



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년10월29일
(11) 등록번호 10-0865680
(24) 등록일자 2008년10월22일

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0053803

(22) 출원일자 2007년06월01일

심사청구일자 2007년06월01일

(56) 선행기술조사문헌

논문:The journal of horticultural science&biotechnology*

논문:식물생명공학회지

논문:Plant cell, tissue and organ culture

KR100270574 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

재단법인 제주하이테크산업진흥원

제주 제주시 아라1동 4-8번지

(72) 발명자

김경문

제주 제주시 노형동 756 부영아파트 501동 806호

윤필용

제주 제주시 아라1동 4-8 제주하이테크산업진흥원

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김형준

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이충호

(54) 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법

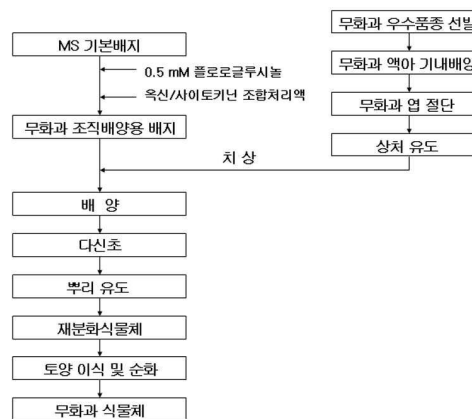
(57) 요약

본 발명은 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법에 관한 것이다.

본 발명은 무화과 유전자원 중 우수한 품종을 선발하고, 선발된 액아를 기내배양한 다음, 무화과 끝눈에서 발달된 무화과 엽을 절단하고, 이 무화과 엽절편에 침을 이용하여 상처를 유도한 후, 플로로글루시놀(phloroglucinol)과 옥신류/사이토키닌류 조합처리액이 포함된 배지에 상처처리된 엽절편을 치상하고 배양하여 다신초를 유도한 다음, 이렇게 생산된 다신초를 뿌리 유도배지에 옮겨 뿌리를 유도하여 재분화식물체를 생산하고, 이 재분화식물체를 토양에 이식하고 순화하여 무화과 식물체를 대량생산하는 것으로 구성된다.

본 발명에 의해 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이효연

제주 제주시 노형동 2583-1 프란체 203동 1504호

송필순

제주 제주시 연동 268 도원아미스 1301호

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

식물체의 대량생산방법에 있어서,

무화과 유전자원 중 액아에서 식물체로의 발달정도가 우수한 품종을 선발하는 제1공정,

제1공정에서 선발된 품종의 무화과 액아를 기내배양하는 제2공정,

기내배양된 무화과 끝눈에서 발달된 무화과 엽을 절단하는 제3공정,

제3공정의 무화과 엽절편에 핀셋 또는 칩을 이용하여 상처를 유도하는 제4공정,

0.5 mM 플로로글루시놀(phloroglucinol)과 식물생장조절제로써 옥신류/사이토키닌류인 $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ 인돌뷰트릭에시드(IdoleButyric Acid, IBA)/ $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ 티지아주론(ThiDiaZuron, TDZ), $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ 인돌뷰트릭에시드(IBA)/ $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ 티지아주론(TDZ) 중 선택된 1 종의 조합처리액이 포함된 무화과 조직배양용 배지를 제조하는 제5공정,

제4공정의 상처처리된 무화과 엽절편을 제5공정에서 준비한 배지에 치상하고 이를 다공질 테이프(porous tape)로 밀봉한 후, 배양하여 다신초를 유도하고 생산하는 제6공정,

제6공정에서 생산된 다신초를 뿌리 유도배지에 옮겨 뿌리를 유도하여 재분화식물체를 생산하는 제7공정,

제7공정의 재분화식물체를 토양에 이식하고, 순화한 후, 온실에 옮겨 생장시키는 제8공정을 거쳐 무화과 식물체를 대량생산하는 것으로 구성된,

무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

제6공정의 다신초 유도공정 중 배양은, 무화과 엽절편을 암 조건에서 1 주일간 배양 후, 16 시간 명 조건으로 옮겨 $27 \pm 2^\circ \text{C}$ 에서 배양하며, 2 ~ 4 주 간격으로 계대배양하면서 10 ~ 14 주 동안 배양하는 것이 특징인,

무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

제8공정의 순화공정 시, 28°C , 포화습도, 16 시간 광조건에서 1 ~ 2 개월간 순화과정을 거치는 것이 특징인,

무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법.

청구항 5

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법에 관한 것이다.

- <16> 무화과(*Ficus carica* L.)는 뽕나무과(*Moraceae*)의 무화과 속(*Ficus* Linn)에 속하는 아열대성 식물로서 지중해 연안이 원산지로서 우리나라에서는 전남을 비롯한 제주도, 경남 등지에 분포하고 있다.
- <17> 무화과는 형태학적으로 작과에 매우 유리하고 다른 과수에 비하여 결과 연령이 빠른 속성 과수이며, 무화과의 재배는 노동력 경합이 비교적 적은 편이고 병충해 방제의 노력이 거의 필요 없는 과수다.
- <18> 무화과는 과실의 단위 생산량이 많고 비타민과 무기질, 단백질 분해 효소인 ficin을 다량 함유하고 있어서 영양학적 가치가 높으며, 특히 섬유질과 탄수화물 함량이 높아 변비해소 및 미용식, 약용식으로 쓰이고 있으며, 또한 과실의 무기질은 산성체질을 중화시키는 알칼리성 식품으로 가치가 높은 것으로 알려져 있다.
- <19> 따라서 이들 다양한 용도에 부응하기 위하여 저장성 개선, 내재해성, 내병성 등 새로운 형질의 도입이 절실히 요구되고 있는 실정이다.
- <20> 무화과는 무화과 말벌류(Fig wasp)의 매개로 수분(pollination)이 가능하며, 육종이 가능하나, 이러한 전통적인 육종기법으로 무화과의 신품종을 육성하는 것은 많은 시간과 노력이 필요한 문제가 있다.
- <21> 또한, 일반적으로 무화과는 삽목이나 접목에 의해 증식되고 있으며, 삽목방식은 품종의 균질성을 유지할 수 있으나 증식속도가 제한되고 발근에 문제가 있는 것으로 알려져 있다.
- <22> 근래에는 짧은 시간에 식물체의 신품종을 육성하기 위해 조직배양기술이 사용되고 있으며, 기내 대량증식(micropropagation) 기술의 획기적인 발달로 인해 많은 종류의 과수가 대량증식이 가능하게 되었다.
- <23> 또한, 식물체 재분화 기술은 유전공학 기술을 적용하여 임목 및 과수를 개량하는 데 있어 가장 중요한 요인 중 하나으로써 많은 연구가 이루어지고 있다.
- <24> 한국등록특허공보 제10-0270574호(조직배양기술을 이용한 고추의 재분화식물체의 대량 생산방법 및 재분화된 고추식물체)에는, 조직배양기술을 이용하여 고추의 유조직으로부터 완전한 고추 식물체를 효과적으로 재분화시키는 방법 및 재분화된 고추 식물체에 관한 것이 공개되어 있다.
- <25> 상기와 같이 식물체 재분화를 위해 조직배양기술이 많이 이용되고 있으나, 본 발명에서 제공될 무화과의 식물체 재분화는 통상의 조직배양기술로는 다른 식물체보다 식물체 재분화가 어려운 것으로 알려져 있다.
- <26> 즉, 무화과는 액아(shoot tips) 또는 정아(apical bud)를 배양하여 식물체를 재분화하는 것에 관한 보고가 있으나, 이는 기관(organ)으로부터 식물체를 얻는 것에 불과하다.
- <27> 최근에는 무화과 엽 조직으로부터 기관발생 과정을 거쳐 얻는 재분화식물체가 보고되었으나 엽절편으로부터 분화된 식물체의 빈도가 매우 낮은 문제가 있었다.
- <28> 또한, 무화과 기내 배양에서 발생하는 또 하나의 중요한 문제점은 무화과 절편의 절개(상처) 부위로부터 분비되는 페놀화합물이 배지에 집적되어 무화과 조직을 갈변시켜 조직의 기관발생 또는 배발생을 억제하는 문제가 있었다.
- <29> 일반적으로 식물의 상처부위에서 분비되는 페놀화합물이 산화되어 반응성이 높은 퀴논류(quinones)를 형성하는데, 이 물질은 식물조직에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다.
- <30> 무화과의 경우 상처 부위에서 특히 많은 양의 페놀화합물이 분비됨으로 무화과 절편에서 분비되는 페놀화합물의 분비 억제 또는 완화는 기내 배양의 성공에 중요한 관건이다.
- <31> 상기와 같이 무화과는 교잡육종법으로 신품종을 육성하기 어려운 대표적인 과수로서 새로운 품종을 육성하기 위해서는 유전공학기술의 적용이 절실한 과수이며, 이를 위해서는 효율적인 기내 재분화 기술의 개발이 매우 필요하고 시급한 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <32> 본 발명은 상기의 문제를 해결하기 위해 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법을 제공하는데 목적이 있다.
- <33> 또한, 무화과로부터 재분화시 페놀화합물의 분비를 억제 또는 지연시켜 다신초의 재분화능을 향상시키고, 이로 인한 무화과 식물체의 생산 효율을 증대시키는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

