

수박(*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai) 자엽 절편의 재분화에 미치는 성장조절물질의 영향

조송미^{1*}, 오상아¹, 최용수¹, 박상빈²

¹전남과학대학교 화훼원예과, ²아시아 종묘(주) 생명공학육종연구소

Effect of Plant Growth Regulators on Regeneration from the Cotyledon Explants in Watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai)

Song Mi Cho^{1*}, Sang A Oh¹, Yong Soo Choi¹ and Sang Bin Park²

¹Department of Horticulture, Chonnam Techno University, Gokseong 516-911, Korea
²R&D Center, Asia Seed Co. Ltd., Icheon 467-906, Korea

Abstract - In this study, we developed a high frequency watermelon regeneration system using three breeding lines ('B02', 'B05' and 'D04') of watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai) which are differed in their fruits in shape, color of pericarp and flesh. The highest frequency of explants with callus was observed by using explants that consist of cotyledon proximal part end in all breeding lines, and the highest rate of callus induction was obtained on MS medium containing 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L IAA for 'B02' (94%), 3.0 mg/L BAP for 'B05' (95%), 3.0 mg/L BAP + 0.1 mg/L IAA for 'D04' (90%). The highest shoot regeneration rates from derived callus were obtained on MS medium containing 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L IAA for 'B05' (94%), and then a 'B02' (81%) with a same culture conditions, and the lowest regeneration was obtained on MS medium containing 1.0 mg/L BAP for 'D04' (56%). Regenerated plants showed the best rates of root formation on MS containing 0.1 mg/L IBA for 'B02' (67%), 0.1 mg/L NAA for 'B05' (87%), 0.5 mg/L IAA for 'D04' (88%). The regenerated plants showed a 100% survival rate in soil condition. The tissue culture and regeneration conditions obtained from this study will be useful for regenerating plants in breeding applications, and will be a useful tool for further genetic transformation studies on watermelons.

Key words - Tissue culture, Callus, Plant breeding

서 언

수박은 전세계에서 3번째로 많이 생산되고 있는 중요한 원예 작물 중 하나로서 그 재배 역사가 4,000년 이상이 된 것으로 보고되고 있다(Mustafa *et al.*, 2010). 수박의 원산지는 남아프리카 중앙부 칼라하리 사막과 주변의 사바나 지대로 추정되고 있으며, 지역에 따라서 일부 야생종을 음료, 사료 또는 약용 등으로 다양하게 이용되고, 재배종은 대부분 여름철에 생식으로 많이 이용된다. 특히 수박열매는 비타민C와 비타민 A 뿐만 아니라 칼륨, 철분, 칼슘과 같은 다양한 영양분을 공급해주고 과육에 풍부한 라이코펜은 항산화물질로서 다양한 암 예방효과가 있는

것으로 보고되고 있다(Comptom *et al.*, 2004).

수박 품종에 있어서 열매는 크기나 모양, 줄무늬, 과육, 과중, 종자의 색깔 및 수확시기 등이 다양하다. 일반적으로 널리 알려진 수박 열매는 줄무늬가 있고 붉은 과육 색을 띠며 검은색 또는 갈색 종자를 지니고 있다(Comptom *et al.*, 2004). 그러나 상업적 수박 생산보고서에 따르면 과피의 경우 줄무늬가 있거나 없는 경우도 있으며 색깔 또한 밝은 색에서 짙은 녹색이 될 수도 있고 과육의 색깔 또한 열은 붉은색에서부터 짙은 붉은색이거나 노란색인 경우까지 다양하다고 하였다(Boyhan *et al.*, 1999). 이러한 수박 열매의 외형적인 차이와 더불어 수박 품종은 크게 종자의 발달 방법에 따라 자연수분형, F₁ 교배형, 3배체 또는 씨없는 형으로 나눌 수 있다. 그러나 수박 육종가들에게 있어서 품종 선택의 기준은 생산성과 품질의 우수성 뿐만 아니라

*교신저자(E-mail) : csmempal1@empas.com

환경이나 병에 대한 저항성을 지니고 있는 것을 중요하게 여기고 있으며 무엇보다 구매자인 소비자의 요구에 따른 시장흐름에 맞추어 변화하고 있다. 이와 더불어 세계종자시장은 그 규모가 거대해지고 또한 글로벌화되고 있는 추세이다. 이와 같은 국외 종자산업의 변화양상은 국내에서도 우수하고 다양한 종자 유전자원에 대한 연구개발 및 보급에 대한 위기를 확산시키고 있다.

현재 수박의 생산량은 토양 전염성 덩굴쪄짐병균(*Fusarium oxysporum*)이나, 세균성 과실썩음병균(*Acidovorax avenae* subsp. *citrullii*), 추키니모자이크황화바이러스(*Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV*) 등과 같은 병원균에 의해 심각한 영향을 받고 있다(Hopkins *et al.*, 2003; Compton *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2013). 이러한 문제를 해결하기 위해 기내 조직배양을 원천기술로 활용한 생명공학기술과 환경이나 병원균에 내성을 갖는 형질전환체들이 개발되어 보고되고 있다(Akashi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). 또한 이러한 육종학적 기술은 씨 없는 수박과 같은 유용한 품종을 개발하는데 이용되고 있다(Compton, 1999; Compton *et al.*, 2004).

