

오이 배발생세포의 현탁배양을 통한 고빈도 식물체 재분화

정원중¹ · 우제욱^{1,2} · 박효근³ · 최관삼² · 유장렬^{1*}

¹생명공학연구소 식물세포공학연구실, ²충남대학교 농생물학과, ³서울대학교 원예학과

High Frequency Plant Regeneration in Embryogenic Cell Suspension Cultures of Cucumber

JEONG, Won Joong¹ · WOO, Je Wook^{1,2} · PARK, Hyo Geun³ · CHOI, Kwan Sam² · LIU, Jang Ryol^{1*}

¹Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology.

P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-606, Korea.

²Department of Agricultural Biology, ChungNam University, Yusong, Taejeon, 305-764, Korea.

³Department of Horticulture, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea.

ABSTRACT Hypocotyl explants from 7 days old seedlings of one F₁ hybrid cultivar and two pure lines of cucumber formed embryogenic calli at frequencies of up to 8% when cultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 1 mg/L 2,4-D for 3 weeks. Embryogenic calli gave rise to somatic embryos. When slices of somatic embryos were cultured on the same medium for 4 weeks, they formed embryogenic calli. Embryogenic cell suspension cultures were established with embryogenic calli in MS liquid medium with 1 mg/L 2,4-D. Embryogenic potential of cell suspension cultures was maintained by subculturing every seven days. When the level of 2,4-D in the medium was lowered to 0.2 mg/L by diluting with liquid MS basal medium, embryogenic cell suspension cultures underwent development into numerous somatic embryos. When plated onto MS basal medium, over 95% of somatic embryos developed into plantlets. Plantlets were transplanted to potting soil and grown to maturity.

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

서 론

오이는 세계적으로 중요한 채소작물 중 하나이다. 최근 형질전환을 통한 식물의 품종개량이 연구되면서 주요 작물의 재현 가능한 효율적인 재분화시스템이 요구되고 있다. 오이에 있어서 식물체재분화는 성숙종자의 자엽, 유식물의 하배축과 자엽, 식물체의 잎, 줄기 절편에서 유도된 캘러스로부터 체세포 배발생이 보고된 바 있다 (Malepszy and Nadolska-Orczyk 1983; Ziv and Gadasi 1986; Kim et al. 1988; Lou and Kako 1994; Kim et al. 1998). 한편 유식물의 하배축과 자엽절편을

사용하여 최고 50%의 빈도로 점액성의 배발생캘러스를 유도하였는데, 2,4-D와 kinetin이 첨가된 배지에서 점액성 캘러스를 유도하고 NAA와 BA가 첨가된 배지에 체세포배를 유도하였다 (Chee 1990). 또한 최근에 pickling cucumber의 배발생캘러스의 현탁배양계가 보고되었는데, 이때 역시 2,4-D와 BA를 사용하여 배발생캘러스를 유도하였으나 NAA와 BA 및 AgNO₃를 첨가한 고체배지에서 46%의 캘러스에서 식물체가 발생하였다 (Raharjo and Punja 1994). 그러나 이러한 보고들은 대부분 배발생캘러스로부터의 배발생률이 낮거나, 배발생캘러스의 유도, 체세포배발생 및 식물체재분화에 여러 배지조건의 변화를 요구하고 있어서 전형적인 체세포배발생계보다 복잡하다. 또한 현탁배양계에서의 체세포배발생은 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 국내 품종을 사용하여 2,4-D의 첨가만으로 배발생캘러스를 유도하여 현탁배양계를

*Corresponding author. Tel 042-860-4430
E-mail jrlu@mail.kribb.re.kr

확립하고, 액체배지에서 체세포배를 대량생산하여 식물체로 재분화하는 단순하고 효율적인 체세포배발생계를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

F₁ 잡종 오이 (*Cucumis sativus* L.) 5 품종 (조생낙합, 미리내, 은성백다다기, 신흑진주, 내서삼척)과 중앙종묘의 순계 4 계통 (S-♂, S-♀, 244-♂, 244-♀)의 종자를 1/4로 희석한 상업용 표백제 및 70% 에탄올로 표면살균 후 성장조절제를 첨가하지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 고체배지에 치상하여 25°C 암배양하였다. 발아 7일된 유식물체의 하배축을 5 mm 크기의 절편으로 절단하였다. 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS (MS1D) 고체배지를 플라스틱 페트리디쉬 (87 × 15 mm)에 분주한 후, 오이의 하배축 절편을 치상하여 25°C 암조건에서 배양하였다. 배양 3주 후 하배축 절편으로부터 발달한 다양한 캘러스를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본 배지로 옮겨 체세포배를 유도하였다. 또한, 초기에 유도된 2~3 mm 길이의 체세포배를 배축에 수직방향으로 절단하여 MS1D 배지에 치상하여 재분화능이 왕성한 배발생캘러스를 유도하였다. 배발생캘러스를 동일 조성의 50 mL의 액체배지를 담은 250 mL Erlenmeyer flask에서 현탁하여 7일 간격으로 계대배양하였다. 현탁배양액에 2~5배의 MS 기본 액체배지를 첨가함으로써 체세포배를 생산하였다. 유도된 체세포배를 20 mL의 MS 기본 고체배지 (플라스틱 페트리디쉬 (87 × 15 mm))에 평판하여 식물체로 재분화시켰다.

