

콩 품종의 생육특성 및 생육단계별 ADP-Glucose Pyrophosphorylase의 활성변화 비교

김영진*[†] · 이시명** · 조상균* · 오영진* · 김학신*

*국립식량과학원 벼맥류부, **국립농업과학원 농업생명자원부

Comparison of Agronomic Characteristics and Activity Variation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase at Different Growth Stages in Soybean Cultivars

Young Jin Kim*[†], Si Myeong Lee**, Young Jin Oh*, Sang Kyun Cho*, and Hag Sin Kim*

*Div. of Winter Cereal and Forage Crop Research, National Institute of Crop Science, RDA, Iksan 570-080, Korea

**Div. of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT The relationship between ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP) activity and the characteristics of related pod setting in developing seed of soybean cv. Pungsannamulkong, Iksannamulkong, Geumjeongkong #1 and Danpaheuk was studied. AGP activity during the accumulate of the majority of dry matter in all cultivars suggested that this enzyme might be associated with this process. At the Vn and R1 stages, AGP activity of full-grown leaves of Pungsannamulkong, Iksannamulkong, Geumjeongkong #1 was the highest and then decreased progressively. However AGP activity of Danpaheuk was the lowest and also had lower seed weight. So regulation of matter accumulation in developing soybean seeds may also depend on AGP activity. AGP capacities as expressed by AGP activity seem to have a good predicting value for the dry matter of leaf and seed at R1 to R5 stages in our series of R3 stage genotypes. Western blots probed with antibody specific to the subunit of potato AGP revealed a single 60KD immunoreactive band that changed in intensity during the growth cycle in association with changes in total AGP activity.

Keywords : Soybean, AGP activity, pod setting, developing seed, seed weight, Western blot

콩(*Glycine max*)은 종실에 약 40%의 단백질과 20% 정도의 지방을 가지고 있는 영양학적으로 매우 중요한 작물이다. 또한 콩은 수천 년 전부터 한반도에서 재배되어 왔으며, 콩으로 만든 된장, 간장, 두부, 콩나물 등의 식품들은 한국

민의 식생활에서 무시할 수 없는 전통식품으로 자리 잡아 왔다. 그러나 최근 재배면적의 감소와 더불어 수입산 콩의 증가로 콩의 자급률은 6.4%에 지나지 않으며 식용콩으로서의 자급률도 28.2%에 지나지 않는 실정이다(2008, 농림식품부). 또한 종실 수량도 250kg/10a 내외로 화본과 작물들에 비하여 50% 수준 밖에 되지 않는데, 이는 에너지대사 과정에서 glucose의 단백질로의 전환율이 지방이나 탄수화물로의 전환율보다 낮기 때문인 것으로 보고한바 있다(山口 등, 1975). 앞에서 광합성에 의해 생성된 탄수화물은 주로 sucrose 형태로 종자 등의 저장기관으로 이동한 후 invertase나 sucrose synthase 등의 작용에 의해 glucose phosphate와 fructose로 분해된다. 생성된 glucose phosphate는 일련의 대사과정을 거쳐 ADP-glucose가 되며 이후 starch synthase 등의 작용을 받아 전분이 합성된다. 전분합성효소인 ADP-glucose pyrophosphorylase(AGP)는 glucose-1-phosphate와 ATP가 만나서 전분생합성 기질인 ADP-glucose와 pyrophosphate를 생산하는 효소반응에 관여하는 세 개의 amyloplast 특이효소의 첫 번째 효소로서(Keeling *et al.*, 1988) 식물의 저장기관과 앞에서의 광합성산물 분배의 역할을 수행함으로써 전분의 합성을 증가시킨다(Preiss, 1991). 박테리아의 AGP는 단일 유전자가 생산하는 펩타이드 4개로 구성된 homotetramer 이며 식물의 AGP는 2종류의 유전자에 의해 생성된 large subunit(ls)와 small subunit(ss) 2개씩 결합하여 이루어진 heterotetramer이다. 식물 AGP 각 subunit의 기능을 보면 ADP-glucose 생산반응에 관여하는 반응은 ss peptide의 기능이며, ls peptide의 기능은 AGP의 활성조절인 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2001; Park and Chung, 1998).