수박 유묘 자엽을 이용한 신초 재분화 기술에 관한 연구는 신초 기관형성, 체세포배 형성, 원형질체 배양, 형질전환체 개발에 효율성 증진 및 방법의 용이성 뿐만 아니라 4배체의 상업적 품종의 종자증식 시간의 단축 때문에 많은 관심을 받고 있다(Choi *et al.*, 1994; Compton and Gray, 1994; Tabei, 1997). 그러나 이러한 형질전환체 개발이나 유용한 품종 육성은 기내 재분화 기술의 실질적인 적용방법과 효율성 때문에 제한된 품종에 국한되고 있다(Wang *et al.*, 2013). 그리고 기내 재분화 효율은 유전자형이나 생장조절제의 농도 및 종류, 절편체의 사용 시기 및 발근과 순화조건에 영향을 많이 받고 있다(Compton and Gray, 1993; Chaturvedi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013). 이러한 연구 중 수박 유전자형이나 품종에 따른 자엽절편을 이용한 신초형성율이나 그 형성수에 있어서 생장조절제가 미치는 요인은 BAP (6-benzylaminopurine)와 같은 사이토키닌의 농도보다 IAA (Indol-3-acetic acid)나 NAA (1-Naphtalene acetic acid)와 같은 옥신의 혼용처리 유무에 따라 영향을 받는다고 알려져 있으며(Compton and Gray, 1993), 특히 특정 수박 품종에 있어서는 IAA나 NAA의 농도에 따라 신초형성이 억제되는 연구도 보고되고 있다(Srivastava *et al.*, 1989).

국내에서 대부분의 수박을 이용한 형질전환체개발이나 4배체와 같은 배수체 육종 등을 위한 조직배양에 대해 지속적인 연구에도 불구하고 그 품종은 주로 국내 시판용인 녹색 과피의 원

형이면서 적색 과육을 지닌 대과종에 한정되어 있다. 따라서 본 연구에서는 상업적으로 이용가치가 확대되고 있는 과형과 과피 및 과육 색이 다양하면서 과중이 4~8 kg에 달하는 새로운 3가지 육종 품종에 대하여 자엽절편을 이용한 기내 재분화 조건에 영향을 미치는 생장조절제의 농도조건을 구명하여 기내 배양조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배지

수박 육종계통 'B02', 'B05' 그리고 'D04'의 종자를 아시아종묘(주)에서 분양 받아 시험재료로 이용하였다(Table 1). 'B02' 계통의 경우 열매의 특성이 'Jubilee' 타입에 타원형이면서 블랙과피와 오렌지색 과육을 지닌 평균 4~5 kg이며, 'B05' 계통의 경우 열매의 특성이 'Stripe' 타입에 타원형이면서 황색 과피와 오렌지색 과육을 지닌 평균 과중이 6~7 kg이며, 'D04' 계통의 경우 열매의 특성이 'Stripe' 타입에 원형이면서 녹색 과피와 적색 과육을 지닌 평균 과중이 7~8 kg이다(Fig. 1). 기본배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 3% sucrose와 0.5 g/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES, Duchefa, Netherland), 그리고 배지의 고체화를 위해 3.0 g/L의 phytigel (Sigma, USA)를 넣었으며, pH는 1N NaOH를 이용하여 5.8로 조정하였고, 이후 121°C, 1.5기압에서, 15분간 고압멸균하였다.

발아율 검정

수박 종자는 미리 12시간 동안 증류수에 침지한 후 종피를 제거하였고 이후 70% ethanol에 1분간 침지 후 2% NaOCl에 5분간 멸균하여 표면 살균하였다. 이를 멸균 증류수로 5회 세척한 후 10분간 멸균한 여과지(110 mm Dia, Whatman, USA) 위에서 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 종자를 MS 기본배지에 3% sucrose와 0.5 g/L MES, 그리고 3.0 g/L의 phytigel을 첨가하여 배양실 내 암(광차단) 조건과 광조건(광주기, 16h light/8h

Table 1. Morphological traits of fruit in watermelon (*Citrullus lanatus*) breeding lines, 'B02', 'B05' and 'D04'

Traits	Breeding lines		
	B02	B05	D04
Fruit shape	Oval	Oval	Circle
Color of pericarp	Black	Yellow	Green
Color of flesh	Yellow	Yellow	Red

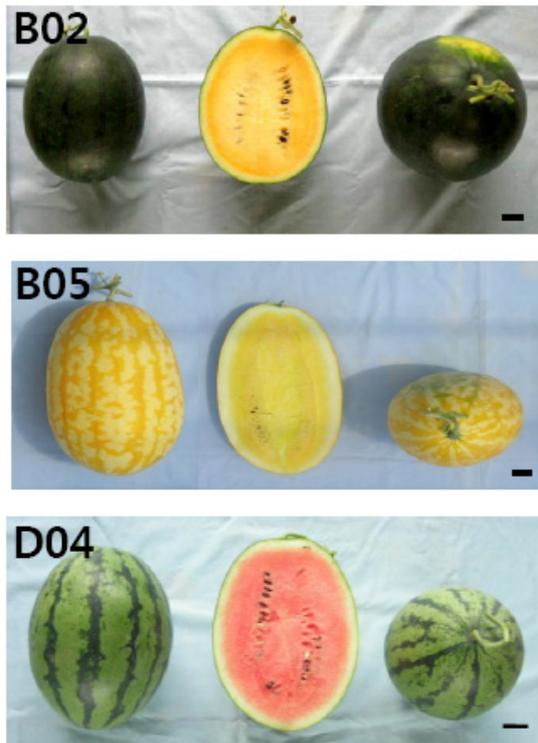


Fig. 1. Difference of pericarp and flesh color and shape on fruit of watermelon breeding lines 'B02', 'B05' and 'D04' (Scale bar=1 cm).

dark, 2,500lux, 26 ± 2°C) 하에서 발아를 유도하였다. 발아는 종자로부터 유근의 출현으로 발아여부를 판단하였다(Li *et al.*, 2011).

