

Breeding of Green Soybean Strain with Green Cotyledon and Tetra Null Genotype

Sarath Ly¹, Jeong Hwan Lee¹, Hyeon Su Oh¹, Se Yeong Kim¹, Jin Young Moon² and Jong Il Chung^{1*}

¹Department of Agronomy, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

²Department of Crop Research, Gyeongnam Agricultural Research & Extension Services, Jinju 52733, Korea

Received July 7, 2023 / Revised July 26, 2023 / Accepted July 27, 2023

A soybean cultivar with a green seed coat and cotyledon contains high levels of lutein, which is beneficial for eye health. Plus, antinutritional components such as lipoxigenase, Kunitz trypsin inhibitor (KTI), lectin and stachyose exist in the mature seed. The genetic elimination of these antinutritional factors is a necessary step in green soybean breeding. This research was conducted to improve a new green soybean line with the green cotyledon and tetra null genotype (*lox1lox2lox3tilers2*) in terms of lipoxigenase, KTI, lectin and stachyose. We used five germplasms to develop a breeding population. A total of 69 F₂ seeds were obtained from the cross of parent 1 and parent 2, and from those, 21 F₂ seeds were selected that had the green seed coat color, and which were free of lectin protein. Next, four F₂ plants with the green seed coat and tetra null genotype were selected from the breeding population derived from four genotypes. The absence of lipoxigenase, KTI and lectin proteins was confirmed in the F₅ strain. The breeding line has a green seed coat, green cotyledon and white hilum color. The 100-seed weight and stachyose content for the breeding line were 30.7 g and 2.40 g/kg, respectively. The line selected in this study could be used as a cultivar or parent to improve colored soybean cultivars through the removal of antinutritional components such as lipoxigenase, KTI, lectin and stachyose.

Key words : Green soybean, KTI, lectin, stachyose, tetra null

서 론

콩(*Glycine max* (L.) Merr. 2n=40)은 한반도를 포함한 동북아시아가 원산지로 알려져 있으며, 성숙 종실에는 보통 탄수화물 30%, 단백질 40%, 지질 20% 정도가 함유되어 있는 대표적인 두과작물이다. 녹색콩에는 노란콩이나 검은콩에 비하여 lutein 함량이 월등히 높은 것으로 알려져 있으며[12, 13], lutein은 carotenoid 성분의 하나로 몸에서 합성될 수 없어 음식으로만 섭취 가능하고 섭취시 눈병, 시력저하, 황반변성, 백내장과 같은 안질환의 예방 및 개선에 효과가 있다고 알려져 있다[1]. 녹색콩 품종이나 유전자원의 성숙 종실에는 lipoxigenase, Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI), lectin의 단백질과 stachyose와 같은 대표적인 항영양성분이 존재한다.

Lipoxigenase 단백질은 산화환원효소의 일종으로 지방

산의 산화작용을 촉매시키고 콩에서 비린내를 유발한다. 콩의 비린내 발생에는 3개의 lipoxigenase isozyme (L-1, L-2, L-3)이 관여하는 것으로 보고되어져 있다[8]. Lipoxigenase isozyme들은 각각 *Lox1*, *Lox2*, *Lox3* 유전자에 의해 지배된다[4, 6, 8]. *Lox1*과 *Lox2* 유전자는 chromosome 13번에 위치하며 서로 밀접하게 연관되어 있고, *Lox3* 유전자는 chromosome 15번에 위치하여 *Lox1*과 *Lox2*와는 서로 독립적으로 유전된다[4]. *Lox1*, *Lox2*, *Lox3* 유전자들이 모두 열성동형접합형일 때 성숙 종실에서 lipoxigenase 단백질이 부재하여 콩 종자에서 비린내가 발생하지 않는다. KTI 단백질은 췌장에서 분비되는 단백질 분해효소인 trypsin의 억제제로 췌장에서 단백질 가수분해 활동을 억제하여 단백질의 소화에 부정적인 영향을 미치고[9, 10], 췌장 비대증을 유발하는 것으로 알려져 있다[17]. KTI 단백질은 단일 유전자 *Ti*에 의해 지배되고[14], *Ti* 유전자가 열성동형접합형일 때 KTI 단백질이 콩 종실에 존재하지 않는다. Lectin은 당에 특이적으로 결합하는 단백질로서 구조가 안정하여 protease에 의해 쉽게 분해되지 않는 특성을 가지며 섭취 시 장내 상피세포와 결합하여 구조와 기능을 변형시키고 소화와 흡수에 부정적인 영향을 야기한다[16, 22]. 또한 적혈구를 응집시키는 특성을 가지며 콩 식품 섭취 후 메스꺼움, 구토, 설사 등의 급성증상을

