

## 멜론(*Cucumis melo* L.) 유묘 절편으로부터 고빈도의 체세포배발생과 식물체 재분화

최필선<sup>1,2</sup> · 소응영<sup>2</sup> · 조덕이<sup>3</sup> · 유장렬<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실,

<sup>2</sup>전북대학교 생물학과, <sup>3</sup>전주 우석대학교 생물학과

## High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Seedling Explant Cultures of Melon (*Cucumis melo* L.)

Pil S. CHOI<sup>1,2</sup>, Yoong Y. SOH<sup>2</sup>, Duck Y. CHO<sup>3</sup>, and Jang R. LIU<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Biological Resources Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 17,

Taedok Science Town, Taejeon, 305-660; <sup>2</sup>Department of Biology, Chonbuk National University,

Chonju, 560-756; and <sup>3</sup>Department of Biology, Chonju Woosuk University, Chonbuk, 565-800. \*Corresponding author.

Cotyledonary and hypocotyl explants of melon seedlings were cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with various concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzyladenine (BA). Up to 22% of cotyledonary explants and 7% of hypocotyl explants, respectively, produced somatic embryos through intervening two types of calli: bright yellow compact (BYC) callus and pale-yellow compact (PYC) callus. BYC callus was capable of producing somatic embryos at initial culture, but it became necrotic as subcultures proceeded. In contrast, PYC callus was incapable of producing somatic embryos during initial culture (first 6 weeks), but it became bright-yellow friable (BYF) callus with forming a few globular embryos after 2 months of subculture, indicating that the callus turned embryogenic. The embryogenic capacity of BYF maintained for over one year when the callus was subcultured at 4-week intervals. Upon transfer onto MS basal medium, the callus gave rise to numerous somatic embryos and subsequently converted to plantlets. Plantlets were transplanted to potting soil and grown to maturity in the phytotron.

**Key words:** cotyledonary explants, embryogenic callus, hypocotyl explants

멜론은 박과에 속하는 일년생 초본이며, 세계 여러 지역에서 재배되고 있는 중요한 경제작물중의 하나이다. 기내재분화는 기관발생이나 체세포배발생을 통해 이루어지는 것이 모두 가능하다(Punja et al., 1990). 특히 Blackmon(1981)에 의해 멜론의 체세포배발생에 대한 연구가 처음으로 이루어진 이후 중요한 품종에서 몇몇 연구자들에 의해 재분화가 보고되었다(Young et al., 1983; Moreno et al., 1985a;

Branchard and Chateau, 1988; Debeaujon and Brachard, 1991; Kageyama, 1991; Tabei et al., 1991; Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993). 이들 대부분의 보고에서는 조직절편으로부터 직접 또는 배발생 캘러스를 거쳐 체세포배를 유도하는 간접적인 방법으로 체세포배를 유도하였다. 그러나 장기간 안정적으로 체세포배를 생산할 수 있는 배발생 캘러스 선발에 대하여 자세하게 언급한 보고는 없었다. 따

라서 본 연구에서는 계대배양을 통하여 체세포배 생산 능력을 오랫동안 유지할 수 있는 캘러스의 선발방법과 이를 이용한 식물체의 대량생산 시스템을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

멜론(*Cucumis melo* L. cv Crugar) 종자를 70% 에탄올에 1분, 1% sodium hypochlorite 용액에 10분 처리하여 표면살균한 후 멸균수로 3-5회 수세하였다. 이들 종자를 멸균된 여과지로 물기를 제거한 후, MS 기본배지를 담은 페트리 디쉬에 용기당 9개씩 치상하여 5일동안 발아시켰다. 전체실험을 통하여 특별한 언급이 없는 한 배지는 플라스틱 페트리 디쉬(87×15 mm)에 25 mL씩 담아서 사용하였으며 배양은 25°C 암소에서 행하였다. 길이가 약 20 mm 정도된 유묘로부터 자엽과 배측부위를 취하여 자엽은 횡단으로 절반이 되도록 잘랐으며, 배측은 5 mm 길이로 절단하여 이들 각각을 절편으로 사용하였다.

