

GOVP1200623371

최 중
연구보고서

T0015701

**콩 미이라병 저항성 유전자 관련 DNA
marker 개발 및 우량계통 육성**

Development of breeding lines and DNA markers associated
with resistance to Phomopsis Seed Decay in soybean

연구기관
순천향대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “콩 미이라병 저항성 유전자 관련 DNA marker 개발 및 우량계통 육성” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 순천향대학교

총괄연구책임자 : 김 용 호

세부연구책임자 : 김 용 호

연 구 원 : 엄 상 미

연 구 원 : 이 재 도

연 구 원 : 남 시 훈

연 구 원 : 남 두 현

연 구 원 : 고 병 용

협동연구기관명 : 작물과학원

협동연구책임자 : 윤 흥 태

연 구 원 : 서 민 정

연 구 원 : 안 선 옥

연 구 원 : 홍 연 기

요 약 문

I. 제 목

콩 미이라병 저항성 유전자 관련 DNA marker 개발 및 우량계통 육성

II. 연구개발의 목적 및 필요성

콩 (*Glycin max* L. Merr)은 매우 중요한 식량작물중의 하나이며 우리나라에서는 식생활에서 가장 비중이 큰 식물성 단백질 공급원으로써 농업에서 차지하는 비중도 크다. 그러나 콩 재배에는 여러 가지 병해가 콩의 수량 및 품질을 떨어뜨리는 요인이 된다. 이러한 병해 중 콩 미이라병은 주요한 병해의 하나로 우리나라 뿐 만 아니라 세계적으로도 많이 발생되는데, 성숙기가 고온 다습한 조건에서 발생하여 콩의 품질 및 발아율에 악 영향을 미친다. 미이라병에 감염되면 균에 의한 부패립의 발생이 심하고, 종자가 쭈글쭈글해지는 등 종자의 품질이 낮아질 뿐만 아니라 발아율을 크게 떨어뜨려 콩의 수량 감소 및 품질 저하에 많은 영향을 끼친다.

그동안 우리나라 콩 육종은 수량과 품질을 우선시하여 수행되어 왔으며, 병충해 관련 저항성 품종 육성은 거의 이루어지지 않았다고 하여도 과언이 아니다. 그 까닭은 저항성 품종 육성에 투입되는 시간과 노력에 비해 얻어지는 결과가 미진한 탓도 있다 할 것이다. 그러나 최근에는 분자표지를 활용한 작물 분자유종체계 확립의 중요성이 부각되고 있어 특히 병해 관련 저항성 품종 육성에 큰 희망이 되고 있다. 즉, 주요 농업형질 탐색용 DNA 표지인자를 개발하고, 이를 이용한 고밀도 유전자 지도 작성과 QTL 분석을 통하여 육종 효율 증진 및 육종 연한을 대폭 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 과제에서는 콩 미이라병 저항성 유전자에 관련된 DNA marker 를 개발하는 한편, DNA marker 개발 과정 중에서 우량 계통들을 선발함으로써 콩 미이라병 저항성 품종 육성에 일익을 담당하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 세부과제인 콩 미이라병 저항성 관련 DNA marker 개발과 협동과제인 콩 미이라병 저항성 관련 우량계통 육성으로 구성되어 있다.

세부과제인 콩 미이라병 저항성 관련 DNA marker 개발 분야는 AFLP marker 2종 및 SSR marker 3종 개발이 주 목적이다. 따라서 우선적으로 콩 미이라병 감염종자에서 균주를 분리하는 한편 기 확보된 균주와의 동일성을 확인하였다. 그리고 미이라병 저항성 유전자원을 획득하기 위하여 야생콩 200여 계통을 대상으로 균 접종을 통한 미이라병 저항성 유전자원을 탐색하였다. 또한 F₂ 집단, BC₁F₂ 집단 및 BC₂F₂ 집단을 대상으로 AFLP 및 SSR analysis를 수행하여 콩 미이라병 저항성 유전자와 관련된 DNA marker를 선발하였다.

협동과제인 콩 미이라병 저항성 관련 우량계통 육성 분야는 콩 미이라병 저항성 품종 육성 목적으로 인공교배를 한 후, 교잡된 후대를 대상으로 직접 미이라병 균을 접종하고 저항성인 우량계통을 선발하였다. 이를 위하여 SSD법으로 대만 소재 AVRDC(아시아 채소 연구 개발 센터)에서 세대축진(F₃~F₅)을 수행하였으며, NIL 집단 양성을 위하여 2차례의 backcross를 실시하여 BC₂F₂ 집단을 육성하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 콩 미이라병 저항성 관련 DNA marker 개발

콩 미이라병 감염 종자로부터 10종의 미이라병 균을 분리하였으며, 그중 병원성이 가장 큰 JP151을 접종원으로 사용하였다. 먼저 미이라병에 저항성인 유전자원을 선발하기 위하여 야생콩 202계통에 미이라병 균을 인공 접종하였으며, 모든 실험은 유리온실에서 수행되었다. 재배 후 수확된 종자를 대상으로 미이라병 감염 여부를 조사한 바 계통 간에 큰 차이를 찾을 수 없었다. 즉 수확된 종자에서의 저항성 여부는 육안으로는 공시 재료 간에 특별한 병징을 발견할 수 없었으며, PDA배지에서도 차이가 나지 않았다. 이것은 공시재료 중에는 미이라병에 이병성인 유전자원이 포함되지 않았을 가능성이 있거나, 혹은 야생콩 특유의 종자 형태 특성상 육안으로는 미이라병의 징후를 발견하기 어려운 점 등의 이유가 있을 것으로 판단되었다 따라서 야생콩은 미이라병에 대부분 저항성임을 판단할 수 있었으나 추후 더 깊은 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

한편, 작물과학원에서 교잡된 F₁ seeds를 분양받아 F₂ 및 backcross를 통한

BC₁F₂ 집단을 양성한 후, 이들 집단을 대상으로 인공접종을 통한 미이라병의 유전 분리 양상을 분석한 바, 저항성과 이병성의 분리비가 9 : 7 및 3 : 1로 나타나 콩 미이라병 저항성 유전자는 1~2개의 우성 유전자에 의해 지배됨을 알 수 있었다.

또한 F₂집단 및 BC₁F₂와 BC₂F₂ 식물체의 DNA를 대상으로 콩 미이라병에 저항성인 유전자를 탐색하기 위한 DNA marker analysis를 수행하였다. SSR marker를 이용하여 관련 유전자를 탐색한 바 47.1 cM의 거리에 3.3~12.5 cM 정도의 간격으로 위치한 8개의 marker를 선발(Sct_033, Satt335, Sat_313, Satt490, Sat_197, Satt554, Satt657, Satt522)하였다. 이중 Sct_033이 미이라병 발병과 높은 상관을 보였다. AFLP marker는 5개가 선발(AF1, AF2, AF3, AF4, AF5)되어졌으며 이중 3개가 미이라병 발현과 80% 내외의 연관을 나타내어 콩 미이라병 저항성 유전자와 관련이 있을 것으로 판단되었지만, 선발된 SSR marker와는 다소의 간격이 나타나 연관을 찾을 수 없었다. 그리고 RFLP marker 중 미이라병 저항성으로 알려진 2개의 marker 및 인접 marker를 대상으로 SNP 분석을 실시한 바, 몇 개의 polymorphism이 나타났지만 각 염기의 quality가 떨어져 이것이 SNP와 관련된 염기라 판단하기에는 신뢰성이 떨어졌다.

이러한 결과는 콩 미이라병에 관여하는 군주가 10개 이상이며, 미이라병의 발현에는 미이라병 외의 여러 가지 병이 복합적으로 어울려 나타나기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 미이라병 관련 정밀 linkage group map을 작성하기 위해서는 복합적 병 저항성에 관련된 연구가 필요하리라 사료되었다. 그러나 본 연구의 결과를 종합적으로 판단하건대 SSR marker인 Sct_033, Satt544 와 Satt490, AFLP marker인 AF3이 콩 미이라병 저항성 유전자와 밀접한 관계가 있는 것으로 판단되었다.

나. 콩 미이라병 저항성 관련 우량계통 육성

여교잡을 이용한 콩 미이라병 저항성 계통 육성을 위하여 국내 우량품종 중 조생종으로서 농업형질이 우수한 화엄꽃콩과 미이라병 저항성 인자 보유 자원인 PI 417479를 인공교배 하였으며, 본과제의 주목적인 국내 육성종에 미이라병 저항성인자 도입을 위하여 여교잡을 3회 수행하였다. 2005년에는 여교잡된 F₁ 식물체를 양성하였고, 본과제가 종료되는 2006년 현재 BC₃F₂세대의 계통을 전개 중이며, 이들 계통 중 농업형질이 우수한 계통을 선발하여 2007년 생산력검정시험에 공시할 예정이다.

또한 국내 우량 품종에 미이라병 저항성 인자를 도입하며 우량계통을 육성하기 위하여 일련의 육종과정을 수행하였다. 2003/2004 2개년 간 9조합을 인공교배 하였으며, 반복친의 농업형질을 유지하기 위하여 여교잡을 실시하였다. F₁ 은 2003~2005(3개년) 동안 F₂세대 11조합 207립을 파종하여, 99개체 4,600립을 양성하였고, F₂의 세대의 후대 선발은 제한된 포장면적을 고려하여 2004, 2005년은 1립1개체법(single seed descent method)으로 선발하였으며, 주요조사항목은 교배여부를 중심으로 하였다. 2003~2005년 동안 8조합 6,027립을 파종하여, 입질이 불량한 1조합을 실내 도태한 후 7조합 3,647립을 수확하였다. F₃ 세대는 2004~2005년에 2조합 1,510립을 공시하여 292계통을 선발하였으며, F₄ 세대는 2005년에 SS01415 조합을 실내선발 후 139계통을 선발하여 2006년에 116 계통을 파종하였다. F₃ 세대에서는 미이라병 저항성 조사 및 달관으로 농업형질을 고려하여 선발하였으며, 2005년도에 실내에서 입질 및 수량성을 조사한 후 우수한 계통을 선발하여 2006년 생산력검정 예비선발시험에 공시하였다. 선발된 SS01415-80-1 계통군은 화엄꽃콩의 외관형질과 유사하여 제색이 황색이며 종피가 파열되지 않아 유망시 되었으며, 이외에 SS01415-3-4, SS01415-44-3의 계통들도 수량성 등이 뛰어나 유망시 되었다. 2006년 생산력검정 예비선발시험에 공시된 계통은 2006~2007년간 수량성 및 농업형질을 정밀검토한 후 2008년도 지역 적응시험에 공시할 예정이다.

SUMMARY

I. Title

Development of breeding lines and DNA markers associated with resistance to Phomopsis Seed Decay in soybean

II. Major Results and Discussions

1. Development of DNA markers associated with resistance to Phomopsis Seed Decay in soybean

Phomopsis seed decay(PSD) is part of a major fungal disease complex found in most soybean production areas of the world. PSD is a common contributor to reduced soybean seed quality, particularly when maturation occurs during periods of high humidity and high temperature. Numerous studies have shown a strong negative relationship between incidence of Phomopsis seed infection and soybean germination, vigor, and emergence. *Phomopsis longicolla* and *P. sojae* are the species found with the greatest frequency in PSD-infected seed lots. While some chemical and cultural control measures exist to reduce losses due to this disease, genetic resistance would be desirable. The most economical and feasible solution for managing areas infested with PSD is the use of resistant cultivars. The use of molecular markers is an efficient alternative to the tedious work of genotype evaluation for PSD resistance and allows for an efficient selection of polygenic resistance to PSD. Molecular markers can be used in the indirect selection of traits that are difficult to evaluate and/or that are largely affected by the environment.

For finding a genetic segregation ratio and developing a genetic linkage map , resistant cultivar PI 417479 and susceptible cultivars Hwaeomputkong, Keunolkong and Seokryangputkong were crossed and their F₂ plants and F₃

seeds were evaluated. Greenhouse-grown plants with different R genes and alleles were inoculated to PSD strains. The F₁ plants of the cross showed resistant reaction and F₂ populations were segregated 9 : 7 ratio based on disease severity of seeds that confirming the resistance is governed by the two dominant genes. This results indicate that a resistance to PSD is controlled by complementary genes.

F₂, BC₁F₂, and BC₂F₂ populations and the corresponding F_{2:3} population families were used to evaluate the correlation between the molecular markers and resistance to PSD. To establish the genetic linkage map and efficient soybean breeding program, DNA markers such as SSR, AFLP and SNP were surveyed for polymorphism between PSD resistant (cv. PI 417479) and susceptible (cv. Hwaeomput-kong) variety. SSR analysis was performed with genomic DNAs extracted from F₂ plants by using primers showing clear PCR products between parent DNAs. Among total 43 F linkage group primers, eight primers were selected and mapped with genetic distance 47.3cM in F₂ populations. Among these 8 SSR markers, Sct_033 was the most significantly associated with PSD resistance (80.27%). In AFLP analysis, eleven primer pairs detected a total of 311 AFLP fragments in a sample of Hwaeomputkong and PI 417479, with an average of 52 fragments produced per primer pair. And it showed 7.3% polymorphic between parent plants. Total 18 primer combinations were used to identify specific bands to PSD resistance, and five markers were selected. One of these AFLP markers, AF3 was the most significantly associated with PSD resistance in Hwaeomput-kong and PI 417479. Although SNP analysis was performed by using RFLP markers such a A_708 and A_162, which were considered that associated with resistance gene to PSD, we could not found a SNP.

The use of molecular markers allows for an efficient selection in early generations of the breeding process because they are not affected by the environment. Thereby, identification of markers would be efficient tools for selecting resistant plants in early segregating populations, avoiding the tedious conventional evaluation procedure and expediting the development of cultivars resistant to PSD in soybean breeding programs.

2. Development of resistant lines to PSD in soybean

The purpose of this study was to develop elite resistant lines to phomopsis seed decay for adoption to various cropping system and cultivation to paddy field using soybean. To achieve this goal, total 9 combinations were crossed, especially including a back-cross of three times between Hwaeomputkong and PI 417479, which was reported phomopsis seed decay resistant soybean germplasm.

Many promising breeding lines which have resistance to PSD in soybean have been developed. The mode of inheritance for the related resistance gene was analysed and the possibility of wild soybeans as breeding materials for developing resistance variety was also evaluated. More than 9 combinations and 6,027 plants in F₂ generation were analysed for the selection of resistant properties. They were artificially inoculated to PSD pathogenes in the field. One hundred sixteen lines were selected for resistance in the F₄ generation. Their agronomic characteristics were evaluated in addition to resistant response to PSD. More than 50% of seed quality and plant types were recovered by two times of back cross. Many promising lines could be selected from two times of back cross, especially from the cross Hwaeomput-kong/PI 417419. From this cross, more than 292 lines were selected, which could be used as source materials for the development of resistant varieties to PSD and high quality of seed in the future.

