

기내 배양을 통한 국내 콩(*Glycine max* L.) 품종의 식물체 재분화

김동건¹, 비파다 칸타요스¹, 김동관², 박흥규², 김행훈³, 나의식³, 이성준³, 배창휴^{3*}

¹순천대학교 대학원, ²전남 농업기술원 식량작물연구소, ³순천대학교 웰빙자원학과

Plant Regeneration by *in vitro* Tissue Culture in Korean Soybean (*Glycine max* L.)

Dong-Gun Kim¹, Vipada Kantayos¹, Dong-Kwan Kim², Heung-Gyu Park², Haeng-Hoon Kim³,
Eui-Shik Rha³, Sheong Chun Lee³ and Chang-Hyu Bae^{3*}

¹Graduate School, Sunchon National University, Sunchon 57922, Korea

²Institute of Agricultural Science and Technology, Jellaname-do Agricultural Research and Extension Services, Naju 58213, Korea

³Department of Well-being Bioresources, Sunchon National University, Sunchon 57922, Korea

Abstract - Plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis was investigated in Korean soybean cultivars including Cheongja 3, Jinpumkong 2, Taekwangkong and Uram. Cotyledon, cotyledon+hypocotyl and hypocotyl segments of 7-day-old seedlings were cultured on MS medium containing various concentration (0, 1, 2 and 4 mg/L) of BA and TDZ. The results showed that MS medium supplemented with BA 2.0 mg/L yielded the highest shoot formation ratio of 83.3%. In 4 cultivars, Taekwangkong showed the highest ratio of shoot formation. When various sizes of immature cotyledons (S: 1 ~ 2 mm, M: 3 ~ 5 mm, L: 6 ~ 8 mm) were tested on MS medium containing 2,4-D 40 mg/L for somatic embryogenesis, the optimum size for embryogenic callus induction was 3 ~ 5 mm in length of immature cotyledons. In 4 cultivars, Taekwangkong showed the highest percentage of embryogenic callus induction. The results indicate that Taekwangkong is the best soybean cultivar for plant regeneration via organogenesis and embryogenic callus induction among the 4 cultivars.

Key words - BA, Callus, Organogenesis, Somatic embryogenesis, Soybean, TDZ

서 언

장미목 콩과의 일년생 쌍자엽식물인 콩(*Glycine max* L.)은 세계 각지에서 재배되는 경제적으로 중요한 식용작물로 단백질 원인 동시에 isoflavone, oligosaccharides, saponins, phytic acid 등 여러 기능성 성분이 풍부하다(Kim and Kim, 2005).

콩과작물의 세포나 조직으로부터 기내 식물체 재분화는 클로버(White and Voisey, 1994), 땅콩(Sellars *et al.*, 1990), 완두(Bean *et al.*, 1997) 등 몇몇 종을 제외하고는 그 효율이 낮은 편이다(하와 한, 2002; Malik and Saxena, 1992). 콩의 경우 Gamborg *et al.* (1968)이 자엽과 배축 절편 배양으로 캘러스를 유도한 이후 다양한 조직 부위로부터 재분화가 연구되고 있는

데, 기관형성(organogenesis)으로 직접 재분화시킨 식물체는 탈분화 세포를 경유하는 체세포배발생 경로를 통한 것보다 체세포변이(somatic variation)가 낮은 것으로 보고(Finer and Nagasawa, 1988)되고 있다.

기관형성을 통한 콩의 재분화에는 배양 조직절편 부위, 품종, 배지의 종류, 생장조절물질이 크게 영향을 미친다(Arun *et al.*, 2014; Franklin *et al.*, 2004; Sairam *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001). 지금까지 상배축(Wright *et al.*, 1987), 배축(Dan and Reichert, 1998), 자엽(Franklin *et al.*, 2004; Mante *et al.*, 1989), 자엽마디(Liu *et al.*, 2010; Zia *et al.*, 2010; Malik and Saxena, 1992), 줄기마디(Saka *et al.*, 1980)를 이용한 치상 부위별 차이, 그리고 유전형 차이(Liu *et al.*, 2010; Zia *et al.*, 2010; Shan *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2004; Yoshida, 2002; Dan and Reichert, 1998)가 보고되고 있다. 신초형성에는 TDZ (Verma

*교신저자: chbae@sunchon.ac.kr
Tel. +82-61-750-3214

et al., 2011; Shan *et al.*, 2005; 하와 한, 2002; Bhagwat *et al.*, 1996), BA (Zia *et al.*, 2010; Ma and Wu, 2008; Dan and Reichert, 1998; Kaneda *et al.*, 1997; Malik and Saxena, 1992), zeatin (Zia *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2001), 그리고 kinetin (Marele, 2013; Joyner *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 1987)의 효과가 큰 것으로 보고되고 있고, 기본배지로는 MS (Franklin *et al.*, 2004; Mante *et al.*, 1989)와 B5 (Liu *et al.*, 2010) 배지가 주로 이용되고 있다.

체세포배발생(somatic embryogenesis) 경로를 통한 콩의 재분화는 기관형성과 마찬가지로 조직절편 부위, 품종, 성장조절 물질에 따라 배양효율이 크게 좌우된다. 이용 조직절편으로 자엽(Klink *et al.*, 2008; Hiraga *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2005; Ko and Korban, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Santarém *et al.*, 1997; Finer and Nagasawa, 1988)이 주로 이용되며, 자엽의 성숙 정도에 따라 다른 결과를 보인다. 그 밖에 품종 간 유전자형(Yang *et al.*, 2009; Hiraga *et al.*, 2007; Kita *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 2004; Baily *et al.*, 1993; Finer and Nagasawa, 1988; Komatsuda and Oyama, 1988), pH (Hofmann *et al.*, 2004; Lazzeri *et al.*, 1987), 배지 및 고형물질의 종류(Rajasekaran and Pellow, 1997; Santarém *et al.*, 1997) 등도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

체세포배발생을 통한 식물체 재분화는 기관형성 경로를 이용한 방법에 비해 복잡한 단계를 거치는 것으로 알려져 있고 (Hiraga *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 1993), 품종(genotype)에 따라서 재분화율에 차이를 보이기 때문에 특정 품종에서는 재분화가 가능할지라도 모든 품종에 적용되지 못하는 한계도 가지고 있다. 식물의 효과적인 배발생 연구는 대량증식, 형질전환, 우량 형질의 육종 및 인공종자 개발 등 산업적 실용화에 중요하다.

