

한국 콩(*Glycine Max* (L.) Merr.) 품종의 효율적인 원형질체 분리 및 유전자 도입

조철오 · 김둘이 · 최만수 · 진민아 · 서미숙*

농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과

Efficient Isolation and Gene Transfer of Protoplast in Korean Soybean (*Glycine Max* (L.) Merr.) Cultivars

Chuloh Cho, Dool-Yi Kim, Man-Soo Choi, Mina Jin, and Mi-Suk Seo*

Crop Foundation Research Division, National Institute of Crop Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is one of the most important crops with economic value as a source of protein and vegetable oil for human food and animal feed. In recent years, rapidly developed genome editing techniques have shown widespread application prospects for gene function studies and for improving important agronomic traits in many crops. Therefore, it is important to establish a highly efficient method for protoplast isolation and transient expression systems in soybeans. In this study, we established an efficient method for protoplast isolation and its application to transient gene expression in Korean soybean cultivars. The protoplasts were isolated from leaves, epicotyls, hypocotyls, cotyledons, and etiolated hypocotyls using various combinations of enzyme mixtures. We found that high-quality and large amounts of protoplasts were isolated from the etiolated hypocotyls when incubated for 8 h under conditions of 0.5% cellulase, 0.5% pectinase, and 1% viscozyme. In addition, we observed a high transfection efficiency of green fluorescent protein using etiolated hypocotyl protoplasts. Taken together, our protoplast isolation and transfection method is highly efficient and can be used for gene function and molecular analysis to better understand the biological and physiological processes in soybean.

Keywords soybean, *Glycine max*, hypocotyl, protoplast isolation, transient expression

Received on May 20, 2021. Revised on May 24, 2021. Accepted on June 17, 2021.

* Corresponding Author (E-mail: sms1030@korea.kr, Tel: +82-63-238-5326, Fax: +82-63-238-5305)

서 언

원형질체(protoplast)는 완전한 식물세포에서 세포벽이 제거된 세포로 정상 세포의 특성과 활성을 유지함으로써 세포내 반응과 원형질체 융합 그리고 식물체 재분화 등 다양한 방면에 활용되고 있다(Melchers & Labib 1974, Gresshoff 1980). 원형질체는 Cocking (1960)에 의해 처음으로 식물에서 분리되었으며, 다양한 식물 종에서 원형질체 분리와 형질전환 방법이 보고되었다(Mathur 1995, Shen et al. 2014). 원형질체는 일반적으로 떡잎, 하배축, 잎, 뿌리 그리고 뿌리털과 같은 식물의 어린 조직으로부터 주로 분리된다(Davey 2005). 엽육 세포를 이용한 원형질체 분리는 담배(Nagata & Takebe 1971), 애기장대(Yoo et al. 2007), 옥수수(Kanai & Edwards 1973), 콩(Lin 1983), 벼(Toriyama & Hinata 1985) 뿐만 아니라 알과파(Song et al. 1990), 지팡이풀(Mazarei et al. 2008), 야자나무(Masani et al. 2014) 그리고 고무나무(Zhang et al. 2016) 등 매우 다양한 식물 종에서 분리되

었다. 유채(Poulsen & Nielsen 1989), 콩(Hammatt & Davey 1988), 당근(Grzebelus et al. 2012)과 케일(Sun et al. 2019) 등은 식물 하배축을 이용하여 원형질체를 분리하였으며, 관상용 식물인 *Dendrobium* (Hu et al. 1998), 해당화(Hirata et al. 2012) 그리고 호접란(Lin et al. 2018)은 꽃잎에서 원형질체를 분리하였다.

분리된 원형질체는 polyethylene glycol (PEG), microinjection 그리고 electroporation 방법을 이용하여 DNA, RNA 및 단백질과 같은 거대분자를 주입할 수 있으며(Christou et al. 1987, Koop et al. 1996, Holm et al. 2000, Sheen 2001, Shen et al. 2014), 이는 프로모터 활성화, 세포내 단백질 위치, 단백질 간 결합 그리고 CRISPR-Cas9을 이용한 유전자 교정 효율 검증 등 다양한 유전자 기능 연구에 활용되고 있다(Lin & Wittenbach 1981, Christensen 1992, Berger et al. 2007, Fujikawa & Kato 2007, Li et al. 2013). 최근에는 유전자교정 기술을 이용한 작물 개발 연구가 각광을 받으면서, 원형질체를 통한 가이드 RNA 선발 시스템 구축 및 CRISPR ribonucleoproteins (RNPs)을 이용

한 DNA/transgene-free editing 식물을 개발하기 위한 연구가 다양한 식물에서 진행되고 있다(Schindele et al. 2020, Zhang et al. 2021). 효과적인 가이드 RNA 선발과 RNP를 이용한 유전자 교정을 위해서는 효율적인 원형질체 분리와 함께 원형질체 형질 전환 시스템이 필수적이다(Yoo et al. 2007, Wu et al. 2009). 그러나 일부 식물을 제외한 대부분의 식물에서 활성을 가진 원형질체 분리가 쉽지 않고 효소 용액의 조합과 처리 시간, 삼투압 조절제의 농도 등 다양한 요인이 원형질체 분리에 영향을 미치므로 효율적인 원형질체의 분리를 위한 최적 조건의 확립이 필요한 실정이다.