A breeding line named as SS01415-8-1 which has high yield among the selected lines and is to be considered having resistance gene to PSD. This line has somewhat high quality such a large seed size, bright hilum color, round shape, and etc.. It will be tested a yield forecasting trial's from 2006 to 2008 and elite lines selected to YFT could be examined to regional yield test after 2008.

CONTENTS

Chapter 1. General introduction	12
Section 1. Purpose of research	12
Section 2. Necessity and area of research	12
Chapter 2. The current status related with research topic	14
Chapter 3. The contents and results of research development achievement	16
Section 1. The method of research development	16
1. Development of DNA markers associated with resistance to PSD in soybean	16
2. Development of resistant breeding lines to PSD in soybean	21
Section 2. The results and discussion of research development achievement	24
1. Inheritance of resistant gene to PSD in soybean	24
2. Wild soybean germplasm survey for finding a resistant gene to PSD	32
3. DNA markers related to resistant gene to PSD in soybean	35
4. Development of resistant lines to PSD in soybean	56
Chapter 4. The achievement index of research proposal	76
Chapter 5. The application plan for research results	78
Section 1. Achievements of research development	78
Section 2. Plan for practical application	79
Chapter 6. References	80

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 1 절 연구개발의 목적	12
제 2 절 연구 개발의 필요성 및 범위	12
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절 연구 수행 방법	16
1. 콩 미이라병 저항성 관련 DNA marker 개발	16
2. 콩 미이라병 저항성 우량 계통 육성	21
제 2 절 연구 수행 결과 및 고찰	24
1. 콩 미이라병의 유전적 분리	24
가. 콩 미이라병 균주 분리 및 확인	24
나. 콩 미이라병의 유전적 분리	27
2. 콩 미이라병 저항성 관련 야생콩 유전자원 탐색	32
3. DNA marker 선발	35
가. AFLP marker 선발	35
나. SSR marker 선발	40
다. SSR marker 와 AFLP marker 의 통합	52
라. SNP marker 분석	52
4. 콩 미이라병 저항성 우량계통 육성	56
가. 공시재료의 특성	57
나. 여교잡을 이용한 콩 미이라병 저항성 계통 육성	62
다. 우량 품종의 미이라병 저항성 인자 도입 및 계통 육성	62

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	76
제 1절	목표 달성도	76
제 2절	관련분야에의 기여도	77
제 5 장	연구 개발 결과의 활용계획	78
제 1절	연구개발 성과	78
1.	계량적 성과	78
2.	성과 내용	78
제 2절	연구개발의 활용 계획	79
제 6 장	참고문헌	80

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 콩 미이라병 저항성 유전자에 관련된 DNA marker를 개발하는 한편, DNA marker 개발 과정 중에서 우량 계통들을 선발함으로써 콩 미이라병 저항성 품종 육성의 기초를 제공하고자 한다.

제 2 절 연구 개발의 필요성 및 범위

콩 (*Glycin max* L. Merr)은 매우 중요한 식량작물중의 하나이며 우리나라에서는 식생활에서 가장 비중이 큰 식물성 단백질 공급원으로써 농업에서 차지하는 비중도 크다. 최근에는 콩을 이용한 각종 가공 식품이 널리 생산되고 있을 뿐만 아니라 풋콩, 콩나물 등의 신선채소에 관한 선호도가 높아짐에 따라 앞으로 콩의 건강 식품 및 간식류로서의 수요가 점차 증가할 것으로 판단된다. 그러나 콩 재배에는 여러 가지 병해가 콩의 수량 및 품질을 떨어뜨리는 요인이 된다. 이러한 병해 중 콩 미이라병은 주요한 병해의 하나로 우리나라 뿐 만 아니라 세계적으로도 많이 발생되는데 성숙기가 고온 다습한 조건에서 발생하여 콩의 품질 및 발아율에 악 영향을 미친다. 미이라병에 감염되면 균에 의한 부패림의 발생이 심하고, 종자가 쭈글쭈글해지는 등 종자의 품질이 낮아질 뿐만 아니라 발아율을 크게 떨어뜨려 콩의 수량 감소 및 품질 저하에 많은 영향을 끼친다(Oh 등, 2001; Lee 등, 1992; Park, 1991).

특히 우리나라에서는 풋콩의 성숙기가 고온다습한 시기인 8월경에 해당하므로 미이라병이 풋콩 재배의 큰 문제로 야기되고 있다. 한편, 우리나라에서 농지 활용과 콩 재배 면적 확대를 위해서는 작부체계의 개선이 필요한데, 우리나라 기상 조건하에서 1년 2작을 위한 경제적인 방법으로는 맥류 및 채소 전작용으로 하대두 품종을 이용하거나 빠르게 생육할 수 있는 극조생종 콩 육성이 필요하다. 이러한 목적에는 풋콩 재배가 유망시 되며, 우리나라에서 건전한 풋콩용 종자 공급을 위해서는 무엇보다도 미이라병 방제가 필수적이다(Lee 등 1992). 미이라병의 방제방법으로는 연작 재배를 피하고 파종기를 늦추는 방법 등이 제시되었으나, 실제적으로 윤작을 실시하기가 쉽지 않으며 파종기를 늦출 경우 생식 성장단계가 짧아지므로 생산량이 떨어지게 될

우려가 있다 (Park 등, 1992). 따라서 재배적인 접근 방법보다는 저항성 품종을 육성하는 것이 훨씬 타당한 방법이라 사료된다.

그러나 그동안 우리나라 콩 육종은 수량과 품질을 우선시하여 수행되어 왔으며, 병충해 관련 저항성 품종 육성은 거의 이루어지지 않았다고 하여도 과언이 아니다. 그 까닭은 저항성 품종 육성에 투여되는 시간과 노력에 비해 얻어지는 결과가 미진한 탓도 있다 할 것이다. 그러나 최근에는 분자표지를 활용한 작물 분자유종체계 확립의 중요성이 부각되고 있어, 특히 병해 관련 저항성 품종 육성에 큰 희망이 되고 있다. 즉, 주요 농업형질 탐색용 DNA 표지인자를 개발하고 이를 이용한 고밀도 유전자 지도 작성과 QTL 분석을 통하여 육종 효율 증진 및 육종 연한을 대폭 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 콩 미이라병 저항성 유전자에 관련된 DNA marker를 개발하는 한편, DNA marker 개발 과정 중에서 우량 계통들을 선발함으로써 콩 미이라병 저항성 품종 육성에 기초를 제공하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

현재 우리나라 콩 품종 육성은 큰 어려움에 봉착하여 있다고 하여도 과언이 아니다. 수량성 뿐 만 아니라 품질 제고 등이 한계점에 도달하여 있어 다양한 유전자원의 확보 등이 중요한 과제로 떠오르고 있다. 특히 내재해 저항성 육종은 그동안 수량성 제고 등이 육종 목표로 우선시된 까닭으로 인하여 크게 주목받지 못하였다. 따라서 양질·다수성 콩 품종 육성을 위해서 무엇보다도 병해 저항성 관련 유전인자의 도입이 시급하다고 하겠다. 최근에는 작물 육종에서 molecular marker를 이용하는 방법이 중요한 육종방법으로 대두되고 있는데, DNA marker를 이용한 품종 육성은 기존의 교배 육종보다 큰 효율을 얻을 수 있는 것으로 보고되고 있다.

콩 병해 관련 저항성 gene의 mapping은 국내에서는 거의 이루어진 바 없으며, 국외에서도 연구가 저조한 형편이다. 콩 병해 저항성 관련 molecular marker 연구는 콩의 linkage group에 관한 mapping이 보고(Cregan et al., 1999)된 이래로 활기를 띠고 있는데, soybean cyst nematode 및 SMV의 저항성에 관한 연구가 보고(I.Schuster et al., 2001; K.Meksem et al., 1999; D.Danesh et al., 1998; S.J.C.Chang et al., 1997)된 바 있다. DNA marker는 주로 RFLP 및 SSR marker에 대한 보고가 주를 이루었으나, AFLP를 이용한 일반적인 병해 저항성 관련 gene의 mapping에 관한 연구 보고(A.J.Hayes and M.A.S.Maroo, 2000)후 최근에는 다양한 DNA marker 연구가 이루어지고 있다.

콩 미이라병은 우리나라 뿐 만 아니라 다양한 성숙기를 가진 외국에서도 중요 병해로 취급되고 있으며, 따라서 이와 관련된 저항성 gene의 identification은 국내외적으로 콩 품종 육성에 큰 기여를 할 것으로 판단된다. 그러나 국외에서는 미이라병에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으나 대부분 균의 분리 및 동정 등 병리학적 연구에 치우치고 있으며, 최근에는 molecular를 이용한 균의 동정에 관한 연구가 많이 보고되었다(A.W.Zhang et al., 1998, 1997). 이와 함께 PSD 저항성의 유전에는 2개의 complementary dominant nuclear gene이 관련되어 있으며, PI 417479 등 몇 가지 품종이 저항성인 것으로 밝혀졌다(M.S.Zimmerman and H.C.Minor, 1993).

국내에서는 콩 미이라병 연구가 거의 수행되지 못하였는데, 풋콩 재배에 관련된 미이라병의 발생 정도 및 예찰에 관한 결과가 보고(박 등, 1992; 농촌진흥청 특정연구보고서, 1994)된 바 있다. 미이라병 외에도 국내에서는 SMV를 제외한 기타 콩 관

런 병해에 관한 연구, 특히 육종 관련 연구 보고는 전무한 실정인데, 최근들어 불마
름병, 멧뿌리썩음병, soybean cyst nematode 등에 관한 DNA marker 연구가 이루어
지고 있는 정도이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법

1. 콩 미이라병 저항성 유전자 관련 DNA marker 개발

가. 콩 genetic materials

1) 교배조합 선발 및 후대 양성

미이라병 저항성 인자 도입 목적으로 F₁ 및 F₂ 조합을 대상으로 *Phomopsis* spp.에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 방법은 교배 부모본에 사용되었던 품종들을 재배하여 PSD 균을 접종하고, 이들의 병원성 발발 정도에 따라 DNA marker 개발용 식물 집단을 구성하였다. PSD 균 접종에 의해서 선발되어진 교배조합은 유리온실 및 대만 소재 AVRDC에서 SSD방법으로 세대진전 시켜 RIL 집단을 조기에 구축하였다. 이밖에 F₁ 개체에 Backcross를 실시하여 NIL 집단을 구성하였다.

이와는 별도로 야생콩 유전자원을 대상으로 균을 접종한 후 저항성 계통을 탐색하고 추후 우량계통 육성의 중간 모본 가능성을 확인하였다. 야생콩은 여러 가지 병해 및 각종 재해에 저항성인 유전적 소질을 가지고 있을 확률이 높으므로 순천향대학교에서 보유하고 있는 야생콩 유전자원 200여 계통에 대한 전반적인 검토가 수행되었다.

2) 미이라병 저항성 유전자 탐색 집단

SSR 및 AFLP를 수행하기 위하여 F₂, 및 F₃ 조합에서 200개 이상의 개체가 확보된 계통을 선발하였다. 또한 BC₁F₂ 및 BC₂F₂ 집단도 저항성 유전자 탐색에 이용하였다.

나. 균 배양 및 접종

저항성 계통 육성을 위하여 인공적으로 콩 미이라병균을 접종시켜 미이라병을 유발시킴으로써 정밀한 실험을 수행하였다. PSD를 일으키는 *Phomopsis* spp.의 균주는 13종을 증식 하였으며 이중 병원성이 가장 강한 한 종류를 시험용 균주로 사용하였다. 본 과제 수행 전에 수행된 예비실험 결과 미이라병에는 10여종의 균주가 관여

하는 것으로 판단되나, 병리학적인 검토를 위해서는 가장 병원성이 큰 균주에 대한 검토가 필수적인 까닭에 본 연구에서는 보유 중인 균주 중 병원성이 가장 큰 JP151을 대상으로 미이라병에 관한 저항성 정도를 수행하였다.

병원균은 감자한천배지(Potato Dextrose Agar; Potato Dextrose Broth 24g, Sucrose 20g, Agar Powder 16g/L)에 접종하여 24℃에서 한 달간 증식하였으며, 병원균 균총으로 부터 수집한 분생포자 2.5×10^5 현탁액을 콩 식물체에 분무 접종하였다. 균 접종은 식물체의 R₃~ R₄시기에 스프레이 방식으로 접종하고 접종 후 3일 동안 95%의 상대습도를 유지시켜 병 발생을 유도하였다. 접종 후 성숙기를 거쳐 수확된 종자는 potato dextrose agar(PDA)배지에서 균의 발생정도를 관찰하였다. 즉 종자를 95% ethanol로 1분, 1% NaOCl로 4분간 표면 살균 후 살균 증류수로 2회 세척하고 PDA 배지에 치상하였으며, 배양조건은 25℃에서 1주일간 12시간 명암 처리하였다.

F₂ 계통의 포장 접종은 실내검정에 준하여 수행하였다. 방법은 이미 이병된 식물체를 작물과학원 F₂ 계통 포장 내에 고르게 배치시켜 자연적인 접종을 유발시키는 한편, R₃~ R₄ 시기에 스프레이법으로 식물체에 미이라병균을 인공 접종한 후 비닐을 3 ~ 4 일간 피복함으로써 상대습도를 유지시켜 미이라병 발생을 유도하였다. F₂ 집단에서 선발된 F₃ 계통은 작물과학원 실험포장에 비닐하우스를 설치한 후, 파종부터 수확까지 콩 생육 전 과정을 면밀하게 환경을 조절하며 수행하였다. 한편 F₃ 계통 재배시의 인공접종을 통한 미이라병 유발은 F₂ 집단과 같은 방법으로 수행하였다.

다. Genome DNA의 분리 및 정제

순천향대학교 유리 온실동에서 양성한 F₂ 집단과 모부분 식물체에서 채취한 잎을 24시간 동결건조 시킨 후 액체질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 15ml tube에 약 1mg정도 되도록 담고 2% CTAB buffer (CTAB 10g, 0.5M EDTA pH 8.0 20ml, Tris-HCl 1M pH 8.0 50ml, NaCl 40.9, 2% mercaptoethanol 10ml)를 tube volume 4ml이 되도록 첨가한 후 1분간 vortexing 하여 시료가 잘 섞이도록 하였다. Tube를 65℃로 setting한 water-bath에 1시간동안 보관하였으며 15분마다 한번씩 tube를 inverting 하였다. Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1)을 tube volume과 동량으로 첨가한 후 rotamix machine을 이용하여 30분 동안 상, 하로 섞어준 후 원심분리기를 이용하여 rpm 4,000에 20분 동안 원심분리 하여 상하층을 분리시켰다. 분

리된 상층액을 새로운 15ml tube에 옮기고 95% 에탄올을 tube volume의 두 배 정도 첨가한 후 3~4번 inverting 하였다. Tube내에서 DNA가 분리되면 가는 유리관을 이용하여 1.5ml tube에 옮긴 후, 상온(room temperature)에서 30분 동안 건조시켰다.

