

최 중
연구보고서

고구마의 무병 배양종묘의 대량생산과
보급체계 확립

연구기관 : 전북대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고구마의 무병 배양종묘의 대량생산과 보급체계 확립” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 12 월 9일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 은 중 선

연 구 원 : 김 영 선

연 구 원 : 박 종 숙

연 구 원 : 정 재 훈

연 구 원 : 오 월 선

협동연구기관명 : 전북농업기술원

원종사업소

협동연구책임자 : 김 요 진

요 약 문

I. 제 목

고구마의 무병 배양종묘의 대량생산과 보급체계 확립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목 적

고구마의 번식은 씨고구마를 장기간 저장한 후 이듬해 出芽, 挿植하여야 하므로 수확량의 10%는 씨고구마로 저장하여야 하고 저장 중 부패가 많으며, 15℃ 내외의 특수한 저장시설이 요구는 바 재배농가의 부담이 많아 극히 비경제적이다. 또한 영양 번식성 고구마에는 SPFMV 등 10여종의 바이러스가 感染되어 있어 품질저하 및 수량 감소가 초래되고 있다. 귀중한 유전자원의 유지도 매년 가을 種蒔用 塊根을 저장한 후 翌年에 포장재배, 수확하여 보존하여야만 하므로 위험성이 따르며 노력 및 경비가 많이 소요되고 있다.

따라서 본 연구에서는 고구마의 無病 배양종묘를 器內에서 생산하고 대량으로 증식하며, 순화시켜 挿植用 배양종묘를 생산하는 방법을 개발하여 농가에 보급하는 체계를 확립함과 동시에 遺傳子源을 기내에서 凍結保存하는 방법을 구명하고자 하였다.

2. 필요성

가. 고구마는 세계 5대 작물로서 우리나라에서는 경기, 전남·북, 충남, 경남, 제주지방에서 총 재배면적의 86%를 占有하고 있다. 절대 식량자원이 부족하였던 '60년대에는 고구마의 재배면적이 가장 많았으나 경제성장과 더불어 생활수준이 향상됨에 따라 식생활이 고급화되고, WTO체제에 따라 전분과 주정원료 및 당면의 수입증가로 급격히 감소되었으나 최근 수요가 증가하여 재배면적이 늘어나고 있는 실정이다.

나. 최근 고구마에 함유되어 있는 다량의 복합적인 영양소는 기능성 식품으로서 그 가치가 크게 인정되어 식용이 증가되고 있으며 고구마순을 채소로 이용하는 재배면적이 급증하고 있고, 사료용, 生分解性 plastic용 전분원료, 가공용, 색소용 유색고구마 등이 소개되면서 다양한 유전자원의 개발이 요구되고 있다.

다. 고구마의 번식은 영양체인 塊根을 저장, 이듬해 出芽시켜 莖葉을 삽식하는 영양번식방법을 이용하고 있으므로 母株에 바이러스, 마이코플라스마, 세균, 진균 등이 감염되어 있으면 대대로 이병되기 때문에 생육 및 품질의 저하 뿐 아니라 수량면에도 큰 손실이 따른다. 고구마의 바이러스병은 여러 가지가 알려져 있으나 특히 대상조피증(SPFMV)에 이병되면 품질이 현저하게 떨어지고 생산량도 감소되어 문제가 되고 있는 바 무병주의 유도, 증식 및 보급체계가 요구되고 있다.

라. 씨고구마용 種諸의 저장 및 유전자원의 유지·보존을 위하여 매년 11월~翌年 3월까지 12~15℃, R.H. 85~90%의 특수한 저장시설이 요구되는 바 많은 시설비와 유지비용이 소요되며 저장후 씨고구마의 부패에 의한 감모율이 높고 중량감소가 따르므로 경제적 손실이 크다.

마. 種諸用 고구마는 당년에 수확한 양질의 塊根을 선별하여 1톤/ha의 고구마를 판매하지 못하고 저장하여야 하고 삽식용 종묘를 구입하는 경우 20~30원/삽식묘이 소요되므로 종묘대는 ha당 125만원내외가 요구된다. 따라서 본 연구의 개발로 염가의 무병한 배양종묘를 생산, 농가에 보급하는 재배체계를 확립하여야 한다.

바. 21세기의 첨단농업시대를 앞두고 육묘의 공정화, 영농구조의 분업화, 기업화, 자동화하는 추세에서 농민이 직접 다량의 씨고구마를 매년 저장하고 육묘하여 재배하여야 하고, 遺傳子源도 매년 포장에서 재배, 유지하여야 하는 구태의연한 농법에서 탈피하고 첨단과학기술이 도입된 신 농법이 요구된다.

사. 품종개발에는 다양한 유전자원을 수집하여 보존·유지하여야 하는데 현재 우리나라의 유전자원 유지방법으로는 저장한 씨고구마를 매년 포장에서 재배하여야만 하는 바 병·해충의 汚染 등으로 위험성이 따르고 포장재배와 저장에 많은 인력과 비용이 요구되고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구내용

- 가. 국내·외의 우량한 유용 유전자원을 수집 및 재배한다.
- 나. 치상재료별로 胚發生的 켈러스와 체세포배를 유도하고 再分化하는 체계를 수립한다.
- 다. 정단분열조직의 크기, 熱處理, 화학약품 처리 등에 따른 無病株 생산 효과와 적정배지의 조성을 구명한다.
- 라. 再分化된 식물체에 대하여 각각 바이러스 罹病性 여부를 조사한다.
- 마. 형광등과 적색광, 청색광, 혼합광 등 LED를 이용한 성장반응을 조사한다.
- 바. 순화용 기내 배지와 光混合 및 光自家榮養培養에 의한 성장효과를 조사한다.
- 사. 無病 배양종묘의 급속 대량증식을 위하여 마디삽방법을 개발한다.
- 아. 배양종묘를 포트에 插植하고 순화방법과 증식효율을 조사한다.
- 자. 배양종묘의 포장재배와 관행의 재배방법을 비교하여 생산성을 분석하고 경제성을 제시한다.
- 차. 遺傳子源을 器內에서 凍結貯藏하는 방법을 한다.

2. 연구개발 범위

- 가. 국내 우량재배 품종인 '신천미', '진홍미' 등과 일본 수입종인 '베니아즈마' 등 10여종을 목포시험장, 원종장, 독농가 등에서 수집, 유지하면서 배양재료로 활용한다.
- 나. 정단분열조직을 치상재료로 하여 MS배지 등 기본배지와 auxin, cytokinin 등 성장조절물질의 조성을 달리하여 배발생적 켈러스와 체세포배의 유도, 유식물체의 재생, 증식 등에 적합한 배지조성, pH, 糖 농도, 배양온도 등을 구명한다.
- 다. 無病株를 육성하기 위하여 정단분열조직의 크기, 열처리, 항바이러스제 처리, 열처리와 항바이러스제 혼합처리 등으로 유식물체를 재분화시키고, 바이러스 이병성 조사는 ELISA 및 RT-PCR방법으로 검정한다.
- 라. 형광등과 적색, 청색, 및 혼합광 등 발광다이오우드 조사에 의한 폐쇄환경에서

의 성장반응을 조사하고, membrane filter를 이용한 光混合 및 光自家榮養培養에 따른 유묘의 성장효과를 조사한다.

마. 기내 배양종묘의 증식효율을 제고시키기 위하여 마디부위별 성장효과를 조사하고 이 방법의 개발을 위하여 1병당 삽식마디 수, 배양기간 등에 따른 증식효율을 조사한다.

바. 배양종묘를 plug묘판에 삽식하고 순화효과를 조사한다.

사. 무병 배양종묘와 기존의 관행 증식법에 따른 挿植苗를 포장조건에서 재배하면서 성장량, 罹病性, 변이성, 수확량 등을 조사하여 생산성을 비교하며 경제성 등을 조사 분석한다.

아. 정단분열조직배양에서 유도된 배발생적 캘러스 및 체세포배의 동결보존을 위하여 초저온저장법, vitrification법 등을 적용하여 液體窒素에 급속 동결저장하고, FDA법 등에 의한 생존효과를 조사한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 품종에 따른 성장반응은 유식물체의 再生에 있어서 공시품종 중 ‘신천미’, ‘진홍미’, ‘울미’, ‘신황미’, ‘자미’ 품종이 다른 품종에 비해 쉽게 재생되었다. 성장조절제의 조성에 따른 성장반응은 0.05~0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용구에서 전체적으로 양호한 再生率을 보였으며, 1.0~2.0 mg/L BA 단용구에서도 좋은 결과를 얻었다. 葉原基의 부착 枚數에 따른 shoot 분화율은 엽원기 3~4매 부착한 0.6~0.8 mm 크기에서 68.8%로 다소 높게 나타났으며, 초기 생육이 다소 빠르게 진전되었으나 배양기간이 경과하면서 일단 분화된 shoot는 성장속도가 빨라져서 정단분열조직의 크기와 매수에 관계없이 성장하여 배양 60일경에는 차이를 관찰할 수 없었다.

胚發生 캘러스는 4.0 mg/L의 2,4-D 첨가구에서는 전혀 얻을 수 없었으나 1.0~2.0 mg/L 첨가구에서 배발생캘러스를 유도할 수 있었다. 품종 ‘White Star’의 경우 배발생 캘러스의 發生率이 74%로 ‘울미’에 비해 다소 높은 경향을 보였다.

나. ELISA를 이용하여 86개체의 培養苗에서 CMV를 검정한 결과 모두 51개체에서 바이러스에 感染된 것으로 나타났다. 또한 자체 제작한 primer를 사용하여 SPFMV를 검정하였던 바 바이러스에 감염된 식물체의 경우 SPFMV의 특이 위치인 411bp에서 PCR産物을 형성하였고 virus-free 식물체의 경우 PCR 산물을 형성하지 않았다. RT-PCR을 이용하여 SPFMV의 感染與否를 진단한 결과 전체 86개체 중 65개체에서 특이 밴드를 확인할 수 있었는데 이 결과는 SPFMV의 무병주 획득률이 24.4%임을 나타낸다.

다. 頂端分裂組織의 크기가 크면 클수록 식물체 재생률은 높아졌으나 바이러스 제거율은 낮아졌으며, 0.3~0.5 mm 크기의 정단분열조직배양에서는 SPFMV의 제거율이 35%로 나타났다. 35℃에서 2주간 열처리한 후 葉原基를 3-4매 부착하여 정단분열조직을 배양한 후 SPFMV를 조사한 결과 모든 식물체에 바이러스가 감염된 것으로 판명되어 2주간의 열처리 효과는 전혀 없는 것으로 나타났다.

‘栗美’의 정단분열조직을 엽원기 1~2매 부착하고 amantadine과 배양한 결과 amantadine 무처리구에서 41.7% SPFMV-free 개체를 얻었으며, 10~20 mg/L가 첨가된 배지에서 SPFMV-free 개체를 100% 얻었으나, 20 mg/L가 첨가된 배지의 shoot 재생률이 현저히 감소하여 5-10 mg/L의 amantadine 처리와 엽원기 1~2매 부착하여 정단분열조직배양을 하는 것이 無病株를 얻는데 효과적이라고 판단되었다.

‘White Star’의 정단분열조직을 엽원기 1~2매 부착하여 배양한 결과 抗바이러스제의 처리 有無와는 관계없이 전 처리구간에서 100%의 바이러스 무병주를 획득하였다. 그러나 엽원기 3~4매 부착하여 배양한 결과 amantadine 무처리에서는 바이러스 무병주를 한 주도 얻지 못하였으나 20 mg/L의 amantadine 처리구에서 76.9%의 높은 바이러스 무병주를 얻어 품종간에 효과가 달랐다. ‘울미’의 경우 葉原基를 3~4매 부착하고 35℃ 2주간의 온도처리와 10 mg/L의 amantadine를 함께 처리한 경우 SPFMV-free 식물체를 얻는데 효과적이었다.

라. 유식물체의 생육에 가장 효과적인 pH는 4.8이었으며, 설탕의 함량은 6~8%인 배지에서 식물체의 초장, 근장, 마디수, 엽면적, 생체중 및 건물중 등 성장반응이 가장 양호하였고 설탕의 함량이 6~8%보다 낮거나 높아지면 생장이 감소하였다.

培養溫度에 매우 민감한 반응을 보여 22℃에서 초장이 3.8 cm였으나, 31℃에서는 11.6 cm로 3배에 달하는 차이를 보였다. 28℃에서 배양된 식물체의 경우 뿌리와 신

초의 생장이 양쪽 모두 우수하여 기내 배양에 있어서 28℃ 온도조건이 가장 양호한 반응이었다.

마디의 위치는 頂端部位를 포함하는 맨 윗마디가 다른 마디를 배양한 결과보다 우수하였고 그 외의 마디 배양간에는 큰 차이가 없었으므로 대량증식할 경우 경정조직을 포함한 마디를 제외하고 그 이하의 마디를 배양하면 균일한 묘를 동시에 확보할 수 있었다.

MS배지에서 배양된 유식물체는 B5배지에서 보다 초장, 절간수, 총 엽록소에 있어서 양호한 반응을 보여 적합한 배지로 나타났다. MS培地の 무기염과 질소농도는 器內 식물체의 생장에 영향을 미쳤는데, 60 mM(NH₄⁺: 20.6 mM, NO₃⁻: 39.4 mM)의 질소농도에서 草長, 절간수, shoot의 생체중, 총 엽록소 함량이 증가하였다. 1배 MS배지에서 배양된 식물체는 여러 가지 성장반응에 있어서 0.5배나 2배 MS 무기물 농도에 비하여 더 양호한 결과를 보였다.

NAA농도 효과는 0.1~0.5 mg/L가 첨가된 배지간에 현격한 차이는 확인할 수 없었으나, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서는 줄기의 기부에 캘러스가 거의 발생하지 않고 뿌리가 직접 발생하여 순화에 양호하였다.

본 실험에서 밝혀진 최적조건에 따라 기내증식한다면 이론적으로 1년간 약 1천만 본의 유식물체 생산이 가능하다고 판단된다.

마. MF 未附着區에서 3% sucrose가 포함된 배지에서 신초의 성장과 절간수가 증가하였으며, MF 3개 부착된 배지에서 초장은 MF 미부착구보다 작았으나, 뿌리의 길이, 엽면적과 건물물에 있어서 더 좋은 반응을 보였다. 6% sucrose가 첨가된 MF 미부착구에서 초장과 절간수에 있어서 가장 좋은 반응을 보였으며, MF 1개 부착구에서 성장반응은 3% sucrose의 MF 3개 부착구와 유사한 성장반응을 보였다.

赤色 LED에서 성장한 식물체는 형광등과 다른 LEDs에서 성장된 식물체에 비하여 가장 긴 줄기신장과 가장 작은 葉面積을 보였다. Shoot길이는 청색광에서 2.7 cm, 赤色光에서 8.1 cm로 적색의 單色光에서 식물체가 도장되었으나, 적색/청색 혼합광에서 3.6 cm로 형광등의 4.3 cm와 비슷하였고 적색의 단색광보다 2배이상 짧았다. 적색/청색의 混合光에서 식물체의 草長은 청색광의 영향을 받아 정상적인 식물체의 생육을 보여 적색과 청색의 혼합광이 식물체 생육에 적당하였다. 螢光燈에서의 葉面積은 19.5 cm²로 적색광에서의 10 cm²에 비하여 약 2배가 넓었으며 다른 처리구에 비하여 가장 넓게 나타났다. 赤色光에서 초장에 큰 차이를 보여 MF를 부착하지 않은 경우

shoot길이는 10.7 cm였으나 부착한 경우 5.4 cm로 2배이상 감소하여 형광등의 4.9 cm와 비슷하였는데 MF처리가 적색 단색광에서의 식물체의 徒長을 현저하게 억제시켜 효과적이었다. 뿌리길이와 葉面積 역시 MF가 부착된 모든 LEDs에서 부착하지 않은 경우보다 높게 나타났다.

바. RAPD를 이용하여 변이체의 발생 有無를 총 21개의 primer를 이용하여 분석한 결과, ‘울미’와 ‘White Star’ 두 품종 모두 대량 증식된 식물체간에 변이체를 전혀 발견할 수 없었다.

순화실험에서 뿌리를 붙인 채 심은 배양종묘의 경우 품종 ‘베니아까’는 100% 생존하여 가장 높았고 ‘신천미’는 93.3%로 가장 낮았으며 평균 96.4%가 생존하였다. 뿌리를 자르고 삼목한 처리구는 ‘신천미’가 91.6%로 가장 높았고 ‘진홍미’는 85.7%의 생존율을 보였다.

배양종묘와 저장종저와의 삼식묘 생산량은 배양종묘중에서는 ‘신황미’가 1본당 평균 19.2개로 타품종 보다 0.5~3.2개 정도 많았고, 貯藏種蒔에서는 ‘신천미’가 25.6개로 다른 품종에 비해 5.2~7.3개가 많았다. 또한 배양종묘와 저장종저와의 1개체당 비교에서는 저장종저의 삼식묘 생산량이 대체로 많은 편으로 특히 ‘신천미’의 경우 41.4%가 더 생산되었다. 무병종묘를 묘상에서 육묘하여 삼식용 종묘를 생산할 수 있는 본수는 품종별로 약간의 차이는 있으나 평균 18본을 얻을 수 있었다. 그러나 계속적인 채묘방식을 활용하면 최고 65본까지 생산할 수 있었다.

1차년도 배양종묘에서 수확한 저장종저와 2차년도 배양종묘를 재배한 후 수확량을 비교할 때 모든 품종에서 2차년도 배양묘에서 11.7~55.8% 증수되었는데 이것은 묘소질의 차이가 아니고 토질, 기후 등 환경적 요인이 크게 작용한 결과라고 생각된다.

無病種蒔와 저장종저묘와의 생육특성은 품종간에 큰 차이를 발견할 수 없었고, 수확량에서는 無病種蒔에서 ‘울미’와 ‘진홍미’는 貯藏種蒔 보다 9%내외의 增收를 보여 경제성을 분석하면 4,000,000원/ha의 소득증대 효과가 있었다. ‘신황미’와 ‘신천미’는 대조구와 큰 차이가 나타나지 않았다.

사. 정단분열조직의 초저온 동결보존에 있어서 PVSII용액을 이용한 vitrification방법에 의한 냉동 후 생존한 식물체를 한 주도 얻지 못하였다. 품종 ‘울미’의 배발생켈러스를 실험재료로 여러 가지 동결보호제를 처리하여 2-step method에 의해 초저온 동결보존한 후 TTC방법과 FDA염색법을 통해 생존여부를 확인한 결과 0.4 M sucrose가 포함된 1.28 M DMSO 처리구에서 46.8%의 가장 높은 생존율을 나타냈다. 생존된 켈러스는 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 6주일간, 0.1 mg/L 2,4-D와

kinetin이 첨가된 배지에서 2주일간 계대배양하여 체세포배를 발생시켰고 성장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에 옮겨 체세포 배의 발아를 관찰할 수 있었다.

2. 연구결과의 활용계획

가. 본 연구결과는 各道 농업기술원 傘下 시군 농업기술센터의 홍보자료로 활용하고, 민간기업에 기술이전하여 고구마의 무병한 배양종묘 대량생산과 증식, 재배, 보급 등에 실용화할 수 있도록 지도한다.

나. 본 연구결과를 농가에 보급하여 실용화하기 위한 실증적 연구를 위하여 전라북도 농업기술원의 경상과제로 2003년도에 시험을 수행하기로 하였으며, 공동연구과제로 농촌진흥청에서 수행하는 '2003 농업생산현장 신기술투입 접목연구'의 신규과제로 제출하고 자 협의중이다.

다. 본 연구는 오윤바이오텍이 참여기업으로 공동연구하였으므로 기업화를 희망하는 경우 농림기술관리센터와 협의하여 추진할 계획이다.

라. 유전자원의 급속 동결보존 연구결과는 기내에서 유전자원을 장기간 저장하므로서 유전자원의 유지 및 증식에 소요되는 막대한 예산을 절감하는 자료로 활용한다.

마. 본 연구결과는 딸기, 국화, 카네이션 등 영양번식성 원예작물의 無病株 획득 및 증식체계와 유전자원의 장기 凍結保存體系의 확립에 유용한 자료로 응용될 수 있다.

사. 주요 연구결과 특히 대량증식방법, 바이러스무병주의 검정방법 및 초저온 동결보존방법 등은 특허출원을 하고자 한다.

아. 본 연구결과의 일부는 국내·외 전문학술회의에 발표하고 논문으로 투고·게재하며, 연구원의 석사학위 및 박사학위 취득논문으로 활용한다.

3. 활용에 대한 건의

본 연구는 고구마에서 우량한 바이러스 무병종묘를 육성하여 기내 대량증식하는 체계와 재배에 이용하기 위한 순화, 채묘, 재배적 잇점 등 일련의 연구를 종료하였는 바 실제 培養種묘의 기업적 생산 및 재배농가의 현장애로 문제에 적극 대처할 수 있다고 생각된다. 이의 활용을 위하여 대 농민 선진농업 기술교육과 농촌지도사업 및 연구자료로 활용할 수 있도록 各道 농업기술원 차원에서 적극 홍보하고 활용할 수 있는 대책이 요구된다.

SUMMARY

1. Induction of plantlets from apical meristem tip culture

Eight cultivars cultivated in Korea ('Shincheonmi', 'Jinhongmi', 'Yulmi', 'Shinhwangmi', 'Jami', 'Beniaka', 'Beniazuma' and 'Choongseung #100') were collected. The apical meristem in different size was cultured on MS medium with various plant growth regulators for 60 days and checked growth responses and regeneration efficiency.

Among varieties, 'Shincheonmi', 'Jinhongmi', 'Yulmi', 'Shinhwangmi' and 'Jami' regenerated plantlets more readily than other cultivars. NAA at 0.05~0.1 mg/L in combination with BA at 1.0~2.0 mg/L was effective in regenerating plantlets, so was only BA at 1.0~2.0 mg/L. High concentration of BA or kinetin induced a poor regeneration.

The apical meristem 0.6~0.8 mm in size with 3~4 of leaf primordia was higher than 0.3~0.5 mm in size in shoot regeneration and enhanced earlier growth. Later, there was no difference in shoot growth regardless of apical meristem size and leaf primordia number.

Embryogenic callus were induced on MS medium with 1.0~2.0 mg/L 2,4-D but no induction in 4.0 mg/L at 2,4-D. Somatic embryogenesis showed higher tendency in 'White Star' than 'Yulmi' and indicated 74.0% in 'White Star'.

2. Detection of virus for cultured plantlets

In vitro plantlets derived from apical meristem culture were examined to check virus infection as determined by ELISA test for cucumber mosaic virus(CMV) and RT-PCR assay for sweet potato feathery mottle virus(SPFMV) detection.

Among total 86 plantlets, 51 plantlets were infected with CMV by ELISA test. By using the SPFMV primers produced, specific PCR products of 411bp were

confirmed in virus infected sweet potato, while no specific products were detected in virus-free sweet potato. As a result, 21 plantlets among total 86 plantlets (24.4%) were not detected for SPFMV.

3. Production of virus-free stocks

In order to minimize virus damage that decline yield and quality and establish virus-free plant production system by apical meristem culture, this experiment was conducted. Also, it was examined to establish virus-free plant production system by heat treatment only, anti-viral agent only, and in combination heat treatment and anti-viral agent using excised vine-tip in some cultivars that hardly regenerate shoots through apical meristem culture.

The apical meristem culture in size 0.3~0.5 mm was eliminated SPFMV at 35%. The effect of heat treatment at 35°C for 2 weeks before apical meristem culture was evaluated. The apical meristem with 3~4 leaf primordia was cultured for 2 months and was checked for SPFMV by RT-PCR. All plantlets derived from apical meristem culture were infected with SPFMV

Both apical meristem culture of 1~2 leaf primordia(small) or 3~4 leaf primordia(large) and amantadine treatment were used to generate virus-free plants in cv. 'Yulmi'. In small meristem culture without amantadine, 41.7% of virus-free plantlets was obtained, whereas in the addition of amantadine at 10 or 20 mg/L 100% of virus-free plantlets was produced. However, shoot regeneration rate was very low in the MS medium containing 20 mg/L of amantadine. The highest percentage(55.5%) was obtained in MS medium containing 20 mg/L of amantadine. There was no virus-free plantlets in large meristem culture without amantadine. In conclusion, apical meristem culture for 'Yulmi' was effective in obtaining virus-free plants when meristem size was 1~2 leaf primordia(small) in MS medium containing 5~10 mg/L of amantadine.

With 'White Star' small meristem (0.3~0.5 mm) culture produced 100% of virus-free plant independent of amantadine. In large meristem culture there was

no virus-free plants without amantadine, while 76.9% of virus-free plants was obtained in 20 mg/L of amantadine treatment.

When both heat and amantadine treatment were applied to 'Yulmi' excised large meristem, amantadine at 10 mg/L with heat treatment was effective in obtaining virus-free plants.

4. Culture condition on the *in vitro* multiplication of virus-free stocks

pH, sugar concentration, culture temperature, nodal position, kind of basal medium, salts strength and NAA concentration were examined to check *in vitro* culture condition effected on micropropagation of cv. 'Yulmi' derived from apical meristem using single node culture.

The most effective pH of the medium was 4.8 for various plant growth responses in single-node culture. Sugar concentration of 60~80 g/L resulted in the increases in shoot length, root length, node number, leaf area and bio mass of shoot and roots. At lower or higher concentration (by 6%) of sugar, plant growth was reduced.

Temperature obviously affected shoot growth; Q_{10} was about 3 (i.e., 3.8 cm at 22°C vs 11.6 cm at 31°C). The plantlets cultured at 28°C had good responses both shoot and root growth. It was considered as the best temperature for *in vitro* multiplication.

MS medium was better than B5 medium in terms of the better responses in shoot length, node number, and total chlorophyll content. MS medium strength and nitrogen concentration had influence on *in vitro* plant growth. Nitrogen at 60mM in MS medium effectively increased shoot length, node number, fresh weight of shoot, and total chlorophyll contents. In general, the 1× strength of MS salt was better than 2× strength of MS salt for various growth responses.

NAA concentration at 0.1~0.5 mg/L in MS medium had no significant differences in growth responses but it was showed differences in the size of callus formed around basal node. NAA concentration at 0.1 mg/L in MS medium

was formed directly roots without hardly callus formation.

In our experiment we can produce about 10,000,000 plantlets per 1 year theoretically if we followed optimal *in vitro* culture condition revealed.

5. *In vitro* acclimatization of cultured seedlings

To check *in vitro* acclimatization effects of sweet potato cv. 'Yulmi' derived from apical meristem, the single node was cultured with or without membrane filter attached on the lid for autotropic and also under red, blue, red(80%) plus blue(20%) using light emitting diodes(LEDs), and fluorescent lamps(control), the effects of light quality and membrane filter on the *in vitro* growth and morphogenesis were examined.

There was no effect of membrane filter attached to the lid(MF+) in sucrose-free medium for the shoot growth, whereas MF+ treatment enhanced the root growth remarkably. In MS medium containing 3% sucrose MF-(without membrane filter on the lid) treatment, shoot length and node number were increased. MF+(3) treatment (3 sheets of membrane filters attached to the lid) induced shorter shoot length than MF- medium, but showed the better response in root length, leaf area and dry matter rate. MF- treatment with 6% sucrose showed the best responses in shoot length and node number. MF+(1) treatment (1 sheet of membrane filter attached to the lid) containing 6% sucrose showed similar responses to MF+(3) treatment containing 3% sucrose.

Plantlets grown under red LED had the longest shoot length and the smallest leaf width. Shoot length was the greatest (8.1 cm) under red LED and it was the shortest(2.7 cm) under blue LED. The stems remarkably elongated under red LED when compared with those under blue LED. But the growth of plantlets under red plus blue LEDs was inhibited. Shoot length was 2 times shorter under red plus blue than under red LED. This results indicate that red LED may be suitable, in proper combination with other wavelengths of light. Leaf area of plantlets developing under fluorescent lamps was 2 times wider (19.5 cm² in area)

than that of plantlets grown under red LED(10 cm² in area). On the other hand, in order to examine the effect of membrane filter, sweet potato plantlets were cultured in culture vessels capped with or without membrane filter under various LEDs. Node number and shoot length of plantlets grown under blue, red, red plus blue LEDs with membrane filter increased. Above all, shoot length of plantlets grown under red LED without membrane filter was the greatest(10.7cm per seedling) among the treatments. However, shoot length of plantlets grown under red LED with membrane filter was 5.4cm similar to plantlets grown under fluorescent lamps with membrane filter. Root length and leaf area of plantlets under blue, red, red plus blue LEDs with membrane filter were higher than those of plantlets under grown blue, red, red plus blue LEDs without membrane filter.

6. Cultivation, economic analysis, and spread system of cultured seedlings

Virus-free plantlets were acquired from SPFMV infected plant by apical meristem culture in sweet potato cv. 'Yulmi' and 'White Star'. These virus-free plantlets were used as a mother stock and multiplied *in vitro*. RAPD analysis, a method of molecular marker was conducted to detect variation for *in vitro* mass-propagated plantlets. There was no variation of *in vitro* propagated plantlets in two cultivars using by total 21 primers.

Among the *in vitro* plantlets transplanted with roots, cv. 'Beniaka' was the highest survival rate at 100%, 'Shincheonmi' was the lowest at 93.3%, and the mean of survival rate was 96.4%, whereas 'Shincheonmi' was the highest at 91.6%, and 'Jinhongmi' was 87.5% of survival rate in *in vitro* plantlets transplanted without roots.

In the vine cutting production of *in vitro* seedlings and storage root seedlings, cv. 'Shinhwangmi' was the best (the mean of 19.2 seedlings for field cutting per plant) that produced 0.5~3.2 cuttings more than other cultivars among *in vitro* seedlings and 'Shincheonmi' produced 25.6 seedlings for cutting, that was 5.2~7.3 more than others in storage root seedlings. Also, in the comparison of *in vitro*

seedlings and storage root seedlings per plant, vine cutting production of *in vitro* seedlings was generally more than storage root seedlings, particularly cv. 'Shincheonmi' produced 41.4% more. It showed more or less difference among cultivars for producing virus-free cutting seedlings raised in the nursery, obtained the mean of 18 seedlings for field cutting. But we produced up to 65 seedlings when used a cut-out method continuously .

The second year *in vitro* seedlings produced 11.7~55.8% more in the comparison of yield after cultivating storage root seedlings from the first year *in vitro* seedlings and the second year *in vitro* seedlings in all cultivars. It was regarded as the result of environment effects such as soil and weather not quality of seedlings.

It showed sort of difference in the growth response of virus-free seedlings and storage root seedlings. Virus-free seedlings cv. 'Yulmi' and 'Jinhongmi' produced about 9% more in yield, but cv. 'Shinhwangmi' and 'shincheonmi' were similar to control. It was considered as the main effect that the mother stocks maintained and multiplied in the experimental station were high grade storage roots not infected virus, as we couldn't observe distinct virus symptom in appearance or morphological abnormality in the field,

In the analysis of economical efficiency, it was estimated that the cost of producing *in vitro* seedlings was ₩115 per 1 seedling and it was regarded that economical efficiency for *in vitro* seedlings was high. In the comparison of *in vitro* seedlings with storage root seedlings for economical analysis in yield, growing *in vitro* seedlings would increase farmer's income about ₩4,000,000 per ha more than storage root seedlings.

We expect to form a part of the farmer's income elevation when prepared organizational producing system and uplifted farmer's recognition because of weak recognition of virus damage although the superiority of virus-free seedlings in growing and producing on a farm was approved and the response was friendly to farmers.

7. *In vitro* cryopreservation of germplasm

It was examined to establish *in vitro* germplasm cryopreservation of apical meristem and embryogenic callus in sweet potato cv. 'Yulmi' using liquid nitrogen.

There was no survival apical meristem explant by vitrification method using PVS II solution after cryopreservation. Cryopreservation of embryogenic callus of sweet potato 'Yulmi' obtained from apical meristem culture on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D was attempted when slow prefreezing method (two-step method) with various cryoprotectants was used. The cryoprotectant comprising 1.28M DMSO and 2 M glycerol + 0.64 M DMSO in 0.4 M sucrose solution gave the best survival (over 46%) of sweet potato cells exposed to liquid nitrogen, as determined by TTC reduction and fluorescent diacetate(FDA) staining method. Cryopreserved calli cultured on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D were grown for 4 weeks in the dark and induced embryogenic callus after another 4 weeks. They were subcultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L kinetin for 2 weeks and developed into normal plantlets in MS basal medium.

CONTENTS

Chapter I. Introduction of the study subject	20
Section 1. Objectives of the study	20
Section 2. Necessity and category of the study	20
Chapter II. Present state of the study in domestic and overseas	23
Section 1. Domestic	23
Section 2. Overseas	23
Section 3. Position of this study in present state of the world	25
Chapter III. Major research and results obtained	26
Section 1. Induction of plantlets from apical meristem tip culture	26
Section 2. Detection of virus for cultured plantlets	41
Section 3. Production of virus-free stocks	53
Section 4. Culture condition on the <i>in vitro</i> multiplication of virus-free stocks	71
Section 5. <i>In vitro</i> acclimatization of cultured seedlings	95
Section 6. Cultivation, economic analysis, and spread system of cultured virus-free seedlings	115
Section 7. <i>In vitro</i> cryopreservation of germplasm	133
Chapter IV. Achievement degree of objective and contribution degree to concerned field	147
Chapter V. Application plan of the results	150
Chapter VI. Collected technical information from overseas	151
Chapter VII. References	155

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	20
제 1 절 연구개발의 목적	20
제 2 절 필요성 및 범위	20
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	23
제 1 절 국내	23
제 2 절 국외	23
제 3 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1 절 정단분열조직배양에 의한 유식물체 유도	26
제 2 절 배양종묘의 바이러스검정	41
제 3 절 바이러스 무병주 생산	53
제 4 절 무병주의 기내 증식에 미치는 배양조건	71
제 5 절 배양종묘의 기내 순화체계	95
제 6 절 배양종묘의 재배, 경제성 조사 및 보급체계	115
제 7 절 유전자원의 기내 초저온동결보존	133
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	147
제 1 절 목표달성도	147
제 2 절 관련분야에의 기여도	148
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	150
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	151
제 7 장 참고문헌	155

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

고구마의 번식은 挿植苗를 이용하기 때문에 씨고구마를 장기간 저장한 후 이듬해 봄 出芽시켜 종묘를 생산하여야 하므로 수확량의 10%는 씨고구마용으로 저장하여야 하고, 저장 중 부패가 많으므로 15℃ 내외의 특수한 저장시설이 요구되는 바 재배농가의 부담이 많은 극히 비경제적이고 구태의연한 농법이다. 또한 영양번식성 고구마에는 SPFMV 등 10여종의 바이러스가 感染되고 대대로 轉移되어 있어 품질저하 및 수량감소가 초래되고 있다. 귀중한 유전자원의 유지도 매년 가을 種蒔用 塊根을 저장한 후 翌年에 포장재배, 수확하여 보존하여야만 하므로 위험성이 따르며 노력 및 경비가 많이 소요되고 있다.

따라서 본 연구에서는 고구마의 無病 배양종묘를 器內에서 생산하고 대량으로 증식하며, 순화시켜 挿植用 배양종묘를 생산하는 방법을 개발하여 농가에 보급하는 체계를 확립함과 동시에 遺傳子源을 기내에서 凍結保存하는 방법을 구명하고자 하였다.

제 2 절 필요성 및 범위

1. 필요성

가. 고구마는 아열대성 작물로서 우리나라에서는 경기, 전남·북, 경남, 충남, 제주지방에서 총 재배면적의 86%를 점유하고 있다. 절대 식량자원이 부족하였던 '60년대에는 고구마의 재배면적이 152천ha('65)에 총 생산량이 2,997천톤으로 가장 많았으나 경제성장과 더불어 생활수준이 향상됨에 따라 식생활이 고급화되고, WTO체제에 따라 澱粉과 주정원료 및 唐麵의 수입증가로 농가소득이 감소되고 농촌노동력이 줄어들어 그 재배면적이 '94년 14천여ha에 불과한 약 1/10로 감소되었다. 그러나 최근 수요가 증가하여 2000년 16천여ha로 증가되는 실정이다.

나. 고구마는 '60년대에는 전체 생산량의 70%를 식용으로 이용하고 나머지가 酒精

및 전분용으로 사용되었으나 경제수준이 급속히 향상되면서 식용의 소비가 감소되고 주로 가공용으로 소요되어 왔다. 그러나 최근 고구마에 함유되어 있는 다량의 복합적인 영양소는 기능성 식품으로서 그 가치가 크게 인정되어 食用이 증가되고 있으며 고구마순을 채소로 이용하는 재배면적이 급증하고 있고, 사료용, 생분해성 plastic용 전분원료, 釀造. 당면, 제과, 제빵 등 가공용, 색소용 유색고구마 등이 소개되면서 다양한 유전자원의 개발이 요구되고 있다.

다. 고구마의 번식은 영양체인 塊根을 저장, 이듬해 出芽시켜 莖葉을 삼식하는 영양 번식방법을 이용하고 있다. 따라서 母株에 바이러스, 마이코플라스마, 세균, 진균 등에 감염되어 있으면 대대로 이병되기 때문에 생육 및 품질의 저하 뿐 아니라 수량면에도 큰 손실이 따른다. 고구마의 바이러스병은 여러 가지가 알려져 있으나 특히 帶狀粗皮症(SPFMV)에 罹病되면 품질이 현저하게 떨어지고 생산량도 감소되어 문제가 되고 있는 바 無病株의 육성, 증식 및 보급체계가 요구되고 있다.

라 씨고구마용 種藪의 저장 및 유전자원의 유지·보존을 위하여 매년 11월~翌年 3월까지 12~15℃, R.H. 85~90%의 저장시설이 요구되는 바 많은 시설비(2천만원~3천만원/50평)와 유지비용이 소요되며 저장후 씨고구마의 감모율이 높고 중량감소가 따르므로 경제적 손실이 크다.

마. 種藪用 고구마는 당년에 수확한 양질의 塊根을 선별하여 1톤/ha의 고구마를 판매하지 못하고 저장하여야 하고 삼식용 종묘를 구입하는 경우 1개체에 20~30원이 소요되므로 종묘대는 ha당 125만원내외가 요구된다. 전국의 재배면적이 2001년 12,768 ha에 달하므로 저장용 씨고구마는 13,000여톤을 저장하여야 하고 種苗貸는 약 200억 원으로 실로 엄청난다.

바. 일본에서는 무병주의 재배를 위한 조직배양방법이 실용화되어 식용 고구마의 95%이상이 조직배양묘를 농가재배에 이용하고 있으나 우리나라에서는 아직 이에 대한 연구가 없어 매년 씨고구마를 저장고에 저장하고 이듬해 출아시켜 삼식하는 전통적인 번식법에만 의존하고 있다.

사. 품종개발에는 다양한 유전자원을 수집하여 보존·유지하여야 하는데 현재 우리나라의 유전자원 유지방법으로는 저장한 씨고구마를 매년 圃場에서 재배하여야만 하는 바 병·해충의 汚染 등으로 위험성이 따르고 포장재배와 저장에 많은 인력과 비용이 요구되고 있다.

아. 21세기의 첨단농업시대를 앞두고 育苗의 공정화, 영농구조의 분업화, 기업화, 자동화하는 추세에서 농민이 직접 다량의 씨고구마를 매년 저장하고 육묘하여 재배하여야 하고, 유전자원도 매년 포장에서 재배, 維持하여야 하는 구태의연한 농법에서 탈피하고 첨단과학기술이 도입된 新 農法이 요구된다.

2. 연구 범위

가. 국내 우량재배 품종인 '신천미', '진홍미' 등과 일본 수입종인 '베니아즈마' 등 10여종을 목포시험장, 원종장, 篤農家 등에서 수집, 유지하면서 배양재료로 활용한다.

나. 정단분열조직을 치상재료로 하여 MS배지 등 기본배지와 auxin, cytokinin 등 성장조절물질의 조성을 달리하여 배발생적 캘러스와 체세포배의 유도 및 유식물체의 재분화에 적합한 배지조성, pH, 糖 농도, 배양온도 등을 구명한다.

다. 무병주를 육성하기 위하여 정단분열조직의 크기, 열처리, 抗바이러스제 처리, 열처리와 抗바이러스제 혼합처리 등으로 유식물체를 재분화시키고, 바이러스 이병성 조사는 ELISA 및 RT-PCR방법으로 검정한다.

라. 형광등과 적색, 청색, 혼합광 등 발광다이오우드(LED) 조사에 의한 폐쇄환경에서의 성장반응을 조사하고, membrane filter를 이용한 광혼합 및 광자가영양배양에 따른 유묘의 성장효과를 조사한다.

마. 기내 배양종묘의 증식효율을 제고시키기 위하여 마디부위별 성장효과를 조사하고 이 방법의 개발을 위하여 1병당 삽식마디 수, 배양기간 등에 따른 증식효율을 조사한다.

바. 배양종묘를 plug묘판에 삽식하고 순화효과를 조사한다.

사. 무병 배양종묘와 기존의 관행 증식법에 따른 삽식묘를 포장조건에서 재배하면서 성장량, 罹病性, 수확량 등을 조사하여 생산성을 비교하며 경제성을 조사 분석한다.

아. 정단분열조직배양에서 유도된 배발생적 캘러스 및 체세포배의 凍結保存을 위하여 초저온저장법, vitrification법 등을 적용하여 액체질소에 급속 냉동저장하고, FDA법 등에 의한 생존효과를 조사한다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내

1. 국내의 고구마에 관한 연구에 대하여 1995년부터 현재까지 서울대학교 농업생명과학 연구정보센터의 ALRIS Database에서 검색된 자료는 총 100여건으로 육종분야가 제일 취약하며 주로 호남농업시험장 목포시험장에서 수행하고 있는 交雜育種에 한하고 있는데 무병종묘의 생산 등 尖端 生物工學 研究는 거의 보고된 바 없다.

2. 고구마의 육종과 재배에 관한 연구기관은 오직 호남농업시험장 목포시험장에서만 이루어지고 있는데 그동안 用途에 알맞은 품종을 육성하여 1986년 이후 15품종 이상이 발표되었고, 재배기술면에서도 상당히 많은 연구가 이루어지고 있으나,

3. 고구마의 무병주 육성에 관한 보고는 없으며 같은 薯類인 감자에 비해 조직배양기술도 기초분야에서만 몇몇 보고가 있을 뿐 실용화면에서는 아직 이루어지고 있지 않은 실정이다.