캘러스 유도

발아 후 5~7일 된 유묘의 자엽을 기부(proximal)로부터 정단부(distal)까지 1~0.5 cm 크기로 3등분 횡절단된 절편체를 캘러스 유도에 사용하였다. 절편은 식물생장조절제의 처리별로 Petri-dish (SPL, South Korea)당 각각 10개씩 치상하였고, 배지는 MS기본배지에 30 g/L sucrose, 3 g/L phytigel을 첨가하였으며, 성장조절물질의 조합은 BAP (6-benzylaminopurine, Duchefa, Netherland) 1.0, 2.0, 3.0 mg/L와 IAA (Indol-3-acetic acid, Sigma, USA) 0.1, 0.2, 0.3 mg/L 또는 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy, Duchefa, Netherland) 0.1, 0.2, 0.3 mg/L를 각각 혼합하여 사용하였다. 배양 2~3주 후에 부위별로 형성된 캘러스를 육안으로 관찰하여 그 수를 조사하였고, 조사는 각 처리 구마다 3반복으로 실시하였다. 배양은 26 ± 2°C, 16 시간 광주기, 2,500 Lux광도의 배양실 조건에서 수행하였다.

신초형성

자엽 절편들로부터 형성된 캘러스를 이용하여 신초를 형성시키기 위해 MS기본배지에 30 g/L sucrose, 3 g/L phytigel을 첨가하였으며 성장조절제로 옥신과 사이토키닌을 각각 1.0, 2.0, 3.0 mg/L BAP와 0.1, 0.2, 0.3 mg/L IAA를 조합하여 혼합하였다. 각 육종 계통별로 30개 이상의 캘러스를 신초 형성용 배지 조합별 배지로 계대배양하였다. 배양 4주 후에 분화된 신초의 수를 조사하였으며 이와 같은 과정을 3반복 수행하였다. 배양 조건은 캘러스 형성조건과 동일하게 하였다.

신초 길이생장

신초형성 4주 이후 분화된 식물체의 부정아를 개개 신초로 분리하여 길이신장을 위한 새로운 배지로 계대배양하였다. 길이신장을 위해 성장조절제로 1 mg/L BAP를 단용한 MS 기본 배지에서 신초를 신장시켰으며, 배양조건은 신초 형성조건과 동일하게 배양하였다. 배양 4주 후에 각 육종 계통별로 30개 이상의 신초의 길이를 측정하였으며, 본 과정을 3회 이상 수행하였다.

발근을 검정

성장조절제인 IAA, IBA (Indole-3-butyric acid, Sigma, USA) 및 NAA (1-Naphtalene acetic acid, Duchefa, Netherland)를 각각 1.0, 2.0, 3.0 mg/L이 첨가된 MS 배지에 신초가 3 cm 이상 증식된 개체를 배양하여 뿌리생성을 유도하였다. 뿌리가 형성된 개체는 giffy-pot (No. 7, Korea)에 옮겨 1주일간 100% 습도를 유지하면서 순화를 유도한 후 멸균된 인공배양토(perlite: 부토, 3:1 v/v)에 이식하였다. 발근 유무는 발근 배지로 이식한 2주 후에 각 육종 계통당 30개 이상의 식물체에 대하여 조사하였으며, 본 과정을 3회 이상 수행하였다.

통계분석

본 연구의 각 시험에 대해 3회 반복으로 수행하였으며, 통계 처리는 SPSS (version 12.0)을 이용하였고, 발아율에 대한 결과는 T-검정법(Student's t-test)을 캘러스 및 신초 형성율과 발근율 결과에 대한 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 실시하여 5% 수준에 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

종자 발아조건

발아일수가 조직배양 시 기관형성능에 영향을 준다는 보고

Table 2. Germination of watermelon breeding lines ‘B02’, ‘B05’ and ‘D04’ on light and dark condition on Murashige & Skoog medium^y

Treatments	B02		B05		D04	
	Days to germination	Germination rate (%)	Days to germination	Germination rate (%)	Days to germination	Germination rate (%)
Light	5-7	89 ± 7.9	4-5	84.2 ± 8.5	4-5	98 ± 1.7 ^z
Dark	5-7	96 ± 2.9 ^z	5-6	90.8 ± 4.2 ^z	5-7	90 ± 4.1

^yValues are means of five replicates ± standard error. Each replicate includes ten explants per a petri dish. ^zSignificant at P=0.05.



Fig. 2. Callus induction from cotyledon explants of watermelon breeding lines ‘B02’, ‘B05’ and ‘D04’. Calli were best highly induced from proximal part of leaf explants on the medium containing 0.5 mg/L IAA and 1 mg/L BA for ‘B02’ breeding line (A), 3 mg/L BA for ‘B05’ breeding line (B) and 0.1 mg/L IAA and 3 mg/L BA for ‘D04’ breeding line (C) (Scale bar=1 cm).