건조시킨 tube에 70% 에탄올을 500 μ l 첨가 한 후 tube를 조심스럽게 돌리면서 세척한 후 첨가한 에탄올을 버렸다. 세척된 tube를 다시 상온에 overnight 시킨 후 다음날 1 \times TE buffer (Tris-HCl 1M pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0)를 500 μ l 첨가해서 용해 시켜 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 용해된 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 Genome gel dak(Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290; EDAS 290)을 이용하여 DNA상태를 확인하였다. 불순물 제거 및 DNA정제를 하기 위해 RNase 1 μ l, 1 \times TE buffer 40 μ l의 비율로 섞은 용액을 7 μ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C incubater에 1시간동안 보관하였다. Tube에 ddH₂O 50 μ l, ammonium acetate 50 μ l을 첨가하였고 isopropanol을 tube의 총 volume과 동량으로 첨가한 후 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 30분 동안 보관하였다. Tube를 3~4번 inverting한 후 13,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 상온에서 2시간동안 건조시킨 후 70% 에탄올 500 μ l를 첨가하여 세척한 후 상온에서 overnight 시켰다.

다음날 1 \times TE buffer (Tris-HCl 1M pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0)를 500 μ l 첨가해서 용해시킨 후 1% agarose gel에 전기영동하여 Genome gel dak(Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290; EDAS 290)을 이용하여 DNA상태를 확인하였고 최종적으로 DNA의 농도를 50ng/ μ l로 조정하였다.

라. AFLP analysis

게놈 DNA 100ng을 *EcoR* I 과 *Mse* I 의 제한효소로 절단시킨 후 1.2% agarose gel에서 절단 정도를 확인하였다. 절단된 DNA 5 μ l에 2 unit의 ligase (Promega)와 *EcoR* I / *Mse* I adaptor를 첨가하여 14 $^{\circ}$ C에서 16시간 ligation 시켰다. 이 반응액을 5배 희석한 후 PCR의 주형 DNA로 사용하였다. PCR 반응을 위해 DNA 5 μ l, *EcoR* I primer (E-C), *Mse* I primer (M-A), 3 unit *Taq*, dNTP, 10 \times PCR buffer, MgCl₂를 첨가하여 총 20 μ l로 조정하여 pre-amplification 하였다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초 (denature), 60 $^{\circ}$ C에서 30초 (annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 (extension)의 cycle을 총 30회 반복하였다. 증폭 후 1.2% agarose gel 상에서 증폭된 fragment들을 확인한 후 4 $^{\circ}$ C에 저장하였다. 반응액은 50배로 희석하여 두 번째 증폭반응 (Selective PCR) 주형으로 사용하였다. Selective PCR은 DNA 10 μ l,

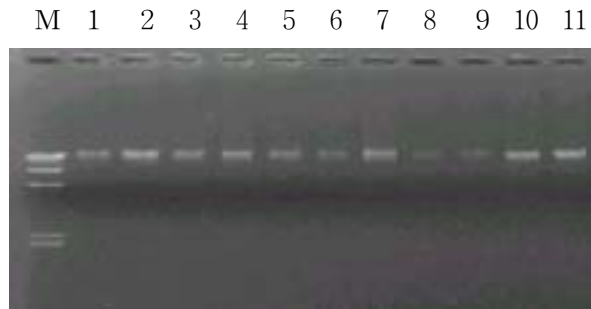


Fig. 1. Genomic DNAs extracted from leaves of soybean
Lane M : DNA digested with Hind III(100ng)
Lane 1~11 : samples

EcoR I selective primer (E-CNN), *Mse* I selective primer (M-ANN), 1 unit *Taq*, dNTP, 10×PCR buffer, MgCl₂를 첨가하여 총 25μl로 조정하여 수행하였으며, 반응 조건은 touchdown PCR법을 이용하여 94°C에서 30초, 65°C~56°C (회당 1°C씩 감소)에서 30초, 72°C에서 60초간 9회 실시한 후, annealing 온도를 56°C에서 30초로 고정하여 총 26회 반복 수행하였다. 2차 증폭을 마친 DNA에 15μl loading dye (40% sucrose, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol)를 첨가하여 95°C에서 5분간 denature시킨 후, 그 중 5μl를 50°C로 denaturing 된 7% polyacrylamide/8M urea gels에 80W로 2시간 30분동안 전개시켰다. DNA 단편을 전개시켜 분리한 다음에는 Silver staining kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 염색한 후 그 결과를 분석하였다.

마. SSR 분석

PCR 반응액은 5×SCR buffer, 10×PCR buffer, 2mM dNTP (Promega), 50mM MgCl₂, 10μM primer, *Taq* (Promega)을 포함하여 총 10μl로 만들고, 여기에 50ng/μl의 DNA 0.9μl를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 2분, 94°C에서 30초 (denature), 49°C에서 30초 (annealing), 68°C에서 1분간 (extension)의 cycle을 총 35회 반복 한 후, 68°C에서 5분 처리를 하고 4°C에 저장하였다. PCR을 마친 반응액은 1.5% agarose gel에서 100V로 2시간 30분간 전기영동한 후 EtBr (Ethidium Bromide) 용액에서 40분간 염색하고, UV trans-illuminator상에서 밴드를 확인하였다.

바. SNP 분석

Genome DNA 50ng 4μl, 10μM primer (F,R 조합) 4μl, 10×buffer 5μl, dNTP(2.5μM) 4μl, *Taq* polymerase 0.6μl, ddH₂O 32.4μl를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C 4분, primer temperature 30초, 72°C에서 1분의 반응 후, 이를 29회 반복하고 72°C에서 10초 처리 후 사용하였다. 이후 1% agarose gel 상에서 3×dye 2μl, PCR 산물 4μl를 첨가하여 15분간 전기영동 하여 증폭현상을 관찰한 후 4°C에서 냉장 보관하였다. 한편, purification을 하기 위해서 PCR purification kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 PCR 산물을 1.5ml tube에 넣고 PCR binding buffer를 5배정도 첨가하여 혼합한 후, binding column에 넣고 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 하였다. Tube 하단에 걸러져 나온 용액은 따로 버리고 washing buffer

를 500 μ l 첨가하여 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 하였다. 다시, 하층액을 버리고 washing buffer를 500 μ l 첨가하여 13,000 rpm에서 2분 동안 원심분리를 하였으며, tube안에 있는 binding column을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 후 상온에서 뚜껑을 열고 5분 동안 건조시켰다. Binding column 중간에 elution buffer 15 μ l를 tube에 묻지 않게 넣고 상온에서 뚜껑을 열고 5분 동안 건조시켜 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 그 이후 binding column을 버리고 1% agarose gel 상에서 3 \times dye 2 μ l, PCR 산물 2 μ l를 첨가하여 15분간 전기영동 하여 purification 결과를 관찰하였다. 그리고 PCR 산물 2 μ l, 3.2 μ M Primer 1 μ l, 5 \times buffer 1 μ l, Bigdye 0.3 μ l(Bigdye[®] Terminator v 3.1 cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems), ddH₂O 1.7 μ l를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C 4분, 94 $^{\circ}$ C 10초, 50 $^{\circ}$ C 5초, 60 $^{\circ}$ C 1분의 순서대로 반응 시킨 후 39회 반복하고 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다. 다음으로 PCR tube에 80% Ethanol 30 μ l을 첨가하고 잘 혼합하여 상온에서 40분 동안 보관한 후 2,500 rpm에서 40분 동안 원심분리 하였다. 다시 tube 뚜껑을 열고 여러 장의 휴지로 렉을 감싼 후 뒤집어서 1분 동안 원심분리한 다음, tube 뚜껑을 닫고 잘 감싼 후 서울대학교 농업과학공동기기센터에 sequence를 분석의뢰 하였다.

사. Data 분석

저항성 gene의 분리와 molecular marker와의 관계는 chi-square test로 수행하였으며, linkage relationships와 map distances등 유전자 연관지도는 MAPMAKER를 이용하였다.

2. 콩 미이라병 저항성 우량 계통 육성

가. 우량품종의 미이라병 저항성 인자 도입 및 계통육성

국내장려 품종에 미이라병 저항성 인자 도입을 위하여 인공교배를 수행하였는데, 인공교배는 각 조합의 개화기 조절을 위하여 4회에 걸쳐 시차 파종하였으며, 비닐하우스에서 100 \times 50 \times 100cm의 재식밀도로 파종하였고, 기타 재배법은 작물과학원 표준재배법에 준하였다.

콩 미이라병 저항성 계통 육성 및 선발을 위하여 '03~'05 3개년간 인공교배 9조합, F₁ 11조합, F₂ 9조합 및 F₃ 이후 계통 10조합을 공시하였으며, F₂ 세대 이후 계통의 재식밀도는 60 \times 15cm 1주1본으로 재배하였다. 재배방법은 작물과학원 표준재배법

Table 1. Characteristics of molecular markers for DNA study.

	RAPD	RFLP	SSR	AFLP
Principle	PCR with random primers	Restriction & hybridization	PCR of SSR	Selective PCR
DNA amount required(μg)	0.02	10	0.05~0.10	0.5~1.0
PCR-based	Yes	No	Yes	Yes
Gel-based	Yes	Yes	Yes	Yes
Genomic abundance	Very high	High	High	Very high
Marker type	Dominant	Co-dominant	Co-dominant	Dominant
Reproducibility	Fair	Very high	Very high	Very high
Sequence information required	No	No	Yes	No
Development	Low	Medium	High	Low
Easy of use	Easy	Labor intensive	Easy	Defficult
Quantity of information	High	Low	High	High
Replicability	Variable	High	High	High
Resolution of genetic differences	Moderate	High	High	High
Development time	Short	Long	Long	Short

에 준하였으며, 주요 조사항목으로는 교잡여부 및 농업형질을 조사한 후 우량계통을 선발하였다.

나. 여교잡을 이용한 콩 미이라병 저항성 계통 육성

콩 미이라병 저항성 계통 육성을 위하여 조생종이며 대립인 화엄꽃콩(홍 등, 1993)을 반복친으로, 기존에 미이라병 저항성으로 보고된 PI 417479(Zimmerman et al. 1993)을 수여친으로 하여 여교잡을 3회 수행함으로써 미이라병 저항성 인자를 도입하고자하였다(작물시험장, 2001, 2002, 2003; 작물과학원 2004, 2005). 재배방법은 작물과학원의 표준재배법에 의하여 수행되었다.

제 2 절 연구 수행 결과 및 고찰

1. 콩 미이라병의 유전적 분리

가. 콩 미이라병 균주 분리 및 확인

콩 미이라병의 원인인 *Phomopsis sojae* 와 *Phomopsis longicolla* 를 서울대학교 농생대 박은우 교수로부터 분양받아 증식하였다. 균 증식은 감자한천배지(Potato Dextrose Agar; Potato Dextrose Broth 24g, Sucrose 20g, Agar Powder 16g/L)에 접종하여 24℃에서 한 달간 배양하였다. 이렇게 증식한 균주 중 JP 151이 가장 크게 병원성을 나타내었으므로 식물체의 접종원으로는 JP 151을 사용하였다.

배양된 균주는 병원균 균총으로부터 수집한 분생포자를 2.5×10^5 농도의 현탁액으로 만든 후, 콩 생육 시기 R₃~R₅ (협형성 초기)의 식물체에 분무 접종하였다. 접종 후에는 발병이 왕성하게 이루어질 수 있도록 1주일간 30±2℃, 95% 습도조건을 주어 미이라병 발병을 유도하였다. 한편 JP 151을 식물체에 접종하고 수확한 꼬투리와 종자에서 병원성 검정을 위해 균을 순수 분리한 후, 형태적·배양적 특성을 조사한 결과 접종전의 균주와 동일한 병원균임을 확인할 수 있었다(그림 2).

또한 2003년 하계에 감염된 종자(농촌진흥청 작물과학원 포장에서 이병된 종자를 수확)를 통하여 10 종류의 균을 분리하였으며 이를 현미경 등을 이용하여 분석하였다. 분리된 균 중에는 JP151과 같은 형태의 균주를 발견할 수 있었으며 이를 순수 배양한 후 현미경으로 관찰한 결과 JP151과 동일한 균주임을 알 수 있었다. 그리고 DNA를 추출하여 AFLP pattern을 분석한 결과에서도 차이점을 볼 수 없었다(그림 3). 이외에도 JP 151과 같은 형태적·배양적 특성이 유사한 경향을 가진 균들이 많이 발견되었다. 이와 같이 우리나라에서 발견되어진 균들은 형태적 특징만으로 정확하게 판단할 수 없었지만 이러한 결과를 토대로 볼 때 콩 미이라병 균은 예전에 비해 크게 분화되지는 않은 것으로 생각되어지며, 정확한 판단을 위해 앞으로 좀 더 깊은 검토가 필요할 것으로 사료된다.



A



B

Fig.2. Appearance of PSD cultured on PDA media

A : Inoculated soybean seed on PDA medium

B : JP151 separated from A

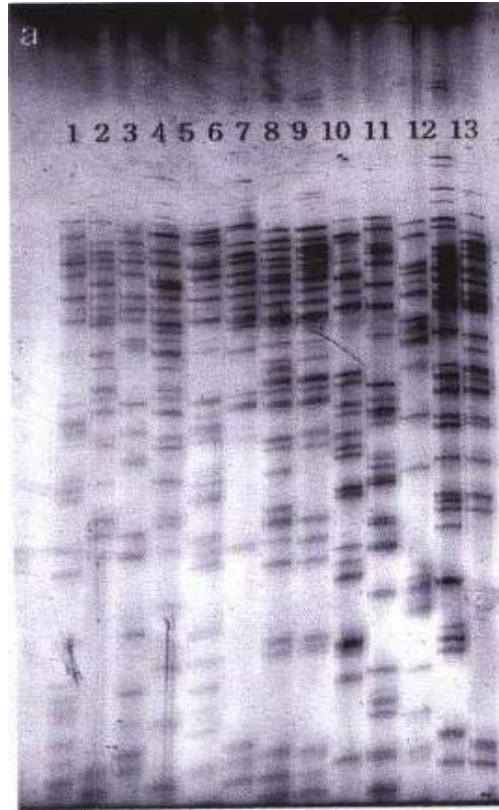


Fig.3. AFLP patterns of PSD species

나. 콩 미이라병의 유전적 분리

콩 미이라병 접종 및 병원성 확인은 유리 온실과 계통 포장에서 실시되었다. 농촌진흥청 작물과학원에서 화염꽃콩과 PI 417479를 교배한 F₁ 종자를 분양 받아 양성한 F₂ 집단을 순천향대학교 유리온실과 작물과학원 전작 포장에 각각 재배한 후 실험을 수행하였다. 화염꽃콩은 우리나라의 대표적인 꽃콩 품종이나 미이라병에 감수성이며, PI 417479는 콩 미이라병에 저항성인 계통으로 미국 USDA-ARS에서 분양 받아 교배에 이용하였다.

