

## 江原地方 在來種 콩의 蛋白質 및 脂肪 含量과 RAPD

허남기\*·박대호\*\*·심교문\*\*·이성렬\*·김기식\*·김남수\*\*

## Protein and Lipid Contents of Kangwon Local Soybeans and their RAPDs

Nam Kee Heo\*, Dae Ho Park\*\*, Kyo Moon Shim\*\*, Sung Yeul Lee\*,  
Kee Sig Kim\* and Nam Soo Kim\*\*

**Reprinted  
from  
Korean Journal of Breeding  
Vol. 27. 3, 1995  
Korean Breeding Society**

# 江原地方 在來種 콩의 蛋白質 및 脂肪 含量과 RAPD

허남기\*·박대호\*\*·심교문\*\*·이성렬\*·김기식\*·김남수\*\*

## Protein and Lipid Contents of Kangwon Local Soybeans and their RAPDs

Nam Kee Heo\*, Dae Ho Park\*\*, Kyo Moon Shim\*\*, Sung Yeul Lee\*,  
Kee Sig Kim\* and Nam Soo Kim\*\*

**ABSTRACT** : Protein and lipid contents as well as the genetic diversity among local soybean varieties collected from all over the Kangwon province were investigated to provide the basic information for improving soybean cultivars. The protein content was varied from 33.2% to 48.8% with average of 38.7% in the dry weight of the seed. Lipid content was also varied from 14.2% to 22.2% and the average was 17% of the dry weight of the seed. There were negative correlations between the high contents of protein and lipid and the high yield.

Although major differences were not found in the seed storage protein profile in PAGE analysis, polymorphisms were found at the DNA level in the RAPD analysis for investigating genetic diversity. There were three gorups at 15% of diversity level and ninety percent of the landraces were able to be clustered at 20% of diversity level by the RAPD analysis. There were three landrace lines clustered beyond 40% of diversity level, which could be valuable genetic resources in soybean improvement program.

**Key word** : Soybean, Landraces, Protein, Lipid, Correlation, Genetic diversity, PAGE, RAPD, Germplasm

### 緒 言

콩은 우리나라를 포함한 東아시아가 原產地로서 高蛋白質의 식품적 우수성이 인정되면서 세계적으로 그 消費가 증가하고 있는 作物種의 하나이다.

우리나라에서는 太古때부터 중요한 食糧作物의 하나로 재배하여 왔고, 우수한 蛋白質 供給源으로서 된장, 간장, 두부, 콩나물, 밥밀콩 등 다양한 傳統食品으로 가공 조리 되어왔다. 특히 콩의 단백질은 良質의 植物性 蛋白質로서 최근의 加工技術의 발전에 따라 다른 식품에 첨가되는 蛋白質 補強材料로도 이용되며 油脂用 콩의 경우는 大豆油 제거후의

大豆粕은 飼料로서의 이용도가 높다<sup>17)</sup>. 따라서 콩의 용도는 食用, 飼料用, 工業用 등 용도가 매우 다양하여 용도에 따라 요구되는 종실의 특성도 각각 다르다. 특히 우리가 식용으로 이용하는 나물콩, 풋콩, 밥밀콩은 용도별로 종실의 특성과 영양가치가 뚜렷이 다른 양상을 보인다<sup>17, 18)</sup>. 이상과 같은 콩의 중요성에도 불구하고 우리나라의 콩생산 基盤은 매우 낮으며 自給率도 전체수급량의 10% 정도의 수준에 있다. 그러나 최근에는 농산물시장 개방에 대응하기 위하여 국산농산물의 品質高級化와 生産費 節減技術開發, 그리고 國內自給은 물론 輸出까지 가능한 나물콩, 풋콩, 검정콩 등의 國際競爭力있는 식용콩 품종 개발에 정부와 농민이 노력을 기울이고

\* 江原道 農村振興院 (Kangwon Provincial RDA, Chunchon, Korea 200 - 150)

〈 '95. 1. 25 接受 〉

\*\* 江原大學校 農學科 (Department of Agronomy, Kangwon National University, Chunchon, Korea 200 - 170)

있다.

