

## 체세포배발생을 통한 오일팜나무(*Elaeis guineensis* Jacq.) 클론의 기내증식 및 RAPD를 이용한 체세포변이의 검정

안인숙 · 박혜림 · 손성호

### *In vitro* propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clones through somatic embryogenesis and analysis of somaclonal variation by RAPD

In-Suk Ahn · Hye-Rim Park · Sung Ho Son

Received: 30 August 2012 / Accepted: 10 September 2012  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** This study was carried out to develop reliable systems for somatic embryogenesis in oil palm tree (*Elaeis guineensis* Jacq.), and to verify the somaclonal variants by RAPD analysis. Embryogenic callus was induced successfully on modified half-strength MS medium containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and casein. Embryogenic callus was further developed to somatic embryo mass (SEM), which is very hard and bonded tightly each other. Plantlets were proliferated when SEM was cultured on modified MS medium containing half strength  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , casein and L-ascorbic acid. Plantlets were transplanted into pots containing artificial soils. When RAPD analysis was conducted using randomly selected 95 *in vitro* plantlets and 19 random primers, somaclonal variation was detected using BNR35 primer. There was missing band around 1 kb in #22, #28, #35, and #77 plantlets. In addition, bands obtained from #28, #35, and #77 was much stronger than other normal bands. The blast results at NCBI revealed that somaclonal variation observed in this study was related to chloroplast genome of oil palm. The results also revealed that oil palm reproduction system through somatic embryogenesis is quite

reliable and early detection of somaclonal variants seem to be possible at *in vitro* stage by RAPD analysis.

**Keywords** oil palm, *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, somaclonal variation, RAPD

#### 서론

오일팜나무(*Elaeis guineensis* Jacq.)는 열대지역에서 자라는 단자엽식물로서, 경제적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 수종이다. 오일팜나무 열매에서 생산되는 팜오일은 식품, 화장품, 비누, 세제(Park et al. 2010) 등 다양한 제품에 이용되고 있으며, 최근에는 지구온난화의 주범으로 지목받고 있는 화석연료의 대안으로 떠오르고 있는 바이오디젤의 원료(Lam and Lee 2011)로 사용되면서 관심이 집중되고 있다.

지금까지 오일팜나무는 주로 실생묘로서 번식되었다(Kanchanapoom et al. 2010). 그러나, 오일팜나무 실생묘의 경우, 모본의 우수 형질이 자손에게 온전히 전달되지 않으며, 종자 발아율도 낮고, 종자 번식된 개체들 간의 오일 생산량에도 많은 변이를 보이고 있다(Kubis et al. 2003). 또한, 꽃의 형태가 변하는 등 여러 가지 변이가 5~10% 정도의 높은 비율로 나타나고 있어서(Rival et al. 2008) 우수한 형질을 가진 오일팜나무를 대량으로 번식하는 것이 어려운 실정이다. 특히, 오일팜나무는 타가수정을 하는 수종으로서, 영양번식이 어렵기 때문에 그 대안으로서 체세포 배발생이나 액체 현탁배양과 같은 기내 조직배양법이 이용되었다(Gorret et al. 2004). 기내조직배양법을 이용하여 생산된 클론묘는 선발된 품종의 우수한 형질을

I.-S. Ahn · H.-R. Park · S. H. Son  
(주)비트로시스  
(Vitrosys Incorporation, 385-1 Changrak-Ri, Punggi-Eup,  
Yeongju, Gyeongsanbuk-Do, 750-804, Republic of Korea)

S. H. Son (✉)  
동양대학교 생명화학공학과  
(Department of Biochemical Engineering, Dong Yang University,  
Punggi-Eup, Yeongju-Si, Gyeongsangbuk-Do, 750-711, Republic  
of Korea)  
e-mail: vitrosys@hanmail.net

그대로 가지고 있기 때문에 본당 단가가 실생묘의 5~10 배 이상 높은 것으로 알려지고 있다. 따라서, 조직배양법을 이용한 클론묘의 생산은 형질적인 측면에서, 그리고 경제적인 측면에서 매우 중요하다고 생각된다.

오일팜나무의 경우, 대부분의 callus 배양은 고농도의 2,4-D를 요구하고 있다. 그러나, 고농도의 2,4-D가 체세포 변이를 야기(Rival et al. 1997; Matthes et al. 2001) 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 오일팜나무 대량증식에 있어서 체세포 변이를 감소시키거나 억제하는 것은 매우 중요하다. 체세포배 유래 오일팜나무 식물체의 약 5~10%가 비정상적인 화기 구조를 보이는 변이체가 나타나고 있는 것으로 알려지고 있는데(Corley et al. 1986; Tregear et al. 2002), “mantled” 표현형이라고 알려진 이 변이는 암꽃과 수꽃이 동시에 수정이 된다. 비정상적인 수꽃에서는 수술이 carpelloid 구조로 발달하게 되며, 비정상적인 암꽃에서는 staminodes가 pseudocarpel 구조로 발달하여 열매의 발달을 저해하게 되고, 변이 정도에 따라 불임이 되기도 한다. 따라서, 체세포 배발달을 통하여 얻어진 클론이 야외에 식재되기 전에, 비정상적인 개체를 초기 단계에 감지하여 제거할 수 있는 방법이 필요한 상황이다. RAPD (random amplification polymorphic DNA; Rival et al. 1998) 마커나 RFLP(restriction fragments length polymorphism; Jaligot et al. 2002) 마커, 그리고 MSAP(methylation sensitive amplified fragment length polymorphism; Jaligot et al. 2004; Lei et al. 2006) 마커 등이 초기 단계에 “mantled” 표현형을 보이는 오일팜나무를 선별하기 위하여 시도된 바 있다. 또한, *EgM39A*, *EgIAA1*(Morcillo et al. 2006), *EGADI*(Tregear et al. 2002), *EgMET1*, *EgCMT1*, *EgDRM1*(Rival et al. 2008) 등과 같은 유전자와 “mantled” 표현형과의 관련성이 연구되기도 하였다.

