

오이 캘러스 분화시 광의 영향, 형태발생 및 단백질함량

이은모 * · 조만현 · 송남현 · 우인식 · 이영복¹ · 곽상수²

충남농업기술원 원예연구과, 충남대학교 식물자원학부¹, 생명공학연구소 식물세포공학연구실²

Light Influences, Morphogenesis and Protein Content on Callus Differentiation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

LEE, Eun Mo * · JO, Man Hyun · SONG, Nam Hyun · WOO, In Shik · LEE, Young Bok¹ · KWAK, Sang Soo²

Horticulture Research Division, Chungnam Agricultural Research & Extension Services, Yusong, Taejeon, 305-313, Korea

¹Chungnam National University, Yusong, Taejeon, 305-764, Korea

²Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,

P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea.

ABSTRACT To investigate the cucumber regeneration from embryogenic calli, shoot tips of aseptically-grown cucumber seedlings were used as explants for establishing tissue cultures. Growth and differentiation of callus were studied by using Murashige and Skoog's (MS) medium containing 0.5 to 2 mg/L 2,4-D. Plantlets were induced from shoot tip culture on the plant growth regulators-free MS medium. Non-embryogenic calli and viscous calli were induced on the medium supplemented with 0.5 to 2 mg/L 2,4-D, but embryogenic callus was not induced on the same medium. Segments (ca. 5~10 mm) of aseptically-grown hypocotyl from five to seven days old seedlings after germination were placed on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D for 50 days. Embryogenic calli and embryoids were induced only from the seedlings grown in dark condition, and hypocotyl was placed on the media explanted in light condition. Forty-five point one percent of white fragile calli and 0.6% yellowish compact calli formed roots. Yellowish callus lines were investigated to have a considerably higher concentration of crude proteins than white callus lines. Plantlets derived from embryogenic calli or embryoids have been transferred to pots containing sterile vermiculite and perlite. Normal fruits were harvested from nutrient culture on aggregated hydroponics in the F-clean house.

Key words: crude protein, embryogenic callus, hypocotyl, shoot-tip, 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)

서 론

오이는 국민소득 향상과 식생활 성향의 변화에 따라 소비량이 계속 늘어나 국내의 오이 재배면적 (7,894 ha)과 생산량 (408,317 톤)은 계속 증가하고 있는 추세이다 (Ministry of Agri. and Forestry 1999). 또한 소비형태도 계절소비에서 년중 소비로 변화되고 노지재배에서 시설재배 방식으로 전환되

고 있으며, 오이를 이용한 요리도 다양하여 각종 샐러드를 비롯한 오이냉국, 오이지, 오이장아찌, 오이피클 등의 절산발효 식품 등 식품적 가치도 매우 우수하다. 이렇게 재배작형이 세분화되고 이용 용도가 다양화됨에 따라 재배하는 농가는 새로운 품종을 요구하고 있다. 최근에 고품질 오이를 육성하기 위하여 조직배양 및 형질전환을 통한 품종개량 연구가 많이 수행되어, 액아 절편체로부터 직접적인 유식물체 재생 (Handley and Chambliss 1979), 근단, 엽병, 자엽, 하배축 절편체로부터 기관분화 (Chee 1990; Kim et al. 1988; Kim et al. 1998; Sekioka and Tanaka 1981; Trulson and Shahin

* Corresponding author. Tel 042-820-5231

E-mail garliclem@hanmail.net

1986), 약배양에 의한 배상체분화 (Lazarte and Sasser 1982), 배발생세포의 현탁배양을 통한 고빈도 식물체 재분화 (Jeong et al. 1999)를 보고한 바 있다. 한편 배양하는 절편체로부터 기관분화 양상은 배지조건이나 배지에 첨가하는 성장조절물질에 의해서 차이가 나며 배양하는 식물재료의 부위 연령에 따라서 차이가 많이 나는데, 앞서 보고된 오이 관련 논문은 주로 이런 내용을 다루고 있으나, 배양재료 간에 다른 분화 양상에 대한 해부학적, 생화학적 특징과 관련된 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구는 오이의 경단 및 하배측 배양시 2,4-D 첨가 및 배양환경에 따른 캘러스 분화특성을 조사하고, 캘러스의 형태 특성 차이에 따른 단백질 함량 등을 구명하여 효율적인 오이 재분화 시스템을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 육성

