

자색고구마의 잎 조직배양을 통한 식물체 재생

박혜정, 안영섭¹, 정병춘¹, 박현용*

조선대학교 자연과학대학 생물학과, ¹호남농업시험장 목포시험장

Plant Regeneration Derived from Leaf Disk Cultures in Purple Sweetpotato

Hyae-Jeong Park, Young-Sup Ahn¹, Byeong-Choon Jeong¹, Hyeon-Yong Park*

Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

¹Mokpo Experimental Station, Rural Development Administration, Jeollanamdo 534-833, Korea

ABSTRACT This study was carried out to establish a regeneration system from leaf explant of purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). The optimal concentrations of plant growth regulators for callus induction and shoot formation were determined. The optimal combination for callus formation was 1 μM 2,4-D and 5 μM BA, and highest yield of embryogenic calli were observed on Murashige and Skoog basal medium containing 0.5 μM 2,4-D under light condition after 4 weeks of culture. Embryogenic callus was subcultured on medium supplemented with 5 μM ABA for 4 days. Subsequently, regeneration of adventitious shoots occurred when these embryogenic calli were transferred onto medium with 3-6 μM gibberellic acid. Regenerated shoots were developed into normal plantlets.

Key words: Leaf disk, plant regeneration, purple sweetpotato

서 론

중앙 아메리카의 열대지방이 원산지인 고구마 (*Ipomoea batatas* L.)는 메꽃과에 속하는 포복성 줄기의 초본식물로서 영양소를 괴근의 형태로 저장한다 (Dodds et al. 1991). 감자, 카사바 등과 함께 단위 면적당 높은 수확량을 갖는 열량원으로서, 열악한 환경조건하에서 잘 생육하는 특성 등에 의해 개발도상국에서 주요 식량작물로 재배되고 있다 (Phuc et al. 2001). 고구마의 품종 가운데 진한 보라색 수용성 색소인 안토시아닌을 다량 함유한 자색고구마의 품종들을 목포시험장에서부터 개발하여 생산체계와 응용성 등에 대하여 많은 노력을 기울이고 있다. 자색고구마에 함유한 안토시아닌은 다른 식물에 비교하여 괴근의 육질전체에 많이 함유하고 있는 특성을 갖는다 (Fuleki and Francis 1968). 식물에서 가장 널리 분포하는 수용성 색소성분인 안토시아닌은 항산화기능, 항균작용, 간보호기능, 항고혈압기능 (Yoshimoto 2001) 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 그 응용성에 대하여 또한

많은 관심이 부각되고 있다. 이와 같은 관심과 함께 최근 조직배양을 기반으로 하는 생명공학 기술을 통해 안토시아닌, 시코닌, 베타시아닌등 이차대사산물을 대량생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Dicosmo and Misawa 1995). 특히 고구마는 개화가 매우 늦게 이루어지고 주로 영양번식이 이루어지기 때문에 타 작물에 비교하여 조직배양이나 형질전환의 기법에 의한 육종이 요구되는 작물이다.

조직배양을 기초로 한 많은 연구가 여러 작물에서 이루어지고 있지만 고구마의 품종육종에 대한 연구는 타 작물에 비교하여 매우 열악한 것으로 나타나고 있다. 조직배양을 이용한 고구마의 식물체 재분화에 관한 연구는 주로 정단분열조직 (Liu et al. 1989; Otani and Shimada 1996)을 배양하여 이루어졌으며, 그 밖에 엽병 (Liu and Cantliffe 1984) 및 원형질체 (Otani et al. 1987) 등의 배양을 통해 이루어졌다. 그러나 정단분열조직을 이용한 방법을 제외한 대부분의 연구 보고에서 아주 낮은 빈도로 체세포배가 유도되었으며, 또한 매우 낮은 재분화율과 동일한 결과를 재현하기 어려운 것으로 나타나고 있다 (Prakash and Varadarajan 1992; Newel et al. 1995). 따라서, 보다 효과적이고 일반화될 수 있는 조직배양방법의 개발과 이를 이용한 형질전환 등의 기초적 연구가 요구된다. 특히

