

고구마 정단분열 조직배양에 의한 多芽體 형성

은종선* · 김영선¹

전북대학교 원예학과, ¹전북대학교 농업과학기술연구소

Multiple Shoot Formation by Apical Meristem Culture in *Ipomoea batatas* Poir.

EUN, Jong Seon* · KIM, Young Seon¹

Department of Horticulture, Chonbuk National University

¹Institute of Agricultural Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

ABSTRACT In sweet potato cultivars 'Mokpo #29' and 'Sanchunza', shoots from explants were formed 100% on the MS medium with 0.1 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA after 30 days of culture and roots produced from the base of stem at frequencies of 66.7% ('Mokpo #29') and 69.2% ('Sanchunza'), respectively. The media with 0.5-4.0 mg/L BA were produced the greatest frequency of multiple shoot and the most of shoots developed rapidly into normal plantlets with rooting within 60 days of culture. Whereas the cultivar 'Keumsi' failed to produce normal shoot multiplication on the medium with cytokinins alone because of callusing of adventitious shoots. When single shoots with 1 to 2 nodes were excised from the multiple shoot or shoots covered with callus devoid of root and transferred to MS medium with 4.0 mg/L BA or kinetin. Most divided shoots showed the callus induction at the stem base and it was able to obtain regenerated plantlets with shoot and root normally.

Key words : Regenerated plantlets, shoot multiplication, sweet potato

서 론

고구마에는 전분, 당분, 비타민 및 무기염류가 다량 함유되어 있어 穀物 및 채소류라 할 수 있는 작물로 식용, 주정 및 전분의 원료로 이용될 뿐만 아니라 제과, 제빵 원료로 가공하여 사용되고 있는 바 그 소비가 상당히 다양한 작물이다.

고구마의 번식은 식물체의 줄기를 삽식하여 행해지고 있는데 이 경우 삽목묘의 母株에 virus가 감염되어 있는 종묘는 결국 수량감소뿐 아니라 품질저하를 초래하게 된다 (Litz and Conover 1978). 또한 유전자원으로서 종묘를 포장에서 유지, 보존할 경우 병해감염의 요인이 되며 상당한 비용이 소요되기도 하는데 (Jarret et al. 1984), 유전자원의 器內保存과 無

病苗의 획득을 위하여 고구마의 정단분열조직배양에 대한 많은 연구가 행해져 왔다 (Litz and Conover 1978; Mori 1971).

본 연구는 건강식품으로서 점차 수요가 증가하고 있는 고구마의 고품질묘를 생산하고 대량증식시킴으로써 실제 농가에 무병묘를 보급할 수 있는 생산체계를 확립하기 위한 것으로 정단분열조직배양에 의한 종묘의 대량증식에 적합한 생장조절제의 조성과 농도를 구명하고 배양에 적합한 정단분열조직의 크기를 조사하였다.

재료 및 방법

전북대학교 실험포장의 비닐하우스에 재식되어 있는 고구마 3개 품종 ('금시', '목포 29호', '산천자')에 대하여 藥原基 1매가 부착된 정단분열조직을 0.3~0.5 mm 크기로 절취

*Corresponding author. Tel 0652-270-2576
E-mail jseun@moak.chonbuk.ac.kr

하여 실험재료로 사용하였다. 재료의 조제는 줄기선단 약 5 cm를 절취하여 70% 에탄올에 10여초간 표면살균하고 7% calcium hypochlorite 수용액에 10분간 침지한 후 멸균수로 3~4회 수세하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962)기본배지에 NAA와 BA를 혼용처리하거나 BA, kinetin 및 TDZ (thidiazuron) 등의 cytokinin류를 단용처리한 후 캘

러스, shoot 및 뿌리발생에 미치는 성장조절제의 효과를 조사하였다. 배지는 3% sucrose를 첨가한 다음 pH 5.8이 되도록 조정하였으며 0.2% gelrite를 첨가한 배지에 정단분열조직을 치상하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 성장상에서 명배양하였다.

多芽體形成에 적합한 정단분열조직의 크기를 조사하기 위하여 0.3, 0.5 및 1.0mm 크기로 분류하여 multiple shoot 및 분화된 식물체의 생육에 가장 양호한 배지를 선정하여 배양하였으며 1개의 정단분열조직에서 분화된 shoot에서 다시 multiple shoot를 유도하기 위하여 cytokinin 단용처리배지에 shoot를 계대배양하였다.

