

콩 조직배양 기술에 기반한 생명공학 연구 동향

서미숙¹, 조철오², 최만수¹, 전재범¹, 진민아³, 김돌이^{1*}

¹국립식량과학원 작물기초기반과, 농업연구사, ²박사후연구원, ³농업연구관

Status of Molecular Biotechnology Research Based on Tissue Culture of Soybean

Mi-Suk Seo¹, Chuloh Cho², Man-Soo Choi¹, JaeBuhm Chun¹, Mina Jin³ and Dool-Yi Kim^{1*}

¹Researcher, ²Post-doc, ³Senior Researcher, Crop Foundation Research Division, National Institute of Crop Science, Wanju 55365, Korea

Abstract - Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important crops of the world. With the completion of the soybean genome sequence, the Korean soybean core collection consisted of 430 accessions with genetic and phenotypic diversity was constructed in recent year. The availability of genome sequences and core collection will result in the crop improvement by molecular breeding using the various accessions and genome editing approaches. Efficient tissue culture techniques, such as haploid production, protoplast culture and plant regeneration from various organs are essential for the successful molecular biological approach and crop improvement. However, soybean is still considered to be recalcitrant in tissue culture because of the low frequency of regeneration and limitation of available responsive cultivars. In this study, we discuss the recent studies of tissue culture technology and methodology for efficient tissue culture to genetic improvement and application of molecular biotechnology in soybean.

Key words – Core-collection, Genome, Molecular biotechnology, Soybean, Tissue culture

서 언

차세대 염기서열 분석기술(Next Generation Sequencing, NGS)의 발전은 식물의 유전체, 유전학 연구를 비롯하여 최근에는 유전체 교정(Genome Editing, GE)을 통한 기능 연구에 이르기까지 기초 및 응용연구 전반에 걸쳐 비약적인 기술의 진보를 가져오게 되었다(Nguyen *et al.*, 2019). 최근에는 식물의 특성을 체계적으로 관찰하고 대량으로 분석할 수 있는 식물표현체 시스템이 구축되면서 유전체 정보와 연계한 농업형질 관련 대량 분자표지 마커 및 유전자 발굴 등의 연구가 가능하게 되었다(Bezouw *et al.*, 2019).

식물의 세포나 조직을 기내에서 배양하여 그 조직이나 기관을 증식시키는 조직배양 기술은 유전자원의 보존, 무병묘 생산, 세포 대량증식과 같은 분야뿐만 아니라 유전적으로 동일한 개

체를 획득할 수 있는 반수체 배양, 이형 세포 융합을 위한 원형질체 배양 및 유전자의 형질전환 기법 등과 같은 식물 생명공학 분야에서도 다양하게 활용되고 있다(Buter *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 2008; Uchimiya *et al.*, 1986). 이와 더불어 NGS 기술을 통한 식물 표준유전체 해독, 비교유전체 및 구조유전체 분석 연구의 가속화와 함께 유전체 해독을 위한 재료가 되는 식물의 순계를 확보하는 것이 이들 연구의 빠른 성공을 위한 중요한 요소로 주목받고 있으며, 순계확보를 위하여 반수체 배양 기법이 활용되고 있다(Neale *et al.*, 2014). 또한, 식물에 GE 기술을 적용하여 새로운 특성을 가진 작물을 개발하기 위해서는 조직배양 기술을 이용한 원형질체 배양, 식물 형질전환 기술이 필수적으로 고려되고 있다(Eck, 2018). 따라서 유전체를 기반으로 하는 다양한 기초 연구 및 이를 활용한 식물 육종 연구의 성공을 위해서는 효율적인 식물 조직배양 기술이 필수적이다. 식물 조직배양 기술의 중요성이 부각되고 있음에도 불구하고, 벼를 비롯한 몇몇 작물을 제외한 대부분의 식물에서 효율적인 조직배양 기

*교신저자: E-mail dykim22@korea.kr

Tel. +82-63-238-5323

술은 여전히 어려운 문제로 남아있다(Hansen and Wright, 1999). 조직배양 효율이 높은 벼의 경우에도, 일부 품종에 한정되어 조직배양이 이루어지고 있으며, 인디카 품종에서는 낮은 식물 재분화 효율을 보이고 있다(Sahoo *et al.*, 2011). 또한 옥수수 및 밀에서도 낮은 조직배양 효율을 극복하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(He and Lazzeri, 2001; Rakshit *et al.*, 2009).

전세계적으로 널리 재배되고 있는 콩(*Glycine max* (L.) Merrill)은 장미목 콩과 식물로서 종자에 약 40%의 단백질을 포함하고 있으며, 약 20%는 오일로 구성된 고단백 유지 작물로 경제적 가치가 높다(Vagadia *et al.*, 2017). 식품 원료 외에도 공업용, 사료용 및 녹비용 등 다양한 용도로 이용되고 있다(Singh and Hymowitz, 1999). 현재 콩의 조직배양 연구는 반수체 및 원형질체 배양을 통한 식물체 재분화 효율이 매우 낮고, 식물체 재분화를 통한 형질전환 기술은 일부 품종에 국한되어 있다(Dhir *et al.*, 1992; Hai *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2004). 2010년에 콩의 표준 유전체 정보가 해독(Schmutz *et al.*, 2010)된 이후, 최근에는 표준 유전체 정보를 기반으로 한국, 일본, 중국에서 재배되고 있는 콩 2,872 계통으로부터 유전적, 표현형적으로 다양성을 가진 핵심 집단 430계통이 선발되었다(Chun *et al.*, 2019; Jeong *et al.*, 2019). 콩 핵심집단은 백립종, 개화기 등 농업적으로 중요한 형질을 가진 계통들을 포함하고 있어, 향후 핵심집단을 이용한 콩의 유전 및 육종 연구의 활용이 기대되고 있다. 따라서, 핵심집단을 포함한 다양한 콩 유전자원의 학문적, 산업적 활용도를 높이기 위해서는 효율적인 식물 조직배양 기술이 수반되어야 할 것이다.

본 논문에서는 콩의 유전체 기반 분자유종 연구 및 유전자교정을 비롯하여 형질전환 기술을 이용한 새로운 육종 소재 개발에 선결조건이라고 할 수 있는 콩의 조직배양 연구 현황과 조직배양 효율에 영향을 미치는 요인들에 대하여 서술하고자 한다.

본 론

콩의 반수체 배양

유성생식에 의해 종자를 생산하는 식물은 수분과 수정의 과정을 통해 접합체를 형성하고 세포분열 등의 과정을 거치면서 종자로 발달하여 다음 세대의 개체를 형성하게 된다. 그러나, 이러한 생식 생장 과정 없이 난핵 또는 웅핵이 단독으로 세포분열하여 배를 형성할 수 있는데 이때 형성된 식물체의 경우 정상 식물체의 반수에 해당하는 염색체만 가지고 있는 반수체(haploid)를 형성하게 된다(Seo *et al.*, 2015). 반수체 식물은 자연 상태에

