(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0122946
(43) 공개일자 2017년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 4/00 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01H 4/00 (2013.01)
A01H 4/001 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0051950
(22) 출원일자 2016년04월28일
심사청구일자 2016년04월28일

(71) 출원인
충청북도 (관리부서:충청북도 농업기술원)
충청북도 청원군 오창읍 가곡길 46
(72) 발명자
허윤선
충청북도 청주시 상당구 용담동 호미로 330번길 대림e편한세상@ 107동 1302호
이정관
충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 65, 우림필유2차@ 605동 1303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **양앵두 왜성대목의 대량증식을 위한 배양방법**

(57) 요 약

본 발명에서 신초(새가지)의 어린 잎을 채취하여 소독 및 치상한 후, 캘러스 및 부정아를 유도하였고, 이로부터 직접 신초를 형성하여 어린 식물체로 분화시켰으며, 이를 기외 순화시켜, 유목으로부터 성목을 생산하여, 양앵두 왜성대목 “기세라 5”의 묘목을 제조하는 방법을 확립하였고, 상기 잎 절편(엽편)의 치상 방법으로 잎 중앙맥에 상처를 내고, 잎 아랫면이 위를 향하고, 잎 윗면이 배지에 닿게 치상하였을 때, 캘러스의 형성이 현저하게 증가함을 확인하였으며, 본 명의 캘러스 유도 배지, 어린 식물체 분화 배지, 식물체 증식 배지에서 배양하였을 때, 배양묘의 생산 효율이 증가함을 확인하여, 본 발명의 배양방법은 양앵두 왜성대목 “기세라 5”의 대량생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7

(52) CPC특허분류
A01H 5/00 (2013.01)
C12N 5/0025 (2013.01)
C12N 5/04 (2013.01)
(72) 발명자
박상임
충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 105, 쌍용@ 908동 1304호

남상영
충청북도 청주시 흥덕구 대농로 55, 두산위브지웰시티2차@ 208동 604호

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 양앵두(cherry) 왜성대목 "기세라 5"의 신초의 유엽(어린 잎)으로부터 캘러스 및 부정아를 유도하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 부정아로부터 신초를 형성하여 배양하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 신초를 유목(어린 식물체)으로 분화시키는 단계; 및

4) 상기 단계 3)의 유목에서 뿌리를 형성한 후, 기외 순화시켜 성목을 생산하는 단계를 포함하는 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 대량증식을 위한 배양방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)은 글리신(Glycine) 3 내지 5mg/L, 미오이노시톨 (Myo-inositol) 150 내지 250 mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, Thidiazuron(TDZ) 0.5 내지 1.5mg/L, α-Naphthaleneacetic acid(NAA) 0.05 내지 0.15mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)은 유엽 중앙맥에 상처를 내고, 유엽 아랫면이 위를 향하고, 유엽 윗면이 배지에 닿게 치상하여 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)은 암상태에서 6 내지 10 주간 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 신초 형성은 아스코르빈산(Ascorbic acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 글리신(Glycine) 3 내지 5mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, 6-Benzylaminopurine (BAP) 0.25 내지 0.75mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.05 내지 0.15mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 신초 형성은 명상태에서 3 내지 5 주간 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 배양은 명상태에서 4 내지 8 주간 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 3)은 아스코르빈산(Ascorbic acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 글리신(Glycine) 3 내지 5 mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, 6-Benzylaminopurine (BAP) 0.75 내지 1.25mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.05 내지 0.15mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 단계 3)은 명상태에서 3 내지 5 주간 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 단계 4)의 뿌리의 형성은 아스코르빈산(Ascorbic acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 글리신(Glycine) 3 내지 5mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.75 내지 1.25mg/L, Naphthalene acetic acid (NAA) 0.25 내지 0.75mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 단계 4)의 뿌리의 형성은 명상태에서 4 내지 8 주간 실시하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엽편 배양방법을 이용한 양앵두 왜성대목 "기세라5"의 대량증식을 위한 배양방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 양앵두는 장미목 장미과 벚나무속(Prunus)에 속하는 쌍떡잎식물로 단양앵두(*Prunus avium* L.)와 신양앵두(*Prunus cerasus* L.), 그리고 단양앵두와 신양앵두의 교잡종인 듀크벚(duke cherry) 등을 일컫는 말이며, 원산지는 유럽 중남부 및 소아시아 지역이고, 현재 온대지방에서 주로 재배되고 있다. 전 세계적으로 295,892ha에서 1,550,737MT이 생산되고 있으며, 미국이 연간 약 23만 톤을 수확하는 체리의 주요 생산국이고, 유럽 서부 국가들 인 독일, 이탈리아, 프랑스, 스위스 등도 연간 약 70만 톤을 생산하고 있다. 우리나라에는 1908년에 처음 도입되었으며 1920년대 경주 등에서 일본 품종이 심어지기 시작하여 지금까지 재배되고 있다. 재배면적은 2006년 60ha에서 2010년 110ha으로 2배 정도 증가하였고, 수입량(미국산) 또한 2006년 1,292톤, 2010년 3,860톤, 2013년 10,100톤으로 급증하고 있다.

[0005] 양앵두의 중요 품종은 염색체가 2배체인 감과 양앵두(단양앵두, sweet cherry)와 4배체인 산과 양앵두(신양앵두, sour cherry)로 나뉘는데, 감과 양앵두는 과실의 신맛이 적어 생과용으로 적합하며, 산과 양앵두는 신맛이 많아 주로 가공용으로 사용되고 있다. 우리나라에서 대부분 감과 양앵두를 재배하고 있으며, 양앵두 소비 수요 증가에 따라 국내 재배면적 또한 함께 증가하고 있으나, 관련 묘목 수급이 원활하지 않아 생과 수입뿐만 아니라 묘목 수입 물량도 급증하고 있는 추세이다.

