韓作誌(Korean J. Crop Sci.) 37(5) : 419~424(1992)

콩 幼苗의 組織培養에 의한 植物體 分化

金龍昊*, 金奭東*, 洪殷憙*

Plant Regeneration from *in vitro* Tissue Culture of Soybean Seedling

Yong Ho Kim*, Seok Dong Kim*, and Eun Hi Hong*

ABSTRACT : To study the capacity of callus and shoot formation on seedling stage in soybean, excised hypocotyl, epicotyl, shoot tip, cotyledonary node and primary leaf were cultured on artificial media (MS and B_5 medium) supplemented with several hormones. Regeneration of shoots was fairly successful from shoot tip and cotyledonary node tissues in soybean. These shoots could be rooted *in vitro* through tissue culture technique and transplanted normally into soil. Hypocotyl and epicotyl tissues formed only callus, of which growth and appearance were different according to the kinds of media and additives. A small number of shoots were formed from primary leaf tissues, but they did not develop further.

Key words : soybean, tissue culture, regeneration, cotyledonary node, primary leaf

콩은 植物性 蛋白質의 供給源이며, 土地 利用度를 높일 수 있는 作物로서 오랫동안 널리 栽培되어 온 農作物의 하나이다. 그러나 그동안 콩에 대한 遺傳硏究와 品種 改良은 많이 이루어져 왔으나, 콩의 器內培養에 대한 硏究는 아직 미미한 형편이다. 器內培養의 遺傳育種硏究는 그동안 無病毒性 植物 養成을 위한 生長點培養, 人工交雜의 障碍를 克服하기 위한 胚培養, 體細胞 雜種植物 生成을 위한 原形質體 融合, 外來 DNA 導入에 의한 形質轉換 等의 分野로 발전해 왔다. 그런데 이런 分野에서 소기의 目的을 달성하기 위해서는 器內培養體로부터 植物體 分化가 容易해야 하나 一部 植物을 除外한 境遇 外에는 그 技術이 確立되어 있지 않다.

Bajaj 等[1]은 組織培養을 통해 遺傳的 變異를 誘發시킬 수 있다고 했지만 콩의 경우 組織培養에 成功한 예는 소수에 不過하다. Christianson 等(1983)과 몇몇 報告[2,13]에서 콩의 未熟胚를 이용해 植物體 分化에 成功했다고 했으며 Lippmann 等[15], Cheng 等(1980)과 Saka 等(1980)이 子葉節을 組織培養해 植物體를 얻었다고 했다. 그외에 Grant 等[10], Widholm 等(1983), Newell and Luu(1985) 等이 野生種인 *Glycine canescens*를 利用해 植物體 分化에 成功했다. Protoplast를 利用한 single cell에서의 植物體 分化는 Gamborg 등[6]이 可能性을 시사한 以後 Myers 等[16]이 역시 野

* 作物試驗場 (Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea) 〈접수일자 '92. 3. 8〉

生種에서 植物體 分化에 成功했을 뿐이다.

本 硏究는 器內培養 技術을 利用한 콩 遺傳育種의 基礎硏究로써, 콩 幼苗의 여러 部位를 組織培養하여 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

奬勵品種인 長葉콩, 八達콩, 短葉콩 種子를 材料로 使用했으며, 材料의 오염을 막기 위해 70% 알콜에 1分間 침지한 後, 0.1% Sodium hypochlorite 溶液에 15分間 흔들어 주면서 消毒시키고 滅菌水로 3回 洗滌한 뒤 0.8% agar가 含有된 MS培地에 置床하였다. 置床된 種子가 發芽한 後 5일이 經過된 個體를 꺼내어 無菌狀態에서 各 部位別로 切斷한 다음 다시 置床하였다. 置床 部位는 줄기 頂端組織, 子葉節, 葉組織, 胚軸 및 不胚軸을 使用하였으며 몇 가지 生長調節劑가 混合處理된 MS 培地와 B5培地에 이들을 置床하였다. 培養은 27℃의 溫度에서 16時間 明조건, 8時間 暗조건 狀態에서 實施하였으며, 4週동안 callus 增殖 및 個體分化 程度를 조사하였고 필요에 따라 callus를 繼代培養해야 할 때는 3週 間隔으로 행하였다.

結果 및 考察

1. 줄기의 頂端組織 培養

콩의 줄기頂端組織을 利用해 組織培養한 結果는 表 1과 같다. 培地는 Murashige and Skoog (MS) 培地에 NAA 0.2mg / ℓ 와 BA 0.01mg / ℓ 를 添加하여 使用하였다.

