

체세포배발생을 통한 국내 주요 고구마 품종의 식물체 재분화

권은정^{1,3} · 권석윤² · 김문자³ · 안영섭⁴ · 이준설⁴ · 정병춘⁴ · 곽상수² · 이형순^{1*}

¹한국생명공학연구원 식물세포공학연구실, ²환경생명공학연구실, ³목원대학교 생명과학과, ⁴호남농업시험장 목포시험장

Plant Regeneration of Major Cultivars of Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) in Korea via Somatic Embryogenesis

KWON, Eun-Jeong^{1,3} · KWON, Suk-Yoon² · KIM, Moon Za³ · LEE, Joon-Seol⁴ · AHN, Young-Sup⁴ ·
JEONG, Byeong-Choon⁴ · KWAK, Sang-Soo² · LEE, Haeng-Soon^{1*}

¹Laboratory of Plant Cell Biotechnology,

²Laboratory of Environmental Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yusong, Daejeon 305-806, Korea

³Department of Life Science, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea

⁴Mokpo Experiment Station/RDA, Muan, Jeollanamdo 534-833, Korea

ABSTRACT An efficient plant regeneration system of major cultivars of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) in Korea via somatic embryogenesis was established. Embryogenic calli were formed from shoot apical meristems of sweetpotato cultivars when cultured on LS medium supplemented with 1 mg/L auxin (2,4-D, picloram, dicamba). Among three kinds of auxin, 1 mg/L 2,4-D showed the highest embryogenic calli induction rate. After 4 weeks of cultures on LS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D, embryogenic calli induction rates of Sinhwangmi, Zami, Yulmi, and White Star were 86%, 78%, 76%, and 80%, respectively. Upon transfer onto LS basal medium, most of somatic embryos developed into plantlets. Regenerated plantlets were transplanted to potting soil and grown to mature plants in a greenhouse.

Key words : Embryogenic callus, shoot apical meristem, somatic embryo

서 론

고구마 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)는 세계 7대 식량작물로 특히 아시아에서는 탄수화물의 중요한 공급원일 뿐만 아니라 메탄이나 에탄올 등의 연료 생산에 있어서 주요한 대체 에너지원으로 이용되고 있다. 그러나 고구마는 6배체 영양번식 작물로 유전적으로 복잡하고 종자 형성이 극히 불량하여 재래적인 육종방법으로는 품종개량을 기대하기 어렵다. 따라서 무병주의 확보뿐만 아니라 재래육종 한계를 극복하기 위한 분자육종을 위해서는 식물체 재분화 및 형질전환기술 확

립이 매우 중요하다.

고구마의 조직배양은 작물의 중요도에 비해 매우 한정된 품종에서 이루어져 왔으나 식물체 재분화는 기관발생을 통한 경우보다는 주로 체세포배발생에 의한 결과가 주로 보고되었다. 즉, 약 (Tsay and Tseng 1979), 잎, 줄기, 뿌리 (Liu and Cantliffe 1984), 엽병 (Liu and Cantliffe 1985), 측아 (Tang et al. 1993; Cavalcante Alves et al. 1994; Desamero et al. 1994; Al-Mazrooei et al. 1997) 및 정단분열조직 (Jarret et al. 1984; Liu and Cantliffe 1984; Chee and Cantliffe 1988a, 1988b; Chee and Cantliffe 1989; Liu et al. 1989; Min et al. 1994; Otani and Shimada 1996) 배양으로부터 배발생 캘러스와 체세포배가 유도되었다. 그러나 대부분의 조직에서는 아주 낮은 빈도로 체세포배가 유도되었으며 사료용인 화이트

스타 (White star) 품종의 정단분열조직에서는 90% 정도의 높은 배발생 캘러스가 유도된 바 있다 (Cantliffe et al. 1987; Liu et al. 1989). 그러나 고구마의 체세포배발생에 의한 식물체 재분화는 소수의 품종에 한정되어 있어 형질전환 (Prakash and Varadarajan 1992; Newell et al. 1995), 대량증식 (Zheng et al. 1996) 및 유전형질 보존 등에 매우 유용한 기술로 이용되기 위해서는 보다 심도있는 연구가 요구된다.

