

녹색자엽 검정콩 품종 육성을 위한 Stay green 변이체 활용

강성택* · 서민정* · 문중경* · 윤홍태* · 이영호** · 김시주* · 황영선*** · 이석기* · 정명근***†

*국립식량과학원, **서울대학교 식물생산과학부, ***강원대학교 생약자원개발학과

Introduction of Stay Green Mutant for the Development of Black Seed Coat and Green Cotyledon Soybean Variety

Sung-Taeg Kang*, Min-Jung Seo*, Jung-Kyeong Moon*, Hong-Tae Yun*, Young-Ho Lee**, Si-Ju Kim*, Young-Sun Hwang***, Suk-Ki Lee*, and Myoung-Gun Choung***†

*National Institute of Crop Science, RDA, Suwon, 441-857, Korea

**Dept. of Plant Science, Seoul National University, Seoul, 151-921, Korea

***Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

ABSTRACT The soybean stay green mutant genotype (SSG) derived from the nuclear gene, *d1d2*, and cytoplasmic gene, *cytG*, inhibit the breakdown of chloroplast in the leaves, pod walls, seed coats, and embryos during maturity. Soybean seed with black seed coat and green cotyledon (SBG) are preferred than black seed coat with yellow cotyledon (SBY) especially for cooking with rice and as source of traditional food in Korea. The researchers evaluated the seed's chlorophyll content of SSG and introduced SSG to the SBG variety breeding program.

The seed chlorophyll content of SSG with *d1d2* was 39.93~60.80 $\mu\text{g/g}$ and SSG with *cytG* 38.08~39.89 $\mu\text{g/g}$. The Korean SBG variety which was derived from SSG with *cytG*, contains 16.35~37.73 $\mu\text{g/g}$. The composition of seed chlorophyll differs according to the genetic background of SSG genotype.

Inheritance study showed that cotyledon color was segregated 15:1 (yellow:green) at F_2 seed indicating two recessive genes control green cotyledon as revealed by previous study. Only less than 3% soybean lines showed black seed coat with green cotyledon among crosses SBY and SSG (*d1d2*). Results showed that SSG with *d1d2* can be used as a good source for SBG with high chlorophyll content in the seed cotyledon, but due to the complex genetic behavior, breeding resource of SBG with *d1d2* should be prepared to improve the breeding efficiency for development SBG variety.

Keywords : soybean, black seed coat, green cotyledon, chlorophyll

Abbreviation : Soybean Stay Green (SSG), Seed with black seed coat and green cotyledon (SBG), Seed with black seed coat with yellow cotyledon (SBY)

국내에서 이용되는 콩 중에서 유색콩은 예로부터 혼반용으로 이용되어 독특한 식단을 제공하여 왔으며, 지금까지 주로 검정콩, 서리밥콩, 아주까리콩 등의 유색대립 재래종이 이용되어 왔고, 최근 혼반용 유색콩의 소비량 증가 및 건강 기능성 식품으로의 중요성이 인식되어 검정콩 중심의 품종 육성이 이루어지고 있는 실정이다(Chu *et al.*, 2002).

검정콩은 예로부터 약용, 혼반용 및 떡소용 등으로 이용되어 왔고, 최근 검정콩의 다양한 생리적 기능이 보고되면서 검정콩을 이용한 두유, 된장 및 고추장 등 다양한 가공식품의 형태로 이용되고 있다(Kim *et al.*, 2006).

과거 국내 검정콩 연구는 혼반용으로서의 연구가 주류를 이루었고(Kim *et al.*, 1993), 대부분 취반특성과 관련이 있는 무름성(Lee *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1985; Park, 1986; Kim *et al.*, 1990; Son, 1992; Kim *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994) 및 종피색소(Choung *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006)에 대한 연구가 주류를 이루었으며, 최근 검정콩의 소비가 늘어나고 소비자의 선호도가 증가되면서 소비자 가격도 일반 황색콩에 비해 높게 형성되고 있어, 농민들 또한 고품질 검정콩 품종의 재배에 대한 수요가 증가되고 있는 양상이다.

국내 검정콩 품종육성은 1990년대 이후 본격적으로 수행되어 검정콩 1호(Soybean breeding team, 1994)를 시작으로 황색자엽 검정콩이 개발되었고, 청자콩(Baek *et al.*, 2001)을 시작으로 녹색자엽을 가진 검정콩 품종이 본격적으로 개

†Corresponding author: (Phone) +82-33-570-6491
(E-mail) cmg7004@kangwon.ac.kr <Received November 16, 2009>

발, 보급되기 시작하였다.

최근 국내에서는 재배 검정콩 중 녹색자엽 검정콩에 대한 수요가 특히 높은데, 우리나라에서는 녹색자엽 검정콩을 통상 “서리태”로 부르며, 이들은 대부분 극만숙종으로 성숙이 후에도 자엽의 색깔이 녹색으로 유지되는 특성을 보유하고 있다(Kim *et al.*, 2006).

