

## 다양한 콩 자원들의 기내 조직배양 효율 및 형질전환

서미숙<sup>1†\*</sup>, 조철오<sup>2†</sup>, 정남희<sup>3</sup>, 성순기<sup>4</sup>, 최만수<sup>1</sup>, 진민아<sup>5</sup>, 김들이<sup>1</sup>

<sup>1</sup>국립식량과학원 작물기초기반과, 연구사, <sup>2</sup>박사후연구원, <sup>5</sup>연구관, <sup>3</sup>국립원예특작과학원 과수과, 연구사,  
<sup>4</sup>(주)팜한농, 종자·식량종자개발팀, 팀장

### *In Vitro* Tissue Culture Frequency and Transformation of Various Cultivars of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)

Mi-Suk Seo<sup>1†\*</sup>, Chuloh Cho<sup>2†</sup>, Namhee Jeong<sup>3</sup>, Soon-Kee Sung<sup>4</sup>, Man-Soo Choi<sup>1</sup>,  
Mina Jin<sup>5</sup> and Dool-Yi Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Researcher, <sup>2</sup>Post-doc and <sup>5</sup>Senior Researcher, Crop Foundation Research Division, National Institute of Crop Science, Wanju 55365, Korea

<sup>3</sup>Researcher, Fruit Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

<sup>4</sup>Team Leader, Crop Seed R&D Team, Farmhannong Co., Ltd., Daejeon 34115, Korea

**Abstract** - Efficient *in vitro* regeneration system is essential for the successful crop breeding of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) using the new biotechnology. The genotype of donor plants strongly influences the establishment of tissue culture system. Therefore, the screening of genotypes with excellent tissue culture ability is very important for soybean genetic improvement. In this study, we report the tissue culture efficiency of 21 soybean cultivars belong to Korean soybean core-collection and two foreign cultivars (Jack and Maverick). The Kwangan, Anpyeong and Seonam are share close genetic relationship in 21 cultivars and these three cultivars were observed the high frequency of germination and regeneration. Furthermore, the high tissue culture abilities were also observed in the Williams 82 used in reference genome sequencing and the two foreign cultivars. The transformation of pBATc:tRNA with *bar* gene was performed by *Agrobacterium tumefaciens* in the cultivars with high tissue culture ability. Transformation of the *bar* gene was identified by PCR analysis in Kwangan, Pungwon, Seonam, and Maverick. Our results provide useful information for the breeding of various soybean cultivars by plant biotechnology such as, genome editing.

**Key words** - *bar* gene, Cultivar, Soybean, Tissue culture, Transformation

## 서 언

콩(*Glycine max* (L.) Merr.)은 고단백 유지 작물로 경제적 가치가 높고, 식용 외에 사료용, 녹비용 등 다양한 용도로 재배가 이루어지고 있다(Singh and Hymowitz, 1999; Vagadia *et al.*, 2017). 주요 식량 작물인 콩의 농업적 가치를 향상시키고, 생산성을 증대시키기 위해 전통 육종 및 생명공학 기법을 이용한 품종 개량 연구가 활발하게 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2020). 최근에는 콩의 표준 유전체 정보를 활용하여 농업

적으로 유용한 형질에 관련된 유전자 및 분자 표지를 개발하기 위한 연구(Chun *et al.*, 2019)가 진행 중이며, 국내에서는 유전체 정보를 기반으로 유전적, 그리고 표현형적으로 다양성을 가진 콩 핵심집단 약 430개 자원들이 선별되어, 핵심집단을 이용한 콩의 유전 및 육종 연구에 활용이 기대되고 있다(Jeong *et al.*, 2019).

유전체 정보를 바탕으로 대량 분자 표지 및 유용 유전자 발굴이 본격화되면서 새로운 유전자의 기능을 규명하고, 이를 작물에 도입하여 유용 형질을 가진 품종으로 개발하기 위한 형질전환 기술 개발 연구가 이루어지고 있다(Blanca *et al.*, 2012). 최근에는 CRISPR/Cas9과 같은 유전자 가위 기술을 이용하여 목

\*교신저자: E-mail sms1030@korea.kr

Tel. +82-63-238-5326

† These authors contributed equally to this work.