본 실험은 강원도 전역에서 蒐集한 在來種 콩 90系統의 可示的 形質特性<sup>19)</sup>에 이어 이들 系統들의 化學的 및 分子生物學的 分析을 통하여 계통들의 특성을 구명하여 在來種중 유망계통 선발 및 콩품종개발의 기본적 자료를 제공하고자 수행하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 粗蛋白質 및 粗脂肪 含量分析

供試系統들의 蒐集 및 栽培는 許 등<sup>19)</sup>에 기술하였다. 粗蛋白質과 粗脂肪 分析은 種子를 miller에서 마쇄한 후 60℃의 dry oven에서 2시간 동안 乾燥시켜 分析試料로 이용하였다. 단백질은 Micro-Kjeldahl법에 의해 전 질소를 定量하고 6.25를 곱하여 粗蛋白質 含量으로 하였으며 脂肪 含量의 분석은 Soxhlet 脂肪 추출기로 8시간동안 ether로 추출후 ether만을 증발시키고 殘量을 定量하여 粗脂肪 含量으로 하였다.

### 2. 公種實의 貯藏蛋白質의 分離 및 電氣泳動

各 系統當 公種實 3개씩을 막자사발과 막자공이로 곱게 마쇄한 후 이중 0.05g을 취하여 250 $\mu$ l의 0.01M sodium phosphate buffer (pH 6.8)와 혼합한 후 4℃에서 5분간 15,000rpm으로 遠心分離하였다. 이중 상등액 10 $\mu$ l를 취하여 10 $\mu$ l의 loading dye(1% sucrose in 1% bromophenolblue)와 혼합한 후 2분간 95℃에서 단백질을 變性시키고 이중 3 $\mu$ l를 10% acrylamide gel로 電氣泳動하여 bromophenol blue로 染色하였다.

### 3. 公 植物體의 genomic DNA 分離 및 PCR反應

幼植物體의 葉組織 50mg을 1.5 ml centrifuge tube에서 액체질소로 급냉각후 마쇄하여 400 $\mu$ l의 DNA 추출 buffer(200mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가후 흔들어서 혼합후 60℃에 1시간 보관한 다음 13,000rpm의 속도로 15분간 遠心分離하였다. 상등액을 새로운 tube로 옮긴후 300 $\mu$ l의 chloroform을 넣고 천천히 뒤집으면서 섞은 후 10,000rpm의 속도로 5분간 원심 분리했다. 분리된 상층액을 다시 새로운 tube로 옮긴후 300 $\mu$ l의 isopropanol을 섞은 뒤 -20℃에 30분간 방치후 4℃에서 13,000rpm으로 3분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 침전된 DNA는 공기건조후 200 $\mu$ l의 증류수에 녹였다.

PCR반응 총액은 25 $\mu$ l로서 이중에는 50ng의 template DNA와 1X PCR buffer, 200 $\mu$ M dNTPs, 6 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 0.2 $\mu$ M random primer(10mer) 및 2 units의 Amplitaq Stoefel fragment(Perkin Elmer)를 첨가하였으며 PCR반응 도중 반응액의 증발을 막기위해 15 $\mu$ l의 light mineral oil을 반응액 위에 덮었다. PCR primers AGGAGTGAGA, CCGCCCACTG, GGCCCATTCG, GGGTGTGGGT, CCACCACCCA GGAGGAGGGA, CCCACACCCA 등 7개의 random primers와 pUC/M13 forward sequencing primer CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC 등을 사용하였다. PCR조건은 94℃ 1분, 35℃ 1분, 72℃ 2분씩 45회를 반복하고 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시킴으로서 DNA 증폭을 완료하였다. 그리고 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel로 1X TAX buffer를 사용하여 電氣泳動하고 ethidium bromide(0.5 $\mu$ g/ml)로 staining하여 UV light에서 관찰후 증폭된 단편들을 조사하였다.

증폭된 DNA 단편의 有 또는 無에 따라 1과 0으로 분류하고 계통들의 유연관계는 NTSYS-PC 통계분석의 UPGMA법<sup>9)</sup>에 따라 분석하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 蛋白質 및 脂肪 分析

콩은 良質의 植物性 蛋白質과 脂肪을 다량 함유하고 있어 이들은 콩의 食品營養面에서 중요한 성분이다. 단백질의 함량은 종실의 용도에 따라 차이가 커서 장류, 두부, 두유용콩은 단백질의 함량이 높으며 混飯用이나 油脂用 등은 함량이 낮은 편이다. 우리나라 장려품종의 粗蛋白質 含量은 대체로 39~45%로서 높은편이며, 脂肪含量은 16~21%로 낮은 편이다<sup>18)</sup>. 權 등<sup>13)</sup>에 의하면 우리나라 地方 蒐集系統의 단백질함량은 최고 53.7%로서 平均 43.6%, 지방함량은 최고 21.7%로서 平均 17.4%이었다. 그러나 이들 성분함량은 각계통이나 品種의 遺傳性에도 기인이 되나 栽培條件이나 環境條件 등에도 영향을 많이 받는다<sup>12)</sup>. 金 등<sup>17)</sup>은 최근의 報告에서 국내 6개지역에서 수확된 高蛋白系統, 수원158호의 2품종의 성분함량 변이를 조사한 바 지역에 따라 조단백과 조지방함량의 변이가 있었으며 조단백의 遺傳力은 39.7%로서 조지방의 69.7%보다 낮다고 보고하였다.