[†]Corresponding author: +82-63-840-2237

(E-mail) yjikim@rda.go.kr < Received March 4, 2010 >

E. coli 유래의 AGP 유전자를 이용하여 형질전환한 감자, 옥수수 및 *Arabidopsis*의 경우 전분합성 및 수량이 20-30% 이상 증가하였는데(Muller-Rober *et al.*, 1994; Zhangying *et al.*, 2007), 만약 성숙단계별로 콩 종자의 AGP 활성의 변화가 탐색된다면, 이미 cloning 되어 있는 AGP 유전자(김 등, 1998)를 콩에 형질전환 하여 전분 합성량을 증가시키고, 2차적으로 지방산 관련효소를 조작함으로써 유지량을 증대시키는 기초자료로서 이용될 수 있을 것이다. 따라서 콩의 생산성을 높이는데 중요한 역할을 하는 효소의 활성변화를 콩의 성숙단계별로 조사하여 종실 수량과의 관련성 여부를 탐색하였다.

재료 및 방법

생태형이 서로 다른 풍산나물콩, 익산나물콩, 검정콩1호, 단파흑 4품종을 공시하여 2000년 5월 26일에 국립식량과학원 벼맥류부 전작포장에서 단작 표준재배법에 준하여 파종 및 관리를 하였다. 공시품종의 엽수 및 엽면적은 R₂ 시기에 조사하였으며 개체당 결협관련 특성들은 성숙기에 조사하였다. 잎의 단위별 광합성능은 V₅시기에 완전 전개된 중위 엽을 대상으로 적외선개스분석기(Infra-red gas analyzer, LCA-4, ADC Ltd., UK.)로 오전 10:00~11:00 사이에 광도(PPFD)가 광포화상태를 유지하는 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상일 때 5반복 측정하였다. AGP의 활성 측정은 Sowokinos(1976)와 Huber(1983)의 방법에 의해 수행하였다. 생육단계별로 Vn(영양생장기), R₁(개화시), R₂(개화기), R₃(착협시), R₄(착협성기) 및 R₅(립비대시)시기에 완전 전개된 상위 4번째 잎을 각 품종당 10개체로부터 채취하여 -70°C에 저장하였다. 그 후 저장 중인 시료를 이용하여 막자사발에서 액체질소를 넣고 잘 마쇄한 다음 4°C의 extraction buffer(20 mM HEPES, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 소량의 PI)로 효소를 추출하고

reaction buffer(75 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM 3-phosphoglycerate, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 1.5 mM ADP-glucose, 0.6mM NAD⁺, 2Unit phosphoglucomutase, 미생물원 유래의 2Unit glucose 6-phosphate dehydrogenase, enzyme)에서 반응시킨 후 최종 반응액으로서 0.15M NaPPi를 반응시켜 Spectrophotometer(Biospec 1601, Shimadzu Co)의 340nm 파장대에서 5분 간격으로 흡광도를 측정하여 AGP의 활성을 조사하였는데, 효소를 기질과 반응시키기 전에 crude protein을 CBB 방법에 준하여 595nm의 파장에서 농도를 조사하여 반응에 들어가는 효소의 양을 일정하게 통일시킨 후 효소의 활성을 측정하였다. Western blot을 수행하기 위해 crude extract 10 μg 을 취하여 SDS-PAGE 단백질 전기영동을 수행한 후 gel을 membrane에 blotting 하였으며, 국립농업과학원 농업생명자원부에서 antibody를 분양 받아 1차로 감자 AGP의 small subunit을 1,000배 희석하고 2차로 토끼의 혈청으로부터 추출한 HRP(horse radish peroxidase) antibody를 1,000배 희석하여 반응시킨 후 X-ray film 상에서 immunoblot의 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 공시품종의 생육특성을 나타낸 것으로 엽수 및 엽면적은 R₂ 시기에 조사하였으며 그 외의 형질들은 수확 후 조사한 결과이다. 농업형질 중에서 공시품종들의 엽수와 엽면적의 변이가 가장 컸다. 풍산나물콩은 엽수 및 엽수가 개체당 131개 및 102개로 가장 많았는데, 100립중은 10.4g으로 가장 낮았으나 수량은 275 kg/10a으로 가장 높아 물질생산 및 건물축적 효율이 우수한 것으로 나타났다. 그런데 단파흑은 개체당 엽면적이 3,968 cm²로 가장 많고 100립중도 30.5 g으로 가장 높은 반면, 수량은 149 kg/10a으로 가장 낮아 sink로 축적되는 source의 능력인 건물축적 효율이

Table 1. Agronomic characteristics of soybean.