적 유전자를 직접적으로 교정하여 새로운 형질을 가진 작물을 개발하는 연구가 다양한 식물에서 시도되고 있다(Jaganathan *et al.*, 2018). 유전자 교정 기술을 포함한 식물 생명공학 기술의 적용을 위해서는 형질전환을 위한 효율적인 조직배양 기술의 확립이 선행되어야 하지만, 옥수수, 밀, 보리 등과 같이 농업적으로 중요한 작물들의 조직배양 효율은 낮고, 일부 품종에 한정되어 조직배양이 이루어지고 있다(Yang *et al.*, 2011). 콩은 조직배양이 어려운 식물로 알려져 있는데, 미성숙 자엽에서 유도된 체세포 배를 이용하여 Jack을 비롯한 일부 품종에서 particle bombardment를 사용한 형질전환이 주로 이루어지고 있다(Dufourmantel *et al.*, 2005; Kita *et al.*, 2007). Particle bombardment법은 물리적 방법에 의해 목적 유전자를 도입하기 때문에 형질전환이 비교적 용이하지만, 미세 입자로 목적 유전자를 코팅하기 위한 유지 비용 및 고가 장비의 구입 등 고비용이 소요되고, 도입된 유전자의 불안정적 발현 및 다중 도입(multiple copy numbers)의 문제점을 가지고 있다. 반면에, *Agrobacterium*법은 저비용으로 목적 유전자의 안정적인 도입이 가능하다는 장점을 가지고 있기 때문에 많은 식물에서 기술의 확보를 위한 연구가 이루어지고 있다(Li *et al.*, 2017). 최근, 콩에서는 자엽절(cotyledonary node) 조직을 사용하여 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환 연구가 진행되고 있으며, 표준 유전체 해독이 이루어진 Williams 82 품종에서는 제초제 저항성(Zeng *et al.*, 2004), zein 단백질 축적 유전자(Kim and Krishnan, 2004)의 형질전환 연구가 보고되었고, Jack 품종에서는  $\alpha$ -linolenic acids 생합성에 관여하는 *GmFAD3* 유전자의 형질전환이 보고된 바 있다(Flores *et al.*, 2008). 그러나, *Agrobacterium*법은 T-DNA의 식물 세포내 도입을 위한 조건 탐색 및 도입된 세포의 재분화를 위한 효율적인 조직배양 기술의 어려움 때문에 아직까지 일부 식물이나 품종에 한정되어 연구가 진행되고 있다(Seo *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2019). 콩에서도 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 연구가 진행되고 있으나 국내에서는 아직까지 콩의 형질전환 효율은 낮고 형질전환 가능한 품종이 제한적이다(Jeon and Chung, 2003; Kim *et al.*, 2017). 따라서, 형질전환 가능한 콩 품종을 확대하고 효율적인 형질전환 기술을 개발하는 연구는 콩의 안정적 생산 및 경제적 가치 향상을 위한 새로운 육종 소재 개발 연구를 위해 매우 중요하다. 식물의 유전형(genotype)은 조직배양 효율 및 형질전환의 성공 여부를 결정짓는 중요한 요소로 알려져 있다(Ono *et al.*, 1994). 최근, 국내에서는 우람, 진품2호, 청자3호, 태광 품종을 사용하여 조직 부위 및 배지 종류에 따른 재분화 효율을 검토(Kim *et*

*al.*, 2016)한 바 있으며, Kim *et al.* (2008)은 익산나물콩의 발아된 종자의 분열조직을 재료로 사용하여 *Agrobacterium*법에 의한 안정적인 형질전환을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환에 적합한 콩 품종을 확대하기 위하여, 콩 핵심집단에서 선발한 자원들의 재분화효율을 검토하고, 선발된 자원을 대상으로 유전자 교정용 CRISPR/Cas9 벡터를 사용하여 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환을 수행하였다. 이들 결과는 향후 콩 유전자 교정을 통한 육종 소재 개발에 활용이 가능할 것이다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 연구를 위하여 콩 핵심집단(Jeong *et al.*, 2019)에 속하는 21개 자원들을 선발하여 실험에 사용하였다. 또한, LG팜한농에서 보유한 미국 품종 Jack, Maverick을 제공받아 총 23개 자원들을 사용하여 콩 조직배양 효율을 검토하였다. 핵심집단에 속하는 21개 자원들에 대한 phylogenetic tree는 고밀도 180K SNP chip 데이터(Jeong *et al.*, 2019)를 이용하여 MEGA6 software를 통해 분석되었다.

### 23개 자원들의 조직배양 효율 검증

총 23개 자원들의 조직배양 효율을 검증하기 위하여 각 자원별로 종자를 표면 소독하여 배지에 치상하였다. 종자는 70% ethanol로 1분간 표면 살균한 후, 2% sodium hypochlorite 용액에서 20분간 소독하였다. 소독이 끝난 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 후 실온에서 16시간 정도 침지하였다. 침지가 끝난 종자의 물기를 제거한 후, 종피를 제거하고 종자를 반으로 자른 후 3% sucrose, 0.8% agarose를 포함하는 MS 기본 배지에 치상하여 2주간 배양한 후 종자의 발아율을 조사하였다. 발아된 종자는 배축(embryonic axis)을 제거한 후, 2 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine), 3% phytoigel을 포함한 MS 배지에 치상하여 배양 4주 후 자엽절 조직으로부터 재분화된 3 mm 이상의 유식물체를 재분화 개체로 판단하여 재분화 효율을 조사하였다.

### 제초제 저항성 유전자의 형질전환

콩 형질전환은 Li *et al.* (2017)의 방법을 이용하여 수행되었다. 형질전환을 위해 사용된 벡터는 제초제 저항성(*bar*) 유전자가 선발 마커로 삽입된 유전자 교정용 pBAtc:tRNAO2 벡터로 한국생명공학연구원으로부터 분양받아 사용하였다. 벡터는 *A.*