서는 극히 낮은 빈도로 나타나는데, 기내 조직배양 기술을 이용하여 반수체를 생성할 수 있게 하는 방법이 다양한 식물에서 시도되었다(Seo *et al.*, 2014; Touraev *et al.*, 1996). 일반적으로 교배 육종을 통해 형질이 고정된 계통을 육성하기 위해서는 최소 5년 이상의 많은 시간과 노력이 소요되는 반면에, 반수체를 이용한 육종은 손쉽게 염색체를 배가시켜 동형접합체(homozygote)를 만들어 낼 수 있기 때문에 유전적으로 고정된 계통을 빠르게 획득할 수 있다. 또한 반수체는 배수성이 다른 종간 교잡에 활용되거나 이배체(diploid)에서 발현되지 않는 우량 열성 형질의 표현형을 선발하기 위해 활용되기도 한다(Lhee *et al.*, 1997). 최근에는, 반복서열(repeat), 염색체의 배수화, 이형접합성(heterozygosity)과 같은 복잡한 식물의 구조 유전체 해독을 위하여 반수체를 이용한 순계 재료 확보의 중요성이 더욱 주목받고 있다(Velasco *et al.*, 2010). 반수체를 유도하는 방법에는 웅성 배우체인 약(anther)과 소포자(microspore), 혹은 자성 배우체 기관인 배주(ovule)를 이용하는 방법이 널리 사용되고 있다(Ferrie and Keller, 1995; Zhang *et al.*, 1992). 특히 자가불화합성을 가진 배추속 작물을 중심으로 소포자 혹은 약을 이용한 반수체 유도 연구가 활발하게 진행(Bajaj *et al.*, 1986; Keller and Armstrong, 1983)되고 있으며, 자가수정 작물인 벼, 보리, 밀 등에서도 육종 연한의 단축, 순계 획득 등을 위한 반수체 연구가 진행되고 있다(Cistué *et al.*, 2006; Jacquard *et al.*, 2009; Ochatt *et al.*, 2009). 약배양은 화기의 수술대에 달린 웅성배우체인 약이 화분으로 완전하게 발달하기 전 단계에서 기내배양을 통하여 웅성 반수체를 유도하는 방법으로 콩을 비롯하여 밀, 옥수수 등과 같은 작물에서 약배양을 통한 반수체 생산 연구가 진행되었다(Buter *et al.*, 1993; Guiderdoni *et al.*, 1992; Wheatley *et al.*, 1986). 콩에서는 1970년대부터 다양한 품종을 대상으로 약배양을 통한 반수체 생산 연구(Ivers *et al.*, 1974)가 진행되었으나 아직까지 효율적이고 안정적인 반수체 생산에 관한 연구 결과는 보고되지 않고 있다(Table 1). Zao *et al.* (1998)은 콩 110 계통을 약배양하여 28 계통에서 배발생을 유도하였으나 식물체 재분화율은 2% 미만이라고 보고하였다. 성공적인 약배양을 위해서는 식물의 유전형, 약 분리 시기 및 배양 배지의 조성 등이 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Farnham, 1998; Phippen and Ockendon, 1990). 화분으로 완전하게 발달하기 전의 약을 기내 배양하여 웅성 반수체를 유도하는 약배양은 약을 분리하는 시기가 매우 중요한 것으로 알려져 있는데, Hai *et al.* (2016)은 4 계통의 콩을 대상으로 약의 채취 시기 및 배양 배지 조건에 따른 약배양 효율을 조사한 결과, 1핵기의 소포자를 함유하는 2,3 ~

Table 1. Studies for efficient anther culture in soybean

Soybean genotype	Reference
Four genotypes (G1, G2, GP451, PK 1347)	Hai <i>et al.</i> (2016)
Four cultivars (Bragg, IAS5, MG/BR-46-Conquista, BRS133)	Rodrigues <i>et al.</i> (2005)
110 genotypes	Zhao <i>et al.</i> (1998)
Brazilian soybean cultivars (IAS5, RS7)	Kaltchuk-Santos <i>et al.</i> (1997)
Hark	Ivers <i>et al.</i> (1974)

Table 2. Studies about protoplast isolation and culture in soybean

Explant type	Soybean cultivar	Reference
Immature cotyledon	14 soybean genotypes	Dhir <i>et al.</i> (1992)
	Clark63 and Heilong	Dhir <i>et al.</i> (1991)
	6 soybean genotypes	Wei and Xu (1988)
	Wye, Williams 82	Lin <i>et al.</i> (1987)
Seedling hypocotyl	16 genotypes (<i>G. max</i> , <i>G. sojaete</i>)	Gamborg <i>et al.</i> (1983)
	Mandarin	Klein <i>et al.</i> (1981)
	<i>G. max</i>	Hammatt and Davey (1988)
	<i>G. canescens</i> PI399478	Newell and Luu (1985)
Pod	Strain T219	Zieg <i>et al.</i> (1980)

4 mm 크기의 약배양시, 가장 높은 캘러스 유도율과 재분화율을 관찰할 수 있었고, 효율적인 캘러스 유도 및 재분화를 위하여 품종에 따라 배양 배지의 호르몬 조합이 영향을 주는 것으로 보고 되었다. 콩에서 농업적 활용도가 높은 계통을 대상으로 효과적인 반수체 생산 체계가 구축된다면, 콩의 유전체 기반 및 분자유종 연구의 가속화를 통한 다양한 육종 소재 개발이 가능할 것이다. 콩의 성공적인 약배양을 위해서는 다양한 계통에 따른 최적 약 분리시기, 전처리 효과, 배양 환경 및 배지의 구성에 따른 반수체 유도 효율에 관한 연구가 활발히 이루어져야 할 것이다.

콩의 원형질 분리 및 원형질체 배양

식물세포에서 세포벽을 제거한 세포를 뜻하는 원형질 (protoplast)은 유전적인 구조가 서로 다른 두 가지의 세포를 융합하는 원형질체 융합 (protoplast fusion)이나 다른 세포의 세포기관이나 유전물질을 이식하여 잡종세포를 만드는 체세포 잡종 (somatic hybridization) 기술을 위하여 1970년대부터 본격적으로 연구가 시작되었다 (Kao *et al.*, 1970, 1974; Melchers and Labib, 1974). 특히, 배추, 양배추와 같은 배추과, 오렌지, 레몬 등과 같은 감귤류, 그리고 토마토 등의 가지 속에서 원형질

체 융합 관련 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Collonnier *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2003). 1980년대부터는 새로운 농업 형질을 식물에 도입하기 위하여 원형질을 이용한 형질전환 연구가 벼를 포함한 다양한 작물에서 시도되었다 (Rhodes *et al.*, 1988; Uchimiya *et al.*, 1986; Zhang and Wu, 1988). 원형질체 배양은 물리적 방법, 혹은 cellulase와 pectinase와 같은 효소적 방법을 사용하여 원형질체를 둘러싸고 있는 세포벽을 제거하고 정제한 후 배양하여 세포분열을 통해 식물체로 재분화하는 과정을 거치게 되는데, 다양한 식물종에서 효율적인 원형질체 분리, 배양 및 식물체 재분화 조건을 최적화하였다 (Chen *et al.*, 2004; Kakkar *et al.*, 2000; Rhodes *et al.*, 1988). 콩에서는 주로 미성숙 자엽 혹은 배축 부위를 채취하여 원형질을 분리하는 연구가 진행되었고, 미성숙 자엽으로부터 분리된 원형질체는 1.2% agarose bead를 사용하여 배양하였을 때 액체 배양과 비교하여 캘러스 유도율이 증가하였다 (Dhir *et al.*, 1991) (Table 2). 또한 glutamine, asparagine 그리고 GA₃의 첨가는 캘러스로부터 식물체 재분화의 효율을 증가시킨다고 보고하였다. Dhir *et al.* (1992)은 14 품종의 미성숙 자엽에서 원형질을 분리하여 Jack 품종에서 27%의 비교적 높은 재분화 효율을 나