콩(*Glycine max* (L.) Merr.)은 식물성 단백질과 지방의 주요 공급원으로써 중요한 작물이다(Sedivy et al. 2017). 콩의 유전체는 부분적으로 이배체화된 4배체로 거의 75%의 유전자가 multiple copy로 되어있으며, 상동성 유전자의 기능적 중복성 때문에 유전자의 기능 연구가 쉽지 않다(Shultz et al. 2006, Li et al. 2014, Zhou et al. 2015). 또한 애기장대나 벼와 달리 형질전환 효율이 매우 낮아 유전적으로 안정적인 형질전환 계통을 얻는데 많은 시간이 소요된다(Li et al. 2017). 최근에는 작물 개발에 소요되는 시간이 짧고, 원하는 위치에 특이적 변이를 일으킬 수 있으며, 외래 유전자가 도입되지 않는 유전자교정 기술을 이용한 품종 개발이 활발히 연구되고 있다. 유전자교정을 위한 최적 가이드 RNA 선발은 다양한 조직에서 분리된 원형질체를 이용하여 상추(Woo et al. 2015), 감자(Andersson et al. 2018), 밀(Ardell et al. 2019), 옥수수(Sant'Ana et al. 2020), 페튜니아(Yu et al. 2020), 담배(Kang et al. 2020) 그리고 애기장대(Oh et al. 2020) 등 다양한 식물에서 연구되었다. 또한, 유전자 교정된 원형질체로부터 식물체의 생산이 일부 보고되었는데, 상추는 46% (Woo et al. 2015), 감자는 1~25% (Andersson et al. 2018), 그리고 페튜니아는 11.9% (Yu et al. 2020)의 유전자 교정 효율을 보였다. 반면, 콩에서는 원형질체 분리 및 유전자의 도입을 통한 기능 연구가 보고되었으나 다른 식물들과 비교하여 매우 낮은 효율을 보이고 있는 실정이다(Yi et al. 2010, Kidokoro et al. 2015, Sun et al. 2015). 콩 원형질체에 유전자 도입 효율은 약 50% 내외(Wu and Hanzawa 2018)이나, 애기장대의 경우 60~90%의 높은 유전자 도입 효율(Yoo et al. 2007)을 보이며, 국내 콩 품종을 이용한 원형질체 분리 및 유전자 교정 연구는 아직까지 연구가 미흡한 실정이다(Kim & Choi 2020).

본 연구에서는 국내 콩 품종에서 효율적인 원형질체 분리를 위해 조직 부위별, 효소의 조합과 효소 처리 시간 조건 등에 따른 원형질체 분리 및 정제를 위한 최적 조건을 연구하였다.

또한 원형질체를 이용하여 green fluorescent protein (GFP) 리포터 유전자를 이용한 유전자 도입 효율을 확인하였다.

재료 및 방법

식물 재료

원형질체 분리 및 일시적 발현 분석을 위한 콩(*Glycine max* (L.) Merr.) 시험 재료는 광안콩, 풍원콩 및 태광콩 그리고 LG 팜한농에서 Maverick 품종을 분양받아 포장에서 개체 증식 후 채종하여 사용하였다. 기내 배양을 위해 콩 종자를 70% 에탄올로 1분간 표면 살균 후 0.01% Tween-20이 함유된 2% sodium hypochlorite로 20분간 표면 소독하였고, 이후 멸균수로 5회 이상 세척하였다. 소독된 종자를 1/2 MS 배지(3% sucrose, 0.5% agar, pH 5.7)에 치상하고 25°C 기내 배양실에서 일주일간 암배양하여 원형질체 분리를 위한 하배축을 유도하였다.

원형질체 분리

콩 원형질체 분리를 위한 최적의 조직을 선별하기 위해 배양 조건과 성장 시기가 다른 조직을 이용하여 원형질체를 분리하였다. 원형질체 분리를 위한 조직으로 기내 배양실에서 7일간 암배양한 하배축(hypocotyl)과 온실에서 2주간 배양한 식물체의 하배축, 자엽(cotyledon), 상배축(epicotyl)과 복엽(unifoliate leaf) 그리고 3주간 배양한 식물체의 삼복엽(trifoliate leaf)을 이용하였다. 조직 부위별 원형질체 분리 효율을 검토하기 위해 각각의 조직을 0.5~1 mm 크기로 자른 후 CPW (Cell and Protoplast Washing) 용액(0.2 mM KH_2PO_4 , 1 mM KNO_3 , 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.96×10^{-3} mM KI, and 1.6×10^{-4} mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 500 mM Mannitol, 3 mM MES, pH 5.8)을 처리하였다(Hammatt & Davey 1988, Miao & Jiang 2007). 효소 용액 처리 후 암상태에서 6시간동안 40~50 rpm 속도로 진탕배양하여 효소 처리가 끝난 각각의 조직을 40 μm 세포여과망(SPL, Gyeonggi-do, Korea)을 통과시켜 여과액을 14 mL round bottom tube (SPL, Gyeonggi-do, Korea)에 모아 100×g에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 침강된 원형질체에 W5 용액(154 mM NaCl, 125 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 2 mM MES) 10 mL을 넣어준 후 100×g에서 5분간 원심분리하고 3회 세척하였다. 원형질체 분리 후 hemocytometer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE)를 이용하여 분리된 원형질체 개수를 측정하였다.

콩 원형질체의 효율적인 분리를 위한 최적의 세포벽 분해효소

조합 및 처리 시간을 결정하기 위해 다양한 효소 조합과 처리 시간을 적용하여 원형질체 분리를 시도하였다. 하배축에서 분해효소의 조합과 처리 시간에 따른 원형질체 분리를 위해 유래가 다른 효소 용액(E1~E3) (400 mM Mannitol, 20 mM KCl, 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 5.7)과 CPW 효소 용액(E4~E6) (0.2 mM KH₂PO₄, 1 mM KNO₃, 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.96 × 10⁻³ mM KI, and 1.6 × 10⁻⁴ mM CuSO₄ · 5H₂O, 500 mM Mannitol, 3 mM MES, pH 5.8)을 사용하였다. 분해효소 조합에 따른 원형질체 분리 효율을 검토하기 위해 하배축을 0.5~1 mm 크기로 자른 후 다양한 농도의 cellulase R-10 (Yakult Pharmaceutical Industry Ltd., Tokyo, Japan) (0.5%, 1% 및 2%)과 pectinase (Sigma, St. Louis, MO, USA) (0.125%, 0.25% 및 0.5%)가 첨가된 효소 용액과 cellulase (0.25%, 0.5% 및 1%), pectinase (0.5%, 1% 및 2%), viscozyme (0.5%, 1% 및 2%)이 첨가된 CPW 효소용액을 처리하여 암상태에서 40~50 rpm 속도로 진탕배양 하였다(Table 1). 또한 효소 처리 시간에 따른 원형질체 분리 효율을 검토하기 위해 하배축을 이용하여 CPW 효소 용액을 2, 4, 6, 8 및 10시간 처리하여 위와 같은 방법으로 원형질체를 분리하였다.

재배 품종별 원형질체 분리를 위해 광안, 태광, 풍원 및 Maverick 품종을 이용하여 위와 같은 방법으로 하배축에서 원형

질체를 분리하였다.