결과 및 고찰

배양 2주 후부터 공시한 5 품종 및 4 계통 모두의 오이 하배축절편에서 다양한 캘러스가 발생하였다. 하배축의 중앙부 위 및 양 절단면에서 뿌리로 분화하는 캘러스 및 부서지기 쉬운 연노란 색의 비배발생캘러스가 생성되었으며, 배지에 접한 면에서는 기존의 보고 (Chee 1990)와 같은 점액성 캘러스 (gelatinous callus)가 발생하였다. 그러나 이러한 점액성 캘러스에서는 1% 이하의 효율로 체세포배가 발달하였을 뿐 배발생캘러스로 유지되지 않고 대부분 MS 기본배지에서 뿌리로 분화되었다. 한편 하배축 유래 캘러스 중 F₁ 1 품종 '조생낙합'에서는 7.5%, 순계 2 계통 (S-♀와 244-♂)에서는 2%의 효율로 배지에 접하지 않은 표면 쪽에서 체세포배가 발생하였다 (Figure 1A). 그러나 이때 배발생캘러스가 외형적으로 구별되지 않아서 분리 배양할 수 없었다. 배발생캘러스를 유도하기 위하여 유도된 체세포배를 절단하여 MS1D에 배양한 결과 4주 경과 후 약 50%의 절편에서 또 다른 점액성의 캘러스가 발생하였다. 이 점액성 캘러스는 형태적으로 하배축

유래의 점액성캘러스와 같았으나 점액질 내에 노란 색의 수많은 friable 캘러스가 포함되어 있었으며 계속 배양한 결과 노란 색의 friable 캘러스가 우세하게 증식하였다 (Figure 1B). 이 노란 색의 friable 캘러스는 표면에서 수많은 체세포배로 발달하여 배발생캘러스로 확인되었다. 이렇게 얻은 배발생캘러스는 액체배지에서 쉽게 현탁되어 증식하였다 (Figure 1C). 한편, 현탁배양 중에 배발생캘러스로부터 계속 체세포배가 발달하였으나, 현탁배양에서 상층부의 현탁액을 분리하여 2,4-D 농도를 낮추었을 때, 훨씬 더 빠르고 많은 체세포배가 발생하였다 (Figure 1D). 오이의 체세포배는 두 개의 자엽을 가진 것, 여러 개의 자엽을 가진 것, 여러 개의 배가 붙어있는 것 등 다양한 형태를 나타냈다. 유도된 체세포배의 95% 이상이 MS 기본배지에서 발아하였다 (Figure 1E). 유식물체는 화분에서 식물체로 발달하여 개화 후 착과하였다 (Figure 1F).

오이의 체세포배발생은 기존에 외국품종에서 보고되어 있다. 그러나 대부분 체세포배가 낮은 빈도로 발생하였으며, 'Poinsett 76'에서는 하배축 및 자엽의 25~50%에서 점액성캘러스가 발달하였는데, 이 캘러스는 배지에 접한 면에서 발생하였고 NAA와 BA가 첨가된 성숙배지에 옮겨졌을 때 배발생캘러스로 발달하였다 (Chee 1990). 본 연구에서는 2,4-D만을 사용하였을 때, 오이 5 품종 모두에서 역시 80% 이상의 점액성캘러스를 얻었으나 기존의 보고와는 달리 대부분 뿌리만 발생하였다. 따라서 점액성캘러스를 배발생캘러스라고 단정지을 수는 없었다. 한편 F₁ 1 품종 '조생낙합'과 순계 (S-♀와 244-♂)에서는 8% 이하로 체세포배가 발생하였으나 하배축의 표면에서 발생한 것으로 배지에 접한 면에서 유도된 점액성캘러스로부터 발생한 것이 아니었다. 체세포배 절편을 MS1D 배지에 배양하여 발생한 새로운 점액성캘러스에서도 직접 체세포배가 발생하지 않고 계속 배양하였을 때 노란 색의 friable 캘러스가 증식하고 이어서 수많은 체세포배로 발달하였으므로 이 friable 캘러스가 배발생캘러스로 확인되었다.

한편 체세포배를 대량생산하기 위해서는 현탁배양계를 통한 체세포배발생계가 확립되어야 한다. Raharjo와 Punja (1994)는 오이 배발생세포의 현탁배양계에서는 2주 간격으로 계대배양하였을 때 최적의 캘러스 상태를 유지하고, 세포현탁 배양으로부터 체세포배를 얻을 수 있었지만 배발생캘러스나 현탁배양계에서의 배발생세포군을 구별하지 못하여 현탁배양 세포를 고체배지에 평판하였을 때 일부 (46%)의 세포군에서만 체세포배가 발달하였다. 그러나 본 연구에서 확립한 체세포배발생계에서는 배발생세포가 기존에 보고된 배발생세포보다 훨씬 빠르게 분열하여 현탁배양 1주만에 3배 이상의 속도로 왕성하게 증식하였으며, 2,4-D의 농도를 낮춘 액체배지 내에서 1주 내에 수많은 체세포배가 발생하였으며 체세포배의 대부분이 식물체로 재분화되었다. 한편 예비실험에서 현탁배양 시 세포의 밀도, 2,4-D의 농도, 다른 성장조절제 첨가 등의 변화를 주어 현탁배양 세포군의 크기를 작게 하려고 시도하

