

체세포배발생에 의한 한국 고구마 품종의 고빈도 식물체 재분화

민성란 · 유장렬* · 노태홍¹ · 김철현¹ · 주정일¹
한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹,
¹충청남도 농촌진흥원

High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of Korean Cultivar Sweet Potatoes

Sung R. MIN, Jang R. LIU*, Tae H. RHO¹, Chil H. KIM¹, and Jung I. JU¹

Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejeon, 305-333; and
¹Chung-Nam Provincial Rural Development Administration, Taejeon, 305-313. *Corresponding author.

Culture conditions for high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato of two Korean cultivars 'Puyojaerae' and 'Yulmi' are described. Shoot apical meristem explants (height: 150 μ m; base: 350 μ m) were cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. After 6 weeks of culture, greater than 80% of the survived explants produced embryogenic calli. When transferred onto MS medium with 0.1 mg/L each of 2,4-D and kinetin, the calli gave rise to somatic embryos at frequencies of 71% ('Puyojaerae') and 63% ('Yulmi'), respectively. When somatic embryos at various developmental stages measured in length were transversely cut into two halves and cultured on MS medium with 1 mg/L 2,4-D, the upper halves produced secondary embryos more frequently than the lower ones, and halves of somatic embryos less than 1 mm in length had a higher competence for secondary embryo formation than longer ones of either cultivar. However, 'Puyojaerae' somatic embryo halves showed a higher frequency of secondary embryo formation than 'Yulmi' ones on the whole. Upon transfer onto MS basal medium, most of the primary and secondary somatic embryos underwent development into plantlets. The plantlets were transplanted to potting soil and grown to maturity in a phytotron. The overall results suggest that the shoot apical meristem culture system for somatic embryo formation in sweet potato previously established by us (SABRAO J 21: 93-101) may be applicable regardless of its genotypes.

Key words: embryogenic callus, *Ipomoea batatas*, shoot apical meristem

고구마의 세계 총 생산량은 전체 작물중 6위를 점하며 (Harlan, 1976), 아시아권에서는 탄수화물과 단백질의 중요한 공급원이 되고 있다. 주로 영양 번식을 하므로 무병주의 확보나 체세포유전학적 방법에 의한 품종 개량을 위하여 조직배양 기술의 도입이 요구된다. 고구마의 조직배양은 작물의 중요성에 비추어 비교적 한정된 범위에서 이루어져 왔으나 (Henderson et al., 1984), 지난 10여년 동안 체세포배 발생에 의한 식물체 재생에 관한 일련의 연구가 보고되었

다. 즉, 蔞 (Tsai and Tseng, 1979), 莖頂 (Jarret et al., 1984; Liu and Cantliffe, 1984), 줄기, 뿌리 및 잎 (Liu and Cantliffe, 1984, 1985)에서 얻은 캘러스로부터 체세포배가 유도되었는데, 특히 莖端 分裂組織 (shoot apical meristem dome)에서는 90% 이상의 절편에서 배발생 캘러스가 유도된 바 있다 (Cantliffe et al., 1987; Liu et al., 1989). 본 연구에서는 국내 품종인 '부여재래'와 '율미'를 대상으로 경단분열조직의 배양에 의한 체세포배 발생과 이들 체세포배로부터 배발생 캘

러스 및 이차 체세포배를 대량으로 생산할 수 있는 방법을 제시하였다.

재료 및 방법

생육상(明: 27°C, 16시간, 약 30,000 Lux; 暗: 22°C: 8시간: 상대습도 60-70%)에서 재배된 고구마(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.: 품종: '부여재래' 및 '율미') 정단 혹은 측지를 1 cm 정도 채취하여 10% 유한락스에 10분간 침지한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 해부현미경하에서 scalpel과 forceps으로 어린 잎을 제거한 후 높이 약 150 μm, 지름 약 350 μm의 정단분열조직을 적출하여 잘린 면이 배지에 닿도록 치상하였다(Cantliffe et al., 1987; Liu et al., 1989).