GFP 유전자의 원형질체 도입

원형질체에 유전자의 도입을 위해 하배축에서 분리된 1 × 10⁵ mL⁻¹의 원형질체를 이용하였다. 분리된 원형질체를 얼음에서 30분간 방치한 후 침강된 원형질체를 100×g에서 5분간 원심 분리 하였다. 상온에서 상층액을 제거하고 MMG 용액(400 mM Mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES, pH 5.7)으로 침강된 원형질체를 잘 풀어준 후 5, 10, 20, 그리고 40 µg 농도의 GFP가 융합된 pCAMBIA1304 플라스미드 DNA를 원형질체와 부드럽게 섞어주었다. 동량의 PEG4000 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액(40% PEG, 200 mM Mannitol, 100 mM CaCl₂)을 첨가하여 부드럽게 섞어준 후 암상태, 상온에서 10분간 방치하였다. 이후 800 µL의 W5 용액을 첨가하여 반응을 멈춘 후 100×g 속도로 2 분간 원심분리 하여 원형질체를 침강시켰다. 이후 W5 1 mL을 첨가하여 원형질체를 풀어준 후 25°C 배양실에서 2일간 암배양 하였다. GFP 발현 여부는 DMRE 형광현미경(Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE)의 DFC490 카메라를 사용하여 20배 배율로 관찰하였고, DNA 농도별 유전자 도입 효율은(GFP 발현 원형질체 수/전체 원형질체 수) × 100%로 산출하였다.

Table 1. Composition of enzyme solutions for protoplast isolation.

Enzyme compositions	Enzyme solutions						
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	
[% , W/V]	Cellulase (O) ^z	0.5	1	2	-	-	-
	Cellulase (T) ^y	-	-	-	0.25	0.5	1
	Pectinase (R) ^x	0.125	0.25	0.5	-	-	-
	Pectinase (A) ^w	-	-	-	0.25	0.5	1
	Viscozyme	-	-	-	0.5	1	2
mM	CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	-	-	10	10	10
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	-	-	1.6 × 10 ⁻⁴	1.6 × 10 ⁻⁴	1.6 × 10 ⁻⁴
	KCl	20	20	20	-	-	-
	KH ₂ PO ₄	-	-	-	0.2	0.2	0.2
	KI	-	-	-	0.96 × 10 ⁻³	0.96 × 10 ⁻³	0.96 × 10 ⁻³
	KNO ₃	-	-	-	1	1	1
	Mannitol	400	400	400	500	500	500
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	-	-	1	1	1
	MES	20	20	20	3	3	3
	pH	5.7	5.7	5.7	5.8	5.8	5.8

^zCellulase (O), Cellulase Onozuka R-10; ^yCellulase (T), Cellulase from *Trichoderma reesei* (Celluclast); ^xPectinase (R), Pectinase from *Rhizopus* sp.; ^wPectinase (A), Pectinase from *Aspergillus aculeatus* (Pectinex® Ultra SPL)

데이터 분석

모든 시험은 3반복 수행하여 결과를 획득하였으며, 각각의 결과에 대한 통계 분석은 SPSS 통계 패키지 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 통계적 검증은 ANOVA (분산 분석)를 수행하였으며, 사후 검증은 Duncan's LSR을 사용하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

원형질체 분리를 위한 최적 조직 선정

본 연구에서는 콩 원형질체 분리를 위한 식물체의 최적 성장 시기 및 조건 그리고 부위를 조사하기 위해 발달 상태가 다양한 조직들을 이용하여 원형질체 분리를 시도하였다. 원형질체 분리를 위해 기내 배양실에서 7일간 암배양한 하배축과 온실에서 2주간 배양한 식물체의 하배축, 자엽, 상배축 및 복엽 그리고 3주간 배양한 삼복엽을 이용하였다(Fig. 1). 각각의 조직을 이용하여 CPW 효소 용액 처리 후 암상태에서 진탕배양하여 원형질

체를 분리하였다. 기내 배양실에서 암배양한 하배축을 이용하여 원형질체를 분리한 결과 평균 9.3×10^5 protoplasts/g이 분리되었으며 온실에서 배양한 하배축(평균 7.8×10^5 protoplasts/g)과 상배축(평균 8.4×10^5 protoplasts/g)의 경우 암배양한 하배축과 비슷한 원형질체 분리 효율을 보였다(Figs. 1A, 1B, 1D). 반면 자엽의 경우 평균 4.2×10^5 protoplasts/g으로 하배축이나 상배축과 비교하여 원형질체 분리 효율이 크게 감소하였다(Fig. 1C). 콩의 잎을 이용하여 원형질체를 분리한 결과 복엽(평균 1.3×10^6 protoplasts/g)과 삼복엽(평균 1.5×10^6 protoplasts/g)은 다른 조직들과 비교하여 다소 높은 원형질체 분리 효율을 보였으나, 정상적인 원형의 세포뿐만 아니라 비정상적인 형태의 다양한 원형질체가 함께 분리되었다(Figs. 1E, 1F). 또한 잎에서 원형질체 분리 시 잎의 발달 단계에 따라 원형질체 분리 효율이 상이하였다. 이상의 결과를 바탕으로 원형질체 분리 효율 및 원형질체 분리 상태 그리고 시료 준비의 용이성을 등을 고려하여 콩 원형질체 분리 시 최적의 조직으로 암배양한 하배축을 선정하였다. 일반적으로 식물 원형질체 분리는 다양한 요인에 의해 영향을 받는데 특히 세포벽 분해효소의 종류, 농도 및 처리시간 그리고 원형질체 분리에 사용되는 식물체의 성장 시기 및 성장 조건과 부위 등이 원형질체의 분리와 활력에 직접적으로 영향을 주는 주된 요인으로 알려져 있다(Lin 1983, Hammatt & Davey 1988, Yoo et al. 2007, Shen et al. 2014, Jia et al. 2016, Xiong et al. 2019). 대부분의 식물체는 원형질체 분리를 위해 세포의 개수가 많고 분해효소의 침투가 용이한 잎을 주로 사용하고 있지만, 일부 식물체의 경우 잎에서 원형질체 분리가 용이하지 않거나 활력이 좋지않아 하배축과 꽃잎 등 다양한 조직 부위가 사용되고 있다(Hammatt & Davey 1988, Poulsen & Nielsen 1989, Grzebelus et al. 2012, Hirata et al. 2012, Lin et al. 2018, Sun et al. 2019). 콩에서는 Hammatt & Davey (1988)가 하배축에서 2.3×10^6 protoplasts/g의 원형질체 분리 효율을 나타내었고, Wei & Xu (1988)은 6개 콩 자원들의 미성숙 자엽을 사용하여 $4.8\sim 7.8 \times 10^5$ protoplasts/g 범위의 다양한 원형질체 분리 효율을 확인하였다. 최근에는 콩의 복엽에서 효과적으로 원형질체를 분리하여, 약 50%의 효율로 외부 유전자를 도입한 결과가 보고되었다(Wu & Hanzawa 2018). 본 연구에서는 복엽과 삼복엽 이용 시 1.5×10^6 protoplasts/g의 높은 원형질체 분리 효율을 보였으나, 형태적으로 균일하지 않고 비정상적 모양의 원형질체들이 함께 분리되었다. 반면, 하배축을 이용하여 원형질체를 분리하였을 경우에는 균일하고 정상적인 형태의 원형질체를 7.8×10^5 protoplasts/g의 높은 분리 효율로 획득할 수 있었다.