타내었다. 그러나, 콩에서 원형질체 분리 및 식물체 재분화 효율은 타작물들에 비하여 현저히 낮고, 형질전환된 원형질체로부터 식물체 재분화는 매우 어려운 실정으로 1990년대 이후 콩 원형질체 배양에 관한 연구 결과는 보고되지 않았다. 최근, 원형질체를 이용한 형질전환 기술은 개별세포(single cell)에 목적 유전자를 도입할 수 있고, 유전자 변형 식물체의 환경 위해성 문제를 피할 수 있다는 장점 때문에 RNP (ribonucleoprotein)를 기반으로 하는 DNA-free 유전자 교정 연구가 여러 작물에서 시도되고 있다(Lin *et al.*, 2018). 콩에서는 원형질체를 분리하여 유전자 교정 연구를 수행하였으나 아직까지 원형질체로부터 유전자교정된 식물체의 생산은 보고되지 않고 있다(Sun *et al.*, 2015). 콩의 원형질을 이용한 효과적인 형질전환 및 유전자 교정 기술의 개발을 위해서는 원형질체 분리를 위한 효율적인 분리 및 정제 조건, 그리고 캘러스 유도 및 식물체 재분화 등을 포함하는 최적 배양 조건에 대한 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

콩 조직으로부터 식물체 재분화

식물의 조직을 배양하여 캘러스를 유도하고 식물체를 재분화시키는 기술은 유전자원의 증식 및 활용뿐만 아니라 생명공학 기술을 이용한 유용 유전자의 형질전환을 위해서 반드시 필요한 기술이다. 특히, 농업적으로 유용한 형질을 식물에 도입하여 원하는 형질로 개량하는 식물 형질전환 기술은 벼를 포함한 다양한 작물에서 연구가 진행되고 있으며, 효율적인 식물 형질전환을 위해서는 조직을 배양하여 식물체를 재분화시키는 기술이 선행되어야 할 것이다. 식물체 재분화 효율은 배양 배지의 조성이나 배양환경, 모식물의 유전형 및 절편체 종류 등 다양한 요인의 영향을 받는다(Ge *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2013). 콩에서는 배양 배지에 첨가되는 호르몬의 종류 및 농도를 포함하는 배양 배지 조성의 효과, 절편체 종류 및 유전형에 따른 다양한 조직배양 조건을 검토하여 효율적인 재분화 시스템을 개발하는 연구가 진행되었다(Table 3). 콩의 자엽(cotyledon), 자엽절(cotyledonary node) 및 배축(hypocotyl) 등과 같은 다양한 조직을 배양하여 재분화를 유도하였는데, 자엽절을 사용하여 효율적인 재분화를 유도하는 연구가 주로 이루어지고 있다(Barwale *et al.*, 1986; Raza *et al.*, 2017; Sairam *et al.*, 2003). 또한, 배지에 첨가하는 식물생장조절 물질은 재분화 효율에 크게 영향을 미치는 요인으로 조사되었는데, 콩의 경우 cytokinin 계열의 BAP가 재분화를 위해 가장 효과적으로 사용되고 있으며, 일부 연구에서는 TDZ (thidiazuron)의 첨가에 따른 효과를 보고

하였다(Kaneda *et al.*, 1997; Yoshida, 2002). 콩의 재분화 효율은 품종에 따라 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있는데, Raza *et al.* (2017)은 품종에 따른 절편 부위 및 식물생장조절물질의 농도가 식물 재분화에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 또한 국내에서는 Kim *et al.* (2016)이 우리나라 콩 재배품종을 대상으로 조직 절편 부위 및 배지 종류에 따른 재분화 효율을 검토한 바 있다. 이외에도, 배양 배지내 첨가물에 따른 재분화 효율에 관한 연구 결과가 보고되었는데, 최근 Karthik *et al.* (2019)은 PUSA 9712 품종의 재분화 배지에 식물의 성장과 발달 과정에서 다양한 조절 기능을 가진 것으로 알려진 SNP (sodium nitroprusside)를 첨가하여 증가된 재분화 효율을 확인할 수 있었다. 따라서, 우리나라 콩 유전자원의 증식 및 재배품종의 형질전환을 통한 육종 소재 개발을 위해 높은 재분화 효율을 가진 콩 적합 계통의 선발과 함께, 품종에 따른 절편 부위별, 배양배지의 조성, 첨가물의 효과 등 재분화에 영향을 미치는 다양한 요인들에 대한 활발한 검토가 이루어져야 할 것이다.

식물 조직배양 관련 유전자

앞서 언급한 바와 같이 효율적인 식물 조직배양 기술은 조직 절편체의 종류, 배양배지의 조건 및 유전형(genotype) 등과 같은 다양한 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특히 식물의 유전형에 따라 조직배양 효율은 크게 영향을 받기 때문에 조직배양에 적합한 계통을 선발하여 배양 효율을 증진시키는 연구가 다양한 식물에서 진행되었다(Bolibok *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2006; Mano and Komatsuda, 2002). 그러나 작물에서 농업적 가치가 높은 대부분의 계통들은 여전히 낮은 조직배양 효율을 가지고 있기 때문에 육종 소재 개발을 위한 연구에 커다란 장애요인이 되고 있다(Taguchi-Shiobara *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2011). 따라서, 식물의 조직배양 효율에 관여하는 메커니즘을 규명하여 농업적 가치가 높은 계통의 조직배양 효율을 개선하고자 하였다(Nishimura *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2013; Taguchi-Shiobara *et al.*, 2006).

식물 조직배양 효율에 관련된 메커니즘 연구는 주로 애기장대와 벼를 중심으로 활발하게 이루어지고 있으며, 최근 콩에서도 조직배양 효율에 관여하는 유전자가 일부 확인되었다. 애기장대에서는 지베렐린 생합성 조절에 관여하는 전사조절인자 *LEC1* (*LEAFT COTYLEDON1*), *LEC2* (*LEAFT COTYLEDON2*)와 *FUS3* (*FUSCA3*) 유전자가 체세포배 발달을 유도하는 유전자로 알려져 있으며, *SERK1* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase1*) 유전자는 정단분열조직에서 체세포배 발달을 증

Table 3. Plant regeneration studies in soybean

Explant type	Soybean cultivar	Shoot regeneration medium	Hormone treatment of shoot regeneration medium	Reference
Cotyledonary node	White hilum	MS medium	BAP 0.5 mg/L	Shan <i>et al.</i> (2005)
	155 <i>G. max</i> and 13 <i>G. soja</i>	B5 medium	BAP 1-5 μmol	Barwale <i>et al.</i> (1986)
	Williams 82, Newton, Loda	Modified MS medium	BAP 8.8 μM	Sairam <i>et al.</i> (2003)
	Clark	MS medium	BAP 1 mg/L	Shetty <i>et al.</i> (1992)
	Wayne	MS medium	BAP 5 μmol	Wright <i>et al.</i> (1986)
Immature cotyledons	33 soybean genotypes	MS medium + B5 vitamins	-	Parrott <i>et al.</i> (1989)
Cotyledonary node and hypocotyl	Bonminor	MS medium + B5 vitamins	TDZ 2 mg/L or BAP 1.15 mg/L	Kaneda <i>et al.</i> (1996)
Cotyledonary node, hypocotyl and half split hypocotyl	Nine cultivars containing Jack and William	B5 medium	BAP 1.67 mg/L	Raza <i>et al.</i> (2017)
Young cotyledon	Six cultivars	MS medium + B5 vitamins	BAP 3 mg/L, NAA 0.04 mg/L	Yang <i>et al.</i> (1990)
Embryogenic callus derived from suspension culture of cotyledons	Fayette	MS medium + B5 vitamins	-	Finer and Nagasawa (1988)
Hypocotyl	13 soybean genotypes	SI medium modified MS medium	BAP 5-10 μmol	Dan and Reighceri (1998)
	Ohsuzu, Kosuzu, Suzukari, Suzuyataka, Tachiyutaka, NT-98-236	B5 medium	TDZ 2-10 μmol	Yoshida (2002)
Immature embryos	26 cultivars (Japan)	MS medium + B5 vitamins	-	Komatsuda and Ohyama (1988)
Half-seed	PUSA 9712	MS medium + B5 vitamins	BAP 4.4 μM	Karthik <i>et al.</i> (2019)