시판하는 오이 (*Cucumis sativus* L.) 2개 품종 '은성백다다기', '조생낙합'을 사용하였다. 오이 종자를 70% 알콜로 30초, 2% 차아염소산나트륨에 15분간 표면살균 후 멸균수로 3회 세척하였다. 소독한 종자는 성장조절물질이 첨가하지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 고체배지에 파종하였다. 배지는 pH 5.8로 조정, 0.8% agar를 첨가후 고압습윤멸균 (121°C, 15분) 하였다. 파종된 종자는 온도 23±1°C, 광도 60 μmol · m⁻² · s⁻¹의 명배양 (16 h/day) 또는 암배양을 하였다. 발아 5~7일 된 유묘를 실험에 사용하였다.

경단 배양

상기와 같이 광조건에서 발아 후 7일된 '은성백다다기' 오이 유묘를 이용하여 엽원기 1매를 포함한 경단을 배양하였다. 배지는 MS 기본배지에 30 g/L 설탕과 0, 0.5, 1, 2 mg/L 2,4-

D를 각각 첨가하였으며, pH 5.8로 조정하고, 0.8% agar를 첨가하여 고압습윤멸균 (121°C, 15분)한 후, 클린벤치 내에서 petridish (Ø 90 mm × 12 mm)에 30 mL씩 분주하여 실험에 이용하였다. petridish 당 8개 경단을 치상하여 5반복하였으며, 배양은 온도 23±1°C, 광도 60 μmol · m⁻² · s⁻¹ (16 h/day)하에 50일간 배양하였다.

하배측 배양

발아기 및 하배측 배양시 광 조사 유무가 캘러스 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 광조건 (60 μmol · m⁻² · s⁻¹, 16 h/day) 및 암조건에서 배양하였다. 발아 5일째 '조생낙합' 유묘의 하배측을 petridish 당 10개 절편체 (길이 약 5 mm)를 치상하여 5반복으로 수행하였다. 배지는 MS 기본배지에 30 g/L 설탕과 1 mg/L 2,4-D를 첨가하였으며, 배양은 23±1°C 온도조건 하에서 광조건 및 암조건에서 50일간 각각 배양하였다. 배양 50일 후 배발생캘러스 및 배상체는 MS 기본배지로 이식하여 유식물체를 유도하였으며 정상적인 개체는 순화과정을 거쳐 비닐하우스에서 재배하였다. 같은 조건에서 분화된 비배발생캘러스는 백색 및 노랑색 캘러스로 구분하여 발근 정도를 조사하였다.

비배발생캘러스의 단백질 정량

비배발생캘러스의 단백질 함량을 조사하기 위하여, '조생낙합' 종자를 암조건에서 7일간 배양하여 육성한 유묘를 1 mg/L 2,4-D, 30 g/L 설탕이 첨가된 MS 배지에 하배측 및 자엽을 배양하였다. 배양은 23±1°C, 60 μmol · m⁻² · s⁻¹ 광조건에서 1일 16시간 조사하여 40일간 배양하였다. 배양 후 캘러스 색깔형태별로 구분하여 Lowry 법 (1951)으로 단백질을 정량 분석하였다.

Table 1. Effect of 2,4-D on callus differentiation in shoot-tip culture of *Cucumis sativus* L. cv. 'Eunseongbaegdadagi'.

2,4-D (mg/L)	Survival (%)	Embryogenic callus		Non-embryogenic callus		Viscous callus		No. of shoots	Shoot height (cm)
		(%)	Growth ^a	(%)	Growth	(%)	Growth		
0	76	0	-	0	-	0	-	1.0	3
0.5	95	0	-	47	2.5	53	1.6	0	-
1	90	0	-	35	2.1	65	1.4	0	-
2	87	0	-	52	2.8	48	0.9	0	-

^aFive mm of callus diameter was indicated by 1.