*Corresponding author Tel 062-230-6652 Fax 062-230-6652

E-mail hypark@chosun.ac.kr

자색고구마의 경우는 Kwon 등 (2002)에 의해 정단분열조직 배양이 보고되었을 뿐 극히 미비한 상태이다. 따라서 국내 자색고구마의 기내배양 방법을 위한 기초연구로서 잎 조직으로부터 효과적인 캘러스의 형성 및 식물체의 재분화 시스템을 유도하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

재료식물은 호남농업시험장 목포시험장에서 공급받은 자색고구마의 계통 IT310의 괴근을 실험에 이용하였다. 잎 조직은 공급받은 괴근을 화분에서 성장시킨 후, 식물체의 정단으로부터 3~4번째 잎이 약 4 cm로 성장하면 채취하여 70% ethanol에 1분, 2% Sodium hypochlorite 용액에 5분간 표면살균하고 멸균수로 3회 세척하여 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 무균 마디배양을 실행하였다. 마디배양에서 식물체가 10 cm 정도로 성장하면 잎을 채취하여 배양에 이용하였다.

캘러스 유도

잎조직으로부터 캘러스의 유도는 무균조건에서 성장하고 있는 자색고구마의 3~5마디의 잎을 채취하여 주맥을 제거하고 5 mm×5 mm 크기로 잘라 캘러스 유도배지에 치상하였다. 캘러스 유도배지는 MS 기본배지에 3% sucrose, 0.3% phytigel, 0.1% myo-inositol을 첨가하고 pH 5.8로 조정된 고체배지를 사용하였으며, 배양조건은 26/20°C, 16/8 hr (day/night), 6000 lux의 광조건으로 하였다. 성장조절제는 0, 1, 10, 100 μM 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50 μM 6-benzylaminopurine (BA)를 조합 처리한 후, 자색고구마 잎 절편 (5 mm×5 mm)을 petri dish (60 mm×10 mm)에 3개씩 치상하여 4반복 실시하였다. 배양 4주 후 캘러스 형성, 발근률과 배발생률을 조사하였다. 배발생 캘러스는 0.5, 1, 1.5 μM 2,4-D를 첨가한 배지에 상광 (6000 lux), 약광 (3000 lux), 암의 3가지 조건에서 유도하였으며, 배양 4주 후에 배발생 캘러스의 형성률을 관찰하였다.

식물체 재생

식물체 재생은 0.5 μM 2,4-D가 첨가된 배지에서 배양 3~4주 후에 생성된 배발생 캘러스로부터 유도하였다. 배발생 캘러스를 1, 3, 5 μM abscisic acid (ABA)를 첨가한 MS 배지에서 4, 12, 24일 배양한 후, 3, 6, 9 μM GA₃가 첨가된 새로운 배지에 계대배양 하였다. 배발생 캘러스로부터 소식물체가 출현하여 2 cm 정도 성장하면, 식물체를 분리하여 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 배지에 옮겨 발근을 유도하였다. 식물체는 1/2 MS배지에서 성장시킨 후, 5 cm 크기로 성장하면 식물체를

화분으로 옮겨 정상적인 식물체로 성장시켰다.

결과 및 고찰

캘러스 유도

잎 절편체를 0~50 μM BA와 0~100 μM 2,4-D를 혼용 처리한 MS배지상에서 4주간 배양한 결과는 Figure 1에서 보는 바와 같다. 잎 절편체를 배지에 치상한 후, 빛 조건과 관계없이 4~5일 후부터 캘러스의 형성이 시작되었다. 배양 4주 후에 캘러스의 성장양상은 4종류로 구분되었다. Table 1에서 보는 바와 같이 배발생 캘러스, 황색의 부스러지기 쉬운 캘러스, 녹색의 부스러지기 쉬운 캘러스, 녹색의 밀집형 캘러스 등으로 다양한 형태의 캘러스가 유도되었다. 1~10 μM 2,4-D와 5~50 μM BA 혼용 처리구에서는 녹색의 밀집된 형태로 성장하는 캘러스를 주로 형성하였다. 또한, BA 단독 처리구에서도 이같은 형태의 캘러스가 형성되었다. BA 단독처리 혹은 2,4-D와 조합하여 BA가 첨가된 배지에서의 캘러스 형성은 BA 농도가 높아질수록 더욱 밀집형으로 형성되었다. 배양 3주 후부터 1 μM 2,4-D 처리구에서 부분적으로 점액성의 배발생 캘러스가 형성되기 시작했다. 배양 4주 후에 배발생 캘러스의 형성률은 1 μM 2,4-D 첨가 배지에서 높은 빈도로 나타났다. 여러 형태의 즉, 노란색과 흰색을 띠는 점액질의 매끈한 배발생