본 연구에서는 국내 콩 4 가지 장려품종을 대상으로 기관형성 및 체세포배발생을 통한 식물체 재분화율을 비교하여 효율적인 식물체 재생의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

국내 장려품종인 우람, 진품2호, 청자3호, 태광 품종을 전남 농업기술원에서 분양받아 사용하였다. 각 품종의 종자를 70% isopropanol에서 1 분간, 1% sodium hypochlorite 용액에서 15 분간 표면살균 한 후 멸균증류수로 1 분씩, 3 회 이상 수세한 뒤

멸균된 여과지로 수분을 제거시킨 다음 0.8% 한천 배지에서 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건에서 7 일간 발아시켰다(Kim, 2016).

기내배양

발아된 기내식물체로부터 자엽, 배축, 자엽+배축 절편 혹은 자엽+배축 절편을 각각 0.7 ± 0.3 mm 크기로 분리하여 B5 (Gamborg *et al.*, 1968) 또는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 2 mg/L의 BA 혹은 0, 1, 2, 4 mg/L의 BA와 TDZ를 각각 첨가한 신초유도배지에 치상하였다. 배지는 0.8% 한천을 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121°C , 1.2 기압에 15분간 고압멸균 후에 배양병에 분주하여 사용하였고, 배양은 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $20 \mu\text{mol/s/m}^2$ 광도로 조명(16 시간/일) 하에 실시하였다.

조직절편 부위에 따른 신초형성

자엽, 배축, 자엽+배축 조직절편을 BA 2.0 mg/L를 포함한 MS 배지에 품종 당 30 개(10 개 절편, 3 반복처리)씩 치상하여 배양 4 주후 1 mm 이상 신초수를 조사하였다.

배지 종류에 따른 신초형성

선행 실험에서 신초형성이 양호했던 자엽+배축 조직절편을 BA 2.0 mg/L를 포함한 MS와 B5 배지에 품종 당 30 개(10 개 절편, 3 반복처리)씩 치상하여 배양 4 주후 1 mm 이상 신초수를 조사하였다.

신초형성에 미치는 성장조절제의 영향

BA와 TDZ를 각각 0, 1, 2, 4 mg/L 농도로 첨가한 MS 배지에 전술한 바와 같이 자엽+배축 조직절편을 치상한 후 절편 당 신초수와 신초형성을, 신초의 길이를 조사하였다.

체세포배발생용 식물재료

공시 품종의 종자를 포트 당 4 립씩 파종하여 순천대학교 유리온실에서 육성하였다. 개화 후 성숙중인 꼬투리(협)를 채취하여 전술한 바와 같은 방법으로 표면소독 하였다. 꼬투리를 절단하여 드러난 미성숙 자엽을 S (1~2 mm), M (3~5 mm), L (6~8 mm) 크기로 구분하였다. 미성숙자엽의 둥근 부분(embryogenic axis)을 잘라 제거한 후 향배축면(flat side)이 MSD40 배지면 위로 향하게 치상하였다. MSD40 배지는 MS 기본배지에 40 mg/L 2,4-D를 첨가하고, pH 7.0으로 조정하여 90×15 mm Petri-dish 에 25 ml씩 분주하여 사용하였다.

체세포배발생 캘러스 유도 및 증식

Petri-dish당 20 개의 미성숙 자엽절편을 MSD40 배지에 치상하고, 약광($2\ \mu\text{mol/s/m}^2$), 16시간/일 조명으로 배양한 뒤 7~8 주째, 20 mg/L의 2,4-D를 MS 기본배지에 첨가시킨 배지인 MSD20 배지(pH 5.8)에 체세포 배발생형 캘러스(embryogenic callus)를 치상하여 4주 간격으로 계대 배양하였다. MSD20 배지에서 녹색을 띄는 캘러스는 MSM6+AC 배지(maltose 6%, active carbon 0.5%, pH 5.8)에 이식하여 4주간 계대 배양한 후 MSM6 배지(MSM6+AC 배지성분 중 active carbon을 뺀 배지)로 옮겨 4주간 배양하였다. 배양실은 $25\pm 2^\circ\text{C}$, $20\ \mu\text{mol/s/m}^2$ 광도로 조명(16 시간/일) 하였다.

결과 및 고찰

조직절편 부위에 따른 신초형성

콩의 조직절편으로부터 신초를 유도하기 위하여 기내발아 후 7 일째에 공시품종의 유묘로부터 자엽, 배축, 자엽+배축 조직절편을 분리하여 2.0 mg/L의 BA를 포함한 MS 배지에 배양하였다. 배양 21 일째 신초형성을 조사한 결과(Table 1), 배양 13 일째부터 신초원기가 관찰되었으며, 3 주후부터 조직 부위별로 신초형성율에 차이가 나타났다(Fig. 1). 자엽과 배축에서는 신초가 형성되지 않은 반면 자엽+배축 조직절편에서 신초의 형성이 관찰되었다. 품종별로는 태광 품종이 83.3%로 가장 높게 신초가 형성되었고, 우람 품종이 56.6%, 진품2호 품종이 53.3%,

Table 1. Shoot formation ratio (%) from different explants of soybean (*Glycine max* L.) cultivars by *in vitro* culture^z

Variety	Cotyledon	Cotyledon + hypocotyl	Hypocotyl
Cheongja 3	0 (0/30) ^y	33.3 (10/30) ^y	0 (0/30) ^y
Jinpumkong 2	0 (0/30)	53.3 (16/30)	0 (0/30)
Taekwangkong	0 (0/30)	83.3 (25/30)	0 (0/30)
Uram	0 (0/30)	56.6 (17/30)	0 (0/30)

^zThe explants were cultured for 3 weeks on MS medium containing 2.0 mg/L of BA.

^y(Number of explants with shoot/number of cultured explant).