[0007] 감과 양앵두는 전세계적으로 소비자들에게 고급 생과 중의 하나로 인식되어 소비량이 급증하고 있어, 풍산성, 내열과성 등 과실의 품질이 좋고 생산성이 우수한 신품종의 육성을 위한 다양한 육종프로그램이 진행되고 있다. 양앵두 나무는 수고(나무의 키)가 높아 생력형 저수고 재배를 위한 왜성대목(矮性臺木, dwarf rootstock, 유전적으로 키가 작은 성질을 지닌 대목. 교목성으로 키가 큰 과수를 왜화시키고자 할 때 왜성대목과 접목을 하여 사용함)의 이용이 필요하여, 기존에는 야생 체리라 할 수 있는 푸른잎벚나무, 마자드, 마하렙 등을 대목으로 이용하여 묘목을 번식하였으나, 나무의 키가 너무 크기 때문에 현재에는 콜트 대목이나 왜성대목 계통인 기세라(Gisela) 혹은 GM계의 대목을 이용하여 묘목을 번식하고 있다.

[0008] 주로 사용되는 대목의 종류는 하기와 같다.

[0009] 1. 일반 대목

[0010] (1) 푸른잎벚나무(청엽앵, 靑葉櫻, *P. lannesiana* (Carr.) Wils)

[0011] 산벚나무 일종의 발육이 왕성한 교목성 대목으로 삽목 번식이 쉬우며 감과 양앵두와 접목 활착률도 높아 균일한 묘목 육성이 가능하다. 하지만, 현재 우리나라 및 일본에서는 거의 이용되지 않고 있다.

[0012] (2) 마자드(Mazzard, *P. avium* L.)

[0013] 감과 양앵두의 원생종으로 감과 양앵두와 산과 양앵두 모두 친화성이 높으나 삽목 번식이 어려워 종자에 의한 실생번식을 주로 하나 현재에는 거의 이용되지 않고 있다.

[0014] (3) 마하렙(Mahaleb, *P. mahaleb* L.)

[0015] 남부 유럽에 자생하며 종자로 주로 번식한다. 풍토에 대한 적응성이 넓으나 접목 활착률이 다소 낮은 편이며, 지상 60~70cm에서 접목하면 어느 정도 왜화 효과가 나타나지만, 나이가 들수록 대목부의 굵기가 접수의 굵기보다 가늘어지는 대부(臺負)현상이 일어난다.

[0016] 2. 왜성 대목

[0017] (1) 콜트(Colt)

[0018] 1958년 영국 이스트말링 연구소에서 육성된 왜성대목으로, 일반 대목 대비 약 30% 정도의 왜화 효과가 있다고 알려져 있으나, 우리나라와 일본의 재배환경에서는 왜화 효과가 뚜렷하게 나타나지 않는 것으로 평가되고 있다. 삽목이나 묻어떼기 방법으로 증식하며, 감과 양앵두 및 산과 양앵두 모두 접목친화성이 높다.

[0019] (2) 지엠(GM)계

[0020] 벨기에 짐브로우(Gembloux)의 과수 및 각과류 연구소에서 1962년에 선발된 계통 중 번식력, 친화성, 내상성(耐霜性), 생장력, 생산성 등의 평가를 통하여 1986년 인밀(Inmil, GM9), 다밀(Damil, GM61/1), 카밀(Camil, GM79)을 육성하였다.

[0021] 1) 인밀(Inmil, GM9) : 조직배양 및 삽목으로 번식하며, 감과 양앵두나 산과 양앵두 모두 접목 친화성이 좋다. 매자드 대목과 접목된 나무와 비교 시 1/4 정도 자라는 극왜성 대목이다.

[0022] 2) 다밀(Damil, GM61/1) : 삽목 번식이 쉬우며, 감과 양앵두와 접목 친화성이 좋다. 매자드 대목과 접목된 나무와 비교 시 1/2~1/3 정도 자란다.

[0023] 3) 카밀(Camil, GM79) : 반왜화성 대목으로 삽목 번식이 쉬우며, 감과 양앵두와 접목 친화성이 좋다. 매자드 대목과 접목된 나무와 비교 시 1/2~2/3 정도 자란다.

[0024] (3) 태산부군(泰山府君)

[0025] 일본 야마가다 원예시험장에서 선발한 왜성대목으로 배수성이 양호한 토양에서 재배 가능하다.

[0026] (4) 기세라(Gisela)

[0027] 독일 Giessen 대학교에서 육종되었으며, 현재 기세라 3, 5, 6, 12번이 주로 사용되고 있는데 숫자가 작을수록 왜화도 및 조기결실성이 강하다고 보고되고 있다. 지금까지 개발된 상업적 단양앵두 대목 중 가장 왜화성이 높은 품종은 '기세라 5'라고 알려져 있는데, *Prunus cerasus* 'Schattenmorelle'와 *P. canescens* 간 교잡을 통해 개발된 3배체 잡종으로, 준왜성 단양앵두 품종인 'Mazzard' 실생에 비해 50% 이상의 왜화도를 나타낸다. 또한

접수의 개화 및 숙기를 2~4일 단축시키고 다양한 양앵두 유전자형과 접목친화성을 가지고 있으며 아이라 바이러스(ilar virus)에 대한 내성도 가지고 있다.