배발생 캘러스와 체세포배를 유도하기 위하여 자엽과 배측을 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 10, 20 및 30 mg/L 2,4-D 단독처리와 4 mg/L 2,4-D와 0.1, 0.5, 1 및 2 mg/L BA 그리고 0.1 mg/L BA와 0.1, 0.5, 1, 2 및 4 mg/L 2,4-D를 각각 조합으로 첨가한 MS 배지에 치상하였다. 배발생 캘러스와 체세포배 형성 빈도는 자엽과 배측 모두 성장조절제 조합당 50개 이상을 대상으로 배양 6주경과 하였을 때 조사하였다. 또한 오랫동안 안정적으로 체세포배를 생산하기 위한 배발생 캘러스를 선발하기 위하여 상기의 각 처리구중 체세포배와 배발생 캘러스 형성빈도가 가장 높았던 4 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BA 조합에서 형성된 두가지 캘러스 즉, 연한 노란색의 단단한 캘러스와 진노란색의 단단한 캘러스를 0.1, 0.5 및 1 mg/L 2,4-D 단독처리와 4 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA가 첨가된 배지에 옮겨 4주 간격으로 계대배양하면서 주기적으로 해부현미경하에서 캘러스의 변화를 관찰하였으며, 체세포배를 대량으로 생산할 수 있는 배발생 캘러스 선발을 시도하였다.

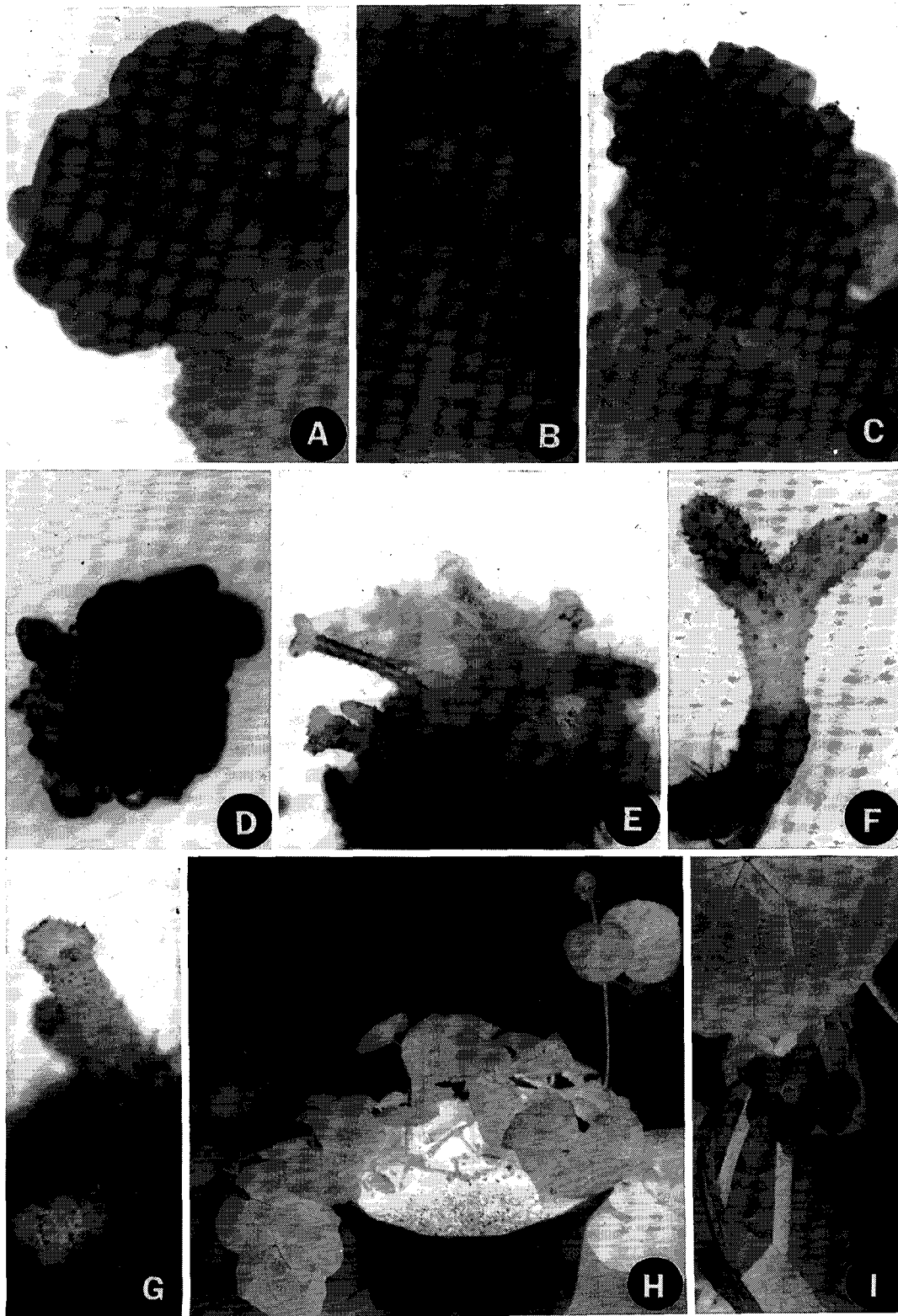
식물체 재분화를 위해 선발된 배발생 캘러스는 MS 기본배지에 옮겨 3주간 명조건(cool-white 형광등, 약 1,000 lux, 16시간 광주기)에서 배양하였다. 자엽기의 체세포배를 다시 동일배지가 들어있는 배양병(5×10 cm)에 옮겨 유식물체로 키웠으며, 이러한 유식물체를 화분에 이식한 후 생육상에서 생장시켰다.

