

## 오이(*Cucumis sativus* L.) 기관분화 및 체세포배 발생을 통한 식물체 재분화

김재훈 · 오승용 · 이행순 · 광상수\*  
생명공학연구소 식물생화학 Research Unit

### Plant Regeneration Through Organogenesis and Somatic Embryogenesis of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

KIM, Jae-Whune · OH, Seung-Yong · LEE, Haeng-Soon · KWAK, Sang-Soo\*

Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea. \*Corresponding author.

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants were regenerated through organogenesis and somatic embryogenesis in cotyledon and hypocotyl cultures. The shoots were efficiently formed on the basal region of cotyledons cultured on MS medium containing 1.0 mg/L zeatin and 0.1 mg/L IAA in all cultivars used. Embryogenic calli were formed on hypocotyl segments cultured on MS medium containing 1.0 mg/L 2,4-D in cv. group 'Nakhab' and maintained by consecutive subculture on the same medium every 2-3 weeks without loss of embryogenic ability. Upon transfer to MS basal medium, high frequency somatic embryogenesis was achieved easily from embryogenic callus. Regenerated plantlets through organogenesis and somatic embryogenesis were transplanted to pots and gradually acclimatized to greenhouse condition where they subsequently produced fruits.

**Key words:** cotyledon, embryogenic callus, hypocotyl, regenerated plantlets

과채류는 90% 이상이 수분으로서, 저 칼로리 식품일 뿐만 아니라 무기염류와 비타민류의 중요한 공급원으로 이용되고 있다. 특히 오이(*Cucumis sativus* L.)는 과채류 중에서도 알칼리도가 높아, 산성식품을 주로 섭취하는 우리 식생활의 균형을 위해 유용한 것으로 평가되고 있다. 지금까지 고품질 오이 개발을 위한 조직배양 연구가 많이 수행되어, 하버측(Rajasekaran et al., 1983), 잎(Chee and Tricoli, 1988), 자엽(Cade et al., 1987; Gambley and Dodd, 1990), 화분(Lazarte and Sasser, 1982), 원형질체(Jia et al., 1986; Colijn-Hooymans et al., 1988) 등의 배양으로부터 식물체 재분화가 보고되었다. 그러나 이와 같은 보고에도 불구하고, 여전히 낮은 비율의 식물체 재분화 및 생존율, 비정상적인 형태형성, 조기개화 등 많은 문제점이 나타났다(Ziv and Gadasi, 1986; Kim et al., 1988; Gambley and Dodd, 1991). 또한, 국내에서도 여러 오이 품종을 대상으로 조직배양에 의한 식물체 재분화에 대해 체계적인 연구 보고가 미비한 실정이다. 따라서 조직배양에 의해 정상적인 형태로 발달하는 오이 개체를 얻기 위하여 개선된 재분화 방법이 요구된다.

본 연구를 통하여 국내 오이품종을 대상으로 자엽절편에서 부정아를 유도하여 재분화 개체를 얻는 방법과 하배측절편으로부터 배발생 캘러스를 유도하여 그 특성을 유지하면서 증식시켜 이들로부터 재분화체를 대량으로 생산할 수 있는 방법을 개발하였다.

#### 재료 및 방법

##### 자엽절편 배양으로부터 부정아 유도

오이(*Cucumis sativus* L.) 종자(여름삼척, 은성백다다기, 백봉다다기, 조생낙합, 장형낙합)를 증류수에 1시간 동안 침지시킨 후 75% ethanal에 1분간 1차 표면 살균한 다음 2% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 2차 멸균시킨 후 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균 처리된 종자는 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에서 발아시켰다. 종자 발아조건은 약  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 형광빛