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-1872, Fax : +82-55-772-1879

E-mail : jongil@gnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

유발한다[11]. 콩에서 lectin 단백질은 단일유전자 *Le*에 의해 발현되며[15], *Le* 유전자가 열성 동형접합형일 때 Lectin 단백질이 콩 종실에서 존재하지 않는다. 콩 종실에 존재하는 raffinose와 stachyose는 대두에서 각각 1%와 4% 정도 함유되어져 있고[7], 난소화성당으로 인체 내에서 분해 및 흡수가 불가능하다. 분해되지 못한 raffinose와 stachyose는 장내 미생물에 의해 발효되면서 N₂, CO₂, methane 등의 가스를 발생시키고 복부 팽만감을 유발시킨다[18, 21]. 콩에서 *RS2* 유전자가 raffinose와 stachyose 함량에 크게 영향을 미치며 열성동형접합형일 때 콩 종실에서 stachyose의 함량이 크게 낮아진다[5].

녹색콩에 존재하는 이러한 항영양성분들을 불활성화시키기 위하여 고온처리나 첨가제 처리가 수반되지만 완전히 불활성화 되지 않으며, 열처리시 필수 아미노산 및 다른 유용 성분이 파괴되고 가공과정상 추가 비용이 발생한다. 따라서, 성숙 종실에서 항영양성분이 유전적으로 제거된 녹색콩의 계통 육성이 필요하다. 이러한 녹색콩 계통은 종피 및 자엽속에 포함되어 있는 lutein 성분의 장점으로 전두유 개발을 위한 좋은 재료가 될 것으로 보여 진다. 현재까지 성숙 콩 종실에서 KTI, lectin 및 P34의 3가지 단백질이 모두 부재한 triple null 유전자형을 가진 녹색콩 계통의 선발에 관한 보고가 있다[3]. 본 연구는 성숙 종실에서 녹색 자엽을 가지면서 lipoxxygenase, KTI 및 lectin의 3가지 단백질이 모두 없으면서 stachyose의 함량이 매우 낮은 tetra null 유전자형을 가진 녹색콩 계통을 육성하기 위하여 진행되었다.

재료 및 방법

모본 및 계통 육성

녹색콩에서 가공성과 영양성 및 기능성을 떨어뜨리는 주요 성분으로 알려진 lipoxxygenase, KTI 및 lectin의 3가지 단백질이 모두 없으면서 stachyose의 함량이 매우 낮은 녹색 종피색과 tetra null 유전자형(*lox1lox2lox3tilers2*)을 가진 계통을 선발하기 위하여 5개의 자원이 모본으로 이용되었다. 이용된 모본에 대한 종피색, 자엽색 및 항영양성분에 대한 형질은 Table 1과 같다.