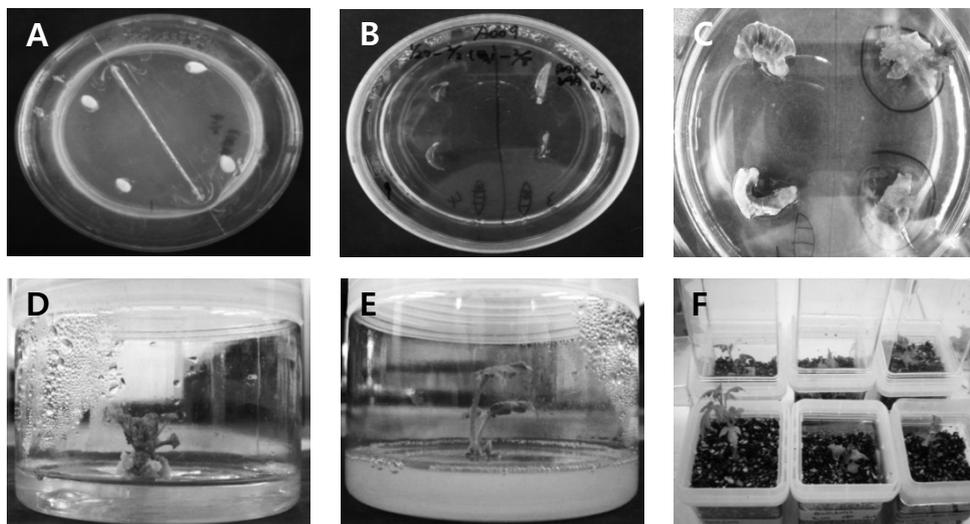


Fig. 3. Germination and plant regeneration from cotyledon explants of watermelon breeding lines ‘B02’, ‘B05’ and ‘D04’. A, Seed germination. B, Adventitious callus induction from proximal part of cotyledon cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA or 2,4-D. C, Shoot induction from calli cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L BA and 0.1 or 0.5 mg/L IAA. D, Elongated shoot cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L BA. E, Rooted plantlet on MS medium supplemented with 0.1, 0.5 mg/L IAA or IBA or NAA. F, Acclimatized plants grown were in plastic Mazenta box.

(Srivastava *et al.*, 1989)가 있기 때문에 각각 육종라인을 이용하여 발아율을 향상시키는 조건을 알아보려고 하였다. 수박 종자의 발아는 일정한 온도조건하에서 암처리 시 최적으로 발아

가 된다고 하였으며 외피를 제거하면 발아가 더 촉진된다고 하였다(Thanos and Mitrakos, 1992). 본 연구에서는 각 계통별로 동일한 온도조건하에서 외피를 물리적으로 제거한 후 광처리

Table 3. Comparison in the efficiency of adventitious callus induction among different plant parts excised from cotyledon of watermelon breeding lines 'B02', 'B05' and 'D04'^{y,z}

Hormonal supplements (mg·L) ^y	Percent of callus induction ^z								
	B02			B05			D04		
	Part of explants			Part of explants			Part of explants		
	Prox. end	Prox.	Distal.	Prox. end	Prox.	Distal.	Prox. end	Prox.	Distal.
2,4-D									
0.1	38 ± 2.0cd	20 ± 2.0defg	0.0 ± 0.0g	20 ± 2.0bcd	10 ± 2.0cde	0.0 ± 0.0e	25 ± 2.0cde	10 ± 2.0ef	0.0 ± 0.0f
0.2	41 ± 1.5bcd	25 ± 1.5def	5.0 ± 1.0fg	35 ± 1.8b	15 ± 1.5cde	0.0 ± 0.0e	35 ± 1.5bcd	25 ± 1.0cde	5.5 ± 1.2ef
0.5	60 ± 2.3ab	30 ± 2.3de	10.0 ± 2.0efg	55 ± 2.2a	35 ± 2.3b	5.0 ± 2.0de	60 ± 2.0a	35 ± 2.0bcd	10.0 ± 2.0ef
1.0	65 ± 2.3a	55 ± 2.3abc	12.0 ± 1.5efg	70 ± 2.5a	25 ± 2.5bc	10.0 ± 1.5cde	50 ± 2.5ab	45 ± 2.5abc	15.0 ± 1.5def
IAA									
0.1	20 ± 1.5efg	25 ± 2.3ef	0.0 ± 0.0g	75 ± 1.5a	40 ± 2.0bcd	0.0 ± 0.0f	80 ± 1.5a	45 ± 2.3cd	0.0 ± 0.0e
0.2	35 ± 2.5de	25 ± 2.5ef	0.0 ± 0.0g	40 ± 2.5bcd	35 ± 2.5cd	0.0 ± 0.0f	65 ± 2.0ab	35 ± 2.0d	5.5 ± 1.3e
0.5	85 ± 2.5a	50 ± 1.3cd	10.0 ± 2.5fg	55 ± 2.5abc	30 ± 2.0de	16.0 ± 2.0f	50 ± 1.5bcd	55 ± 1.8bc	7.3 ± 1.5e
1.0	75 ± 1.2ab	60 ± 1.5bc	30.0 ± 2.3def	60 ± 1.2ab	30 ± 1.8de	10.0 ± 2.5ef	55 ± 1.8bc	50 ± 1.0bcd	16 ± 1.6e
BAP+IAA									
1/0.0	75 ± 3.2abc	25 ± 2.8def	0.0 ± 0.0f	88 ± 1.9ab	82 ± 2.3abc	25 ± 2.8bfgh	59 ± 1.6bc	75 ± 0.0ab	13 ± 2.0ef
1/0.1	50 ± 0.0bcde	25 ± 2.8def	0.0 ± 0.0f	58 ± 2.1bcde	67 ± 3.1abcd	25 ± 0.0fgh	88 ± 2.0a	25 ± 2.9def	0.0 ± 0.0f
1/0.5	94 ± 1.0a	63 ± 3.3abcd	0.0 ± 0.0f	75 ± 2.0abc	83 ± 2.1abc	13 ± 2.0gh	50 ± 0.0bcd	50 ± 0.0bcd	13 ± 2.0ef
3/0.0	50 ± 3.4abcd	33 ± 3.3def	0.0 ± 0.0f	95 ± 1.3a	58 ± 2.1bcde	13 ± 2.0gh	63 ± 3.5abc	25 ± 2.9def	25 ± 0.0def
3/0.1	63 ± 2.9abcd	63 ± 0.9abcd	0.0 ± 0.0f	92 ± 1.9a	33 ± 2.1efg	42 ± 1.7efg	90 ± 1.8a	25 ± 2.9def	0.0 ± 0.0f
3/0.5	38 ± 3.5bcde	63 ± 3.0abcd	13 ± 2.9aef	75 ± 0.0abcd	67 ± 2.1bcde	50 ± 0.0def	50 ± 0.0bcd	50 ± 0.0bcd	13 ± 2.0ef
5/0.0	63 ± 2.9abcd	29 ± 1.1def	0.0 ± 0.0f	88 ± 2.9a	38 ± 2.0efg	25 ± 0.0fgh	63 ± 2.0abc	25 ± 2.9def	13 ± 2.0ef
5/0.1	38 ± 3.5bcde	25 ± 0.0def	0.0 ± 0.0f	90 ± 1.3a	38 ± 2.0efg	13 ± 2.0gh	75 ± 0.0ab	25 ± 2.9def	0.0 ± 0.0f
5/0.5	88 ± 2.0ab	50 ± 3.5bcde	0.0 ± 0.0f	75 ± 2.8abcd	83 ± 2.1abc	0.0 ± 0.0h	63 ± 2.0abc	38 ± 2.0cde	0.0 ± 0.0f
7/0.0	50 ± 3.4cdef	38 ± 3.1cdef	0.0 ± 0.0f	88 ± 2.0ab	50 ± 3.8def	25 ± 0.0fgh	63 ± 3.5abc	38 ± 2.0cde	8.5 ± 1.7f
7/0.1	84 ± 3.4ab	17 ± 2.3ef	0.0 ± 0.0f	75 ± 2.7abcd	55 ± 1.8cde	29 ± 1.2efgh	25 ± 0.0def	13 ± 2.0ef	0.0 ± 0.0f
7/0.5	50 ± 2.9abcd	17 ± 2.3ef	0.0 ± 0.0f	88 ± 2.0a	39 ± 1.8efg	0.0 ± 0.0h	50 ± 0.0bcd	50 ± 0.0bcd	0.0 ± 0.0f