배발생 캘러스 유도는 Murashige와 Skoog (1962) 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine HCl, 30 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite를 넣은 MS 기본배지에 1 mg/L 2,4-D를 첨가하여 pH를 5.8로 조정후 25 mL 씩을 87 × 15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 넣어 사용하였다. 형성된 배발생 캘러스로부터 체세포배를 유도하기 위하여 0.1 mg/L 2,4-D + 0.01 mg/L kinetin, 0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin, 0.5 mg/L 2,4-D + 0.01 mg/L kinetin 및 0.5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 MS 기본배지에 직경 2-3 mm 크기의 배발생 캘러스를 치상하였다. 각 배지별로 페트리디쉬당 5개의 배발생 캘러스를 치상하여 3반복으로 실시하였고, 배양 6주후에 어뢰형이거나 이보다 더 발달된 체세포배를 대상으로 체세포배 발생률을 구하였다. 또한 위에서 형성된 체세포배를 이용하여 이차 체세포배 발생률을 알아보기 위하여 이차 체세포배 발생률을 구하였다. 또한 위에서 형성된 체세포배를 길이 1 mm 이하, 1-3 mm, 3-5 mm로 나누고 이들을 각각 동등한 길이로 상하로 나누어 MS 무기염에 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에 페트리디쉬당 10개씩 6반복으로 치상하여 배양 3주후에 이차배 발생률을 조사하였다. 유도된 체세포배는 MS 기본배지에 배양하여 식물체로 발달할 수 있도록 하였다.

기내배양은 27°C에서 행하였는데 배발생 캘러스 및 체세포배의 유도는 暗所에서, 성숙한 체세포배를 식물체로 전환하여 화분으로 옮기기까지는 약 1,000 lux의 cool-white 형광, 광주기 16시간 조건에서 배양하였다. 순화되어 화분에 옮겨진 식물체는 생육상에서 키웠다.

결과 및 고찰

'부여재래' 및 '율미'의 절편은 전반적으로 'White Star'(Cantliffe and Liu, 1987; Liu et al., 1992)와 동일한 발달 양상을 보였다. 즉, 배양 2주 후 절편은 처음보다 2-3배 커졌으며 3주후에는 배발생 캘러스 및 발달초기 단계의 체세포

Table 1. Frequency of embryogenic callus formation from shoot apical meristem explants of Korean cultivars of sweet potato cultured on MS medium with 1 mg/L 2,4-D.

Cultivar	No. of cultured explants ^a	% Survival rate	% Frequency of embryogenic callus formation out of survived explants
Puyojaerae	20	70.0 ± 14.1	85.7 ± 3.5
Yulmi	50	84.0 ± 11.4	90.5 ± 5.5

^aThe shoot apical meristem explant measured about 150 μm in height and 350 μm at the base.

^bThe frequency was determined after 6 weeks of culture (±SD).

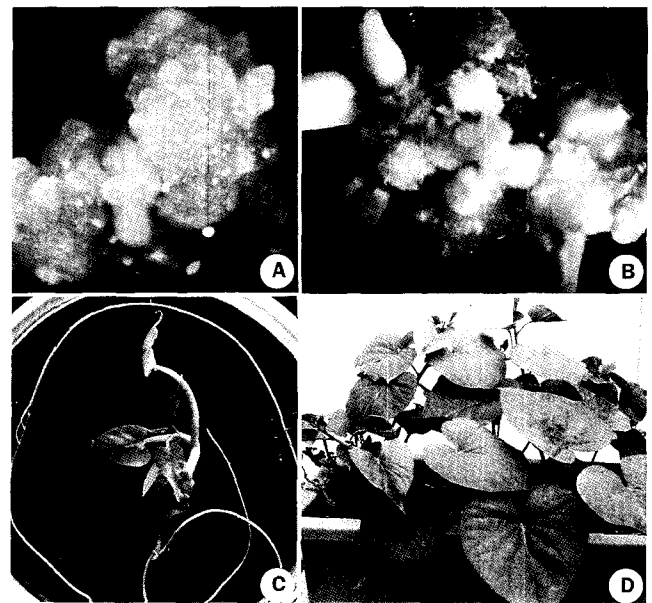


Figure 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration in shoot apical meristem cultures of sweet potato (cv 'Puyojaerae'). A: Embryogenic callus derived from excised shoot apical meristem domes; B: Somatic embryos from embryogenic callus; C: Plantlet from somatic embryo; D: Regenerants growing in potting soil.

배를 절편 표면에 형성하였다(Fig. 1). 20-30%의 절편은 갈변화되어 생존하지 못하였는데(Table 1), 이는 절편의 적출 과정에서 탈수되었거나 상처를 입었기 때문으로 사료된다. 6주후에 두 품종은 생존한 절편중 80% 이상이 배발생 캘러스를 형성하였으며(Table 1) 두 품종간에 형성빈도의 통계적 유의성은 없다. 이는 'White Star'의 90% 이상(Cantliffe and Liu, 1987; Liu et al., 1989, 1992) 보다는 약간 낮으나 대체적으로 본 논문에서 이용된 방법이 품종에 관계없이 광범위한 종류의 고구마에 적용 가능함을 시사하고 있다.