Table 4. Genes related to plant tissue culture efficiency in soybean

Gene name	Gene description	Gene function	References
<i>GmESR1</i> (<i>Enhancer of Shoot Regeneration1</i>)	Transcription factor targeting regeneration-associated genes	Seed germination and shoot and root elongation	Zhang <i>et al.</i> (2017)
<i>GmRAV1</i> (Related to ABI3/VP1 family)	AP2/ERF transcription factor	Regulators of the cytokinin signaling pathway involved in root and shoot regeneration	Zhang <i>et al.</i> (2018)
<i>GmAGL15</i> (<i>AGAMOUS-LIKE15</i>), <i>GmAGL18</i> (<i>AGAMOUS-LIKE18</i>)	MADS box transcription factor	Plant regeneration by somatic embryogenesis	Thakare <i>et al.</i> (2008), Zheng and Perry (2014), Zheng <i>et al.</i> (2016)

가시키는 유전자로 보고되었다(Gaj *et al.*, 2005; Gazzarrini *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 2001). 벼에서는 재분화 효율에 관여하는 QTL 유전자 *NiR* (ferredoxin-nitrite reductase)의 동정 및 질소동화 작용의 조절에 의한 재분화 효율 증진의 메커니즘을

규명하였고, *NiR* 유전자의 형질전환을 통해 재분화 능력이 개선된 형질전환체를 획득하였다(Nishimura *et al.*, 2005). 또한, 식물의 성장과 발달에 관여하는 것으로 알려진 MADS 도메인 전사조절인자군에 속하는 *AGL15* (*AGAMOUS-LIKE15*)와 *AGL18*

(*AGAMOUS-LIKE18*)은 애기장대와 콩에서 체세포 배발생에 관여하였다(Thakare *et al.*, 2008; Zheng and Perry, 2014; Zheng *et al.*, 2016)(Table 4). 최근에는 과실의 성숙, 화기 발달 및 내재해 저항성과 같은 다양한 생물학적 기능을 가진 AP2/ERF 전사조절인자에 속하는 *GmESR1* (*Enhancer of shoot Regeneration 1*)과 *GmRAVI* (Related to ABI3/VP1 family)이 콩의 재분화 과정에 관여한다고 보고되었다(Zhang *et al.*, 2017, 2018). *GmESR1*은 콩의 재분화에 관여하는 유전자들을 조절함으로써 종자의 발아와 성장 및 재분화에 영향을 미치며, *GmRAVI*은 식물호르몬의 일종인 cytokinin 신호전달 경로에 관여하여 콩의 뿌리와 유식물체의 재분화를 유도하였다(Zhang *et al.*, 2017; 2018). 이와 같이, 콩을 비롯한 여러 작물에서 조직 배양 효율 관련 유전자의 탐색 및 기능 연구가 수행되고 있으며, 이러한 결과를 바탕으로 조직배양 능력이 우수한 계통 선발을 위한 마커 개발 및 조직배양 효율 관련 메커니즘의 조절을 통한 효율적인 조직배양 기술의 확립이 가능할 것이다.

조직배양을 기반으로 하는 콩 형질전환

차세대 염기서열 분석(NGS) 기술이 발달하면서 식물의 표준 유전체 정보를 바탕으로 특정 형질 관련 유전자의 탐색 및 분자 표지 개발 연구가 활발하게 진행 중에 있다(Blanca *et al.*, 2012). 특히 식물 염색체에 목적 유전자를 안정적으로 도입하는 형질전환 기술은 유전자의 기능을 규명하고, 새로운 형질을 가진 품종을 개발하기 위한 기술로 다양한 식물에서 안정적인 형질전환 기술 개발 연구가 이루어지고 있다(Hamada *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). 식물의 형질전환 기술 개발을 위해서는 효율적인 조직배양 시스템 확립이 필수적이지만 옥수수, 밀, 보리 등과 같은 주요 작물에서는 낮은 조직배양 효율로 인해서 안정적인 형질전환 기술 개발이 어려운 실정이다(Ishida *et al.*, 2007; Travella *et al.*, 2004). 조직배양이 까다로운 작물 중 하나로 알려진 콩의 경우, Table 3에서와 같이 다양한 계통 및 배양 조건 개선을 통해 조직배양 효율을 향상시키기 위한 연구들이 꾸준히 시도되었고, 그 결과 *Agrobacterium*과 Particle bombardment법을 이용하여 다양한 유전자들의 형질전환 연구가 진행되고 있다(Table 5). *Agrobacterium*법은 목적 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens* 균주내 T-DNA 벡터에 삽입하여 식물 세포에 도입하는 방법으로, 저비용으로 활용이 용이하며, 도입된 유전자가 안정적으로 후대에서 발현하는 장점을 가지고 있다. 그러나 *Agrobacterium* 내의 T-DNA가 식물세포 내에 도입되기 위한 최적 조건의 탐색 및 도입된 식물세포가 정상적으로 재분화되는 배양계의 확립에

어려움이 많아 적용 가능한 대상 식물이 한정적이다. 콩에서는 자엽절(Hinchey *et al.*, 1988), 미성숙 자엽(Parrott *et al.*, 1994), 그리고 배발생 현탁 배양 세포(Trick and Finer, 1998) 등과 같은 다양한 조직을 사용하여 *Agrobacterium*에 의한 형질전환이 초기에 시도되었으나 최근에는 주로 자엽절을 이용한 *Agrobacterium*법이 널리 사용되고 있다(Flores *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 2006). 표준 유전체 해독을 위해 사용된 Williams 82 품종에서는 제초제 저항성(Zeng *et al.*, 2004), zein 단백질 축적 관련 유전자(Kim and Krishnan, 2004)의 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환이 보고된 바 있으며, 이외에도 다양한 품종에서 지방산 및 단백질 함량 관련 유전자와 병저항성 유전자의 형질전환이 보고되었으나 아직까지 *Agrobacterium*을 이용한 콩의 형질전환 효율은 낮고 형질전환 가능한 품종이 제한적이다(Li *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019). 우리나라에서는 주로 광안콩에 한정되어 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환 연구가 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2017). 따라서, 새로운 육종 소재 개발을 위해서는 농업적 가치가 높은 국내 콩 품종에서 *Agrobacterium*을 통한 효율적인 형질전환법의 개발이 이루어져야 할 것이다. *Agrobacterium*과 비교하여 형질전환을 통한 외래 유전자 도입이 비교적 용이하다고 알려진 particle bombardment법은 목적 유전자를 금입자 혹은 텅스텐 등과 같은 미세 입자로 코팅하여 유전자총(gene gun)을 통하여 목적 유전자를 식물세포에 도입하는 방법으로 형질전환을 시도하고 있다(McCabe and Martinell, 1993; Vasil and Vasil, 2006). 콩에서는 배축(embryonic axis)과 미성숙 자엽에서 유도된 체세포 배를 이용하여 particle bombardment를 사용한 형질전환 연구가 진행되고 있다. 특히 Jack 품종의 미성숙 자엽을 이용하여 제초제 및 병 저항성, 그리고 기능성 물질 함량 관련 유전자 등 다양한 유전자가 도입된 형질전환 식물체가 생산되었다(Table 5). 그러나, particle bombardment를 이용한 형질전환에는 미성숙 자엽의 채취를 위한 재료의 유지에 많은 인력과 시간, 형질전환을 위한 고가의 장비 및 유지 비용이 소요될 뿐만 아니라 물리적 방법에 의해 목적 유전자를 도입하는 과정에서 식물 세포의 손상, 유전자의 다중 도입(multiple copy numbers)에 의한 불안정적인 발현 및 유전자 침묵(gene silencing) 등이 문제점으로 지적되고 있다(Matzke *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2009). 이러한 문제점을 개선하기 위해서는 형질전환에 용이 용이한 절편 부위의 선발, 물리적 형질전환 방법의 개선 및 저가의 고효율 particle bombardment 장비의 개발 등이 필요할 것이다.