- <34> 본 발명은 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법에 관한 것이다.
- <35> 본 발명은, 무화과 유전자원 중 액아에서 식물체로의 발달정도가 우수한 품종을 선발하는 제1공정, 선발된 품종의 무화과 액아를 기내배양하는 제2공정, 기내배양된 무화과 끝눈에서 발달된 무화과 엽을 절단하는 제3공정, 제3공정의 무화과 엽절편에 침을 이용하여 상처를 유도하는 제4공정, 플로로글루시놀 (phloroglucinol)과 옥신류/사이토키닌류 조합처리액이 포함된 무화과 조직배양용 배지를 제조하는 제5공정, 제4공정의 상처처리된 무화과 엽절편을 제5공정에서 준비한 배지에 치상하고 배양하여 다신초를 유도하고 생산하는 제6공정, 제6공정에서 생산된 다신초를 뿌리 유도배지에 옮겨 뿌리를 유도하여 재분화식물체를 생산하는 제7공정, 제7공정의 재분화식물체를 토양에 이식하고 순화하여 무화과 식물체를 생산하는 제8공정을 거쳐 대량생산하는 것으로 구성된다.
- <36> 본 발명의 발명자들은 신품종 육종이 어렵고, 조직배양을 통해 재조합 식물체를 생산하기 어려운 무화과에 대하여 재분화율을 높이면서 대량생산까지 가능한 방법을 찾기 위해 오랜 시간 수많은 시행착오를 겪으며 본 발명을 완성하게 되었다.
- <37> 먼저, 조직배양에 적합한 무화과 유전자원을 찾는 것이 선결과제이다.
- <38> 본 발명의 발명자들은 종래의 무화과 유전자원 중 조직배양용으로 적합한 품종을 선발하기 위하여 7종의 수집 무화과 유전자원인 승정도후인, 봉래시, 바나네, 브룬스워, 비오레도후인, 브라운 터키, 더 킹을 온실에서 재배하여 액아를 기내 배양하여 이들 액아로부터 식물체로의 발달정도를 비교하였다.
- <39> 승정도후인 품종의 경우 타 유전자원에 비해 비교적 짧은 기간에 액아(bud)에서 식물체로 발달하는 경향을 보였으며, 이 승정도후인은 국내에서 70 %이상 재배되고 있는 우수 품종으로서 재분화를 위한 적합한 품종으로 선발하여 사용하였다.
- <40> 무화과 엽절편(leaf segment)으로부터 식물체 재분화를 유도하는데 있어서 가장 큰 문제점은 엽절편의 상처 부위에서 분비되는 페놀화합물과 탄닌 성분 등에 의한 조직의 갈변현상이었다.
- <41> 이 조직의 갈변현상으로 엽 조직이 형태형성(morphogenesis)을 저해하여 식물체 재분화에 어려움이 있었다.
- <42> 또한, 식물체로 발달하는 기간이 길어질수록 무화과 액아의 절개부위로부터 페놀화합물과 탄닌 성분 등이 분비되어 식물체로의 발달을 저해하였다.
- <43> 따라서, 본 발명의 발명자들은 조직의 갈변현상을 제거 또는 완화시키기 위한 방법을 찾던 중 플로로글루시놀(phloroglucinol)을 첨가하여 제조한 배지에 엽절편을 치상하여 배양하면 갈변현상이 제거 또는 완화된다는 사실을 알게 되었다.
- <44> 즉, 무화과 엽절편을 0.5 mM 플로로글루시놀이 첨가된 배지에 배양하였을 때 조직의 갈변현상 상당히 완화되어 매우 효과적이었다(표 2).
- <45> 또한, 무화과 엽절편을 상기의 배지에서 배양할 때 2 ~ 3 주 간격으로 계대배양하는 경우에 갈변현상 완화에 매우 효과적이었다(도 1).
- <46> 플로로글루시놀을 첨가하면 절개부위에서 발생하는 페놀화합물과 탄닌 성분등을 중화시키고, 치상 후 다공질 테이프(porous tape)로 밀봉하여 배양을 하면 이들 물질을 배지 밖으로 배출시켜 배양 엽절편의 갈변현상을 개선할 수 있었다.
- <47> 그러나, 무화과 엽절편을 상기와 같이 처리한 배지에 배양하면 갈변현상은 해결이 되나 신초의 분화율이 높지 않은 문제가 있었다.
- <48> 이를 해결하기 위하여 무화과 엽절편에 핀셋 또는 침으로 상처를 유도한 후 배양한 결과 무화과 엽절편에서 다신초 발생율을 획기적으로 높일 수 있었다.
- <49> 즉, 기내 배양한 무화과 액아에서 발달된 무화과 엽을 약 1 cm^2 크기로 절단한 무화과 엽절편을 예리한 핀셋 또는 뭉친침(8 ~ 10 개의 한방침 다발)으로 상처를 유도한 후, 플로로글루시놀이 포함된 배지에 치상하고 다공질 테이프(porous tape)로 밀봉하여 배양한 결과 다신초의 재분화율이 월등히 높아졌다.
- <50> 상처 유도과정 없이 무화과 엽절편을 배양한 경우에는 엽절편 당 평균 1 ~ 2 개의 재분화식물체를 생산하였으나, 상처 유도 후 엽절편을 배양한 경우에는 식물체 생산이 6 ~ 10 배 정도 증가하였다.
- <51> 또한, 본 발명에서 이용한 무화과 조직배양용 배지는 MS 기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 옥신류/사이토

키닌류 조합처리액, 0.5 mM 플로로글루시놀(phloroglucinol)를 첨가하여 제조한 배지이다.