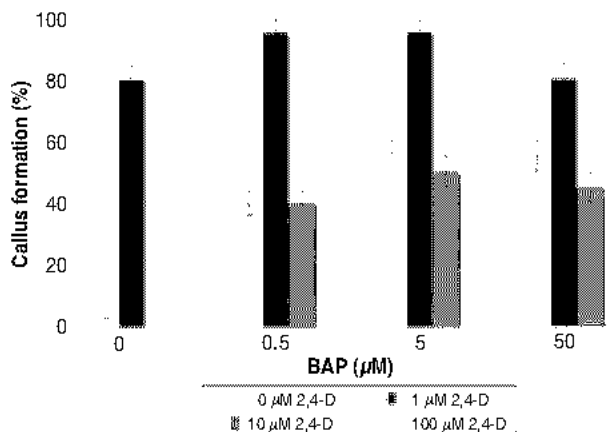


Figure 1. Effect of 2,4-D and BA on callus formation from leaf disk of *Ipomoea batatas* after 4 weeks of culture.

Table 1. Morphological types of calli induced from leaf disk of purple sweetpotato after 4 weeks of culture on MS medium containing 2,4-D and BA.

Types of callus	Color	Character
Type A	Whitish yellow	friable, watery, embryogenic
Type B	yellowish brown	fiable, soft
Type C	green	soft, watery
Type D	green	non-friable, compact

캘러스가 약 80% 형성되었다. 이 결과와는 대조적으로 1 μM 2,4-D와 0.5 μM BA 조합 처리구에서 5~10%의 낮은 빈도의 배발생 캘러스 형성률을 나타냈으며, 나머지 부위는 대부분 비배발생 캘러스로 유도되었다. 결과에서 보듯와 같이 배발생 캘러스의 형성률은 저농도의 BA 첨가군에 비해 저농도 2,4-D 단독처리가 효과적이며, 왕성히 생육하는 비배발생 캘러스는 1 μM 2,4-D와 0.5-5 μM BA 혼용처리 조건에서 효과적으로 나타났다. 따라서 2,4-D 단독 처리군에 비교해 BA를 저농도로 첨가시키는 것이 callus 성장과 증식에 더 효과적인 것으로 나타났다. 고구마의 조직배양시 대부분 낮은 농도의 옥신 첨가배지(Liu et al. 1989; Kwon et al. 2002)에서 배발생이 이루어진 결과와 유사한 결과가 자색고구마의 배발생 캘러스의 유도에서도 나타났다.

동일 농도의 2,4-D 첨가에서는 BA 농도가 상승시킴에 따라 더 밀집형 캘러스를 형성하였으며, 캘러스의 증식은 0.5~5 μM BA와 2,4-D 조합 처리가 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 50 μM BAP의 첨가는 캘러스를 매우 밀집형으로 유도하며, 고농도의 2,4-D, 즉 100 μM의 첨가는 캘러스의 형성이 나타나지 않고 괴사했다. 배양 4주 경과 후 B, C, D형의 캘러스는 (Table 1) A형의 캘러스에 비교하여 1.5~2배의 성장을 나타냈다. A형 구상형의 등근 배발생 캘러스는 배양 6~8주가 경과하면서 대부분 캘러스가 부정근으로 발달한 후 갈변화하였다.

광조사가 배양에 미치는 영향을 위해 광, 암조건에서 배양하여 비교하였다. 암, 광조건 모두 1~10 μM 2,4-D 처리구 혹은 0.5 μM BA와의 조합 처리군에서 배발생 캘러스의 형성률이 높게 나타났다. 광조건의 경우 캘러스의 형성과 배발생 캘러스의 형성이 암조건에 비교하여 일반적으로 2주 빠르게 출현하였다. 암, 광조건 모두 1 μM 2,4-D에 0.5 μM BA를 첨가한 경우 비배발생 캘러스를 먼저 형성한 후, 배발생 캘러스가 낮은 빈도로 나타났다. 배발생 캘러스의 형성은 1 μM 2,4-D 단독처리시 배발생 캘러스 형성률이 적합한 것으로 나타났다. 2,4-D의 농도가 증가함에 따라 캘러스의 형태는 다르게 나타났다. 100 μM에서 1주 후부터, 10 μM에서는 3주 후부터 캘러

스가 무르게 변화하며 갈변화한 후 괴사했다.