최근 CRISPR/CAS9과 같은 유전자 가위 기술을 이용하여 목

Table 5. Recent advances for soybean transformation

Transformation method	Explant	Soybean cultivar	Target gene	Gene function	Reference	
<i>Agrobacterium</i>	Cotyledonary node	Williams 82	Bar	Herbicide resistance	Zeng <i>et al.</i> (2004)	
			11-kDa methionine-rich delta-zein	Accumulation of zein protein	Kim and Krishnan (2004)	
		Jack	α -linolenic acids (<i>GmFAD3</i>)	Reduction of α -linolenic acids	Flores <i>et al.</i> (2008)	
		Thorne, NE3001, 420-5	$\Delta^6\Delta^{15}$ desaturase gene	Accumulation of stearidonic acid	Eckert <i>et al.</i> (2006)	
		Asgrow3237	vegetative storage protein gene (<i>VspA</i>)	Reduction of VSP α and VSP β	Staswick <i>et al.</i> (2001)	
	A3237, Thorne, NE3001	Δ^6 -desaturase gene	γ -linolenic acid and stearidonic acid	Sato <i>et al.</i> (2004)		
	Somatic embryo	Chapman	β -glucuronidase (<i>GUS</i>)	-	Trick and Finer (1998)	
	Embryonic tip	Hefeng25, 35, 39 etc.	Pinellia ternata agglutinins gene (<i>pta</i>), Insecticidal crystal protein gene (<i>cryIAC</i>)	Resistance to cotton bollworm	Dang and Wei (2007)	
	Particle bombardment	Embryonic axis	BR-16, 91, Doko RC	Acetohydroxyacid synthase (<i>ahas</i>)	Herbicide resistance	Aragão <i>et al.</i> (2000)
				Oxalate decarboxylase (<i>oxdc</i>)	Resistance to white mould	Cunha <i>et al.</i> (2010)
BR-16			Human growth hormone gene (<i>hgh</i>)	Accumulation of mature form of hGH	Cunha <i>et al.</i> (2011)	
			Conquista	ER luminal binding protein (<i>BIP</i>)	Tolerance to drought stress	Valente <i>et al.</i> (2009)
Somatic embryo derived from immature cotyledons		Jack	α -subunit of rice anthranilate synthase (<i>OAS4_rD</i>)	Increase of free tryptophan	Kita <i>et al.</i> (2007)	
			Green fluorescent protein (<i>GFP</i>)	-	Khalafalla <i>et al.</i> (2005)	
			Gly m Bd 30K gene	Reduction of allergen	Herman <i>et al.</i> (2003)	
			$\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 15$ desaturase gene, GLELO elongase gene	Production of arachidonic acid	Chen <i>et al.</i> (2006)	
			Epoxygenase gene (<i>SIEPX</i>), Diacylglycerol acyltransferase genes (<i>VgDGAT1</i> and <i>VgDGAT2</i>)	Increase of epoxy fatty acid	Li <i>et al.</i> (2010)	
			Soybean phytase gene (<i>Gmphy</i>)	Reduction of phytate content	Chiera <i>et al.</i> (2004)	
Jack, JQ1, JQ2	Jack, JQ1, JQ2	Transcription factor CRC, flavanone 3-hydroxylase gene (<i>F3H</i>)	Increase of isoflavones	Yu <i>et al.</i> (2003)		
		Chalcone synthase gene (<i>CHS6</i>), Isoflavone synthase gene (<i>IFS2</i>), Phenylalanine ammonia-lyase gene (<i>PAL5</i>)	Reduction of isoflavone	Zernova <i>et al.</i> (2009)		
		β -amyrin synthase gene (<i>GmBASI</i>)	Reduction of seedsaponin	Takagi <i>et al.</i> (2011)		
		Insecticidal crystal protoxin gene (<i>cryIAb</i>)	Resistance to velvetbean caterpillar	Dufourmantel <i>et al.</i> (2005)		
		Inverted repeat-SbDV coat protein (CP)	Resistance to soybean dwarf virus (SbDV)	Tougou <i>et al.</i> (2007)		
		Bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (<i>HPPd</i>)	Isoxaflutole tolerance (herbicide)	Dufourmantel <i>et al.</i> (2007)		

적 유전자를 식물 게놈 상에서 직접적으로 교정하는 연구가 다양한 식물을 대상으로 이루어지고 있다(Jaganathan *et al.*, 2018). 유전자 가위를 통해 목적 유전자를 직접 교정하여 우수한 형질을

식물에 도입하거나, 불필요한 형질을 제거하는 유전자 교정 기술은 GMO를 대체할 수 있는 기술로 주목받고 있으며, 유전자 교정 기술을 통해 새로운 형질을 가진 품종을 개발하기 위한 노력

들이 전세계적으로 진행되고 있다(Jaganathan *et al.*, 2018). 유전자 교정 기술을 효과적으로 식물에 적용하기 위해서는 조직배양을 기반으로 하는 효율적인 형질전환 시스템이 선행되어야 한다. 그러나, 콩을 포함한 대다수의 작물에서 조직배양을 기반으로 하는 효율적인 형질전환 시스템은 일부 품종에 한정되어 연구가 진행되고 있다(Zhang *et al.*, 2017). 콩에서는 비교적 형질전환이 용이한 Williams82와 Jack 품종을 중심으로 유전자 교정 연구가 진행되고 있으며, 콩의 개화시기 조절(Cai *et al.*, 2018) 및 식물 구조 형성(Bao *et al.*, 2019)과 같은 생산성 관련 형질, 그리고 카로티노이드 생합성 관련 유전자(Du *et al.*, 2016) 등의 교정을 통한 목적 형질의 전환이 보고되었다.

현재까지 콩에서는 약배양 및 원형질체 배양 등을 비롯한 다양한 조직배양 연구가 진행되었으나 아직까지 재분화 효율은 높지 않고 조직배양 효율에 관여하는 메커니즘 규명 및 조직배양 효율 관련 유전자에 대한 연구도 일부에 불과하다. 이와 더불어, 조직배양을 통한 목적 유전자의 형질전환 기술도 일부 계통에 한정적이고, 형질전환 효율 또한 높지 않은 실정이다. 본 논문에서는 현재까지 콩에서 시도된 다양한 기내 조직배양 및 형질전환 연구의 현황을 분석함으로써 향후 농업적 가치가 높은 콩 품종을 이용한 조직배양 기술의 적용을 위한 정보를 제공하고자 하였다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 효율적인 콩 조직배양 시스템이 구축된다면 향후 유전체 육종 및 GE기술을 적용한 콩의 새로운 육종 소재 개발을 통한 가치창출에 기여할 수 있을 것이다.

