

초저온 보존된 오이 배발생세포 현탁배양으로부터 식물체 재분화

김석원 · 인동수¹ · 정원중¹ · 우제욱¹ · 정민¹ · 유장렬^{1*}
생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행사업실, ¹제2연구부 식물세포 및 분자생물학 R.U.

Plant Regeneration from Cryopreserved Embryogenic Cell Suspension Cultures of Cucumber

KIM, Suk Weon · IN, Dong Su¹ · JEONG, Won Joong¹ · WOO, Je Wook¹ · JUNG, Min¹ · LIU, Jang Ryol^{1*}

Gene Bank, Genetic Resources Center and ¹Division of Biotechnology, Plant Cell & Molecular Biology
Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115,
Yusong, Taejeon, 305-606, Korea. *Corresponding author.

Conditions for high frequency plant regeneration from cryopreserved embryogenic cell suspension cultures derived from hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) are described. Cells cryoprotected with a mixture of 2 M DMSO and 0.4 M sucrose exhibited a regeneration frequency of 85%. However, cells cryoprotected with different concentrations of glycerol showed no regeneration after cryopreservation. Pretreatment of cells in a high osmotic medium was not necessary to the process. Upon transfer to MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, regenerated calli gave rise to numerous somatic embryos, then underwent development into plantlets.

Key words: *Cucumis sativus* L., embryogenic cell suspension cultures

식물세포나 조직은 장기간의 계대배양과정에서 이루어지는 체세포변이에 의해 유전적 균일성이 변화된다. 이러한 변화는 식물세포주의 재분화능 감소나 유용물질생산능의 변화 등 세포주의 유용한 특성 변화에 커다란 영향을 주게 된다. 특히 유용형질이 도입된 형질전환 세포주의 경우 이를 농업적으로 이용하기 위해서는 유전적 안정성이 절실히 요구되고 있으나 재생된 식물체의 형태적 이상이나 불임 등 표현 형질의 변화가 빈번하게 나타나고 있다. 그러므로 체세포변이에 의한 부정적 효과를 최소화하면서 식물세포나 조직을 장기간 보존하는 방법의 개발이 절실히 요구된다. 현재 액체질소에 의한 초저온보존방법이 널리 이용되고 있지만 (Kantha and Engelmann, 1994) 국내에서는 아직까지 보존분야의 기술개발이 활발하지 못하다.

오이는 세계적으로 중요한 채소작물의 하나이다. 최근 작물의 형질전환을 이용한 품종개량에 관한 연구가 시도되면서 조직배양을 통한 효율적인 식물체 재분화시스템의 확립

의 중요성이 증가하고 있다. 오이의 경우 건조종자의 자엽, 유식물의 하배축과 자엽, 식물체의 잎, 줄기절편에서 유도된 캘러스로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재분화시스템이 확립된 바 있다 (Ziv and Gadasi, 1986; Lou and Kako, 1994; Kim et al., 1998). 또한 최근에 배발생세포의 현탁배양시스템이 보고된 바 있다 (Raharjo and Punja, 1994; Woo et al., 1998). 그러나 초저온보존법을 오이를 포함하는 호로과 식물에 적용한 보고는 아직까지 없다. 본 연구에서는 유용한 유전자원의 안정적인 보존시스템을 개발하기 위한 기초 연구로서, 현탁배양중인 오이의 배발생세포주(Woo et al., 1998)의 초저온보존에 요구되는 cryoprotectant의 종류 및 농도를 규명함으로써 재생된 오이의 배발생캘러스로부터 식물체의 성공적인 재분화시스템을 확립하고자 하였다.

식물재료 및 현탁배양

F₁ 잡종 오이 (*Cucumis sativus* L.) 조생낙합의 배발생세포주(Jeong et al., 1998)를 2,4-D가 1 mg/L 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 액체배지(MSID) 에서 약 7일간격으로 계대배양하였다. 계대배양 후 7일 경과된 현탁배양세포를 수거하여 실험에 이용하였다.