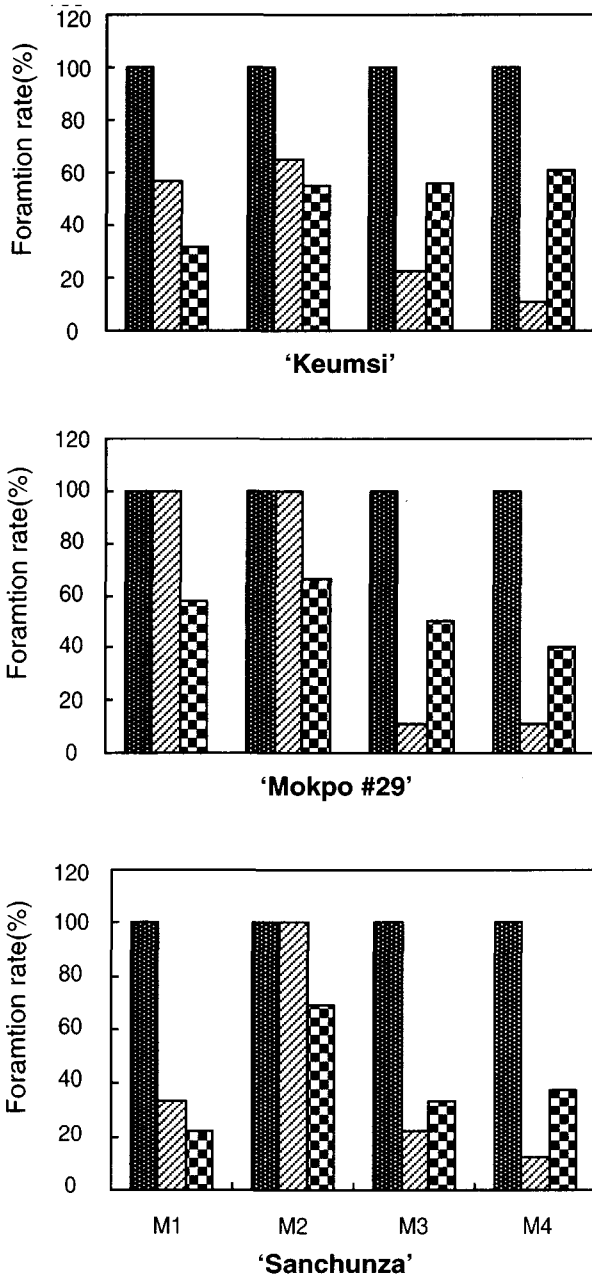


Figure 1. Effect of plant growth regulators on the formation of callus, shoot, and root from apical meristem culture of sweet potato (three cultivars: 'Keumsi'; 'Mokpo#29'; 'Sanchunza') after 60 days of culture.

M1: 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA;
 M2: 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA;
 M3: 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA;
 M4: 0.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA.

결과 및 고찰

성장조절물질의 종류 및 농도구명

0.1, 0.5 mg/L NAA와 1.0, 2.0 mg/L BA를 조합하여 혼용 처리한 후 배양한 결과 (Figure 1) 0.1 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 혼용처리에서 배양 10일경 가장 빨리 절단면에서 캘러스가 유도되면서 shoot가 분화되었는데 배양 20일경에 분화된 shoot는 배양 30일 후에는 본엽 5~7개로 성장되었다.

배양 후 약 30일이 경과되었을 때는 품종에 무관하게 0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리구에서 shoot 증식이 양호하였는데 절단면이 캘러스화되면서 shoot가 발생되기 시작하였으며 분화된 shoot는 캘러스로 덮여 있는 상태로 배양 60일 후까지 5~6마디로 성장되었고 뿌리도 동시에 발생되어 식물체로 재분화되었다. 그러나 1개의 절편에서 1개의 shoot분화만 관찰되었고 多芽體의 분화는 없었다.

특히 '목포 29호'와 '산천자'의 경우 0.1 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 혼용처리구에서 100% shoot가 분화되었고 뿌리도 각각 66.7%와 69.2%가 발생되어 가장 양호하였으며 '금시'의 경우도 0.1 mg/L NAA와 BA 혼용처리구에서 shoot분화율이 양호하였다. 그러나 0.5 mg/L NAA와 BA 혼용처리구에서는 품종에 무관하게 shoot분화율이 낮았는데 NAA 농도에 따라 shoot분화에 큰 차이를 나타내었다.

Cytokinin류 단용배지에 품종별로 배양한 결과 (Figure 2) 3가지 품종 모두 성장조절제의 종류에 따라 큰 차이를 보였는데 BA와 kinetin이 TDZ보다 양호하였다. BA 단용처리에서 '목포 29호'와 '산천자'의 경우 배양 7일경부터 shoot가 분화되기 시작하여 배양 14일경에는 캘러스에서 다수의 多芽體가 분화되었다 (Figure 3A, B). 또한 절편체의 절단면에서 캘러스가 동시에 발생되었고 캘러스발생은 성장조절제의 종류와 무관하게 유도되었으며 배양 약 30일 후 조사 결과 캘러스가 더 이상 증식되지 않은 상태에서 shoot의 생육은 진전되어 본엽 4~7개 정도로 성장되었다. 분화된 shoot는 줄기의基部에서 새로운 shoot가 분화되어 多芽體로 증식되

