한국식물생명공학회지 제29권 제2호
Korean J. Plant Biotechnology
Vol. 29, No. 2, 135~138 (2002)

대두 재조합순계주에서 고빈도 체세포배발생능 계통 조사

최필선[1*] · 다가오 고마쓰다[2] · 김민훈[1] · 최규명[1] · 최동욱[1] · 유장렬[1,3]
[1](주)유진텍부설연구소, [2]일본농업생물자원연구소 유전다양성과, [3]한국생명공학연구원 식물세포공학실

Screening of Soybean Recombinant Inbred Lines for High Competence Somatic Embryogenesis

CHOI, Pil Son[1*] · Takao Komatsuda[2] · KIM, Min Hoon[1] · CHOI, Kyu Myeong[1] · CHOI, Dong Woog[1] · LIU, Jang Ryol[1,3]
[1]Eugentech Inc., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oun-dong, Yuseong-gu, Daejeon
[2]Department of Gene Diversity, National Institute of Agrobiological Resources (NIAS), Kan-non-dai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan [3]Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oun-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea

ABSTRACT Cotyledonary explants from immature zygotic embryos of each 85 recombinant inbred lines (RILs) were cultured on medium containing MS salts, B5 vitamins, 40 mg^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 30 g^{-1} sucrose. Frequency of somatic embryo formation on cotyledonary explants showed in thirty-six lines(<10%), in thirty-seven lines (11~49%), in nine lines (50~89%), and in three lines(>90%), respectively. The highest frequency (up to 90%) and number (6.36 per cotyledon) of somatic embryos were obtained from lines of KM1010, KM1032 and KM1064. Primary somatic embryos produced from three lines produced numerous secondary somatic embryos on the surfaces, which were subcultured for over one year. Upon transfer to maturation and conversion medium (Komatsuda, 1992), somatic embryos converted to plantlets at a frequency of approximately 25%.

Key words: Soybean, *Glycine max* L., *Glycine gracilis* Skvortz., somatic embryogenesis, recombinant inbred lines (RILs)

서 론

대두의 기내식물체 재생연구는 체세포배발생을 통하여 처음으로 보고되었고 (Christianson et al. 1983), 이후 식물생장조절제의 적정농도 (Finer and Nagasawa 1988; Liu et al. 1992), 배양재료로서 미숙배의 중요성 (Komatsuda 1995), 오옥신과 sucrose의 상호작용 (Lazzeri et al. 1988; Komatsuda 1992), 체세포배의 이상형태 발생 (Choi et al. 1994), 체세포배의 성숙 및 식물체로의 전환 (Buchheim et al. 1989) 그리고 품종간 체세포배 형성능 (Komatsuda and Ohyama 1988) 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 대두의 품종간 체세포배발생능 비교 연구는 전 세계에서 수집한 약 300여 개 품종을 대상으로 광범위하게 조사하여 대두의 식물체 재분화 연구에 품종의 중요성이 강조된 바 있다 (Komatsuda 1992). 이와 같이 기내 배양이 어려운 콩과식물에서 품종 간 비교연구는 식물체 재분화시스템 확립에 있어서 필수적이라 할 수 있으며, 배양재료로서 우수한 계통 또는 품종선택은 식물체 재생 및 형질전환연구에 있어서 성공 여부를 결정 지을 수 있는 중요한 과정이라 할 수 있다 (Green 1982; Rhodes et al. 1988a,b; Foroughi-Wehr and Friedt 1981; Vasil et al. 1990; Kamiya et al. 1988). 이와 관련하여 Komatsuda (1992)는 체세포배발생에 대한 quantitative trait loci (QTL)분석을 목적으로 체세포배 발생능이 높은 품종 (Masshokutou Kou 502)과 낮은 품종 (Keburi)의 교배로부터 117개 대두재조합순계주를 개발한 바 있다 (personal communication with T. Komatsuda). 따라

*Corresponding author Tel 042-863-2049 Fax 042-863-2049
E-mail cps6546@hanmail.net

서 본 연구에서는 대두 기능유전체분석을 위한 고빈도 형질 전환 시스템을 개발할 목적으로 117개 재조합순계주에 대한 체세포배 발생능을 조사하고 고빈도 체세포배발생능 계통으로부터 식물체 재생에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

대두 117개의 재조합 순계주 (RIL, recombinant inbred lines) F14세대를 Dr. Komatsuda (일본 농업생물자원연구소 유전다양성과)로부터 공급받았다. 대두 117개의 재조합 순계주는 이전 연구에서 체세포배 발생능이 높은 *Glycine gracilis*의 semi-wild 변종인 Masshokutou Kou 502와 체세포배발생능이 낮은 *Glycine max*의 재배품종인 Keburi를 (Komatsuda 1992) 교배하여 single-seed descent방법으로 개발하였다 (personal communication with T. Komatsuda). 본 실험에서는 2개의 양친 품종과 117개의 재조합순계주를 온실포장에 파종하여 85계통의 계통의 식물체를 얻어 실험에 사용하였다.