## 결 과

치상된 자엽과 배측에서 배양 1주 경과후, 절편으로부터

캘러스형성은 일어나지 않고 약간의 신장이 일어났으며, 배양 2주째부터 절단면으로부터 캘러스가 형성되기 시작하였다. 일반적으로 2,4-D가 단독으로 첨가된 배지에서는 솜같은 흰색의 캘러스와 부정근이 형성되었으나 이들 처리구에서는 배발생 캘러스나 체세포배가 관찰되지 않았다. 6주후 2,4-D가 저농도(0.1과 0.5 mg/L)인 처리구에서는 절편당 약 6개의 가늘고 긴뿌리와 굵고 짧은 뿌리의 부정근이 유도되었으며, 약간의 캘러스가 형성되었지만 이들 캘러스는 갈변되어 괴사하였다. 또한 1-4 mg/L 2,4-D 농도를 처리하였을 때는 흰색의 캘러스만이 왕성하게 증식되었고, 고농도인 10-30 mg/L 처리시에는 캘러스는 거의 형성되지 않고 조직 절편이 점차 갈변되어 괴사하였다(테이더 미제시). 반면 2,4-D와 BA가 조합된 배지에서는 배양 2주째부터 연한 노란색과 진한 노란색의 단단한 캘러스가 느리게 성장하면서 형성되었으며, 6주후 이중 연한 노란색의 캘러스는 표면으로부터 직접 체세포배를 형성하여 이 캘러스를 배발생 캘러스로 간주하였다(Figure 1A, B). 이러한 캘러스의 형성 빈도는 성장조절제 조합에 따라 최저 6%에서 최고 22%였으며, 특히 4 mg/L 2,4-D+1 mg/L BA 그리고 2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L BA가 각각 조합 하였을 때 가장 높았고 배측보다는 자엽절편에서 약 15배 높은 빈도의 체세포배와 배발생 캘러스가 형성되었다(Figure 2). 그러나 그 빈도는 약 20%로 낮고 계대배양동안 점차 갈변되어 괴사하였기 때문에 계대배양하면서 체세포배를 생산하는 데에는 적합하지 않았다.

한편 진노란색의 캘러스는 체세포배를 형성하지 않았지만 외부형태적으로는 배발생 캘러스와 매우 유사하였다. 따라서 초기배양(6주)결과 적합한 배발생 캘러스를 얻지 못하였다. 그러나 4 mg/L 2,4-D+1 mg/L BA가 조합첨가된 배지에서 6주경과후 유도된 진한 노란색의 단단한 캘러스를 동일배지와 여러가지 농도의 2,4-D를 단독처리한 배지에 옮겨 1달간격으로 계대배양하면서 3달동안 배발생 캘러스를 선발한 결과, 2,4-D와 BA가 조합된 배지에서는 외부형태적으로 새로운 캘러스가 형성되지 않았으며 성장속도가 상대적으로 대단히 느리고 체세포배 형성빈도도 낮았다. 그러나 2,4-D가 단독으로 첨가된 배지에서는 1달 경과후부터 점차적으로 부서지기 쉬운 연한 노란색의 캘러스(Figure 1C)가 형성되기 시작하여 2개월 정도되었을 때에는 왕성하게 증식하였으며, 이러한 캘러스는 구상형 또는 드물게 심장형 체세포배를 형성하였다(Figure 1D). 특히 0.5와 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 약 75% 빈도로 형성되었다(Figure 3). 이러한 캘러스는 동일조건에서 1년이상 체세포배 생산능력을 유지시킨 상태로 안정하게 계대배양할 수 있었으며 초기배양에서 얻어진 배발생 캘러스와는 이러한 점에서 구별 되었다. 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에 옮겨진 후 약 2주정도 경과되면 수많은 자엽기의 체세포배