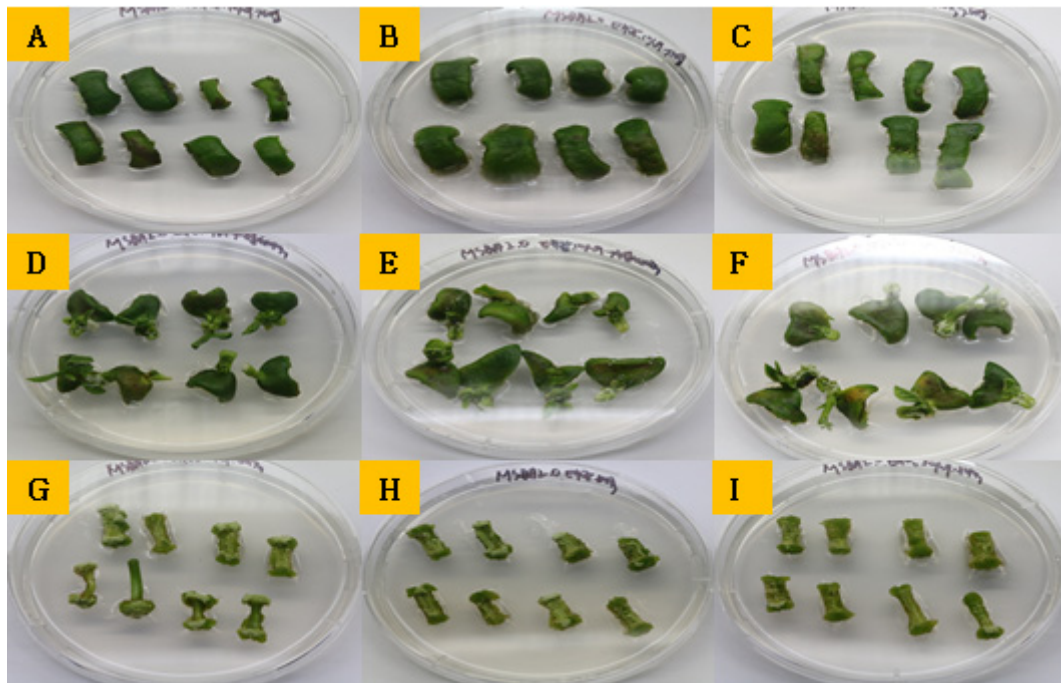


Fig. 1. Shoot formation from cotyledon (A, B, C), cotyledon + hypocotyl (D, E, H) and hypocotyl (G, H, I) explants in soybean (*Glycine max* L.) cultivars for 3 weeks culture on MS medium containing 2.0 mg/L of BA. Cheongja 3; A, D, G, Taekwangkong; B, E, H, Uram; C, F, I.

청자3호 품종이 33.3%로 신초형성의 정도는 품종별로 차이가 크게 나타났다(Table 1).

품종 간 신초형성율의 차이는 콩의 자엽부위 배양에서 품종 간 기관형성의 차이를 보고한 것(Arun *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2010; Zia *et al.*, 2010; Ma and Wu, 2008; Shan *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2004; Yoshida, 2002)과 유사한 결과이다. 그리고 익산나물콩은 배축 조직을 사용하여 효과적인 신초형성이 관찰되었다(Kim *et al.*, 2008). 한편 동일 품종 내에서 조직절편 부위별로 차이를 보인 것은 조직부위별 형태학적 특성의 차이로 인해 조직부위별 탈분화 능력이 다르다는 것을 시사한다(김과 배, 1992).

배지종류에 따른 신초형성

배지의 종류에 따른 신초형성의 차이를 검토하기 위하여 신초형성이 양호한 자엽+배축 조직을 이용하여 BA 2.0 mg/L를 포함한 MS 배지와 B5 배지를 각각 공시하여 신초형성 차이를 조사하였다. 그 결과(Table 2), 배양 후 4주째 신초형성율은 4 품

종 모두에서 MS + BA 2.0 mg/L 배지가 B5 + BA 2.0 mg/L 배지보다 양호하였다. 공시 4 품종 중 태광콩은 배지 종류에 따른 차이가 가장 크게 나타났으며, MS + BA 2.0 mg/L 배지에서 83.3%, B5 + BA 2.0 mg/L 배지에서 56.6%로 배지의 종류에 따라 26.7%의 차이를 나타내었다. 우람 품종과 진품2호 품종이 56%와 53%를 보였고, 청자3호 품종이 33.3%로 가장 낮은 신초형성율을 보였다.

Liu (2010)는 콩의 자엽절 배양시 MS보다 B5 배지에서 신초형성이 높았으나, 본 실험에서는 B5 배지보다 MS 배지를 기본 배지로 사용한 경우가 신초형성이 높게 나타났다. Franklin *et al.*, (2004), Sairam *et al.* (2003)은 콩의 자엽절편 배양에서 MS 배지를 기본으로 사용하는 것이 신초 유도에 효과적이라고 하였다. 그러나 희귀 및 멸종위기 식물인 만년콩 액아의 기내 배양에서 MS 배지보다 WP 배지가 더 양호하다는 보고(송, 2010)도 있어서 품종(genotype)과 조직절편 부위가 달라지면 최적 기본배지가 다를 수 있다는 점을 시사해 준다.

신초형성에 미치는 생장조절제의 영향

생장조절제의 농도가 신초형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 B5 배지보다 신초형성이 양호했던 MS 기본배지에 생장조절제의 종류와 농도를 달리하여 30개 절편을 치상한 뒤 신초의 형성을 조사하였다(Table 3, Table 4). 각 품종 당 30 개의 자엽+배축 조직절편을 BA 0, 1, 2, 4 mg/L를 첨가한 MS 배지에 치상하여 배양 4 주후 신초형성 차이를 관찰하였다. 그 결과(Table 3, Fig. 2), 태광 품종이 전체 처리 구간에서 다른 품종에 비해 높은 신초형성율을 나타내며, 2.0 mg/L BA 처리에서 83%로 가장 높았다. 진품2호 품종과 우람 품종은 비슷하였고, 청자3호 품종이 비교적 낮은 신초형성율을 보였다. 처리 농도별에서는 2.0 mg/L BA 처리에서 태광콩, 우람, 진품2호, 청자3호 품종

Table 2. Shoot formation by MS and B5 media in cotyledon + hypocotyl explants of soybean (*Glycine max* L.) cultivars^z

Variety	Shoot formation ratio (%)	
	MS	B5
Cheongja 3	33.3 (10/30) ^y	30.0 (9/30) ^y
Jinpumkong 2	53.3 (16/30)	33.3 (10/30)
Taekwangkong	83.3 (25/30)	56.6 (17/30)
Uram	56.6 (17/30)	40.0 (12/30)

^zThe explants were cultured on MS and B5 medium supplemented with 2.0 mg/L of BA for 4 weeks.

^y(Number of explants with shoot/number of cultured explant).