NAA와 BA를 조합한 실험의 결과는, 전반적으로 2,4-D 조합 조건과 유사한 양상을 보였으나, 배발생 캘러스가 전혀 형성되지 않고 부정근 발생이 활발히 유도되어 배발생 캘러스와 식물체 재분화의 유도에 적절치 않은 것으로 나타났다. 이는 고구마의 조직배양 실험에서 나타냈던 다양한 옥신 가운데 2,4-D가 배발생 캘러스를 유도한 것 (Zheng et al. 1996)과 유사한 결과를 자색고구마에서 나타냈다.

배발생 캘러스의 최적조건 확립

성장조절제의 영향에 대한 1차 실험에서 1 μM 2,4-D를 첨가한 배지에서 높은 배발생 캘러스의 형성률을 나타냈다. 따라서 최적 조건을 확립하기 위해 1 μM 2,4-D를 중심으로 0.5, 1, 1.5 μM의 농도와 광조사 조건으로 암, 약광 (3000 lux), 강광 (6000 lux)에서 배발생 캘러스 형성률을 조사하였다. 배양 4주 후에 배발생 캘러스의 형성률을 조사한 결과 강광 0.5 μM 2,4-D 첨가 배지에서 가장 높은 빈도로 배발생 캘러스가 유도되었으며, 형성률은 98%의 빈도를 나타냈다 (Table 2). 그러나 1 μM과 1.5 μM 2,4-D 첨가 배지에서는 60~80%와 50~60%로 전반적으로 낮은 빈도의 배발생 캘러스 유도율을 나타냈다. 본 연구 결과는 2,4-D 첨가배지에서 6주간 배양으로 90% 정도의 유도율을 보인 화이트 스타 혹은 울미 (Liu et al. 1989; Min et al. 1994)에 비교하여 단기간에 고빈도의 배발생 캘러스가 형성되었다. 전체적인 광조사의 영향은 낮은 농도 즉 0.5 μM의 2,4-D 첨가 조건에서 강광이 효과적이었으나, 1 μM 혹은 1.5 μM 농도로 상승함에 따라 광조사의 영향이 적어지는 것으로 나타났다. 1.5 μM 2,4-D 강광 조건에서는 배발생 캘러스 형성률이 낮은 반면, 비배발생 캘러스가 함께 형성되는 특징을 보였다. 일반적으로 고구마에서 비배발생 캘러스의 생장이 배발생 캘러스에 비해 생장이 빠르기 때문에 계대 배양시에 항상 두 종류의 캘러스를 따로 분리해 주어 배발생 캘러스만을 유지하는데 효과적인 (Kwon et al. 2002) 것으

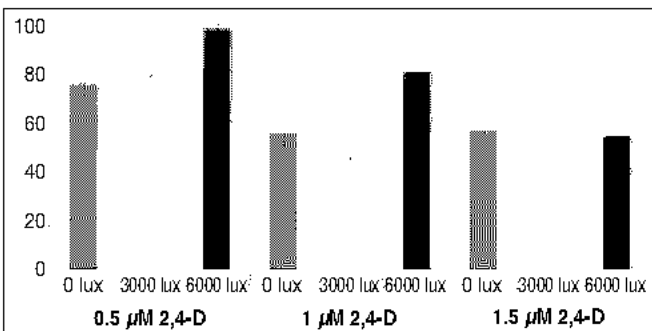


Figure 2. Frequency of embryogenic callus formation from leaf disk culture of purple sweetpotato on MS medium containing 0.5-1.5 μM 2,4-D under various light intensity.

Table 2. Organogenesis from embryogenic callus derived from leaf disk of purple sweetpotato on MS medium. After 4, 12 and 24 days of culture on medium containing ABA, the embryogenic callus was transferred to medium containing 3, 6 and 9 μM GA₃.

