인자 및 농도(mg/L)		캘러스 유도효율(%)
2,4-D	BA	
3	0.1	20
3	0.3	22
2,4-D	kinetin	
3	0.1	28
3	0.3	10
Dicamba	BA	
5	0.1	15
5	0.3	13
Dicamba	kinetin	
5	0.1	20
5	0.3	13

[0034] 따라서 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도하기 위한 최적 조건은 30 g/L 수크로스, 750 mg/L MgCl₂ ·

6H₂O, 2 g/L 젤라이트(gelrite)가 함유된 MS 배지에 3 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지로 판명되었다.

[0035] <실시예 3: 캘러스로부터 식물체 재분화>

[0036] 성숙종자로부터 유래된 캘러스를 식물체로 재분화시키기 위한 재분화 배지로는 30 g/L 수크로스, 750 mg/L MgCl₂ · 6H₂O, 2 g/L 젤라이트(gelrite) 및 여러 가지 농도의 식물생장 호르몬이 함유된 MS 배지를 사용하였다. 구체적으로 식물체 재분화를 위한 적정 식물생장 호르몬의 종류와 농도를 조사하기 위하여 4주령의 배발생 캘러스를 옥신(2,4-D, dicamba)과 사이토키닌(BA, kinetin)을 단용 또는 혼용 첨가된 재분화 배지에 옮겨 24±2℃, 16시간 낮/8시간 밤 조건에서 4주간 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 1cm 이상으로 자란 shoot를 재분화 개체로 조사하였다.

[0037] 앞서 3 mg/L 2,4-D가 첨가된 캘러스 유도배지에서 4주간 형성된 배발생 캘러스를 kinetin, BA가 각각 0, 2, 4 mg/L의 농도로 첨가된 재분화 배지에서 배양한 결과 2 mg/L kinetin이 41%로 가장 높은 재분화 효율을 나타내었고 2 mg/L BA가 38% 재분화 효율을 나타내었다(표 4). 따라서 kinetin과 BA 사이에 큰 차이는 없었고 두 식물생장 호르몬 모두 4 mg/L 농도에서 식물체 재분화 효율이 뚜렷하게 감소함을 확인할 수 있었다(표 4).

[0038]

표 4

식물체 재분화에 대한 성장 조절인자의 영향

성장 조절인자	농도(mg/L)	식물체 재분화 (%)
kinetin	0	14.0
	2	41.0
	4	19.0
BA	0	13.0
	2	38.0
	4	22.0

[0039]

또한, 옥신(2,4-D, dicamba)과 사이토키닌(BA, kinetin)을 혼용 처리하였을 경우는 1 mg/L의 2,4-D에 2 mg/L의 BA를 첨가하여 배양하였을 때 45%로 가장 높았다(표 5). 즉, 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화의 경우 2,4-D와 BA의 혼용 처리가 단용 처리보다 높은 효율을 보여주었다.

[0040]

표 5

식물체 재분화에 대한 옥신과 사이토키닌의 영향

성장 조절인자 및 농도(mg/L)		식물체 재분화율(%)
2,4-D	BA	
1	2	45
3	2	33
2,4-D	kinetin	
1	2	23
3	2	28
Dicamba	BA	
1	2	18
3	2	36
Dicamba	kinetin	
1	2	11
3	2	23

[0041]

따라서, 이후의 실험에서 배발생 캘러스 유도에는 3 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지를, 식물체 재분화에는 1 mg/L의 2,4-D와 2mg/L의 BA를 첨가한 배지를 사용하였다. 이러한 조건에서 배양하였을 때 배발생 캘러스는 캘러스 유도 배지에서 배양 4주 후 70% 이상 형성되었으며, 배발생 캘러스 유래 신초는 재분화 배지에서 배양 4주 후에 40% 이상 형성되었다. 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 발근 배지에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 화분에 이식하여 재배할 수 있었다(도 1의 E, F).

도면

도면1