우선 순천향대학교에서는 화염꽃콩과 PI 417479의 교배 후대인 F₂ 집단 74개체에 미이라병을 인공적으로 접종시킨 후 개체별로 종자를 수확하여 유전적 양상을 분석하였다. 미이라병을 접종한 후 성숙기에 수확된 종자를 대상으로 종자에서의 병원성 발현 정도를 분석하였는데, 1차적으로 각 종자에 나타난 병원성 정도를 0~9 단계로 구분하였으며, 단계구분은 종자 표면적의 병원성 발현 비율을 기준으로 하였다. 0등급은 병징이 전혀 없는 건전 종자, 1등급은 종자 총 표면적의 10% 이내의 병징을 나타내는 등, 각 단계별로 이병 정도를 10%씩 늘임으로써 0~9단계의 총 10등급으로 구분하였다. 저항성 개체의 구분은 종자의 미이라병 병반 면적을 기준으로 나눈 등급과 개체별 종자 수와 곱한 후 총 종자수로 나눔으로써 식물체 당 미이라병 발병도를 환산하였다. 이렇게 구분된 발병 정도가 20% 미만인 경우는 저항성 식물체로, 20% 이상인 경우를 이병성 식물체로 구분을 하였다.

작물과학원에서는 화염꽃콩과 PI 417479 조합외에 태광콩과 PI 417479를 교잡한 조합 등 총 3개 조합의 F₂ 집단을 포장에 전개하였다. 방법은 개화기 이후 스프링클러를 이용하여 지속적인 다습조건을 부여함으로써 자연적인 접종을 유발시키는 한편, R₃~ R₄ 시기에 스프레이법으로 식물체에 미이라병을 인공 접종 후 비닐을 3~4일간 피복함으로써 상대습도를 유지시켜 미이라병 발생을 유도하였다. 저항성 정도는 실내 검정과 동일한 방법으로 분석하였다.

통계 분석은 저항성 식물체와 이병성 식물체의 분리비를 χ^2 적합도 검사를 통하여 수행하여 콩 미이라병의 유전적 분리비를 확인하였으며, 그 결과는 표2와 같다.



Fig. 4. Index score of PSD according to disease severity in soybean.

0 = 0%, 1 = 1~10% , 2 = 11~20%, 3 = 21~30%, 4 = 31~40%,

5 = 41~50%, 6 = 51~60%, 7 = 61~70%, 8 = 71~80,

9 = more than 80% of soybean seed covered with disease symptom

순천향대학교에서의 실내검정에서는 F₁ 개체 및 F₂ 집단에 인위적으로 미이라병을 접종한 결과 F₁ 개체에서는 병반이 나타나지 않았으나 F₂ 집단 총 74 개체에서 수확한 종자에서는 각기 다른 반응을 보였다. 각 종자의 병반 면적율을 조사하여 식물체당 미이라병 발병도를 환산한 결과 43개 식물체가 저항성 식물체로 분류되었고, 나머지 31개체가 이병성 식물체로 분류되었다. 이것은 χ^2 test를 통한 적합도 검정 결과 9 : 7의 분리비임을 확인할 수 있었다(표 2).

작물과학원에서 수행된 포장검정에서는 화엄꽃콩과 PI 417479 조합의 기타 2조합에서는 미이라병이 발병되지 않아 저항성 정도를 판단할 수 없었으나 화엄꽃콩에서는 병이 발발하여 표2에서 보는 바와 같이 유전분리비가 9 : 7 임을 추정할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 Willman 등(1987)이 포장 상태에서 미이라병의 발생 정도를 분석한 결과와도 일치하였다.

이 9 : 7의 분리비는 미이라병과 관련된 저항성 유전자는 두 개가 관여하며, 이들은 우성유전자간 상호작용을 하여 공동으로 한 표현형을 발현하는 보족유전자임을 말한다. 이와 관련하여 종자 전염 중 가장 발생 빈도가 높은 미이라병은 저항성 유전자를 가지고 있는 계통을 이용한 여교잡 방법을 통하여 저항성 품종을 육성할 수 있다는 보고도 있다 (Zimmerman 등, 1993; Chul 등, 1995). 따라서 PI 417479 등 저항성 계통을 이용한 미이라병 저항성 계통 육성이 가능하리라 판단되었다.

그러나 분리비가 다르게 나타나는 결과도 있었다. 화엄꽃콩과 PI 417479 조합의 교잡 후대인 F₂ 및 BC₁F₂ 집단을 작물과학원 전작 계통포장에 재배하면서 미이라병을 인공적으로 접종시킨 후 개체별로 종자를 수확하여 유전적 양상을 분석하였으며, 또한 선발된 화엄꽃콩과 PI 417479 조합의 F₃ 계통은 전작 포장에 비닐하우스를 설치한 후 상기와 같은 방법으로 수행하였다. 1차적으로 여교잡이 이루어진 BC₁F₁ 개체는 1 : 1의 분리비로 저항성과 이병성이 나누어졌다. 따라서 저항성을 보인 개체를 수확하여 BC₁F₂ 집단을 전개하였는데, 이들 BC₁F₂ 집단은 3 : 1의 분리비를 나타내었다. 한편, 석랑꽃콩과 PI 417479 조합의 F₂ 집단도 저항성과 이병성이 3 : 1의 분리비를 나타내었다. 이러한 결과는 화엄꽃콩과 PI417479 조합에서 나타난 9 : 7의 분리비와는 달랐다. 따라서 콩 미이라병 저항성은 1~2개의 우성유전자에 의하여 지배됨을 판단할 수 있었으나 추후 좀더 세밀한 검토가 있어야 할 것이다.

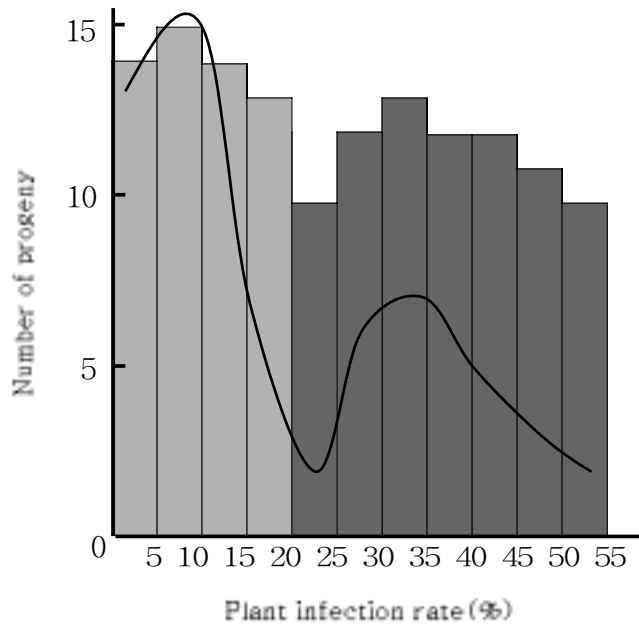


Fig. 5. Frequency of plant infection rate based on disease index score in the F₂ progeny of the cross Hwaecomputkong × PI 417479.

Table 2. Segregation of genotypes inoculated to Phomopsis Seed Decay in the F₂ progeny of the cross Hwaeomputkong × PI 417479 .

Inoculated place	No. F ₂ plants	No. of penotypes		Expected ratio	X ²	Probability
		resistant	susceptible			
Green house	74	43	31	9:7	0.099	0.5<P<0.9
Field	240	134	106	9:7	0.016	0.9<P

Table 3. Segregation of genotypes inoculated to Phomopsis Seed Decay in the BC₁F₂ progeny

Line	No. of plants	No. of penotypes		Expected ratio	X ²	Probability
		resistant	susceptible			
Hwaeom-putkong	30	0	30			
PI417479	30	30	0			
BC ₁ F ₁	17	9	8	1 : 1	0.029	0.95<P<0.97
BC ₁ F ₂	199	144	55	3 : 1	0.277	0.75<P<0.90

2. 콩 미이라병 저항성 관련 야생콩 유전자원 탐색

콩 미이라병 저항성 관련 유전자원을 탐색하기 위하여 야생콩을 대상으로 그 가능성을 탐색하였다. 야생콩 유전자원 205 계통을 유리온실에서 재배하면서 미이라병균 접종을 실시하였다. 그러나 수확된 종자에서의 저항성 여부는 육안으로는 공시재료 간에 특별한 병징을 발견할 수 없었으며, PDA배지에서도 차이가 나지 않았다. 이것은 공시재료 중에는 미이라병에 이병성인 유전자원이 포함되지 않았을 가능성이 있거나, 혹은 야생콩 특유의 종자 형태 특성상 육안으로는 미이라병의 징후를 발견하기 어려운 점 등의 이유가 있을 것으로 판단되었다. 또한 야생콩을 동계에 유리온실에서 재배한 것이 미이라병 발현에 적합하지 않았을 가능성도 있으리라 사료된다.

표5는 콩 장려품종 20개와 야생콩 유전자원 200종을 AFLP를 이용하여 유전적 다양성을 확인한 결과이다. 총 18개 조합 중 polymorphism이 확인된 11개 primer 조합에서 분석된 총 DNA 단편의 수, polymorphism이 확인된 단편 수 및 그 비율을 나타내었다. 재배콩과 야생콩을 종합한 11조합에서 총 610개의 DNA 단편이 검출되어 평균 56개의 단편이 관찰되었는데, 재배콩과 야생콩 간의 단편 수는 큰 차이를 보이지 않았다. 이중 재배콩에서 polymorphism이 확인된 단편은 총 32개로 평균 2.9개의 비율을 보였다. 이런 결과는 기타 다른 보고에 비해 수치가 떨어지는 편인데 DNA 단편 확인 방법으로 silver staining을 사용한 것도 한 요인이 되리라 생각된다. 따라서 유전적 다양성 확인만이 아닌 gene mapping 등을 위해서는 방사성 동위원소를 이용하는 것이 AFLP에서는 더 유용하게 적용될 수 있으리라고 판단되었다.

한편, 야생콩에서는 평균 12.2개의 polymorphism을 보여 재배콩보다 훨씬 높게 나타났다. 야생콩이 재배콩보다 다양성이 높게 나타난 것은 공시 재료수의 차이에서도 기인하지만 야생콩의 유전적 분화가 재배콩보다 훨씬 다양함을 나타내는 것이라 사료된다. 야생콩과 재배콩 모두에서 같은 위치에 나타난 DNA 단편은 평균 2.4개였으며 따라서 전체 공시 재료에서 유전적 다양성이 확인된 것은 평균 12.7개이었다.

Primer 조합별로도 polymorphism에 다양한 차이가 나타났는데 13.0 ~ 38.5 %의 변이를 보이며 평균 22.9%를 나타내었다.

Table 4. Primer sequences used for AFLP analysis in this study

Type	Name	Enzyme	Sequence(5'→3')
Adaptor	EA+	<i>EcoR</i> I	CTCGTAGACTGCGTACC
	EA-	<i>EcoR</i> I	CTGACGCATGGTTAA
	MA+	<i>Mse</i> I	GACGATGAGTCCTGAG
	MA-	<i>Mse</i> I	TACTCAGGACTCAT
pre-amplification primer	E-C	<i>EcoR</i> I	AGACTGCGTACCAATTCC
	M-A	<i>Mse</i> I	GACGATGAGTCCTGAGTAAA
selective amplification primer	E-CAG	<i>EcoR</i> I	GACTGCGTACCAATTCCAG
	E-CAC	<i>EcoR</i> I	GACTGCGTACCAATTCCAC
	E-CAA	<i>EcoR</i> I	GACTGCGTACCAATTCCAA
	M-AAG	<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAAAAG
	M-AAT	<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAAAAT
	M-AGA	<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAAAGA
	M-AGG	<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAAAGG
	M-ACG	<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAAACG
M-ATA	<i>Mse</i> I	GATGAGTCCTGAGTAAATA	

Table 5. Number of polymorphic fragments in *G. max* and *G. soja* detected at 11 AFLP loci

Primer pairs	Total no. of fragments	No. of polymorphic bands detected				Percent of polymorphic fragments
		<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>	Shared	Total	
E-CAC, M-AGA	46	3	9	3	9	19.6
E-CAC, M-ACG	54	2	8	2	8	14.8
E-CAC, M-AAT	74	5	15	4	16	21.6
E-CAC, M-ATA	54	2	7	2	7	13.0
E-CAG, M-AGG	47	4	13	3	14	29.8
E-CAG, M-AAT	51	1	9	1	9	17.6
E-CAG, M-ATA	52	3	19	2	20	38.5
E-CAA, M-AGA	68	3	13	3	13	19.1
E-CAA, M-ACG	43	2	9	1	10	23.3
E-CAA, M-AGG	59	4	16	3	17	28.8
E-CAA, M-ATA	62	3	16	2	17	27.4
Total	610	32	134	26	140	
Average	55.5	2.90	12.2	2.36	12.7	22.9

3. DNA marker 선발

가. AFLP marker 선발

AFLP 기술은 genomic DNA를 제한효소 인식 좌의 빈도가 낮은 제한효소 (*EcoR* I)로 절단하고 다시 제한효소 인식 좌의 빈도가 높은 제한효소 (*Mse* I)로 이중 절단하여 사용한다. 절단된 DNA 단편은 양끝을 adaptor로 표식한 후, 표식부위의 DNA 염기서열을 바탕으로 작성한 primer를 PCR을 통하여 특정 제한효소 조합에 의한 DNA 단편으로 증폭시키고, 이 증폭산물의 차이 유무를 비교하는 것이다 (Cho, 2000).