[0029] 식물의 눈, 잎, 줄기, 뿌리 등의 조직을 인공적인 기내 환경에서 배양하여 온전한 식물체로 생산하는 기술을 “조직배양”이라고 하는데, 온도 및 습도가 조절되는 배양실 안에서 유리병이나 시험관 등의 배양용기 내에 식물체가 자랄 수 있는 양분을 넣고 오염이 없는 무균상태에서 식물체를 키우는 기술이라 하겠다. 이러한 조직배양 기술은 계절에 상관없이 연중 묘목 생산이 가능하여 적정한 배양조건이 확립되면 기내 식물체를 일시에 대량으로 생산할 수 있는 이점이 있다.

[0031] 식물체는 여러 종류의 기관 즉 뿌리, 줄기, 잎, 화기 등으로 구성되어 있는데 모든 기관이 분화능을 가지고 있으나, 기관의 종류에 따라 분화능력에 차이가 있기 때문에 적절한 배양기관의 선정은 대단히 중요하다. 대부분 경정부(정단부, shoot tip), 액아(곁눈, axillary bud), 잎 절편(엽편, leaf segment)등을 이용하여 배양하는데, 특히 잎 절편으로부터 신초(shoot)를 분화시켜 온전한 식물체를 재배하였다는 연구결과(Billings 등, 1988; Callow 등, 1989)가 보고된 이후, 토마토(Tatchell과 Binns, 1986), 감자(Shddrman와 Bevan, 1988), 크랜베리(Qu, 2000) 등 다양한 작물에 대한 적용사례가 보고되고 있다.

[0033] 배양기관 중, 엽편을 이용하여 신초 형성 및 식물체 재분화를 유도하는 배양 방법은 식물이 가지고 있는 분화능력인 전형성능(totipotency, 全形成能)을 이용하는 것으로, 단세포 혹은 식물 조직 일부분으로부터 완전한 식물체가 재생되는 능력을 말한다. 모든 세포가 전형성능을 지니고 있지만 세포조직의 분화 정도, 채취 부위, 배지의 조성, 배양 환경 등에 따라 발현되는 결과는 현저히 차이가 나므로, 작물의 종류 또는 품종의 종류에 따른 배양 조건의 최적화가 필요하다.

[0034] 일반적으로 엽편으로부터 신초 재분화(shoot regeneration)를 유도하려면 미분화된 부정형의 세포덩어리인 캘러스(callus)를 형성한 후, 신초가 형성되는 과정을 거치게 되므로, 배양 초기에 왕성한 캘러스 형성 능력 또는 직접적인 신초 분화 능력을 유도하는 배양 조건을 찾는 것이 가장 중요하다. 캘러스(callus)란 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로 식물에 상처가 났을 때 상처 주변 조직의 세포분열이 왕성해지면서 증식된 세포덩어리이다. 배양체 조직 절편의 상태나 배양 환경에 따라 캘러스의 형성 및 생장이 다르게 나타나며 적정 식물호르몬(식물생장조절제) 등이 포함된 영양 배지에서 배양하면 온전한 식물체로 분화 가능하다.

[0036] 상기의 대목의 종류별 특성을 통해 알 수 있듯이 단양앵두와 접목친화성 및 왜화도가 높은 '기세라 5'를 왜성대목으로 사용하는 경우 저수고, 초고밀식 양앵두 재배가 가능하므로, 노동력 절감 및 수량 증대 면에서 유리하다. 이러한 이유로, 국내뿐만 아니라 유럽과 미국 등에서도 '기세라 5'의 인기가 높으나 관행적인 묘목 증식방법인 삽목으로는 기외 삽수의 발근율이 매우 저조하여 대목 번식률이 현저히 떨어지는 문제가 있어 묘목 수급의 불균형이 초래되고 있는 실정이다. 따라서 관행적인 기존의 묘목 번식방법을 개선할 수 있는 효율적인 묘목 증식 기술의 필요성이 대두되고 있다.

[0038] 이에, 본 발명자들은 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 엽편(잎절편)을 배양하여 캘러스를 유도하고, 부정아(不定芽, adventitious bud, 잎, 뿌리, 줄기 절간 등 일반적으로 눈이 형성되지 않는 기관이나 조직에 생기는 눈)를 형성한 후, 이로부터 직접 신초를 형성하고, 유목(유식물체)으로 분화시킨 후, 이를 기외 순화하여, 국내에서 왜성대목으로 가장 널리 사용 중인 "기세라 5"의 묘목을 효율적으로 증식하는 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0040] 본 발명의 목적은 엽편 배양방법을 이용하여 양앵두 왜성대목 "기세라 5"(*Prunus cerasus* x *Prunus canescen*

s)의 대량증식을 위한 기내 유식물체 형성을 최적화할 수 있는 적정 배양방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0042] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0043] 1) 양앵두(cherry) 왜성대목 "기세라 5"의 신초의 유엽(어린 잎)으로부터 캘러스 및 부정아를 유도하는 단계;

[0044] 2) 상기 단계 1)의 부정아로부터 신초를 형성하여 배양하는 단계;