결과 및 고찰

경단배양시 2,4-D 농도에 따른 캘러스 분화양상

식물생장조정제가 첨가되지 않은 MS 고체배지에서 경단의 생존율은 76%로 다소 저조하였으나, 2,4-D를 첨가한 배지에서는 87% 이상 생존하였으며, 특히 0.5 mg/L 2,4-D를 첨가한 배지에서는 95%로 가장 높게 생존하였다 (Table 1). 또한 MS 기본배지에서는 캘러스는 전혀 분화되지 않고 생존개체 모두 신초로 분화하였으며 배양 50일 후는 약 3 cm 정도 신장하였다. 그러나 2,4-D를 0.5~2 mg/L 첨가한 배지에서는 배발생캘러스는 분화되지 않았으나 비배발생캘러스 및 점액성 캘러스로 분화되었고, 특히 2,4-D 1 mg/L 첨가배지에서는 점액성캘러스가 65%로 가장 많이 분화되었다.

식물조직배양시 생장조절물질의 종류, 처리농도 및 처리기간을 변화시킴으로써 다양한 형태분화를 유도할 수 있다 (Liu et al. 1992). 오이 경단배양시 shoot 분화는 2,4-D 무첨가 배지에서만 관찰되는데 이러한 결과는 고구마 경단배양시 2,4-D는 shoot 분화 및 발근은 억제하나 비배발생캘러스 및 배발생캘러스의 분화에 2,4-D가 촉진적으로 작용한다는 보고와 유사한 경향이였다. 본 실험에서는 배발생캘러스는 전혀

분화되지 않고 비배발생캘러스 및 점액성 캘러스 만이 분화되었다. 이런 결과는 조직절편체로부터 캘러스 분화시 옥옥신 특히 2,4-D가 중요한 역할을 하는데, 2,4-D는 DNA의 전사, mRNA의 번역에 영향을 주어 세포를 배발생 방향으로 변성시킨다. 즉 배양중에 2,4-D 등 옥옥신은 분화조직을 탈분화시킴과 동시에 탈분화된 미분화세포에 배발생능을 갖게 하는데 (Kwon and Cho 1998), 본 연구에서 경단배양시 배발생캘러스의 분화는 없고 비배발생캘러스 및 점액성캘러스가 분화된 것은 배양재료 육성시 암조건이 아닌 광조건에서 육성한 원인으로 생각되었다. 또한 2,4-D 1 mg/L첨가 배지에서는 점액성캘러스의 분화율이 65%로 가장 높았듯이 2,4-D 농도의 높고 낮음에 따라 캘러스의 분화 형태는 다양하였다.

종자 발아기 및 하배축 배양시 광조건에 따른 캘러스 분화양상

종자 발아기 및 하배축 배양기간 중 광조사 유무가 캘러스 분화에 미치는 영향은 table 2와 같다. 하배축 배양 50일후 다양한 형태의 캘러스가 분화되었는데, 배발생캘러스는 노랑고 단단하며 표면이 등골등골한 형태로 분화되는 반면에, 비배발생캘러스는 반투명의 백색으로 부드럽고 물기가 많으며 표면이 거친 모양이었다 (Figure 1). 또한 배발생캘러스의 상단에

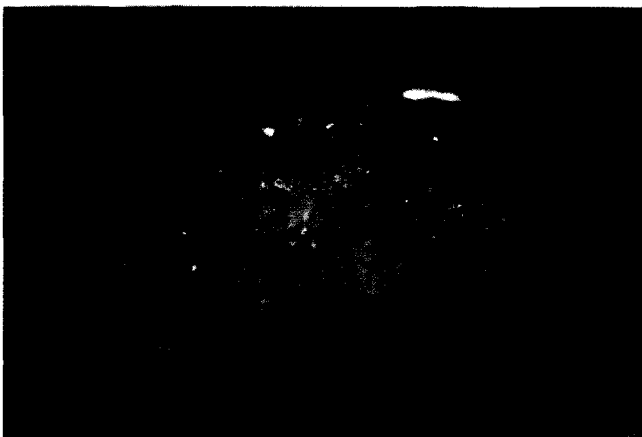


Figure 1. Callus differentiation from hypocotyl explants of *Cucumis sativus* L. cv. 'Josaengnaghab'. EC: Embryogenic callus; NEC: Non-embryogenic callus; ED: Embryoid.