GS146 x ‘진품2호’의 교배를 통하여 녹색종피와 자엽을 가지면서 lipoxxygenase 단백질이 부재한 *lox1lox2lox3* 유전자형을 가진 개체가 선발되었다. PI200508은 *rs2rs2* 유전자형을 가져 stachyose의 함량이 2.35 g/kg으로 매우 낮은 자원이다. 선발개체와 PI200508과의 교잡으로 lipoxxygenase 단백질이 부재하면서 stachyose의 함량이 낮고 녹색종피와 자엽을 가진 *lox1lox2lox3rs2* 유전자형 개체가 선발되었다. ‘개척1호’와 선발된 녹색종피 및 자엽이면서 *lox1lox2lox3rs2* 유전자형 개체와의 교배로부터 lipoxxygenase 및 KTI의 2가지 단백질이 모두 부재하면서 stachyose의 함량이 낮은 *lox1lox2lox3tirs2* 유전자형과 녹색종피 및 자엽을 가진 개체가 선발되었다. ‘개척1호’와 PI548392와의 교배를 통하여 lipoxxygenase-2,3, KTI 및 lectin 단백질이 없고 검정종피와 녹색자엽을 가진 *lox2lox3tile* 유전자형 개체가 선발되었다. 선발 개체와 녹색종피 및 자엽이며 lipoxxygenase 단백질이 부재한 개체와의 교배를 통하여 검정종피와 녹색자엽을 가지면서 lipoxxygenase, KTI, lectin의 3가지 단백질이 모두 없는 *lox1lox2lox3tile* 유전자형 개체가 선발되었다. 선발된 녹색종피 및 자엽이면서 lipoxxygenase 및 KTI의 2가지 단백질이 모두 없으면서 stachyose의 함량이 낮은 *lox1lox2lox3tirs2* 유전자형 개체와 검정종피와 녹색자엽을 가지면서 lipoxxygenase, KTI, lectin의 3가지 단백질이 모두 없는 *lox1lox2lox3tile* 유전자형 선발개체와의 교배를 통하여 F₁ 종자를 얻은 후 F₁ 식물체로 양성하였다. 잡종성이 확인된 F₁ 식물체로부터 F₂ 종자를 얻었다. 각각의 F₂ 종자를 이용하여 lectin 단백질이 부재하면서 녹색종피를 가진 종자가 선발되었다. 선발된 F₂ 종자는 F₂ 식물체로 양성되었으며 각각의 F₂ 식물체중에서 stachyose의 함량이 낮은 개체가 선발되었다. 선발된 개체는 F₃ 계통으로 유지되면서 초형, 경장, 성숙기, 백립중등 양호한 계통이 선발되었다. 선발계통은 F₄ 계통과 F₅ 계통으로 세대진전 되었다. F₅ 계통의 수확 후 임의의 종자를 이용하여 lipoxxygenase, KTI 및 lectin의 3가지 단백질의 부재와 stachyose의 저 함량에 대한 유전적 고정이 검정되었다. 녹색콩 대조품종으로 ‘청미인’[19]의 종자와 F₅ 계통의 수확종자에 대하여 종피색, 자엽색, 백립중등을 조사하였다. 녹색종피 및 자엽과 tetra null 유전자형을 가진

Table 1. Seed coat and cotyledon color, presence or absence of lipoxxygenase, KTI and lectin proteins and content of stachyose for five parents used in this experiment

Germplasm Name	Lipoxxygenase			KTI	Lectin	Stachyose content	Seed Coat color	Cotyledon color
	1	2	3					
GS146	Present	Present	Present	Present	Present	Normal	Green	Green
‘Jinpum#2’	Absent	Absent	Absent	Present	Present	Normal	Yellow	Yellow
‘Gaechuck#1’	Present	Absent	Absent	Absent	Present	Normal	Black	Green
PI548392	Present	Present	Present	Absent	Absent	Normal	Black	Yellow
PI200508	Present	Present	Present	Present	Present	Low	Yellow	Yellow

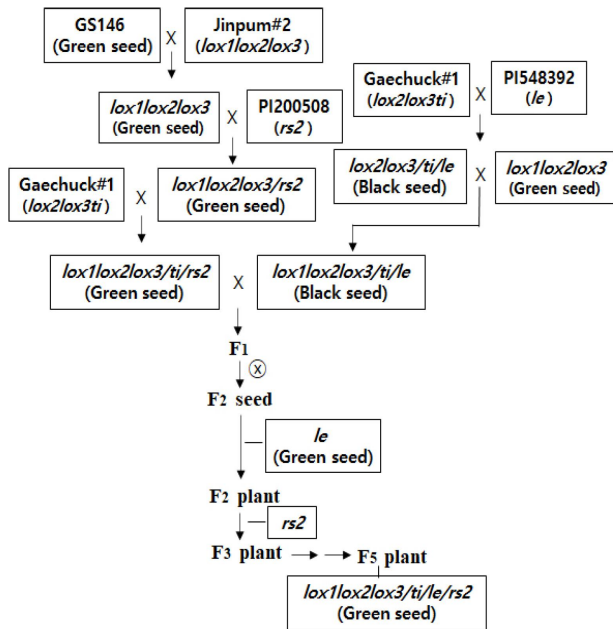


Fig. 1. Scheme for selection of green soybean strain with tetra null genotype (*lox1lox2lox3tilers2*) and green cotyledon.

계통의 육성과정은 Fig. 1과 같다.