4. Kim 등(1991), Liu 등(1992), Min 등(1994)은 고구마의 정단분열조직을 배양하여 體細胞胚의 유도 및 식물체재분화와 함께 人工種子와 무병주생산 및 形質轉換 연구의 가능성을 보고하였다.

5. 농업과학기술원에서는 원예작물 資源研究의 일환으로 고구마의 기내보존방법에서 저온에 의한 유전자원의 기내보존에 관한 기초실험을 보고한 바 있다(Kim 등, 1996).

5. 한국원자력연구소의 방사선유전공학팀 방사선처리에 의한 變異體유도 연구를 수행하고 있으나 아직 연구단계이고, 고구마 무병 기내종묘의 이용, 보급에 관한 연구는 본 연구책임자가 발표한 器內 種묘생산에 관한 기초연구보고 이외에 아직 보고되지 않고 있다.

제 2 절 국외

1. 고구마와 감자에 관한 국제연구기관은 페루에 본부를 둔 CIP가 있고 세계적으로 8개 지역으로 나뉘어 동남아시아지역은 인도네시아에 지부를 두고 있으며 약

10,000여종의 遺傳子源을 보유하고 있다. 일본에는 약 2,000여종이 있으나 우리나라에는 200여종에 불과한 국내·외 유전자원을 농촌진흥청 산하 호남농업시험장 목포시험장에 보유하고 있을 뿐이다.

2. 일본 鹿兒島縣은 고구마의 주산지로서 생산량이 전국의 1/3을 점유하고 있어 제1위이며 식용뿐 아니라 釀造, 제과, 제빵, 음료 등 고구마를 이용한 각종 가공품을 생산하여 鹿兒島縣의 농가소득과 지역경제활성화에 크게 기여하고 있으며, 생식용 씨고구마는 10여년전부터 조직배양한 無病種苗를 95% 이상의 농가에서 재배하고 있다. 그러나 우리나라에서 이 분야의 연구는 필요성과 가능성만을 제기할 뿐 아직 실용화를 위한 구체적인 연구보고가 없다.

3. 조직배양 특히 정단분열조직배양에 의한 무병주 생산체계는 50년대초부터 발표되기 시작하여 유용한 식물의 급속대량증식법과 함께 조직배양방법이 농업산업에서 유용하게 활용되는 분야로서 日本의 鹿兒島縣 鹿屋市와 愛知縣 豊橋市에 소재하는 배양종묘회사인 (株)ベルデイ를 1995년과 2000년에 방문하였던 바 주된 배양종묘로 무병 고구마 종묘를 각각 120만본씩 생산하여(생산량; 2위) 농가에 보급하고 있는 실정이었다.

4. 일본 鹿兒島縣에서는 1988년부터 식용품중에 帶狀粗皮症이라고 하는 virus병(SPFMV)이 발생하기 시작하여 1992년에는 전체 80% 정도의 발생률을 보여 심각한 문제로 되었는데 농업시험장의 Dr. Ichi(1990)는 경정조직을 배양하여 virus-free묘를 생산하고 농가보급체계를 확립하였으며, 재배농가에 무병종묘를 보급하기 시작한 결과 품질과 수량을 향상시킬 수 있었고 포장재배시 바이러스가 재오염되므로 2~3년마다 배양묘로 교체하여야 한다고 보고하였다.

5. 일본 千葉大學 園藝學部 Dr. Kozai교수 연구실에서는 도요타자동차회사의 지원을 받아 장차 고구마의 전분을 생분해성 plastic재료로 활용하기 위하여 자동화 시스템을 갖춘 연구시설을 완비하고 無病種苗의 대량생산체계를 확립하고 있다.

6. 고구마 유전자원의 기내보존방법으로 ABA를 처리한 배지에서 장기간 보존하면서 생존능력을 보유하기 위한 실험이 실시되었고(Jarret and Gawel, 1991), 일본 鹿兒島縣 Biotechnology연구소의 Dr. Shimonishi 등(1996)은 “열대작물의 배유래 배양계의 초저온보존” 연구에서 고구마의 胚發生캘러스와 체세포부정배를 액체질소에 의한 초저온저장과 건조법에 의하여 보존한 후 용해시키고 再培養하여 식물체로 재생시킨 연구결과를 발표하였고 고구마 유전자원의 장기보존방법으로 제시하고 있다.

제 3 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 고구마에서 정단분열조직을 배양하여 바이러스 무병주를 육성하고자 품종, 배양 조직의 크기, 생장조절물질의 조성을 달리하여 배양하고, 무병주를 검정한 연구결과는 국내에서는 처음 보고되는 것이다. 일본에서는 일반화된 연구 결과임.

2. 고구마의 바이러스(SPFMV) RNA를 간단히 추출하는 방법을 개발하였고, RT-PCR 기술을 이용한 SPFMV 검정용 primer를 자체개발하였으며 이것으로 고구마의 바이러스 검정에 RT-PCR을 이용하여 간단하고 빠르게 검정하는 체계를 확립하였다. 또한 ELISA방법을 이용하여 고구마의 CMV 검정을 실시하였으며, 조직배양으로 유도된 무병종묘에서 변이체 유무를 검정하는 방법으로 RAPD 기술을 응용하였는데 이와 같은 일련의 연구는 고구마의 경우 국내에서는 최초로 보고하는 것이다. 물론 이와 비슷한 기술은 일본, 중국 등지에서 보고된 바 있다.

3. 고구마의 바이러스 SPFMV 제거를 정단분열조직배양법 이외에 열처리와 화학약품 amantadine을 복합처리하여 제거 효율을 향상시켰다. 국내에서는 처음 시도된 연구결과이며 외국에서는 연구보고가 많다.

4. 고구마 무병주의 기내 대량증식에 외마디배양법을 활용하였고, 배양조건으로 배지, 無機鹽의 농도, pH, 당의 농도, 배양온도, 마디의 위치 등 적합한 배양조건을 구명하였는데 국내에서는 처음 보고된다. 일본 및 중국에서의 보고는 있다.

5. 배양종묘의 순화에 membrane filter를 부착하였고, 인공광으로 LED 효과를 실험한 결과도 국내 최초의 보고이다. 일본에서의 보고는 있다.

6. 기내 배양된 무병종묘의 삽식묘 생산 효율, 생육, 수량, 변이체 발생 등을 기존의 저장종저와 비교, 검토하였으며 경제성을 분석하였다. 국내에서 처음 보고되며, 중국, 일본 등 고구마 주 생산국에서는 상당한 보고를 찾아볼 수 있다.

7. 유전자원의 장기 동결보존방법으로 액체질소에急速凍結하는 방법을 연구하였는데 최근 다른 작물에서 연구되고 있으나 고구마의 경우 국내에서 처음이고, 일본 등 구미에서는 흔히 찾아볼 수 있는 기술이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 정단분열조직배양에 의한 유식물체 유도

1. 서 언

고구마는 亞熱帶性 작물로서 세계적으로 중요한 5대 작물에 속하며 특히, 중국을 비롯한 아시아 여러 지역의 탄수화물과 단백질의 중요한 공급원이면서 비타민과 무기염류가 다량 함유되어 있어 健康補助食品으로도 널리 사용되고 있다.

우리나라에서는 경기, 전남·북, 경남, 충남, 제주지방에서 총 재배면적의 86%를 점유하고 있다. 절대 식량자원이 부족하였던 '60년대에는 고구마의 재배면적이 152천 ha('65)에 총 생산량이 2,997천톤으로 가장 많았으나 경제성장과 더불어 생활수준이 향상됨에 따라 식생활이 고급화되고, WTO체제에 따라 전분과 주정원료 및 당면의 수입증가로 농가소득이 감소되고 농촌노동력이 줄어들어 그 재배면적이 '94년 14천여 ha에 불과한 약 1/10로 감소되었다. 그러나 최근 수요가 증가하여 '2000년 16천여ha로 증가되는 실정이다. 고구마는 '60년대에는 전체 생산량의 70%를 식용으로 이용하였고 나머지가 주정 및 전분용으로 사용되었으나 경제수준이 급속히 향상되면서 식용의 소비가 감소되고 주로 가공용으로 소요되어 왔다. 그러나 최근 고구마에 함유되어 있는 다량의 복합적인 영양소는 기능성 식품으로서 그 가치가 크게 인정되어 식용이 증가되고 있으며 고구마순을 채소로 이용하는 재배면적이 급증하고 있고, 사료용, 生分解性 plastic용 澱粉原料, 가공 및 색소용 유색고구마가 소개되면서 다양한 유전자원의 개발이 요구되고 있다.

현재 재배되고 있는 고구마는 6배체로써 자가불화합성을 띠며 종자생산성도 떨어지기 때문에 육종 등 특수한 목적외에는 종자를 번식수단으로 사용하는 것이 불가능하며, 번식법은 영양체인 塊根을 저장, 이듬해 出芽시켜 莖葉을 삼식하는 영양번식방법을 이용하고 있다. 이 줄기번식법은 병해충으로부터 母株를 보호하기에는 비효율적인 방법으로(Litz and Conover 1978), 母株가 바이러스에 감염된 경우는 收量減少와 品質低下를 초래하기 때문에 영양계번식 작물에서 virus 감염피해는 심각하다. 또한 유전자원으로서 種苗를 포장에서 유지, 보존할 경우 상당한 비용이 소요되며 병원균

의 감염과 자연재해와 같은 요인으로 바람직한 유전자형을 유실할 수 있어서(Jarret et al. 1984), 유전자원의 器內 凍結保存과 無病苗의 획득을 위하여 고구마의 정단분열 조직배양에 관한 많은 연구가 행해져 왔다(Litz and Conover 1978; Mori 1971).

고구마의 바이러스병은 여러 가지가 알려져 있으나 특히 대상조피증에 罹病되면 품질이 현저하게 떨어지고 생산량도 감소되어 문제가 되고 있는 바 무병주의 유도, 증식 및 보급체계가 요구되고 있다.

현재 상업적 생산을 위해 가장 많이 사용되는 微細繁殖方法은 정단분열조직으로부터 再生된 shoot를 증식하는 것이다. 이 방법은 유전적 안정성을 제공하고, 많은 식물 중에서 쉽게 얻을 수 있으며, 국가의 생물산업 발달에 있어서 중요한 역할을 하며, 기내에서의 頂端分裂組織의 배양은 무병주의 생산과 無病株의 보존이라는 다른 두가지의 목적이 있다.

카네이션에서는 정단분열조직을 채취하여 多芽體를 형성시킨 후 유식물체를 획득하고 반복적인 계대배양을 통하여 새로운 다아체나 유식물체를 기하급수적으로 증식시킬 수 있는 급속증식체계를 확립하였다(Kim과 Byun, 1985). 또한 고추냉이의 정단분열조직배양에 의한 미세증식에 있어서 성장조절제의 영향을 조사한 결과 1.0 mg/L BA 첨가구에서 분할 가능한 기내묘를 배양 90일 후에 5.4개체 정도 얻었다고 보고하였다(Eun et al., 1997).

국내에서는 1999년 목포시험장 조사 결과 총 수확량의 29%의 병해충 피해가 발생했으며 이 중 9%는 바이러스에 의한 것으로 보고하였으며(Jeong et al., 2001), 그 피해는 해마다 늘고 있으나 고구마 재배에 있어서 무병주 육성과 증식에 대한 인식은 아직 저조한 상태에 있다.

본 연구에서는 고구마의 품종별 無病株를 육성하는 첫단계로 정단분열조직에서 유식물체를 재생시키는 적합한 조건을 확립하고자 정단분열조직을 배양재료로 하여 生長調節劑의 종류와 농도조성, 정단분열조직의 크기에 따라 유식물체의 再生을 유도하였으며, 體細胞胚의 유도 및 발아에 적합한 배지의 조성을 구명하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

우리나라에서 재배되고 있는 고구마 품종 '신천미' 외 7종을 수집하여 전북대학교 실험포장의 유리온실에서 재배하여 실험재료로 사용하였다.

나. 소독방법 및 배양조직의 크기

온실에서 성장하고 있는 고구마의 줄기 선단 1.5 cm 정도를 절취하여 70% 에탄올에 10여 초간 表面殺菌하고 2% sodium hypochlorite 수용액에 10분간 浸漬한 후 멸균수로 3~4회 水洗하였다. 배양조직의 크기는 해부현미경하에서 엽원기 1~2매가 부착된 정단분열조직 0.2~0.4 mm 크기와 엽원기 3~4매가 부착된 0.6~0.8 mm로 구분하여 치상하였다.

다. 배지조성

1) 유식물체의 직접 유도를 위한 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본 배지에 0.05~0.1 mg/L NAA(α -naphthalene acetic acid)와 1.0~4.0 mg/L BA(6-benzyadenine)의 혼용처리, 0.1 mg/L NAA와 1.0~4.0 mg/L kinetin의 혼용처리 및 1.0~4.0 mg/L BA와 kinetin을 단용처리 하였고,

2) 체세포 胚發生 誘導를 위해서 1.0~3.0 mg/L 2,4-D 단용처리 하였다. 배지에 3% sucrose를 첨가한 다음 pH 5.8이 되도록 조정하였으며 0.35% gelrite를 첨가하고 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

라. 배양환경

치상한 재료는 배양온도 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 성장상에서 암상태로 5일간 배양한 후 PPFD $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 형광등하에서 명배양하였다.

마. 조사항목

배양기간 동안 캘러스, shoot 및 뿌리의 발생 등 성장반응을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

고구마의 無病株를 육성하기 위한 기초실험으로 정단분열조직배양시 유식물체의

발생에 미치는 배양효과를 조사하고자 우리나라 재배품종 '신천미' 외 7품종의 頂端分裂組織을 배양하여 성장조절제의 조성과 정단분열조직의 크기 및 體細胞胚 유도 효과를 조사하였다(Table 1).

가. 품종과 성장조절제의 조성에 따른 배양효과

품종에 따른 성장반응은 유식물체의 재생에 있어서 공시품종 중 '신천미'가 68.0%로 가장 높은 再生率을 보였고 '진홍미'와 '울미', '신황미', '자미' 품종에 있어서는 50% 내외로 비슷한 재생률을 보였다. 식물체 유도에 있어서 '신천미'의 경우 다른 품종에 비해 생육이 다소 빠른 경향을 보여 정단분열조직을 치상한 후 10일경부터 캘러스의 발달을 관찰할 수 있었고 培養 15일경에는 shoot가 성장하는 것을 관찰할 수 있었다. 배양 30일경에는 본엽 1~2매 정도까지 발달하였고, 배양 60일경 본엽 5~7매의 유식물체로 발달하였으며 하나의 정단분열조직으로부터 단일 shoot만이 재생되었다(Photo. 1). '베니아까'의 경우 연녹색의 캘러스 발생 후 유식물체로의 재생률이 35.28%로 저조하였으며 '베니아즈마'는 12.5%에 불과하였다(Table 1). '충승100호'의 경우 모두 캘러스만 발생하였고 유식물체는 얻을 수 없었던 결과와 같이 품종간에 큰 차이를 보였다. 모든 처리구에서 배양초기에는 기부에서 캘러스가 발생하였고 유식물체의 재생보다 먼저 캘러스가 왕성하게 증식하였고 배양 3주일후에는 직경 1 cm 내외로 성장하며 연녹색을 띠었다. 뿌리발생은 동일 배지간에도 불규칙적으로 발생하였는데 배양 60일경에는 幼植物體가 발생한 모든 배지에서 뿌리 발생을 관찰할 수 있었다. 뿌리는 캘러스에서 발생하기도 하였으나, 시험관내의 높은 습도때문에 기부측 마디에서 부정근이 다수 발생하였다. 성장조절제의 조성에 따른 성장반응은 0.05~0.1 mg/L NAA 와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용구에서 전체적으로 우수한 再生率을 보였으며, 1.0~2.0 mg/L BA 단용구에서도 좋은 결과를 얻었다). 또한 kinetin 단용처리와 NAA와의 혼용처리는 BA단용 또는 혼용처리에 비해 효과가 적었으며, BA와 kinetin 이 4.0 mg/L 첨가된 혼용구나 단용구 모두 유식물체로의 재생률이 극히 저조하였다 (Table 1).

본 실험에서 BA와 kinetin 단용처리, NAA와 BA 및 NAA와 kinetin 혼용처리 결과 4.0 mg/L BA와 kinetin 單用區에서의 식물체 재분화율은 30%내외로 가장 저조하였고, 4.0 mg/L의 BA 혹은 kinetin의 혼용구에 있어서도 식물체 再分化率이 낮았다.

Table 1. Relationship between cultivars and plant growth regulators on plantlet regeneration from the meristem culture of sweet potato

PGRs(mg/L) ^z			Cultivars (Regenerated plantlets / No. of explant)							Total
NAA	BA	Kinetin	SC	JH	YM	SH	JM	BA	BZ ^y	
	1.0		8/9	6/8	6/8	6/9	4/10	2/10	0/0	59.3
	2.0		9/10	9/10	6/9	5/8	4/9	3/10	0/0	64.3
	4.0		5/9	5/10	4/10	4/9	2/10	1/8	0/0	37.5
0.05	1.0		9/10	9/10	8/10	7/9	7/10	8/10	0/0	81.4
0.05	2.0		8/9	8/10	6/9	6/8	8/10	5/9	0/0	74.5
0.05	4.0		3/10	5/10	3/9	5/10	5/9	2/9	0/0	40.6
0.1	1.0		9/10	6/8	6/8	6/9	6/9	5/10	3/9	65.1
0.1	2.0		9/10	7/10	6/9	7/10	6/10	6/9	2/7	66.2
0.1	4.0		4/10	5/10	3/10	3/9	4/9	2/10	1/10	32.4
		1.0	5/10	5/10	5/10	4/9	5/9	2/9	0/0	45.6
		2.0	6/10	4/9	5/10	3/8	4/10	4/10	0/0	45.6
		4.0	6/10	2/10	3/10	2/9	3/9	1/10	0/0	29.3
0.1		1.0	5/10	4/9	3/9	4/9	4/9	4/10	1/10	37.9
0.1		2.0	8/10	4/10	6/10	3/10	4/10	3/9	0/10	40.6
0.1		4.0	6/10	2/9	2/9	2/8	4/9	2/9	0/10	28.1
Total			68.0	56.6	51.4	50.0	49.3	35.2	12.5	447/904
Total (%)										55.6

^zPGRs: Plant growth regulators.

^ySC: Shincheonmi, JH: Jinhongmi, YM: Yulmi, SH: Shinhwangmi, JM: Jami, BA: Beniaka, BZ: Beniazuma.

나. 정단분열조직의 크기가 식물체 再分化에 미치는 영향

고구마 품종 ‘율미’의 정단분열조직배양 유래 유식물체를 재료로 분열조직의 크기가 식물체 재분화에 미치는 효과를 조사하였다. 정단분열조직은 엽원기 1~2매가 부착된 0.2~0.4 mm 크기(small)와 葉原基 3~4매를 부착시킨 0.6~0.8 mm 크기(large)로 구분하였고, 품종별 실험에서 유식물체의 발생이 양호하였던 0.05~0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA를 혼용처리한 MS배지에 배양하였다(Table 2). 배양 10일경부터 모든 배지에서 캘러스가 발생하기 시작하였으며, 배양 30일경부터는 약간의 shoot 성장을 관찰할 수 있었다. 葉原基 1~2매가 부착된 정단분열조직을 배양한 경우보다 葉原基 3~4매 부착하여 배양한 처리구에서 초기생육은 다소 왕성하였다.

Table 2. Effects of apical meristem size on the induction of callus and shoots in the sweet potato cv. ‘Yulmi’ after 60 days culture on organogenic medium

PGRs (mg/L)		Small ^z			Large ^y		
NAA	BA	No. of explant	Callus (%)	Shoot (%)	No. of explant	Callus (%)	Shoot (%)
0.05	1.0	10	100	80.0	8	100	100
0.05	2.0	10	100	60.0	6	100	50.0
0.10	1.0	12	100	33.3	8	100	75.5
0.10	2.0	10	100	60.0	8	100	50.0
Total		42	100	58.3	30	100	68.8

^zSmall: 1~2 of leaf primordia, size 0.2~0.4 mm

^yLarge: 3~4 of leaf primordia, size 0.6~0.8 mm

배양기간이 경과하면서 일단 분화된 shoot는 성장속도가 빠르게 진전되어 엽원기의 부착 매수에 관계없이 성장하여 배양 60일경에는 차이를 관찰할 수 없었다. 포장에서 줄기 先端部를 절취해 정단분열조직배양을 실시한 경우 보다 기내 식물체를 이용하여 배양한 경우 shoot 분화가 늦게 발생했으며, shoot의 성장속도 또한 매우 느린 경향을 보여 배양 60일경 shoot의 길이는 1.5~2.0 cm 정도를 나타냈다. 培養種苗의 기내 증식이 목적일 경우는 외마디 배양을 하여 증식 효과를 높여야 하지만, 무병주로 일단 확인된 개체의 기내 보존을 목적으로 할 경우 엽원기 3~4매를 부착하여 정단분열조직을 배양하면 생존율이 높고 시간과 노력, 경비를 줄일 수 있다고 생각된다.

다. 정단분열조직배양에 의한 체세포 배발생 유도

품종 '율미'와 'White Star'를 이용하여 체세포배 형성에 미치는 2,4-D의 효과를 조사하였다(Table 3). 2,4-D의 농도를 1.0~4.0 mg/L로 달리 조정하여 배양한 결과 모든 처리구에서 캘러스가 발생하였으나 4.0 mg/L 2,4-D 高濃度添加區는 배양 6주일 후 조사에서도 배발생 캘러스는 전혀 얻지 못하였다. 2,4-D 1.0 mg/L 첨가구에서 '율미' 62%, 'White Star' 74%가 발생하였고 2.0 mg/L 첨가구는 1/2~1/3로 급격히 감소하였다. 품종 'White Star'의 경우 배발생 캘러스의 발생률이 '율미'에 비해 다소 높은 경향을 보였다.

2,4-D가 1.0 mg/L 포함된 MS 고체배지에 정단분열조직을 배양한 6주일 후 증식된 체세포 배의 발아를 위하여 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin의 혼합배지로 캘러스를 2주일간 繼代培養(Min et al., 1994)한 후 生長調節物質이 포함되지 않은 MS 배지로 옮겨 식물체를 재생시킬 수 있었다(Photo. 2).

Table 3. Effects of 2,4-D on somatic embryogenesis from *in vitro* meristem culture of 2 cultivars 'Yulmi' and 'White Star' after 6 weeks culture

2,4-D concentration (mg/L)	Somatic embryogenesis (%)	
	Yulmi	White Star
1.0	62.0±3.6	74.0±3.1
2.0	22.1±2.6	35.4±2.8
4.0	0	0

고구마와 같은 영양번식성 작물의 경우 이병주로부터 무병주를 획득하기 위한 방법으로 정단분열조직을 배양하여 건전한 식물체를 재생시킨 많은 연구가 행해져 왔다.

Alconero 등(1975)은 고구마의 정단분열조직을 이용하여 kinetin과 NAA 혼용처리를 하여 배양한 결과 캘러스만 유도되었을 뿐 shoot 생장은 이루어지지 않았지만 IAA와의 혼용첨가에서는 배양 50일 안에 再分化된 식물체를 얻는 것이 가능했는데 2.0 mg/L kinetin과 1.0 mg/L IAA 혼용처리구에서 비정상 식물체의 출현이 가장 적었다고 하였다. Litz와 Conover(1978)는 고구마 2품종의 정단분열조직을 배양하였을 때 모두 배양 2~3주일안에 절단면에서 캘러스가 발생되어 증식되었는데 과도한 캘러스의 증식을 억제하기 위해 活性炭을 배지에 첨가하였다. 품종 'White Star'가 'PI 315343'보다 캘러스 발생률이 낮았으며 1.0 mg/L BA 처리구에서 shoot가 분화되었는데 'White Star'는 IAA 첨가배지에서 캘러스 形成率이 높게 나타나 품종에 따라 반응양상은 다르다고 하였다. 또한 shoot 분화가 이루어지기 전 배양 2~3주일 동안은 캘러스가 계속 유도되었으나, 배양 5주일 후에는 분화된 shoot가 성장되어 1개의 切片體당 'White Star'의 경우 8.5개, 'PI 315343'의 경우 5.1개가 재생되었다. Ichi(1991)는 고구마 정단분열조직을 0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리구에 배양하여 약 2개월간 경엽분화를 시킨 후 분화한 경엽에서 발근시켜 약 3~4개월 후에는 이식 가능한 식물체로 재분화 시켰다. Eun과 Kim(1999)은 고구마 정단분열조직을 0.1~0.5 mg/L NAA, 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리에서 배양하였을 때 0.1 mg/L NAA와 BA 혼용처리구에서만 식물체를 再分化 시킬 수 있었는데 多芽體로의 증식은 없었고 1개의 절편체에서 하나의 식물체가 분화되었고, 0.5 mg/L NAA와 BA의 혼용처리구에서는 주로 캘러스만 유도되었으며 캘러스에서 기관분화는 관찰되지 않아 NAA의 농도는 shoot 분화에 크게 영향하는 것으로 나타나 성장조절제의 종류와 농도의 조성은 고구마의 頂端分裂組織배양에서 중요한 요인으로 작용한다고 하였다. Ichi(1991)의 연구에서 0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리구에서 식물체의 재분화가 되었다는 보고와 같이 0.05~0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리구에서 품종에 관계없이 정단분열조직으로부터 식물체가 再生되었고, 1.0~2.0 mg/L BA 단용구의 경우도 Litz와 Conover(1978)의 보고와 같이 건전한 식물체로 성장되었다.

Min 등(1994)은 고구마의 정단분열조직을 배양재료로 이용하여 성장조절제의 종류와 농도에 따라 체세포배를 발생시킨 후 식물체 재분화를 유도했다. 體細胞胚 발생

을 통한 식물체 재분화에 대한 실험에서 Liu와 Cantliffe(1984)는 2.0 mg/L 2,4-D 이상의 처리구에서는 胚發生的 켈러스의 발생이 없었고, 0.5~2.0 mg/L 2,4-D 처리구에서 배발생이 이루어 졌다고 하였다. 그러나 Jarret 등(1984)은 3.0 mg/L 2,4-D 처리구에서 體細胞胚를 유도시킨 후 식물체 재분화가 가능하다고 한 바와 같이 품종과 생장조절제의 종류 및 농도에 따라 다른 반응을 보이고 있다. Ichi(1991)는 정단분열조직을 0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용처리구에 배양하여 약 2개월간 경엽분화를 시킨 후 분화한 莖葉에서 발근시켜 약 3~4개월 후에는 이식 가능한 식물체로 재분화되었다. 이들 배양 식물체는 無菌的으로 우량계통을 보존하기 위하여 또는 조직배양에 의한 대량증식을 위하여 일부를 시험관내에서 보존하는 경우 7~8절로 분화한 식물체의 상부 2~3절을 새로운 배지에 이식하여 기내보존할 수 있다고 하였다.

고구마의 정단분열조직배양을 통한 식물체로의 재분화에는 식물생장조절제의 종류와 농도가 중요한 역할을 하며 또한 고구마 품종간에도 再生率이 다르다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 품종에 가장 적합한 생장조절제의 종류와 농도를 먼저 구명하고 배양하면 훨씬 효과적임을 시사하고 있다.

4. 적 요

우리나라에서 재배되고 있는 고구마 품종 ‘신천미’ 외 7품종을 수집하여 MS배지에 생장조절제의 조성을 달리하여 정단분열조직을 크기별로 60일간 배양하였으며 생장반응과 증식효율을 조사하였다.

품종에 따른 생장반응은 유식물체의 再生에 있어서 공시품종 중 ‘신천미’, ‘진홍미’, ‘울미’, ‘신황미’, ‘자미’ 품종이 다른 품종에 비해 쉽게 재생되었다. 생장조절제의 조성에 따른 생장반응은 0.05~0.1 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼용구에서 전체적으로 양호한 再生率을 보였으며, 1.0~2.0 mg/L BA 단용구에서도 좋은 결과를 얻었다. 또한 kinetin 단용처리와 NAA와의 혼용처리는 BA 단용 또는 혼용처리에 비해 효과가 적었으며, BA와 kinetin이 4.0 mg/L 첨가된 혼용구나 單用區 모두 유식물체로의 재생률이 극히 저조하였다.

葉原基의 부착 枚數에 따른 shoot 분화율은 엽원기 3~4매 부착한 0.6~0.8 mm 크지에서 68.8%로 다소 높게 나타났으며, 초기 생육이 다소 빠르게 진전되었으나 배양

기간이 경과하면서 일단 분화된 shoot는 성장속도가 진전되어 정단분열조직의 크기와 매수에 관계없이 성장하여 배양 60일경에는 차이를 관찰할 수 없었다.

胚發生 켈러스는 4.0 mg/L의 2,4-D 첨가구에서는 전혀 얻을 수 없었으나 오직 1.0~2.0 mg/L 첨가구에서 배발생켈러스를 최고 74%까지 유도할 수 있었다. 품종 'White Star'의 경우 배발생 켈러스의 發生率이 '율미'에 비해 다소 높은 경향을 보였다.

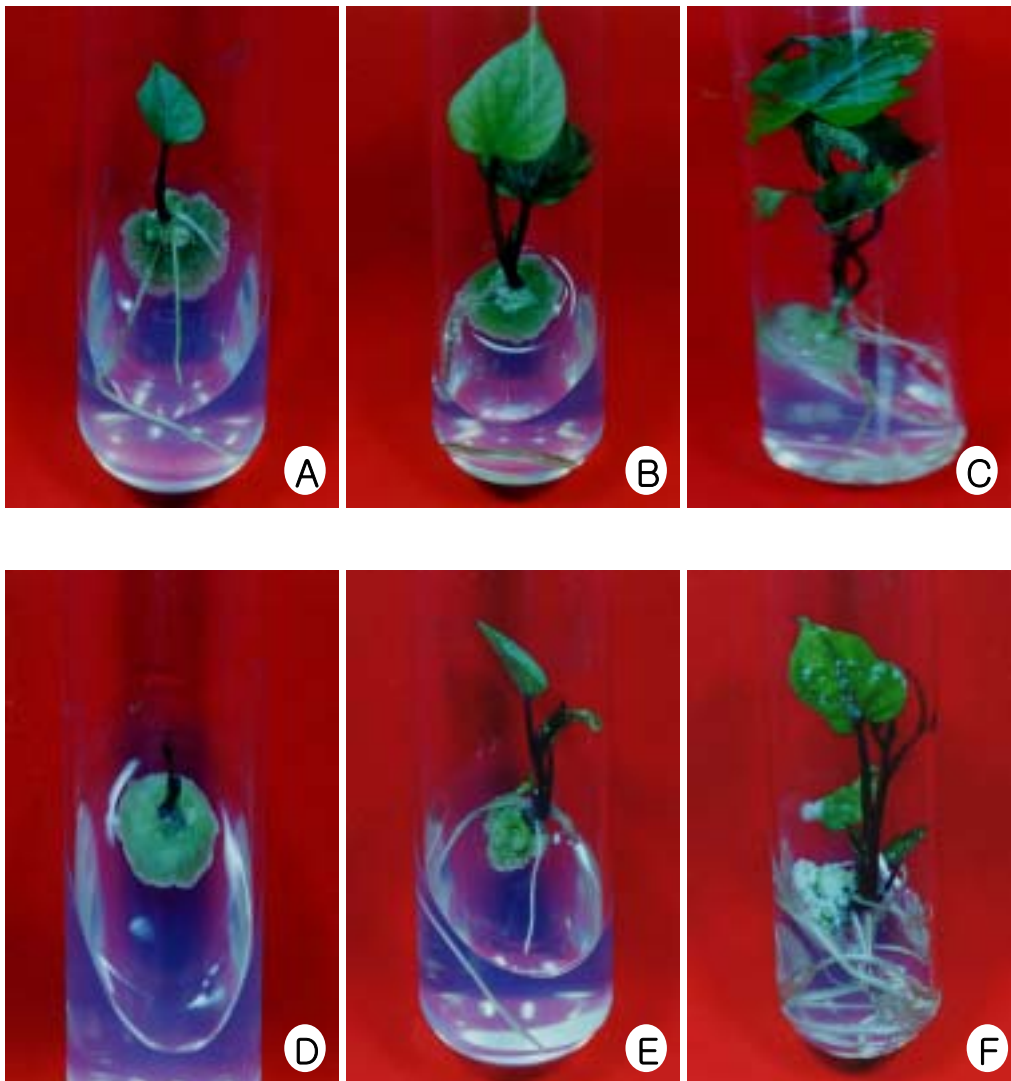


Photo. 1. Plantlet regeneration from apical meristem on MS medium supplemented with 0.05~1.0 mg/L NAA + 1.0~2.0 mg/L BA after 20~60 days of culture. After callus formation at cutted stem shoot was regenerated. (upper part; cv. 'Shincheonmi', lower part; cv. 'Jami').

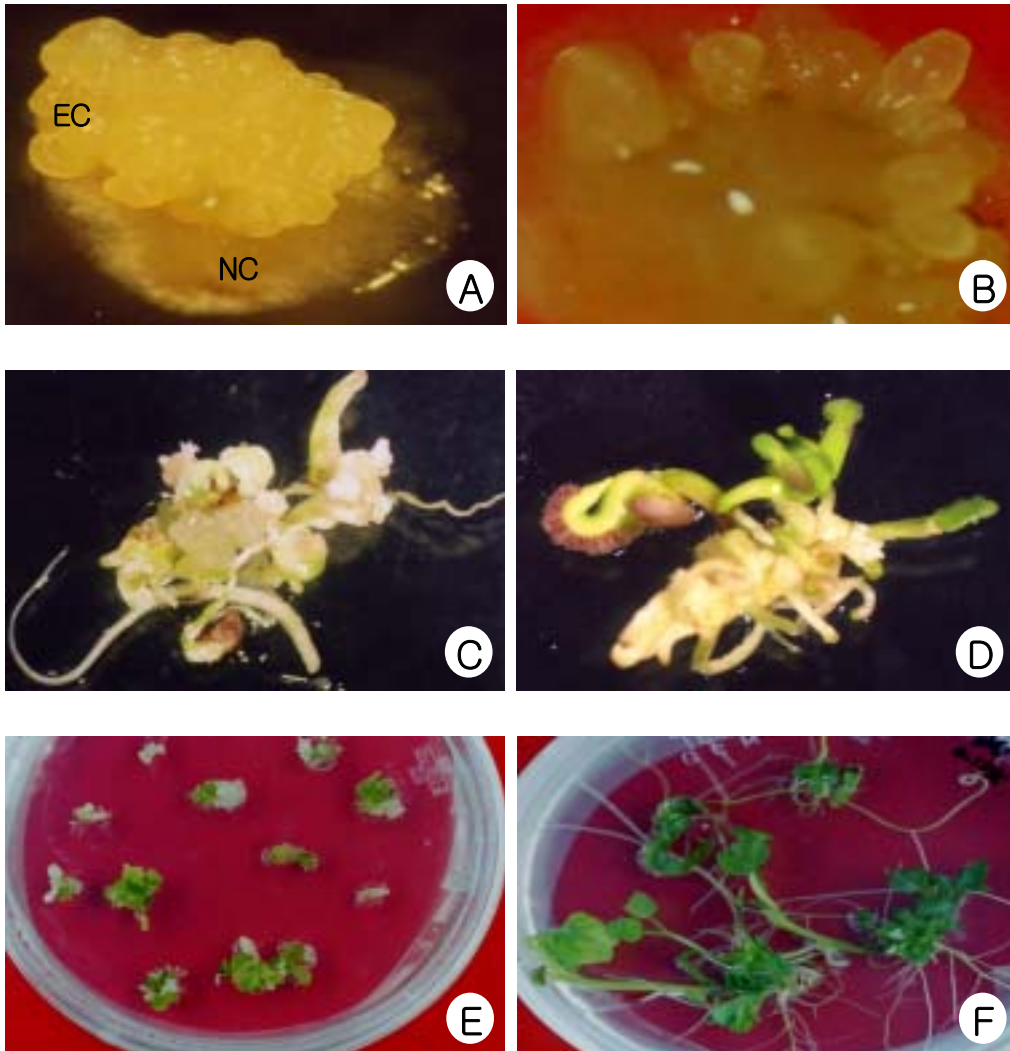


Photo. 2. Callus formation and plantlet regeneration derived from apical meristem tissue on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D. A: non-embryogenic callus(NC) and embryogenic callus(EC), B: somatic embryo, C, D, and E: shoots and roots germinated from somatic embryo, F: plantlets.

제 2 절 배양종묘의 바이러스검정

1. 서 언

고구마의 주요 바이러스는 sweet potato feathery mottle virus(SPFMV), sweet potato latent virus(SPLV), sweet potato caulimo-like virus(SPCLV)이다. 고구마 바이러스에 대한 최초의 보고는 1919년 미국에서 고구마의 莖葉에 모자이크 증상이 나타난 것이며, 그 후 남아프리카, 나이지리아, 이스라엘, 일본, 중국 등 여러 지역에서 바이러스에 感染된 고구마에 대한 보고가 있었다.

국내에서는 아직 고구마 바이러스에 관한 연구가 거의 되어 있지 않은 실정이며, 세계 총생산량의 약 80%를 차지하는 중국의 경우는 고구마 생산지에 바이러스의 感染이 만연하며, 현재까지 보고된 고구마 바이러스에는 SPFMV를 비롯해서 sweet potato mild mottle bymovirus(SPMMV), sweet potato vein mosaic potyvirus (SPVMV), sweet potato yellow dwarf bymovirus(SPYDV), sweet potato shukuyo mosaic virus(SPSMV), sweet potato symptomless virus(SPSLV), sweet potato closterovirus(SPCV), tobacco mosaic virus(TMV), cucumber mosaic virus(CMV), tobacco streak virus(TSV), sweet potato leaf curl virus(SPLCV)가 있다.

국제바이러스 명명위원회(International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV)에서 1995년 보고한 바에 의하면 고구마에 발생하는 바이러스는 대부분 potyviridae에 해당된다. 따라서 이들을 각각의 病徵 차이를 통해서, 혹은 전자현미경을 통한 입자 관찰로 바이러스를 동정하기가 그렇게 용이하지 않은 상황이다. SPFMV도 potyviridae에 속하는 바이러스로서 Hildebrandt(1960)에 의해서 최초로 명명되었다. 이 바이러스는 아프리카, 아시아, 남미, 북미 등 거의 세계 모든 지역의 고구마가 재배되는 지역에서 발생이 보고되었다.

바이러스의 진단방법으로는 초기의 육안검정, 기주식물 반응조사 등이 주로 이용된 이후 현재는 分子生物學的인 진단방법의 개발에까지 이르게 되었다(Mattews, 1993). 현재까지 고구마의 바이러스 특히 SPFMV의 진단방법으로는 혈청학적 진단, 전자현미경을 이용한 검정, dsRNA 분석을 이용한 진단, Ribo-probe를 이용한 진단방법 등이 연구되어 왔다. 바이러스 無病株 육성을 위해서는 기본적으로 가장 적은 양의 바이러스까지도 진단해 낼 수 있는 방법이 개발, 이용되어야 한다. 또한 보다 정

확한 진단이 필요하기 때문에 최근에는 넓은 범위에서 바이러스진단에 사용되었던 血清學的인 진단방법보다 더 민감한 방법으로 분자생물학의 발전과 함께 다양한 방법의 진단방법이 연구 개발되고 있으며, 특히 효과적인 방법으로 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)이 여러 가지 면에서 유용한 바이러스 진단방법으로 연구되고 있다. 그러나 PCR방법은 DNA에서 DNA를 증폭시키는 반응이기 때문에 대부분이 RNA 바이러스인 식물 바이러스의 경우에는 바이러스 RNA로부터 相補的 DNA(Complementary DNA, cDNA)를 합성하는 과정이 필요하여 逆轉寫(Reverse Transcription, RT)과정이 첨가된 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 방법이 식물바이러스 진단을 위해서 실제적으로 연구가 진행되었다(Kawasaki, 1990).

따라서 본 연구에서는 역전사 기술을 이용한 PCR (RT-PCR)을 통해 배양기내·외 고구마 대량증식에 있어서 문제시되고 있는 SPFMV를 검정할 수 있는 조건을 확립하였으며, 바이러스 검정에 많이 사용되는 ELISA방법을 이용하여 식물체에 흔히 감염되어 피해를 주는 CMV를 검정하여 이를 통한 건전한 母植物體의 생산에 이용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 효소결합항체법(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)을 이용한 CMV 검정

1) 공시재료

외관상 바이러스에 감염된 것으로 보이는 식물체를 채취하여 형태적인 특성을 조사하였으며, 감염된 잎을 취해 각각 ELISA방법과 RT-PCR방법을 이용하여 바이러스를 검출하였다. 대조구로는 바이러스에 감염되지 않은 健全苗, 완충액 및 CMV positive control을 사용하여 각각 실험을 실행하였다.

2) 검정방법

ELISA분석을 위해 1차 抗體, alkaline phosphatase와 conjugate된 2차 항체(Agdia Inc., Elkhart, Indiana)를 각각 구입하였고, Clark과 Adam(1977)의 방법을 이

용한 double antibody sandwich방법(DAS-ELISA)을 사용하였다.

나. RT-PCR을 이용한 SPFMV 검정

1) 공시재료

정단분열조직 유래 식물체들과 유리온실에서 재배되고 있는 고구마계통들을 이용하여 실시하였다. 먼저 SPFMV에 감염된 것으로 보이는 식물체를 채취하여 형태적인 특성을 조사하였으며, 감염된 잎을 취해 RT-PCR 방법을 이용하여 바이러스를 검출하였다. 실험에서의 대조구로는 바이러스에 감염되지 않은健全苗, 완충액 및 SPFMV positive control을 사용하여 각각 실험을 실행하였다.

2) RT-PCR을 이용한 바이러스 검정

식물체 잎 20 mg을 취해 eppendorf tube에 넣은 다음 RT-buffer(Lee et al., 1996) 200 μ l를 넣고 drill tip을 이용하여 磨碎 추출한 후 200 μ l의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 용액으로 정제하였다. 이를 원심분리하여 상등액 100 μ l를 취해 60 μ l의 isopropanol을 넣고 15분간 12,000 rpm으로 원심분리 하였다. 생성된 pellet은 70% ethanol 500 μ l로 2회 洗滌하고 건조시킨 후 200 μ l의 DEPC 처리된 3차 멸균수에 녹였다. RNA는 다시 DEPC 처리된 3차 멸균수로 100배 희석하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리한 후 곧바로 얼음에 넣어 5분간 방치한 試料로 RT-PCR을 수행하였다.

사용된 primer는 SPFMV의 coat protein을 增幅하도록 제작하였으며, 제작된 primer의 鹽基序列은 각각 5'-ATG GTG GGG GCA TCA TCA AAG A-3', 5'-CCT AAA AGTAGG CAC TGC ATG G-3'이었다. 또한 이를 이용한 PCR산물은 411 bp이었다(Fig. 1).