Table 3. Effect of BA on multiple shoot induction of cotyledon+hypocotyl explants in soybean (*Glycine max* L.)^z

Variety	C ^y	No. of explant with shoot from 30 cultured explants				No. of shoots per explant ^x			
		0	1	2	4	0	1	2	4
Cheongja		5(16) ^w	8(26) ^w	10(33) ^w	7(23) ^w	1.6 ± 0.55 ^v	2.5 ± 0.76	3.0 ± 0.82	2.7 ± 1.11
Jinpumkong 2		6(20)	15(50)	16(53)	8(26)	1.6 ± 0.52	2.7 ± 0.99	3.2 ± 1.05	2.8 ± 1.16
Taekwangkong		18(60)	21(70)	25(83)	18(60)	1.8 ± 0.55	2.5 ± 0.81	3.5 ± 1.10	2.3 ± 0.69
Uram		9(30)	13(43)	17(56)	13(43)	1.9 ± 0.60	2.5 ± 0.78	2.8 ± 0.95	2.5 ± 0.88

^zThe explants were cultured on MS medium containing 0, 1, 2 and 4 mg/L BA for 4 weeks.

^yC: BA concentration (mg/L). ^xAverage number of shoots per explant. ^wPercentage of shoot formation (%).

^vAll values are the mean ± SD. (n=3).

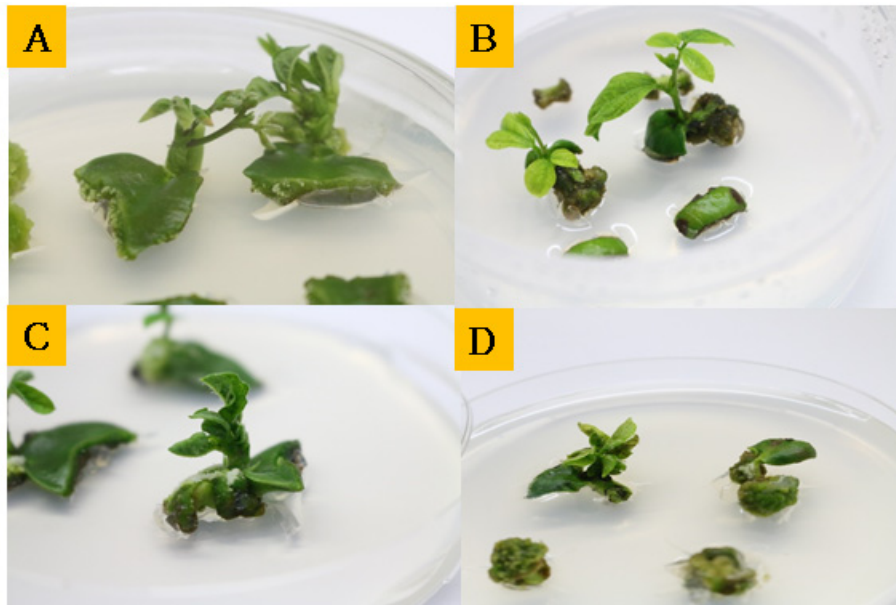


Fig. 2. Shoot formation from cotyledon + hypocotyl explant of Taekwangkong (A), Jinpungkong 2 (C), Cheongja 3 (D) and Uram (E) soybean (*Glycine max* L.) cultivars cultured on MS medium containing 2.0 mg/L BA for 4 weeks.

Table 4. Effect of TDZ on multiple shoot induction of cotyledon+hypocotyl explants in soybean (*Glycine max* L.)^z

Variety	C ^y	No. of explant with shoot from 30 cultured explants				No. of shoots per explant ^x			
		0	1	2	4	0	1	2	4
Cheongja		5(16) ^w	9(30) ^w	12(40) ^w	9(30) ^w	1.6 ± 0.55 ^v	2.2 ± 0.83	2.5 ± 0.67	2.2 ± 1.00
Jinpungkong 2		6(20)	12(40)	14(46)	10(33)	1.3 ± 0.52	2.4 ± 0.67	3.5 ± 0.85	2.2 ± 0.63
Taekwangkong		14(46)	19(63)	19(63)	15(50)	1.5 ± 0.65	2.7 ± 0.95	3.3 ± 1.05	2.5 ± 0.74
Uram		8(26)	11(36)	15(50)	13(43)	1.8 ± 0.46	2.2 ± 0.60	2.8 ± 0.68	2.5 ± 10.66

^zThe explants were cultured on MS medium containing 0, 1, 2 and 4 mg/L TDZ for 4 weeks.

^yC: TDZ concentration (mg/L). ^xAverage number of shoots per explant. ^vPercentpage of shoot formation (%).

^wAll values are the mean ± SD. (n=3).

순으로 각각 83%, 56%, 53%, 33%였다. 4.0 mg/L에서는 60%, 43%, 26%, 23%로 신초형성율이 감소하였다. 품종별 절편 당 평균신초수는 태광콩이 2.0 mg/L BA 처리에서 3.5 개로 가장 많았고, 진품2호, 청자3호, 우람 품종 순으로 평균신초수가 낮게 나타났다. 치상한 절편 당 신초수 역시 2.0 mg/L BA 처리에서 가장 많았으며, 태광콩, 진품2호, 청자3호, 우람 품종 순으로 각각 3.5, 3.2, 3.0, 2.8 개였다. 1.0 mg/L BA 처리와 4.0 mg/L BA 처리에서는 비슷하였다.

Arun *et al.* (2014)은 콩 자엽절 배양시 BA를 첨가했을 때 신초형성에 효과적이라 하였고, 식물의 신초형성에 있어서 BA의 효과는 여러 연구결과(Kwon *et al.*, 2014; Zia *et al.*, 2010; Dan

and Reichert, 1998; Kaneda *et al.*, 1997)에서 보고된 바 있다.

TDZ 농도에 따른 신초형성을 조사하기 위하여 0~4 mg/L의 TDZ를 첨가한 MS 배지에 각 품종 당 30개의 자엽 + 배축 조직절편을 치상하여 배양 4 주후 신초형성 차이를 관찰한 결과(Table 4, Fig. 3), 태광콩이 전체 처리 구간에서 다른 품종에 비해 다소 높게 나타났고, 1.0 mg/L와 2.0 mg/L 처리에서 각각 63%로 가장 높았으며, 4.0 mg/L 처리에서는 50%로 감소하는 경향을 보였다. 청자3호 품종은 우람 품종과 진품2호 품종에 비해 신초형성이 비교적 낮게 나타났다. 처리 농도간 신초형성율을 살펴보면 2.0 mg/L 처리의 경우 태광콩, 우람, 진품2호, 청자3호 품종 순으로 각각 63%, 50%, 46%, 40%의 신초형성율을 나타내었다.

