

야생식물 *Sicyos angulatus* L.로부터 캘러스 유도 및 체세포배 발생

권순태* · 조문수¹

안동대학교 자연과학대학 원예육종학과, ¹대구대학교 자연자원대학 원예학과

Callus Induction and Somatic Embryogenesis from *Sicyos angulatus* L.

KWON, Soon Tae* · CHO, Moon Soo¹

Department of Horticulture and Breeding, Andong Nat'l Univ., Kyungpook, 760-749, Korea: and ¹Department of Horticulture, Taegu University, Kyungpook, 712-714, Korea. *Corresponding author.

In order to investigate the possibility of *in vitro* mass propagation via somatic embryogenesis from *Sicyos angulatus* L., effects of plant growth regulators and carbon sources on callus induction and somatic embryogenesis were evaluated. Optimal combinations of plant growth regulator for callus induction from cotyledon and inflorescence explants were 2,4-D 2.0 mg/L + BA 0.1 mg/L and 2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/L in MS basal medium supplemented with sucrose 30 g/L, respectively. Somatic embryogenesis was observed from cultured inflorescence explants, but it could not be achieved from leaf or cotyledon explants. The most effective plant growth regulators for somatic embryogenesis from callus was NAA 1.0 mg/L + kinetin 1.0 mg/L in the half strength of MS basal medium supplemented with 20 g/L sucrose.

Key words: BA, 2,4-D, inflorescence, explant, carbon source

야생식물인 *Sicyos angulatus* L.(일명 '안동오이')은 안동시 인근의 하천가에서 서식하는 박과식물로 이 등(1991)이 우연히 발견하여 보고하였는데 우리 나라에는 아직 이름이 알려지지 않은 귀화식물로 추정하고 있다. 이 식물은 박과 채소의 접목용 대목(rootstock)으로 이용할 경우 기존에 사용하고 있는 대목에 비해 우수한 접목활착률과 수량성을 보여, 대목용 묘의 종자를 상당부분 외국산에 의존하는 실정에서 자생식물로서 대체가 가능함을 보고한 바 있다(Lee et al., 1991). 한편, 이 식물은 발아시 뿌리의 수가 기존의 대목보다 많고, 접목 시 덩굴쪼김병이 현저히 감소하며, 환경 적응성이 강한 것으로 알려져 있다(Lee et al., 1991; Lee 1989; Kwon et al., 1996). 박과채소인 호박, 참외, 특히 오이와 흡사한 모양을 하고 있어 일부 농가에서 실제 대목으로 사용하고 있다(Lee et al., 1991; Lee 1989; Park and Jung, 1989; Kwon et al., 1996). 지금까지 이 식물에 대한 연구는 형태적 특성과 종자의 발아 및 접목친화성에 관하여 부분적으로 수행되었으나 아직 미진하다. 특히, 이 식물은 종자의 발아율이 극히 저조하여 실제 농가에 적용하기에는 많은 어려움이 있다(Hwang et al., 1994). 이 식물을 대목으로 사용하기 위해서는 수박씨앗 모양의 딱딱한 종피를 일일이

제거하여 발아시킨 후 사용해야 하나 종피를 제거하는 과정에 자엽의 손상으로 상당부분이 발아하면서 묘가 썩거나 생육이 저조하게 되어 대량재배를 위한 농가의 실용화에 큰 장애요인이 된다. 이러한 문제점을 효율적으로 해결할 수 있는 방법의 하나는 조직배양에 의해 건전한 토의 대량 생산을 모색하는 것으로 사료된다.

따라서, 본 실험은 *Sicyos angulatus* L.의 세포배양과 체세포배 발생에 미치는 식물생장조절제의 영향과 배지에 첨가되는 탄소원의 영향을 조사하여 박과식물의 대목으로써 상당한 잠재력을 가진 이 식물의 농가 확대보급을 위한 기초 자료를 얻고자 수행되었다.