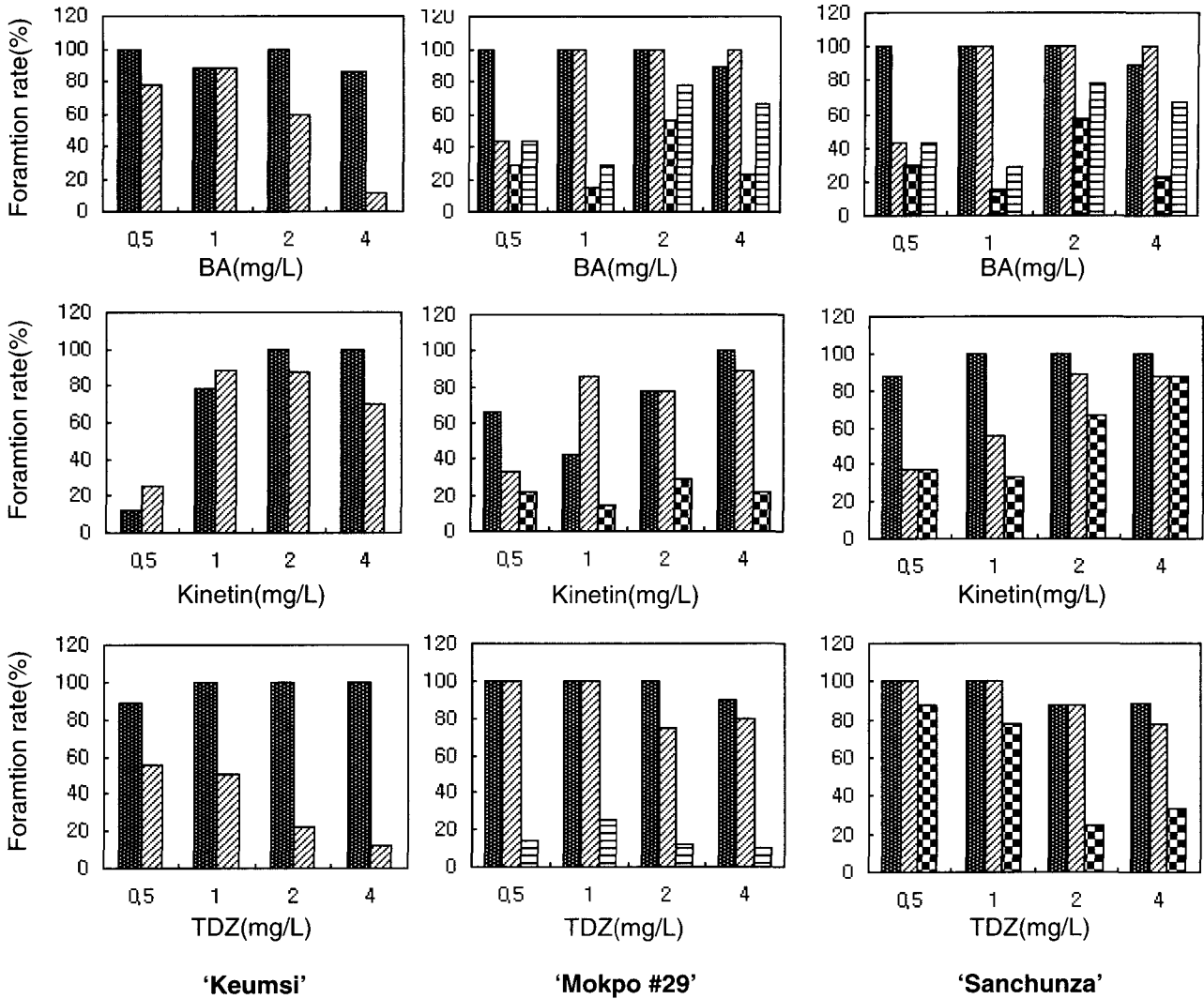


Figure 2. Effect of cytokinins on the formation of callus, shoot, and root from apical meristem culture of sweet potato (three cultivars: 'Keumsi'; 'Mokpo#29'; 'Sanchunza') after 60 days of culture. ■ Callus ▨ Shoot ▩ Root ▪ Multiple shoot.

었는데 배양 60일 이후에는 2.0 mg/L BA처리구에서 절편당 약 15개 정도의 多芽體로 분화되었다. BA처리구에서 뿌리발생은 배양 50일경 0.2~1.0 mg/L구에서 분화된 shoot의 기부부분에서 일제히 발생되었는데 배양 40일경까지 전혀 발생되지 않았던 점에서 볼 때 뿌리발생에는 일정 배양기간이 요구되었다.