Cryoprotectant 처리

현탁배양세포를 피펫으로 수거하여 15 mL conical tube에 넣은 다음 100 xg로 3분간 원심분리하였다. 배양세포의 packed cell volume을 2 mL로 조정된 다음 남아있는 액체배지를 피펫으로 제거하였다. Pre-chilled된 각각의 cryoprotectant 용액을 5 mL씩 현탁배양세포에 첨가한 다음 잘 섞어서 ice bath에서 30분간 처리하였다. Cryoprotectant 용액은 MSID 배지에 0.4 M sucrose를 첨가한 기본용액에 여러 농도 (0.64, 1.28 M)의 DMSO와 glycerol (0.54, 1.08, 1.62, 2 M)를 단독처리 또는 2 M DMSO + 0.54 M glycerol, 2 M glycerol + 0.64 M DMSO를 혼용처리하여 pH를 5.8로 조정 후 membrane filter (pore size, 0.22 μ m)로 멸균하여 사용하였다.

동결

Cryoprotectant를 처리한 현탁배양세포(약 400 mg) 1 mL을 2 mL cryo vial (Nalgene)에 넣은 다음 Parafilm으로 밀봉하였다. Cryo vial을 Cryomed Model 1010 Micro Computer Programmable Freezer Unit에 넣은 다음 분당 1 $^{\circ}$ C씩 -40 $^{\circ}$ C까지 동결하였다. Cryo vial을 -40 $^{\circ}$ C에서 45분간 유지한 후 곧바로 액체질소 탱크에 넣었다.

해동 및 재생

액체질소에 1주간 유지한 배양세포를 꺼내어 40 $^{\circ}$ C 수조에 넣은 다음 약 90초간 급속 해동하였다. 배양세포가 vial의 바닥에 침전되도록 방치한 다음 상층액을 제거한 후 세포를 여과지가 올려진 고체 배지위에 옮겼으며 남아있는 cryoprotectant 용액은 여과지 디스크를 이용하여 제거하였다 (Kantha et al., 1982). 약 1시간 경과 후 세포가 놓여있는 여과지를 동일조성의 새 배지로 옮겨준 다음, 세포피 (직경 약 1 mm)를 새로운 MSID 고체배지에 25개씩 치상하여 25 $^{\circ}$ C 암소에서 4주간 배양하였다.

식물체 재생

액체질소 저장 후 해동된 세포의 재생률은 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reduction 분석방법(Steponkus and Lanphear, 1967)을 이용하여 조사하였다. 세포를 0.18 M TTC 용액에 침적하여 25 $^{\circ}$ C에서 16시간 처리한 다음 적색의 세포피를 육안으로 식별하여 계산하였으며 무처리 대조구와 재생률을 비교 분석하였다. 보다 확실한 재생률 조사 방법으로 각 처리구별로 MSID 고체배지에 20~25개의 세포피를 무작위로 선발하여 치상한 다음 25 $^{\circ}$ C 암소에서 4주간 배양한 후 캘러스 재생 빈도를 조사하였다 (각 처리구별로 4~5개씩 반복 처리하였다). 재생된 배발생캘러스로부터 발달된 체세포배는 MS 기본배지로 옮겨 25 $^{\circ}$ C에서 명배양(광도: 약 1,000 Lux, cool-white 형광, 광주기 16시간/일)하여 소식물체를 재생하였다.

결과 및 고찰

Cryoprotectant의 종류 및 농도가 캘러스 재생률에 미치는 영향

Glycerol과 DMSO의 처리 농도가 액체질소 저장 후 캘러스의 재생률에 미치는 영향을 조사한 결과 2 M DMSO와 0.4 M sucrose를 혼용처리한 경우 캘러스의 재생빈도가 85%로 가장 높았으며, 1.28 M DMSO와 0.4 M sucrose를 혼용처리한 경우 69%로 DMSO의 처리농도가 증가할수록 재생빈도가 증가하였다(Table 1). 그러나 glycerol 처리구에서는 모든 처리구에서 캘러스의 재생이 전혀 이루어지지 않았다. 한편 glycerol과 DMSO의 혼용처리에 의한 효과를 보면, 2 M DMSO와 0.54 M glycerol의 혼용처리시 캘러스 재생률은 49%이었으나 2 M glycerol과 0.64 M DMSO의 경우는 캘러스 재생이 전혀 이루어지지 않았다(Figure 1). 또한 오이 캘러스 재생에 미치는 glycerol과 DMSO의 혼용처리 효과는 DMSO의 단독처리구 보다 오히려 재생률이 감소하였다. 이상의 결과로부터 오이 배발생세포주의 경우 glycerol 보다는 DMSO가 더욱 효과적인 cryoprotectant로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구의 결과는 벼의 경우, 5% (0.64 M) DMSO가 18% (1.95 M) glycerol보다 캘러스의 재생에 더욱 효율적이라는 Sala 등(1979)의 보고와 일치하며 또한 태백벼와 동진벼(Kim et al., 1995)의 배발생세포주 재생 결과와 일치한다.

