

최 종  
연구보고서

자색고구마의 기내배양을 이용한 천연색소  
안토시아닌의 대량 생산

Mass production of natural colorant anthocyanin  
by *in vitro* culture of purple sweetpotato

연구기관

조선대학교

호남농업시험장 목포시험장

농림부 도서실



0001351

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “자색고구마의 기내배양을 이용한 천연색소 안토시아닌의 대량생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 25 일

주관연구기관명 : 조 선 대 학 교

총괄연구책임자 : 박 현 용

연 구 원 : 박 혜 정

연 구 원 : 김 윤 실

협동연구기관명 : 호남농업시험장

목 포 시 험 장

협동연구책임자 : 정 병 춘

연 구 원 : 안 영 섭

연 구 원 : 정 미 남

# 요 약 문

## I. 제 목

### 자색고구마의 기내배양을 이용한 천연색소 안토시아닌의 대량생산

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

식품업계에 사용되고 있는 식용색소는 식품의 중요한 요소이며, 이들 색소는 가공조건 등에 따라 변화하여 품질의 저하가 일어날 수 있다. 현재 이용되고 있는 국내 식품업계나 의·약 업계에서는 주로 인공색소와 일부 수입된 천연색소를 사용하고 있는 실정이다. 그러나 식생활의 개선과 인공색소의 부작용 및 안정성 등에 대한 문제점과 함께 천연색소를 사용한 제품개발이 활발히 진행되어지고 있다. Anthocyanin을 포함한 flavonoid계열 화합물과 carotenoid 화합물 등은 천연색소로서 식품 업계와 의·약 업계에서 많이 이용되고 있으나, 이 천연색소들을 산업화하는 과정에는 대상 식물이 한정되어 있다는 문제점이 있다. 이러한 시점에서 자색고구마의 anthocyanin 색소는 aromatic acyl group을 갖고 있기 때문에 안정성이 높다고 알려져 있으며, 식품의 색소(음료수, 요구르트, 잼, jelly등) 의약품, 화장품 등에 응용하여 유용하게 사용되고 있다. 따라서 국내산 자색고구마로부터 천연색소의 개발은 천연색소를 이용한 제품개발의 파급효과를 이루게 할 것으로 추측된다.

최근 생물 산업이 본격화되면서 주요작물 및 자원식물의 조직배양을 통해, 식용색소를 포함한 2차 대사물질을 대량 생산하고자 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 기내배양을 이용한 식용색소의 대량생산 기법은 현재 산업화하기에는 아직 미비한 단계이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 새로이 육성 재배하

기 시작한 자색고구마의 기내배양을 이용하여 anthocyanins의 대량생산하는 기법을 개발하는 것이 목적이다. 한편 자색고구마의 cell line을 이용한 세포배양으로부터 anthocyanins의 생산은 저비용으로 높은 경제성을 지니고 있다. 따라서 연구의 목표는 기내배양을 이용한 천연색소의 생산방법의 개발을 통해 식품 업이나 여성들의 화장품, 의·약품 등에 천연색소를 대체 사용함으로써 부작용을 최소화하고, 수입에 의존하고 있는 천연 식용색소를 자체적으로 공급할 수 있으며 나아가 수출효과도 기대 할 수 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 자색고구마의 조직배양을 이용하여 천연색소 안토시아닌의 기내 생산을 위한 연구를 실행하고자 했다. 잎 조직과 괴근 조직으로부터 캘러스를 유도하기 위해 각 배지의 조성과 성장조절제의 조합을 통해 효과적인 캘러스 유도조건을 개발하고자 했다. 유도된 캘러스를 계속적으로 유지하고 증식하기 위한 계대배양 방법을 위해 계대배양의 기간과 배지조성을 실험하였다. 이와 같이 형성된 캘러스와 계대배양 방법은 식물체의 재분화 유도, 현탁 배양 및 높은 생합성 세포의 선발 실험에 이용하였다.

캘러스를 이용한 식물체의 재분화 실험은 잎 조직으로부터 유래한 캘러스로부터 그리고 괴근 조직으로부터 유래한 캘러스로부터 배발생 캘러스를 유도하고, 식물체의 재생을 유도하기 위한 성장조절제의 조합과 환경조성을 통해 정상적인 식물체를 효과적으로 재생시킬 수 있는 방법을 개발하였다. 또한 액체 배양액에서 효율적으로 세포주를 증식시키고 유지하기 위한 현탁배양 방법은 진탕속도와 성장조절제의 조성 등을 조합하여 지속적으로 배양할 수 있는 방법을 확립하였다.

증식된 캘러스의 계대배양을 통해 높은 생합성능을 갖는 세포주의 선발은

생장조절제, 빛 조건 및 배지의 조성 등을 통해 높은 색소 생합성 세포주를 지속적으로 선발하였다. EMS 처리를 통해 돌연변이체의 유도를 시도하였으며, 세포의 선발과정에서 캘러스 변이체를 동시에 선발하였다. 이런 캘러스 변이체는 현탁 배양과 색소 생합성 캘러스군의 선발과정에서 효과적인 결과를 보였다. 각 조건에서 배양한 캘러스는 육안 식별을 통해 안토시아닌 생합성 세포주를 1차적으로 선별했으며, 계속되는 계대배양을 통해 선발을 지속해 실행하였다. 육안 식별을 통해 선발과정을 거친 후 확실한 생합성군으로 선발된 세포군은 spectrophotometer를 이용하여 안토시아닌의 생합성을 비교분석하였으며, 최종적인 안토시아닌의 성분 분석은 HPLC를 통해 캘러스 조직에 생합성된 색소 함량을 분석하여 확인하였다.

협동 연구기관으로부터는 교잡육종에 의한 다수성, 안토시아닌 고함량 자색고구마 신품종 육성을 위해 자색고구마의 다양한 품종들을 유지 관리하고 교잡육종법 및 기존 유전자원에 대한 특성평가 및 수량성 검정에 의해 안토시아닌 고함량 자색고구마 신품종 육성을 위한 계통선발을 실행 하였다. 또한 재배시기 및 수확시기에 따른 색소함량을 높일 수 있는 조건을 구명하여 재배방법에 의한 자색고구마 색소함량 제고 적정조건을 확립하고자 했다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 조직배양방법의 확립 및 색소생합성 세포주의 선발

자색고구마의 잎 조직으로부터 캘러스의 유도는 MS (Murashige and Skoog) 배지에 1  $\mu$ M 2,4-D와 5  $\mu$ M BA를 혼합 처리한 배지에서 가장 효과적이었다. 배발생 캘러스(embryogenic callus)의 발생은 0.5  $\mu$ M 2,4-D를 첨가한 배지에 치상한 후, 광 조건에서의 배양이 효과적으로 나타났다. 식물체의 재분

화는 배발생 캘러스를 4일간 5  $\mu\text{M}$  ABA를 처리한 후, 다시 3~6  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>를 첨가한 MS 배지에 옮기면 배발생 캘러스로부터 shoots가 형성되기 시작했다. 형성된 shoots는 hormone free MS 배지에 옮겨 정상적인 식물체로 발달시켰다.

괴근 조직을 이용한 캘러스 유도는 10  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0.5~5  $\mu\text{M}$  BA를 혼합한 배지가 효과적이었다. 재분화 실험에서는 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D를 첨가한 배지에 치상한 후, 광 조건에 5주간 배양하여 배발생 캘러스를 유도하였으며, 이를 5  $\mu\text{M}$  ABA를 첨가한 배지에 4일간 처리한 후, MS hormone free medium에 옮겨 shoots의 형성을 유도하였다. 가장 높은 재분화율은 나타낸 품종은 무안 5호로 나타났다. 기내에서 재분화된 shoots를 포트에 옮겨 정상적인 식물체로 유도하였다. 캘러스로부터 greenhouse에서 정상적인 식물체로의 성장까지 8~10 주 정도가 소요되었다.

색소 생합성 캘러스의 선발을 위해 실험한 결과, 광이 안토시아닌 생합성에 중요한 요소임을 확인하였다. 광조사의 실험에서 3000 lux의 광조건이 대조구에 비교하여 2배의 안토시아닌 생합성을 나타냈다. 광의 종류에 따른 영향은 far red, red광에서는 미비한 영향을 나타냈지만, blue 광을 2시간씩 조사한 실험구에서 2.2~2.4 배의 생합성 효과를 나타냈다.

## 2. 현탁배양 방법의 개발과 색소 생합성 세포주의 선발

기내 안토시아닌 생합성 기법을 확립하고자, 보라미의 잎 조직으로부터 유도된 자색 캘러스와 무안 5호 괴근으로부터 유도된 자색 캘러스를 이용하여 액체 현탁배양에 적용하여 대량증식 방법과 고생합성 세포주의 선발을 시도하였다. 10 ml 배양액이 든 50 ml 삼각플라스크에 0.1 g의 캘러스를 접종한 후 1 주 간격으로 계대배양하면서 2,4-D와 BA등 여러 가지 성장조절제를 조합 처

리하여 자색 껀러스를 증식시키고 안토시아닌 생합성을 유도하고자 하였으나, 계대배양 10주 이후에는 모두 피사하여 유지, 증식이 불가능 하였다. 이에 대한 대처 방안으로 생장조절제가 첨가되지 않는 MS 기본 배지에서 유지, 증식이 가능한 변이체 껀러스를 선발하였고 이들로부터 세포 집합체 클론화에 의한 자색 변이체 껀러스를 선발하였다. 세포 생장은 접종 후 12일 까지 안정기를 거쳐 12 ~ 13일 사이 대수생장기를 나타냈다. 다음의 계대 배양기까지 접종량의 19배까지 성장하였다. 색소 생합성능은 계대배양 접종 후 6일째, 배양 초기의 4배를 형성하였으며(0.99 mg/ml), 이는 자색고구마 피근(자미;1.5 mg/ml, 보라미;1.2 mg/ml)와 유사한 수준이다.

자색 변이체 껀러스의 최적 배양 조건 조사하였다. 2,4-D 혹은 BA는 자색 변이체 껀러스의 생장과 안토시아닌 생합성을 억제하며, ABA는 생장률을 증가시키고 jasmonic acid는 안토시아닌 생합성량을 증가시켰다. 자색 변이체 껀러스의 안토시아닌은 HPLC의 분석 결과 cyanidin이 검출되지 않았으며, peonidin으로 분석되었다.

### 3. 자색고구마 고구마 색소함량 제고를 위한 적정조건 규명

피근의 상저수량은 모든 삼식시기 시험에서 수확시기가 늦을수록 증가하였고, 삼식 140일 후의 상저수량은 4월 16일 삼식에서는 2,076kg/10a, 5월 16일 삼식에서는 1,905kg/10a, 6월 16일 삼식에서는 1,823kg/10a로 삼식시기가 늦을수록 수량이 감소하였다. 그러나 안토시아닌 색가는 모든 처리에서 전체적으로 9.4 ~ 10.0 E 10%, 1cm 으로 삼식 및 수확시기 간에 유의적인 차이가 없었다. 따라서 고구마의 피근은 식물의 생육기관중 뿌리가 비대된 것 이므로 뿌리의 기능 이외에 안토시아닌 색소함량의 고저에는 유전적인 영향이 가장 높고 환경 및 재배적인 영향은 매우 적은 것으로 판명되었다. 그러므로 이상의 시험

결과에서 자색고구마는 괴근 형성과 동시에 안토시아닌 색소가 축적되며 괴근의 비대와 더불어 색소수량은 증가할 수 있으나 단위당 함량은 유전적 특성에 의해 일정한 것으로 보인다.

자색고구마 삼식 및 수확시기에 따른 수량 및 색가 변화를 검토한 결과 모든 삼식 및 수확시기 시험에서 수확시기가 늦을수록 상저수량은 증가하였으나 색가는 9.4 ~ 10.0 E 10%, 1cm 으로 큰 차이가 없었다. 따라서 안토시아닌 색소의 절대함량은 재배기간에 따라 변화하지 않지만, 색소의 상대적 다수확을 위해서는 120일 이상 재배하는 것이 안토시아닌 색소함량의 제고를 위한 적정 재배조건으로 생각된다.



## SUMMARY

Anthocyanins have been used extensively as food and beverage additives. The main pigments that accumulate in the storage roots of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) are anthocyanins with aromatic acyl groups. These pigments have a high thermostability and contribute towards antioxidative activity. Therefore, the sweet potato pigment is expected to be a high quality natural food colorant which may aid in the prevention of lifestyle-related diseases.

Plant cell cultures have been suggested as a feasible technology for the production of plant-derived secondary metabolites. Significantly progress has been made in the enhancement of both productivity and yield of anthocyanins in a number of plant cell cultures. However, very few tissue culture techniques have been applied to introduce the biosynthesis of anthocyanins in vitro from sweet potato. In this study, we have tested the effects of optimization of media and culture conditions on the pigments accumulation in the tissue culture of purple sweet potato .

1. Development of tissue culture method and the selection of pigmented callus

This study was carried out to establish a regeneration system and selection of high anthocyanin producing cell line from leaf and storage root explant of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Callus induction was initiated from explants derived leaf and root storage. Using leaf, optimal

combination of the growth regulators for callus formation was 1  $\mu\text{M}$  2,4-D and 5  $\mu\text{M}$  BA, and the highest yield of embryogenic calli were observed with a Murashige and Skoog (MS) basal medium containing 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D under light condition after 4 weeks of culture. Embryogenic calli were subcultured on a medium supplemented with 5  $\mu\text{M}$  ABA for 4 days. Regeneration of shoots occurred when those embryogenic calli were transferred onto the hormone free MS medium complemented with 3~6  $\mu\text{M}$  gibberellic acid. Regenerated shoots were developed into normal plantlets.

The optimal concentration for callus formation derived storage root explants was the best in 10  $\mu\text{M}$  2,4-D and 0.5~5  $\mu\text{M}$  BA combination. The embryogenic calli were observed on MS basal medium containing 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D under the light condition after 5 weeks of culture. Embryogenic callus subcultured on medium supplemented with 5  $\mu\text{M}$  ABA for 4 days. Subsequently, the regeneration of shoots occurred when these embryogenic calli were transferred onto the MS hormone free medium. The highest frequency(2 shoots/explant) of shoot regeneration occurred in the line Muan 5. Regenerated shoots rooted rapidly and the plantlets transferred to soil in the greenhouse appeared normal. This system of somatic embryogenesis described here will facilitate tissue culture and gene transfer research of purple sweet potato due to its rapidly(8 ~ 10 weeks).

For the selection of highly anthocyanin synthesizing cell line were used the callus derived storage root and leaf explants. Light intensity was identified as important influence on anthocyanin synthesis in callus culture. Under 3000 lux light intensity was the best for pigment production in this study. In these condition brought about a 2-fold increase in anthocyanin content compared to the original leaf tissue. Dark condition was not

suitable for anthocyanin production. The blue, red, far red light irradiation were influenced on the pigment accumulation in callus. Under the blue light irradiation for 2 h was most effective in anthocyanin accumulation, but little anthocyanin under the other light condition. The average anthocyanin contents was enhanced 2.2~2.4 fold by light-emitting diodes(LED) treatment for 2~4 h.

## 2. Development of effective suspension culture and cell line selection

We attempted to select a high pigmented callus(PC) suitable for the development of an efficient technological procedure for anthocyanin mass production. Suspended cell cultures were initiated by transferring about 0.1g (fresh weight) of callus to 10 ml of liquid medium in 50 ml flask. The cultures were incubated on rotary shaker (120 rpm) at 27°C in the dark. The growth and the anthocyanin accumulation in suspension cultures were monitored periodically. The cell growth observed a typical curve with induction period at 12 days and exponential phase between 12 and 30 days after inoculation. The cell growth to next subculture increased about 19 times during the whole growth period.

To select the high anthocyanin synthesizing cell line, we tested culture condition including the composition of plant growth regulators, light irradiation, and shaking speed etc. The PC appeared in the suspension culture after 20 weeks subculturing in MS medium. However, the frequency was very low and their formation suppressed by 2,4-D or BA. The maximum pigment accumulation on the present culture observed during the first 6 days (0.99 mg/mL), which was closed that of a pigment extracted

from storage roots, (which was 1.5). The highest increase in the anthocyanin contents in culture was associated with a low growth rate. On the contrary the pigment contents was constant at the exponential growth phase.

Light irradiation or addition of jasmonic acid (20 $\mu$ M) enhanced anthocyanin accumulation in suspension culture, but inhibited cell growth. This represented an 8.5-fold increase compared with the control culture in the dark. Following the continuous light irradiation of 8000–8300 lux, the maximum anthocyanin accumulation was 6.8 CV(color value)/gFCW(fresh callus weight) at 10 days after inoculation, which was 4.8-fold that the control. A process that combined jasmonic acid treatment and light irradiation resulted in a significant synergistic enhancement of anthocyanin accumulation up to 22.8 CV/g FCW on day 7. This value was 13.8-fold that of the control. One anthocyanin was isolated from the highly pigmented callus derived from the storage root of purple sweet potato cv. muan. It was identified as cyanidin by HPLC analysis.

### 3. Selection of new breeding lines with high anthocyanin content by hybridization breeding

Selection of new breeding line having high anthocyanin content was tried by hybridization breeding method. Seeds for new lines were obtained from artificial cross, and cutted at field as seedlings next year. 8 new breeding lines having anthocyanin pigment were selected from total 1,603 seeds by artificial cross. And, 6 genetic resources were selected from seedling 5 ~ 7 generations. These resources have high anthocyanin contents and yields

and will be used for new variety development of high anthocyanin content.

Cultivation periods were experimented for high anthocyanin content using purple sweetpotato. Even if cultivation period was prolonged, anthocyanin content was not changed from short day cultivation as 80 days. But, total anthocyanin yield can obtained higher and higher by fleshiness of storage root. Therefore, cultivation over 120 days was recommended for high yield of anthocyanin.

# CONTENTS

	page
Chapeter 1. Introduction .....	21
Section 1. Background and significance .....	21
1. Technological aspect .....	21
2. Economical and industrial aspect .....	22
3. Social and cultural aspect .....	23
Section 2. Objective and scope .....	23
1. Objective .....	23
2. Scope .....	25
Chapter 2. Establishment of tissue culture method .....	31
Section 1. Material and methods .....	31
Section 2. Selection of purple callus and tissue cultue of sweetpotato leaf explant .....	32
1. Induction of callus .....	32
2. Formation of embryogenic callus .....	38
3. Plant regeneration .....	41
4. Culture factors for high-anthocyanin production .....	45
A. Selection of purple callus .....	45
B. Effect of growth regulator .....	51
1) 2,4-D treatment .....	51
2) ABA treatment .....	53
3) Jasmonic acid treatment .....	55
C. Investigation pigment production by LED .....	57
Section 3. Selection of purple callus and tissue culture of sweet potato storage root .....	59

1. Induction of callus .....	59
2. Formation rate of embryogenic callus .....	62
3. Plant regeneration .....	65
4. Culture factors for high anthocyanin production .....	69
A. Purple callus selection .....	69
B. Effect of growth regulator .....	71
1) 2,4-D and BA effect .....	71
2) NAA and BA effect .....	73
5. Induction of mutant by EMS .....	73
Section 4. Tissue culture of mutant callus .....	75
1. Induction of mutant callus .....	75
2. Maintain and development .....	77
3. Effect of growth regulator .....	77
가. 2,4-D and BA treatment .....	77
나. Pigment production by LED .....	80
Section 5. Result .....	80
Chapter 3. Establishment of suspension culture method .....	83
Section 1. Suspension culture of callus by purple sweetpotato leaf explant .....	83
1. Effect of shaking speed .....	83
2. Effect of growth regulator .....	87
3. Growth curve of callus during suspension culture .....	91
Section 2. Suspension culture of derived storage root .....	93
1. 2,4-D and BA effect .....	93
Section 3. Suspension culture of mutant callus .....	95
1. Maintain and development .....	95

2. 2,4-D and BA effect .....	95
3. Selection of high anthocyanin producing mutant callus .....	98
A. Selection of pigment product callus .....	98
B. Growth curve .....	102
C. Anthocyanin analysis of purple mutant callus .....	104
D. Establishment of culture condtion .....	407
1) Test of various medium .....	107
2) Effect of sugar .....	109
3) Effect of inoculated cell volume .....	112
4) Effect of 2,4-D and BA combination .....	114
5) ABA treatment .....	116
6) Jasmonic acid treatment .....	118
Section 4. Results and discussion .....	120
Chapter 4. Investigation of culture condition for high piment	
contens .....	121
Section 1. Selection of higt anthocyanin produting lines by cross	
-breeding .....	121
1. Method .....	121
A. Induction of artificial blooming .....	121
B. Artificail crossing, fruiting and seed harvesting .....	123
C. Seeding of botanical seed and selection .....	123
D. Pretest and maintest of pedegree selecction .....	124
E. Measurment of anthocyanin color value .....	124
2. Test result .....	126
A. Upbreeding of high anthocyanin color line .....	126
1) Artificail breeding and amount of seed-gathering .....	126



2) Selection of great line .....	128
3) Comparison of color value .....	130
3. Summery of result .....	132
Section 2. The test of anthocyanin content by cultivation method .....	133
1. Method .....	133
2. Test result .....	133
3. Result and discussion .....	134

# 목 차

	page
제 1장 총 론 .....	21
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	21
1. 기술적 측면 .....	21
2. 경제, 산업적 측면 .....	22
3. 사회, 문화적 측면 .....	23
제 2 절 연구개발의 목적 및 범위 .....	23
1. 연구개발의 목적 .....	23
2. 연구개발의 범위 .....	25
제 2장 조직배양 방법의 확립 .....	31
제 1 절 실험재료 및 방법 .....	31
제 2 절 잎 조직을 이용한 조직배양과 자색캘러스 선발 .....	32
1. 캘러스의 유도 .....	32
2. 배발생 캘러스 형성 .....	38
3. 식물체의 재분화 .....	41
4. 높은 안토시아닌 생합성을 위한 배양 조건 .....	45
가. 자색 캘러스 선발 .....	45
나. 생장조절제 처리 .....	51
1) 2,4-D 처리 .....	51
2) ABA 처리 .....	53
3) Jasmonic acid 처리 .....	55
다. 광조사 기구(LED)를 통한 색소 생합성 조사 .....	57
제 3 절. 괴근 조직을 이용한 조직배양 및 자색캘러스 선발 .....	59
1. 캘러스의 유도 .....	59
2. 광조건과 배양기간에 따른 배발생 캘러스 형성률 .....	62

3. 식물체의 재분화 .....	65
4. 높은 생합성을 위한 배양조건 .....	69
가. 자색 켈러스 선발 .....	69
나. 성장조절제 처리 .....	71
1) 2,4-D와 BA 처리 .....	71
2) NAA와 BA 처리 .....	73
5. EMS 처리에 의한 돌연변이체 유도 .....	73
제 4 절 변이체 켈러스를 이용한 조직배양 .....	75
1. 변이체 켈러스 선발 .....	75
2. 유지 · 증식 .....	77
3. 성장조절제의 효과 .....	77
가. 2,4-D 와 BA 처리 .....	77
나. 광조사 기구(LED)를 통한 색소 생합성 조사 .....	80
제 5 절 결 과 .....	80
제 3장 현탁배양 기술의 확립 .....	83
제 1 절 잎조직 유래 켈러스의 현탁배양 .....	83
1. 진탕 속도가 안토시아닌 생합성에 미치는 영향 .....	83
2. 성장조절제 처리 .....	87
3. 잎 조직 유래 켈러스의 성장곡선 .....	91
제 2 절 피근조직 유래 켈러스의 현탁배양 .....	93
1. 2,4-D와 BA 영향 .....	93
제 3 절 변이체 켈러스의 현탁배양 .....	95
1. 유지 및 증식 .....	95
2. 2,4-D와 BA 영향 .....	95
3. 고생합성 변이체 켈러스 선발 .....	98
가. 색소 생합성 켈러스의 선발 .....	98

나. 생장곡선.....	102
다. 자색 변이체 켈러스의 안토시아닌 분석.....	104
라. 배양조건 확립.....	407
1) 배지조건의 실험.....	107
2) 당의 영향.....	109
3) 켈러스 접종량.....	112
4) 2,4-D와 BAP 혼합 처리의 영향.....	114
5) ABA 영향.....	116
6) Jasmonic acid 영향.....	118
제 4 절 결과 및 고찰.....	120
제 4 장 자색고구마 색소함량 제고를 위한 적정조건 구명.....	121
제 1 절 교잡육종에 의한 안토시아닌 색소 고함량 계통 선발시험목포 시험장.....	121
1. 수행방법.....	121
가. 인위 개화유도.....	121
나. 인공교배 및 결실, 채종.....	123
다. 실생종자 파종 및 선발 (실생1년, 실생개체선발시험).....	123
라. 계통선발 예비시험(실생 2년) 및 본시험(실생 3년).....	124
마. 안토시아닌 색가(color value)의 측정.....	124
2. 시험결과.....	126
가. 안토시아닌 색소 고함유 계통육성.....	126
1) 인공교배 현황 및 채종립수.....	126
2) 유망계통 선발.....	128
3) 색가 비교.....	130
3. 결과요약.....	132
2 절 재배방법에 의한 안토시아닌 색소함량 제고 적정조건 구명 시험.....	133

1. 수행방법 .....	133
2. 시험결과 .....	133
3. 결과요약 .....	134

## 제 1장 총 론

### 제 1 절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

식품에 첨가하는 색소는 식품의 품질이나 소비자의 선택을 결정하는 중요한 요소로써 작용하며, 이들 색소는 가공조건 등에 따라 변화하여 품질의 저하가 일어날 수 있다. 따라서 이러한 문제점들을 보완하기 위하여 인위적으로 합성한 식용색소를 첨가하는 방법이 널리 사용되고 있다. 그러나 합성색소들이 인체에 미치는 영향과 안정성 등이 식품업계와 의약계에 대두되면서 천연색소의 개발이 전 세계적으로 많은 관심의 대상으로 부각되고 있다. 이러한 천연색소들은 식물계에 널리 분포하며 이 가운데 anthocyanins은 가장 잘 알려진 색소로서 이미 약 300여 종이 보고된 바 있다.

최근 자색고구마의 품종이 목포시험장으로부터 개발되면서 이의 응용성에 대하여 많은 관심을 나타내고 있다. 자색고구마는 표피층 뿐만 아니라 육질 전체가 진한 자색을 띠고 있어 다른 어떤 식물성 색소원에 비교하여 anthocyanins을 대량 함유하고 있다. 자색고구마에 함유되어 있는 anthocyanins은 Zulin 등의 보고에 의하면 peonidin-3-diglucoside에 ferulic acid와 caffeic acid가 3:1 또는 2:1로 acylated된 형태라고 보고 하고있다 (1). 또한 국내에서 개발된 자색고구마의 anthocyanin 색소구조에 대한 보고는 농촌진흥청 목포시험장에서 이미 이루어진 바 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 새로이 육성 재배하기 시작한 자색고구마의 기내배양을 이용하여 anthocyanins의 대량생산하는 기법을 개발코자 한다.