[0045] 3) 상기 단계 2)의 신초를 유목(어린 식물체)으로 분화시키는 단계; 및

[0046] 4) 상기 단계 3)의 유목에서 뿌리를 형성한 후, 기외 순화시켜 성목을 생산하는 단계를 포함하는 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 대량증식을 위한 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0048] 본 발명에서 신초(새가지)의 어린 잎을 채취하여 소독 및 치상한 후, 캘러스 및 부정아를 유도하였고, 이로부터 직접 신초를 형성하여 어린 식물체로 분화시켰으며, 이를 기외 순화시켜, 유목으로부터 성목을 생산하여, 양앵두 왜성대목 “기세라 5”의 묘목을 제조하는 방법을 확립하였고, 상기 잎 절편(엽편)의 치상 방법으로 잎 중앙맥에 상처를 내고, 잎 아랫면이 위를 향하고, 잎 윗면이 배지에 닿게 치상하였을 때, 캘러스의 형성이 현저하게 증가함을 확인하였으며, 본 명의 캘러스 유도 배지, 어린 식물체 분화 배지, 식물체 증식 배지에서 배양하였을 때, 배양묘의 생산 효율이 증가함을 확인하여, 본 발명의 배양방법은 양앵두 왜성대목 “기세라 5”의 대량생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[0049] 관련하여, 본 발명의 양앵두 왜성대목 “기세라 5” 품종의 대량생산을 위한 배양방법은 국내 묘목 수요 충족, 농가 보급 위한 연중 묘목생산 시스템 확립, 우량묘목 자급화, 수입 묘목 대체 및 로열티 절감, 생산성 증대 등을 가능하게 하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 잎 중앙맥 상처 처리 여부별 캘러스 형성의 비교를 나타낸 도이다.

도 2는 엽편 캘러스로부터 직접 형성된 신초(배양 3~4주)를 나타내는 도이다.

도 3은 엽편 캘러스로부터 직접 형성된 신초만을 골라서 다시 6주간 배양한 후의 신초를 나타낸 도이다.

도 4는 유식물체 증식을 나타낸 도이다.

도 5는 발근 배지의 종류에 따른 유식물체의 뿌리 형성의 비교를 나타낸 도이다.

도 6은 표 7의 조성으로 제조된 배지를 발근 배지로 사용하였을 때, 뿌리가 완전히 분화된 유식물체를 나타낸 도이다(좌 : 뿌리가 분화된 유식물체, 우 : 배지 내에 형성된 뿌리).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0055] 본 발명은

[0056] 1) 양앵두(cherry) 왜성대목 "기세라 5"의 신초의 유엽(어린 잎)으로부터 캘러스 및 부정아를 유도하는 단계;

[0057] 2) 상기 단계 1)의 부정아로부터 신초를 형성하여 배양하는 단계;

[0058] 3) 상기 단계 2)의 신초를 유목(어린 식물체)으로 분화시키는 단계; 및

[0059] 4) 상기 단계 3)의 유목에서 뿌리를 형성한 후, 기외 순화시켜 성목을 생산하는 단계를 포함하는 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 대량증식을 위한 배양방법을 제공한다.

[0060] 상기 단계 1)은 글리신(Glycine) 3 내지 5mg/L, 미오이노시톨 (Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, Thidiazuron(TDZ) 0.5 내지 1.5mg/L, α-Naphthaleneacetic acid(NAA) 0.05 내지 0.15mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것이 바람직하고, 유엽 중앙맥에 상처를 내고, 유엽 아랫면이 위를 향하고, 유엽 윗면이 배지에 닿게 치상하여 실시하는 것이 바람직하다.

[0061] 배지에 첨가되는 글리신은 아미노산(amino aicd) 중 하나로 배양 식물체에 암모늄 이온(ammonium ion)과 같은 환원된 형태의 질소(reduced nitrogen)를 공급하는 에너지원 역할을 하며, 미오이노시톨은 비타민 B복합체의 구성성분인 이노시톨형 성분으로 생체의 막 구성 성분이기도 하여 세포벽 생합성이나 다당류의 생합성에 사용되는 성분이며, 식물 조직배양에서는 생장촉진물질로써 사용되고 있어 식물의 캘러스 배양뿐만 아니라 배배양, 생장점배양 등에서도 활용되고 있다. 비타민 B 계통인 티아민 HCl, 니코틴산, 피리독신 HCl은 미오이노시톨과 마찬가지로 식물 조직배양에서 생장을 촉진시키는 효과를 나타내며, 특히 티아민은 당류 대사작용(carbohydrate metabolism)과 아미노산 생합성(amino acid biosynthesis) 작용에 관여하는 중요한 성분이다.

[0062] 따라서 상기 배지에 식물세포의 분열, 증식 및 생장을 촉진시키는 식물생장조정제(식물호르몬)인 옥신(Auxin) 계통의 NAA와 시토키닌(Cytokinin) 계통의 TDZ 뿐만 아니라 글리신, 미오이노시톨, 티아민 HCl, 니코틴산, 피리독신 HCl을 첨가하는 경우 양앵두 왜성대목 “기세라 5”의 캘러스 및 부정아의 형성, 증식, 생장에 유리하였다.

[0063] 조직배양 과정에서 배양체로부터 유도된 캘러스는 식물체의 종류 및 배양환경에 따라, 체세포 배(體細胞胚, somatic embryo, 종자의 배와 같이 기관을 분화하는 체세포)로 분화하는 체세포 배 발생(體細胞胚發生, somatic cell embryogenesis, 절편체의 체세포 조직으로부터 직접 배를 형성시키거나, 절편체에서 생긴 캘러스로부터 간접적으로 배를 발생시키는 것) 단계를 거친 후 신초가 형성되거나, 또는 캘러스로부터 직접 신초가 형성(direct shoot organogenesis)되기도 한다. 특히 캘러스로부터 직접 신초를 유도하는 경우에는 캘러스에서 부정아(不定芽: adventitious bud, 잎, 뿌리, 줄기의 절간(節間)등 일반적으로 눈이 형성되지 않는 기관이나 조직에서 생기는 눈)의 형성을 유도하고 이로부터 신초를 직접 재생시킬 수 있다.