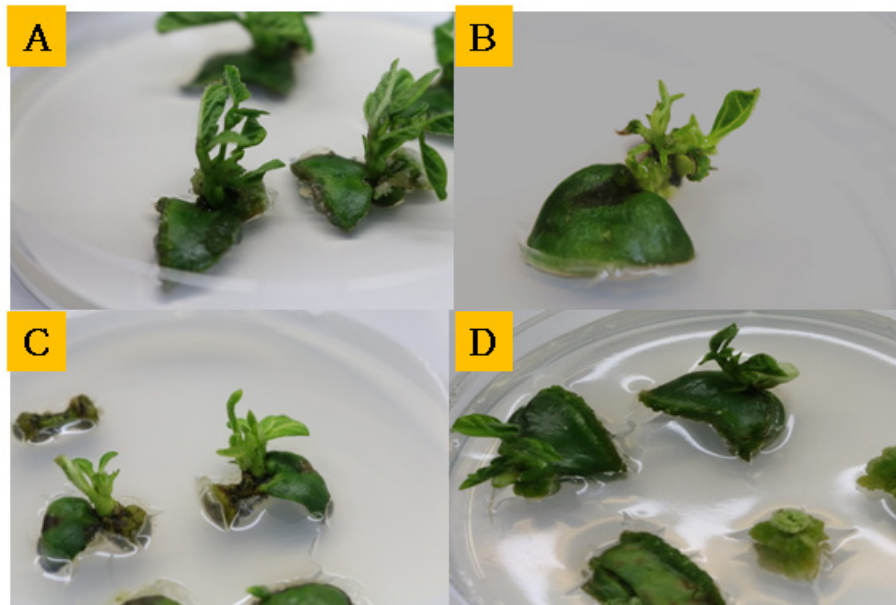


Fig. 3. Shoot formation from cotyledon + hypocotyl explant of Taekwangkong (A), Cheongja 3 (B), Jimpumkong 2 (C) and Uram (D) soybean (*Glycine max L.*) cultivars cultured on MS medium containing 2.0 mg/L TDZ for 4 weeks.

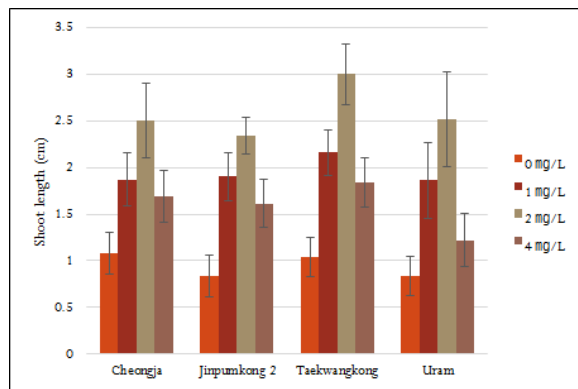


Fig. 4. Effect of BA concentration on shoot length from cotyledon + hypocotyl explants of soybean (*Glycine max L.*) cultivars. The explants were cultured on MS medium containing 0, 1, 2 and 4 mg/L BA for 4 weeks. Each bar represents the mean \pm SD. (n = 3).

4.0 mg/L 처리에서는 각각 50%, 43%, 33%, 30%로 신초형성율이 감소하였다. TDZ 농도에 따른 품종간 평균신초수를 비교한 결과, 1.0 mg/L 처리에서 평균 2.5 개로 모든 품종에서 큰 차이가 없었고, 2.0 mg/L의 경우 진품2호와 태광콩 품종이 약 3.4 개로 높게 나타났고, 우람 품종과 청자3호 품종은 약 2.6 개로 비교적 낮게 나타났다. 고농도(4.0 mg/L) TDZ 처리는 평균 2.3 개로 모든 품종에서 비교적 낮은 신초가 형성되었다.

이상의 결과와 같이 생장조절제 처리에 의한 신초형성율은

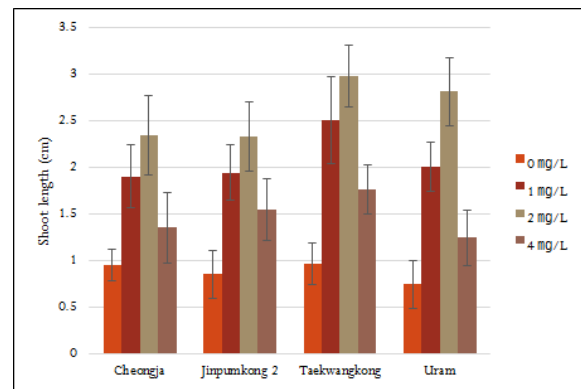


Fig. 5. Effect of TDZ concentration on shoot length from cotyledon + hypocotyl explants of soybean (*Glycine max L.*) cultivars. The explants were cultured on MS medium containing 0, 1, 2 and 4 mg/L TDZ for 4 weeks. Each bar represents the mean \pm SD. (n = 3).

BA 처리가 보다 효과적으로 나타났고, Shan *et al.* (2005)은 콩의 자엽절편 배양에서 TDZ이 신초형성에 효과적임을 보고하였고, 여러 식물체에서 TDZ 처리가 신초형성에 효과적이라는 연구결과들(Yoshida, 2002; Bhagwat *et al.*, 1996; Malik and Saxena, 1992)이 보고되었다.