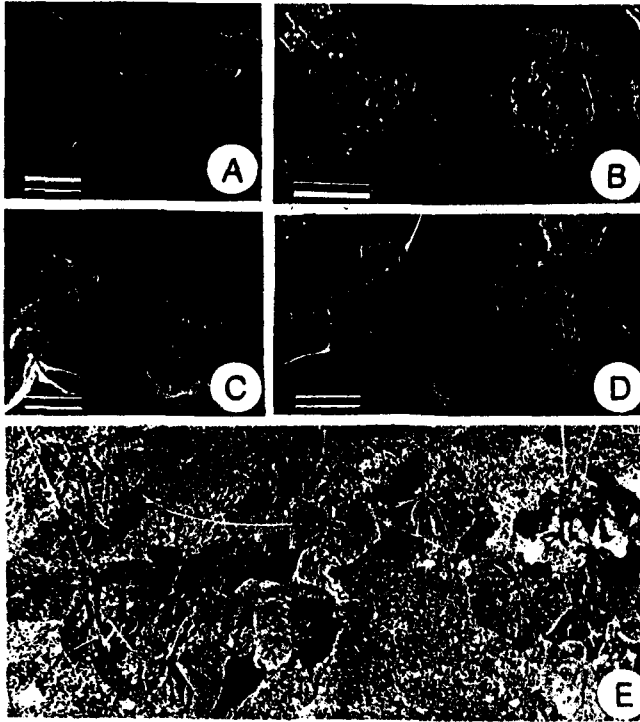


Figure 1. Plant regeneration by organogenesis from cotyledon cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). A: Cotyledons cultured on MS medium containing 1.0 mg/L zeatin and 0.1 mg/L IAA, B: Shoots induced from cotyledon explants, C: Plantlets with roots and shoots, D: Shoots showing morphological abnormality, E: Regenerated plants growing in a green house. Bars = 10 mm.

아래에서 16 시간, 암 8시간의 광주기와  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도였다. 발아 7일째 자엽의 기저부와 상층부를 절단하여 중심부(크기 약  $5 \times 5 \text{ mm}$ )만을 배지에 이식하여 배양하였다 (Figure 1A). 자엽절편 배양을 위한 배지조성은 MS 배지에 3% sucrose와 0.4% Phytigel를 첨가한 후 cytokinin (1.0 or 2.0 mg/L zeatin, 1.0 mg/L BAP, 1.0 or 3.0 mg/L kinetin) 및 IAA (0.1 or 0.2 mg/L) 와 조합처리하고, pH를 5.8로 조정하였다. 배지는  $121^\circ\text{C}$ , 1.2 기압으로 15분간 습열 멸균하여 Petridish ( $87 \times 15 \text{ mm}$ )에 각각 25 mL씩 분주하였으며, Petridish당 5개의 자엽절편을 이식하여 배양하였다. 배양은 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 와  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 형광빛 아래에서 16시간, 암 8시간의 광주기로 하였다. 자엽절편을 cytokinin 단독 및 IAA와 조합 처리된 MS 배지에 이식하여 4주간 배양한 후 부정아(shoot) 발생을 조사하였다.

하배축 배양으로부터 체세포배 유도

오이의 종자 발아는 위의 자엽배양과 동일한 방법으로 암소에서 수행하였다. 발아 5 일째 하배축을 절단(길이 5-10 mm)하여 배양하였다. 배지조성은 MS 배지에 3, 5, 10% sucrose와 0.4% Phytigel 및 1.0 mg/L 2,4-D를 첨가한 후,

Table 1. Effect of plant growth regulators on shoot formation from cultured cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Eunsung Bakdadagi) after 4 weeks of culture.