본 시험에서 공시된 江原道 蒐集 在來種 90계통의

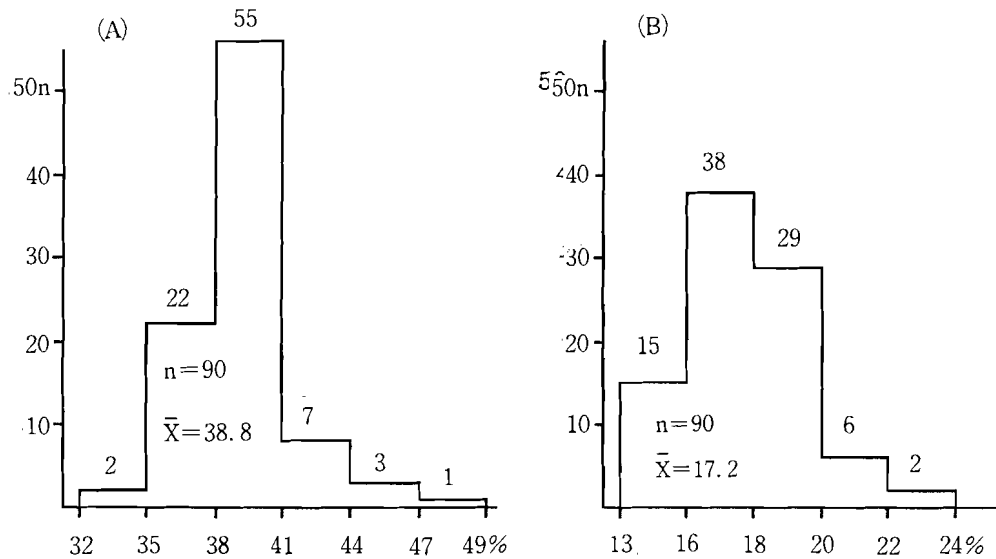


Fig. 1. Frequency distribution of soybean landrace lines for protein (A) and lipid (B) content.

조단백질의 함량은 최저 33.2%에서 최고 48.8%의 분포로서 평균 38.8%이었는데 이는 權 등<sup>13)</sup>이 報告한 평균보다는 낮은 편이나 金 등<sup>17)</sup>에 의해 報告된 전국수집 검정콩의 평균 39.8%와는 비슷한 분포를 보였다(그림 1). 또한 본 試驗供試系統들의 조지방 함량은 최저 14.2%에서부터 최고 22.2%로서 평균 17.2%으로서 權 등<sup>13)</sup>의 전국 평균치 17.4%와 비슷하였다(그림 1). 공시계통 90계통중 조단백질함량이 45% 이상의 高蛋白 계통은 3계통이었으며 조지방함량이 21% 이상의 高脂肪 계통도 3계통으로서 이들은 앞으로 콩품종개량시 주요한 유전자원으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

콩도 타작물과 같이 收量性 증가에도 중요성이 있으나 種實의 化學的 成分등도 고려하여 高收量과 高蛋白質 및 高脂肪系統을 동시에 선발할 수 있다면 理想的인 것이다. 하지만 金 등<sup>16)</sup>은 百粒重과 粗蛋白質은 統計的으로 有意性을 발견할 수 없었고 粗脂肪과는 負의 상관이 있었으며 粗蛋白質과 粗脂肪含量間에도 有의한 負의 相關이 보고 되었는데 본 실험에서도 같은 경향이었다(表 1). 즉 百粒重과 粗脂肪 함량간에 있어서 粒重이 무거울수록 조지방 함량이 낮아지는 負의 相關( $r = -0.38^{**}$ )이었고 단백질과 지방성분 함량간에도 有意한 負의 상관( $r = -0.23^{**}$ )으로서 단백질 함량이 높아질수록 지방함량도 낮아지는 경향이였다. 이외에도 收量과도 負의 상

관으로서 콩育種시 수량도 높은 동시에 단백질과 지방 등의 함량도 높이는 것은 다른 연구자들<sup>13, 14, 18)</sup>이 지적한 바와 같이 상당히 어려울 것으로 思料된다.