생물산업이 본격화되면서 주요작물 및 자원식물의 조직배양과 gene transfer를 이용한 작물의 품종 개량과, 식용색소를 포함한 2차 대사물질을 대

량 생산하고자 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 기내배양을 이용한 식용색소의 대량생산 기법은 현재 산업화하기에는 아직 미비한 단계이다. 그 이유로는 색소 합성에 관여하는 유전자원이 옥수수나 parsley 등 일부 식물에서만 국한되어 있으며, 또한 이러한 유전자원을 다른 식물체에 전이시켜 색소식물로 형질 전환하기에는 다소 어려움이 있다. 그러나 고구마의 경우 조직 배양 방법이 타 작물에 비교하여 잘 개발되어 있는 상태이기 때문에 고구마의 일종인 자색고구마의 경우에도 비교적 용이할 것으로 기대된다. 따라서 현탁배양과 같은 in vitro system에서 cell line을 이용한 anthocyanins의 기내 대량생산기법을 개발, 자색고구마로부터 anthocyanin의 생합성 기전, gene transformation 및 돌연변이체의 유도 등을 통해 더 높은 생합성 능력을 갖는 품종개발이 요구된다.

## 2. 경제, 산업적 측면

현재 이용되고 있는 국내 식품업계나 의·약업계에서는 주로 인공색소와 일부 수입된 천연 색소를 사용하고 있는 실정이다. 그러나 식생활의 개선과 인공색소의 부작용 및 안정성 등에 대한 문제점과 함께 천연색소를 사용한 제품개발이 활발히 진행되어지고 있다. 이러한 시점에서 자색고구마의 anthocyanin 색소는 aromatic acyl group을 갖고 있기 때문에 안정성이 높다고 알려져 있으며, 식품의 색소(음료수, 요구르트, 잼, jelly등) 의약품, 화장품 등에 응용하여 유용하게 사용되고 있다(1). 따라서 국내산 자색고구마로부터 천연색소의 개발은 천연색소를 이용한 제품개발의 파급효과를 이루게 할 것으로 추측된다.

Anthocyanin을 포함한 flavonoid계열 화합물과 carotenoid 화합물 등은 천연색소로서 식품 업계와 의·약 업계에서 많이 이용되고 있으나, 이 천연색소들을 산업화하는 과정에는 대상 식물이 한정되어 있다는 문제점이 있다. 한

편 농촌진흥청 목포시험장에서 개발한 자색고구마는 대량의 색소를 함유하고 있어, 자색고구마의 cell line을 이용한 세포배양으로부터 anthocyanins의 생산은 저비용으로 높은 경제성을 지니고 있다. 따라서 수입에 의존하고 있는 천연색소나 의약 산업에 응용할 수 있는 물질 등을 개발하면 수입대체 효과는 물론 나아가 수출효과도 기대 할 수 있다.

### 3. 사회, 문화적 측면

사회가 발달할수록 인체의 부작용을 일으키는 인공색소를 천연색소로 대체하여 건강을 유지하려는 경향이 뚜렷하다. 이러한 요구를 충족시키기 위해 천연색소를 수입에 의존하기보다는 국내에서 개발하여 국민 건강의 피해를 최소화할 필요가 있다. 즉, 각종 음료수를 포함한 식품업이나 여성들의 화장품, 의약품 등에 천연색소를 사용함으로써 부작용을 최소화하고, 또한 항균 및 항산화 제품의 개발로 국민의 건강 증진을 도모할 수 있을 것이다.

## 제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

### 1. 연구개발의 목적

천연 식용색소에 대한 관심이 최근 급격히 부각하고 있으며, 그에 따라 천연색소 시장은 더욱 증가추세인 것으로 알려져 있다. 이와 같이 계속 증가 추세에 있는 색소시장을 목표로 각 나라들은 다양한 천연색소 개발을 서두르고 있으며, 국내시장 역시 인공색소 보다는 천연색소를 사용하려는 국민적 요구에 따라 시장의 규모가 증가할 것이다.

협동기관인 목포시험장에서는 1993년에 도입된 야생 자색고구마 유전자원(야마까와무라사끼)과 국내품종과의 인공교배에 의해 자색고구마 신품종육성



연구를 시작하였다. 본 연구는 일련의 육종과정을 거쳐 1998년부터 가시적인 성과가 달성되어 수량이 야생 유전자원보다 77%이상 증수되고 안토시아닌 색소 함량도 고품유된 “자미”(교배조합 : 건미/야마까와무라사끼) 품종을 개발하였다. 본 품종은 껍질색(皮色) 및 살색(肉色)이 모두 자색(紫色)으로서 안토시아닌(anthocyanin) 색소를 함유한 국내 최초의 고구마 품종이다. 본 품종의 개발에 따라 자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소의 용도 다양화 연구가 활성화되어 식품첨가 천연색소, 섬유 또는 목재 염색 등의 산업용 색소 등 색소의 순수추출에 의한 이용성 연구 및 안토시아닌 색소 함유 식품의 건강 기능성이 다각도로 연구되어 본 자색고구마 품종은 생산 및 소비자들로부터 건강기능성 품종으로 호평을 받게 되었다. 따라서 목포시험장에서는 지속적인 연구를 통해 고색소 함량의 품종 육성과 적정 재배조건을 구명하고자 하였다.

색소 공급원으로 포도보다 경제성이 뛰어난 자색고구마로부터 색소를 대량 생산하여 산업적으로 활용하려는 시도는 실현 가능성이 매우 높으며, 또한 경제적, 사회적으로 미치는 효과도 클 것으로 사료된다. 자색고구마로부터 생합성된 anthocyanin 색소는 aglycon의 종류와 결합되어 있는 당류, acyl 잔기 등에 따라 안정성이 다른 것으로 알려져 있기 때문에 포도와 다른 색소 성분을 함유하고 있는 고구마로부터 안정된 색소생산을 위하여 기술의 검토 및 개발이 요구된다. 즉, 자색고구마는 색소 생산성 면에서 포도를 능가하며 기내배양 방법 또한 포도 등에 비교하여 비교적 손쉽게 이루어질 것으로 기대한다. 생물산업이 본격화되면서 주요작물 및 자원식물의 조직배양을 통해, 식용색소를 포함한 2차 대사물질을 대량 생산하고자 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 기내배양을 이용한 식용색소의 대량생산 기법은 현재 산업화하기에는 아직 미비한 단계이다. 한편 자색고구마의 cell line을 이용한 세포배양으로부터 anthocyanins의 생산은 저비용으로 높은 경제성을 지니고 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 새로이 육성 재배하기 시작한 자색고구마의 기내배양을 이용하여 anthocyanins의 대량생산하는 기법을 개발하는 것이 목적이다. 연구의

목표가 실행될 경우 천연색소 생산방법의 개발을 통해 식품업이나 여성들의 화장품, 의약품 등에 천연색소를 대체 사용함으로써 부작용을 최소화하고, 수입에 의존하고 있는 천연 식용색소를 자체적으로 공급할 수 있으며 나아가 수출효과도 기대 할 수 있다

## 2. 연구개발의 범위

### ○ 효과적인 조직배양 방법의 개발

- 괴경조직과 잎조직을 이용한 callus의 유기 및 재분화  
캘러스의 유도 및 배발생 캘러스로의 전환 및 식물체의 재분화를 유도  
계대배양과 환경조건의 변화에서 활발히 성장하는 배양조건을 확립
- 다양한 품종의 조직배양을 통한 색소 고생합성 세포주의 선별
- 세포집합체의 클론화에 의한 선별 및 변이체의 선별  
조직배양방법을 기초로 온도, 빛조건 및 성장조절제를 조합하여 계대배양을 실행하는 동안 세포집합체 클론화에 의해 지속적이고 색소의 고생합성능을 갖는 cell line의 선별
- 조직배양을 이용한 기내 anthocyanins의 생합성 능력의 확인  
조직배양, 현탁배양, 계대배양과 세포의 선별과정에서 색소를 통한 육안식별과 HPLC를 통해 안토시아닌 색소의 생합성 능력을 확인

### ○ 현탁배양 기술의 확립

- 현탁배양 방법 개발  
지속적인 성장과 대량증식을 시킬 수 있는 배양방법을 확립

- 세포집합체의 클론화에 의한 선발 및 변이체의 선별 시작
  - 기내 생합성능을 향상키 위해 적합한 배양조건 즉, 성장조절제, 빛조건, 온도 그 밖에 무기염류 등의 조건을 변형시켜 cell line을 선발
  
- 기내 anthocyanins의 생합성을 분석 확인
  - 현탁배양, 계대배양과 세포의 선별과정에서 색소를 통한 육안식별과 HPLC를 통해 안토시아닌 색소의 생합성 능력을 확인
  
- 자색고구마 색소함량 제고를 위한 적정조건 구명
  - 다양한 품종의 자색고구마종을 경작지에서 격리재배와 확실한 병충해방제 등을 통해 유지관리
  - 재배과정에서 색소생합성에 영향을 미칠 수 있는 환경조건 및 재배방법을 구명

○ 자색고구마 색소함량 제고를 위한 적정조건 구명

- 교잡육종에 의한 안토시아닌색소 고함량 계통 선발시험

고구마 육종연구는 다른 작물들의 육종체계와 매우 비슷하게 주로 교전육종 방법으로 알려져 있는 “교잡육종”에 의한 새로운 변이체의 창성에 주로 의존하고 있다.

본 연구에서는 자색고구마로서 다수성이면서 안토시아닌 색소 고함유 품종을 육성하기 위하여 자색고구마 유전자원간 인공교배에 의해 얻어진 실생종자의 파종에 의해 유망계통을 선발하고자 하였다.

본 연구는 호남농업시험장 목포시험장에서 2001년부터 2003년까지 3년간 다 음과 같은 과정에 의해 수행하였다.

- 인위 개화유도

고구마의 교잡육종을 위해서는 반드시 꽃이 있어야 한다. 그러나 고구마는 우리나라와 같은 온대지역에서는 개화가 잘되지 않으므로 개화유도를 위한 많은 연구결과에 의해 나팔꽃대목에 고구마 접수를 접목하여 개화가 되도록 하고 있다.

▷ 나팔꽃 대목 양성 : 전년 10월 중순에 채종된 나팔꽃종자를 다음해 4월 상순에 종자소독한후 배유부분을 찢각하여 항온기에서 최아된 종자를 소형 비닐포트에 파종하여 온실에서 육묘하였다. 나팔꽃묘는 생육중에

主莖이 굵고 튼튼하도록 관리하여 접수고구마와의 접목이 용이하도록 재배하였다.

- ▷ 고구마 접수 재배 : 인공교배의 모·부본에 해당하는 고구마 품종 및 계통들을 씨고구마 파종 및 육묘를 위한 표준재배법에 준하여 3월 하순에 비닐하우스 묘상에 파종·육묘하여 접수로 사용하였다.
- ▷ 접목 및 접목묘 관리 : 접목은 6월 하순에 접수용 고구마 품종들의 지상부 30cm정도를 채취하여, 접목이 가능하도록 줄기두께가 굵게 자란 나팔꽃 대목의 頂端부위를 횡으로 절단하고 다시 중심부를 종으로 2cm정도 분할한 후, 접수용 고구마 품종의 줄기 하단부위 양면을 칼로 깎아서 분할된 나팔꽃 대목에 삽입하여 고정하는 방법으로 수행하였다. 접목부위의 고정은 파라핀(paraffin film)으로 감아 고정하였다.
- ▷ 초롱식지주대 설치 및 줄기 유인 : 접목 부위가 고착된 후 접수인 고구마 줄기가 자라게 되면 초롱식지주대를 설치하여 이후 계속해서 자라는 고구마 줄기의 중간 중간을 초롱식지주대에 끈으로 가볍게 묶어 유인하였다.
- ▷ 단일처리에 의한 개화유도 : 접목된 식물체를 자연일장이 짧아 단일처리를 하지 않아도 되는 겨울철에 야간온도를 15℃이상 유지할 수 있도록 가온시설이 갖추어진 유리온실과 비닐하우스에 두고 개화를 유도하여 동계 11월부터 다음해 3월까지 인공교배를 수행하였다.

#### - 인공교배 및 결실, 채종

접목 및 단일처리 방법에 의해 인위적으로 개화유도된 품종 각각에 대하여, 개화 전날 오후 3~5시경에 교배대상 품종별 柱頭(母本)로 사용될 완전 개화되지 않은 花蕾의 측면을 핀셋으로 가르고 5개의 수술을 제거한 후, 유산지 봉투를 씌워 집게로 봉하고, 다음날 오전 10~11시 사이에 父本이 될 꽃을

따서 제공된 꽃의 주두에 화분을 묻혀주는 방법으로 수분하여 인공교배를 수행하였다. 인공교배에 의한 수분후 여름철에는 20일 정도, 겨울철에는 40일 정도에 채종이 가능하였다.

- 실생종자 과종 및 선발 (실생1년, 실생개체선발시험)

인공교배에 의해 채종된 종자는 교배조합별로 정리하여 묘상에 과종하고 종자로부터 발아된 묘를 잘라 본밭에 삽식하여 이로부터 생성된 괴근을 수확, 유망계통을 선발하였다. 고구마 종자는 경실종자로서 자연상태에서는 발아가 잘 되지 않는다.

본 연구에서는 종자의 배에 가까운 배유부분을 찢각하여 흡습이 용이하도록 하여 발아시켜 묘상에 과종하였다. 묘상관리 및 묘재배는 목포시험장의 표준방법에 준하여 실시하였다. 묘상에서 묘가 30 ~ 40cm 정도 자라면 6월 상·중순경에 뿌리째 뽑아서, 뿌리부분을 완전 제거하고, 하루나 이틀 정도 그늘에 두어 충분히 경화시킨 뒤 본밭에 75 × 50cm 간격으로 두둑 위에 삽식한다. 삽식방법은 고구마 표준재배법에 준하여 실시하며, 삽식후의 관리는 고구마의 일반재배 방법과 동일하게 실시하였다.

본밭에 삽식된 묘에서 괴근이 형성되면 10월 중순경에 굴취 수확하여 갯수가 많이 달리고 외관형상이 유망하며 용도별로 적합하다고 판단되는 괴근에 대하여 식물체 개체별로 선발하여, 다음해에 계통선발 예비시험(실생2년)에 과종하고자 겨울철에 일반고구마의 저장방법과 동일하게 저장하였다 고구마는 유전적으로 염색체수가 많고 다배체이므로 인공교배에 의해 결실된 종자 하나 하나로부터 각각 매우 다양한 변이체가 창성되므로, 일반적으로 실뿌리와 같은 괴근으로부터 대단히 크게 비대된 괴근까지 크기나 모양 및 껍질색에 있어서 다양한 표현형을 나타낼 뿐만 아니라 성분, 맛, 전분함량 등에서도 모

두 다른 개체들이 출현한다.

- 계통선발 예비시험(실생 2년) 및 본시험(실생 3년)

실생1년에서 선발된 유망계통은 실생2년부터는 일반고구마의 재배방법과 동일하게 파종·수확되어 선발되는데 이는 고구마가 영양번식을 주로 하는 작물이므로 실생2년 이후의 과정은 증식에 의해 많은 특성들을 검사하면서 선발하는 과정으로 볼 수 있다. 이후의 과정은 실생4~5년차에서 생산력검정 예비시험 및 본시험, 실생 6~9년차에서 지역적응시험 및 실증시험을 거쳐 하나의 품종이 육성되므로 농가에서 신품종을 재배하기에는 약 10년의 기간이 경과 된다.

- 안토시아닌 색가(color value)의 측정

안토시아닌 함량의 척도인 색가측정은 다음과 같은 방법으로 하였다.

안토시아닌 색소추출을 위한 구연산나트륨 완충용액은 0.1M 구연산과 0.2M 인산이나트륨용액을 4 : 1 로 혼합하여 pH 3.0으로 조정된 것을 사용하였다. 생고구마를 절단하여 10g 정도 평량하여 구연산나트륨 완충용액 100ml를 넣은 후 믹서로 마쇄하여 No. 6 여과지로 여과하였다. 이 여액을 다시 구연산나트륨 완충액으로 2배 희석하여 비색계의 액층 1cm, 파장 530nm에서 흡광도를 측정하여 색가를 환산하였다.

〈색가(E 10%, 1cm) = 흡광도 × 10 ÷ 시료량(10g) × 희석배수(2)〉

## 제 2장 조직배양 방법의 확립

### 제 1 절 실험재료 및 방법

○ **식물재료** : 잎 조직배양은 무안시험장에서 공급 받은 3개의 품종과 2개 라인(자미, 보라미, 신자미, IT310, 무안 5호)을 기내에서 무균상태로 성장시켜 사용하였다. 식물체 증식은 MS 기본배지에 sucrose를 3 % 첨가하여 16시간 일장으로 5000 ~ 7000 lux의 cool-white 형광, 26℃의 배양실에서 배양하였다.

괴근 조직배양은 무안시험장에서 공급받은 괴근으로 단기간 실험실(26℃)에서 보관하여 사용하였다.

○ **배지제조 및 조직배양 조건** : 배지는 MS(3 % sucrose와 0.01 % myo-inositol이 첨가)배지를 기본배지로 하여 실험마다 여러 농도의 성장조절제를 첨가하여, pH 5.8로 조절하고 phytagel을 0.3 % 첨가하여 고압멸균기(121℃에서 15분간)에서 멸균하여 60 × 10 mm petri dish에 10 ml씩 분주하였다. 각각의 petri dish에 4개 또는 9개의 절편체를 처리하여 반복하여 캘러스 성장 상태에 따라 배양 후, 1주 간격 혹은 12, 24, 30일에 각각 관찰하여 캘러스 생장률, 발근률, 안토시아닌 생합성률, shoot수 등을 조사하였다.

모든 조직배양은 26±1℃로 조절되는 배양실에서 0 lux, 3000 lux(약광), 6000 lux(강광)의 광도로 24시간/일 조명 하에서 배양하였다.

○ **검량선 작성 및 안토시아닌 함량 측정** : 무안시험장에서 공급받은 자색고구마 색소분말을 정량적으로 취하여 0.1 % citric acid를 함유하는 20 % ethanol 추출용액에 녹인 후 530 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하



였다. 시료의 안토시아닌 함량 측정은 시료를 1 mm × 1 mm 정도로 세절한 후, 0.3 g을 취해 추출 용매 6 mL을 첨가하여 24시간 동안 30℃로 유지하여 추출 한 뒤, 800 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분광광도계를 사용하여 530 nm에서 색소의 함량을 조사하였으며, 정확한 안토시아닌 분석은 HPLC를 통해 실행하였다.

## 제 2 절 잎 조직을 이용한 조직배양과 자색캘러스 선발

### 1. 캘러스의 유도

무균 생장한 자색고구마 3개의 품종과 2개의 라인을 정단 분열조직에서 3 ~ 6번째, 2 ~ 3 cm 크기의 잎을 가장자리와 주맥을 제거하고 0.5 × 0.5 cm 크기로 잘라 배양 배지에 치상하였다.

배양 배지는 MS 기본배지에 0, 1, 10, 100 μM 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50 μM BA를 혼합 처리하였다. 조건 당 4개씩의 잎 절편(0.5 × 0.5 cm)을 치상하여 4반복 실시하여 배양 후, 캘러스의 형성률과 배발생 캘러스 형성률을 조사하였다.

배양 결과 전체적으로 1 μM 2,4-D와 BA 혼합 처리한 배지가 단독 성장조절제를 첨가한 배지보다 훨씬 더 빠른 캘러스 성장을 나타냈다.

성장 조절제를 첨가한 배지에 잎 절편체를 치상한 후, 빛 조건과 관계없이 4 ~ 5일 후부터 상처 부위가 비대하기 시작하면서 캘러스가 형성되었다. 비대한 절편체는 시간이 경과함에 따라 배발생 캘러스(Type A), 황색의 쉽게 부서지는 캘러스(Type B), 녹색의 쉽게 부서지는 캘러스(Type C), 녹색의 밀집형 캘러스(Type D)등 주로 4가지 형태의 캘러스로 유도되었다(Fig. 1). 이러한 형태의 캘러스 형성률은 품종에 따라 차이가 있었는데, 자미, 보라미, 신자미,

IT310, 무안 5호의 잎 절편체를 0 ~ 100  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0 ~ 50  $\mu\text{M}$  BA를 혼합 처리한 MS 배지 상에서 4주간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 캘러스 생장이 가장 높은 조건은 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0.5 ~ 50  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구였다.

생장조절제 농도에 따른 캘러스 형태는 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독 처리 조건과, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 저농도의 BA 혼합 처리구에서 Type A형의 캘러스가, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구에서 Type B형의 캘러스가 주로 형성되었다. 1 ~ 10  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리 구에서는 Type C형의 캘러스가, BA가 단독 첨가된 조건과 2,4-D에 50  $\mu\text{M}$  BA가 첨가된 조건에서는 Type D형의 캘러스가 주로 형성되었다. 배양 4주 경과 시 Type B, C, D형의 캘러스 생장이 Type A형의 캘러스의 2배 정도를 나타냈다. 품종별 형성된 캘러스 형태는 IT310에서 주로 Type A형의 캘러스가 높은 비율로 나타났고, 자미와 보라미에서는 주로 Type B, C, D형의 캘러스 형성률이 높았으나, 품종간 많은 차이를 나타냈다.  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독처리시 3개 품종과 2개 라인에서 모두 배발생 캘러스를 유도 할 수 있었다. 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리시 BA 처리 농도가 높아 질수록 배발생 캘러스 형성률이 낮아져 자색고구마 잎 조직 유래 배발생 캘러스 형성에는 BA가 부정적인 것으로 조사되었다.

캘러스 증식에는 1  $\mu\text{M}$  2,4-D에 0.5 ~ 50  $\mu\text{M}$  BA 첨가 시 효과적이었는데, 신자미는 모든 처리구에서 캘러스와 배발생 캘러스 형성률이 낮아 잎 조직배양용 품종으로는 부적절 하였다. 또한, 10  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 구에서는 캘러스 형성률과 배발생 캘러스 형성률이 모두 감소하였으며, 100  $\mu\text{M}$  2,4-D가 처리된 배지에서는 배양 1주 이내에 모든 절편체가 갈변 괴사하였다. 따라서, 자색고구마 잎 조직 배양 시 2,4-D 처리는 1  $\mu\text{M}$ 의 농도가 적절한 것으로 판단되었다.

배양 6주 후부터는 0 ~ 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 구에서도 부분적 갈변이 진행되어 8주째에 50 %가 괴사하였다. 따라서, 캘러스의 유지와 증식을 위해서는 최

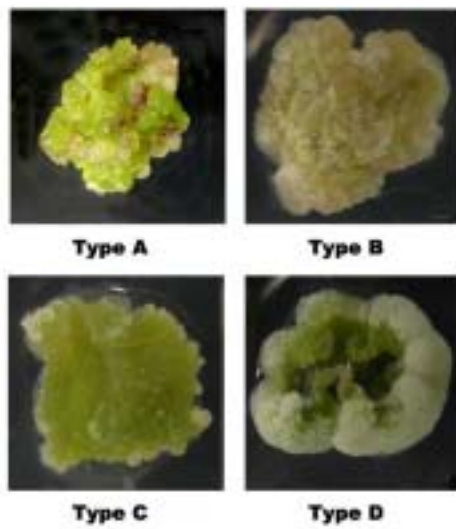
소 6주 이내에 계대배양이 요구되었다. 2,4-D와 BA를 첨가한 조직배양과 동일한 농도 혼합으로 NAA와 BA 혼합에 의한 캘러스 형성에 대한 실험 결과는, 전체적으로 2,4-D 혼합 처리구와 유사한 발달 양상을 나타냈다. 그러나 Type A형의 캘러스는 형성되지 않았고 부정근 발생이 많이 유도되어 자색고구마 조직배양의 이용에는 부적절하게 판단되었다. 배양 4주째 동일 조건으로 계대배양을 시행하여 캘러스를 유지, 증식시키고자 하였으나 캘러스는 더 이상 증식하지 않았고 배발생 캘러스는 모두 부정근으로 발달하였다.

**Table 1.** Effect of plant growth regulators on the callus formation from leaf disk cultures of purple sweet potato(three cultivars; 'Jami'; 'Borami'; 'Sinjami'. two lines; 'IT310' '무안 5') after 4 weeks of culture. (bold ; good response of callus formation, underline ; embryogenic callus formation)

		Jami	Borami	Sinjami	IT310	Muan 5
0 $\mu$ M 2,4-D	0 $\mu$ M BA	-	-	15 $\pm$ 5	5 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	0.5 $\mu$ M BA	40 $\pm$ 5	35 $\pm$ 5	60 $\pm$ 10	40 $\pm$ 5	50 $\pm$ 5
	5 $\mu$ M BA	<b>70<math>\pm</math>10</b>	<b>93<math>\pm</math>10</b>	<b>80<math>\pm</math>10</b>	60 $\pm$ 10	50 $\pm$ 5
	50 $\mu$ M BA	<b>80<math>\pm</math>5</b>	35 $\pm$ 5	75 $\pm$ 10	55 $\pm$ 5	15 $\pm$ 5
1 $\mu$ M 2,4-D	0 $\mu$ M BA	<u>80<math>\pm</math>5</u>	<u>30<math>\pm</math>5</u>	<u>35<math>\pm</math>5</u>	<u>80<math>\pm</math>5</u>	<u>80<math>\pm</math>10</u>
	0.5 $\mu$ M BA	<b>98<math>\pm</math>5</b>	<u>90<math>\pm</math>5</u>	<u>60<math>\pm</math>10</u>	<b>95<math>\pm</math>5</b>	<u>90<math>\pm</math>15</u>
	5 $\mu$ M BA	<b>90<math>\pm</math>5</b>	<b>95<math>\pm</math>5</b>	75 $\pm$ 10	<b>95<math>\pm</math>5</b>	<b>95<math>\pm</math>10</b>
	50 $\mu$ M BA	70 $\pm$ 5	<b>90<math>\pm</math>10</b>	60 $\pm$ 5	<b>80<math>\pm</math>5</b>	40 $\pm$ 5
10 $\mu$ M 2,4-D	0 $\mu$ M BA	5 $\pm$ 0	-	35 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	0.5 $\mu$ M BA	30 $\pm$ 5	<u>40<math>\pm</math>5</u>	35 $\pm$ 5	40 $\pm$ 5	25 $\pm$ 5
	5 $\mu$ M BA	70 $\pm$ 10	60 $\pm$ 5	60 $\pm$ 10	50 $\pm$ 10	30 $\pm$ 5
	50 $\mu$ M BA	45 $\pm$ 10	-	35 $\pm$ 10	45 $\pm$ 15	0 $\pm$ 5
100 $\mu$ M 2,4-D	0 $\mu$ M BA	-	-	-	-	-
	0.5 $\mu$ M BA	-	-	-	-	-
	5 $\mu$ M BA	-	-	-	-	-
	50 $\mu$ M BA	-	-	-	-	-

**Table 2.** Types of calli induced from leaf explants of purple sweet potato cultured on MS media containing 0~100  $\mu\text{M}$  2,4-D and 0~50  $\mu\text{M}$  BA after 4 weeks of culture.