식물의 발달 단계에서 DNA methylation이 중요한 역할을 한다는 사실은 이미 알려져 있다(Larkin and Scowcroft 1983). DNA methylation의 변화는 유전자 발현에 영향을 주고, 이는 식물체의 발달과 분화에 영향을 미치게 된다. 조직배양된 오일팜나무에서 발견되는 체세포 변이가 methylation과 관련이 있다는 증거들이 나타나고 있는데, Jaligot 등(2004)은 MSAP 기법을 통하여 체세포 변이와 methylation 변화와의 관련성을 조사하였고, Rival 등(2008)은 DNA-(cytosine-5) methyltransferase(DNMT)의 축적과 “mantled” 표현형과의 연관성을 조사하기도 하였다. 따라서, 오일팜나무의 체세포 변이를 확인하기 위하여 methylation의 변화를 조사하는 것은 매우 유용한 변이체 측정 방법이 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 오일팜나무 기내배양묘로부터 엽원기를 포함한 성장점을 2,4-D가 첨가된 배지에 배양하여 somatic embryogenic mass(SEM)를 유도하고, 이것으로부터 식물체를 분화하여 오일팜나무 기내 대량증식 시스템을

확립하고, RAPD 마커를 통하여 기내 증식된 식물체의 체세포 변이를 초기 단계에서 감지할 수 있는 시스템을 개발하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험에 사용된 오일팜 기내배양묘는 코스타리카의 ASD 사로부터 제공받아 사용하였다. 기내배양묘로부터 엽원기를 포함한 성장점 조직을 분리하여 작은 크기로 절단하여 실험에 사용하였다.

### Embryogenic callus 유도

오일팜나무 성장점으로부터 SEM을 유도하기 위한 배지는  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하지 않은 1/2 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  169.6 mg/L, casein 1000 mg/L를 첨가한 배지를 기본배지로 사용하였으며, 여기에 2,4-D 10 mg/L, 2-iP 0.01 mg/L, 및 500 mg/L charcoal을 첨가하였다. 배지의 pH를 5.7로 조정 후 3 g/L의 gelrite를 첨가하여 121°C, 1.2 기압의 고압멸균기에서 20 분간 멸균하여 사용하였다. 준비된 배지에 엽원기를 포함하는 성장점 조직을 분리하여 작은 크기로 절단하여 배양하고, 28°C로 설정된 배양실에서 6주 간격으로 계대 배양하면서 embryogenic callus를 유도하였다.

### Somatic embryo mass(SEM)으로부터의 신초 분화

SEM으로부터 신초분화를 위한 배지는  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하지 않은 MS 기본배지에 2배의 미량 원소를 첨가하고,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 1/2로 감소시켜 사용하였다. 여기에 1,500 mg/L casein과 100 mg/L L-ascorbic acid를 첨가하였다. 식물생장조절물질로서 NAA를 0.5 mg/L 처리한 배지에 SEM을 배양하여 6주 간격으로 계대배양 하면서 신초분화를 유도하였다.

### 신초의 생장 및 기외 순화

유도된 신초를 기저부로부터 분리한 후,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하지 않은 MS 기본배지에  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 1/3로 감소시키고, 미량 원소가 2배로 증가된 배지에 배양하여 길이 생장을 유도하였다. 길이 생장이 이루어진 신초는 토양으로 옮겨 순화하였다. 기내에서 유도된 오일팜나무 유식물체를 순화하기 위하여 coco pit, vermiculite:perlite=2:1, 원예용 상토의 세 가지 토양을 이용하여 순화를 실시하

였다. 초기 상대습도를 90% 이상으로 조절하면서 차츰 습도를 낮추어 4주간 실시하였다.

### Genomic DNA 분리 및 RAPDs 분석

SEM에서 유도된 신초의 체세포변이를 조사하기 위하여 RAPDs를 수행하였다. 기내에서 증식된 클론 중 건강하고 생장이 양호한 95 개체를 임의로 선발 한 후 시판되는 DNA 추출 키트(DNeasy plant mini kit, Qiagen, Germany)를 사용하여 잎 조직으로부터 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 methylation 민감성 제한효소인 *HpaII*와 *MspI*으로 처리하여 절단하였다. 절단된 genomic DNA를 template DNA로 사용하여 RAPD를 수행하였다. 사용된 random primer는 Bioneer 사(대전, 한국)에서 판매되는 10-mer random primer(BNR)를 사용하였다(Table 1). PCR 증폭산물로부터 Qiagen gel extraction kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 DNA를 회수한 후, sequencing을 실시하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열은 NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### SEM 배양을 통한 오일팜나무의 대량증식

오일팜나무로부터 embryogenic callus를 유도하기 위하여 기내 배양중인 신초를 이용하였다. 오일팜나무의 뿌리와 줄기 연결부위를 절단하여 외부 조직을 제거한 후에 엽원기를 포함한 성장점 조직을 분리하여 배지에 치상하고 배발생 캘러스를 유도하였다. 기내 배양시 최적의 배양 조건을 찾기 위하여 배지의 구성 성분을 조절하기도 하는데, Kim 등(2011)은 딸기 조직배양묘의 대량증식을 위