재료 및 방법

안동시 인근의 하천가에서 자생하는 *Sicyos angulatus* L.(이하 '안동오이'라 칭함)의 종자를 채취하여 종피를 제거한 후 꾀트에 파종하여 온실에서 재배하였다. 조직배양을 위해 발아 후 10일된 유묘로부터 자엽을 채취하였고, 약 1달이 경과한 식물체로부터 잎을 채취하였다. 화기는 자동동

주인 안동오이의 꽃 중 미수정된 암꽃만을 채취하여 사용하였다. 식물재료는 70% 에탄올에 30초, 3% 과산화수소에 3분 및 1% sodium hypochlorite 용액에 10분간 연속적으로 살균하여 멸균수로 수회 세척 후 사용하였다. 기본배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962)에 30 g/L sucrose를 첨가한 후 pH 5.8로 조정하였다. 식물생장조절제는 auxin류로 2,4-D 1, 2, 5 mg/L와 NAA 1, 2 mg/L, cytokinin류로 BA 0, 0.1 mg/L과 kinetin 0, 1.0 mg/L를 단독 또는 혼용 처리하였다. 식물 절편체는 가로 세로 5mm씩 잘라 9cm 샐리에 5개씩 5반복으로 치상하였고, 25°C항온이 유지되는 1,500 lux 형광등 하에서 배양하였다. 치상 6주 후에 유도된 캘러스의 생체중과 구상형(globular)이상이 진전된 체세포 배의 수를 조사하였다. 각각의 절편체에서 유도된 캘러스의 체세포배 발생 능력을 알아보기 위하여 캘러스를 유도한 절편체별로 구분 치상하여 6주 후에 형성된 배의 수를 조사하였다. 한편 캘러스로부터 형성된 체세포배의 경시적 발달과정을 관찰하기 위하여 구상형배만 다량이 형성된 배 발생 초기단계의 캘러스만을 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 이식하여 매 3일 간격으로 동일한 캘러스에서 형성되는 구상형, 심장형, 어뢰형배 및 자엽의 수를 관찰하였다. 안동오이는 조직배양시 MS기본배지에서 초대배양은 가능하나 1차 계대배양부터는 MS기본배지를 그대로 사용하면 형성된 캘러스의 90% 이상이 1주일 이내에 갈변 고사하는 현상이 발생하여, 초대배양이후의 모든 배양은 1/2 MS염류가 함유된 배지에서 배양하였다. 탄소원의 처리는 sucrose, glucose, fructose 및 galactose를 각각 20, 30 및 50 g/L를 처리하여 6주 후 발생된 배의 수를 조사하였다.

결과 및 고찰

식물생장조절물질인 auxin류와 cytokinin류의 농도를 달리 하여 MS배지에 첨가한 후 화기, 자엽 및 잎 절편체를 구분 치상하여 6주 후에 유도된 캘러스의 생체중과 형성된 체세포배의 수를 조사하였다(Table 1). 먼저 캘러스의 유도량을 보면 식물생장조절물질의 처리조합별로 약간의 예외는 있으나 대체적으로 자엽의 절편체가 가장 많고 화기 및 잎의 순이었다. 안동오이의 잎 절편체는 염육이 거의 없어서 소독과정에서 이미 상당 부분이 손상을 입어 조직배양을 위한 절편체로는 적당치 않다. 캘러스 유도에는 화기 및 자엽 절편체 공히 2,4-D를 처리한 것이 가장 양호하였는데, 2,4-D를 단독으로 처리한 것 보다 BA 0.1 mg/L가 혼용된 것이 현저히 높았다. 캘러스 유도에 가장 양호한 처리는 2,4-D 2 mg/L + BA 0.1 mg/L를 조합한 자엽 절편체로 6주 후에 절편체당 271 mg으로 나타났고 화기절편체는 2,4-D 1 mg/L + BA 0.1 mg/L였다. 2,4-D에 kinetin을 혼용한 것은 BA에 비하여 효과가 현저히 낮으며 NAA처리도 캘러스 유도에는

Table 1. Effects of growth regulators and explants on callus induction and somatic embryogenesis of *Sicyos angulatus* L¹⁾.