- <52> 먼저, 무화과 엽절편에 상처를 처리하지 않고 조합처리액의 종류 및 농도를 다양하게 사용하여 배양해보았다.
- <53> 이때, 옥신류는 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D), 나프탈렌아세트에시드(Naphtalene Acetic Acid, NAA), 인돌뷰트릭에시드(IndoleButyric Acid, IBA)를 사용하고, 사이토키닌류인 벤질 1 아미노퓨린(Benzyl Amino Purine, BAP), 티지아주론(ThiDiaZuron, TDZ)를 사용하였다.
- <54> 그 결과, 모든 2,4-D 농도/0.1 mg ℓ^{-1} BAP에서 캘러스가 유도되었으며, 특히, 1 mg ℓ^{-1} 2,4-D/0.1 mg ℓ^{-1} BAP 조합에서 캘러스 형성이 우수하였다.
- <55> NAA/BAP 조합에 엽절편을 배양한 경우, 엽절편 조직의 가장자리에서 캘러스가 유도되었으며, 엽절편 조직의 갈 변현상을 동반하여 더 이상 형태형성을 하지 못하였다.
- <56> 2 mg ℓ^{-1} 2,4-D/ 낮은 농도의 TDZ (0.1, 0.5 mg ℓ^{-1})의 조합에서 캘러스의 발생이 비교적 우수하였으며, 0.5 mg ℓ^{-1} 2,4-D/0.1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합에 처리한 엽절편으로부터 식물체가 재분화되었으나, 그 빈도는 매우 낮았다(도 3B).
- <57> 이 조합 이외의 옥신류/사이토키닌류(2,4-D, NAA/BAP, TDZ) 조합을 포함하는 배지에 치상한 엽절편으로부터 재분화식물체를 얻지 못하였다.
- <58> 또한, IBA/TDZ 조합에서는 캘러스 발생율은 42.9 ~ 78.8 %였으며, 캘러스 유도는 0.5 mg ℓ^{-1} IBA 농도에 치상한 엽절편에서 높았다. 0.5 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 mg ℓ^{-1} TDZ 또는 0.5 mg ℓ^{-1} IBA/1.0 mg ℓ^{-1} TDZ 조합에 치상한 엽절편으로부터 캘러스 발생율은 각각 78.6 %, 82.1 % 였다.
- <59> 또한, 이들 조합에서 유도된 식물체 재분화율은 각각 78.6 %, 67.9 %였다.
- <60> 반응을 보인 엽절편 당 평균적으로 3.1 ~ 3.9 개 재분화식물체가 생산되었다(도 3C, 3D).
- <61> 1 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 mg ℓ^{-1} TDZ 조합에서 치상한 엽절편에서 재분화식물체를 얻었으나, 그 빈도는 28.9 %였으며, 반응을 보인 엽절편에서 유도된 식물체는 평균적으로 1 개체였다.
- <62> 본 실험 결과 0.5 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 mg ℓ^{-1} TDZ 처리 조합에 치상한 엽절편에서 가장 양호한 식물체 재분화율을 보였다(도 3C).
- <63> 또한, 무화과 엽절편에 상처를 처리한 후 조합처리액의 종류 및 농도를 다양하게 사용하여 배양해보았다.
- <64> 그 결과, TDZ 농도에 관계없이 낮은 농도의 IBA(0.5, 1 mg ℓ^{-1})가 포함된 배지에 치상한 엽절편으로부터 비교적 높은 빈도의 캘러스(67.9 ~ 89.3 %)가 유도되었으나, 이들 캘러스는 식물체로 분화하지 못하였다.
- <65> 2 mg ℓ^{-1} IBA/처리한 TDZ 조합을 포함하는 배지에 치상한 엽절편은 캘러스 형성율(7.1 ~ 17.9 %)은 매우 낮았으나, 재분화식물체의 발생율은 TDZ 농도에 따라 28.6 ~ 92.95 %의 변이를 보였다.
- <66> 또한, 2 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 mg ℓ^{-1} TDZ 조합 및 2 mg ℓ^{-1} IBA/ 1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합을 포함하는 배지에 치상한 엽절편으로부터 재분화식물체 유도율은 각각 89.3 %, 92.9 %로 우수하였으며, 각각의 조합에서 배양 엽절편 당 평균적으로 8.1 개와 10.8 개의 다신회가 생산되었다(도 4).
- <67> 비교적 농도가 높은 IBA(5 mg ℓ^{-1}) 조건에 치상한 엽절편에서는 TDZ 농도에 관계없이 캘러스 발생은 중간 정도였으며(39.2 ~ 42.3 %), 캘러스 또는 엽절편으로부터 식물체 분화는 일어나지 않았다.
- <68> 따라서, 2 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 또는 1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합에 치상한 상처처리 엽절편으로부터 다신회 발생이 가장 우수하였다(도 4).
- <69> 또한, IBA/TDZ 조합처리액을 이용한 경우에는 2 mg ℓ^{-1} IBA/0.5, 1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합처리액을 사용하는 경우가 가장 재분화 효율이 뛰어났다.
- <70> 즉, TDZ 농도에 관계없이 낮은 농도의 IBA(0.5, 1 mg ℓ^{-1})가 포함된 배지에 치상한 엽절편으로부터 비교적 높은

빈도의 캘러스(67.9 ~ 89.3 %)가 유도되었으나, 이들 캘러스는 식물체로 분화하지 못하였다.