^yEach explants were cultured on MS medium supplemented with 1, 3, 5 mg/L BA and 0.1, 0.5 mg/L IAA or not 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L 2,4-D or IAA, only, and the callus induction frequency was evaluated 4 weeks after cultivation.

^zValues are means of five replicates ± standard error. Each replicate includes ten explants per a petri dish. Means followed by different letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, P=0.05 level.

유무에 따른 종자의 발아율을 검토하였다. 'B02' 계통의 경우 발아 일수는 광조건에 영향을 받지 않았으며 암처리 조건에서 발아율이 96%로 높게 나타났고, 'B05' 계통과 'D04' 계통의 경우 오히려 광처리 조건에서 각각 98%의 높은 발아율을 보여주었다. 또한 두 계통 (B05, D04) 모두 암 처리보다 광 처리 조건에서 발아시기도 더 빨라지는 것이 확인되었다(Table 2). 이와 같은 결과를 통하여 계통에 따라 발아에 미치는 광의 영향이 달라짐을 확인할 수 있었다. 또한 계통에 따라 자엽 절편을 이용한 신초 형성에 있어서 발아소요일수가 짧은 유묘를 이용할수록 신

초형성율이 6배 이상 높게 나타난 보고도 있으며(Compton and Gray, 1994), 발아시키는 방법에 있어서 암 처리가 차후 신초 등과 같은 기관형성능을 향상시킨다는 보고(Compton, 1999)가 있으므로 계통에 따라 최적의 발아조건을 구명하는 것이 중요한 것으로 판단되며 추가적으로 광 처리 조건별로 캘러스 신초형성율에 어떻게 달라지는지 연구가 필요할 것으로 사료된다.

캘러스 형성

'B02', 'B05' 그리고 'D04' 모두 BAP와 IAA가 첨가된 배지조

건에서 자엽 기부(proximal) 끝부분을 절편화하여 배양하였을 때, 녹색 빛깔의 캘러스가 가장 많이 형성되었다. 캘러스 형성율은 'B02'의 경우 1.0 mg/L BAP와 0.5 mg/L IAA를 혼합한 처리구에서, 'B05'의 경우 1.0 mg/L BAP 단독 처리구에서, 'D04'의 경우 3.0 mg/L BAP와 0.1 mg/L IAA를 혼합한 처리구에서 각각 94%, 95%, 90%로 높게 나타났다(Fig. 2, Table 3, Fig. 3A-B). 이와 같은 결과는 자엽의 기부(proximal)의 끝부분을 이용하였을 때 캘러스 형성 및 재분화율이 높다는 결과와는 일치하였다(Gambley and Dodd, 1990; Mohiuddin *et al.*, 1997; Compton *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2005; Khatun *et al.*, 2010). 그러나 동일한 수박에서도 BAP와 IAA를 혼용처리하는 것보다 1 mg/L의 2,4-D를 단독으로 처리하였을 때 캘러스 형성이 가장 높게 나타난다는 보고가 있으며(Khatun *et al.*, 2010), 또 다른 박과채소인 오이 자엽 절편을 이용한 캘러스 형성에 있어서도 0.5 mg/L의 kinetin과 2 mg/L의 2,4-D를 혼용처리하였을 때 최적의 캘러스가 형성된 반면 그 이하나 그 이상의 농도를 처리하였을 때는 오히려 캘러스가 거의 형성되지 않았다(Chee *et al.*, 1990). 이는 계통별로 또는 식물 종류별로 캘러스 형성을 위한 성장조절물질 처리 조건이 달라질 수 있음을 보여준다. 또한 박과 채소의 기내 기관형성에 있어서 유묘의 이용

연령기가 중요함이 제시되고 있어(Compton and Gray, 1993) 향후 본 육종계통을 이용하여 유묘 생육 단계별로 캘러스 형성에 관한 효율성을 추가적으로 검토해 보는 것이 필요한 것으로 판단된다.

