

고추의 미숙 접합배로부터 체세포배발생에 의한 식물체 재분화

정원중 · 민성란 · 유장렬* · 박용주¹ · 조규원¹

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹, ¹한농종묘 육종연구소

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Immature Zygotic Embryo Cultures of Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Won Joong JEONG, Sung Ran MIN, Jang R. LIU*, Yong Joo PARK¹, Kyoo Won CHO¹

Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115,
Taejeon, 305-606; and ¹Han-Nong Seeds Co., LTD, Kyeong Nam, 623-840. *Corresponding author.

Immature zygotic embryos (up to 4 mm in length) were cultured on MS medium supplemented with 0.5 to 8 mg/L 2,4-D. Up to 87% of them formed somatic embryos on the plumule without producing an intervening callus. The site of somatic embryo formation was confirmed by culturing plumule explants, which consisted of shoot apical meristem domes with 1 or 2 leaf primordia, excised from 2-week-old seedlings. When the concentration of 2,4-D was increased over 4 mg/L, the plumule explants produced nonembryogenic calli only, whereas the distal end of the cotyledons directly formed numerous somatic embryos at frequencies of up to 60%. Upon transfer onto MS basal medium, 2 out of 15 somatic embryos converted into plantlets. The plantlets were potted to a soil mixture and grown to maturity in a phytotron.

Key words: shoot apical meristem, somatic embryo

고추는 국내에서 가장 중요한 채소작물중의 하나로서 체세포변이체 유도와 유전자 조작 등을 통하여 품종개량을 하려면 이에 대한 재분화시스템을 확립할 필요가 있다. 현재까지 고추에서 조직배양에 의한 식물체 재분화는 자엽, 하배축 혹은 원형질체로부터 기관발생을 통하여 shoot을 유도한 바 있다(Gunay and Rao, 1970; Phillips and Hubstenberger, 1985; Agrawal et al., 1989; Diaz et al., 1989; Ochoa-Alejo and Moreno, 1990; Lee et al., 1993). 조직배양을 통한 식물체 재분화의 다른 경로는 체세포배발생이다. 체세포배발생을 통한 식물체 재분화는 작물의 품종개량을 위하여 많은 종의 작물에서 응용되고 있으나, 고추에서는 최근에 와서 미국품종의 미성숙접합자배로부터 직접 체세포배를 유도하여 처음으로 재분화할 수 있었다(Harini and Lakshmi Sita, 1993). 본 연구에서는 이와 유사한 방법으로 국내품종을 사용하여 체세포배가 발생하는 치상조직, 배지 조건 및 체세포배의 발생부위를 규명하여 효율적인 식물체 재분화시스템을 확립하고자 하였다.

공시재료

체세포배발생을 위한 치상재료로는 홍농종묘사의 F₁잡종 '녹광'의 풋고추(*C. annuum* L.)를 25%로 희석된 상업용 표백제 (유한락스)에 15분 표면살균한 후 멸균증류수로 3회 수세하여, 해부현미경하에서 미성숙접합자배를 크기 별로 적출하고, 홍농종묘사의 '파리' 풋고추를 2주간 25°C, 암조건에서 무균발아된 유식물체로부터 엽원기(leaf primordium) 1-2개를 포함하는 정단분열조직 절편(shoot apical meristem explant), 정단분열조직을 포함하지 않는 자엽절편 및 5 mm 크기로 절단한 하배축을 재료로 사용하였다.

체세포배발생

크기 0-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-3, 3-4 mm의 미성숙접합자배를 2,4-D 농도가 각각 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/L 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지(0.6% Phytagar)에 치상하였다. 엽원기 1-2개를 포함하는 정단부위는 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 고체배지에서 배양하였다. 자엽 및 하배축

절편은 2 mg/L 2,4-D와 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/L BA가 첨가된 MS배지에 치상하였다. 배양조건은 25°C, 광조건을 사용하였으며 각 처리구는 페트리디시당 10개의 절편을 치상하여 3반복 시행하였다. 배양 3주 후 체세포배를 발생부위에 따라 조사하였다.

식물체 재분화

상기조건에서 발생한 고추의 체세포배를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS고체배지에 5개씩 치상하여 3반복으로 발아를 유도하였다. 발아하여 얻어진 유식물체를 피트모스에서 순화시켜 부엽토, perlite, vermiculite 등이 첨가된 상토에 옮겨 인공기상실 (25°C 명/23°C 암; 16시간 광주기; 약 30,000 lx)에서 계속적으로 배양하였다.