일반적으로 식물체에서 엽록소의 퇴화양상은 유전적 특성으로서 성숙이 진전됨에 따라 일어나는 자연스런 현상이지만, 다양한 종에서 엽록체 구성성분의 퇴화가 억제되는 자연돌연변이체의 존재가 보고된 바 있다(Thomas & Smart, 1993; Noodén & Guiamét, 1996; Thomas & Howarth, 2000).

일반적으로 콩의 자엽, 종피, 힘 및 엽은 정상적으로 녹색으로 발달하다가, 종실 성숙기에 접어들어 황색으로 변한다(Crookston & Hill, 1978; Okatan *et al.*, 1981). 콩에서 녹색자엽의 형성은 핵내에 존재하는 *DID2* 유전자가 열성동형접합체(*d1d1d2d2*)이거나, 아니면 세포질에 존재하는 유전자 *cytG*에 의해 식물체내 엽록소의 퇴화가 지연되면서 나타나는 현상으로, 자엽뿐만 아니라 엽, 줄기, 힘 등에서도 엽록체의 퇴화가 지연되어 녹색을 띠게 된다. 이렇게 엽록소 퇴화가 지연되는 현상을 “stay-green”이라고 표현한다(Bernard & Weiss, 1973; Guiamét *et al.*, 1990).

식물체는 노화가 진행됨에 따라 엽록소의 분해를 시작으로 차례로 혹은 부수적으로 단백질, 색소체, 지질 및 엽록체 등의 함량이 감소하고, 궁극적으로는 최종단계에서는 분해된다(Noodén *et al.*, 1997). 각각 정상(*DID2*)이거나 핵(*d1d2*) 혹은 세포질유전(*cytG*)에 의한 stay-green 유전자를 보유한 콩을 대상으로 잎에 함유된 엽록소 a 및 b의 함량을 비교 분석한 결과, 정상 잎의 엽록소 함량은 종실 비대기나 후기에 감소하나, 핵 유전자(*d1d2*)를 보유한 자원은 생육이 진전되어도 잎에 함유된 엽록소 a 및 b의 함량과 조성비에서 큰 차이가 없었으며, *cytG*는 일부 생육진전과 더불어 엽록소의 감소는 발생하나 엽록소 b의 함량은 높고, 후기까지 녹색을 유지한다고 하였다. 즉 *d1d2*는 thylacoid protein, *cytG*는 광수확복합체(light harvesting complex, LHC-II)의 유지에 기여하고, *cytG*는 노화과정에서 광합성능력의 저하에 관련된 자원으로 활용가능성이 높다고 보고하였다(Guiamét *et al.*, 1991).

그 외에도 식물체의 수분스트레스(Luquez & Guiamét, 2002)나 광합성능력 유지와 관련된 연구도 일부 있었으나, 실제 광합성 능력 유지와는 무관하다고 하였다(Hilditch *et al.*, 1986; Guiamét *et al.*, 1990; Guiamét & Giannibelli, 1994 & 1996).

한편 벼에서 Yoo *et al.*, (2007)은 엽록체 단백질을 인코

드하는 노화 관련 유전자 *Sgr1*가 광수확복합체(LHCP II)에 직접 작용하여 광수확복합체의 분해를 일으킴으로써 엽록소 분해를 조절함을 밝힌 바 있고, stay-green 특성과 수량과의 상관관계 연구에서 stay-green 특성과 수량 및 수량구성요소(개체당 분얼수, 이삭당 낱알수, 낱알무게)가 부(-)의 상관을 나타냈다는 보고가 있으나(Jiang *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2006), Yoo *et al.*, (2007)은 아종내 교배(intra subspecies cross)집단을 이용하여 stay-green 특성이 종실 수량 및 착립률과 정의 상관을 보여 차후 저 투입 다수성 품종육성의 중요한 재료로 활용가능성을 보여주었다.

이상에서 보는 바와 같이 stay-green에 관한 기존 연구는 대부분 엽 및 식물체 전반의 노화 및 엽록소 퇴화와 관련된 연구이며, stay-green 특성이 식품적 측면에서 기호성 증가와 관련된 연구는 현재까지 전무한 실정이다. 현재 국내에서는 검정콩의 건강 기능성이 알려지면서 혼반용으로의 사용이 증가되고 있고, 소비자들은 녹색자엽 검정콩을 약콩이라고 표현할 정도로 기호도가 높다(Kang *et al.*, 2007). 또한 검정콩 재배농가에서도 자엽의 녹색이 짙고 고품질의 특성을 가진 검정콩에 대한 수요가 극히 높은 실정이다. 그러나 현재까지 국내에서 개발된 대부분의 녹색자엽 검정콩은 세포질 유전자에 의해 유전되는 자원을 모본으로 활용하여 육성된 품종으로서 자엽의 녹색정도가 낮아, 짙은 녹색을 선호하는 소비자와 재배농가의 욕구를 충족시키지 못하고 있는 실정이다.