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



**Figure 1.** Growth pattern of calli derived from leaf explants of purple sweet potato.

## 2. 배발생 켈러스 형성

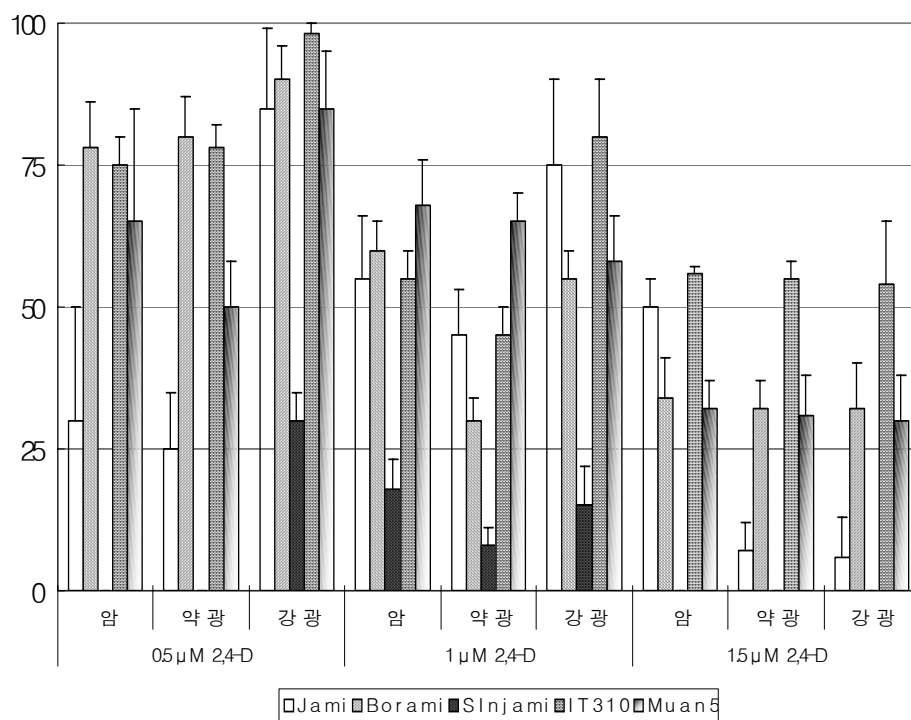
잎 조직을 이용한 재분화 식물체를 유도하기 위해서 배발생 켈러스 최적 유도 조건을 확립하고자 하였다. 자색고구마 잎 조직배양에서 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 시 3개의 품종(자미, 보라미, 신자미)과 2개의 라인(IT310, 무안 5호) 모두에서 배발생 켈러스를 유도할 수 있었다. 자미, 보라미, IT310과 무안 5호는 배발생 켈러스가 높은 비율로 형성되었으며, 신자미는 다소 낮게 형성되었다. 이는 저농도의 2,4-D 단독 처리가 자색고구마 배발생 켈러스 유도에 일반적으로 적용될 수 있는 농도로 판단되었다. 따라서, 저농도의 2,4-D를 단독 처리함으로써 품종과 2,4-D 농도에 따른 배발생 켈러스 형성률을 비교하였다.

MS 기본 배지에 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1.5  $\mu\text{M}$  2,4-D를 첨가한 고체 배지를 고압멸균한 후 60 mm  $\times$  10 mm petri dish에 10 ml 씩 분주하였다. 3개의 품종과 2개의 라인의 무균생장하고 있는 잎 조직을 이용하여 0.5 cm  $\times$  0.5 크기로 잘라 4개씩 처리하여 4반복 시행하여 암과, 약광(3000 lux), 강광(6000 lux)에서 배양하여, 품종간 광조건과 2,4-D 농도 차에 따른 배발생 켈러스 형성률을 조사하였다.

잎 조직을 이용한 켈러스 유도 방법과 동일한 방법으로 잎 조직을 채취한 후 0.5, 1, 1.5  $\mu\text{M}$  2,4-D를 첨가한 MS 기본배지에서 치상하여 암, 약광(3000 lux), 강광(6000 lux)에서 4주간 배양 후 품종 간 배발생 켈러스의 형성률을 조사하였다. 4주 후, 배발생 켈러스 형성률을 조사한 결과는 Figure 2에서 보는 바와 같다. 품종 간에는 IT310이, 광 조건은 강광(6000 lux)에서, 2,4-D 농도는 0.5  $\mu\text{M}$ 에서 배발생 켈러스 형성이 가장 높았다. 강광 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 시 IT310, 보라미, 자미, 무안 5호 및 신자미가 각각 98, 90, 85, 85, 30 %의 빈도로 배발생 켈러스를 형성하여 IT310이 가장 높았다. 동일 품종 내에서 2,4-D 농도가 높아질수록 배발생 켈러스 형성률은 낮아졌다. IT310은 모든 처리구에서 비교적 높은 켈러스 형성률을 나타내었으나, 자미, 보라미와 무안 5호는

2,4-D 농도와 광 조건에 예민한 반응을 보였다. 한편, 신자미는 0.5  $\mu$ M 2,4-D 처리구의 강광 조건에서 최고 30 %의 배발생 켈러스 형성능을 보이는 등 모든 처리구에서 30 % 미만의 배발생 켈러스 형성률을 나타내어 조직배양에 이어 배발생 켈러스 유도에도 부적합한 품종으로 판단되었다.





**Figure 2.** Frequencies of embryogenic calli formation from leaf disk cultures of purple sweet potato on MS medium containing 0.5~1.5  $\mu$ M 2,4-D under various light intensity.

### 3. 식물체의 재분화

자색고구마 잎 조직을 이용하여 유도한 배발생 캘러스를 이용하여 재분화를 유도하고자 하였다. 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D를 첨가하여 강 광 조건에서 4주간 배양하여 유도한 배발생 캘러스를 먼저 1, 3, 5  $\mu\text{M}$  ABA가 첨가된 배지에 옮겨 4, 12, 24일 동안 배양한 후, 3, 6, 9  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 계대 배양해 재분화 가능성을 조사하였다.

잎 조직의 절편체로부터 shoot가 2 cm 크기의 소식물체로 성장하면 절단하여 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에 옮겨 발근을 유도하였다. 어린 식물체를 화분으로 옮겨 밤과 낮이 26/21 $^{\circ}\text{C}$ , 6000 lux, 16시간 광 조건에서 배양하였다. 조직배양과 배발생 캘러스 유도가 어려웠던 신자미를 제외한 자미, 보라미, IT310, 무안 5호의 배발생 캘러스를 1, 3, 5  $\mu\text{M}$  ABA가 첨가된 배지에서 배양한 후 3, 6, 9  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에서 3주간 배양한 결과, IT310에서 20 ~ 25 %의 낮은 비율로 재분화 식물체를 유도할 수 있었다 (Table 3)

ABA 처리 후, GA<sub>3</sub> 첨가 배지에서 일주일 이내에 뿌리 형성이 시작되었는데 ABA 처리 농도가 높을수록 같은 농도 GA<sub>3</sub> 첨가배지로 계대 배양 시 뿌리 발생이 높았다.

물기 있고 촉촉해 보이던 Figure 3의 A형과 같은 배발생 캘러스는 ABA 처리 후, GA<sub>3</sub> 배지에서 갈변이 진행되는데, ABA와 GA<sub>3</sub> 농도가 높을수록 그 정도가 심하였다.

GA<sub>3</sub> 첨가 배지에서 Figure 3의 B에서 보이는 자색의 밀집형 캘러스에서 재분화 식물체가 유도되는데 IT310이 경우 5  $\mu\text{M}$  ABA 처리 후, 3  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> 처리시 20 %의 재분화 식물체를 유도할 수 있었으며, GA<sub>3</sub>의 처리기간이 길어질수록 자색 밀집 부분의 형성이 높게 나타났으며 6  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>에 배양할 경우 25 %의 shoot가 형성되었다. 그러나, 자미, 보라미, 무안 5호는 동일한 방법으로

재분화 식물체를 유도할 수 없어 품종간 큰 차이를 나타냈다.

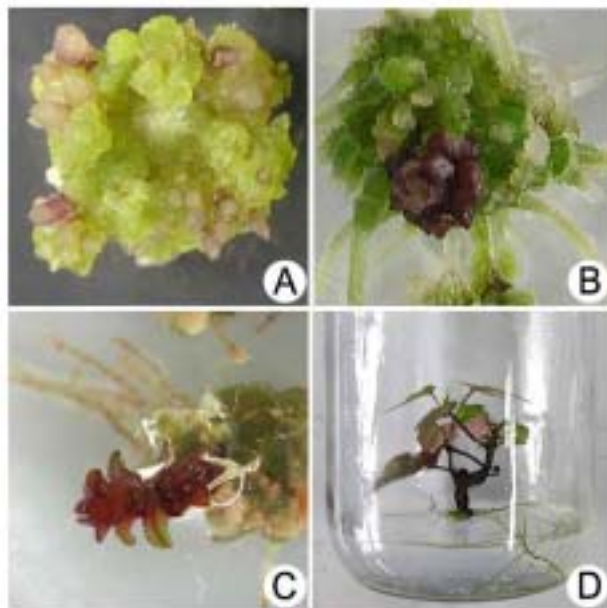
일 조직 유래 배발생 켈러스를 성장조절제가 제거된 MS 배지로 계대배양할 경우 shoot의 형성은 전혀 이루어지지 않았으며, 단지 부정근이 형성되었고 배발생 켈러스에 ABA 첨가 배지에서 배양한 후 MS 기본배지로 계대 배양할 경우에도 재분화는 일어나지 않았다. 또한 2,4-D와 저 농도의 kinetin을 혼용 처리시 자색고구마의 배발생 켈러스는 뿌리발생 이후 갈변과 함께 괴사하였다. 그러나 ABA 처리에 이어 GA<sub>3</sub>를 처리함으로써 재분화를 유도 할 수 있었는데, 이는 자색고구마 즉, IT310의 경우 식물체 재분화에 GA<sub>3</sub>가 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 즉, 자색고구마의 재분화 유도에는 배발생 켈러스의 생성 후, 단독조건에서 ABA의 처리가 중요한 단계로 추측되며 농도는 5 μM이 가장 적합하였다. 이어서 GA<sub>3</sub> 첨가 배지에 계대배양을 실행하여 shoot 형성을 유도할 수 있었다. 형성된 shoot가 5 cm 정도로 성장하면 성장조절제를 첨가하지 않은 MS배지에서 발근을 유도하였고(Fig. 3C), 배양 10주 후에는 완전한 소식물체를 얻을 수 있었다(Fig. 3D). 기내 소식물체(초장 약 7 ~ 8 cm)를 포트에 이식하여 정상적으로 생육하였다.

동일 실험 방법으로 자미, 보라미, 무안 5호에서는 재분화를 유도할 수 없어 재분화를 유도하기 위해서는 실험 초기 품종 선택이 중요하였다. 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.

**Table 3.** Organogenesis from embryogenic callus derived from leaf disk of purple sweet potato 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  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>.

ABA ( $\mu\text{M}$ )	1			3			5			
	4	12	24	4	12	24	4	12	24	
GA <sub>3</sub> ( $\mu\text{M}$ )										
3	S	0	0	0	0	0	0	20	20	20
	R	80	90	80	100	80	80	100	90	80
6	S	0	0	0	0	0	0	25	0	0
	R	90	90	80	80	90	80	100	80	80
9	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	90	90	80	80	90	90	100	90	90

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



**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  $\mu\text{M}$  2,4-D; B, Development of shoot in regeneration medium supplemented with 6  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>, after 12 days of culture on medium containing 5  $\mu\text{M}$  ABA; C, D, Normal plantlet formation after 50 and 60 days culture, respectively.

#### 4. 높은 안토시아닌 생합성을 위한 배양 조건

##### 가. 자색 켈러스 선발

국내 자색고구마 잎 조직을 2,4-D와 BA, NAA와 BA, NAA와 kinetin을 혼합 처리하여 조직배양을 시행하던 중 보라미와 신자미의 저농도 2,4-D 처리구에서 자색 켈러스를 유도하였다. 보라미, 신자미 잎 조직유래 자색 켈러스는 저농도 2,4-D 처리구에서 배발생 켈러스와 함께 형성되었는데, 이때 광조건과 배양기간에 따른 자색 켈러스 형성률을 조사하고자 하였다. 두 품종을 이용하여 조직배양에서 광조건과 배양기간에 따른 자색 켈러스 형성률을 조사하여 잎 조직 유래 자색 고함유 켈러스를 선발하고자 하였다.

실험 방법은 0.5  $\mu$ M 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 보라미와 신자미 잎 조직을 0.5 cm  $\times$  0.5 cm 크기로 잘라 9개의 절편체를 집중하여 각각의 광 조건당 6회 반복하여 4회 실험하였다. 광 조건은 암과 약광(3000 lux), 강광(6000 lux)으로 하였으며, 배양 2주 후부터 1주 간격으로 자색 켈러스 형성률을 백분율로 조사하고 안토시아닌 함량을 spectrophotometer로 간이 정량하였다.

자색 켈러스 형성률은 전체 절편체당 자색면적 비율이 20 %이상 자색인 켈러스 수를 조사하여 전체 켈러스에 백분율로 나타냈으며(Fig. 5), 사용된 petri dish중 4개를 임의 선발하여 안토시아닌 함량을 측정하였다(Fig. 6).

배양기간에 따른 켈러스의 형태적 변화는 다음과 같다. 보라미의 경우 전체적으로 배양 2주 후 잎맥이 자색으로 변화하며(Fig. 4A) 조직 절편의 켈러스화가 시작되었다. 배양 3주 후부터 상처부위에 배발생 켈러스가 형성되기 시작하여 육안 식별이 가능한 선명한 자색을 형성하였다(Fig. 4B,C). 보라미 잎 조직으로부터 Figure 4의 B형태의 자색 색소를 함유한 배발생 형태의 켈러스를 배양 2 ~ 4주째에 약광(3000 lux)하에서 Figure 5에 나타난 바와 같이 배양구의 최대 90 %까지 단기간에 대량으로 잎 조직으로부터 유래 된 자색 켈러스

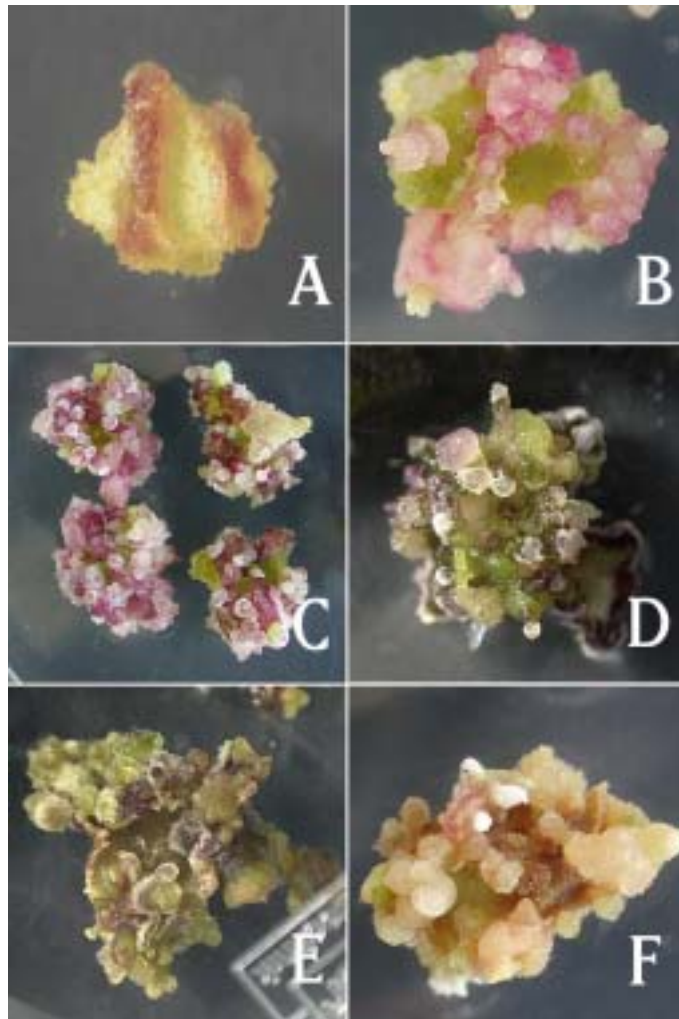
를 얻을 수 있었다. 그러나, 배양 6주 경과 후 자색의 구상형 배발생 켈러스는 원추형(Fig. 4D), 건조 밀집 형태(Fig. 4E,F)로 갈변하였다. 지속적인 성장을 위해서는 6주 이내에 계대배양이 필요하다고 판단되었다. 특이하게도 배양 2, 3, 4, 5, 6주 된 각각의 켈러스를 동일 조건으로 계대배양 할 경우 2주 이내에 자색 색소가 저하되는 특징이 육안으로 관찰되며 4 ~ 6주 후 완전히 사라져 자색 켈러스 유지가 불가능하였다. 켈러스 형태는 배발생 켈러스 형태에서 4 ~ 6주 후, 약 70 %가 부정근으로 분화되었다.

자색고구마 잎 조직을 이용한 배양과정에서 광 조건이 색소생합성에 미치는 영향에 대한 결과는 Figure 5, 6에서 보는 바와 같다. Figure 5는 배양기간에 따라 켈러스 면적의 20 % 이상은 자색이 함유한 절편체 수를 조사한 것이며, Figure 6은 광조건과 배양기간에 따른 안토시아닌 색소의 생합성량을 spectrophotometer를 통해 정량적으로 나타낸 것이다. 본 실험 조건 범위 내에서는 배양 2주 후 전체의 70 ~ 90 % 이상의 절편체가 자색 색소를 형성하며, Figure 5, 6에서 보는 바와 같이 암조건보다 광 조건에서 안토시아닌 생합성이 효과적이었다. 또한 본 실험결과에 따르면 자색 켈러스 유도에는 강 광조건(5000 ~ 6000 lux)에 비교하여 약 광 조건이 더욱 효과적으로 나타났다. Figure 6의 결과에서 배양 6주 이후 안토시아닌 생합성 함량이 다소 증가하는 것으로 나타나는데 Figure 5와 연관시켜 전체적으로 비교 할 경우 배양구의 30 % 정도에서 자색 켈러스가 유지 되는 것으로 나타났다.

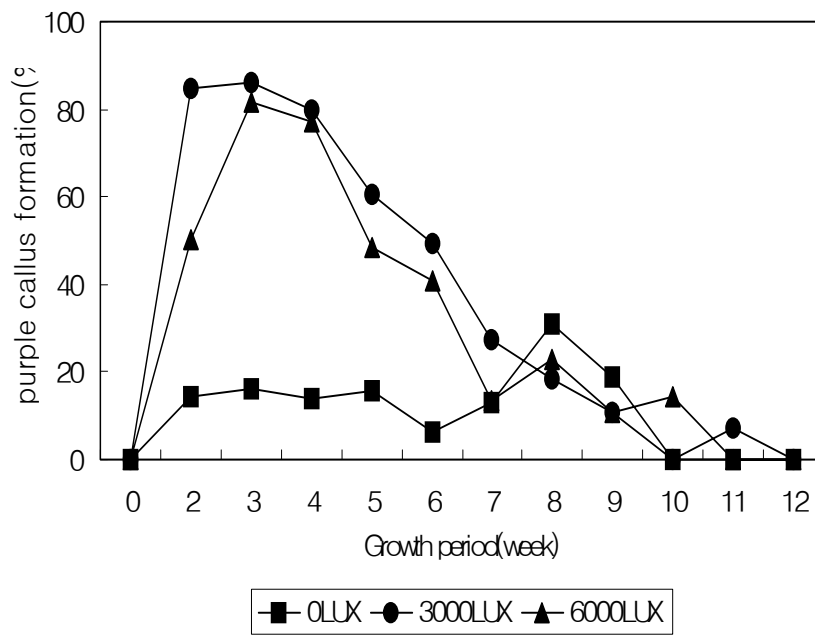
암 조건에서는 광 조건에 비교하여 1주 후 즉, 3주째에 대부분의 절편체 잎 맥에서 Figure 4의 A형태와 같이 나타냈으나, 배양 4주째에 Figure 4의 B형태로 성장하지 못하고 대부분 갈변화가 진행되었다. 그러나, 암배양 8주째에는 괴사하지 않고 자색의 배발생 켈러스 형태를 유지하는 경우가 전체 배양구의 30 %정도를 차지했다(Fig. 6). 이들은 10주 이후까지 괴사하지 않고 양호한 상태로 유지되었으며, 이 같은 결과는 초기 생장이 느리게 진행되기 때문에 장기간 동안 지속적인 생장이 유지되는 것으로 추측된다.

전체적으로 배양기간이 2주, 4주, 6주, 8주로 지속되면서 켈러스의 육안 식별을 통한 형태변화는(Fig. 4) 배발생 켈러스에서 비배발생 켈러스로 변화되며, 색소 형성능도 동시에 저하되는 것으로 추측된다. 동일 실험을 신자미로 2반복 실시한 결과 6000 lux에서 배양 3주째 Figure 4의 B와 유사한 형태가 전체 절편체의 2 %에서 나타나 품종에 따른 많은 차이를 나타냈다.

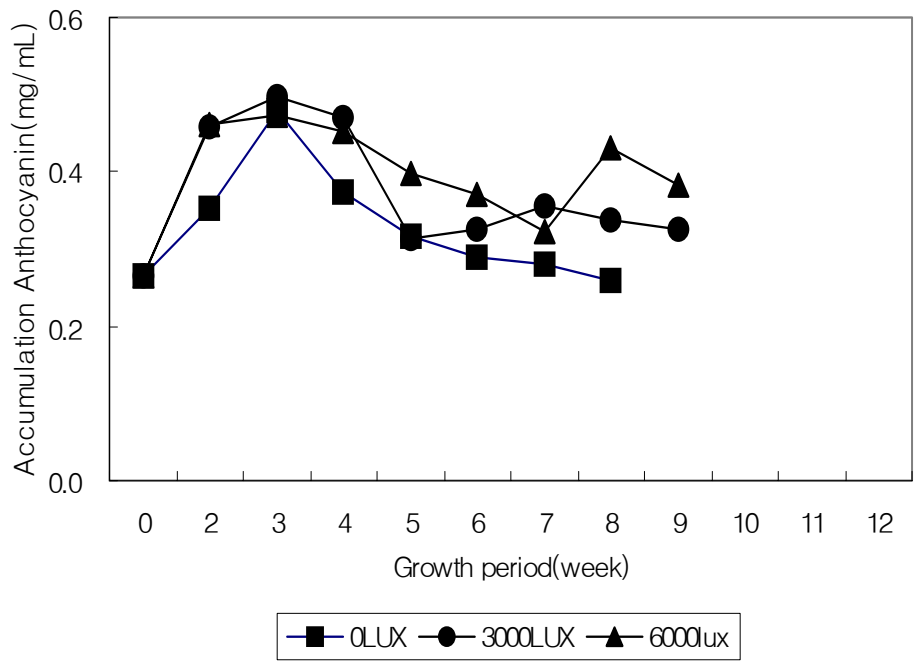




**Figure 4.** Morphological patterns of purple embryogenic callus from purple sweetpotato cv. Borami. A, 2 weeks after culture; B, C, 3~4 weeks after culture; D, E, 6 weeks after culture; F, 10 weeks after culture.



**Figure 5.** Effect of light intensity on the purple callus formation in tissue culture of purple sweetpotato.



**Figure 6.** Effect of light on accumulation of anthocyanin in tissue culture of purple sweetpotato.

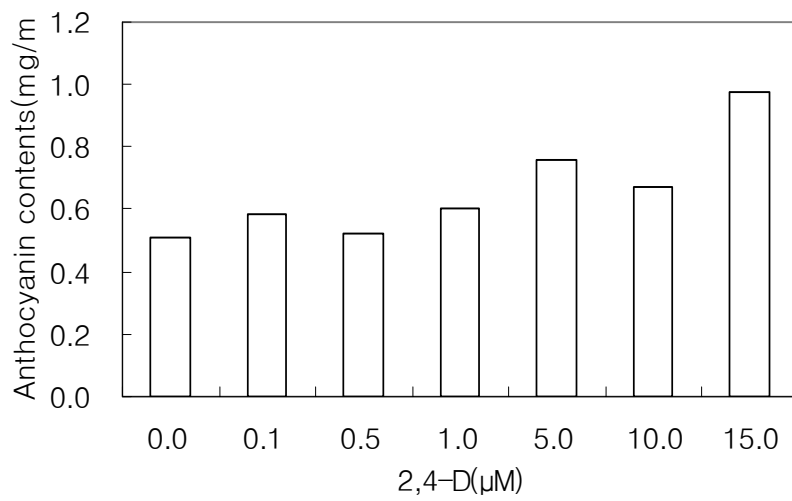
## 나. 성장조절제 처리

보라미 잎 조직을 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 첨가 배지에 2 ~ 4주간 배양하여 고빈도 자색 캘러스를 유도할 수 있었다. 그러나, 4주 후 자색 캘러스 빈도는 급격히 감소하였고 색소 함량도 저하 되었다. 캘러스 형태 또한 Figure 4의 D, E 형태로 변화하여 배양 4주에는 계대배양이 요구되었다. 따라서, 배양 2 ~ 4주에 형성된 자색 캘러스는 이어지는 다양한 성장조절제가 조합 처리된 배지에 계대 배양하여 자색 캘러스의 유지 및 증식 가능성 여부를 조사하였다.

### 1) 2,4-D 처리

보라미 잎 조직배양으로부터 형성된 자색 캘러스를 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15  $\mu\text{M}$  2,4-D 첨가배지로 계대배양 하여 2주 후 캘러스 형태를 비교하고 안토시아닌 생합성량 변화를 측정하였다(Fig. 7). 실험 결과 모든 처리 구에서 계대배양시 Figure 4의 D형태를 유지하였으며, 캘러스 생장은 육안으로 판단하기 어려울 정도로 생장이 미비하였다.

배지와 0.1  $\mu\text{M}$  2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 뿌리가 발생하였으며, 10  $\mu\text{M}$  처리 구에서는 약간의 갈변이 진행되면서 캘러스 조직이 무르게 변화하였다. 캘러스의 생장은 매우 미비하였다. 보라미 잎 조직유래 자색 캘러스의 안토시아닌 함량은 2,4-D 농도가 높아질수록 증가하는 것으로 나타나 15  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 시에 1 mg/mL를 합성하여 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구의 2배가량을 생합성 하였다. 그러나, 이는 고농도로 캘러스 조직이 무르게 변화하여 괴사하여 계대배양으로 증식시킬 수 없어 유지가 불가능 하였다.

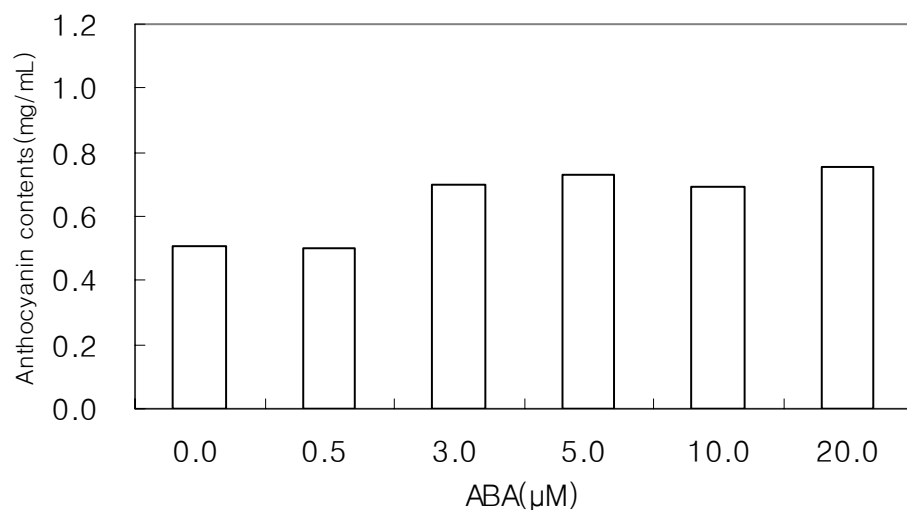


**Figure 7.** Effect of 2,4-D on the amount of anthocyanin contents. Data were evaluated at 2 weeks after 2,4-D treatment.

