

## 감자 유전자원의 기내 장기보존 방법

이정윤<sup>1\*</sup> · 조현목<sup>1</sup> · 박권우<sup>2</sup>

<sup>1</sup>고령지농업시험장 감자과, <sup>2</sup>고려대학교 원예학과

### *In vitro* Long Term Conservation of Potato Germplasms

Yi, Jung-Yoon<sup>1\*</sup> · Cho, Hyun-Mook<sup>1</sup> · Park, Kuen-Woo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Alpine Agricultural Experiment Station, RDA, Pyongchang 232-950, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Horticultural Science, Korea University, Seoul 136-701, Korea

\*corresponding author

**ABSTRACT** This study was carried out to establish the *in vitro* culture system of potato germplasms for minimizing the occurrence of variation and maximizing the culture period. We used osmoticum such as sorbitol or mannitol with sucrose in the absence of plant growth regulators. The growth of potato germplasms in the medium containing osmoticum was increased when the growth temperature was lowered. After six months storage in low temperature, plant heights of tetraploid was somewhat higher than those of diploid with the exception of stn-16 and the difference due to media was not observed. But after twelve months storage, survival rates of plants cultured in LSM 1(sucrose and sorbitol) was higher than those of plants cultured in LSM 2(sucrose and mannitol). The survival rate of stn-16, diploid wild species, was approximately 75% and it was considerably high. In Atlantic, tetraploid cultivated variety, every individual was survived.

**Additional key words:** diploid, osmoticum, potato germplasm, tetraploid

## 서 언

현대 산업기술이 첨단화되고 고도화 됨에 따라 농업분야에서의 생산성 향상과 품종개량 등 농업연구에 대한 관심이 상대적으로 소홀해 지면서 세계적으로 유용농업 유전자원이 크게 황폐됨에 따라 기하급수적으로 늘어나고 있는 인구에 대한 식량공급이 우려되고 있다. 근래 우리나라에서도 작물들의 다양한 유전자원 보존에 대한 중요성을 인식하여 다량의 유전자원을 유지·보존하기 위한 여러가지 노력을 하고 있다.

특히, 감자는 영양제로 번식하기 때문에 선발된 유전자형을 그대로 유지할 수 있는 장점이 있다. 물론 감자도 진정종자(TPS : true potato seed)로써 번식할 수 있으며 이러한 종자는 현행 교잡육종에서 total gene pool을 보존할 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있다. 그러나 감자에서 진정종자 상태로 유전자원을 보존할 경우 매우 이형접합인 경향을 보이므로 영양체처럼 선발된 각각의 특정한 유전자형을 영속적으로 보존할 수 없는 단점이 있다(Morel, 1975). 이러한 이유로 우리나라를 비롯한 대부분의 나라에서 감자의 유전자원을 유지·보존하기 위해 해마다 포장에 괴경을 심고 유지하여 수확한 후 다음 파종기까지 저장하는 일들을 되풀이하고 있다(Lizárraga 등, 1989).

그러나 포장재배를 통한 유전자원의 유지·보존 방법에는 여러 가지 극복해야 할 어려움이 있다. 첫째는 노력과 비용이 많이 든다는 점이고, 둘째는 세균, 곰팡이, 바이러스 등 병원균과 해충에 노출될 위험성이 있으며, 셋째는 우박, 서

리, 바람 등 천재지변에 의해 손실될 가능성이 있다. 또한, 보존중인 유전자원을 이용하기 위한 계절과 생육기 등이 제한된다는 점을 들 수 있다. 이와 같은 많은 문제점 때문에 감자 유전자원의 기내보존 방법에 대한 체계의 구축이 필요하게 된 것이다(Dodds, 1986; Henshaw와 O'hara, 1983; Nizsche, 1983; Withers, 1983). 그러나 기내 유전자원 보존방법도 적절한 생육조건을 조성해 주지 않는다면 인력, 시약 및 기자재 등에 소요되는 비용이 크다는 단점이 있다. 감자의 경우, 기본적인 배지조성에 sucrose를 탄소원으로 사용할 시에는 최소한 2개월마다 계대배양을 해주어야 한다(Roca 등, 1978). 이와 같은 기내 유전자원의 생육을 적절하게 지연시키는 방법으로는 생장억제제의 사용(Estrada 등, 1986; George와 Sherrington, 1984; Lizárraga 등, 1989), 낮은 온도 처리