화엄꽃콩과 PI 417479의 게놈 DNA를 PCR로 증폭시키고 전기영동을 수행한 후 silver staining으로 분석한 결과를 그림 6에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 품종별로 DNA 단편들은 품종별로 많이 나타났으며 두 품종간의 polymorphism도 여러 군데에서 확인되었다. 따라서 콩의 유전적 다양성을 AFLP를 통하여 분석할 수 있었으며, AFLP에서 나타난 polymorphism은 기타 DNA marker들 보다 훨씬 다양함을 알 수 있었다. 그러나 AFLP를 통한 전기영동의 패턴은 수많은 DNA 단편들을 확인할 수 있는 장점이 있는 반면에 품종간의 뚜렷한 차이를 분석하기 위한 재현성에는 SSR marker 등에 비해 명확하지 못한 문제가 있었다. 이것은 silver staining 수행 과정에서 발생하는 여러 가지 환경 요인 때문이라 사료되며 따라서 보다 정확한 분석을 위해서는 세심한 주의가 필요할 것으로 판단된다. 한편, AFLP수행시 silver staining 대신에 방사성 동위원소를 사용하면 훨씬 명확한 결과를 얻을 수 있었다.

표6은 화엄꽃콩과 PI 417479를 교잡하여 얻은 F₂ 집단을 이용하여 AFLP marker의 유전분리 현상을 분석한 결과이다. 두 모부분에서 공히 polymorphism을 보인 E-CAG / M-AGG primer 조합에서 확인된 4군데 단편의 차이를 χ^2 법으로 분리비의 정확도를 확인하였다. 각 단편들은 3 : 1의 분리비를 보이는 것으로 판단되었으며, 이것으로 AFLP markers가 멘델의 유전분리 현상을 따른다는 것을 알 수 있었다. Maughan 등(1995)은 AFLP marker는 co-dominance의 방식이 나타나기도 한다고 하였다. 따라서 AFLP marker는 콩의 유전자 지도 작성에 무리없이 적용될 수 있으리라 판단되었다.

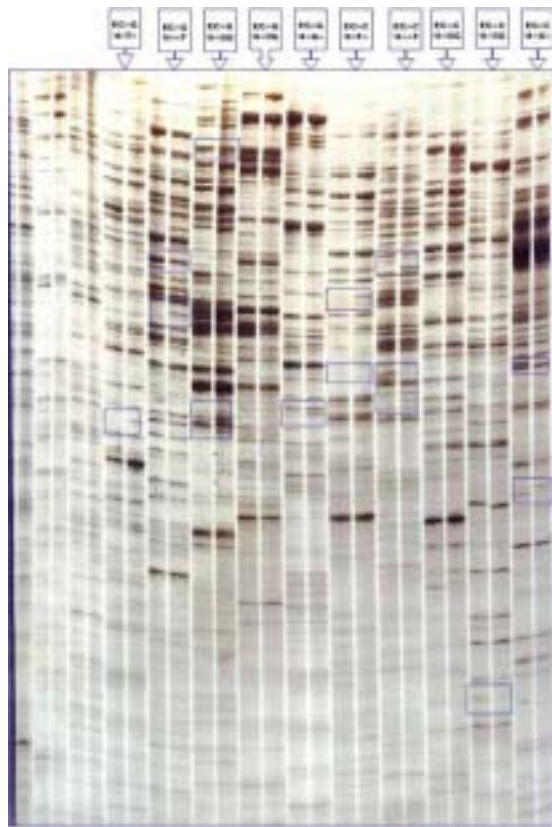


Fig. 6. AFLP patterns by using 10 primer pairs between Hwaecomput-kong and PI 417479.

DNA marker의 이용은 유전자지도 작성에 많은 공헌을 하고 있다. 이것의 이용으로 고밀도로 작성된 분자 유전자지도는 양적 형질의 정밀분석을 가능하게 하였고, 비교 유전자지도의 작성을 통하여 유사 종간의 분류학적인 유연관계와 진화과정에 대한 해석이 가능하게 되었다. 그리고, 교배중간 및 수집된 유전자원 등에 대한 근연관계를 밝혀 유전·육종의 기초자료로 용이하게 활용되고 있다. 또한 중요 형질과 밀접히 연관된 marker들을 이용하여 유용유전자의 분리도 손쉽게 이루어지고 있으며, 나아가 잘 발달된 분자 유전자지도는 식물의 유전정보를 밝히기 위한 genomic DNA의 염기서열 결정에 중요한 시발점을 제공하고 있다. 이중 AFLP는 유전적 다양성과 유연관계를 밝히는데 효율적인 방법이 된다. 그러나 분석해야 할 DNA 단편이 많고, 서로 연관되어 작용하는 기능성 유전자의 정확한 위치를 찾기가 어려운 단점이 있으므로 앞으로 좀 더 보완적인 기술 개발이 필요하리라 판단된다.

Primer 에 따른 AFLP의 fragment 차이는 표7과 같다. 총 18개 조합 중 polymorphism이 확인된 9개 primer 조합에서 분석된 총 DNA 단편의 수, polymorphism이 확인된 단편 수 및 그 비율을 나타내었다.

F₂ 와 BC₁F₂ 집단에서 총 705개의 DNA 단편이 검출되어 평균 78개의 단편이 관찰되었는데, 집단간 단편 수는 큰 차이를 보이지 않았으나 BC₁F₂ 집단이 F₂ 집단보다 적게 나타나는 경향이였다. F₂ 집단에서 polymorphism이 확인된 단편은 총 83개로 평균 9.2개의 비율을 보였다. 한편, BC₁F₂ 집단에서는 평균 6.7개의 polymorphism을 보여 F₂ 집단보다 낮게 나타났다. BC₁F₂ 집단이 다양성이 낮게 나타난 것은 backcross의 영향으로 사료된다. 두 집단에서 같은 위치에 나타난 DNA 단편은 평균 4.4개였으며 따라서 전체 공시 재료에서 유전적 다양성이 확인된 것은 평균 10.8개 이었다. Primer 조합별로도 polymorphism에 다양한 차이가 나타났는데 8.6 ~ 17.6%의 변이를 보이며 평균 13.8%를 보였다.

Table 6. Segregation data for four AFLP loci in the F₂ progeny of the cross Hwaeomputkong x PI 417479

Primer-locus name	No. F ₂ plants	No. of genotypes			Expected ratio	χ^2	Probability
		A ₋	AB	BB			
E-CAG/M-AGG-1	128	96	-	32	3 : 1	0.38	0.5<P<0.7
E-CAG/M-AGG-2	125	89	-	36	3 : 1	0.96	0.3<P<0.5
E-CAG/M-AGG-3	128	92	-	36	3 : 1	0.67	0.3<P<0.5
E-CAG/M-AGG-4	127	91	-	36	3 : 1	0.76	0.3<P<0.5

Table 7. Polymorphic fragments of AFLP loci in the progeny of the cross Hwaeomputkong x PI 417479

Primer pairs	Total no. of fragments	No. of polymorphic bands detected				Percent of polymorphic fragments
		F ₂	BC ₁ F ₂	Shared	Total	
E-CAC, M-AGA	84	8	7	5	11	13.1
E-CAC, M-ACG	69	7	5	3	9	13.0
E-CAC, M-AAT	74	8	8	4	13	17.6
E-CAC, M-ATA	81	6	5	2	7	8.6
E-CAG, M-AGG	79	11	7	5	12	15.2
E-CAG, M-AAT	73	7	5	4	9	12.3
E-CAG, M-ATA	85	15	9	6	14	16.5
E-CAA, M-AGA	88	12	6	6	12	13.6
E-CAA, M-ACG	72	9	8	5	10	13.9
Total	705	83	60	40	97	
Average	78.3	9.2	6.7	4.4	10.8	13.8

그림 7은 석량꽃콩 x PI 417419 조합의 F₂를 대상으로 AFLP marker를 이용한 PSD 관련 연관지도이다. 그림에서 보는 바와 같이 각 marker 간의 유전적 거리가 상당히 떨어져 있으므로 이번에 선발된 marker만으로는 콩 미이라병 저항성 관련 연관지도를 작성하기에는 부족한 것으로 판단된다. 따라서 좀 더 다양한 primer를 준비하여 연관지도를 작성하는 노력이 필요할 것으로 판단되었다.

포장에서 조사한 콩 미이라병 저항성 정도와 실내에서 AFLP 분석을 통한 DNA marker와의 연관분석을 한 결과를 표8에 나타내었다. 5개의 AFLP marker를 이용하여 BC₁F₂ 집단의 미이라병 저항성과의 연관관계를 조사한 결과 AF1, AF2, AF3 등이 저항성과 가깝게 연관되어 있을 가능성이 있었다. AF4와 AF5의 경우는 분석된 시료수가 적은 까닭에 좀더 정밀한 분석이 어려웠던 것으로 사료되므로 추후 분석 시료수를 늘려 재검토 하여야 할 것이다.

나. SSR marker 선발

SSR은 단순하게 반복된 특이 염기배열로부터 primer를 만들고 이를 이용하여 특정부분을 PCR에 의하여 증폭함으로써 그 반복배열의 변이를 분석하여 진화학적인 연구뿐만 아니라 연관분석에 의한 분자 유전자 지도 작성에 이용하는 방법이다 (Cho, 2000). 콩의 병저항성 관련 DNA marker들은 주로 F linkage group에 존재를 하며 병과 관련된 유전자들은 집단으로 존재하는 것으로 보고되고 있다. 또한 RFLP를 이용하여 분석한 결과 20가지의 콩 linkage group 가운데 F와 H linkage group에 병과 관련된 유전자가 있을 것이라 추정한 보고가 있다 (Cregan, 1999).

큰올콩과 PI 417479와 (신팔달콩 2호×석량꽃콩)과 PI 417479의 교잡 후대 F₂를 대상으로 모부분간 분획양상이 뚜렷한 primer를 선발하여 작성한 F group과 H group의 연관군 지도는 그림 9와 10에 나타내었다.

큰올콩과 PI 417479의 교잡 후대 집단의 경우 실험에 사용된 39개 중 F group primer에서는 6개, H group primer 20개 중 4개의 primer가 선발되었다. 그리고, F linkage group에서는 510.7cM, H linkage group 에서는 234.3cM의 총 연관거리를 보였다. 또한 (신팔달콩 2호×석량꽃콩)과 PI 417479의 교잡 후대를 대상으로 실험한 결과 F linkage group은 5개, H linkage group에서는 4개의 primer가 선발되었으며, 각각 178.4cM와 83.1cM의 총 연관거리를 보였다.

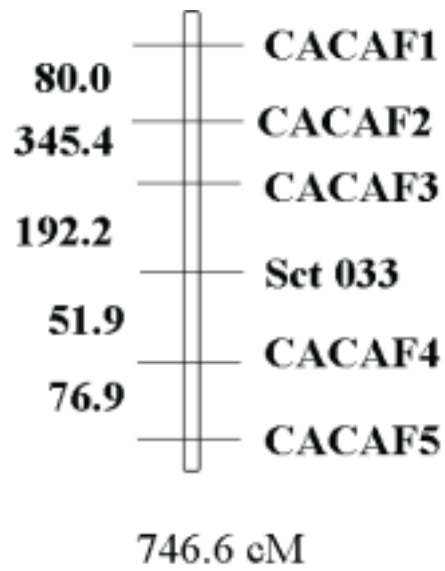


Fig. 8. Linkage map by AFLP marker associated with resistance to PSD in the F2 of cross Seokryangput-kong x PI 417419

Table 8. Linkage analysis(BC_1F_2) of AFLP markers associated with resistance to PSD in soybean

	AF1	AF2	AF3	AF4	AF5
Linkage to resistance	99 (78.6 %)	150 (78.1 %)	154 (80.6 %)	21 (35.0 %)	15 (32.6 %)
Non-linkage	27 (22.4 %)	42 (21.9 %)	37 (19.4 %)	40 (65.0 %)	46 (67.4 %)
Total	126	192	191	61	61

이것들은 외국에서 보고되고 있는 콩 유전자 연관 지도와 유사하였다 (Cregan 등, 1999). 그러나 그림 10에서는 H group의 Satt 192가 그림 9에서는 F group의 Satt 145가 연관지도에서 분리되어 있는 것을 볼 수 있는데, 이것은 분획 양상이 확실하지 않은 missing data의 처리와 실험에 사용한 sample의 수가 적어 나타난 현상이라 볼 수 있다. 지금까지 외국에서는 20개의 연관군에서 총 606개의 SSR 유전자 좌가 발표되었는데 이에 비해 본 실험에서 찾은 유전자 좌는 현저하게 부족하다.

큰올콩 과 PI 417479, (신팔달콩 2호×석량꽃콩)과 PI 417479 두 교잡 후대 F₂ 집단에서의 F linkage group과 H linkage group의 SSR marker 순서는 유사하였다. 그러나, 아직 marker간의 거리 차가 너무 크며, 모든 염색체 상에 매 5~10cM 거리마다 DNA marker들을 가진 정밀한 유전자 연관 지도를 작성하기 위해서는 보다 많은 수의 sample이 필요한 것으로 판단되었다. 또한, F₂ 집단만을 대상으로 할 것이 아니라 더 많은 후대를 검정해야하며, 다양한 DNA marker가 필요하다고 판단되었다.

그림 11은 SSR 분석에서 보여지는 몇 가지 모습을 나타내었다. 일반적으로 SSR 분석은 agarose gel을 이용하여 분석하는 것이 일반적인 경향이며, A가 대표적인 agarose 상의 polymorphism을 나타낸 것이다. Agarose gel을 이용하면 A에서 보는 바와 같이 band들이 명확하게 나타나는 장점이 있으나, 고가의 시약 필요 및 유해물질 취급 등의 문제점이 있다. 또한 B와 같이 때로는 band들이 너무 근접하여 있기 때문에 서로의 차이점을 쉽게 발견 못할 수도 있다. 이러한 단점을 개선시킬 수 있는 것이 polyacrylamide를 사용하는 방법이며, C에서는 B에서 나타나지 않았던 차이점을 polyacrylamide gel 상에서 그 차이점을 발견할 수 있다. 그러나 polyacrylamide를 이용하는 것은 silver-staining에 따른 염색상의 어려움이 있는 것이 또한 단점이 될 수 있었다.

표9는 기존에 선발된 F₁ 조합으로 F₂ 를 전개한 후 F₂ 및 BC₁F₂ 집단을 대상으로 SSR marker를 탐색한 결과이다. SSR marker를 이용하여 F linkage group의 41개 primer와 H linkage group의 21개 primer 등 총 62개의 primer를 사용하였으며 이 중 8개가 선발되었다. 1차년도에는 큰올콩과 PI 417479의 교잡 후대 집단의 경우 39개의 F group primer 중 6개, 20개의 H group primer 중 4개의 primer가 선발되었으며, SS 932058(신팔달콩 2호×석량꽃콩)과 PI 417479의 교잡후대를 대상으로 실험한 결과 F linkage group은 5개, H linkage group에서는 4개의 primer가 선발된 바 있다.