Cultivar	Plant height	No. of branch	No. of node	No. of pod	No. of leaf	leaf area	Leaf area /plant	100-seed wt.	Yield
	cm					cm ²	cm ²	g	kg/10a
Pungsannamulkong	56.0	3.8	14.8	130.8	102	2245	22.0	10.4	275
Iksannamulkong	67.0	4.0	14.0	60.3	70	1514	21.6	12.6	240
Geumjeongkong#1	61.4	4.5	15.2	72.2	76	2976	39.2	20.3	191
Danpaheug	78.1	3.7	18.0	3.5	90	3968	44.1	30.5	149
Average	65.6	4.0	15.5	66.7	84.5	2,676	31.7	18.5	214
CV(%)	12.5	1.3	3.7	53.4	23.7	46.4	8.4	15.3	18.5

가장 낮았다.

Table 2는 공시품종의 1개체 당 결협관련 특성을 나타낸 것으로 성숙기에 조사한 결과이다. 풍산나물콩은 성숙기가 가장 짧아 나물콩 임에도 가장 높은 종실건물중(18.2g)을 나타내었는데 극대립인 단파흑의 경우 성숙기가 가장 늦고 종실건물축적 효율이 떨어지므로 가장 낮은 수치(9.8g)를 보였다. 립경비율은 익산나물콩이 40.6%로 가장 높았으며 검정콩1호가 20.6%로 가장 낮았다.

품종별 CO₂ 동화량은 풍산나물콩이 20.96 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 가장 높았으며 검정콩1호는 12.54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 가장 적었다. 수분이용효율은 풍산나물콩이 18.9 mmol mol^{-1} 로 가장 높아 건물생산에 효율적인 품종이었으며 익산나물콩이 9.8 mmol mol^{-1} 로 가장 낮은 수치를 보였고 기공전도도에서는 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 3). 풍산나물콩은 잎이 세장형이면서 잎의 단면이 두꺼워 광합성 효율이 좋은 반면, 검정콩1호는 잎이 환형이면서 광합성 효율이 낮았다. 이는 Shibles *et al.*(1987)과 김 등(2003)이 콩 잎이 소엽이면서 두꺼운 품종들은 잎 두께가 얇고 큰 잎을 가진 품종들보다 더 많은 엽록체를 가지고 있어서 엽면적당 광합성 효율이 좋다고 하였으며, Mian *et al.*(1998)이 콩잎이 넓으면 잎의 두께가 얇아진다고 보고한 결과와 일치하는 경향을 나타냈다.

Fig. 1 에서 콩의 생육에 따른 잎의 AGP활성은 풍산나물콩과 검정콩1호의 경우 개화 이전의 시기에는 각각 534 $\mu\text{mol/mg/hr}$ 및 319 $\mu\text{mol/mg/hr}$ 였으나 개화가 시작될 때에는 600 $\mu\text{mol/mg/hr}$ 이상으로 최고치를 나타냈다가 그 이후 점차 감소하는 경향이였다. R₃ 시기의 개체당 결협관련 특성들을 살펴보면 협중, 엽중, 경중, 종실 건물중 및 지상부 건물중이 풍산나물콩과 검정콩1호가 다른 두 품종에 비해서 월등하게 높은 것을 알 수 있는데(Table 2), 이 같은 결과는 개화기의 높은 AGP 활성으로 인한 전분축적의 결과로서 해석될 수 있을 것이다. Crafts-Brandner(1992)는 AGP의 활성이 생육단계에 따른 콩 잎의 전분함량과 정확하게 일치하지는 않았다고 하였으나, Kerr *et al.*(1984)은 대부분의 경우 전분축적은 SPS(sucrose phosphate synthase)와 관련은 없지만 AGP의 활성과는 관련이 있으며, SPS 활성은 콩 품종에 있어서 성장률과 유의한 상관을 가지고 있다고 하여 본 시험과 유사한 결과를 나타내었다. 반면, 단파흑의 경우 개화 시작 전부터 AGP의 활성이 낮고 그 이후에도 계속 감소하는 경향을 나타내었는데(Fig. 1), 그 결과 R₃ 시기의 개체당 협중이 0.2 g이며 종실건물중도 9.8 g에 불과하게 나타난 것으로 보인다(Table 2). 특수콩의 경우 검정콩1호의 AGP 활성은 R₅ 시기까지도 200 $\mu\text{mol/mg/hr}$ 내외를 유지했는데 반해, 단파흑은 개화기(R₂)에서부터 낮은 AGP

Table 2. Characteristics of related pod setting in developing seed of soybean.