- <71> 2 mg ℓ^{-1} IBA/TDZ 조합처리액을 포함하는 배지에 치상한 엽절편은 캘러스 형성율이 7.1 ~ 17.9 %로 매우 낮았으나, 재분화식물체의 발생율은 TDZ 농도에 따라 28.6 ~ 92.95 %의 변이를 보였다.
- <72> 또한, 2 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 mg ℓ^{-1} TDZ 조합처리액 및 2 mg ℓ^{-1} IBA/ 1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합처리액을 포함하는 배지에 치상한 엽절편으로부터 재분화식물체 유도율은 각각 89.3 %, 92.9 %로 우수하였으며, 각각의 조합에서 엽절편 당 평균적으로 8.1 개와 10.8 개의 재분화식물체가 생산되었다(도 4).
- <73> 그러나, 0.5 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 또는 1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합처리액이 포함된 배지에 치상한 경우에도 캘러스 형성율은 높았으나 재분화식물체 발생은 일어나지 않았다.
- <74> 또한, 비교적 농도가 높은 IBA(5 mg ℓ^{-1}) 조건에 치상한 엽절편에서는 TDZ 농도에 관계없이 캘러스 발생은 중간 정도였으며(39.2 ~ 42.3 %), 캘러스 또는 엽절편으로부터 식물체 재분화는 일어나지 않았다.
- <75> 따라서, IBA/TDZ 조합처리액 중에서는 2 mg ℓ^{-1} IBA/0.5 또는 1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합에 치상한 상처처리된 엽절편으로부터 재분화식물체 발생이 가장 우수하였다(도 4).
- <76> 한편, 본 발명의 상처처리된 무화과 엽절편을 배양하는 배양액에는 MES, 수크로스(sucrose), 식물한천(plant agar), 생장촉진용 보조재료 등을 첨가할 수도 있다.
- <77> 이렇게 상처처리된 무화과 엽절편을 상기와 같은 본 발명의 배양액에 치상하고 배양하여 다신초를 유도한다.
- <78> 이때, 배양은 암 조건에서 1 주일간 배양 후, 16 시간 명 조건으로 옮겨 27±2 °C에서 배양하며, 2 ~ 4 주 간격으로 계대배양하면서 10 ~ 14주 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.
- <79> 상기와 같은 방법으로 생산한 다신초를 뿌리 유도배지에 옮겨 뿌리를 유도하여 재분화식물체를 생산한다(도 5A, 5B).
- <80> 이때, 뿌리 유도배지는 3 % 수크로스와 0.8 % Gellix® 식물한천이포함된 MS 배지를 사용한다.
- <81> 이 재분화식물체를 토양에 이식하고, 28 °C, 포화습도, 16 시간 광주조건으로 1 ~ 2 개월 동안 순화과정을 거친 후 온실로 옮겨 생장시켜 본 발명의 무화과 식물체를 대량생산하게 된다(도 5C).
- <82> 이때, 순화과정에서 이용한 토양은 버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1로 혼합한 상토가 바람직하며, 토양에 이식한 후에는 수분유지를 위하여 플라스틱 비닐로 2 ~ 3 주간 화분을 감싼 후 유지하는 것이 좋다.
- <83> 이들 엽절편으로부터 재분화한 식물체는 삼복한 개체와 비교하여 생장습성이나 형태적인 특징의 차이를 보이지 않았다.
- <84> 상기와 같은 본 발명의 무화과 식물체 대량생산방법을 이용하면 무화과의 형질개량 및 품질개량 연구에 효율성 및 경제성을 높여 해당 기술분야에 크게 이바지할 수 있을 것이다.
- <85> 이하, 본 발명의 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법에 대해 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <86> <무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산공정>
- <87> 1. 제1공정 : 품종 선발
- <88> 무화과 유전자원 별 액아에서 식물체로의 발달 정도가 우수한 품종을 선발한다.
- <89> 액아에서 식물체로 발달(budbreak)하는 기간이 길어질수록 무화과 액아의 절개에 의한 상처 부위로부터 페놀화합물과 탄닌 성분 등이 분비되어 배지에 집적되고, budbreak 이후 완전한 식물체로의 발달을 저해한다.
- <90> 따라서, budbreak 기간이 비교적 짧고, 그 효율이 우수한 품종을 조직배양용 품종으로 선발한다.
- <91> 2. 제2공정 : 기내배양
- <92> 제1공정에서 선발된 품종의 무화과 액아를 기내배양한다.
- <93> 3. 제3공정 : 무화과 엽 절단
- <94> 제2공정의 기내배양된 무화과 끝눈에서 발달된 무화과 엽을 1 cm² 크기로 절단한다.

- <95> 4. 제4공정 : 엽절편 상처 유도
- <96> 제3공정의 무화과 엽절편에 핀셋 또는 뭉친침(8 ~ 10 개의 한방침 다발)을 이용하여 10 회 정도 상처를 유도한다.
- <97> 5. 제5공정 : 무화과 조직배양용 배지 제조
- <98> MS 기본배지에 0.5 mM 플로로글루시놀(phloroglucinol)과 식물생장조절제로써 옥신류/사이토키닌류 조합처리액을 넣고 무화과 조직배양용 배지를 제조한다.
- <99> 이때, 식물생장조절제인 옥신류/사이토키닌류 조합처리액은 1 또는 2 mg l^{-1} 2,4-D/0.1 mg l^{-1} BAP의 조합처리액, 2 mg l^{-1} 2,4-D/0.1 또는 0.5 mg l^{-1} TDZ의 조합처리액, 0.5 또는 2 mg l^{-1} IBA/0.5 또는 1 mg l^{-1} TDZ 조합처리액을 사용하는 경우에 식물체의 재분화 효율이 높다.
- <100> 한편, 상기의 배지에는 MES, 수크로스, 식물한천(plant agar), 성장촉진용 보조재료 등을 더 첨가할 수 있다.
- <101> 6. 제6공정 : 다신초 유도
- <102> 제4공정의 상처처리된 무화과 엽절편을 제5공정에서 준비한 배지에 치상하고 2 ~ 4 주 간격으로 계대배양하며 다신초를 유도한다.
- <103> 이때, 배양은 암 조건에서 1 주일간 배양 후, 16 시간 명 조건으로 옮겨 27 ± 2 °C에서 배양하며, 2 ~ 4 주 간격으로 계대배양하면서 10 ~ 14 주 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.
- <104> 7. 제7공정 : 재분화식물체 생산
- <105> 제6공정에서 생산된 다신초를 뿌리 유도배지에 옮겨 뿌리를 유도하여 재분화식물체를 생산한다.
- <106> 이때, 뿌리 유도배지는 3 % 수크로스와 0.8 % Gellix® Plant agar가 포함된 MS 배지를 사용한다.
- <107> 8. 제8공정 : 무화과 식물체 생산
- <108> 제7공정의 재분화식물체를 토양으로 이식한 후, 28 °C, 포화습도, 16 시간 광조건에서 1 ~ 2 개월간 순화과정을 거친 후 온실에 옮겨 생장시켜 본 발명의 무화과 식물체를 생산한다.
- <109> 이때, 순화과정에서 이용한 토양은 버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1로 혼합한 상토가 바람직하며, 토양에 이식한 후에는 수분유지를 위하여 플라스틱 비닐로 2 ~ 3 주간 화분을 감싼 후 유지하는 것이 좋다.
- <110> 이하, 본 발명의 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법에 대하여 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세히 설명하나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- <111> <실시예 1> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산1
- <112> 승정도후인, 봉래시, 바나네, 브룬스윅, 비오레도후인, 브라운 터키, 더 킹의 7 종의 무화과 유전자원인을 수집하여 유전자원 별 액아에서 식물체로의 발달 정도를 비교하여, budbreak 기간이 비교적 짧고, 그 효율이 우수한 품종인 승정도후인을 선발하였다.
- <113> 선발한 품종의 무화과 액아를 기내배양하여, 무화과 끝눈에서 발달된 무화과 엽을 1 cm^2 크기로 절단하였다.
- <114> 상기의 무화과 엽절편에 핀셋을 이용하여 10 회 정도 상처를 유도하였다.
- <115> MS 기본배지에 0.5 mM 플로로글루시놀(phloroglucinol)을 넣고, 식물생장조절제로써 2 mg l^{-1} IBA/0.5 mg l^{-1} TDZ 조합처리액을 넣고, 3 mM MES, 3% (w/v) 수크로스, 0.8 % Gellix® 식물한천을 첨가하여 무화과 조직배양용 배지를 제조하였다.
- <116> 준비한 배지에 상처처리된 무화과 엽절편을 치상하고 암 조건에서 1 주일간 배양 후, 16 시간 명 조건으로 옮겨 25 °C에서 배양하며, 2 주 간격으로 계대배양하면서 10 주 동안 배양하여 다신초를 유도하였다.
- <117> 이렇게 생산된 다신초를 뿌리 유도배지(3 % 수크로스와 0.8 % Gellix® Plant agar가 포함된 MS 배지)에 이식하여 뿌리를 유도하여 재분화식물체를 생산하였다.
- <118> 상기의 재분화식물체를 버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1로 혼합한 상토에 이식한 후, 플라스틱 비닐로 2 주간 화분을 감싸 수분을 유지하도록 하고, 28 °C, 포화습도, 16 시간 광조건에서 1 개월간 순화과정을 거친 후 온실