*tumefaciens* GV3101에 형질전환하여, YEP 배지(25 g/L YEP broth, 15 g/L bacto agar, 50 mg/L spectinomycin, 100 mg/L gentamycin, 50 mg/L rifampicin)에서 배양한 후, 형질전환된 콜로니를 채취하여 액체 YEP 배지에서 28°C, 50 rpm 진탕 배양기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 증식된 *Agrobacterium*은 10 분간 5000 rpm으로 원심하여 침전된 세포를 모은 후 aceto-syringone 40 mg/L가 첨가된 액체 감염 배지(OCCM; 3.9 g/L MES, 30 g/L sucrose, 1 mM sodium thiosulfate, 1 mM dithiothreitol, 3.3 mM L-cystein, 0.25 mg/L GA<sub>3</sub>, 1.67 mg/L benzylamino-purine이 첨가된 B5 기본 배지, pH 5.4)에 OD<sub>650</sub>=0.6 ~ 0.7 농도로 재현탁하였다. *Agrobacterium*법에 의한 형질전환을 위해 상기의 조직배양 효율 검토를 통해 선발된 품종들을 대상으로 pBAtc:tRNAO2 유전자 형질전환을 수행하였다. 형질전환을 위해 종자는 70% ethanol로 1분간 표면 살균한 후, 2% sodium hypochlorite 용액에서 20분간 소독하였다. 소독이 끝난 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 후 실온에서 16시간 정도 침지한 후 여과지 위에서 종피를 제거하였다. 종피를 제거한 종자는 배축을 중심으로 절반으로 절단한 후 *Agrobacterium* 현탁액에 30 분간 접종하였다. 접종이 끝난 종자는 8 g/L plant agar가 첨가된 고체 감염 배지(CCM)에 치상하여 16/8h 명조건, 25°C에서 3 일간 공동배양하였다. 접종이 끝난 종자는 뿌리 부분을 제거한 후, SIM 신초 유도 배지(0.58 g/L MES, 30 g/L sucrose, 1 mM sodium thiosulfate, 1 mM dithiothreitol, 3.3 mM L-cystein, 1.67 mg/L benzylaminopurine, 250 mg/L cefotaxime, 100 mg/L ticarcillin이 첨가된 B5 기본 배지, pH 5.6)에 치상하여 16/8 h 명조건, 25°C에서 10일간 배양하였다. 발아가 관찰될 절편체는 배축 부분을 제거한 후, 5 mg/L glufosinate를 첨가한 SIM 신초 유도 배지에 이식하여 25°C 배양실(16/8h 광조건)에서 glufosinate 저항성 신초를 유도하였다. 절편체로부터 1 cm 이상 재분화된 신초는 0.58 g/L MES, 30g/L sucrose, 1 mM sodium thiosulfate, 1 mM dithiothreitol, 50 mg/L asparagine, 100 mg/L pyroglutamic acid, 3.5 g/L phytigel, 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>, 0.1 mg/L IAA (indoleacetic acid), 1 mg/L zeatin-riboside, 250 mg/L cefotaxime, 100 mg/L ticarcillin, 5 mg/L glufosinate가 첨가된 MS 재분화(SEM) 배지에 치상하여, 2주 간격으로 계대배양을 수행하였다. 신장된 신초는 30 g/L sucrose, 8 g/L plant agar, 1 mg/L IBA(indole-butyrac acid), 250 mg/L cefotaxime, 100 mg/L ticarcillin, 5 mg/L glufosinate가 첨가된 B5 발근 유도 배지에 치상하여 뿌리를 유도하였다. 뿌리가 유도되어 완전한 glufosinate 저항성을 보이는 유식물체는 순화 과정을 거쳐 화

분에 이식한 후 온실에 옮겨 정상적인 식물체로 유도하였다.

### 삽입 유전자의 확인

Glufosinate 저항성 유식물체의 잎에서 Bar-strip과 PCR 분석을 통해 유전자의 삽입을 확인하였다. Bar-strip 분석은 비형질전환 식물체와 형질전환 유식물체의 잎 0.1 g을 분쇄하여 멸균수 0.5 mL를 첨가한 후 LibertyLink® strip을 용액에 넣어 밴드의 유무를 확인하였다. PCR 분석을 위해서는 형질전환체의 잎 0.1g을 분쇄한 후, Quiagen plant mini kit를 사용하여 gDNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 *bar* 유전자 특이적 프라이머 (*barF* ATGAGCCCAGAACGACGC, *barR* TTCTGGCAGCTGGA CTTCAG)를 사용하여 PCR분석을 수행하였다. PCR은 denature: 94°C 5 min, annealing: 94°C, 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec, 30 cycles, elongation: 72°C, 5 min으로 수행되었고, 0.8% agarose gel 전기영동을 통해 *bar* 유전자의 삽입 여부를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 23개 자원들의 발아율 분석

콩 형질전환 적합 자원 선발을 위해 우선 핵심집단 내 21개 자원들과 미국 품종인 Jack, Maverick의 발아율을 조사하였다 (Fig. 1). 발아 종자의 자엽절(cotyledonary node) 조직을 통한 재분화 효율 검증을 위해 half-seed로부터 발아 효율을 조사한 결과, 자원에 따라 발아 시기에는 차이가 있으나 약 2주 후 모든 자원들에서 발아가 확인되었고, 16개 자원들에서는 평균 50% 이상의 발아율이 관찰되었다. 반면에 장류용 콩에 속하는 Dae-pung, Daewon, Taekwang, Yugwu16, 그리고 Cheongja3에서는 40% 이하의 낮은 발아율을 보였다. 일반적으로 종자의 발아율은 여러가지 요인에 의하여 영향을 받는데 특히 종자의 보관 상태 및 발아 기간 동안의 온도, 수분 등과 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2005). 최근 콩의 침종처리에 따른 발아율을 조사한 결과, 전기전도율과 총 용존 고형물(Total Dissolved Solid (TDS))이 낮고, 종자의 수분 흡수가 낮은 품종들에서 높은 발아율이 관찰되었는데 종자의 크기가 작은 나물용 품종들이 장류용 및 밥밀용 품종들과 비교하여 전기전도율과 TDS, 수분흡수가 낮아 상대적으로 발아율이 높게 관찰되었다(Cho *et al.*, 2015). 이와 함께, 21개 자원들의 유전적 근연관계에 따른 조직배양 효율 분석을 위하여 한국 콩 핵심집단의 고밀도 180K SNP chip 데이터를 사용하여 21개