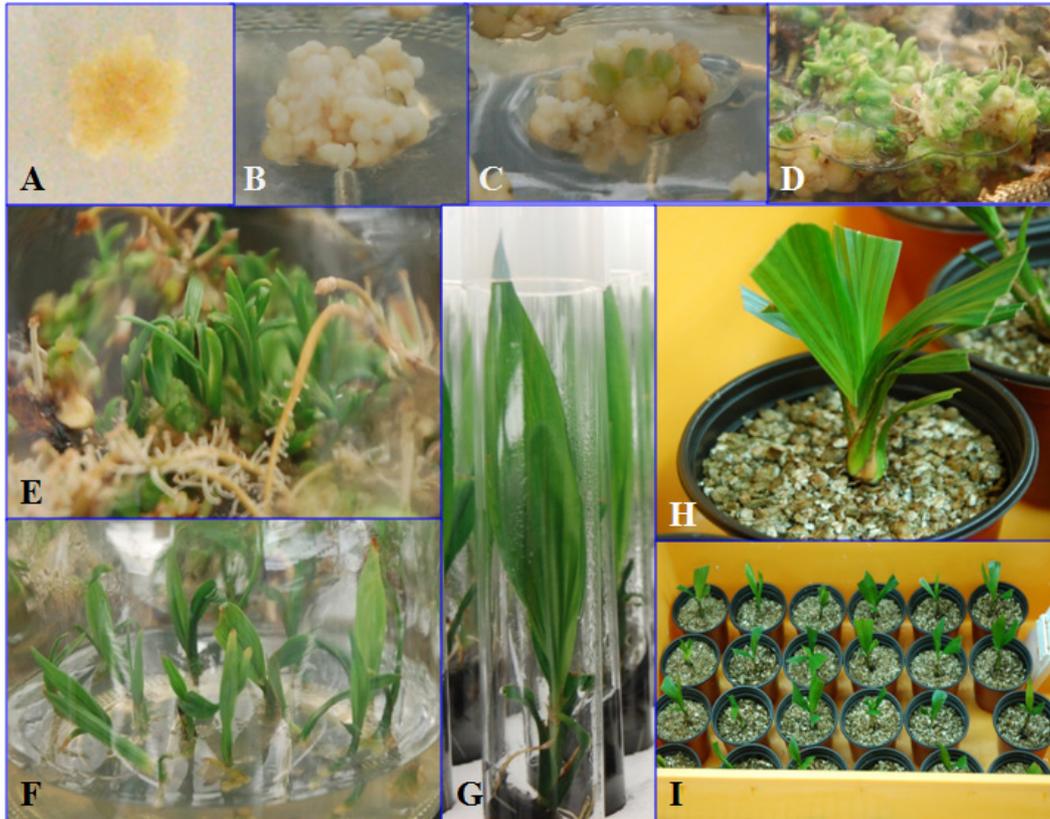
하여 질소질의 종류 및 농도를 다양하게 하여 최적 배양 조건을 조사하였고, 오일팜나무의 경우, Gorret 등(2004)이 질소원의 농도를 조절함으로써 성공적인 생물반응기 배양을 수행한바 있다. 본 연구에서는  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  및 casein을 첨가하고,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 농도를 감소시킴으로써 보다 효과적인 대량생산 시스템을 구축할 수 있었다.

오일팜나무로부터의 캘러스 유도는 다른 식물 종에 비하여 느리게 유도되었으며, 유도된 캘러스의 성장도 느리게 나타났다. 배양 후 처음 3달 동안은 조직의 팽창 정도만 관찰되었으며, 캘러스의 형성은 관찰되지 않았다. 배양 3달이 지나면서 배양 조직으로부터 작은 마이크로캘러스가 관찰되었고, 이후 3~4달의 배양 기간이 지나면서 배발생 캘러스로 발달하였다(Fig. 1A). 팜나무류에서 캘러스 유도는 주로 접합자배를 이용하여 이루어졌다(Gupta et al. 1984; Gabr and Tisserat 1985; Srinivasan et al. 1985; Alang and krishnapillary 1986). 그러나, 이 경우 모본의 우수한 형질이 유지가 되지 않는다는 단점이 있다. 본 연구에서는 엽원기를 포함한 성장점으로부터 배발생 캘러스를 유도함으로써 모본의 형질을 그대로 유지한 클론 묘를 생산할 수 있었다.

오일팜나무에서 유도된 배발생 캘러스의 성장 특성 중 하나는 배발생 캘러스가 mass 형태로 자란다는 것이다. 초기에 유도되는 배발생 캘러스는 부드럽고 쉽게 분리가 되었지만, 캘러스가 성장하면서 단단하게 뭉쳐지는 mass (Somatic Embryo Mass, SEM) 형태로 발달하였다. SEM 상태에서 배발생 캘러스는 서로 단단하게 붙어있어 mass로부터 분리하는 것이 쉽지 않았다. 동백나무의 경우, 초기 배발생 캘러스는 단단하였지만 8주 이상 동일 배지에 배양하면 부드럽고 연한 배발생 캘러스가 증식하는 것으로 보고(Choi et al. 2011) 되었는데, 오일팜나무의 배발생 캘러스는 동백나무에서의 배발생 캘러스와는 다른 형태로 성장하는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 종의 차이에서 기인한 결과일 수도 있을 것이라고 생각된다. 초기 배

**Table 1** 10-mer random primers used for RAPDs analysis

BNR No.	Sequence	BNR No.	Sequence
23	CAGGCGGCGT	38	GGTCCCTGAC
24	TGACGCGCTC	41	ATCGGGTCCG
25	CTGGCGGCTG	46	TTCCCGGAGC
26	TGGGCTCGCT	49	CGGTGGCGAA
27	TGCGCCGCGG	55	GTCACGGACG
28	CCCGCCGTTG	56	GCCATGCACG
29	GACATCTCGC	76	GAGGCCCGTT
30	GCCACCTCCT	78	GGGGTTAGG
35	AGCGGCTAGG	81	TCCCCAGGAG
36	GGGCCGAGG		