[0064] 또한, 상기 단계 1)은 암상태에서 6 내지 10 주간 실시하는 것이 바람직하며, 8주인 것이 보다 바람직하다.

[0065] 또한, 상기 단계 2)의 신초 형성은 아스코르빈산(Ascorbic acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 글리신(Glycine) 3 내지 5 mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산 (Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, 6-Benzylaminopurine (BAP) 0.25 내지 0.75mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.05 내지 0.15mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것이 바람직하고, 명상태에서 3 내지 5 주간 실시하는 것이 바람직하며, 4주인 것이 보다 바람직하다.

[0066] 배지에 첨가되는 아스코르빈산은 비타민 C로써 식물 조직배양 기본배지에 첨가하여 사용하는 경우 배양체에서 생기는 페놀 화합물(phenolic compound)의 발생을 억제하여 배양 식물체의 갈변(browning) 또는 흑변(blackening)현상을 감소시키고 건전한 배양묘의 생산효율을 높이는 효과를 나타낸다.

[0067] 따라서 상기 배지에 식물세포의 분열, 증식 및 생장을 촉진시키는 식물생장조정제(식물호르몬)인 옥신(Auxin) 계통의 IBA와 시토키닌(Cytokinin) 계통의 BAP 뿐만 아니라 아스코르빈산, 글리신, 미오이노시톨, 티아민 HCl, 니코틴산, 피리독신 HCl을 첨가하는 경우 양앵두 왜성대목 “기세라 5”의 캘러스로부터 바로 신초를 형성시킬 수 있었다.

[0068] 또한, 상기 단계 3)은 아스코르빈산(Ascorbic acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 글리신(Glycine) 3 내지 5mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, 6-Benzylaminopurine (BAP) 0.75 내지 1.25mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.05 내지 0.15mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것이 바람직하고, 명상태에서 3 내지 5 주간 실시하는 것이 바람직하며, 4주인 것이 보다 바람직하다.

[0069] 또한, 상기 단계 4)의 뿌리의 형성은 아스코르빈산(Ascorbic acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 글리신(Glycine) 3 내지 5mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 150 내지 250mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 1.5 내지 2.5mg/L, 니코틴산 (Nicotonoc acid) 0.5 내지 1.5mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 0.5 내지 1.5mg/L, Indole-3-Butyric

Acid(IBA) 0.75 내지 1.25mg/L, Naphthalene acetic acid (NAA) 0.25 내지 0.75mg/L를 포함하는 배지에서 실시하는 것이 바람직하고, 명상태에서 4 내지 8 주간 실시하는 것이 바람직하며, 6주인 것이 보다 바람직하다.

[0070] 상기 배지에 식물의 뿌리세포의 분열, 증식 및 생장을 촉진시키는 식물생장조정제(식물호르몬)인 옥신(Auxin) 계통의 IBA와 NAA뿐만 아니라 아스코르빈산, 글리신, 미오이노시톨, 티아민 HCl, 니코틴산, 피리독신 HCl을 첨가하는 경우 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 유식물체 뿌리 형성을 유도할 수 있었다.

[0072] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 신초(새가지)의 유엽(어린 잎)을 채취하여 소독 및 치상한 후, 캘러스 및 부정아를 유도하였고, 이로부터 직접 신초를 형성하여 어린 식물체로 분화시켰으며, 이를 기외 순화시켜, 유목으로부터 성목을 생산하여, 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 묘목을 제조하는 방법을 확립하였다. 또한, 상기 잎 절편(엽편)의 치상 방법으로 잎 중앙맥에 상처를 내고, 잎 아랫면이 위를 향하고, 잎 윗면이 배지에 닿게 치상하였을 때, 캘러스의 형성이 현저하게 증가함을 확인하였으며(도 1 참조), 본 명의 캘러스 유도 배지, 어린 식물체 분화 배지, 식물체 증식 배지에서 배양하였을 때, 배양묘의 생산 효율이 증가함을 확인하였다(도 4 내지 도 6 참조).

[0073] 따라서, 본 발명의 엽편 배양방법을 이용한 기내 유식물체 배양방법은 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 대량생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[0075] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0076] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0078] **<실시예 1> 신초(새가지) 어린 잎(유엽, 幼葉) 조직으로부터 캘러스 유도 배양**

[0079] 5월에 양앵두 왜성대목 "기세라 5"의 신초에서 나는 어린 잎(유엽)을 채취하여, 실험실에서 흐르는 물에 2분간 표면 세척하였다. 그런 다음, 클린벤치(무균작업대)에서 70% 에탄올이 담긴 멸균 유리병(외경 81㎜, 높이 132㎜)에 30 초간 어린 잎을 침지하여 잎 표면을 소독하고 2% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액이 담긴 멸균 유리병에서 10분 동안_침지하여 1회 소독한 후 꺼내어서 멸균수가 담긴 유리병에서 5분씩 3회 세척하였다.