MS 기본배지에 BA를 0, 1, 2, 4 mg/L 첨가하여 4 주후 신초길이를 조사한 결과(Fig. 4), 태광콩 품종이 전체 처리 구간에서 다른 품종에 비해 신초길이가 길었으며, 2.0 mg/L BA 처리에서

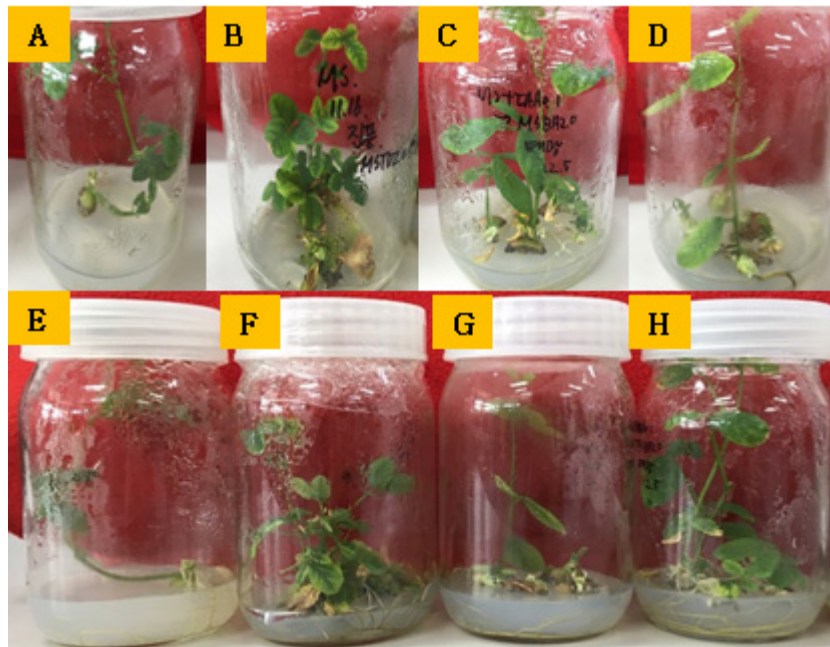


Fig. 6. Regeneration from cotyledon + hypocotyl explants of soybean (*Glycine max* L.) cultivars on MS medium containing 0.1 mg/L IAA for 4 weeks. A and E: Cheongja 3, B and F: Jinpungkong 2, C and G: Taekwangkong, D and H: Uram.

Table 5. Induction of embryogenic callus from different sizes of immature cotyledon in soybean (*Glycine max* L.) cultivars cultured on MSD40 medium for 8 weeks^z

Variety	S ^y	S (1~2mm)				M (3~5mm)				L (6~8mm)			
	I ^x	A ^w	B ^v	C ^u	B/A (%) ^t	A	B	C	B/A (%)	A	B	C	B/A (%)
Cheongja		36	1	2	2.7	96	59	3.6	61.5	36	6	2.6	16.7
Jinpungkong 2		30	0	0	0	377	132	2.5	35	130	12	3	9.2
Taekwangkong		49	3	2.3	6.1	155	102	4.2	65.8	105	12	3.3	11.4
Uram		25	0	0	0	211	82	3.9	38.9	101	3	2.3	2.9

^zMSD40 medium: MS+2,4-D 20 mg/L, 3% sucrose, pH 5.8.

^yS: size, ^xI: 18 item, ^wA: Number of explant, ^vB: Number of explant with callus, ^uC: Average callus number per explant with callus, ^tB/A(%): Callus formation (%).

3 cm로 가장 길었다. 우람 품종과 청자3호 품종에 비해 진품2호 품종이 신초길이는 짧게 나타났다. 처리 농도별로는 2.0 mg/L BA 처리에서 태광콩, 우람, 청자3호, 진품2호 품종 순으로 각각 3.0 cm, 2.6 cm, 2.5 cm, 2.3 cm였고, 4.0 mg/L에서는 4 품종 모두에서 각각 1.9 cm, 1.3 cm, 1.7 cm, 1.6 cm로 신초길이가 짧아졌다. MS 기본배지에 TDZ을 0, 1, 2, 4 mg/L 첨가하여 4 주후 신초길이를 조사한 결과(Fig. 5), 품종별 비교에서는 태광콩 품종이 2.0 mg/L TDZ 처리에서 2.9 cm로 가장 길었다. 우람 품종이 청자3호 품종과 진품2호 품종에 비해 신초 길이가 길게 나타났다. 처리 농도별로는 2.0 mg/L TDZ 처리에서 태광콩, 우람, 청자3호,

진품2호 품종 순으로 각각 2.9 cm, 2.7 cm, 2.3 cm, 2.3 cm였고, 4.0 mg/L에서는 4 품종 모두에서 각각 1.7 cm, 1.3 cm, 1.4 cm, 1.5 cm로 신초길이가 짧아졌다. 신초가 유도된 조직절편을 치상 4 주후 MS 기본배지에 3% sucrose와 IAA 0.1 mg/L을 첨가한 배지로 계대 배양하여 발근을 유도하였다(Fig. 6).

체세포배발생을 통한 식물체 재생

미성숙 자엽 절편을 1~2 mm (S), 3~5 mm (M), 6~8 mm (L)의 3 가지 크기별로 치상하여 크기에 따른 체세포 배발생형 캘러스 (embryogenic callus) 형성을 검토한 결과(Table 5), 배양 후 2

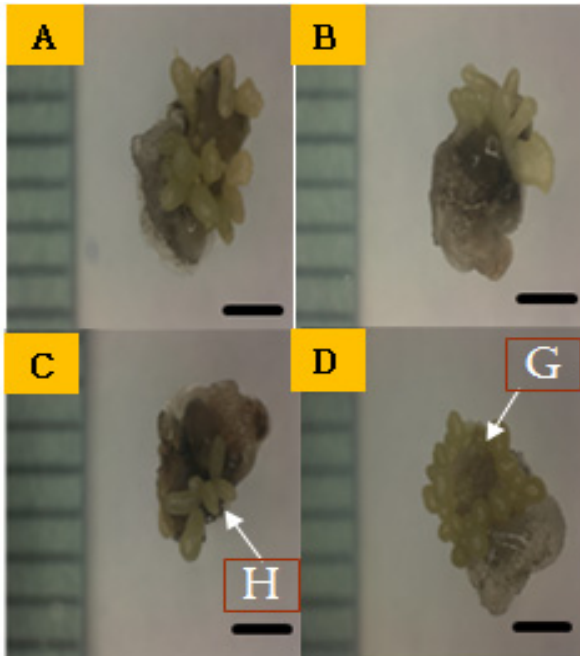


Fig. 7. The morphological characteristics of embryogenic callus induced from immature cotyledon segment of Cheongja 3 (A), Jinpungkong 2 (B), Taekwangkong (C) and Uram (D) soybean (*Glycine max* L.) cultivars (from left to right) in 8 weeks culture. G; globular stage, H; heart stage. Bars: 1 mm.