Growth regulators(mg/L)	Callus fresh weight(mg/explant)			No. of somatic embryos(/explant)		
	Inflorescence	Cotyledon	Leaf	Inflorescence	Cotyledon	Leaf
2,4-D+BA						
1 + 0	105	85	1.8	10.7	0	0
2 + 0	73.5	64.8	1.8	12.8	0	0
5 + 0	57.0	65.0	1.0	8.7	0	0
1 + 0.1	100.7	229.5	0.5	0	0	0
2 + 0.1	87.9	271.0	13.3	0	0	0
5 + 0.1	70.0	102.0	3.5	0	0	0
2,4-D+Kinetin						
1 + 1.0	24.8	2.8	2.8	6.8	0	0
2 + 1.0	34.5	0	3.5	10.4	0	0
NAA+BA						
1 + 0	0	0	0	24.8	0	0
2 + 0	18.7	14.3	4.5	10.7	0	0
1 + 0.1	0	7.3	0	0	0	0
2 + 0.1	12.8	22.0	3.8	0	0	0
NAA+Kinetin						
1 + 1.0	0	7.8	3.7	38.7	0	0
2 + 1.0	0	6.4	7.8	14.5	0	0
LSD 0.05	24.3	34.5	ns	14.0	-	-

¹⁾All data were determined at 6 weeks after explant inoculation.

효과적이지 못하였다. 일반적으로 분열조직이 포함되지 않은 절편의 배양에서는 탈분화과정에 호르몬의 요구가 필수적이며 주로 auxin과 cytokinin의 농도균형이 탈분화와 재분화의 조절에 중요하다. 한편 많은 경우에 있어서 탈분화와 체세포배 발생에는 2,4-D가 필수적인 것으로 보고되고 있는데(Chung et. al., 1995; Guo and Gui 1993), 본 실험에서도 동일한 농도의 NAA보다 2,4-D가 효과적이었고 cytokinin류 중에서는 kinetin보다 BA가 효과적이었다.

각 배지별로 치상된 절편체 종류별 형성된 체세포배의 수를 보면(Table 1), 자엽과 잎 절편체에서는 전혀 체세포배가 형성되지 않았으나 화기 절편체에서는 상당한 수의 체세포배가 발생하였다. 캘러스의 형성에는 2,4-D가 NAA에 비해 효과적이었으나 체세포배 발생에는 2,4-D에 비해 NAA가 효과적인 것으로 나타났다. 2,4-D 1, 2 및 5 mg/L를 단독 처리한 화기 절편체에서 각각 평균 10.7, 12.8 및 8.7개의 체세포배가 형성되었으나 BA 0.1 mg/L가 2,4-D와 혼용 처리된 곳에서는 전혀 체세포배 발생이 되지 않아 BA는 안동오이의 체세포배 발생에 억제작용을 하는 것으로 나타났다. 그러나, kinetin과 2,4-D가 혼용 처리된 곳에서는 체세포배가 발생되어, 같은 cytokinin류라도 그 종류에 따라 체세포배 발생에 미치는 영향이 다름을 알 수 있다. 본 실험에서 사용된 식물생장조절제 중 안동오이의 체세포배 발생에 가장 양호한 처리는 NAA 1.0 mg/L + kinetin 1.0 mg/L가 혼합된 처리로 치상 6주후에 절편체당 평균 38.7개의 체세포배가 관찰되었다. Auxin의 종류에 따라 체세포배 발생효율이 차이가 나는 현상에 관해서는 여러 종류의 식물에서

Table 2. Somatic embryogenesis from callus derived by various explants of *Sicyos angulatus* L.¹⁾

Growth regulators (mg/L)	Explants at callus induction		
	Inflorescence	Cotyledon	Leaf
Hormone free	28.7	0	0
24-D 1	7.0	0	0
24-D 1 + Kinetin 1.0	5.5	0	0
NAA 1	47.0	8.7	0
NAA 1 + Kinetin 1.0	106.8	13.4	0
LSD 0.05	22.0	-	-

¹⁾All data were determined at 6 weeks after callus inoculation.