체세포배 발생 및 재분화능 조사

개화 후 15일째에 미숙배의 크기가 2.5~3 mm로 자란 꼬투리를 취하여 수돗물에 3~5회 수세한 후 미숙종자의 종피를 제거한 후 자엽절편만을 배양재료로 이용하였다. 체세포배 유도배지 (SIM, Somatic Induce Medium)는 MS salt (Murashige and Skoog 1962), B5비타민 (Gamborg et al. 1968), 40 mg^{-1} 2,4-D (Finer and Nagasawa 1988) 및 30 g^{-1} sucrose를 조합하여 배지를 조성하였다. 배지는 4 g^{-1} Phytagel을 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121℃, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 후 90×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며, 페트리디쉬당 20개의 자엽절편을 치상하였다. 배양은 25℃로 조절되는 배양실에서 광도 46 μmol $m^{-2}s^{-1}$의 16시간 광주기에서 5주간 배양한 후 체세포배 발생빈도와 자엽당 체세포배 발생수를 기록하였다.

일차 체세포배를 동일배지상에 옮겨 구형기의 2차 체세포배로 증식하였으며, 성숙배지와 식물체 전환배지 (Komatsuda 1992)에 옮겨 완전한 식물체로 생육시켰다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

대두 재배품종 (Keburi)과 semi-wild 변종 (Masshokutou Kou 502)의 교배로부터 얻은 117개의 재조합 순계주를 파종하여 얻은 85계통의 식물체로부터 개화 후 약 15일째에 미숙배를 얻었다. 미숙배로부터 자엽절편을 취하여 체세포배 유도배지 (SIM)에 이식한 결과, 배양 1주 후부터 자엽절편 가장자리에서 갈변되기 시작하여 3주째에는 거의 모든 부위가 갈색으로 변하였고, 자엽절편 가장자리와 가운데에서 캘러스 형성 없이 체세포배가 형성되기 시작하였다. 그러나 갈변현상 없이 자엽으로부터 캘러스가 형성되거나 팽창현상이 일어나는 계통에서는 체세포배가 거의 형성되지 않았다 (데이터 미제시).

배양 5주 후 양친의 자엽절편으로부터 체세포배형성률과 자엽당 체세포배 형성 수를 조사한 결과, 대두 재배품종인 Keburi에서는 체세포배가 관찰되지 않았으나, semi-wild 변종인 Masshokutou Kou 502에서는 92%의 형성빈도와 자엽당 3.92개의 체세포배가 형성되었다 (Table 1). 이러한 결과는 품종 간 체세포배발생능 차이가 분명함을 보여 주며, 체세포배발생능에 대한 약 300여 개의 품종스크리닝 (Komatsuda 1992)과 Masshokutou Kou 502와 Keburi에서 자엽당 각각 4.6개와 0.02개의 체세포배가 형성된다는 이전 연구결과 (Ito et al. 1999)와 아주 잘 일치하였다.

양친의 교배로부터 얻은 재조합순계주 F14세대에서 85계통에 대한 체세포배의 형성 빈도와 형성 수를 비교한 결과, 36계통에서 0~10%의 낮은 체세포배 형성빈도와 자엽당 약 0.07개의 체세포배가 형성되었고, 37계통에서 11~49%의 형성빈도와 자엽당 약 0.90개의 체세포배가, 9계통에서 50~89%의 형성빈도와 자엽당 약 3.12개의 체세포배가 각각 형성되었으며, 90% 이상의 고빈도 체세포배 형성빈도는 3계통에서만 관찰되었고, 자엽당 6.36개의 체세포배가 형성되었다 (Figure. 1). 이러한 고빈도 체세포배발생능을 갖는 3계통의 일차배를 동일배지에 옮겨 2차배 증식방법으로 1년 이상 증식 및 유지할 수 있었으며 (Figure. 2A), 체세포배를 탄수화물 (sucrose), 2,4-D 및 GA_3의 농도를 다르게 첨가하여 조제한 성숙배지 I, II 그리고 발아배지 (Komatsuda 1992)에 옮겼을 때 체세포배 중 약 25% 정도가 정상 식물체로 생육하였

Table 1. Competence of somatic embryogenesis in parental varieties of soybean.

Parents	Number of cotyledon cultured	Number of explants with somatic embryos (%)	Total number of somatic embryos formed on explants	Number of somatic embryos per cotyledonary explant
Keburi	60	0 (0)	0	0
Masshokutou Kou 502	60	55 (92)	235	3.92

다 (Figure. 2B, C). 이러한 기내식물체를 토양에서 순화시켰을 때 꽃이 피고 열매가 정상적으로 생장하는 식물체로 키울 수 있었다 (Figure. 2D).