**Fig. 1** Somatic embryo mass formation and plantlet proliferation. A, Embryogenic callus induction from apical meristem with a few leaf primordia; B, Somatic embryo mass (SEM) developed from embryogenic callus; C and D, Development of shoot primordia from SEM; E, Development of plantlets; F, Isolation of single plantlet; G, Elongation of plantlet; H and I, Acclimatization of *in vitro* plantlets

**Table 2** Number of shoots proliferated from one SEM

	Shoots > 25 mm*	Shoots < 25 mm
Mean Number of Shoots	31.2±0.99**	11.8±0.97

\*One SEM was multiplied to 5 SEM clumps at the end of proliferation stage, and number of shoots proliferated from each SEM was counted by size.

\*\*Standard Deviation

발생 캘러스 유도는 많은 시간이 소요되지만, 배발생 캘러스가 SEM 형태로 되면 캘러스 유도때와는 달리 빠른 성장을 보였으며, 색도 옅은 노란색에서 흰색에 가까운 색으로 변화하였다(Fig. 1B).

배발생 캘러스에서 유도된 SEM을 신초 유도 배지에 배양하여 신초분화를 유도하였다. 일반적인 체세포 배의 발아나 체세포 조직으로부터의 재분화와 비교하여 SEM으로부터의 신초 분화는 더 긴 시간을 요하였다. 신초 분화 배지에 배양된 후 한 달 정도는 신초 분화 보다는 계속적인 SEM의 생장이 관찰되었다. 첫 번째 계대배양 이후부터 SEM 윗부분에서 녹색의 신초 원기들이 보이기 시작하였고(Fig. 1C, 1D), 몇 번의 계대배양을 통하여 이들은 완전한 신초로 분화하였다(Fig. 1E). 계대 배양이 진

행되는 동안 처음 한 개의 SEM은 몇 개의 SEM으로 증식하였고, 증식과 분화가 동시에 일어났다. 분화된 신초들은 mass에 결합되어 있는 다경줄기군(multiple shoot clump) 형태로 성장하였으며, 뿌리와 줄기가 동시에 발달하였다. SEM의 상태에 따라 조금씩 다른 결과를 보이긴 하였으나, 신초 유도 배지에 배양된 후 4-6개월 사이에 배양된 거의 모든 SEM으로부터 신초 분화가 이루어졌으며, 초기 배양된 한 개의 SEM 당 신장 배지로 계대가 가능한 25 mm 이상의 신초 수는 평균 31.2±0.99개였다(Table 2).

오일팜나무에서 식물체 재분화는 주로 캘러스 배양이나 현탁배양을 통하여 이루어지지만, 캘러스나 현탁배양된 세포의 생장이 매우 느리기 때문에(Kanchanapoom et al. 2010) 캘러스 성장 및 식물체 재분화를 촉진시키기 위

하여 배지 및 성장조절물질에 대한 적정농도 구명이 필요하다. 따라서 효과적인 캘러스 생장 및 식물체 재분화를 위하여 배지의 수정 및 성장조절물질의 변화가 시도되었다. 본 연구에서는 MS 배지를 기본으로 하여 첨가되는 영양 성분들의 양을 가감함으로써 최적의 배양 조건을 찾아낼 수 있었다. 캘러스로부터 식물체를 분화시키기 위하여 사이토키닌(cytokinins)이 주로 사용된다. 그러나, 오일팜나무의 경우 사이토키닌을 사용하게 되면 변이체 비율이 높아지는 경향이 있다. Zeatin이 신초 분화에 효과적이기는 하지만, 유도된 신초가 모두 변이체라는 보고도 있다(personal communication with Dr. Nidia, ASD, Costa Rica). 본 연구에서는 오일팜나무 식물체 분화에 사이토키닌을 사용하지 않고 오옥신으로서 NAA를 저농도로 처리함으로써 SEM으로부터 다경줄기균을 유도할 수 있었다.

다경줄기균에서 분화된 신초들을 분리하여 줄기 신장 배지에 배양하였다(Fig. 1F). 줄기 신장 배지에 배양된 신초들은 신초 분화 단계에서 뿌리와 줄기가 함께 발달하였기 때문에 발근을 위한 특별한 처리는 필요하지 않았다. 줄기 신장 배지에 배양된 대부분의 신초들은 약 2개월의 생장 기간 동안 순화 가능한 신초로 발달하였다(Fig. 1G). 분화된 신초 간에는 뿌리 발달에 차이를 보였는데, 주근과 측근이 모두 잘 발달한 뿌리가 있는 반면, 주근만 길게 자라고 측근이 전혀 발달하지 않는 개체들도 있었다. 이 중에서 뿌리 발달이 좋은 기내 오일팜나무를 이용하여 기외 순화를 실시하였다. 오일팜나무의 순화는 다른 식물체의 순화와 비교하여 비교적 용이하였으며, 대부분의 개체들이 큰 어려움 없이 순화되었다(Fig. 1H, 1I). 오일팜나무의 경우 토양 수분이 순화에 매우 중요한 작용을 하였는데, 토양 수분이 적으면 오일팜나무는 건조하여 잎이 마르는 현상이 나타났지만, 토양 수분이 충분하면 건조 현상은 잘 나타나지 않았다. 순화에 사용된 세 가지 다른 인공토양은 순화에 큰 영향을 미치지 않았다. 이는 토양 수분이 충분할 경우 인공토양의 종류는 순화에 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 판단되었다.