급속한 인구증가와 산업화에 의해 초래되고 있는 환경문제는 식량문제, 에너지문제 등에 영향을 주고 있다. 고구마는 모든 부위를 이용할 수 있는 작물로서 척박한 토양에 적합한 구황작물뿐 아니라 산업용 식물로서 각광받을 수 있는 21세기형 작물로 평가된다. 따라서 분자유종을 통한 재해내성 형질전환 고구마 등 신기능성 고구마 개발이 요구된다. 이를 위해서는 우선적으로 효율적인 식물체 재분화 체계가 구축되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 국내 주요 고구마 품종인 '자미', '올미', '신황미'를 대상으로 정단 및 측아 분열조직 배양에 의한 배발생 캘러스 유도 및 체세포배발생을 통한 고빈도 식물체 재분화 체계를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

온실에서 재배되고 있는 고구마 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.: 품종: 올미, 신황미, 자미, 화이트 스타]의 정단 혹은 측지를 1 cm 정도 채취하여 100 μ L Tween 20이 첨가된 0.5% 차아염소산나트륨 용액에 15분간 침지한 후 멸균수로 3회 이상 수세하였다. 해부현미경하에서 어린 잎과 엽원기를 제거하고 한 개의 엽원기를 포함한 높이 약 150 μ m, 지름 약 350 μ m의 정단분열조직 및 측아의 분열조직을 적출하여 잘린 면이 배지에 닿도록 치상하였다 (Min et al. 1994).

배발생 캘러스 유도

배발생 캘러스 유도는 Murashige와 Skoog (MS, 1962) 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 30 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite가 들어가 있는 Linsmaier와 Skoog (LS, 1965) 기본배지에 1 mg/L auxin을 첨가한 배지를 사용하였다. 세종류의 auxin (2,4-D, picloram, dicamba)를 1 mg/L씩 배지에 첨가한 후 각 배지의 pH를 5.8로 조정해서 87×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하여 사용하였다.

배발생 캘러스 유도배지에 분열조직을 페트리디쉬 당 10개씩 치상하여 5반복 수행하였다. 배양은 25°C 암소에서 실시하였으며 배양 4주째에 배발생 캘러스의 형성율을 해부현미경하에서 관찰하여 백분율로 나타내었다.

체세포배발생 및 식물체 재분화

2,4-D 함유 배지에서 유도된 배발생 캘러스로부터 체세포 배를 유도하기 위하여 LS 기본배지에 0.1 mg/L 2,4-D, 15 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite 배지로 옮긴 후 14일 정도 배양한 후에 2,4-D를 제거한 배지에 계속 배양하였다. 호르몬이 없는 배지에서 발달한 소식물체는 포트 (Vitro Vent Containers, Duchefa)에 옮겨 배양하였다. 소식물체의 배양은 무기염 성분을 반으로 줄인 1/2 LS 기본배지에 30 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite를 첨가한 배지를 사용하였다.

성숙한 체세포배를 식물체로 전환하여 화분으로 옮기기까지는 27°C, 약 40 μ mol · m⁻² · sec⁻¹의 cool-white 형광, 광주기 16시간 조건에서 배양하였다. 순화하여 화분으로 옮겨진 식물체는 온실에서 키웠다.