ABA (μM)	1			3			5		
	4	12	24	4	12	24	4	12	24
3	S 0	R 80	0	S 0	R 90	0	S 0	R 90	0
6	S 0	R 90	0	S 0	R 90	0	S 25	R 100	0
9	S 0	R 90	0	S 0	R 90	0	S 0	R 90	0

S; shoot formation (%), R; root formation (%)

로 보고하고 있다. 그러나 자색고구마의 경우 0.5 μM 2,4-D 첨가구에서 배발생캘러스만 유도 되기 때문에 캘러스를 분리할 필요가 없어 효율적인 배양조건이라 할 수 있다. 이와 같이 형성된 배발생 캘러스는 배양기간이 계속되어 7주 이상 경과하면 구상형의 형태에서 원주형의 형태를 거쳐 뿌리로 발달하였다.

식물체의 재분화

잎 조직을 0.5 μM 2,4-D 첨가 배지에서 4주 성장하여 형성된 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도하기 위해 형성된 배발생 캘러스를 먼저 1, 3, 5 μM ABA가 첨가된 배지에 옮겨 4, 12, 24일 동안 배양한 후, 3, 6, 9 μM GA₃가 첨가된 배지에 계대배양해 재분화 가능성을 조사하였다. 그 결과 ABA의 농도가 높을수록 뿌리발생이 빨리 시작되며 캘러스의 갈변화가 빨리 진행되었다. 또한 ABA의 처리기간이 길어짐에 따라 뿌리 발생의 빈도는 감소하였다. 0.5 μM 2,4-D에서 3~4주 배양한 배발생 캘러스 (Figure 3A)를 5 μM ABA에서 4일, 12일, 24일 배양한 후, 3 μM 혹은 6 μM GA₃에 옮겨 배양한 결과 shoot를 형성하였다. 최적 조건으로 ABA를 4일 처리한 후, GA₃ 첨가배지에 옮겨 14일 배양한 경우 캘러스로부터 자색밀집부분이 나타나고 (Figure 3B) 3주 배양 후에 shoot를 형성하였다. GA₃의 처리기간이 길어질수록 자색 밀집 부분의 형성이 높게 나타났으며 6 μM GA₃에 배양할 경우 25%의

shoot가 형성되었다.

고구마의 재분화 실험은 2,4-D 첨가배지에서 배발생 캘러스를 유도한 후, 성장조절제가 첨가하지 않은 배형성 배지에서 체세포배의 형성과 식물체 재분화를 유도하였다 (Liu and Cantliffe 1984; Kwon et al. 2002). 그 밖에 ABA 및 GA₃를 첨가하여 배형성과 shoot의 형성을 유도하였다 (Otani et al. 1998). 본 자색고구마의 실험에서는 배발생 캘러스를 성장조절제가 제거된 MS 배지로 계대배양할 경우 shoot의 형성은 전혀 이루어지지 않았으며, 단지 부정근이 형성되었다. 또한 2,4-D와 저농도의 kinetin을 혼용 처리해 재분화한 Min 등 (1994)의 실험과 달리 자색고구마의 배발생 캘러스는 뿌리발생 이후 갈변과 함께 괴사하였다. 그러나 본 실험에서 자색고구마의 경우 Otani 등 (1998)의 실험결과와 유사한 ABA 처리 후, 이어서 GA₃의 처리가 식물체 재분화에 효과적인 것으로 나타났다. 즉, 자색고구마의 shoot 형성에는 배발생 캘러스의 생성 후, 단일조건에서 ABA의 처리가 중요한 단계로 추측되며 농도는 5 μM 이 가장 적합하였다. 이어서 GA₃ 첨가 배지에 계대배양을 실행하여 shoot 형성을 유도할 수 있었다. 형성된 shoot가 5 cm 정도로 성장하면 성장조절제를 첨가하지 않은 MS배지에서 발근을 유도하였고 (Figure 3C), 배양 10주 후에는 완전한 소식물체를 얻을 수 있었다 (Figure 3D). 기내 소식물체 (초장 약 7~8 cm)를 포트에 이식하여 정상적으로 생육하였다. 자색고구마의 육종과 세포배양을 통한 안토시아닌 생합성 등을 위해서 적합한 배양 기술의 확립이 요구되는 시점에서 새로이 개발된 자색고구마의 재분화 방법은 형질전환 등에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