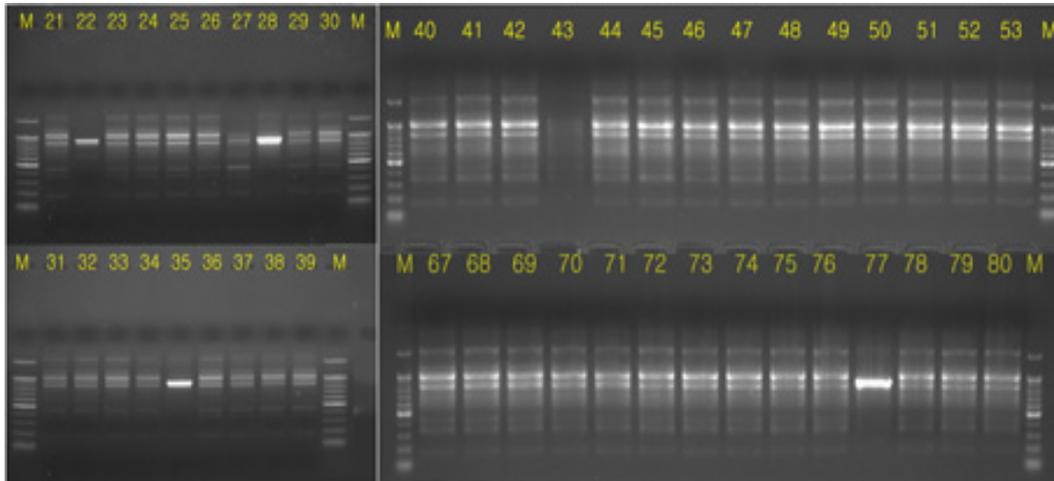
#### 오일팜나무 클론묘의 체세포 변이 검정

체세포배 유래 오일팜나무 식물체의 경우 5% 정도가 비정상적인 화기 구조를 보이는 것으로 알려져 있기 때문에(Jaligot et al. 2002), 본 연구는 오일팜나무 클론을 포지에 식재하기 전인 조직배양 단계에서 변이체를 확인할 수 있는 기술을 개발하고자 시도되었다. 변이체를 확인하는 방법에는 여러 가지가 있다. 고전적인 방법으로 온실이나 포지에 식재한 후에 성장하면서 나타나는 표현형의 변이를 관찰할 수도 있으나, 이 경우 시간이 많이 걸리고, 모든 조직배양묘를 식재해야 하기 때문에 넓은 식

재지가 요구된다. 반면 분자수준에서의 방법은 짧은 시간에 변이체를 확인할 수 있는 장점이 있지만, 경우에 따라 변이의 종류를 알기 어려운 경우도 있다. 따라서, 이 경우 변이체 확인 후 온실에 식재하여 표현형으로 나타나는 변이를 확인하는 단계를 한번 더 거쳐야 할 필요성이 생기기도 한다. 그러나 이미 분자 마커가 개발된 경우라면 분자수준에서의 변이체 확인법은 매우 유용한 변이체 확인법이 될 수 있을 것으로 판단된다. 오일팜나무의 경우 아직 정확한 분자 마커가 개발되지 않은 상태이기 때문에 후자의 방법을 택하여 먼저 DNA 수준에서 변이체를 확인하고, 포지 식재 후에 나타나는 형질을 비교하여 표현형과의 관련성을 확인하고자 하였다.

오일팜나무에서 발견되는 많은 변이가 DNA 상의 methylation 변화에 의한 유전자의 발현·비발현에 기인한다고 알려져 있다(Jaligot et al. 2002; Chan et al. 2005). 따라서, 본 연구에서는 SEM에서 분화된 개체를 이용하여 methylation의 변화를 RAPD를 이용하여 조사하였다. 총 19개의 random primer를 사용하여 95 개체에 대한 RAPD를 수행한 결과, *HpaII*로 처리된 genomic DNA를 이용한 분석에서는 모든 primer에서 동일한 밴드 형태를 보여 어떠한 변이도 감지할 수 없었다. *MspI*으로 절단된 genomic DNA를 이용한 분석에서도 대부분의 primer에서 변이를 발견할 수 없었다. 그러나, BNR36 primer로 PCR을 수행하였을 때, 개체 간 차이를 보이는 밴드 형태를 나타내었다. 1kb 부근에서 대부분의 개체(90 개체)는 뚜렷한 2개의 밴드를 가진 반면, #22, #28, #35, #77번의 4 개체에서는 밴드 하나가 사라진 하나의 밴드만이 관찰이 되었다. 또한, #28과 #35, #77번의 경우 하나의 밴드 강도가 월등히 강하게 나타났(Fig. 2). #27번 개체의 경우, 밴드의 강도가 조금 약하게 나왔으나, 전체적인 밴드 패턴은 정상적인 90 개체와 동일하였기 때문에 변이체로 판단하기에는 무리가 있는 것으로 여겨졌다.