관찰되었는데, *Aralia cordata*의 경우 IAA나 NAA보다 24-D가 효과적이라고 하였고(Lee and Soh, 1993), *Solanum melongena* (Matsuoka and Hinata, 1979)나 *Thalictrum urbaini* (Yang and Chang, 1980)의 경우에는 각각 NAA와 IAA처리가 효과적이라고 하여 식물의 종류에 따라 auxin의 요구성이 다른 것을 알 수 있다. MS배지를 기본으로 하여 안동오이로부터 유도된 캘러스를 동일한 배지로 옮긴 후 1주일 경부터 캘러스가 급격히 갈변하면서 고사하는 현상이 나타난다. 이것을 해결하기 위하여 다양한 종류의 배지를 사용해 보았으나 MS배지의 염류농도를 반으로 희석한 1/2 MS기본배지를 사용하는 것이 세포의 갈변고사를 방지하는데 가장 효과적이어서(자료미제시) 초대배양이후의 모든 배양은 1/2 MS기본배지를 사용하였다.

각각의 절편체로부터 유도된 캘러스의 체세포배 발생능력을 조사하기 위하여 절편체 별로 유도된 캘러스를 구분하여 치상 후 형성된 체세포배를 관찰하였다(Table 2). 앞으로부터 유도된 캘러스에서는 전혀 체세포배 발생이 관찰되지 않았고, 자엽으로부터 유도된 캘러스에서는 NAA 1 mg/L 및 NAA 1 mg/L + kinetin 1 mg/L 처리에서 체세포배 발생이 관찰되었다. 잎이나 자엽에서 유도된 캘러스의 체세포배 발생능력이 저조한 반면 화기로부터 유도된 캘러스에서는 다량의 체세포배가 형성되었다. 육안으로 관찰된 배 발생 캘러스는 치상 후 약 1 내지 2주 후부터 서서히 색이 적갈색으로 변하면서 굳어지는 과정을 거치면서 체세포배가 발생되었다(Figure 1). 화기의 캘러스를 호르몬이 없는 배지에 옮기면 24-D가 처리된 배지보다 체세포배의 발생수가 많았으며 NAA 1 mg/L나 NAA 1 mg/L + kinetin 1 mg/L 배지에서는 각각 평균 47.0 및 106.8개의 체세포배가 형성되어 효과적이었다. 본 실험에서 동일한 캘러스라도 캘러스가 유래한 절편체의 종류에 따라 배 발생능력이 현저한 차이를 나타내는 것을 볼 수 있는데, 안동오이 캘러스의 체세포배 발생여부는 일차적으로 절편체의 종류가 결정적인 영향을 미치며 배 발생의 효율성은 식물생장조절제의 종류나 농도에 의해 좌우된다고 볼 수 있다. *Cnidium officinale*의 잎과 엽병 절편체에서는 캘러스는 유도되나 체