**Figure 1.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *C. melo* L. cv Crugar: A: Bright-yellow compact callus; B: Somatic embryo produced from bright-yellow compact callus; C: Bright-yellow friable callus from pale-yellow compact callus; D: Somatic embryos of globular and heart stage; E: Numerous somatic embryos of cotyledonary stage; F: Two cotyledonary somatic embryo; G: Fused cotyledonary somatic embryo; H: Plant transplanted to potting soil; I: Flowering of plant.

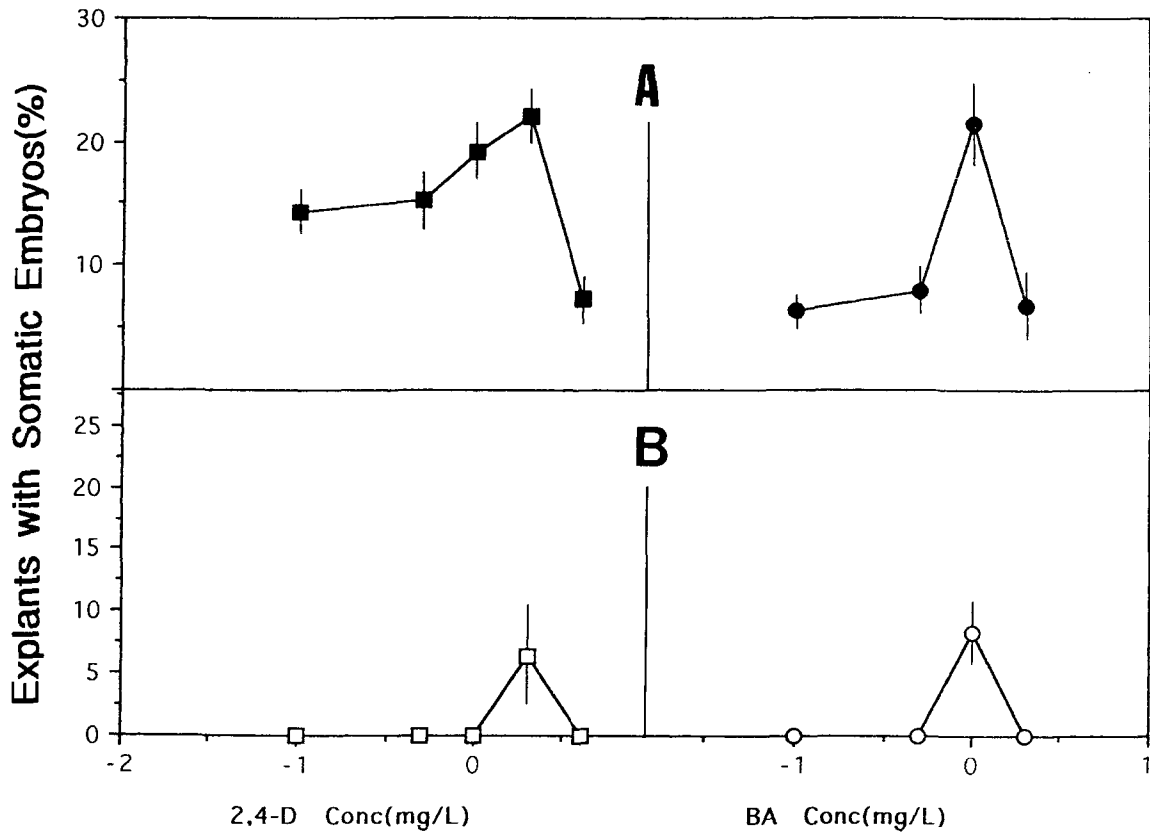


Figure 2. The frequency (%) of somatic embryo formation on cotyledonary and hypocotyl explants cultured on medium containing various concentrations of 2,4-D and 0.1 mg/L BA or of BA and 4 mg/L 2,4-D in *C. melo* L. cv Crugar. A: cotyledons; B: hypocotyls. Bars indicate standard errors based on 6 or 7 replicates. Each replicate contained 6 to 8 explants.