대체적으로 줄기 頂端組織을 培養하였을 때는 品種에 관계없이 callus의 形成은 잘 이뤄지지 않은 反面 shoot의 分化는 81.3~88.8%로 높게 나타났다. 分化된 shoot를 完全個體로 分化시키기 위해 다시 호르몬이 없는 MS培地로 移植했을 경우 뿌리가 發生해서 完全한 植物體로 자라난 比率은 28.8~40.0%를 보였다. 이상의 결과를 볼 때 줄기頂端組織은 콩 植物體 分化를 위한 적당한 部位라 생각된다. 그러나 줄기頂端組織을 培養했을 경우 대부분 置床된 組織當 1개의 植物體 밖에 分化되지 않아 大量 增植을 위한 組織培養에는 不適合하다고 判斷된다. 그동안 줄기頂端組織 培養은 여러 작물에서 無病個體를 얻기 위한 수단으로 많이 이용되었으나 완전한 無病個體 획득에는 어려움이 많다.

줄기頂端組織 培養과 목적이 비슷한 경우로 여러 作物에서 無病 植物體를 얻기 위한 生長點 培養이 試圖되고 있는데 Kartha 等[12]에 의하면 콩도 生長點 培養으로 植物體를 얻을 수 있었으며 shoot 分化 後에는 다시 뿌리 分化를 위한 繼代培養이 必要하다고 하였다.

2. 子葉節 組織培養

培地를 달리한 條件에서 콩의 子葉節을 組織培養한 結果는 表 2와 같다.

培地는 MS와 B5 培地에 生長調節劑를 각기 달리해서 添加하였는데 품종에 관계없이 MS培地에서는 callus가, B5培地에서는 대부분 multiple shoots가 分化되었다. 그런데 이것이 MS培地와 B5培地의 造成差異 때문인지, 添加된 生長調節劑의 影響때문인지는 좀더 檢討해 볼 必要가 있으리라 생각된다. Beversdorf 等[3]은 호르몬과 遺傳子型이 callus 形成에 많은 影響을 미친다고 報告한

Table 1. Regenerative response of cultured soybean shoot tips on MS medium.

Variety	No. of explants cultured	No. of explants producing callus	No. of explants producing shoot	No. of whole plants regenerated
Jangyeobkong	80	3(3.7)*	65(81.3)*	23(28.8)
Paldalkong	75	2(2.7)*	66(88.3)*	27(36.0)
Danyeobkong	80	0	71(88.8)	32(40.0)

* ( ) indicates percentage to No. of explants cultured.

Table 2. Regenerative response of cultured soybean cotyledonary node tissue

Media[1)]	Variety	No. of explants cultured	No. of explants producting callus	No. of explants porducting shoot	No. of whole plants regenerated
A	Jangyeobkong	210	182(82)[2)]	0	0
	Pladalkong	210	189(90)	1(0.5)[2)]	0
	Danyeokong	200	185(93)	1(0.5)	0
	Total	620	496(80)	2(0.3)	0
B	Jangyeobkong	210	9(4.3)	172(82)	37(18)
	Paldalkong	210	5(2.4)	167(80)	28(14)
	Danyeobkong	200	6(3.0)	169(85)	36(18)
	Total	620	20(3.0)	508(83)	101(16)

1) A : MS+NAA 0.1mg ℓ +BA 5mg / ℓ
B : M5+BA 1mg / ℓ −IBA 0.05mg / ℓ
2) percentage to No. of explants cultured.

Table 3. Green spot formation of callus and shoot regeneration observed from calli of soybean cotyledonary nodes through 1 and 2 transfers.

Media[1)]	Green spot formation of callus		Regeneration of shoot
	1st transfer	2nd transfer	
C	+++[2)]	+++	++
D	++	+	
E	++	++	

1) C : 1/2 B5+BA 1mg / ℓ +Agar 0.8%
D : 〃 +Agar 1.6%
E : 1/4 B5+BA 1mg / ℓ +Agar 0.8%
2) +++ : good, ++ : moderate, + : bad

바 있다.

Shoot가 分化된 뒤 다시 multiple shoots에서 하나씩의 shoot만 分離하여 호르몬이 없는 B5培地로 移植했을 때 뿌리가 發生해 完全한 植物體로 形成된 比率은 14~18%를 나타내었다. 이 比率은 줄기頂端組織을 培養했을 경우 28.8~40.0%의 完全個體 分化率을 보인 것에 비교하면 많이 뒤떨어지는데 (表1), 이것은 줄기頂端組織과 子葉節의 植物分化機能의 差異가 아닌가 思料된다. 그러나 子葉節에서의 shoot의 分化率은 대개가 80% 以上으로 줄기頂端組織과 비슷했으며 특히 줄기頂端組織에서는 置床 조직당 1개의 shoot가 分化되었으나 子葉節에서는 multiple shoots가 생겨 子葉節은 콩의 대량 增殖에 有用하게 利用될 수 있으리라 생각된다.