(Dodds and Roberts, 1985), 낮은 광도 처리(Hughes, 1981; Lizárraga 등, 1989), 양분공급의 제한(Lizárraga 등, 1989; Wescott, 1981), 삼투조절제의 처리(Dodds와 Roberts, 1985; Espinoza 등, 1992; George와 Sherrington, 1984; Thompson 등, 1986), 초저온 저장(Bouafia 등, 1996; Harding, 1991; Uragami 등, 1990) 등이 있으며, 이들을 단독으로 사용하기보다는 주로 적절하게 조합하여 사용하는 경우가 많다.

본 연구는 감자 유전자원의 보존중 유전적 변이를 일으키지 않는 한도에서 선발된 영양체를 최대한 장기간 유지 보존할 수 있는 체계를 만들기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

본 시험에 공시된 감자는 배수체별로 근연아생종, 재배종 등의 group간 기내 보존정도의 차이를 알아보기 위해 2배체 근연아생종인 stn-16(*S. stenotomum*)과 IvP48(*S. phureja*), 4배체 근연아생종인 tbr-2(*S. tuberosum*)와 sto-160(*S. stoloniferum*), 그리고 4배체 장려 품종인 'Atlantic'과 'Atlantic'으로부터 유래한 반수체인 HAT-22 등이 사용되었다. 괴경상태로 포장에서 유지되어온 감자는 맹아를 절단한 후 유효염소농도 0.5%의 차아염소산나트륨 용액과 tween 20을 혼합한 용액에 30분간 흔들여 주어 소독한 다음 멸균수에 5~6회 행군 후 생장점 부분을 도려내어 신초유기 배지에 치상하였다. 치상 3~4주 후 형성된 신초를 마디가 1~2개 포함되게 절단하여 MS 기본염에 sucrose 30g/L가 포함된 기존계대배지에 최대한 많이 증식시켰다. 증식된 신초는 정단부위를 제외하고 2마디씩 기존계대배지, 장기배양배지 1(LSM 1)과 장기저장배지 2(LSM 2)에 20개씩 치상하였다. 장기저장배지는 CIP(국제감자연구소)에서 사용하고 있는 감자의 long storage medium(LSM)을 약간 변형한 것으로 탄소원으로서는 기존계대배지는 sucrose 30g/L만을 사용하는데 비해, LSM 1은 sorbitol 40g/L와 sucrose 20 g/L, LSM 2는 mannitol 40g/L와 sucrose 30g/L를 사용하였다. 온도는 감자조직배양 시의 적온인 23±1°C와 감자생육

**Table 1.** Plant heights of potato plant 6 months after storage *in vitro*.

Temperature (°C)	Medium	Tetraploid(4x)			Diploid(2x)		
		Atlantic	tbr-2	sto-160	stn-16	IvP48	HAT-22
23±1	ES <sup>z</sup>	+++ <sup>w</sup>	+++	+++	+++	++	+
	LSM 1 <sup>y</sup>	+++	+	+	+	+	+
	LSM 2 <sup>x</sup>	+	+	+	+	+	+
6±1	ES	++	++	++	++	++	+
	LSM 1	++	++	++	++	+	+
	LSM 2	++	+	++	++	+	+

<sup>z</sup>Established medium : MS mix. 4.4 g/L, sucrose 30g/L, agar 8g/L.

<sup>y</sup>Long storage medium 1 : MS mix. 4.4 g/L, sucrose 20g/L, sorbitol 40 g/L, agar 8g/L.

<sup>x</sup>Long storage medium 2 : MS mix. 4.4 g/L, sucrose 30g/L, mannitol 40 g/L, agar 8g/L.