## 2) ABA 처리

0, 0.5, 3, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  ABA 첨가배지로 계대배양 하여 2주 후 캘러스 형태와 안토시아닌 생합성량 변화를 측정하였다(Fig. 8). 그 결과, 2,4-D 처리 시와 유사하게 캘러스 생장은 거의 없었으며 저농도 즉, 0.5  $\mu\text{M}$  ABA 처리구에서 뿌리가 발생 하였으며, 3  $\mu\text{M}$  이상 처리 구에서 뿌리 발생이 없었다.

안토시아닌 생합성량은 0.5  $\mu\text{M}$  ABA 처리 시 0.503 mg/mL을 합성했으며, 20  $\mu\text{M}$  ABA 처리 시 0.76 mg/mL로 가장 높게 나타났으나, 15  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 시 보다 낮아 비효과적이었다.



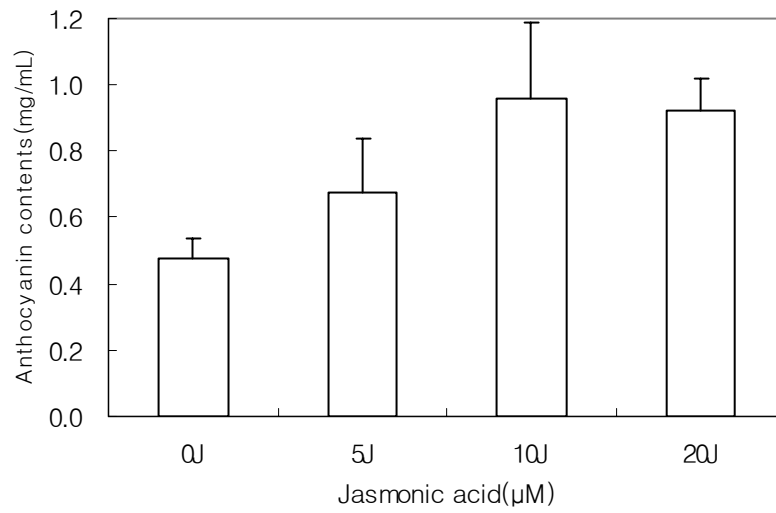
**Figure 8.** Effect of ABA on the amount of anthocyanin contents. Data were evaluated at 2 weeks after ABA treatment.

### 3) Jasmonic acid 처리

보라미 잎 조직을 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 첨가배지에서 2 ~ 4주간 배양하여 형성된 자색 켈러스를 0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  jasmonic acid 첨가배지에서 2주간 배양하여 켈러스 성장과 안토시아닌 생합성의 변화를 조사하였다(Fig. 9). 그 결과, 2,4-D, ABA 처리시와 마찬가지로 켈러스 생장은 매우 미비하여 기내배양을 통한 대량 증식에 대단히 큰 문제점으로 작용하여, 안토시아닌 대량생산의 시발재료로 자색 켈러스 선발과 증식에 큰 어려움이 되었다. 그러나, 10  $\mu\text{M}$  jasmonic acid 처리시 0.95 mg/ml의 안토시아닌이 생합성 되었다. 이는, 보라미 잎 조직 유래 자색켈러스의 2 ~ 4주 배양 된 것의 2배의 생합성률이었다.

20  $\mu\text{M}$  처리구에서는 안토시아닌 생합성률이 저하되고, 40  $\mu\text{M}$  이상 처리 시에 일주일 후 갈변하여 괴사하였다. 따라서, 보라미 잎 조직 유래 자색 켈러스의 안토시아닌 생합성을 증가시키기 위해서는 jasmonic acid를 10 ~ 20  $\mu\text{M}$  농도로 첨가하는 것이 효과적이었다.





**Figure 9.** Effect of Jasmonic acid on the amount of anthocyanin contents. Data were evaluated at 2 weeks after Jasmonic acid treatment.

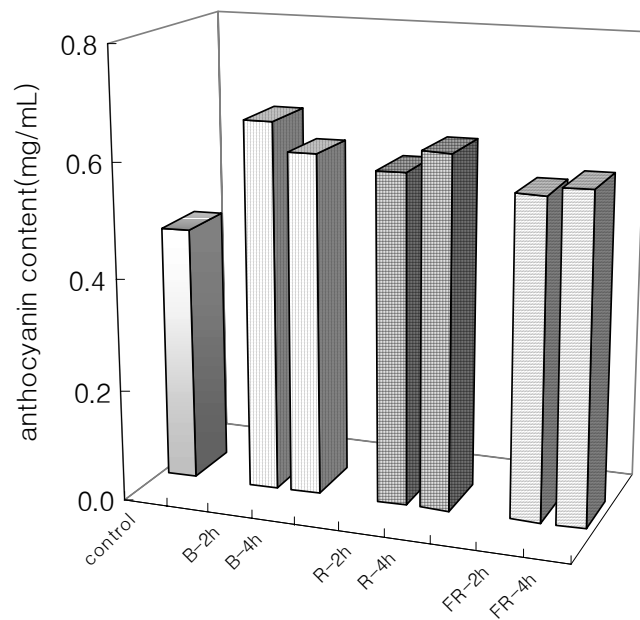
#### 다. 광조사 기구(LED)를 통한 색소 생합성 조사

LED를 이용한 광원에 따른 안토시아닌 생합성률 변화의 실험은 보라미 잎 조직을 2 ~ 4주 배양하여 형성된 자색 켈러스를 사용하였다. 광원은 blue, red, far-red의 분광특성이 470, 654, 738 nm의 파장영역에서 유효 광량자 유입밀도 (PPFD)가 최대치를 나타내는 단색 LED [(주)좋은인상]를 이용하였다. 이들 광원의 PPFD는 모두 3000 lux로 조정하여 배양하였다. LED의 각 광원의 조사시간에 따른 안토시아닌 생합성률을 비교하기 위해 각 파장의 빛을 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 시간씩 처리하여 1주후에 안토시아닌 함량을 정량적으로 실행하였다.

실험에서는 약광 (3000 lux)에서 2주 동안 배양한 후, Blue, Red, Far red를 2 ~ 128시간 처리하여, 3주째 안토시아닌 생합성에 미치는 광원의 영향에 대한 조사한 결과는 Figure 10에서 나타나는 바와 같다.

Blue light를 2시간 처리한 경우 같은 시기의 3000 lux에 비교해 1.4배의 가장 높은 안토시아닌 생합성을 나타냈으며, far red 2시간 처리 시 1.2배를 나타냈다. 단파장 blue light에서 2시간 처리 시 가장 양호하였으며, 장파장일수록 낮은 생합성을 나타내며, 처리시간은 각 파장별로 2 ~ 4시간이 효과적이었다. 8시간 이상 처리 시 대조구와 비교하여 별다른 차이가 나타나지 않았다 (data not shown).

안토시아닌 생합성에서 지속적인 광 조사는 약광 조건으로 실행하는 것이 효율적이며, 약광조건하에서 2주째에 blue light를 2 ~ 3시간 처리함으로써 본래 잎 조직에 비교하여 약 2.5배의 안토시아닌을 생합성 효과가 나타났다.



**Figure 10.** Changes in pigment accumulation after treatment of blue(B), red(R), far red(FR) light. After 2 weeks of culture in the low intense light (3000 lux) wer treated with B, R, FR up to 4 h: Control; 3 weeks, in low intense light.

### 제 3 절 괴근 조직을 이용한 조직배양 및 자색켈러스 선발

#### 1. 켈러스의 유도

호남농업시험장 목포시험장에서 재배한 자색고구마 괴경을 공급받아 70 % 에탄올에 1분간, 2 % 락스에 5 분간 표면살균 후, 탈색된 조직을 제거하여, 0.5 cm × 0.5 cm × 0.1 cm 크기로 절단 후 배지에 닿도록 치상하였다. 괴근 조직배양용 배지는 MS 기본배지에 0, 1, 10, 100  $\mu$ M 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50  $\mu$ M BA를 혼합 처리하여 121 °C에서 15분간 고압 멸균하여 60 × 10 mm petri dish에 10 ml 씩 분주하여 사용하였다. 조건 당 4개의 절편체를 치상하여 4반 복 실시하였다. 배양조건은 24시간 26°C로 하여 암과 광조건(6000 lux)에서 4 주 배양 후, 켈러스 형성률, 배발생 켈러스 형성률을 조사하였다.

자색고구마 괴근 절편체를 0 ~ 100  $\mu$ M 2,4-D와 0 ~ 50  $\mu$ M BA를 혼합 처리한 배지에 치상하여 암, 광 조건에서 4주간 배양한 결과는 Table 4에 나타낸 바와 같다. 잎 조직배양과 유사하게 절편체를 치상한 4일 후부터 조직의 확장이 관찰되었으며, 켈러스 형성이 시작되었다. Table 4에서 보는 바와 같이 동일 품종 간에는 암과 광 조건에서 유사한 발달 양상을 나타냈으며 품종간 켈러스, 배발생 켈러스 형성에 격차가 있었다. 품종에 따른 켈러스 형성률은 무안 5호, 보라미, 신자미, 자미 순서로 나타났으며 배발생 켈러스 형성률은 무안 5호, 자미, 보라미 순으로 효과적이었으며, 2,4-D를 첨가하지 않는 것 보다 1  $\mu$ M 2,4-D를 첨가하는 것이 켈러스와 배발생 켈러스 형성에 효과적이었다.

100  $\mu$ M 2,4-D 첨가구에서는 켈러스 형성률이 급격히 떨어졌다. 이러한 결과는 잎 조직을 이용한 조직배양과 동일하게 고농도의 2,4-D 사용으로 조직이 갈별, 괴사하게 되는 것인데, 잎 조직과 달리 100 % 괴사하지 않고 신자미와

무안 5호등 일부 품종에서는 부분적으로 켈러스를 형성하였다.

광 조건에 따른 배발생 켈러스 형성 효율은 자미, 보라미 무안 5호는 암에서, 신자미는 광에서 약간 더 효율적인 것으로 나타났다.

2,4-D BA와 같은 농도 조합의 NAA와 BA 처리 배양 시 높은 빈도의 뿌리 발생과 왕성한 켈러스 성장을 나타냈으며, 배발생 켈러스 유도는 관찰되지 않았다. 예외적으로 신자미의 경우 암조건 10  $\mu\text{M}$  NAA와 0.5  $\mu\text{M}$  BA에서 낮은 빈도로 배발생 켈러스가 형성되어 2,4-D와 BA 혼합 처리구와 대조적인 결과를 나타냈다.

자색고구마 잎과 괴근 조직을 이용한 조직 배양 시 성장조절제 이용은 2,4-D와 BA 혼합 처리 시 가장 양호하며 저농도의 2,4-D 처리시 배발생 켈러스 형성률을 높일 수 있었다. 괴근 조직을 이용한 배발생 켈러스 유도실험에서도 2,4-D 첨가 조건에서 배발생 켈러스 형성이 높아 자색고구마 배발생 켈러스 유도에 1  $\mu\text{M}$  2,4-D의 농도가 일반적으로 적용될 수 있을 것으로 추측된다.

**Table 4.** Embryogenic callus and non-embryogenic callus formation from storage root explants of purple sweet potato cultivars, "Jami", "Borami", "Sinjami", line "Muan 5" on MS media supplemented with various combinational of 2,4-D and BA under dark or light condition.

		Jami		Borami		Sinjami		Muan 5									
2,4-D ( $\mu$ M)	BA ( $\mu$ M)	E	C	E	C	E	C	E	C								
0	0	-	-	●	-	-	-	●	⊙	-	-	●	⊙				
	0.5	-	-	●	-	-	-	●	⊙	-	-	●●	⊙				
	5	-	-	●	⊙	-	-	●●	⊙⊙	-	-	●●	⊙⊙				
	50	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-	●●	⊙⊙				
1	0	●●	⊙	●	⊙	●●	-	●●	⊙	-	-	●	●●	⊙⊙	●	⊙	
	0.5	-	-	●	⊙	●●	-	●●	⊙⊙	-	-	●	⊙⊙	⊙	⊙	●●	⊙⊙
	5	●●	⊙	●●	⊙⊙	-	⊙	●●	⊙⊙	-	-	●●	⊙⊙	●●	⊙	●●	⊙
	50	-	-	●	⊙⊙	-	-	●	⊙	-	-	●	⊙	-	-	●●	⊙
10	0	-	⊙	●	⊙	-	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-	⊙
	0.5	-	-	●	⊙	●●	-	●●	⊙	-	-	●	⊙	-	-	●●	⊙
	5	-	-	●	⊙	-	-	●●	⊙⊙	⊙	-	●●	⊙⊙	-	-	●●	⊙⊙
	50	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-	●●	⊙⊙	-	-	●●	⊙⊙
100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	⊙	-	-	●	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●●	⊙
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●●	⊙

(E: embryogenic callus formation, C: callus formation)

(⊙ : in light, ● : in dark)

## 2. 광조건과 배양기간에 따른 배발생 켈러스 형성률

자색고구마 괴근을 이용한 조직배양에서 배발생 켈러스 유도에는 품종은 무안 5호를 이용하는 것이 가장 효과적이었으며 성장조절제의 사용은 저농도의 2,4-D 단독처리가 가장 효과적이었다. 무안 5호 괴근을 이용하여 광조건과 배양기간에 따른 배발생 켈러스 형성률을 조사하고자 하였다. 괴근 조직배양과 동일하게 준비한 무안 5호 괴근 절편체를 배발생 켈러스 유도 배지에 9개씩 치상, 4반복 실시하여 광과 배양기간에 따른 배발생 켈러스 형성률을 조사하고자 하였다.

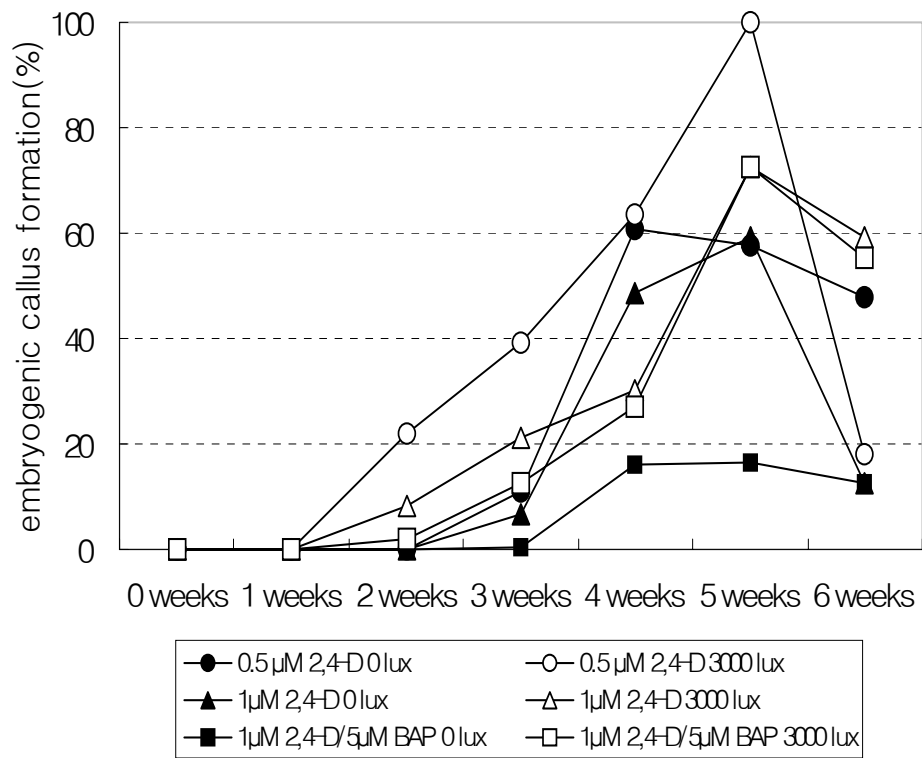
배발생 켈러스 유도 배지는 MS 기본배지에 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독처리구와 5  $\mu\text{M}$  BA와 혼합 처리하여 사용하였으며 광 조건은 암(0 lux)과 약광(3000 lux)의 26 $^{\circ}\text{C}$  조건으로 배양 하여, 배양 1주 후 1주 간격으로 6주까지 배발생 켈러스 형성률을 조사하여 백분율로 나타냈다. 암과 약광(3000 lux)으로 배양기간에 따른 배발생 켈러스 수를 1주 간격으로 조사한 결과는 Figure 11에서 보는 바와 같다. 약광 에서 배양 2주 후, 암 조건하에서는 3주 경과 후 배발생 켈러스이 형성이 시작되어 배양 4 ~ 5주 후에 각 최대 형성률을 나타냈다.

약광 조건하에서는 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독 처리구에서 배양 5주째 100 %, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구에서 78 %를 각각 형성하였으며 암 조건에서는 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서 4주째 61 %, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서 5주째 60 %, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구에서 5주째 17 %로 나타나 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서 약광배양 5주째 최대 형성률을 타나냈으며, 동일 성장조절제 하에서 광 조사는 배발생 켈러스 형성률을 향상시키며 발생기간도 앞당기는 것으로 나타났다.

0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D와 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 구에서는 형성층을 따라 배발생 켈러스가 형성되었고, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리 구에서는 형성층과 형성층 내

부로 배발생 켈러스와 비배발생 켈러스가 형성되었다(Fig. 12AB). 배발생 켈러스의 형태적인 특징은 2,4-D 단독처리 시 배발생 켈러스 각각의 크기가 작고 그 개체가 많은 반면 BA첨가 시 배발생 켈러스 각각의 크기는 크고 그 개체 수는 적었다. 한편, 배양 6주 후 배발생 켈러스 수는 급격히 감소하였는데, 이는 광 조건하에서 더욱 심하며 배발생 켈러스를 유지하지 위해서는 계대배양이 필요하다고 판단되었다.





**Figure 11.** The amount of embryogenic callus during culture period.

### 3. 식물체의 재분화

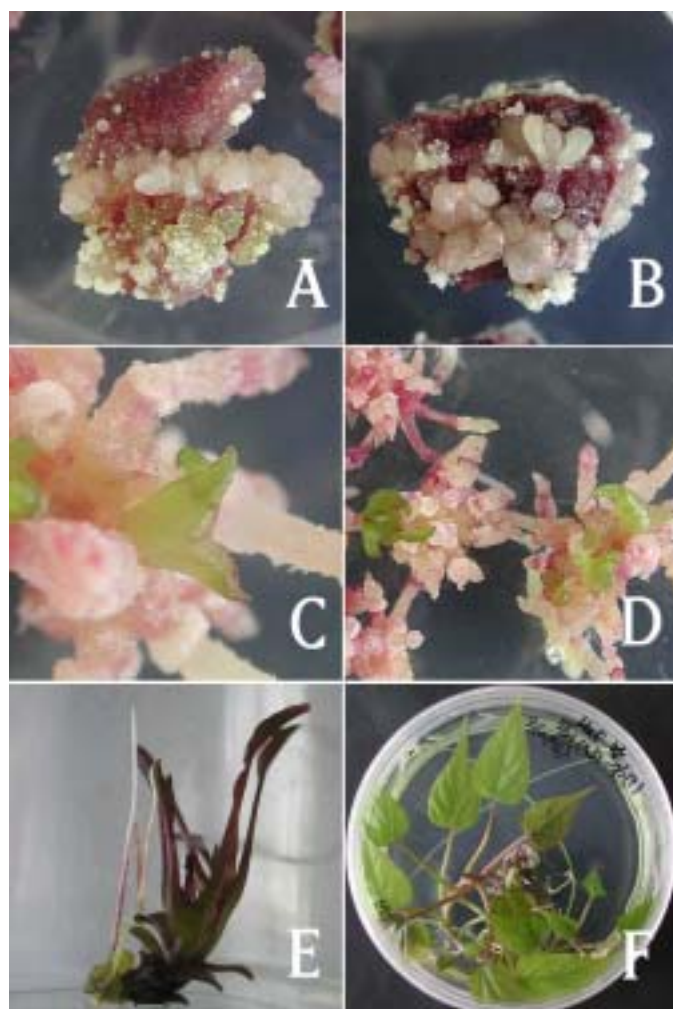
재분화 유도에 사용된 배발생 캘러스는 MS 기본배지에 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA가 혼합 처리한 배지에서 26  $^{\circ}\text{C}$  암조건에서 4주간 배양하여 유도하였으며, 재분화 실험 즉, ABA 처리부터는 낮과 밤이 26/21  $^{\circ}\text{C}$ , 18/6 시간으로 조건되는 배양기에서 3000 lux 조명으로 배양하였다.

자색고구마 괴근 조직을 이용하여 재분화 식물체를 유도하고자 하였다. 자색고구마 잎 조직을 이용한 재분화 유도 실험과 유사하게 괴근으로부터 유도된 배발생 캘러스를 3, 5  $\mu\text{M}$  ABA가 첨가된 MS 배지로 계대배양하여 4일간 배양한 후에, MS 기본배지와, 3  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>, 6  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 계대배양 하여 동일 실험을 3회 반복하여 재분화능을 조사하였다.

절편체로부터 발생한 소식물체는 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에 옮겨 발근을 유도하였으며, 소식물체를 화분으로 옮겨심기 전까지는 낮과 밤이 26/21 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절되는 3000 lux의 16 시간 광주기 조건에서 배양하였다.

0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D와 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 첨가배지 조건에서 형성층이 갈라지면서 형성층 주위에 배발생 캘러스가 형성되었다(Fig. 12A). 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리 조건에서는 형성층과 그 안쪽 부분에서 배발생 캘러스가 형성되었다(Fig. 12B). 그 크기는 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D와 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에 비해 볼때, 각각의 배발생 캘러스 크기가 컸다. 따라서, 한개의 절편체당 배발생 캘러스 형성률은 낮게 나타났다. 암과 광에서 모두 유사한 형태로 형성되었으나 암조건에 비교하며 광조건에서 발달 상태가 2주 정도 빠르게 나타났다. 8주 이후에 계대배양 없이 방치 할 경우 구상형의 형태에서 원추형의 형태로 변화하며, 10주가 경과하면서 전체 절편의 50 % 정도가 갈변하며 괴사하였다. 이러한 변화는 자미, 보라미에서도 유사하게 나타난다. 배발생 캘러스 유도 배지에서 4주간 암 배양하여 유도된 배발생 캘러스를 MS 기본배지에 5  $\mu\text{M}$  ABA, 3 % sucrose, 0.3 % phytagel 첨가 배지에서 4일 배양한 후, ABA를 제거하고 MS

기본배지와 3  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>, 6  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 계대배양 하여 재분화능을 조사한 결과 품종 중 무안 5호에서만 재분화가 유도되었다. 무안 5호의 괴근 조직을 이용한 재분화 유도 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서 형성된 배발생 캘러스를 5  $\mu\text{M}$  ABA 처리구에서 4일간 배양한 후 MS 기본배지로 계대배양 할 경우 재분화가 가장 양호하였다. 5  $\mu\text{M}$ 의 ABA가 3  $\mu\text{M}$  보다 양호하며 ABA 처리 후 GA<sub>3</sub> 첨가배지로 계대배양하는 것보다 MS 기본배지로의 계대배양이 재분화율이 높게 나타났다. 계대배양 6주째까지 재분화는 계속되며, 계대배양 8주 이후에도 재분화 shoot는 출현하였으나 배지 양분 소실로 인한 절편체의 갈변과 괴사가 함께 진행되어 shoot 형태가 불량하게 나타났다. 재분화된 shoot 가운데 70 %가 정상적인 식물체로 발달하였으며(Fig. 12F) 10 %는 비정상적인 식물체로 발달하고(Fig. 12E) 나머지는 식물체로 발달하지 못하고 괴사하였다. 이러한 현상은 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA 조건에서 유도된 배발생 캘러스로부터 재분화된 shoot에서 현저히 높게 나타났다.



**Figure 12.** Plant regeneration from storage root disk culture of *Ipomoea batatas* line "Muan 5". A, Embryogenic callus after 2 weeks of culture on MS medium containing 0.5 μM 2,4-D; B, Embryogenic callus after 2 weeks of culture on MS medium containing 1 μM 2,4-D and 5 μM BA; C, D, Development of shoot in MS medium, after 4 weeks of culture E, Abnormal shoot; F, Normal plantlet formation after 50 and 60 days culture, respectively.













**Table 5.** Organogenesis from embryogenic callus derived from storage root disk of purple sweet potato. After 4 days of culture on a medium containing ABA, the embryogenic callus was transferred to a medium containing MS only, 3 or 6  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$  supplemented. Each value represents the average of 3 determinations. [S; shoot formation (%), R; root formation(%)]

4 weeks		4 days		4 weeks		6 weeks	
압		약광		S(%)	R(%)	S(%)	R(%)
0.5 $\mu\text{M}$ 2,4-D	3 $\mu\text{M}$ ABA	MS		0 $\pm$ 0	67 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	117 $\pm$ 10
"	"	3 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	165 $\pm$ 10	0 $\pm$ 0	200 $\pm$ 20
"	"	6 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	162 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0	143 $\pm$ 10
"	5 $\mu\text{M}$ ABA	MS		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	27 $\pm$ 5
"	"	3 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	98 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	78 $\pm$ 5
"	"	6 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	80 $\pm$ 20	0 $\pm$ 0	153 $\pm$ 10
1 $\mu\text{M}$ 2,4-D	3 $\mu\text{M}$ ABA	MS		<b>27<math>\pm</math>3</b>	13 $\pm$ 5	<b>40<math>\pm</math>10</b>	0 $\pm$ 0
"	"	3 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	105 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0	105 $\pm$ 10
"	"	6 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		<b>3<math>\pm</math>0</b>	0 $\pm$ 0	<b>3<math>\pm</math>0</b>	43 $\pm$ 5
"	5 $\mu\text{M}$ ABA	MS		<b>160<math>\pm</math>20</b>	0 $\pm$ 0	<b>160<math>\pm</math>20</b>	0 $\pm$ 0
"	"	3 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	350 $\pm$ 30	0 $\pm$ 0	325 $\pm$ 30
"	"	6 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	83 $\pm$ 10	0 $\pm$ 0	50 $\pm$ 5
1 $\mu\text{M}$ 2,4-D/ 5 $\mu\text{M}$ -BA	3 $\mu\text{M}$ ABA	MS		0 $\pm$ 0	240 $\pm$ 20	0 $\pm$ 0	227 $\pm$ 15
"	"	3 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	211 $\pm$ 20	<b>11<math>\pm</math>3</b>	178 $\pm$ 20
"	"	6 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	170 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0	145 $\pm$ 15
"	5 $\mu\text{M}$ ABA	MS		0 $\pm$ 0	50 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	50 $\pm$ 10
"	"	3 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	108 $\pm$ 10	0 $\pm$ 0	108 $\pm$ 5
"	"	6 $\mu\text{M}$ $\text{GA}_3$		0 $\pm$ 0	29 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	17 $\pm$ 3

#### 4. 높은 생합성을 위한 배양조건

##### 가. 자색 켈러스 선발

자색고구마 괴근을 이용한 조직 배양 시에 계대배양 없이 배양 6주가 경과하면 유도된 켈러스 조직이 갈변하게 되는데, 특이하게도 무안 5호 괴근의 경우 전체 처리구의 15 ~ 20 % 가량은 갈변하지 않고 자색 켈러스를 형성하게 된다. 이러한 무안 5호 괴근의 특이적 생육성질을 이용하여 여러 배양조건으로부터 안토시아닌 생합성 세포군의 선발을 시도하였다. 선발은 주로 켈러스의 표면에 나타나는 색소를 육안으로 구별하여 분리하였다. 조직배양 실험 결과에서 본 바와 같이 안토시아닌을 생합성하는 켈러스의 생성은 광조건의 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 조건에서 가장 높은 비율로 출현했다(Fig. 13). 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 첨가구에서 배양 6주 후에 켈러스의 많은 부위에서 안토시아닌 생합성 부위가 나타나기 시작하여 점점 색의 농도가 높아져 배양 8주에 가장 높은 색소의 함량을 나타냈다. 0.5 ~ 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독 처리 시와 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 BA 혼합 조건에서 6주 ~ 10주 배양 시 자색 함유량이 최고치에 달했다. 그러나, 이들은 배양이 지속되면서 결국 배지의 양분 소모로 켈러스 조직이 갈변하게 되어 계대배양이 불가피 하였으나, 이들 또한 잎 조직 유래 자색 켈러스와 마찬가지로 계대배양으로 자색 켈러스를 유지하거나 증식 시킬 수 없었다. 따라서, 여러 가지 성장조절제를 혼합 처리하여 이들의 생육특성을 조사하였고, 돌연변이 유발원을 첨가하여 색소 생합성능을 유지할 수 있는 켈러스 유도를 시도하였다.