신초 재분화

각 계통별로 신초 형성율은 'B02'와 'B05'의 경우 1.0 mg/L BAP와 0.5 mg/L IAA를 혼합한 처리구에서 'D04'의 경우 1.0 mg/L BAP 단독 처리구에서 각각 81%, 94%, 56%로 높게 나타났다. 또한 MS 배지에 BAP를 단독으로 처리한 것보다 IAA를 추가하였을 때 캘러스로부터 신초 형성수가 증가하였다(Fig. 3C, Table 4). 그러므로 'B02', 'B05' 그리고 'D04' 계통별 신초 형성이나 분화에 있어 사이토키닌의 역할이 중요하며 계통과 농도에 따라 옥신의 역할이 다르게 나타남을 보여주고 있다. 이와 유사하게 수박 자엽 절편에서 BAP 단독처리구가 눈의 형성을 높게 한다는 연구보고가 있으며(Li *et al.*, 2011), 사이토키닌과 옥신을 혼합 처리하면 오히려 옥신이 신초 분화를 억제하여 사이토키닌의 신초형성 기능을 억제시킨다는 보고도 알려지고 있다(Srivastava *et al.*, 1989; Compton and Gray, 1993). 또 다른 수박 재분화에 관한 연구보고에 따르면 사이토키닌으로 BAP 대

Table 4. Effect of plant growth regulators on adventitious shoot regeneration of watermelon breeding line 'B02', 'B05' and 'D04'. Via callus derived from cotyledon explants of 7-day-old seedlings were cultured on MS medium, and the efficiency was evaluated 4 weeks after culture initiation^{y,z}

Hormonal supplements (mg/L) ^y BAP/IAA	Breeding lines ^z					
	B02		B05		D04	
	Regeneration frequency (%)	No. of shoots per callus	Regeneration frequency (%)	No. of shoots per callus	Regeneration frequency (%)	No. of shoots per callus
1/0.0	50 ± 0.0ab	1.0 ± 0.8ab	69 ± 3.6ab	1.7 ± 0.6abc	56 ± 2.1a	1.3 ± 1.3bcd
1/0.1	50 ± 0.0ab	2.3 ± 0.6b	63 ± 1.2ab	2.5 ± 1.2c	38 ± 0.0ab	3.5 ± 0.6a
1/0.5	81 ± 3.0a	3.3 ± 1.0a	94 ± 1.9a	3.5 ± 0.6a	50 ± 0.0ab	2.8 ± 0.5abc
3/0.0	42 ± 2.4ab	1.8 ± 0.5b	88 ± 0.0ab	2.0 ± 0.8bc	44 ± 3.6ab	2.0 ± 0.8bcd
3/0.1	63 ± 0.0ab	2.0 ± 0.8ab	63 ± 0.0ab	2.8 ± 1.0abc	44 ± 2.1b	3.0 ± 0.8ab
3/0.5	50 ± 0.0ab	3.0 ± 0.8ab	56 ± 0.7b	3.0 ± 0.8ab	50 ± 0.0ab	3.5 ± 0.8bcd
5/0.0	40 ± 4.0ab	1.0 ± 0.8b	63 ± 1.6ab	1.8 ± 0.5abc	44 ± 3.6ab	1.8 ± 0.5cd
5/0.1	31 ± 3.6b	3.0 ± 0.8b	69 ± 2.1ab	2.0 ± 1.0abc	50 ± 3.0ab	2.8 ± 0.5abc
5/0.5	63 ± 0.0ab	2.8 ± 1.0b	88 ± 2.6ab	2.5 ± 0.8bc	31 ± 2.1ab	3.5 ± 0.6d

^yEach explants were cultured on MS medium supplemented with 1, 3, 5 mg/L BA and 0.1, 0.5 mg/L, and the callus induction frequency was evaluated 4 weeks after culture initiation.

^zValues are means of five replicates ± standard error. Each replicate includes ten callus per a culture dish. Means followed by different letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, P=0.05 level.

신 5-40 μm kinetin이나 zeatin 또는 2-isopentenyladenine이나 0.1-10 μm thidiazuron을 첨가하면 신초 형성율이 높아진다는 보고도 있다(Dong and Jia, 1991; Compton and Gray 1993; Compton *et al.*, 2004). 그러나 이와 같은 결과들을 보면 신초 형성 및 신초 수 발달에 미치는 사이토키닌과 옥신의 종류와 농도는 수박 유전자형이나 계통에 따라 달라질 수 있다고 하였다(Compton and Gray, 1994; Wang *et al.*, 2013). 또한 thidiazuron과 같은 사이토키닌의 경우는 계통에 따라 차이가 있지만 일정 농도 이상에서는 신초가 두껍고 생장이 저해되어 비정상적인 신초가 만들어지기도 하였다(Compton and Gray 1993). 본 실험에서는 지금까지 다양한 수박계통에서 신초형성에 영향을 주었던 BAP를 성장조절제로 이용하였다. 그 결과 농도에 따라 캘러스 형성 및 재분화율이 달라졌고 계통에 따라서는 옥신으로 IAA를 혼용 처리하는 것이 캘러스 및 신초 형성에 더 효과적임을 확인하였다. 본 연구에 이용된 육종 계통을 활용하여 신품종 육성을 위한 재분화 시험에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