결과 및 고찰

자미, 올미, 신황미, 및 화이트 스타의 분열조직, 즉 성장점은 1 mg/L auxin (2,4-D, picloram, dicamba)가 각각 첨가된 배지에서 전반적으로 비슷한 발달 양상을 나타내었다. 즉, 배양 2주 후 성장점은 처음보다 2배 이상 부피가 커졌고 3주 후부터는 배발생 캘러스 및 초기 구상형 단계의 체세포배가 성장점 표면에 형성되었다 (Figure 1). 배양 4주 후에 배발생 캘러스의 형성률을 조사한 결과 실험에 사용한 4품종 모두 2,4-D 첨가 배지에서 가장 높은 빈도로 배발생 캘러스가 유도되었으며 신황미, 올미, 자미, 및 화이트 스타의 경우 86%, 76%, 78% 및 80%의 빈도를 나타내었다 (Table 1). 반면, picloram과 dicamba의 경우 전반적으로 낮은 빈도의 배발생 캘러스 유도율을 보였으며 특히 올미에서 가장 낮게 나타났다. 본 연구결과는 2,4-D 첨가배지에서 6주 배양으로 90% 정도의 유도율을 보인 화이트 스타 혹은 올미 (Liu et al. 1989; Min et al. 1994)에서 보다 약간 낮았지만 이것은 4주 동안 배양하여 얻은 결과에 기인한 것으로 생각되며 1~2 주 더 배양한 후에는 거의 비슷한 수준의 배발생 캘러스 유도율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 1 mg/L auxin이 첨가된 배지에서는 배발생 캘러스

Table 1. Frequency (%) of embryogenic callus formation from shoot apical meristem explants of sweetpotato cultured on LS medium with 1mg/L auxin*.

Cultivar	Auxin (1 mg/L)		
	2,4-D	Picloram	Dicamba
Zami	78±0.4	20±1.8	22±1.6
Ymlmi	76±1.7	18±3.0	16±1.1
Sinhwangmi	86±3.0	25±1.2	53±1.2
White star	80±0.7	62±2.4	34±3.2

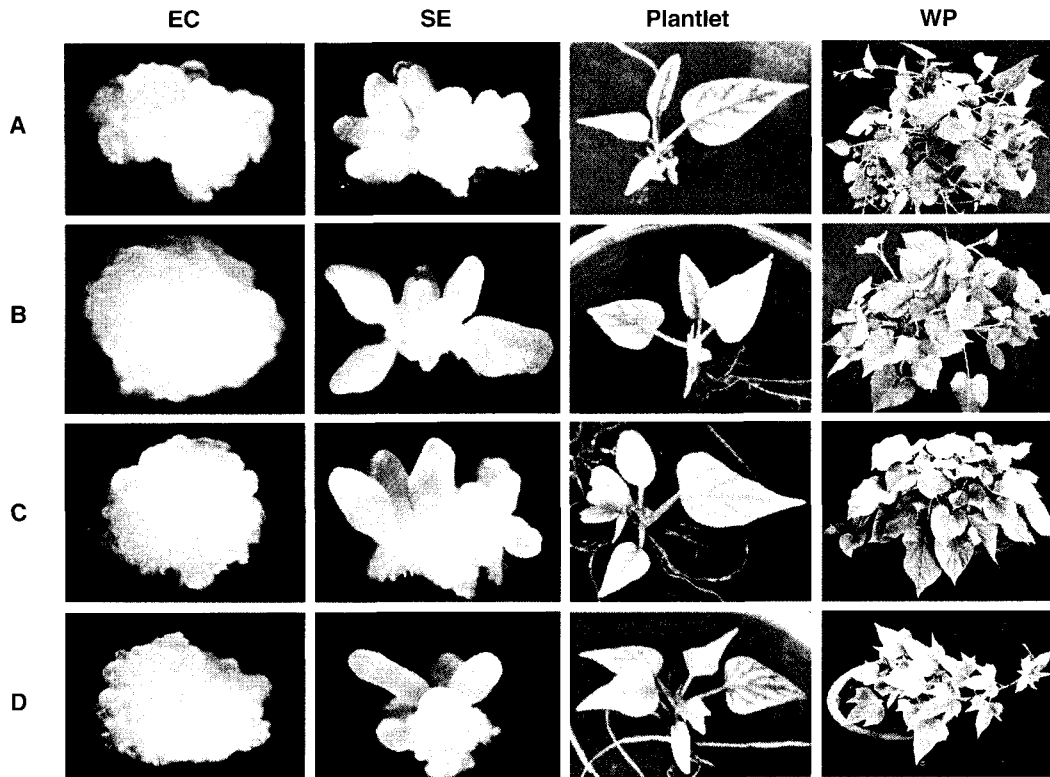


Figure 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus in shoot apical meristem cultures of sweetpotato. A: Zami, B: Yulmi, C: Sinwhangmi, D: White star. EC: embryogenic callus derived from excised shoot apical meristem cultures. SE: somatic embryos from embryogenic callus. Plantlet: developed from somatic embryo. WP: whole plants grown in a pot under green house.