결 과

‘녹광’의 미성숙접합자배를 치상조직으로 사용한 경우 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에서는 체세포배가 발생하지 않고 미성숙접합자배가 발아하였다. 그러나 2,4-D가 첨가된 배지에서는 치상 2주 경과 후부터 캘러스의 형성없이 미성숙접합자배로부터 직접 체세포배가 발생하였다(Fig. 1A, B, C). 2,4-D 농도가 낮은 (0.5, 1, 2 mg/L) 경우에 미성숙접합자배의 자엽부위에서는 체세포배가 발생하지 않고 성장점

을 포함하는 정단부위에서 보통 4개의 체세포배가 발생하였고(Fig. 1B, C), 미성숙접합자배의 크기가 클수록 체세포배의 발생빈도가 높아져서 3-4 mm의 것을 치상하였을 때 86.7%로 가장 높았다(Fig. 2A). 체세포배는 구상형, 심장형, 어뢰형 단계가 혼재하였다. 그러나 2,4-D 농도가 높은(4, 8 mg/L)경우에 정단부위에서는 체세포배가 발생하지 않고 캘러스만 나타났으며 미성숙접합자배 자엽의 가장자리가 말리면서 분열능력이 왕성한 조직으로 바뀌어 수 개의 체세포배가 발생하였고(Fig. 1A), 미성숙접합자배의 크기가 작을수록 체세포배의 발생빈도가 높아져서 0.5-1 mm의 것을 치상하였을 때 60%로 가장 높았다(Fig. 2B). 대부분의 체세포배는 구상형과 심장형 단계만 존재하였고 서로 유합되어 있었다.

‘파리’에서 엽원기 1-2개 및 성장점을 포함하는 정단부위를 치상조직으로 사용한 경우, 성장점에서는 점액성의 캘러스가 발생하였으며 성장점 아래쪽의 엽원기 위치에서 캘러스의 형성없이 체세포배가 발생하여 구상형, 심장형, 어뢰형 단계로 발달하였으며(Fig. 1D, E, F), 성장점으로부터 발생한 점액성 캘러스중 일부에서는 2개월이 경과하여 새로이 체세포배가 발달하였다(Fig. 1G). 자엽 및 하배축절편으로부터는 배양 2주 후부터 흰색의 캘러스가 발생하여, BA의 농도가 높아질수록 캘러스는 보다 단단해 졌으나 어떤 농도에서도 체세포배를 형성하지 못하고 비배발생캘러스로서 계속 증식만 하였다. 또한 ‘녹광’ 미성숙접합자배 유래의 체세포배는 발아 중에 하배축 부위에서 이차체세포배가 발