MS medium + (mg/L)				Number of cotyledons used	Number of shoots (%)
BAP	kinetin	zeatin	IAA		
1.0				315	4 (1.3)
1.0			0.1	720	32 (4.4)
	1.0			210	0 (0)
	1.0		0.1	345	7 (2.0)
		1.0		324	11 (3.4)
		1.0	0.1	379	46 (12.1)
		2.0	0.2	251	27 (10.7)
	3.0		0.2	227	13 (5.7)

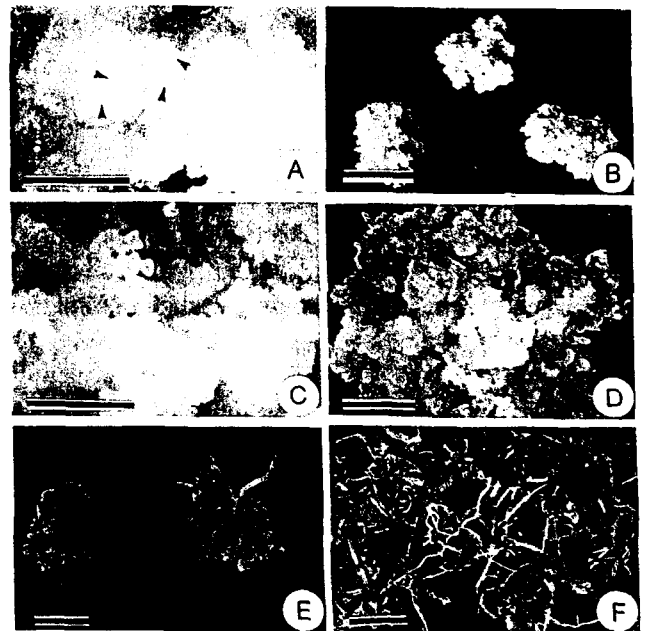


Figure 2. Somatic embryogenesis from embryogenic callus of cucumber (*Cucumis sativus* L.). A: Embryogenic callus (arrowheads) induced on MS medium containing 1.0 mg/L 2,4-D, B: Embryogenic callus maintained on MS medium containing 1.0 mg/L 2,4-D, C: Globular embryos developed on medium without growth regulators, D: Various stage embryos developed from globular embryos, E: Cotyledonary-stage embryos developed through somatic embryogenesis, F: Plantlets germinated from mature somatic embryos. Bars = 10 mm.

pH를 5.8로 조정하였다. 하배축절편으로부터 유도된 배발생 캘러스는 같은 조건의 배지에서 계대배양을 실시하여 배발생 캘러스만을 선별하여 양호한 것만을 유지 및 증식시켰다. 배발생 캘러스로부터 체세포배 발생은 2,4-D가 첨가된 배지에서 2주간 배양한 후, 2,4-D가 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 배양하였다.

식물체 재분화

유도된 부정아만을 절단하여 0.2 mg/L NAA 단독 또는 0.2-0.5 mg/L zeatin이 함께 첨가된 배지에 이식하였을 때 발근되어 소식물체가 되었다. 잎이 2-3장 나온 소식물체는 원예용상토의 화분에 옮겨 약 80% 정도의 습도를 유지하면서 순화시킨 후 완전한 식물체로 키워 과실을 얻었다. 체세포배 발생과정을 통해서 얻어진 소식물체는 식물생장조절 물질이 첨가되지 않은 MS 배지에서 키운 후 화분에 이식하여 부정아와 같은 방법으로 순화시켰다.