적 요

콩은 전세계적으로 재배되는 중요한 작물 중에 하나로 최근, 표준유전체 해독과 함께 유전적, 표현형적으로 다양성을 가진 한국핵심집단이 구축됨에 따라 유전체 기반 분자 육종 연구, 유전자 교정 기술을 활용한 새로운 육종 소재 개발 연구가 가속화될 것으로 예상된다. 유전체 정보 기반 작물의 분자 육종 및 생명공학 연구를 통한 성공적인 작물의 개량을 위해서는 식물의 효율적인 조직배양 기술이 수반되어야 할 것이다. 그러나 반수체 생산, 원형질체 배양 및 형질전환 기술과 같은 콩의 조직배양 효율은 아직까지 높지 않고 일부 계통에 한정되어 이루어지고 있다. 본 논문에서는 콩의 분자육종 및 생명공학 기술의 적용을 위하여 다양한 콩 조직배양 기술에 관한 연구 동향을 분석하고 조직배양 효율에 영향을 미치는 요인들에 대한 정보를 제공하고자 하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립식량과학원 어젠다 사업(과제번호: PJ014954012020)과 차세대농작물 신육종기술개발사업(과제번호: PJ015157032020)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aragão, F.J.L., L. Sarokin, G.R. Vianna and E.L. Rech. 2000. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101:1-6.
- Bajaj, Y.P.S., S.K. Mahajan and K.S. Labana. 1986. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. juncea* through ovary, ovule and embryo culture. *Euphytica* 35:103-109.
- Bao, A., H. Chen, L. Chen, S. Chen, Q. Hao, W. Guo, D. Qiu, Z. Shan, Z. Yang, S. Yuan, C. Zhang, X. Zhang, B. Liu, F. Kong, Xia Li, X. Zhou, L.S.P. Tran and D. Cao. 2019. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol.* 19:131.
- Barwale, U.B., M.M. Meyer and J.M. Widholm. 1986. Screening of *Glycine max* and *Glycine soja* genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node. *Theor. Appl. Genet.* 72:423-428.
- Bezouw, R., J.J.B. Keurentjes, J. Harbinson and M. Aarts. 2019. Converging phenomics and genomics to study natural variation in plant photosynthetic efficiency. *Plant J.* 97(1): 112-133.
- Blanca, J., C. Esteras, P. Ziarolo, D. Pérez, V.F.N. Pedrosa, C. Collado, R.R.D. Pablos, A. Ballester, C. Roig, J. Cañizares and B. Picó. 2012. Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genomics* 13:280.
- Bolibok, H., A. Gruszczynska, A. Hromada-Judycka, and M. Rakoczy-Trojanowska. 2007. The identification of QTLs associated with the *in vitro* response of rye (*Secale cereal* L.). *Cell Mol. Biol. Lett.* 12:523-535.

- Buter, B., S.M. Pescitelli, K. Berger, J.E. Schmid and P. Stamp. 1993. Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 13:79-82.
- 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.
- Chen, L.P., M.F. Zhang, Q.B. Xiao, J.G. Wu and Y. Hirata. 2004. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleracea*) by using nurse cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 77:133-8.
- Chen, R., K. Matsui, M. Ogawa, M. Oe, M. Ochiai, H. Kawashima, E. Sakuradani, S. Shimizu, M. Ishimoto, M. Hayashi, M. Yoshikatsu and T. Yoshikazu. 2006. Expression of $\Delta 6$, $\Delta 5$ desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds. *Plant Sci.* 170:399-406.
- Chiera, J.M., J.J. Finer and E.A. Grabau. 2004. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Mol. Biol.* 56:895-904.
- 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).
- Cistué, L., M. Soriano, A.M. Castillo, M.P. Vallés, J.M. Sanz and B. Echávarri. 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 25:257-264.
- Collonnier, U., I. Fock, M.C. Daunay, A. Servaes, F. Vedel, S. Siljak-Yakovlev, V. Souvannavong and D. Sihachakr. 2003. Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Sci.* 164:849-61.
- Cunha, N.B., A.M. Murad, T.M. Cipriano, A.C.G. Araújo, F.J.L. Aragão, A. Leite, G.R. Vianna, T.R. McPhee, G.H.M.F. Souza, M.J. Waters and E.L. Rech. 2011. Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res.* 20:811-826.
- Cunha, W.G., M.L.P. Tinoco, H.L. Pancoti, R.E. Ribeiro and F.J.L. Aragão. 2010. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylate gene. *Plant Pathol.* 59:654-660.
- Dan, Y. and N.A. Reighceri. 1998. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34:14-21.
- Dang, W. and Z. Wei. 2007. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Sci.* 173:381-389.
- Dhir, S.K., S. Dhir and J.M. Widholm. 1991. Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep.* 10(1):39-43.
- _____. 1992. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): Genotypic differences in culture response. *Plant Cell Rep.* 11(5-6):285-289.
- Du, H., X. Zeng, M. Zhao, X. Cui, Q. Wang, H. Yang, H. Cheng and D. Yu. 2016. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J. Biotechnol.* 217:90-97.
- Dufourmantel, N., G. Tissot, F. Goutorbe, F. Garçon, 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.
- Dufourmantel, N., M. Dubald, M. Matringe, H. Canard, F. Garçon, C. Job, E. Kay, J.P. Wisniewski, J.M. Ferullo, B. Pelissier, A. Sailland and G. Tissot. 2007. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. *Plant Biotech. J.* 5:118-133.
- Eck, J.V. 2018. Genome editing and plant transformation of solanaceous food crops. *Curr. Opin. Biotech.* 49:35-41.
- 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.
- Farnham, M.W. 1998. Doubled-haploid broccoli production using anther culture: effect of anther source and seed set characteristics of derived lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 73-77.
- Ferrie, A. and W.A. Keller. 1995. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Rep.* 14:580-584.
- Finer, J.F., and A. Nagasawa. 1988. Development of an

- embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 15:125-136.
- Flores, T., O. Karpova, X. Su, P. Zeng, K. Bilyeu, D.A. Sleper, H.T. Nguyen and Z.J. Zhang. 2008. Silencing of *GmFAD3* gene by siRNA leads to low α -linolenic acids (18:3) of *fad3*-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)]. *Transgenic Res.* 17:839-850.
- Gaj, M.D., S.B. Zhang, J.J. Harada and P.G. Lemaus. 2005. LEAFT COTYLEDON genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. *Planta* 222:977-988.
- Gamborg, O.L., B.P. Davis and R.W. Stahlhut. 1983. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Glycine* species. *Plant Cell Rep.* 2:209-212.
- Gazzarrini, S., Y. Tsuchiya, S. Lumba, M. Okamoto and P. Mccourt. 2004. The transcription factor FUSCA3 controls development timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev. Cell* 7:373-385.
- 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.
- Guiderdoni, E., E. Galinato, J. Luistro and G. Vergara. 1992. Anther culture of tropical japonica x indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62(3):219-224.
- Guo, W.W., D. Prasard, Y.P. Cheng, P. Serrano, X.X. Deng and J.W. Grosser. 2004. Targeted cybridization in citrus: transfer of Satuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep.* 22:752-758.
- Hai, N.H., S.K. Lal, S.K. Singh, A. Talukdar and Vinod. 2016. Anther culture of *Glycine max* (Merr.): Effect of media on callus induction and organogenesis. *Indian J. Genet.* 76(3):319-325.
- Hamada, H., Q. Linghu, Y. Nagira, R. Miki, N. Taoka and R. Imai. 2017. An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* 7:11443.
- Hammatt, A. and M.R. Davey. 1988. Isolation and culture of soybean hypocotyl protoplasts. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 24(6): 601-604.
- Hansen, G. and M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Sci.* 4(6): 226-231.
- He, G.Y. and P.A. Lazzeri. 2001. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures. *Euphytica* 119:369-376.
- Hecht, V., J.P. Vielle-calzada, M.V. Hartog, E.D. Schmidt, K. Boutillier, U. Grossniklaus, and S.C.D. Vries. 2001. The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 127:803-816.
- Herman, E.M., R.M. Helm, R. Jung and A.J. Kinney. 2003. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* 132:36-43.
- Hinchee, M., A.W. Connor-Ward, D.V. Newell, C.A. Mcdonnell, R.E. S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley and R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nat. Biotech.* 6:915-922.
- Ivers, D.R., R.G. Palmer and W.R. Fehr. 1974. Anther culture in soybeans. *Crop Sci.* 14(6):891-893.
- Ishida, Y., Y. Hiei and T. Komari. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nat. Protoc.* 2:1614-1621.
- Jacquard, C., F. Nolin, C. Hécart, D. Grauda, I. Rashal, S. Dhondt-Cordelier, R.S. Sangwan, P. Devaus, F. Mazeyrat-Gourbeyre and C. Clément. 2009. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep.* 28:1329-1339.
- Jaganathan, D., K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan and G. Venkataraman. 2018. CRISPR for crop improvement: An update review. *Front. Plant Sci.* 9:985.
- 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.
- Kakkar, R.K., P.K. Nagar, P.S. Ahuja and V.K. Rai. 2000. Polyamines and plant morphogenesis. *Biol. Plant* 43:1-11.
- Kaltchuk-Santos, E., J.E. Mariath, E. Mundstock, C.Y. Hu and M.H. Bodanese-Zanettini. 1997. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 49(2):107-115.
- 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 soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Plant Cell Rep.* 17:8-12.
- 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.