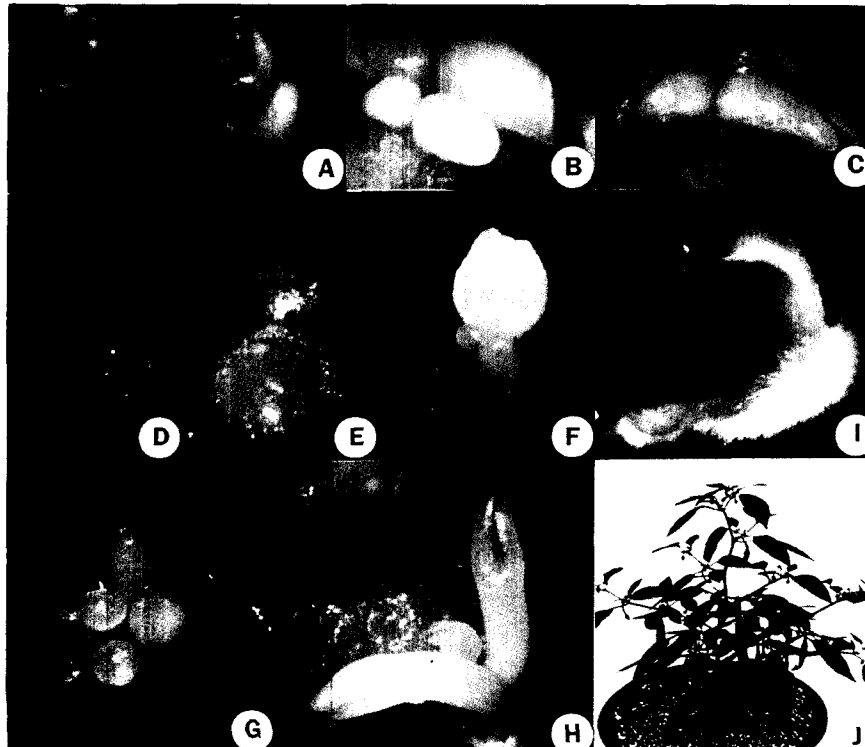


Figure 1. Direct somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of hot pepper. A, Somatic embryos developed from the cotyledon of immature zygotic embryo; B and C, Globular, heart- and torpedo-shaped somatic embryos from the apical region of immature embryos, respectively; D, E and F, Globular, heart- and torpedo-shaped somatic embryos from plumule explants; G, Somatic embryos from meristem-derived calli; H, Secondary somatic embryos from hypocotyl of germinating somatic embryo; I, Germination of somatic embryos. J, Plant converted from somatic embryo.

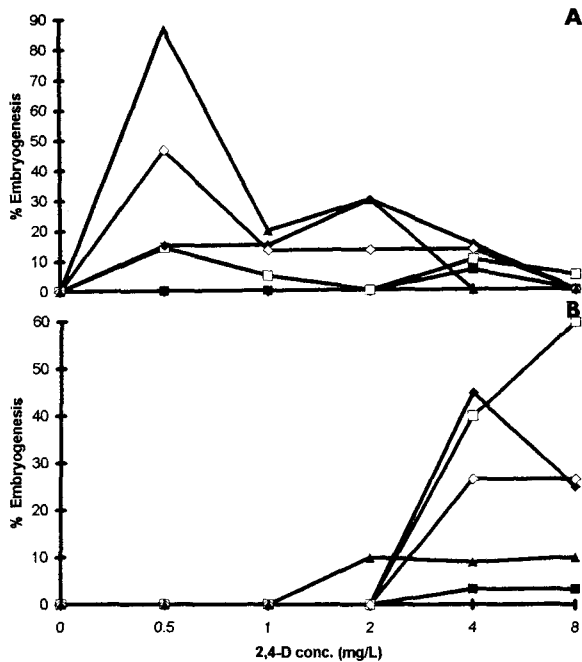


Figure 2. Effects of 2,4-D concentration and immature zygotic embryo size on direct somatic embryo formation frequency (%) of hot pepper. A, Frequency of somatic embryo formation on the apical region of immature zygotic embryo: B, Frequency of somatic embryo formation on the cotyledons of immature zygotic embryo. Symbols are size of immature zygotic embryo explant: —■ (< 0.5 mm), —□ (0.5 ≤ - < 1 mm), —◆ (1 ≤ - < 2 mm), —◇ (2 ≤ - < 3 mm), —▲ (3 ≤ - < 4 mm).

생하였다(Fig. 1H). 미성숙접합자배로부터 발생한 체세포배는 MS 기본배지에서 3,4일 경과 후 하배축이 신장하면서 뿌리가 발달하였으나(Fig. 1I) shoot은 발달하지 않았다. 그러나 2개월후 치상된 15개중 2개의 체세포배가 완전한 shoot과 뿌리를 가진 유식물체로 발아하여 토양으로 옮긴 후 완전한 개체로 발달하여 정상적으로 개화하여 열매를 맺었다 (Fig. 1J).

고 찰

'녹광'의 체세포배는 미성숙접합자배를 사용할 경우 Harini와 Lakshmi Sita (1993)의 보고와 같이 정단아(apical buds)와 자엽에서 발생하였다. 이들은 coconut milk 및 고농도의 sucrose, 1-5 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지에 미성숙접합자배를 치상조직으로 사용하여, 구상형과 심장형 단계의 미성숙접합자배는 2,4-D 존재 하에서 생존치 못하였으며 3-10 mm의 미성숙접합자배를 배양하였을 때, 체세포배의 발생부위는 정단아와 자엽의 두 부위로서 체세포배발생은 1-2 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지에서 가장 양호하였고 2,4-D 농도가 높아질수록 그 빈도는 감소하며 sucrose농도 8%와

