

## 고구마 정단분열조직 유래 식물체 재분화 조건 확립

이준설\*<sup>†</sup> · 안영섭\*\* · 정미남\*\*\* · 김학신\* · 정병준\*

\*작물과학원 목포시험장, \*\*작물과학원, \*\*\*농촌진흥청

### Establishment of Plant Regeneration from Apical Meristem of Sweetpotato

Joon-Seol Lee\*<sup>†</sup>, Young-Sup Ahn\*\*, Mi-Nam Chung\*\*\*, Hag-Sin Kim\*, and Byeong-Choon Jeong\*

\*Mokpo Experiment Station, National Institute of Crop Science, RDA, Muan, 534-833, Korea

\*\*National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

\*\*\*Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT** This study was conducted to investigate somatic embryogenesis capacity using callus derived from bud meristems in sweetpotato. Shoot apical meristem explants (height:150  $\mu$ m;base: 350  $\mu$ m)were cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L 2/4-D. Embryogenic callus were observed in five cultivars when their shoot apices were cultured on MS medium supplements with 1 mg/L 2,4-D. After 6 weeks of culture, greater than 80% of the survived explants produced embryogenic calli and the calli gave rise to somatic embryos at frequencies of 72% (Yulmi), 60% (Shinhwangmi), 78% (Geonmi), 70% (KoKei 14), 40% (Sinjami). The regenerated plants developed into whole plantlets after they were transferred onto the fresh hormon-free MS medium of 74% (Yulmi), 82% (Shinhwangmi), 86% (Geonmi), 74% (KoKei 14), 41% (Sinjami) respectively.

**Keywords** : sweetpotato, regeneration, apical meristem, culture

**고구마** 재배면적은 1960년대 중반까지 재배면적이 15만 ha 이상에 이르렀고 생산량은 연간 2,997천톤 까지 생산된 적이 있었으나, 소득수준의 향상과 함께 식생활 패턴이 변화되면서 80년대 이후부터는 급격히 감소하는 경향을 보이다가 1990년대 후반부터 여주, 익산, 해남, 논산 등에 고구마 주산지역을 형성하면서 2000년도의 재배면적 16,149 ha 을 기점으로 재배면적이 매년 조금씩 늘어나고 있다.

품종개발에 있어서는 1923년에 원기, 1943년에는 충승 100호가 일본으로부터 도입되어 재배되다가, 1944년에 충

승100호보다 고전본이며 다수성인 수원147호가 육성되어 전국에 널리 보급되었다. 그 외에도 천미 등 몇 가지 품종들이 육성되었으나 대부분 단명하였고, 1960년~1980년대까지 신미, 황미, 홍미, 진미, 선미와 같은 다수성 위주 품종이 개발되어 농가에 보급되었다. 그 후 쌀의 자급이 이루어지고 경제가 성장되면서 1980년대 초부터는 다수성이면서 고품질 품종을 아울러 개발하기 시작한 결과, 1991년에 수원 147호보다 식미가 우수하고 분질도가 높은 울미가 육성되어 전국에 널리 보급되었다. 그 후로 신울미, 증미, 연미, 진홍미, 신천미 등 다수성이면서 식미와 외관 품질이 우수한 품종이 개발되었으며, 엽병채소용인 하얀미, 생식 및 색소 원료용으로 자미, 신자미, 신황미, 주황미 등 유색고구마 품종이 육성 보급되었다.

최근에는 공업원료로 이용 가능성이 높은 광합성 고 효율 품종 개발과 내병성, 전분질 등 품질개량을 위하여 유전공학기법을 이용한 유용형질 도입에 관한 연구가 보고되고 있다. 그러나 고구마 재배종은 6배체로서 근연 야생종인 2배체에 비하여 식물체 재분화율이 매우 낮아 새로운 형질을 도입하는데 어려움이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 목적에 맞는 유용 유전자를 고구마에 도입하기위하여 체세포배로부터 식물체의 재분화가 안정적으로 이루어질 수 있는 체계가 우선적으로 확립되어야한다. 작물의 중요성에 비추어 볼 때, 그 동안 고구마 기내 재분화 식물체에 관하여 많은 연구가 이루어지지 못하다(Henderson *et al.*, 1984), 최근 몇 년 동안 체세포배 발생을 통한 식물체 재분화에 관한 일련의 연구가 보고되었다. 또한 고구마 잎 calli로부터 식물체 재분화 효율 증대(Myrylyn *et al.*, 1992), 정단분열조직의 체세포배발생과 이들 체세포로부터 배발생 캘러스를

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-453-0143

(E-mail) jsl@rda.go.kr

대량으로 생산할 수 있는 방법(Sung *et al.* 1994)을, 체세포 배 캘러스 형성 효율(Motoyasu *et al.* 1996)을 보고하였다.