Table 1. Correlation coefficients between protein and lipid contents in seeds and six other agronomic characters of the studied local soybean varieties.

|                         | Protein content | Lipid content |
|-------------------------|-----------------|---------------|
| Yield                   | -0.17           | -0.20         |
| One-hundred seed weight | 0.19            | -0.39**       |
| Maturity                | -0.11           | -0.02         |
| Plant height            | -0.05           | -0.13         |
| No. of branches/plant   | -0.14           | 0.04          |
| No. of pods/plant       | -0.05           | -0.19         |
| Protein content         |                 | -0.23         |

Note : \* and \*\* indicate significant differences at 5 and 1% levels, respectively.

콩蛋白質의 70% 이상을 차지하고 있는 것은 globulin으로서 7S globulin과 11S globulin의 두가지가 있다. 7S와 11S는 物理的 및 化學的 특성이 달라서

이들의 組成比나 polyacrylamide 電氣泳動상에서 어느 특정한 polypeptide의 결핍 등은 종실의 가공성격상 중요하다<sup>17)</sup>. 또한 種實貯藏蛋白質의 전기영동상 분리양상은 식물의 種간 또는 屬간의 類緣關係 구명 또는 종내의 遺傳的 變異를 구명하는데 많이 사용되어져 왔다<sup>4,8)</sup>. 공시계통들은 polyacrylamide 전기영동상에서 종실 저장단백질들은 약 20여개의 bands로 분리되었으며 이중 8개의 bands는 major bands로서 모든 계통에서 나타났으며 나머지 minor bands들은 계통간의 차이가 약간 있었으나 재현성의 문제가 있어서 이들 유형을 가지고 계통을 分類하기에는 어려움이 있었으므로 사용하지 않았다(그림 2).

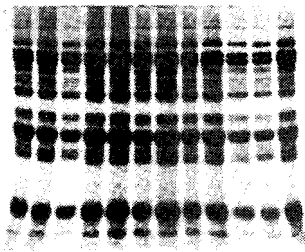


Fig. 2. SDS-PAGE separation of seed storage proteins of the local soybean varieties.

## 2. RAPD 分析을 이용한 蒐集系統간의 變異 分析과 系統 分類

分子生物學的 기술이 발전함에 따라 이들 技法들을 이용한 植物 遺傳學도 최근 크게 진보하고 있다. 특히 일정한 유전자를 cloning하고 이를 molecular probe로 하여 제한효소 처리된 식물의 genomic DNA에 분자교잡한 후 찾을 수 있는 制限酵素 斷片 多型化現象(RFLP: restriction fragment length polymorphism)은 표현형질을 이용하여 유전분석을 하는 것보다 환경의 영향이나 유전자의 上位現象 등의 영향을 받지 않으며 분석할 수 있고 분석할 수 있는 數에 제한이 없는 등 많은 이점이 있어서 이를 이용하여 여러분야의 植物體 遺傳分析에 응용하고 있다<sup>3,5,11)</sup>. 그러나 RFLP 기법은 여러가지 복잡한 과정을 거치므로 큰 규모의 육종사업에의 일상적 응용에는 곤란한 경우도 있다. 그렇지만 식물의 genomic DNA를 간단한 염기구조로 되어 있는 primer를 사용하여 DNA 連鎖重合反應(PCR)을 시킨 후 증폭된 DNA의 단편을 調査하는 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 分析法은 조작이 간단하