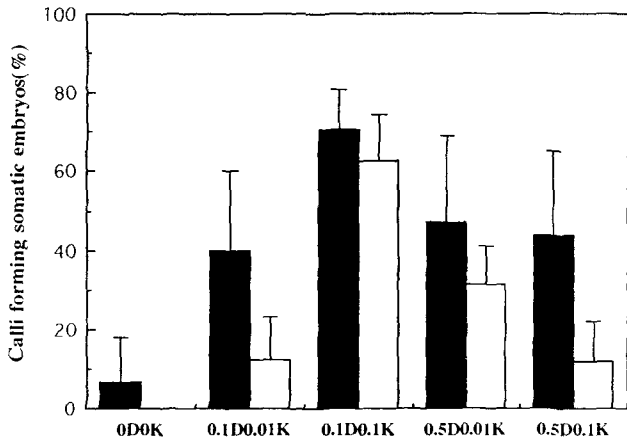


Figure 2. Frequency of somatic embryo formation from embryogenic calli of two Korean cultivars ['Puyojaerae' (■) and 'Yulmi' (□)] of sweet potato. Calli, 2 to 3 mm in diameter, were cultured on MS medium supplemented with 0.1, 0.5 mg/L 2,4-D (D) and 0.01, 0.1 mg/L kinetin (K). The number of calli with somatic embryos at torpedo-shaped or more advanced stage were divided with the total number of calli to determine the frequency after 6 weeks of culture. Vertical bars represent ± SD.

배발생 캘러스로부터 체세포배 발생을 위한 실험에서는 '부여재래'의 경우 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 배지에서 71%로 다른 처리에 비해 높았고 '율미'의 경우에서도 63%로 현저히 높았다(Fig. 2). 배발생 캘러스를 기본배지나 0.3 mg/L ABA 및 Zip가 첨가된 MS 배지에 치상하였을 경우 'White Star' (Cantliffe and Liu, 1987; Liu et al., 1989, 1992)와는 달리 초기 발생단계(구상배)의 체세포배에서 더 이상 발달이 이루어지지 않아서 성숙한 체세포배 발생률이 극히 낮았다 (6.7%). 따라서 '부여재래'나 '율미'의 배발생 캘러스로부터 어뢰형 이상의 체세포배를 유도하기 위해서는 낮은 농도의 2,4-D와 kinetin이 필수적인 것으로 보인다(Fig. 2). 체세포배 발생률은 어뢰형 이상의 체세포배를 대상으로 구하였기 때문에 배양시기가 경과 할수록 구상형이나 심장형 체세포배가 성숙되면 그 발생률은 더욱 높아질 수 있으리라고 생각된다. '부여재래'와 '율미'의 체세포배 발생에 있어서 발생률의 차이는 품종에 기인된 것으로 보인다.

체세포배로부터의 이차배 유도 실험에서 1 mm 이하의 체세포배를 이등분하여 치상하였을 때 '부여재래' 상부로부터의 발생률이 75%로 하부보다 약 2배 높았으며(Fig. 3), 체세포배 크기가 클수록 이차배 발생률은 감소하였다. '율미'에 있어서도 유사한 결과를 얻었다(Fig. 3). 유도된 체세포배는 90% 이상이 MS 기본배지에서 완전한 식물체로 발달하였다(Fig. 1C, D)