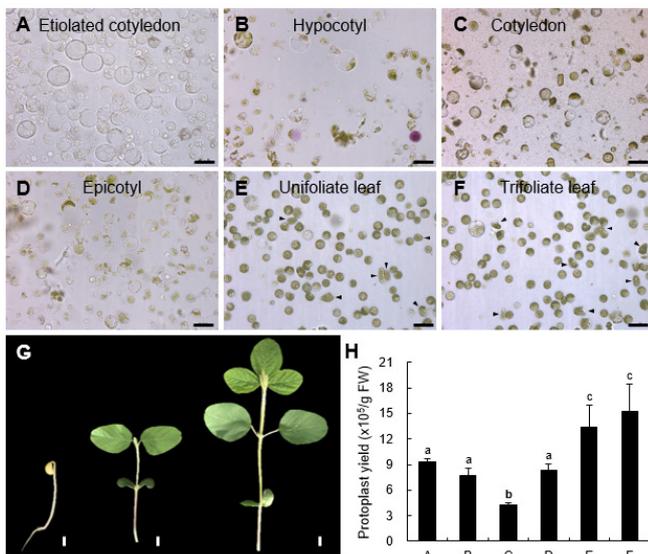


Fig. 1. Yield of protoplast isolation from different organs in soybean. Protoplast cells were prepared from 7-days old dark grown soybean seedlings (A), 10-days old seedlings (B-E), and 14-days old seedlings (F): etiolated cotyledon (A), hypocotyl (B), cotyledon (C), epicotyl (D), unifoliate leaf (E), trifoliate leaf (F), corresponding to the soybean seedling in (G) on the left, middle, and right, respectively. (H) Protoplast isolation yield from A to F. The scale bars is 40 μ m (A-F) or 1 cm (G). The error bars indicate the standard deviation of three replicates. The arrowhead indicates the abnormal protoplast cells. Different letters indicate a significant difference determined by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test ($p < 0.05$).

따라서 콩에서 높은 원형질체 분리 효율과 활력을 위해서는 적절한 성장 단계와 조직부위, 그리고 유전형(genotype) 등을 고려하여 원형질체 분리 조건의 검토가 충분히 이루어져야 할 것이다.

원형질체 분리를 위한 분해효소 조합 선정

콩 원형질체 분리에 세포벽 분해효소의 종류와 농도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 조합의 세포벽 분해효소를 이용하여 원형질체 분리 효율을 조사하였다. 콩 하배축에서 원형질체를 효율적으로 분리하기 위한 최적의 효소 조합을 검토하기 위해 벼(Mathur et al. 1995), 담배(Koop et al. 1996), 애기장대(Marion et al. 2008, Shen et al. 2014) 등에서 다양한 식물에서 원형질체 분리에 사용되는 세포벽 분해효소를 다양한 조건으로 처리하였다(Table 1). 벼, 담배 및 애기장대 원형질체 분리에 주로 사용되는 cellulase와 pectinase 효소 용액(E1~E3, E1: 0.5% cellulase R-10 + 0.125% pectinase, E2: 1% cellulase R-10 + 0.25% pectinase, E3: 2% cellulase R-10 + 0.5% pectinase)은 6시간 처리 후에도 원형질체 분리가 거의 일어나지 않았다(Fig. 2). 하지만 CPW 효소 용액(E4~E6, E4: 0.25% cellulase + 0.25% pectinase + 0.5% viscozyme, E5: 0.5% cellulase + 0.5% pectinase + 1% viscozyme, E6: 1% cellulase + 1% pectinase + 2% viscozyme) 처리 시에는 효소 농도에 따라 분리되는 원형질체의 수가 증가하였다(Fig. 2). CPW 효소 용액을 사용하여 원형질체 분리 시 E4 조건에서 평균 3.8×10^5 protoplasts/g, E5 조건에서 평균 9.3×10^5 protoplasts/g 그리고 E6 조건에서 평균 10.6×10^5 protoplasts/g의 원형질체가 분리되어 E6 조건에서 가장 많은

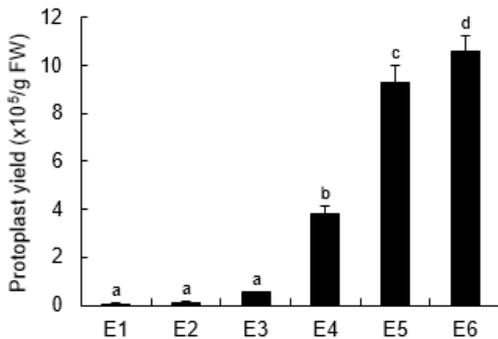


Fig. 2. Effect of various enzyme combinations on isolation yield of protoplast from soybean hypocotyls. Protoplast cells were prepared from 7-days dark grown soybean seedling hypocotyls. The error bars indicate the \pm standard deviation of three replicates. Different letters indicate a significant difference determined by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test ($p < 0.05$).