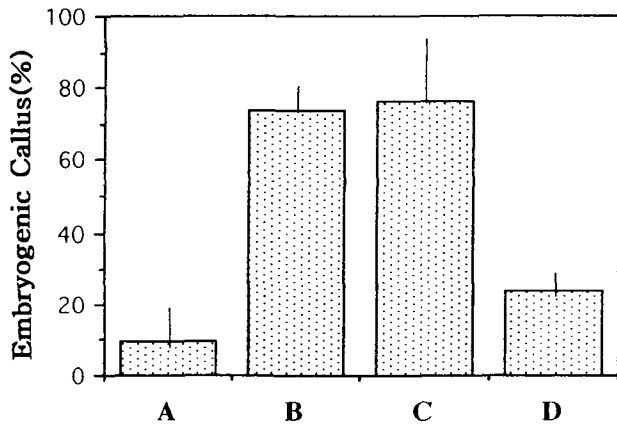


Figure 3. The frequency (%) of somatic embryo formation on pale-yellow compact calli cultured on medium containing various concentration of 2,4-D and BA in *C. melo* L. cv Crugar. A: 0.1 mg/L 2,4-D; B: 0.5 mg/L 2,4-D; C: 1 mg/L 2,4-D; D: 4 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BA.

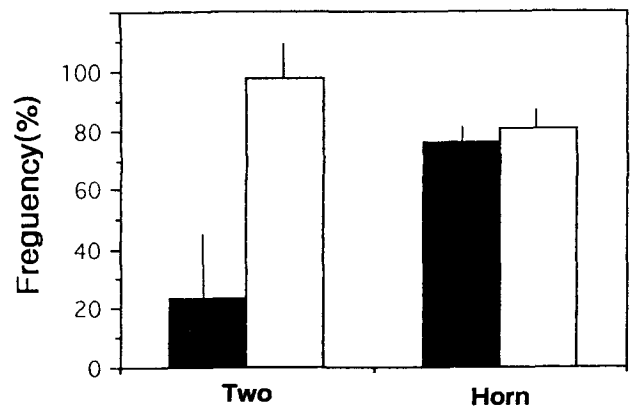


Figure 4. The frequency (%) of somatic embryos (■) with two cotyledons or a horn-type cotyledon and their 'germination' (□) in *C. melo* L. cv Crugar. The somatic embryos were produced from embryogenic calli after transfer to MS basal medium.

(Figure 1E)를 형성하며 이들 체세포배중에는 정상적으로 2개의 자엽을 갖는 것(Figure 1F)과 자엽이 융합된 나팔형의

체세포배도 관찰되었는데 전자보다 후자가 3배 높은 빈도로 나타났다(Figure 1G). 이 두가지 형태의 체세포배중 정상적인 자엽을 갖는 체세포배는 대부분 완전한 유묘로 자

라게 되지만 비정상적인 형태의 자엽을 갖는 나팔형의 경우 발아가 잘 되지 않고(Figure 4) 생장이 되더라도 매우 느렸으며 괴사하는 경우도 있었다. 식물체로 재분화 되었을 때는 정상적으로 발달하여 토양에 옮겨 순화과정을 거쳤을 때 정상적으로 생장이 되었으며 수정후 견실한 열매를 맺었다(Figure 1H).

## 고 찰

박과작물의 체세포배발생에 관한 연구는 *Cucumis melo* (Debeaujon and Branchard, 1991; Gray et al., 1993), *Cucumis sativus* (Chee, 1990) 및 *Citrullus vulgaris* (Compton and Gray, 1993)에서도 여러 연구자들에 의하여 행하여 졌다. 일반적으로 대부분의 식물의 경우 배발생 캘러스 유도 과정에서 필요한 성장조절제는 오옥신 단독으로 충분하지만 박과에 속하는 호박, 오이 및 멜론에서는 오옥신의 저농도의 시토키닌이 요구된다(Kageyama et al., 1990; Debeaujon and Branchard, 1991). 본 연구에서도 배발생 캘러스 유도과정에 2,4-D 외에 저농도의 BA가 요구 되었다.