본 연구는 체세포배 발생을 통한 고구마 식물체를 재분화하기 위하여 성장조정제 및 부위별 배양조건과 체세포배 캘러스 발생 조건에 관한 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

실험에 사용할 재료는 율미, 신태미, 건미, 고계14호, 신자미를 포트에 파종하여 생육상에서 재배하였다. 파종 후 50일에 자라난 싹의 정단 1 cm 정도를 채취하여 1% sodium hypochloride 용액에 15분간 침지소독한 후 정단분열조직은 해부현미경하에서 분엽을 제거하고 높이 약 15  $\mu$ m, 지름 약 350  $\mu$ m의 성장점을 적출하여 잘린 면이 배지에 닿도록 치상하였고(Cantliffe *et al.*, 1987; Liu. *et al.*, 1989), 줄기의 절간, 잎, 엽병을 치상하였다.

일반캘러스 유도는 MS 기본배지에 IAA, NAA, picloram, 2,4-D 등을 첨가한 배지와 LS기본배지에 picloram 등을 첨가하여 배양하였다.

배발생캘러스의 유도는 Murashige와 Skoog(MS)(1962) 배지의 무기염에 100 mg/L Myo-inositol, 0.4 mg/L Thiamine. Hcl, 30 g/L Sucrose를 넣은 MS 기본배지에 1 mg/L 2,4-D 및 4 g/L Gelite를 첨가하여 pH를 5.8로 조정한 후 25 ml씩 87×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 넣어 27°C 암조건에서 실험하였다. 형성된 배발생캘러스로부터 체세포배를 유도하기 위하여 배발생캘러스 유도배지와 동일조건에서 1개월 간격으로 계대배양을 하였다. 또한 식물체를 유도하기 위하여 체세포배를 MS기본배지에 넣어 1,000 Lux의 cool-white 형광, 광주기 16시간의 명배양 조건에서 배양하였다.

### 결과 및 고찰

고구마 정단분열조직과 절간, 엽, 엽병을 취하여 명배양 조건에서 성장조정제의 조성을 달리하여 배양한 결과 MS+0.5 mg/L IAA+10.0 mg/L BA, MS+1.0 mg/L NAA+5.0 mg/L BA, MS+1.0 mg/L picloram, MS+1.0 mg/L 2,4-D, LS+1.0 mg/L picloram 등에서 높은 캘러스 유기율을 보였고, 부위별로는 정단분열조직과 엽이 절간과 엽병에 비하여 캘러스

**Table 1.** Frequency of callus formation from apical meristem, stem, leaf, petiole in different growth regulator.

Medium	Growth regulator (mg/L)			Callus formation			
	IAA	NAA	BA	Apical meristem	Stem	Leaf	Petiole
MS	0.1	-	5.0	++ <sup>1</sup>	+	+	+
			10.0	++	+	++	+
			15.0	+++	+	++	+
	0.5	-	5.0	+++	+	++	++
			10.0	+++	++	+++	+++
			15.0	+++	+	++	+
	1.0	-	5.0	++	+	++	++
			10.0	++	+	++	++
			15.0	+++	++	++	+
	-	0.1	5.0	++	+	+	+
			10.0	++	+	++	+
			15.0	+++	++	++	+
		0.5	5.0	+++	++	++	++
			10.0	+++	++	++	++
			15.0	+++	+	++	+
-	1.0	5.0	+++	++	+++	+++	
		10.0	+++	++	+++	++	
		15.0	+++	+	++	+	
-	1 mg/L picloram			++	++	+++	+++
	1 mg/L 2,4-D			+++	++	+++	+++
	1 mg/L picloram			+++	++	+++	++
LS	1 mg/L picloram			+++	++	+++	++

<sup>1</sup> Calluse formation rating; + (Slight), ++ (Moderate), +++ (Vigorous)

유기율이 높았다(Table 1).