이러한 결과는 대두의 재조합 순계주에서 체세포배 형성능이 높은 계통은 양친 중 Masshokutou Kou 502의 유전적 특성이, 체세포배 형성능이 낮은 계통은 Keburi의 유전적 특성이 유전되었기 때문인 것으로 사료되며, 특히 KM1032, KM1064 및 KM1010계통과 같이 체세포배 형성빈도가 각각 92%, 92% 및 100%로 그리고 자엽당 체세포배 형성수가 각각 4.77개, 8.23개 및 8.52개로 양친 (Masshokutou Kou 502) 보다 높게 나타난 것은 유전학적 상가효과 (additive effect)에 의한 것으로 추측된다. 이와 같이 계통 간 체세포배발생능 차이는 대두뿐 아니라 옥수수의 여러 가지 순계주중 A188계통에서도 확인된 바 있으며 (Green 1982), 이후 A188계통은 세포배양과 원형질체 배양을 통한 식물체재생에 (Rhodes et al. 1988a) 그리고 electroporation법에 의한 형질전환식물체 생산에 필수적으로 이용되어 왔다 (Rhodes et al. 1988b). 또한 보리의 여러 품종 중 Dissa와 Igri품종에서도 약배양에 의한 반수체식물 생산 (Foroughi-Wehr and Friedt 1981)과 미숙배 배양에 의한 부드러운 배발생캘러스 유도가 가능하였고 (Luhrs and Lorz 1987), 밀품종중 Chris에서도 약, 화기 및 미숙배 배양에 의한 식물체 재생이 이루어졌다 (Vasil et al. 1990). 덧붙여 벼의 약 500개의 품종을 대상으로 배발생능을 조사하여 고빈도 배발생능 품종을 선발한 바 있다 (Kamiya et al. 1988). 이와 같이 대두를 포함한 많은 식물에서 동일종이라 할지라도 계통 간 또는 품종 간 체세포배 발생능이나 식물체 재분화능에 있어서 현저한 차이가 있기 때문에 기내배양이 어려운 종일수록 광범위한 스크리닝 연구를 통해서 우수한 품종이나 계통 선발과정이 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서도 117개의 재조합순계주에서 체세포배발생능이 우수한 KM1032, KM1064 및 KM1010 등 3계통을 선정하였으며, 이는 지금까지 매우 낮은 대두 식물체 재생률과 형질전환율을 향상시키는 데 중요한 유전자원으로 활용될 수 있을 것이다.

적 요

대두 85개 재조합순계주의 미숙배로부터 얻은 자엽절편을 MS salt, B5비타민, 40 mg^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 및 30 g^{-1} sucrose로 조성된 체세포배유도배지 (SIM, somatic induce medium)에 치상하여 5주간 배양하였다. 10% 이하의 체세포배형성빈도는 36계통에서, 11~ 49%의 형성빈도는 37계통에서, 50~80%의 형성빈도는 9계통에서 그리고 90% 이상의 형성빈도는 3계통에서 각각 관찰되었다. 90% 이상의 체세포배형성빈도와 자엽당 6.36개의 체세포배를 형성하는 계통으로는 KM1010, KM1032 및 KM1064이었으며, 3계통에서 얻은 일차배를 동일배지상에서 계대배양하면서 2차배 증식방법으로 1년 이상 증식 유지하였다. 체세포배를 성숙배지와 식물체전환배지 (Komatsuda 1992)에 옮겼을 때 약

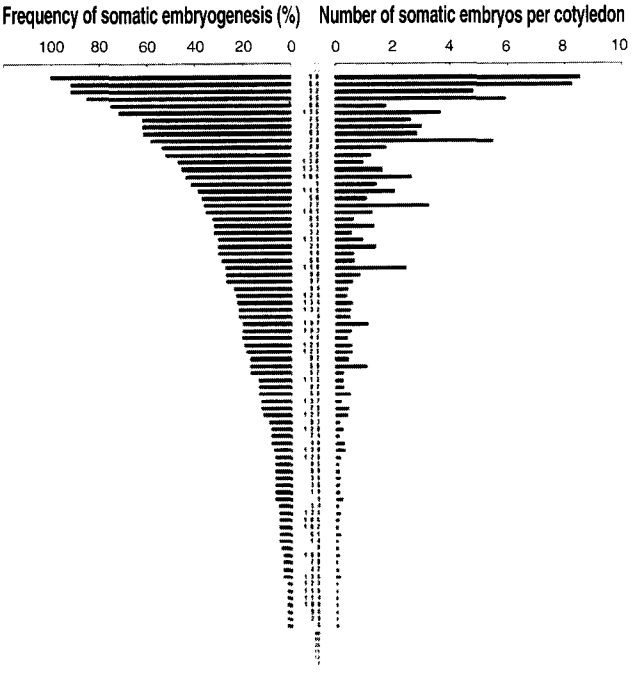

Figure 1. Frequency (%) of somatic embryo formation and num ber of somatic embryos per cotyledonary explant from 85 recombi nant inbred lines cultured on medium containing 40 mg1-1 2,4-D.