길이신장 및 발근

재분화되어 형성된 신초를 1.0 mg/L BAP가 단독으로 처리된

MS 배지에서 계대배양하면 신초의 생장이 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 3D). 수박에서 신초의 길이 증식에 관한 연구는 성장조절물질을 첨가하지 않은 배지조건에서 길이 생장이 가능한 경우(Compton and Gray, 1993)와 0.92 μm 의 kinetin이 첨가된 조건에서 길이 생장이 잘 되는 경우(Dong and Jia, 1991)가 보고되어 있으며 계통에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. 신장된 신초의 계통별로 계대배양 2주 경과 후부터 'B02' 경우 0.5 mg/L IBA, 'B05' 경우 0.1 mg/L NAA, 'D04' 경우 0.5 mg/L IAA 조건에서 각각 66.7%, 86.7%, 88%의 발근율을 나타내었다(Fig. 3E, Table 5). 수박 재분화 개체에 대한 발근 조건에 대한 연구는 MS 기본배지에 옥신을 첨가하면 신초에 뿌리 형성이 촉진된다는 보고가 있으며(Compton and Gray, 1993; Wang *et al.*, 2013), 성장조절물질을 첨가하지 않고 1/2 농도의 MS 배지조건에서 발근율이 높다는 보고도 있다(Zhang *et al.*, 2011). 발근된 소식물체를 giffy-pot(No. 7, Korea)에 습실 처리 후 2주간 순화를 유도하였고 이후 멸균된 인공 배양토에 이식하여 생장시키며 관찰하였던 결과 뿌리 발달이 충분히 된 식물체는 100% 모두의 생존하였다(Fig. 3F).

본 연구에서도 과형과 과피 및 과육 색이 다른 3가지 육종 계통을 이용하여 기내 재분화 조건을 실험해 본 결과, 발아율에 있

Table 5. Effect of different concentration of auxin on rooting from regenerated shoot from cotyledon derived callus of watermelon breeding line 'B02', 'B05' and 'D04'^{y,z}

Hormonal supplements (mg/L) ^y	Percent of Rooted plants ^z		
	B02	B05	D04
IAA			
0.1	23 ± 2.0ns	23 ± 2.0ns	54 ± 1.1b
0.5	45 ± 2.3ns	22 ± 1.8ns	88 ± 0.8a
1.0	25 ± 1.2ns	23 ± 0.9ns	50 ± 1.3b
IBA			
0.1	33 ± 1.5b	36 ± 2.0c	63 ± 0.0b
0.5	67 ± 2.6a	55 ± 1.2b	80 ± 1.6a
1.0	43 ± 1.5ab	73 ± 0.9a	63 ± 1.1b
NAA			
0.1	32 ± 0.9b	87 ± 1.9a	61 ± 0.7b
0.5	40 ± 1.2a	23 ± 1.9b	75 ± 1.2a
1.0	33 ± 0.9b	32 ± 1.5b	66 ± 1.6ab

^yEach regenerants were cultured on MS medium supplemented with 0.1, 0.5, 1.0 mg/L IAA or IBA or NAA, and the rooting frequency was evaluated 2 weeks after cultivation.

^zValues are means of five replicates ± standard error. Each replicate includes ten plants per a culture dish. Means followed by different letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test, P=0.05 level. Ns, means were not significantly according to analysis of variance.

어서는 계통별로 광 처리와 암 처리가 발아율과 발아시기에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 이 육종 계통 모두 유묘 자엽의 기부(proximal) 끝부분이 다른 부위보다 캘러스 형성율이 높았고 이에 따라 신초 형성 및 재분화 효율도 높아졌다. 육종 계통별로 최적의 캘러스와 신초 형성 및 발근 조건에 미치는 생장조절물질의 종류와 농도범위를 확립하였으며 최종적으로 토양순화를 거쳐 외부 포장에서 활용할 수 있는 식물체들을 본 연구를 통해 확보하였다.

앞선 연구에 따르면 이러한 수박 재분화 기술의 연구는 형질 전환에 의한 다양한 물리적 환경내성이나 내병성 품종개발뿐만 아니라 씨 없는 수박 등과 같은 다양한 배수체 품종 개발에 잠재적인 활용도가 높다고 알려져 있다(Choi *et al.*, 1994; Tabei, 1997; Compton *et al.*, 2004). 그러나 이러한 품종개발에 있어서 신초재분화시스템은 생장조절제의 조합이나 함유농도 그리고 유묘의 자엽 이용 부위나 이용시기, 발근조건과 순화조건 등의 많은 문제들이 선행적으로 확립되어야 상업적 품종에 적용될 수 있다고 하였다(Compton *et al.*, 2004). 따라서 본 연구에서 다루어지고 있는 다양한 과형과 과피 및 과육 색을 지닌 유색 수박이면서 과중이 5~8 kg 중소과종인 육종 계통의 유전자원을 이용한 기내 재분화 조건의 확립은 이들 유전자원을 활용한 다양한 품종 육성에 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