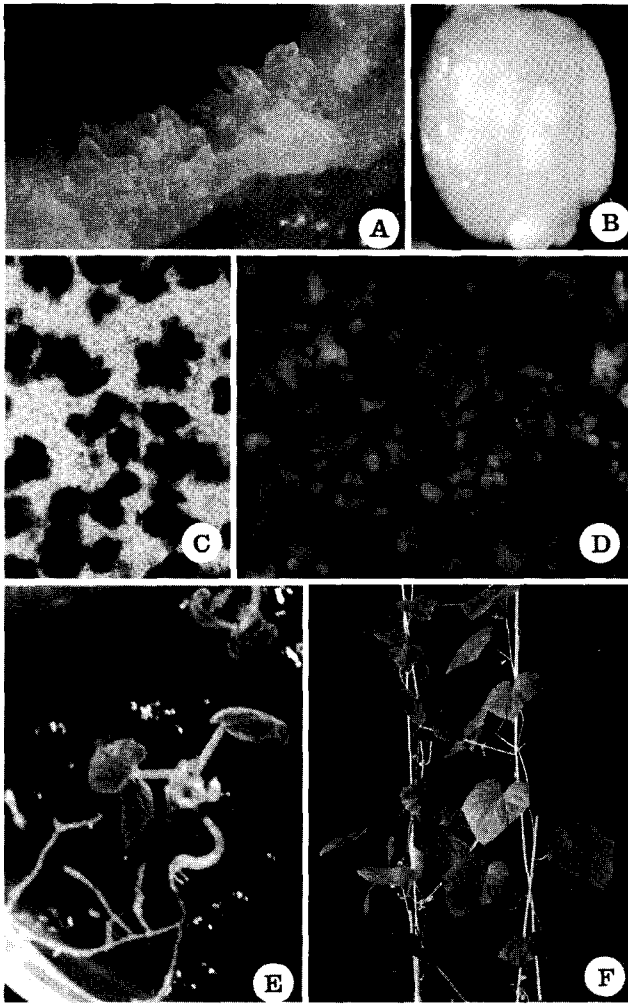


Figure 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Cucumis sativus* L. (A) Somatic embryos from hypocotyl explant; (B) Embryogenic callus from somatic embryo-segment; (C) Embryogenic suspension cells; (D) Numerous somatic embryos from embryogenic suspension cells; (E) Plantlet regenerated from somatic embryo; (F) Flowering regenerants.

였으나 배발생캘러스 세포군의 크기는 더 이상 작아지지 않고 200~400 μm 크기로 증식하였다.

본 연구에서는 오이의 국내 품종으로 F₁ 잡종과 순계를 사용하여 배발생캘러스의 현탁배양계로부터 체세포배를 대량생산하여 식물체로 재분화시키는 시스템을 확립하였는데 이는 이전에 발표된 시스템 (Chee 1990; Raharjo and Punja 1994) 과 비교할 때 배양과정이 단순하며 식물체 재분화 빈도가 월등히 높다. 본 연구에서 제시된 오이의 식물체재분화 방법은 배발생 현탁배양에 의한 식물체재분화 방법의 일반적인 범주에 속하므로 여러 오이 품종에 대해 일반적으로 적용될 수

있을 것이며 고빈도 식물체재분화가 가능하므로 형질전환에 이용될 수 있을 것이다.

적 요

발아 7일된 오이 (*Cucumis sativus* L.) F₁ 5품종과 순계 4 품종의 하배축 절편을 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS고체배지에 치상하여 3주간 배양하였다. F₁ 1품종과 순계 2품종에서 발달한 캘러스의 8%이하에서 체세포배가 발생하였다. 체세포배 절편을 동일한 배지에 4주간 배양하여 배발생캘러스를 유도하였다. 배발생캘러스는 동일조성의 MS액체배지에 현탁되어 증식하였다. 액체배지에서 배발생캘러스는 수많은 체세포배로 발달하였으며, 성장조절제가 첨가되지 않은 MS기본배지에서 95%이상의 체세포배가 식물체로 발아하였다. 재분화된 식물체는 화분에서 생육되어 개화 후 착과하였다.

인용문헌

- Chee PP (1990) High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* 25:792-793
- Kim SG, Chang JR, Cha HC, Lee KW (1988) Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 12:67-74
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Kwak SS (1998) Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Tiss Cult* 25:501-505
- Lou H, Kako S (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience* 29:906-909
- Malepszy S, Nadolska-Orczyk A (1983) *In vitro* culture of *Cucumis sativus*: I. Regeneration of plantlets from callus formed by leaf explants. *Z Pflanzenphysiol* 111:273-276
- 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 Cellular & Developmental Biology Plant* 30: 16-20
- 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