에 옮겨 성장시켜 본 발명의 무화과 식물체를 생산하였다.

<실시예 2> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산2

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실시예 3> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산3

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실시예 4> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산4

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $1.0 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실시예 5> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산5

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ 2,4-D/ $0.1 \text{ mg } \ell^{-1}$ BAP의 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실시예 6> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산6

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ 2,4-D/ $0.1 \text{ mg } \ell^{-1}$ BAP의 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실시예 7> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산7

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ 2,4-D/ $0.1 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ의 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실시예 8> 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산8

본 발명의 실시예 1과 동일한 방법으로 무화과 식물체를 생산하되, 무화과 엽절편을 배양할 때 첨가하는 식물생장조절제를 $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ 2,4-D/ $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ의 조합처리액으로 대체하여 배양하였다.

<실험예 1> 무화과의 조직배양용 품종 선발실험

무화과 기내 조직배양 및 형질전환용 품종을 선발하기 위하여 승정도후인, 봉래시, 바나네, 브룬스워, 비오레도후인, 브라운 터키, 더 킹의 7 종의 무화과 유전자원인을 수집하여 준비하였다.

준비한 각각의 품종으로부터 액아를 포함한 줄기를 절단하여 70 % 알코올에서 10 분간 소독한 후 0.01%(v/v) Tween 20이 포함된 상업용 락스(4%이상 차아염소산나트륨)에 30 분간 소독 후 멸균수로 3 ~ 4 회 씻어주었다.

준비한 재료를 멸균 페이퍼에 옮겨 과잉의 수분을 제거하였다.

줄기의 액아 부분을 무균적으로 절단하여 $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ BAP, 3%(w/v) 수크로즈, 0.7%(w/v) 식물한천을 포함하는 1/2 MS 기본배지에 배양하였으며, 25 °C, 16 시간 일장조건에서 6 주 동안 배양하여 액아에서 식물체로 발달하는 정도(budbreak)를 관찰하였다.

그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.

<표 1> 무화과 유전자원 별 budbreak 정도

| 유전자원 (품종) | budbreak 정도 | 기간 | 비교 |
|-----------|-------------|---------|-------|
| 승정도후인 | +++ | 3 ~ 4 주 | 품종 선발 |
| 봉래시 | ++ | 5 주 이상 | |
| 바나네 | + | 5 주 이상 | |
| 브룬스워 | + | 5 주 이상 | |

| | | | |
|------------------------|----|--------|--|
| 비오레도후인 | + | 5 주 이상 | |
| 브라운 터키 | ++ | 5 주 이상 | |
| 더 킹 | + | 5 주 이상 | |
| +: 낮음, ++: 보통, +++: 높음 | | | |

<141> 상기의 표 1에서 보는 바와 같이 승정도후인의 경우 배양 4 주후 액아로부터 식물체로 발달하는 budbreak 효율이 가장 높았으며, 다음으로 봉래시와 브라운 터키 품종이 우수하였으며, 나머지 품종의 액아브레이크 정도는 불량하였다.

<142> 무화과의 budbreak 정도는 품종에 따라 다른 반응을 보였다.

<143> budbreak 기간이 길어질수록, 즉 식물체로 발달하는 기간이 길어질수록 무화과 액아의 절개에 의한 상처 부위로부터 페놀화합물과 탄닌 성분 등이 분비되어 배지에 집적되고 결과적으로 budbreak 후 완전한 식물체로의 발달을 저해하였다.

<144> 따라서, budbreak 기간이 비교적 짧고 또한 그 효율이 우수한 승정도후인 품종을 조직배양용 품종으로 선발하였다.

<145> <실험예 2> 무화과 엽절편에 대한 배양방법에 따른 갈변정도 확인실험

<146> 무화과 엽절편(leaf segment)의 상처 부위로부터 분비되는 페놀화합물에 의한 조직의 갈변현상의 억제 또는 완화는 무화과 기내배양을 이용한 재분화기술 확립의 전제조건이므로, 조직의 갈변현상을 완화시키기 위한 다양한 처리를 하여 비교실험하였다.

<147> 기내 배양한 액아로부터 재분화한 무화과 식물체의 엽절편을 1 cm² 크기로 절단하여 0.04 mg l⁻¹ IBA, 1 mg l⁻¹ BAP, 3 % 수크로스, 0.7 % 식물한천이 포함된 MS 배지에 배양하였다.

<148> 상처부위에서 페놀화합물의 분비를 조절하기 위하여 다음과 같은 방법으로 엽절편을 배양하였다.

<149> (1) 배지위에 멸균 필터 페이퍼를 놓고 엽절편 배양, (2) 엽절편 배양 후 다공질 테이프로 밀봉처리, (3) 배지에 0.3 % 활성탄을 첨가한 배지에 엽절편 배양, (4) 플로로글루시놀(phloroglucinol) 0.5 mM 또는 AgNO₃(20 μM) 첨가 배지에 엽절편 배양, (5) 항산화제 아스파르테이트(aspartate) 2 g l⁻¹, 시트레이트(citrate) 500 mg l⁻¹ 첨가 배지에 엽절편 배양, (6) 플로로글루시놀(phloroglucinol) 첨가 배지에 엽절편을 배양 후 다공질 테이프로 밀봉 처리, (7) 상기(6)과 동일한 조건으로 하되, 파라필름으로 밀봉처리하여 대조군을 준비하였다.

<150> 식물조직은 25 °C, 16 시간 일장조건에서 배양하였으며, 2 ~ 4 주 간격으로 계대배양하여, 배지의 갈변정도 및 식물조직의 갈변 또는 고사정도를 비교하였다.