콩의 子葉 및 子葉節로 組織培養한 報告[7,9,14,17,18]를 보면 子葉節에서 植物體가 分化되었으며 生長調節劑 및 培地의 影響이 크다고 했다.

子葉節에서 分化된 callus에서 shoot 分化를 위해 3週 간격으로 繼代培養하면서 callus의 狀態 및 shoot 分化를 조사한 결과는 表 3과 같다. 각 培地의 조성은 B5培地 조성에 필요한 무기 元素 및 비타민의 量을 1/2과 1/4로 줄이고 대신 agar의 量을 일반적인 倍地 添加量인 0.8%보다 높여 使用하였다. 實驗結果는 表에서 나타나듯이 C 培地의 callus가 狀態가 좋고 shoot도 분화된 반면, 다른 培地에서는 callus만 增殖될 뿐 아무런 變化를 보이지 않았다. 이것은 agar의 影響은 크게 없었으나 培地 조성물의 量은 어느 정도 효과가 다르게 나타남을 反影하는 것이라 생각된다. 따라서 앞으로 callus 繼代培養과 이에 따른 培地조성물 差異에 대한 효과는 깊은 檢討가 필요하리라 생각

된다. 이와 유사한 結果는 Ghazi 等[5]이 報告한 바 있는데 callus 狀態에 따라 植物體 分化程度가 틀리다고 하였으며 無機物과 sucrose 含量도 이에 影響을 끼친다고 하였다.

3. 胚軸 및 上胚軸 組織培養

표 4는 콩의 胚軸을 組織培養한 결과이다.

胚軸 및 上胚軸 모두 callus만 誘起되었고, 品種別로는 差異가 없었지만 培地에 따라서는 callus의 誘起率이 다르게 나타났다. 胚軸의 組織培養에는 B5보다는 MS培地가 낫고 cytokinin보다는 auxin류가 더 有利한 것 같다. 그러나 shoot의 分化는 전혀 나타나지 않았으며 callus를 繼代培養해도 反應은 마찬가지였다.

胚軸 및 上胚軸의 組織培養에서 Iiang 等[8]과 Chen 등[4]은 *Glycine soja*의 胚軸에서 植物體 분화가 可能했다고 하였으며 Kameya 등[11]도 野生콩의 胚軸에서 植物體 분화가 이루어졌으나 이들은 置床組織의 길이, 位置 및 老化程度가 큰 影響을 미친다고 하였다. 그러나 아직 栽培콩으로 연구한 報告는 미흡하며, 대부분 callus 觀察이 報告되었을 뿐이다.

4. 葉組織培養

表 5는 培地의 種類와 品種을 달리하면서 葉組織을 置床했을 때 나타난 結果이다. 培地種類나 品種에 관계없이 root나 callus가 조금씩 나타났으나 shoot는 거의 分化되지 않았으며, 다만 短葉콩의 葉組織을 境遇 1% 以下의 shoot 分化率을 보였으나 곧 枯死하고 말았다.

그러나 表 6에서와 같이 이 callus를 다시 shoot 分化用 培地로 2회 繼代培養한 結果 약간의 shoot가 분화됨을 確認할 수 있었다. 따라서 培地의 種類나 호르몬 조성이 植物體 분화에 영향을 끼침을 알 수 있었으며, 품종간에도 반응이 다른 것으로 보아 遺傳子型도 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 앞으로 品種·培地 생장조절제 등 여러 요인에 대해 많은 검토가 이루어진다면 엽조직에서도 완전한 植物體를 얻을 수 있으리라 생각된다.

Wight 등[19]은 5日된 幼苗의 어린 잎을 組織培養함으로써 植物體 分化에 成功하였는데 置床 組織의 크기, 묘령, 培地 및 生長調節劑의 影響이 크다고 했으며 특히 pyroglutamic acid 및 2.4.5-T의 效果가 크다고 報告한 바 있다.

摘 要

콩에서의 組織培養 可能性을 알아보고자 콩 幼苗를 器內에서 培養시킨 뒤, 여러 部位를 採取하여 각기 다른 培地에 置床한 結果는 다음과 같다.

Table 4. Response of cultured soybean hypocotyl and epictyl and epicotyl tissue for callus formation

Media[1]	Variety	Hypocotyl		Epicotyl	
		No. of explants	No. of explatns producing callus	No. of explats	No. of explants producing callus
A	Jangyeobkong	210	199(95)[2]	210	205(98)
	Paldalkong	210	202(96)	210	200(95)
	Danyeobkong	200	192(96)	200	187(94)
	Total	620	593(96)	620	592(95)
B	Jangyeobkong	210	105(50)	210	120(57)
	Paldalkong	210	121(58)	210	137(65)
	Danyeobkong	200	122(61)	200	129(65)
	Total	620	347(56)	620	386(62)

1) A : MS+NAA 0.1mg / ℓ +BA 5mg / ℓ
B : B5+BA 1mg / ℓ +IBA 0.05mg / ℓ
2) percentage to No. of explants.