A : Keunol-kong x PI 417479

B : SS 932058 x PI 417479

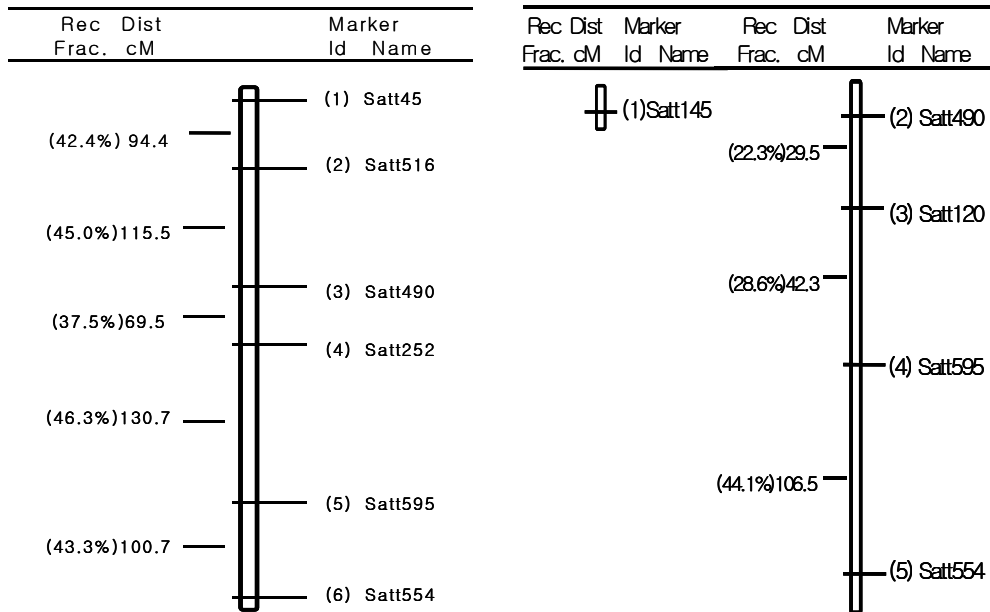


Fig. 9. SSR markers associated with resistance to PSD in soybean linkage group F

A : Keunol-kong x PI 417479

B : SS 932058 x PI 417479

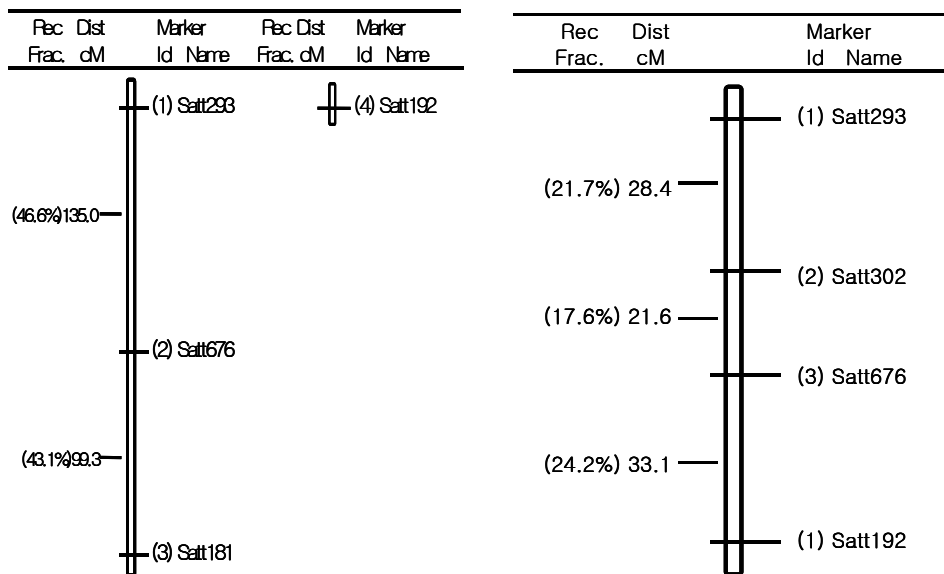
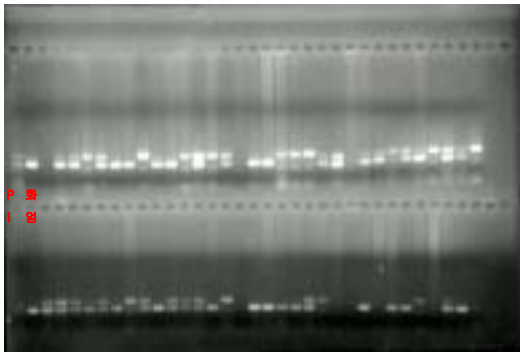
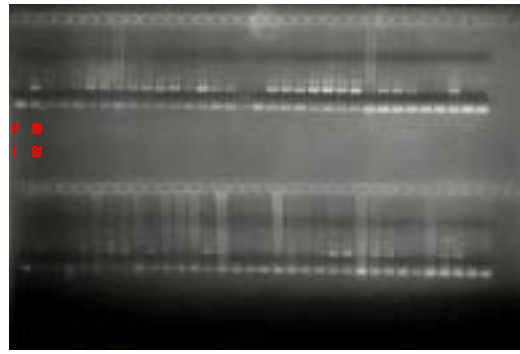


Fig. 10. SSR markers associated with resistance to PSD in soybean linkage group H

A



B



C



Fig. 11. SSR marker patterns in the F₂ progeny of the cross
Hwaeomput-kong X PI 417479.

A and B : agarose gel ; C : polyacryl amide gel

Table 9. Sequences of SSR markers selected for PSD resistance

Satt 490	F	GCGGCACGAGTCAACTTTCTGTTTCCT
	R	GCGGAAGAAGATTTTCGTTTTTAT
Satt 522	F	GCGAAACTGCCTAGGTAAAA
	R	TTAGGCGAAATCAACAAT
Satt 544	F	GCTATGGGAAAGGATGTGTG
	R	GAGCTACCCGAGATGATACTC
Satt 657	F	GCGCATTTGGACTTTTACTTC
	R	GCGACGATGTTAATTGGTAGAATC
Sat_ 375	F	GCGTGTTAATGATTGCATAAGGTTCG
	R	GCGTGTCAAAAAGAACTCAATAAAGAAAAAT
Sat_ 313	F	GCGTATTCCCTTAACAAAATTAAGTTTCAC
	R	GCGCGTCAGCCTAACAAAAAGAATAAAAAT
Sat_ 197	F	GCGATTTTGGTTTTGTTTTATTAG
	R	GCGGTTAACAGCCAAGTTCTTTC
Sct_ 033	F	CTTTTAAATTATAATAGCATGATCT
	R	TGCTAATTTAGATTACGTTATGT

그림 12는 화엄꽃콩 x PI 417419 조합의 F₂ 집단을 대상으로 SSR marker 분석을 실시한 후 만들어진 linkage map 이다. 전체적으로 47.1 cM의 거리에 8개의 marker가 위치하였으며, 각 marker 간에는 3.3~12.5 cM 정도의 간격이 나타났다. 이것은 그림 9 및 10 등에서 만들어진 map 들 보다는 훨씬 정교하게 표현되었다. 그 까닭은 큰올콩 x PI 417419 조합이나 SS 932058 x PI 417479 조합보다 분석된 F₂ 개체수가 많았을 뿐만 아니라 missing data 들의 수가 감소한 까닭으로 사료된다. 따라서 화엄꽃콩 x PI 417419 조합에서 선발된 marker 들이 콩 미이라병 저항성에 관련이 깊을 것이라고 판단되었다. 한편, SSR 분석에 사용된 3조합에서 공히 Satt544 와 Satt490 이 polymorphism 이 나타났으므로 이들 2개의 primer에 대한 좀 더 깊은 검토가 요구된다.

화엄꽃콩 x PI 417419 조합의 F₂, BC₁F₂ 및 BC₂F₂ 집단을 대상으로 SSR marker 분석을 실시한 결과 각 집단에서 부모본간 polymorphism 이 나타낸 primer 를 표10에 나타내었다. 각각의 집단에서 polymorphism 을 나타낸 primer는 비슷하였으며, 다만 다른 집단에서는 나타나지 않았던 Sat_375가 특이하게 BC₁F₂ 집단에서는 Satt335와 Sat_313 사이에서 나타났다. 세 집단 공히 polymorphism 을 보인 것은 Sct_033, Satt335, Sat_313, Satt490, Sat_197, Satt657 등 6개였다. 따라서 콩 미이라병 저항성 유전자와 관련된 SSR marker는 이들 6개가 밀접하게 연관되었으리라 추정되었다.

실제적으로 콩 식물체 및 종자에 나타난 미이라병 저항성 정도와 SSR 분석을 통한 DNA marker와의 연관분석을 한 결과를 표11에 나타내었다. 7개의 SSR marker 를 이용하여 BC₁F₂ 집단의 미이라병 저항성과의 연관관계를 조사한 결과 Sct_033 이 저항성과 밀접하게 연관(80%)되어 있을 것으로 판단할 수 있었다. 그러나 위에서 밝힌 바와 같이 Satt544 와 Satt490의 가능성도 큰 것으로 추정되며, 이들은 표에서 보는 바와 같이 각각 60%, 69%의 연관을 나타내어 그 정도도 다른 것에 비해 높았다.

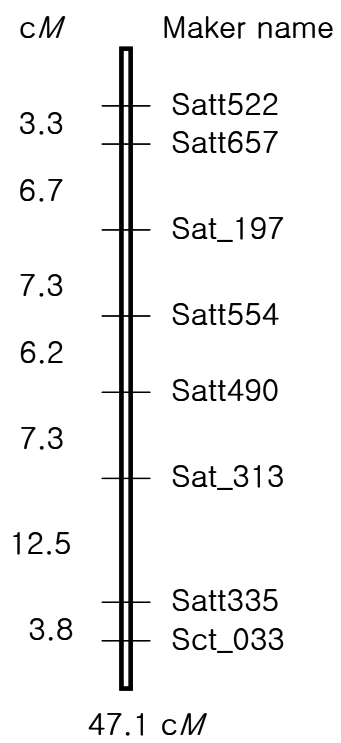


Fig. 12. SSR markers associated with resistance to PSD in soybean linkage group F

Table 10. List of SSR primers showed polymorphism in the hybrid progeny acquired from the cross Hwaeomput-kong x PI 417419

Progeny	Primers
F ₂	Sct_033, Satt335, Sat_313, Satt490, Sat_197, Satt554, Satt657, Satt522
BC ₁ F ₂	Sct_033, Satt335, Sat_375, Satt554, Satt490, Sat_197, Satt657, Satt522
BC ₂ F ₂	Sct_033, Satt335, Sat_313, Satt490, Sat_197, Satt657

Table 11. Linkage analysis(BC₁F₂) of SSR markers associated with resistance to PSD in soybean

	Sct_033	Sat_197	Sat_313	Satt490	Satt522	Satt554	Satt657
Linkage to resistance	110 (80.3 %)	100 (50.8 %)	50 (40.0 %)	107 (69.0 %)	92 (51.7 %)	113 (60.4 %)	103 (60.9 %)
Non-linkage	27 (19.7 %)	87 (49.2 %)	76 (60.0 %)	48 (31.0 %)	86 (48.3 %)	74 (39.6 %)	62 (39.1 %)
Total	137	187	126	155	178	187	169

다. SSR marker와 AFLP marker의 통합

그림 13은 콩 미이라병 저항성과 관련이 있을 것으로 추정되는 SSR marker와 AFLP marker를 통합하여 도식한 것이다. 그러나 그림에서 보는 바와 같이 콩 미이라병 저항성 유전자와 관련된 genetic map이라고 하기에는 여러 가지로 문제점이 많다고 하겠다. 선발된 SSR marker와 AFLP marker 간에는 큰 연관성이 없어 보였으며, AFLP marker 간에도 거리적인 차이가 컸다. 이것은 polymorphism이 크게 나타나는 등의 AFLP 특성에 기인하는 바가 크므로 AFLP marker 탐색은 추후에도 계속적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

라. SNP marker 분석

SNP는 RFLP나 AFLP와 같은 제한효소에 의하여 감지될 수 없는 point mutation을 분석할 수 있으며 식물 육종분야에서도 다른 DNA 마커와 같이 유전적 마커로 이용적 가치가 높고 차세대 마커로서 관심을 받고 있으며 현재 일부 작물, 특히 콩에서도 SNP 출현율에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. SNP분석법은 전기영동과정 없이 hybridization을 고도로 정밀하게 하는 기술로써 gel-based 시스템 마커인 RFLP, SSR, AFLP 보다도 육종 시 선발효율을 극대화 할 수 있는 차세대 마커로 기대되고 있으므로, 앞으로는 작물육종을 위한 SNP 탐색 및 그 이용에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 SNP primer는 콩 연관군 F group의 A_708과 H group의 A_162로 2001년 미국 Michigan 대학에서 미이라병과 연관성이 있다고 발표한 RFLP 마커를 기초하여 사용하였다. 이밖에 이들과 인접하게 위치하고 있는 6개의 RFLP marker를 대상으로 SNP 분석을 수행하였다. 그림 14는 주문 제작한 primer로 모부분 개체를 PCR한 결과를 나타내었다. 그림에서와 같이 모부분간 PCR상태를 확인할 수 있었는데, 이들은 다시 purification 단계를 거쳐 PCR 산물들을 좀 더 안정적으로 만들었으며, 그 이후 2차 PCR를 수행한 후 sequence 분석을 통해 SNP 탐색을 하였다(그림 15). 그림에서 표시한 부분에서 확인할 수 있듯이 여러 부분에서 모부분간의 염기가 다른 것(G-C, C-T, A-G, C-T, T-G)을 확인할 수 있었지만 이것이 SNP와 관련된 염기라 판단하기엔 신뢰성이 떨어졌다. 그것은 각 염기의 quality를 나타내는 모형이 주변의 그것보다 낮은 수준으로 구성되어 있기 때문이다.