SDS-PAGE를 이용한 lipoxigenase 단백질 확인

녹색종피 및 자엽과 tetra null 유전자형을 가진 F₅ 계통의 수확 종자와 녹색콩 대조품종 ‘청미인’의 임의의 종자를 이용하여 SDS-PAGE 방법으로 lipoxigenase 단백질의 존재여부를 확인하였다. 각 시료를 막자 사발에 넣고 막자로 찢어서 가루로 만든 다음 0.5 ml의 buffer [1M Tris, pH 8.0]를 첨가하고 미세하게 갈아준 후 1.5 ml의 microcentrifuge tube에 옮겨 4°C에서 25분간(15,000 rpm) 원심분리를 하였다. 세 층으로 분리된 것 중 제일 위층의 얇은 막 부분을 제거하고 그 아래층의 단백질 부분을 새 microcentrifuge tube로 옮겨 정제와 정량을 하고 SDS-PAGE의 gel을 이용하는 방법 중 discontinuous gel 방법을 이용하여 전기영동을 통해 분석을 실시하였다. 두 개의 유리판을 ethanol로 깨끗이 닦고 유리판 사이에 spacer를 끼워 넣은 다음 주위를 테이프로 감았다. Running gel로 pH 8.8 기준의 12% Acrylamide gel 용액을 제조하여 두 유리판 사이에 붓고 n-butanole을 조심스럽게 첨가한 뒤 gel을 굳혔다. Gel이 굳을 만큼 충분한 시간이 지난 뒤 gel이 굳으면 상층의 n-butanole을 버리고 pH 6.8 기준의 5% Acrylamide gel 용액의 stacking gel을 붓고 comb를 꽂고 충분한 시간을 주어 stacking gel을 굳혔다. Gel이 굳는 동안 종실에서 추출한 각 단백질과 5X sample buffer를 5 µl씩 혼합한 뒤 혼합액이 담긴 microcentrifuge tube를 끓는 물에 5분간 담근 후 만들어진 gel에 분주하여 70 V에서 16시간 동안 loading하

여 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 staining solution (0.25 g coomassie brilliant blue R250, 10% acetic acid, 45% methanol)에 충분히 염색을 한 다음 destaining solution (10% acetic acid, 45% methanol)에 탈색을 시켜 lipoxigenase (97 kDa) 단백질의 존재 여부를 확인하였다.

Western Blot을 이용한 KTI 및 lectin 단백질 확인

장려품종(‘청미인’)과 선발계통의 임의의 종자 및 개개의 F₂ 종자를 이용하여 Western Blot 방법으로 KTI 및 lectin 단백질의 존재 여부를 확인하였다. Sample 종자로부터 추출한 단백질 시료의 농도를 정량한 후 12% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 하였다. Gel에서의 분리된 단백질을 PVDF membrane에 옮긴 후 2시간 동안 blocking buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% nonfat dried milk)에 담갔다. 이후 1차 antibody인 KTI antibody와 Lectin antibody를 1시간 동안 반응시킨 후 TTBS buffer (20 mM, Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 5분씩 3번 씻고, 2차 antibody (Bio-Rad, Catalog Number 170-6516, USA)와 1시간 동안 반응시켰다. 2차 antibody 처리가 끝난 membrane들은 TTBS에서 5분씩 3회에 걸쳐 washing 되었고, washing이 완료된 membrane 들을 detection reagent kit (Ab signal, Abclon Inc.)에 처리하여 Chemi-luminescence Bioimaging Instrument (CheBI, NeoScience Co., Ltd)를 통해 KTI (21.5 kDa) 및 lectin (120 kDa) 단백질의 유무를 확인하였다.

DNA 마커를 이용한 rs2rs2 유전자형 개체 선발

콩에서 stachyose 함량에 영향을 미치는 RS2 유전자 마커를 이용하여 F₂ 식물체중에서 rs2rs2 유전자형을 가진 개체를 선발하였다[2, 5]. 모본 및 개개의 F₂ 식물체의 어린 잎을 2 ml 원심분리 튜브에 넣고 액체질소를 추가하여 잎을 마쇄하였다. 마쇄한 잎이 들어 있는 각각의 sample tube에 CTAB extraction buffer [CTAB, 5M NaCl, 1M Tris, 0.5M EDTA, 14M 2-mercaptoethanol] 500 µl를 넣어준 뒤 항온수조에 1시간 반응시킨 후 상온에서 10분 동안 식혀 주었다. 충분히 식혀진 sample tube에 chloroform/octanol (24:1) 500 µl를 추가하여 10분 동안 섞어 주었고, 섞은 후 4,300 rpm, 4°C 조건에서 12분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액만 추출하여 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 담았고 상층액이 옮겨진 각각의 sample tube에 냉동 보관된 isopropanol 500 µl를 넣어준 뒤 잘 섞어 -80°C 초저온 냉동고에서 30분간 보관하였다. 30분 후 멎쳐진 덩어리를 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 담았고, 덩어리가 옮겨진 각각의 sample tube에 80% ethanol 500 µl를 넣어준 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 ethanol을 제거하였고 ethanol이 제거된 sample tube를 10분간 상온에서 건조시켰다.