높은 유기율을 보인 성장조정제와 부위를 선정하여 2개월간 명배양한 후 형성된 캘러스의 물리적인 특성과 기관분화 양상을 조사하였다. 아그로박테리움을 이용하여 형질전환을 할 경우 체세포배를 우선적으로 얻어야함으로 만약 이 과정에서 기관분화가 이루어지면 바람직하지 못하다. 엽으로부터 형성된 캘러스에서는 MS+1.0 mg/L picloram, MS+1.0 mg/L 2,4-D에서 뿌리나 식물체를 형성하지 않았으나, MS+0.5 mg/L IAA+10.0 mg/LBA, MS+1.0 mg/L NAA+5.0 mg/L BA, LS+1.0 mg/L picloram 등에서는 뿌리나 식물체를 형성하였다. 또한 캘러스의 색 및 물리적 특성을 관찰한 결과 엽부위에서는 부슬부슬하고 부서지기 쉬운 흰색캘러스를, 성장점에서는 단단하고 윤기있는 노란색(흰색)을 띤 체세포배발생 캘러스를 형성하였다(Table 2).

명배양조건에서 기관분화와 캘러스 형성 양상을 조사한 결과, MS+1.0 mg/L 2,4-D, MS+1.0 mg/L picloram에서 체세포배형성 가능성이 높아 다음 실험에서 MS+1.0 mg/L 2,4-D 농도별 및 부위별로 암배양조건에서 체세포배형성캘러스의 유기율을 조사하였다. 부위별로는 정단분열조직 > 엽기저부위 > 줄기선단부위 순으로 높았고, 성장점에서는

건미, 울미, 고계14호 등에서 75~80%로 노랑고 윤기가 있는 체세포배캘러스를 형성하였다. 건미의 캘러스가 자색을 띤 것은 페놀화합물이 다른 품종에 비하여 많이 함유되어 polyphenol oxidase에 의한 산화 결과 갈변되었기 때문으로 생각되며, 자미는 줄기의 색이 자색을 띠기 때문인 것으로 생각된다(Table 3).

고구마 조직배양은 주로 체세포배발생을 통한 식물체 재분화 시스템이 널리 이용되고 있다. 따라서 형질전환 기법을 이용하여 유용형질을 도입 할 경우 가급적이면 많은 양의 체세포배를 확보하는 것이 중요하다. 체세포배발생 캘러스를 유기하는데(민 등, 1994)은 MS기본배지에 2,4-D의 농도를 1.0 mg/L를 첨가하였을 경우 발생율이 높다고 하였다. 본 실험에서는 울미, 신허미, 건미, 고계14호, 신자미로부터 성장점을 적출하여 2,4-D농도별 체세포배발생캘러스 형성을 조사한 결과 MS+1.0~1.5 mg/L 2,4-D에서 높았고, 품종별로는 건미가 가장 높았다(Table 4).

암배양조건에서 형성된 체세포배 캘러스로부터 식물체를 유도하기위하여 MS free배에서 명배양 조건으로 배양하였다. 체세포배 유기율과는 달리 울미와 신허미에서 식물체 재분화율이 70~73%로 신자미와 고계14호에 비하여 높았다.

**Table 2.** Frequency of callus formation in dark condition.

Medium	Leaf			Apical meristem		
	Root formation (%)	Color	Hardness	Plant regeneration (%)	Color	Hardness
MS + IAA (0.5) + BA (10.0)	100	W	F	75	W(Y)	F+H
MS + NAA (1.0) + BA (5.0)	100	W	F	53	W(Y)	F+H
LS + 1 mg/L picloram	60	W	F	0	W(Y)	F+H
MS + 1 mg/L 2,4-D	0	W	F	0	Y(W)	H+F
MS + 1 mg/L picloram	0	W	F	0	Y(W)	H+F

※ Color : W(White) Y(yellow), Hardness : F(friable) H(hard)