본 연구의 결과는 Jaligot 등(2004)이 MSAP 방법을 이용하여 동일 클론 유래 자손 개체 간의 변이를 감지할 수 있었던 결과와 동일하다. 그러나, Thawaro 와 Te-chato (2009)는 기내 증식된 오일팜나무에서 야기될 수 있는 체세포변이를 RAPDs와 SSRs 마커를 이용하여 감지하려고 하였으나 어떠한 차이도 감지하지 못하였다. 이러한 결과의 차이는 변이를 감지하기 위한 방법의 차이에 기인한 것으로 보여진다. 본 연구와 Jaligot 등(2004)은 PCR 증폭 전에 methylation 민감성 제한효소로 genomic DNA를 절단한 후 template DNA로 사용하였으나, Thawaro와 Te-chato(2009)는 제한효소 절단 없이 genomic DNA를 template DNA로 사용하였기 때문에 그러한 결과를 얻은 것으로 사료된다. Lei 등(2006) 역시 동일한 결과를 보여주었는데, AFLP 수행 전에 methylation 민감성 제한효소를 사용함으로써 기내 배양 유래 재분화체에서 변이를



**Fig. 2** RAPD patterns of plantlets derived from SEM. RAPD analysis was conducted using BNR36 primer. The amplification products were compared on the basis of molecular size. Lane M, 100 bp DNA ladder (NEB); Other lanes, plantlets used for RAPD analysis

감지할 수 있었다. 따라서 오일팜나무의 변이체 감지 방법에 있어서 methylation의 변화를 확인하는 것은 매우 중요하다고 볼 수 있을 것이다.

본 분석에 사용된 methylation 민감성 제한효소인 *HpaII*와 *MspI*은 동일한 염기서열(5'-CCGG-3')을 절단하지만, methylation 되는 cytosine의 위치에 따른 민감성은 다르다 (Butkus et al. 1987; McClelland et al. 1994). *MspI*의 경우 안쪽의 C가 methylation 되었을 때 절단하고 바깥쪽 C가 methylation 되었을 때는 절단하지 않지만, *HpaII*는 바깥쪽의 C가 hemimethylation 되었을 때 절단한다. 즉, DNA 이중나선 중에서 어느 한쪽의 C가 methylation 되었을 때 DNA를 절단하게 된다. 따라서, 본 연구에서 확인된 변이체의 경우 CCGG의 염기서열 중 안쪽의 cytosine에서 methylation의 변화(새로이 methylation 되었거나 또는 methylation에서 해제됨)가 있었다고 생각할 수 있으며, 이로 인하여 *HpaII*로는 감지되지 않은 변이가 *MspI*에 의하여 감지되었다고 판단된다.

#35번 개체에서 관찰된 1 kb 부근의 밴드를 Qiagen gel extraction kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 DNA를 회수한 후 sequencing을 실시하였다. Sequencing으로 얻어진 염기서열을 NCBI 검색을 통하여 분석한 결과, 오일팜나무 (*Elaeis guineensis* Jacq.)의 엽록체 DNA 및 *Elaeis oleifera*의 23S rRNA 유전자와 99% 상동성을 보였다(Fig. 3). 이 결과는 본 연구에서 확인된 변이체가 엽록체와 관련이 있다고 추정해볼 수 있을 것이나, 정확한 형태적 변이의 판단은 차후 본 변이체를 포지에 식재하여 성장하는 양상을 관찰함으로써 가능할 것이다.

본 연구 결과, 기내 상태에서 오일팜나무 클론모는 methylation의 유무를 조사함으로써 변이를 감지할 수 있다는 가능성을 보여 주었다. 차후 본 연구에서 확인된 변이체를 야외에 식재할 계획에 있으며, 성장양상을 관찰

함으로써 위에서 확인된 DNA 상의 변이와 형태적 변이의 연관성을 확인할 예정이다.

## 적 요

본 실험은 오일팜나무에서 somatic embryo mass(SEM)를 유도한 후 이로부터 식물체 분화를 통한 클론모 대량증식 시스템을 확립하고, 기내 배양에 의하여 야기된 체세포 변이의 확인 방법을 확립하기 위하여 수행되었다. 오일팜 조직배양묘의 정단 부분을  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 카제인이 첨가된 1/2MS 수정 배지에 배양하여 체세포배성 캘러스를 유도하였다. 유도된 체세포배성 캘러스는 몇 번의 계대배양을 통하여 SEM으로 발달하였다. SEM 조직은 단단하며, 강하게 붙어있어서 개개의 체세포배를 따로 분리하는 것이 매우 어려웠다. SEM 조직을  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 카제인, L-ascorbic acid가 첨가된 MS 수정 배지에 배양하였을 때 신초가 성공적으로 분화하였다. 기내 오일팜나무를 야외로 순화하여 완전한 오일팜나무 클론모를 획득할 수 있었다. 기내 배양묘 중 건강하고 생장이 양호한 신초를 무작위로 95 개체를 선발하여 RAPD 분석을 실시하였다. 총 19개의 random primer를 사용하여 95 개체에 대한 RAPD를 수행한 결과, 대부분의 primer에서는 동일한 밴드 형태를 보여 어떠한 변이도 감지할 수 없었다. 그러나, *MspI*으로 절단된 genomic DNA를 BNR36 primer로 PCR을 수행하였을 때, 개체 간 차이를 보이는 밴드 형태를 나타내어 체세포변이를 감지할 수 있었다. 95 개체 중 #22, #28, #35, #77의 4 개체에서 약 1kb 부근의 밴드 하나가 없었으며, 그 중 #28, #35, #77의 밴드 강도는 정상 밴드보다 월등히 강한 것을 확인하였다. NCBI 분석 결과, 이 변이 밴드는 오일팜나무의 엽록체 게놈과 관련이 있는