## 결과 및 고찰

### 자엽절편 배양으로부터 부정아 유도

오이 자엽으로부터의 부정아 유도율은 발아 일 수와 관련이 있었는데 5일째 또는 7일째의 자엽절편을 사용하였을 때 부정아 유도율이 높았다(결과 미제시). 이것은 Colijn-Hooymans 등(1994)의 3일째 및 5일째의 자엽절편을 배양하였을 때 부정아의 유도가 좋았다는 결과와는 조금 다르게 나타났다. 발아 7일째의 자엽절편을 사용하여 cytokinin (zeatin, BAP, kinetin) 단독 및 IAA와 조합 처리된 MS 배지에서 4주간 배양한 후 부정아의 형성률을 조사하였을 때 1.0-2.0 mg/L zeatin과 0.1-0.2 mg/L IAA가 함유된 배지에서 부정아 형성률이 11-12%로 양호하였다(Table 1). BAP가 첨가된 배지에서도 부정아는 유도되었지만 이들은 생장이 잘 되지 않고, 잎이 비후하여 정상적인 식물체로 거의 발달하지 못했다. Kinetin이 단독으로 첨가된 배지에서는 부정아가 전혀 유도되지 않았지만, 0.1 mg/L IAA와 함께 첨가되었을 때는 부정아가 낮은 비율로 유도되었고, kinetin의 농도를 5.0 mg/L로 높였을 때 부정아 유도율이 증가하였다(Table 1). 부정아 유도는 자엽절편의 절단면인 기저부(basal region)에서만 일어났고(Figure 1-B), 그 이외의 부분에서는 전혀 유도되지 않았는데 이와 같은 결과는 Gambley와 Dodd (1990)의 보고와 일치하였다. 따라서 오이의 자엽절편 배양에 있어서 식물체 재분화능은 조직상태 및 조직부위의 특이성이 있는 것으로 사료된다.

자엽절편의 기저부에서 유도된 부정아를 캘러스나 자엽조직으로부터 분리하여 0.2 mg/L NAA가 첨가된 MS배지에 이식하여 뿌리를 유도하였다(Figure 1-C). 부정아가 더 이상 신장되지 않은 경우에는 0.5-0.2 mg/L zeatin과 0.2 mg/L NAA가 함께 첨가된 MS 배지에서 배양하였을 때 부정아 및 뿌리의 생장이 좋았다. 그러나 일부 부정아는 집단적으로 동시에 발생하여 줄기가 발달되지 않고 잎이 여러 겹으로 말리면서 소식물체로 자라지 못하였다(Figure 1-D). 이러한 현상은 부정아가 자엽 기저부에서 집단적으로 발생하여 뿌리조직이 분리되지 않아, 각각의 부정아가 근단분열조직을 갖추지 못했기 때문으로 사료된다. 오이를 포함하여

박과 식물(Cucurbitaceae)의 자엽절편을 배양하면, 기저부에서 다량의 부정아와 잎이 동시에 유도되면서 집단 왜소화 현상으로 생장이 정지되는 현상이 나타나는 경우가 있다(Gambley and Dodd, 1990; Dong and Jia, 1991; Colijn-Hooymans et al., 1994). 이러한 현상은 자엽의 기저부에 엽원기(leaf primordium)를 완전히 절단하지 않거나 일부분이 붙어 있는 자엽절편을 배양하였을 때 나타나는 현상이다. 따라서 집단 왜소화 현상을 방지하기 위해서는 자엽절편의 기관분화능이 다소 떨어지더라도 자엽의 기저부를 1/4 정도 절단하여 확실하게 엽원기를 제거하는 것이 필요하다. 즉, 다량의 부정아를 유도하는 것보다 정단 및 근단분열조직을 가진 소수의 부정아를 유도하면, 이들은 정상적인 소식물체로 발달할 수 있는 가능성이 높다. 이와 같은 자엽절편 배양으로부터 부정아 유도 및 소식물체로의 분화는 재료로 사용한 오이의 모든 품종에서 가능하였다(결과 미제시).

뿌리가 잘 발달하고 잎이 2-3장 나온 소식물체는 원예용상토의 화분에 옮겨 약 80% 정도의 습도를 유지하면서 순화시켰다. 재분화된 식물체는 온실의 토양으로 옮겨 정식하였을 때 정상적인 식물체로 성장하여 과실을 얻을 수 있었다(Figure 1-E). 이러한 오이 자엽절편의 배양에 의한 식물체 재분화 시스템은 식물의 상처를 통해 감염되어 외래유전자를 도입시킬 수 있는 *Agrobacterium*의 형질전환법에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 하배축 배양으로부터 체세포배 유도