[0080] 그 후, 세척 및 소독이 완료된 어린 잎은 잎의 중앙맥인 중심맥 (main vein, midrib, 엽신의 중앙 기부에서 끝을 향해 있는 커다란 맥. 주된 잎맥으로 보통 가장 굵은 맥을 말함)을 포함하여 가로와 세로의 길이가 각각 1cm 정도 되게 잎의 가장자리를 메스로 잘라낸 후 잎의 아랫면(abaxial surface)이 위로 향하고 잎의 윗면(adaxial surface)이 아래로 향하게 하여, 어린 잎으로부터 캘러스를 형성시키고 부정아를 유도하는 배지로써, 하기 표 1에 기재된 바와 같이, WPM 기본배지(Lloyd & McCown Woody Plant Basal Salt Medium w/o vitamins, MBcell)에 수크로오스(Sucrose) 30g/L, 글리신(Glycine) 4mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 200mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 2mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 1mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 1mg/L, 아가(한천) 7g/L, Thidiazuron(TDZ) 1mg/L, α-Naphthaleneacetic acid(NAA) 0.1mg/L 및 PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology社) 1㎖/L를 첨가하여 제조한 후, 배지의 pH를 5.8로 조정하여 고압멸균(121℃, 1.2 kgf · cm^{-2} pressure, 15분) 한 후 사용하였다.

표 1

[0082]

성 분 명	함 량
NH_4NO_3	400.00 mg/L
$MgSO_4$	180.70 mg/L
K_2SO_4	990.00 mg/L
KH_2PO_4	170.00 mg/L
$Ca(NO_3)_2 4H_2O$	386.00 mg/L

$CaCl_2$	72.50 mg/L
$ZnSO_4 7H_2O$	8.60 mg/L
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25 mg/L
$MnSO_4 H_2O$	22.30 mg/L
H_3BO_3	6.20 mg/L
$C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8 3H_2O$	42.11 mg/L
$CuSO_4 5H_2O$	0.25 mg/L
Glycine	4.00 mg/L
Myo-Inositol	200.00 mg/L
Thiamine HCl	2.00 mg/L
Nicotinic acid	1.00 mg/L
Pyridoxine HCl	1.00 mg/L
TDZ	1.00 mg/L
NAA	0.10 mg/L
PPM	1 ㎖/L
Sucrose	30.00 g/L
Aagr	7.00 g/L
배지의 pH	5.8

[0084] 그런 다음, 잎 절편을 식물 배양용 페트리디쉬 (plant culture dish, 외경 100㎜, 높이 40㎜)에 치상한 후 빛이 차단된 암상태에서 8주간 배양하였다.

[0086] 이 때 중심맥을 0.2~0.25㎝ 간격으로 메스를 이용하여 칼집을 내듯 상처를 내어(incising) 치상하면, 잎 절편체로부터 유도되는 캘러스 형성율을 높일 수 있는데, 잎의 윗면 또는 아랫면이 배지에 닿게 각각 방향을 다르게 하여 치상하는 경우와 잎의 중앙맥을 상처 내어 준 후 치상하는 경우에 대한 캘러스 형성율을 조사한 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 잎 중앙맥에 상처를 내고, 잎 아랫면이 위를 향하고, 잎 윗면이 배지에 닿게 치상하였을 때, 캘러스의 형성이 현저하게 증가함을 확인하였다.

표 2

[0087]

잎 치상방향 (A)	잎 중앙맥 상처내기 (B)	캘러스 형성율 (%)
배축면(Abaxial side) 위 (잎 아랫면이 위를 향하고, 잎 윗면이 배지에 닿게 치상)	무처리	58.8b[z]
	처 리	76.5[a]
향축면 표측(Adaxial side) 위 (잎 윗면이 위를 향하고, 잎 아랫면이 배지에 닿게 치상)	무처리	26.3[d]
	처 리	40.4[c]
Significance[y]		
A		**
B		*
A×B		NS

[0089] [z]P ≤ 0.05에서의 Duncan's multiple range test에 의한 평균치검정(Mean separation).

[0090] [y]NS(not significant), *, **은 각각 P ≤ 0.05 및 0.01에서 유의성이 있음.

[0092] <실시예 2> 캘러스로부터 직접 신초 형성

[0093] 기내에서 배양 중인 잎 절편 캘러스부터 직접 신초 형성을 유도하기 위하여 표 3의 조성으로 제조된 배지를 이용하였다.

[0094] 구체적으로, Murashige & Skoog Medium (MS 배지, M0221, Duchefa)에 수크로오스(Sucrose) 30g/L, 아스코르빈산(Ascorbic acid) 1mg/L, 글리신(Glycine) 4mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 200mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 2mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 1mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 1mg/L, 아가(한천) 7g/L, 6-Benzylaminopurine (BAP) 0.5mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.1mg/L, PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology社) 1mℓ/L를 첨가하여 제조한 후, 배지의 pH를 5.8로 조정하여 고압멸균(121℃, 1.2 kgf · cm^{-2} pressure, 15분) 한 후 사용하였다.

표 3

[0095]

성 분 명	함 량
NH_4NO_3	1650.00 mg/L
$MgSO_4$	180.54 mg/L
KNO_3	1900.00 mg/L
KH_2PO_4	170.00 mg/L
$CaCl_2$	332.02 mg/L
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025 mg/L
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.60 mg/L
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.25 mg/L
$MnSO_4 . H_2O$	16.90 mg/L
H_3BO_3	6.20 mg/L
KI	0.83 mg/L
FeNaEDTA	36.70 mg/L
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025 mg/L
Glycine	4.00 mg/L
Myo-Inositol	200.00 mg/L
Thiamine HCl	2.00 mg/L
Nicotinic acid	1.00 mg/L
Pyridoxine HCl	1.00 mg/L
Ascorbic acid	1.00 mg/L
BAP	0.50 mg/L
IBA	0.10 mg/L
PPM	1 mℓ/L
Sucrose	30.00 g/L
Agar	7.00 g/L
배지의 pH	5.8

[0097] 그런 다음, 잎 절편에서 유래된 캘러스를 상기 배지 100 mℓ가 들어있는 식물 배양용 유리병(plant culture vessle, 외경 10㎜, 높이 130㎜)에 치상한 후 명상태(23±2℃, 16/8h light/dark photoperiod, 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$)에서 다시 4주간 배양하였으며, 직접 분화를 통한 신초 형성율은 표 4에 나타내었다.