그러나 '목포 29호' 및 '산천자'와는 달리 '금시'의 경우 주로 캘러스의 증식이 이루어져 shoot 분화 및 뿌리발생이 두 품종에 비해 저조한 결과를 보였다.

Kinetin처리구는 배양 7일경에 shoot가 분화되면서 BA처리구와 마찬가지로 전처리구에서 절편면에 캘러스가 유도되었고, 배양 30일경에 분화된 shoot에서 뿌리가 발생되어 배양 40일경에는 급격한 뿌리신장을 보였으며 shoot가 분화된 경우는 모두 뿌리가 발생되어 BA처리보다 뿌리발생이 상당히 빨랐다. 특히 2.0 mg/L kinetin처리구의 경우 왕성한 뿌리신장과 더불어 7~8개 마디까지 신장되었는데 이들 식물체는

pot에 이식 후 정상식물체로 생육되었다. 그러나 0.5 mg/L kinetin 처리구의 '산천자'에서만 몇 개체의 절편에서 多芽體가 유도되었을 뿐 다른 처리구에서 多芽體는 관찰되지 않았고 1개의 절편당 1개의 shoot만 관찰되었다.

TDZ 처리구의 경우 0.2~1.0 mg/L에서 캘러스 및 shoot가 같이 발생되어 0.2 mg/L에서는 2~3개의 multiple shoot도 분화되었으나 0.5~1.0 mg/L에서 분화된 shoot는 다시 캘러스화되어 정상적인 shoot분화를 보이지 않아 가장 부적합한 성장조절제로 관찰되었다. 2.0 mg/L의 경우는 캘러스만 발생한 상태로 shoot 발생은 없었으며 0.5 mg/L TDZ 처리구의 '산천자'에서 뿌리발생이 약간 관찰되었으나 다른 처리구에서 뿌리발생은 배양 50일까지 관찰되지 않았다.

배양에 적합한 정단분열조직의 크기 조사

Cytokinin류 단용처리에서 shoot분화에 양호하였던 4.0

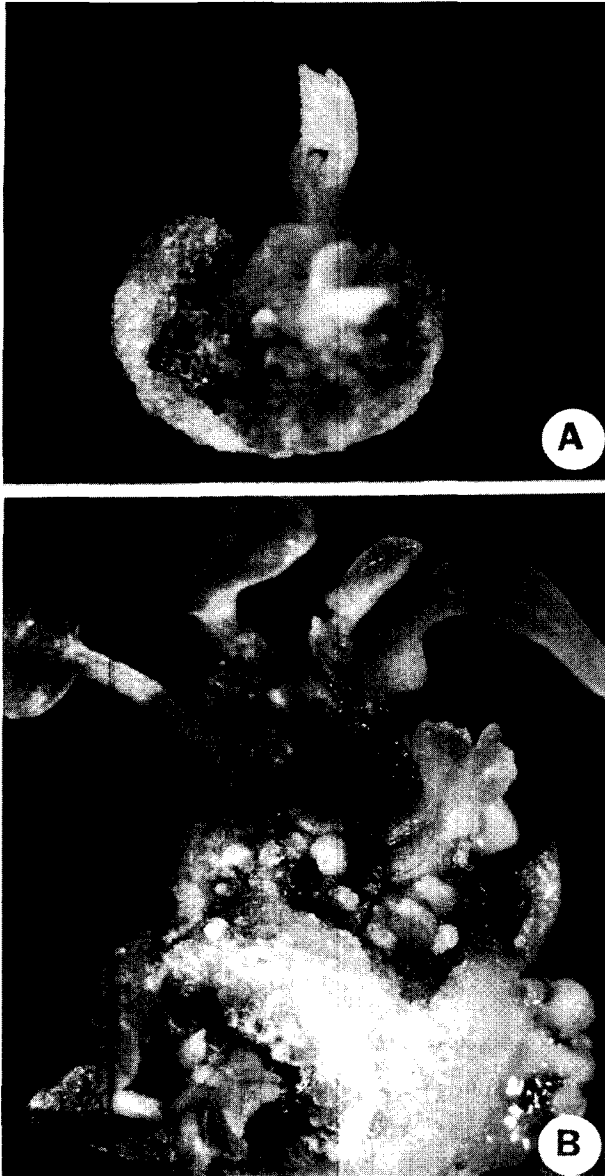


Figure 3. Plantlet regeneration on MS medium with 2.0 mg/L BA alone in the cultivar 'Sanchunza'. Callus and shoot formation after 7 days (A) and 14 days (B) of culture.

mg/L kinetin 첨가배지에 정단분열조직 크기별 shoot 분화속도 및 마디신장효과를 조사하였다 (Figure 4).