Table 5. Regenerative response of cultured soybean primary leaves.

Maia[1]	Variety	No. of explants cultured	No. of explants producing		
			callus	root	shoot
F	Jangyeobkong	100	10	23	0
	Paldalkong	100	7	18	0
	Danyeobkong	100	15	12	1
	Total	300	32(10.7)[2]	53(17.7)	1(0.3)
G	Jangyeobkong	100	9	21	0
	Paldalkong	100	9	20	0
	Danyeobkong	100	18	13	2
	Total	300	36(12)	54(18)	2(0.7)

1) F : B5+Adenine sulfate 40mg / ℓ +L−glutamine / ℓ +2· 4· 5−T 0.1mg / ℓ
G : F media+BA 1mg / ℓ
2) Percentage to No. of explants.

Table 6. Callus propagation and shoot regeneration observed from calli of soybean primary leaves through 2nd transfers.

Media[1]	No. of calli cultured	Callus Propagation	No. of calli producing shoot
H	60	good	8(13)[2]
I	60	moderate	2(3)

1) H : B5+BA 1mg / ℓ
I : B5+BA 5mg / ℓ
2) percentage to No. of callus cultured

1. 줄기頂端組織 培養에서는 대부분 shoot가 分化되어 完全한 植物體를 얻을 수 있었다.

2. 子葉節 組織培養에서는 multiple shoots가 나타나 大量增殖에 有用했으나 培地에 따른 影響이 컸다.

3. 胚軸 및 上胚軸 組織培養에서는 callus만 分化되었다.

4. 葉組織培養에서는 callus 分化 후 繼代培養했을 때 shoot가 分化되었으나 完全한 植物體를 얻기는 힘들었다.

引用文獻

1. Bajaj, Y. P. S. and S. S. Gosal 1981. Induction of genetic variability in grain legumes through tissue culture. Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants, Singapore pp 25−41.
2. Barwale, U. B., H. R. Kerns, and J. M. Widholm 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta. 167 : 473−481.
3. Beversdorf, W. D. and E. T. Bingharm 1977. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species, Crop Sci. 17 : 307−311.
4. Chen, Y., and Yugao Wang.(1984) The effect of various concentrations and ratio of kinetin and NAA on organ differentiation of tissue culture of soybean. Soybean Sci. 3 : 339−343.
5. Ghazi, T. D., H. V. Cheema, and M. W. Nabors 1986. Somatic embryogenesis and

plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. Plant Cell Reports. 5 : 42−456.

6. Gamborg, O. L., B. P. Davis, and R. W. Stahlhut, 1983. Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of *Glycine* species and leaf tissue of soybean. Plant Cell Reports. 2 : 213−215.
7. Hammatt, N. et al. 1987. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Glycine canescens* and *G. clandestina*. Plant Science. 48 : 129−135.
8. Iiang, X., Qiguan Shao and P. S. Carlson, 1983. Plant regeneration from hypocotyl and cotyledon of *Glyscine soja*. Soybean Science. 2 : 25−29.
9. Iversm, D. R., R. G. Palmer, and W. R. Fehr, 1974. Anther culture in soybeans. Crop Sci. 14 : 891−893.
10. Grant, J. 1984. Plant regeneration from cotyedonary tissue of *Glycine canescens*, a perennial wild relative of soybean. Plant Cell Tissue Organ Culture. 3 : 169−173.
11. Kameya, T. and J. Widholm, 1981. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. Plant science letters. 21 : 289−294.
12. Kartha, K. K. et al. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes : soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. Can. J. Bot. 59 : 1671−1679.
13. Li, B. J., H. R. Langridge, and A. A. Szalay, 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max*. Plant Cell Reports. 4 : 344−347.
14. Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand, and G. B. Collins, 1987. Soybean somatic embryogenesis : Effects of hormones and culture manipulations. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 10 : 197−208.
15. Lippmann, B. and G. Lippmann, 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. Plant Cell Reports. 3 : 215−218.
16. Myers, J. R., P. A. Lazzer, and G. B. Collins, 1989. Plant regeneration of wild *Glycine* species from suspension culture-derived protoplasts. Plant Cell Reports. 8 : 112−115.
17. Oswald, T. H., A. E. Smith, and D. V. Phillips, 1977. Callus and plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. Physiol. Plant. 39 : 129−134.
18. Wright, M. S., S. M. Koehler, M.A . Hinchee, and M. G. Carnes 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. Plant Cell Reports. 5 : 150−154.
19. Wright, M. S., D. V. Ward, M. A. Hinchee, M. G. Carnes, and R. T. Kaufman 1987. Regeneration of soybean from cultured primary leaf tissue. Plant Cell Reports. 6 : 83−89.