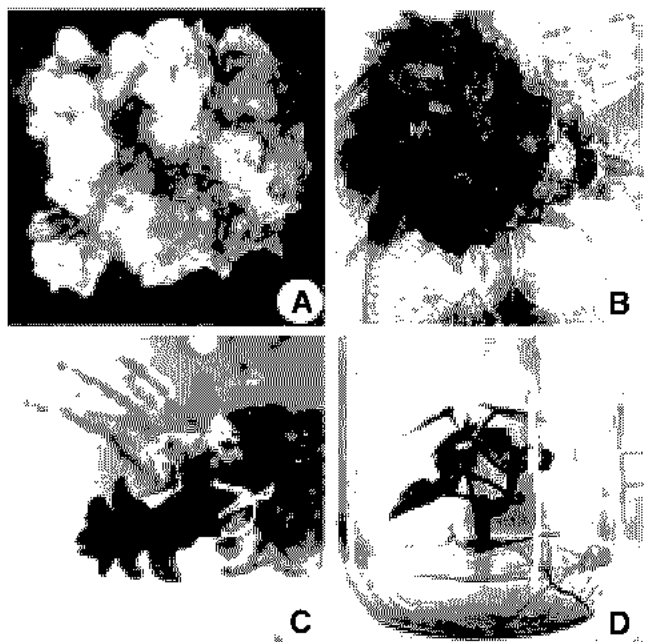


Figure 3. Plant regeneration from leaf disk culture of *Ipomoea batatas* line "IT310". A, Embryogenic callus after 4 weeks of culture on MS medium containing 0.5 μM 2,4-D; B, Development of shoot in regeneration medium supplemented with 6 μM GA₃ after 12 days of culture on medium containing 5 μM ABA; C-D, Normal plantlet formation after 50 and 60 days of culture, respectively.

적 요

본 연구는 자색고구마 (Line IT310)의 잎과 괴근 조직을 이용한 재분화 방법을 확립하고자 실행되었다. MS 기본 배지에 다양한 농도의 2,4-D와 BA를 조합 처리하여 캘러스와 배발생캘러스의 형성을 유도하였다. 배발생 캘러스 형성은 광조건, 0.5 μM 2,4-D 첨가배지에서 배양 4주 후 98%의 형성률을 나타냈다. 형성된 배발생 캘러스를 성장조절제를 첨가하지 않은 배지에서 배양할 경우 모두 뿌리로 성장하였다. 그러나 배발생 캘러스를 5 μM ABA 첨가 배지에 옮겨 4일간 배양한 후, 다시 3~6 μM GA₃ 첨가 배지에서 3주 배양한 실험구에서 식물체 재생을 유도하였다.

사사 - 본 연구는 2001 농림기술개발사업 (ARPC)에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Dennis L, Bidney, James F, Shepard (1980) Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. *Plant Sci Lett* 18: 335-342
- Dodds JH, Merzdorf C, Zambrano V, Siguenas C, Jaynes J (1991) Potential use of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to confer insect resistance in sweet potato. In: Jansson RK, Raman KV (eds). Sweetpotato Pest Management; a Global Perspective. Westview, Boulder, Colo, pp 203-219
- Fuleki T, Francis FJ (1968) Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J Food Sci* 33: 72-77
- Kwon EJ, Kwon SY, Kim MZ, Lee JS, Ahn YS, Jeong BC, Kwak SS, Lee HS (2002) Plant regeneration of major cultivars of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) in Korea via somatic embryogenesis. *Korean J Plant Biotech* 29: 189-192
- 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, 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
- Dicosmo F, Misawa M (1995) Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotech Advances* 13: 425-453
- Murashige T, Skoof F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Newell CA, Lowe JM, Merryweather 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 Biotech* 15: 11-16
- Otani M, Shimada T, Nizeki H (1987) Mesophyll protoplast culture of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) *Plant Sci* 53: 157-160
- Yoshimoto M (2001) New trends of processing and use of sweet potato in Japan. *Farming Jpn* 35: 22-28
- Phuc JE, Lindberg B, Ogle, Thomke S (2001) Determination of the nutritive value of tropical biomass products for monogastrics using rats. Part 2. Effects of drying temperature. *Asian-Australian J Anim Sci* 14: 994-1002
- Prakash CS, Varadarajan U (1992) Genetic transformation of sweetpotato by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 11: 53-57
- Zheng Q, Dessai AP, Prakash CS (1996) Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 6: 381-385

(접수일자 2003년 7월 16일, 수리일자 2003년 9월 3일)