건조된 sample tube에 1X TE buffer (pH 8.0) 250 μ l를 넣어 녹여준 뒤 4°C 조건에서 냉장 보관하여 DNA sample로 사용하였다. 추출한 DNA를 증폭시키기 위해 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하였다. Primer는 Forward primer:5'-GCGTGGAGCAGGTGTATGTGTGG-3', Reverse primer:5'-TCAACC TTAACACCGTCAATACC-3'로 디자인하였다. PCR 반응액의 조성은 각 sample 당 DNA 2.5 μ l, Water 11.5 μ l, PCR Master Mix [10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 100 mM BSA, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP, 100 mM dCTP] 3.44 μ l, forward와 reverse primer 각 0.23 μ l, Polymerase (E-3100, Bioneer Co., Daejeon, Republic of Korea) 0.1 μ l를 혼합하여 총 18 μ l volume이 되게 하였다. PCR은 95°C 30s (denature), 60.5°C 30s (annealing), 72°C 30s (extension)의 조건으로 32회 반복 실행되었다. PCR 완료 후 DNA가 증폭된 반응액 sample에 loading dye 2 μ l를 혼합하여 2% agarose gel (1 X TAB buffer 100 ml 당 agarose 2 g, ETBR 3 μ l)에 loading하였고, 120 V 조건에서 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 완료 후 band의 유무로 *rs2rs2* 유전자형을 구분하였다.

HPLC 방법에 의한 stachyose의 함량 분석

선발 계통 및 장려품종(‘청미인’)의 임의의 종자를 이용하여 stachyose의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였다. 선발된 종자들의 종피를 제거한 후 미세하게 분말로 갈아서 각 시료 당 수분을 동일하게 제거한 후 500 mg을 취하여 acetone 10 ml를 가하여 약 2시간 동안 열을 가하면서 지방을 제거하였다. 필터를 통해 acetone을 제거하고 남은 powder에 증류수 10 ml를 가하여 60°C 온탕기에 2시간 동안 둔 후 추출물 1 ml을 취하였다. 1 ml에 단백질 및 기타 유기 colloid 등을 침전시키고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 0.2 μ l membrane 필터에 필터하고 난 후 냉장고에 저장하면서 HPLC를 통해 분석하였다. HPLC 분석 컬럼은 Supelcogel 610-H Column (30 cm×7.8 mm, 9 μ m, Supelco, USA)을 사용하였으며, 이동상은 2차 증류수에서 0.1% H₃PO₄, 유속은 0.5 ml/min, 온도는 30°C로 유지시켰다. Reflective index detector (RID) 검출기를 사용했으며 stachyose 각 standard를 10, 8, 6, 4, 2, 0 mg/ml로 calibration 후 각각의 sample 당 stachyose의 함량(g/kg) 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

녹색종피와 triple null 유전자형을 가진 F₂ 종자의 선발

녹색종피와 자엽색을 가지면서 lipoxygenase 및 KTI의 2가지 단백질이 모두 없으면서 stachyose의 함량이 낮은 *lox1lox2lox3tirs2* 유전자형 개체와 검정 종피와 녹색자엽이면서 lipoxygenase, KTI, lectin의 3가지 단백질이 모두

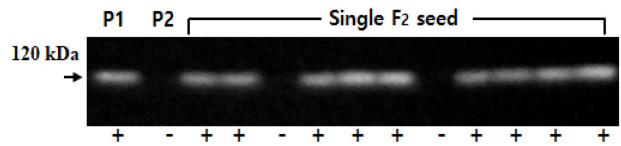


Fig. 2. Segregation of lectin protein in the parents and F₂ seeds. Arrow is the lectin protein band. P1:*lox1lox2lox3tirs2* (*LeLe*), P2:*lox1lox2lox3tile* (*lele*). +, -: presence and absence of lectin protein, respectively.