10%에서만 체세포배가 유도되었다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 치상재료 '녹광'으로부터는 발달단계 및 크기에 따른 미성숙접합자배와 '과리'의 유식물체로부터는 정단부위, 자엽절편 및 하배축절편을 사용하였을 때, 미성숙접합자배 및 정단부위로부터 체세포배발생을 확인할 수 있었으나 자엽 및 하배축절편으로부터는 재분화능이 없는 캘러스만 발생할 뿐 체세포배 또는 shoot의 발생을 관찰할 수 없었다. 치상재료로 구상형 및 심장형 단계 (길이 0.1-0.5 mm)의 미성숙접합자배를 사용하였을 때, Harini와 Lakshmi Sita (1993)는 대부분 생존치 못하였다고 하였으나 본 연구에서는 50% 이상이 생존하여 그 중 일부에서는 체세포배가 발생하였다. 또한 미성숙접합자배로부터 체세포배발생의 최적 조건은, 정단부위에서는 0.5 mg/L 2,4-D와 미성숙접합자배의 크기 3-4 mm이고, 자엽부위에서는 8 mg/L 2,4-D와 미성숙접합자배의 크기 0.5-1 mm로 각각 다르게 나타났으며 (Fig. 2A, B), 2,4-D 농도가 낮을 때 정단부위에서의 체세포배는 구상형, 심장형, 어퇴형의 모든 단계가 나타났으나, 치상 3주째의 결과 2,4-D 농도가 높았을 때 자엽에서의 체세포배는 구상형과 심장형의 체세포배만이 발생하였다. 또한, Harini와 Lakshmi Sita (1993)의 보고와는 달리 고농도(8% 이상)가 아닌 3% sucrose만을 사용하고 화학적 조성이 결정되지 않은 coconut milk를 사용하지 않고도 효율적으로 체세포배를 유도할 수 있었으므로 배지조건을 더욱 단순화할 수 있었다. 한편 체세포배를 생산하는 미성숙접합자배는 표면이 조직화되면서 크기가 신장하는데 반해, 체세포배를 생산하지 않는 미성숙접합자배는 대부분이 배지에서 희게 탈색되어 치상상태 그대로 죽는 것이 대부분이었다. 따라서 생존율이 높은 배를 선별하여 치상하면 더욱 높은 빈도로 체세포배가 생산될 것이다. 예비 실험결과 투명한 빛을 띠고 단단한 접합자배를 치상하면 미성숙배의 생존율을 높여져 0.5-1 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 체세포배가 90% 이상 발생하였다(data 미제시).

낮은 농도의 2,4-D에서 체세포배는 보통 성장점 둘레의 4곳에서 나타났다(Fig. 1B, C). Harini와 Lakshmi Sita (1993)는 그 부위를 정단아라고 하였으나 본 연구에서는 보다 정확한 위치를 알기 위해 엽원기 1-2개 및 성장점을 포함하는 정단부위를 배양한 결과 성장점부위에서는 점액성의 캘러스가 나타났으나 성장점 아래쪽의 엽원기 위치에서 캘러스의 형성없이 체세포배가 발생한 것으로 보아(Fig. 1D, E, F), 미성숙접합자배를 치상하여 낮은 농도의 2,4-D에서는 체세포배가 성장점 둘레의 엽원기로부터 발생한 것으로 추정할 수 있다. 고농도의 2,4-D에서는 자엽의 가장자리에서 여러 개의 체세포배가 유합되어 발생하였는데 그 개수는 수 개에서 10여개까지 다양하였다. 또한 미성숙접합자배의 크기가 클 경우 체세포배가 관찰되지 않았으나 대부분 자엽부위가 분열이 왕성한 조직으로 바뀌어졌으므로 충분한 배양기간이 주어지면 체세포배가 나타날 것으로 기대된다.

그러나 미성숙접합자배로부터 발생한 체세포배는 기본배지에서 초기에 하배측의 신장 및 뿌리의 발달이 있었으나 2개월 경과후 이들 15개의 체세포중 2개만이 유식물체로 전환되었다. 우리가 수행한 무의 경우에도 2,4-D만 첨가된 배지에서 발생한 체세포배는 주로 하배측의 신장 및 뿌리만 발달하였으나 sucrose 농도를 높이거나 ABA를 첨가하여 발달한 체세포배는 정상적으로 shoot이 발달하였다 (Jeong et al., 1994). 이것은 체세포의 상배측이 충분히 발달되지 않은 상태에서 발아되었기 때문에 추측된다. 따라서 우리는 고추에서도 발아전 체세포배를 충분히 발달시키는 연구를 진행하고 있다.