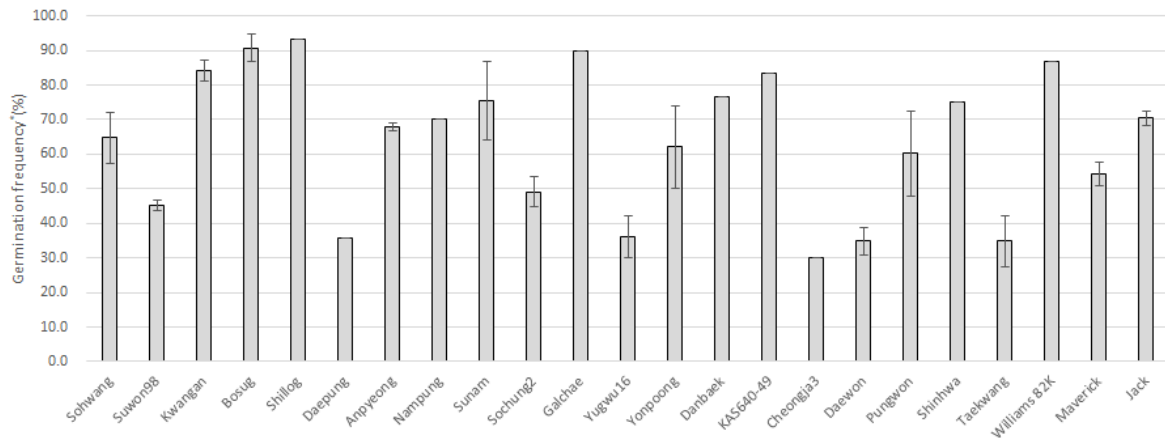


Fig. 1. Germination frequency from half-seed of total 23 soybean cultivars. Embryonic axis was counted at 10 days after culture. Bars represent the mean with standard deviation for three independent experiments. Some cultivars could not confirm the results from replicated data by seed contamination.

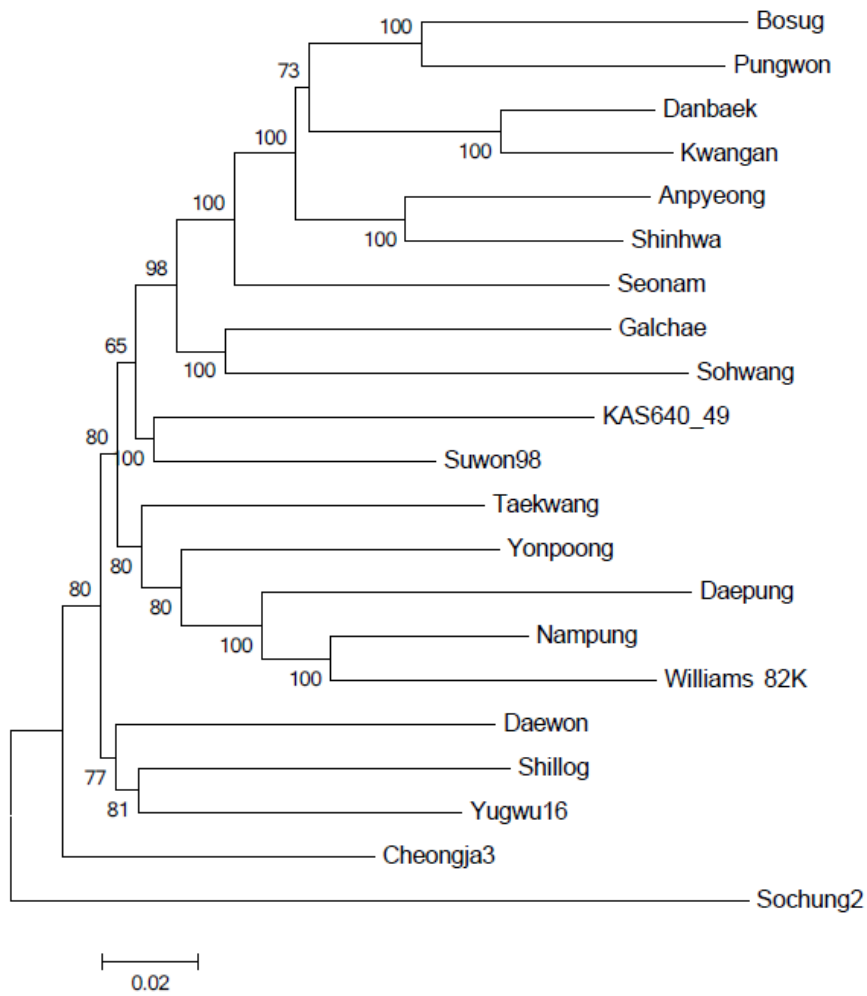


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the 21 cultivars belong to Korean soybean core collection. This tree was constructed using MEGA, version 6, software. Bootstrap values with 500 replicates are denoted as percentages.