주경부터 조직이 갈변하다가 배양 3 주째부터 치상절편의 가장 자리와 항배측면(flat side) 위에서 캘러스 원기가 관찰되었다. 8 주째 전체 품종에서 3~5 mm 중간 크기에서 체세포 배발생형 캘러스 형성이 가장 높게 나타났다. 1~2 mm에서는 캘러스 형성이 낮았고, 6~8 mm에서는 주로 비배발생형 캘러스(non-embrogenic callus)가 형성되었다. 품종 간 비교에서는 태광, 청자3호, 우람, 진품2호 품종 순으로 각각 65.8%, 61.5%, 38.9%, 35%였고, 모든 품종에서 중간 크기의 자엽에서 가장 높았다. 1~2 mm 이하는 태광콩 품종이 가장 양호하였고, 진품2호와 우람 품종에서는 전혀 캘러스가 유도되지 않았다. 6~8 mm에서는 청자3호, 태광콩, 진품2호, 우람 품종 순으로 각각 16.7%, 11.4%, 9.2%, 2.9%를 나타냈고, 6~8 mm에서는 체세포 배발생형 캘러스가 아닌 비배발생형 캘러스가 형성되었다(자료 미제시). 태광콩, 우람, 청자3호, 진품2호 품종 순으로 각각 4.2, 3.9, 3.6, 2.5 개로 절편 당 발생한 캘러스 수가 많았다. 치상한 미성숙 자엽절편 조직으로부터 각 품종에서 유도된 구형단계(globular stage)와 심장형단계(heart stage) 체세포 배발생형 캘러스 형성을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 또한 자엽형 단계(cotyledonary stage)를 확인할 수 있었다(Fig. 8).

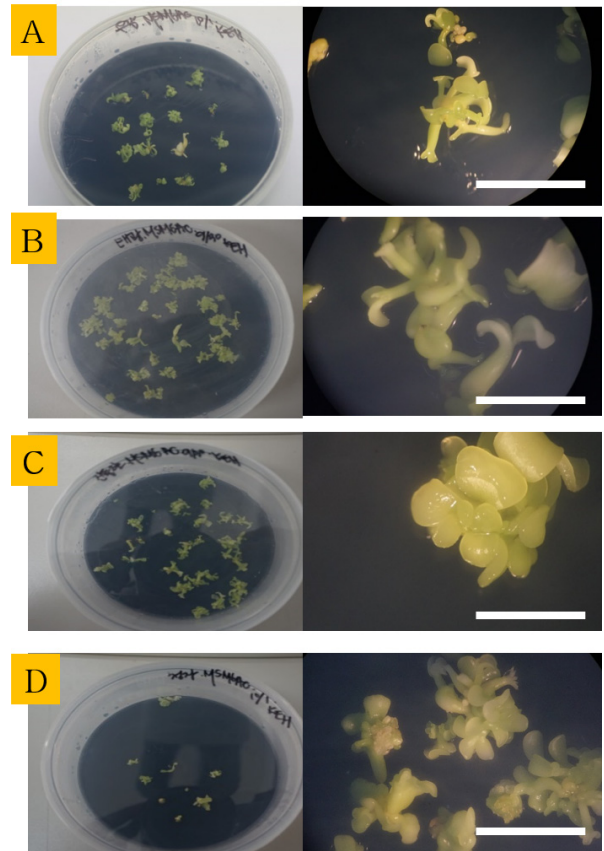


Fig. 8. Morphology of somatic embryos with cotyledonary stage from immature cotyledon segment of soybean cultured on MSM6+AC medium for 12 weeks.

²MSM6 + AC medium: MS + 6% maltose, 3% sucrose, 0.5% active carbon, pH 5.8. A: Uram, B: Taekwangkong, C: Jinpungkong 2, D: Cheongja 3. Bars: 1 cm.

위와 같은 결과는 미성숙 자엽이 체세포배발생형 캘러스 형성에 효과적이라는 보고(Hofmann *et al.*, 2004; Santarém *et al.*, 1997; Finer and Nagasawa, 1988)와 미숙자엽의 크기가 5 mm 정도에서 배발생형 캘러스 형성이 양호했다는 보고(Yang *et al.*, 2009; Ko and Korban, 2004)와 일치하였다. 또한 콩 품종의 미숙자엽 배양 시 고농도(10~40 mg/L)의 2,4-D를 포함한 MS 배지가 효과적이라는 보고(Hofmann *et al.*, 2004; Ko and Korban, 2004; Rajasekaran and Pellow, 1997)와 유사한 결과를 국내 장려품종에서도 확인할 수 있었다.

적 요

국내 콩 품종의 기내 재생 효율을 개선하고자 국내 장려품종인 우람, 진품2호, 청자3호, 태광콩 품종의 기관형성 및 자엽 크

기별 체세포배발생을 검토하였다. 식물체 조직절편 부위별 (자엽, 배축, 자엽+배축 절편) 신초 형성율을 조사한 결과, 자엽과 배축을 포함한 절편(자엽 + 배축)이 절편 당 분화된 신초수가 가장 많았다. 반면에 자엽 절편과 배축 절편에서는 신초가 형성되지 않았다. 배지 종류별로는 B5 배지보다 MS 배지에서 신초형성이 양호했으며, BA 2 mg/L 처리구가 TDZ 2 mg/L을 첨가한 배지보다 신초 형성율이 높았다. 공시한 4 가지 품종 중 태광콩이 BA 2 mg/L를 포함한 MS배지에서 신초형성율이 83.3%로 가장 높았다. 또한 체세포 배발생을 통한 캘러스 유도율을 조사하기 위하여 미성숙 자엽을 크기(S: 1~2 mm, M: 3~5 mm, L: 6~8 mm) 별로 구분하여 배양한 결과, 4 가지 품종 모두 중간 크기(M, 3~5 mm)에서 가장 높았으며, 태광콩이 65.8%로 가장 높은 캘러스 유도율을 보였다.

사 사

이 논문은 2012년도 순천대학교 대학자체 장기해외과제 연구 지원에 의해 이루어진 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다. 아울러 석사학위 청구논문의 일부로 사용되었습니다.

References

Arun, M., K. Subramanyam, J. Thebora, A. Ganapathi and M. Manickavasagam. 2014. Optimized shoot regeneration for Indian soybean: the influence of exogenous polyamines. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 117:305-309.

Bailey, M.A., H.R. Boerma and W.A. Parrott. 1993. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *Cell Dev. Biol. Plant* 29:102-108.

Bean, S.J., P.S. Gooding, P.M. Mullineaux and D.R. Davies. 1997. A simple system for pea transformation. *Plant Cell Rep.* 16:513-519.

Bhagwat, B., L.G.E. Vieira and L.R. Ericson. 1996. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46:1-7.