수박에서 과형, 과피, 과육 색이 서로 다른 중소과종인 3가지 계통의 재분화 조건을 확립하고자 각 계통의 유묘의 자엽절편을 배양하여 캘러스 및 신초 형성에 미치는 생장조절물질의 효과를 조사한 결과는 다음과 같다. 각 발아된 유묘 자엽의 캘러스 형성은 모든 계통에서 유묘의 자엽 부위 중 기부(proximal)의 끝부분에서 가장 높은 효율을 나타내었다. 또한 캘러스 형성에 미치는 생장조절제의 영향은 'B02'의 경우 1.0 mg/L BAP와 0.5 mg/L IAA를 혼합한 처리구에서, 'B05'의 경우 1.0 mg/L BAP 단독 처리구에서, 'D04'의 경우 3.0 mg/L BAP와 0.1 mg/L IAA를 혼합한 처리구에서 가장 높게 나타나 계통에 따라 생장조절제의 조건이 달라짐을 확인하였다. 신초 형성율은 'B02'와 'B05'의 경우 1.0 mg/L BAP와 0.5 mg/L IAA를 혼합한 처리구에서 'D04'의 경우 1.0 mg/L BAP 단독 처리구에서 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 재분화된 식물체의 길이신장은 MS 기본 배지에 생장조절제로 1 mg/L BAP가 첨가된 배지에서 가장 효과적이었으며, 이들 식물체의 최적 발근은 'B02' 경우 0.5 mg/L IBA, 'B05' 경우

0.1 mg/L NAA, 'D04' 경우 0.5 mg/L IAA를 첨가된 배지 조건에서 이루어졌다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 GSP사업단 연구 지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

References

- Akashi, K., K. Morikawa and A. Yolota. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation system for the drought and excess light stress-tolerant wild watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Biotechnol.* 22:13-18.
- Boyhan, G.E., D.M. Granberry and W.T. Kelley. 1999. Commercial Watermelon Production. Bulletin. 996. Cooperative Extension Service, University of Georgia. <http://www.Ces.Uga.edu/pubcd/B996-w.htm>.
- Chaturvedi, R. and S.P. Bhatnagar. 2001. High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar baby. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:255-258.
- Chee, P.P. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* 25:792-793.
- Choi, P.S., W.Y. Soh, Y.S. Kim, O.J. Yoo and J.R. Liu. 1994. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 13:344-348.
- Compton, M.E. and D.J. Gray. 1993. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. *J. Am. Soc. Hort Sci.* 118:151-157.
- Compton, M.E. and D.J. Gray. 1994. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledon from tetraploid watermelon. *HortScience* 29:211-213.
- Compton, M.E. 1999. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 58:185-188.
- Compton, M.E. 2000. Interaction between explant size and cultivar affects shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. *HortScience* 35:749-750.
- Compton, M.E. D.J. Gary and V.P. Gaba. 2004. Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 77:231-243.

- Dong, J.Z. and S.R. Jia. 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) Plant Cell Rep. 9:559-562.
- Gambley, R.L. and W.A. Dodd. 1990. An *in vitro* technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 20:177-183.
- Han, J.S., C.K. Kim, S.H. Park, K.D. Hirschi and C.G. Mok. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl). Plant Cell Rep. 23:692-698.
- Hopkins, D.L. and C.M. Thompson. 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne disease of watermelon. Plant Disease 87:1495-1499.
- Khatun, M.M., M.S. Hossain, M. Khalekuzzaman, A. Rownaq and M. Rahman. 2010. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and internodes derived callus in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). Int. J. Sustain. Crop Prod. 5:25-29.
- Lee, Y.K., W.I. Chung and H. Ezura. 2003. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). Plant Sci. 164:413-418.
- Li, J., X.M. Li, Y.G. Qin, Y. Tang, L. Wang, C. Ma and H.X. Li. 2011. Optimized system for plant regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). Afr. J. Biotechnol. 10:9760-9765.
- Ling, N., W. Zhang, D. Wang, J. Mao, Q. Huang, S. Guo and Q. Shen. 2013. Root exudates from grafted-root watermelon showed a certain contribution in inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. PLoS ONE 8: 1-8
- Mohiuddin, A.K.M., M.K.U. Chowdhury, C. Abdullah-Zaliha and S. Napis. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 51:75-78.
- Mustafa, P., A. Cevat, B. önder Türkme and S. Musa. 2010. Modeling of some physical properties of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf.) seed depending on moisture contents and mineral compositions. Pak. J. Bot. 42:2775-2783.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Park, S.M., J.S. Lee, S. Jegal, B.Y. Jeon, M. Jung, Y.S. Park, S.L. Han, Y.S. Shin, N.H. Her, J.H. Lee, M.Y. Lee, K.H. Ryu, S.G. Yang and G.H. Han. 2005. Transgenic watermelon rootstock to CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*) infection. Plant Cell Rep. 24:350-356.
- Srivastava, D.R., V.M. Andrianov and E.S. Piruzian. 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv, Melitopolski). Plant Cell Rep. 8:300-302.
- Tabei, Y. 1997. Study on breeding of cucurbitaceae using biotechnology. Bull. Natl. Inst. Argobiol. Resource 11:1-107.
- Thanos, C.A. and K. Mitrakos. 1992. Watermelon seed germination. Seed Science Reseach 2:163-168.
- Wang, X., L. Shang and F. Luan. 2013. A highly efficient regeneration system for watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). Pak. J. Bot. 45:145-150.
- Zhang, H., G. Peng and L. Feishi. 2011. Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo* L.). Afr. J. Biotechnol. 10:6757-6761.

(Received 22 July 2013 ; Revised 13 December 2013 ; Accepted 15 January 2014)