이에 본 연구는 고품질 녹색자엽 검정콩 신품종 육성연구의 일환으로 녹색자엽의 유전자원별 녹색의 정도를 평가할 수 있는 엽록소 함량 및 조성과 이들의 유전양상을 검토하고, 유전적 배경을 달리한 녹색자엽 자원을 활용한 녹색자엽 검정콩의 선발효율을 검토하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 시험에 활용된 재료 중 녹색자엽 유전자인 *cytG*, *d1* 및 *d2* 유전자를 보유한 것으로 확인된 PI547680 등 12점의 유전자원을 미국 USDA-ARS로 부터 분양 받았으며, 국내 육성 검정콩인 일품검정콩, 청자콩, 청자콩 2호, 청자콩 3호는 국립식량과학원에서 보유중인 종자를 활용하였다.

USDA-ARS에서 분양받은 녹색자엽 유전자원 12점(Table 2) 및 국내 육성 검정콩 4품종(일품검정콩, 청자콩, 청자콩 2호, 청자콩 3호)을 2005년 하계 국립식량과학원 전작물 재배포장에서 콩 표준재배법에 준하여 재배하며 기본특성을 조사하였고, 성숙기 이후 이들 종자를 수확하여 각 종실에

Table 1. HPLC condition for analysis of green cotyledon extract.

Parameter	Condition
Column	YMC ODS AM 303 (250 × 4.6 mm)
Mobil phase (gradient elution)	A : 75 % MeOH, B : 100 % EtOAc
Wavelength	430 nm
Flow rate	1.0 mL/min.
Injection vol.	20 µL
Column temp.	30°C

Table 2. Characterization of qualitative trait in plant introduction (PI) with stay-green mutation.

PI No.	Gene [†]	Color						Maturity Group [†]
		Flower	Hilum	Cotyledon	Pod	Pubescence	Seed coat	
PI547680	<i>cytG</i>	purple	green	green	brown	gray	green	II
PI547407	<i>cytG</i>	purple	black	green	brown	tawny	green	IV
PI547443	<i>G d1</i>	purple	black	yellow	brown	tawny	green	IV
PI547426	<i>cytG d1 d2</i>	purple	black	green	brown	tawny	green	IV
PI547445	<i>d1 d2</i>	purple	black	green	brown	tawny	green	IV
PI547691	<i>cytG d1 d2</i>	purple	green	green	brown	gray	green	II
PI547709	<i>cytG d1</i>	purple	green	yellow	brown	gray	green	II
PI547711	<i>d1 d2</i>	purple	green	green	brown	gray	green	II
PI547758	<i>d1</i>	purple	yellow	yellow	brown	gray	yellow	II
PI548160	<i>d1 d2</i>	white	gray	green	brown	tawny	green	IV
PI548164	<i>D1 d2 or d1 D2</i>	purple	black	yellow	brown	tawny	green	I
PI548167	<i>d1 d2 or cytG</i>	purple	black	green	brown	tawny	green	IV

[†] Cited at http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc_queries.html

함유된 엽록소 함량과 조성을 조사하였다.

유전실험을 위한 집단양성을 위해 2005년 하계에 USDA-ARS 로 부터 분양받은 12점의 유전자원 중 핵유전 유전자 (*d1d2*)를 보유한 계통과 일품검정콩을 인공교배 하였고, 이들의 F₁을 2005/6년 동계 온실에서 재배하여 F₂ 종자를 확보하였다. 2006년 하계에 모부분, F₁ 및 F₂를 국립식량과학원 전작물 재배포장에 70 × 15cm, 1주 1본으로 재식하여 기본특성을 조사하였으며, 이들 중 포장형질이 우수한 계통을 선발함과 동시에 실내에서 종실별 자엽의 녹색정도를 육안으로 조사하였다.

종실 엽록소 함량 및 조성 분석

유전자원 및 품종의 종실 함유 엽록소 함량을 분석하기 위해 종실시료를 분쇄하고 60 mesh 체로 통과시킨 후 분쇄시료를 이용하여 엽록소를 추출하였다. 즉, 분쇄시료 1.0 g에 아세톤 10 mL 첨가 후 40°C 조건의 초음파 추출기에서 30분간 추출하였고, 상온조건에서 3,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리 후 상징액을 회수하여, 여과지로 1차 여과하고, 다시 0.45 µm의 실린지 필터로 2차 여과 후 20 µL를 HPLC에 주

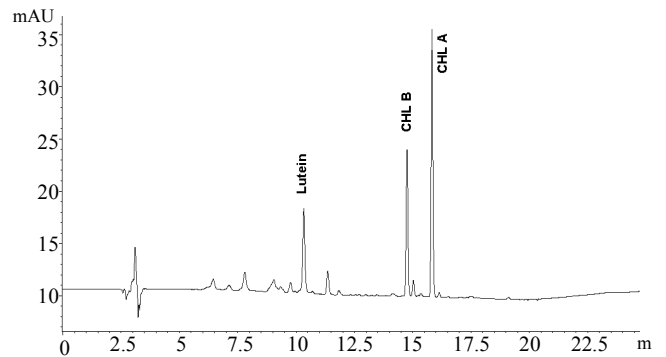


Fig. 1. HPLC chromatogram of green cotyledon extract.