<151> <표 2> 무화과 엽절편에 대한 갈변현상

| 처리 | 갈변정도 |
|---------------------------------|------|
| 대조구 | +++ |
| 배지위에 필터페이퍼 처리 | +++ |
| 다공질 테이프로 밀봉 | +++ |
| 활성탄 첨가 | +++ |
| 플로로글루시놀 첨가 | + |
| AgNO ₃ 첨가 | +++ |
| 시트르산 첨가 | +++ |
| 아스파라긴산 첨가 | +++ |
| 갈변정도: + 낮음; ++ 중간; +++ 높음 (암갈색) | |

<153> 상기의 표 2에서 보는 바와 같이, 엽절편의 상처부위로부터 분비되는 페놀화합물의 효과적인 확산을 통한 조직의 갈변 현상을 완화시키기 위하여 필터 페이퍼를 배지 위에 올려놓고 무화과 엽절편을 그 위에 배양하였으나 효과가 없었다.

<154> 또한, 일반적으로 배지에 첨가하는 활성탄은 조직배양 과정에서 분비되는 불순물을 제거하는 효과가 있는 것으

로 알려져 있으나, 무화과 엽절편의 갈변 현상 완화에는 효과가 없었다.

<155> 또한, 밀봉 재료로 다공질 테이프를 사용하였으나 이 또한 조직의 갈변현상을 완화시키는 효과가 없었다.

<156> 기내 배양에서 많이 이용되는 에틸렌 억제제인 AgNO_3 , 항산화제로 이용되는 아스파라긴산(aspartic acid)와 시트르산(citric acid) 역시 무화과 엽절편 배양시 발생하는 조직의 갈변 현상을 완화시키는 효과가 없었다.

<157> 무화과 엽절편을 0.5 mM 플로로글루시놀(phloroglucinol)이 첨가된 배지에 배양하였을 때 조직의 갈변현상 상당히 완화되어 매우 효과적이었으며(표 2), 무화과 엽절편을 플로로글루시놀이 첨가된 배지에서 2 ~ 4 주간 간격으로 계대배양할 경우 갈변현상 완화에 매우 효과적이었다(도 2).

<158> <실험예 3> 식물생장조절제 처리에 따른 무화과 식물체 재분화율 실험

<159> 무화과 승정도후인 품종을 선발하고, 선발한 품종의 무화과 액아를 기내배양하여 엽을 채취하였다.

<160> 채취한 무화과 엽을 약 1 cm 크기로 절단하여 엽절편을 준비하였다.

<161> 무화과 엽절편을 배양할 배지를 제조하되, 0.5 mM 플로로글루시놀, 3 mM MES, 3% (w/v) sucrose, 0.8% Gellix ① 식물한천이 포함된 배지를 준비하였다.

<162> 또한, 상기의 배지에 식물생장조절제로서 옥신류/사이토키닌류 조합처리액을 첨가하되, 종류와 농도를 다양하게 하여 그 결과를 관찰하였다.

<163> 즉, 옥신류[0.1, 1, 3 mg ℓ^{-1} 2,4-D; 0.1, 1, 3 mg ℓ^{-1} NAA; 0.5, 1 mg ℓ^{-1} IBA]와 사이토키닌류[0.1, 1 mg ℓ^{-1} BAP; 0.5, 1, 2 mg ℓ^{-1} TDZ] 조합처리액, 또는 IBA(0.5, 1 mg ℓ^{-1})와 TDZ(0.5, 1, 2, 5 mg ℓ^{-1}) 조합처리액을 첨가하여 배지를 제조하였다.

<164> 엽절편은 25 °C, 16 시간 일장 조건에서 배양하였으며, 치상 엽절편으로부터 기관발생 즉 부정근신초 및 다신초의 발달을 비교하였다.

<165> 그 결과, 2,4-D/BAP 조합의 경우, 캘러스 형성 및 엽절편 크기의 증가가 관찰되었으며, 엽절편의 크기는 치상할 때보다 2배 이상 증가하였다.

<166> 모든 2,4-D 농도/0.1 mg ℓ^{-1} BAP에서 캘러스가 유도되었으며, 특히, 1 mg ℓ^{-1} 2,4-D/0.1 mg ℓ^{-1} BAP 조합에서 캘러스 형성이 우수하였다.

<167> NAA/BAP 조합에 엽절편을 배양한 경우, 엽절편 조직의 가장자리에서 캘러스가 유도되었으며, 엽절편 조직의 갈변현상을 동반하여 더 이상 형태형성을 하지 못하였다.

<168> 2 mg ℓ^{-1} 2,4-D/ 낮은 농도의 TDZ (0.1, 0.5 mg ℓ^{-1})의 조합에서 캘러스의 발생이 비교적 우수하였으며, 0.5 mg ℓ^{-1} 2,4-D/0.1 mg ℓ^{-1} TDZ 조합에 처리한 엽절편으로부터 식물체가 재분화되었으나, 그 빈도는 매우 낮았다(도 3B).

<169> 이 조합 이외의 옥신류/사이토키닌류(2,4-D, NAA/BAP, TDZ) 조합을 포함하는 배지에 치상한 엽절편으로부터 재분화식물체를 얻지 못하였다.

<170> 또한, IBA/TDZ 조합에 치상한 엽절편의 식물체 재분화능을 표 3에 나타내었다.

<171> <표 3> IBA/TDZ 조합처리 종류별 캘러스 형성 및 재분화식물체 발생율

<172>

| 식물생장조절제(mg ℓ^{-1}) | | 캘러스 형성율 (%) | 재분화식물체 발생율(%) | 엽절편 당 재분화식물체 수 |
|--------------------------|-----|---|---|----------------|
| IBA | TDZ | | | |
| 0.5 | 0.5 | 22 ^a /28 ^b (78.6) | 22 ^c /28 ^b (78.6) | 3.9 |
| 0.5 | 1.0 | 23/28 (82.1) | 19/28 (67.9) | 3.1 |
| 0.5 | 2.0 | 16/28 (57.1) | 0 | 0 |
| 0.5 | 5.0 | 12/28 (42.9) | 0 | 0 |
| 1.0 | 0.5 | 12/28 (42.9) | 8/28 (28.9) | 1.0 |
| 1.0 | 1.0 | 14/28 (50.0) | 0 | 0 |

| | | | | |
|--|-----|--------------|---|---|
| 1.0 | 2.0 | 15/28 (53.6) | 0 | 0 |
| 1.0 | 5.0 | 12/28 (42.9) | 0 | 0 |
| ^a 캘러스 발생 엽절편 수; ^b 치상 엽절편 수; ^c 재분화식물체 발생 엽절편 수 | | | | |

<173> 상기의 표 3에서 보는 바와 같이, IBA/TDZ 조합에서는 캘러스 발생율은 42.9 ~ 78.8 %였으며, 캘러스 유도는 0.5 mg l⁻¹ IBA 농도에 치상한 엽절편에서 높았다. 0.5 mg l⁻¹ IBA/0.5 mg l⁻¹ TDZ 또는 0.5 mg l⁻¹ IBA/1.0 mg l⁻¹ TDZ 조합에 치상한 엽절편으로부터 캘러스 발생율은 각각 78.6 %, 82.1 % 었다.