며 소량의 DNA를 사용하므로 식물 유전분석에 많이 이용되고 있다<sup>1,2,6,7)</sup>. 본 시험에서는 소량의 葉片 조각 (>50mg) 으로부터 분리된 DNA를 각각의 primer로 증폭한 결과 증폭된 DNA 단편의 수는 primer에 따라 2개에서 10여개까지였으며 단편들의 크기는 200bp부터 2,000bp였다(그림 3). 이들 단편들중 major bands들은 항상 재현이 되었으나 minor bands들은 반응할 때마다 약간씩 차이가 있었는데 이들은 아마도 primer와 template가 nonspecific하게 binding하거나 false binding을 한 후 증폭되어지는 것으로 사료된다. 항상 再現이 되는 단편들의 수는 8개의 primer로부터 39개였으며 대부분의 수집 계통들은 단편들의 전기영동 분리양상이 같았으며 간혹 몇개는 단편의 消失, 새로운 단편의 형성, 크기의 차이 등에서 多型化 現象을 보였다(그림 3). PCR 반응에서 성공적으로 DNA가 증폭하려면 forward primer와 reversed primer가 증폭이 가능한 거리내에서 template DNA에 binding하여야 하므로 記述된 다형화 현상들은 돌연변이에 의한 계통간의 DNA 차이에서 비롯된 것이다. 즉 DNA의 消失, 插入, 轉座 또는 逆位 등으로 인해 primer의 binding 부위가 소실 또는 생성될 수 있으며 양방향 primers의 binding 부위간의 거리 또한 변할 수 있으며 이들의 여러 차이는 PCR 증폭시 斷片 多型化 現象으로 나타났다고 여겨진다. 그러므로 이들 단편들의 분리 유형을

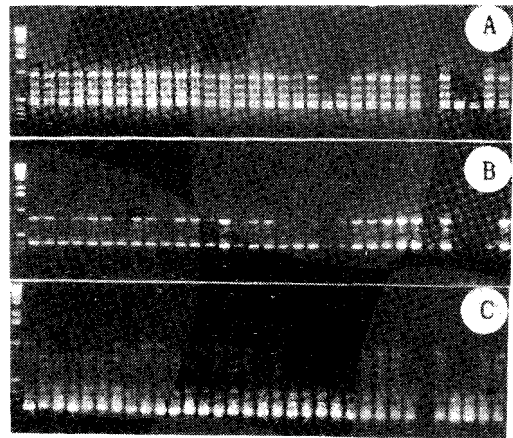


Fig. 3. RAPD profiles of the local soybean varieties. The primers in A, B and C were CCAC-CACCCA, GGCCCATTCG and CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC, respectively.

비교 분석하여 계통들간의 유연관계 구명에 응용할 수 있을 것이다.

실제로 공시계통들의 RAPD 단편들의 분리 양상에 따라 cluster 분석을 한결과 多様性 程度 (diversity level) 가 15% 수준에서 크게 3가지군으로 分類할 수 있었으며 20% 수준에서 90% 이상의 계통들을 clustering 할 수 있었다(그림 4). 낮은 수준의 DNA sequence diversity는 Tingey<sup>10)</sup> 등의 報告와 일치하나 수집계통중 KWS78, KWS81, KWS82 등은 나머지 계통들과 相異하게 culstering 되는 점으

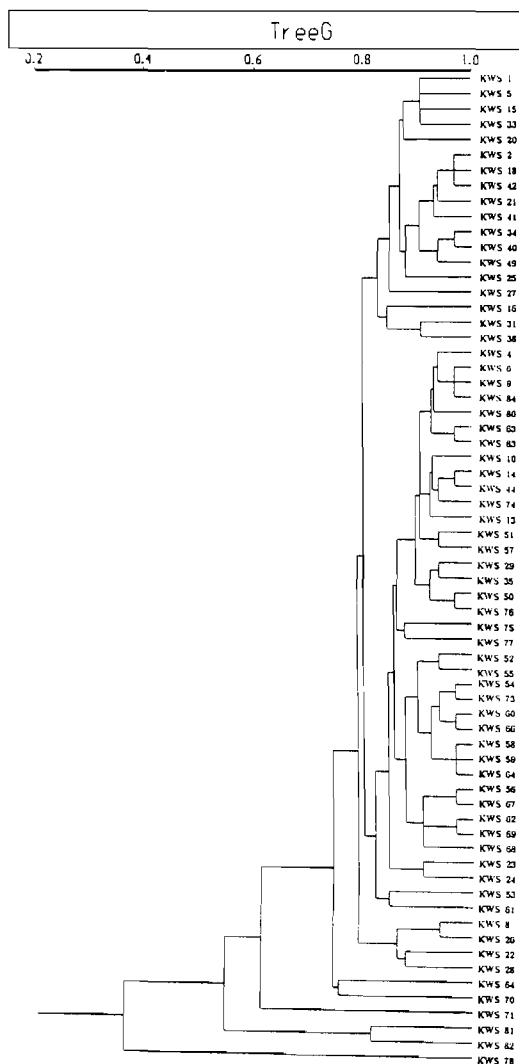


Fig. 4. Phylogenetic dendrogram of the soybean landraces based on the RAPD profiles.