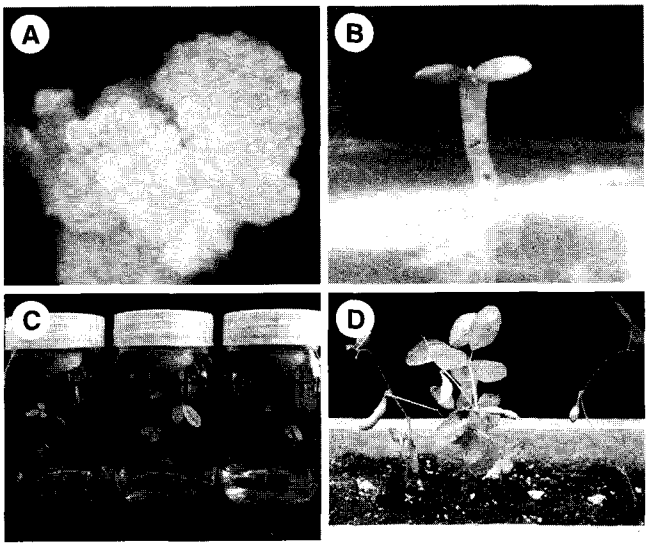

Figure 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of soybean recombinant inbred line KM1010; A, Pro liferation of secondary somatic embryos on primary somatic embryos; B, Developed somatic embryo after 2 weeks of transfer to medium containing 1 mg^{-1} 2,4-D and 30 g^{-1} sucrose; C, Germination of somatic embryos on medium containing 0.001 mg^{-1} GA3; D, Mature plants transplanted to soil.

25% 정도가 정상식물체로 생육하였다.

사사 - 본 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업단 과제 (CG2121)의 지원과 일본과학기술청 (STA) 특별연구프로그램에 의해 수행되었음.

인용문헌

Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiol **89**:768-775

Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlrophenoxyacetic acid on somatic embryo morphology. Korean J Plant Tiss Cult **21**:7-13

Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morpho genetically competent soybean suspension culture. Science **22**:632-634

Foroughi-Wehr B, Friedt W (1981) Responsiveness to anther culture of *Hordeum vulgare* cv. "Dissa" and its parents. Barley Genet Newsl **11**:50-53

Finer JJ, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merill). Plant Cell Tiss Org Cult **15**:125-136

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp cell Res **50**:151-158

Green CE (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. Plant Tissue Culture 1982 (ed, Fujiwara A). Maruzen, Tokyo. pp 107-108

Ito M, Komatsuda T, Takahata Y, Kaizuma N (1999) Genotype X sucrose interactions for 2,4-D-induced somatic embryogenesis in soybean (*Glycine max* L.) Plant Biotechnology (submitted)

Kamiya M, Yamanaka H, Oono K (1988) Intervarietal variations in somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). Natl Inst Agrobiol Resources (Japan) Ann Rep No 4, 127-161

Komatsuda T, Ohyama K (1988) Genotype of high competence for somatic embryogenesis and plant *Glycine max* tissue culture. Theor Appl Genet **75**:695-700

Komatsuda T, Kaneko K, Oka S (1991) Genotype × sucrose interactions for embryogenesis in soybean. Crop Sci **31**:333-337

Komatsuda T 1992 Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. Natl Inst Agrobiol Resources (Japan) Ann Rep No 7. 1-78

Komatsuda T (1995) Somatic embryogenesis in soybean (*Glycine* species). In Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II, Bajaj, Y P S (ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 239-255

Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. Plant Mol Biol Rep **3**:160-167

Liu W, Moore PJ, Collins GB (1992) Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling propagation. In Vitro Cell Dev Biol **28**:153-160

Luhrs R, Lorz H (1987) Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Theor Appl Genet **75**:16-25

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**:473-497

Rhodes CA Lowe KS, Ruby KL (1988a) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. Bio/Technology **6**:56-60

Rhodes CA, Pierce DA, Mettler IJ, Mascarenhas D, Detmer JJ (1988b) Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science **240**:204-207

Vasil IK, Vasil V, Redway F (1990) Plant regeneration from embryogenic calli, cell suspension cultures and protoplasts of *Triticum aestivum* L. (wheat). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proceeding of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, The Netherlands, 24-29 June 1990. (ed., Nijkamp HJJ, Vander Plas LHW, Van Aartrijk J). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp 33-37

(접수일자 2002년 5월 2일)