<sup>w</sup>+++ growing exceedingly

++ growing optimally

+ growing poorly

**Table 2.** Degree of yellowing potato plant 6 months and 12 months after storage *in vitro*.

Period	Temperature(°C)	Medium	Tetraploid(4x)			Diploid(2x)		
			Atlantic	tbr-2	sto-160	stn-16	IvP48	HAt-22
6months	23±1 °C	ES	G <sup>z</sup>	Y	G	Y	Y	Y
		LSM 1	G	G	Y	Y	G	Y
		LSM 2	Y <sup>y</sup>	G	Y	Y	G	Y
	6±1 °C	ES	YG <sup>x</sup>	Y	G	G	Y	YG
		LSM 1	G	YG	G	G	YG	Y
		LSM 2	G	YG	G	G	YG	Y
12months	23±1 °C	ES	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		LSM 1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		LSM 2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	6±1 °C	ES	Y	Y	G	G	Y	YG
		LSM 1	G	YG	G	G	YG	Y
		LSM 2	G	Y	Y	G	YG	Y

<sup>z</sup>Green

<sup>y</sup>Yellow

<sup>x</sup>Yellow Green

**Table 3.** Survival rates of potato plant 12 months after storage in low temperature.

Medium	Tetraploid(4x)				Diploid(2x)				Total mean
	Atlantic	tbr-2	sto-160	Mean	stn-16	IvP48	HAt-22	Mean	
ES	11 <sup>z</sup>	10	50	23.7	57	20	30	35.7	29.7
LSM1	100	40	60	66.7	75	30	10	52.5	52.5
LSM2	100	10	10	40.0	50	38	10	36.3	36.3
Mean	70.3	20.0	40.0	43.4	60.7	29.3	16.7	35.6	39.5

<sup>z</sup>Number of survived individual/Number of total individual×100

한계저온인 6±1°C를 처리하였다. 그러나 저온 배양 시에도 3-4주동안은 정상온도에서 발근을 시킨 후 저온으로 옮겼다. 광도는 생육적온에서는 3000 lux, 그리고 저온배양에서는 1000 lux로 균형을 맞추었으며 광주기는 공히 16시간 명기, 8시간 암기로 처리하였다.

### 결과 및 고찰

저장 6개월 후 기내 유식물체의 초장은 table 1과 같은데 이에 의하면 상온하의 기존 계대배지에서는 대부분의 계통이 도장하였고, LSM 1과 LSM 2에서는 대부분 생육부진을 보였는데 이와같은 개체들은 저장후기에 가서 식물체 재분화율을 낮추어 유전자원의 소실을 초래한다고 생각되었다. 이것으로 미루어보아 상온하의 기존 계대배지에서는 기존의 2~3개월마다 배지를 갈아주어야하는 생육적정기간을 초과했기 때문에 도장이 이루어졌으며(Roca 등, 1978), 상온하의 LSM 1배지와 LSM 2배지에서의 생육부진은 삼투 스트레스에 따른 온도의 균형이 이루어지지 않았기 때문으로 생각된다.

기내 유식물의 생장지연방법으로 사용된 삼투억제제는 탄수화물 급원으로서 sorbitol, mannitol 등의 비활성 당당류를 기존의 탄소 급원인 sucrose와 적절히 혼합한 것인데(Table 1), 이는 배지내의 삼투압 억제효과를 유도함으로써 기내 유식물의 양분흡수 속도를 지연시켜서 결과적으로 유식물체를 장기간 보존할 수 있게 하는 것으로 알려져 있다(Dodds와 Roberts, 1985; Espinoza 등, 1992; George와 Sherrington, 1984; Thompson 등, 1986).

저온하의 LSM 1과 LSM 2는 정상온도에서의 발근후 저온에 배양된지 6개월까지도 table

1에서 나타내는 것처럼 대체로 정상적인 발근과 생육이 이루어졌다. 이와같은 결과는 Espinoza 등(1992)의 보고와 일치하는 것으로 그들은 감자 식물체의 기내 보존시 삼투조절제와 함께 낮은 온도와 낮은 광도가 함께 처리된 구에서 만족할 만한 결과를 얻었다고 하였다.