Table 2. Segregation for the presence or absence of lectin proteins in F₂ seed generation derived from the cross P1 and P2 parents

Lectin	Seed number		χ^2 value (3:1)	P
	Observed	Expected		
Present	48	51.75	1.087	0.5-0.1
Absent	21	17.25		

없는 *lox1lox2lox3tile* 유전자형 개체와의 교배를 통하여 녹색종피를 가진 69개의 F₂ 종자를 얻었다. 얻어진 각각의 F₂ 종자에서 lectin 단백질은 분리되었다. P1 (*lox1lox2lox3tirs2* 유전자형), P2 (*lox1lox2lox3tile* 유전자형) 및 F₂ 개개의 종자에서 lectin 단백질의 분리양상은 Fig. 2와 같다.

전체 69개의 녹색종피 F₂ 종자에서 lectin 단백질의 유무에 대한 분리 결과는 Table 2와 같다.

얻어진 69개의 F₂ 종자중에서 48개의 종자에서는 lectin 단백질이 존재하였으며 21개의 종자에서는 부재하였다. 이러한 결과는 lectin (χ^2 value: 1.087, P value: 0.5 – 0.1) 단백질에 대하여 존재 및 부재의 비율이 3:1이었고, 성숙 종실에서 lectin 단백질의 존재여부는 single 유전자에 의해 좌우된다는 이전의 연구결과와 일치하였다[3, 15]. 녹색종피이면서 lectin 단백질이 없는 triple null 유전자형 (*lox1lox2lox3tile*)을 가진 21개의 F₂ 종자는 파종되어 F₂ 식물체로 양성되었다.

DNA 마커를 이용한 *rs2rs2* 유전자형을 가진 F₂ 식물체 선발

녹색종피와 자엽색을 가지면서 triple null 유전자형을 가진 21개의 F₂ 개체는 *RS2* 유전자 마커에서 분리가 나타났다(Fig. 3).

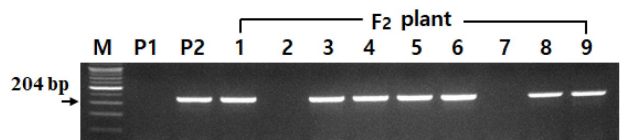


Fig. 3. Segregation of DNA marker based on *RS2* allele in parents and individual F₂ plants. P1:*lox1lox2lox3tirs2rs2rs2*, P2:*lox1lox2lox3tileRS2RS2*. F₂ plant-2 and 7: *rs2rs2* genotype.

Table 3. Seed related traits of check cultivar ('Cheongmiin') and breeding line developed in this experiment

Cultivar /breeding line	Traits				
	Seed coat color	Hilum color	Cotyledon color	Seed weight (g/100 seed)	Stachyose (g/kg)
'Cheongmiin'	Green	Black	Green	34.3	10.23
Breeding line	Green	White	Green	30.7	2.40

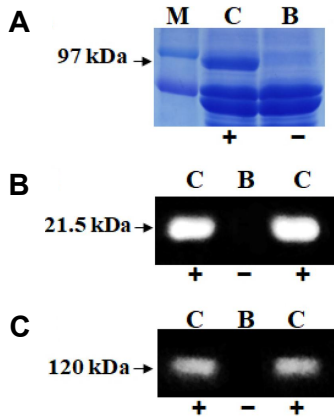


Fig. 4. Confirmation of absence for lipoxygenase (A), KTI (B), and lectin (C) proteins in mature seed of the breeding line (B) with green seed coat, green cotyledon and the tetra null genotype (*lox1lox2lox3tilers2*). Arrows indicate lipoxygenase protein of 97kDa, KTI protein of 21.5kDa and lectin protein of 120kDa. C: Check cultivar ('Cheongmiin'- (*Lox1Lox2Lox3TiLeRS2* genotype). +, -: presence and absence of lipoxygenase, KTI and lectin proteins.

전체 21개의 F₂식물체중에서 4개의 식물체는 *rs2rs2* 유전자형을 가진 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 성숙 종실에서 stachyose의 함량과 관련이 있는 *RS2* 유전자가 single gene 분리양상을 따른다는 이전의 결과와 일치하였다[20, 23]. 성숙 시 *rs2rs2* 유전자형을 가져 tetra null 유전자형을 가진 것으로 확인된 4개의 F₂식물체는 개체별로 수확되어 유지되었다.

Tetra null 유전자형 검증 및 종자 형질

녹색종피와 자엽 및 tetra null 유전자형을 가진 4개의 F₂ 선발계체는 F₃ 계통으로 유지되면서 농업형질이 양호한 한 개의 계통이 선발되었다. 선발계통은 F₅ 계통으로 세대진전 되었고 F₅ 계통의 종자에서 lipoxygenase, KTI 및 lectin의 3가지 단백질의 부재에 대한 검증은 Fig. 4와 같다.