<174> 또한, 이들 조합에서 유도된 식물체 재분화율은 각각 78.6 %, 67.9 %였다.

<175> 반응을 보인 엽절편 당 평균적으로 3.1 ~ 3.9 개 재분화식물체가 생산되었다(도 3C, 3D).

<176> 1 mg l⁻¹ IBA/0.5 mg l⁻¹ TDZ 조합에서 치상한 엽절편에서 재분화식물체를 얻었으나, 그 빈도는 28.9 %였으며, 반응을 보인 엽절편에서 유도된 식물체는 평균적으로 1 개체였다.

<177> 본 실험 결과 0.5 mg l⁻¹ IBA/0.5 mg l⁻¹ TDZ 처리 조합에 치상한 엽절편에서 가장 양호한 식물체 재분화율을 보였다(도 3C).

<178> 또한, 무화엽절편을 암 조건에서 1 주일간 배양 후, 16 시간 명 조건으로 옮겨 배양하였을 때, 엽절편으로부터 재분화식물체의 발생율이 높음을 관찰하였다.

<179> <실험예 4> 엽절편의 상처처리를 통한 다신초의 재분화능 실험

<180> 기내 배양한 무화과 액아에서 발달된 무화과 엽을 1 cm² 정도 크기로 절단하여 날카로운 핀셋을 이용하여 엽절편의 단면을 10 회 상처를 처리하였다.

<181> 상처 처리한 엽절편을 MS 기본배지에 IBA(0.5, 1, 2, 5 mg l⁻¹)와 TDZ(0.5, 1, 2 mg l⁻¹) 등을 조합처리액, 0.5 mM 플로로글루시놀, 3 mM MES, 3% (w/v) 수크로스, 0.8 % Gellix[®] 식물한천이 포함된 배지 치상하였다.

<182> 이때, 상처를 처리한 무화과 엽절편은 향측면이 배지에 닿도록 배지에 치상하고, 27 °C, 16 시간 일장 조건에서 배양하였으며, 치상 엽절편으로부터 기관발생 즉 신초 및 다신초의 발달을 관찰하여 아래의 표 4에 나타내었다.

<183> <표 4> 엽절편의 상처처리를 통한 다신초의 재분화능 실험결과

| 식물생장조절제 (mg l ⁻¹) | | 캘러스 형성율 (%) | 재분화식물체 발생율 (%) | 반응 엽절편 당 재분화식물체 수 |
|--|-----|---|----------------------------|-------------------|
| IBA | TDZ | | | |
| 0.5 | 0.5 | 24 ^a /28 ^b (85.7) | 0 | 0 |
| | 1 | 25/28 (89.3) | 0 | 0 |
| | 2 | 22/28 (78.9) | 0 | 0 |
| 1 | 0.5 | 19/28 (67.9) | 0 | 0 |
| | 1 | 19/28 (67.9) | 0 | 0 |
| | 2 | 19/28 (67.9) | 0 | 0 |
| 2 | 0.5 | 5/28 (17.9) | 25 ^c /28 (89.3) | 8.1 |
| | 1 | 2/28 (7.1) | 26/28 (92.9) | 10.8 |
| | 2 | 2/28 (7.1) | 8/28 (28.6) | 1.0 |
| 5 | 0.5 | 11/28 (39.3) | 0 | 0 |
| | 1 | 12/28 (42.3) | 0 | 0 |
| | 2 | 12/28(42.3) | 0 | 0 |
| ^a 캘러스 발생 엽절편 수; ^b 치상 엽절편 수; ^c 재분화식물체 발생 엽절편 수 | | | | |

<185> 상기의 결과에서 보는 바와 같이, TDZ 농도에 관계없이 낮은 농도의 IBA(0.5, 1 mg l⁻¹)가 포함된 배지에 치상한 엽절편으로부터 비교적 높은 빈도의 캘러스(67.9 ~ 89.3 %)가 유도되었으나, 이들 캘러스는 식물체로 분화하지 못

하였다.

- <186> $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/처리한 TDZ 조합을 포함하는 배지에 치상한 엽절편은 캘러스 형성을(7.1 ~ 17.9 %)은 매우 낮았으나, 재분화식물체의 발생율은 TDZ 농도에 따라 28.6 ~ 92.95 %의 변이를 보였다.
- <187> 또한, $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 조합 및 $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 조합을 포함하는 배지에 치상한 엽절편으로부터 재분화식물체 유도율은 각각 89.3 %, 92.9 %로 우수하였으며, 각각의 조합에서 배양 엽절편 당 평균적으로 8.1 개와 10.8 개의 다신횇가 생산되었다(도 4).
- <188> 비교적 농도가 높은 IBA($5 \text{ mg } \ell^{-1}$) 조건에 치상한 엽절편에서는 TDZ 농도에 관계없이 캘러스 발생은 중간 정도였으며(39.2 ~ 42.3 %), 캘러스 또는 엽절편으로부터 식물체 분화는 일어나지 않았다.
- <189> 따라서, $2 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ 0.5 또는 $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 조합에 치상한 상처처리 엽절편으로부터 다신횇 발생이 가장 우수하였으며(도 4), 이는 엽절편에 상처처리 및 최적 옥신과 사이토키닌의 조합에 의해 다신횇의 발생율을 높이는 것으로 추정된다.