자원들의 phylogenetic tree 분석을 수행하였다(Fig. 2). 나물용콩으로 개발된 Anpyeong, Kwangan, Shinhwa, Seonam 콩은 유전적 근연 관계가 매우 높게 나타났으며, 표준유전체 해독 품종인 Williams 82는 Nampung 및 Daepung과 같은 장류용콩과 유전적으로 높은 근연 관계를 보였다. 본 실험에서는, 유전적 근연관계가 매우 높은 Kwangan, Anpyeong, Seonam 콩에서 높은 발아율을 보인 반면에, 이들 자원들과 근연관계가 낮고, 장류용콩에 속하는 Daewon, Daepung 콩에서는 낮은 발아율이 관찰되었다. 반면에, Daepung 콩과 같은 장류용콩과 유전적 근연관계가 높지만, 소립콩에 속하는 Williams 82의 경우, 높은 발아율을 보였다. 따라서 종자의 크기 및 유전적 요인이 콩 종자의 발아율에 미치는 영향에 대한 명확한 분석을 위하여 광범위한 유전적 분석 및 형질 조사가 필요할 것으로 사료된다.

### 발아된 자원들의 재분화 효율 분석

발아가 확인된 종자는 배축을 제거한 후, 자엽절 조직을 재분화 배지에 4주간 배양하였다. 재분화 과정에서 종자 오염 등의 문제로 재분화 효율 검증이 어려운 자원을 제외한 총 14개 자원들의 재분화율을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 우리나라 재래종으로 알려진 KAS640-49은 86.4%의 가장 높은 재분화 효율이 관찰된 반면, Yonpoong은 평균 17.6%로 가장 낮은 재분화 효율을 보였다. 또한, Anpyeong, Seonam, Kwangan과 같은 나물용 품종들의 경우, Daewon, Taekwang과 같은 장류용 대립종 품종들과 비교하여 높은 재분화 효율을 보였다. 표준 유전체 해독 재료로 사용된 Williams 82의 재분화율은 약 53%를 보였고, 미국 품종인 Jack은 평균 76.3%의 높은 재분화 효율을 보였다.

다. KAS640-49, Kwangan, Jack 등의 품종들은 종자 발아율과 재분화 효율 모두 높은 자원으로 확인되어 향후, 생명공학 기술을 위한 재료로써 사용이 가능할 것으로 사료된다. 식물의 재분화 효율은 배양 배지 및 절편체 종류, 그리고 유전형에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Ge *et al.*, 2006). 특히 유전형은 식물의 재분화 및 형질전환 효율에 영향을 미치는 중요한 요인으로, 조직배양 효율이 높은 자원을 선발하여 생명공학 기술을 적용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Zhang *et al.*, 1998). 본 실험에서는 Fig. 2와 같이 유전적 근연관계가 높은 Kwangan, Anpyeong, Seonam 그룹에서는 대체적으로 높은 발아율과 재분화율이 관찰된 반면에, 이들 그룹과 유전적 근연 관계가 낮은 Daewon, Yugwu16은 낮은 조직배양 효율을 보였다. 따라서, 콩의 핵심집단 내 자원별 조직배양 효율이 유전형과 밀접한 상관 관계를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 콩의 조직으로부터 식물체 재분화에 관한 연구는 최근까지도 활발하게 이루어지고 있다(Karthik *et al.*, 2019; Raza *et al.*, 2017). 특히, 콩의 절편체 종류에 따른 재분화 연구가 진행되었는데, 최근에는 주로 자엽절을 이용한 효율적인 재분화와 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환 연구가 보고되고 있다(Li *et al.*, 2017; Paz *et al.*, 2006).

### 다양한 자원들의 형질전환

본 연구에서는 *Agrobacterium*법을 이용한 콩의 형질전환을 위하여 자엽절 조직을 사용하여 다양한 자원에서 발아율 및 재분화 효율을 검토하여 효율적인 형질전환을 위한 자원을 선발할 수 있었다. 콩 21개 자원들의 발아율 및 재분화 효율 검증을

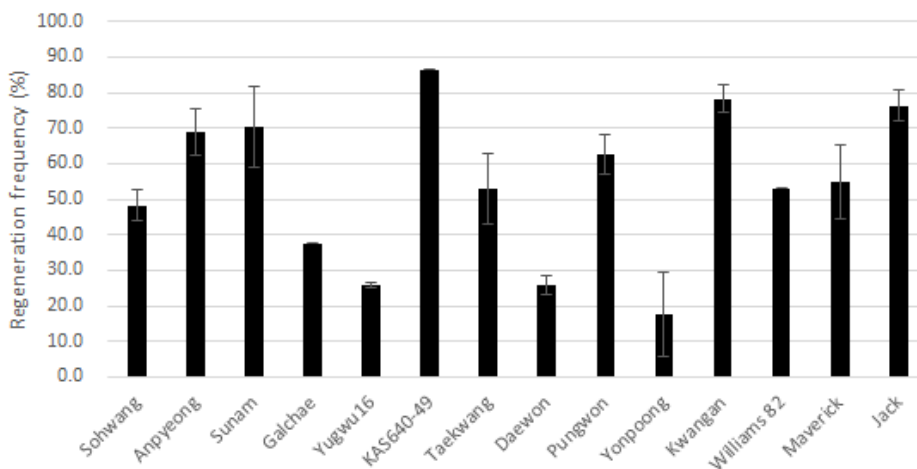


Fig. 3. Regeneration frequency from cotyledonary node in soybean cultivars. Bars represent the mean with standard deviation for three independent experiments. Some cultivars could not confirm the results from replicated data by seed contamination.