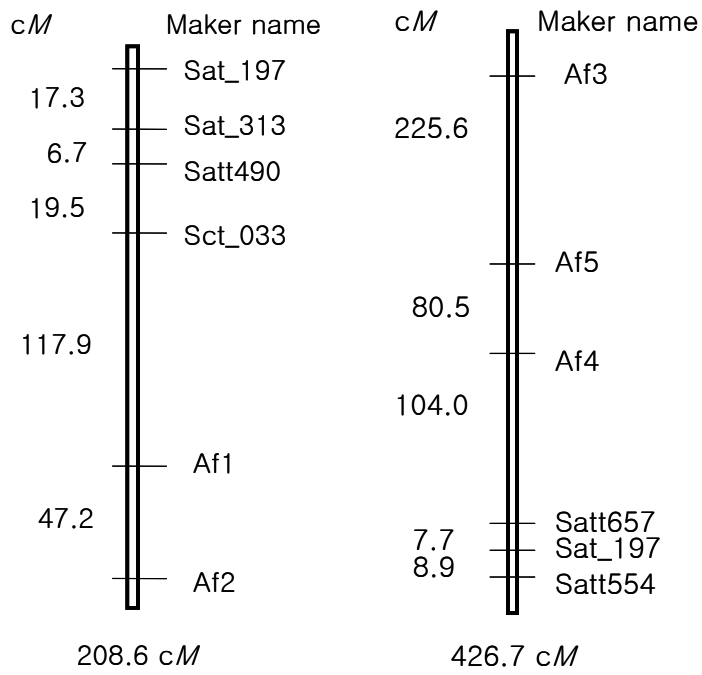


Fig. 13. Locations of SSR and AFLP markers associated with resistance to PSD in soybean

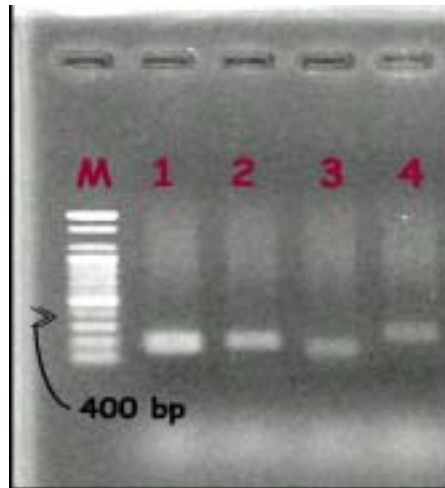


Fig. 14. PCR products of SNP

M : 100 bp Marker

1 : A_708 F - PI 417479

2 : A_708 F - Hwaeomput-kong

3 : A_162 F - PI 417479

4 : A_162 F - Hwaeomput-kong

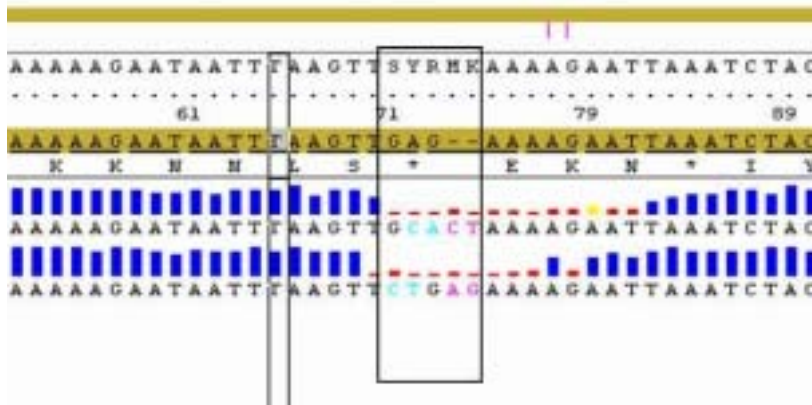


Fig. 15. Analysis of SNPs detected on SeqScape v. 2.0

이러한 결과는 염기를 나타내는 peak가 뚜렷할수록 높은 quality의 모형을 나타내지만 peak의 모형이 뭉뚱하고 한 개의 peak가 아닌 여러 가지 peak가 중첩될 경우 SNP와 관련성이 있는 염기라 하여도 낮은 quality의 모형을 나타내는 요소이기 때문인 것으로 판단된다. 기존의 보고에 의하면 식물체 특히, 콩 품종을 대상으로 18,000 base를 조사한 연구 결과 1kb 당 3.4 개의 SNP 출현율이 나타난다고 보고되어 있지만 본 연구에 사용된 primer size는 400bp 미만으로 현저히 작았다. 따라서 primer의 size를 좀 더 크게 제작하고 미이라병과 연관성 있는 다양한 마커를 탐색하여 사용한다면 quality 높은 SNP를 탐색할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 콩 미이라병 저항성 우량계통 육성

우리나라에서의 콩 재배에 있어 피해를 주는 주요병해는 미이라병, 불마름병, 바이러스 및 세균성점무늬병 인 것으로 조사되었으며(작물시험장, 2003), 이중 미이라병은 콩 수확 시 종실에 직접적인 피해를 주어 상품성이 크게 떨어뜨리며(김 등 1995 ; Hepperly *et al.* 1978), 특히 종자감염에 따른 콩종자의 발아력과 활력을 감소시킴(김 등 1996; Zorrilla *et al.* 1994)이 보고된 후 중요한 병해로 인식 되었다(이 & 김, 1995).

우리나라에서 발생하는 콩 미이라병의 정도는 만생종인 추대두형보다 조생종인 하대두형에서의 감염이 심하며(주 등 1995), 이와 같은 직접적인 원인은 성숙기부터 수확기 까지 고온·다습한 기상 요인을 회피하지 못하는 것이 가장 큰 원인이며(김 등 1996), 일반적으로 미이라병의 방제는 파종기의 이동(Wrathet *et al.* 2003) 및 채종지의 선택으로 고온·다습한 환경을 회피하면 안전 채종이 가능하다고 보고된 바 있다(김 등 1996).

콩 미이라병은 *Phomopsis*와 *Diaporthe phaseolorum* 등의 몇 종류의 병원균에 의하여 복합적으로 작용하여 발생되며, 병의 발생 양상은 *Phomopsis longicolla* 에 의한 seed decay, *Diaporthe phaseolorum* var. *soiae*에 의한 pod and stem blight 및 *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* 와 *Diaporthe phaseolorum* var. *meridonalis*에 의한 stem cranker 가 종합적으로 발생한다(Hobbs *et al.* 1985; Kulik, 1984). 콩 미이라병은 *Diaporthe/Phomopsis* complex로 통칭되거나 발병부위 및 병원균에 따라 에 따라 *Phomopsis* seed decay 또는 Pod and stem blight로 불리우고 있다(Hartman 등, 1999).

콩 미이라병의 감염을 방제하려는 노력은 살균제의 종자처리(노 등, 1997; Tekrony *et al.* 1985), 파종기의 이동을 포함한 재배법의 개선(작물시험장, 1994), 저항성 품종의 육종(Jackson *et al.*, 2005)등 여러 가지 접근방법을 통하여 수행되었으나, 효과적인 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 콩 미이라병에 대한 유전적 접근으로서 저항성의 유전에는 2개의 complementary dominant nuclear gene이 관련되어 있으며 일본 유래의 PI417479 등 몇 가지 품종이 저항성인 큰 것으로 보고된 바 있다(Zimmerman *et al.* 1993; Jackson *et al.*, 2005). 최근에는 분자생물학적 기술을 이용한 미이라병균의 동정에 관한 연구도 보고되었다(Berger *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1997). 한편 콩 미이라병 방제를 위한 약제처리 효과에 대한 다수의 보고가 있었으며, 약제 중 benzimidazole계 베노밀의 처리가 가장 큰 것으로 보고되었다(노 등, 1997; Tekrony *et al.* 1985).

현재 우리나라의 콩의 자급률은 약 7% 수준에 불과하며 식용콩은 소비량의 75% 수입에 의존하고 있다(농림부, 2004). 콩 자급률 향상을 위해서는 콩 재배면적 확대가 필수적이며, 이를 위해서는 유희 논을 대체한 논 재배 콩의 확대 및 토지의 고도 활용을 위한 작부체계의 개선이 필요하다. 논에서의 콩 재배는 밭과 비교하여 배수 불량에 따른 다습한 조건에서의 미이라병의 발생이 심할 것이므로 이를 해결하여야 하는 것이 시급한 과제의 하나이다. 이밖에 작부체계에 있어 이모작을 위한 맥류 및 채소 전작용 콩 품종은 하대두 및 극조생종 계통이 알맞으며, 우리나라 기상조건하에서 극조생종 콩 육성은 무엇보다 우선 미이라병 해결이 중요한 과제라 할 수 있다. 본 연구는 이와 같이 이모작 작부체계에 적응하며, 논 콩재배에 적용할 수 있는 미이라병 저항성 콩 품종육성을 위하여 수행되었다.

가. 공시재료의 특성

화엄꽃콩과 PI 417479의 단교잡종은 2001년 기 교배된 조합을 이용하여 사용하였으며, 화엄꽃콩과 PI 417479의 주요특성은 표 12와, 종실의 외관특성은 그림 16과 같다. 한편, 국내장려 품종에 미이라병 저항성 인자 도입을 위한 인공교배를 수행하였으며, 이를 위해 사용된 품종 및 계통의 특성은 표13과 같다.

Table 12. Agronomic characteristics of Hwaeomputkong and PI 417479

Cultivars	Growth habit	Flower color	Leaflet shape	Testa color	Hilum color	Matu rity	Seed size	PSD* resistance
Hwaeomputkong	Determinate	White	Ovoid	Yellow	Light brown	Early	Large	S [↓]
PI417479	“	Purple	“	“	Yellow	”	Small	R

* PSB : Pod & stem bligh

↓ S : susceptible, R : resistance

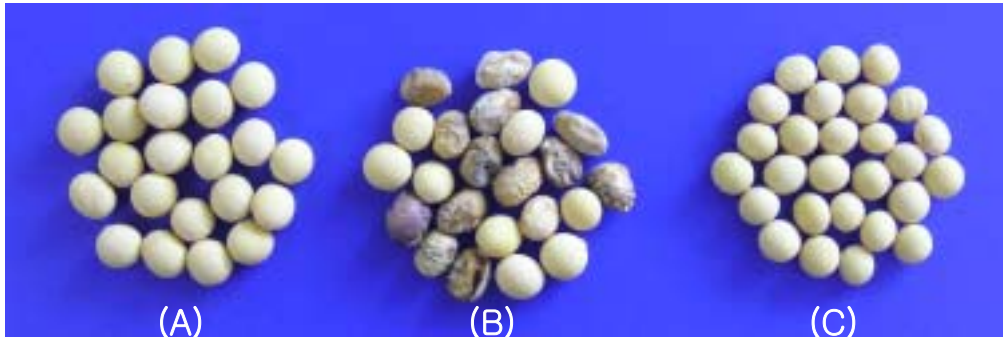


Fig. 16. Comparison of seed shape between Hwaeomputkong and PI 417479 (A : Hwaeomputkong; normal seed B: Hwaeomputkong infected seed to PSD, C : PI 417479)

Table 13. Some characteristics of parental genotypes using artificial cross in the experiment.

	Flower color	Testa color	Hilum color	Maturity	Seed size	PSD resistance
Miryang 134	Purple	Yellow	Brown	Early	Large	S
SI 993782	Purple	Yellow	Yellow	Early	Large	S
Seokryangputkong	White	Green	Black	Early	Large	S
Shillok	Purple	Yellow	Yellow	Early	Mid	S
Hwaeomputkong	White	Green	Black	Early	Large	S
PI 417479	Purple	Yellow	Brown	Late	Mid	R

콩 미이라병 저항성 계통 육성 및 선발을 위한 인공교배부터 계통 선발과정의 시험 재료수는 표 14와 같다. '03~'05 3개년 간 인공교배 9조합, F₁ 11조합, F₂ 9조합 및 F₃ 이후 계통 10조합을 공시하였으며, F₂ 세대 이후 계통의 재식밀도는 60×15cm, 1주1본으로 재배하였으며, 기타 재배법은 작물과학원 표준재배법에 준하였고, 주요조사항목으로는 교잡여부 및 농업형질을 조사한 후 우량계통을 선발하였다.

Table 14. Hybrid generation, cross year and number of lines examined

Year	No. of cross combination	F ₁	F ₂ combination (seed)	F ₃ combination (line)	F ₄ combination (line)	F ₅ combination (line)
'03	5	2	1(2,250)	-		
'04	4	5	2(1,667)	1(230)		
'05	-	4	5(3,300)	1(190)	1(139)	
'06	-	-	1(930)	5(2,050)	1(120)	1(116)
Total	9	11	9(8,147)	7(2,470)	2(161)	1(116)

나. 여교잡을 이용한 콩 미이라병 저항성 계통 육성

우리나라에서 발생하는 미이라병의 감염은 나물콩 및 장류콩보다 조생종인 풋콩에서 심하다(이 & 김, 1995). 본 연구에 이용된 화엄풋콩은 생육기간이 짧은 극조생종으로서(홍 등, 1993) 과중시기에 따른 발병률을 조사한 결과 5월 중순 과중시 수원을 포함한 5개지역에서 평균 20%의 감염률을 나타내었으며, 6월 중순 과중시에도 13.3%의 감염율을 나타내었고, 수확적기 10일 후의 종자에서는 감염이 더욱 진행되는 양상을 보였다(작물시험장, 1994). 이와 같은 극조생 콩에 미이라병 저항성 인자를 도입하고자, 2개의 상보적 우성 핵내 유전자에 의해 지배되는 유전 양상을 고려하여(Zimmerman et al. 1993), 기존 보고된 미이라병 저항성인자 보유 자원을 이용하여 여교잡을 3회 수행하였다(그림 17). 수여친으로 이용된 PI 417479는 일본이 원산지인 자원으로서 미이라병 저항성 자원으로 보고(Zimmerman et al. 1993)된 것으로 2000년 미국 ARS로부터 도입하였다. 그후 농업형질을 조사한 바 콩 미이라병에 저항성인 것으로 판단되어 국내 우량품종 중 조생종으로서 농업형질이 우수한 화엄풋콩과 2001년 인공교배 하였으며, 2002년 여교잡을 1차 수행하였다. 2003년부터 2004년 까지 총 3회에 걸쳐 여교잡을 완료하였으며, 2005년에는 BC₃F₁을 양성하였다. 본과제가 종료되는 2006년 현재 BC₃F₂세대의 계통을 전개 중이며, 이들 계통 중 농업형질이 우수한 계통을 선발하여 2007년 생산력검정시험에 공시할 예정이다.

목표형질이 우성이므로 여교잡 방법은 그림 17과 같이 수행하였다. 일반적인 여교잡 방법은 반복친을 모본으로 수여친을 부분으로 수행하여 교잡을 수행하나, 본 여교잡에서는 교잡의 편리성을 위하여 반복친을 부분으로 사용하여 수행하였다. 단교잡시 F₁은 44립을 수확하였으며, 여교잡시에는 11~25 립을 수확하였다. 2005년에 BC₃F₁을 양성하여 2006년 하계에 930립의 BC₃F₂세대를 전개하였다.