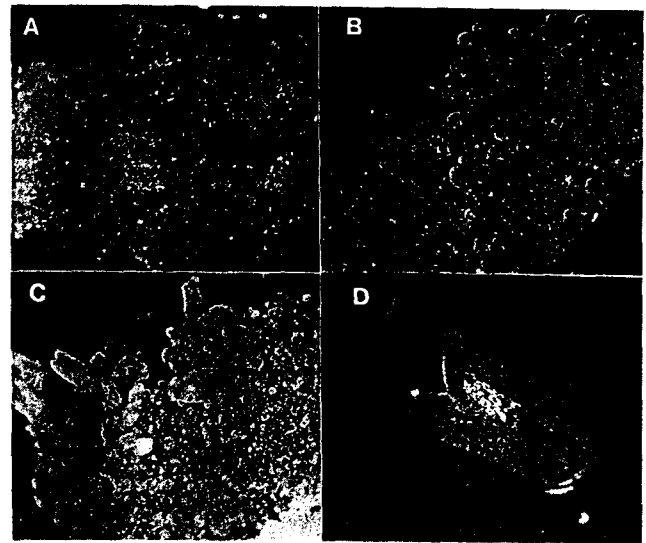


Figure 1. Somatic embryogenesis from callus of *S. angulatus* L. A: callus stage, B: globular- and heart-shaped embryos, C: torpedo-shaped embryos, D: Single embryo isolated from callus.

세포배가 형성되지 않고 미수정 화기에서만 체세포배가 형성된다고 하였고(Cho et al., 1994), *Oplonanax elatus*도 화기에서만 체세포배가 발생된다고 하였다(Cho et al., 1991). 초본식물에서도 체세포배 발생을 위한 절편체로서 화기가 다른 조직보다 효과적이라는 보고도 있다(Sun and Chu, 1986; Pareddy and Petolino, 1990; Wang et al., 1990).

캘러스로부터 체세포배가 발생하는 과정 중 구상형 배만 관찰되는 캘러스(Figure 1-B)를 선발하여 호르몬이 없는 고체배지에 옮겨 매 3일 간격으로 배 발생의 단계를 조사하였다(Figure 2). 최초 3일에는 구상형 배에서 심장형 배로 진전되는 것이 관찰되지 않았으나 6일째에는 한 두개가 관찰되었고 배양일수가 경과할수록 구상형 배에서 심장형으로 진전되는 정도가 현저히 증가하였다. 어뢰형 배가 관찰된 것은 배양 후 12일이 경과한 후였고 18일 후에는 자엽이 관찰되었다. 본 실험에서 관찰된 바로는 하나의 캘러스덩이에 있는 수십개의 구상형배가 모두 심장형 및 어뢰형 배의 과정을 거쳐 자엽으로 발달하는 것이 아니라 구상형 배의 약 30% 정도는 적절한 계대배양을 하지 않을 경우 더 이상의 배 발생 단계를 진전시키지 못하는 것으로 나타났다. 본 실험의 결과로 보아 캘러스에서 배 발생을 통한 식물체를 생산할 경우 구상형 배 단계에서 1차적으로 계대배양을 한 후 심장형 배의 수가 최대로 증가하는 시점인 15-18일 경에 계대배양을 하는 것이 효율적일 것으로 사료된다. *Cnidium officinale*는 액체배양을 할 경우 구상형에서 최초로 어뢰형 배가 관찰되는 시기가 배양 후 5일부터라고 한 것으로 보아(Cho et al., 1994) 안동오이의 경우도 액체배양을 할 경우 배 발생 단계가 훨씬 앞당겨 질 수도 있을 것으로 기대된다.

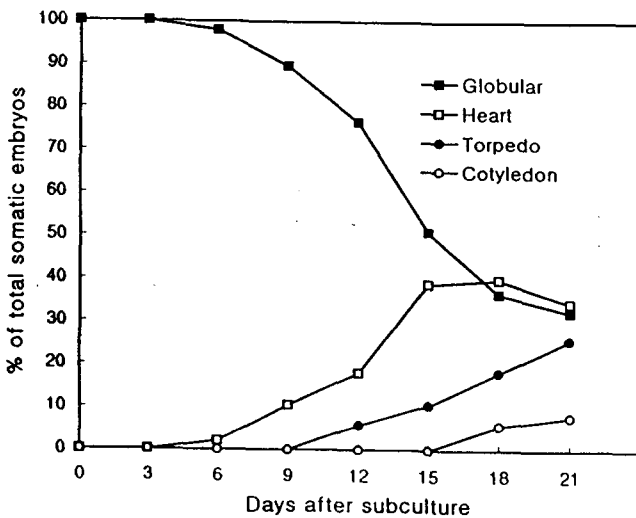


Figure 2. Changes in the composition of various stages of somatic embryos during the culture on solid medium. Callus with globular-shaped embryos were incubated on hormone free 1/2MS medium and counted the number of embryos every 3 days.