통해 비교적 양호한 조직배양 효율을 나타낸 Kwangan, An-pyeong, Seonam, Pungwon, Maverick 품종을 선발하여 *Agrobacterium*법을 이용한 형질전환을 수행하였다. 실험에 사용한 유전자는 제초제 저항성 (*bar*) 유전자를 포함하는 유전자 교정용 CRISPR/Cas9백터인 pBAtc:tRNA02를 사용하였고, half-seed에 *Agrobacterium*을 감염시켰다. 감염된 절편체는 재분화 유도 배지에서 glufosinate에 저항성을 가진 유식물체를 선발할 수 있었다(Fig. 4). 본 실험의 결과, Kwangan, Pungwon, Seonam, 그리고 Maverick 품종에서 glufosinate 저항성 유식물체가 관찰되었고, 이들 식물체는 bar-strip 검정과 PCR 분석을 통해 제초제 저항성 유전자(*bar*)의 형질전환 여부를 확인할

수 있었다(Fig. 5). 유전자의 삽입이 확인된 유식물체는 순화 과정을 거쳐 화분에 이식한 후 온실에서 재배하였다. 콩의 자엽절을 이용한 *Agrobacterium*에 의한 형질전환은 2000년도 이후 다양한 품종을 통해 연구가 진행되었다(Eckert *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2004). 표준 유전체 해독 품종인 Williams82에서는 Zeng *et al.* (2004)이 제초제 저항성 유전자를 형질전환하였고, Flores *et al.* (2008)은 Jack 품종에서  $\alpha$ -linolenic acids 함량 감소에 관여하는 *GmFAD3* 유전자의 형질전환을 보고한 바 있다. 우리나라에서는 *Agrobacterium*을 이용한 콩 형질전환 연구는 일부 품종에서 제한적으로 이루어지고 있는데, 자엽절을 이용한 Kwangan콩의 형질전환(Kim *et al.*, 2017)과 배축 조직

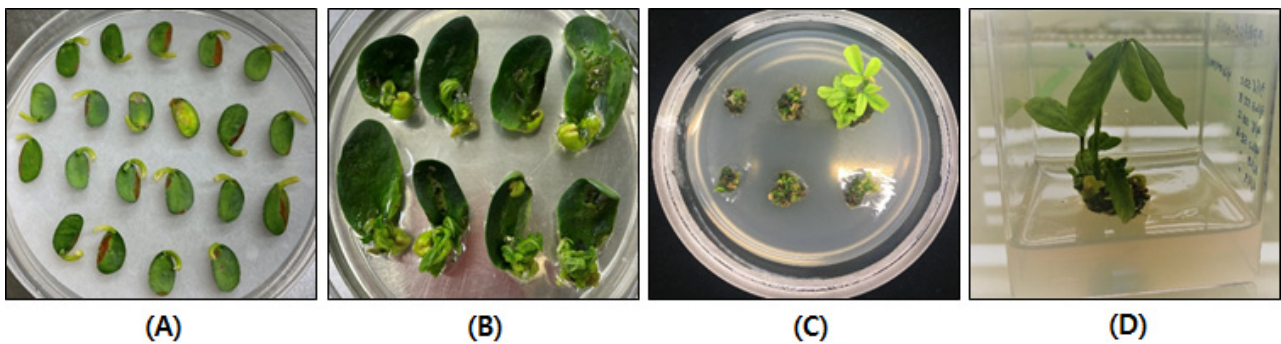


Fig. 4. *Agrobacterium*-mediated transformation of pBAtc:tRNA vector with *bar* gene for gene editing in soybean cultivar 'Kwangan'. (A) Co-cultivated half-seed explants for three days, (B) Half seeds cotyledonary explants in SIM medium, (C) Regenerated shoot in SEM medium containing 5 mg/L glufosinate, (D) Rooted plantlet in RM medium containing 5 mg/L glufosinate.

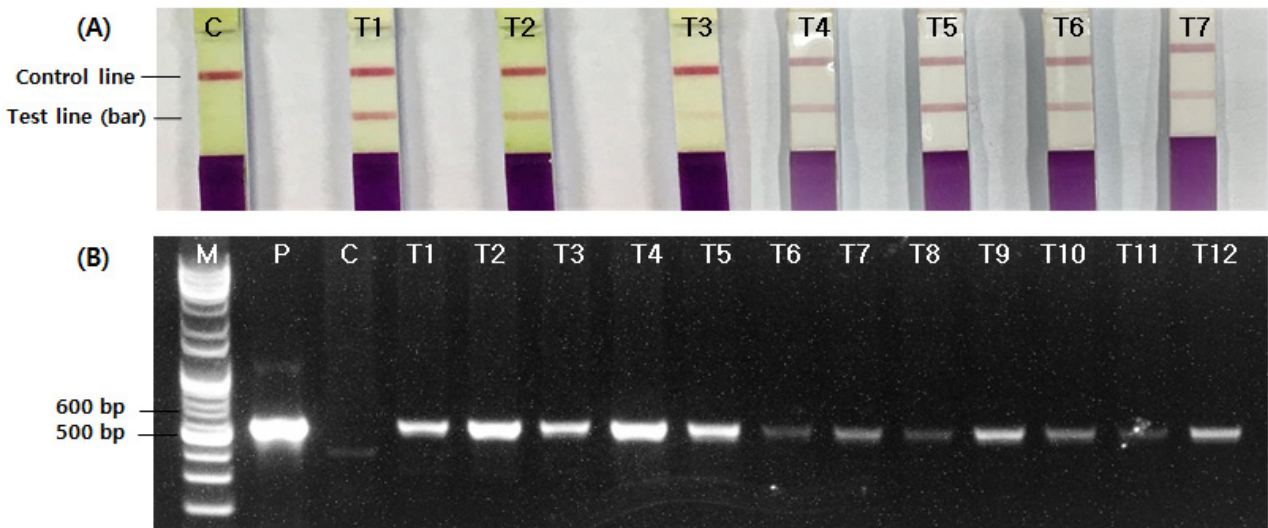


Fig. 5. Detection of the *bar* gene in transgenic soybean plants. (A) LibertyLink® strip detection. The first line is control line, and the second line is test line. C; non-transgenic plant, T1~T7; transgenic plants (T1, T2; Kwangan, T3~T4; Maverick, T5~T6; Seonam, T7; Pungwon), (B) PCR amplification of the 506 bp *bar* gene fragment. M; 1 kb molecular marker, P; pBAtc:tRNA02 vector plasmid, C; non-transgenic plant, T1~T12; transgenic plants (T1~T2; Seonam, T3~T7; Kwangan, T8~T11; Maverick, T12; Pungwon).