품종, 라인		배지조성	6주	8주	10주	14주
"	괴근	0.5 $\mu$ M 2,4-D				
무안5	"	1 $\mu$ M 2,4-D				
"	"	1 $\mu$ M 2,4-D 5 $\mu$ MBAP				

**Figure 13.** Morphological pattern of anthocyanin synthesizing callus from purple sweet potato cultivars after 6, 8, 10 and 14 weeks of culture on MS medium supplemented with 0.5~1  $\mu$ M 2,4-D.

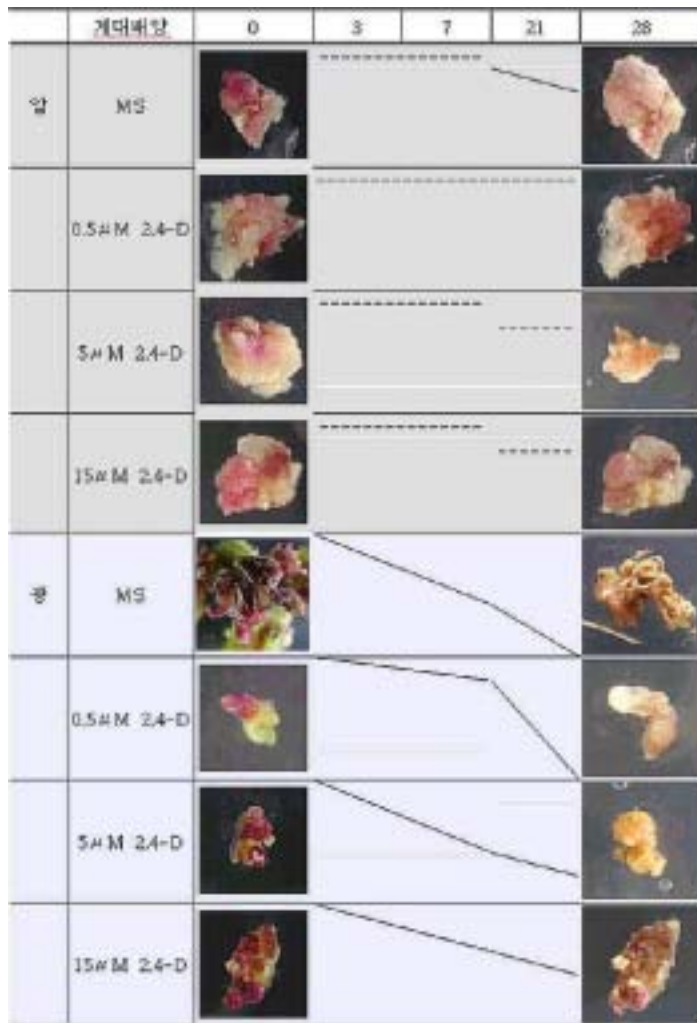
## 나. 성장조절제 처리

### 1) 2,4-D와 BA 처리

선발한 자색 함유 캘러스를 지속적으로 계대배양하고 증식하기 위해 다양한 환경조건으로 배양을 실행했다. 실험 결과는 Figure 14에서 나타나는 바와 같다. 계대배양 후 배양기간이 2 ~ 3주 후부터 색소 생합성 정도가 점점 저하되는 것으로 나타나고 있다. 혹은 계대 배양한 캘러스가 새로운 배양배지의 접촉면에서 새로운 녹색을 띠는 캘러스가 성장하고 색소 생합성 캘러스는 성장하지 않고 2 ~ 3주 유지된 후, 점점 소멸되어 가고 있다.

계대배양 후 3주가 경과하면서 대부분의 색소 생합성 부위는 소멸되어진다. 특히 광 조건에서 더 빠른 속도로 진행되며, 암 조건에서는 약간의 캘러스 성장과 함께 4주 후 까지 유지되었다. 따라서 요구되어지는 실험은 안토시아닌 색소 생합성 캘러스를 성장조절제의 변화 및 빛 조건 등을 다양하게 변화시켜 지속적인 증식과 성장으로 이끌어 가는 것이다. 그리고 이러한 색소 생합성 캘러스로부터 더 높은 생합성능을 갖는 세포군을 선발해 가는 것을 목표로 실험을 진행하였다.





**Figure 14.** Changing pattern of purple callus on MS medium supplemented with 0~15  $\mu$ M 2,4-D after subculture.

## 2) NAA와 BA 처리

국내 자색고구마를 이용하여 조직배양 하던 중 자색 켈러스를 선발하였다. 조직배양에 사용된 5개 품종 가운데, 괴근에서는 무안 5호 만이 저농도의 2,4-D 처리구에서 자색 켈러스를 형성하였다. 따라서 이를 2,4-D와 BA를 처리하였으나, 켈러스 성장 뿐 아니라 증식과 색소 생합성능에서도 유지가 어려웠다. 앞 조직배양에서 선발한 자색 켈러스를 2,4-D 첨가 배지에 계대배양 하였을 경우에도 색소 생합성능에는 부정적으로 나타났다. 따라서, 2,4-D를 NAA로 치환하여 동일 실험을 시행하여 켈러스 성장과 색소 생합성능을 검색하였다.

무안 5호 괴근에서 얻은 자색 켈러스를 0, 0.5, 5, 50  $\mu\text{M}$  NAA와 0, 0.5, 5, 50  $\mu\text{M}$  BA가 혼합된 배지에 계대배양 하여, 배양 12, 24일 후 켈러스 성장과 색소 생합성능을 관찰한 결과, 100 NAA 처리구에서 10  $\mu\text{M}$  2,4-D와 유사한 갈변이 나타났으나 절편체의 괴사율은 2,4-D 처리구의 80 % 정도 수준이었다. 1 ~ 10  $\mu\text{M}$  NAA와 0 ~ 5  $\mu\text{M}$  BA 첨가구에서 색소 형성능이 유지되었으며 켈러스도 2,4-D 처리구에 비교하여 20 % 가량 더 성장하였다.

그러나, 계대배양 3회 이후에도 켈러스의 성장 정도가 미비하며 색소 함량은 줄어들어 2,4-D 처리와 마찬가지로 본 실험의 방법으로는 자색 켈러스 유지 증식이 어렵게 판단되어, 앞과 괴근 조직배양으로는 켈러스 유지와 증식이 불가능하게 보였다.

## 5. EMS (Ethyl methane sulfonate) 처리에 의한 돌연변이체 유도

재분화율이 높고 자색 켈러스 형성이 가능한 무안 5호 배발생 켈러스에 돌연변이를 유도하기 위해 EMS를 처리하였다. 고구마는 유전적 고정과정을 거치지 않고 영양계 번식이 가능한 작물이기 때문에 돌연변이원 처리 후 재분화된

식물체를 이용하여 육종에 이용하고자 하였다. 또한, 괴근 유래 자색 캘러스가 계대배양으로 유지가 어려워 이를 극복할 수 있는 돌연변이체를 시도해 보고자 하였다.

본 실험에서는 배발생 캘러스 조직이 종자에 비해 약하기 때문에 MS 기본 현탁 배지에 Sigma에서 구입한 EMS를 여과 살균하여 0, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  씩 첨가하여 2시간 처리하고 3차 멸균수로 15분 동안 3회 세척하였다. 이후 이 캘러스를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지와, 배발생 캘러스 유도 시 사용된 동일한 배지 그리고 재분화에 사용된 ABA 첨가 배지에 계대 배양하여 이틀 간격으로 관찰하였다.

그 결과, 20 ~ 80  $\mu\text{M}$  EMS에서 2시간 처리하면 본래 캘러스가 가지고 있던 자색이 모두 탈색되었다. 5 ~ 10  $\mu\text{M}$  EMS 처리에서는 비교적 양호하였는데, 4일 후 절편체가 전체적으로 갈변이 시작되어 14일 후에는 모두 괴사하였다.

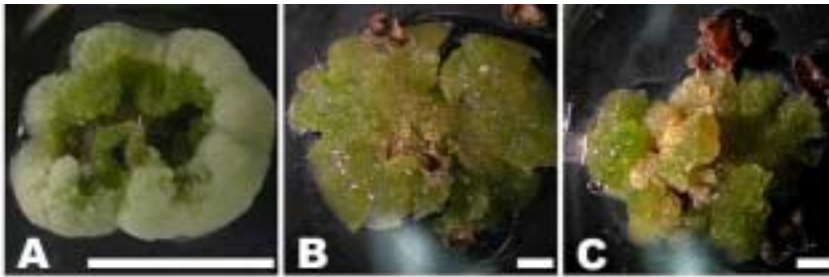
## 제 4 절 변이체 켈러스를 이용한 조직배양

### 1. 변이체 켈러스 선발

자색고구마를 이용한 자색 색소의 대량 생합성 연구를 위해서는 우선적으로 자색 고탐유 세포주를 선발해야 하며 이들의 유지와 증식 방법을 개발하여야 한다.

자색고구마의 잎과 괴근 조직을 이용하여 자색 켈러스를 유도하였으나 이들의 유지와 증식이 여러 배양 조건을 조절한 계대배양으로 유지가 불가능 하였다. 따라서, 본 연구에서는 켈러스의 생육이 왕성하고 계대배양으로 증식이 가능한 켈러스를 선발하고자 하였다.

자색고구마 잎 조직을 저농도의 2,4-D 단독 처리구에 6개월간 배양하여 생장조절제가 첨가되지 않는 MS 기본배지에서 빠르게 증식하는 변이체 켈러스를 선발하였다. 이러한 변이체 켈러스의 크기는 Figure 15의 A와 같이 잎이나 괴근 조직배양으로 유도될 수 있는 평균적인 켈러스 크기에 비교하여 3 ~ 5 배가량의 크기이며(Fig. 15B,C) 이들은 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 증식이 가능하였다. 이로써, 자색고구마 잎과 괴근 조직으로부터 유도한 켈러스의 유지와 증식의 어려움을 해결하였으며, 나아가 이들의 생육 특성을 조사하여 최적 배양 조건을 확립하고 이들로부터 자색 변이체 켈러스를 선발 하고자 하였다.



**Figure 15.** Shape of callus(A) and mutant callus(B,C). Bars=1 cm

## 2. 유지·증식

변이체 캘러스로부터 자색 변이체 캘러스 선발과 최적 조건 확립을 위해서 변이체 캘러스를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 3 ~ 4주에 1회 계대 배양하여 유지, 증식하며 실험에 사용하였다.

## 3. 성장조절제의 효과

### 가. 2,4-D 와 BA 처리

3 ~ 4 주 간격으로 계대배양 하며 3개월 동안 MS 배지에서 유지, 증식시킨 변이체 캘러스를 이용하여 고체배지에 성장조절제 농도에 따른 캘러스 형성에 관해 조사하였다. 계대배양 3주 후부터 육안으로도 성장률의 구별이 가능할 정도로 뚜렷이 빠르게 성장하는 양상을 나타냈다. MS 배지에 BA를 단독 처리구한 조건에서 생장이 가장 양호하였으며, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 첨가 시 성장량이 다소 감소하였다. 이러한 현상은 10  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서 더욱 심해져 100  $\mu\text{M}$  처리구에서는 오히려 생장이 감소하였다(Fig. 16). 그러나, 고농도의 BA 즉, 50  $\mu\text{M}$ 의 BA를 첨가 할 경우 변이체 캘러스 증식이 가능하였는데 이는 변이체 캘러스가 2,4-D 처리에는 부정적이나 BA에는 긍정적인 성장 반응을 보이는 것으로 판단된다. 한편 1 ~ 10  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독 처리구, 1 ~ 10  $\mu\text{M}$  2,4-D 와 0.5 ~ 5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구에서는 부분적으로 주황색 캘러스가 형성되었는데, 이들은 계대배양으로 그 성질을 유지할 수 있었다. 그러나, 캘러스 생장은 거의 나타나지 않았다.

저농도의 BA 첨가 배지가 캘러스 생장에 양호하게 나타났으나, 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 배양한 것과 유사한 수준으로 2,4-D 와 BA 혼합 처리에 의한 캘러스 증식과 색소 생합성률 향상에는 큰 영향이 없는

것으로 판단되었다.

2,4-D와 BA 혼합 처리 시와 동일한 농도로 NAA와 BA를 혼합 처리하여 처리한 결과, 2,4-D 와 BA 혼합처리구와 혹은 MS 기본배지와 BA 단독 처리구에서 생육이 나타났다.. 그러나, 2,4-D와 BA 혼합 처리구에서 나타났던 주황색 캘러스는 관찰되지 않았다.

변이체 캘러스는 3 ~ 4주 배양 하면, 잎이나 괴근 조직배양 성장량의 3 ~ 5배가량의 크기로 성장하며, 또한 10  $\mu$ M 2,4-D 이상 처리 구에서도 잎과 괴근 조직배양과 달리 배양 초기에 바로 갈변 괴사하지 않고 약간의 생장이 이루어져 변이체 캘러스가 고농도의 성장조절제, 즉 잎과 괴근 유래 캘러스에 비교해 스트레스에 대한 저항성이 높은 것으로 보인다. 이는, 변이체 캘러스가 이후 현탁 배양이나 안토시아닌 생합성 세포군의 증식 방법에 매우 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 잎 괴근 조직 배양이 계대배양으로 유지와 증식이 어려웠던 단점을 보완 해 줄 것으로 기대된다.

2,4-D( $\mu\text{M}$ ) BA( $\mu\text{M}$ )	0	1	10	100
0				
0.5				
5				
50				

**Figure 16.** Effect of 2,4-D(0 ~ 100  $\mu\text{M}$ ) and  $\mu\text{M}$  BA(0 ~ 50) combination during tissue culture mutant calli. 4 weeks after subculture.



#### 나. 광조사 기구(LED)를 통한 색소 생합성 조사

변이체 캘러스를 이용하여 LED, 즉 광원에 따른 이들의 생장 변화와 안토시아닌 생합성률 변화를 비교하였다.

광원은 blue, red, far-red의 분광특성이 470, 654, 738 nm의 파장영역에서 유효 광량자 유입밀도 (PPFD)가 최대치를 나타내는 단색 LED [(주)좋은인상]를 이용하였다. 이들 광원의 PPFD는 모두 3000 lux로 조정하여 배양하였다. LED의 각 광원의 조사시간에 따른 안토시아닌 생합성률을 비교하기 위해 각 파장의 빛을 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 시간씩 처리하여 1주후에 색소 생합성능 변화를 관찰하였다.

MS 배지에서 왕성하게 성장중인 변이체 캘러스를 0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm 크기로 잘라 성장조절제가 첨가되지 않은 기본배지에서 계대배양 하였다. 3000 lux 약 광조건(대조구), 적색 red(660 nm), fa-red(750 nm), 청색 blue(450 nm)에서, 생장온도는 26℃, all day 조건으로 4주간 배양하여 캘러스 형성 또는 안토시아닌 생합성의 영향을 조사하였다. 그 결과 MS 기본배지에서 적색과 청색에서는 2 ~ 16 시간 처리 구에서 MS 기본배지와 동일한 형태로 성장하였으며, 32 ~ 128 시간 처리 구에서는 매우 미비한 성장량을 나타냈다. 변이체 캘러스의 색소 생합성의 변화도 관찰되지 않았다.

## 제 5 절 결 과

국내 자색고구마를 이용하여 조직배양법을 확립하였다. 자색고구마 잎 조직 배양의 경우 캘러스 유도는 1 ~ 10  $\mu$ M 2,4-D와 0.5 ~ 5  $\mu$ M BA 혼합처리 시 가장 양호하였다. 배발생 캘러스 형성은 0.5 ~ 1  $\mu$ M 2,4-D 처리 시 높게 나타났으며, 이를 이용한 재분화 식물체 유도는 IT310에서만 가능했다. 즉, 자미, 보라미, 신자미, 무안 5호로 실행한 결과 재분화 식물체를 얻을 수 없었는

데, 이는 잎 조직배양의 경우 품종별로 각각의 다른 조건이 필요하다는 것을 의미한다.

따라서, 본 연구에서 사용한 자색고구마 5품종 중 잎 재분화 연구에는 'IT310'을 이용하는 것이 비교적 용이할 것으로 판단된다.

국내 주요 자색고구마 괴근을 이용하여 조직배양 한 결과, 캘러스 형성에는 잎 조직배양과 유사한 성장조절제 처리 시 양호하게 나타났으며, 재분화 유도에는 무안 5호의 괴근 조직이 재분화에 효과적으로 나타났다. 본 연구에서 확립된 방법을 사용할 경우 절편체당 최고 2개의 재분화 식물체를 유도할 수 있었다. 이는 지금까지 보고된 바 없는 고빈도 재분화율이며 이후 자색고구마 형질전환 및 육종에 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 잎 조직에서와 마찬가지로 괴근 재분화 실험에서 무안 5호와 동일한 실험방법으로 자미, 보라미, 신자미를 이용하여 실행한 결과 재분화 식물체를 얻을 수 없었다.

따라서, 형질전환 및 육종에 이용되기 전에 비교적 조직배양이 유리한 품종을 선택하는 것이 실험의 완성도를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

자색 색소를 기내 대량 생산하기 위해서는 우선적으로 자색 고함유 세포주를 선발하는 것과 생합성량을 극대화 할 수 있는 배양조건 확립이 우선적으로 진행 되어야 한다. 본 연구에서는 이 두 가지 방법을 병행하여 시행하였다. 첫째, 잎과 괴근의 조직배양 과정에서 광범위한 성장 조절제 처리로 자색 캘러스를 형성하는 몇 가지 조건을 찾아내어, 그에 관한 세부적인 실험을 시행하였다. 이때, 잎과 괴근 조직 유래 자색 캘러스 형성조건은 각각 품종, 성장조절제와 그 농도에 따른 차이가 있었는데, 이를 우선적으로 선발하여 2차 계대배양을 실시하여 자색 캘러스 선발을 진행하게 되었다.

잎 조직을 이용하는 경우에는 보라미를 이용하여 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D를 첨가하여 2 ~ 4주 동안 3000 lux에서 배양하여 비교적 높은 빈도의 자색 캘러스를 유도하였으며, 괴근의 경우 저농도의 2,4-D와 BA를 혼합 처리하여 자색 캘러스를 유도하였다.

이들 두 가지 자색 켈러스를 이용하여 여러 배양 조건에 계대 배양한 후, 켈러스 증식과 안토시아닌 생합성률을 향상시키고자 하였다. 계대배양 일주일 이내에 색소 함량이 저하되고 켈러스 성장률도 거의 이루어지지 않았다. 3차 계대배양 이후에는 실험구의 70 % 가량이 갈변화 되며 괴사하여 켈러스의 증식과 유지가 불가능 하게 되는 문제점이 발견되었다.

이러한 문제점을 해결하고자 계대배양으로 유지가 가능한 생장이 빠른 변이체 켈러스를 선발하였다. 특이하게 변이체 켈러스는 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서의 생장이 성장조절제가 첨가된 조건에 비교해 빠른 성장률을 나타냈다. 따라서, 이를 이용해 대량생산에 이용할 경우 원하는 물질을 안정적으로 빠르게 생산이 가능할 것으로 기대된다.

## 제 3장 현탁배양 기술의 확립

자색고구마 잎과 괴근 조직으로부터 유도한 자색 캘러스를 고체배지 상에서 유지, 증식하는 방법은 매우 비효율적인 것으로 나타나 현탁 배양을 이용한 유지, 증식 방법을 개발하고자 하였다. 또한 선발한 변이체 캘러스를 현탁 배양을 통해 자색 변이체 캘러스에 이용하였다.

### 제 1 절 잎조직 유래 캘러스의 현탁배양

#### 재료 및 방법

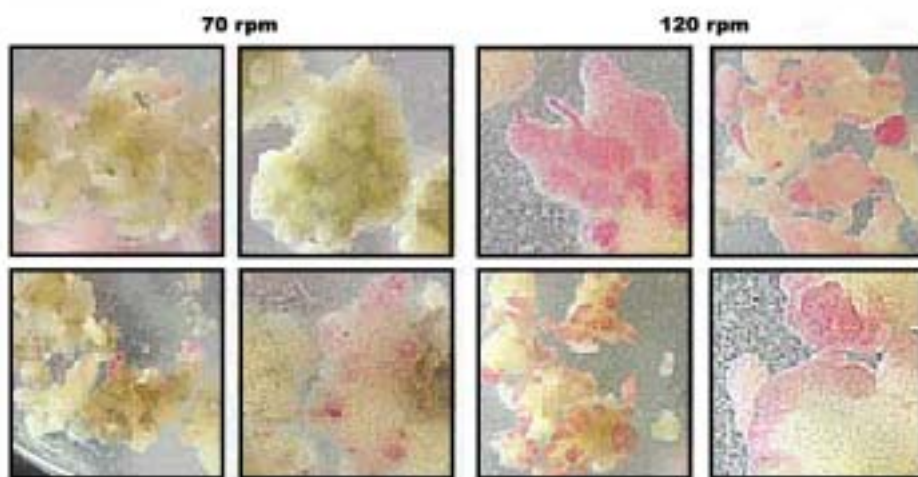
보라미 잎 조직을 0.5  $\mu$ M 2,4-D를 첨가한 MS 기본배지에서 2 ~ 4주간 배양하여 유도된 자색 캘러스를 현탁 배양에 이용하였다. 배지는 MS(3 % sucrose, 0.01 % myo-inositol 첨가) 현탁 배양액에 여러 농도의 성장조절제를 첨가하여 pH 5.8로 조절 한 후, 50 ml 삼각 플라스크에 10 ml씩 분주하여 121  $^{\circ}$ C에서 15분간 고압 멸균하여 사용하였다. 플라스크 하나에 자색 캘러스를 생체중 0.1 g씩 접종하여 26 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C로 암 상태에서 현탁 배양하였다. 배양 12, 30 일 후, 캘러스 성장률은 캘러스 생체중 증가량으로 측정하고 안토시아닌 생합성률을 육안으로 조사하거나 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 무안 시험장에서 공급받은 자색고구마 색소분말을 정량적으로 취하여 0.1 % citric acid를 함유하는 20 % ethanol 용액에 녹인 후 530 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 시료로부터 안토시아닌 함량 측정은 시료를 1 mm  $\times$  1 mm 정도로 세절한 후, 0.3 g을 취해 추출 용매를 6 mL 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 색소를 추출하였다. 800 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분광광도계를 사용하여 530 nm에서 색소의 함량을 측정하였다.

#### 1. 진탕 속도가 안토시아닌 생합성에 미치는 영향

진탕 속도를 70, 120, 150 rpm으로 하여 진탕속도에 따른 색소함량 변화를 관찰하였다(Table 6). 보라미 잎 조직으로부터 유도한 자색 켈러스를 임의 선발하여 0.2 mm × 0.2 mm × 0.2 mm 크기로 잘게 잘라 현탁 배양에 사용하였다. 현탁 배양용 배지는 phytigel이 첨가되지 않은 MS 기본배지에 0.5 μM 2,4-D를 첨가하여 사용하였으며, 배양 1주 후부터 1주 간격 계대배양 하여 10주 간 배양하여 안토시아닌 생합성률을 육안으로 조사한 결과는 다음과 같다.

배양 2주까지는 160 rpm에서 자색 켈러스의 출현이 증가하였다. 그러나 3주부터 6주까지는 120 rpm에서 가장 양호하였으며, 70 rpm에서는 배양 10주 동안 자색 켈러스가 유지 되는 정도였다. 공통적으로 배양 7주 이후에 자색이 급격히 사라져 10주 후에는 배양 켈러스 유지가 불가능 하였다. 70 rpm에서는 켈러스가 지나치게 뭉쳐 성장하고 160 rpm에서는 배양 속도의 영향으로 켈러스가 떨어져 나와 배양액이 탁했다. 즉, 배양 속도로는 120 rpm이 가장 적절해 보였다. 진탕 속도에 따라 자색 색소 함유량의 변화는 육안으로 쉽게 관찰할 수 있었으나, 켈러스 생장은 거의 나타나지 않아 보여 자색 색소를 대량 생산하기 위한 배양 조건의 확립과 증식, 유지가 가능한 세포주 선발이 중요한 요인으로 부각되었다.

0.5 μM 2,4-D 단일 농도 처리로 얻은 켈러스로 동일 조건에서 배양할 경우 10주 이상 지속하지 못한 다는 점에서 안토시아닌 대량 생산을 위한 세포주로는 부적절하게 판단되었다. 따라서, 다른 여러 성장조절제의 혼합에 의한 자색 켈러스의 변화 양상을 육안으로 관찰하여 대량생산에 이용된 세포주를 선발하고자 하였다.



**Figure 17.** Formation of anthocyanin synthesizing site during the suspension culture in shaking incubator with various shaking speed.

**Table 6.** Anthocyanin synthesis in suspension culture with various shaking speed.

	Growth period (week)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	
rpm										
70	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	-	
120	+++	+++	+++	+++++	+++++	+++++	++++	+	-	
160	+++	++++	+++++	++++	+++	++	++	+	-	

## 2. 성장조절제 처리

보라미 잎 조직배양으로 형성된 자색 켈러스를 현탁 배양하여 켈러스의 형태적 변화, 안토시아닌 생합성량 변화를 조사하여 안토시아닌 대량생산의 가능성을 여러 성장조건 처리를 통해 검토하고자 하였다.