본 연구의 결과들로 고추의 직접적인 체세포배의 발생기원이 미성숙접합자배의 정단부위에서는 유아(plumule)이고 자엽부위에서는 그 가장자리로 볼 수 있으며, 체세포배의 발생조건은 2,4-D 농도 및 미성숙접합자배의 크기에 따라 다름을 알 수 있었다. 한편 '짜리' 풋고추 유식물체의 정단부위를 배양하여 생장점으로부터 유도된 점액성 캘러스중 일부에서는 체세포배가 새로이 발생하였으며(Fig. 1G), 생장조절제 무첨가배지에서 발아중인 체세포배의 하배측부위로부터 2차체세포배가 발생하였다(Fig. 1H). 따라서 일반적인 체세포배발생처럼 고추에서도 배발생캘러스로부터의 체세포배발생 및 2차 체세포배발생계가 가능할 것이다. Liu 등 (1990)은 자엽 및 하배측을 이용하여 고추의 형질전환을 시도하였으나 재분화식물체를 얻지 못하였으며, 최근에 와서 Lee 등 (1993)은 유식물체의 싹초로부터 기관발생을 이용하여 CMV유전자의 도입 및 식물체에서의 발현을 보고하였다. 이처럼 고추에서 형질전환 연구가 부족한 것은 식물체 재분화 조건이 아직 확립되어 있지 않기 때문으로, 현재까지 대부분의 연구가 고빈도의 재분화식물체를 얻을 수 있는 조건규명에 집중되어 왔다. 본 연구에서 제시된 방법을 이용하면 기관발생의 일반화되지 않은 배지 및 생장조절제의 조건 등의 문제점을 해결할 수 있으나, 이 방법에서 체세포배의 발생률은 높지만 식물체로의 전환율이 낮은 문제점이 나타나 전환율을 높이는 연구가 수행되고 있다. 또한 본 연구에서 수행된 고추의 체세포배발생계를 이용하면 체세포배의 발생위치를 예상할 수 있으므로 보다 효율적으로 형질전환체의 선발이 가능할 것이다.

적 요

0-4mm 크기의 미성숙접합자배를 0.5-8 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 배양하였다. 87%의 미성숙접합자배가 정단부위로부터 캘러스의 발생없이 체세포배를 형성하였다. 1-2개의 엽원기와 생장점을 포함하는 정단분열절편을 배양하여 체세포배의 발생위치는 유아임을 확인할 수 있었다. 2,4-D 농도가 4 mg/L 이상일 때에는 유아에서 비배발생캘

러스만 나타났으나, 60%의 미성숙접합자배가 자엽가장자리에서 체세포배를 형성하였다. 체세포배는 MS 기본배지에서 발아하여 15개의 체세포 중에서 2개가 식물체로 재분화되었다. 재분화된 식물체는 화분에 옮겨서 생육상에서 성숙개체로 발달하였다.

사사 본 논문은 과학기술처 특정과제(G70580)의 연구결과이다. 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해준 백경희, 박상수, 이문순 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Agrawal S, Chandra N, Dothari S L (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 16: 47-55
- Diaz I, Moreno R, Power JB (1988) Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Reports* 7: 210-212
- Gunay A L, Rao P S (1978) In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of re pepper *Capsicum*. *Plant Sci Lett* 11: 365-372
- Harini I, Lakshmi Sita G (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 89: 107-112
- Jeong WJ, Min SR, Liu JR (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Cell Reports* (submitted)
- Lee SJ, Kim BD, Paek KH (1993) In vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explant of Hot pepper (*Capsicum annuum* cv Golden Tower). *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 289-294
- Liu W, Parrot WA, Hildebrand DE, Collins GB, Williams EG (1990) *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports* 9: 360-364
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 91A: 473-497
- Ochoa-Alejo N, Moreno I (1990) Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Hort* 42: 21-28
- Phillips GC, Hubstenberger JF (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 261-269

(1994년 9월 27일 접수)