Cultivar	Pod dry weight	Leaf dry weight	Stem dry weight	Seed dry weight	Total dry weight	Seed/total dry weight
	g	g	g	g	g	%
Pungsannamulkong	9.1	11.9	20.5	18.2	59.7	30.5
Iksannamulkong	5.6	6.8	10.7	15.8	38.9	40.6
Geumjeongkong#1	9.5	13.2	25.9	12.6	61.2	20.6
Danpaheug	0.2	10.8	21.6	9.8	42.4	23.1
Average	6.1	10.7	19.7	14.1	50.6	28.7
CV(%)	18.7	7.8	13.3	9.7	23.7	13.4

Table 3. Photosynthesis parameters of individual leaves, as determined from the measurement of CO₂ exchange.

Cultivar	CO ₂ assimilation	Transpiration	Water use efficiency	Stroma conductivity
	$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	mmol mol^{-1}	$\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Pungsannamulkong	20.96	1.11	18.9	0.03
Iksannamulkong	19.24	1.96	9.8	0.04
Geumjeongkong #1	12.54	0.91	13.8	0.03
Danpaheug	18.15	1.23	14.8	0.04
Average	17.72	1.30	14.3	0.04

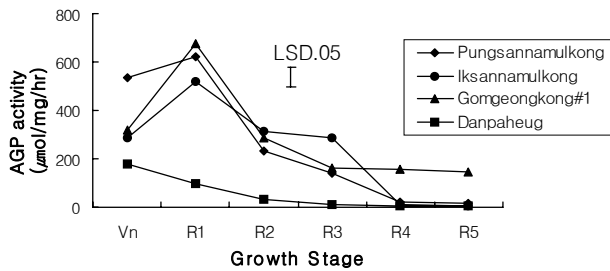


Fig. 1. Changes of AGP activity of leaves at different growth stages in soybean.

활성을 나타내어 그 수량성도 149 kg/10a에 불과한 것을 알 수 있었다(Table 3).

Fig. 2는 풍산나물콩 잎에서 추출한 총 단백질로부터 Western blot을 수행한 결과를 나타낸 것으로 AGP의 small subunit는 60KD의 single band를 나타냈는데 그 양은 영양생장기에 최고점을 보였다가 생육단계별로 점차 감소하는 경향이였다. 풍산나물콩의 경우 AGP 활성변화는 영양생장기보다 개화시에서 약간 높은 경향이였으나 AGP의 small subunit 에서는 영양생장기에서 약간 높은 경향을 보였고 개화기 이후 AGP의 활성변화와 일치하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과에서 콩의 등숙기간 중 잎에서의 AGP 활성 변화는 품종별로 따라 생육시기별로 다르게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

적 요

콩의 생산성을 높이는데 중요한 역할을 하는 효소의 활성 변화와 종실 수량과의 관련성을 탐색하기 위해 등숙관련효소인 ADP-glucose pyrophosphorylase(AGP)의 활성변화를 콩 품종별로 등숙기간에 따라 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 풍산나물콩은 협수 및 잎수가 131개 및 102개로 가장 많았으며, 100립중은 10.4g으로 가장 낮았으나 수량은 275kg/10a으로 가장 높아 물질생산 및 건물축적 효율이 우수한 것으로 나타났는데, 개화시기(R₁, R₂)에 AGP의 활성도 가장 높은 경향이였다.
2. 품종별 CO₂ 동화량은 풍산나물콩이 20.96 μmol m⁻²s⁻¹로 가장 많았으며 검정콩1호는 12.54μmol m⁻²s⁻¹로 가장 적었다.
3. 단파흑은 개체당 잎면적이 3,968cm²로 가장 많고 100립중도 30.5g으로 가장 높은 반면 수량은 149kg/10a으로