2,4-D와 BA 혼합, NAA와 BA를 혼합 처리하여 배양한 결과는 Table 7과 Table 8에 나타나는 바와 같다. 이들 성장 조절제 혼합처리에 따른 켈러스 성장 상태, 뿌리 발생률, 자색 켈러스 형성률을 육안으로 관찰 한 것으로, 10  $\mu\text{M}$  2,4-D 이상 처리 시와 100  $\mu\text{M}$  NAA 처리 시는 갈변 괴사하였으며, 1  $\mu\text{M}$  NAA와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구, 5  $\mu\text{M}$ 과 50 $\mu\text{M}$  BA 단독 처리구, 10  $\mu\text{M}$  NAA와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리 구에서 양호하게 나타났다. 이러한, 다섯 가지 조건으로 동일한 실험을 시행하여 성장량과 안토시아닌 생합성량을 각각 측정하였다. 그 결과는 Figure 18에서 보는 바와 같이 켈러스 성장량은 50  $\mu\text{M}$  BA 단독 처리 시 초기의 4.6배로 성장률을 나타냈고, 안토시아닌 생합성은 10  $\mu\text{M}$  NAA와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 처리에서 0.622mg/mL로 가장 높게 나타났다. 그러나, 전제 처리구에서 배양 30일 후 켈러스에서 자색이 모두 사라지고 켈러스 성장도 관찰되지 않았다.



**Table 7.** Effects of growth regulators(NAA/BA) and culture periods on anthocyanin synthesis.

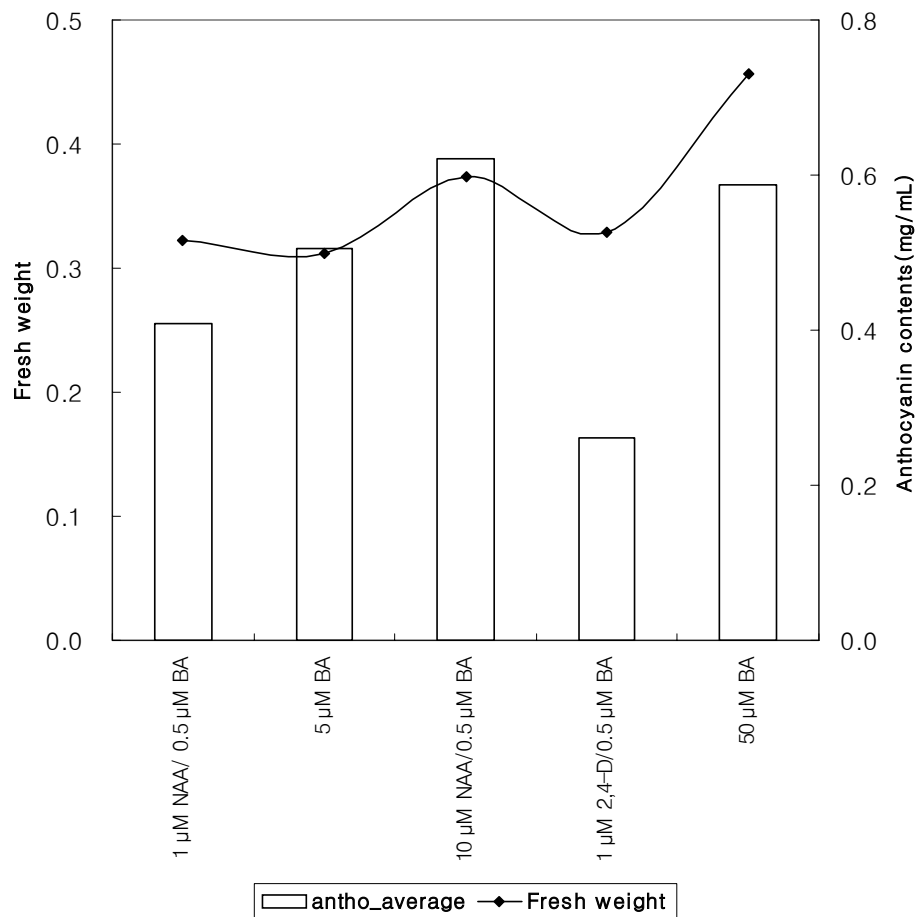
		Growth period (day)				
		0	6	12	18	24
0N/0B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++	++
	P	+	+	++	++	++
0N/0.5B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++++	++++
	P	+	++	++	++	++
0N/5B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++	++
	P	+	+++	++	++++	+++++
0N/50B	C	+	+	+++	+++++	+++
	R	-	-	-	-	-
	P	+	++	+	++	++
1N/0B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++++	++++
	P	+	+	++	+++	+++
1N/0.5B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	+	-
	P	+	++	+++	++++	+++++
1N/5B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++	++
	P	+	+++	++	+++	+++++
1N/50B	C	+	+	+	++++	+++
	R	-	-	-	-	-
	P	+	++	+	-	-
10N/0B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++++	+++
	P	+	+	++	+++	+
10N/0.5B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	++++	++
	P	+	+	++	+++	+
10N/50B	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	+++	++
	P	+	+	+	+++	+

(C; callus formation, R; root formation, P; purple callus formation)

**Table 8** Effects of growth regulators(2,4-D/BA) and culture periods on anthocyanin synthesis.

		Growth period (day)				
		0	6	12	18	24
0 $\mu$ M 2,4-D/ 0 $\mu$ M BA	C	+	+	+++	+++	++
	R	-	-	-	+++	-
	P	+	++	++	++	-
0 $\mu$ M 2,4-D/ 0.5 $\mu$ M BA	C	+	+	+++	+++	++
	R	-	-	-	+++	-
	P	+	++	++	++	-
0 $\mu$ M 2,4-D/ 5 $\mu$ M BA	C	+	+	++	++	+
	R	-	-	-	++	-
	P	+	+	++	++	-
0 $\mu$ M 2,4-D/ 50 $\mu$ M BA	C	+	+	+++	+++	+
	R	-	-	-	-	-
	P	+	+	++	++	+++
1 $\mu$ M 2,4-D/ 0 $\mu$ M BA	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-
	P	+	++	++	++	++
1 $\mu$ M 2,4-D/ 0.5 $\mu$ M BA	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-
	P	+	+	++	++	+++
1 $\mu$ M 2,4-D/ 5 $\mu$ M BA	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-
	P	+	+	++	++	++
1 $\mu$ M 2,4-D/ 50 $\mu$ M BA	C	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-
	P	+	+	++	++	++

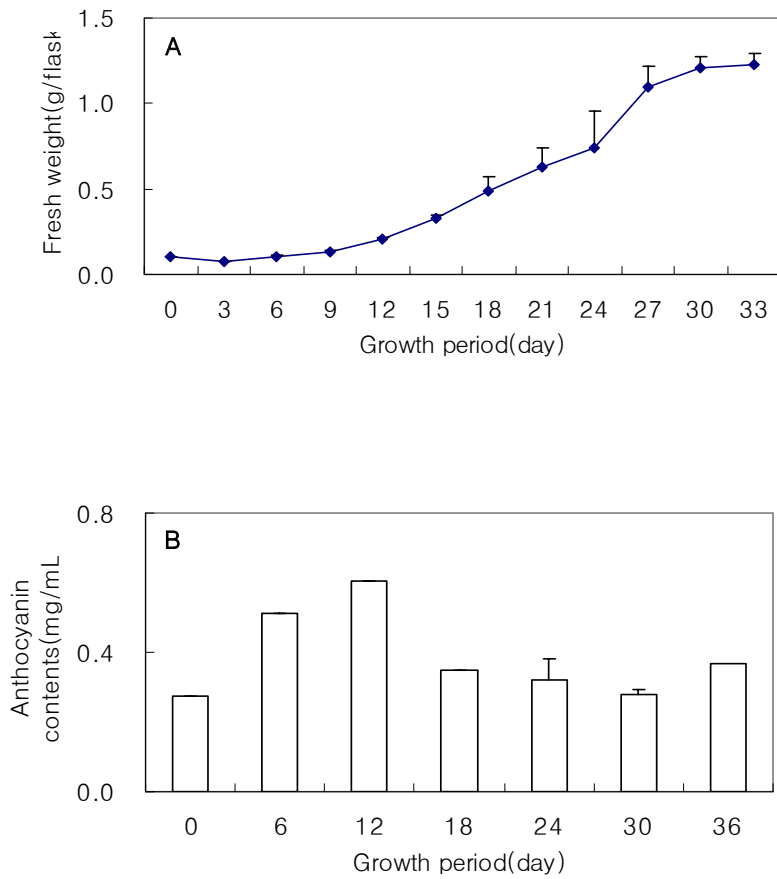
(C; callus fomration, R; root formation, P; purple callus formation)



**Figure 18.** Correlation between callus growth and anthocyanin contents during suspension culture with various growth regulator.

### 3. 잎 조직 유래 퀼러스의 생장곡선

광 조건에서 4주간 배양하여 형성된 밀집형 퀼러스를 사용하여 생장량과 안토시아닌 함량을 측정하였다(Fig. 19). 배지는 MS 기본배지에 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 와 5  $\mu\text{M}$  BA를 혼합처리 하여 사용하였으며 50 ml 삼각플라스크에 10 ml씩 분주하여 4반복 실행하였다. 배양 3일 후부터 3일 간격으로 36일까지 생장률과 안토시아닌 생합성률을 측정한 결과 배양 6일까지 생체중의 변화는 나타나지 않았으나 안토시아닌 함량은 0.99 mg/mL로 배양 중 최대치를 나타냈다. 이후 15일부터 생장량이 급속히 증대하여 배양 33일째 18배의 생체중이 증가했다. 그러나, 최대 생장량을 나타내던 30일째 안토시아닌 함량이 0.09mg/mL로 가장 낮았으며, 33일 이후 생장량이 감소하면서 안토시아닌 생합성량이 다소 증가하였으며 36일 이후에는 퀼러스가 갈변 괴사 되었다.



**Figure 19.** Growth of suspension culture (A) and changes in pigment accumulation (B) in the purple calli originating from the leaf of purple sweet potato cv. Borami, maintained in MS medium with 1  $\mu$ M 2,4-D and 5  $\mu$ M BA.

## 제 2 절 괴근조직 유래 캘러스의 현탁배양

### 1. 2,4-D와 BA 영향

괴근 조직을 이용한 조직배양에서 무안 5호 괴근을 이용하여 저농도의 2,4-D 단독 처리구 혹은 저농도 BA 혼합 처리 구에서 자색 캘러스를 선발하였다. 그러나, 조직배양으로 이들을 유지, 증식하지 못하여 조직배양과 안토시아닌 생합성 실험에 있어 어려움이 있었다. 따라서 이 자색 캘러스를 이용하여 현탁 배양을 시도하여 유지, 증식 가능성 여부를 2,4-D와 BA를 이용 여러 농도로 처리하여 검색하였다. 그 결과 table 9에서 보는 바와 같이 배양 12일 후 까지 0.5 ~ 5  $\mu\text{M}$  BA 단독 처리 시 캘러스 생장이 양호하였으며, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D에 0 ~ 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리 시 색소 생합성능이 양호하였다. 그러나, 24일 후 모두 감소하며, 30일 후에는 모두 괴사하거나 색소를 잃게 되었다.

**Table 9.** Effects of 2,4-D and BA on anthocyanin synthesis.

			Growth period ( day)		
			12	24	
0 $\mu$ M 2,4-D	0 $\mu$ M BA	C	-	-	
		P	-	+	
	0.5 $\mu$ M BA	C	++	-	
		P	-	+	
	5 $\mu$ M BA	C	++	-	
		P	-	+	
	50 $\mu$ M BA	C	-	-	
		P	-	-	
	1 $\mu$ M 2,4-D	0 $\mu$ M BA	C	-	-
			P	++	-
0.5 $\mu$ M BA		C	--	-	
		P	++	+	
5 $\mu$ M BA		C	-	-	
		P	-	-	
50 $\mu$ M BA		C	-	-	
		P	++	-	
10 $\mu$ M 2,4		0 $\mu$ M BA	C	-	-
			P	-	-
	0.5 $\mu$ M BA	C	-	-	
		P	-	-	
	5 $\mu$ M BA	C	-	-	
		P	-	-	
	50 $\mu$ M BA	C	-	-	
		P	-	-	

(C; callus formation, P; purple callus formation)

### 제 3 절 변이체 켈러스의 현탁배양

자색고구마 조직배양을 통한 색소 대량생산을 위해 잎과 괴근 조직으로부터 자색 고탐유 켈러스를 유도하였다. 이들을 이용하여 조직, 현탁 배양조건을 조절해 줌으로써 자색 켈러스를 대량 증식 시키고자 하였으나, 켈러스 생장이 낮을 뿐 아니라 본래 가지고 있던 자색 색소가 계대배양으로 사라지게 되었다. 이러한 문제점을 해결하고자 생장이 빠른 변이체 켈러스를 유도해 조직배양하였다. 그러나, 변이체 켈러스는 조직배양으로 색소 생합성을 유도할 수 없었다. 따라서 현탁 배양을 통해 자색 변이체 켈러스를 선발하고 이들의 색소 생합성능을 제고 시킬 수 있는 배양 조건을 확립하고자 하였다.

#### 1. 유지 및 증식

조직배양으로 유지하고 있는 변이체 켈러스를 3 g 채취해 0.2 cm × 0.2 cm × 0.2 cm 크기로 잘라 250 ml 삼각플라스크에 담아 120 rpm의 속도로 현탁 배양하여 유지하였다. 변이체 켈러스의 조직배양과 현탁 배양은 동일하게 MS 기본 배지에서 생장이 가장 양호하였으며, 계대배양으로 본래의 성장속도를 유지하며 빠르게 성장하였다. 1주일에 1회 계대배양을 시행하였으며, 이때 켈러스의 1/2정도를 잘게 잘라 접종 한 후 배양하여 유지하였다.

#### 2. 2,4-D와 BA 영향

조직배양에서 출현한 변이체 켈러스를 현탁 배양을 통해 증식시킬 수 있는 방법과 색소생합성 켈러스의 선발에 이용하고자 하였다. MS 기본배지에서 현탁 배양으로 유지, 증식되고 있는 변이체 켈러스를 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm 크기로 잘라, 0, 1, 10, 100  $\mu$ M 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50  $\mu$ M BA가 혼합 처리된



배지로 계대배양 하였다. 사용된 배지는 MS 기본배지에 2,4-D와 BA를 첨가한 후 50 ml 삼각플라스크에 10 ml 씩 분주하여 각각 4반복 하였다.

계대배양 후, 7일 간격으로 동일 배지로 계대배양 하였으며 4주 후, 현탁 배양에서 변이체 캘러스의 성장과 안토시아닌 생합성 여부를 육안으로 관찰하였다. MS 배지와 BA 단독 처리 구에서 생장이 양호하였다. 2,4-D가 첨가될수록 생장이 저지되어 100  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 구에서는 계대배양 3주후 모두 괴사하였다. MS 배지와 BA 단독 처리 구에서는 단단한 밀집형 캘러스를 주로 형성하였고, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리 구에서는 부취 지기 쉬운 형태로 변하였다(Table 10). 이러한 결과는 변이체 캘러스를 이용한 조직배양과 유사한 결과였다.

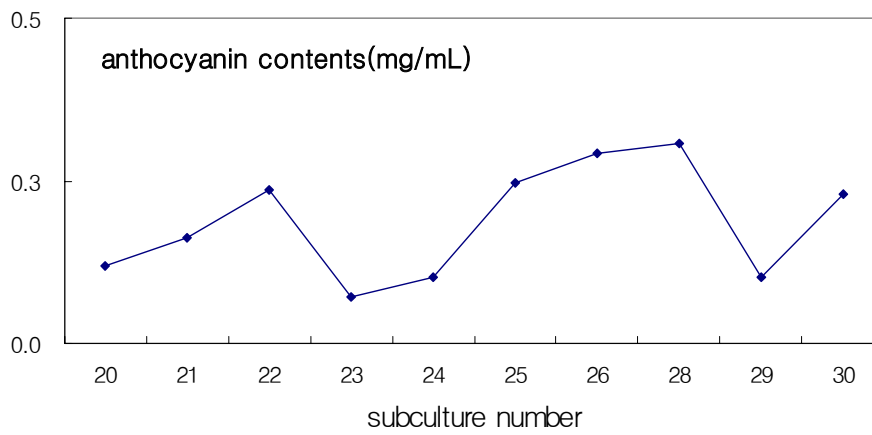
**Table 10.** Effect of 2,4-D and BA on callus growth rate of mutant callus in the dark at 26 °C.

	0 $\mu\text{M}$ 2,4-D	1 $\mu\text{M}$ 2,4-D	10 $\mu\text{M}$ 2,4-D	100 $\mu\text{M}$ 2,4-D
0 $\mu\text{M}$ BA	++++	+++	+	-
0.5 $\mu\text{M}$ BA	+++	++++	+	-
5 $\mu\text{M}$ BA	++	+++	+	-
50 $\mu\text{M}$ BA	++	+++	+	-

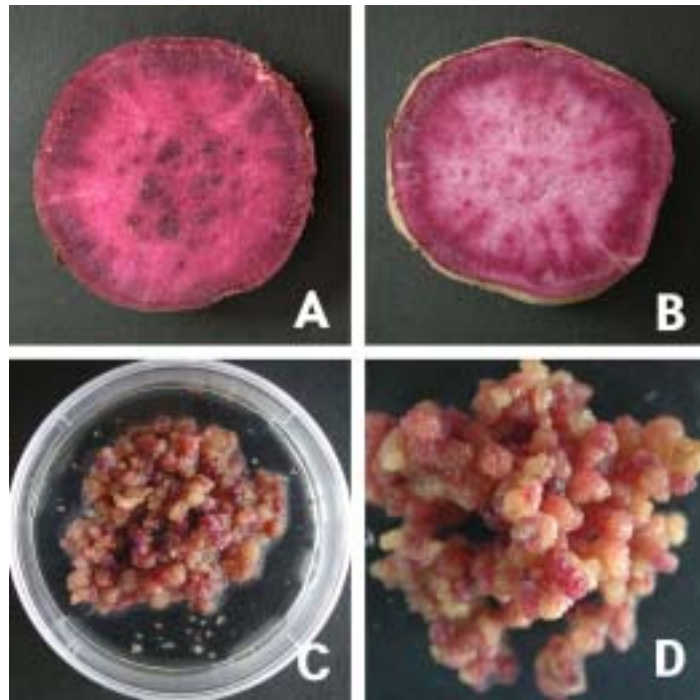
### 3. 고생합성 변이체 켈러스 선발

#### 가. 색소 생합성 켈러스의 선발

1주일 간격으로 20회 이상 계대배양이 경과하면서 Figure 20에서 보는 바와 같이 주기적으로 안토시아닌 생합성량이 변화하면서 증가하였는데, 계대배양 40회 경과 후에 켈러스 표면에 자색을 육안으로 관찰 가능한 자색 변이체 켈러스를 분리하였다(Fig. 21C,D). 이들의 색소 추출액은 Figure 22의 A, B 즉 괴근에서 추출한 색소와 비교하여 육안 관찰시 비슷한 색소 함유량을 보이는 것으로 판단되었다.



**Figure 20.** Changes in anthocyanin content during the selective subculturing of the purple sweetpotato calli. The calli were cultured on hormone free MS medium (liquid) under the dark for 7 days.



**Figure 21.** A color tone accumulated anthocyanin in storage root of purple sweet potato cv. Jami(A), cv Borami(B), and varied calli(C,D)



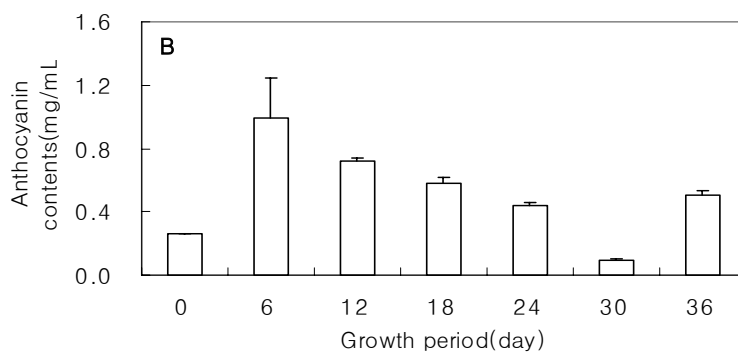
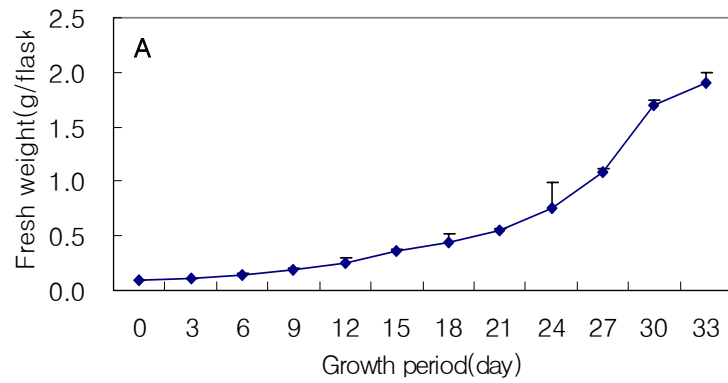
**Figure 22.** Comparison between storage root of cv. Jami(A) and purple variegated calli(B).

#### 나. 생장곡선

선발된 자색 변이체 켈러스의 배양기간에 따른 생장량과 안토시아닌 생합성량을 조사하였다. 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지 10 ml을 50 ml 삼각플라스크에 담고 0.1 g 켈러스를 첨가하여 30일간 배양하였다. 3일 간격으로 생체중을 측정하고, 6일 간격으로 안토시아닌 함량을 측정하였다(Fig. 23).

12일간의 lag phase를 경과하여, 30일까지 rapid growth phase를 거친 후, 30일 이후는 stationary phase로 사료되며 이 시기 이후 계대배양을 하면 켈러스 생존률이 급격히 떨어진다. lag phase에 안토시아닌 생합성량이 급격히 증가하며 30일을 전후해 생체중이 최대 증가한다. 특히, 자색 변이체 켈러스는 색소 함량이 높고, 생장조절제가 첨가되지 않는 MS 기본배지에서 생육이 가능하였다. 이러한 자색 변이체 켈러스는 배양 환경을 조절하여 안토시아닌을 대량으로 생합성 하고, 나아가 상업적으로 이용가치가 있을 것으로 사료된다.

유용물질을 생성하기 위해서는 세포배양에서 우선 식물체에서 켈러스를 유기하고 이것에서 선발한 우수 세포주를 bioreactor를 이용한 대량 생산으로 유용물질을 획득함으로써 산업화할 수 있다. 그러나 고생산성 세포주를 획득 하였다 해도 계속되는 계대배양에 의해 그 특성을 상실하는 경우가 많아 일정 간격으로 세포주를 다시 선발해야 하는 문제점이 있다. 하지만 본 실험의 변이체 켈러스는 보통의 잎과 괴근 조직 유래 켈러스에 비교해 증식속도가 빠르고 생장조절제 공급 없이도 지속적인 생장이 가능하고 증식 속도가 월등히 빠르기 때문에 이를 이용하여 2차 대사산물을 생산할 경우 안정적으로 단시간 내 보다 많은 유용 2차 대사산물을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.



**Figure 23A,B** Growth of suspension culture (A) and changes in pigment accumulation (B) in the PL cell-line of purple sweetpotato, maintained in MS hormone free medium.



#### 다. 자색 변이체 켈러스의 안토시아닌 분석

자색고구마의 괴근 조직배양에서 선발된 자색 켈러스로부터 생합성된 안토시아닌 성분을 HPLC를 통해 분석 하였다. 괴근과 자색 켈러스 6 g을 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm로 잘게 잘라, 1 %(v/v) HCL MeOH 용액 100 mL에서 침지시켜 4 ℃ 암소에서 12시간 방치한 후, 색소를 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 1 여과지를 사용한 Buchner funnel을 사용하여 흡인 여과하여 잔사는 시료의 색소가 완전히 제거될 때까지 동일 용매를 사용하여 반복 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출액을 회전감압농축기를 사용하여 농축한 후, 농염산을 첨가하여 100 ℃의 water bath에서 1시간 정도 가열하여 색소를 완전히 가수분해하였다. 가수분해한 색소액을 냉각 후, 물을 첨가하여 원래 양의 2배로 희석하고, 희석액에 isoamylalcohol을 첨가하여 강하게 흔든 후, 잠시 방치해 두면 aglycone은 상층의 알코올 층으로 전용된다. 상층의 알코올 층을 다른 비이커에 옮긴 다음, ether 혹은 벤젠을 첨가하여 여러 지질성분을 제거하는 과정을 3회 반복하여 실행하였다. 이렇게 정제된 색소액에 소량의 isoamylalcohol을 첨가하여 상층의 aglycone 부분을 취하여 HPLC 시료로 사용하였으며, 이때 색소 성분을 확인하기 위해 표준물질의 aglycone(cyanidin, peonidin)을 구입하여 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같았다.