저온조건은 기내 유식물의 생육을 억제시켜 장기저장을 가능하게 하여 table 1에서 나타내듯이 기존 계대배지에서도 6개월까지는 상당한 보존정도를 보였으나 보고에 의하면 이와같은 저온처리만으로는 보존기간이 1년 미만으로 짧다고 한다(Dodds and Roberts, 1985 ; George and Sherrington, 1984).

저온하에서 4배체인 장려품종 'Atlantic'과 4배체 근연야생종 tbr-2와 sto-160 등은 table 1에서 나타내는 바와 같이 4배체 근연야생종인 *S. phureja* 유래 근연 야생종인 IvP48과 'Atlantic' 유래의 반수체인 HAt-22는 4배체 반수체보다 다소 낮은 생육정도를 보였는데 이는 조 등(1994)이 보고한 감자의 배수성 변화에 따른 생육정도에서 언급된 것처럼 이형접합성인 배수체 작물의 배수성 저하에 따라 초장이나 괴경 등 생육형질이 저하된다는 사실과 일치하는 것으로 생각되었다. 그러나 이러한 사실은 배수성의 감소에 따른 양적형질의 유전자중 감소에서 오는 영향보다는 유전자좌에서의 상호작용 상실에서 비롯되는 영향이 더 크게 작용한다고 보고(Kotch 등, 1992)되어 있다. 그러나 2배체 근연 야생종인 stn-16은 다른 4배체 계통보다 높은 생육정도를 보여 배수성 저하에 따른 양적형질의 저하가 적용되지 않았는데 이는 배수성이 감소된 반수체인 HAt-22와 달리 stn-16은 2배체종으로서 생태적으로 오랫동안

적응되어온 중만생의 근연 야생종이기 때문인 것으로 생각된다. 또한 같은 4배체내에서도 조생종의 특성을 보이는 tbr-2는 중만생종의 경향을 보이는 sto-160보다 생육정도가 떨어졌으며 2배체내에서도 조생종의 경향을 띤 IvP48이 중만생종인 stn-16보다 생육정도가 떨어졌다. 이러한 사실들로 미루어보아 기내 배양시에도 배수성 변화에 따른 양적형질의 변화 뿐만 아니라 각 계통의 생육특성이 배양기간에 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

table 2를 보면, 저장 12개월 후 상온하의 모든 개체는 황화되어 소실되었고 저온하의 LSM 1과 LSM 2에서는 'Atlantic'과 stn-16계통이 상당수 생존하였으며, 특히 'Atlantic'의 경우에는 처리개체 모두가 생존하였다. tbr-2와 sto-160 계통은 LSM 2배지에서는 생존율이 낮았으나 LSM 1배지에서 매우 높은 생존율을 보였고(Table 3), 특히 2배체 근연야생종인 stn-16은 모든 배지에서 50% 이상의 생존율을 보였으며, 그중에서도 LSM 1배지에서는 75%의 높은 생존율을 보였다(Table 3). 그러나 'Atlantic' 유래 반수체 유기체인 HAt-22는 모든 배지와 온도조건에서 생육이 좋지 않았다. 이러한 경향은 위에서 언급된 바와 같이 인위적인 염색체수 감소에 따른 식물체내의 shock와 양적형질의 감소경향이 복합되어 나타나는 현상이라 생각된다.

유전자원의 기내보존시에는 변이개체의 발생을 극소화하고 장기보존 상태에서 생존율을 극대화시키는 것이 무엇보다도 중요하다. 또한 유전자원의 유전자형에 따른 저장배지의 광범위한 생장반응 적응력이 중요하다고 할 수 있다. 이러한 결과를 토대로 앞으로는 좀더 많은 계통을 공시하여 배수성별로 근연야생종, 재배종 등의 group간 기내 유전자원 장기보존 정도를 조사하여 각 유전자원의 유전자형에 광범위하게 적응하는 배지 및 배양조건을 확립하는 일이 무엇보다 시급하다.