**Table 3.** Frequency of callus formation in light condition.

Varieties	Medium	Explant with shoot			Color
		Apical meristem (%)	Leaf disk (%)	Stem (%)	
Yulmi		37.5(75)	11.0(22)	3.0(6)	Yellow
Shinhwangmi		31.5(63)	9.5(19)	0.0(0)	Yellow
Geonmi	MS +	40.0(80)	11.5(23)	2.5(5)	Purple
Kokei 14	1.0 mg/L 2,4-D	36.5(73)	11.5(23)	1.5(3)	Yellow
Sinjami		21.5(43)	5.0(10)	0.0(0)	Purple

※ 치상개체수 : 50개, 암배양, 조사시기 : 치상 후 60일

Table 4. Embryogenic callus formation in different concentration of 2,4-D.

Medium		Varieties (%)				
Base	2,4-D (mg/L)	Yulmi	Shinhwangmi	Geonmi	Kokei 14	Sinjami
	0.5	13.5(27)	16.5(33)	15.0(30)	18.0(36)	11(22)
MS	1.0	38.0(76)	32.0(64)	41.0(82)	36.5(73)	23.5(47)
	1.5	37.0(74)	24.0(48)	42.5(85)	34.5(69)	18(36)

※ 치상개체수 : 50개, 암배양, 조사일 : 치상 후 60일

Table 5. Frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus.

Varieties	Somatic embryo (/embryogenic callus 50, %)	Plant regeneration (/somatic embryo 50, %)
Yulmi	36.8±1.9(74)	36.6±2.1(73)
Shinhwangmi	41.2±2.4(82)	35.2±2.4(70)
Geonmi	43.2±1.7(86)	31.6±2.1(63)
Kokei 14	36.8±2.5(74)	29.4±1.8(59)
Sinjami	20.6±3.6(41)	24.0±1.6(48)

※ 명배양, MS배지, 조사 시기 : 치상 후 10일(체세포배) 35일(재분화 식물체)

## 적 요

## 인용문헌

체세포배 발생을 통한 고구마 재분화 식물체를 유도하기 위하여 성장조정제 및 부위별 배양조건과 체세포배 캘러스 발생 조건에 관한 실험을 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 성장조정제별 캘러스 유기율은 MS+0.5 mg/L IAA+10.0 mg/L BA, MS+1.0 mg/L NAA+5.0 mg/L BA, MS+1.0 mg/L picloram, MS+1.0 mg/L 2,4-D, LS+1.0 mg/L picloram 등에서 높았고, 부위별로는 정단분열조직과 엽이 절간과 엽병에 비하여 높았다.

2. 고구마 치상 부위별 캘러스 형성은 부위별로는 정단분열조직 > 엽기저부위 > 줄기상단부위 순으로 높았고, 생장점에서는 건미, 울미, 고계14호 등에서 75~80%의 노랑고 윤기가 있는 체세포배캘러스를 형성하였다.

3. 2,4-D농도별 체세포배발생캘러스 형성을 조사한 결과 MS+1.0~1.5 mg/L 2,4-D에서 높았고, 품종별로는 건미가 가장 높았다.

4. 식물체 재분화율은 울미가 73%, 신황미가 70%로 신자미와 고계14호에 비하여 높았다.

Cantliffe DJ, Liu JR, Schultheis JR. 1987. Development of artificial seeds of sweetpotato 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.

Myrilyn M. Belarmino, Toshinori Abe and Sasahara. 1992. Efficient Plant Regeneration from Leaf Calli of *Ipomoea batatas*(L.) Lam and its related species. *Japan. J. Breed.* 42 : 109-117.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15 : 473-497.

Motoyasu Otani and Takiko Shimada. 1996. Efficient embryogenic callus formation in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *Breeding Science* 46 : 257-260.

Henderson JHM, Phills BR, Whatley BT. 1984. Sweetpotato. In WR Sharp, DA Evans, PV Ammirato, Y Yamada, eds, *Handbook of Plant Cell Culture. Crop Species* Macmillan Publish Co.. New York. pp. 302-326.

Sung R. MIN, Jang R. LIU, Tae H. RHO, Chil H. KIM, and Jung I. JU. 1994. High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of Korean Cultivar Sweet Potatoes. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 21(3) : 157-160.