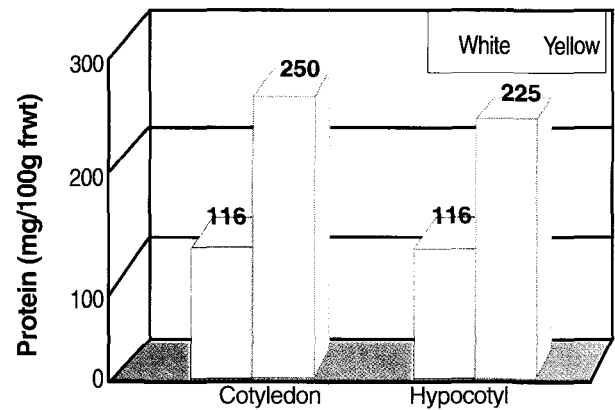


Figure 2. Comparison of protein content between white and yellow calli obtained from cotyledon and hypocotyl culture in cucumber.

Table 2. Effect of light condition during the seedling and hypocotyl culture on callus differentiation of *Cucumis sativus* L. cv 'Josaengnaghab'.

Light condition		No. of explants	Embryogenic callus (%)	Non-embryogenic callus (%)	Embryoid (%)
Seedling	Culture				
Light ^a	Light	40	0 (0)	40 (100)	0 (0)
Light	Dark	30	0 (0)	30 (100)	0 (0)
Dark	Light	46	11 (24)	31 (67)	4 (9)
Dark	Dark	20	0 (0)	0 (0)	0(0)

^aLight condition was intensity of 60 μmol · m⁻² · s⁻¹ during 16 h / day.

서 구상의 배상체가 발달되는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 다양한 형태의 캘러스는 광조건에 따라 달라, 광조건에서 발아된 유묘의 하배축 배양시 광조건과 암조건 모두 배발생캘러스의 분화는 없었고, 배양절편체 모두 비배발생캘러스로 분화하였다. 그러나 암조건에서 발아된 유묘의 하배축을 광조건에서 배양한 경우에는 이식 절편체 중 24%가 배발생캘러스로, 67%가 비배발생캘러스로, 그리고 약 9%가 배상체로 분화하였다. 그러나 발아기 및 하배축배양시 모두 암조건에서 배양하는 경우 배양 절편체 모두 캘러스나 배상체의 분화는 관찰되지 않았다.

조직배양에 있어 기관분화는 광, 온도, 공기조성, 배지 등 여러 요인이 관여하며 특히 광조건은 형태발생에 많은 영향을 미치는데 주로 배양식물체의 전분 축적을 유도하여 shoot 형성을 촉진시키고 (Read 1990), 암조건은 캘러스 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 1998; Jeong et al. 1999). 또한 배발생캘러스 유도시 광은 저해적이지만 일단 배발생캘러스가 만들어지면 광조사 유무에 관계없이 계속 유도되는 것으로 알려져 있다. 이렇게 광조건에 따라 캘러스 분화가 다른 것은 일반적으로 광조건에서는 배양용기 내의 탄산가스 농도가 대기중의 농도보다 훨씬 낮고, 암기 동안에는 유식물체의 호흡에 의한 탄산가스 방출로 대기의 농도보다 높아지는 등 광조건 및 암조건에 따라 배양용기 내의 탄산가스, 에틸렌 등 공기조성이 다르기 때문에 배양 식물체의 대사 및 생리 작용이 달라져 절편체의 분화 양상도 달라지는 것으로 사료된다. Jeong 등 (1999)은 오이 현탁배양시 종자 발아기 및 하배축배양시 모두 암조건에서 배양하여 다양한 캘러스를 유도하고 이들 캘러스를 MS 기본배지에 계대 배양하여 체세포배를 유도하였으나, 본시험에서 종자 발아기에는 암조건에서 배양하고 하배축배양시 광조건에서 배양하여야 배발생캘러스 및 배상체 분화가 양호하였는데, 이런 결과를 볼 때 초기배양시 형태형성에 반드시 광이 필요하지 않고 오히려 암상태에서 분화력이 촉진되는 경우로 사료되었다.