입하여 분석하였으며, HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

종실에 함유된 엽록소의 함량평가는 HPLC로 분석된 각 peak의 면적 값을 기준으로 계산하였으며(Fig. 1), 함량계산에 이용된 표준물질은 본 연구자들이 column chromatography를 실시하여 순수분리 한 후 NMR, MS, UV-VIS. 등 분광적 방법을 이용하여 화학적 구조를 동정한 분리 표준품을 이용하여 표준 검량식을 작성하고, 검량식에 준하여 엽록소 a 및 b의 함량을 평가하였다.

결과 및 고찰

유전자원별 기본 특성평가

본 시험에 사용하기 위해 USDA-ARS에서 분양받은 12종의 콩 자원들의 자엽색상을 포함한 기본 특성은 Table 2와 같다. 즉, 자엽색에 관련된 유전자의 종류에 따라 자엽색이 상이하였으며, 이는 알려진 바와 같이 자엽색의 경우 *cytG*나 *d1d1d2d2*, 혹은 두 가지 모두의 경우 녹색의 자엽을, 그 외의 경우에는 황색의 자엽을 나타내고 있음을 알 수

있고(Bernard & Weiss, 1973), 각 자원에 따라 종피색, 협색 및 신육형도 다양하였다.

국내 재배환경에서 USDA-ARS 분양 자원들의 생육상황을 관찰하기 위해 이들 계통을 국립식량과학원 포장에 재식 후 기본적인 농업형질을 조사한 결과 각 계통들은 무한신육형이 많았고, 중단경종에 속하며, 성숙기는 대체적으로 9월 중하순에서 10월 초로서 우리나라에서 재배하기에는 적합하여 녹색자엽 검정콩 육성의 교배모본으로 활용가능성이 높음을 알 수 있다(Table 3).

Table 3. Characterization of quantitative trait in plant introduction (PI) with stay-green mutation.

PI No. or Varietal name	Cotyledon gene	Growth habit	Maturity date (month/day)	Plant height (cm)	Branch no.	Node no.	Pod no.
PI547680	<i>cytG</i>	Indetermin	9/27	41.7	3.3	14.0	77.3
PI547407	<i>cytG</i>	"	10/05	67.0	6.0	19.7	220.7
PI547443	<i>d1</i>	"	10/05	67.0	3.6	18.6	115.2
PI547426	<i>d1d2</i>	"	9/20	77.0	6.0	20.0	174.0
PI547445	<i>d1d2</i>	"	9/28	78.0	5.2	20.6	138.6
PI547691	<i>d1d2</i>	"	9/18	66.0	4.8	18.8	122.4
PI547709	<i>d1</i>	"	9/18	60.0	5.0	18.0	123.5
PI547711	<i>d1d2</i>	"	10/04	60.0	2.0	18.5	101.0
PI547758	<i>d1</i>	"	9/18	64.8	3.0	18.5	138.3
PI548160	<i>d1d2</i>	Determin	9/18	29.6	3.8	11.2	67.6
PI548164	<i>D1d2</i> or <i>d1D2</i>	Indetermin	9/15	40.0	5.0	14.0	146.0
PI548167	<i>d1d2 cytG</i>	Determin	9/18	41.6	4.0	12.8	115.0
Ilpumgoumjeongkong	<i>D1D2</i>	"	9/25	46.0	2.2	15.6	59.8
Cheongjakong 3	<i>cytG</i>	"	10/05	69.0	2.6	15.8	30.8

Table 4. Chlorophyll content and composition in plant introduction (PI) and cultivar with stay-green mutation.

PI No. or Varietal name	Cotyledon color	Hilum color	Chlorophyll content ($\mu\text{g/g}$)		
			Chl b	Chl a	Chl b + Chl a
Ilpumgoumjeongkong	yellow	black	-	-	-
Cheongjakong 3	green	black	20.96	11.84	32.81
Cheongjakong 2	green	black	22.20	13.52	35.73
Cheongjakong	green	black	11.37	5.06	16.43
PI547680	green	green	26.34	11.73	38.08
PI547407	green	black	25.67	14.20	39.87
PI547443	yellow	black	-	-	-
PI547426	green	black	16.39	60.80	77.19
PI547445	green	black	17.19	59.18	76.37
PI547691	green	green	15.23	48.24	63.47
PI547709	yellow	green	-	-	-
PI547711	green	green	14.99	47.92	62.90
PI547758	yellow	yellow	-	-	-
PI548160	green	grey	14.33	39.93	54.26
PI548164	yellow	black	-	-	-
PI548167	green	black	26.20	32.46	58.66