이외에 비배발생 캘러스도 함께 유도되었다 (결과 미제시). 일반적으로 비배발생 캘러스의 생장이 배발생 캘러스에 비해 빠르기 때문에 계대배양시에 항상 두 종류의 캘러스를 따로 분리해 주어야 배발생 캘러스만을 유지하는 데 효과적이다. 하지만 울미의 경우 세 종류의 auxin 배지에서 배발생 캘러스만이 유도되었다.

세 종류 auxin 첨가배지에서 형성된 배발생 캘러스는 거의 비슷한 형태를 보였지만 2,4-D 배지에서 유도된 캘러스는 단단하면서 크기가 다소 작은 특징을 보였으며, picloram 및 dicamba가 첨가된 배지에서 형성된 배발생 캘러스보다 생장속도가 느렸다. 한편, 배양중인 생장점은 도중에 갈변되어 생존하지 못하는 것들이 있었는데 모든 품종에서 2,4-D에 비해 picloram과 dicamba 첨가 배지에서 이러한 현상이 두드러졌다 (결과 미제시). 이러한 현상은 생장점 적출과정에서 탈수되었거나 상처를 입었기 때문으로 사료된다 (Min et al. 1994).

배발생 캘러스로부터 체세포배발생을 유도하기 위한 실험에서는 유도율이 높았던 2,4-D 첨가 배지에서 형성된 배발생 캘러스를 이용하였다. 4종류 품종의 배발생 캘러스를 먼저 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지로 옮겨 14일 동안 배양한 후 다시 2,4-D를 제거한 배지에 계속 배양하였다. 그 결과 4품종 모두에서 배발생 캘러스로의 90% 이상이 체세포배로 발달되었으며 완전한 소식물체로 발달하였다 (Figure 1).

배발생 캘러스로부터 체세포배 유도를 위해 사용한 2,4-D를 제거해 주는 것이 일반적으로 사용되는 방법이다. 그 외에 낮은 농도의 kinetin을 첨가해 주거나 (Min et al. 1994) 혹은 ABA 및 GA를 첨가해 주기도 한다 (Otani et al. 1998). 이와는 달리 본 연구에서는 2,4-D의 농도를 낮춰 준 후 완전히 제거함으로써 효과적으로 체세포배를 유도할 수 있었다. 식물생장조절제를 제거한 배지에서 체세포배의 90% 정도는 shoot과 뿌리가 발달한 소식물체로 전환하였으며 4~5개 이상의 본엽이 자랐을 때 무균처리한 포트에 옮겨 배양실에서 순화시켰다. 약 2주 동안의 순화과정을 거친 소식물체는 100% 토양착륙을 나타내었으며 온실에서 정상적으로 식물체로 성장하였다 (Figure 1). 그러나 고구마의 경우 체세포배로부터 발달한 소식물체가 순화처리를 거치지 않고서도 성숙한 식물체로 성장하였다 (Min et al. 1994).

본 연구에 사용된 고구마 품종은 식용, 산업용, 사료용으로 중요한 품종을 선택한 것이다. 자미는 안토시아닌을 많이 함유하고 있어서 염색약의 원료인 산업용이며, 울미와 신허미는 식용으로 이용되고, 화이트 스타는 사료용이다. 고구마는 비교적 다른 작물에 비해 환경 스트레스에 강한 편이지만 따뜻한 지역에서 재배되는 관계로 저온에 약하다. 또한 최근 들어 심각하게 나빠지는 환경에 대비하여 복합스트레스에 저항성을 가지는 고구마 품종을 개발할 필요가 대두되었다. 따라서 고염, 건조, 저온 스트레스 등의 복합 스트레스에 저항성을 지닌

품종을 개발하기 위해서는 국내 주요 품종을 대상으로 확립된 고빈도의 식물체 재분화 방법이 형질전환 식물체 개발에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