[0098] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 캘러스 조직으로부터 배양 4주 후에 다신초(多新草, mutli-shoot)가 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0099] 배양 4주 후 캘러스로부터 직접 형성된 신초만 선택하여 상기 배지 100 mℓ이 들어있는 식물 배양용 유리병(plant culture vessle, 외경 10㎜, 높이 130㎜)에 치상한 후 명상태(23±2℃, 16/8h light/dark photoperiod,

40 μmol $m^{-2}s^{-1}$)에서 다시 6주간 배양하였으며, 배양 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0101]

	신초 형성율 (배양4주, %)	Shoot No. (배양4주+6주, /explant)	Shoot Length (배양4주+6주, mm)
기세라 5	81.2±5.1[z]	2.5±0.2	18.8±1.9

[0102] [z]Each value represents the mean±SE.

[0104] <실시예 3> 유식물체(유묘)의 증식

[0105] 캘러스로부터 직접 분화된 신초를 유식물체로 성장시킨 후, 증식시키기 위하여 하기 표 5의 조성으로 제조된 배지를 사용하였다.

[0106] 구체적으로, Murashige & Skoog Medium (MS 배지, M0221, Duchefa)에 수크로오스(Sucrose) 30g/L, 아스코르빈산(Ascorbic acid) 1mg/L, 글리신(Glycine) 4mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 200mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCl) 2mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 1mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 1mg/L, 아가(한천) 7g/L, 6-Benzylaminopurine (BAP) 1.0mg/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 0.1mg/L, PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology社) 1mℓ/L를 첨가하여 제조한 후, 배지의 pH를 5.8로 조정하여 고압멸균(121℃, 1.2 kgf·cm^{-2} pressure, 15분) 한 후 사용하였다.

표 5

[0107]

성 분 명	함 량
NH_4NO_3	1650.00 mg/L
$MgSO_4$	180.54 mg/L
KNO_3	1900.00 mg/L
KH_2PO_4	170.00 mg/L
$CaCl_2$	332.02 mg/L
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025 mg/L
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.60 mg/L
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.25 mg/L
$MnSO_4 . H_2O$	16.90 mg/L
H_3BO_3	6.20 mg/L
KI	0.83 mg/L
FeNaEDTA	36.70 mg/L
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025 mg/L
Glycine	4.00 mg/L
Myo-Inositol	200.00 mg/L
Thiamine HCl	2.00 mg/L
Nicotinic acid	1.00 mg/L
Pyridoxine HCl	1.00 mg/L
Ascorbic acid	1.00 mg/L
BAP	1.00 mg/L
IBA	0.10 mg/L
PPM	1 mℓ/L
Sucrose	30.00 g/L
Agar	7.00 g/L

배지의 pH	5.8

[0109] 그런 다음, 캘러스에서 직접 분화된 신초를 상기 배지 100 ㎖이 들어있는 식물 배양용 유리병 (plant culture vessle, 외경 10㎜, 높이 130㎜)에 치상한 후 명상태(23±2℃, 16/8h light/dark photoperiod, 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$)에서 다시 4주간 배양하여 정상적인 유식물체를 형성시키고 증식시켰다.

[0110] 그 결과는 표 6 및 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 배지를 사용하였을 때, 유식물체의 형성율은 84.7% 이었고 신초의 개수는 3.5개, 신초의 길이는 36.1㎜ 임을 확인하였다.

표 6

[0112]

	유식물체 형성율 (%)	Shoot No. (/explant)	Shoot Length (㎜)
기세라 5	84.7±4.7[z]	3.5±0.2	36.1±0.3

[0113] [z]Each value represents the mean±SE.

[0115] **<실시예 4> 유식물체 뿌리 형성(발근)**

[0116] 상기 <실시예 3>에서 4주간 배양한 유식물체의 뿌리를 형성시키기 위해서 하기 표 7의 조성으로 제조된 배지를 이용하였다.

[0117] 구체적으로, 1/2의 농도의 Murashige & Skoog Medium (MS 배지, Including Modified Vitamins, M0245, Duchefa)에 수크로오스(Sucrose) 20g/L, 아스코르빈산(Ascorbic acid) 1mg/L, 글리신(Glycine) 4mg/L, 미오이노시톨(Myo-inositol) 200mg/L, 티아민 HCl(Thiamine HCI) 2mg/L, 니코틴산(Nicotonoc acid) 1mg/L, 피리독신 HCl(Pyridoxine HCl) 1mg/L, 아가(한천) 7g/L, Indole-3-Butyric Acid(IBA) 1.0mg/L, PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology) 1㎖/L를 첨가하여 제조한 후, 배지의 pH를 5.8로 조정하여 고압멸균(121℃, 1.2 kgf · cm^{-2} pressure, 15분) 한 후 사용하였다.