녹색자엽 유전자원 및 품종의 종실 엽록소 함량 및 조성

녹색자엽 유전자를 보유한 유전자원 12계통, 국내에서 육성된 녹색자엽 검정콩 3품종 및 황색자엽 검정콩 1품종의 종실 엽록소 함량과 조성을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 녹색의 자엽을 가진 자원에서는 엽록소 a, b 및 lutein의 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

각 계통 및 품종별 종실 엽록소 함량을 보면 황색자엽에서는 엽록소가 전혀 검출되지 않았고, 녹색자엽 콩에서는 보유한 녹색자엽 관련 유전자에 따라 엽록소 함량과 조성이 상이한 양상이었다. 또한 동일한 유전자를 보유한 계통 간에도 종실 엽록소 함량에 차이가 있음을 확인할 수 있다 (Table 4). 보유한 유전자에 따른 엽록소 총량은 *cytG* 유전자를 보유한 계통은 16.43 ~ 39.87 $\mu\text{g/g}$, *dld2* 유전자를 보유한 계통은 54.26 ~ 77.19 $\mu\text{g/g}$, *dld2*와 *cytG* 유전자를 동시에 보유한 계통은 58.66 $\mu\text{g/g}$ 수준의 경향을 보였으며, 이 결과로 볼 때 핵내 유전자 *dld2*를 보유한 자원이 *cytG* 혹은 *dld2*와 *cytG*를 동시에 보유한 계통보다 엽록소 함량이 훨씬 높아 종실 엽록소 함량이 높은 검정콩 육성을 위한 자원

으로 활용 가치가 높음을 알 수 있었다.

한편 종실 엽록소의 조성은 *cytG* 유전자를 보유한 계통은 엽록소 b의 함량이 엽록소 a 함량에 비해 약 2배 전후로 높은 양상을 나타내었고, *dld2*의 유전자를 보유한 계통은 엽록소 a의 함량이 b에 비해 3 ~ 4배정도 높고, *cytG*와 *dld2* 유전자를 동시에 보유한 자원은 엽록소 a와 b의 조성이 비슷한 경향을 보여, Guimé *et al.*, (1991)이 콩의 잎에서 분석한 결과와 유사하였다. 기존 국내 육성품종인 청자콩, 청자콩 2호 및 3호의 경우 전체 엽록소 함량이 낮고, 조성면에서도 다른 *cytG* 계통들과 유사하여 향후 녹색의 강도가 더 높고, 엽록소 함량이 높은 품종을 선호하는 소비자의 기호를 고려할 때 *cytG* 유전자만을 보유한 계통보다는 핵유전을 하는 *dld2* 유전자를 보유한 녹색자엽 유전자원들을 교배 모부본에 적극 활용하여야 할 것으로 판단된다.

녹색자엽 핵유전 유전자 보유 자원의 유전양상 및 선발효율

종실 엽록소 함량이 높고 녹색의 강도가 높은 녹색자엽 검정콩 품종육성을 위한 재료로 자엽이 녹색인 핵유전 유전

Table 5. Segregation of the cotyledon color in the F₂ seed crosses Ilpumgeomjeongkong (*DID2*) and plant introductions with green cotyledon (*dld2*).

Cross	Cotyledon color			$\chi^2(15:1)$	P
	Green	Yellow			
Ilpumgeomjeongkong / PI547426	53	800		0.00	0.96
PI547445 / Ilpumgeomjeongkong	125	1960		0.23	0.63
Ilpumgeomjeongkong / PI547691*	175	2319		2.50	0.11
Ilpumgeomjeongkong / PI547711*	173	2632		0.03	0.86
Ilpumgeomjeongkong / PI548160*	117	1642		0.48	0.49
Ilpumgeomjeongkong / PI548167	37	659		1.04	0.31

* Pooled reciprocal.

Table 6. Segregation of the cotyledon color in the F₃ seed crosses Ilpumgeomjeongkong (*DID2*) and plant introductions with green cotyledon (*dld2*).

Cross	Cotyledon color (No. of plants)				P (yellow : seg.: green = 7:8:1)	P (yellow + seg.: green = 15:1)
	Yellow	Segregation	Green	Total		
	(<i>D1-D2</i> -)	(<i>dld1D2d2</i> or <i>D1d1d2d2</i>)	(<i>dld1d2d2</i>)			
Ilpumgeomjeongkong / PI547426	63	131	9	203	0.00	0.28
PI547445 / Ilpumgeomjeongkong	43	53	8	104	0.78	0.54
Ilpumgeomjeongkong / PI547691*	59	27	8	94	0.00	0.37
Ilpumgeomjeongkong / PI547711*	70	60	7	137	0.22	0.58
Ilpumgeomjeongkong / PI548160*	64	93	12	169	0.30	0.65
PI548167 / Ilpumgeomjeongkong	40	49	5	94	0.88	0.71

* Pooled reciprocal.