배양 30일까지 모든 처리구에서 캘러스가 유도된 후에 shoot분화가 이루어졌는데 0.3 mm에서 33.3%를 보인 것에 비해 葉原基 2~3개가 부착된 1.0 mm에서 63.6%를 보여 정단분열조직 크기에 따라 초기배양의 shoot분화에는 차이를 보여 정단분열조직이 클수록 shoot분화율이 양호하였다. 그러나 배양기간이 경과하면서 일단 분화된 shoot는 생장속도가 급속히 진전되어 절편체의 크기와 무관하게 증식하였는데 배양 60일 후에는 모두 100%의 shoot와 뿌리발생률을 보였다. 또한 분화된 shoot는 일부 절편체에서 多芽體로 증식되기도 하였으나 뿌리신장과 함께 마디신장이 되어 1.0 mm에서 7.5개의 마디가 신장되어 가장 양호하였으나 배양 60일 후 조사

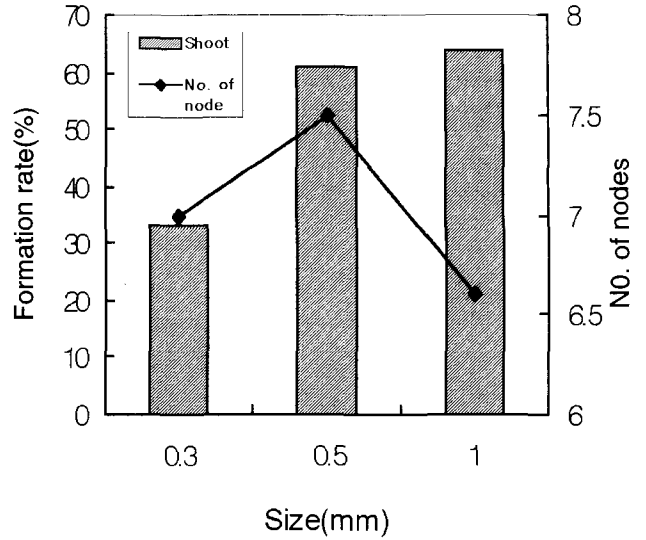


Figure 4. Effect of different size of apical meristem explants of sweet potato (cv. 'Sanchunza') on medium with 4.0 mg/L kinetin.

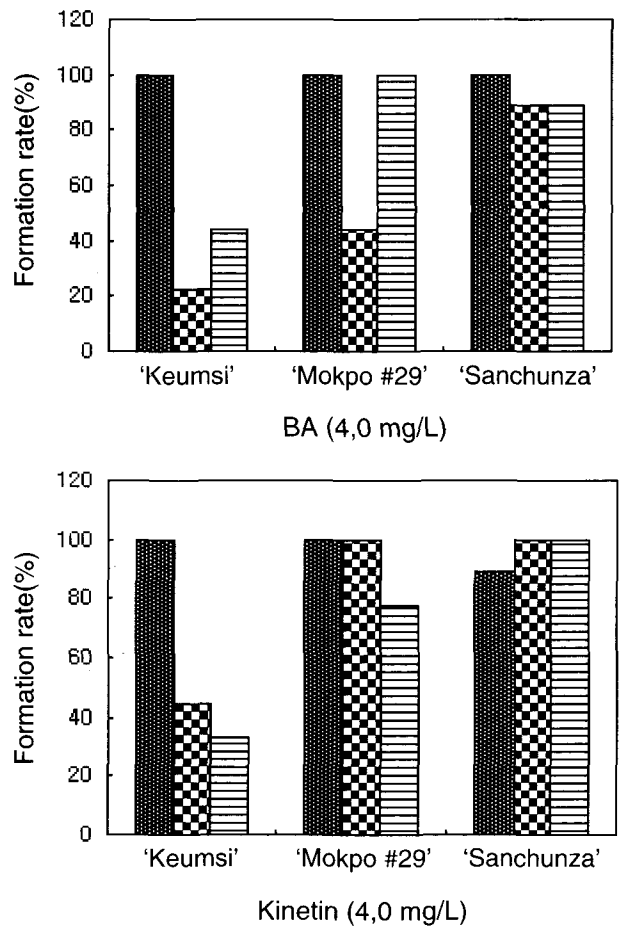


Figure 5. Root and multiple shoots formation from excised shoot (three cultivars: 'Keumsi'; 'Mokpo#29'; 'Sanchunza'). ■ Callus ▨ Shoot ▩ Root ▪ Multiple shoot.