한편, 배양과정에서 관찰된 2종류의 배발생 캘러스는 동일한 과에 속하는 호박류에서 입자상의 부서지기 쉬운 노란색의 캘러스(Jelaska, 1974)와 오이에서 오렌지색의 부드러운 캘러스(Orezyk and Malepszy, 1985) 및 멜론에서 부드럽고 흰색과 노란색을 띠는 캘러스(Branchard and Chateau, 1988) 등과 외부 형태적인 특징과 체세포배형성 능력은 매우 유사하였지만, 조직절편으로부터 형성된 연한 노란색의 단단한 배발생 캘러스는 기내배양을 통해 계속적으로 유지되지 않고 시간이 경과됨에 따라 체세포배형성 빈도가 감소하고 갈변하는 현상을 나타낸 반면 오옥신과 시토키닌이 조합첨가된 배지에서 6주정도 자란 캘러스로부터 형성된 연노란색의 부서지기 쉬운 배발생 캘러스의 경우에는 적정농도의 오옥신(Figure 3)이 첨가된 배지에서 안정적으로 유지되면서 체세포배를 생산하였다. 다른 연구자들은 멜론의 배발생 캘러스를 계대배양 하였을 때 배발생 능력이 어느정도 유지될수 있는지에 대하여 언급하지 않았다(Young et al., 1983; Moreno et al., 1985a; Branchard and Chateau, 1988; Debeaujon and Branchard, 1991; Kageyama, 1991; Tabei et al., 1991; Oridate et al., 1992; Gray et al., 1993). 그러나 이와같은 현상은 배양중에 옥수수에서 두가지 종류의 배발생 캘러스, 즉 계대배양할 때 증식이 어렵고 액체배양이 어려운 단단한 캘러스(type I)와 안정적으로 체세포배를 생산하는 부드러운 캘러스(type II)가 관찰된 경우(Armstrong and Green, 1985)와 매우 유사하였고, 밑에서 관찰된 4가지 형태의 배발생 캘러스는 회색의 단단한 돌기상의 캘러스(type A), 흰색의 단단한 캘러스(type B), 단단한

돌기상의 캘러스(type C) 및 부드러운 배발생 캘러스(type D)였는데, type A 와 B는 현탁배양이 되지 않았으나 type C 와 D는 가능 하였다(Redway et al., 1990)는 보고에 비추어 보아 본 연구에서 선발한 연한 노란색의 부드러운 캘러스는 멜론의 현탁배양 시스템에도 적합할 것으로 사료된다.

박과작물에서 형성된 대부분 체세포배의 외부형태적 특징은 비정상적이고 식물체로의 전환율도 상당히 낮은 것으로 보고되었다(Jelaska, 1977; Ziv and Gadasi, 1986). 본 연구에서도 정상적인 것과 비정상적인 체세포배가 관찰되었고 이러한 결과는 체세포배의 자엽형성 초기과정에서 오옥신의 극성이동(Liu et al., 1993)과 sucrose(Kageyama et al., 1990) 등의 영향에 의하여 유관속 변이가 일어나 생긴 결과라고 추측되며, 식물체로의 재분화 빈도가 정상자엽을 갖는 체세포배에 비하여 감소하는 현상은 정단분열조직과 자엽발달이 정상적으로 일어나지 않아 체세포배 성숙과정에서 생장이 멈추거나 지연되었기 때문인 것으로 사료된다.

결론적으로, 멜론 자엽절편으로부터 배발생 캘러스 유도는 오옥신과 저농도의 시토키닌이 첨가된 배지에 6주동안 처리하여 캘러스를 유도하고, 이러한 캘러스를 적정농도의 오옥신에 처리하면 안정적으로 유지되는 배발생 캘러스를 얻을 수 있었으며 이로부터 높은 빈도로 체세포배가 형성되어 열매를 맺을 수 있는 식물체로 발달 하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 방법은 메론 우량개체의 대량생산이나 자엽절편이나 배발생 캘러스를 *Agrobacterium*과 공동배양함으로써 형질전환된 멜론 식물체를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 이는 기관 발생 과정을 이용하여 확립한 멜론의 형질전환 시스템(Dong et al., 1991)을 적용할 수 없는 품종에 대한 형질전환에 활용될 수 있을 것이다.