Table 7. Segregation of the cotyledon color among the black seed coat lines in the F₃ seed crosses Ilpumgeomjeongkong (*D1D2*) and plant introductions with green cotyledon (*d1d2*).

Cross	Cotyledon color (No. of plants)			P**		Selection ratio of black seed coat and green cotyledon (%)	
	Yellow (<i>D1-D2</i> -)	Segregation (<i>d1d1D2d2</i> or <i>D1d1d2d2</i>)	Green (<i>d1d1d2d2</i>)			I ***	II ****
				Y:S:G = 7:8:1	Y+S:G = 15:1		
Ilpumgeomjeongkong / PI547426	24	30	2	0.67	0.41	3.6	1.0
PI547445 / Ilpumgeomjeongkong	12	12	3	0.55	0.30	11.1	2.9
Ilpumgeomjeongkong / PI547691*	11	6	2	0.26	0.44	10.5	2.1
Ilpumgeomjeongkong / PI547711*	13	4	0	0.02	0.29	0.0	0.0
Ilpumgeomjeongkong / PI548160*	12	15	2	0.96	0.89	6.9	1.2
PI548167 / Ilpumgeomjeongkong	20	13	1	0.19	0.43	2.9	1.1

* AB : Pooled reciprocal crosses,
 ** Y : yellow cotyledon, S : segregation, G : green cotyledon
 *** I : (black seed coat and green cotyledon plants)/(black seed coat plants)
 **** II : (black seed coat and green cotyledon plants)/(total plants)

자(*d1d2*)를 보유한 계통을 교배 모부분에 활용하기 위해 이들 형질의 유전양상과 녹색자엽 검정콩의 선발효율을 검토하였다. 먼저 종피색이 검정색이고 자엽색이 황색인 일품검정콩에 핵유전 녹색자엽 유전자(*d1d2*)를 보유한 계통을 교배 후 각 세대별로 종피색과 자엽색을 조사하였다.

F₂ 및 F₃세대에서 종실의 자엽색은 Table 5 및 6에서와 같이 황색:녹색의 분리비율이 15:1로 나타나 자엽색 유전에는 2 개의 유전자가 관여하고, 녹색자엽은 2 개의 열성 유전자에 기인한다는 기존의 보고와 일치하였다(Bernard & Weiss, 1973).

F₃ 종자에서 자엽색은 대부분 황색:분리(황색과 녹색):녹색을 나타내는 분리비가 7:8:1을 만족하고 있으며, 일부 분리비가 벗어나는 조합도 황색+분리(황색과 녹색):녹색 자엽의 분리비가 15:1의 분리비에 적합하게 분리하여 매우 낮은 비율의 녹색자엽 검정콩 개체를 선발할 수 있음을 알 수 있다.

F₃ 종자에서 종피색의 분리비를 조사한 결과, 종피색은 I (종피색 분포), R (검정 및 갈색 종피색), T (모용색과 제색과 관련)유전자에 의해 결정된다는 보고(Bernard and Weiss, 1973) 처럼 각 조합별로 모본의 특성에 따라 황색, 녹색, 검정색 및 갈색으로 분리되는 비율이 상이하였고, 전체적으로 검정색 종피를 가진 콩의 비율은 낮은 수준이었다.

Table 7은 F₃ 종실에서 검정색 종피를 가진 종자 중 목표형질인 녹색자엽을 보유한 개체를 선발할 수 있는 비율과

전체 종자 중 검정색 종피와 녹색자엽을 보유한 종자를 선발할 수 있는 비율을 계산하였다. 검정색 종피에 황색자엽을 가진 일품검정콩과 녹색 종피에 핵유전 녹색자엽 유전자를 보유한 계통을 교배한 F₃ 종실에서 검정색 종피를 가진 종실을 대상으로 하여 자엽색을 조사한 결과 녹색자엽의 분리비는 전체 종자에서와 마찬가지로 대부분 황색:황색+녹색:녹색의 분리비가 7:8:1을 만족하였고, 황색과 황색+녹색:녹색의 분리비는 15:1을 만족하였으며, 일부조합에서 분리비를 벗어나는 것은 조사 시 전체종자가 아닌 일부 종자를 채취하여 조사하였기 때문인 것으로 판단된다.