Sequences	CCCAGGGATGGAGGAGGCTAGGTTAGCCGAAAGATGGTTATCGGTTCAAGGACGCAAGG	63
JF274081.1	CCCAGGGGACGGAGGAGGCTAGGTTAGCCGAAAGATGGTTATCGGTTCAAGGACGCAAGG	107765
EU016908.1	CCCTAGGGACGGAGGAGGCTAGGTTAGCCGAAAGATGGTTATCGGTTCAAGGACGCAAGG	1499
Sequences	TGACCTGCTTTTTCAGGGTAAGAAGGGGTAGAGGAAATGCCTCGAGCCAATGCCCGAGT	123
JF274081.1	TGACCTGCTTTTTCAGGGTAAGAAGGGGTAGAGGAAATGCCTCGAGCCAATGCCCGAGT	107825
EU016908.1	TGACCTGCTTTTTCAGGGTAAGAAGGGGTAGAGGAAATGCCTCGAGCCAATGCCCGAGT	1559
Sequences	ACCAGGCGCTACGGCGTTGAAGTAACCCATGCCATACTCCAGGAAAAGCTCGAACGACC	183
JF274081.1	ACCAGGCGCTACGGCGTTGAAGTAACCCATGCCATACTCCAGGAAAAGCTCGAACGACC	107885
EU016908.1	ACCAGGCGCTACGGCGTTGAAGTAACCCATGCCATACTCCAGGAAAAGCTCGAACGACC	1619
Sequences	TTCAACAAAAGGGTACCTGTACCCGAAACCGACACAGGTGGGTAGGTAGAGAATACCTAG	243
JF274081.1	TTCAACAAAAGGGTACCTGTACCCGAAACCGACACAGGTGGGTAGGTAGAGAATACCTAG	107945
EU016908.1	TTCAACAAAAGGGTACCTGTACCCGAAACCGACACAGGTGGGTAGGTAGAGAATACCTAG	1679
Sequences	GGGCGGAGACAACCTCTCTAAGGAACTCGGCAAAATAGCCCGTAACTTCGGGAGAAG	303
JF274081.1	GGGCGGAGACAACCTCTCTAAGGAACTCGGCAAAATAGCCCGTAACTTCGGGAGAAG	108005
EU016908.1	GGGCGGAGACAACCTCTCTAAGGAACTCGGCAAAATAGCCCGTAACTTCGGGAGAAG	1739
Sequences	GGGTGCCTCCTCACAAGGGGTCGCAGTGACAGGCCGGGCGACTGTTTACAAAAAC	363
JF274081.1	GGGTGCCTCCTCACAAGGGGTCGCAGTGACAGGCCGGGCGACTGTTTACAAAAAC	108065
EU016908.1	GGGTGCCTCCTCACAAGGGGTCGCAGTGACAGGCCGGGCGACTGTTTACAAAAAC	1799
Sequences	ACAGGTCTCCGAAAAGTCGTAAGACCATGTATGGGGGTGACGCCTGCCAGTGCCGGAA	423
JF274081.1	ACAGGTCTCCGAAAAGTCGTAAGACCATGTATGGGGGTGACGCCTGCCAGTGCCGGAA	108125
EU016908.1	ACAGGTCTCCGAAAAGTCGTAAGACCATGTATGGGGGTGACGCCTGCCAGTGCCGGAA	1859
Sequences	GGTCAAGGAAGTTGGTGACCTGATGACAGGGGAGCCGGGACCGAAGCCCGGTGAACGG	483
JF274081.1	GGTCAAGGAAGTTGGTGACCTGATGACAGGGGAGCCGGGACCGAAGCCCGGTGAACGG	108185
EU016908.1	GGTCAAGGAAGTTGGTGACCTGATGACAGGGGAGCCGGGACCGAAGCCCGGTGAACGG	1919
Sequences	CGGCCGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTTCCGACCCG	543
JF274081.1	CGGCCGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTTCCGACCCG	108245
EU016908.1	CGGCCGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCCGGTAAGTTCCGACCCG	1979
Sequences	CACGAAAGGCGTAACGATCTGGGCACTGTCTCGGAGAGAGGCTCGGTGAAATAGACATGT	603
JF274081.1	CACGAAAGGCGTAACGATCTGGGCACTGTCTCGGAGAGAGGCTCGGTGAAATAGACATGT	108305
EU016908.1	CACGAAAGGCGTAACGATCTGGGCACTGTCTCGGAGAGAGGCTCGGTGAAATAGACATGT	2039
Sequences	CTGTGAAGATGCGGACTACCTGCACCTGGACAGAAAGACCCTATGAAGCTTTACTGTTC	663
JF274081.1	CTGTGAAGATGCGGACTACCTGCACCTGGACAGAAAGACCCTATGAAGCTTTACTGTTC	108365
EU016908.1	CTGTGAAGATGCGGACTACCTGCACCTGGACAGAAAGACCCTATGAAGCTTTACTGTTC	2099
Sequences	CTGGGATTGGCTTTGGGCTTTCTTGCAGCTTAGGTGGAAGGCAAGAAGGCCTCCTT	723
JF274081.1	CTGGGATTGGCTTTGGGCTTTCTTGCAGCTTAGGTGGAAGGCAAGAAGGCCTCCTT	108425
EU016908.1	CTGGGATTGGCTTTGGGCTTTCTTGCAGCTTAGGTGGAAGGCAAGAAGGCCTCCTT	2159
Sequences	CCggggggCCCGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTGGAAGAGCTAGAATTCTAACCTTG	783
JF274081.1	CCGGGGGGCCCGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTGGAAGAGCTAGAATTCTAACCTTG	108485
EU016908.1	CCGGGGGGCCCGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTGGAAGAGCTAGAATTCTAACCTTG	2219
Sequences	TGTCAG-ACCTACGGCCAAGGGACAGTCTCATGTAGACAGTTTCTATGGGGCGTAGGCC	842
JF274081.1	TGTCAGGACCTACGGCCAAGGGACAGTCTCAGTAGACAGTTTCTATGGGGCGTAGGCC	108545
EU016908.1	TGTCAGGACCTACGGCCAAGGGACAGTCTCAGTAGACAGTTTCTATGGGGCGTAGGCC	2279
Sequences	TCCCAAAAGGTAACGGAGGCGTGCAAAGGTTTCTCTCGGG	881
JF274081.1	TCCCAAAAGGTAACGGAGGCGTGCAAAGGTTTCTCTCGGG	108584
EU016908.1	TCCCAAAAGGTAACGGAGGCGTGCAAAGGTTTCTCTCGGG	2318