로 미루어 이들 계통들은 여타계통들과 交配시 그 잡종 후대에서는 다양한 변이가 예상되어서 育 品 種 育成시 상당히 중요한 遺傳資源이라 할 수 있겠다.

## 摘 要

江原道 전역에서 蒐集한 在來種 콩 系統들의 粗蛋白質과 粗脂肪 分析 결과, 조단백질의 함량은 평균 38.7%로서 최저 33.2%에서 최고 48.8%였으며 조지방의 함량은 최저 14.2%부터 최고 22.2%로서 평균 조지방함량은 17%였다. 조단백질함량과 조지방의 함량은 有意한 負의 相關을 보였으며 이들 두 형질 각각과 收量과도 負의 相關을 보여 이는 高收量의 高品質品種 육성시 넘어야 할 과제로 사료된다. 각 계통들간에는 種實貯藏 蛋白質의 polyacrylamide gel 전기영동시 나타나는 band의 차이는 없었으나 PCR을 이용한 RAPD 分析에서는 계통들간의 變異가 나타났다. 또한 RAPD 類型을 이용한 cluster 분석에서는 多様性 程度가 15% 수준에서 크게 3개의 群으로 분류할 수 있었으며 20% 수준에서는 90개의 공시계통중 90% 이상을 clustering 할 수 있었다. 수집계통중 3계통은 다른 계통들과 상이하게 clustering 되므로 이들은 앞으로 중요한 育 種 材 料가 될 수 있다고 사료된다.

## 引用文獻

1. Baird E, Cooper-Bland S, Waugh R, DeMaine M, Powell W 1992. Molecular characterization of inter and intra-specific somatic hybrids using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Genet. 233* : 469~475.
2. Benito C, Figuerias AM, Zaragoza C, Gallego FJ, de la Pena A 1993. Rapid identification of *Triticeae* genotypes from single seeds using polymerase chain reaction. *Plant Mol. Biol.* 21 : 181~183.
3. Helentzaris T, King G, Slocum M, Siedenstrong C, Wegman S 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5 : 109~118.
4. Ladzinsky G. and Hymowitz T 1979. Seed pro-

- tein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. Appl. genet.* 54 : 145~157.
5. Mansur LM, Orf J, Lark KG 1993. Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP markers using extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* L. Merr). *Theor. Appl. Genet.* 86 : 914~918.
  6. Michelmore RW, I, Paran, Kesseli RV 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis : A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 9828~9832.
  7. Paran I and Michelmore RW 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downey mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 985~993.
  8. Singh RJ, Kollipara KP, and Hymowitz 1992. Genomic relationships among diploid wild perennial species of the genus *Glycine* Willd. subgenus *Glycine* revealed by crossibility, meiotic chromosome pairing and seed protein electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 276~282.
  9. Rohlf FJ 1990. NTSYS-pc (Version 1.60), Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exter. NY.
  10. Tingey SV, Rafalski JA, Williams JGK, and Sebastian S 1991. Soybean genome analysis : DNA polymorphisms are identified by oligonucleotide primers of arbitrary sequence. *In Plant molecular biology 2. Herrmann RG and Larkin B (Eds).* Academic Press, New York. pp. 263~268.
  11. Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW 1989. RFLP mapping in plant breeding : New tools for and old science. *Bio/Technology.* 7 : 257~264.
  12. 昆野昭長 1970. タイズかうみた登熟の生理. *農業技術* 26 : 361~366.
  13. 權臣韓, 任建燦, 金在利 1972. 地方蒐集 大豆의 蛋白質 및 脂肪含量 變異 (I). *韓育誌* : 29~32.
  14. 金奭東, 金龍昊, 洪殷燾, 金鍾碩 1993. 蒐集 재래 검정콩의 化學的 成分. *韓作誌.* 38 : 1~7.
  15. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 朴義浩 1993. 蒐集 在來 검정콩의 種實特性. *韓作誌.* 38 : 437~441.
  16. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ 1994. 우리나라 콩의 生産과 品種開發 方向. *콩 生産, 加工 및 營養에 관한 國際 심포지움.* 建國大學校. pp. 5~37.
  17. 金龍昊, 金奭東, 成烈圭, 洪殷燾. 1994. 콩 蛋白質 系統 種實 含量의 地域變異. *韓育誌* 25 : 157~162.
  18. 趙載英의 32인 1993. 田作. 郷文社. pp. 271~329.
  19. 허남기, 변학수, 김기식, 박승의, 김이훈, 김남수 1995. 강원지방 재래종콩의 작물학적 특성. *韓育誌* 27(2) : 124~130.