DMSO가 더욱 효과적인 cryoprotectant로서 작용하는 이유는 명확하지는 않지만 몇가지를 짐작할 수 있다. 첫째, 일반적으로 배발생세포주는 비배발생세포주에 비하여 단단한 구조를 가지고 있다. 따라서 DMSO는 glycerol에 비하여 세포막에 대한 투과성이 더욱 높기 때문에 cryoprotectant의 세포내 흡수가 glycerol에 비하여 DMSO가 용이할 것으로 사료된다. 둘째, DMSO는 독성효과를 갖는 free radical의

Table 1. Effect of cryoprotectants on the regeneration of cucumber cell suspension cultures.^{a,b}

| Cryoprotectants | Freezing method | Regeneration |
|--|-----------------|--------------|
| No cryoprotectant | -- ^c | 100 |
| No cryoprotectant | RF ^d | 0 |
| 2 M DMSO + 0.4 M Sucrose | -- ^b | 98.3 |
| 2 M DMSO + 0.4 M Sucrose | RF | 0 |
| 0.4 M Sucrose | SF ^e | 0 |
| 0.64 M DMSO + 0.4 M Sucrose | SF | 3 |
| 1.28 M DMSO + 0.4 M Sucrose | SF | 69 |
| 2 M DMSO + 0.4 M Sucrose | SF | 85 |
| 0.54 M Glycerol + 0.4 M Sucrose | SF | 0 |
| 1.08 M Glycerol + 0.4 M Sucrose | SF | 0 |
| 1.62 M Glycerol + 0.4 M Sucrose | SF | 0 |
| 2 M Glycerol + 0.4 M Sucrose | SF | 0 |
| 2 M DMSO + 0.54 M Glycerol + 0.4 M Sucrose | SF | 49 |
| 2 M Glycerol + 0.64 M DMSO + 0.4 M Sucrose | SF | 0 |

^aThe frequency of callus regrowth from thawed cells was determined after four weeks of culture on MS1D medium.

^bEach datum represents the mean value of three replicates.

^c--: no freezing.

^dRF: rapid freezing.

^eSF: slow freezing.

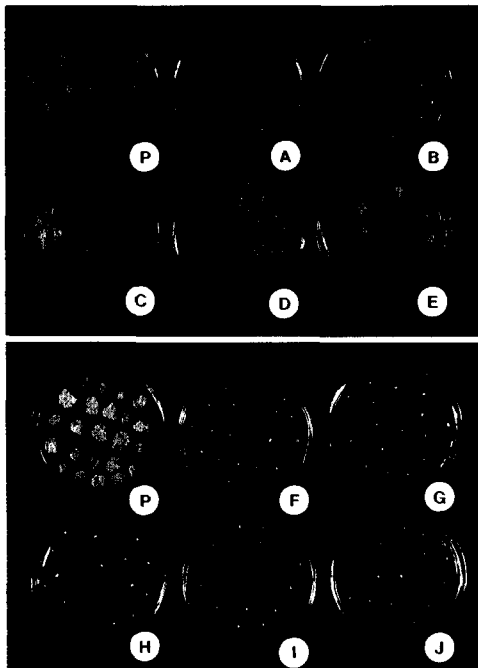


Figure 1. Regrowth of embryogenic calli from cryopreserved *Cucumis sativus* cells after 4 weeks of culture on MS1D medium. P, Positive control (no cryoprotectant and no freezing); A, 0.4 M sucrose; B, 0.64 M DMSO + 0.4 M sucrose; C, 1.28 M DMSO + 0.4 M sucrose; D, 2 M DMSO + 0.4 M sucrose; E, 2 M DMSO + 0.54 M glycerol + 0.4 M sucrose; F, 0.54 M glycerol + 0.4 M sucrose; G, 1.08 M glycerol + 0.4 M sucrose; H, 1.62 M glycerol + 0.4 M sucrose; I, 2 M glycerol + 0.4 M sucrose; J, 2 M glycerol + 0.64 M DMSO + 0.4 M sucrose.

scavenger로서 기능이 보고된 바 있다 (Benson et al., 1992). 따라서 DMSO가 재생과정에서 free radical을 효과적으로 제거함으로써 캘러스의 재생률이 증가한 것으로 사료된다.