**Fig. 3** Sequence alignment of the target, *Elaeis guineensis* chloroplast genome, and *Elaeis oleifera* 23S ribosomal RNA (rrn23) gene. Sequences, Nucleotide sequences of the band obtained from #35 plantlet; JF274081.1, *Elaeis guineensis* chloroplast complete genome; EU016908.1, *Elaeis oleifera* 23S ribosomal RNA (rrn23) gene, partial sequence

것으로 확인되었다. 본 연구 결과로부터 오일팜나무의 클론모 대량증식 시스템을 확립할 수 있었고, RAPD 분석을 통하여 기내 상태에 있는 조직배양묘의 체세포 변이 여부를 판별할 수 있는 방법 확립할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 지식경제부 신재생에너지융합원천기술개발사업(과제번호: 1415116711)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Alang Z, Krishnapillary B (1986) Studies on the growth and development of embryos of the sago palm (*Metroxylon* sp.) *in vitro* and *in vivo*. Proceeding of Third International Sago Symposium, Tokyo, pp 121-120
- Butkus V, Petrauskienė L, Maneliene Z, Klimasaukas S, Laucys V, Janulaitis A (1987) Cleavage of methylated CCCGGG sequences containing either N4-methylcytosine or 5-methylcytosine with *MspI*, *HpaII*, *SmaI*, *XmaI* and *CfrI* restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 15:7091-7102
- Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 6:351-360
- Choi JH, Kwon SY, Choi PS (2011) Anomalous somatic embryos formation and plant regeneration from the cultures of immature embryos of *Camellia japonica* L. *J Plant Biotechnol* 38: 258-262
- Corley RHV, Lee CH, Law LH, Wong CY (1986) Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter (Kuala Lumpur)* 62:233-240
- Gabr MF, Tisserat B (1985) Propagation palms *in vitro* with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* 25:255-262
- Gorret N, bin Rosli SK, Oppenheim SF, Willis LB, Lessard PA, Rha C, Sinskey AJ (2004) Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen sources, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *J Biotechnol* 108:253-263
- Gupta PK, Kendurkar SV, Kulkarni VM, Shirgurkar MV, Mascarenhas AF (1984) Somatic embryogenesis and plant from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Rep* 3:222-225
- Jaligot E, Beulé T, Baurens FC, Billotte N, Rival A (2004) Search for methylation-sensitive amplification polymorphic associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 47:224-228
- Jaligot E, Beulé T, Rival A (2002) Methylation-sensitive RFLPs: Characterisation of two oil palm markets showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theor Appl Genet* 104: 1263-1269
- Kanchanapoom K, Phongdara A, Kanchanapoom K (2010) The effect of chitosan on the organogenesis of oil palm embryo-derived callus. *Not Bot Hort Agrbot Cluj* 38:213-217
- Kim HJ, Lee JN, Kim KD, Im JS, Lim HT, Yeoung YR (2011) Suitable hormone-free medium for *in vitro* mass propagation via bioreactor culture of ever-bearing strawberry. *J Plant Biotechnol* 38:221-227
- Kubis SE, Castilho AMMF, Vershinin AV, Heslop-Harrison JS (2003) Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol Biol* 52: 69-79
- Lam MK, Lee KT (2011) Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win-win strategies toward better environmental protection. *Biotechnol Adv* 29:124-141
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1983) Somaclonal variation and crop improvement. In: Kosuge T, et al. Genetic engineering of plants: an agricultural perspective. New York, NY: Plenum, 289-314
- Lei CP, Jiun KS, Choo CS, Singh R (2006) Analysis of tissue culture-derived regenerants using methylation sensitive AFLP. *Asia Pacific J Mol Bio Biotechnol* 14:47-55
- Matthes M, Singh R, Cheah SC, Karp A (2001) Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor Appl Genet* 102:971-979
- McClelland M, Nelson M, Raschke E (1994) Effect of site-specific modification on restriction endonuclease and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 22:3640-3659
- Morcillo F, Gagneur C, Adam H, Richaud F, Singh R, Cheah SC, Rival A, Duval Y, Tregear JW (2006) Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. *Tree Physiol* 26:585-594
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Park JK, Oh KI, Sulaiman J (2010) All things about palm oil. pp 56-102
- Rival A, Bertrand L, Beulé T, Combes MC, Trouslot P, Lashermes P (1998) Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm. *Plant Breeding* 117:73-76
- Rival A, Beulé T, Barre P, Hamon S, Duval Y, Noirot M (1997) Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep* 16:884-887
- Rival A, Jaligot E, Beulé T, Finnegan EJ (2008) Isolation and expression analysis of genes encoding MET, CMT, and DRM methyltransferases in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in relation to the 'mantled' somaclonal variation. *J Exp Bot* 59:3271-3281
- Srinivasan C, Litz RE, Barker J, Norstog K (1985) Somatic embryogenesis and plantlet formation from Christmas palm callus. *Hort Sci* 20(20):278-280

- Thawaro S, Te-chato S (2009) Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated in vitro. *ScienceAsia* 35:142-149
- Tregear JW, Morcillo F, Rich명 F, Berger A, Singh R, Cheah SC, Hartmann C, Rival A, Duval Y (2002) Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *J Exp Bot* 53: 1387-1396