결과는 0.5 mm보다 0.3 mm에서 7.0개로 오히려 마디신장이 양호하였던 점에서 일단 shoot가 분화될 때까지는 크기의 영

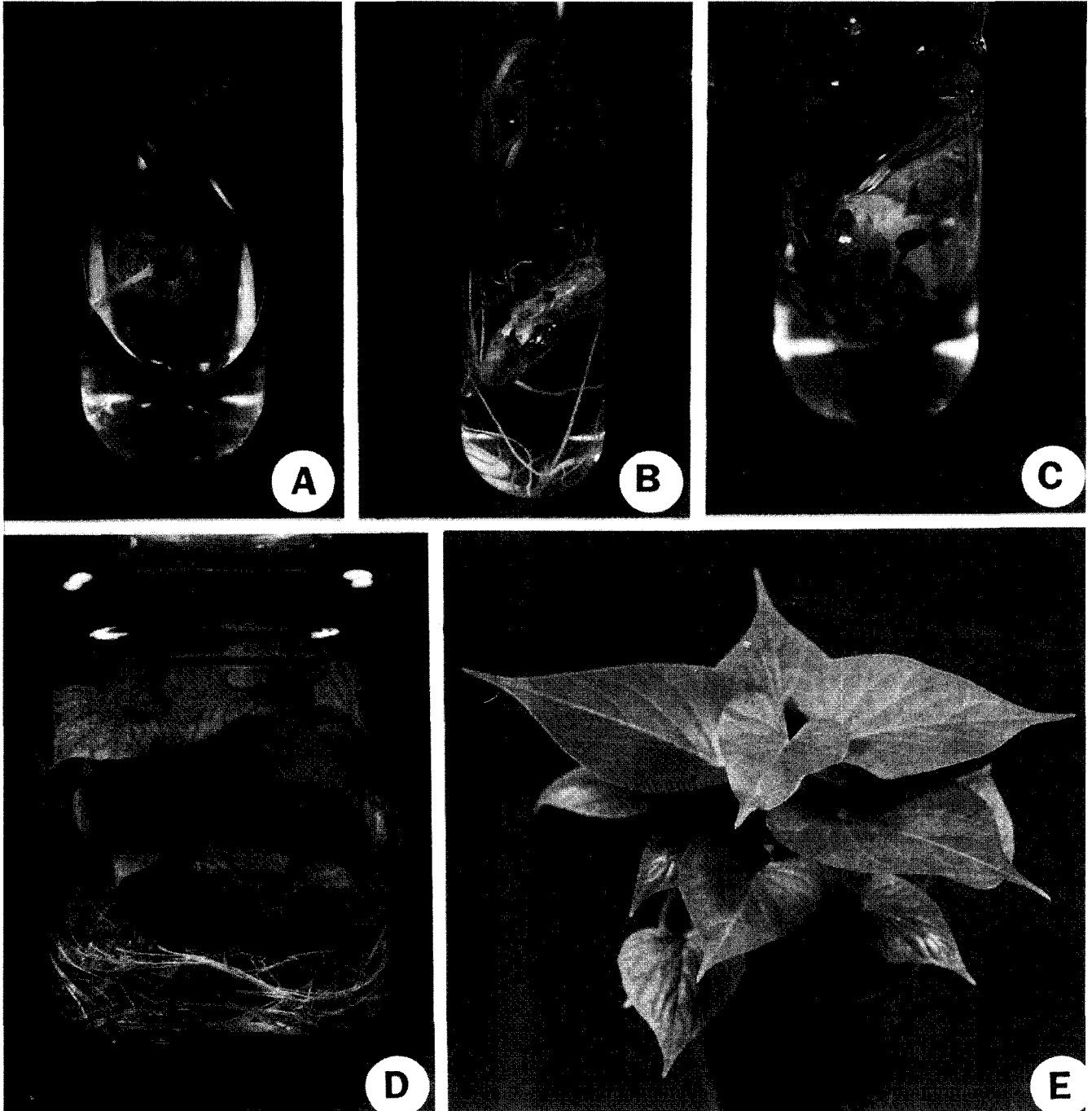


Figure 6. Plantlet regenerated from shoot excised in the cultivar 'Mokpo#29'. A, B: Plantlets regenerated after rooting from shoot after 14 days of subculture, C: A lot of multiple shoot formation from a explant after 30 days of culture, D: Plantlet regenerated with well-developed roots after 60 days of culture, E: Plants transplanted in pot.

향을 받지만 배양기간이 길어질수록 식물체의 성장속도에는 큰 차이가 없는 것으로 보였다.

Shoot로부터 多芽體 유도

Cytokinin류 단용처리구에서 캘러스와 함께 분화된 shoot 가 1~2마디로 성장되었을 때 분할하여 多芽體 및 뿌리발생을 위하여 4.0 mg/L BA 또는 kinetin 배지에 배양하였다

(Figure 5).