원형질체가 분리되었으나 E5 조건과 큰 차이는 보이지 않았다 (Fig. 2). Wu & Hanzawa (2018)는 콩의 복엽을 이용하여 0.1% cellulase와 0.2% pectolase 처리하였을 때 원형질체 분리 효율이 가장 높았다고 보고한 바 있는데, 본 연구에서는 하배축을 이용하여 0.5%의 cellulase와 pectinase를 처리하였을 때 가장 높은 원형질체 분리 효율을 보여 하배축에서 원형질체 분리를 위한 분해효소의 적합 농도는 엽육조직 보다 높았다. 반면 유채는 하배축 원형질체 분리를 위해 1% cellulysin과 0.1% macerace (Poulsen & Nielsen 1989)를 이용하였으며, 당근은 1% cellulase와 0.1% pectolyase (Grzebelus et al. 2012) 그리고 케일은 3%의 cellulase와 0.5% pectolase (Sun et al. 2019)를 이용하는 등 콩 하배축 분해효소와 종류 및 사용되는 양이 다르며 이는 식물종의 차이일 것으로 생각된다. 또한 E5와 E6 조건에서 세포벽 분해효소의 양은 2배 차이를 보였으나 분리되는 원형질체의 개수는 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 분해효소 양이 증가하더라도 일정 농도 이상이면 원형질체 분리 효율에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각되며, 이는 분해효소의 종류 및 처리 농도 등의 조건이 다르기 때문으로 판단된다.

원형질체 분리를 위한 분해효소 처리시간 선정

세포벽 분해효소의 처리 시간에 따른 원형질체 분리 효율을 조사하기 위해 기내 배양실에서 7일간 암배양한 하배축을 이용하여 시간별 분해효소 처리에 따라 분리되는 원형질체 개수를 조사하였다(Fig. 3). 분해효소 처리 2시간 후에는 원형질체 분리

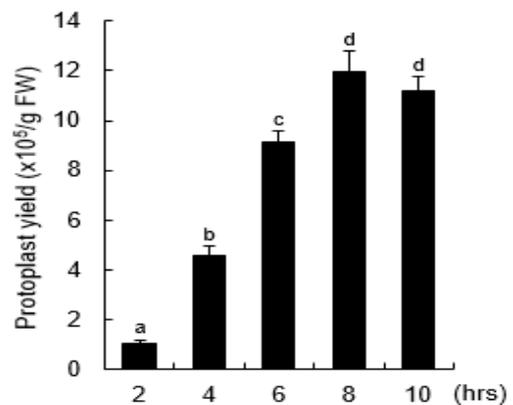


Fig. 3. Effect of incubation time on isolation yield of protoplast from soybean hypocotyls. Protoplast cells were prepared from 7-days dark grown soybean seedling hypocotyls. The protoplast cells were treated with enzyme solutions at given time period (2, 4, 6, or 8 hours). The error bars indicate the \pm standard deviation of three replicates. Different letters indicate a significant difference determined by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test ($p < 0.05$).

가 거의 일어나지 않았으나 4시간 이후부터 처리 시간이 증가함에 따라 원형질체 분리 효율이 증가하였다. 분해효소 처리 4시간 처리구에서는 평균 4.6×10^5 protoplasts/g 원형질체가 분리되었으며, 6시간 처리구에서는 평균 9.2×10^5 protoplasts/g의 원형질체가 분리되어 4시간 처리구 보다 2배 증가된 양상을 보였다. 분해효소 8시간 처리구에서는 평균 1.2×10^6 protoplasts/g의 원형질체가 분리되어 가장 높은 원형질체 분리 효율을 보였으며, 10시간 처리구에서는 평균 1.1×10^6 protoplasts/g의 원형질체가 분리되어 8시간 처리구와 큰 차이를 보이지 않았다. 본 연구의 결과 분리되는 원형질체의 수는 분해효소 처리 시간에 따른 정적 상관관계를 나타내지 않았으며, 분해효소에 의한 분리된 원형질체가 피해를 입는 것을 최소화하기 위해서는 적정 시간 동안 처리하는 것이 중요할 것으로 판단된다. 또한 일정량 이상의 활력을 가지는 원형질체 분리를 위해서는 분해효소 처리 시간의 증가와 함께 사용되는 식물 조직의 양 등이 영향을 미칠 것으로 판단된다. 이상의 결과를 바탕으로 콩 하배축의 원형질체 분리를 위한 최적의 분해효소 처리 조건으로 8시간을 선정하였다.

재배품종 원형질체 분리

현재 국내에서 콩 기능 연구와 형질전환을 위한 품종은 주로 광안콩이 사용되고 있으며 다양한 국내 콩 품종들에 대한 기능 및 형질전환 연구는 일부에 불과하다(Kim et al. 2017). 따라서 다양한 육종 소재 개발을 위해서는 농업적 가치가 높은 품종에서

의 기능 연구 및 형질전환 방법이 필요하다. 본 연구에서는 병충해에 강하고 광지역 적응의 양질 다수성 특성을 가지는 장류 및 두부용 콩 태광, 도복과 병에 강한 다수성 고품질 나물콩 풍원 그리고 해외에서 주로 사용되는 스트레스 내성을 가지며 높은 형질전환 효율을 보이는 엘리트 품종 Maverick을 이용하여 원형질체 분리를 시도하였다(Fig. 4). 원형질체 분리를 위해 암상태에서 배양한 하배축을 이용하여 CPW 효소용액을 처리하였다. 원형질체 분리 결과, 대조구로 사용된 광안 품종과 비교하여 Maverick, 풍원, 태광 품종 모두에서 높은 원형질체 분리 효율을 보였다. 또한 분리된 원형질체는 광안과 비교하여 다소 작은 크기를 보였으나 모두 정상적인 원형 상태를 유지하였다(Figs. 4A-4D). 광안콩은 효소처리 8시간 후 평균 9.15×10^5 protoplasts/g의 원형질체가 분리되었으며, Maverick (평균 1.3×10^6 protoplasts/g) 과 풍원(평균 1.37×10^6 protoplasts/g)은 광안과 비교하여 다소 높은 원형질체 분리 효율을 보였다. 태광은 평균 1×10^6 protoplasts/g의 원형질체가 분리되어 광안과 유사한 분리 효율을 보였다(Fig. 4E). 이러한 결과는 우수한 농업 형질과 특성을 가지고 있는 다양한 재배품종에서 유전자 기능 연구 및 분자 분석이 가능함을 시사한다.