RT-PCR은 한 tube내에서 모든 반응을 할 수 있도록 하였으며, RNA 추출물 4 μ l와 primer(50 pmol), dNTP(2.5 mol), reverses transcriptase(30 unit), RNasin(5 unit), Taq polymerase(1 unit)가 각각 첨가된 조건으로 PCR 반응액을 조제하여 실시하였다(Yang 등, 1998). RT-PCR 조건은 먼저 cDNA의 합성을 위해 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰으며, 96 $^{\circ}$ C 3분간 반응 후 다시 96 $^{\circ}$ C 30초, 63 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간씩 40회 반응시켰고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하여 종결시켰다. PCR반응이 끝난 후 반

응산물을 각각 10 μ l 취해 2% agarose gel을 이용하여 50V로 전기영동하였으며 EtBr에 염색한 후 UV를 조사하여 遺傳子의 증폭을 확인하였다.

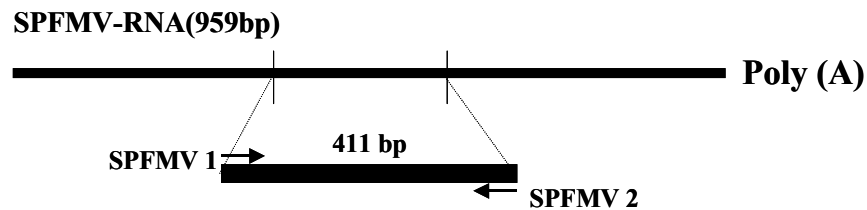


Fig. 1. SPFMV-RNA for coat protein, showing the location of specific primers (SPFMV 1, 2,) used in this study.

3. 결과 및 고찰

가. ELISA를 이용한 CMV 검정

식물체에 感染된 바이러스는 단독보다는 혼합감염이 많기 때문에 그러한 病徵을 육안으로 판단한다는 것은 어렵다. 따라서 보다 객관적이고 정확한 바이러스 진단을 위해서는 ELISA방법이나 최근 많이 개발되고 있는 RT-PCR방법을 이용할 수 있다. ELISA방법은 이미 회사에서 확립된 조건을 제시하고 있으므로 별다른 조건없이 사용하여 결과를 확인할 수 있다.

고구마 6개 품종을 대상으로 식물체의 정단분열조직을 절취하여 器內에서 증식시킨 培養苗를 이용하여 상기 기술된 ELISA방법을 이용하여 CMV의 검정을 실시한 결과는 Table 4와 같다. 고구마 정단분열조직배양 유래 86개체의 배양묘에서 CMV를 검정한 결과 모두 51개체에서 바이러스에 감염된 것으로 나타났으며, 바이러스 감염의 진단은 健全苗에서 나타나는 OD값의 2-3배 이상의 값을 가지는 개체를 바이러스에 감염된 것으로 본 결과이다. 이것은 본 실험에서 頂端分裂組織을 배양한 배양묘 중 40.7%에서 바이러스 CMV 무병주를 획득할 수 있었음을 나타내는 결과이다.

Table 4. CMV-free plantlets derived from apical meristem culture grown on the MS medium supplemented with various PGRs by ELISA test

Cultivar	Plantlet No.	ELISA values(OD ₄₀₅)	Cultivar	Plantlet No.	ELISA values(OD ₄₀₅)
Beniaka	BA-14	0.206	Shinhwangmi	SH-7	0.190
	BA-15	0.173		SH-9	0.238
	BA-18	0.225		SH-10	0.244
Jinhongmi	JH-3	0.154	SH-17	0.179	
	JH-4	0.151	SH-19	0.313	
	JH-9	0.160	SH-21	0.215	
	JH-19	0.169	Yulmi	YM-3	0.190
	JH-22	0.167		YM-9	0.181
JH-23	0.163	YM-14		0.160	
Jami	JH-24	0.161	YM-15	0.169	
	JM-18	0.152	YM-17	0.173	
	JM-21	0.161	YM-19	0.177	
	JM-22	0.163	YM-20	0.191	
Shincheonmi	SC-20	0.167	YM-21	0.198	
	SC-21	0.180	YM-24	0.209	
	SC-23	0.159	YM-25	0.190	
	SC-29	0.189	Healthy	0.164	
	SC-30	0.181	Positive	0.328	
SC-31	0.193	Total	35 plantlets (40.7%)		

나. RT-PCR을 이용한 SPFMV 검정

RT-PCR 방법을 이용하고자 할 때에는 먼저 그 바이러스의 일부분을 선택적으로 증폭할수 있는 primer의 선발이 중요하며, 이러한 primer를 이용하여 최적의 바이러스 검정조건을 확립하여야 한다. 따라서 고구마에 감염되어 피해를 끼치는 SPFMV를 조기에 검정하고자 RT-PCR을 이용한 검정조건을 확립하였다. 우선 바이러스에 감염되었을 것으로 추정되는 잎과 조직배양을 통해 얻어진 건전 대조구의 잎을 취해 조직산액을 추출하고 상기 기술된 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 후 전기영동한 결과 건전 대조구에서는 밴드를 확인할 수 없었는데 반해 바이러스에 감염된 것으로 추정되는 잎에서 SPFMV의 특이 위치인 411bp 에서 밴드를 확인할 수 있었다(Photo. 3). 이러한 결과는 RT-PCR을 실시한 후 형성된 특이 밴드들은 각각 SPFMV의 일

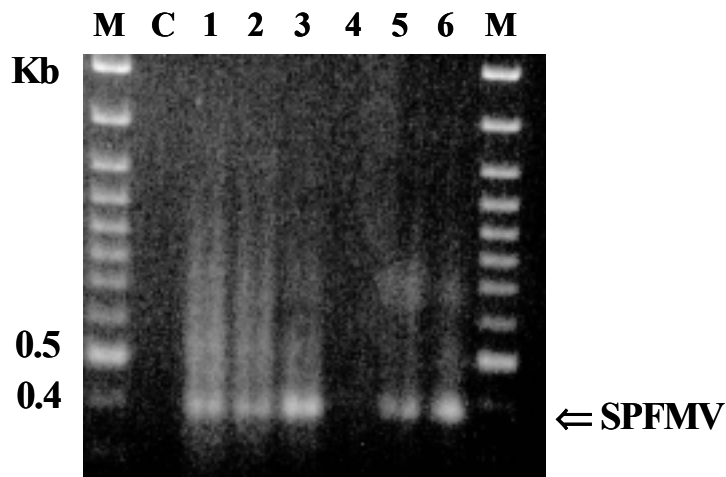


Photo. 3. Detection of SPFMV by one step RT-PCR. Ethidium bromide-stained agarose gel of RT-PCR products using various templates. The arrow indicates the position of the 411bp PCR product. Lanes M: 100bp DNA ladders, Lane C: nucleic acid extracted from healthy sweet potato plant, Lanes 1-3; nucleic acid extracted from SPFMV infected cultivated sweet potato plants, Lanes 4-6: nucleic acid extracted from randomly selected tissue culture raised sweet potato plants for testing SPFMV infection (note in Lane 4 no infection was detected).

부 유전자를 증폭하도록 제조된 primer에 의해 형성된 것으로 이렇게 확인된 고구마 식물체는 SPFMV에 감염된 것으로 진단할 수 있었다.

확인된 바이러스 感染株를 이용하여 보다 정확하고 효율적인 진단을 위해 바이러스 핵산농도를 100, 200, 300 ng으로 조절하여 RT-PCR을 실시한 결과 200 ng의 핵산농도에서 보다 선명한 밴드를 얻을 수 있었다(Photo. 4). 또한 annealing 온도를 각각 55, 60, 63℃로 하여 PCR을 실시한 결과 온도를 높여 실시한 조건에서 보다 뚜렷한 밴드를 보여 명확한 결과를 얻을 수 있었다(Photo. 4). 이러한 결과들은 Yang 등 (1998)의 보고와도 類似한 결과로서 CGMMV의 염기서열을 기초로 제조한 primer에 의해 RT-PCR을 실시하였던 바 특히 밴드를 관찰할 수 있었으며, CGMMV 바이러스 진단을 위한 최적의 RT-PCR 조건을 구명한 결과 annealing 온도가 55℃보다 60℃에서 최적의 결과를 얻었다고 보고하였다.

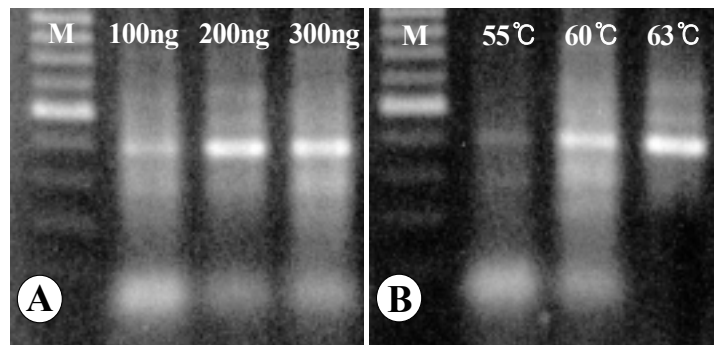


Photo. 4. A comparison of the effect of different crude nucleic acid concentrations (A) and annealing temperatures (B) on the RT-PCR reaction. Ethidium bromide-stained agarose gel of RT-PCR products using nucleic acid extracted from SPFMV infected cultivated sweet potato plants. The arrow indicates the position of the 411bp PCR product. Lane M, 100bp DNA ladders.

Primer농도를 20, 30, 50, 100 pmol로 각각 조절하였으며, PCR cycle수를 35회, 40회, 45회씩 각각 달리하여 SPFMV의 검정조건을 확인한 결과 50pmol의 primer농도에서 보다 명확한 밴드가 형성되었으며(Photo. 5), cycle수에 따른 결과에서는 40회가 45회를 반응시킨 것과 비교하여 별다른 차이를 얻을 수 없었으므로 40회에서 최적조건을 찾을 수 있었다(Photo. 5).

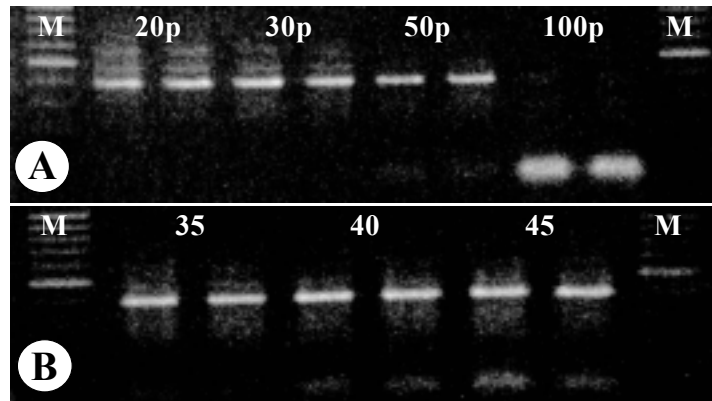


Photo. 5. A comparison of the effect of primer concentrations (A) and different reaction cycles (B) on the RT-PCR reaction. Ethidium bromide-stained agarose gel of RT-PCR products using nucleic acid extracted from SPFMV infected cultivated sweet potato plants. The arrow indicates the position of the 411 bp PCR product. Lane M, 100 bp DNA ladders.

고구마 6개 품종을 대상으로 정단분열조직배양 유래 식물체를 이용하여上記 기술한 RT-PCR방법을 이용하여 SPFMV의 感染與否를 진단한 결과(Table 5) 전체 86개 체 중 65개체에서 특이 밴드를 확인할 수 있었는데(Photo. 6), 이것으로 SPFMV에 감염되지 않은 無病株는 24.4% 획득할 수 있었다.

Table 5. SPFMV-free plantlets derived from apical meristem culture grown on the MS medium supplemented with various PGRs by RT-PCR

Cultivar	Plantlet No.	Cultivar	Plantlet No.
Beniaka	BA-2	Shinhwangmi	SH-8
	BA-14		SH-11
Jinhongmi	JH-12		SH-12
Jami	JM-14	Yulmi	YM-4
	JM-17		YM-5
	JM-18		YM-14
	JM-19		YM-16
Shincheonmi	SC-13		YM-20
	SC-18		YM-21
	SC-20		YM-22
Shinhwangmi	SH-1	Total	21 plantlets (24.4%)

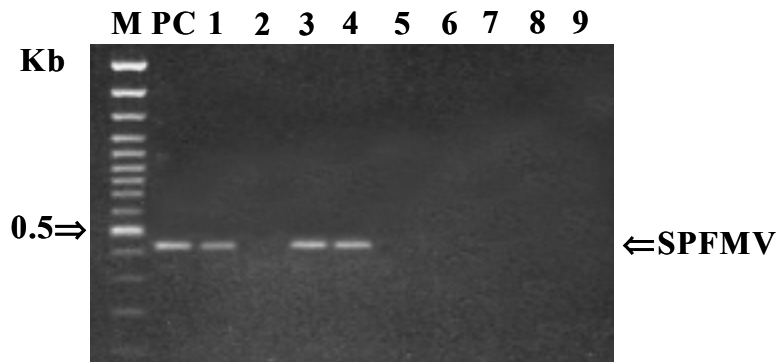


Photo. 6. RT-PCR based detection of SPFMV in tissue culture raised sweet potato plantlets. Ethidium bromide-stained agarose gel of RT-PCR products using various templates. The arrow indicates the position of the 411 bp PCR product. Lanes M; 100 bp DNA ladders, Lane PC; nucleic acid extracted from infected sweet potato plant, Lanes 1-9; nucleic acid extracted from randomly selected tissue culture raised sweet potato plants for testing SPFMV infection (note in Lane 2, 5, 6, 7, 8 and 9 no infection was detected).

식물바이러스를 진단하는 방법으로는 전자현미경, 指標植物檢定法, 沈降反應法, 라텍스응집반응법, 酵素結合抗體法 등이 주로 이용되어 왔으나, 바이러스를 검출할 수 있는 한계가 낮아 바이러스 감염 농도가 낮을 경우에는 검출하지 못한다. 분자생물학적 기술들이 발달되면서 특정유전자를 선택적으로 增幅할 수 있는 2종의 primer를 이용하여 미량의 遺傳子를 사용하여도 정확하게 유전자를 증폭하여 확인할 수 있게 되었으며, 이러한 기술들을 이용하여 식물바이러스의 동정 및 조기진단이 가능해지고 있다. 식물바이러스의 대부분은 RNA 형태이므로 목적하는 유전자를 증폭하기 위해서는 먼저 逆轉寫 반응을 이용하여 cDNA를 합성한 후 특정 primer를 사용하여 PCR을 실시하는 2단계의 실험을 거치게 되는데, 최근 이러한 반응들을 한 tube내에서 이루어지게 함으로써 간편하고 정확하게 바이러스를 검정하는 방법이 개발되고 있다 (Marinho et al., 1998). Jeong 등(2001)은 ELISA를 이용한 바이러스 검정에서는 바

이러스에 따라 약간의 차이가 있었으나, 식물추출액의 10^{-2} 희석액까지 바이러스 감염 여부를 진단할 수 있었다. 그러나 RT-PCR을 이용한 방법에는 10^{-4} 희석액까지 검출이 가능하여 ELISA 방법보다 100배 이상 민감하게 바이러스를 검출할 수 있었다고 하였다. Park 등(1998)의 보고에 의하면 ORSV검출에 ELISA는 1/5,120(w/v)배, RT-PCR은 1/40,960(w/v)배 까지 진단이 가능하였으며, CyMV는 ELISA에서 1/2,560(w/v), RT-PCR은 1/20,480(w/v)배까지 검정할 수 있었다고 보고하였다.

ELISA방법은 조직배양묘의 바이러스 대량검정시 많이 이용되고 있으며, RT-PCR에 비해 적은 비용이 소요된다는 장점이 있는데, ELISA를 이용한 바이러스 검정은 항원인 각각의 바이러스와 반응하는 抗體가 있을 경우 식물체의 종류나 바이러스의 종류에 관계없이 광범위하게 이용할 수 있다. 바이러스 무병주 식물체의 획득을 위해서는 바이러스 검정시 ELISA방법을 이용하여 1차 바이러스 진단 후 바이러스가 검출되지 않은 식물체에 대해 RT-PCR방법을 이용하여 2차 진단을 시도하는 방법이 바람직하다.

본 실험에서는 식물체에 가장 흔히 발생하는 CMV를 ELISA방법을 이용하여 1차 바이러스를 조사한 후 고구마에 발생하는 바이러스 중 가장 많은 문제가 발생되고 있는 SPFMV 진단을 위해서 보다 정확한 방법인 RT-PCR 방법을 사용하여 바이러스罹病性 여부를 검정하는 체계를 확립하였다. 한편, 바이러스는 식물체가 건강한 상태에서는 그 증상이 나타나지 않을 뿐만 아니라 진단 또한 매우 어려운 한계가 있다. 그러나 주위 환경이 열악해지면 언제나 다시 발병할 수 있는 잠재력을 가지고 있으므로 보다 정확하고 확실한 바이러스 無病株를 획득하기 위해서는 보다 체계적인 바이러스 무병주 확보와 증식 및 관리프로그램이 확립되어야 한다.

4. 적 요

정단분열조직을 배양하여 획득한 고구마 培養種苗의 바이러스 검정에 ELISA방법을 이용하여 CMV를 검정하였고, RT-PCR방법을 이용하여 SPFMV를 검정하여 무병주를 육성하고자 하였다.

ELISA를 이용하여 86개체의 培養苗에서 CMV를 검정한 결과 모두 51개체에서 바이러스에 感染된 것으로 나타났다. 또한 제작된 primer를 사용하여 바이러스에 감염

된 식물체의 경우 SPFMV의 특이 위치인 411bp에서 PCR産物을 형성하였고 virus-free 식물체의 경우 PCR 산물을 형성하지 않았다. RT-PCR을 이용하여 SPFMV의 感染與否를 진단한 결과 전체 86개체 중 65개체에서 특이 밴드를 확인할 수 있었는데 이 결과는 SPFMV의 무병주 획득률이 24.4%임을 나타낸다.

제 3 절 바이러스 무병주 생산

1. 서 언

고구마는 세계적인 식량자원으로써 그리고 공업용 에너지源으로써 중요한 작물이다. 그러나 영양번식에 의해 재배되는 작물로서 바이러스의 확산과 전파가 용이하며, 포장에 재배되고 있는 고구마 식물체는 생육되는 전 과정에서 진딧물이나 온실흰가루이 등 여러 媒介蟲에 의해 혹은 물리적인 접촉에 의해 바이러스가 전이될 수 있다(Kennedy and Moyer, 1982; Schaefers and Terry, 1975). 또한 대부분의 고구마는 수종의 바이러스에 노출되어져 있으며 이로 인해 수확량 및 품질 감소 등의 많은 피해를 가지고 있다(Li et al., 2001).

대부분의 식물체들은 내부적으로 바이러스에 감염되어 있으며, 그 증상은 생장둔화, 흑반증, 권엽증, 잎이나 꽃에 줄무늬, 생산량의 감소, 심한 경우 고사 현상을 보인다(Quak, 1977). 일단 포장에서 바이러스에 감염되면 罹病 식물체의 화학적 방제 방법은 없다. 모든 바이러스가 종자에 의해 後代로 전염되는 것은 아니다. 영양번식법에 의해 번식되는 식물 즉, 감자, 고구마, 마늘, 파인애플, 蘭科類, 카네이션, 바나나, 딸기 등은 일단 母株가 바이러스에 감염되면 종서, 종구, 삽수, 접수 등 母體를 통하여 다음 세대로 계속 전해지고 곤충에 의한 매개 등으로 더욱 이병도가 높아져 아무리 우량한 신품종이라도 전 개체가 바이러스에 감염되어 결국 廢棄하여야 하는 주된 원인이 된다.

榮養繁殖作物의 바이러스 무병주 육성방법에는 정단분열조직배양법, 열 처리법과 화학요법 처리법이 있다. 바이러스에 감염된 식물체에서 바이러스 분포가 균일하지 않다는 사실이 알려진 후 토마토의 根端組織과 감자의 정단분열조직을 이용하여 식물의 분열조직에는 바이러스가 존재하지 않는다는 것을 처음으로 입증하였다(White, 1943). Morel과 Martin(1952)은 다알리아의 정단분열조직을 이용하여 virus-free stock을 만드는데 선구적인 역할을 수행했고 1970년대에 들어서 처음으로 진정한 정단분열조직을 통해 被子植物에서 완전한 식물체를 만드는데 성공하였다. 그 이전에 수행된 정단분열조직배양은 정단분열조직 그 자체가 발달한 것이 아니라 인접한 葉原基나 줄기 조직일 것으로 간주하고 있다.

식물의 정단분열조직에 바이러스가 아직 감염되지 않았거나 그 밀도가 극히 낮은

이유는 아직 확실하지 않으나(Quak, 1977; Wang and Hu, 1980), 바이러스는 유관속계를 통하여 식물체 내에서 쉽게 轉移될 수 있는데 정단분열조직에는 유관속계가 없으며, 원형질연락사로 세포에서 세포로 이동될 수 있으나 그 속도가 매우 느려 활발히 성장하는 정단분열조직은 보호될 수 있고, 왕성하게 분열하는 정단분열조직의 세포는 代謝能이 높아서 바이러스의 복제가 불가능한 것인지, 식물체 내에 바이러스를 불활성화시키는 체계가 있는데 다른 부분보다 정단분열조직의 세포분열이 더욱 활발하여 감염되지 않는지, 정단분열조직은 내생 옥신 함량이 높아서 바이러스의 증식을 억제하는 것인지 추정할 뿐 아직 확실하지 않다. 정단분열조직배양을 이용하면 바이러스 제거 효과 이외에도 마이코플라스마유사체, 세균, 진균 등도 제거할 수 있으며 (Baker and Phillips, 1962), 이러한 무병주는 이병주에 비해 초세가 왕성하고 꽃의 크기, 꽃색, 꽃수 등 여러가지 품종 고유의 특성과 수량이 현저하게 양호해진다.

식물의 바이러스는 다른 식물병원체와는 달리 직접적인 방제방법이 아직 개발되지 않고 媒介體를 구제하거나 무병주의 育成, 저항성식물을 육종하여 재배하는 방법이 이용되고 있다. 매개체 구제의 경우에는 바이러스가 일단 확산되어 버린 상태이면 병에 의한 피해가 광범위하게 발생되기 때문에 무병주를 육성·재배하거나, 저항성식물을 육종, 재배하는 방법이 오히려 효과적으로 이용되고 있다. 특히 바이러스 무병주의 육성은 영양번식체에 의해 식물이 재배되거나, 종자전염되는 바이러스의 경우 효과적이라고 할 수 있다.

일본에서는 이미 無病株의 재배를 위한 조직배양방법이 실용화되어 식용 고구마의 95%이상이 조직배양묘를 농가재배에 이용하고 있으나 우리나라에서는 아직 이에 대한 연구가 없어 매년 씨고구마를 저장고에 저장하고 이듬해 출아시켜 삼식하는 전통적인 번식에만 의존하고 있다. 고구마 생산체계의 안정을 위해서는 건전한 母植物體 즉 바이러스 무병주를 확보하고 이를 대량으로 생산할 수 있는 체계의 확립이 필수적이며, 신속하고 정확한 바이러스 진단에 의한 무병주의 유지, 관리가 필요하다. 또한 포장에서의 매개체 방제 등 다각적이며 지속적인 사업의 전개가 필요하다.

본 연구에서는 바이러스 感染에 의한 수확량 및 품질의 감소에 의한 피해를 최소화하기 위해 선결되어야 할 바이러스 무병주 식물체를 생산하고자 고구마의 頂端分裂組織배양을 통하여 바이러스 무병주 생산 체계를 확립하고자 하였으며, 정단분열조직 배양을 통해 재생이 어려운 품종에 대해서는 식물체의 줄기 선단부위를 잘라서 열처리 및 抗바이러스제를 단독 혹은 복합 처리하여 바이러스 無病株 식물체를 생산하는

체계를 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

본 실험에 사용한 공시재료는 器內 조직배양되고 있는 식물체와 유리온실에서 재배되고 있는 고구마 품종 ‘栗美’ 및 ‘White Star’를 이용하였다. 먼저 바이러스에 감염된 것으로 보이는 식물체를 채취하여 형태적인 특성을 조사하였고, RT-PCR을 이용하여 바이러스의 感染與否를 판단하였다. 이병이 확인된 식물체는 무병주 육성재료로 이용하였으며 대조구는 바이러스가 감염되지 않은 健全苗를 이용하였다.

나. 소독방법

배양재료는 줄기 先端 1.5 cm 정도를 절취하여 70% 에탄올에 10여 초간 표면살균하였고 2% sodium hypochlorite 수용액에서 10분간 침지, 소독한 후 멸균수로 3~4회 수세하였다.

다. 배지 조성

배지는 MS 기본배지에 3% sucrose를 첨가하고 0.05~1.0 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA를 混用添加 한 다음 pH 5.8이 되도록 조정하였으며 gelrite 0.35%를 첨가한 후 121℃의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균하여 제조하였다.

라. 배양방법

1) 정단분열조직배양

정단분열조직배양을 위해 온실에서 생육중인 품종 ‘율미’의 바이러스 罹病이 확인된 식물체의 줄기선단에서 정단분열조직의 크기가 각각 0.3~0.5, 0.5~1.0, 1.0~1.5 mm가 되도록 해부현미경하에서 절취하여 배지에 치상하였다.

2) 열처리

罹病이 확인된 고구마 품종 ‘올미’ 줄기 선단부를 40 cm 정도로 절취하여 비이커에 꽂고 35±1℃의 生長箱에서 PPFD 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광조건으로 1일 16시간 광, 8시간 암상태에서 2주일간 처리하였다. 열처리된 식물체는 해부현미경하에서 葉原基 3~4매가 부착된 정단분열조직을 0.8~1.0 mm 크기로 절취하여 각각의 배지에 치상하였다.

3) 항바이러스제 처리

항바이러스제인 amantadine(화학명; adamantanamine, C₁₀H₁₇N)의 농도를 각각 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 mg/L이 되도록 무균 여과하여 배지에 첨가하였으며, 고구마 품종 ‘올미’와 ‘White Star’의 줄기에서 葉原基 1~2매(0.3~0.5 mm) 또는 3~4매(0.8~1.0 mm)가 부착된 정단분열조직을 절취하여 上記한 배지에 치상하였다.

4) 열처리와 항바이러스제 복합처리

열처리는 罹病이 확인된 고구마 품종 ‘올미’ 줄기 선단부를 40 cm 정도로 절취하여 35±1℃의 生長상에서 PPFD 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광조건으로 1일 16시간 광, 8시간 암상태에서 2주간 처리하였다.

항바이러스제인 amantadine의 농도는 각각 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 mg/L이 되도록 무균 여과하여 배지에 첨가하여 제조하였으며, 식물재료는 해부현미경하에서 엽원기 3~4매가 부착된 정단분열조직을 0.8~1.0 mm 크기로 절취하여 上記한 배지에 치상하였다. 배양 5주일 후에는 식물 절편체들을 amantadine-free 배지로 옮겨 2주간 배양하였다.

마. 배양환경

치상한 배양재료는 25±1℃의 生長箱에서 PPFD 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광조건으로 1일 16시간 광, 8시간 암상태에서 배양하였다.

바. 성장반응 및 바이러스 검정

배양 8주일 후 캘러스 형성 및 shoot의 재생률을 조사하였고, 바이러스는 RT-PCR방법을 이용하여 SPFMV의 제거효과를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 정단분열조직배양을 통한 바이러스 제거

고구마 품종 ‘율미’의 줄기선단에서 정단분열조직의 크기가 각각 0.3~0.5, 0.5~1.0, 1.0~1.5 mm가 되도록 절취하여 NAA와 BA를 혼용첨가한 MS 기본배지에 치상한 후 배양 8주일 후에 바이러스 除去率과 성장반응을 조사하였다(Table 6, Photo. 7).

정단분열조직을 절취하여 배지에 치상한 후 약 5일이 경과되면서 절편의 기부를 중심으로 조직의 비대가 이루어 졌으며(Photo. 7-A), 그 후 15일이 경과되면서 기부에서 캘러스가 증식되었고 이어서 新梢가 발달되어 신장하기 시작하였다(Photo. 7-B). 배양 30일이 지나면서 신초는 2~3cm로 신장하였으며(Photo. 7-C), 이러한 신초는 대부분 培養 50일이 되면서 뿌리가 발생하여 완전한 식물체로 성장하였다(Photo. 7-D). 완전한 식물체로 재생된 器內 소식물체는 순화과정을 거쳐 토양으로 이식되었는데, 대부분의 식물체가 성공적으로 토양에서 순화되었다(Photo. 8).

한편 식물생장조절제에 따른 정단분열조직의 식물체 재생률은 0.05 mg/L NAA 와 1.0 mg/L BA를 混用處理한 MS배지에서 가장 높았는데(Table 6), 식물체 절편의 크기에 따라 식물체 재생률에 큰 차이를 보였다. 즉 0.3~0.5 mm의 절편체는 평균 52%의 생존률을 보인데 반해 0.5~1.0, 1.0~1.5 mm의 切片體에서는 각각 71%, 82%에 이르는 재생률을 보여 식물체 절편의 크기가 배양 후 재생률에 밀접한 正의 상관관계를 가짐을 알 수 있었다.

정단분열조직을 크기별로 취하여 배지에 치상한 후 식물체 재생률과 바이러스 무병주 獲得率을 비교한 결과 0.3~0.5 mm 크기의 조직에서는 약 35%의 무병주를 얻을 수 있었으나 1.0~1.5 mm에서는 10%이하에 불과하였다. 이와 같이 절편체의 크기가 클수록 식물체의 재생률은 높아졌으나 바이러스 무병주를 얻기는 힘들었으며, 절편체의 크기가 작을수록 식물체 再生率은 낮았으나 무병주의 획득률은 급속히 높아졌다(Fig. 2). 따라서 무병주의 획득에 미치는 여러 요인 중 切片體의 크기가 매우 중요한 요인임을 알 수 있었다.

Table 6. Effect of shoot tip size on regeneration in sweet potato cv. Yulmi

PGR ^z (mg/L)		Plantlet regeneration(%)		
NAA	BA	0.3~0.5 ^y	0.5~1.0	1.0~1.5
0.05	1.0	60±5.2	86±3.2	96±3.8
0.05	2.0	46±5.8	52±4.0	68±2.8
0.1	1.0	50±3.4	72±3.8	78±4.4
0.1	2.0	52±4.6	74±4.4	87±3.6
Total		52±4.8	71±3.9	82±3.7

^zPGR: Plant growth regulator.

^yShoot tip size(mm). Values represent the mean±SE.

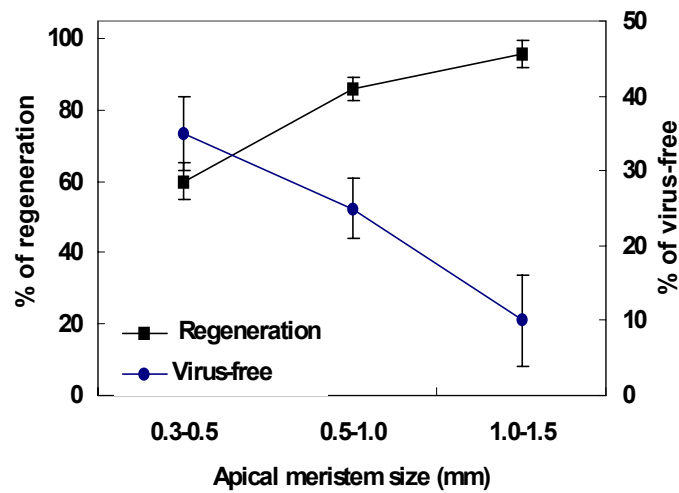


Fig. 2. Effect of shoot tip size on regeneration and ratio of virus-free plantlets.

나. 열처리에 의한 바이러스 제거

前述한 결과에서 보여 준 바와 같이 고구마 바이러스 무병주의 생산에는 정단분열 조직의 크기가 매우 중요한 요인으로 작용함을 확인 할 수 있었다. 그러나 0.3~0.5 mm의 정단분열조직을 절취한다는 것은 매우 전문적이고 정밀한 기술을 요하는 작업이며, 이러한 크기의 절편을 취하기 위해서는 많은 시간과 노력 및 재료가 소요된다. 따라서 손쉽고 빠르게 절편을 취할 수 있는 크기인 0.8~1.0 mm의 크기를 이용하여 無病株의 育成을 시도하고자 다음과 같은 실험을 실시하였다.

온실에서 재배 중인 고구마 품종 ‘울미’의 줄기 선단부를 40cm 정도로 절취하여 35±1℃ 生長箱에서 2주일간 열처리한 후 엽원기 3~4매 부착된 정단분열조직을 0.8~1.0 mm 크기로 절취하여 NAA와 BA를 혼용 첨가한 MS기본배지에 치상한 배양 8주일 후 바이러스 除去率과 성장반응을 조사하였다(Table 7).

엽원기가 3~4매 부착된 정단분열조직을 배양한 결과, 69.2%의 유식물체를 획득하였으나 배지에 관계없이 모든 처리구에서 식물체에 SPFMV가 감염된 것으로 판명되어, 2주일간의 熱處理는 바이러스 무병주 획득에는 효과가 없는 것으로 나타났다.

Table 7. Effect of the heat treatment at 35°C for 2 weeks before apical meristem culture on plantlet regeneration and elimination of SPFMV in sweet potato

PGR (mg/L)		Large ^z			
NAA	BA	No. of explants	Callus (%)	Shoot (%)	SPFMV-free (%)
0.05	1.0	20	100	100	0
0.05	2.0	18	100	33.3	0
0.1	1.0	24	100	83.3	0
0.1	2.0	20	100	60.0	0
Total		82	100	69.2	0

^zLarge: 3~4 of leaf primordia, size 0.8~1.0mm.

다. 항바이러스제 처리에 의한 바이러스 제거

항바이러스제로 많이 사용되고 있는 amantadine은 그 기작이 밝혀진 것은 아니라 할지라도 세포로 바이러스의 침입을 예방하거나, virus protein uncoating 예방과 viral RNA 轉寫를 막는 등 바이러스 복제 cycle의 초기 단계에서 amantadine이 억제한다는 상당한 보고가 있다(Hoffmann et al., 1965, Skehel et al., 1977). 따라서 본 실험에서는 바이러스 무병주를 획득하기 위해 항바이러스제인 amantadine을 이용하였다.

실험포장의 유리온실에서 재배중인 품종 ‘울미’와 ‘White Star’에서 엽원기 1~2매(0.3~0.5 mm) 또는 3~4매(0.8~1.0 mm)가 부착된 정단분열조직을 절취하여 배지에 치상하였다. 항바이러스제인 amantadine이 고구마의 정단분열조직배양시 SPFMV의 제거에 미치는 효과를 알아보기 위해 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 mg/L의 농도로 배지에 첨가하여 5주일간 배양한 후 NAA 0.05 mg/L와 BA 1.0 mg/L가 혼용 첨가된 배지로 옮겨 2주일간 繼代培養 후 바이러스 제거율과 성장상태를 조사하였다(Table 8, 9).

고구마 품종 ‘울미’의 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 절취하여 배양한 결과 amantadine 무처리구에서 41.7%의 SPFMV-free 개체를 얻었으며, 10 mg/L와 20 mg/L가 첨가된 배지에서 SPFMV-free 개체를 100% 얻을 수 있었으나, 20 mg/L의 amantadine이 첨가된 배지에서의 shoot 재생률이 28.6%로 현저히 감소되어 고농도의 항바이러스제 처리보다 5-10 mg/L의 amantadine 처리가 식물체의 재생에 효과적임을 알 수 있었다. 또한, 葉原基를 1~2매(0.3~0.5 mm) 부착한 정단분열조직을 배양하는 것이 엽원기를 바이러스 무병주를 얻는데 더욱 효과적이라고 판단되었다(Table 8).

정단분열조직의 크기를 0.8~1.0 mm로 절취하여 배양한 결과 amantadine 무처리구에서는 바이러스 無病株를 얻지 못하였으며, amantadine 5~20 mg/L 처리된 배지에서 shoot 재생률은 농도에 따라 영향받지 않으며 55.6~75%의 재생률을 보였다. 그러나 바이러스 무병주 획득률은 상당히 낮아 amantadine 20 mg/L 포함된 배지에서 최고 55.5%를 나타냈다(Table 8). 이러한 결과는 항바이러스제인 amantadine이 바이러스 무병주의 생산에 영향을 미치나 정단분열조직의 크기가 더욱 효과적인 요인임을 증명하는 결과라고 생각된다.

따라서 품종 ‘栗美’를 이용한 바이러스 무병주 생산을 위해 항바이러스제 처리를 병행할 경우 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 작게 절취하고 항바이러스제는

5-10 mg/L의 amantadine을 처리하는 것이 바이러스 무병주 획득에 효과적이었다.

고구마 품종 'White Star'의 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 작게 절취하여 배양한 결과 '율미' 품종과는 다르게 amantadine 처리는 전혀 shoot 발생률에 영향을 미치지 않았으며, 항바이러스제의 처리 유무와는 관계없이 전 처리구간에서 100%의 바이러스 무병주를 획득하였다(Table 9).

또한 정단분열조직의 크기를 0.8~1.0 mm로 크게 절취하여 배양한 결과 amantadine 무처리에서는 바이러스 무병주를 얻을 수 없었다. 그러나 항바이러스제를 처리한 처리구에서 무병주를 얻을 수 있었으며, 20 mg/L amantadine 처리구에서 76.9%의 바이러스 무병주를 얻었다(Table 9). 이는 항바이러스제인 amantadine 처리보다 정단분열조직의 크기가 더욱 중요한 요인임을 나타내는 결과이며, 바이러스 무

Table 8. Effects of amantadine treatment on plantlet regeneration and elimination of SPFMV according to the size of apical meristem in sweet potato cv.'Yulmi'

Amantadine (mg/L)	Small ^z				Large ^y			
	No. of explants	Callus (%)	Shoot (%)	SPFMV -free(%)	No. of explants	Callus (%)	Shoot (%)	SPFMV -free(%)
0	30	100	80.0	41.7	24	100	91.7	0
5	30	100	80.0	58.3	24	100	66.7	12.5
10	34	100	41.2	100	18	100	75.0	22.2
20	28	100	28.6	100	26	100	55.6	55.5
40	-	-	-	-	20	100	10	0
80	-	-	-	-	20	100	-	-
120	-	-	-	-	20	100	-	-
Total	182	100			152	100	39.1	

^zSmall: 1~2 of leaf primordia, size 0.3~0.5mm.

^yLarge: 3~4 of leaf primordia, size 0.8~1.0mm.

병주 획득에 있어 항바이러스 처리 농도 및 頂端分裂組織의 크기가 품종간에도 뚜렷한 차이가 있음을 보여주었다.

따라서 고구마 품종 'White Star'의 바이러스 무병주를 얻기 위해서는 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 작게 절취하는 것이 가장 효과적이었으며, 항바이러스 처리를 병행하고자 할 때에는 0.8~1.0 mm 크기까지 크게 떼어낸 경우도 20 mg/L amantadine을 첨가하여 배양하면 바이러스 무병주를 획득할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 9. Effects of amantadine treatment on plantlet regeneration and elimination of SPFMV according to the size of apical meristem in sweet potato cv. 'White Star'

Amantadine (mg/L)	Small ^z				Large ^y			
	No. of explants	Callus (%)	Shoot (%)	SPFMV -free(%)	No. of explants	Callus (%)	Shoot (%)	SPFMV -free(%)
0	16	100	87.5	100	12	100	91.2	0
5	15	100	93.3	100	22	100	95.2	20.0
10	16	100	100	100	10	100	90.0	33.3
20	18	100	100	100	14	100	92.9	76.9
Total	51	100	95.2		58	100	92.3	

^zSmall: 1~2 of leaf primordia, size 0.3~0.5mm.

^yLarge: 3~4 of leaf primordia, size 0.8~1.0mm.

라. 熱處理와 抗바이러스제 복합처리에 의한 바이러스 제거

열처리와 항바이러스제를 복합처리 하였을 때에 무병주 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

유리온실에서 재배중인 고구마 품종 '울미' 줄기 선단부를 40 cm 정도로 절취하여 35±1℃ 성장상에서 2주일간 처리한 후 엽원기 3~4매 부착된 정단분열조직을 0.8~1.0

mm 크기로 절취하여 amantadine 0, 5, 10, 20 mg/L의 농도가 첨가된 0.05 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 배지에 치상하고 배양 5일주 후 amantadine-free 배지로 옮겨 2주일간 繼代培養 후 바이러스 제거율과 성장상태를 조사하였다(Table 10).

Amantadine을 첨가하지 않고 35℃ 2주일간의 온도처리만으로는 전혀 효과가 없었으며, amantadine 20 mg/L가 포함된 처리구에서는 shoot의 발생률이 14.3%로 극히 저조하였으나, 일단 shoot로 발달이 이루어진 후에 생육에는 큰 지장이 없었다. 10 mg/L amantadine과 열처리를 한 복합처리구는 62.5%의 shoot 再生率을 보였고 80%의 개체가 SPFMV 무병주로 나타나 가장 양호한 방법으로 나타났다.

抗바이러스제와 熱을 동시에 처리했을 때(Kim et. al., 1997)은 양난의 바이러스 제거율은 amantadine 80mg/L의 농도와 변온 35℃일 때 100%로 높게 나타났다고 보고하였으나 본 실험에서는 35℃ 2주일간의 열처리로는 정단분열조직을 0.8~1.0mm 크기로 절취하여 배양한 경우 無病株를 획득하지 못하였다. 그러나 여러 보고에서와 마찬가지로 amantadine에 의한 장애가 거의 관찰되지 않았으며, 정단분열조직배양과 더불어 항바이러스제를 첨가하여 배양하면 더욱 효과적이었고, 이때 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 작게 절취하여 배양하면 無病株의 획득이 용이함을 알 수 있었다. 즉 '올미'의 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 절취하여 배양했을 때 amantadine 10mg/L와 20mg/L가 첨가된 배지에서 100%의 SPFMV-free 개체를 얻을 수 있었다. 또한 熱處理와 amantadine 10~20mg/L 혼용처리에서는 정단분열조직의 크기를 0.8~1.0 mm로 다소 크게 절취하여도 바이러스 무병주를 다량 얻을 수 있었다.

바이러스에 감염된 자두에서 정단분열조직배양에 의한 無바이러스株를 얻었는데, 바이러스 검사는 指標植物을 사용하여 실시하였으며 2-12개월 후에도 바이러스 증상을 보이지 않았다고 보고하였다(Isac, 1986)). 반면에 Ishii(1974)에 의하면 분열조직배양이 蘭의 번식수단으로 중요한 역할을 해 온 이후 바이러스에 感染된 식물체가 생산되었는데 정단분열조직배양만으로는 蘭 바이러스를 완전히 제거한다는 것은 불가능하며 ORSV는 정단분열조직 유래의 조직에서 사라지지 않고 남아있다고 보고하였다.