Instrument - Shimadzu LC10ADVP

Detector - UV detector

Wavelength - 520 nm

Mobile phase - H<sub>2</sub>O:MeOH:CH<sub>3</sub>COOH=63:35:2(v/v/v)

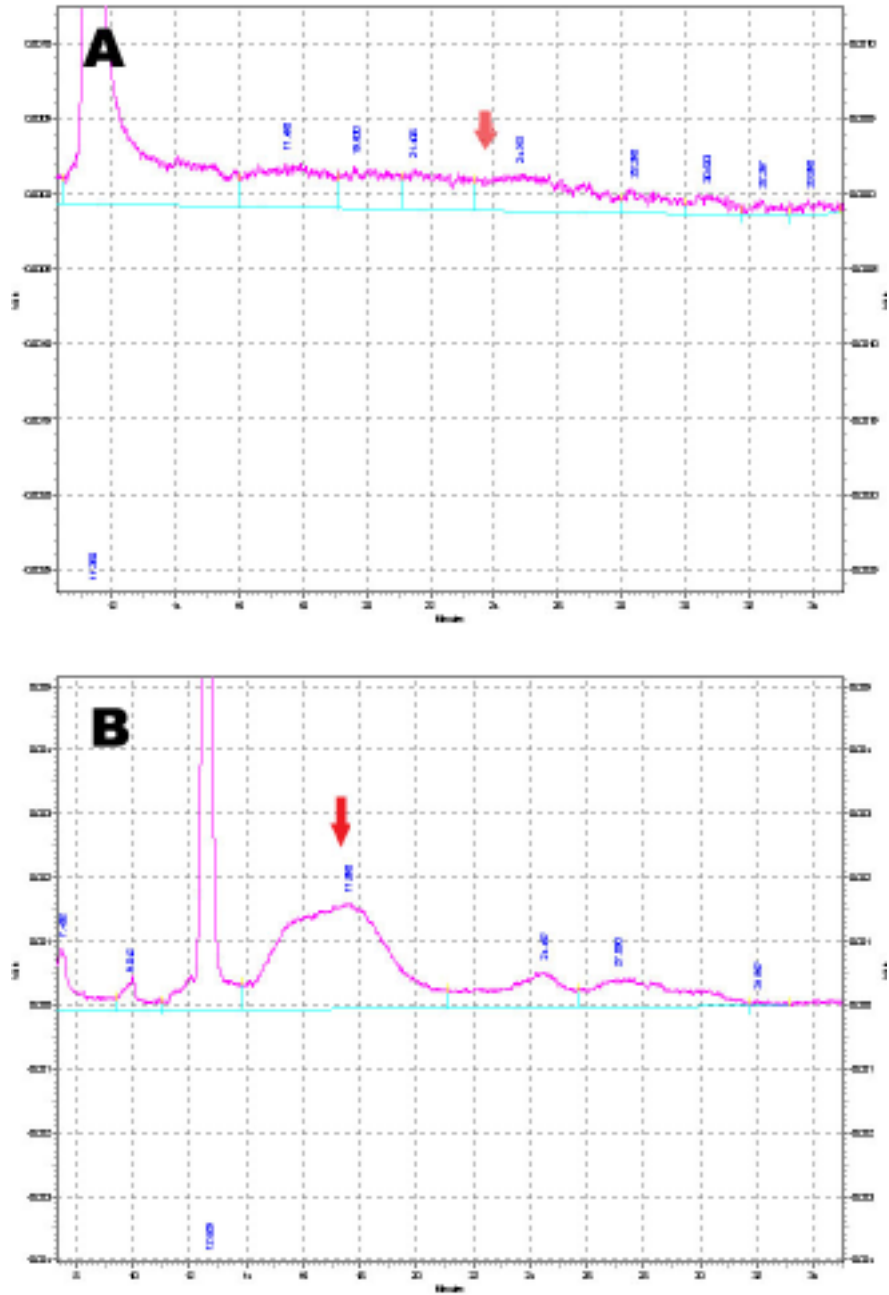
Column - Capcell Pak C18 SG120(4.6mmI.D.×250mm)

Flow rate - 1.0ml/min

자미 괴근과 선발된 자색 고태유 세포주의 안토시아닌을 비교한 결과, 괴근의 경우 cyanidin이 7.1 ppm/g, peonidin이 2.15 ppm/g 들어 있는 것으로 조사

되었다(Fig. 24). 반면 자색 변이체 켈러스는 cyanidin이 검출되지 않았으며, 단지 peonidin만 0.55 ppm/g으로 분석되었다.

상기 실험 즉 spectrophotometer를 이용한 정량분석에서는 자색고구마 자미 괴근의 안토시아닌 함량은 생체중 0.3 g당 1.3 mg/mL 함유되어 있는 것으로 조사되었고, 자색 켈러스 변이체 켈러스는 1.1 mg/mL 가량 함유되어 있는 것으로 나타났다. 안토시아닌 전체 함량은 유사하나 선발된 자색 변이체 켈러스의 안토시아닌은 본래 괴근의 조직배양에서 생합성 축적된 안토시아닌 종류인 cyanidin과 peonidin과는 달리, cyanidin이 검출되지 않았으며, peonidin이 소량 검출 되어 안토시아닌 전구체 물질이 상당량 축적되어 있는 것으로 추측되었다. 이러한 분석 결과는 배양중인 켈러스 조직에서 생합성된 색소는 안토시아닌의 전구체 물질들로 구성되어 있는 것으로 추측된다. 따라서, 이러한 전구체 물질의 안토시아닌으로 전환 단계에 요구되는 조건확립이 요구된다.



**Figure 24.** HPLC chromatogram of the anthocyanin extracted from purple mutant calli (A) and storage root of purple sweetpotato(B) cv Jami.

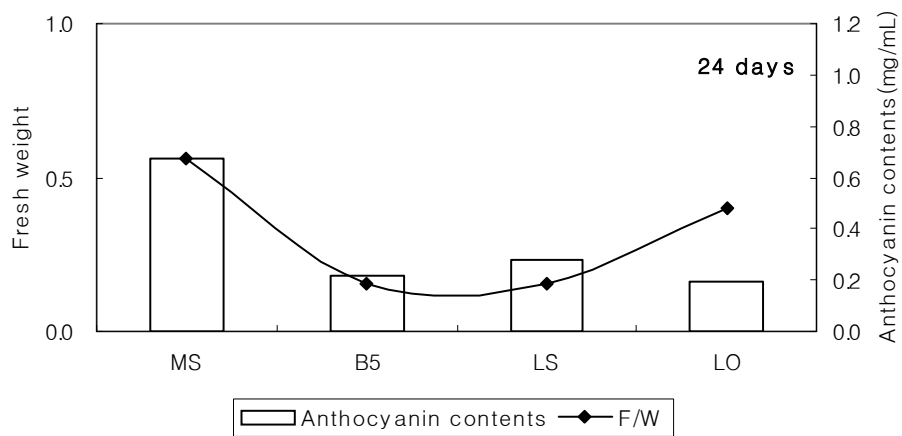
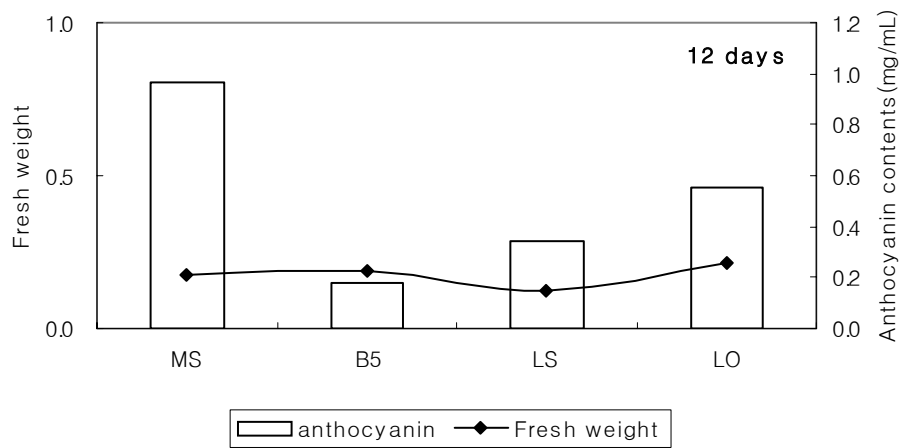
## 라. 배양조건 확립

### 1) 배지조건의 실험

배지에 따른 성장률과 안토시아닌 생합성률을 비교하였다. 사용된 MS 배지는 실험실에서 직접 조제하였으며, B5, LS, LO 배지는 Duchefa에서 구입하여 3 % sucrose를 첨가하고, 성장조절제는 첨가하지 않고 사용하였다.

배양 12일 후, 캘러스 성장량은 LO 배지에서 2.2배로 가장 많이 증가하였고, 안토시아닌 생합성량은 MS 배지에서 1 mg/mL로 가장 높게 나타났다(Fig. 25). 배양 24일 후, 배양 초기와는 달리 MS 배지에서 6배로 가장 큰 성장을 나타냈으며, 안토시아닌 생합성량 또한 MS 배지에서 0.7 mg/mL로 가장 높게 나타났다.

결과적으로 MS 배지에서 높은 성장률과 안정적인 안토시아닌 생합성률을 나타내 다른 배지에 비교하여 MS 배지가 선발된 자색 캘러스를 유지하기에는 적당하다고 판단되었다.



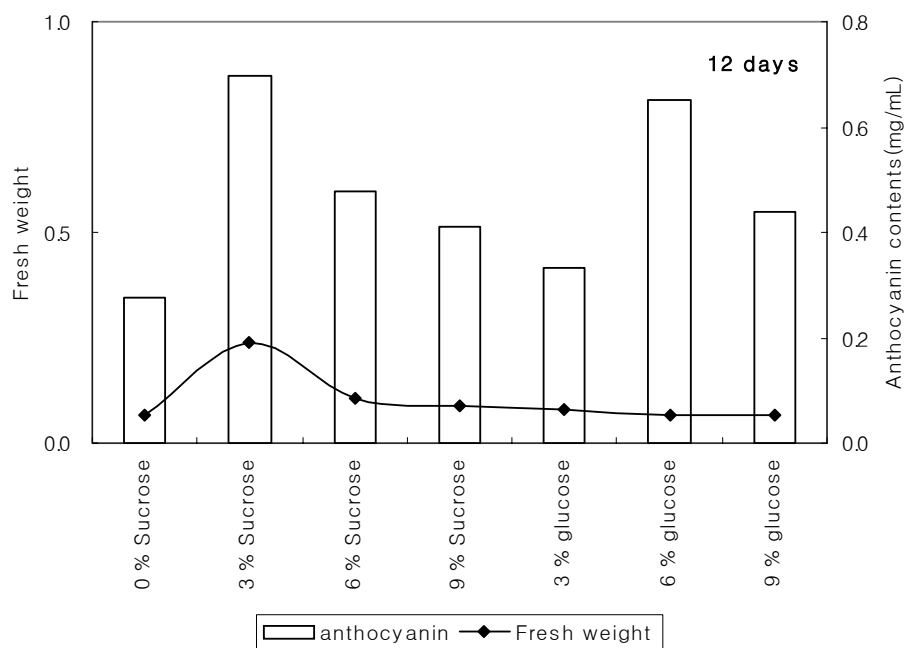
**Figure 25.** Growth rate of suspension-cultured and changes in pigment accumulation in the purple mutant calli of purple sweetpotato, according to various culture media.

## 2) 당의 영향

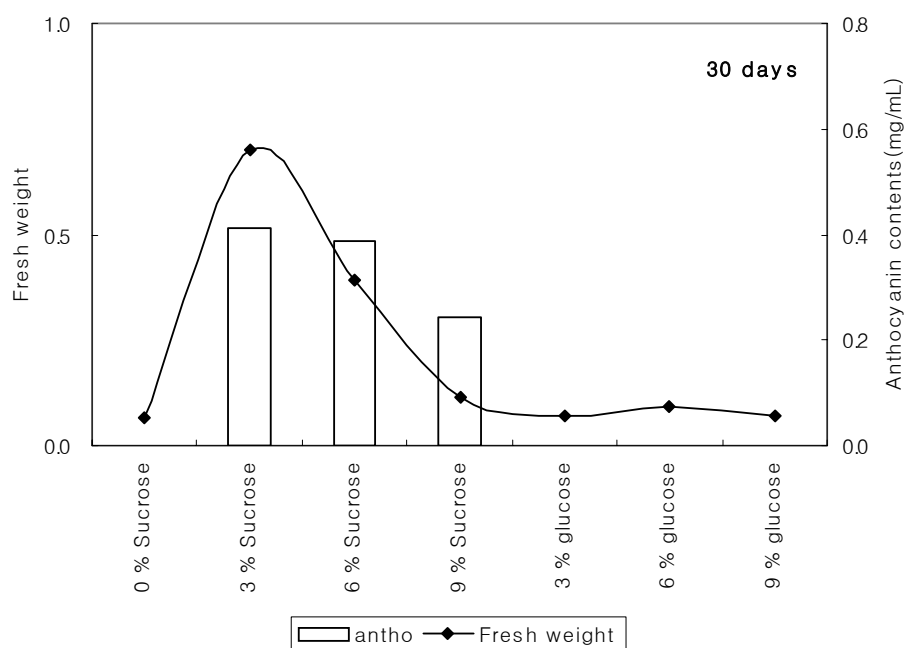
기내배양에서 에너지원으로 쓰이는 당(sucrose, glucose)을 0, 3, 6, 9  $\mu\text{M}$ 로 처리하여 자색 켈러스 변이체 켈러스의 생체중과 안토시아닌 생합성량 변화를 조사하였다(Fig. 26).

배양 12일 후, 켈러스 성장량은 MS 배지에 기본적으로 첨가되었던 3 %에서 2.4배로 가장 많이 성장하였으며 안토시아닌 생합성량은 3 % 처리 시와 6 % 처리 시에 각각 0.7 mg/mL, 0.65 mg/mL로 높게 나타났다(Fig. 26A).

배양 30일 후, 3 % sucrose 첨가 시 생체중이 무려 7배 성장하였으며, 안토시아닌 생합성 또한, 3 % sucrose 첨가 시 0.414 mg/mL로 가장 높게 나타났다(Fig. 26B).



**Figure 26A.** The effect of various concentrations of sucrose and glucose on anthocyanin content. Sucrose and glucose were added on 0 days and callus growth and anthocyanin synthesis was measured 12 days after the addition. In each well, 10 ml medium was used and 0.1 g wet calli were inoculated.



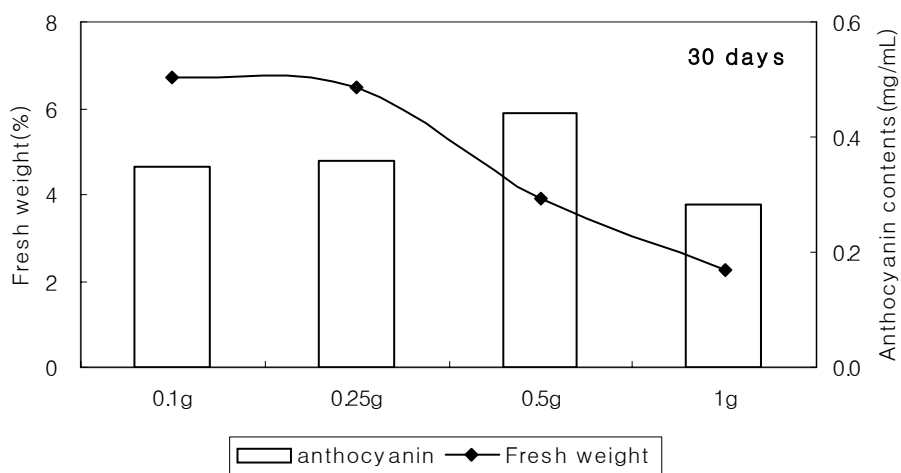
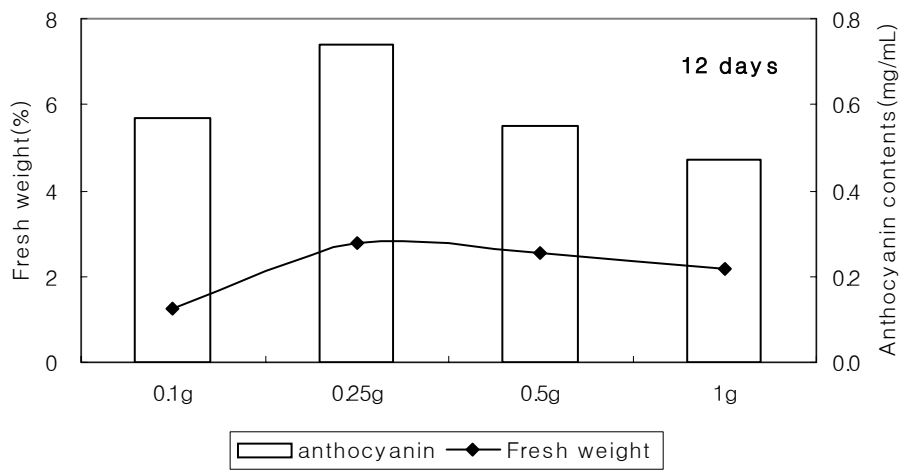
**Figure 26B.** The effect of various concentrations of sucrose and glucose on anthocyanin content. Sucrose and glucose were added on 0 days and callus growth and anthocyanin synthesis was measured 30 days after the addition. In each well, 10 ml medium was used and 0.1 g wet calli were inoculated.



### 3) 켈러스 접종량

자색 변이체 켈러스 성장량을 높이고 안토시아닌 생합성량을 제고하기 위해 배지에 첨가되는 적정의 세포량을 조사하기 위하여 다음의 실험을 시행하였다. 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지를 10 mL을 50 mL 삼각 플라스크에 분주하여 6반복 실행하였다. 한 개의 삼각 플라스크당 켈러스 생체중을 각각 0.1 g(0.1 %), 0.25 g(0.25 %), 0.5 g(0.5 %), 1 g(1 %)로 첨가하여 배양 12일과 30일 후에 생체중 증가율을 백분율로 나타냈으며, 안토시아닌 생합성량을 측정하였다. 배양 12일 후 켈러스 성장 증가율을 살펴보면, 현탁배양액당 켈러스 비율 1 %의 경우 1.3배, 2.5 % 접종인 경우 2.8 배, 5 %의 경우 2.6배, 10 % 접종 시 2.2배의 증가율을 보였다(Fig. 27). 12일 이내, 즉 단기간에 높은 성장량을 얻기 위해서는 2.5 %로 접종하는 것이 생체중 증가에 효과적이고, 켈러스를 유지시키기 위해서는 1 %로 접종하여 성장 속도를 조절하여 계대배양 횟수를 줄이는 것이 배양유지에 효과적인 것으로 판단된다. 안토시아닌 생합성량에 있어서도 2.5 % 켈러스 접종 시 0.741 mg/mL를 생합성 하여 가장 높게 나타났다. 한편, 1g 접종 시 배양액 탁한 정도가 다른 처리구보다 심하며 켈러스가 무르게 변해있어 켈러스 조직 갈변과 괴사가 12일 이내에 시작된 것으로 보인다. 따라서, 켈러스 접종량을 배지의 10 % 이상으로 할 경우 최대 12일 이내에는 계대배양을 시행해야 할 것으로 판단된다.

배양 30일 후의 생체중 변화는 1 ~ 10 % 접종 시 각각 6.7, 6.5, 4, 2.2배 증가하여 0.1 % 접종이 30일 가장 장기간 배양 할 경우 유리하게 판단되며, 안토시아닌 생합성량은 12일에 비교하여 50 % 가량 감소하여 5 % 접종 시 0.442 mg/mL로 가장 양호하게 나타났으나, 이는 성장량이 낮고 또한 켈러스 유지 형태가 무르게 변하여 이후 계대배양 할 경우 갈변 괴사율이 높아 비효율적이었다.

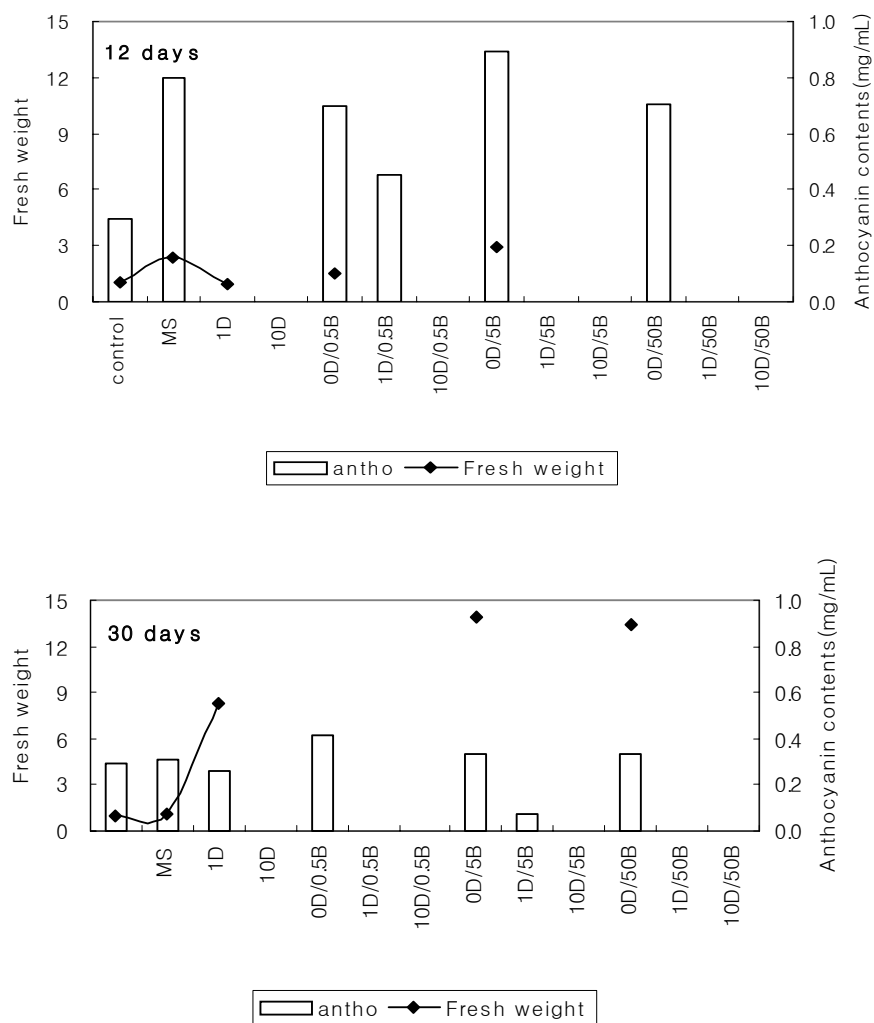


**Figure 27.** Effects of cell inoculum size on cell growth and anthocyanin contents in cell suspension culture of purple mutant calli.

#### 4) 2,4-D와 BAP 혼합 처리의 영향

2,4-D와 BA를 혼합 처리가 자색 변이체 켈러스의 성장과 색소 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0, 0.5, 5, 50  $\mu\text{M}$  BA를 혼합 처리한 현탁배양에서 12일과 30일 후의 성장량과 안토시아닌 생합성 변화는 Figure 28에서 보는 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 2,4-D 첨가 시 켈러스 성장과 색소생합성에 부정적이었다. 배양 1주일 이내에 갈변 피사하는 조건으로 이들은 표기하지 못했다. Control로 사용된, 즉 배양 시발 재료에 비해 배양 12일 후에는 MS 기본배지와 5  $\mu\text{M}$  BA가 첨가된 조건에서 각각 2배, 3배의 안토시아닌을 생합성 했으며, 켈러스는 1.5 ~ 3배가량 성장하였다. 배양 30일 후에는 켈러스가 크게 성장하여 5 ~ 50  $\mu\text{M}$  BA 처리 구에서 14배가량 성장하였다. 그러나, MS 기본배지에서는 크게 성장하지 못하였다. 각각의 처리 구를 6반복 시행하였으며, 배양 15일 경과 후에 이들의 생장은 급속히 증가하였으나, 이를 기준으로 성장하지 못하고 피사하였다. 특이하게도, 이때 단순히 갈변, 피사하는 것이 아니라 배양액이 짙은 노란색으로 변하며 죽게 되는 데 이에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

모든 처리 구에서 2,4-D 첨가가 켈러스 성장이나 색소 생합성에 부정적으로 나타났다. 이는 잎과 괴근 조직, 현탁 배양에서와 매우 상반되는 결과이다. 자색 변이체 켈러스가 생합성 하는 안토시아닌을 분석했던 결과, 괴근의 것과 달리 cyanidin이 없고 peonidin이 소량 검출 되는 것으로(Fig. 24) 나타난 것과 관련하여 이에 관한 세부 실험이 필요하다고 판단되었다.

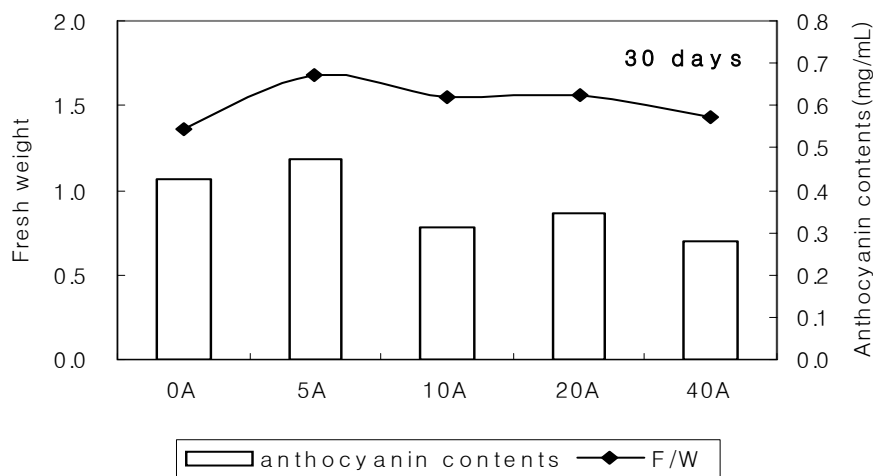
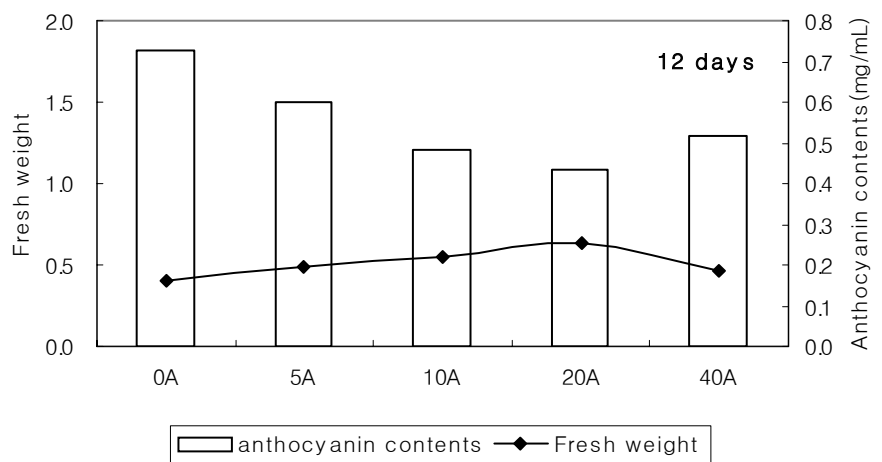


**Figure 28.** The effect of various concentrations of 2,4-D and BA on anthocyanin content. 2,4-D and BA were added on 0 days and callus growth and anthocyanin synthesis was measured 12 and 30 days after the addition. In each well, 10 ml medium was used and 0.1 g wet calli were inoculated.

## 5) ABA 영향

자색고구마 잎과 괴근을 이용한 조직배양과 현탁배양에서 ABA 처리는 2,4-D, BA, Jasmonic acid 처리에 비교하여 캘러스 성장과 안토시아닌 색소 생합성에 큰 효과가 없었다. 그러나, 우리가 선발한 자색 변이체 캘러스를 몇 가지 조건으로 실험한 결과 잎과 괴근을 이용한 실험과는 상반된 결과를 나타낸 것이 많았다. 따라서, 자색 변이체 캘러스에 ABA를 처리하여 나타나는 효과를 관찰하였다.