대조품종으로 이용된 녹색종피와 자엽을 가진 '청미인'은 *Lox1Lox2Lox3 TiLeRS2* 유전자형을 가져 성숙 콩 종실에서 lipoxygenase, KTI 및 lectin의 3가지 단백질이 모두 존재하였지만, 선발계통의 종자에서는 3가지 단백질이



Fig. 5. Appearance of F₅ plant and F₆ seed possessing green seed coat, green cotyledon and tetra null genotype.

모두 부재하였다. 이러한 결과는 lipoxygenase, KTI 및 lectin 단백질의 존재여부는 single 유전자에 의해 좌우되며 열성인 경우 부재하여 선발과 함께 유전적으로 고정된 상태를 나타내었다[3, 4, 6, 8, 14, 15]. 선발계통과 대조품종으로 이용된 '청미인'에 대한 종자관련 형질은 Table 3과 같다.

선발계통의 종피 및 자엽색은 대조품종인 '청미인'과 동일한 녹색이며, 배꼽색은 '청미인'이 검은색인데 비하여 하얀색이다. 백립중은 '청미인'의 34.3 g보다 다소 작은 30.7 g이다. 성숙 종실에서 stachyose의 함량은 *RS2RS2* 유전자형인 '청미인'은 10.23 g/kg이고 *rs2rs2* 유전자형을 가진 선발계통에서는 2.40 g/kg으로 매우 낮았다. 선발계통의 성숙기 초형과 수확 후 F₆ 종자 모양은 Fig. 5와 같다.

선발 계통의 성숙 자엽색은 모두 녹색이며 종피색은 환경의 영향에 따라 녹색의 정도에서 일부 차이를 보여 세대진전을 통하여 모두 동일한 색상을 보이는 종자선발이 필요할 것으로 보인다. 연구를 통하여 선발된 계통은 콩에서 항영양성분으로 알려진 lipoxygenase, KTI 및 lectin의 3가지 단백질이 모두 없으면서 난소화성당으로 알려진 stachyose의 함량이 매우 낮은 유색콩 품종 및 중간모본으로 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 논문은 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을