정단분열조직배양과 열처리를 병행하여 배양할 경우 無바이러스株 효율을 높일 수 있다. Kim 등(1983)은 감자를 이용하여 37℃에 3주일간 단독 열처리로는 PVS 및 PVX의 제거에 전혀 효과가 없었고 0.2~0.4 mm의 정단분열조직배양은 PVX의 제거에 효과가 있었으나, PVS는 제거하지 못하였고, 39℃에서 6주간 열처리한 후 정단분열조직배양을 반복한 복합처리에서 PVS를 제거할 수 있었다고 보고하였다.

Table 10. Effects of heat and amantadine treatment on plantlet regeneration and elimination of SPFMV in sweet potato cv. 'Yulmi'

Amantadine (mg/L)	Large ^z			
	No. of explants	Callus (%)	Shoot (%)	SPFMV-free (%)
0	13	100	69.2	0
5	6	100	83.3	20
10	8	100	62.5	80
20	7	100	14.3	100
Total	34	100	57.3	

^zLarge: 3~4 of leaf primordia, size 0.8~1.0mm.

또한, 난의 ORSV 제거를 위해 감염된 심비디움의 原塊體를 이용하였는데, 35℃ 5주일간 처리에서는 原塊體가 갈변되기 시작했으며 처리기간이 길어지거나 38℃로 더 높일 경우는 처리기간에 관계없이 모두 고사하여 바이러스 검정이 불가능하였고 열처리에 의한 바이러스 제거 효과를 나타내지 못하였으나, 30℃에서 5주 배양 후 35℃나 38℃에서 2주 동안 변온 처리하여 배양했을 때는 농도장해가 적어지고 OD값도 다소 낮아져 무병률은 57.1%를 나타냈다(Kim *et al.*, 1997).

정단분열조직배양을 이용한 無바이러스株 육성에 열처리 뿐 아니라 항바이러스제를 배지에 첨가하여 바이러스를 불활성시키려는 연구가 진행되고 있다.

Deogratias 등(1989)은 prunus necrotic ring spot virus(PNRSV), prune dwarf virus(PDV), apple chlorotic leaf spot virus(ACLSV)에 감염된 *Prunus mahaleb*의 shoot와 기내 배양된 sweet cherry(*Prunus avium*)에서 열처리와 화학요법 처리를 병행하였다. 처리 기간중 많은 식물체가 죽었음에도 불구하고 'Van 2D' 품종에서 32-34℃에 3주일간 熱處理 후 무병주를 얻었으나, 열처리법에 의해서는 처리된 2 품종 중 하나만 성공적이었다. 60 mg/L virazole 처리에 의한 'Van 2D'의 shoot는 21개의 식물체가 PNRSV와 PDV에 ELISA negative 반응을 보여 바이러스 무병주였으

며, DHT 처리는 PDV에 효과적이지 못하지만 완전히 PNRSV의 복제를 억제시킨 바 있다. 化學藥品處理는 집중적으로 영양번식을 하는 식물에서 더욱 효과적이지만 바이러스 종류나 유전적인 식물재료의 형태에 따라 성공이 좌우된다고 하였다.

감자의 정단분열조직배양 배지에 virazole을 첨가하여 PVM을 효과적으로 제거하였는데 첨가하지 않았을 때의 無바이러스株 생산비율이 59%에서 100%로 우수한 효율을 보였으나, virazole은 식물에 독성이 있어서 정단분열조직에서 식물체로 발달하는데 6주일 정도 지연되었다(Cassells and Long, 1982). 또한 Kim 등(1997)은 ORSV에 감염된 양란 심비디움의 原塊體에서 바이러스 제거를 위해 rivavirin과 amantadine을 처리했는데, 모두 100 mg/L가 첨가된 배지에서 7주 동안 처리했을 때 각각 71.4%와 85.7%로 바이러스 除去率을 보였으나, ribavirin이 60 mg/L 이상 첨가되었을 때 농도 장애가 일어나는 반면 amantadine은 농도 장애가 전혀 나타나지 않았다고 하였다. 또한 chrysanthemum stunt viroid(CSV)에 감염된 국화의 정단분열조직배양에서도 virazol, phosphonoacetic acid와 amantadine을 처리 한 결과 amantadin 100 mg/L 첨가구에서도 독성은 보이지 않았으며 더욱 바이러스제거에 효과적이었다고 하는데 amantadine 50-100 mg/L가 첨가된 배지에서 10-15%의 CSV를 제거시킨 바 있다. (Horst and Cohen, 1980).

아직 바이러스 複製를 억제하는 amantadine의 기작이 밝혀진 것은 아니지만 세포로 바이러스의 침입을 예방하거나, virus protein uncoating 예방과 viral RNA 轉寫를 막는 등 바이러스 복제 cycle의 초기 단계에서 amantadine이 억제한다는 상당한 증거가 있다(Hoffmann *et al.*, 1965, Skehel *et al.*, 1977). Smith(1980)는 抗바이러스제 첨가로 바이러스의 DNA와 RNA의 합성을 차단하므로 바이러스 증식을 막는다고 보고했으며, 바이러스가 존재하는 조직이 계속 성장하나 바이러스 농도는 억제된다는 보고도 있다(Simpkins *et al.*, 1980). 항바이러스제와 熱處理를 병행한 경우 양란의 바이러스 제거율은 amantadine 80 mg/L의 농도와 변온 35℃를 처리하였을 때 100%로 높게 나타났다고 보고했다(Kim 등, 1997).

본 실험에서는 35℃, 2주일간의 열처리로는 정단분열조직을 0.8-1.0 mm 크기로 절취하여 배양하였을 때 無바이러스株를 획득하지 못하였으나, 많은 보고에서와 같이 amantadine에 의한 장애가 거의 관찰되지 않았다. 정단분열조직배양과 더불어 抗바이러스제를 첨가하여 배양하면 더욱 효과적이었고, 이때 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 작게 切取하여 배양하면 無바이러스株의 획득이 용이함을 알 수 있었다.

즉 ‘울미’의 정단분열조직의 크기를 0.3~0.5 mm로 절취하여 배양했을 때 amantadine 10~20 mg/L가 첨가된 배지에서 100%의 SPFMV-free 개체를 얻을 수 있었다. 또한 열처리와 amantadine 10~20 mg/L 혼용처리에서는 정단분열조직의 크기를 다소 크게 절취하여도 바이러스 無病株를 다량 얻을 수 있었다.

4. 적 요

바이러스 感染에 의한 품질의 저하와 수확량 감소에 의한 피해를 최소화하기 위해 선결되어야 할 바이러스 무병주 식물체를 생산하고자 고구마의 頂端分裂組織배양을 통하여 바이러스 無病株 생산체계를 확립하고자 하였으며, 정단분열조직배양을 통해 재생이 어려운 품종에 대해서는 식물체의 줄기 선단부위를 잘라서 열처리 및 항바이러스제를 단독 혹은 복합 처리하여 바이러스 무병주 식물체를 생산하는 체계를 확립하고자 하였다.

頂端分裂組織의 크기가 크면 클수록 식물체 재생률은 높아졌으나 바이러스 제거율은 낮아졌으며, 0.3~0.5 mm 크기의 정단분열조직배양에서는 SPFMV의 제거율이 35%로 나타났다.

35℃에서 2주간 열처리한 후 葉原基를 3~4매 부착하여 정단분열조직을 배양한 다음 재생된 식물체를 RT-PCR을 이용하여 SPFMV를 조사한 결과 모든 식물체에 바이러스가 감염된 것으로 판명되어 2주간의 열처리 효과는 전혀 없는 것으로 나타났다.

‘栗美’의 정단분열조직을 엽원기 1~2매 부착하고 amantadine과 배양한 결과 amantadine 무처리구에서 41.7% SPFMV-free 개체를 얻었으며, 10~20 mg/L가 첨가된 배지에서 SPFMV-free 개체를 100% 얻었으나, 20 mg/L가 첨가된 배지의 shoot 재생률이 현저히 감소하여 5~10 mg/L의 amantadine 처리와 엽원기 1~2매 부착하여 정단분열조직배양을 하는 것이 無病株를 얻는데 효과적이라고 판단되었다. ‘울미’의 정단분열조직을 엽원기 3~4매 부착하여 배양한 결과 amantadine 무처리구에서는 바이러스 무병주를 얻지 못하였으며, 무병주 획득률은 상당히 낮아 amantadine 20 mg/L 포함된 배지에서 최고 55.5%를 나타냈다.

‘White Star’의 정단분열조직을 엽원기 1~2매 부착하여 배양한 결과 항바이러스제의 처리 有無와는 관계없이 전 처리구간에서 100%의 바이러스 무병주를 획득하였

다. 그러나 엽원기 3~4매 부착하여 배양한 결과 amantadine 무처리에서는 바이러스 무병주를 한 주도 얻지 못하였으나 20 mg/L의 amantadine 처리구에서 76.9%의 높은 바이러스 무병주를 얻어 품종간에 효과가 달랐다.

‘울미’의 경우 葉原基를 3~4매 부착하고 35℃ 2주간의 온도처리와 10 mg/L의 amantadine를 함께 처리한 경우 SPFMV-free 식물체를 얻는데 효과적이었다.

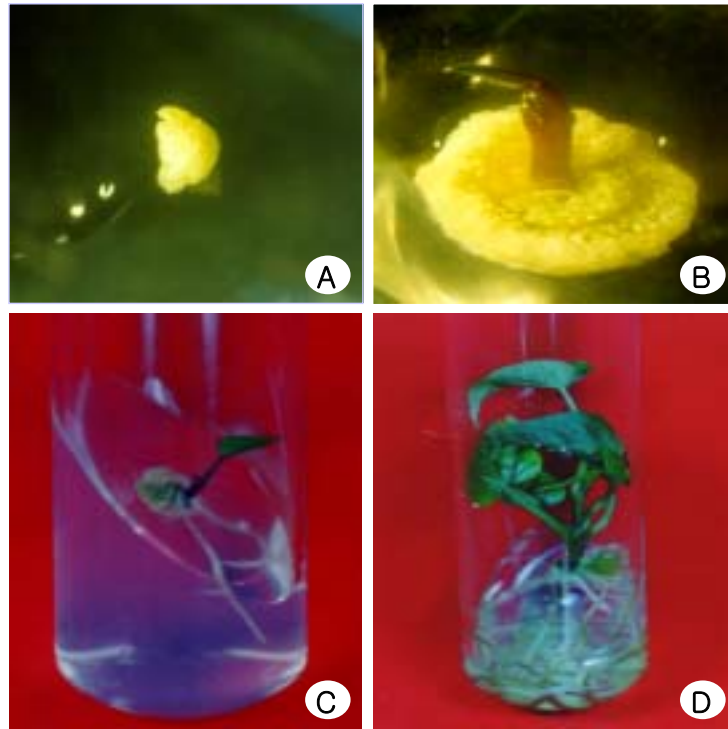


Photo. 7. Plantlet regeneration from apical meristem in MS medium supplemented with 0.05 mg/L NAA and 1.0 mg/L BAP after 5 days(A), 15 days(B), 30 days(C) and 60 days(D) culture.



Photo. 8. Virus-free plantlets after acclimatization in plug tray.

제 4 절 무병주의 기내 증식에 미치는 배양조건

1. 서 언

정단분열조직배양에 의해 얻어진 無病株를 실용적으로 보급하기 위해서는 無病種 苗 생산후 계대배양에 의한 유식물체의 대량증식 및 순화체계의 확립이 필요하다. 기내 조직배양에서 유식물체의 생장은 배지조성, 식물생장조절물질 및 온도가 중요한 환경요인이기 때문에 배양묘의 생산에 있어서 비용이 많이 들고, 기내 培養 苗는 함유량이 높으며 광합성 능력이 저하되고 배양묘의 순화기간 동안 생존율이 저하되어 높은 생산비를 부담해야 되는 문제점이 있다. 환경요인들이 배양중인 식물체의 성장과 발육, 形態形成에 영향을 미친다고 보고한 바와 같이 조직배양에서 높은 상대습도는 잎의 형태학적 구조의 발달을 저해한다. 즉 외피큐티클의 왁스 형성(Fuchigami et al., 1981; Grout and Aston, 1977), 기공의 기능(Brainerd and Fuchigami, 1981)과 器外條件으로 전환 후 유식물체의 높은 致死率(Sutter and Langhans, 1979)에 관여한다. 몇몇 연구(Smith et al., 1990, 1992; Wardle et al., 1983)에 의하면 배양병내에 相對濕度를 낮추는 것은 수분손실에 대한 저항력을 향상시켜 기외조건에서의 생존율을 높일 수 있다고 하였다.

Zimmerman과 Cobb(1989)에 의하면 페추니아의 절간을 다양한 수준의 gelrite와 sucrose가 함유된 MS배지에서 배양하였는데, gelrite 고농도에서는 vitrification이 감소한 반면에 sucrose가 증가되면 vitrification이 증가하였으며, 유리질화된 잎에서는 정상 잎에 비해 inositol의 수준이 낮거나 거의 감지할 수 없었고, 還元糖과 sucrose의 수준이 더 높았다고 보고하였다.

pH의 영향에 있어서 딸기의 유식물체 繼代培養을 위한 배지 pH의 범위는 4.8로부터 5.8로 비교적 넓은 범위에서 양호하게 나타났으나 그 중에서 pH 5.3으로 조절하는 것이 유식물체의 분화, 초장의 신장, 뿌리의 발생 및 생체중의 증가에 가장 효과적이라고 하였다(Lee 등, 1992).

생장조절제의 영향에 관한 Lee 등(1995)의 보고에 의하면 기내 백합 자구 소인편 조직을 배양할 때 3% sucrose, 0.05 mg/L 2,4-D 이하에서, 혹은 9% sucrose, 0.01 mg/L 2,4-D에서 子球分化가 양호하였으며, 0.1 mg/L 2,4-D 농도가 되면 오히려 억제

가 되었고, BA 첨가는 대조구에 비해 자구분화는 촉진되었으나 子球肥大는 불량하였다고 한다.

본 연구에서는 기내에서 생산된 고구마 무병종묘의 대량증식을 위한 배양조건을 확립하고자 배지의 종류 및 조성, pH, 糖의 농도, 배양마디의 위치, 배양온도, NAA의 농도 등에 대한 배양효과를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 기내 증식에 미치는 배양조건

1) 공시재료

정단분열조직배양 유래 무병종묘로 확인된 품종 ‘율미’ 유식물체를 이용하여 기내에서 30일간 배양한 소식물체의 마디를 1마디씩 절취하여 배양재료로 사용하였다.

2) 배지조성 및 배양조건

배지는 MS기본배지에 NAA 0.5 mg/L를 첨가하고 한천 0.9%로 조정하였다. pH에 따른 효과는 3% sucrose에 pH를 4.3~6.3까지 0.5씩 차이를 두었으며, 糖의 함량에 따른 반응은 pH 5.8에 시판용 설탕을 1~10%로 조정하였고, 재료로 사용된 마디는 성장점부위를 포함한 頂端部를 제외한 부분만을 사용하였다. 고구마 마디의 배양 효율에 미치는 정아우세성을 조사하기 위해 3% 설탕, pH 5.8로 조정된 후 정단부를 포함하는 가장 윗부분을 기준으로 차례로 7마디까지 총 8마디를 치상하였다. 生長反應에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해 22~35℃까지 3℃씩 차이를 두어 배양하였으며, 또한 發根 및 생장에 미치는 NAA농도 효과를 조사하기 위해 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mg/L로 조정하여 실험하였다.

3) 배양환경

배양조건은 25℃ 또는 28℃ 성장상에서 PFD 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광조건으로 1일 16시간 광, 8시간 암상태에서 30일간 배양하였다.

4) 성장량 조사

성장반응은 배양 30일 후 초장, 근장, 마디수, 엽면적, 엽록소 함량, 莖葉과 뿌리의 생체중 및 건물중을 비교하였다. 통계처리는 Window용 SAS 6.12 version을 이용하였다.

5) 엽록소 측정법

100 mg 시료당 10 mL DMSO를 첨가하고 65°C 수조에서 30분간 추출하였고 spectrophotometer를 이용하여 吸光度를 측정하여 아래와 같이 산출하였다.

$$\text{Chlorophyll a (Chl a)} = 0.0127 \cdot \text{Abs663} - 0.00269 \cdot \text{Abs645}$$

$$\text{Chlorophyll b (Chl b)} = 0.0229 \cdot \text{Abs645} - 0.00468 \cdot \text{Abs663}$$

$$\begin{aligned} \text{Total chlorophyll content (mg/F.W.g)} \\ = 0.0202 \cdot \text{Abs645} + 0.00802 \cdot \text{Abs663} \end{aligned}$$

나. 기내 증식에 미치는 배지종류 및 MS배지의 농도

1) 공시재료

정단분열조직배양 유래 무병주 품종 '울미'를 이용하여 기내에서 30일간 배양한 식물체의 마디를 1마디씩 잘라 배양재료로 사용하였다.

2) 배지조성

마디의 성장반응에 미치는 基本培地의 영향을 조사하기 위해 MS배지와 B5배지 (Table 11)에 6% sucrose, pH 4.8, 0.9% agar를 첨가하였고, NH_4^+ 와 NO_3^- 의 함량을 1/2, 1, 2배로 조정하고 또한 적절한 MS strength를 알아보기 위해 MS 무기염의 농도를 1/2, 1, 2배로 조정하였다.

3) 배양환경

배양조건은 25°C 또는 28°C 生長箱에서 PPFD $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광조건으로 1일 16시간 광, 8시간 암상태에서 30일간 배양하였다.

4) 성장량 조사

생장반응은 배양 30일 후 초장, 根長, 마디수, 엽면적, 莖葉과 뿌리의 생체중 및 건물중과 엽록소함량을 비교하였다. 통계처리는 Window용 SAS 6.12 version을 이용하였다.

Table 11. Composition of basal MS medium and B5 medium (mg/L)

Chemicals	MS ^z	B5 ^y
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
NH ₄ NO ₃	1,650	-
KNO ₃	1,900	2,500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	-
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	-	150
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ · EDNA	37.3	37.3
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	-
MnSO ₄ · H ₂ O	-	10
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	2
H ₃ BO ₃	6.2	3
KI	0.83	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025
Myo-inositol	100	100
Nicotinic acid	0.5	1.0
Pyridoxine · HCl	0.5	1.0
Thiamine · HCl	0.1	10.0
Glycine	2.0	-

^zMS: Murashige and Skoog(1962) medium

^yB5: Gamborg et al.(1968) medium

3. 결과 및 고찰

가. pH, 糖 농도, 마디 위치 및 배양온도에 따른 영향

1) 배지의 pH 영향

식물체의 마디배양에서 배지의 pH가 유식물체의 생육상태에 미치는 영향을 조사하고자 3% 설탕, 0.5 mg/L NAA를 첨가하여 pH를 4.3에서 6.3까지 0.5 간격으로 조절된 MS배지에 기내 소식물체의 외마디를 치상하여 생장상에서 30일간 배양한 식물체의 생장반응을 조사하였다(Table 12). 식물체의 초장은 pH 4.8에서 5.2cm로 가장 컸으며, pH 6.3에서 3.6 cm로 가장 작게 나타났다. 根長은 pH 4.8에서 9.9 cm로 가장 긴 결과를 보였으며 pH 4.3에서는 7.2 cm로 작게 나타났으나, pH 4.8을 제외한 배지간에는 有意的 차이가 나타나지 않았다. 또한 절간수에 있어서도 pH 4.8에서 7.9개로 가장 많은 절간수를 보였으나, pH 4.3~5.3범위의 배지간에는 차이가 크지는 않았다.

Table 12. Effects of pH on the growth of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

pH	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (mg)	
					Shoot	Root	Shoot	Root
4.3	4.3 ab	7.2 b	7.2 ab	12.1 a	0.84 a	0.12 a	59.2 a	11.8 ab
4.8	5.2 a	9.9 a	7.9 a	13.8 a	0.84 a	0.17 a	63.6 a	15.3 a
5.3	4.5 ab	7.5 b	7.4 ab	12.3 a	0.80 a	0.13 a	60.8 a	12.2 ab
5.8	4.1 ab	7.9 b	6.9 b	12.0 a	0.72 a	0.10 a	55.0 a	10.3 ab
6.3	3.6 b	7.7 b	6.9 b	10.7 a	0.64 a	0.09 a	50.8 a	8.5 b

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

엽면적, 초장과 뿌리의 생체중 및 新梢의 건물중에 있어서 pH 4.8에서 가장 높은 수치를 보였으나, 다른 배지간과의 유의성은 인정되지 않았다. 뿌리 건물중의 pH 반응은 pH 4.8에서 15.3 mg 가장 많았고 pH 4.3~5.8 배지간에 큰 차이를 보이지는 않았다.

고구마 마디배양에 있어서 pH 범위는 엽면적, 新梢 및 뿌리의 생체중에서 뚜렷한 유의성이 인정되지 않아 비교적 넓은 것으로 보이지만, 유식물체의 성장반응에 효과적인 초장, 근장, 절간수에 있어서 가장 좋은 반응을 보인 pH는 4.8로 조정된 배지로 나타났다(Photo. 9-A).

2) 당 함량에 따른 영향

배지의 糖 함량에 따른 유식물체의 초장, 마디수, 엽면적 및 생체중 등 성장반응을 조사한 결과(Fig. 3) 초장은 설탕 1~6%까지는 농도의 증가에 따라 계속해서 증가하는 경향을 보였고 6%이상부터 감소하기 시작하여 10%에서는 초장이 2.2cm에 불과하였으며 1% 설탕 첨가배지에서의 식물체는 왜소화되고 다소 황변된 모습을 보였다. 근장에 있어서는 10% 첨가구에서 약간 낮아지기는 하였으나 대체적으로 당 함량이 높을수록 길어지는 경향을 보여 地下部 생육보다는 지상부의 생육에 더 민감한 반응을 보였다(Photo. 9-B). 유식물체의 마디수에 있어서도 8% 설탕에서 8.7개로 계속 증가하다가 10% 첨가배지에서 5.8개로 줄었다. 6~8% 설탕이 함유된 배지에서 식물체의 엽면적은 12.2~14.3 cm²로 가장 넓었고, 1%에서는 1.4 cm²에 불과하여 설탕의 함량이 낮아질수록 葉面積도 줄어들었다. 신초의 생체중과 건물중에 있어서 6~8% 설탕 첨가배지에서 0.8 g과 69.2~80.0 mg으로 가장 좋았고 당 함량이 낮아질수록 줄어들었다. 뿌리의 생체중과 건물중에 있어서 1~5% 설탕에서 0.01~0.1 g과 1.07~9.89 mg으로 상당히 낮았고 6~8% 함유 배지에서 0.18~0.23 g과 19.4~25.2 mg으로 높게 나타났다.

3) 마디위치별 배양효율

외마디배양을 통한 증식방법에서 마디 위치별 배양효율을 조사하기 위해 生長點을 포함하는 가장 윗부분을 기준으로 차례로 7마디까지 총 8부분을 치상하였다. 성장점을 포함하는 가장 윗부분만이 배양 30일 후 초장 7.8 cm, 근장 6.4 cm, 절간수 10.6개 및 신초의 生體重 0.8 g 등 대부분의 성장반응에서 가장 높은 유의적인 증가를 보였

다(Photo. 9-C). 두 번째 마디부터 기부에 이르는 8번째 마디의 배양에서는 가장 윗부분의 2, 3번째 아래 마디에서 4.7 cm, 4.0 cm로 다소 초장이 길었고, 근장에 있어서 4.7 cm와 5.5 cm로 차이가 다소 있었으나 마디수, 엽면적, 新梢와 뿌리의 생체중, 근체중에 있어서는 마디위치간의 유의차가 인정되지 않았다(Table 13).

정단분열조직을 포함하는 첫 번째 마디의 성장반응이 두 번째 마디를 배양한 결과보다 양호하였을 뿐 큰 차이가 없으므로 우량 종묘의 기내 大量増殖시 頂端部를 포함하는 마디를 제외하고 배양하면 균일한 묘를 동시에 대량으로 확보할 수 있는 방법이 될 수 있었다.

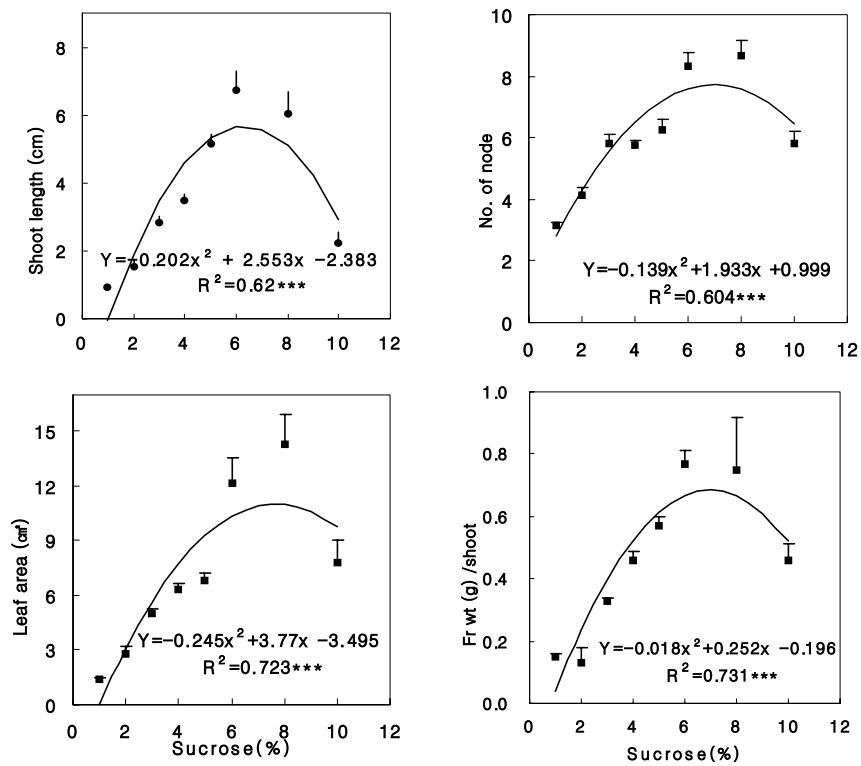


Fig. 3. Effects of sucrose on the growth of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'. Vertical bars represent mean \pm SE of 3 replicates.

Table 13. Effects of nodal position on the growth of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Nodal position	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (mg)		Dry weight (mg)	
					Shoot	Root	Shoot	Root
1st	7.8 a	6.4 a	10.6 a	9.7 a	819.2 a	104.2 a	61.7 a	10.0 a
2nd	4.7 b	4.7 ab	6.4 b	6.6 b	512.5 b	53.3 b	40.8 b	5.3 b
3rd	4.0 bc	5.5 ab	7.1 b	7.7 b	545.8 b	76.7 b	40.8 b	5.8 b
4th	3.8 cd	5.0 ab	6.9 b	6.2 b	482.5 b	61.7 b	37.5 b	5.0 b
5th	3.5 cde	3.9 b	6.5 b	6.3 b	489.2 b	55.0 b	39.2 b	4.5 b
6th	3.5 cde	4.2 b	6.6 b	5.8 b	447.5 b	48.3 b	26.7 b	5.0 b
7th	2.6 e	3.4 b	5.9 b	5.6 b	410.0 b	44.2 b	33.3 b	3.5 b
8th	3.6 de	4.6 ab	6.4 b	7.4 b	504.4 b	83.0 b	37.2 b	6.9 b

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

4) 배양온도의 영향

고구마의 정단분열조직에서 유래된 품종 '율미'의 식물체의 마디배양에서 배양온도에 따른 유식물체의 성장상태를 조사하기 위해 6% sucrose, pH 4.8, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 MS배지에 培養溫度를 22~34℃ 범위로 조정한 후 성장상에서 배양 30일 후 식물체의 성장정도를 조사하였다(Table 14). 草長에 있어서 온도에 매우 민감한 반응을 보여 22℃에서 3.8 cm였으나, 31℃에서는 11.6 cm로 3배에 달하는 차이를 보였다. 뿌리발달에 있어서는 길이나 생체중, 건물중 모두 25℃에서 가장 좋은 반응을 보였으며, 뿌리길이에 있어서 25℃와 31℃에서 뚜렷한 차이는 없었으나 뿌리의 생체중과 乾物重에 있어서 31℃에서 저조했으며, 34℃에서는 성장점 부위가 고사하고 뿌

리의 색깔이 다소 노란 빛을 띠어 온도장해를 받았음을 알 수 있었다. 절간수에 있어서 31℃에서 15.6개로 가장 많았으며, 28℃에서는 14.1개를 보였다. 엽면적과 신초의 생체중, 건물중에 있어서 31℃ 生長箱에서 배양된 식물체가 가장 좋은 반응을 보였다.

뿌리의 생장은 25℃에서 가장 좋은 반응을 보였으며, shoot의 경우는 다소 높은 온도인 31℃에서 성장반응이 양호하였으나, 28℃에서 배양된 식물체의 경우 뿌리와 新梢의 생장이 양쪽 모두 우수하여 器內 배양에 있어서 28℃ 온도조건이 가장 좋은 것으로 판단되었다.

본 실험에서 밝혀진 배지조성, NAA 농도, pH, 당 농도, 배양온도 등 최적조건에 따라 30일 주기로 최소 5개의 마디를 잘라서 계대배양하여 기내증식한다면 1년에 최소 9~10회만 배양하여도 5⁹⁻¹⁰ 즉 1년에 최소 1천만분의 유식물체 생산이 이론적으로 가능하다고 판단된다(Photo. 10).

Table 14. Effects of temperature on the growth of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Temp.	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
					Shoot	Root	Shoot	Root
22℃	3.8 d	11.1 b	7.6 d	12.1 d	0.9 d	0.4 a	0.08 d	0.03 b
25℃	6.8 c	15.7 a	10.3 c	16.4 c	1.3 c	0.4 a	0.13 c	0.05 a
28℃	10.8 b	15.6 a	14.1 b	21.1 b	1.8 b	0.3 a	0.18 b	0.03 b
31℃	11.6 a	14.9 a	15.6 a	27.6 a	2.1 a	0.2 b	0.21 a	0.02 c
34℃	10.8 b	10.2 b	7.8 d	5.6 e	1.0 d	0.2 b	0.11 c	0.02 c

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the DMRT (P=0.05).

나. 배지 종류와 농도에 따른 성장반응 효과

1) 배지종류의 영향

無病株로 확인된 개체의 외마디를 정단분열조직을 30일간 배양한 고구마 품종 ‘울미’의 소식물체 마디를 배양재료로 사용하여 기내배양에 미치는 기본배지의 영향을 조사하기 위해 MS배지와 B5배지에 3% sucrose, pH 5.8, 0.9% agar를 첨가하고 16시간 광조건, 8시간 암상태의 生長箱에서 30일간 배양 후 성장량을 조사하였다(Fig. 4).

草長에 있어서 MS배지에서 성장한 식물체는 6.6 cm이었으나, B5배지의 소식물체의 초장은 4.3 cm로 작았으며, 뿌리길이는 B5배지의 경우 28.2 cm로 MS배지 9.5 cm에 비해 3배나 긴 뿌리가 신장되었다. 절간수에 있어서 MS배지의 식물체는 10.3개를 나타낸 반면에 B5배지에서는 8.8개를 보여 MS배지에서 생육이 더욱 왕성하였다.

엽면적에 있어서는 MS배지 11.3 cm², B5배지 16.2 cm²로 비교적 유사한 결과를 나타냈다. 신초의 생체중과 건물중은 차이가 없었으나, B5배지에서 배양된 소식물체의 뿌리신장은 차이가 많아 뿌리 생체중과 건물중은 MS배지에 비해 3-4배정도 높았다.

MS배지와 B5배지에서 성장한 소식물체의 엽록소 함량을 분석한 결과 엽록소 a의 함량이 MS배지에서 높게 나타났고, 엽록소 b의 경우는 MS배지 0.08 mg, B5배지 0.05 mg으로 큰 차이를 보이지 않았으나, 총 葉綠素 함량은 MS배지 0.35 mg으로 B5배지 0.23 mg에 비해 1.5배 높았다.

나. MS배지내 질소 및 무기물 농도의 영향

1) 질소농도의 영향

MS배지내에 함유된 질소이온의 농도는 NH₄⁺ 20.6 mM, NO₃⁻ 39.4 mM로써 총 질소농도는 60 mM인데 본 실험에서는 배지내 총 질소농도를 30, 60, 120 mM로 1/2, 1 및 2배로 조정하여 頂端分裂組織배양 유래 ‘울미’ 품종의 소식물체 마디를 30일간 배양한 후 生長量을 조사하였다(Table 15).

질소 농도 30 mM과 60 mM 처리에서 소식물체의 草長에 있어서는 9.1, 9.4 cm로 차이가 없었으나, 120 mM 처리구에 있어서는 5.8 cm로 생장이 억제되는 결과를 보였다. 뿌리 길이에 있어서는 30 mM 처리구에서 19.3 cm로 가장 길었으며, 60 mM과

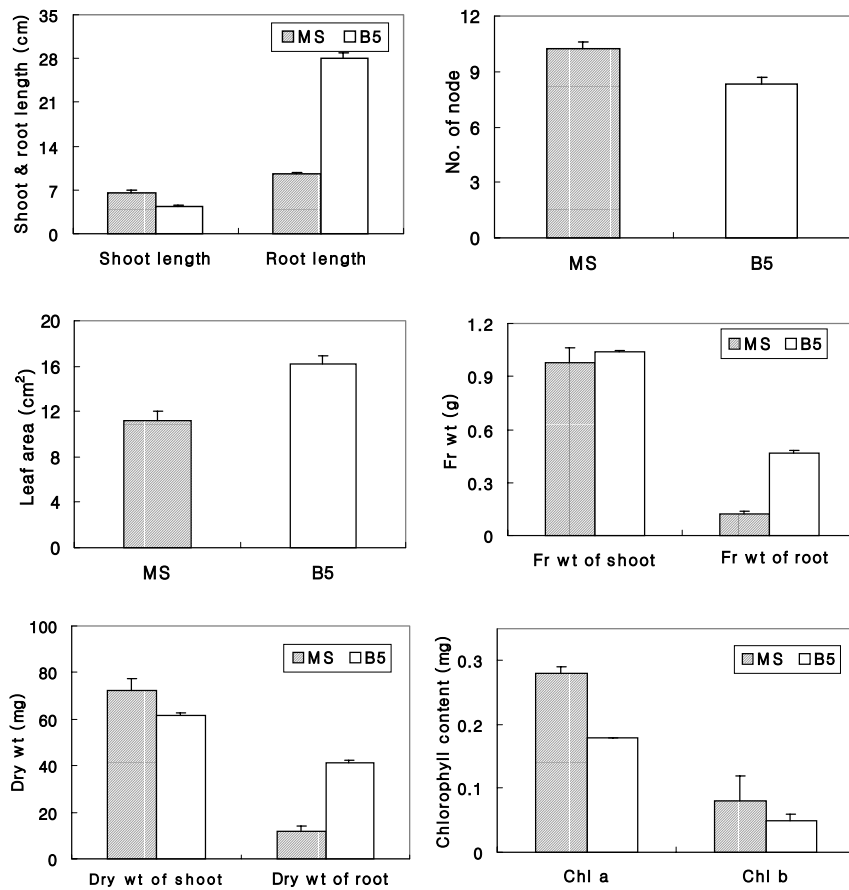


Fig. 4. Effects of basic medium (MS and B5) on the growth response of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'.

120 mM 처리구에서는 차이를 보이지 않았다. 절간수는 60 mM 처리구에서 11.1개로 가장 많았고, 30 mM과 120 mM 처리구는 10.2개와 9.7개로 유의성의 차이를 보이지 않았다. 또한 葉面積에 있어서 3개 처리구 모두 유의성이 인정되지 않았으며, 신초의 生體重은 60 mM 처리에서 $1.3 \pm 0.04\text{g}$ 으로 가장 좋은 반응을 보였다. 신초의 乾物率에 있어서 30 mM 처리에서 7.7%, 60 mM 처리에서 8.1%, 120 mM 처리는 8.7%로 가장 높았다. 엽록소 함량을 조사한 결과 60 mM 처리에서 총 엽록소 함량 0.46 mg으로 가장 높았으나 有意的 차이를 보이지 않았다.

2) 무기물 농도의 영향

MS배지의 무기물 농도를 1/2, 1, 2배로 조정하여 ‘율미’ 소식물체의 외마디배양을 하였던 바 新梢長, 根長, 절간수 등 성장반응에 있어서 차이가 나타났고 유의성도 인정되었다(Table 16). 2배 MS배지에서 초장이 4.4 cm로 현저히 작았으며, 1배 MS배지는 12.0 cm로 가장 길었고 MS 無機物 농도를 반으로 줄인 0.5배 MS배지는 7.6 cm를 나타냈다. 뿌리 길이에 있어서 0.5배 MS배지에서 20.8 cm로 길었으며 1 및 2배 MS배지에서는 유의적 차이를 보이지 않았다. 절간수에 있어서는 1배 MS배지에서 14.3개로 가장 많았고, 新梢와 뿌리의 생체중에 있어서도 1배 MS배지에서 가장 좋은 결과를 보였으나, 0.5배와 2배 MS배지에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

엽록소 함량에 있어서 1배와 0.5배 MS배지에서는 엽록소 함량 차이를 보이지 않았으나, 2배 MS배지에서는 엽록소 a, b 총 함량이 0.2 mg으로 현저히 적었는데, 0.5와 1배 MS배지와 비교할 때 1/2 정도의 낮은 함량을 보였다. 2배 MS배지의 경우 육안 관찰만으로 그 차이를 확인 할 수 있을 정도로 소식물체의 잎이 황화현상을 보였다.

Table 15. Effects of nitrogen contents on the growth of plantlets regenerated on the MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Nitrogen contents	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)	
					Shoot	Root
1/2× N ^z	9.1 a	19.3 a	10.2 b	17.0 a	1.0 b	0.3 a
1× N	9.4 a	12.5 b	11.1 a	18.1 a	1.3 a	0.2 b
2× N	5.8 b	12.9 b	9.7 b	16.6 a	1.1 a	0.2 b

Nitrogen contents	Dry weight (g)		Ratio of dry matter		Chlorophyll contents (mg)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	Chl a	Chl b	Total
1/2× N	0.1 a	0.03 a	7.7 b	9.7 a	0.34 a	0.11 a	0.46 a
1× N	0.1 a	0.02 b	8.1 ab	10.7 a	0.34 a	0.12 a	0.46 a
2× N	0.1 a	0.02 b	8.8 a	10.1 a	0.31 a	0.09 a	0.40 a

^z1/2× N: 30 mM, 1× N: 60 mM, 2× N: 120 mM nitrogen contents.

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

Table 16. Effects of MS medium strength on the growth of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Medium	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)	
					Shoot	Root
1/2× MS	7.6 b	20.8 a	10.2 b	13.0 b	1.0 b	0.3 ab
1× MS	12.0 a	16.7 b	14.3 a	21.9 a	1.9 a	0.3 a
2× MS	4.4 c	14.8 b	9.3 b	19.6 a	1.1 b	0.2 b

Medium	Dry weight (g)		Ratio of dry matter		Chlorophyll contents (mg)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	Chl a	Chl b	Total
1/2× MS	0.1 c	0.03 a	9.0 b	11.3 a	0.30 a	0.08 a	0.38 a
1× MS	0.2 a	0.03 a	8.2 b	11.3 a	0.30 a	0.08 a	0.38 a
2× MS	0.1 b	0.02 b	10.0 a	11.0 a	0.16 b	0.04 b	0.20 b

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

3) 기내 고구마 성장곡선과 NAA의 효과

가. 성장곡선

기내 정단분열조직 유래 소식물체 품종 ‘율미’의 외마디를 이용하여 MS배지에 6% 설탕, pH 4.8, 0.9% agar를 첨가하고 16시간 광조건, 8시간 암상태의 生長箱에서 30일간 성장량의 변화를 조사하였다(Fig. 5).

식물체의 생장은 약 2주일 동안은 매우 더디게 진행되어 배양 7일째까지의 성장과 節間數, 엽면적 등이 置床하였을 때와 차이를 보이지 않았고 오직 뿌리만이 1.1 cm 자랐으며, 배양 13일째도 초장이 0.4 cm에 불과 하였고 뿌리는 다소 신장하여 4.7 cm 를 보여 주로 초기에는 新梢의 성장보다는 뿌리의 발육이 먼저 일어남을 알 수 있었다.

신초의 생장은 배양 18일부터 25일 사이에 급격하게 이루어졌으며, 뿌리 신장에는 큰 차이를 보이지 않았다. 절간수와 엽면적에 있어서도 차이를 보여 25일째에 절간수 9.9개, 葉面積 5.7 cm²를 나타냈다. 엽면적 성장곡선은 초기 3주일간은 엽면적 크기가 현저히 작았으나 생육 후기에 급격하게 엽면적이 늘어났다.

전반적으로 30일간의 고구마 성장곡선을 살펴보면 新梢의 생장은 배양 13일째 이후부터 직선에 가까운 성장을 보였으며, 뿌리 생장은 배양 18일 제까지 급격히 신장하는 것을 관찰할 수 있었다. 절간수에 있어서는 직선에 가까운 증가를 보였고, 엽면적은 배양 18일 이후에 급격히 늘어났으며, 신초의 생체중과 乾物重은 초장과 根長의 발달과 유사한 경향을 보였다.

2) NAA의 효과

기내 정단분열조직 유래 소식물체 품종 ‘율미’의 외마디를 이용하여 6% 설탕, pH 4.8, 0.9% agar가 添加된 MS배지에 NAA 농도를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mg/L로 조정하고, 16시간 광조건 8시간 암상태의 성장상에서 30일간 배양한 후 성장량을 조사하였다(Fig. 6).