이들 품종은 생식이나 근고구마용으로 주로 사용되고 있

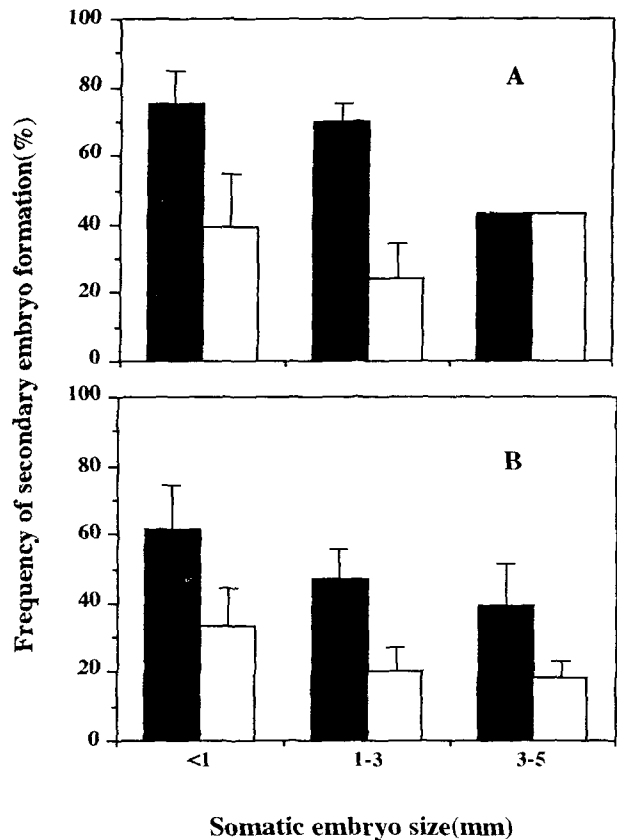


Figure 3. Frequency of secondary embryo formation from transversely sliced somatic embryo halves (■: upper half; □: lower half) of two Korean cultivars [('Puyojaerae' (A) and 'Yulmi' (B)) of sweet potato. The embryo halves were cultured on MS medium with 1 mg/L 2,4-D. Data were collected after 3 weeks of culture. Vertical bars represent ± SD.

는데 현재의 괴근은 너무 커서 오히려 상품적 가치를 떨어뜨리고 있다. 감자의 경우 ADP-glucose pyrophosphorylase 유전자를 antisense로 발현시킴으로써 괴경의 크기를 줄이고 당도를 높인 예가 보고되었는데 (Müller-Röber, 1992), 동일한 방법을 국내 고구마에 적용하면 이들 품종의 부가가치 향상에 기여할 수 있을 것으로 보인다. 이렇게 하려면 고구마의 형질전환 방법이 먼저 확립되어야 하는데 Prakash와 Varadaragan (1992)의 경우 particle bombardment 방법으로 캘러스로부터 형질전환된 뿌리를 얻을 수 있었으나 이들이 사용한 캘러스는 비배발생 캘러스였으므로 형질전환된 완전한 식물체를 얻을 수 없었다. 본 논문에 기술된 고구마의 고빈도 재분화방법은 형질전환에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

국내 두 품종의 고구마를 대상으로 경단분열조직 배양에 의한 체세포배발생과 이들로부터 식물체 재분화 체계를 확립하였다. '부여재래'나 '올미'의 경단분열조직 절편을 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 배양하여 6주후에 80% 이상의 절편으로부터 배발생 캘러스를 얻었다. 이 캘러스를 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 배지에 옮겼을 때 '부여재래'와 '올미'의 체세포배 발생률이 각각 71% 및 63%로 다른 처리에 비해 현저히 높았다. 형성된 체세포배를 상하로 이등분하여 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 치상하였을 경우 품종에 관계없이 길이가 짧은 체세포배의 상반부에서 이차배가 더 많이 발생하였다. 이들 체세포배는 MS 기본배지에서 90% 이상이 완전한 식물체로 발달하였다. 이러한 결과는 우리가 이전에 확립하였던 고구마의 경단분열조직으로부터의 체세포배발생 방법(SABRAO J 21: 93-101)이 광범위한 고구마 계통에 적용될 수 있음을 시사한다.

사 사

이 논문은 과학기술처 특정과제(G71180)의 연구결과이다. 원고에 대하여 세심한 수정과 논평을 하여 준 곽상수, 이문순 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Cantliffe DJ, Liu JR, Schultheis JR (1987) Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. *In* WH Smith, JR Frand, eds, *Methane from Biomass: A Systems Approach*. Elsevier Applied Sci, New York, pp 183-195
- Harlan JR (1976) The plants and animals that nourish man. *Sci Am* **235**: 89-97
- Henderson JHM, Phills BR, Whatley BT (1984) Sweet potato. *In* WR Sharp, DA Evans, PV Ammirato, Y Yamada, eds, *Handbook of Plant Cell Culture, Vol 2, Crop Species*. Macmillan Publishing Co., New York, pp 302-326
- Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep* **3**: 112-115
- Liu JR, Cantliffe DJ, Simonds SC, Yuan JF (1989) High frequency somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem domes of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *SABRAO J* **21**: 93-101
- Liu JR, Min SR, Yang SG (1992) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid at a single concentration determining various morphogenesis patterns in shoot apical meristem cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Korean J Plant Tissue Culture* **19**: 167-170
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Muller-Rober B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J* **11**: 1229-1238
- Prakash CS, Varadarajan U (1992) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep* **11**: 53-57
- Tsai HS, Tseng MT (1979) Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot Bull Acad Sinica* **20**: 117-122

(1994년 3월 14일 접수)