Cryoprotectants 처리시간 및 동결방법의 영향

일반적으로 고농도의 삼투조절제가 첨가된 배지에서 3-4일 간 전처리를 하게되면 세포내의 수분함량이 낮아짐으로써 동결가능한 수분함량이 감소되어 동결과정에서 세포의 재생률이 증가하게 된다(Withers, 1985). 그러나 본 연구에서는 이와같은 전처리과정을 거치지 않고도 효율적인 캘러스의 재생이 가능하였다. 고농도 삼투용액의 전처리 과정이 필요하지 않은 이유로 먼저 본 연구에 이용된 배양세포는 1주간 배양된 세포를 이용하였는데, 이 기간동안 세포에서 polysaccharide로 추정되는 다량의 점액성 물질이 분비되었다. 이와같이 세포외부에 축적된 대사산물이 삼투조절제 역할을 대신함으로써 세포내의 동결가능한 수분함량 감소에 기여하였을 것으로 생각된다. 또한 캘러스 재생률은 cryoprotectant의 처리시간은 *Saccharum* sp.의 경우 2시간 (Gnanapragasam and Vasil, 1990), 벼의 경우 1시간(Lynch et al., 1994) 보다 짧은 30분간 처리하였으므로 고농도의 cryoprotectant를 장기간 처리할 때 나타날 수 있는 cryoprotectant 자체의 독성효과를 줄일 수 있었기 때문이라 사료된다.

동결과정에서 세포가 죽게되는 이유는 세포내의 얼음결정 형성에 따른 세포 막구조의 손상때문인 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 cryoprotectant를 처리하지 않은 세포를 액체질소에 급속 동결시킨 경우 세포의 생존이 불가능하였다. 또한 cryoprotectant를 처리한 세포를 액체질소에 급속하게 얼리면 세포는 세포내 얼음결정 형성을 효과적으로 감소시키지 못하여 결국 죽게된다. 또한 세포의 재생률에 미치는 영향이 cryoprotectant의 독성효과에 기인한 것인지를 조사하기 위하여 가장 높은 농도의 cryoprotectant 처리구인 2 M DMSO와 0.4 M sucrose를 혼용처리한 배양세포를 동결과정을 거치지 않고 캘러스의 재생률을 조사하였다 (Table 1). 이때의 재생률은 98.3%이었으며 cryoprotectant를 처리하지 않은 대조구의 100%와 비교하였을 때 처리시간내 cryoprotectant의 독성효과는 거의 없었다. 또한 동결 속도가 세포의 생존에 미치는 영향을 조사한 결과 2 M DMSO와 0.4 M sucrose를 처리 후 액체질소에 급속냉동을 시킨 결과 세포의 재생이 전혀 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서 오이 배발생세포가 동결과정에서 죽게되는 원인은 cryoprotectant의 독성효과에 기인한 것이 아니라 동결과정에서 이루어지는 세포내의 얼음결정 형성에서 기인한 것으로 추측된다. 아울러 초저온 보존 후 재생된 배발생캘러스를 MS1D 배지에 재차 현탁배양을 시도한 결과 현탁배양세포는 원래 세포주와 동일한 전형적인 배발생세포주의 형태