암소에서 5일간 발아시켜 얻은 오이 유식들치의 하배축을 절단하여 1.0 mg/L 2,4-D와 여러 sucrose 농도(3, 5, 10%)가 첨가된 MS 배지에 이식한 후 암배양하였다. 배양 4주 후 거의 대부분의 하배축절편으로부터 흰색의 캘러스가 유도되었고 일부 연노랑색의 캘러스도 드물게 유도되었다. 연노랑색의 캘러스만을 분리하여 계대배양을 실시하면 배지의 접합면에서 점성이 강하고 투명한 캘러스가 생성되는데, 이들로부터 노란색의 배발생 캘러스가 유도되었다(Figure 2-A, arrowheads). 이러한 배발생 캘러스는 암소에서 3% sucrose에 배양하였을 때 하배축 재료의 2.3% 정도의 낮은 빈도로 오이 품종중 낙합계(조생낙합, 장형낙합)에서만 유도되었다. 오이의 배발생 캘러스는 점액성의 투명한 캘러스에서 기원되는 노란색의 캘러스인데, 이와 같은 배발생 캘러스의 기원은 이전에 보고된 당근(Fujimura and Komamine, 1979), 참당귀(Choi and Soh, 1993), 파(Kim and Soh, 1996), 섬오갈피(Choi et al., 1997) 등의 배발생 캘러스의 기원과는 전혀 다른 양상이었다. 배발생 캘러스 및 체세포배 유도율을 향상시키기 위해 sucrose의 농도를 높였을 때 효과가 있었다는 보고가 있다(Ziv and Gadasí, 1986; Chee and Tricoli, 1988). 그러나 본 실험에서는 sucrose 농도를 10%까지 높여 배양하였지만 배발생 캘러스는 전혀 유도되지 않았다(결과 미제시).

오이의 하배측으로부터 배발생 캘러스를 유도할 때 빛은 저해적이지만, 일단 배발생 캘러스를 암소에서 유도한 후 아들을 형광빛 환경으로 옮겨 2-3주 간격으로 계대배양한 결과 배발생 캘러스의 특성은 변하지 않고 그대로 유지되면서 증식도 잘되었다. 따라서 오이의 경우 배발생 캘러스를 유도할 때에는 암조건이 요구되지만 일단 배발생 캘러스가 만들어지면 이들 캘러스의 배발생능의 성질이나 증식에 있어서 빛은 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 배발생 캘러스의 계대배양을 2-3회 더 실시하였을 때 열은 노란색의 배발생 캘러스는 점점 짙은 노란색으로 변하였다(Figure 2-B). 이러한 배발생 캘러스는 1년 이상 계대배양하여도 그 성질이 변하지 않고, 고빈도의 체세포배로 발달할 수 있는 배발생 능력이 일정하게 유지되었다. 따라서 이들 캘러스를 이용하면 particle bombardment에 의한 외래유전자를 도입하는데 유용하고, 체세포배 발생과정에 있어서 특이적인 유전자의 발현 등의 연구에도 유용할 것으로 사료된다. 배발생 캘러스를 2,4-D가 첨가된 배지에서 2주간 배양한 후, 2,4-D가 첨가되지 않은 MS 기본배지에 옮겨 배양하였을 때 약 1주 후부터 배발생 캘러스로부터 구상형 시기의 체세포배가 발생하였다(Figure 2-C). 그리고 구상형 시기의 체세포배는 같은 배지에 계대배양하면 녹색을 띠면서 체세포배가 발달하였다(Figure 2-D). 이들은 자엽과 뿌리가 신장하면서 자엽기 시기의 체세포배가 되었고(Figure 2-E), 정상적으로 성장한 체세포배만을 각각 분리하여 MS 기본배지에서 키워 다량의 완전한 소식물체를 얻을 수가 있었다(Figure 2-F). 체세포배로부터 얻어진 소식물체도 부정아로부터 얻어진 소식물체와 같은 방법으로 순화시켰을 때 완전한 재분화체가 되었다.