을 이용한 Iksannamul콩(Kim *et al.*, 2008)의 형질전환이 보고된 바 있다.

최근, GMO의 안정성 문제를 회피할 수 있는 식물 생명공학 기술로서 CRISPR/Cas9과 같은 유전자 가위 기술이 주목받고 있다(Cai *et al.*, 2018). 유전자 가위 기술을 이용하여 원하는 유전자 부위를 교정하여 단기간에 새로운 형질을 가진 품종을 개발하기 위해서는 농업적 가치가 높은 품종에서 효율적인 형질전환 시스템이 구축되어야 할 것이다. 본 논문에서는 유전체 연구가 진행되고 있는 우리나라 콩 핵심집단에서 다양한 자원들을 선발하고, 글로벌 종자 시장 선점을 위한 품종으로 3 품종을 선정하여 조직배양 효율을 검토하였다. 또한 조직배양 효율이 높은 일부 자원들에서는 *Agrobacterium*법을 이용한 형질전환을 통해 제초제 저항성 유전자의 삽입을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 확립된 형질전환 시스템을 이용한다면, 향후 유용 형질 관련 유전자 교정을 통한 새로운 육종 소재 개발이 활발하게 이루어질 수 있을 것이다.

## 적 요

유전자 가위 기술 등 생명공학 기술을 콩에 적용하여 새로운 품종을 개발하기 위해서는 효율적인 조직배양 기술이 필수적이다. 식물의 유전형은 조직배양 효율에 의존하는 형질전환 기술의 성공 여부를 결정짓는 중요한 요소로 알려져 있다. 본 연구에서는 우리나라 콩 핵심 집단 내 21개 자원들을 선발하여, 외래 품종 2종과 함께 조직배양 효율을 조사하였다. 그 결과, 근연 관계가 높은 Kwangan, Anpyeong, Seonam은 발아율과 재분화 효율이 높았으며, Daepung, Daewon 품종은 발아율과 재분화를 모두 낮게 관찰되었다. 또한 3종의 외래 품종에서는 표준 유전체 해독에 사용된 Williams82와 Jack, Maverick 모두 높은 조직배양 효율을 보였다. 조직배양 효율이 높은 자원들을 대상으로 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환을 수행하여 PCR 및 bar-strip 분석한 결과 Kwangan, Pungwon, Seonam, 그리고 Maverick 품종에서 제초제 저항성 유전자의 삽입을 확인할 수 있었다. 이들 결과를 바탕으로 농업적 가치가 높은 다양한 콩 품종들의 형질전환을 통한 새로운 품종 개발이 가능할 것이다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대농작물 신육종기술개발사업(과제번호: PJ015157032021)과 국립식량과학원 어젠다 사업

(과제번호: PJ014954022021)의 지원에 의하여 수행되었습니다. 연구 수행을 위하여 실험적 지원을 해주신 국립식량과학원 작물기초기반과 이옥경, 강현애 선생님과, Maverick, Jack 품종의 종자를 제공해주신 성순기 박사님을 포함한 LG팜한농 관계자분들께 감사드립니다.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Blanca, J., C. Esteras, P. Ziarsolo, D. Perez, V.F.N. Pedrosa, C. Collado, R.R.D. Pablos, A. Ballester, C. Roig, J. Canizares and B. Pico. 2012. Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. BMC Genomics 13:280.
- Cai, Y., L. Chen, X. Liu, C. Guo, S., Sun, C. Wu, B. Jiang, T. Han and W. Hou. 2018. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean. Plant Biotech. J. 16:176-185.
- Cho, S.W., T.S. Kim, S.J. Kwon, S.K. Roy, C.W. Lee, H.S. Kim and S.H. Woo. 2015. Effect of pre-germination by treatment of soaking on germination of soybean. Korean J. Crop Sci. 60(1)123-137 (in Korean).
- Chun, J.B., M. Jin, N. Jeong, C. Cho, M.S. Seo, M.S. Choi, D.Y. Kim, H.B. Sohn and Y.H. Kim. 2019. Genetic identification and phylogenetic analysis of new varieties and 149 Korean cultivars using 27 InDel markers selected from dense variation blocks in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Korean J. Plant Res. 32(5):519-542 (in Korean).
- Dufourmantel, N., G. Tissot, F. Goutorbe, F. Garcon, C. Muhr, S. Jansens, B. Pelissier, G. Peltier and M. Dubald. 2005. Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin. Plant Mol Biol. 58:659-668.
- Eckert, H., B.L. Vallee, B.J. Schweiger, A.J. Kinney, E.B. Cahoon and T. Clemente. 2006. Co-expression of the borage  $\Delta 6$  desaturase and the Arabidopsis  $\Delta 15$  desaturase results in high accumulation of steridonic acid in the seeds of transgenic soybean. Planta 224:1050-1057.
- Flores, T., O. Karpova, X. Su, P. Zeng, K. Bilyeu, D.A. Slepser, H.T. Nguyen and Z.J. Zhang. 2008. Silencing of *GmFAD3* gene by siRNA leads to low  $\alpha$ -linolenic acids (18:3) of fad3-

- mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)]. Transgenic Res. 17:839-850.
- Ge, X.J., Z.H. Chu, Y.J. Lin and S.P. Wang. 2006. A tissue culture system for different germplasms of indica rice. Plant Cell Rep. 25:392-402.
- Jaganathan, D., K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan and G. Venkataraman. 2018. CRISPR for crop improvement: an update review. Front. Plant Sci. 9:985.
- Jeon, E.H. and Y.S. Chung. 2003. Development of genetic transformation method of Korean soybean. J. Plant Biotechnol. 36:344-351.
- Jeong, N., K.S. Kim, S. Jeong, J.Y. Kim, S.K. Park, J.S. Lee, S.C. Jeong, S.T. Kang, B.K. Ha, D.Y. Kim, N. Kim, J.K. Moon and M.S. Choi. 2019. Korean soybean core collection: genotypic and phenotypic diversity population structure and genome-wide association study. PLoS ONE 14(10): e0224074.
- Karthik, S., G. Pavan, V. Krishnan, S. Sathish and M. Manickavasagam. 2019. Sodium nitroprusside enhances regeneration and alleviates salinity stress in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Biocatal. Agricult. Biotech. 19:101173.
- Kim, D.G., V. Kantayos, D.K. Kim, H.G. Park, H.H. Kim, E.S. Rha, S.C. Lee and C.H. Bae. 2016. Plant regeneration by *in vitro* tissue culture in Korean soybean (*Glycine max* L.). Korean J. Plant Res. 29(1):143-153 (in Korean).
- Kim, H.J., H.S. Cho, J.H. Park, K.J. Kim, D.H. Lee and Y.S. Chung. 2017. Overexpression of a chromatin architecture controlling ATPG7 has positive effect on yield components in transgenic soybean. Plant Breed. Biotech. 5(3):237-242.
- Kim, H.S., H.S. Kim, K.H. Kim, Y.J. Oh, S.K. Suh and H.K. Park. 2005. Water absorption and germination ratio of sprout-soybean varieties affected by different planting date. Korean J. Crop Sci. 50(S):132-135 (in Korean).
- Kim, J.M., I. Shin, S.K. Park, M.S. Choi, J.D. Lee, B.K. Ha, J. Lee, Y.J. Kang, S.C. Jeong, J.K. Moon and S. Kang. 2021. Soybean cultivar 'Hipro' for tofu and soymilk with high seed protein content and pod shattering resistance. Korean J. Breed. Sci. 53(1):60-68 (in Korean).
- Kim, W.S. and H.B. Krishnan. 2004. Expression of an 11kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells. Plant Biotech. J. 2:199-210.
- 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 meristematic 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.
- Li, S., Y. Cong, Y. Liu, T. Wang, Q. Shuai, N. Chen., J. Gai and Y. Li. 2017. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. Frontiers in Plant Sci. 8:246.
- Melo, B.P., I.T. Lourenço-Tessutti, C.V. Morgante, N.C. Santos, L.B. Pinheiro, C.B.J. Lins, M.C.M. Silva, L.L.P. Macedo, E.P.B. Fontes and M.F. Grossi-de-Sa. 2020. Soybean embryonic axis transformation: combining biolistic and *Agrobacterium*-mediated protocols to overcome typical complications of *in vitro* plant regeneration. Frontiers in Plant Sci. 11:1228.
- Ono, Y., Y. Takahata and N. Kaizuma. 1994. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica Napus* L.). Plant Cell Rep. 14:13-17.
- Paz, M.M., J.C. Martinez, A.B. Kalvig, T.M. Fonger and K. Wang. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. Plant Cell Rep. 25(3):206-213.
- Raza, G., M.B. Singh and P.L. Bhalla. 2017. *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. BioMed Res. Int. 2017:7379693.
- Sato, S., A. Xing, X. Ye, B. Schweiger, A. Kinney, G. Graef and T. Clemente. 2004. Production of  $\gamma$ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean. Crop. Sci. 44:646-652.
- Seo, M.S., C. Cho, M.S. Choi, J.B. Chun, M. Jin and D.Y. Kim. 2020. Status of molecular biotechnology research based on tissue culture of soybean. Korean J. Plant Res. 33(5):536-549 (in Korean).
- Singh, R.J. and T. Hymowitz. 1999. Soybean genetic resources and crop improvement. Genome 42:605-616.
- Vagadia, B.H., S.K. Vanga and V. Raghavan. 2017. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor-a review. Trends Food Sci. Technol. 64:115-125.
- Yang, C., T.J. Zhao, D.Y. Yu and J.Y. Gai. 2011. Mapping QTLs for tissue culture response in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). Mol. Cells 32:337-342.
- Zeng, P., D.A. Vadnais, Z. Zhang and J.C. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Rep. 22:478-482.



Zhang, W. and R. Wu. 1998. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.* 76:835-840.

Zhao, Q., Y. Du, H. Wang, H.J. Rogers, C. Yu, W. Liu, M. Zhao and F. Xie. 2019. 5-azacytidine promotes shoot regeneration during *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Physiol. Biochem.* 141:40-50.

(Received 13 May 2021 ; Revised 14 June 2021 ; Accepted 17 June 2021)