발명의 효과

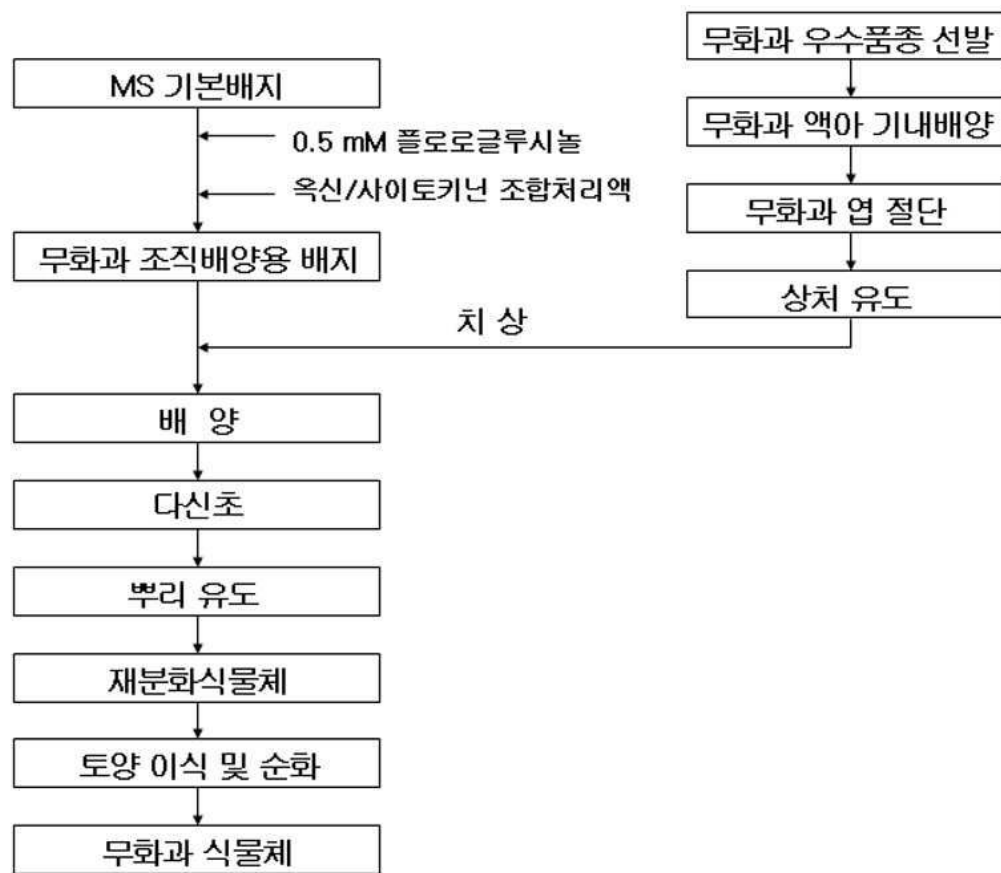
- <190> 본 발명에 의해 엽절편에서 분비되는 페놀화합물에 의한 갈변현상이 완화 또는 제거되면서 다신횇의 유도율을 높여 재분화식물체의 생산율을 높임으로써 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산방법이 제공된다.
- <191> 또한, 본 발명에 의해 무화과의 형질개량 및 품질개량 연구에 효율성 및 경제성을 높여 해당 기술분야에 크게 이바지할 수 있는 무화과 식물체의 대량생산방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

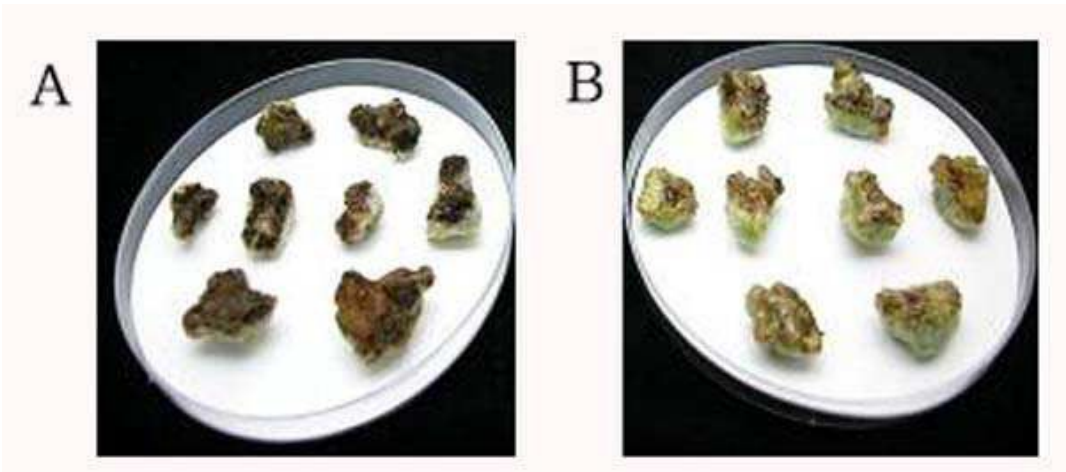
- <1> 도 1은 본 발명의 무화과 엽절편으로부터 재분화된 식물체의 대량생산공정도
- <2> 도 2는 플로로글루시놀 처리 유무에 따른 조직의 갈변현상 확인결과 사진
- <3> A : 무처리군, B : 처리군
- <4> 도 3은 식물생장조절에 처리에 따른 무화과 엽절편의 재분화 모습
- <5> A : 무화과 엽절편, B : $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ 2,4-D/ $0.1 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 처리군
- <6> C : $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 처리군,
- <7> D : $0.5 \text{ mg } \ell^{-1}$ IBA/ $1 \text{ mg } \ell^{-1}$ TDZ 처리군
- <8> 도 4는 상처 처리된 무화과 엽절편으로부터 다신횇 재분화 모습
- <9> A : 재분화중인 다신횇,
- <10> B : 뿌리 유도배지로 옮기기 전의 다신횇
- <11> 도 5는 본 발명의 무화과 엽절편으로부터 재분화된 무화과 식물체 사진
- <12> A : 기내에서 뿌리 유도중인 재분화식물체,
- <13> B : 뿌리가 유도된 재분화식물체,
- <14> C : 온실에서 생육중인 무화과 식물체

도면

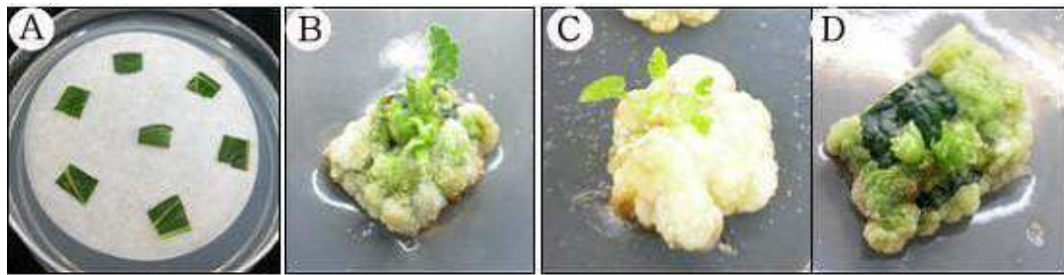
도면1



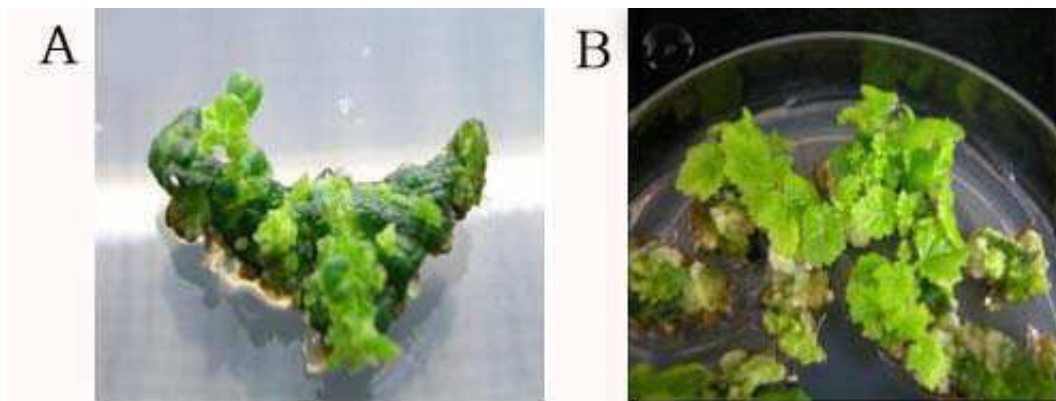
도면2



도면3



도면4



도면5