신초의 생장은 NAA 0.3 mg/L 첨가된 배지에서 13.4 cm로 가장 길었으며 NAA 무첨가 배지에서 9.4 cm로 가장 작은 초장을 나타냈다. 뿌리 길이에 있어서는 NAA 무첨가구와 0.1 mg/L 첨가구에서 길었으며 뿌리 生體重은 배지간에 유의성은 인정되지 않았으나 NAA 0.3 mg/L 첨가구에서 가장 무거운 0.29 g을 나타냈다. 절간수에 있어서는 NAA 0.1 mg/L 첨가된 배지에서 14.3개로 많았으며, NAA 0.5, 0.8 mg/L 배

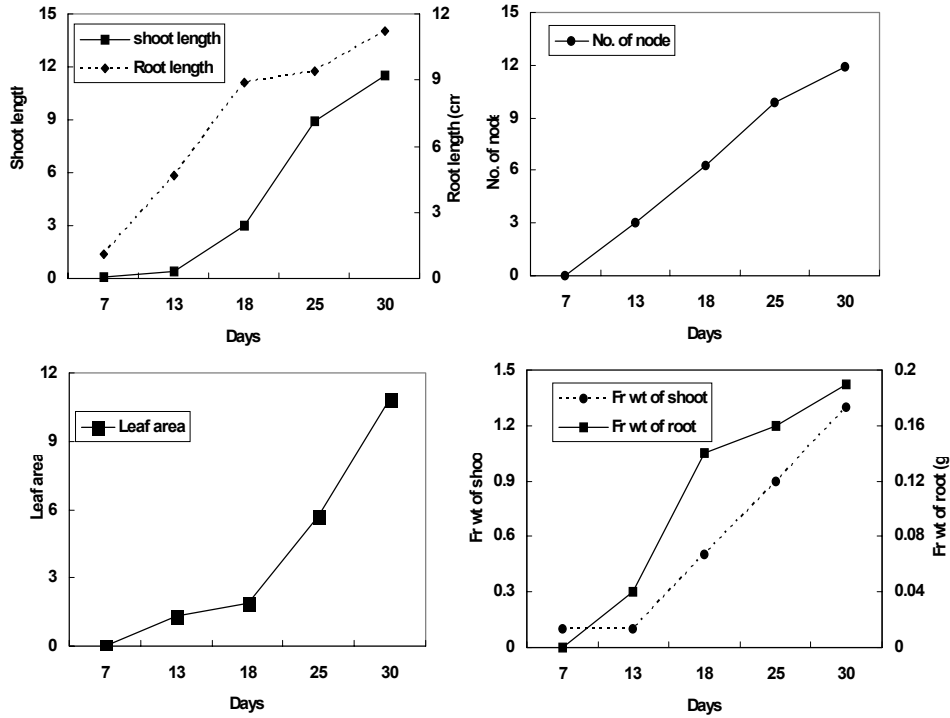


Fig. 5. Growth curves of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA for 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'.

지에서 12.3개, 11.6개로 가장 작게 나타났다. 엽면적에 있어서는 NAA 0.1 mg/L 첨가된 배지에서 18.8 cm²로 가장 좋았으나 배지간에 유의성은 인정되지 않았다(Photo. 9-D).

新梢와 뿌리의 생체중에 있어서 처리구간에 유의성은 인정되지 않았으나, NAA 무첨가 배지에서 가장 적은 수치의 생체중을 나타냈다. 신초의 乾物重은 배지간에 약간의 有意性이 인정되었고 NAA 무첨가구와 NAA 0.8 mg/L 첨가구에서 가장 저조하였으며, 뿌리의 건물중은 유의성이 인정되지 않았다.

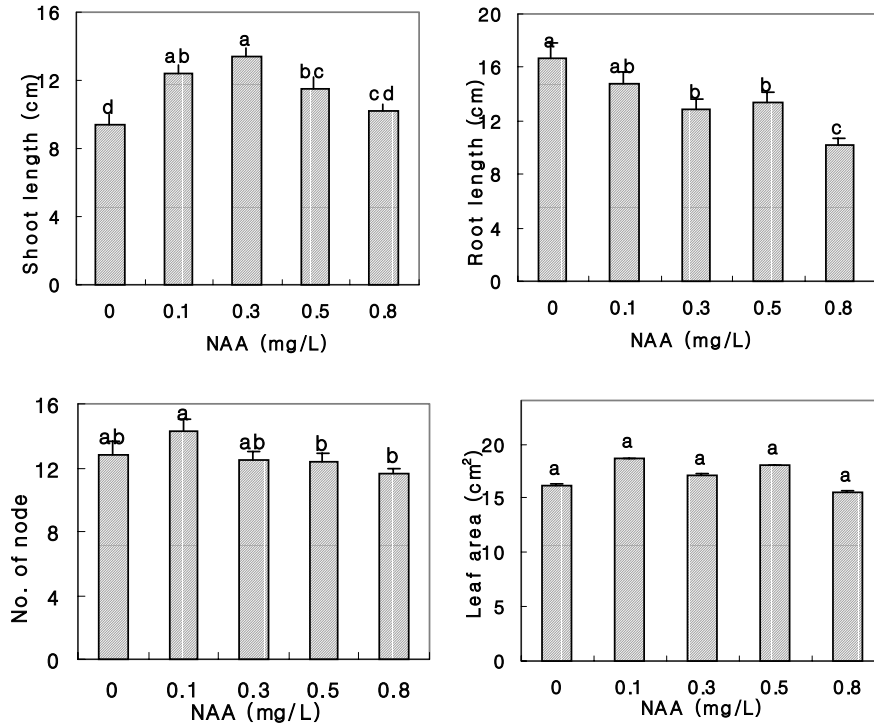


Fig. 6. Effects of NAA on the growth of plantlets regenerated on MS medium supplemented with 6% sucrose at 28°C after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'.

전반적인 生長反應에서 NAA 무첨가 배지 보다는 NAA 0.1~0.5 mg/L 첨가 배지에서 보다 양호한 生長反應을 보였으며, 특히 초장에 있어서 NAA 첨가 효과가 뚜렷하였다. 0.1~0.5 mg/L NAA 첨가된 배지간에 현저한 차이는 확인할 수 없었으나 마디 기부에서 발생하는 캘러스의 크기에 차이를 볼 수 있었다. 즉 NAA 함량이 높은 배지일수록 基部에 발생한 캘러스의 크기가 커져 기내 식물체의 마디배양에 있어서 NAA 0.1 mg/L 첨가가 가장 적절하다고 판단되었다.

식물조직배양에 사용되는 배지의 일반적인 pH 범위는 주로 5.5~5.8이고 고구마

조직배양의 경우 대부분 pH 5.8에서 주로 이루어졌다(Eun and Kim, 1999; Eun et al., 1999). 식물종류에 따라서 배양에 적합한 pH 범위는 다양하여 Anderson(1975)은 rhododendron을 이용한 신초증식에 적합한 pH는 4.5가 적당하다고 하였으며, 딸기의 유식물체 繼代培養을 위한 배지 pH의 범위는 4.8~5.8로 비교적 넓은 범위에서 양호하였으나, 그 중에서 pH 5.3에서 유식물체의 분화, 草長의 신장, 뿌리의 분화 및 생체 중의 증가에 가장 효과적이었다(Lee et al., 1992). 심비디움 원괴체 증식의 경우 기관발생은 pH 4.0에서, 생장은 pH 5.0에서 양호하였다(Paek and Chun, 1985).

Jarret과 Gawel(1991)은 고구마 마디배양에서 sucrose함량이 3%에서 1.5~2.0%로 낮아질수록 뿌리와 절간수가 줄었다고 하였고, 또한 카네이션과 토마토의 기내 소식물체의 생장에 있어서 sucrose 함량의 감소는 생장을 억제시키는데 효과가 있었다(Schnapp and Preece, 1986).

고구마의 기내 小塊根 형성용 줄기의 대량증식을 위한 보고(Kim et al., 1991)에서 長太不定根原基가 가장 많을 것으로 예상되는 6~12마디 크기의 줄기를 균일하게 대량으로 획득하기 위해 줄기절간에 존재하는 상대적인 정아우세를 없애기 위하여 1개의 마디만 포함되어 있도록 3~4mm 정도의 절편으로 절단한 뒤 35일 동안 배양한 후 균일한 묘를 얻을 수 있었다고 보고하였다.

고구마 품종 '율미'의 정단분열조직을 배양하여 얻은 무병주를 이용하여 고품질의 培養種苗를 대량증식하여 농가에 보급할 수 있는 생산체계를 확립하기 위해 외마디배양 시 기내증식에 미치는 효과적인 pH 농도, 설탕함량 및 마디의 위치에 따른 성장반응을 조사한 결과, 고구마 마디배양에 있어서 pH범위는 비교적 넓은 것으로 보이지만 가장 유식물체의 생육에 효과적인 pH는 4.8로 나타났다. 이것은 고구마가 산성토양에 강한 재배적 특성과 일치하는 경향을 보인 결과라고 생각된다. 본 실험에 사용한 당은 培養種苗의 단가를 낮출 목적으로 시판하는 설탕을 사용하였는데 설탕의 함량이 6~8%인 배지에서 식물체의 초장, 근장, 마디수, 엽면적, 生體重 및 건물중 등 성장반응이 우수하였고 sucrose함량이 6~8%보다 감소할수록 비례적인 감소를 보였다. 성장점을 포함하는 마디의 생장은 다른 마디를 배양한 결과보다 우수하였고 그 외의 마디 배양간에는 큰 차이가 없었으므로 대량생산할 경우 경정조직을 포함한 마디를 제외하고 그 이하의 마디를 배양하면 균일한 묘를 동시에 대량으로 확보할 수 있었다.

고구마와 같은 고온성 작물의 경우 지상부 생육에 미치는 온도의 영향은 매우 민감한 반응을 보여 22℃에서 3.8 cm였으나, 31℃에서는 11.6 cm로 3배에 달하는 차이

를 보였으나, 34℃ 고온에서는 生長點 부위가 고사하고 뿌리의 색깔이 변색되어 온도 장해를 관찰할 수 있었다. Jarret과 Gawel(1991)의 연구에서도 10~26.7℃ 온도범위에서 고구마 腋芽生長은 15.6℃에서 거의 억제된다고 하였으며, 신초 생장비율은 온도가 증가할수록 증가하는 정의 상관관계에 있으며, 21℃ 보다 낮은 온도에서는 황화된 연약한 줄기가 자주 발생되고, 15.6~21.1℃ 온도에서 Jewel 품종의 경우 성장속도가 50% 감소되었다고 보고하여 고구마 신초 생장에는 온도가 매우 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

식물의 조직배양에 가장 많이 이용되는 배지는 MS배지인데, MS배지는 총 질소함량이 다른 배지에 비해 높은 편이다. MS배지의 무기물 농도가 기관형성 및 식물체 생장에 영향을 미치는데(Amirouche et al., 1985; Hussey and Stacey, 1981; Singha, 1982), 식물에 따라 MS 무기물 농도에 대한 요구는 차이가 크다. 딸기 器內培養의 경우 1/2 MS 무기물의 농도가 사용되며, 감자 기내배양에서는 MS배지의 무기물 농도가 높아 농도를 낮추는 것이 器管形成에 효과적이다(Evans, 1993). 나리의 경우 MS배지의 무기물 농도에 따라 품종간에 차이가 있으며 Lim 등(1998)은 나리 품종 'Cherry Blossom'의 器內 배양에서 배지 내의 무기물 농도가 높을수록 자구 형성수가 증가하고 자구 생체중은 오히려 감소한다고 하였는데 다른 품종에서는 반대의 결과를 보였다. MS배지 내 질소농도는 전체 무기물 농도의 2/3 이상을 차지하기 때문에 배지 내 窒素濃度는 식물체 생장 및 기관형성에 큰 영향을 미치는데, 고구마의 기내배양 실험에서 MS배지를 이용한 보고가 많다. 한편 Leidi 등(1991)은 작물의 질소 흡수는 식물체 내 질소 또는 탄수화물 함량과 같은 내부요인과 온도, 산소의 수준, 根圈의 pH 등 外部요인에 따라 변화한다고 하였다.

본 실험에서 고구마의 기내 증식에 미치는 MS 무기물의 농도나 질소함량의 차이가 보였으며, 2배의 MS 무기물이나 2배의 질소 농도는 생육을 극히 억제하는 것으로 나타났다. 주로 뿌리 생장에 영향을 미쳤으며, MS 無機物의 양을 2배로 늘리거나 줄이는 경우 질소 농도에 변화를 주는 것 보다 기내 식물체의 생장을 저조하게 하였다.

4. 적 요

정단분열조직 由來 무병주인 고구마 품종 '울미'의 마디배양으로 대량증식에 미치

는 배양조건을 구명하고자 pH, 糖 농도, 배양온도, 마디위치, 배지의 종류 및 鹽의 농도, NAA농도 등을 조사하였다.

유식물체의 생육에 가장 효과적인 pH는 4.8이었으며, 설탕의 함량은 6~8%인 배지에서 식물체의 초장, 근장, 마디수, 엽면적, 생체중 및 건물중 등 성장반응이 가장 양호하였고 설탕의 함량이 6~8%보다 낮거나 높아지면 生長이 감소하였다.

培養溫度에 매우 민감한 반응을 보여 22℃에서 초장이 3.8 cm였으나, 31℃에서는 11.6 cm로 3배에 달하는 차이를 보였다. 28℃에서 배양된 식물체의 경우 뿌리와 신초의 생장이 양쪽 모두 우수하여 기내 배양에 있어서 28℃ 온도조건이 가장 양호한 반응이었다.

마디의 위치는 頂端部位를 포함하는 맨 윗마디가 다른 마디를 배양한 결과보다 우수하였고 그 외의 마디 배양간에는 큰 차이가 없었으므로 대량증식할 경우 경정조직을 포함한 마디를 제외하고 그 이하의 마디를 배양하면 균일한 묘를 동시에 확보할 수 있었다.

MS배지에서 배양된 식물체는 B5배지에서 유식물체 보다 초장, 절간수, 총 엽록소에 있어서 더 나은 반응을 보여 적합한 배지로 판단되었다. MS培地の 무기염과 질소농도는 器內 식물체의 생장에 영향을 미쳤는데, 60 mM(NH₄⁺: 20.6 mM, NO₃⁻: 39.4 mM)의 질소농도에서 草長, 절간수, shoot의 생체중, 총 엽록소 함량이 증가하였다. 1배 MS배지에서 배양된 식물체는 여러 가지 성장반응에 있어서 0.5배나 2배 MS 무기물 농도에 비하여 더 양호한 결과를 보였다.

NAA농도 효과는 0.1~0.5 mg/L가 첨가된 배지간에 현격한 차이는 확인할 수 없었으나, 마디 基部에 발생하는 캘러스의 크기에 차이를 볼 수 있었다. 즉, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서는 줄기의 기부에서 캘러스가 거의 발생하지 않고 뿌리가 직접 발생하여 순화에 양호하였다.

본 실험에서 밝혀진 최적조건에 따라 기내증식한다면 이론적으로 1년간 1천만분의 유식물체 생산이 가능하다고 판단된다.

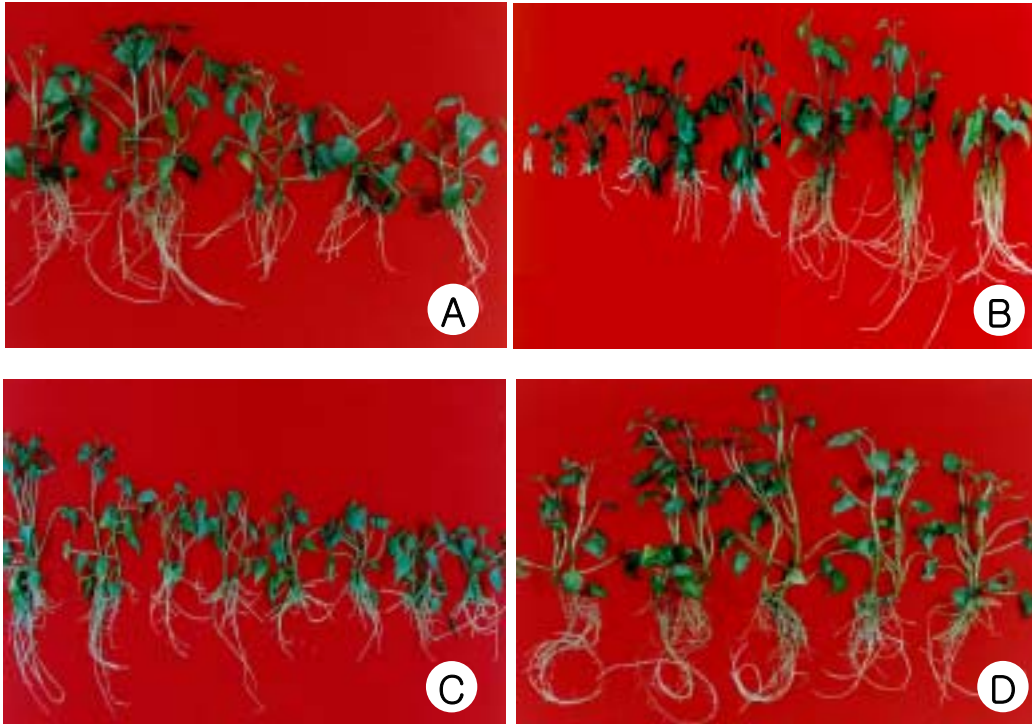


Photo. 9. Effects of pH, sucrose, nodal order, and NAA on the growth of plantlets in MS medium. A: pH 4.3, 4.8, 5.3, 5.8, 6.3, B: sucrose 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10%, C: 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th node, D: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mg/L NAA (left to right).

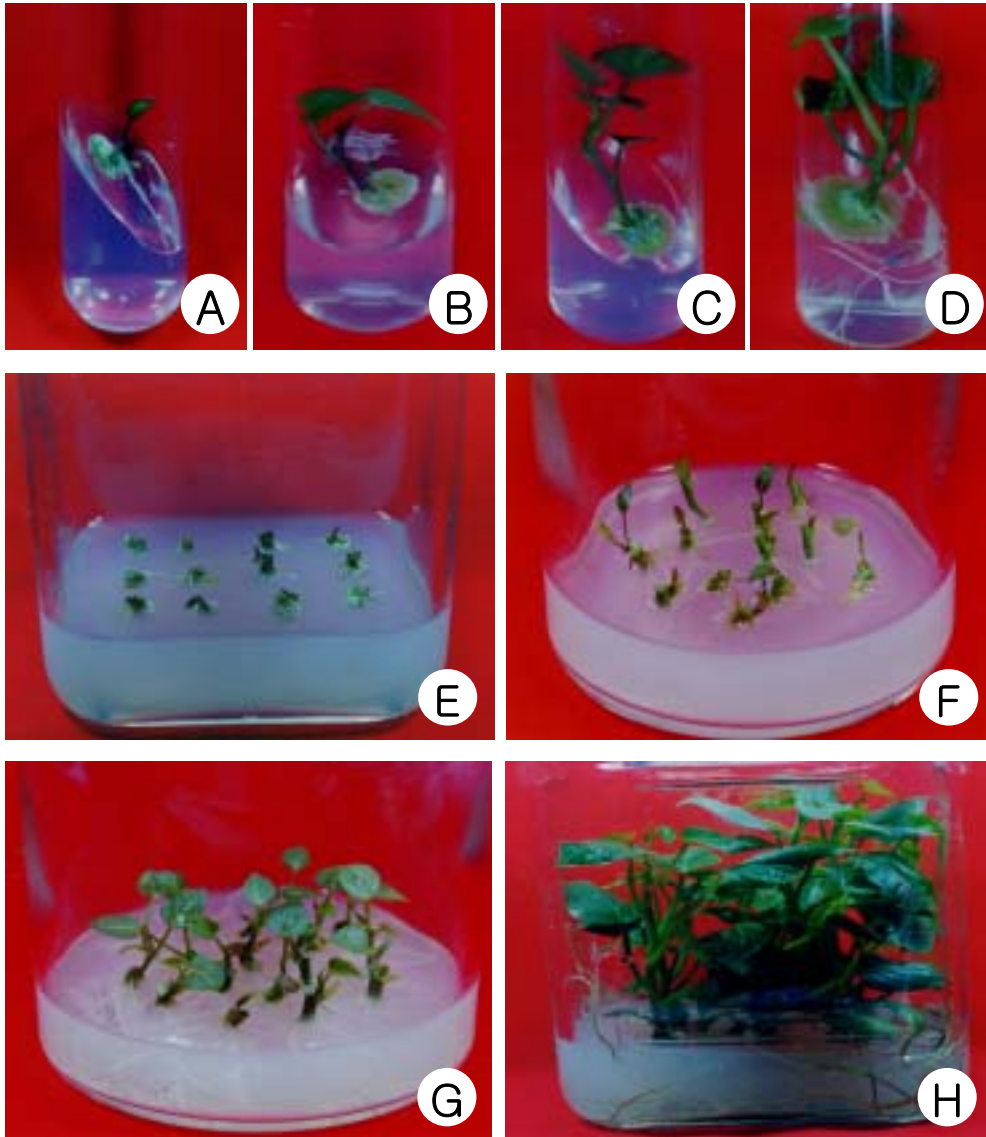


Photo. 10. Virus-free plantlets derived from apical meristem as determined by RT-PCR. A, B, C, and D: virus-free plantlets, E, F, G, and H: A nodal culture for mass propagation after 7, 10, 15, and 30 days culture respectively.

제 5 절 배양종묘의 기내 순화체계

1. 서 언

정단분열조직배양에 의해 얻어진 無病株를 실용적으로 농가에 보급하기 위해서는 무병종묘 생산후 계대배양하여 증식한 유식물체를 기내에서 순화시키는 체계의 확립이 필요하다. 기내 조직배양에서 유식물체의 생장은 배지 및 식물생장조절물질의 조성, 온도 등이 중요한 환경요인이 된다. 기내 배양묘는 함수량이 높으며, 광합성 능력이 극히 저하되고 연약하여 순화기간 동안 생존율이 저하되므로 높은 생산비를 부담해야 되는 문제점이 있다. 이러한 이유는 높은 인건비와 시설비, 기내에서의 성장 불량 및 순화 후의 낮은 생존율에 기인된 높은 생산 단가 때문이며 생산비 절감을 위해 배양의 자동화와 함께 기내에서 健全種苗를 획득하여 순화 후 생존율을 높여야만 한다.

일반적인 조직배양은 가스교환이 제한적이거나 거의 밀폐된 용기에서 이루어지므로 배양환경은 상대습도가 높고, 광도가 부족하며, 항온으로 유지되어야 하고, CO₂농도가 명상태에서는 매우 낮고 암상태에서 증가하며, 배양기간에 따라 에틸렌이 축적되기도 하고, 배지내 당과 무기물함량이 높으며 또한 성장조절제가 대부분 첨가된 상태로서 외부환경과 매우 다른 특성을 가진다(Kozai와 Kitaya, 1993). 그 결과 조직배양묘는 표피와 엽육조직이 충분히 발달하지 못하여 낮은 광합성능을 가지므로 탄소원으로 배지내에 공급된 sucrose를 이용하는 他家榮養體系를 이루어왔으며 이를 포장에서 순화할 경우 급격한 환경변화로 심한 스트레스를 받을 뿐 아니라 대기 중의 CO₂를 이용하는 자가영양체계로 전환하는 과정에서 심한 생리적 장애를 입게 된다.

이러한 光自家榮養에 의한 배양방법은 기내배양묘의 품질향상과 성장을 촉진하고 발근과 순화과정을 단축시키며 배지에 첨가되는 유기물과 성장조절제 및 糖의 농도를 줄일 수 있으며 큰 배양용기를 사용할 수 있고 자동화가 용이한 장점 등이 있다(Kozai et al., 1992). 이러한 효과를 얻고자 배양병에 membrane filter(MF)를 부착하여 기내 배양묘의 순화효과에 관한 연구보고가 이루어지고 있다.

Debergh와 Maene(1984)는 환경요인들이 배양중인 식물체의 성장과 발육, 형태형성에 영향을 미친다고 보고하였다. 조직배양에서 높은 상대습도는 잎의 형태학적 구조의 발달을 저해한다. 즉 외피 큐티클층의 왁스 형성(Fuchigami et al., 1981; Grout

and Aston, 1977), 기공의 기능(Brainerd and Fuchigami, 1981)과 기외조건으로 전환 후 식물체의 높은 치사율(Sutter and Langhans, 1979)에 관여한다. 몇몇 연구(Smith et al., 1990, 1992; Wardle et al., 1983)에 의하면 배양병내에 상대습도를 낮추는 것은 수분손실에 대한 저항력을 향상시켜 器外條件에서의 생존율을 높일 수 있다고 하였다. Kozai 등(1991)은 배양환경조절에 의해 광자가영양을 유도하여 조직배양할 경우 식물체의 성장과 발달, 기내 발근, 기내 순화의 촉진뿐만 아니라 더 높은 증식률을 얻을 수 있으며 식물체의 투명화 현상을 방지하고 물리적, 생리적, 영양학적인 환경에 덜 민감하다고 보고하였다.

조직배양묘의 기내환경에 관한 물리·화학적인 환경조절이 식물체의 성장에 미치는 영향에 관한 많은 연구가 이루어졌다. Kozai 등(1992)은 기내 감자 식물체의 성장과 초장에 있어서 PPF(photosynthetic photon flux density)와 광주기와 암주기간의 온도 차이(DIF)의 영향에 관하여 조사하였는데, 같은 PPF하에 식물체의 초장은 DIF 차이가 감소함에 따라 줄어들었고, 각각의 DIF 처리에서 가장 높은 PPF의 경우 초장이 감소되었으며, 식물체당 생체중, 건물중과 엽면적에 증가를 보였다. 농축 CO₂와 광자가배양조건하에서 기내 식물체의 초장은 식물체당 엽면적과 무게의 증가나 감소 없이도 DIF로 조절할 수 있다고 하였다.

Shim 등(2001)은 건전한 포도의 배양묘를 얻기 위한 기내 최적조건구명을 위해 높은 광도와 CO₂ 시용에 의한 미세환경조절을 실시한 결과, CO₂ 시용과 더불어 PPF가 140 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 인 광혼합영양배양조건에서 생체중과 건물중이 가장 많이 증가하였으며, 엽면적은 광독립영양배양 조건에서 현저히 증가하였다고 하였다. Kozai 등(1987)은 스타티스에서 소식물체를 보통보다 높은 PPF 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 증식하였는데, 초기배양 당시 CO₂ 농도를 950 ppm으로 유지하였으나, CO₂ 농도는 매일 저하되어 시험 개시 후 50일째에는 200-400 ppm까지 낮아졌다고 하여 소식물체가 광혼합영양적으로 성장한 결과라고 하였으며, 소식물체의 생장은 CO₂ 시용과 높은 PPF에 따라 촉진된다고 하였다.

상대습도에 관한 연구로 Tanaka 등(1992)은 배양용기 내에 상대습도와 기내 배양된 감자 소식물체의 증산에 관한 잎 뒷면의 저항성 증가는 正의 상관관계에 있다고 하였다. Kozai 등(1993)은 기내 감자 소식물체의 성장에 있어 배양용기 내 상대습도의 영향에 관해 조사하였는데, 식물체의 초장은 배양 8일정도의 초기 상대습도가 감소할수록 줄어들었으며, 가장 작은 초장 35 mm는 가장 낮은 상대습도 처리구에서 관

찰되었고, 가장 긴 초장 52 mm는 대조구였다. 소식물체의 건물중에 큰 감소없이 다소 상대습도가 낮은 처리구에서 미세번식된 짧고 왕성한 이식묘가 얻어진다고 하였다.

한편 최근에는 LED 등 인공광원으로 건전묘 생산에 대한 연구가 보고되고 있다. LED는 칼륨, 알루미늄, 비소, 인 등의 III-V속 원소 및 아연, 카드뮴, 세렌 등의 II-IV속 원소의 화합물 반도체를 주요 재료로 하는 발광소자로서, LED는 螢光램프와 metal halide 램프의 일반적인 광원과 비교할 때 조직배양과 같은 밀폐된 생태계에서 식물생산에 있어 유용한 광원이다. 또한 LED는 放射스펙트럼 폭이 비교적 좁은 單色光을 조사할 수 있는 특징이 있으며 광선중에 熱線을 포함하지 않고 램프가 소형경량이고 수명이 극히 길기 때문에 식물재배용 광원으로 이용하기 쉬운 특징을 가지고 있다(Watanabe et al. 1996).

따라서 전력소비가 적고 광합성능을 높일 수 있는 광원을 찾아서 식물체에 적용시켜야 하는데 LED가 그 중 하나라고 볼 수 있으며 상업적 농작물 생산장치에 LED를 기초로 한 식물 發光시스템에 관한 연구는 꾸준히 이루어지고 있다(Okamoto and Yanagi, 1994; Yangi and Okamoto 1994). 그러나 LED를 이용한 조직배양체의 생장 및 형태형성에 관한 연구는 그다지 많지 않다(Tanaka, 1999).

본 실험에서는 배양종묘의 器內馴化를 유도하고자 광자가영양배양을 위한 membrane filter 부착효과와 LED를 사용한 赤色, 靑色光 및 적색과 청색의 混合光에서의 기내 고구마 培養苗의 각종 성장상태를 기존의 형광등과 비교 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 기내 순화에 미치는 배양조건

1) 공시재료

정단분열조직배양 유래 고구마 품종 '율미'와 '자미' 유식물체를 이용하여 기내에서 30일간 배양한 소식물체의 마디를 1마디씩 잘라 배양재료로 사용하였다.

2) 배지조성 및 배양조건

배지는 MS 기본배지에 NAA 0.1 mg/L를 첨가하고 한천 0.9%로 조정하였다. 배양병당 9개체씩 3반복처리하였고 직경 1cm크기의 구멍이 3개 뚫여있는 플라스틱 뚜껑에 membrane filter를 부착한 것(1개 또는 3개)과 부착하지 않은 것, sucrose의 농도를 0, 3, 6% 등으로 구분하여 배양하였다.

3) 배양환경

배양환경은 25℃ 또는 28℃ 성장상에서 PPFD 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 광조건으로 1일 16시간 광, 8시간 암상태에서 30일간 배양하였다. 光源은 分光 특이성이 赤色 673nm, 青色 442nm인 과장영역에서 光合成有效光量子流入密度(PPFD)가 최대치를 나타내는 적색, 청색 및 적색(80%)+청색(20%) LEDs를 사용하였으며(Fig. 7), 대조구는 일반 형광등을 사용하였고 이들 광원의 PPFD는 75 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 조정하여 배양하였다.

4) 성장량 조사

성장반응은 배양 30일 후 배양병당 평균치에 해당하는 개체를 4개씩을 선발하여 초장, 근장, 마디수, 엽면적, 엽록소 함량, 莖葉과 뿌리의 생체중 및 건물중을 비교하였다. 통계처리는 Window용 SAS 6.12 version을 이용하였다.

5) 엽록소 함량 측정

배양묘의 잎절편 시료 100 mg당 10 mL DMSO를 첨가하고 65℃ 수조에서 30분간 엽록소를 추출하였고 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하여 제4절의 실험방법에서와 같이 엽록소의 함량을 算出하였다.

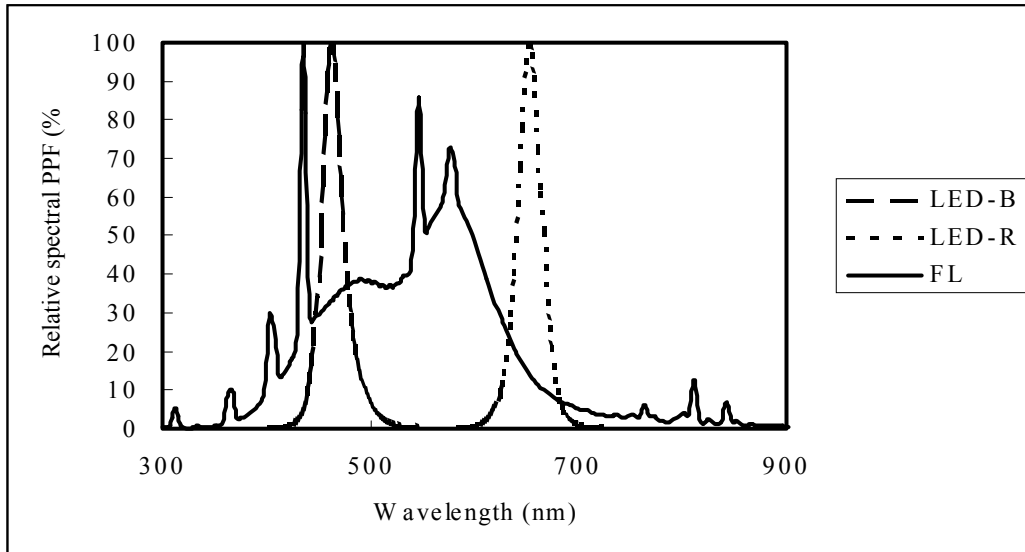


Fig. 7. Comparison of relative spectral photon flux for blue(LED-B), red(LED-R) and fluorescent lamp(FL).

3. 결과 및 고찰

가. Membrane filter (MF)의 부착 효과

1) Sucrose-free 배지에서 MF 부착 효과

Sucrose를 첨가하지 않은 MS기본배지에 0.1 mg/L NAA를 첨가하고 MF를 한 개 또는 3개 부착(광독립영양조건) 또는 미부착(대조구)하여 마디배양한 후 액아 성장량을 배양 30일 후에 조사하였다(Table 17).

탄소원으로 3% sucrose가 첨가된 배지에서와 달리 sucrose-free 배지에서의 액아 신초의 생장은 배양 30일까지 거의 성장되지 않았으나, 뿌리발달에는 차이를 보여 MF 한 개가 부착된 처리구에서 11.3 cm로 뿌리가 신장했으며, MF 미부착구에서는 1.4 cm로 뿌리의 생육이 현저하게 저조하였다. 절간수는 MF 한 개가 부착된 배지에서 3.3개로 가장 좋았으며 엽면적에 있어서도 6.4 cm²로 가장 좋은 반응을 보였다. 전반적으로 sucrose-free 배지의 경우 생장이 매우 저조하여 MF의 부착 여부에 따른 유의성은 인정되나, MF 부착 효과는 기대하기 어려웠다.

Table 17. Effects of membrane filter on the growth of plantlets regenerated on sucrose-free MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Treat.	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (mg)	
					Shoot	Root	Shoot	Root
MF ^{-z}	0.3 b	1.4 c	1.8 c	2.9 c	0.1 b	0.00 b	4.4 b	0.1 c
MF+(1)	0.4 a	11.3 a	3.3 a	6.4 a	0.2 a	0.03 a	13.3 a	2.4 a
MF+(3)	0.4 a	6.5 b	2.4 b	4.3 b	0.1 b	0.02 a	8.9 ab	1.3 b

^zMF means membrane filter; MF⁻, without membrane filter, MF+(1), with 1 sheet of membrane filter, MF+(3), with 3 sheets of membrane filter on the lid.

2) 3% sucrose가 포함된 MS배지에서 MF의 효과

MS기본배지에 3% sucrose를 첨가하고 MF를 한개 또는 3개 부착(광독립영양조건) 또는 미부착(대조구)하여 pH 4.8, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 16시간 광주기로 28°C에서 마디배양한 후 액아의 生長量を 배양 30일 후에 조사하였다(Table 18).

신초의 생장에 있어서 MF 미부착구에서 6.5 cm로 MF를 한 개 또는 3개 부착구에 비해 초장이 길었으며, 뿌리 길이에 있어서는 MF 미부착구에서 가장 작았고 뿌리 생체중 또한 가장 적게 나타났다(Fig. 8). MF 3개 부착된 배지에서 뿌리의 길이와 생체중이 가장 좋았다. 절간수에 있어서 MF 미부착된 배지에서 9.6개로 많았고, 엽면적은 13.2cm²로 가장 적었다. MF 3개가 부착된 배지에서는 28.1cm²로 미부착구에 비해 2배정도 컸으며, 신초의 생체중 또한 1.2g으로 처리구중 가장 무거웠다. 신초와 뿌리의 건물률에 있어서 MF 3개 부착구에서 각각 9.7%, 11.7%로 가장 높았다. 전반적인 성장을 볼 때 MF 미부착 배지에서 초장과 절간수가 MF 3개 부착구보다 2배정도 크거나 많았지만, MF 3개 부착구에서 뿌리의 길이, 엽면적, 생체중과 근중에서 우수하였고, 기내 배양묘를 순화하는데 필요한 시간이 짧고, 포장에서의 활착과 생존율이 가장 좋았다.

Table 18. Effects of membrane filter on the growth of plantlets regenerated on MS medium containing 3% sucrose after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Treat.	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Dry weight (mg)		Ratio of dry matter	
			Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root
MF-	9.6 a	13.2 b	1.0 b	0.1 b	73.3 c	13.5 b	7.5 c	11.5 a
MF+(1)	6.4 b	14.8 b	0.7 c	0.1 b	55.8 b	12.8 b	8.1 b	9.8 b
MF+(3)	7.3 b	28.1 a	1.2 a	0.3 a	115.0 a	32.9 a	9.7 a	11.7 a

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

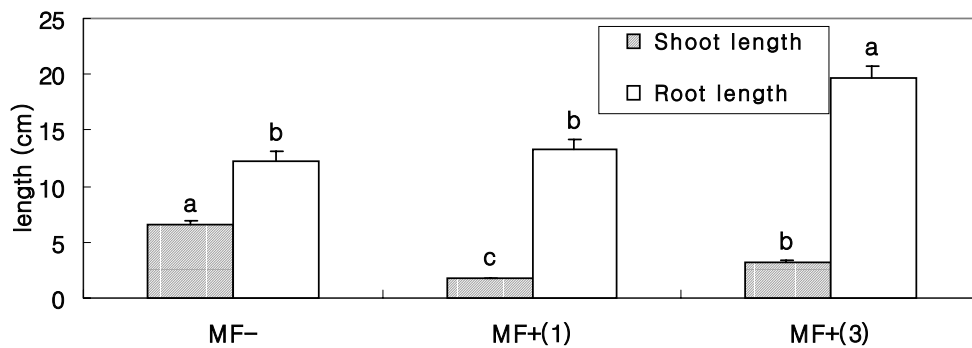


Fig. 8. Effects of membrane filter on the growth of plantlets regenerated on MS medium containing 3% sucrose after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'.

3) 6% sucrose가 포함된 MS배지에서 MF의 부착 효과

MS기본배지에 6% sucrose를 첨가하고 MF를 한 개 또는 3개 부착하거나 미부착(대조구)하여 pH 4.8, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 16시간 광주기로 28℃에서 마디배양한 후 액아 성장량을 배양 30일 후에 조사하였다(Table 19).

초장에 있어서 MF 미부착구에서 11.2 cm로 MF 1개 부착구에 비해 3배정도 길었으며, MF 3개 부착된 배지보다는 8배정도 초장이 길어 6% sucrose 첨가된 배지의 경우 MF를 부착 시 초장에 차이가 큼을 알 수 있었다. 뿌리 길이에 있어서는 MF의 차이를 거의 볼 수 없었으며, 절간수에 있어서 MF 미부착구에서 12.2개로 가장 많았다.

엽면적, 신초와 뿌리의 생체중과 건물중에 있어서도 MF 미부착구에서 좋은 결과를 보였다. MF 3개 부착구는 초장이 1.4 cm로 매우 작은 반면 건물률에 있어서 가장 높은 비율을 보였다.

전반적으로 6% sucrose 첨가배지에서 MF 미부착구에서의 좋은 성장반응의 결과를 얻었고 기내 번식을 목적으로 할 경우에 가장 적합한 것으로 나타났으며, 기외 순화를 목적으로 할 경우 6% sucrose에 MF 한 개가 부착된 배지에서 활착과 생존율이 높았다. 앞 실험 결과와 비교하여 볼 때 기외 순화용으로는 3% sucrose에 MF 3개 부착구와 6% sucrose에 MF 한개 부착구간에 뚜렷한 차이는 보이지 않아 sucrose 함량이 낮은 3% 처리구에 MF 3개를 부착하여 배양하는 것이 좋다고 판단되었다.

Table 19. Effects of membrane filter on the growth of plantlets regenerated on MS medium containing 6% sucrose after 30 days in single-node derived from meristem culture of sweet potato cv. 'Yulmi'

Treat.	Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. of node	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g)		Ratio of dry matter	
					Shoot	Root	Shoot	Root
MF-	11.2 a	17.0 a	12.2 a	28.8 a	1.9 a	0.3 a	9.3 b	13.3 b
MF+(1)	3.6 b	18.8 a	8.3 b	25.4 b	1.2 b	0.3 a	9.8 b	12.0 ab
MF+(3)	1.4 c	17.2 a	5.8 c	18.3 c	0.8 c	0.3 a	14.6 a	14.0a

Values represent the mean. Numbers followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

식물조직배양에서 있어서 종래의 배양기내의 소식물체는 광합성 능력을 거의 가지고 있지 않기 때문에 종속영양적 성장을 위하여 탄소원으로 糖의 첨가가 필수적이었다. 종속영양조건하에서 식물의 생장은 배지조성, 식물생장조절물질 및 온도가 중요한 환경요인이기 때문에 배양묘의 생산에 있어서 비용이 많이 들었고 함수량이 높으며 광합성 능력이 저하되어 배양묘의 순화기간 동안 생존율이 저하되는 문제점이 있었다.

그러나 최근 기내의 광도나 CO₂ 농도를 높여준 소식물체의 경우 기외에서 생육된 식물체와 같은 광합성속도를 나타내었고(Kozai et al., 1987), 기내 소식물체의 광합성을 촉진시켜줄 경우 배지내에 당류를 첨가하지 않는 광독립영양(Kozai and Iwanami, 1988) 조건하에서 배양이 가능하였다. 이와 같이 소식물체가 광독립영양배양이 행하여 질 경우 순화기간이 짧고 정식 후의 생장이 촉진되며 순화기간 동안 배양묘의 고사율을 대폭 줄일 수 있는 잇점이 있다.

Kozai와 Iwanami(1988)는 카네이션의 기내 소식물체를 성분이 다른 배지를 이용한 광독립영양 및 혼합영양조건에서 PPFD를 각각 70, 210 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 달리하고 배지내의 탄소원으로 0~2% sucrose 상태에서 배양용기의 마개에 MF를 부착하거나 미부착하여 배양하였는데 소식물체의 최종 생체중은 배양기의 환기 횟수와 PPFD가 가장 높은 sucrose-free 배지에서 가장 높았고, 가장 낮은 생체중은 가장 낮은 환기횟수와 낮은 PPFD였다. 배양기내의 인위적인 환경변화는 기내 식물체의 성장량에 크게 영향함을 알 수 있었다. 감자의 경우 기내에서 유지되고 있는 소식물체의 마디를 잘라 배양하여 배양기내의 상대습도가 배양 소식물체의 성장 및 shoot 신장에 미치는 영향에 대한 연구에서 shoot 길이는 상대습도가 낮은 처리구 일수록 낮았고 가장 작은 shoot 길이는 가장 낮은 상대습도구에서 관찰되었다(Kozai et al., 1993)

본 실험에서 Kozai 등(1993)의 연구 결과와 유사한 결과를 얻었다. 즉 sucrose-free 배지에서 MF 부착구와 미부착구간에 뿌리길이에서는 차이가 있었으나 신초의 신장이 매우 저조하여 효과를 볼 수 없었으며, 당을 포함하는 MS배지에서 MF가 부착된 처리구에서 미부착구에 비하여 초장이 짧은 경향을 보였다. MF 미부착구의 경우 다소 함수율이 높아 순화과정에 많은 시간을 요구하였으나, MF 3매가 부착된 3% sucrose 처리구에서는 뿌리발생 및 뿌리 신장도 우수하였고 함수율이 낮아 순화에 필요한 시간과 경비를 줄일 수 있었다.