종피색이 검정색이고 자엽색이 황색인 일품검정콩과 종피색이 녹색이고 핵유전 녹색자엽 유전자(*d1d2*)를 보유한 자원을 교배한 후대에서 교배집단별로 전체 F₂ 식물체중 중 검정색 종피에 녹색자엽인 개체를 선발할 수 있는 비율을 조사한 결과, 약간의 차이는 있으나 조합별로 1 ~ 3개 정도의 개체를 선발할 수 있었다. 이를 비율로 환산하면 전체 F₂ 개체 중 검정색 종피에 녹색자엽인 종자를 보유한 개체의 비율은 약 0 ~ 2.9% 이고, 검정색 종피 중에서 녹색자엽에 검정색 종피를 가진 개체의 비율은 0 ~ 11.1%의 비율을 보였다. 이중 Ilpumgeomjeongkong/PI547711 조합에서는 검정색 종피에 녹색자엽을 가진 개체를 선발할 수 없었는데, 이는 검정색 종피에 녹색자엽을 가진 개체수가 1 ~ 2개체로 너무 적어 포장실험 중 소실되었을 것으로 추정된다. 이

인용문헌

상에서 보는 바와 같이 검정색 종피에 녹색자엽을 가진 개체를 선발하기 위해 핵유전 녹색자엽에 녹색 혹은 황색 종피를 가진 자원을 교배모본으로 직접 활용 시 목표하는 개체를 선발할 수 있는 비율은 매우 낮을 것으로 판단된다.

이상의 실험 결과를 종합하면 종실의 엽록소 함량이 높은 녹색자엽 검정콩 품종육성을 위해서는 기존 품종보다 종실의 엽록소 함량이 월등히 높은 *d1d2* 유전자를 보유한 녹색자엽 자원을 교배모본으로 적극 활용하여야 하며, *d1d2* 유전자를 보유한 자원을 활용하여 녹색자엽 검정콩 계통의 선발 효율을 극대화하기 위해서는 먼저 검정색 종피에 *d1d2* 유전자를 보유한 중간모본 양성과 더불어 선발의 효율성을 증가시키기 위한 선발방법의 개량도 고려해야할 요소로 생각된다. 이러한 측면에서 본 시험에서 선발한 *d1d2* 유전자를 보유한 검정콩 자원의 활용도는 향후 *d1d2* 녹색자엽 검정콩 신품종 육성을 위해 매우 활용도가 높을 것으로 판단된다.

적 요

고품질 녹색자엽 검정콩 신품종 육성 연구의 일환으로 녹색자엽의 유전자원별 녹색의 정도를 평가할 수 있는 엽록소 함량 및 조성과 이들의 유전양상을 검토하고, 유전적 배경을 달리한 녹색자엽 자원을 활용한 녹색자엽 검정콩의 선발 효율을 검토한 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 유전적 배경이 상이한 녹색자엽 자원을 검정콩 육종 프로그램에 도입코자 실시한 특성조사 결과 핵유전 녹색자엽 유전자 *d1d2*를 보유한 자원은 세포질 유전 녹색자엽 유전자 *cytG*를 보유한 자원보다 총 엽록소의 함량이 매우 높은 경향이었고, 조성에서는 *d1d2* 보유 자원은 엽록소 a의 함량이 엽록소 b보다 2배 이상 높고, *cytG* 보유 유전자원은 엽록소 b의 함량이 엽록소 a 함량 보다 높은 경향이였다.
2. 핵유전 녹색자엽 유전자(*d1d2*)는 당대의 종실에서 발현되어 F₁ 세대의 F₂ 종실에서부터 선발이 가능하며, 2개의 열성유전자에 지배를 받는다.
3. 녹색 종피의 핵유전 녹색자엽(*d1d2*)과 황색자엽 검정콩(*DID2*)의 교배후대에서 검정색 종피에 녹색자엽 종자를 가진 개체는 모본의 유전적 배경에 따라 조금은 다르지만 F₂ 전체 개체 중 3% 미만의 낮은 비율로 나타나, 향후 핵유전 녹색자엽 검정콩 신품종 육성효율 증진을 위해서는 핵유전 녹색자엽 검정콩 중간모본 개발과 선발방법 개선이 필요할 것으로 판단된다.

Baek, I. Y., S. T. Kang, D. C. Shin, M. G. Choung, W. Y. Han, Y. H. Kwack, and H. P. Moon. 2001. New variety developed : A new black soybean variety with green cotyledon, early maturity and large seed size “Cheongjakong” Kor. J. Breeding 33(3) : 240-241.

Bernard, R. L. and M. G. Weiss. 1973. Qualitative genetics. In : B. E. Caldwell, (ed.) Soybean; Improvement, production, and uses. Agronomy 14 : 117-154.

Choung, M. G., I. Y. Baek, S. T. Kang, W. Y. Han, D. C. Shin, H. P. Moon, and K. H. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). J. of Agric. Food Chem. 49 : 5848-5851.

Chu, Y. H., J. H. Park, S. G. Yun, Y. H. Kim, S. M. Kim, and K. W. Jung. 2002. Seed characteristics of domestic breeding varieties in black soybean (*Glycine max* L. Merr.). Kor. J. Intl. Agri. 14 : 252-259.