받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0)의 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Alves-Rodrigues, A. and Shao, A. 2004. The science behind lutein. *Toxicol Lett.* **150**, 57-83.
- Choi, S. W., Han, S. J., Kang, D. H., Kim, J. A., Lee, S. J. and Chung, J. I. 2017. Selection of low stachyose content of soybean line using *rs2* gene marker. *Kor. J. of Breed. Sci.* **49**, 318-323.
- Choi, S. W., Sarath, L., Hwan, L. J., Oh, H. S., Kim, S. Y., Kim, N. H. and Chung, J. I. 2022. Breeding of green soybean line with green cotyledon and triple null genotype for KTI, lectin and P34 proteins. *J. of Agriculture Life Sci.* **56**, 1-6.
- Davies, C. and Nielsen, N. 1986. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-2 in Soybean. *Crop Sci.* **26**, 460-463.
- Dierking, E. C. and Bilyeu, K. D. 2008. Association of a soybean raffinose synthase gene with low raffinose and stachyose seed Phenotype. *Plant Genome* **1**, 135-145.
- Hildebrand, D. and Hymowitz, T. 1982. Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci.* **22**, 851-853.
- Hymowitz, T., Collins, F. I., Panezner, J. and Walker, W. M. 1972. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agronomy J.* **64**, 613-616.
- Kitamura, K., Davies, C., Kaizuma, S. and Nielsen, N. C. 1983. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* **23**, 924-927.
- Kunitz, M. 1945. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* **101**, 668-669.
- Kunitz, M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* **29**, 149.
- Miyake, K., Tanaka, T. and McNeil, P. L. 2007. Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity. *PLoS One* **2**, e687.
- Monma, M., Terao, J., Ito, M., Saito, M. and Chikuni, K. 1994. Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 926-930.
- Oh, S.D., Yeo, Y., Lee, S. Y., Suh, S. J., Moon, J. K., Park, S. K. and Park, S. Y. 2019. A comparison of the characteristic properties between soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) seeds with different seed coat colors. *Kor. J. of Agricultural Sci.* **46**, 971-980.
- Orf, J. H. and Hymowitz, T. 1979. Inheritance of the absence of the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans. *Crop Sci.* **19**, 107-109.
- Orf, J. H., Hymowitz, T., Pull, S. P. and Pueppke, S. G. 1978. Inheritance of a soybean seed lectin. *Crop Sci.* **18**, 899-900.
- Pan, L., Farouk, M. H., Qin, G., Zhao, Y. and Bao, N. 2018. The influences of soybean agglutinin and functional oligosaccharides on the intestinal tract of monogastric animals. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 554.
- Rackis, J. and Gumbmann, M. 1981. Protease inhibitors: physiological properties and nutritional significance. *Antinutrients and Natural Toxicants in Foods* **pp**, 203-237.
- Rackis, J. J. 1975. Oligosaccharides of food legumes: Alpha-galactosidase activity and the flatulence problem. *Physiological Effects of Food Carbohydrates* **207**, 207-222.
- Seo, J. H., Han, W. Y., Ko, J. M., Baek, I. Y., Lee, B. W., Yun, H. T., Lee, Y. H., Shin, S. O., Oh, K. W., Ha, T. J., Choi, M. S., Kang, B. K., Kim, H. Y., Park, J. H., Kim, J. H., Sung, J. S. and Jung, C. S. 2021. Large-seeded green seed-coated soybean cultivar 'Cheongmiin' with pod shattering tolerance. *Kor. J. Breed. Sci.* **53**, 311-317.
- Skoneczka, J. A., Saghai Maroof, M. A., Shang, C. and Buss, G. R. 2009. Identification of candidate gene mutation associated with low stachyose phenotype in soybean lines PI200508. *Crop Sci.* **49**, 247-255.
- Suarez, F. L., Springfield, J., Furne, J. K., Lohrmann, T. T., Kerr, P. S. and Levitt, M. D. 1999. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 135-139.
- Vasconcelos, I. M. and Oliveira, J. T. A. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* **44**, 385-403.
- Yang, K. W., Ko, J. M., Ha, T. J., Lee, Y. H., Baek, I. Y., Yang, T. J. and Nou, I. S. 2014. Development of molecular markers for low raffinose and stachyose in Korean soybean cultivars. *Plant Breed. Biotech.* **2**, 151-157.

초록 : Tetra null 유전자형과 녹색종피 및 자엽을 가진 콩 계통 육종

리사랏¹ · 이정환¹ · 오현수¹ · 김세영¹ · 문진영² · 정종일^{1*}

(¹경상국립대학교 농학과, ²경상남도 농업기술원)

녹색종피와 자엽을 가진 녹색콩 품종 및 유전자원의 종실에는 눈 건강에 유익한 것으로 알려진 lutein 성분이 많이 함유되어져 있다. 그러나, 리폭시게나제, 쿠니츠 트립신 억제제(KTI), 렉틴 및 스타키오스와 같은 항영양 성분이 존재한다. 콩 식품 제조시 이러한 항영양 성분을 불활성화 시키기 위하여 고온 및 첨가제 처리가 필요하다. 따라서, 성숙 종실의 종피 및 자엽이 녹색이며 리폭시게나제, KTI 및 렉틴의 3가지 단백질이 모두 부재하면서 스타키오스의 함량이 매우 낮은 tetra null 유전자형(*lox1lox2lox3tilers2*)을 가진 계통을 선발하기 위하여 본 연구가 진행되었다. 다섯가지 유전자형을 이용한 육종집단으로부터 녹색종피 및 자엽을 가지면서 lectin 단백질이 없는 triple null 유전자형(*lox1lox2lox3tile*)을 가진 21개의 F₂ 종자가 선발되었다. DNA 마커를 이용하여 *rs2rs2* 유전자형을 가져 tetra null 유전자형인 4개의 F₂식물체가 선발되었으며 종자 형질이 양호한 한 개의 계통이 선발되었다. 선발계통의 F₆ 종자에서 리폭시게나제, KTI 및 렉틴 단백질의 부재가 확인되었다. 선발계통은 녹색종피, 녹색자엽 및 흰색배꼽을 가지고 있으며 백립중은 30.7 g 스타키오스의 함량은 2.40 g/kg으로 매우 낮았다. 선발계통은 리폭시게나제, KTI 및 렉틴의 3가지 단백질이 모두 없으며, 스타키오스의 함량이 낮은 유색콩 품종 개량을 위한 모본으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.