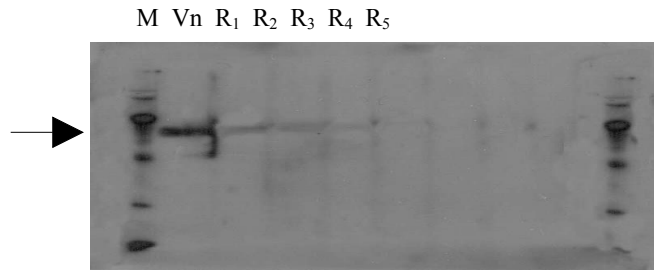


Fig. 2. Western blot analysis in soybean (cv. Pungsannamulkong). M : protein marker; Vn : vegetable stage, R : reproductive stages.

가장 낮아 건물축적 효율이 가장 낮았으며, 생육단계별 AGP활성도 가장 낮은 수치를 나타냈다.

4. AGP의 small subunit은 60KD의 single band를 나타냈는데 개화기 이후 AGP의 활성변화와 일치하는 경향을 보였다.

인용문헌

김동현, 이시명, 황영수. 1998. 식물의 전분합성 관련효소 특성 구명 연구. 농업과학원 시험연구사업보고서(생물자원부편) pp. 488-495.

김영진, 이강세, 천상욱, 오영진, 김경호, 최재성, 이문희. 2003. 엽형에 따른 콩 품종의 광합성 능력과 잎의 해부형태 비교. 한국작물학회지 48(3):248-251.

山口淳一, 河内和, 田中明. 1975. 作物 生長效率に 關する 研究 (第5報). 日本土肥雜誌 46(4):120-125.

Choi SB, Kim KH, Kavakli IH, Lee SK and Okita TW. 2001. Transcriptional expression characteristics and subcellular localization of ADP-glucose pyrophosphorylase in the oil plant *Perilla frutescens*. Plant and Cell Physiol. 42(2):146-153.

Crafts-Brandner SJ. 1992. Phosphorus nutrition influence on starch and sucrose accumulation, and activities of ADP-glucose pyrophosphorylase and sucrose-phosphate synthase during the grain filling period in soybean. Plant Physiol. 98:1133-1138.

Huber SC. 1983. Role of sucrose-phosphate synthase in partitioning of carbon in leaves. Plant Physiol. 71:818-821.

Keeling PL, Wood JR, Tyson RH and Bridges IG. 1988. Starch biosynthesis in developing wheat grain. Plant Physiol. 87: 311-319.

Kerr PS, Huber SC, and Israel DW. 1984. Effect of source on soybean leaf sucrose phosphate synthase starch formation and whole plant growth. Plant Physiol. 75:483-488.

Mian, M. A. R., R. Wells, T. E. Carter Jr., D. A. Ashley, and H. R. Boerma. 1998. RFLP tagging of QTLs conditioning specific leaf weight and leaf size in soybean. *Theo. and*

- Appl. Gen.* 96:354-360.
- Muller-Rober B., U. L. Cognata, U. Sonnewald and L. Willmitzer. 1994. A truncated version of an ADP-glucose pyrophosphorylase promoter from potato specifies guard cell-selective expression in transgenic plants. *The Plant Cell* 6(5):601-612.
- Park, SW. and Chung, WI. 1998. Molecular cloning and organ-specific expression of three isoforms of tomato ADP-glucose-pyrophosphorylase gene. *Gene* 206:215-221.
- Preiss J. 1991. Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol.* 7:59-114.
- Shibles, R. J. Secor, and D. M. Ford. 1987. Carbon assimilation and metabolism. In JR Wilcox, ed, Soybeans: Improvement, production, and uses. Amer. Soc. of Agron., Madison, WI, pp. 535-588.
- Sowokinos JR. 1976. Pyrophosphorylase in *Solanum tuberosum* I. Changes in ADP-glucose and UDP-glucose pyrophosphorylase activities associated with starch biosynthesis during tuberization, maturation and storage of potatoes. *Plant Physiol.* 57:63-68.
- Zhangying W., C. Xiaoping, W. Jianhua, L. Tingsong, L. Yan, Z. Li and W. Guoying. 2007. Increasing maize seed weight by enhancing the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in transgenic maize plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88(1):83-92.