Crookston, R. K. and D. S. Hill. 1978. A visual indicator of the physiological maturity of soybean seed. Crop Sci. 18 : 867-870.

Guamét, J. J., J. A. Teeri, and L. D. Noodén. 1990. Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. Plant and Cell Physiology 31 : 1123-1130.

Guamét J. J., E. Schwartz, E. Pichersky, and L. D. Noodén. 1991. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding proteins during senescence in soybean. Plant Physiology 96 : 227-231.

Guamét, J. J. and M. C. Gianibelli. 1994. Inhibition of the degradation of chloroplast membranes during senescence in nuclear stay green mutants of soybean. Physiologia Plantarum 91 : 395-402.

Guamét J. J. and M. C. Gianibelli. 1996. Nuclear and cytoplasmic stay green mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence. Physiologia Plantarum 96 : 655-661.

Hilditch, P., H. Thomas, and H. Rogers. 1986. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis* : Photosynthesis and photosynthetic electron transport. Planta 167 : 146-151.

Jiang G. H., Y. Q. He, C. G. Xu, X. H. Li, and Q. Zhang. 2004. The genetic basis of stay-green in rice analyzed in a population of doubled haploid lines derived from and indica by japonica cross. Theor. Appl. Genet. 108 : 688-698.

Kang, S. T., M. J. Seo, J. K. Moon, Y. H. Lee, H. T. Yun, M. G. Chung, and S. J. Kim. 2007. Introducing new green cotyledon germplasm for development black seed coat and green cotyledon variety. Treat. of Crop Res. 8 : 332-341.

Kim, D. H., C. A. Yun, and W. J. Kim. 1990. Kinetic study

- of hydration and volume changes of soybeans during soaking. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 33(1) : 18-23.
- Kim, Y. H., S. D. Kim, and E. H. Hong. 1994. Properties of soybean seeds during hydration. *RDA. J. Agri. Sci.* 36(1) : 71-75.
- Kim, Y. H., J. H. Lee, Y. S. Lee, and H. T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black soybean. *Kor. Soybean Digest.* 23 (1) : 1-9.
- Kim, S. D., Y. H. Kim, E. H. Hong, and E. H. Park. 1993. Seed characteristics of black soybean collections in Korea. *Kor. J. Crop Sci.* 38(5) : 437-441.
- Kim, W. J., E. S. Shin, J. K. Kim, and C. B. Yang. 1985. Factors affecting hydrations rate of black soybean. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 17(1) : 41-44.
- Lee, H. S., E. H. Park, and B. K. Lim. 1984. Studies on alkali digestibility of soybean seeds and its inheritance. *Kor. J. Crop Sci.* 29(2) : 179-185.
- Luquez, V. M. and J. J. Guiamet. 2002. The stay green mutations d1 and d2 increase water stress susceptibility in soybeans. *Journal of Experimental Botany* 53 : 1421-1428.
- Noodén L. D. and J. J. Guiamét. 1996. Genetic control of senescence and ageing in plants. In: Schneider E, Rowe J. W., eds. *Handbook of the biology of ageing*, 4th ed. San Diego : Academic Press 94-118.
- Noodén L. D, J. J. Guiamét, and I. John. 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* 101 : 746-753.
- Noodén L. D. and J. J. Guiamét. 1989. Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants. *Physiol. Plant* 77 : 267-274.
- Okatan, Y., G. M. Kahanak, and L. D. Noodén. 1981. Characterization and kinetics of soybean maturation and. monocarpic senescence. *Physiol. Plant.* 52 : 330-338.
- Park, E. H. 1986. Seed characteristics of soybean cultivars for the cooking with rice, Seoul Natl. Univ. Grad. Sch. Ph. D. Dissertation.
- Son, B. Y. 1992. Variation of sugar content and its relation with some major characteristics of collected colored-soybean strains. Seoul Natl. Univ. Grad. Sch. MS Thesis.
- Soybean breeding team, Crop experiment Station. 1994. A black seed-coat, large seed-size, and high-yielding soybean variety suitable for cooking with rice "Geomjeongkong 1" *Kor. J. Breeding* 26(4) : 462-463.
- Thomas, H. and C. M. Smart. 1993. Crops that stay green. *Annals of Applied Biology* 123 : 193-219.
- Thomas, H. and C. Howarth. 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* 51 : 329-337.
- Yoo S. C., S. H. Cho, H. Zhang, H. C. Paik, C. H. Lee, J. J. Li, J. H. Yoo, B. W. Lee, H. J. Koh, H. S. Seo, and N. C. Paek. 2007. Quantitative trait loci associated with functional stay-green SNU-SG1 in rice. *Molecules and Cells* 24(1) : 83-94.
- Yue B., W. Y. Xue, L. J. Luo, and Y. Z. Xing. 2006. QTL analysis for flag leaf characteristics and their relationships with yield and yield traits in rice. *Acta. Genetica Sinica* 33(9) : 824-832.