본 연구에서 확립한 국내 오이 품종의 재분화 시스템은 *Agrobacterium*과 particle bombardment를 이용하여 외래 유용유전자를 보다 효율적으로 도입하여 형질전환체를 얻는데 이용될 수 있을 것이다.

## 적 요

기내에서 무균 발아시킨 오이 유식물체의 자엽절편과 하배측으로부터 기관발생 및 체세포배 발생 경로를 통한 식물체 재분화 시스템을 개발하였다. 자엽절편을 1.0 mg/L zeatin과 0.1 mg/L IAA가 첨가된 MS 배지에서 4주간 배양하였을 때 사용한 모든 품종에서 부정아의 형성이 가장 양호하였다. 자엽절편의 기저부에서 유도된 부정아를 0.2 mg/L NAA가 첨가된 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도하여 완전한 소식물체로 발달시켰다. 한편, 하배측을 약 5-10 mm 크기로 절단하여 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 배양하였을 때 낙합계 품종에서 배발생 캘러스가 유도되었다. 같은 조건의 배지에서 2-3주 간격으로 계대배양을

실시하면서 배발생 캘러스만을 선발하여 유지 및 증식시켰다. 배발생 캘러스를 2,4-D가 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 배양하였을 때 약 1주 후부터 배발생 캘러스로부터 구상형 시기의 체세포배가 발생하였다. 그리고 이들은 심장형, 어퇴형 및 자엽기 시기를 거쳐 발아하여 소식물체로 발달하였다. 자엽절편 및 하배측 배양으로부터 유도된 소식물체는 잎이 2-3장 정도 되었을 때 화분에 옮겨 온실에서 순화시켜 과실을 얻을 수 있는 완전한 식물체로 재분화시켰다.

사사-본 연구는 농림수산특정연구과제(AG190M)의 연구결과이다. 원고의 세심한 논평과 수정을 해준 유장렬 박사에게 감사한다.

## 인용 문헌

- Cade RM, Wehner TC, Blazich FA (1987) Organogenesis and embryogenesis from cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledon-derived callus. HortScience 22: 1130
- Chee PP, Tricoli DM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. Plant Cell Rep 7: 274-277
- Choi YE, Kim JW, Soh WY (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. Plant Cell Rep 17: 84-88
- Choi YE, Soh WY (1993) Effects of culture period on somatic embryo germination from callus culture of *Angelica gigas* Nakai. Korean J Plant Tissue Culture 20: 199-204
- Colijn-Hooymans CM, Bouwer R, Dons JJM (1988) Plant regeneration from cucumber protoplasts. Plant Cell Tissue Organ Culture 12: 147-150
- Colijn-Hooymans CM, Hakkert JC, Jansen J, Custers JBM (1994) Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages. Plant Cell Tissue Organ Culture 39: 211-217
- Dong JZ, Jia SR (1991) High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Rep 9: 559-562
- Fujimura T, Komamine A (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Physiol 64: 162-164
- Gambley RL, Dodd WA (1990) An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 20: 177-183
- Gambley RL, Dodd WA (1991) The influence of cotyledons in axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of *Cucumis sativus* L. (cucumber). J Exp Bot 32: 1131-1135
- Jia SR, Fu YY, Lin Y (1986) Embryogenesis and plant regeneration from

- cotyledon protoplast culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). J Plant Physiol 124: 393-398
- Kim JW, Soh WY (1996)** Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum* L. Plant Sci 114: 215-220
- Kim SK, Chang JR, Cha HC, Lee KW (1988)** Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 12: 67-74
- Lazarte JE and Sasser CC (1982)** Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. HortScience 17: 88-89
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Rajasekaran K, Nullins MG, Nair Y (1983)** Flower formation in vitro by hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Ann Bot 51: 417-420
- Ziv M and 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

(1998년 1월 16일 접수)