GFP 유전자의 원형질체 도입

식물체에서 유전자 기능 연구를 위해서는 목적 유전자의 효과적인 도입과 발현을 위한 방법이 매우 중요하다. 원형질체에

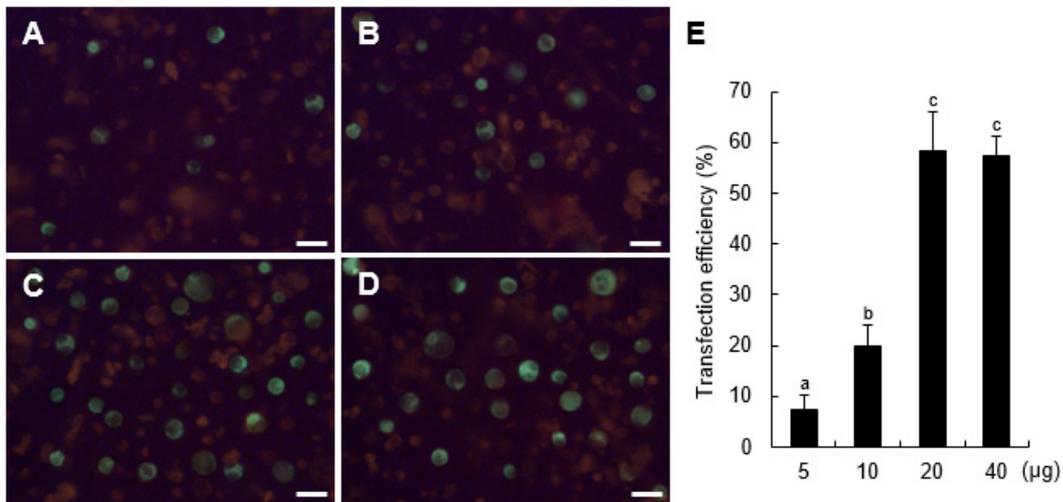


Fig. 4. Transfection efficiency of soybean hypocotyl protoplasts with different amounts of plasmid DNA. Protoplasts were transformed with various concentration of the plasmid pCambia1304 harboring a GFP reporter gene: 5 µg (A), 10 µg (B), 20 µg (C) and 40 µg (D). (E) Transfection efficiency from A to D. Fluorescence signal of GFP was examined 24 hours after transformation under microscopy. Scale bars = 40 µm. The error bars indicate the \pm standard deviation of three replicates. Different letters indicate a significant difference determined by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test ($p < 0.05$).

목적 유전자를 효과적으로 도입하기 위한 조건 검토를 위하여 pCAMBIA1304 벡터를 이용하여 GFP 발현을 조사하였다(Fig. 5). 하배축에서 분리된 원형질체에서 유전자 도입 효율을 검토하기 위해 다양한 농도의 플라스미드 DNA (5 µg, 10 µg, 20 µg 및 40 µg)를 이용하였고, DNA 주입을 위한 삼투제로는 40% PEG4000을 사용하였다(Wu & Hanzawa 2018). 20 µg의 DNA를 사용하였을 경우 58.3%로 가장 높은 유전자 도입 효율을 보였으며(Figs. 5C, 5E), 5 µg의 DNA를 사용하였을 경우 7.5%로 가장 낮은 유전자 도입 효율을 보였다(Figs. 5A, 5E). 또한 40 µg의 DNA를 사용하였을 경우 57.3%로 20 µg의 DNA를 사용하였을 때와 유사한 유전자 도입 효율을 보였다(Figs. 5D, 5E). 본 연구에서는 기존에 보고된 약 50%의 원형질체 유전자 도입 효율(Wu & Hanzawa 2018)과 비교하여 약 8.3% 개선된 유전자 도입 효율을 보였다. 원형질체의 최적 유전자 도입 효율을 위해서는 원형질체 수와 DNA 비율이 매우 중요한 요소이다(Masani et al. 2014, Burris et al. 2016). 애기장대의 원형질체에서는 효과적인 유전자 도입을 위해 2×10^4 원형질체에 10~20 µg DNA 사용이 일반적이지만(Yoo et al. 2007), 원형질체에 유전자 도입 효율은 식물체에 따라 다양하기 때문에 각각의 식물에 대한 원형질체 수와 DNA 농도의 비율 최적화가 필요하다. 따라서 콩 원형질체에 유전자 도입 효율을 높이기 위해서는 원형질체의 개수와 적정 비율의 DNA 농도 설정이 필요할 것으로 판단된다.

식물 원형질체는 세포분열과정을 통해 정상적인 식물체로의 분화가 가능하여 식물세포 분화 조절기작 연구로 활용이 가능하며 외래 유전자의 도입을 통한 유전자 기능분석 연구로 활용이 가능하다. 또한 서로 다른 두 종류의 세포를 융합하거나 다른 세포의 소기관이나 유전물질을 이식하여 잡종세포를 만드는 원형질체 융합(protoplast fusion) 또는 체세포잡종(somatic hybridization) 방법 등을 활용한 품종 개발 수단으로 활용이 가능하다(Melchers & Labib 1974). 최근 GM작물의 대체 개발 수단으로 RNP complex를 식물 원형질체에 직접 도입함으로써 새로운 품종을 개발하는 유전자 교정 기술 개발이 가속화되고 있다(Li et al. 2013, Sun et al. 2015). 그러나 아직까지 원형질체를 이용한 식물체 재분화는 제한된 식물에서만 가능하여 적용 가능한 대상 작물은 한정적이다. 콩에서 원형질체 분리를 통한 유전자 교정 연구가 다양하게 수행되고 있지만 아직까지 원형질체 재분화를 통한 유전자 교정 식물체는 보고되지 않았다(Sun et al. 2015). 따라서 국내 콩 품종의 원형질체를 활용한 다양한 품종 개발을 위해 효율적인 원형질체 분리 및 유전자 도입 방법 그리고 캘러스 유도 등 식물체 재분화를 위한 최적 배양 조건 구명을 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