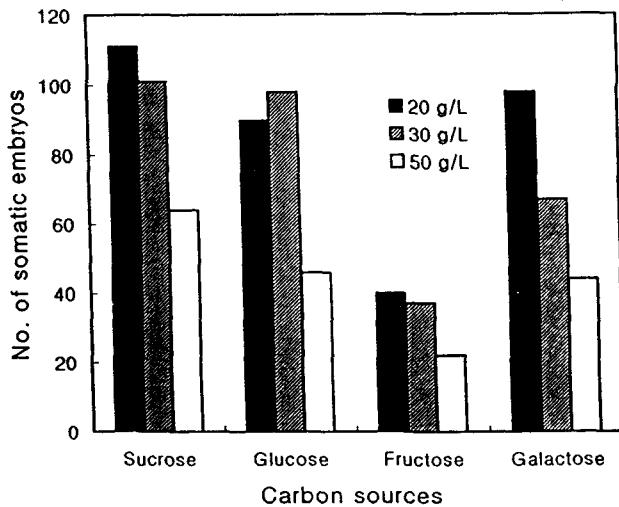


Figure 3. Effect of carbon sources on somatic embryogenesis from callus of *S. angulatus*. Number of somatic embryos were counted at 6 weeks after incubation.

배지의 탄소원으로 sucrose 외에 glucose, fructose 및 galactose를 처리하였을 때 캘러스로부터 발생된 체세포 수를 관찰하였다(Figure 3). 탄소원의 종류에 관계없이 50 g/L을 처리한 경우 배 발생 수가 현저히 감소하였다. Fructose는 체세포 배 발생에 효과적이지 못한 것으로 판단되며, sucrose와 galactose는 처리 농도가 20에서 50 g/L로 증가하면 배 발생 수가 감소하는 것으로 나타났고, glucose는 30 g/L처리가 가장 효율적인 것으로 나타났다. 사용된 탄소원 중 sucrose 20 g/L를 처리한 곳이 캘러스 당 평균 110개의 체세포배(구상형 단계 이상의 배)가 관찰되어 가장 효과적

이었다. 아스파라거스의 체세포배 형성에는 glucose, fructose, mannose 및 sucrose 중 sucrose와 glucose가 가장 효과적이었다고 하였고(Levi and Sink, 1990), *Ligusticum chuanxaong* (Che and Park, 1994)의 경우 탄소원으로 fructose를 사용하면 체세포배의 형성능력이 현저히 떨어지며 심장형 배 이상의 단계로 진전되지 않는다고 하였고, 액체배양에서 sucrose가 가장 효과적이라고 하여 본 실험의 안동오이의 경우와 일치하는 경향이었다.

안동오이는 박과식물과 우수한 접목친화성이 있으나 종자 발아율이 극히 저조하여 농가보급 및 실용화를 위해서는 묘의 생산이 가장 시급히 해결되어야 할 문제점이라 하겠다. 본 실험에서 체세포배 발생을 위한 적정 식물생장조절제 농도와 탄소원의 종류 및 농도를 구명하였는 바 안동오이의 화기조직의 기내배양에 의하여 묘의 대량증식 가능성을 시사해주고 있다. 금후 체세포배 발생을 거쳐 생산된 묘의 순화방법 및 효율적인 접목재배법에 관하여 계속 연구할 예정이다.