나. 光源別 고구마 배양묘의 生長量 비교

器內에서 배양된 고구마 품종 ‘紫美’의 배양묘를 한마디씩 절단하여 배양병당 9개 채씩 치상하여 螢光燈, 청색, 적색의 單色 LED와 적색(80%)과 청색(20%)의 혼합 LEDs 등 光質을 달리하여 25℃에서 30일동안 배양한 후 식물체의 生長량을 조사하였다.

조직배양실에서 일반적으로 이용하고 있는 형광등하에서 배양된 식물체의 生長량과 2가지 단색광의 다른 光質의 처리하에서 생육된 식물체는 광질에 따라 많은 차이를 보였는데 청색광하에서 배양된 식물체의 마디수는 6.4개로 대조구인 형광등하에서 배양된 식물체의 마디수 8.4개보다 2마디 정도가 작았으며, 유의성 검정에서 형광등과 적색광, 혼합광은 유의성이 없었으며 청색광과는 5%수준의 有意성이 인정되었고 청색광에서 처리의 효과가 가장 적었다(Fig. 9).

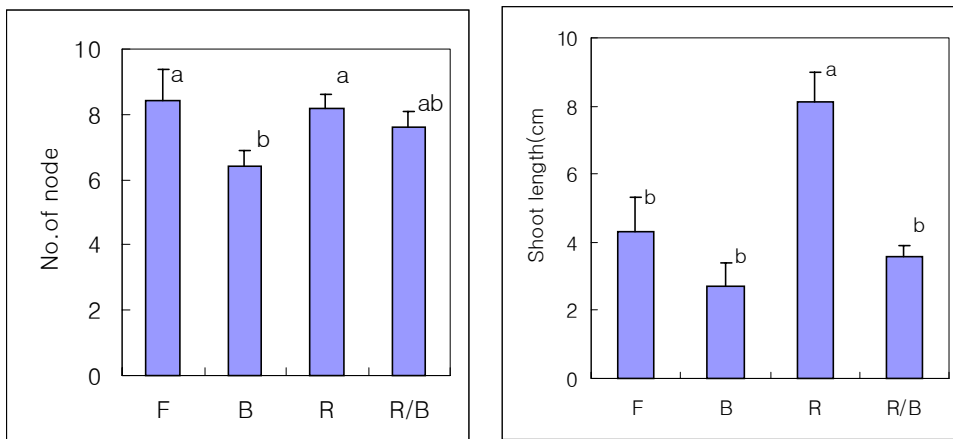


Fig. 9. Effects of fluorescent lamp and LEDs on number of node and shoot length of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F; fluorescent lamp, B; blue, R; red, and R/B; red(80%) plus blue(20%) LEDs. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

초장은 적색광하에서 배양된 식물체가 형광등하에서 배양된 식물체 길이 4.3 cm보다 2배 가까운 8.1 cm로 신장되었고, 가장 작은 것은 청색광하에서 배양된 식물체로 2.7 cm에 불과하여 적색광의 1/3밖에 자라지 않았으며, 유의성 검정에서 赤色光과 다른 광질의 처리간에 유의성이 있었으며, 마디수에서는 형광등과 비슷하였으나 절간신장 효과는 적색광에서 가장 크게 나타났다(Fig. 9).

뿌리길이는 혼합광하에서 배양된 식물체가 10.1 cm로 가장 작았으며 대조구인 형광등하에서 배양된 식물체의 뿌리길이가 22.7 cm로 가장 길었다. 줄기길이가 가장 길었던 赤色光은 뿌리의 생육에 있어서는 저조한 결과를 보였다. 유의성 검정에서 형광등과 청색광, 적색광은 유의성이 없었으나 혼합광과는 유의성이 있었다(Fig. 10).

식물체당 葉面積을 조사한 결과 대조구인 형광등보다 모두 작았으며 적색광은 대조구인 형광등의 1/2에 해당하는 10cm²에 불과 하였다. 유의성 검정에서는 형광등과 청색광, 혼합광은 유의성이 없었고 형광등과 적색광과는 유의성이 있었으며, 반면에 靑色光과 적색광과는 유의성이 없었다(Fig. 10).

식물체당 지상부와 지하부를 분리하여 生體重과 乾物重을 조사한 결과 shoot의 생체중이 가장 높은 것은 형광등하에서 배양된 식물체로 720.7 mg이었으며 가장 낮은 것은 청색광으로 435mg였는데 對照區를 제외한 다른 光質에서는 큰 차이가 없었다. 그러나 청색광과 적색광을 비교해 보면 줄기 길이에서는 3배의 차이를 보였으나 줄기

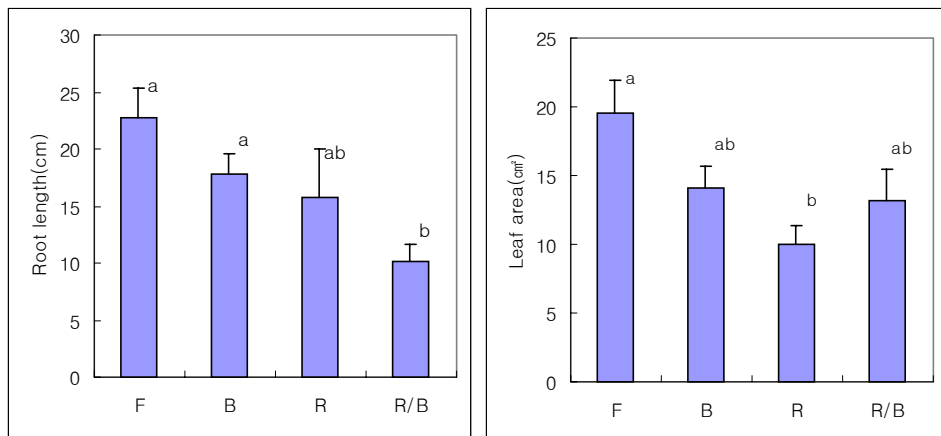


Fig. 10. Effects of fluorescent lamp and LEDs on root length and leaf area of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

생체중에서는 큰 차이를 보이지 않은 것으로 미루어 볼 때 적색광에서 성장된 식물체는 크게 徒長하여 묘의 소질이 연약하였음을 알 수 있었으며, 유의성 검정에서는 형광등과 다른 광질은 유의성이 있었으며 적색광과 청색광사이에는 유의성이 없었고 형광등에서 처리의 효과가 가장 컸다(Fig. 11).

뿌리의 生體重에서 뚜렷한 차이를 보인 것은 형광등과 혼합광이며 형광등의 뿌리 生體重은 284.7 mg이었으며 혼합광은 대조구인 형광등의 1/2에도 미치지 못한 124.9mg에 불과하였다. 반면에 청색광은 237.9 mg으로 대조구와 큰 차이를 보이지 않아 혼합광에 비해 뿌리의비대가 양호한 결과를 나타냈으며 유의성 검정에서는 형광등과 적색광은 유의성이 있었으나 형광등과 청색광, 청색광과 적색광, 적색광과 혼합광 사이에는 유의성이 없었고 처리의 효과는 형광등에서 가장 크게 나타났다(Fig. 11).

Shoot 건물중은 對照區인 형광등이 가장 높은 55.1mg이었으며 가장 낮은 것은 혼합광으로 대조구의 2/3에 불과한 36.5mg이었다. 유의성 검정에서 형광등과 적색광은 유의성이 없었으나 형광등과 청색광 및 혼합광 사이에는 유의성이 있었고 적색광과 청색광사이에는 유의성이 없었다. 줄기의 乾物重은 형광등에서 처리의 효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 12).

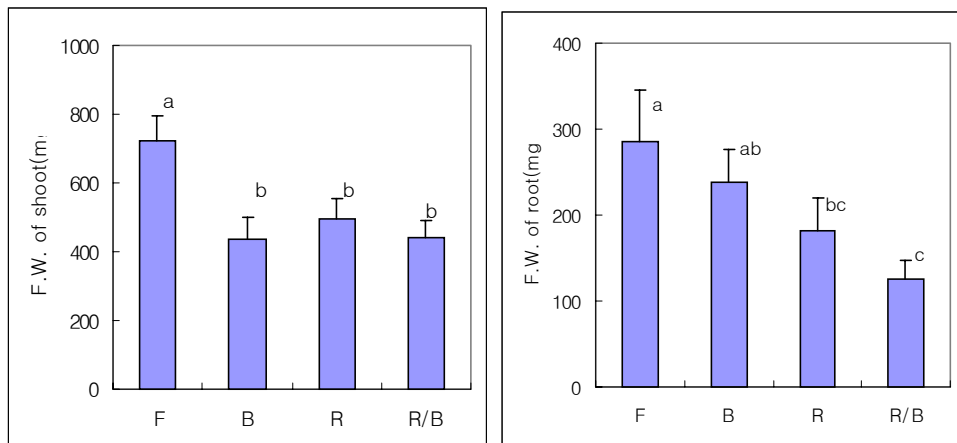


Fig. 11. Effects of fluorescent lamp and LEDs on fresh weight of shoot and root of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

뿌리의 乾物重은 대조구인 형광등이 23.5 mg이고 청색광이 24.5 mg으로 두 처리 간에 큰 차이가 없었지만 혼합광은 청색광의 1/2도 안되는 10.3 mg이었다. 유의성 검정에서도 청색광과 형광등은 유의성이 없이 처리의 효과가 좋았지만 적색광 및 혼합광과는 유의성이 인정되었다(Fig. 12).

Shoot의 乾物率에 있어서는 청색광과 적색광이 큰 차이가 없이 각각 9.0%, 8.8%이었으며 형광등에서 가장 낮게(7.5%) 나타났다. 뿌리의 건물률은 대조구와 적색광은 비슷한 반면에 청색광은 9%로 가장 높게 나타나 含水率은 청색광이 가장 낮았다.

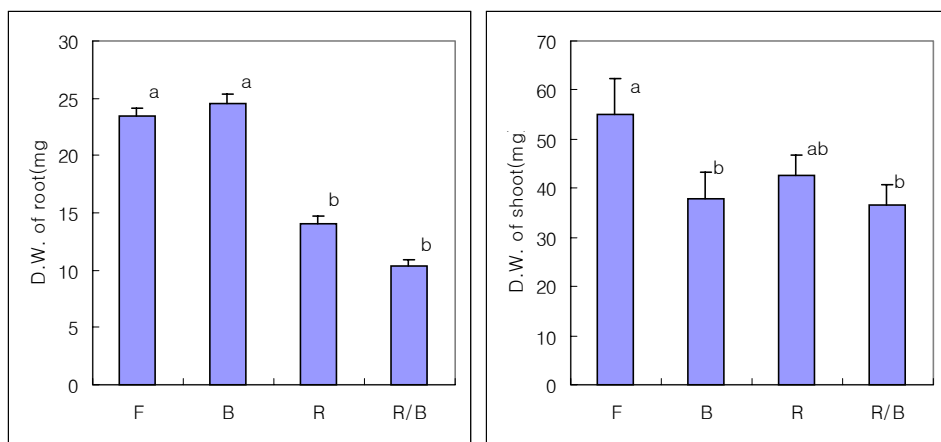


Fig. 12. Effects of fluorescent lamp and LEDs on dry weight of shoot and root of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

다. 光源別 membrane filter(MF)의 부착여부에 따른 培養苗의 生長量 비교

실험 I에서는 MF의 부착여부와 관계없이 광원별로 조사한 반면 실험 II에서는 식물체별 MF를 부착한 것과 부착하지 않은 배양병을 3개씩 똑같은 광질하에서 30일 동안 배양한 후 식물체의 성장량을 조사한 결과 MF의 부착여부 및 광질에 따라 큰 차이를 보였다.

對照區인 형광등과 단색광을 조사해 보았을 때 마디수는 MF를 부착하지 않은 것

은 적색광이 9.2개로 가장 많았으며 청색광이 7.1개로 가장 적었고 MF를 부착한 것은 형광등이 8.4개로 가장 많았으며 청색광이 5.6개로 가장 적었다. 같은 광질에서 비교를 해보면 형광등은 MF를 부착한 것과 부착하지 않은 것 모두 8.4개로 같아 차이가 없었으나 다른 광질에서는 MF를 부착한 것이 마디수가 적었는데 특히 赤色光은 필터를 부착한 것은 9.2개이고 필터를 부착하지 않은 것은 7.2개로 2마디 정도의 성장차를 보였다. 마디수에 대한 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우는 청색광에서만 유의성이 있었고 적색광에서 처리의 효과가 가장 크게 나타났으며 필터를 부착한 경우는 각 처리간에 유의성이 인정되었으며 螢光燈에서 처리의 효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 13).

Shoot의 길이는 MF를 부착하지 않았을 경우 적색광이 10.7 cm로 다른 광질인 청색광(3.2 cm), 형광등(3.6 cm)에 비하여 3배정도 더 신장하였으나 MF를 부착한 결과 적색광의 초장은 형광등 4.9 cm와 유사한 5.4 cm로 현저한 감소를 보였다. 같은 광질에서 비교를 해보면 형광등은 필터를 부착하지 않았을 경우 3.6 cm에서 필터를 부착한 경우 4.9 cm로 1 cm이상 더 신장된 것에 비하여 다른 光質에서는 오히려 shoot의 길이가 줄어들었다. 특히 적색광은 필터를 부착한 경우 1/2정도 줄기 길이가 작았다. 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우 적색광과 다른 광질은 유의성이 있으며 필터를 부착한 경우에는 적색광과 형광등은 유의성이 없이 효율적으로 반응하였으며 청색광 및 혼합광과는 유의성이 있었다(Fig. 13).

뿌리의 길이는 MF를 부착하지 않았을 경우 적색광이 17 cm로 가장 길었으며 혼합光이 7.6 cm로 가장 작았으나 MF를 부착한 결과 형광등이 31 cm로 가장 길었고 적색광은 형광등의 1/2에도 미치지 못하는 14 cm이었으며 혼합광은 13 cm로 가장 작았다. 같은 광질하에서 비교를 해보면 형광등과 청색광은 MF를 부착한 것이 필터를 부착하지 않은 것에 비하여 뿌리의 생육상태가 더 좋았으나 적색광은 오히려 필터를 부착하지 않은 경우 17 cm에서 필터를 부착한 경우 14 cm로 줄어드는 결과를 나타냈다. 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우 적색광과 다른 光質에서 유의성이 있었으며 적색광이 가장 효율적인 반응을 보였고 필터를 부착한 경우에는 각 처리간에 유의성이 있었으며 형광등의 효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 14).

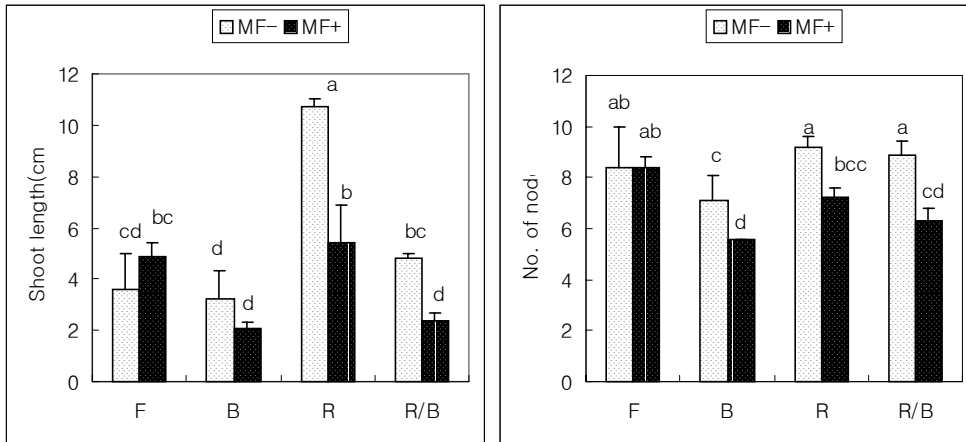


Fig. 13. Effects of fluorescent lamp and LEDs on number of node and shoot length of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. MF+; attached membrane filter, MF-; non-attached membrane filter. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

葉面積은 MF를 부착하지 않은 경우 청색광이 11.7 cm²로 가장 넓었으며 적색광은 5.3cm²로 청색광과 형광등(11cm²)의 1/2에도 미치지 못하였으나 혼합광은 형광등과 비슷하였다. MF를 부착한 경우에는 형광등이 28 cm²로 가장 넓었으며 적색광은 15 cm²로 가장 작았으나 형광등과 비교해 볼 때 1/2을 넘었고 청색광(16 cm²)과 비교해 볼 때는 거의 같았다. 같은 光質下에서 형광등은 MF를 부착한 것이 필터를 부착하지 않은 것에 비하여 2배이상 엽면적이 증가하였고 적색광도 3배정도 증가하였는데 필터를 부착하지 않았을 때 葉面積이 가장 넓었던 청색광은 필터를 부착한 후 엽면적 증가는 50%정도에 불과해 필터 부착 효과가 가장 적었다. 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우에는 적색광만 유의성이 있었으며 필터를 부착한 경우에는 형광등과 다른 光質에서 유의성이 인정되었고 형광등이 가장 효율적인 반응을 보였다(Fig. 14).

Shoot의 生體重을 조사해 볼 때 MF를 부착하지 않은 경우 형광등이 485 mg으로 가장 높았고 청색광이 401 mg으로 가장 낮았으며 MF를 부착한 경우에도 형광등이 957 mg으로 가장 높았으며 청색광은 MF를 부착하지 않았을 경우 형광등과 큰 차이가 없었으나 필터를 부착한 경우에는 형광등의 1/2에도 미치지 못한 469 mg에 불과하였고, 혼합광은 447 mg으로 가장 작았다.

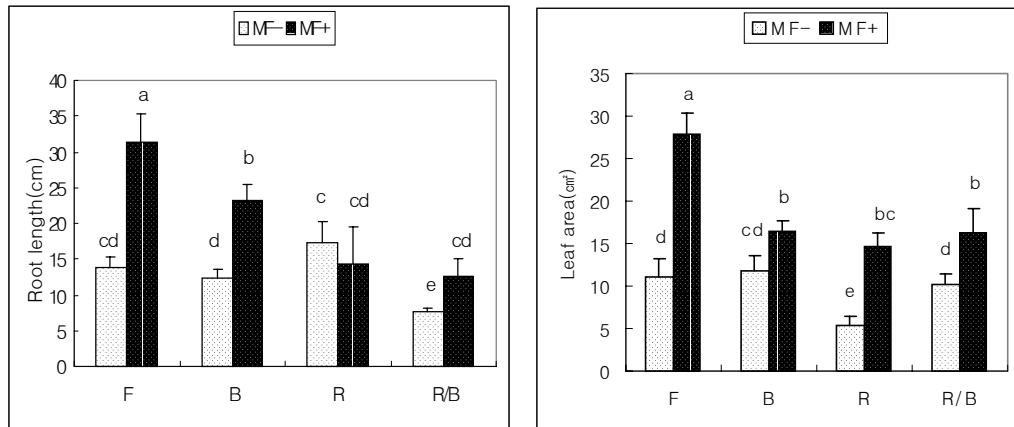


Fig. 14. Effects of fluorescent lamp and LEDs on root length and leaf area of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. MF+ and MF- are same as Fig. 13. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

같은 광질하에서 형광등은 MF를 부착한 경우 필터를 부착하지 않은 경우에 비하여 2배정도 生體重 증가를 보였으나 다른 광질에서는 큰 차이가 없었으며 특히 혼합광과 청색광에서는 필터의 부착 효과가 크지 않았다. 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우에는 각 처리간에 유의성이 없었으며 필터를 부착한 경우에는 형광등과 다른 광질에서는 유의성이 있었으며 형광등에서 효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 15).

뿌리의 生體重에서는 MF를 부착하지 않은 경우 청색광이 205.6 mg으로 가장 높았으며 혼합광이 120.9 mg으로 가장 낮았지만 큰 차이는 보이지 않았다. 그러나 MF를 사용한 경우 뿌리 생체중은 형광등이 412 mg으로 가장 높았으며 혼합광은 129 mg으로 형광등의 1/3에도 훨씬 미치지 못하였다. 같은 광질하에서 MF를 사용한 것과 필터를 사용하지 않은 것을 비교해 보면 형광등은 필터를 사용한 경우 대략 3배 정도의 증가치를 보였으나 적색광은 오히려 MF를 부착하지 않은 경우 198.7 mg에서 필터를 사용한 경우 166 mg으로 32 mg정도의 減少勢를 보였다. 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우에는 각 처리간에 유의성이 없었으며 필터를 부착한 경우에는 각 처리간에 유의성이 있었으며 형광등에서 효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 15).

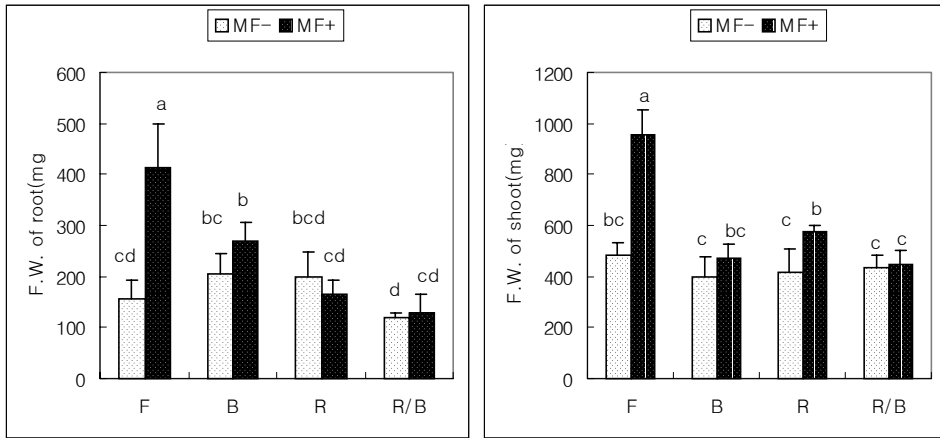


Fig. 15. Effects of fluorescent lamp and LEDs on fresh weight of shoot and root of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. MF+ and MF- are same as Fig. 13. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

줄기의 乾物重을 조사해 보면 MF를 사용하지 않은 경우 적색광이 35 mg으로 가장 높았고 청색광이 31 mg으로 가장 낮았지만 광질에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 MF를 부착한 경우 형광등이 77 mg으로 가장 높았고 혼합광은 39 mg으로 가장 낮았는데 필터를 사용하지 않은 것에 비하여 큰 차이를 보였다. 줄기의 乾物重을 같은 광질에서 비교해 보면 형광등은 필터를 부착한 경우 필터를 부착하지 않은 경우에 비하여 2배이상의 增加値를 보였으며 적색이나 靑色光에서도 50%이상의 증가치를 보였지만 혼합광은 큰 차이가 없었다. 유의성 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우에는 각 처리간에 유의성이 없었으며 필터를 부착한 경우에는 형광등과 다른 광질에서 유의성이 있었으며 적색광과 청색광은 유의성이 없었고 형광등에서 가장 효과가 크게 나타났다(Fig. 16).

뿌리의 乾物重을 조사해 보면 MF를 부착하지 않은 경우 청색광이 19.9 mg으로 가장 높았고 혼합광이 9.3 mg으로 가장 낮았으나 MF를 부착한 경우에는 형광등이 35 mg으로 가장 높았으며 혼합광은 형광등의 1/3정도에 불과하였으며 적색광은 형광등의 1/2에도 훨씬 미치지 못한 14 mg이었다. 같은 광질에서 MF 부착여부에 따른 조사를 보면 형광등만이 3배에 가까운 증가치를 보였을 뿐 다른 光質에서는 큰 차이가 없었다. 有意性 검정에서 필터를 부착하지 않은 경우에는 靑色光과 다른 광질에

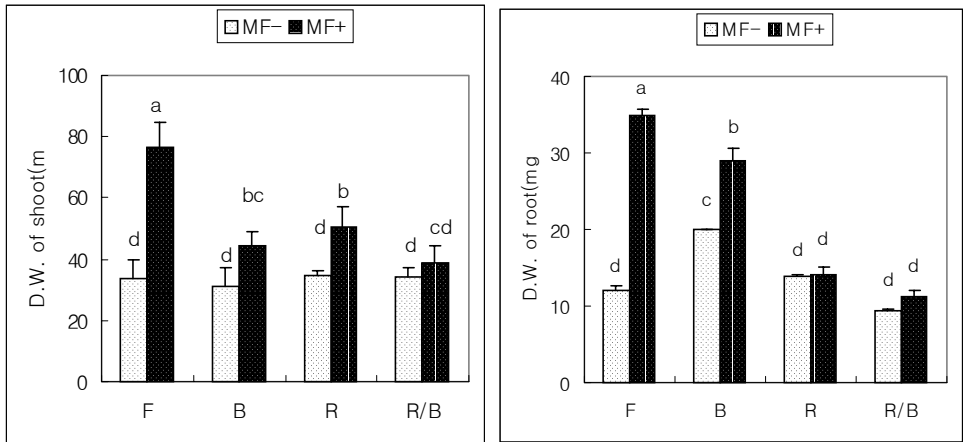


Fig. 16. Effects of fluorescent lamp and LEDs on dry weight of shoot and root of 30-day-old *in vitro* sweet potato seedlings. F, B, R, R/B are same as Fig. 9. MF+ and MF- are same as Fig. 13. Means separation within columns by DMRT at 5% level.

서 유의성을 나타냈으며 청색광에서 가장 효과가 크게 나타난 반면 필터를 부착한 경우에는 각 처리간에 유의성이 있었으며 형광등에서 효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 16).

줄기의 乾物率은 MF를 부착한 청색광에서 9.5%로 가장 높았으며 필터를 부착하지 않은 형광등이 6.9%로 가장 낮았고, 뿌리의 건물률은 MF를 사용한 청색광이 역시 11.1%로 가장 높았으며 필터를 사용하지 않은 적색광이 7.0%로 가장 낮았다.

이상과 같은 실험 결과는 다른 식물체의 실험 결과와 비교해 볼 때 유사한 결과가 나온 것을 알 수 있었는데, 상추에 대한 LED 실험에서 형광등과 白熱燈을 혼합하여 식물체를 21일 성장시킨 결과와 PPFD $325 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 적색광 LED에서의 실험결과와 비교하였을 때 생체중, 건물중, 엽면적, 줄기 길이 등이 큰 차이가 없어 LED광원의 식물생장에 이용가능성이 있음을 보고하였다(Bula et al., 1991).

본 실험에서는 고구마의 器內苗를 적색 및 청색의 단색광과 적색과 청색의 혼합광을 처리하여 MF를 부착하지 않은채 성장시킨 결과 청색광에서는 형광등에 비해 건전한 幼苗로 성장되었으나 적색광에서는 형광등에 비해 3배이상 초장이 길게 도장되어 묘의 상태가 불량하였지만 필터를 부착한 경우에는 형광등과 적색광이 큰 차이가 없었고 청색광과 혼합광에서는 형광등에 비해 1/2밖에 자라지 않았다. 또한 葉面積은

형광등 19.5 cm²와 비교할 때 청색광은 13.9 cm², 적색광은 10.2 cm²로 적색광에서 가장 적게 나타나 광질에 따라서 엽면적에 큰 차이를 보였다.

Yanagi 등(1996)이 실험재료로 상추를 사용하여 PPF_D를 85 μmol·m⁻²·s⁻¹와 170 μmol·m⁻²·s⁻¹으로 구분하여 적색과 청색의 단색광처리 또는 적색/청색의 혼합광을 처리하였는데 2가지 수준의 PPF_D와 무관하게 적색광에서 성장된 식물체가 청색광에서의 식물체보다 더 많은 잎을 발달시켰으나 靑色/赤色의 혼합광에서보다 적었다고 하였고 식물체의 잎 가장자리 말림현상은 청색광이 적색광에 비해 적었다고 하여 PPF_D 수준보다는 光質에 따라 식물체의 생장이 다르게 나타남을 보고하였다. 또한 줄기 신장은 적색광에서 가장 촉진되었다고 하여 본 실험의 고구마 幼苗와 비슷한 결과를 보였다.

*Eucalyptus*에서도 청색광은 줄기의 신장을 억제하고 적색광 및 적색과 청색의 혼합광에서는 현저하게 줄기의 신장을 촉진시켰다고 보고하였다(Tanaka, 1999). 또한 고추의 幼苗를 metal halide, 적색 LED/청색 fluorescent, 적색 LED, 적색 LED/근적외 LED로 구분한 광질 실험에서 적색광만을 처리한 경우는 적색광에 청색형광등을 첨가한 경우와 metal halide에 비해 식물체의 生長이 저조하였고, 적색 LED 또는 赤色 LED/近赤外 LED의 혼합광에서는 청색 형광등을 첨가한 램프에 비해서 잎의 수가 적었다고 하였는데 이것은 적색 LED에 다른 빛의 波長을 혼합할 경우 식물체의 生育이 단색광 처리보다 양호함을 알 수 있었다(Brown et al., 1995).

이것은 본 실험에서도 비슷한 결과를 나타내었는데 단색광으로서 적색 LED와 혼합광으로서 적색(80%)/청색(20%)을 비교해볼 때 적색광 단일처리에서는 식물체가 徒長되어 shoot 길이가 8.1 cm나 되어 식물체로서 이용가치가 적었지만 혼합광에서는 3.6 cm를 보여 식물체의 生育이 정상적임을 알 수 있었다.

4. 적 요

정단분열조직 유래 고구마 품종 ‘울미’ 기내묘의 순화효과를 구명하고자 마디배양시 광자가영양배양을 위한 membrane filter(MF) 부착과 발광다이오드(LED)를 사용한 赤色, 靑色光 및 적색과 청색의 혼합광에서의 기내 고구마 培養묘의 각종 성장상태를 기존의 형광등과 비교 조사하였다.

MF부착 여부와 관계없이 sucrose-free 배지에서의 신초의 생장은 배양 30일까지 거의 이루어지지 않았으나, 뿌리발달에는 차이를 보여 MF 한개가 부착된 처리구에서 현저하게 뿌리생장을 증진시켰다. 3% sucrose가 포함된 배지에서 신초의 생장은 MF 미부착구에서 초장, 절간수가 증가하였으며, MF 3개 부착된 배지에서 초장은 MF 미부착구보다 작았으나, 뿌리의 길이, 엽면적과 건물률에 있어서 더 좋은 반응을 보였다. 6% sucrose가 첨가된 MF 미부착구에서 초장과 절간수에 있어서 가장 좋은 반응을 보였으며, MF 1개 부착구에서 성장반응은 3% sucrose의 MF 3개 부착구와 유사한 성장반응을 보였다.

赤色 LED에서 성장한 식물체는 형광등과 다른 LEDs에서 성장된 식물체에 비하여 가장 긴 줄기신장과 가장 작은 葉面積을 보였다. Shoot길이는 청색광에서 2.7 cm, 赤色光에서 8.1 cm로 적색의 單色光에서 식물체가 도장되었으나, 적색/청색 혼합광에서 3.6 cm로 형광등의 4.3 cm와 비슷하였고 적색의 단색광보다 2배이상 짧았다. 적색 단색광에서 식물체가 徒長된 것에 비해 적색/청색의 混合光에서 식물체의 草長은 청색광의 영향을 받아 정상적인 식물체의 생육을 보여 적색과 청색의 혼합광이 식물체 생육에 적당하였다. 螢光燈에서의 葉面積은 19.5 cm²로 적색광에서의 10 cm²에 비하여 약 2배가 넓었으며 다른 처리구에 비하여 가장 넓게 나타났다. 한편 여러 가지 LEDs하에서 배양병의 容器뚜껑에 MF를 부착하거나 부착하지 않은 상태에서 식물체를 배양한 결과, 마디수와 식물체의 草長은 MF를 부착한 경우가 부착하지 않은 경우보다 작았다. 특히, 赤色光에서 큰 차이를 보여 MF를 부착하지 않은 경우 shoot길이는 10.7 cm였으나 부착한 경우 5.4 cm로 2배이상 감소하여 형광등의 4.9 cm와 비슷하였는데 MF처리가 적색 단색광에서의 식물체의 徒長을 현저하게 억제시켜 효과적이었다. 뿌리길이와 葉面積 역시 MF가 부착된 모든 LEDs에서 부착하지 않은 경우보다 높게 나타났다.

제 6 절 배양종묘의 재배, 경제성 조사 및 보급체계

1. 서 언

고구마는 전분, 당분, 비타민 및 無機鹽類가 다량 함유되어 있는 복합적인 식량자원으로 중요하여 NASA에서는 우주식품으로도 개발하고 있으며 당면, 순채소, 색소추출, 양조, 제과, 제빵, 음료 등 소비패턴이 다양하여 부가가치가 높은 가공산업이 발달하고 있다.

고구마 재배에 있어서 당년에 수확한 양질의 塊根을 선별하여 씨고구마용으로 1톤/ha의 고구마를 판매하지 못하고 저장하여야 하며 삼식용 종묘를 구입하는 경우에는 해마다 약간의 차이는 있으나 挿植苗 1개체당 20~30원이 소요되므로 種苗貸는 ha당 150만원내외가 요구된다. 또한 고구마와 같은 영양번식성 작물에 만연되고 있는 바이러스는 품질저하와 더불어 수량성 감소가 문제시되고 있다.

조직배양 특히 頂端分裂組織배양에 의한 무병주 생산체계는 50년대초부터 발표되기 시작하여 현재 유용한 식물의 급속 대량증식과 함께 무병주 육성 방법이 농업산업에서 유용하게 활용되는 분야이다.

일본에서는 1988년부터 식용품중에 帶狀粗皮症이라고 하는 virus병(SPFMV)이 발생하기 시작하여 1992년에는 전체 재배면적의 80% 정도의 발생률을 보여 심각한 문제로 되었는데 일본 鹿兒島縣 農業試驗場의 Ichi(1990)은 莖頂組織을 배양하여 virus-free묘를 생산하고 농가보급체계를 확립하였으며, 재배농가에 무병종묘를 보급하기 시작한 결과 품질과 수량을 향상시킬 수 있었고 포장재배시 바이러스가 재오염되므로 2~3년마다 배양묘로 교체하여야 한다고 보고하였다. 이와 같이 일본에서는 10여년전부터 무병주의 재배를 위한 조직배양방법이 실용화되어 식용 고구마의 95% 이상이 조직배양묘를 농가재배에 실제 활용하고 있는데, 일본의 鹿兒島縣 鹿屋市와 愛知縣 豊橋市에 소재하는 배양종묘회사인 (株)ベルデイ에서는 각종 배양종묘를 생산하고 있는데 고구마 배양묘도 120만본씩 생산하여 농가에 보급하고 있는 실정이었다.

최근 우리나라에서도 고구마의 바이러스 이병성 문제가 제기되면서 무병종묘의 육성과 농가보급체계의 확립이 요구되었다. 그러나 우리나라에서는 이 분야의 연구 필요성과 가능성만을 제기할 뿐 아직 실용화를 위한 구체적인 연구보고가 보고가 없으므로 매년 씨고구마를 저장고에 저장하고 이듬해 출아시켜 삼식하는 전통적인 번식에

만 의존하고 있다.

21세기 生物産業을 응용하는 첨단농업시대를 앞두고 육묘의 공정화, 영농구조의 분업화, 기업화, 자동화하는 추세에서 농민이 직접 대량의 씨고구마를 매년 저장하고 육묘하여 재배하여야 하고, 유전자원도 매년 포장에서 재배, 유지하여야 하는 구태의 연한 농법에서 탈피하고 첨단과학기술이 도입된 新 農法이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 조직배양에 의하여 육성된 無病株를 순화시켜 재배에 활용하여 기존의 貯藏種藪와 생육 및 수량성을 비교하며, 변이체의 발생, 무병종묘의 경제성, 농가에 보급하는 재배체계를 확립하므로서 농가소득 증대와 지역경제활성화에 기여하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. RAPD를 이용한 변이체 검정

1) 공시재료

본 실험에 사용된 식물체는 정단분열조직배양을 통해 대량 증식된 기내 식물체를 토양으로 순화시킨 후 이를 대상으로 실시하였다.

2) DNA 추출

식물 DNA 추출은 식물체의 잎을 液體窒素를 이용하여 곱게 간 후 100 mg을 1.5 mL의 tube에 취한 후 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 추출하였다.

3) RAPD 분석

RAPD에 사용한 primer는 UBC에서 제작한 10-mer random primer를 이용하였다. 고구마 식물체에 맞는 최적 primer의 선정을 위해 UBC 501-600번의 100개 primer를 이용하였으며, 최적 PCR 조건에서 3개 이상의 다형성을 가지는 21개의 primer를 선발하였다(Table 20). 선발된 primer를 이용하여 RAPD를 실시하였으며 이때 최적 PCR 조건은 95℃에서 3분간 변성반응을 거친 후 95℃에서 1분, 36℃에서 1분, 72℃에서 2분을 1cycle로 하여 45cycle을 반복한 다음 72℃에서 15분간 더 신장반응을 하였을 때 가장 좋은 결과를 나타냈다.

4) 전기영동에 의한 확인

PCR 반응이 끝난 뒤 생성된 PCR 産物은 1.5% agarose gel에서 50V로 전기영동하여 크기 별로 분리하였으며, 이후 EtBr염색을 하여 UV하에서 확인하였다.

Table 20. Primer selection for RAPD in sweet potato

Primer	Sequence	G+C content (%)
UBC-521	CCG CCC CAC T	80
UBC-522	TCG TCT AGC A	50
UBC-523	ACA GGC AGA C	60
UBC-524	CGG TTA CTA G	50
UBC-525	GCT GGT TGG A	60
UBC-526	AAC GGG CAC C	70
UBC-528	GGA TCT ATG C	50
UBC-530	AAT AAC CGC C	50
UBC-534	CAC CCC CTG C	80
UBC-535	CCA CCA ACA G	60
UBC-540	CGG ACC GCG T	80
UBC-546	CCC GCA GAG T	70
UBC-548	GTA CAT GGG C	60
UBC-551	GGA AGT CCA C	60
UBC-555	GTG AAC AGC A	50
UBC-556	ATG GAT GAC G	50
UBC-562	CAA AGT AGC C	50
UBC-566	CCA CAT GCG A	60
UBC-569	CGA ATT GCT G	50
UBC-571	GCG CGG CAC T	80
UBC-574	GCC AGA CAA G	60

나. 기내 종묘의 순화재배

기내 배양종묘의 器外 순화를 위하여 무병종묘가 증식되고 있는 배양병의 뚜껑을 배양실에서 5~7일간 열어둔 후 종묘를 뽑아 뿌리에 붙어있는 한천을 깨끗이 씻어내었고(Photo. 11-A), 재배온실에서 72공 plug묘관에 원예용 床土를 채우고, 뿌리가 붙어있는 채 심거나 5 cm내외로 잘라서 삽목방법으로 시험하였다(Photo. 11-B). 처음 3~5일간은 50% 차광망을 설치하였고, 栽植한 10일 후 생존율을 조사하였다.

다. 생육 및 수량성 조사

정단분열조직배양으로 육성한 고구마 품종 ‘울미’, ‘신황미’, ‘신천미’, ‘진홍미’의 무병 배양종묘와 2001년도 배양종묘에서 생산된 고구마, 그리고 원종사업소에서 유지, 증식하고 있는 종저용 고구마를 비교품종으로 하여 온실에서의 배양종묘와 저장종저와의 挿植苗 생산성 및 포장생육 특성을 농업기술원 원종사업소 시험포장에서 재배하였다.

묘상은 묘상터널, 중간하우스, 외부하우스인 3중비닐냉상으로 각각 10m²씩 설치하였고, 시비는 基肥로써 유기질 퇴 200kg과 複肥 8kg를 넣은 후 종저매치를 품종당 10kg씩 4개 품종을 3월 8일 매치하였다. 배양종묘는 4월 30일 순화처리된 종묘를 품종당 120본씩 묘상에 植栽하였으며, 묘상온도는 23~25℃가 유지되도록 기상여건에 따라 터널 및 비닐하우스를 여닫으며 조절하였다.

本圃는 배수가 양호한 砂壤土를 선정하였으며, 재배관리를 위하여 포장면적 10a에 유기질퇴비 3톤, 복비 80kg, 소석회 200kg 및 토양처리제를 살포 후 비닐멀칭을 하였다. 삽식은 수평식 90×25cm 간격으로 식재하였고, 포장관리는 충해방제 1회와 병해방제 1회, 제초작업 2회 등을 실시하였으며, 기타 관리요령은 고구마재배 표준관리법에 준하였다.

재배 중 무병 배양종묘의 성장반응을 조사하였으며, 저장종저와의 삽식묘 생산성 및 포장생육 특성, 수량성, 경제성 등을 조사하였다.

라. 경제성 조사

배양종묘의 생산단가를 구하였고, 무병주로 확인된 배양종묘를 육묘하여 삽식종묘를 생산하여 재배할 경우와 기존의 번식방법인 貯藏種諸를 육묘하여 재배하였을 때의 수량성 등으로 경제성을 분석하였다

3. 결과 및 고찰

가. RAPD를 이용한 변이체 검정

SPFMV의 이병이 확인된罹病株에서 절취해낸 생장점을 배양하여 바이러스 무병주를 획득하고 이 식물체를 母本으로 器內에서 대량으로 증식하는 과정에서 있을變異體의 발생 유무를 검정하기 위해 기내에서 대량 증식된 고구마 식물체를 토양으로 순화시킨 후 이를 대상으로 분자적 표지의 한 방법인 Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 분석을 실시하였다.

식물체는 ‘올미’와 ‘White Star’를 사용하여 실시하였으며, 식물체 DNA 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 추출하였다. RAPD에 사용한 primer는 UBC에서 제작한 10-mer random primer를 이용하였으며, 고구마 식물체의 유전 분석에 적합한 21개의 최적 primer를 선정하였고, 최적 PCR 조건은 95℃에서 3분간 變性反應을 거친 후 95℃에서 1분, 36℃에서 1분, 72℃에서 2분을 1cycle로 하여 45cycle을 반복한 다음 72℃에서 15분간 신장반응을 하였을 때 나타났다. RAPD 분석시 반응액에는 식물체 DNA(30 ng), primer(20 pmole), dNTP(2.5 mM), Taq DNA polymerase (2U)(bioneer)를 첨가하여 총 20 μ l가 되게 조제하여 PCR 반응을 하였다. 총 21개의 primer를 이용하여 분석한 결과 두 품종 모두 대량 증식된 식물체간에 변이체를 전혀 발견할 수 없었다(Photo. 12).