- Kao, K.N., W.A. Keller and R.A. Miller. 1970. Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean. *Exp. Cell Res.* 62:338-340.
- Kao, K.N., F. Constabel, M.R. Michayluk and O.L. Gamborg. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120(3):215-227.
- Keller, W.A. and K.C. Armstrong. 1983. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *Italica*. *Euphytica* 32:151-159.
- Khalafalla, M.M., S.M. Rahman, E.S. Ha, Y. Nakamoto, K. Wakasa and M. Ishimoto. 2005. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP (S65T) expression in transformed soybean. *Breed. Sci.* 55:257-263.
- 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, 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.
- 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.
- Klein, A.S., D. Montezinos and D.P. Delmer. 1981. Cellulose and 1,3-glucan synthesis during the early stages of wall regeneration in soybean protoplasts. *Planta* 152(2):105-114.
- Komatsuda, T. and K. Ohyama. 1988. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75(5):695-700.
- Lhee, W.Y., Y.H. Cho and K.Y. Paek. 1997. Effect of BA and GA on embryo germination from ovule culture in intergeneric hybrids between Brassica and Raphanus. *Korean J. Plant Tissue Cult.* 24:257-262.
- Li, R., K. Yu, T. Hatanaka and D.F. Hildebrand. 2010. Vernonia DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotech. J.* 8:184-195.
- 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. *Front Plant Sci.* 24(8):246.
- Lin, C.S., C.T. Hsu, L.H. Yang, L.Y. Lee, J.Y. Fu, Q.W. Cheng, F.H. Wu, H.C.W. Hsiao, Y. Zhang, R. Zhang, W.J. Chang, C.T. Yu, W. Wang, L.J. Liao, S.B. Gelvin and M.C. shih. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotech. J.* 16:1295-1310.
- Lin, W., J.T. Odell and R.M. Schreiner. 1987. Soybean protoplast culture and direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts. *Plant Physiol.* 84:856-861.
- Mano, Y. and T. Komatsuda. 2002. Identification of QTLs controlling tissue-culture traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105:708-715.
- Matzke, A.J.M., F. Neuhuber, Y.D. Park, P.F. Ambros and M.A. Matzke. 1994. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* 244:219-229.
- McCabe, D.E. and B.J. Martinell. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Nature Biotech.* 11:596-598.
- Melchers, G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 135(4): 277-294.
- Neale D.B., J.L. Wegrzyn, K.A. Stevens, A.V. Zimin, D.Puiu, M.W. Crepeau, C. Cardeno, M. Koriabine, A.E. Holtz-Morris, J.D. Liechty, P.J. Martínez-García, H.A. Vasquez-Gross, B.Y. Lin, J.J. Zieve, W.M. Dougherty, S. Fuentes-Soriano, L. Wu, D. Gilbert, G. Marçais, M. Roberts, C. Holt, M. Yandell, J.M. Davis, K.E. Smith, J.F.D. Dean, W.W. Lorenz, R.W. Whetten, R. Sederoff, N. Wheeler, P.E. McGuire, D. Main, C.A. Loopstra, K. Mockaitis, P.J. deJong, J.A. Yorke, S.L. Salzberg and C.H. Langley. 2014. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biol.* 15:R59.
- Newell, C.A. and H.T. Luu. 1985. Protoplast culture and plant regeneration in *Glycine canescens* F.J. Herm. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 4(2):145-149.
- Nguyen, K.L., A. Grondin, B. Courtois and P. Gantet. 2019. Next-generation sequencing accelerates crop gene discovery. *Trends Plant Sci.* 24(3):263-274.
- Nishimura, A., M. Ashikari, S. Lin, T. Takashi, E.R. Angeles, T. Yamamoto and M. Matsuoka. 2005. Isolation of a rice

- regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. PNASU 102(33):11940-11944.
- Ochatt, S., C. Pech, R. Grewal, C. Conreux, M. Lulsdorf and L. Jacas. 2009. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). J. Plant Physiol. 166:1314-1328.
- Parrott, W.A., E.G. Williams, D.F. Hildebrand and G.B. Collins. 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tissue Org. Cult. 16:15-21.
- Parrott, W.A., J.N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, and C.N. Stewart, JR. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30:144-149.
- Phippen, C. and D.J. Ockendon. 1990. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Theor. Appl. Genet. 79:33-38.
- Qian, W., R. Liu and J. Meng. 2003. Genetic effects on biomass yield in interspecific hybrids between *Brassica napus* and *B. rapa*. Euphytica 134:9-15.
- Rakshit, S., Z. Rashid, J.C. Sekhar, T. Fatma and S. Dass. 2009. Callus induction and whole plant regeneration in elite indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. Plant Cell Tissue Org. Cult. 100:31-37.
- Raza, G., M.B. Singh and P.L. Bhalla. 2017. In vitro plant regeneration from commercial cultivars of soybean. BioMed Res. Int. 2017:7379693.
- Rhodes, C.A., D.A. Pierce, I.J. Mettler, D. Mascarenhas and J.J. Detmer. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplast. Science 240(4849):204-207.
- Rodrigues, L.R., J.M.S Oliveira, J.E.A. Mariath, and M.H. Bodanese-Zanettini. 2005. Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. Plant Cell Tissue Org. Cult. 80(2): 129-137.
- Sahoo, K.K., A.K. Tripathi, A. Pareek, S.K. Sopory and S.L. Singla-Pareek. 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. Plant Methods 7:49.
- Sairam, R.V., G. Franklin, R. Hassel, B. Smith, K. Meeker, N. Kashikar, M. Parani, A. Dal, S. Ismail, K. Berry and L. Goldman. 2003. A study on effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. Plant Cell Tissue Org. Cult. 75:79-85.
- Sato, S., A. Xing, X. Ye, B. Schweiger, A. Kinney, G. Graef and T. Clemente. 2004. Production of γ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean. Crop. Sci. 44:646-652.
- Schmutz J., S.B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D.L. Hyten, Q. Song, J.J. Thelen, J. Cheng, D. Xu, U. Hellsten, G.D. May, Y. Yu, T. Sakurai, T. Umezawa, M.K. Bhattacharyya, D. Sandhu, B. Valliyodan, E. Lindquist, M. Peto, D. Grant, S. Shu, D. Goodstein, K. Barry, M. Futrell-Griggs, B. Abernathy, J. Du, Z. Tian, L. Zhu, N. Gill, T. Joshi, M. Libault, A. Sethuraman, X.C. Zhang, K. Shinozaki, H.T. Nguyen, R.A. Wing, P. Cregan, J. Specht, J. Grimwood, D. Rokhsar, G. Stacey, R.C. Shoemaker and S.A. Jackson. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463:178-183.
- Seo, M.S., M. Jin, S.S. Lee, S.J. Kwon, J.H. Mun, B.S. Park, R.G.F. Visser, G. Bonnema and S.H. Sohn. 2013. Mapping quantitative trait loci for tissue culture response in VCS3M-DH population of *Brassica rapa*. Plant Cell Rep. 32:1251-1261.
- Seo, M.S., S.H. Sohn, B.S. Park, H.C. Ko and M. Jin. 2014. Efficiency of microspore embryogenesis in *Brassica rapa* using different genotypes and culture conditions. J. Plant Biotech. 41:116-122 (in Korean).
- Seo, M.S., Won S.Y., Kang S.H., S.H. Sohn and J.S. Kim. 2015. Development of tissue culture technology for haploid production in Brassica species. Korean J. Int. Agric. 27(4): 522-528 (in Korean).
- Shan, Z., K. Raemakers, E.N. Tzitzikas, Z. Ma and R.G. Visser. (2005) Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). Plant Cell Rep. 24(9):507-512.
- Shetty, K., Y. Asano, and K. Oosawa. 1992. Stimulation of in vitro shoot organogenesis in *Glycine max* (Merrill.) by allantoin and amides. Plant Sci. 81:245-251.
- Singh, R.J. and T. Hymowitz. 1999. Soybean genetic resources and crop improvement. Genome 42:605-616.
- Staswick, P.E., Z. Zhang, T.E. Clemente and J.E. Specht. 2001. Efficient down-regulation of the major vegetative storage protein genes in transgenic soybean does not compromise plant productivity. Plant Physiol. 127(4):1819-1826.
- Sun, X., Z. Hu, R. Chen, Q. Jiang, G. Song, H. Zhang and Y. Xi. 2015. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. Sci. Rep. 5:10342.