콩(*Glycine max* (L.) Merr.)은 식물성 기름과 단백질원으로써

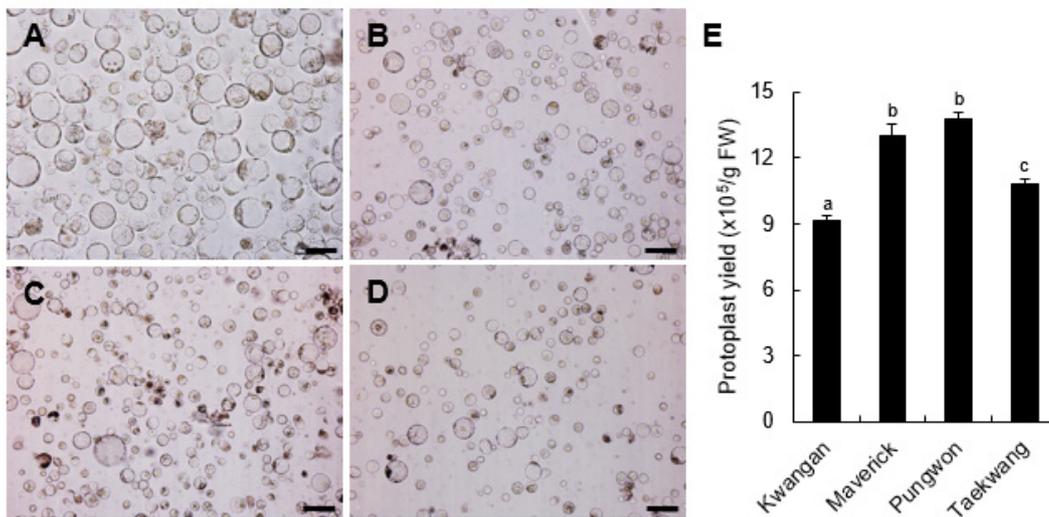


Fig. 5. Yield of protoplast isolation from soybean hypocotyls of different cultivars. Protoplast cells were prepared from 7-days old dark grown soybean seedling hypocotyls. Kwangan (A), Maverick (B), Pungwon (C), and Taekwang (D). (E) Protoplast isolation yield from A to D. Scale bars = 40 µm. The error bars indicate the ±standard deviation of three replicates. Different letters indicate a significant difference determined by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test ($p < 0.05$).

경제적으로 가장 중요한 곡물 중 하나이다. 최근 몇 년 동안 빠르게 발전하고 있는 유전자 교정 기술은 많은 작물에서 유전자 기능 분석과 더불어, 중요 농업 형질의 개선을 위한 광범위한 적용 가능성을 보여주고 있다. 본 연구에서는 국내 콩 품종의 다양한 조직을 이용한 원형질체 분리 및 배양 조건을 확립하고 일시적 발현 시스템에 적용하였다. 콩의 하배축, 자엽, 복엽, 상배축 및 삼복엽 등을 이용하여 원형질체를 분리하였고, 하배축 이용 시 0.5% cellulase, 0.5% pectinase 그리고 1% viscozyme 조건에서 8시간 배양하였을 때 가장 높은 수율의 원형질체가 분리됨을 확인하였다. 또한 하배축 원형질체에 green fluorescent protein (GFP)을 주입하여 높은 수율의 유전자 도입 조건을 확보하였다. 본 연구를 통해 확립한 국내 콩 품종의 원형질체 분리와 유전자 도입 방법은 매우 효율적이며 생물학적 및 생리학적 과정을 이해하기 위한 유전자 기능 및 분자 분석에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립식량과학원 어젠다 사업(과제번호: PJ0149542021)과 차세대농작물신육종기술개발사업(과제번호: PJ015157032021)의 지원에 의해 이루어졌습니다. 본 연구는 2021년도 농촌진흥청 국립식량과학원 전문연구원 과정 지원사업으로 이루어졌습니다. 또한 연구 수행을 위해 실험적 지원을 해주신 국립식량과학원 작물기초기반과 강현애, 이옥경 선생님과 Maverick 품종의 종자를 분양해 주신 성순기 박사님을 포함한 LG팜한농 관계자분들께 감사드립니다.

REFERENCES

- Andersson M, Turesson H, Olsson N, Falt AS, Ohlsson P, Gonzalez MN, Samuelsson M, Hofvander P. 2018. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol Plant* 164: 378-384.
- Arndell T, Sharma N, Langridge P, Baumann U, Watson-Haigh NS, Whitford R. 2019. gRNA validation for wheat genome editing with the CRISPR-Cas9 system. *BMC Biotechnol* 19: 71.
- Berger B, Stracke R, Yatusevich R, Weisshaar B, Flügge UI, Gigolashvili T. 2007. A simplified method for the analysis of transcription factor-promoter interactions that allows high-throughput data generation. *Plant J* 50: 911-916.
- Burris KP, Dlugosz EM, Collins AG, Stewart CN, Lenaghan SC. 2016. Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Cell Rep* 35: 693-704.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18: 675-689.
- Christou P, Murphy JE, Swain WF. 1987. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3962-3966.
- Cocking EC. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-963.
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. 2005. Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiol Plant* 27: 117-130.
- Fujikawa Y, Kato N. 2007. Technical advance: Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in *Arabidopsis* protoplasts. *Plant J* 52: 185-195.
- Gresshoff PM. 1980. In vitro culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Bot Gaz* 141: 157-164.
- Grzebelus E, Szklarczyk M, Baranski R. 2012. An improved protocol for plant regeneration from leaf-and hypocotyl-derived protoplasts of carrot. *Plant Cell Tiss Org* 109: 101-109.
- Hammatt N, Davey M. 1988. Isolation and culture of soybean hypocotyl protoplasts. *In Vitro Cell Dev B* 24: 601-604.
- Hirata H, Ohnishi T, Ishida H, Tomida K, Sakai M, Hara M, Watanabe N. 2012. Functional characterization of aromatic amino acid aminotransferase involved in 2-phenylethanol biosynthesis in isolated rose petal protoplasts. *J Plant Physiol* 169: 444-451.
- Holm PB, Olsen O, Schnorf M, Brinch-Pedersen H, Knudsen S. 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res* 9: 21-32.
- Hu WW, Wong SM, Loh CS, Goh CJ. 1998. Synergism in replication of cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) RNA in orchid protoplasts. *Arch Virol* 143: 1265-1275.
- Jia X, Zhang X, Qu J, Han R. 2016. Optimization conditions of wheat mesophyll protoplast isolation. *Agric Sci* 7: 850-858.
- Kanai R, Edwards G. 1973. Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic