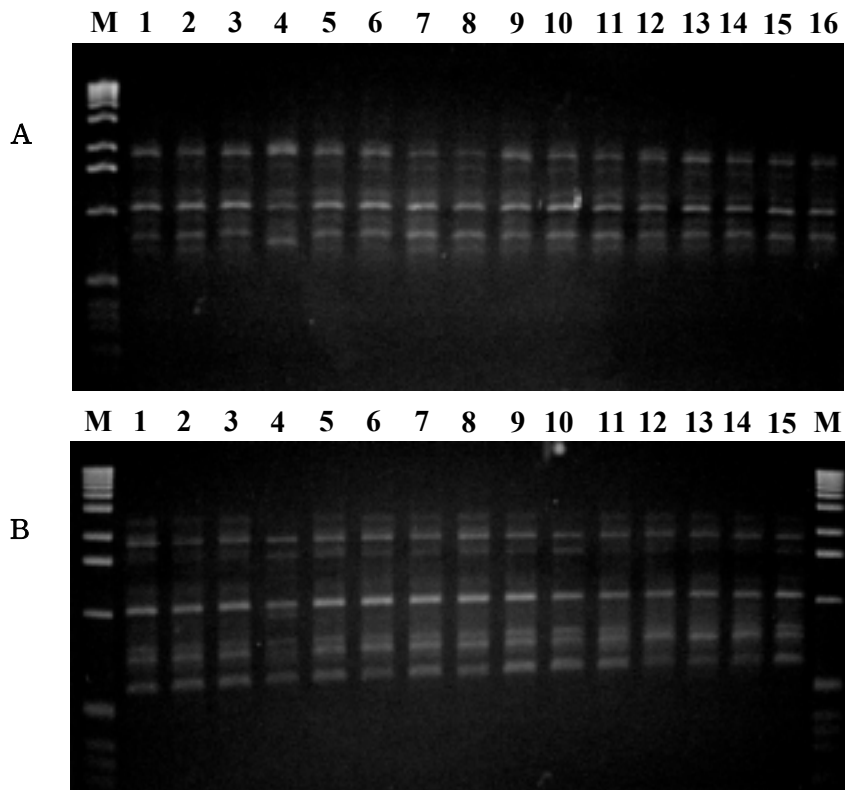


Photo. 12. Amplified DNA band profiles of the analyzed plants by UBC 523 random primers in sweet potato var. 'Yulmi' (A) and 'White Star' (B). Lanes M: 1 kbp DNA ladders, Lanes 1-16; nucleic acid extracted from randomly selected tissue culture raised sweet potato plants for testing somaclonal variation.

나. 기내 종묘의 순화재배

기내 배양종묘의 器外 순화를 위하여 배양병의 뚜껑을 배양실에서 5~7일간 열어 둔 후 종묘를 재배온실에서 원예용 상토를 채운 72공 plug묘판에 뿌리가 붙어있는 채 심거나 5 cm내외로 잘라서 삽목한 10일 후 生存率을 조사하였다(Table 21, Photo. 11-B, C).

뿌리를 붙인 채 심은 배양종묘는 품종 ‘베니아까’는 100% 생존하여 가장 높았고 ‘신천미’는 93.3%로 가장 낮았으며 평균 96.4%가 생존하였다. 뿌리를 자르고 삽목한 처리구는 ‘신천미’가 91.6%로 가장 높았고 ‘진홍미’는 85.7%의 생존율을 보였다. 그러나 기내증식을 위하여 외마디 배양한 30일 후의 초장이 10 cm 이상 성장하여 2~3개로 분할할 수 있으므로 대량증식을 위하여서는 삽목법을 하는 것이 효과적이라고 생각된다.

Table 21. Survival rate of transplanted plants with or without roots after 10 days acclimatization

Cultivar	Survival rate (%)	Survival rate (%)
	(No. of survival plant/ transplanted plant with roots)	(No. of survival plant/ transplanted plant without roots)
Shinhwangmi	96.3 (52/54)	91.6 (33/36)
Jinhongmi	95.8 (46/48)	85.7 (24/28)
Shincheonmi	93.3 (43/45)	88.8 (24/27)
Yulmi	96.4 (43/55)	86.7 (26/30)
Beniaka	100.0 (54/54)	91.4 (32/35)
Mean	96.4	88.8

나. 배양종묘와 저장종저와의 삽식묘 생산량 비교

묘상내의 육묘를 위하여 貯藏種諸는 100~300 g 규격의 종저를 3월 8일 매치하였으며 순화처리를 끝낸 배양종묘의 식재는 4월 30일로 육묘시기가 다른 관계로 육묘후 挿植苗 생산 조사 기준일을 각각 육묘 77일차에 실시하였다. 조사는 배양종묘 1주당, 저장종묘는 1개당 생산단위로 하고 1개의 삽식묘 절단기준은 기부 5 cm 이상부터 절간 5개 단위로 조사하였다. 조사성적은 배양종묘 중 ‘신허미’가 총 경장이 516 cm로서 다른 3개 品種에 비해 가장 길었으며 제일 작은 ‘신천미’ 보다는 216cm, ‘울미’, ‘진홍미’ 보다는 152~158cm로 19.4~72.0% 정도가 크게 성장하였으나 挿植苗 생산은 19.2개로 他 품종 보다 0.5~3.2개가 많은 0.5~20.0% 생산비율을 나타냄으로써 절간장이 길었음을 알 수 있었다(Table 22).

저장種蒔에서의 1개당 삽식묘 생산량은 ‘신황미’가 1본당 평균 19.2개로 타품종 보다 0.5~3.2개 정도 많았고, 莖數가 많고 절간장이 짧은 ‘신천미’는 25.6개로 타 품종에 비해 5.2~7.3개 많았다. 培養種蒔와 저장종저와의 삽식묘 생산량 비교에서는 ‘울미’와 ‘신황미’는 비슷하였으며 ‘진홍미’는 배양묘보다 저장종저가 3.8개 많았고 ‘신천미’는 배양묘 보다 저장종저의 생산량이 25.6개로 41.4%가 많은 월등한 수량차이를 보였는데 이는 ‘신천미’의 종저 특성상 莖數 발생량이 많았던 것으로 판단된다. 또한 저장종저는 저장양분이 충실한 괴근을 매치하여 육묘하기 때문에 배양종묘 보다 삽식묘의 수가 많은 것은 당연한 결과라고 생각된다.

배양종묘를 온실이나 하우스 안에서 육묘하거나 양액육묘장에서 육묘할 때 재식 후 약 30~40일이 경과하면 4~6개의 1회 채묘가 가능하며 그 후 7~10일이면 다시 채묘할 수 있다(Photo. 11-D). 이와 같은 방법으로 배양종묘 1주당 최고 65본의 채묘가 가능하였다. 고구마 재배는 3월 중·하순의 하우스 조기재배부터 6월 초·중순의 노지 만기재배까지 다양한 작형이 분화되어 있으므로 지속적인 채묘가 가능하다. 따라서 배양종묘를 이용하여 육묘하는 것은 농가에서 개인재배를 위한 자가육묘는 적합하지 않고 기업이나 전문적인 육묘업자가 활용하면서 육묘중 수시로 채묘하여 공급하는 체계가 적합하다고 판단된다.

Table 22. Production of vine cutting

Kind of seedling	Characters	Cultivar			
		Yuimi	Shinhwangmi	Shincheonmi	Jinhongmi
	Main vine length(cm)	134.8	198.8	132.2	137.5
	Total vine length(cm)	364.4	516	299.7	357.8
In vitro seedlings	No. of branch	4.1	3.2	4.0	3.9
	No. of node	34.6	37.5	41.3	30.5
	No. of cuttings produced	18.7	19.2	18.1	16.0
Tuberous root stored	No. of vine	10.0	10.1	16.0	9.5
	No. of cuttings produced	18.3	20.4	25.6	19.8

다. 배양종묘로부터 생산된 2차년도 생육특성

고구마 품종 ‘율미’의 5품종에 대하여 1차년도(2001년) 배양종묘로부터 수확한 저장종저와 당해년도(2002년) 배양종묘에서 생산한 삽식용 종묘를 재배하여 수확량을 비교 조사한 결과, 2차년도 즉 금년도의 생산량이 5 품종 모두 월등하게 수량이 증가되었는데 가장 적은 차이를 보인 ‘신천미’가 11.7%, 차이가 많은 품종은 ‘율미’로써 55.8%가增收되었다(Table 23). 이러한 생산량 차이는 포장조건과 기상적 여건이 생육에 부적합한 점이 있었기 때문에 단순비교 하기에는 적절하지 않다고 생각된다. 생육여건이 전년도와 동일하지 않았던 점으로 1차년도 포장은 堆壤土에 극심한 가뭄으로 인하여 생육이 불량하였으나 2차년도에는 토심이 깊은 사양토 포장이 선정되었고 適期의 강우로 생산량 증가에 상당한 영향이 있었다고 생각된다. 포장에서의 바이러스 病徵은 1차년도와 2차년도 모두 발견되지 않았으며 고구마 모양이 1차년도에는 토심이 얇고 가뭄관계로 방추형이 많았던 반면 2차년도에는 토심이 깊어 장방추형의 모양이 많았다.

Table 23. Comparison of tuberous root production (kg/10a)

	Cultivar					
	Yulmi	Shinhwangmi	Shincheonmi	Jinhonmi	Jami	Beniaka
First year(A)	2,862	3,395	3,341	3,288	3,652	2,897
Second year(B)	4,461	4,088	3,733	4,746	4,266	3,946
Amount of increase	1,599	693	392	1,458	614	1,049
B/A(%)	155.8	120.4	111.7	144.3	116.8	136.2

라. 무병종묘의 포장재배시 생육, 수량성 등 생육특성

무병종묘와 저장종저묘를 5월 23일 삽식하여 141일이 경과한 10월 17일 굴취시에 생육상황을 조사한 결과(Table 24, Photo. 11-E), 배양종묘에서 主莖長과 總莖長, 主莖節數는 ‘신황미’가 제일 많았으며 특히 총 경장은 1,468cm로 다른 품종 대비 29.3~49.6%정도가 더 성장하였다. 分枝數는 ‘신천미’가 9.9개로 他 품종 보다 3개정도 발생이 더 되었으며 貯藏種諸 역시 품종간에 약간의 차이는 있었지만 배양종묘와의 뚜렷한 차이점이 없이 대동소이한 품종특성을 유지하였다.

Table 24. Plant growth response according to cultivars in field

Kind of seedling	Characters	Cultivar			
		Yulmi	Shinhwangmi	Shincheonmi	Jinhongmi
Virus-free stock	Main vine length (cm)	215.2	311.0	185.5	231.2
	Total vine length (cm)	980.8	1,468.0	1,004.0	1,135.0
	No. of branch	6.5	6.6	9.9	6.8
	No. of node on main vine	57.6	61.4	51.8	52.7
Storage-root seedlings	Main vine length (cm)	227.8	306.0	183.2	228.0
	Total vine length (cm)	1,029.0	1,353.0	975.0	1,094.0
	No. of branch	6.9	6.3	10.5	6.8
	No. of node on main vine	58.4	61.5	50.9	55.8

무병종묘와 대조구로 기존의 저장종저에서 생산된 삽식묘를 재배하여 품종별 10a 당 수량성을 조사한 결과 無病種苗에서 ‘율미’와 ‘진홍미’는 9%내외의 증수를 보였으나 ‘신황미’와 ‘신천미’는 대조구와 큰 차이가 나타나지 않았다(Table 25).

이와 같은 결과는 本圃에서 재배 중 발생하는 외관적인 바이러스 병징이나 형태적인 이상이 뚜렷하게 관찰할 수 없었던 바와 같이 본 연구의 시험기관인 원종사업소에서 유지·증식하고 있는 母品種이 바이러스에 별로 罹病되지 않은 우량 종저를 사용한 것이 주된 요인이었다고 생각된다. 그러나 수확한 고구마의 외관적인 특성에서 기존의 種譜에서는 표피에 粗皮症이 나타나는 것을 일부에서 발견할 수 있었다(Photo. 11-F).

마. 무병종묘의 농가재배실태 및 경제성 분석

무병종묘를 익산시 2농가에 ‘신황미’와 ‘신천미’를 공급하여 육묘 후 삽식토록 하고 완주군 2농가에는 ‘신황미’와 ‘율미’ 삽식묘를 공급, 본포에 식재하도록 하고 재배 후 호응도를 조사하였던 바 본포에서의 생육이 양호하고 바이러스병징이 전혀 발견되지 않아 농가반응이 좋았다. 단, 무병종묘를 공급한 농가에서 처음 육묘과정의 순화처리

Table 25. Tuberous root production according to cultivars (kg/10a)

Kind of seedlings	Amount of harvest	Cultivar			
		Yulmi	Shinhwangmi	Shincheonmi	Jinhongmi
Virus-free stocks	Production	4,798	3,989	3,748	4,888
	Index	109.5	97.7	100.4	108.7
Storage tuberous root seedlings	Production	4,381	4,080	3,733	4,497
	Index	100	100	100	100

미흡으로 인하여 활착률이 떨어짐에 따라 육묘기술의 병행 보급이 요구되었다. 또한 무병종묘가 농가에 공급되기 위해서는 경제성이 요구되므로 현재 농가에서 종묘용 삽수를 확보하는 방법을 조사하였던 바 많은 농가에서 自家育苗하는 것 보다 삽식묘 공급업자로부터 구입하여 재배하고 있었다. 본포 10a당 육묘비용은 133,266원 이었으며 삽수 구입가격은 1本當 조기 재배용이 2002년도 30~35원, 보통기 재배용 28원, 만기 재배용 18원 정도로 주된 거래가격 28원을 적용하였을 때 10a당(6,550주) 구입비용은 183,400원으로 자가육묘하는 것 보다 37.6%가 더 소요되는 것으로 조사되었다(Table 26). 따라서 본 연구결과 도출된 무병종묘를 시험연구기관, 기업인, 혹은 독농가에서 생산하여 농가에 보급하는 체계를 보다 구체적이고 실제적인 측면에서 접근하는 것이 요청되었다.

Table 26. Cost of vine cuttings required (unit: Won/10a)

Kind of seedling	Seedling	Fertilizer	Labor	Facilities	Agri-machine	Total
Self-raising seedlings (A)	83,419	3,424	39,558	6,343	522	133,266
Purchasing cuttings (B)	183,400					183,400
B/A(%)						137.6

무병종묘를 묘상에서 육묘하여 삼식용 종묘를 생산할 수 있는 본수는 품종별로 약간의 차이는 있으나 평균 18본을 얻을 수 있었다. 따라서 10a당 소요되는 무병종묘의 본수는 평균 366本 이었으며 種諸貸와 비교, 환산할 경우 1본당 가격은 228원으로 조사되었다(Table 27). 따라서 무병종묘 공급은 자가육묘 종저대와 비교하여 1본당 228원 이내에서 경제성이 있어야 농가공급이 가능하다고 판단된다.

본 연구에서 무병종묘를 생산하는데 요구되는 가격을 계산하고자 하였던 바 Table 28에서와 같이 계산할 수 있었다. 여기에서는 일단 무병종묘를 육성한 후 이것을 기본종묘로 하여 외마디배양법으로 증식하는 경우로 하였고, 계대배양 30일간의 소요경비로 계산하였다. MS배지 10 L를 조제하는데 소요되는 경비로 계산하였고 노동력은 전체 경비의 60%로 하였다. 배양병 1개에는 배지가 125 mL씩 분주할 수 있으므로 총 10 L의 배지는 80병의 배지를 조제할 수 있고 배양병 1개에는 12개의 외마디 치상이 강하다. 따라서 배양병 80개에서는 총 960개의 배양묘를 생산할 수 있다. 무병종묘 계대배양하여 1주를 생산하는 단가는 110,000원/960 = 115원 으로 산출된다. 이것은 배양종묘의 단가가 최소 228원이면 경제성이 있다고 평가된 가격의 반 가격으로 생산이 가능하고, 이윤을 포함하여 150원에 공급한다고 하더라도 충분한 경제성이 있다고 평가할 수 있다.

한편 수량성에서 품종 ‘율미’와 ‘진홍미’는 무병종묘가 저장종묘 보다 약 9%의 증수효과를 보았으므로(Table 25) 경제성을 비교하면 4,000,000원/ha의 소득증대 효과가 있었다고 평가된다.

Table 27. Comparison unit cost of virus-free seedlings

Classification	Cultivar				Mean
	Yulmi	Shinhwangmi	Shincheonmi	Jinhongmi	
Cutting production per plant	18.7	19.2	18.1	16.0	18.0
Required cuttings per 10a	351	342	362	409	366
Comparison unit cost	228 Won (storage root cost, 83,419 Won ÷ required cuttings per 10a, 366 cutings)				

Table 28. Estimated value for propagation of virus-free seedlings on 10 L MS media

Item	Price	For 10 L MS medium		Remarks
		Quantity	Amount(₩)	
MS basic medium	₩120,000/50L	10 L	24,000	Sigma
Sugar	₩3,000/3kg	600 g	600	Samyang
Agar	₩60,000/kg	80 g	4,800	Junsei
NAA	₩50,000/25g	1 mg	100	"
Electric charges		200 kW	20,000	30 days
Others(D.W., mess, EtOH etc.)			3,000	
Labor			57,500	60% of above
Total			110,000	

바. 무병종묘 농가 보급체계

無病種苗의 농가보급을 체계화하기 위하여서는 무병주의 재배가 품질이나 수량성에서 우수함을 홍보하고, 필요성의 인식을 위한 농가교육과 함께 경제성 확보가 되어야 할 것이다. 무병한 培養種苗의 유지 및 증식에는 특수한 시설과 기술 등 기본적인 경비가 요구되므로 농가 공급체계가 정착되기 전까지는 연구기관이나 농업기술센터 등에서 무병주를 육성, 증식하여 농가에 공급하다가 수요증가에 따른 시장성이 형성된 후에는 시설을 갖춘 법인이나 농민단체, 일반기업체 등이 참여할 수 있도록 유도하여 시장기능에 의해 공급체계가 이루어지도록 해야 할 것으로 생각된다.

4. 적 요

고구마 품종 ‘율미’와 ‘White Star’ 두 품종에서 SPFMV의 이병이 확인된 罹病株

에서 절취해낸 생장점을 배양하여 바이러스 무병주를 획득하고 이 식물체를 母本으로 器內에서 대량으로 증식하는 과정에서 있을 變異體의 발생 유무를 검정하기 위해 器內에서 대량 증식된 고구마 식물체를 토양으로 순화시킨 후 이를 대상으로 분자적 표지의 한 방법인 RAPD 분석을 실시하였다. 총 21개의 primer를 이용하여 분석한 결과, 두 품종 모두 대량 증식된 식물체간에 변이체를 전혀 발견할 수 없었다.

순화실험에서 뿌리를 붙인 채 심은 배양종묘는 품종 ‘베니아까’는 100% 생존하여 가장 높았고 ‘신천미’는 93.3%로 가장 낮았으며 평균 96.4%가 생존하였다. 뿌리를 자르고 삼목한 처리구는 ‘신천미’가 91.6%로 가장 높았고 ‘진홍미’는 85.7%의 생존율을 보였다.

배양종묘와 저장종저와의 삼식묘 생산량은 배양종묘중에서는 ‘신황미’가 1본당 평균 19.2개로 타품종 보다 0.5~3.2개 정도 많았고, 저장종저에서는 ‘신천미’가 25.6개로 다른 품종에 비해 5.2~7.3개가 많았다. 또한 배양종묘와 저장종저와의 1개체당 비교에서는 저장종저의 삼식묘 생산량이 대체로 많은 편으로 특히 ‘신천미’의 경우 41.4%가 더 생산됨을 알 수 있었다. 무병종묘를 묘상에서 육묘하여 삼식용 종묘를 생산할 수 있는 본수는 품종별로 약간의 차이는 있으나 평균 18본을 얻을 수 있었다. 그러나 계속적인 채묘방식을 활용하면 최고 65본까지 생산할 수 있었다.

1차년도 배양종묘에서 수확한 저장종저와 2차년도 배양종묘를 재배한 후 수확량을 비교할 때 모든 품종에서 2차년도 배양묘에서 11.7~55.8% 증수되었는데 이것은 묘소질의 차이가 아니고 토질, 기후 등 환경적 요인이 크게 작용한 결과라고 생각된다.

無病種묘와 저장종저묘와의 생육특성은 품종간 약간의 차이는 보였지만 큰 차이를 발견할 수 없었고, 수확량에서는 無病種묘에서 ‘율미’와 ‘진홍미’는 9%내외의 증수를 보였으나 ‘신황미’와 ‘신천미’는 대조구와 큰 차이가 나타나지 않았다. 本圃에서 재배중 발생하는 외관적인 바이러스 병징이나 형태적인 이상이 뚜렷하게 관찰할 수 없었던 바와 같이 본 연구의 시험기관인 원종사업소에서 유지·증식하고 있는 母品種이 바이러스에 별로 罹病되지 않은 우량 種藪를 사용한 것이 주된 요인이었다고 생각된다.

경제성 분석에서 배양종묘를 이용하는 경우 1주당 최소 228원이면 저장종저를 자가육묘하여 삼식묘를 생산하는 가격과 상응한 결과로 평가되었으며, 배양종묘 1주를 생산하는 가격은 115원으로 산출되었으므로 배양종묘의 경제성은 높은 결과이었다. 한편 수량성에서 품종 ‘율미’와 ‘진홍미’는 무병종묘가 저장종묘 보다 약 9%의 증수효

과를 보았으므로 경제성을 비교하면 4,000,000원/ha의 소득증대 효과가 있었다고 평가된다.

무병종묘의 농가재배 및 공급에 대하여 우수성이 인정되어 농가호응은 좋았으나 아직 바이러스 피해에 대한 인식이 미약한 실정이기 때문에 이에 대한 농가인식 제고와 함께 구조적인 보급체계가 마련되어 농가소득향상의 일환으로 정착되었으면 한다.



Photo. 11. A: virus-free plantlets before transplanting, B and C: acclimatized plantlets in plug tray, D: plants in hydroponic culture for collection of cutted seedlings, E: field for cultivation, and F: harvested sweet potatoes

제 7 절 유전자원의 기내 초저온동결보존

1. 서 언

식물의 세포나 미세조직을 배양하여 완전한 식물체로 再生시킬 수 있는 조직배양 기술이 1970년대에 들어서면서 급속히 발전함과 더불어 식물유전자원의 器內長期保存에 대한 연구도 활발히 추진되게 되었다(Henshaw, 1975; Morel, 1975). 식물의 일부 조직을 그 식물의 遺傳子源으로 보존하거나 저장하게 되면 종자나 영양계가 아닌 일부조직의 상태로 보존되기 때문에 적은 면적에 많은 자원의 보존이 가능하고, 각종 병해 특히 virus病에 무병상태로도 보존가능하며, 대량급속증식법을 이용하면 일시에 많은 개체를 확보할 수 있다. 또한 유전적으로 비교적 안전한 상태로 보존가능하며, 무병한 상태로 상호교환이 가능하여 식물검역상의 문제가 없고, 보존 및 저장에 필요한 비용이 적게드는 등의 장점이 있다. 특히 榮養界로 번식되는 식물이나 hetero상태로 유지되는 식물의 경우는 이러한 기내보존법이 가장 이상적인 방법이라 할 수 있다 (IBPGR, 1985). 최근 몇 년 동안 초저온 동결기술은 세포, 原形質體, 분열조직, 胚, 캘러스 등 서로 다른 종류의 식물 재료를 이용하여 괄목할만한 진보를 보였는데 열대, 아열대 작물의 超低溫凍結保存에 관한 연구는 耐寒性 작물에 비해 적으며 고구마 등 열대작물기원의 44종이 液體窒素(-196℃)에 저장되었다(Engelmann, 1991).

동결보존방법에서 세포내에 얼음 결정 형성을 피하는 것이 필요하다는 것이 일반적인 견해이며, 최근에는 vitrification과정을 유발하여 얼음 결정이 형성되는 문제를 피할 수 있게 되었다. 이 문제를 해결하기 위한 하나의 방법으로써 세포를 DMSO, glycerol, polyethylene glycol 등 동결보호제와 혼합시키는 'vitrification cocktail technique'를 개발하였으며(Uragami et al., 1989), 이 방법은 凍結保護劑의 종류나 농도를 달리하는 정교한 작업이 필요하지 않게 되었다. 현재 이 vitrification방법이 가장 넓게 사용되는 기술로써 온도조절이 가능한 고가의 freezer가 필요하지 않고 cooling에 필요한 시간을 감소시키며 중요한 열대, 아열대 식물종을 포함하는 많은 식물의 경정조직과 분열조직, 胚發生 캘러스 등을 냉동보존할 수 있다.

식물의 경정조직을 보존재료로 택하게 되면 다른 조직에서 유전적으로 안전한 상태로 보존시킬 수 있고, 無病株의 생산과 대량 급속증식이 가능하며, 캘러스나 원형질체

등에 비해 생존율이 높고, 식물체 재생이 용이한 장점이 있다. 특히 영양기관으로 변식되는 식물이나, 종자의 건조저장이 어려운 식물의 경우는 莖頂組織을 기내배양하여 보존하는 것이 가장 이상적인 방법으로 알려져 있다. 액체질소를 이용한 경정조직의 동결보존은 Seibert(1976)가 카네이션에서 처음으로 성공한 이후 영양번식식물이나 종자저장이 어려운 식물의 장기보존에 가장 좋은 방법으로 알려졌다. 특히 경정조직 절취이전의 母植物의 상태, 전처리유무와 前培養條件, 동결보호제의 조성과 처리방법, 동결방법, 재배양조건 등 여러 가지 측면에서 연구가 수행되었다(Kartha, 1981).

초저온냉동보존의 동결속도에 있어서 급속동결과 2단계 동결방법이 있는데 냉각속도가 生存率에 중요한 영향을 미쳐 식물 종류나 재료에 따라 효과에 차이가 있다. 배양된 식물세포나 분열조직은 적합한 동결보호제가 처리될 때 액체질소에 담기 전에 약 -40°C 까지 $0.5-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 천천히 냉동하고 빠르게 解凍되면 높은 수준의 생존율을 보인다고 하였다. 그러나, 완만한 동결은 시간이 많이 걸리며 민감한 freezer를 필요로 한다. Ishikawa 등(1996)은 bromegrass의 현탁배양 세포를 이용하여 초저온냉동보존을 하였는데, 냉동보호제로 CSP I (10% DMSO, 10% sucrose, 5% glycerol)을 사용하여 -8°C 와 -12°C 에 바로 노출시킨 후 $0.3-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 -30°C 까지 동결하여 액체질소에 저장하였는데, 생존율이 80%이상을 나타냈다. 온도 25°C 에서 CSP I 용액에 30분간 처리한 후 PVS II 용액에 2-4분 노출시킨 후 液體窒素에 저장하여 생존율을 조사한 결과 30-40%의 생존율을 보여 2단계방법에 비해 효과적이지 못하였으며, CSP I 용액 처리없이 바로 PVS II 용액에 처리 후 액체질소에 동결시킨 경우 bromegrass는 생존하지 못했다고 보고하였다. Shimonishi 등(1993)은 토란의 胚發生 캘러스를 동결보호제를 사용하여 -30°C 까지 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 완만하게 豫備凍結한 후 액체질소에 저장하여 75%이상의 생존율을 얻었다고 하였다.

초저온에 동결보존된 식물재료는 비교적 높은 온도인 $37^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 의 온수에서 急速解氷시키는 것이 생존력유지에 효과적이라고 하였으며, 완만한 해빙과정을 거치게 되면 세포가 再結氷될 위험성이 높아지기 때문에 오히려 급속 해빙이 유리하다고 하였다(Withers and Street, 1977). 해빙된 조직의 동결보호제를 살균수로 직접 세척하게 되면 오히려 세포의 脫原形質分離 장애를 조장시킬 수도 있어서 액체배지로 희석시켜 가면서 배양하는 것이 좋으며, 배지내에 sorbitol과 같은 삼투압조절물질을 첨가하면 더욱 효과적이라고 하였다.

고구마에 있어서 超低溫 凍結保存에 관한 연구는 desiccation step을 이용한 體細

胞胚의 초저온 동결(Yoshinaga and Yamakawa, 1994), encapsulation protocol을 이용한 배발생 조직의 초저온 동결(Bhatti et al., 1997), sucrose 전처리와 脫水를 병행한 non-encapsulated 배발생 조직을 이용한 급속동결방법(Blakesley et al., 1996), programmable freezer를 이용하여 0.3°C/1분 비율로 -30°C까지 냉각시킨 후 액체질소에 저장하는 완만동결법에 의한 체세포배의 초저온동결(Shimonishi et al., 2000), PVS II 용액(Sakai et al. 1990)을 이용하여 vitrification에 의한 기내 식물체의 莖頂組織의 초저온동결(Pennycooke and Towill, 2000) 등이 보고되고 있다.

본 연구에서는 고구마 유전자원의 器內 長期保存體系를 확립하고자 고구마의 頂端 分裂組織과 胚發生的 캘러스를 액체질소에 보존하는 방법을 구명하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. Vitrification을 이용한 정단분열조직의 초저온 동결보존

1) 공시재료

기내에서 30일간 마디배양한 정단분열조직배양 유래 고구마 품종 ‘율미’의 정단분열조직(약 1~1.5 mm 크기)을 실험재료로 사용하였다.

2) 전처리

葉原基 3~4매를 포함하는 정단분열조직을 0.3 M sucrose를 함유하는 고체 MS 배지로 옮겨 25±1°C의 온도에서 1일 또는 3일동안 배양하였다.

3) Vitrification 과정

가) 前處理된 정단분열조직을 2 M glycerol + 0.4 M sucrose(loading solution)을 함유하는 MS배지에 22°C에서 60분간 침지시킨다. 그 후 이 용액을 제거한 다음 정단분열조직을 PVS II 용액 [30%(w/v) glycerol, 15%(w/v) EG, 15%(w/v) DMSO와 0.4 M sucrose] (Sakai et al., 1990)에 10, 20 또는 30분간 얼음위에 노출시킨 후 액체질소에 3일간 저장하였다.

나) 變形시킨 PVS II 용액 [30%(w/v) glycerol, 15%(w/v) EG, 5%(w/v) DMSO와

0.4 M sucrose] 에 10, 20 또는 30분간 얼음위에 노출시킨 후 액체질소에 3일간 저장하였다.

4) 解凍

액체질소통에 유지한 정단분열조직을 꺼내어 40℃에서 1분간 급속 解凍시킨 후 1.2 M sucrose가 포함된 MS배지에 22℃에서 20분간 침지시켰다. 정단분열조직배양에 가장 적합한 배지인 0.05 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용구에 여과지를 얹고 하루동안 暗培養한 후 여과지를 제거하고 24시간 동안 암배양하였으며 5일 동안은 희미한 불빛하에서 배양한 후 PPFD 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 옮겨 배양하였다. 각 처리당 5개씩의 정단분열조직을 3반복 처리하였다.

5) 생존율 조사

0.05 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용구에 2개월 동안 頂端分裂組織을 배양하여 성장하는 양상을 관찰하였다.

나. 켈러스를 이용한 초저온 동결보존

1) 공시재료

葉原基 1매가 부착된 고구마 품종 ‘울미’의 정단분열조직을 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS배지에서 8주일간 암배양한 후 발생된 胚發生 켈러스를 1~2 mm 크기로 절취하여 사용하였다(Photo. 13-A, B).

2) 전처리

가) 배발생켈러스를 ABA 전처리 효과를 보기 위하여 0, 1, 10 mg/L 첨가된 액체 MS배지에서 3일 동안 암상태, 25±1℃로 배양하였다.

나) 배발생켈러스를 전처리 효과가 가장 좋았던 10 mg/L ABA가 첨가된 액체 MS배지에 3일 동안 암상태에서 온도 25±1℃로 배양하였다.

3) 동결보호제처리

가) 前處理된 현탁배양 켈러스를 conical tube에 5 mL씩 담고 ABA 용액을 제거한

후 미리 냉장처리해 둔 동결보호제를 각각 1 mL씩 cryovial에 재빨리 넣고 ice에서 30분간 저온배양하였다. 凍結保護劑는 0.4 M sucrose를 포함하는 MS배지에 0, 1, 3, 10, 30% DMSO의 농도를 사용하였으며, 용액의 pH는 5.8로 조정하였고 모두 濾過滅菌한 후 사용하였다.

나) 동결보호제는 0.4 M sucrose를 포함하는 MS배지에 각각 0.54, 1.08, 1.62, 2 M glycerol과 0.64, 1.28, 2 M DMSO, 2M DMSO + 0.54 M glycerol, 2 M glycerol + 0.64 M DMSO를 사용하였으며, 용액의 pH는 5.8로 조정하였고 모두 여과멸균한 후 사용하였다. 또한 DMSO의 독성효과를 조사하기 위하여 켈러스를 동결처리하지 않고 4 M DMSO에 40분간 저온배양하여 생존율을 조사하였다.

4) 동결

동결보호제 처리 후 cryovial을 parafilm으로 밀봉한 후 cryomed model 1010 micro computer programmable freezer unit에 넣고 -40℃까지 1분당 1℃씩 동결시켰고 45분간 -40℃ 상태로 유지시킨 다음 액체질소통에 넣었다.

5) 해동

액체질소통에 유지시킨 켈러스를 꺼내어 40℃의 수조에 약 1분간 급속 해동하였다. 배양세포가 vial의 바닥에 침전되도록 방치한 다음 상등액을 제거한 후 세포를 여과지에 올린 고체배지에 옮겼으며, 동결보호제 용액은 멸균된 여과지를 이용하여 제거하였다. 1시간 경과 후 여과지를 뺀 신선한 세포증식배지인 MS1D배지(MS medium + 1 mg/L 2,4-D)에 옮겨주었다.

6) 생존율 조사

가) TTC reduction 방법

세포의 생존율은 TTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) reduction 분석방법을 사용하였다. 세포를 0.18 M TTC 용액에 침지하여 25℃에서 16시간 처리한 다음 적색의 세포괴를 육안으로 식별하여 계산하였다(Bajaj and Reinert, 1977).

나) FDA 방법

미세한 세포의 생존율 조사는 FDA를 이용하여 형광현미경(Olympus, BX50-FLA)에 UV波長(excitation: B, cube: U-MWB, dichroic mirror: DM500, exciter filter: BP

450-480nm, barrier filter: BA515)을 이용, 검경하여 생존을 확인하였다(Kartha, 1981). 각 처리구별로 해동된 세포괴를 FDA($1\mu\text{g}/\text{mL}$)용액 $20\mu\text{g}$ 와 혼합한 후 30분 동안 eppendorf tube에서 침지한 다음, 증류수로 세척, 형광현미경을 이용하여 螢光의 녹색 세포괴를 육안으로 식별하여 생존율을 계산하였다.

다) 배양

1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에서 8주일간 암배양한 후 성장상태를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Vitrification을 이용한 정단분열조직의 초저온 동결보존

기내에서 30일간 마디배양한 정단분열조직배양 유래 ‘栗美’의 정단분열조직(약 1~1.5mm 크기)을 실험재료로 사용하여 0.3 M sucrose를 함유하는 고체 MS배지로 옮겨 3일 동안 배양 후 2 M glycerol + 0.4 M sucrose를 함유하는 MS배지에 60분간 침지 후 이 용액을 제거하였고 정단분열조직을 PVSII 용액에 10~30분간 얼음위에 노출시킨 후 액체질소에 3일 간 저장 후 생존율을 조사하였다. 또한 0.3 M sucrose에서의 3일 간의 전처리가 식물체 재생에 미치는 영향을 보기 위해 NAA 0.05 mg/L와 BA 1.0 mg/L의 혼합배지에 치상한 결과 100%의 생존율을 보였으며, 액체질소의 처리없이 PVSII 용액에 40분간 처리하여 재생에 미치는 영향을 조사한 결과 置床 후 1주일 후부터 정단분열조직의 기부에서 캘러스의 발생을 관찰할 수 있었다.

정단분열조직을 PVSII 용액에 10, 20 또는 30분간 얼음위에 노출시킨 후 액체질소에 3일 간 저장 후 생존율을 조사한 결과 처리시간에 관계없이 모든 처리구에서 생존한 頂端分裂組織을 확보하지 못하였다. 또한 변형시킨 PVSII 용액에 10, 20 또는 30분간 얼음위에 노출시킨 후 액체질소에 3일간 저장한 후 생존율을 조사한 결과에서도 처리시간에 관계없이 모든 처리구에서 생존한 정단분열조직을 얻지 못하였다.

나. 캘러스를 이용한 超低溫 凍結保存

배발생캘러스를 ABA 무처리와 1, 10 mg/L ABA가 함유된 액체 MS배지에서 3일간 전처리한 후 0.4 M sucrose가 함유된 동결보호제 처리로는 DMSO 0, 1, 3, 10, 30%를 처리한 다음 2단계 동결과정을 걸쳐 생존율을 조사하였다. 생존율 분석을 위해 TTC방법과 FDA방법을 사용하였는데, 그 결과 DMSO 10%가 첨가된 처리구에서만 생존한 세포피를 확인할 수 있었으며(Fig. 17), DMSO 0, 1, 3, 30% 첨가구에서는 전처리와 무관하게 모두 생존하지 못하였다. ABA 전처리 효과는 10 mg/L가 함유된 배지에서 초저온냉동 후 50%의 생존율을 보여 가장 좋았으며, ABA 1 mg/L 전처리에서 35%, ABA 무처리에서 30.0%를 보였다.

胚發生캘러스를 10 mg/L ABA가 함유된 액체 MS배지에서 3일간 전처리한 후 0.4 M sucrose가 함유된 동결보호제 처리로는 0.54, 1.08, 1.62, 2 M glycerol과 0.64, 1.28, 2 M DMSO의 단독처리, 2 M DMSO + 0.54 M glycerol, 2 M glycerol + 0.64 M DMSO 혼용처리를 한 다음 2단계 동결과정을 걸쳐 생존율을 조사하였다.

먼저 동결보호제의 영향을 알아보기 위해 2단계 동결과정없이 4.0 M DMSO에 40분간 처리한 후 TTC방법에 의해 생존율을 확인한 결과 76.9%의 높은 생존율을 얻어 동결보호제의 해는 없는 것으로 판단되었다.

초저온 동결보존한 후 해동된 배발생캘러스를 증식에 적합한 배지인 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에 치상한 다음 암배양 후 변화를 조사한 결과 TTC reduction 방법에서 가장 높은 생존율을 보인 1.28 M DMSO 단독처리구에서 캘러스의 증식이 가장 활발하였다(Photo. 13-C, D).

미세한 세포의 생존율 조사는 FDA를 이용하여 형광현미경(Olympus, BX50-FLA)에 UV과장을 이용하여 형광의 녹색 세포피를 육안으로 식별하여 생존을 확인하였다(Photo. 13-E, F). 0.4 M sucrose와 0.54 M glycerol이 첨가된 처리구는 100% 세포가 죽어서 동결보호제로써 적합하지 못하였다. 모든 농도에서 glycerol 처리구는 생존율이 0~7.5%이었는데 DMSO가 첨가된 처리구는 생존율이 14.9~46.8%로 높아서 동결보호제로써 더 효과적이었으며, 특히 1.28 M DMSO 단독처리구와 2 M glycerol + 0.64 M DMSO 혼용처리구에서 46.8%와 46.5%의 비교적 높은 생존율을 보였다(Table 29). 생존된 캘러스는 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 암배양한 결과 배양 4주일 후부터 1.28 M DMSO 단독처리구에서 캘러스가 자라는 것이 관찰되었고, 배양 8주일 후 배발생 캘러스가 발생하였으며, 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 배지에서 2주일간 계대배양한 다음 성장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에서 완전한 식물체가 재생되었다.

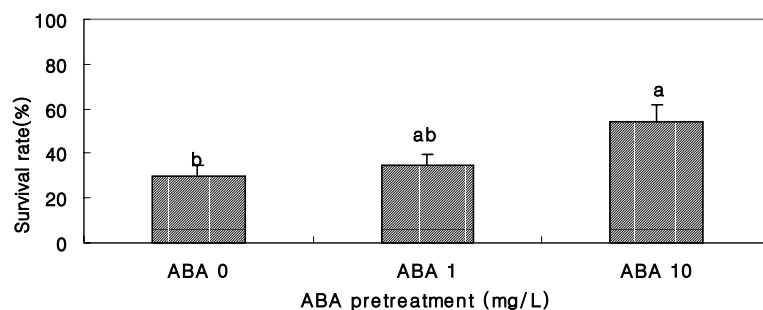


Fig. 17. Effects of ABA pretreatment with 10% DMSO on the survival rate of embryogenic callus by TTC reduction after cryopreservation.

Table 29. Effects of cryoprotectant on the survival rate of embryogenic callus by TTC reduction analysis in sweet potato

Treatment	Survival rate	Treatment	Survival rate
0.40 M sucrose	0±0	Control ^z	100±0
0.54 M glycerol	0±0	0.64 M DMSO	14.9±2.0
1.08 M glycerol	4.3±2.1	1.28 M DMSO	46.8±4.2
1.62 M glycerol	7.4±1.6	2 M DMSO	19.5±2.2
2.00 M glycerol	7.5±2.2	2 M DMSO + 0.54 M glycerol	22.1±1.5
		2 M glycerol + 0.64 M DMSO	46.5±7.8

^zControl: no freezing, Values represent the mean±SE.

고구마와 같은 영양번식성 작물의 유전자원보존에 있어서 기내보존법에 관한 중요성에 대한 인식은 날로 증가하고 있으며 다양한 방법과 기술들이 연구되고 있다.

초저온냉동보존에 가장 적합한 식물재료는 정단분열조직이라고 할 수 있는데, 이는 기관분화가 이루어지지 않은 캘러스나 현탁배양계에 비해 유전적으로 상당히 안정되어 있고 상대적으로 쉽게 식물체가 재생되기 때문이다. 그러나 일부 식물 종에 있어서 정단분열조직을 쉽게 이용할 수 없거나 기술면에서 어려운 것으로 판명될 때 배발생 조직이나 체세포배가 대체방법으로 사용될 수 있으며, 이런 조직은 캘러스나 현탁배양계 보다 유전적으로 훨씬 안정적이다. 또한, 배발생 조직은 흔히 유전적 형질 전환 방법에 사용되고, 합성종자 기술과 미세번식의 기회를 제공하며, 세포주에 배발생능과 유전적 안정성을 유지하는데 장기간 저장할 때는 매우 노동 집약적이기 때문에 배발생 조직에 대한 초저온냉동보존에 관한 연구는 매우 중요하다.