## 적 요

멜론의 배발생 캘러스의 유도와 식물체 재분화 시스템을 확립하기 위해서 자엽과 배축의 절편을 여러 농도의 2,4-D 와 BA가 첨가된 MS 기본배지에 치상하여 관찰한 결과, 초기배양에서는 4 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BA 그리고 2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L BA가 첨가된 배지에서 연한 노란색의 배발생 캘러스가 형성되었고, 위의 조건에서 형성된 캘러스로부터 배발생 캘러스는 0.5와 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 동일 배지에서 약 75%가 형성되었다. 그리고 성장조절제를 첨가하지 않은 기본배지에서 대부분의 체세포배는 식물체로 재분화되었으며, 두개의 자엽을 갖춘 정상적인 체세포배보다 비정상적인 나팔형의 자엽을 가진 것이 3배 높은 빈도로 나타났다. 이러한 체세포배들은 MS 기본배지에서 식물체로 받아되었으며 생육상에서 성장하여 견실한 열매를 맺었다.

## 사 사

본 논문은 과학기술처 특정과제(G70580)의 연구결과이다. 원고에 대하여 세심한 수정과 논평을 해준 백경희, 광상수, 이문순 박사에게 감사한다.

## 인 용 문 헌

- Amstrong CL, Green CE** (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**: 207-214
- Blackmon WJ, Reynolds BD, Postek CE** (1981) Production of somatic embryos from callused cantaloupe hypocotyl explants. *HortScience* **16**: 451
- Branchard M, Chateau M** (1988) Obtention de plantes de melon (*Cucumis melo* L.) par embryogenese somatique. *CR Acad Sci Pars t 307 serie III*: 77-780
- Chee PP** (1990) High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* **25**: 792-793
- Chee PP** (1991) Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* "Topmark". *Hortscience* **26**: 908-910
- Compton ME, Gray DJ** (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon. *Plant Cell Rep* **12**: 61-65
- Debeaujon I, Branchard M** (1991) Somatic embryogenesis and organogenesis from protopalst-derived cultures of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Acta Hort* **289**: 225-227
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH** (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from cauliflower-mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio/Technology* **9**: 858-863
- Gray DJ, McColley DW, Compton ME** (1993) High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* Cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* **118**: 425-432
- Jelaska S** (1974) Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiol Plant* **31**: 257-261
- Jelaska S** (1977) The morphology of abnormal embryoids and plantlets obtained from embryogenic callus of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Acta Bot* **36**: 63-74
- Kageyama K, Komatsuda T, Nakajima K** (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tissue Culture Lett* **7**: 108-110
- Kageyama K, Yabe K, Miyajima S** (1991) Somatic embryogenesis in suspension culture of mature seed of *Cucumis melo* L. *Japan J Breed* **41**: 273-278
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH** (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* **5**: 621-630
- Moreno V, Garcia-Sogo M, Granell I, Garcia-Sogo B, Roig LA** (1985a) Plant regeneration from calli of melon *Cucumis melo* L. cv 'Amarillo Oro'. *Plant Cell Tiss Org Cult* **5**: 139-146
- Orezyk W, Malepszy S** (1985) *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L.V. Stabilizing effect of glycine on leaf protoplasts. *Plant Cell Rep* **4**: 269-273
- Oridate T, Atsumi H, Ito S, Araki H** (1992) Genetic differences in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* **29**: 27-30
- Redway FA, Vasil V, Vasil IK** (1990) Characterization and regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **8**: 714-717
- Tabei Y, Kanno T, Nishio T** (1991) Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon. *Cucumis melo* L. *Plant Cell Rep* **10**: 225-229
- Young H, Skirvin RM, Juvick JA** (1983) Development of embryoid-like structures from *Cucumis melo* callus in vitro. *Cucurbit Genet Coop Rep* **6**: 56-57
- Ziv M, Gadasi G** (1986) Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double layer cultures. *Plant Sci* **47**: 115-122

(1993년 12월 15일 접수)