Dan, Y. and N.A. Reichert. 1998. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 34:14-21.

Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue. Organ Cult.* 15:125-136.

Franklin, G., L. Carpenter, E. Davis, C.S. Reddy, D. Al-Abed, W.A. Alaiwi, M. Parani, B. Smith, S.L. Goldman and R.V. Sairam. 2004. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. *Plant Growth Regul.* 43:73-79.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.

Hiraga, S., H. Minakawa, K. Takahashi, R. Takahashi, M. Hajika, K. Harad and N. Ohtsubo. 2007. Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnol.* 24:435-440.

Hofmann, N., L.N. Randall and S.S. Korban. 2004. Influence of media components and pH on somatic embryogenesis induction in three genotypes soybean. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 77:157-163.

Joyner, E.Y., L.S. Boykin and M.A. Lodhi. 2010. Callus induction and organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. pyramid from mature cotyledons and embryos. *The Open Plant Sci. J.* 4:18-21.

Kaneda, Y., Y. Tabei, S. Nishimura, K. Harada, T. Akihama and K. Kitamura. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 17:8-12.

Kim, D-g. 2016. Regeneration ability of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars by *in vitro* tissue culture. Department of Life Resources, M.S. Thesis, Suncheon National Univ., Korea. pp. 1-40 (in Korean).

Kim, K.H., H.K. Park, M.S. Park and U.D. Yeo. 2001. Effects of auxins and cytokinins on organogenesis of soybean *Glycine max* L. *J. Plant Biol.* 3:95-100.

Kim, M.-J. and K.-S. Kim. 2005. Functional and chemical composition of *Hwanggumkong*, *Yakong* and *Huktae*. *Korean J. Food Cookery Sci.* 6:844-850 (in Korean).

Kim, Y.H., H.M. Park, M.S. Choi, S.I. Sohn, D.B. Shin and J.Y. Lee. 2008. Efficient transformation method of soybean using meristemic tissues of germinating seeds. *Korean J. Breed. Sci.* 40(3):278-285 (in Korean).

Kita, Y., K. Nishizawa, M. Takahashi, M. Kitayama and M. Ishimoto. 2007. Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Rep.* 26:439-447.

Klink, V.P., M.H. MacDonald, V.E. Martins, S.C. Park, K.H. Kim, S.H. Baek and B.F. Matthews. 2008. A new diminutive

- Glycine max* genotype with a rapid life cycle, embryogenic potential and transformation capabilities. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92:183-195.
- Ko, T.S. and S.S. Korban. 2004. Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 40:552-558.
- Komatsuda, T. and K. Ohyama. 1988. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75:695-700.
- Kwon, S.J., K.Y. Cho and H.H. Kim. 2014. Medium composition and growth regulator on organogenesis *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. D.C with yellow green petals. *Korean J. Plant Res.* 27(1):43-50 (in Korean).
- Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins. 1987. Soybean somatic embryogenesis effect of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:209-220.
- Lim, H.S., T.S. Ko, K.N. Lambert, H.G. Kim, S.S. Korban, G.L. Hartman and L.L. Domier. 2005. Soybean mosaic virus helper component-protease enhances somatic embryo production and stabilizes transgene expression in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 43:1014-1021.
- Liu, Q.Q., G. Chen, J.Y. Gai, Y.L. Zhu, L.F. Yang, G.P. Wei and C. Wang. 2010. Highly efficient shoot regeneration from cotyledonary nodes of vegetable soybean. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:307-313.
- Ma, X.-H. and T.-L. Wu. 2008. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiol. Plant* 30:209-216.
- Malik, K.A. and P.K. Saxena. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. High frequency induction of direct shoot formation in intact seedling by benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta* 186:384-389.
- Mante, S., R. Scorza and J. Cordts. 1989. A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv. Bragg. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:385-388.
- Marele, D. 2013. Influence of kinetin on organogenesis of soybean *in vitro*. *Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentara* 9:163-166.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Rajasekaran, K. and J.W. Pellow. 1997. Somatic embryogenesis from cultured epicotyls and primary leaves of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33:88-91.
- Sairam, R.V., G. Franklin, R. Hassel, B. Smith, K. Meeker, N. Kashikar, M. Parani, D. Al. Abed, S. Ismail, K. Berry and S.L. Goldman. 2003. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 75:79-85.
- Saka, H., T.H. Voqui-Dinh and T-Y Cheng. 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. *Plant Sci. Lett.* 19:193-201.
- Santarém, E.R., B. Pelissier and J.J. Finer. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryo. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33:13-19.
- Sellars, R.M., G.M. Southward and G.C. Phillips. 1990. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. *Crop Sci.* 30:408-414.
- Shan, Z, K. Raemakers, E.N. Tzitzikas, Z. Ma and R.G.H. Visser. 2005. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Plant Cell Rep.* 24:507-512.
- Verma, K., A. Rani and R. Saini. 2011. An efficient plant regeneration system from half seed explants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using thidiazuron. *Soybean Res.* 8:12-23.
- White, D.W.R. and C. Voisey. 1994. Prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover. *Plant Cell Rep.* 13:303-308.
- Wright, M.S., M.H. Williams, P.E. Pierson and M.G. Carns. 1987. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr. plants from tissue-cultured epicotyls. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 8:83-90.
- Yang, C., T. Zhao, D. Yu and J. Gai. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) - impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 45:180-188.
- Yoshida, T. 2002. Adventitious shoot formation from hypocotyl sections of mature soybean seeds. *Breed. Sci.* 52:1-8.
- Zia, M., Z.F. Rizvi, R-U. Rehman and M.F. Chaudhary. 2010. Short communication micropropagation of two Pakistani soybean (*Glycine max* L.) cultivars from cotyledonary nodes. *Spanish Journal of Agricultural Res.* 8:448-453.
- 김종홍, 배창휴. 1992. 대두자엽조직의 분화에 미치는 2,4-D와 BA의 영향. *순천대학 기초과학연구.* 3:47-57.

송순영. 2010. 희귀 및 멸종위기 식물 만년콩 (*Euchresta japonica* Benth.)의 종자 발아 및 기내증식에 관한 연구. 제주대학교 석사학위논문.

하건수, 한태정. 2002. 대두 품종에 따른 자엽절에서의 다신초 형성. *Plant Biotechnology*. 29:51-57.

(Received 4 February 2016 ; Revised 17 February 2016 ; Accepted 19 February 2016)