식물조직의 일반적인 초저온냉동보존법은 sample내로 냉동보호제를 침투시키는 것을 기본으로 하여, 세포내 수분을 감소시키고 세포내의 용질의 농도를 향상시키며, programmable freezer를 이용하여 세포의 동결을 시켰으나, 동결보호제의 농도, 조합과 형태가 각 식물 재료에 따라 결정되어야 하는 복잡한 문제를 안고 있다(Sakai, 1985).

ABA와 같은 전처리와 단순한 건조방법은 초저온 동결보존법 중 치명적인 세포내 결빙을 막는 또 다른 효과적 방법으로써 전처리된 식물재료가 액체질소에 의한 상해를 덜 받으며, 동해 내성이 생기고, ABA 전처리 후 건조방법은 용질 축적을 증가시키므로써 세포 내 동결을 피할 수 있게 해준다.

초저온냉동보존을 위한 전처리 효과에 관한 연구로 Shimonishi 등(1993)은 토란의 배발생캘러스를 10 mg/L ABA, 0.5 M proline과 1 mM proline + 1 mg/L ABA 혼합처리, 무처리의 4가지 전처리를 한 다음 냉동보호제로는 10% sucrose + 10% DMSO + 5% glycerol를 사용하여 preefreezing 방법으로 초저온 동결저장 후 전처리를 하지 않은 무처리구는 40% 정도 생존, proline의 경우는 75%이상, ABA 전처리는 40% 미만, proline + ABA 혼합처리는 0%의 생존율을 보여 proline 0.5 M의 전처리 효과가 있음을 보고했다. Hirata 등(1998)은 겨자무(*Armoracia rusticana*)의 싹뿌리 배양에서 2 μ M ABA 전처리로 동결시킨 후 약 60%의 재생률을 보였다. 또한 좁은잎 빈카(*Vinca minor*)의 싹뿌리배양에서 10 μ M ABA + 0.3 M sucrose 1일 전처리로 encapsulation-dehydration방법에 의한 초저온동결 후 70%의 생존율을 보였으며, 0.3

M sucrose 과 0.5 M glycerol 전처리에서는 생존율이 10% 정도로 저조하여 ABA 전처리 효과가 뛰어남을 보고하였다(Hirata et al., 2002). 반다(*Vanda pumila*)의 배양된 원괴체의 shoot apices로부터 조직배양된 shoot primordia를 초저온 동결보존하였는데, 1.0 mg/L ABA에 3일간 전처리 후 desiccation방법에 의해 상대습도를 낮추고 액체질소에 저장한 후 생존율이 65.0±7.5%를 나타냈다고 하였다(Na and Kondo, 1996). Panis 등(1996)은 바나나(*Musa spp.*) 분열조직의 초저온 동결보존을 위해 2~4주간 0.3~0.5 M sucrose를 함유하는 MS배지에 분열조직을 배양한 후 살아있는 분열조직 덩어리를 절취해서 바로 액체질소에 저장하고 재생한 실험에서 42.5%의 생존율을 보여 sucrose의 전처리 효과를 보고하였다.

Shimonishi 등(2000)은 고구마의 체세포배를 이용한 prefreezing method에서 5~10 mg/L ABA에 전처리된 체세포배는 대체적으로 80%이상의 생존율을 보여 ABA 전처리 효과가 있음을 보고하였다. 또한 proline의 전처리 효과는 없으며, ABA 전처리 기간은 3일이나 6일사이에 차이가 명확하지 않다고 하였다(Shimonishi, 1996).

Blakesley 등(1996)은 고구마의 배발생조직을 sucrose 전처리와 여러 정도의 dehydration 방법에 의해 급속 동결저장하였는데, 전처리로 0.4 M 또는 0.7 M sucrose 단용처리 후 50%까지 생존하였으며, silica gel을 이용한 脫水에 의해 함유량을 18-41% 범위로 유지하여 초저온 동결보존한 실험에서 생존율이 증가하였다.

초저온 동결보존에 있어서 sucrose는 osmotic dehydration의 유도뿐만 아니라 배발생 조직에 의해 흡수되어 원형질의 유지와 내부 막의 보존 역할을 하는 것으로 보고 있다(Plessis et al., 1993). Blakesley 등(1995)은 고구마의 배발생조직을 이용하여 sucrose와 dehydration방법으로 초저온 동결보존을 실시하였는데, 2단계 freezing은 rapid freezing에 비해 훨씬 효과적이었으며, TIB 10품종에서 0.1 M sucrose 3일, 0.4 M에서 3일, 0.7 M에서 7일 전처리한 후 dehydration 4시간 후에 0.1 M sucrose에 옮기기 전에 0.7 M sucrose에 1일, 0.4 M에 2일간 처리한 다음 alginate encapsulation 후 freezing 방법으로는 two-step freezing에서 배발생조직이 74.1%, 비배발생조직이 35.9%로 100% 생존하였다고 보고하였다.

Janeiro 등(1996)은 동백나무의 체세포배와 embryonic axes의 초저온 동결에 관한 실험에서 체세포배를 이용한 건조, 화학물질 처리, 낮은 온도에 의한 경화, alginate beads의 encapsulation 방법을 사용하였으나, 액체질소에 24시간 저장 후의 생존율은 0%를 나타냈다. 그러나 embryonic axes의 경우는 laminar flow에서 건조 후 액체질

소에 바로 저장하는 아주 간단한 기술로도 쉽게 초저온 동결되었다고 보고하였다.

본 실험에서 ABA 전처리 효과를 알아보기 위해 동결보호제로 10% DMSO를 사용하고 0~10% ABA를 처리한 결과 무처리구에서 배발생캘러스의 생존율은 30.0%였고, 1 mg/L ABA 처리구에서 34.7%, 10 mg/L ABA 처리구에서 54.0%를 나타냈으며 다른 연구 보고와 마찬가지로 ABA 전처리 효과가 있음을 알 수 있었다.

고구마의 동결보존은 1970년대 현탁배양을 이용하여 처음으로 성공하였으며 고농도의 동결보호제를 사용한 vitrification 방법을 이용하여(Towill and Jarret, 1992) 일부 성공하였지만 지속적인 연구 결과 고구마의 shoot tip culture를 통한 freezing은 매우 어렵고 성공적이지 못하였다. 이와 같이 체세포배나 배발생조직을 통한 초저온 동결보존에 관한 많은 연구들이 폭 넓게 연구되고 있다.

몇몇 연구에서는 내성이 낮은 세포나 정단조직을 직접 PVSII 용액에 노출시킬 경우 osmotic stress 또는 chemical toxicity로 인한 해를 받는다고 보고하였는데, 이러한 해로운 효과를 줄이기 위해서는 cryoprotective loading 같은 적당한 preconditioning이 필요하다(Langis and Steponkus, 1991). 100%의 PVSII 용액에 노출시키기 전에 20% 희석액의 사용으로 고구마에서 다양한 결과를 얻었는데(Towill and Jarret, 1992), PVSII 용액 사용전에 2 M glycerol + 0.4 M sucrose을 이용한 경우에서 몇몇 종에 있어서 효과적이었다(Matsumoto et al., 1998). 또한 sucrose 전처리와 loading 처리를 병행한 결과 shoot 형성률이 와사비의 경우 무처리 10.0에서 100%로(Matsumoto et al., 1994), 백합의 경우 5.0에서 82.5%로 매우 높아졌다(Matsumoto et al., 1995).

Yoshimatsu 등(1996)은 *Panax ginseng*의 싹뿌리의 초저온 동결보존을 위해 vitrification 방법을 이용하였는데, 0.1 mg/L 2,4-D에 3일간 전처리 후 PVSII(Sakai et al., 1990) 용액으로 8분간 탈수시킨 후 액체질소에 저장하였으며, 해동 후 60%의 생존율을 보였다고 보고하였다. 또한 Pennycooke와 Towill(2000)은 고구마 기내식물체로부터 정단분열조직을 절취하여 vitrification 방법에 의해 초저온 동결보존을 실시하였는데, 1일간 0.3 M sucrose에 전처리 한 다음 2 M glycerol + 0.4 M sucrose에 1시간 유지시키고 PVSII 용액에 16분간 담근 후 급속 냉동시켰다. 기내 식물체의 정단분열조직의 위치는 PVSII 용액 처리와 vitrification 후에 생존력에 영향을 미치는데, 주축의 정단분열조직이 2 M glycerol + 0.4 M sucrose와 PVSII 처리 후에 가장 높게 나타났다.

본 연구에서도 다른 연구 결과에서 전처리 효과가 좋은 것으로 나타난 10 mg/L의 ABA를 배발생캘러스의 초저온 동결보존에 사용하였을 때 가장 효과가 좋았으며, 동결보호제로 1.28 M DMSO와 0.4 M sucrose 처리구에서 동결 후 재생률이 46.8%로 가장 높게 나타났으며 DMSO 단독처리는 glycerol 단독처리보다 효과적이었다. 그러나 80% 이상의 생존율을 보인 Shimonishi 등(2000)의 연구에서보다는 저조하였다. 또한 고구마 정단분열조직의 초저온냉동보존에 있어서 PVSⅡ용액을 이용한 vitrification방법에 의해 일부 식물체로 재생한 보고가 있으나, 사용한 식물재료의 genotype의 영향인지, 품종 ‘신울미’를 이용한 정단분열조직의 vitrification방법에 의한 초저온 동결 후 생존한 식물체를 한 주도 얻지 못하였다.

4. 적 요

고구마 유전자원의 기내 장기보존체계를 확립하고자 품종 ‘울미’의 정단분열조직과 배발생적 캘러스를 액체질소에 보존하는 방법을 구명하고자 실시하였다.

정단분열조직의 초저온 동결보존에 있어서 PVSⅡ용액을 이용한 vitrification방법에 의한 냉동 후 생존한 식물체를 한 주도 얻지 못하였다.

품종 ‘울미’를 이용해 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS배지에 정단분열조직배양을 통하여 발생된 배발생캘러스를 실험재료로 여러 가지 동결보호제를 처리하여 2-step method에 의해 초저온 동결보존을 실시하였다. TTC방법과 FDA염색법을 통해 생존 여부를 확인한 결과 0.4 M sucrose가 포함된 1.28 M DMSO 처리구에서 46.8%의 가장 높은 생존율을 나타냈다. 생존된 캘러스는 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 암배양한 결과 배양 4주일 후부터 1.28 M DMSO 단독처리구에서 캘러스가 자라는 것을 육안 관찰할 수 있었으며 배양 8주일 후에는 배발생 캘러스가 발생하였고, 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 배지에서 2주일간 계대배양한 다음 MS기본배지에서 완전한 식물체로 재생되었다.

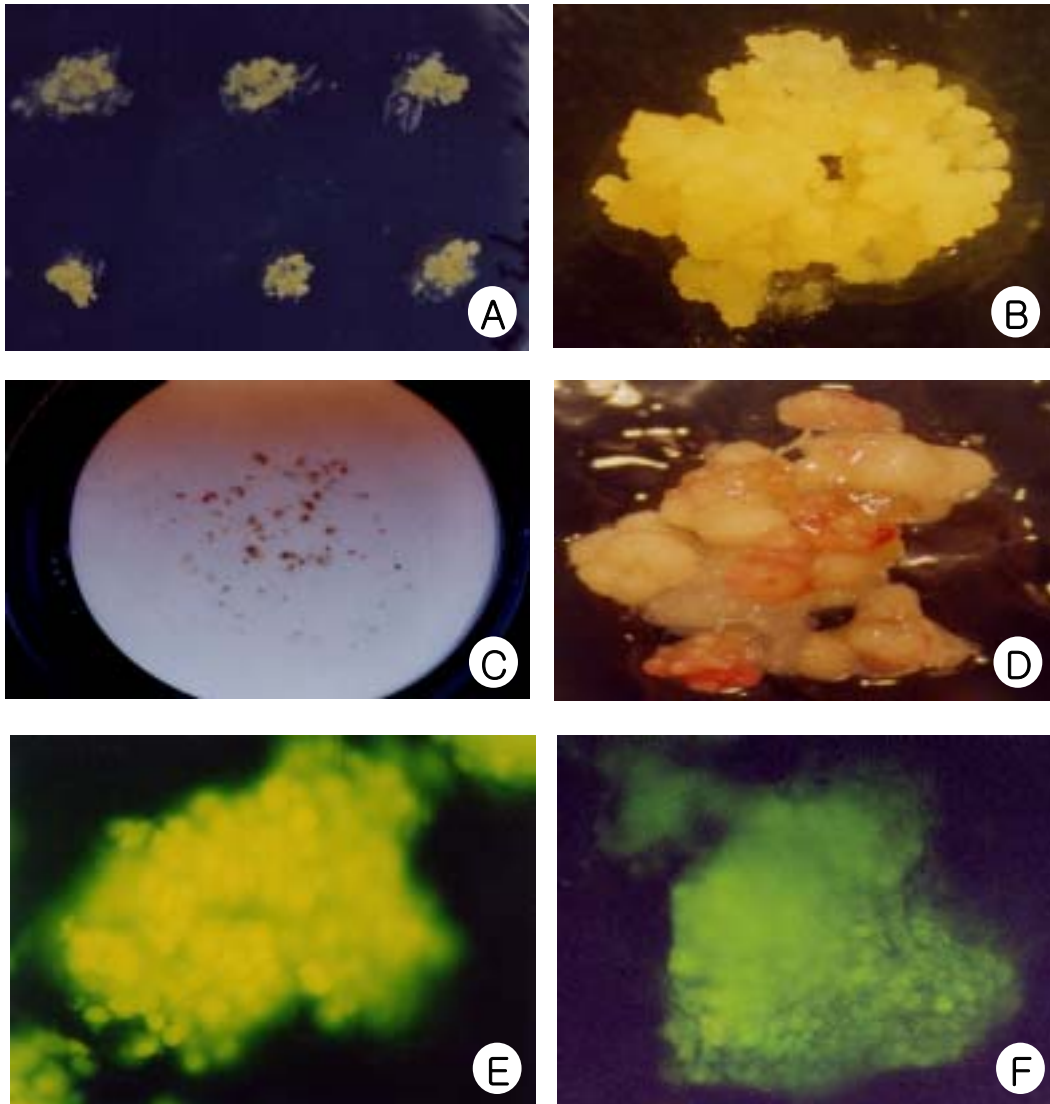


Photo. 13. Cryopreservation of embryogenic callus. A and B: materials for cryopreservation, C and D; TTC reduction test of cryopreserved embryogenic callus (cryoprotectant: 1.28 M DMSO + 0.4 M sucrose in MS medium). Red colored parts are live clump. E and F; FDA test, live clump (E), dead clump (F).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

연구 개발 목표	달성도
○ 켈러스, 체세포배 유도 및 유식물체 재분화체계 수립	100
○ 배양종묘의 바이러스 검정 및 무병주의 생산	100
○ 무병종묘의 대량 증식체계 확립	100
○ 무병종묘 기내 증식을 위한 배양조건 구명	100
○ 배양종묘의 기내 순화체계 구명	100
○ 배양종묘의 변이성 조사	100
○ 배양종묘의 풋트이식 순화 체계	100
○ 삼식종묘의 증식효과 및 생육특성 조사	100
○ 무병종묘의 포장재배에 따른 특성 및 생산성 분석	100
○ 배양종묘 활용의 기술적, 경제성 분석 농가보급체계 확립	100
○ 유전자원의 기내 장기보존법 개발	100

제 2 절 관련분야에 의 기여도

1. 국내 · 외 학술회의 발표 실적

- 가. RT-PCR을 이용한 고구마에서 Sweet Potato Feathery Mottle Virus의 검정. 한국원예학회 2000년도 추계학술연구발표회 초록집
- 나. Effects of Plant Regeneration by means of Apical Meristem Culture in Sweet Potato. 한국식물조직배양학회 2001년도 춘계학술발표회
- 다. Effects of Culture Condition on the In Vitro Propagation of Virus-free Stocks in Sweet Potato. 한국식물조직배양학회 2001년도 춘계학술발표회
- 라. Efficient Cultural Conditions on the In Vitro propagation of Virus-free Stocks in Sweet Potato. 한국식물조직배양학회 및 한국육종학회 2001년도 추계학술발표회 및 국제공동심포지엄
- 마. 器內 배양종묘의 미세번식을 위한 人工光源으로서 發光다이오우드의 이용. 한국농업기계학회 2001년도 동계학술대회
- 바. Effects of Cultural Conditions on the In Vitro Propagation of Plantlets derived from Apical Meristem in Ipomoea batatas. 26th International Horticultural Congress & Exhibition (IHC2002)
- 사. A Protocol for Detection of Sweetpotato Feathery Mottle Vitus in Tissue Culture Regenerated Plants by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. 26th International Horticultural Congress & Exhibition (IHC2002)
- 아. 고구마 품종 'White Star'의 기내 종묘생산에 미치는 NAA와 BA의 효과. 한국원예학회 2002년도 추계 학술연구발표회
- 자. Virus-free Plant Production through Meristem Tissue in Sweet Potato and Detection of Sweet Potato Feathery Mottle Virus by RT-PCR. 한국식물생명공학회 2002년도 추계학술대회

2. 학술지 게재

- 가. 고구마 정단분열조직배양에 의한 多芽體 형성
식물조직배양학회지, 26(2):85-91 (1999)
- 나. 고구마의 莖頂組織 유래 기내 소식물체의 성장촉진과 순화
식물조직배양학회지, 26(2):115-119 (1999)
- 다. 고구마 정단분열조직 유래 식물체의 기내증식에 미치는 배양조건의 영향
식물생명공학학회지, 29(1):37-40 (2002)

3. 학위논문 배출

- 가. 석사학위논문 :
“인공광처리에 의한 고구마 배양묘의 성장 반응 효과”
(2000년 2월 22일 전북대학교 대학원 석사학위 취득)
- 나. 박사학위논문 :
“고구마 무병주의 기내생산, 증식 및 동결보존”
(2003년 2월 22일 박사학위 취득 예정)

4. 세미나 및 특별강연회 발표

- 가. “고구마의 무병주 育成 및 대량증식” 호남농업시험장 목포시험장 주최 “고구마 산업발전을 위한 세미나” 주제발표 (2000년 12월 19일)
- 나. “고구마의 無病苗 육성과 증식체계의 확립” 순천대학교 농업과학기술연구소 특별강연회 발표 (2001년 5월 23일)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구결과를 농가에 보급하여 실용화하기 위한 실증적 연구를 위하여 전라북도 농업기술원의 경상과제로 2003년도에 시험을 수행하기로 하였으며, 공동연구과제로 농촌진흥청에서 수행하는 '2003 농업생산현장 신기술투입 접목연구'의 신규과제로 제출하고 자 협의중이다.

2. 본 연구결과는 각도 농업기술원 傘下 시군 농업기술센터 혹은 민간 기업에 기술이전하여 고구마의 무병종묘 생산과 증식 및 재배에 실용화할 수 있도록 보급하고 기술지도한다.

3. 본 연구는 오윤바이오텍이 참여기업으로 공동연구하였으므로 기업화를 희망하는 경우 농림기술관리센터와 협의하여 추진할 계획이다.

4. 본 연구에서 육성된 무병종묘의 분양을 요청하는 경우 농업연구 시험기관, 농업기술센터, 독농가 등에 분양하여 활용하게 한다.

5. 본 연구결과는 딸기, 국화, 카네이션 등 영양번식성 원예작물의 無病株 획득 및 증식체계와 유전자원의 장기 凍結保存體系의 확립에 유용한 자료로 응용될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제의 수행내용인 遺傳子源의 초저온 凍結 장기저장방법을 개발하기 위하여 2000년 6월 26일 ~ 7월 1일까지 일본 鹿兒島縣 Biotechnology연구소의 Dr. Shimonishi 연구실을 방문하여 고구마 유전자원의 급속 동결보존방법에 대하여 연수를 받았다. 특히 급속 동결보존방법 중 體細胞胚의 직접 및 간접법에서 ABA에 전처리 후 동결방법, dessication방법, vitrification방법, encapsulation방법에 대한 실험을 직접 수행하였다. 본 연구에는 高價인 programming freezer가 필요하며, 급속 융해시키는 원리도 실험을 통하여 습득할 수 있었다.

연수기간동안 실험한 주요 내용은 다음과 같다.

1. 초저온저장법

본 실험은 Direct법 및 2-step법으로 나누었고, PC(ABA preculture)와 N-PC (non ABA preculture)로 나누어 진행되었음.

A1 sol. : S10 + D10 + G5

A2 sol. : Sucrose 10%

A3 sol. : S10 + D20 + G10

가. Cryovial(10mL)에 10% sucrose(A2 sol.) 1mL씩 주입 (2-step용)

나. Embryogenic callus(EC, 직경 약 3 mm)를 vial에 10여개 삽입 (Direct용)

다. EC를 10% sucrose를 넣은 <1>에 넣음

따라서 실험구는 Direct(PC, N-PC)구와 2-step(PC, N-PC)구 임.

라. 빈 vial + A3 sol. 2mL (DMSO가 들어있으니 취급상 주의 요망, cancer induce)

마. Pasture pipette으로 2 mL 흡입 후 1 drop씩 2-step용 2병에 번갈아 가면서, 그리고 가볍게 흔들면서 떨어뜨림. 결국 1병에 1 mL가 주입되므로 총량은 1 mL + 1 mL = 2 mL가 됨.

마. A1 sol.을 direct용 2병에 2 mL 주입 후 (각 1 mL)

사. 뚜경을 덮고 30분 ~ 1시간동안 방치해 둬.

아. Program freezer (protocol 참조)

※ Ice inoculation method

Liquid nitrogen(LN)을 보온통에 담아와서 인두모양의 쇠붙이를 LN통에 담귀 두어 충분히 냉각시킨 후 program freezer(현재 온도 -8°C) 안에 있는 vial의 병 밖에 인두를 접촉시켜 냉각시킨다(병 밖이 하얗게 냉각됨). 다시 program freezer안에 넣어 나머지 한시간을 채운다. 그 후 -30°C 까지 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, 44분에 걸쳐 냉동시킨다.

자. -30°C 에서 약 30분 후 LN에 급속 냉동시킨 후 저장용 대형 LN통에 저장한다.

※ 저장기간이 지난 후 regeneration시키는 방법

가. 보온통에 물을 40°C 로 조절함

나. LN속에 있던 재료를 40°C 로 조절된 물통에 급히 넣어 녹임.

다. 2-step용 PC와 N-PC의 뚜경을 열고 10% sucrose를 pasture pipette으로 한방울씩 천천히 떨어뜨림. 원래 vial내의 액체량의 2~3배액이 되도록 함

라. 잠시 방치 후 vial내의 액을 뽑아 냄.

마. 3% sucrose sol.을 한 방울씩 두 개의 vial에 주입함.량은 두 번째에 첨가한 량만큼.

바. Hormone-free배지 위에 filter paper 2매를 깔음.

사. 3% sucrose sol. 뽑아냄.

아. 1-step용 2병의 뚜경을 열고 액체를 뽑아냄.

자. 1-step용의 재료를 filter paper를 깔 배지에 하나씩 치상함.

ABA와 GA가 들어있는 배지도 좋음.

다시 곧 새로운 Hormone-free배지에 재배양할 계획임.

차. 2-step용을 filter paper 2매를 깔 곳에 옮겨 흡수시킨 후 Hormone-free배지에 치상함.

2. Desiccation method

- 가. 작은 plastic petri-dish 안에 filter paper를 깔고 10% sucrose sol. 100 μ L 적하함.
 - 나. EC(직경 약 3 mm)를 pre-culture한 것(ABA 5mg/L에 5일간 前培養)과 안한 것을 각각 10여개씩 넣고 건조시간을 3시간과 5시간처리로 구분하였으니 결국 4처리가 됨.
 - 다. 큰 petri-dish안에 EC를 置床한 작은 petri-dish를 넣고
 - 라. 건조된 silica gel(6 mesh이상, 청색대립, 球狀) 20 mL를 주변에 넣고
 - 마. EC를 치상한 petri-dish의 뚜껑을 열고, 큰 petri-dish의 뚜껑을 덮은 후 parafilm으로 봉하여 clean bench 안에서 건조시킴.
 - 바. 3시간, 5시간 후 LN에 넣을 작은 plastic bottle(Falcon bottle)에 넣고 마개를 한 후 급속히 LN에 저장함
 - 사. 40°C의 온수에 급속히 融解시킨 후 Hormone-free배지에 치상 후 25°C에서 dark culture함.
- * 수분함량이 중요함. water content check 요망됨.

3. Vitrification(glass化) method

Materials: shoot tip, somatic embryo, embryogenic callus, node, 인공종자 등

Loading sol. ; 2 M glycerol + 0.4 M sucrose

PVS II sol. ; 30% glycerine, 15% ethyleneglycol, 15% DMSO in 0.4 M sucrose

- 가. Cryovial에 3 mm 내외 크기의 EC를 넣음.
- 나. Loading sol. 주입 후 20 min. 방치
- 다. PVS II sol.에 10분, 20분, 30분 등으로 구분하여 시간이 경과한 후
- 라. 냉동(LN)
- 마. 용해 후 1.2 M sucrose sol.으로 洗淨

4. Encapsulation method

- 가. $\text{CaCl}_2 \cdot 100 \text{ mM}$ in 0.4 M sucrose을 Beaker에 부은 후
- 나. $3\% \text{ Na-alginate}$ in 0.4 M sucrose을 부은 beaker 안에 encapsulation 시키고자 하는 somatic embryo, shoot tip, EC 등을 넣고 잘 저은 다음 Pasteure pipette로 하나씩 흡입한 다음 CaCl_2 용액속에 떨어뜨리면 encapsulation 됨.
 - * 硬度는 Na-alginate의 粘度(500, 550, 450 등)가 중요함.
- 다. Encapsulation 후 dehydration method : 상기한 건조방법에 따라 silica gel 속에 10~12시간 가량 건조 후 냉동(LN)함. 크기 및 종류에 따라 건조시간이 다름.

4. FDA에 의한 생존률 검정

- 가. FDA 100 mg을 Acetone 20 mL와 혼합 후 stirring (Stock sol., -0°C 이하 보관) 녹인 후 20 mL용 centrifuge tube에 넣고 Aluminum foil로 감싸서 암흑상태로 함.
- 나. FDA stock sol. 0.5 mL + 50 mL D.W. (100배액) Al. foil로 감싼다.
- 다. Hole slide glass에 배양하고 있는 EC(혹은 검정하고자 하는 세포괴)를 넣고 FDA용액을 2~3방울 떨어뜨린 후 잘 섞이도록 하고 약 30분간 방치한 후 형광 현미경(Olympus Model; BH2-RFCA)으로 검경하여 판정함. 녹색으로 염색되는 부분이 살아있는 세포임.
(고구마 체세포배 형성 ; ABA 4 mg/L + GA 1 mg/L)

제 7 장 참고문헌

- Alconero, R., A.G. Santiago, F. Morales, and F. Rodriguez. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology* 65:769-773.
- Amirouche, L., T. Stuchbury, and S. Matthews. 1985. Comparisons of cultivar performance on different nutrient media in a routine method for potato micropropagation. *Potato. Res.* 28:469-478.
- Anderson, W.C. 1975. Production of rhododendron by tissue culture. I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 25:129-135.
- Bajaj, Y.P.S. and J. Reinert. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene banks. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 47-58
- Baker, R. and D.J. Philips. 1962. Obtaining pathogen-free stock by shoot-tip culture. *Phytopathology* 52:1242-1244.
- Bhatti, M.H., T. Percival, C.D.M. Davey, G.G. Henshaw, and D. Blakesley. 1997. Cryopreservation of embryogenetic tissue of a range of genotypes of sweet potato [*Ipomoea batatas*(L) Lam.] using an encapsulation protocol. *Plant Cell Reports* 16:802-806.
- Blakesley D., S. Al-Mazrooei, M.H. Bhatti, and G.G. Henshaw. 1996. Cryopreservation of non-encapsulated embryogenic tissue of sweet potato(*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Reports* 15:878-876.
- Blakesley, D., S. Al-Mazrooei, and G.G. Henshaw. 1995. Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato(*Ipomoea batatas*): use of sucrose and dehydration for cryoprotection. *Plant Cell Reports* 15:259-263.
- Brainerd, K.E. and L.H. Fuchigami. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:515-518.
- Brown, C.S., A.C. Schuerger, and J.C. Sager. 1995. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:808-813.
- Bula, R., R.C. Morrow, T.W. Tibbitts, D.J. Barta, R.W. Ignatius, and T.S. Martin.

1991. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience* 26: 203-205.
- Cassells, A.C. and R.D. Long. 1982. The elimination of potato viruses X, Y, S, and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of virazole. *Potato Res.* 25:165-173.
- Clark M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Deogratias, J.M., F. Dosba, and A. Lutz. 1989. Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy and in vitro culture. *Canadian J. Plant Pathology* 11:37-342.
- Englemann, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm—a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Eun, J.S. and Y.S. Kim. 1999. Multiple shoot formation by Apical Meristem Culture in *Ipomoea batatas* Poir. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 26:85-91.
- Eun, J.S., Y.S. Kim, and S. Higashi. 1999. Growth acceleration and acclimatization of in vitro plantlets derived from apical meristem of sweet potato. *Korean J. Plant Tiss. Cult.* 26:115-119.
- Eun, J.S., J.A. Ko, Y.S. Kim, and M.J. Kim. 1997. Micropropagation by apical meristem culture of *Wasabia japonica* Matsum. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 24:43-48.
- Evans, N.E. 1993. A preliminary study on the effects of nitrogen supply on the growth in vitro of 9 potato genotypes (*Solanum* spp.). *J. Expt. Bot.* 44:837-841.
- Fuchigami L.H., T.Y. Cheng, and A. Soeldner. 1981 Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:519-522.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Grout, B.W. and M.J. Aston. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* 17:1-7.
- Henshaw, G.G. 1975. Technical aspects of tissue culture storage for genetic

- conservation. In: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, O.H. Frankel and J.G. Hawkes (Eds.), Cambridge Univ. Press, London and New York. pp.349-357.
- Hildebrandt, E.M. 1960. The feathery mottle virus complex of sweet potato. *Phytopathology* 50:751-757.
- Hirata, K., M. Mukai, S. Goda, M. Ishio-Kinugasa, K. Yoshida, A. Sakai, and K. Miyamoto. 2002. Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration. *Biotechnology Letters* 24:371-376.
- Hirata, K., M. Phunchindawan, S. Goda, T. To, M. Ishio, A. Sakai, and K. Miyamoto. 1998. Cryopreservation of hairy root cultures of horseradish using encapsulation-dehydration. *J. Ferment. Bioeng.* 86:418-420.
- Hoffmann, C.E., E.M. Neumayer, R.F. Haff, and R.A. Goldsby. 1965. Mode of action of the antiviral activity of amantadine in tissue culture. *J. Bacteriol.* 90:623-628.
- Horst, R.K. and D. Cohen. 1980. Amantadine supplemented tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemums free of chrysanthemum stunt viroid. *Acta Horticulturae* 110:315-319.
- IBPGR 1985. IBPGR advisory committee on in vitro storage: A status reports. IBPGR Pub. AGPG: IBPGR/85/213, Rome:1-21.
- Ichi K., S. Izumi, M. Karube, and A. Shinya. 1990. Re-infection of virus-free sweet potato plants and its control. *Kushu Agri. Res.* 52:197
- Ichi, K. 1991. Production and propagation of high quality seeding in sweet potato. *Bio. Hort.* 4:103-108.
- Isac, M. 1986. Obtaining plum varieties free of viruses by *in vitro* technique. *Acta Horticulturae* 193:213-217.
- Ishii, M. 1974. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. *Acta Horticulturae* 36:229-233.
- Ishikawa, M., P. Tandon, M. Suzuki, and A. Yamagishi-Ciampi. 1996. Cryopreservation of bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells using slow prefreezing and vitrification procedures. *Plant Sci.* 120:81-88.
- Janeiro, L.V., A.M. Vieitez, and B. Antonio. 1996. Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axes of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Reports* 15:699-703.

- Jarret, R.L. and N. Gawel. 1991. Chemical and environmental growth regulation of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:153-159.
- Jarret, R.L., S. Salazar, and Z. Fernandez. 1984. Somatic embryogenesis in sweet potato. *HortSci.* 19:397-398.
- Jeong, J.H., D.C. Yang, and K.Y. Paek. 2001. Comparison of ELISA and RT-PCR for efficient diagnosis of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in *Cymbidium hoosai* Makino. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 42:336-340.
- Kartha, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation. In: *Plant Tissue Culture—Method and Application*, T.A. Thorpe(Ed.), Academic Press, Orlando, Florida. pp. 181-211.
- Kawasaki, E.S. 1990. Amplification of RNA. In: *PCR Protocol*. Academic Press, New York. pp. 21-27.
- Kennedy, G.G. and J.W. Moyer. 1982. Aphid transmission and separation of two strains of sweet potato feathery mottle virus from sweet potato. *J. of Economic Entomology* 75:130-133.
- Kim, K.W. and M.S. Byun. 1985. Obtaining of pathogene-free stock and clonal multiplication through the carnation shoot apex culture in vitro. *J. Kor. Soc Hort. Sci.* 36:255-262.
- Kim, M.K., H. Joung, J.H. Jeon, and J.S. Koo. 1991. Effects of various cultural conditions on the formation of sweet potato (*Ipomoea batatas*) in vitro. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 18:345-354.
- Kim, M.S., Y.R. Lee, C.H. Song, B.H. Kim, S.B. Kyun, and J.S. Eun. 1997. Elimination of Odontoglossum Ring Spot Virus (ORSV) from orchid (*Cymbidium* spp) by chemotherapy and thermotherapy. *RDA. J. Crop Protec.* 39:19-24.
- Kim, Y.C., S.B. Kim, and B.H. Hahn. 1983. Eradication of potato virus S and X by repeated in vitro heat treatment combined with meristem apex culture. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 10:1-4.
- Kozai, T., M. Hayashi, and M. Ochiai. 1991. Effect of the sideways lighting on the growth and morphogenesis of potato plantlets in vitro. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 60.(Suppl. 1) pp. 228-229.
- Kozai, T., K. Tanaka, B.R. Jeong, and K. Fujiwara. 1993. Effect of relative

- humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 62:413-417.
- Kozai, T., S. Kushihashi, C. Kubota, and K. Fujiwara. 1992. Effects of the difference between photoperiod and dark period temperature, and photosynthetic photon flux density on the shoot length and growth of potato plantlets in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 61:93-98.
- Kozai, T. and Y. Iwanami 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57:279-288.
- Kozai, T., Y. Iwanami, and K. Fujiwara. 1987. Effects of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. (Environmental control for mass propagation of tissue cultured plantlets(1)). Plant Tiss. Cult. letters. 41:22-26.
- Lee, E.M., H.J. Chung, and Y.B. Lee. 1995. Regeneration of bulblets from bulblet-derived bulb-scales of *Lilium longiflorum*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 22:89-93.
- Lee, E.M., Y.B. Lee, S.W. Ra, I.S. Woo, and T.H. Rho. 1992. Effects of temperature, strength of macronutrients and pH on subculture of plantlets obtained by shoot tip culture of *Fragaria* × *Ananassa* Duch. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 19:1-6.
- Lee, S.Y., J.S. Hong, J.S. Lee, J.K. and Choi. 1996. Detection of cucumber mosaic virus by RT-PCR using a simple and rapid crude sap extraction method. Korean J Plant Pathol. 12:432-436.
- Leidi, E.O., M. Silberbush, and S.H. Lips. 1991. Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. I. Biomass production and mineral composition. J. Plant Nutr. 14:235-246.
- Lim, S., J.H. Seon, B.H. Han, and K.Y. Park. 1998. Effects of light, inorganic salts and growth retardants on the formation in *Lilium*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 17:129-136.
- Litz, R.E. and R.A. Conover. 1978. *In vitro* propagation of sweet potato. HortSci. 13:659-660.
- Liu, J.R. and D.J. Cantliffe. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in

- tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.) Plant Cell Reports 3:112-115.
- Marinho Vera, L.A., J Kummert, G Rufflard, D Colinet, and P. Lepoivre. 1998. Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. Plant disease. 82:785-790.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. 1994. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Report 13:442-446.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of lily by vitrification. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14:237-241.
- Matsumoto, T., C. Takahishi, A. Sakai, and Y. Nako. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. Sci. Hortic. 76:105-114.
- Min, S.R., J.R. Liu, T.H Rho, C.H. Kim, and J.I. Ju. 1994. High frequency embryogenesis and regeneration in tissue cultures of Korean cultivar sweet potatoes. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 21:157~160.
- Mori, K. 1971. Production of virus-free plant by means of meristem culture. Jap. Agri. Res. 6:1-7.
- Morel, G. 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, O.H. Frankel and J.G. Hawkes (Ed.), Cambridge Univ. Press, London and New York, pp. 327-332.
- Morel, G. and C. Martin. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie á virus. Comptes rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences (Paris). 234,1324-1325.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Na, H.Y. and K. Kondo. 1996. Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. Plant Sci. 118:195-201.
- Paek, K.Y. and C.K. Chun. 1985. Effects of pH on the organogenesis and nutrient

- uptake through cymbidium protocorm culture. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 12:1-7.
- Panis, B., N. Totte, K.V. Nimmen, L.A. Withers, and R. Swennen. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. Plant Sci. 121:95-106.
- Park, W.M., K.B. Shim, S.J. Kim, and K.H. Ryu. 1998. Detection of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus by ELISA and RT-PCR from cultivated orchids in Korea. Kor. J. Plant Pathol. 14:130-135.
- Pennycooke, J.C. and L.E. Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L)Lam.] by vitrification. Plant Cell Reports 19:733-737.
- Plessis, P., C. Leddet, A. Collas, and J. Dereuddre. 1993. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration; Effects of pretreatment, cooling and post culture conditions. Cryo-Letters 14:309-320.
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, J. Reinert & Y.P.S. Bajaj (Eds.), New York: Springer-Verlag. pp.598-646.
- Sakai, A. 1985. Cryopreservation of shoot-tips of fruit trees and herbaceous plants, In: Cryopreservation of Plant Cells and Organs, K.K. Kartha (Ed.), CRS Press, Boca Raton, Florida. pp. 135-138.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9:30-33.
- Schaefers, G.A. and E.R. Terry. 1975. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria. Phytopathology 66:642-645.
- Schnapp, S.R. and J.E. Preece. 1986. In vitro growth retardation of tomato and carnation microplants. Plant Cell Tiss. Org. Cult 6:3-8.
- Seibert, M. 1976. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C. Science, N.Y. 191:1178-1179.
- Shim, S.W., S.K. Kim, and K.Y. Paek. 2001. Effects of micro-environmental conditions on organogenesis of 'Beni Izu' grapes. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42(3):238-242.

- Shimonishi, K. 1996. Cryopreservation for embryogenic cultures of subtropical crops. *Tissue Culture* 22(9):371-375.
- Shimonishi, K., M. Karube, and M. Ishikawa. 1993. Cryopreservation of taro (*Colocasia esculenta*) embryogenic callus by slow prefreezing. *J. Jap. Breeding* 43(supplement 2): 187.
- Shimonishi K., M. Karube, and M. Ishikawa. 2000. Cryopreservation of somatic embryos of sweet potato by slow prefreezing method. In: Engelmann F. and Tokagi H. (Eds), *Current Research Progress and Application*. JIRCAS International Agriculture Series No.8, Japan.
- Simpkins, I., D.G. Walkey, and A. Neety. 1980. Chemical suppression of virus in cultivated plant tissue. *Ann. Appl. Biol.* 99:161-169.
- Singha, S. 1982. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* Spp.'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:657-660.
- Shekel, J.J., A.J. Hay, and J.A. Armstrong. 1977. On the mechanism of inhibition of influenza virus replication by amantadine hydrochloride. *J. Gen. Virol.* 38:97-110.
- Smith, E.F., A.V. Roberts, and J. Mottley. 1990. The preparation in vitro of chrysanthemum for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21:141-145.
- Smith, E.F., I. Gribaudo, A.V. Roberts, and J. Mottley. 1992. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. *HortScience* 27:111-113.
- Smith, R.A. 1980 Mechanism of action of ribavirin. In: Smith RA and Kirkpatrick W(Ed.) *Ribavirin*. Academic press, London pp 99-118.
- Sutter, E. and R.W. Langhans. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:493-396.
- Tanaka, K., K. Fujiwara, and T. Kozai. 1992. Effect of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*. *Acta Hort.* 319:145-151.
- Tanaka, M. 1999 The use of light emitting diodes (LED) as a novel light source for micropropagation. *Proceedings of the Korea-Japan Joint Symposium on*

- Transplant Production in Horticultural Plants. 1-2, Nov. 1999, Chungbuk National University, Cheongju, Korea. pp. 43-52.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato *Ipomoea batatas* (L.)Lam.] by vitrification. Plant Cell Reports 11:175-178.
- Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai, and T. Takahashi 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. Plant Cell Reports 8:418-421.
- Wang, R.J. and N.Y. Hu. 1980. Regeneration of virus-free plants through in vitro culture. In: A. Fiechter(Ed), Advances in Biochemical Engineering: Plant Cell Culture II. Springer-Verlag, Berlin. pp. 61-99.
- Wardle, K., E.B. Dobbs, and K.C. Short. 1983. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:308-389.
- Watanabe, H., S. Kawai, T. Yoshino, F. Tanaka, and M. Suzuki. 1996. Light emitting diodes as the light source for plant growth regulations. 3. Flowering regulation of chrysanthemum by irradiating of LEDs in winter. Abstract in autumn of Japan Soc. Hort. pp. 452-453.
- White, P.R. 1943. A handbook of plant tissue culture. Jaques Cattle Press, New York, pp. 239.
- Withers, L.A. and H.E. Street. 1977. The freeze-preservation of plant cell cultures. In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, W. Barz, E. Reinhard, Zenk M.H.(Ed.), Springer-Verlag, Berli. and New York. pp. 226-244.
- Yanagi, T., and K. Okamoto. 1994. Super-bright light emitting diodes as and artificial light source for plant growth. Abstract of The Third Inter. Sympo. Artificial Lighting in Horticulture. pp. 19.
- Yanagi, T., K. Okamoto, and S. Takita. 1996. Effects of blue, red, and red/blue lights of two different PPF levels on growth and morphogenesis of lettuce plants. Acta Hort. 440:117-122.
- Yang, D.C., J.S. Lee, D.W. Kim, Y.P. Lim, and B.H. Min. 1998. Efficient diagnosis of cucumber green mottle mosaic virus in watermelon using RT-PCR and cloning of coat protein gene. Korean J. Plant Tissue Culture. 25:519-524.
- Yoshimatsu, K., H. Yamaguchi, and K. Shimomura. 1996. Traits of *Panax ginseng*

hairy roots after cold storage and cryopreservation. *Plant Cell Reports* 15:555-560.

Zimmerman, T.W. and B.G. Cobb. 1989. Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media gelrite and sucrose concentrations. *Plant Cell Reports* 8:358-360.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.