표 7

[0118]

성 분 명	함 량
NH_4NO_3	825.00 mg/L
$MgSO_4$	90.27 mg/L
KNO_3	950.00 mg/L
KH_2PO_4	85.00 mg/L
$CaCl_2$	166.01 mg/L
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.0125 mg/L
$ZnSO_4 . 7H_2O$	4.30 mg/L
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.125 mg/L
$MnSO_4 . H_2O$	8.45 mg/L
H_3BO_3	3.10 mg/L
KI	0.415 mg/L
FeNaEDTA	18.35 mg/L
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.0125 mg/L
Glycine	4.00 mg/L

Myo-Inositol	200.00 mg/L
Thiamine HCl	2.00 mg/L
Nicotinic acid	1.00 mg/L
Pyridoxine HCl	1.00 mg/L
Ascorbic acid	1.00 mg/L
IBA	1.00 mg/L
NAA	0.50 mg/L
PPM	1 mℓ/L
Sucrose	20.00 g/L
Agar	7.00 g/L
배지의 pH	5.8

[0120] 그런 다음, 증식 및 배양 중인 유식물체를 상기 배지 100 mℓ이 들어있는 식물 배양용 유리병(plant culture vessel, 외경 10㎜, 높이 130㎜)에 치상한 후, 명상태(23±2℃, 16/8h light/dark photoperiod, 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$)에서 다시 6주간 배양하여 뿌리를 형성시켰다.

[0121] 그 결과, 표 8에 나타난 바와 같이, 표 7의 조성으로 제조된 배지를 사용하여 배양하였을 때, 뿌리 형성율은 86.0%, 뿌리의 개수는 8.3개, 뿌리 길이는 44.1㎜임을 확인하였다.

표 8

[0123]

	뿌리 형성율 (%)	Root No. (/rooted shoot)	Root Length (㎜)
기세라 5	86.0±5.2^{z}	8.3±0.6	44.1±3.2

[0124] ^{z}Each value represents the mean±SE.

[0126] **<실시예 5> 기외 순화**

[0127] 뿌리가 완전히 형성되어 배양병에서 배양 중인 양앵두 왜성대목 유식물체는 기내에서 기외로 순화하는 과정을 거쳐야만 완전한 조직배양 묘목의 형태를 갖출 수 있으므로, 배양병에서 유식물체를 꺼내고, 유식물체에 배지가 남아있지 않도록 부드럽게 깨끗이 물로 씻어낸 후, 원예용 상토:펄라이트가 2:1(v:v)로 혼합된 상토가 담긴 화분(내부 직경 110 mm, 높이 113 mm)에 심었다. 그런 다음, 햇빛의 40%가 차광되며 최고 25℃, 최저 18℃로 유지되는 온실 또는 순화실에서 순화시켜 키우면서 식물체의 순화율을 높이기 위하여, 공중습도가 80% 정도 유지되게 조절하였다. 기외 순화 4주 후부터 공중습도를 천천히 낮춰주면서 배양하였고, 기외 순화 4주 후부터는 유식물체의 상태를 확인하면서 외기의 환경에 노출시켜 완전히 경화시켰다.

[0128] 그런 다음, 기외 순화 2개월, 4개월 및 6개월 정도 후 온실에서 자란 양앵두 왜성대목의 생육특성은 표 9에 나타내었고, 도 7에 나타난 바와 같이, 정상적인 어린 묘목(유목, 幼木)의 형태를 확인할 수 있었다.

표 9

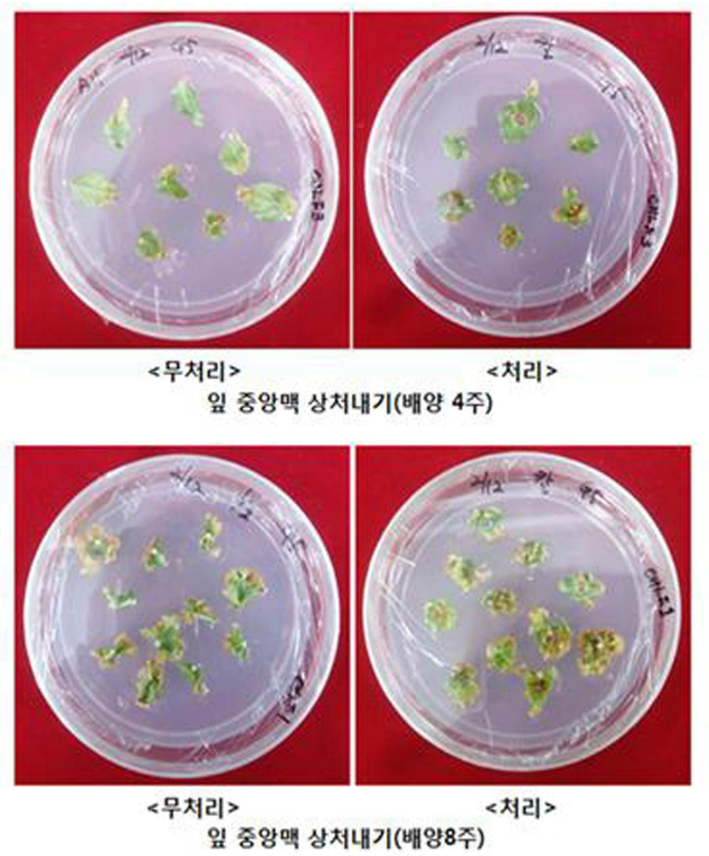
[0129]

기외 순화 기간	Shoot length (cm)	Shoot Diameter (㎜)	Root No.	Root Length (cm)
2개월	4.9±0.4	2.5±0.2	11.5±1.1	6.2±0.5
4개월	8.2±1.0	2.9±0.2	13.9±1.0	7.5±0.6
6개월	15.1±1.8	3.2±0.3	15.2±1.3	7.9±0.8

[0130] [z]Each value represents the mean±SE.

도면

도면1



도면2

도면3

도면4

도면5

도면6

도면7