적 요

4종류 고구마 품종을 대상으로 정단분열조직 배양에 의한 배발생 캘러스 유도, 이들로부터 고빈도의 체세포배발생과 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 자미, 울미, 신황미, 및 화이트 스타의 생장점을 LS 기본배지에 1 mg/L auxin (2,4-D, picloram, dicamba)가 첨가된 배지에서 배양하였다. 그 결과 2,4-D 첨가 배지에서 가장 높은 빈도로 배발생 캘러스가 유도되었으며, 배양 4주째에 유도된 배발생 캘러스의 빈도는 신황미, 자미, 울미, 및 화이트 스타에서 86%, 78%, 76%, 및 80%를 각각 나타내었다. 2,4-D 첨가 배지에서 얻어진 배발생 캘러스를 2,4-D를 제거한 배지로 옮겨 주어 체세포배를 유도하였으며, 이 체세포배의 90% 이상이 완전한 식물체로 발달하였다. 이러한 결과는 정단분열조직 배양으로부터의 체세포배 발생 방법이 광범위한 고구마 품종에 적용될 수 있을 뿐만 아니라 분자육종을 통한 신기능성 고구마 품종개발에 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사사 - 본 연구는 바이오그린 21사업 연구비 지원(ABC 0050211)의 연구결과이다.

인용문헌

- Al-Mazrooei S, Bhatti MH, Henshaw GG, Taylor NJ, Blakesley D (1997) Optimization of somatic embryogenesis in fourteen cultivars of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). Plant Cell Rep 16:710-714
- Cantliffe DJ, Liu JR, Schultheis JR (1987) Development of artificial seeds of sweetpotato for clonal propagation through somatic embryogenesis. In : Smith WH Smith, Frand JR, (eds), Methane from Biomass: A Systems Approach, Elsevier Applied Sci, New York, PP 183-195
- Cavalcante Alves JM, Sihachaker D, Allot M, Tizroute S, Mussio I, Servaes A, Ducreux G (1994) Isoenzyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Plant Cell Rep 13:437-441
- Chee RP, Cantliffe DJ (1988a) Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. In Vitro Cell Dev Biol 24:955-958
- Chee RP, Cantliffe DJ (1988b) Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 15:149-159
- Chee RP and Cantliffe DJ (1989) Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir and production of individualized embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult 17:39-52
- Desamero NV, Rhodes BB, Decoteau DR, Bridges WC (1994) Picolinic acid-induced direct somatic embryogenesis in sweetpotato. Plant Cell Tissue Organ Cult 37:103-111
- Jarret RL, Salazar S, Fernandez AR (1984) Somatic embryogenesis in sweetpotato. HortScience 19:397-398
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. Physiol Plant 18:100-127
- Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweetpotato (*Ipomoea batatas* Poir). Plant Cell Rep 3:112-115
- Liu JR, Cantliffe DJ (1985) Tissue culture propagation development and its application to energy crops. Proceeding of 1984 International Gas Research Conference pp 622-629
- Liu JR, Cantliffe DJ, Simonds SC, Ruan JF (1989) High frequency somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem domes of sweetpotato (*Ipomoea batatas*). SABRAO J 21:93-101
- Min SR, Liu JR, Rho TH, Kim CH, Ju JI (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of Korean cultivar sweetpotato. Korean J Plant Tissue Cult 21:157-160
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Newell CA, Lowe JM, Merrywether A, Rooke LM, Hamilton WDO (1995) Transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. Plant Sci 107:215-227
- Otani M, Shimada T (1996) Efficient embryogenic callus formation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnol 15:11-16
- Prakash CS, Varadarajan U (1992) Genetic transformation of sweetpotato by particle bombardment. Plant Cell Rep 11:53-57
- Tang F, Li K, Lan L, Zhang Q (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration in sweetpotato. Acta Agro Sinica 19:372-375
- Tsay HS, Tseng MT (1979) Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweetpotato. Bot Bull Acad Sinica 20:117-122
- Zheng Q, Dessai AP, Prakash CS (1996) Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 15:381-385