캘러스 색깔 차이에 따른 발근 및 조단백질 함량 특성

하배축배양으로부터 분화된 캘러스의 색깔에 따른 뿌리분화 양상은 table 3과 같다. 비배발생캘러스 중 백색캘러스는 부드럽고 투명하며 unorganized된 형태로 shoot 재분화는 거의 안되고 발근된 캘러스의 뿌리분화율은 약 45% 였다. 그러나 노랑색캘러스는 발근정도가 0.6%에 불과하여 백색캘러스

에서 뿌리 분화가 양호하였다. 그러나 발근된 캘러스는 캘러스 색깔에 관계없이 발근수 및 뿌리길이는 거의 차이가 없었다.

또한 자엽 및 하배축을 배양하여 분화된 캘러스를 백색 및 노랑색 캘러스로 구분하여 조단백질의 함량을 측정된 결과, 캘러스의 생체중 100 g 당 자엽 또는 하배축 유래 백색캘러스는 각각 116 mg 이었으나, 노랑색캘러스는 자엽 유래 캘러스 250 mg, 하배축 유래 캘러스는 225 mg으로 백색캘러스보다 약 2배 정도 함량이 높았다 (Figure 2).

배양절편체로부터 기관분화는 배양조건뿐만 아니라 배양절편체의 내생생장조절물질도 관여하는데 본 시험에서 백색캘러스에서 발근이 양호한 결과를 볼 때 노랑색캘러스보다 백색캘러스에서 오옥신계통의 생장조절물질이 많이 존재하여 발근에 촉진적으로 작용한 것으로 사료된다. 또한 figure 2에서 보는 바와 같이 자엽 및 하배축 유래 캘러스 모두 노랑색캘러스에서 조단백질의 함량이 높고 발근정도가 낮은 것으로 볼 때 단백질 함량이 높은 노랑색캘러스가 발근에 억제적으로 작용하는 것으로 사료된다. 미나리의 배발생캘러스는 비배발생캘러스에 비해 세포질이 농밀하게 차 있고 전분립이 축적된 반면에 비배발생캘러스는 세포배열이 엉성하고 세포가 크며 전분 축적이 적는데 이런 차이는 재분화시 에너지원으로 쓰여지는 것으로 해석된다 (Been and Kim, 1997). 또한 단백질 밴드의 숫자를 비교해 본 결과 비배발생캘러스, 배발생캘러스, 체세포배 순으로 증가하는 양상을 보여 조직의 분화 및 발생과정이 진행됨에 따라 그 기능이 다른 효소를 포함한 새로운 단백질이 만들어진다고 하였다. 본 실험에서는 캘러스의 색깔에 따라서 조단백질의 함량을 다루었으나, 배발생 세포계통은 비배발생 세포계통보다 단백질의 농도가 상당히 높았다는 보고가 있으며 (Filipecki and Prezybecki 1994), 배발생 세포와 비배발생 세포간 핵산이나 단백질의 차이를 보면 세포가 분열하고 배가 되는데 따라 고분자물질의 조성에 변화가 일어난다. 이렇게 형성된 단백질은 식물의 분화과정 중 기관형성에 필요한 효소적 활성을 증가시키는 데 이용될 것이다.

체세포배로부터 식물체 재생

하배축배양 50일 후 얻은 배상체는 식물생장조정제를 첨가하지 않은 MS 고체배지로 이식하였다 (25°C, 16 h/day photoperiod). 뿌리에 부착된 한천을 멸균수로 조심스레 씻으면서 제거 한 후 유식물체는 멸균된 질석 : 펠라이트 (3 : 7, v/v)를 함유한 흑색비닐포트 (Ø9 cm × 8.5 cm)로 이식하였다. 순화 증진을 위해 광도 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (형광등, 16 h photoperiod)하에 Hyponex 500배 희석액을 공급하면서 20일간 기내순화를 시켰다. 순화된 식물체는 혼탄 : 펠라이트 (7 : 3, v/v)가 혼합된 고품배지경에 식재하고 오이전용 Yamazaki용액을 주기적으로 공급하면서 F-clean 하우스에서

Table 3. Root redifferentiation in color of non-embryogenic callus.