### 초 록

감자 유전자원의 기내 유식물체 장기보존시 식물체 변이발생을 최소화하면서 최장기간 배양할 수 있는 배양조건을 확립하기 위해 생장억제물질을 사용하지 않고 탄소공급원으로서 삼투조절제를 sucrose와 혼합처리하였는데, 이러한 삼투조절제에 의한 생육지연 효과는 배양온도를 낮춤으로써 효과를 증대시킬 수 있었다. 6개월 저장 후 저온하의 4배체 계통의 초장이 2배체 계통의 초장보다 다소 높게 나타났으나 배지간 차이는 나타나지 않았다. 그러나 저온저장 12개월 후에는 mannitol과 sucrose의 혼합처리인 LSM 2 배지보다 sorbitol과 sucrose의 혼합처리인 LSM 1 배지의 처리계통에서 만족할 만한 결과를 얻을 수 있었으며, 특히 2배체 근연야생종인 stn-16은 LSM 1 배지에서 75%의 상당히 높은 생존율을 보였으며 재배종인 'Atlantic'은 두 배지 모두에서 100%의 생존율을 보였다.

추가 주요어 : 2배체, 삼투조절제, 감자유전자원, 4배체

## 인용문헌

- Bouafia, S., N. Jelti, G. Lairy, A. Blanc, E. Bonnel, and J. Dereuddre. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation dehydration. *Potato Research* 39:69-78.
- Dodds, J. H. 1986. Storage of plant genetic resources. pp.172-180. In : *Experiments in plant tissue culture*. J. H. Dodds and L.W. Roberts(eds.). Cambridge Press.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1985. *Experiments in plant tissue culture*. 2ed. Cambridge University Press. Cambridge, NY.
- Espinoza, N., R. Lizárraga, C. Siqueñas, F. Buitrón, J. Bryan, J., and J.H. Dodds. 1992. Tissue culture : Micropropagation, conservation, and export potato germplasm. CIP Research Guide 1. International Potato Center, Lima, Peru.
- Estrada, R., P. Tovar, and J.H. Dodds. 1986. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7:3-10.
- Harding, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55:141-146.
- Henshaw, G.G. and J.F. O' hara. 1983. In vitro approaches to the conservation and utilization of global plant genetic resources. pp.219-238. In : *Plant Biotechnology*. S.H. Mantell and H. Smith. (eds.). C.U.P.
- Hughes, K.W. 1981. *In vitro* ecology : Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture system. *Environmental and Experimental Botany* 21:281-288.
- Kotch, G.P., R. Oritiz, and S.J. Peloquin. 1992. Genetic analysis by use of potato haploid populations. *Genome* 35:103-108.
- Lizárraga, R., Z. Huaman, and J.H. Dodds. 1989. In vitro conservation of potato germplasm at the International Potato Center American Potato J. 66:253-270.
- Morel, G. 1975. Meristem culture techniques for long-term storage of cultivated plants. pp.327-332. In : *Crop genetic resources for today and tomorrow*. O.H. Frankel and J.G. Hawkes(eds.). C.U.P.
- Nizsche, W. 1983. Germplasm preservation. pp.782-805. In : *Handbook of Plant Cell Culture*. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, and Y.Yamada(eds.). Macmillan, New York.
- Roca, W.M., N.O. Espinoza, M.R. Roca, and E.J. Bryan. 1978. A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. *American Potato Journal* 55:691-701.
- Thompson, M.R., T.J. Douglas, and H. Obata-Sasamoto, and T.A. Thorpe. 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol. Plant.* 67:365-369.
- Uragami, A., A. Sakai, and M. Nagai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports* 9:328-331.
- Wescott, R.J. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Research* 24:331-342.
- Withers, L.A. 1983. Germplasm storage in plant biotechnology pp 187-218. In : *Plant biotechnology*. S.H. Mantell and H. Smith(eds.). Cambridge Press.
- 조현목, 안수용, 김혜영, 김화영. 1994. 감자의 배수성 변화에 따른 생육 및 수량관계형질의 발현. *한국육종학회지* 26(2):142-147.