적 요

박과식물과 우수한 접목친화성을 가진 것으로 알려진 야생식물인 *Sicyos angulatus* L.(일명 '안동오이')의 화기, 자엽 및 잎 조직을 배양하여 캘러스유도 및 체세포배의 획득 가능성을 밝히고 기내배양에 의한 묘의 대량증식에 필요한 기초자료를 얻고자 본 실험을 수행하였다. 자엽이나 화기 절편체로부터 캘러스유도를 위한 가장 적합한 식물생장조절제는 MS 배지에 각각 2,4-D 2.0 mg/L + BA 0.1 mg/L와 2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/L를 첨가한 것이었다. 잎 및 자엽 절편체로부터는 체세포배 발생이 되지 않았으나 화기 절편체에서는 체세포배 발생이 관찰되었다. 화기로부터 유래한 캘러스를 NAA 1.0 mg/L + kinetin 1.0 mg/L가 첨가된 1/2 MS기본배지에 배양하면 가장 효율적으로 체세포배를 획득할 수 있었고, 탄소원으로는 sucrose 20 g/L가 가장 효율적이었다.

인용 문헌

Che YA, Park SU (1994) Effect of carbon and nitrogen source on somatic embryogenesis in suspension culture of *Ligusticum chuanxiang* Hort. Korean J Medicinal Crop Sci 2: 44-50
 Cho HJ, Yang WY, Lee JR, Park YG, Lee SY (1994) Plant regeneration through embryogenesis of *Cnidium officinale* Makino. RDA J Agri Sci 36: 165-172
 Cho HJ, Yang WY, Yan DW, Kim YH, Soh WY, Chung TY (1991) Somatic embryogenesis from inflorescence derived callus of *Oplopanax*

- elatus* NAKAI. Res Rept RAD 33(3): 1-6
- Guo Z, Gui Y** (1993) Plant somatic embryogenesis and artificial seeds. In Soh WY, Lui JR, Komamine A, eds, *Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants* pp 150-159
- Hwang JM, Lee SG, Lee WY** (1994) Studies on the seed germination and disease resistance of wild plant, *Sicyos angulatus* L. as the root stock of cucurbitacea vegetables. Proc of 24th International Horticultural Congress at Kyoto pp 173
- Jung JD, Ham JS, Sohn JK** (1995) Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *Paeonia lactiflora* PALL. Korean J Plant Tissue Culture 22: 47-51
- Kwon ST, Cho MS, Oh SM** (1996) Response of cucumber and *Sicyos angulatus* L. plants and cells to drought and temperature stresses. Korean J Plant Tissue Culture 23: 89-96
- Lee JM** (1989) On the cultivation of grafted plants of cucurbitaceous vegetables. J Kor Soc Hort Sci 30: 169-179
- Lee KS and Soh WY** (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue culture of *Aralia cordata* Thumb. Korean J Plant Tissue Culture 20: 77-83
- Lee WH, Kim SB, Kwak BH** (1991) Characteristics of *Sicyos angulatus* L. growing wild in Andong area and its potential as root stock for cucurbitaceous crops. J Kor Soc Hort Sci 32: 299-304
- Levi A and Sink KC** (1990) Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus. Plant Physiol 137: 184-189
- Matsuoka H, Hinata K** (1979) NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. J Exp Bot 30: 363-370
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Pareddy DR, Petolino JF** (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. Plant Science 67: 211-219
- Park JY, Chung HD** (1989) Effects of several rootstocks on plant growth, fruit quality and yield in oriental melon. J Kor Soc Hort Sci 30: 262-270
- Sun CS, Chu CC** (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence of *Coxi lacrymajobi*. Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 175-178
- Yang YW, Chang WC** (1980) Embryoid formation and subsequent plantlet regeneration from callus cultures of *Thalictrum urbainii* Hayata (*Ranunculaceae*). Z Pflanzenphysiol 97: 19-24
- Wang L, Huang B, He M, Hao S** (1990) Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. Annals Botany 65: 271-276

(1998년 1월 6일 접수)