이들 shoot는 주로 치상당시 절편체가 캘러스화되어 shoot만 분화되고 뿌리발생이 없는 것만을 선별하였는데 계대배양 2~3일경부터 shoot 절단면에서 캘러스발생과 더불어 대부분 뿌리가 발생되기 시작하였으며 (Figure 6A, B), '산천자'와 '목포29호'의 경우 정단분열조직에 부착된 葉原基가 성장되어 shoot분화가 이루어진 후 shoot기부 부분에서 다수의 多芽體를 형성하였으나 (Figure 6C) '금시' 품종에서는 多芽體

분화율이 대단히 저조하였다. 이들 shoot는 생장속도가 상당히 빨라서 배양 30일경에는 7~8마디까지 신장되기도 하였는데 캘러스에서 분리한 shoot를 계대배양하였을 때 절단면이 약간 캘러스화되기도 하였으나 대부분 정상적인 식물체로 재분화되어 pot에 이식이 가능하였으며 pot이식 후 30일 후에는 포장에 이식할 정도로 성장되었다 (Figure 6D, E).

고구마의 정단분열조직을 배양재료로 이용하여 생장조절제의 종류와 농도조성에 따라 체세포배를 발생시킨 후 식물체 재분화를 유도하거나 (Min et al. 1994) 직접 多芽體를 유도하여 無病苗를 육성하고 있다 (Ichi 1991). 체세포배 발생을 통한 식물체 재분화에 대한 실험에서 Liu와 Cantliffe (1984)는 2,4-D 2.0 mg/L 이상의 처리구에서는 배발생적 캘러스 발생이 없었고 0.5~2.0 mg/L 2,4-D 처리구에서 배발생이 이루어졌다고 하였으며, Jarret 등 (1984)은 3.0 mg/L 2,4-D 처리구에서 체세포배를 유도시킨 후 식물체 재분화가 가능하다고 하여 고구마의 정단분열조직을 통한 체세포배 발생에 적절한 생장조절제의 종류와 농도는 주로 저농도의 auxin류가 양호하였다.

본 실험을 수행하기 전 '목포 29호', '산천자' 및 '금시' 품종에서 0.1과 0.3 mg/L 2,4-D를 단독처리하여 정단분열조직을 배양하였는데 배양 60일까지 배발생적 캘러스에서 다수의 胚가 발생되었다. 이들 배발생적 캘러스를 생장조절제 무처리의 액체 또는 고체배지에서 배양하여 정상적인 胚의 발아를 시도하였는데 이들 胚에서 정상적인 발아과정을 관찰할 수 없었다. 필자 등은 계속해서 체세포배에서 식물체 재분화에 대한 실험을 수행하고 있지만 앞서 여러 연구자들의 연구 결과와는 달리 정단분열조직을 배양하여 체세포배를 유도한 후 정상적인 식물체를 재분화시키는 데에는 많은 문제점이 있었기 때문에 체세포배를 통한 대량증식에는 어떤 성적을 제시하기가 곤란하였다. 이것은 고구마의 체세포배를 통한 식물체 재분화에 성공한 연구에서 사용한 품종과 다른 품종을 사용한 것이 원인이기도 하겠지만 고구마의 정단분열조직을 통한 대량증식에는 생장조절제의 종류 및 농도에 크게 영향을 미치는 바 본 실험에서는 정단분열조직을 배양하여 無病株를 대량으로 증식시키기 위해서는 BA나 kinetin을 단독처리하여 shoot를 생육시키는 것이 훨씬 효과적이었다.

Alconero 등 (1975)은 kinetin과 NAA 혼용처리의 경우 배양 50일까지 캘러스만 유도되었을 뿐 정단분열조직의 생장은 이루어지지 않았지만 IAA와의 혼용첨가에서는 배양 50일 안에 재분화된 식물체의 생산이 가능하였는데 이때 첨가되는 농도에 따라 정상식물체와 비정상 식물체로 성장되었으며 5.0 mg/L kinetin과 2.0 mg/L IAA 혼용처리에서 배양한 모든 품종에서 비정상개체의 출현이 가장 많았고 2.0 mg/L kinetin과 1.0 mg/L IAA 혼용처리구에서 가장 적었다고 하여 적정 농도의 첨가는 정상식물체의 생산에 중요한 역할을 하였다.

Ichi (1991)는 정단분열조직을 0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0

mg/L BA 혼용처리구에 배양하여 약 2개월간 莖葉分化를 시킨 후 분화된 莖葉에서 발근시켜 약 3~4개월 후에는 이식 가능한 식물체로 재분화되었고 이들 배양한 식물체는 무균적으로 우량계통을 보존하기 위하여 또는 조직배양에 의한 대량증식을 위하여 일부를 시험관내에서 보존하는 경우 7~8절로 분화된 식물체의 上部 2~3절을 새로운 배지에 이식하여 器內保存할 수 있다고 하였다.