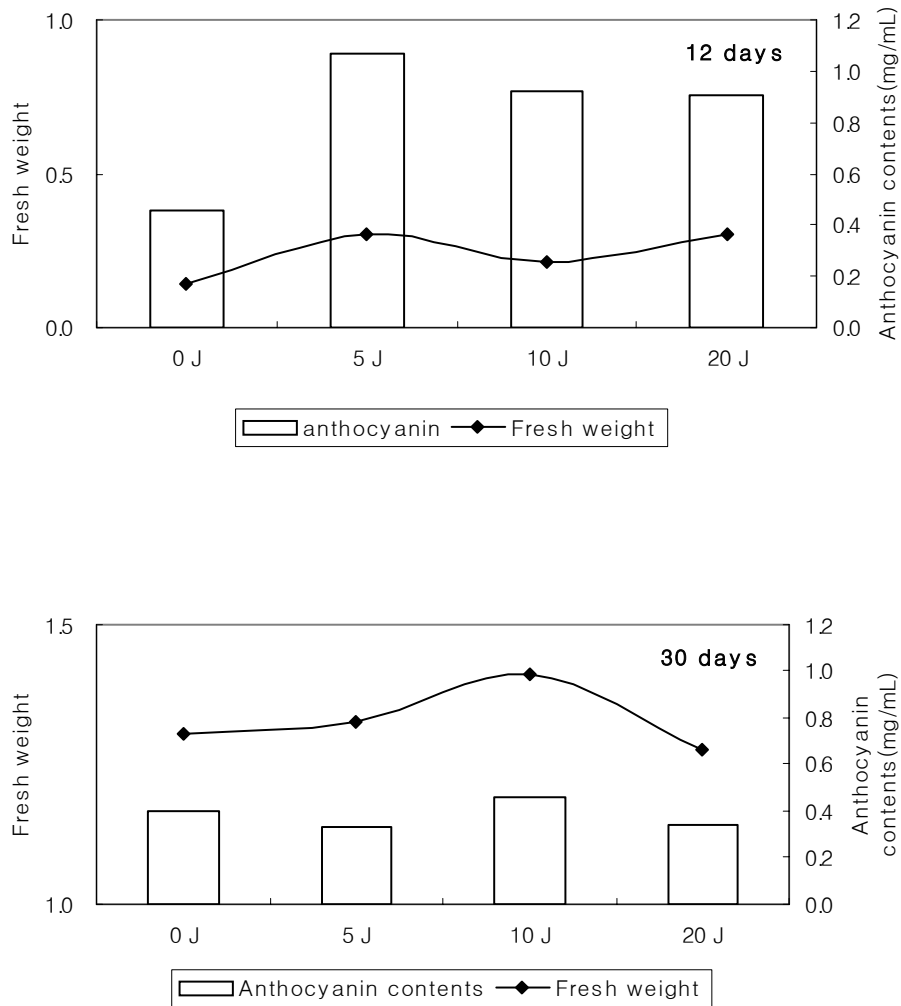
본 실험에서는 배양 6일째까지는 큰 변화가 없었다. 배양 12일 후 0  $\mu\text{M}$  ABA 처리구 즉, MS 기본배지에서 생체중이 0.4 g, 20  $\mu\text{M}$  ABA 처리 시 0.633 g으로 증가하는 결과가 나타났다(Fig. 30). 이는 같은 기간 2,4-D, BA를 처리했을 경우 보다 높은 성장량을 나타냈다. ABA 처리 시 성장량은 크게 증가시킬 수 있었으며 그 농도는 20  $\mu\text{M}$  처리가 가장 높았으며, 40  $\mu\text{M}$  처리 시 다소 감소하였다. 그러나, 안토시아닌 색소 생합성능은 ABA를 처리하지 않은 조건에서 더 높았다. ABA 처리로 단기간에 높은 성장을 유도할 수 있는 성장배지로 사용하고, 이를 다시 안토시아닌 생합성능이 높은 생산 배지로 계대배양하여 안토시아닌을 대량생산할 수 있을 것으로 기대된다.



**Figure 30.** The effect of various concentrations of ABA on anthocyanin content. ABA was added on 0 days and callus growth and anthocyanin synthesis was measured 12 and 30 days after the addition. In each well, 10 ml medium was used and 0.1 g wet calli were inoculated.

## 6) Jasmonic acid 영향

자색 변이체 켈러스에 0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  Jasmonic acid를 처리하여 켈러스 성장과 안토시아닌 생합성량을 조사하였다(Fig. 31). 그 결과 배양 12일 후 5 ~ 20  $\mu\text{M}$  Jasmonic acid 처리 시 켈러스 성장량이 2배가량, 안토시아닌 생합성량이 약 2 ~ 2.5배가량 증가하는 결과를 나타냈다. 이러한, 결과는 2,4-D, BA, ABA 처리 시 성장량과 안토시아닌 생합성량이 대조적으로 나타났던 결과와 반대의 결과였다.. 배양 30일 후에는 켈러스 생장이 13 ~ 14배가량 증가하여 켈러스 성장에도 효과적이었다.



**Figure 31.** The effect of different concentrations of jasmonic acid on athnocyanin content. Jasmonic acid was added on 0 days and callus growth and anthocyanin synthesis was measured 12 and 30 days after the addition. In each well, 10 ml medium was used and 0.1 g wet calli were inoculated.



## 4절 결과 및 고찰

잎과 피근 그리고 변이체 캘러스를 이용한 현탁배양의 결과는 유도된 캘러스의 지속적인 계대배양과 증식에 문제점이 있다. 선발된 변이체 캘러스를 이용한 유지, 증식이 방법은 매우 효과적으로 나타났다. 따라서, 이 캘러스의 배양방법을 이용하여 자색 고탍유 세포주를 선발할 수 있었다. 이를 이용하여 세포주 증식과 색소 생합성능이 높은 배양 조건을 확립하였다. 증식에는 20  $\mu$ M ABA가 첨가된 MS 배지가 효과적이었으며, 색소 생산에는 5 ~ 20  $\mu$ M Jasmonic acid를 첨가하는 것이 효과적이었다. 자색 변이체 캘러스는 피근의 안토시아닌과 달리 cyanidin이 검출되지 않고 peonidin이 소량 검출되는 등 그 성분에 차이를 보였다.

## 제 4 장 자색고구마 색소함량 제고를 위한 적정조건 구명

### 제 1 절 교잡육종에 의한 안토시아닌색소 고함량 계통 선발시험목포시험장

고구마 육종연구는 다른 작물들의 육종체계와 매우 비슷하게 주로 교잡육종 방법으로 알려져 있는 “교잡육종”에 의한 새로운 변이체의 창성에 주로 의존하고 있다. 따라서 본 연구에서는 자색고구마로서 다수성이면서 안토시아닌 색소 고함유 품종을 육성하기 위하여 자색고구마 유전자원간 인공교배에 의해 얻어진 실생종자의 파종에 의해 유망계통을 선발하고자 하였다. 유전적으로 고구마 재배종의 염색체수는  $2n=90$ , 기본 염색체수는  $X=15$ 인 동질6배체(BBBBBB)작물로서(Jones, 1964 ; Nishiyama, 1971 ; Austine, 1977), 배수성에 대하여 이질6배체(Shiotani & Kawase, 1989)라는 주장도 있었으나, RAPD(Random Amplified Polymorphism DNA)에 의한 연구로 Okoskit & Thompsom(1997)이 동질6배체로 확인하여 동질배수체임이 분명하여졌다.

#### 1. 수행방법

본 연구는 호남농업시험장 목포시험장에서 2001년부터 2003년까지 3년간 다음과 같은 과정에 의해 수행하였다.

##### 가. 인위 개화유도

고구마의 교잡육종을 위해서는 반드시 꽃이 있어야 한다. 그러나 고구마는 우리나라와 같은 온대지역에서는 개화가 잘되지 않으므로 개화유도를 위한 많

은 연구결과에 의해 나팔꽃대목에 고구마 접수를 접목하여 개화가 되도록 하고 있다. 고구마의 인위 개화유도 방법으로는 McClellan(1928), 野田(1936), Miller(1937), 繁村 등(1938), 秋元 & 近藤(1939)이 제안한 단일처리법과, Tiountine(1935), 秋元 & 近藤(1939), 萩原 & 石橋(1939), 長谷 & 和田(1952)이 제안한 접목법이 가장 널리 활용되고 있다.

- 나팔꽃 대목 양성 : 전년 10월 중순에 채종된 나팔꽃종자를 다음해 4월 상순에 종자소독한후 배유부분을 찢각하여 항온기에서 최아된 종자를 소형 비닐포트에 파종하여 온실에서 육묘하였다. 나팔꽃묘는 생육중에 主莖이 굵고 튼튼하도록 관리하여 접수고구마와의 접목이 용이하도록 재배하였다.
- 고구마 접수 재배 : 인공교배의 모·부본에 해당하는 고구마 품종 및 계통들을 씨고구마 파종 및 육묘를 위한 표준재배법에 준하여 3월 하순에 비닐하우스 묘상에 파종·육묘하여 접수로 사용하였다.
- 접목 및 접목묘 관리 : 접목은 6월 하순에 접수용 고구마 품종들의 지상부 30cm정도를 채취하여, 접목이 가능하도록 줄기두께가 굵게 자란 나팔꽃 대목의 頂端부위를 횡으로 절단하고 다시 중심부를 종으로 2cm정도 분할한 후, 접수용 고구마 품종의 줄기 하단부위 양면을 칼로 깎아서 분할된 나팔꽃 대목에 삽입하여 고정하는 방법으로 수행하였다. 접목부위의 고정은 파라핀(paraffin film)으로 감아 고정하였다.
- 초롱식지주대 설치 및 줄기 유인 : 접목 부위가 고착된 후 접수인 고구마 줄기가 자라게 되면 초롱식지주대를 설치하여 이후 계속해서 자라는 고구마 줄기의 중간 중간을 초롱식지주대에 끈으로 가볍게 묶어 유인하였다.
- 단일처리에 의한 개화유도 : 접목된 식물체를 자연일장이 짧아 단일처리를 하지 않아도 되는 겨울철에 야간온도를 15℃이상 유지할 수 있도록 가온시설이 갖추어진 유리온실과 비닐하우스에 두고 개화를 유도하여

동계 11월부터 다음해 3월까지 인공교배를 수행하였다.

#### 나. 인공교배 및 결실, 채종

접목 및 단일처리 방법에 의해 인위적으로 개화유도된 품종 각각에 대하여, 개화 전날 오후 3~5시경에 교배대상 품종별 柱頭(母本)로 사용될 완전 개화되지 않은 花蕾의 측면을 핀셋으로 가르고 5개의 수술을 제거한 후, 유산지 봉투를 씌워 집게로 봉하고, 다음날 오전 10 ~ 11시 사이에 父本이 될 꽃을 따서 제웅된 꽃의 주두에 화분을 묻혀주는 방법으로 수분하여 인공교배를 수행하였다. 인공교배에 의한 수분후 여름철에는 20일 정도, 겨울철에는 40일 정도에 채종이 가능하였다.

#### 다. 실생종자 파종 및 선발 (실생1년, 실생개체선발시험)

인공교배에 의해 채종된 종자는 교배조합별로 정리하여 묘상에 파종하고 종자로부터 발아된 묘를 잘라 본밭에 삽식하여 이로부터 생성된 괴근을 수확, 유망계통을 선발하였다. 고구마 종자는 경실종자로서 자연상태에서는 발아가 잘 되지 않는다. 따라서 경실종자를 황산에 침지하여 발아를 촉진시키는 방법도 있지만, 본 연구에서는 종자의 배에 가까운 배유부분을 찢아내어 흡습이 용이하도록 하여 발아시켜 묘상에 파종하였다. 묘상관리 및 묘재배는 목포시험장의 표준방법에 준하여 실시하였다. 묘상에서 묘가 30 ~ 40cm 정도 자라면 6월 상·중순경에 뿌리째 뽑아서, 뿌리부분을 완전 제거하고, 하루나 이틀 정도 그늘에 두어 충분히 경화시킨 뒤 본밭에 75 × 50 cm 간격으로 두둑 위에 삽식한다. 삽식방법은 고구마 표준재배법에 준하여 실시하며, 삽식후의 관리는 고구마의 일반재배 방법과 동일하게 실시하였다.

본밭에 삽식된 묘에서 괴근이 형성되면 10월 중순경에 굴취 수확하여 갯수가 많이 달리고 외관형상이 유망하며 용도별로 적합하다고 판단되는 괴근에 대하여 식물체 개체별로 선발하여, 다음해에 계통선발 예비시험(실생2년)에 파

중하고자 겨울철에 일반고구마의 저장방법과 동일하게 저장하였다 고구마는 유전적으로 염색체수가 많고 다배체이므로 인공교배에 의해 결실된 종자 하나 하나로부터 각각 매우 다양한 변이체가 생성되므로, 일반적으로 싹뿌리와 같은 괴근으로부터 대단히 크게 비대된 괴근까지 크기나 모양 및 껍질색에 있어서 다양한 표현형을 나타낼 뿐만 아니라 성분, 맛, 전분함량 등에서도 모두 다른 개체들이 출현한다.

#### 라. 계통선발 예비시험(실생 2년) 및 본시험(실생 3년)

실생1년에서 선발된 유망계통은 실생2년부터는 일반고구마의 재배방법과 동일하게 파종·수확되어 선발되는데 이는 고구마가 영양번식을 주로 하는 작물이므로 실생2년 이후의 과정은 증식에 의해 많은 특성들을 검사하면서 선발하는 과정으로 볼 수 있다. 이후의 과정은 실생4 ~ 5년차에서 생산력검정 예비시험 및 본시험, 실생 6 ~ 9년차에서 지역적응시험 및 실증시험을 거쳐 하나의 품종이 육성되므로 농가에서 신품종을 재배하기에는 약 10년의 기간이 경과된다.

#### 마. 안토시아닌 색가(color value)의 측정

안토시아닌 함량의 척도인 색가측정은 다음과 같은 방법으로 하였다.

안토시아닌 색소추출을 위한 구연산나트륨 완충용액은 0.1M 구연산과 0.2M 인산이나트륨용액을 4 : 1 로 혼합하여 pH 3.0으로 조정된 것을 사용하였다. 생고구마를 절단하여 10g 정도 평량하여 구연산나트륨 완충용액 100ml를 넣은 후 믹서로 마쇄하여 No. 6 여과지로 여과하였다. 이 여액을 다시 구연산나트륨 완충액으로 2배 희석하여 비색계의 액층 1cm, 파장 530nm에서 흡광도를 측정하여 색가를 환산하였다.

〈색가(E 10%, 1cm) = 흡광도 × 10 ÷ 시료량(10g) × 희석배수(2)〉

〈사진〉 고구마 인공교배 과정



나팔꽃 종자



대목용 나팔꽃 생육



접수용 고구마 묘



나팔꽃 대목에 고구마 접수 접목



단일처리, 개화유도 및 초롱식지주대



제웅 및 수분

## 2. 시험결과

### 가. 안토시아닌 색소 고함유 계통육성

#### 1) 인공교배 현황 및 채종립수

2001년부터 2003년까지 안토시아닌 고함량 품종육성을 위하여 수행된 시험결과는 표1에서 보는바와 같다. 2001년에는 MI p601-1 × 자미 등 3개 교배조합에서 총 2,475화를 교배하여 915개의 삭에서 1,481립을 채종하였고, 2002년에는 목포45호 × VISCA 95 등 2개 교배조합에서 402화를 교배하여 81삭에서 122립을 채종하였으나 2003년에는 무안1호 × 무안10호 등 2개 교배조합에서 1,890화를 교배하였으나 종자획득에는 실패하였다. 이상의 2001년부터 2003년까지의 총 7개 교배조합 중에서 2001년의 MI 9605-5 × 자미 및 2003년의 무안1호 × 무안10호, 자미 × 무안5호 등 3개의 교배조합에서 결삭 및 채종이 불가능 하였던 것은 이들 교배조합의 모부분에 해당되는 품종 및 계통들이 동일 교잡불임군에 속하기 때문으로 생각된다. 고구마에는 무궁화 등에서 볼 수 있는 것처럼 품종 및 계통간 교잡에서 채종 및 결실이 되지 않는 교배불화합성이 존재하여 국내에서는 안(2002)이 33개 국내 품종들을 대상으로 완전이면교잡을 실시하여 6개의 교잡불임군을 분류하였고 이들에 해당되는 품종과 교잡불임군 분류를 위한 표준품종을 선정한다 있다. 이에 따라 2001년에 수행된 교배조합의 모본 MI 9605-5와 2003년에 수행된 교배조합의 부분 무안5호는 이들 품종들의 부분 및 모본으로 사용된 “자미”품종이 교잡불임 S5군이므로 이 S5군과 단일 또는 복합교잡불임이거나 편측교잡불임인 품종으로 생각된다. 또한 2003년에 수행된 교배조합중 부분으로 사용된 무안10호는 모본으로 사용된 무안1호(목계2호)가 교잡불임 S2군이므로 이 S2군과 단일, 복합 또는 편측교잡불임에 해당되는 품종으로 판단된다. 따라서 이들 품종들은 금후 다른 교배조합 작성시 중요한 지표로 이용될 수 있을 것이다.

〈표 1〉 인공교배 현황 및 채종립수

교배 년도	교배번호	교 배 조 합		교배 화수	결삭 수	결삭율 (%)	채종 립수
		모	부				
2001년	MI 2001-20	MI 9601-1	자미	1,290	601	46.6	1,068
"	MI 2001-21	MI 9605-5	자미	598	-	-	-
"	MI 2001-22	MI 9601-1	MI 9605-5	857	314	36.6	413
소계	3조합			2,475	915		1,481
2002년	MI 2002-22	목포45호	VISCA 95	325	72	22.2	111
"	MI 2002-23	목포45호	JA-1997-7	77	9	11.7	11
소계	2조합			402	81		122
2003년	MI 2003-22	무안1호	무안10호	1,592	-	-	-
"	MI 2003-23	자미	무안5호	298	-	-	-
소계	2조합			1,890	0	0	0
총계	7조합			4,767	996	-	1,603



## 2) 유망계통 선발

2001년 인공교배로부터 채종된 실생종자는 2002년에 그리고 2002년에 채종된 종자는 2003년에 묘상에서 받아되어 채묘된 묘를 본밭에 이식하여 자색고구마로서 갯수가 많이 달리고, 비대가 왕성하며, 모양이 단방추형으로부터 장방추형까지 방추형의 일반적인 모양이되 껍질색이나 살색이 자색인 유망계통을 선발한 결과는 표2에서 보는바와 같다. 2001년에 채종된 2개 조합 1,481립으로부터는 2002년에 26계통이 선발되어 2003년에 이들 26계통을 본밭에 삼식하여 6계통이 선발되었고, 2002년에 채종된 2개 조합 122립으로부터는 각 조합에서 1계통씩이 선발되어 총 2계통이 선발되었다. 따라서 본 연구에서 수행된 인공교배로부터 채종된 총 1,603립으로부터 2003년 현재 총 8계통이 선발되어 2004년에 본밭에 삼식되어 2001년에 채종되어 선발된 6계통은 계통선발 본시험(실생 3년차 시험)에 그리고 2002년에 채종되어 선발된 2계통은 계통선발 예비시험(실생 2년차 시험)에 공시되어 포장생육 중으로서 이들 유망계통들은 금후 일련의 육종과정을 모두 거친 후 안토시아닌 색소 고함량의 다수성 품종으로 등록되거나, 육종을 위한 유전자원으로 선발될 것이 기대된다.

〈표 2〉 자색고구마 유망계통 선발 계통수

교배번호	교 배 조 합		과중 립수	2002년 선발계통수	2003년 선발계통수
	모	부			
MI 2001-20	MI 9601-1	차미	1,068	20	5
MI 2001-22	MI 9601-1	MI 9605-5	413	6	1
소계	2조합		1,481	26	6
MI 2002-22	목포45호	VISCA 95	111	-	1
MI 2002-23	목포45호	JA-1997-7	11	-	1
소계	2조합		122	-	2
총계	4조합		1,603	26	8

### 3) 색가 비교

상기 가) 및 나)에서의 인공교배에 의한 안토시아닌 고함유 품종육성 시험과 병행하여 기존의 육종 유전자원 및 고세대 계통들로부터 유망계통을 선발하기 위한 시험결과는 표3에서 보는바와 같다. 2001년부터 2003년까지 1998년에 육성된 “자미”품종을 표준품종으로하고 이후 육성된 “보라미”와 “신자미”를 대조 품종으로하여 3년간 시험하였던 목포45호, 무안1호 및 무안5호는 표준품종 “자미”에 비해 26 ~ 49%까지 다수성이나 2002년에 육성된 “신자미”에 비해서는 수량면에서 큰 차이를 보이지 않을 뿐만 아니라 안토시아닌 함량의 지표로 활용하고 있는 색가(色價, color value)에 있어서도 “신자미”의 8.9 E10%, 1cm 보다 높지 않아 차별성 및 신품종으로서의 구별성이 기존품종과 크게 다른 것이 없으므로 품종등록보다는 유전자원으로 활용하도록 최종 결정하였다. 또한 2002년 1년간 시험된 MI 9710-5는 표준품종 “자미”에 비해 수량 및 색가가 낮아 시험계통에서 탈락시켰고, 2002 ~ 2003년 2년간 시험된 무안10호는 수량은 낮으나 색가가 높은 계통이고 무안15호는 수량, 색가가 모두 낮으나 자색고구마로서의 생식 특성이 다른 자색고구마 유전자원들과 차별성을 보이므로, 금후 기능성 품종 육성을 위한 유전자원으로 활용할 계획이다. 이중에서 99 IT-20-1은 표준품종 “자미”에 비해 색가는 매우 낮으나 수량이 높고, 살색에 자색과 황색의 혼합에 의해 생고구마의 생식미가 우수할 뿐만 아니라, 자색고구마는 일반적으로 찢고구마 즉 “자저”상태에서 안토시아닌색소의 영향에 의해 쓴맛이 있으나 본 계통은 찢고구마의 식미도 양호한 편이므로 일반 식용고구마와의 차별성 및 건강 기능성이 중시되어 “목포53호”로 계통명을 부여하고 2004년에 계속해서 시험·검토할 예정이다.

〈표 3〉 기존 품종대비 자색고구마 유전자원 및 고세대 계통의 수량성 및 안토시아닌 색가

품종 및 계통명	시험기간	수량 (kg/10a)	Color value* (E10%, 1cm)	선발결과
자미	2001 ~ 2003년	2,047 (100)	8.2	(표준)
보라미	"	2,478 (121)	4.1	(대비)
신자미	"	2,442 (119)	8.9	"
목포45호	"	2,587 (126)	8.6	유전자원 보존
무안1호(목계2호)	"	2,865 (140)	7.0	"
무안5호(목계7호)	"	3,052 (149)	7.8	"
MI9710-5	2002년	1,718 (84)	7.2	탈락, 폐기
무안10호 (MI9710-6)	2002 ~ 2003년	1,921 (94)	8.6	유전자원 보존
무안15호 (MI9852-3)	"	2,108 (103)	5.8	"
목포53호 (99 IT-20-1)	"	2,306 (113)	4.5	2004년 시험
MI 9943-2	2003년	1,550 (76)	8.9	탈락, 폐기

\* Color value : 안토시아닌 色價

### 3. 결과요약

교잡육종에 의한 안토시아닌 고함량 계통 선발 시험의 주요결과는 다음과 같다.

- 1) 2001 ~ 2003년 동안 수행된 인공교배 총 7조합으로부터 4조합에서 1,603립의 채종 종자를 획득하여 이들 실생종자로부터 안토시아닌색소 함유 유망 8계통을 선발하여 이후의 육종과정 시험을 수행중이다.
- 2) 기존 자색고구마 품종, 유전자원 및 고세대 계통 에서는 목포45 등 5품종은 안토시아닌 색소 제고를 위한 육종시험에 활용하고자 유전자원으로 선발하였고, MI9710-5 등 2계통은 탈락 폐기하였으면 목포53호는 추가 검토를 위하여 선발, 시험중이다.
- 3) 상기 선발 및 시험중인 계통들은 금후 일련의 육종 시험과정을 거쳐 자색고구마 신품종으로서의 구별성, 신규성, 균일성 등에서 기존 육성 품종과 차별성이 있을 때 신품종으로 등록하여 생산자 및 소비자에게 공급할 예정이다.

## 2 절 재배방법에 의한 안토시아닌 색소함량 제고 적정조건 구명 시험

안토시아닌 색소를 함유한 자색고구마는 교잡육종 등의 육종방법에 의해 색소함량이 높은 품종의 육성도 가능하나, 재배시기의 조절 즉 삼식시기 및 수확시기의 조절 등과 같은 재배방법의 변경에 의해 색소함량의 제고정도를 검토하고자 하였다.

### 1. 수행방법

본 연구는 2002 ~ 2003년 2년간 호남농업시험장 목포시험장 고구마연구포장에서 다음과 같은 재료 및 재배방법에 의해 수행하였다. 시험품종은 2002년 목포시험장에서 육성한 자색고구마 “신자미”(안 등, 2002)를 국내 고구마 재배법에서 구분되는 조기, 보통기, 만기재배의 삼식기인 4월 15일, 5월 15일, 6월 15일 각 3시기에 본밭에 삼식하고, 삼식후 80, 100, 120, 140일 동안 재배한 후 수확하여 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사기준에 준하여 생육, 수량 및 안토시아닌 색가 등을 조사하였다. 본 연구의 육묘, 시비 및 기타 재배법은 고구마 표준재배법에 준하여 실시하였고, 안토시아닌 색가의 측정은 1절 연구의 수행방법에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

### 2. 시험결과

자색고구마 “신자미”품종의 삼식 및 수확시기별 괴근 수량 및 색가는 표 4에서 보는바와 같다. 괴근의 상저수량은 모든 삼식시기 시험에서 수확시기가 늦을수록 증가하였고, 삼식 140일 후의 상저수량은 4월 16일 삼식에서는 2,076

kg/10a, 5월 16일 삽식에서는 1,905kg/10a, 6월 16일 삽식에서는 1,823kg/10a로 삽식시기가 늦을수록 수량이 감소하였다. 그러나 안토시아닌 색가는 모든 처리에서 전체적으로 9.4 ~ 10.0 E 10%, 1cm 으로 삽식 및 수확시기 간에 유의적인 차이가 없었다. 따라서 고구마의 괴근은 식물의 생육기관중 뿌리가 비대된 것 이므로 뿌리의 기능 이외에 안토시아닌 색소함량의 고저에는 유전적인 영향이 가장 높고 환경 및 재배적인 영향은 매우 적은 것으로 판명되었다.

그러므로 이상의 시험결과에서 자색고구마는 괴근 형성과 동시에 안토시아닌 색소가 축적되며 괴근의 비대와 더불어 색소수량은 증가할 수 있으나 단위당 함량은 유전적 특성에 의해 일정한 것으로 보인다.

### 3. 결과요약

자색고구마 삽식 및 수확시기에 따른 수량 및 색가 변화를 검토한 결과는 다음과 같다.

가. 모든 삽식 및 수확시기 시험에서 수확시기가 늦을수록 상저수량은 증가하였으나 색가는 9.4 ~ 10.0 E 10%, 1cm 으로 큰 차이가 없었다.

나. 따라서 안토시아닌 색소의 절대함량은 재배기간에 따라 변화하지 않지만, 색소의 상대적 다수확을 위해서는 120일 이상 재배하는 것이 안토시아닌 색소함량의 제고를 위한 적정 재배조건으로 생각된다.

〈표 4〉 삼식 및 수확시기별 괴근 수량 및 색가

삼식시기 (월. 일)	수확시기 (본밭 삼식후 경과일)	수량 (kg/10a)	Color value (E 10%, 1cm)
4. 15 (조기재배)	80	375 a	9.0 a
	100	727 b	8.8 a
	120	1,578 c	8.8 a
	140	2,076 d	8.7 a
5. 15 (보통기재배)	80	377 a	8.8 a
	100	1,051 b	8.8 a
	120	1,589 c	8.4 a
	140	1,905 d	8.5 a
6. 15 (만기재배)	80	395 a	8.9 a
	100	1,120 b	8.4 a
	120	1,600 c	8.4 a
	140	1,823 d	8.5 a