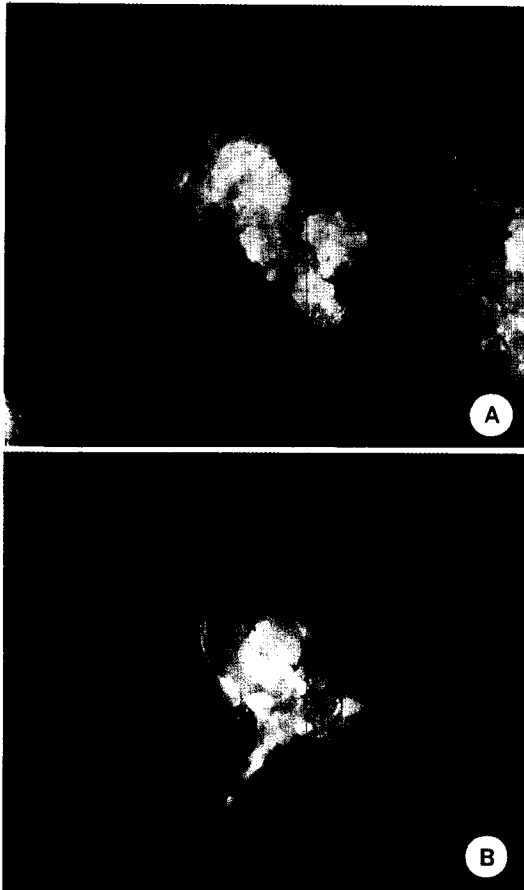


Figure 2. Plant regeneration from cryopreserved *Cucumis sativus* cells. A, Somatic embryo development on MS1D medium; B, Regenerated plantlets.

적 특징을 나타내었다. 재생된 캘러스를 MS 기본 배지로 옮겨서 배양한 결과 식물체로 발달하였다(Figure 2). 본 연구에서 오이의 배발생 현탁배양세포로부터 단시간의 cryoprotectant 처리를 통하여 높은 빈도의 캘러스 재생과 식물체 재분화가 가능한 간편한 초저온보존방법을 개발하였다. 오이의 초저온 보존시스템은 배발생능이 높은 세포주나 유용형질이 도입된 오이 배양세포주의 안정적인 보존은 물론 다른 배발생 세포주에도 적용이 가능할 것으로 예상되며 아울러 식물 유전자원의 효율적인 장기 보존 수단으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

적 요

오이의 국내 F1 품종인 조생낙합의 하배축 유래 배발생 현탁배양 세포의 초저온 보존 시스템을 개발하였다. 액체질소 저장 후 캘러스 재생률은 2 M DMSO와 0.4 M sucrose를 혼용 처리하였을 때 캘러스 재생률이 85%로 가장 높았다.

그러나 glycerol 처리구에서는 처리농도에 상관없이 모든 처리구에서 캘러스 재생이 이루어지지 않았다. 또한 고농도의 삼투용액에서 배양세포의 전처리 과정은 필요하지 않았다. 재생된 캘러스를 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지로 이식하여 배양하였을 때 다수의 체세포배가 발달하였으며 체세포배를 MS 기본배지로 옮겨 명배양한 결과 다수의 소식물체가 발달하였다.

사사 - 본 논문은 과학기술처 국책과제(NB0530)의 연구결과이다. 원고에 대하여 세심한 논평과 수정을 가해준 이형순, 김재훈 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Benson EE, Lynch PT, Jones J** (1992) The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post thaw survival. *Plant Sci* 85: 107-114
- Gnanapragasam S, Vasil IK** (1990) Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Rep* 9: 419-423
- Kartha KK, Leung NL, Gaudet-LaPrairie P, Constabel F** (1982) Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells cultured in vitro. *Plant Cell Rep* 1:135-138
- Kartha KK, Engelmann F** (1994) Cryopreservation and germplasm storage. In Vasil IK, Thorpe TA, eds, *Plant Cell and Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 195-230
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Kwak SS** (1998) Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* (in press)
- Kim SW, Jeong WJ, Min SR, Bae KS, Liu JR** (1995) Plant regeneration from cryopreserved embryogenic cell suspension cultures of Korean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 115-119
- Lou H, Kako S** (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience* 29: 906-909
- Lynch PT, Benson EE, Jones J, Cocking EC, Power JB, Davey MR** (1994) Rice cell cryopreservation: the influence of culture methods and the embryogenic potential of cell suspensions on post-thaw recovery. *Plant Sci* 98:185-192
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Raharjo SHT, Punja ZK** (1994) Regeneration of plantlets from embryogenic suspension cultures of pickling cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Endeavor). *In Vitro Cell & Devel Biol Plant* 30: 16-20
- Sala F, Cella R, Rollo F** (1979) Freeze-preservation of rice in suspension culture. *Physiol Plant* 45:170-176
- Steponkus PL, Lanphear FO** (1967) Refinement of the triphenyl

tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* 42:1423-1426

Withers LA (1985) Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 243-267

Woo JW, Jeong WJ, Jung M, Liu JR (1998) High frequency plant regeneration in embryogenic cell suspension cultures of cucumber. *Plant Cell Tissue Organ Culture* (submitted)

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.

(98년 9월 7일 접수)