- Taguchi-Shiobara, F., S.Y. Lin, K. Tanno, T. Omatsuda, M. Yano, T. Sasaki and S. Oka. 1997. Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 95:828-833.
- Taguchi-Shiobara, F., T. Yamamoto, M. Yano and S. Oka. 2006. Mapping QTLs that control the performance of rice tissue culture and evaluation of derived near-isogenic lines. *Theor. Appl. Genet.* 112:968-976.
- Takagi, K., K. Nishizawa, A. Hirose, A. Kita and M. Ishimoto. 2011. Manipulation of saponin biosynthesis by RNA interference-mediated silencing of β -amyrin synthase gene expression in soybean. *Plant Cell Rep.* 30:1835-1846.
- Thakare, D., W. Tang, K. Hill and S.E. Perry. 2008. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol.* 146(4):1663-1672.
- Tougou, M., N. Yamagishi, N. Furutani, Y. Shizukawa, Y. Takahata and S. Hidaka. 2007. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. *Plant Cell Rep.* 26:1967-1975.
- Touraev, A., A. Ilham, O. Vicente and E. Heberle-Bors. 1996. Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.* 15:561-565.
- Travella, S., R.M. Ross, J. Harden, C. Everett, J.W. Snape and W.A. Harwood. 2004. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* 23:780-789.
- Trick, H.N. and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep.* 17:482-488.
- Uchimiya, H., T. Fushimi, H. Hashimoto, H. Harada, K. Syono and Y. Sugawara. 1986. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 22:421-477.
- 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.
- Valente, M.A.S., J.A.Q.A. Faria, J.R.L. Soares-Ramos, P.A.B. Reis, G.L. Pinheiro, N.D. Piovesan, A.T. Morais, C.C. Menezes, M.A.O. Cano, L.G. Fietto, M.E. Loureiro, F.J.L. Aragão and E.P. B. Fontes. 2009. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J. Exp. Bot.* 60:533-546.
- Vasil, I.K. and V. Vasil. 2006. Transformation of wheat via particle bombardment. *Meth. Mol. Biol.* 318:273-283.
- Velasco, R., A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S.K. Bhatnagar, M. Troglio and D. Pruss. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42:833-839.
- Wang, X., S. Liu and Y. Luo. 2009. Research progression soybean tissue culture system and transformation. *Soybean Sci.* 28:731-735.
- Wei, Z.M. and Z.H. Xu. 1988. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep.* 7(5):348-351.
- Wheatley, W. G., A. A. Marsolais and K. J. Kasha. 1986. Microspore growth and anther staging in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* 5:47-49.
- Wright, M.S., S.M. Koehler, M.A. Hinchee and M.G. Carnes. 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* 5(2):150-154.
- 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.
- Yang, Y.S., K. Wada and Y. Futsuhara. 1990. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. *Plant Sci.* 72(1):101-108.
- Yoshida, T. 2002. Adventitious shoot formation from hypocotyl sections of mature soybean seeds. *Breeding Sci.* 52:1-8.
- Yu, O., J. Shi, A.O. Hession, C.A. Maxwell, B. McGonigle and J.T. Odell. 2003. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry* 63:753-763.
- 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.
- Zernova, O.V., A.V. Lygin, J.M. Widholm and V.V. Lozovaya. 2009. Modification of isoflavones in soybean seeds via expression of multiple phenolic biosynthetic genes. *Plant Physiol. Biochem.* 47:769-777.
- Zieg, R.G. and D.E. Outka. 1980. The isolation, culture and callus formation of soybean pod protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 18(2):105-114.
- Zhang, C., X. Wu, B. Zhang, Q. Chen, M. Liu, D. Xin, Z. Qi, S. Li, Y. Ma, L. Wang, Y. Jin, W. Li, X. Wu and A.Y. Su. 2017. Functional analysis of the *GmESR1* gene associated with soybean regeneration. *Plos ONE* 12(4):e0175656.

- Zhang, K., L. Zhao, X. Yang, M. Li, J. Sun, K. Wang, Y. Li, Y. Zheng, Y. Yao and W. Li. 2018. *GmRAVI* regulates regeneration of roots and adventitious buds by the cytokinin signaling pathway in *Arabidopsis* and soybean. *Physiol. Plant.* 165(4): 814-829.
- 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.
- Zhang, Y.X., L. Bouvier and Y. Lespinasse. 1992. Microspore embryogenesis induced by low gamma dose irradiation in apple. *Plant Breed.* 108:173-176.
- Zhao, G., Y. Liu, A. Yin and J. Li. 1998. Germination of embryo in soybean anther culture. *Chin. Sci. Bull.* 43(23):1991-1995.
- Zhao, Q., Y. Du, H. Wang, H.J. Rogers, C. Yu, W. Liu, M. Zhao, and F. Xie. 2019. 5-azacytiding promotes shoot regeneration during *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Physiol. Biochem.* 141:40-50.
- Zheng, Q. and S.E. Perry. 2014. Alterations in the transcriptome of soybean in response to enhanced somatic embryogenesis promoted by orthologs of *Agamous-like15* and *Agamous-like18*. *Plant Physiol.* 164(3):1365-77.
- Zheng, Q., Y. Zheng, H. Ji, W. Burnie and S.E. Perry. 2016. Gene regulation by the *AGL15* transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 172(4):2374-2387.

(Received 4 June 2020 ; Revised 24 September 2020 ; Accepted 28 September 2020)