본 실험에서도 정단분열조직을 0.1~0.5 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리에서 배양하였을 때 0.1 mg/L NAA와 BA 혼용처리구에서만 식물체를 재분화시킬 수 있었는데 多芽體로의 증식은 없고 1개의 절편체에서 1개의 식물체가 분화되었다. 그러나 0.5 mg/L NAA와 BA의 혼용처리구에서는 주로 캘러스만 유도되었고 캘러스에서 기관분화는 관찰되지 않아 NAA의 농도는 shoot분화에 크게 영향을 주는 것으로 나타나 생장조절제의 종류와 농도의 조성은 고구마의 정단분열조직배양에서 대단히 중요한 요인으로 작용하였다.

Litz와 Conover (1978)는 2가지 품종의 정단분열조직을 배양하였을 때 모두 배양 2~3일안에 절단면에서 캘러스가 발생되어 증식되고 과도한 캘러스 증식을 억제하기 위하여 배지에 활성탄 10 mg/L를 첨가하여 배양하였는데, 'White Star'가 'PI 315343'보다 캘러스 발생률이 낮았으며 1.0 mg/L BA 처리구에서 shoot가 분화되었다. 'White Star'는 IAA 첨가배지에서 캘러스 형성률이 높게 나타나 품종에 따라서 반응양상은 다르다고 하였다. 또한 shoot분화가 이루어지기 전 배양 2~3주 동안은 캘러스가 계속 유도되었으나 배양 5주 후에는 분화된 shoot가 생장되어 1개의 절편당 'White Star'의 경우 8.5개, 'PI 315343'은 5.1개로 품종에 따라 달랐다.

이것은 본 실험의 cytokinin류 단독처리와 같은 결과로 모든 처리구에서 캘러스가 먼저 유도된 후 배양 60일 후에는 대부분 shoot증식이 이루어졌는데, BA 단독처리가 多芽體增殖에 있어서 다른 생장조절제보다 효과적이었고 kinetin은 shoot 및 뿌리발생이 양호하여 재분화된 식물체의 생장속도가 빨랐다. 그러나 TDZ 처리구는 캘러스가 주로 증식되었고 분화된 shoot는 비정상적으로 비대되어 부적당하였다. 품종별로는 '목포 29호'와 '산천자'는 비슷한 결과였으나 '금시'의 경우 shoot분화율이 낮은 편으로 품종에 따라 약간의 차이를 보였다.

이와 같이 정단분열조직배양을 통한 우량종묘의 생산기술이 확립된다면 우량한 培養母株를 선정하여 정단분열조직을 배양한 후 분할배양함으로써 시험관내에서 증식 및 보존하는 일련의 과정을 실시하고 재분화된 식물체는 이식 후 virus 검정을 행한 후 계통선발을 하는 우량종묘 육성방법이 확립될 수 있다고 본다.

적 요

고구마의 정단분열조직을 배양하여 성장조절제의 종류와 농도 및 정단분열조직의 크기에 따른 多芽體 증식효과를 조사하였다. NAA와 BA 혼용처리의 경우 0.1 mg/L NAA에 2.0 mg/L BA 혼용처리에서 '목포 29호'와 '산천자'의 경우 배양 30일 후에 100% shoot 분화율을 보였고, 뿌리발생률은 '목포 29호'는 66.7%, '산천자'는 69.2%였으며 줄기의 기부 부분에서 형성되었다. Cytokinin류인 kinetin과 BA 0.5~4.0 mg/L 단독처리에서 多芽體 분화율이 좋았으며 발달된 shoot의 대부분은 배양 60일 이내에 뿌리발생과 더불어 정상적인 식물체로 재분화되었다. 반면에 '금시'에서는 cytokinin류 단독처리에서 분화된 shoot가 캘러스화되어 정상적인 shoot를 생산하지 못하였다. 캘러스로 덮인 多芽體의 shoot가 1~2마디로 신장된 shoot를 분리하여 4.0 mg/L BA 또는 kinetin 처리구에 계대배양하였을 때, 분화된 shoot의 대부분이 줄기의 기부에 캘러스가 형성되면서 계대배양 30일 후에는 정상적인 shoot와 뿌리를 가진 再分化된 식물체의 생산이 가능하였다.

인용문헌

- Alconero R, Santiago AG, Morales F, Rodriguez F (1975) Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology* **65**:769-773
- Ichi K (1991) Production and propagation of high quality seedling in sweet potato. *Bio Hort* **4**:103-108
- Jarret RL, Salazar S, Fernandez Z (1984) Somatic embryogenesis in sweet potato. *HortSci* **19**:397-398
- Litz RE, Conover RA (1978) *In vitro* propagation of sweet potato. *HortSci* **13**:659-660
- Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Impomea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep* **3**:112-115
- Min SR, Liu JR, Rho TH, Kim CH, Ju JI (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of Korean cultivar sweet potatoes. *Kor J Plant Tiss Cult* **21**:157-160
- Mori K (1971) Production of virus-free plant by means of meristem culture. *Jap Agri Res Q* **6**:1-7
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-479

(접수일자 1998년 10월 9일)