Color of callus	No. of explants	No. of rooted explants (%)	No. of roots	Length of root(mm)
White	51	23 (45.1)	2.3	6.9
Yellow	154	1 (0.6)	2.0	5.0

재배하여 과실도 정상적으로 수확하였다.

적 요

기내에서 무균적으로 성장시킨 오이 유묘의 경단조직과 하배축을 배양하여 캘러스 분화 및 생장에 대해 조사했다. 오이 경단조직을 성장조절물질이 첨가하지 않은 배지에서는 유식물체로 분화하였으나 2,4-D가 0.5~2 mg/L 첨가된 MS배지에서는 비배발생캘러스와 점액성캘러스가 유도되었고 배발생캘러스는 분화되지 않았다. 그러나 유묘 육성시 암조건에서 발아 후 5~7일 된 개체의 하배축을 5~10 mm 크기로 절단하여 2,4-D가 1.0 mg/L이 첨가된 MS배지에 50일간 광조건에서 배양했을 때에는 배발생캘러스와 배상체가 분화되었다. 아울러 하배축 유래 비배발생캘러스 중 백색캘러스는 45.1%가 발근된 반면에, 노랑색캘러스는 불과 0.6%만 발근되었으며, 조단백질의 함량은 백색캘러스보다 노랑색캘러스가 월등히 많았다. 배발생캘러스와 배상체에서 발달된 소식물체는 순화과정을 거쳐 비닐하우스 내의 고품배지경에서 양액재배로 정상적인 과실을 수확하였다.

사사 - 본 연구는 농림수산특정연구과제 (AG 420 M)의 연구 결과이며, 단백질 분석에 도움을 주었던 장준택 박사님께 사의를 표한다.

인용문헌

- Chee PP (1990) High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* 25:792-793
- Been CG, Kim BD (1997) Totipotential, morphological, biochemical comparisons between nonembryogenic callus and embryogenic callus in water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC). *Korean J Plant Tissue Culture* 24:167-173
- Filipecki MK, Przybecki Z (1994) Marker proteins of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genetica-Polonica* (Poland). *Polish Journal of Theoretical and Applied Genetics* 35:1-9
- Handley LW, Chambliss OL (1979) In vitro propagation of *Cucumis sativus* L. *HortScience* 14:22-23
- Jeong WJ, Woo JW, Park HG, Choi KS, Liu JR (1999) High frequency plant regeneration in embryogenic cell suspension culture of cucumber. *Korean J Plant Tissue Culture* 26:289-291
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Jo MH, Lee EM, Woo IS, Kwak SS (1998) Expression of pea superoxide dismutase gene in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Korean J Plant Tissue Culture* 25: 201-206
- 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* 25:501-505
- Kim SG, Chang JR, Cha HC, Lee KW (1988) Callus growth and regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 12:67-74
- Kwon ST, Cho MS (1998) Callus induction and somatic embryogenesis from *Sicyos angulatus* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 25:119-123
- Lazarte JE, Sasser CC (1982) Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. *HortScience* 17:88
- Liu JR, Min SR, Yang SG (1992) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid at a single concentration determining various morphogenesis patterns in shoot apical meristem culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Korean J Plant Tissue Culture* 19: 67-170
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Ministry of Agri and Forestry, Rep. Korea (1999) Crop's statistics
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultured. *Physiol Plant* 15:473-497
- Read PE (1990) Environmental effects in micropagation. In: *Handbook of plant cell culture*, Vol. 5, (Ammirato PV et al., eds) McGraw-Hill Pub, New York, pp 95-125.
- Sekioka TT, Tanaka JS (1981) Differentiation in callus cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *HortScience* 16:45
- Trulson AJ, Shahin EA (1986) In vitro plant regeneration in genus *Cucumis*. *Plant Science* 47:35-43

(접수일자 2000년 7월 26일)