- studies. *Plant Physiol* 51: 1133-1137.
18. Kang M, Ahn H, Rothe E, Baldwin I, Kim S-G. 2020. A robust genome-editing method for wild plant species *Nicotiana attenuate*. *Plant Biotechnol Rep* 14: 585-598.
 19. Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Myint Phyu Sin Htwe N, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K. 2015. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *Plant J* 81: 505-518.
 20. Kim HJ, Cho JH, Park JH, Kim KJ, Lee DH, Chung Y-S. 2017. Overexpression of a chromatin architecture controlling ATPG7 has positive effect on yield components in transgenic soybean. *Plant Breed Biotech* 5: 237-242.
 21. Kim H, Choi J. 2020. A robust and practical CRISPR/crRNA screening system for soybean cultivar editing using LbCpf1 ribonucleoproteins. *Plant Cell Rep* 40: 1059-1070.
 22. Koop HU, Steinmüller K, Wagner H, Rößler C, Eibl C, Sacher L. 1996. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* 199: 193-201.
 23. Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31: 688-691.
 24. Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J, Li Y. 2017. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Front Plant Sci* 8: 246.
 25. Li YH, Zhou G, Ma J, Jiang W, Jin LG, Zhang Z, Guo Y, Zhang J, Sui Y, Zheng L. 2014. *De novo* assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nat Biotechnol* 32: 1045-1052.
 26. Lin HY, Chen JC, Fang SC. 2018. A protoplast transient expression system to enable molecular, cellular, and functional studies in *Phalaenopsis* orchids. *Front Plant Sci* 9: 843.
 27. Lin W. 1983. Isolation of mesophyll protoplasts from mature leaves of soybeans. *Plant Physiol* 73: 1067-1069.
 28. Lin W, Wittenbach VA. 1981. Subcellular localization of proteases in wheat and corn mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 67: 969-972.
 29. Marion J, Bach L, Bellec Y, Meyer C, Gissot L, Faure JD. 2008. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 56: 169-179.
 30. Masani MYA, Noll GA, Parveez GKA, Sambanthamurthi R, Prüfer D. 2014. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA micro-injection. *PLoS One* 9: e96831.
 31. Mathur J, Koncz C, Szabados L. 1995. A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Rep* 14: 221-226.
 32. Mathur J, Koncz C. 1998. PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. pp. 267-276. In: Salinas J. (Ed) *Arabidopsis protocols in methods in molecular biology*. Humana Press Inc., Totowa.
 33. Mazarei M, Al-Ahmad H, Rudis MR, Stewart Jr CN. 2008. Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnol J* 3: 354-359.
 34. Melchers G, Labib G. 1974. Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts. *Mol Genet Genomics* 135: 277-294.
 35. Miao Y, Jiang L. 2007. Transient expression of fluorescent fusion proteins in protoplasts of suspension cultured cells. *Nat Protoc* 2: 2348-2353.
 36. Nagata T, Takebe I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
 37. Oh Y, Lee B, Kim H, Kim SG. 2020. A multiplex guide RNA expression system and its efficacy for plant genome engineering. *Plant Methods* 16: 37.
 38. Poulsen GB, Nielsen SV. 1989. Regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of rapessed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) cultivars. *Plant Cell Tiss Org* 17: 153-158.
 39. Sant'Ana RRA, Caprestano CA, Nodari RO, Agapito-Tenfen SZ. 2020. PEG-delivered CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins system for gene-editing screening of Maize protoplasts. *Genes (Basel)* 11: 1029.
 40. Schindele P, Wolter F, Puchta H. 2020. Crispr guide RNA design guidelines for efficient genome editing. *Methods Mol Biol* 2166: 331-342.
 41. Sedivy EJ, Wu F, Hanzawa Y. 2017. Soybean domestication: The origin, genetic architecture and molecular bases. *New Phytol* 214: 539-553.
 42. Sheen J. 2001. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127: 1466-1475.
 43. Shen J, Fu J, Ma J, Wang X, Gao C, Zhuang C, Wan J, Jiang L. 2014. Isolation, culture, and transient transformation of plant protoplasts. *Curr Protoc Cell Biol* 63: 2.8.1-17.
 44. Shultz JL, Kurunam D, Shopinski K, Iqbal MJ, Kazi S, Zobrist K, Bashir R, Yaegashi S, Lavu N, Afzal AJ. 2006. The soybean genome database (SoyGD): A browser for display of duplicated, polyploid, regions and sequence

- tagged sites on the integrated physical and genetic maps of *Glycine max*. *Nucleic Acids Res* 34: D758-D765.
45. Song J, Sorensen EL, Liang GH. 1990. Direct embryogenesis from single mesophyll protoplasts in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell Rep* 9: 21-25.
46. Sun B, Yuan Q, Zheng H, Liang S, Jiang M, Wang MM, Chen Q, Li MY, Zhang Y, Luo Y. 2019. An efficient and economical protocol for isolating, purifying and peg-mediated transient gene expression of Chinese Kale hypocotyl protoplasts. *Plants* 8: 385.
47. Sun X, Hu Z, Chen R, Jiang Q, Song G, Zhang H, Xi Y. 2015. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep* 5: 1-10.
48. Toriyama K, Hinata K. 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci* 41: 179-183.
49. Wei Z, Xu Z. 1988. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep* 7: 348-351.
50. Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalan C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33: 1162-1164.
51. Wu F, Hanzawa Y. 2018. A simple method for isolation of soybean protoplasts and application to transient gene expression analyses. *J Vis Exp* 25: 57258.
52. Wu FH, Shen SC, Lee LY, Lee SH, Chan MT, Lin CS. 2009. Tape-*Arabidopsis* Sandwich-a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* 5: 1-10.
53. Wu HY, Liu KH, Wang YC, Wu JF, Chiu WL, Chen CY, Wu SH, Sheen J, Lai EM. 2014. Agrobast: An efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Methods* 10: 1-16.
54. Yang Y, Li R, Qi M. 2000. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J* 22: 543-551.
55. Yi J, Derynck MR, Li X, Telmer P, Marsolais F, Dhaubhadel S. 2010. A single-repeat MYB transcription factor, GmMYB176, regulates *CHS8* gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Plant J* 62: 1019-1034.
56. Yoo SD, Cho YH, Sheen J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1565.
57. Yu J, Tu L, Subburaj S, Bae S, Lee GJ. 2020. Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Rep* 40: 1037-1045.
58. Zhang X, Wang L, He C, Luo H. 2016. An efficient transient mesophyll protoplast system for investigation of the innate immunity responses in the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Tiss Org* 126: 281-290.
59. Zhang Y, Iaffaldano B, Qi Y. 2021. CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants. *Plant Commun* 2: 100168.
60. Zhou Z, Jiang Y, Wang Z, Gou Z, Lyu J, Li W, Yu Y, Shu L, Zhao Y, Ma Y. 2015. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nat Biotechnol* 33: 408-414.