다. 우량품종의 미이라병 저항성 인자 도입 및 계통육성

국내우량 품종에 미이라병 저항성 인자를 도입하기 위한 인공교배내역은 표 15와 같다. 극조생종으로 농업형질이 우수한 밀양134호, 화엄풋콩, 석량풋콩 및 신록 등의 우량 계통 및 품종과 유전자원 중 숙기가 빠르며 대립종인 SI 993782에 PI 417479로부터 저항성인자를 도입하였다. 2003/2004 2개년 간 9조합을 인공교배 하였으며 반복친의 농업형질을 유지하기 위하여 여교잡을 실시하였다. 2003년도에는 5조합 200

화를 교배하여 65협 108립을 수확하였으며 착협율은 31.3%이었고, 2004년은 4조합 225화를 교배하여 43협 66립을 수확하였으며 착협율은 19.2%이었다.

Year	Crossing	No. of planted seed
2001	Whaeomputkong × PI417479 (recurrent parent) ↓ (donor parent)	
2002	Whaeomputkong × SS01415 ↓ (F ₁)	44
2003	SS02213 × Whaeomputkong (BC ₁ F ₁) ↓	25
2004	SS03703 × Whaeomputkong (BC ₂ F ₁) ↓	11
2005	SS04701 (BC ₃ F ₁)	18
2006	↓ (BC ₃ F ₂)	930

Fig. 17. Backcross diagram for a new soybean line

Table 15. Results of crosses for development of resistance lines to PSD

Year	Name of pedigree	Combination	No. of flower	Pod harvested	Ratio of pod setted (%)	Seed harvested	
2003	SS03701	Miryang134/PI417476	50	19	38.0	26	BC ₂
	SS03702	PI417479/SI993782	40	23	57.5	41	
	SS03703	SS02213/Hwaeom	35	5	14.3	11	
	SS03704	PI417479/Seokyang	40	13	32.5	23	
	SS03705	PI417479/Sillok	35	5	14.3	7	
	sub-total	5	200	65	31.3	108	
2004	SS04701	SS03703/Hwaeom	75	14	18.6	18	BC ₃
	SS04702	SS03701/Miryang134	50	11	22.0	19	BC ₁
	SS04703	SS03704/Seokyang	50	8	16.0	13	BC ₁
	SS04704	SS03705/Sillok	50	10	20.0	16	BC ₁
	sub-total	4	225	43	19.2	66	
Total		9	425	108	-	-	

Table 16. Results of F₁ cultivation for development of resistance lines to PSD

Year	Pedigree	Combination	Seed sown	Plant harvested	Seed harvested		
2003	SS02213	Hwaeom/SS01415	25	13	1,377	BC ₂	
	SS03703	SS02213/Hwaeom	8	7	290		
	sub-total	2	33	20	1,660		
2004	SS03701	Miryang134/PI417476	26	17	617		
	SS03702	PI417479/SI993782	41	21	621		
	SS03703	SS02213/Hwaeom	11	7	209		
	SS03704	PI417479/Seokyang	23	17	514		
	SS03705	PI417479/Sillok	7	5	149		
	sub-total	5	108	67	2,010		
2005	SS04701	SS03703/Hwaeom	18	12	930		
	SS04702	SS03701/Miryang134	19	-	-		selfing
	SS04703	SS03704/Seokyang	13	-	-		selfing
	SS04704	SS03705/Sillok	16	-	-		selfing
	sub-total	4	66	12	930		
	Total		207	99	4,600		

표 16은 년도별 F₁ 양성내역이다.

2003년도는 2조합 33립을 파종하여 1,660립을 수확하였으며, 2004년도는 5조합 108립을 파종하여 2,010립을 수확하였고, 2005년도는 4조합 66립을 파종하여 selfing 된 3조합을 제외한 1조합 12개체 930립을 수확하였다. 일반적인 콩 F₁ 양성에 비하여 수확립수가 적은 것은 여교배를 위한 부모본으로 개화시 꽃을 많이 이용한 것이 큰 원인인 것으로 사료된다.

F₂ 이후 세대의 우량계통 선발 내역은 표 17과 같다. F₂의 세대의 후대 선발은 제한된 포장면적을 고려하여 2004, 2005년은 1립1개체법(single seed descent method)으로 선발하였으며, 2003년도는 1조합(SS01415)을 공시하여 300계통을 선발하였으며, '04년에는 SS02213(화엄꽃콩/SS01415, BC₁F₂) 및 SS03703(SS02213/화엄꽃콩, BC₂F₂) 등 2조합을 공시하여 1,447립을 수확하였다. 2005년도에는 밀양134호/PI 417479 등 5조합을 파종하여, 입질이 불량한 1조합(SS03705)을 실내 도태한 후 4조합 3,647립을 선발하였다. F₃의 세대는 2004~2005년간 2조합 1,510립을 공시하여 292계통을 선발하였으며, F₄ 세대는 2005년에 SS01415 조합을 실내선발한 후 139계통을 공시하여 116계통을 선발하였다. 주요조사항목은 초기세대에서는 교배여부 등을 조사하였으며, 후기세대에서는 미이라병 저항성 조사 및 달관으로 농업형질을 고려하여 우량계통을 선발하였다.

Table 17. Results of selection for development of resistance lines to PSD in hybrid generations

	Year	Pedigree	Combination	Line (seed) yested	Line selected	
F ₂	2003	SS01415	Hwaeom/PI417479	(2,250)	300	
	2004	SS02213	Hwaeom/SS01415	(1,377)	1,210	SSD method
		SS03703	SS02213/Hwaeom	(290)	237	
	2005	SS03701	Miryang134/PI417479	(617)	600	SSD method
		SS03702	PI417479/SI993782	(621)	600	SSD method
		SS03703	SS02213/Hwaeom	(209)	200	SSD method
		SS03704	PI417479/Seokyang	(514)	500	SSD method
		SS03705	PI417479/Sillok	(149)	-	Discard
sub-total		8	(6,027)	3,647	-	
F ₃	2004	SS01415	Hwaeom/PI417479	300	152	
	2005	SS02213	Hwaeom/SS01415	1,210	140	
	sub-total		2	1,510	292	-
F ₄	2005	SS01415	Hwaeom/PI417479	139	116	'06 YFT test
Total			11	1,649 (6,027)	4,059	-

표 18은 2006년도에 공시한 생산력검정시험 재료(2005년 콩 미이라병 저항성으로 선발된 계통 ; F5세대, 116계통)의 주요 특성이다. 시험계통의 공여친으로 사용된 PI 417479는 종실의 제색이 담갈색이며, 종피가 파열되는 특성을 지니고 있다. 그러나 시험 재료 중 SS01415-80-1 계통군은 화엄꽃콩의 외관형질과 유사하여 제색이 황색이며, 종피의 파열이 발견되지 않았다. SS01415-3-4 등의 계통은 제색이 담갈색이나 종피의 파열이 발견되지 않았으며, SS01415-44-3 등의 계통은 제색이 담갈색이나 종피의 파열이 관찰되었다(그림18, 부표 1). 전체 시험계통(116 계통)의 평균 주당립수는 182립, 주당수량은 45g, 100립중은 22.7g을 나타냈다. 본 시험 계통은 2006~2007년간 수량성 및 농업형질을 정밀검토한 후 2008년도 지역적응시험에 공시할 예정이다.

Table 18. Some characteristics of materials for yield forecasting trial(2006)

	Experimental materials	Seeds per a plant	Yield per a plant (g)	100 seed weight (g)	PSD* resistance	Hilum color
Female	Hwaeomputkong	109	32	29.4	S	Yellow
Male	PI 417479	232	45	19.4	R	Light brown
Check 1	Taekwangkong	225	48	21.3	S	Yellow
Check 2	Daewonkong	158	43	27.3	S	Yellow
Mean value (116 lines)	SS01415	182	41	22.7	R	Segregation

* S : susceptible, R : resistance

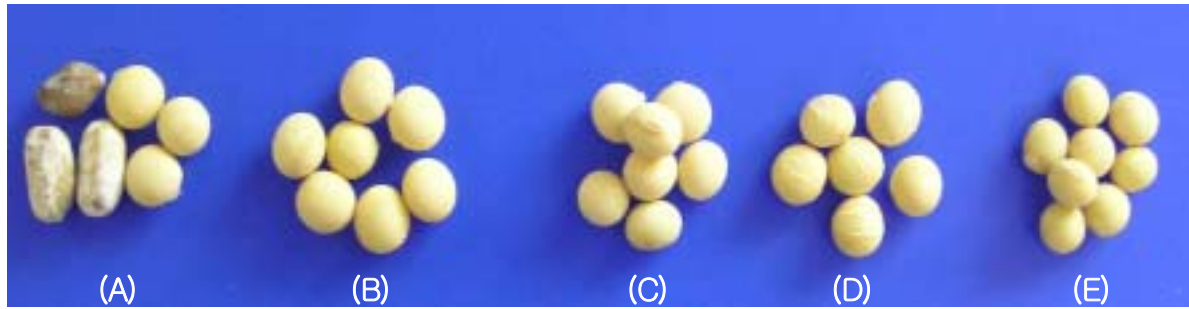


Fig. 18. Comparison of seed shape in selected lines
(A : Hwaecomputkong, B : SS01415-80-1, C : SS01415-3-4 D : SS01415-44-3, E : PI 417479)

Appendix 1. Some characteristics of breeding lines examined in YFT test, 2006

Entry No.	Experimental materials	Seeds per a plant(no.)	Yield per a plant(g)	100seed weight (g)	PSD* resistance	Hilum color	Cracking [↓]
1	Whaeomputkong	109	32	29.4	S	Yellow	N
2	PI417479	232	45	19.4	R	Light brown	Y
3	Taekwangkong	225	48	21.3	S	Yellow	N
4	Daewonkong	158	43	27.3	"	"	"
5	SS01415-3-4-1	212	50	23.6	R	Light brown	"
6	SS01415-3-4-2	201	46	22.9	"	"	"
7	SS01415-3-4-3	189	46	24.3	"	"	"
8	SS01415-3-4-4	190	49	25.8	"	"	"
9	SS01415-7-3-1	157	35	22.3	"	"	"
10	SS01415-7-3-2	188	44	23.4	"	"	"
11	SS01415-7-3-3	170	39	22.9	"	"	"
12	SS01415-7-3-4	189	43	22.7	"	"	"
13	SS01415-12-1-1	207	48	23.2	"	"	"
14	SS01415-12-1-2	207	50	24.2	"	"	"
15	SS01415-12-1-3	132	32	24.2	"	"	"
16	SS01415-12-1-4	167	39	23.3	"	"	"
17	SS01415-12-2-1	167	38	22.8	"	"	"
18	SS01415-12-2-2	271	55	20.3	"	"	"
19	SS01415-12-2-3	235	48	20.4	"	"	"
20	SS01415-12-2-4	263	55	20.9	"	"	"
21	SS01415-12-4-1	179	39	21.8	"	"	"
22	SS01415-12-4-2	159	36	22.6	"	"	"
23	SS01415-12-4-3	205	43	21.0	"	"	"
24	SS01415-12-4-4	222	48	21.6	"	"	"
25	SS01415-25-1-1	256	51	19.9	"	"	Y

* S : susceptible, R : resistance

↓ Y : cracked N : none-cracked

Entry No.	Experimental materials	Seeds per a plant(no.)	Yield per a plant(g)	100seed weight (g)	PSD resistance	Hilum color	Cracking
26	SS01415-25-1-2	191	39	20.4	R	Yellow	Y
27	SS01415-25-1-3	194	39	20.1	"	"	"
28	SS01415-25-1-4	144	30	20.9	"	"	"
29	SS01415-30-2-1	272	55	20.2	"	"	N
30	SS01415-30-2-2	196	41	20.9	"	"	"
31	SS01415-30-2-3	201	40	19.9	"	"	"
32	SS01415-30-2-4	188	41	21.8	"	"	"
33	SS01415-33-4-1	220	46	20.9	"	"	"
34	SS01415-33-4-2	204	42	20.6	"	"	"
35	SS01415-33-4-3	181	36	19.9	"	"	"
36	SS01415-33-4-4	181	36	19.9	"	"	"
37	SS01415-36-3-1	181	41	22.7	"	"	"
38	SS01415-36-3-2	155	37	23.8	"	"	"
39	SS01415-36-3-3	202	43	21.3	"	"	"
40	SS01415-36-3-4	221	46	20.8	"	"	"
41	SS01415-44-3-1	199	45	22.6	"	"	"
42	SS01415-44-3-2	127	30	23.6	"	"	"
43	SS01415-44-3-3	120	29	24.2	"	"	"
44	SS01415-44-3-4	178	39	21.9	"	"	"
45	SS01415-44-4-1	152	34	22.4	"	"	"
46	SS01415-44-4-2	244	49	20.1	"	"	"
47	SS01415-44-4-3	289	57	19.7	"	"	"
48	SS01415-44-4-4	299	59	19.7	"	"	"
49	SS01415-45-1-1	224	52	23.2	"	"	Y
50	SS01415-45-1-2	153	37	24.2	"	"	"

Entry No.	Experimental materials	Seeds per a plant(no.)	Yield per a plant(g)	100seed weight (g)	PSD resistance	Hilum color	Cracking
51	SS01415-45-1-3	125	31	24.8	R	Yellow	Y
52	SS01415-45-1-4	174	41	23.6	"	"	"
53	SS01415-45-2-1	205	47	22.9	"	"	"
54	SS01415-45-2-2	162	38	23.4	"	"	"
55	SS01415-45-2-3	152	35	23.1	"	"	"
56	SS01415-45-2-4	167	39	23.4	"	"	"
57	SS01415-45-4-1	128	30	23.4	"	"	"
58	SS01415-45-4-2	183	40	21.8	"	"	"
59	SS01415-45-4-3	191	40	20.9	"	"	"
60	SS01415-45-4-4	130	31	23.8	"	"	"
61	SS01415-48-3-1	175	40	22.9	"	"	N
62	SS01415-48-3-2	144	34	23.6	"	"	"
63	SS01415-48-3-3	156	37	23.7	"	"	"
64	SS01415-48-3-4	214	43	20.1	"	"	"
65	SS01415-48-4-1	181	39	21.6	"	"	"
66	SS01415-48-4-2	212	43	20.3	"	"	"
67	SS01415-48-4-3	209	42	20.1	"	"	"
68	SS01415-48-4-4	247	48	19.4	"	"	"
69	SS01415-54-1-1	242	48	19.8	"	"	"
70	SS01415-54-1-2	164	35	21.3	"	"	"
71	SS01415-54-1-3	203	40	19.7	"	"	"
72	SS01415-54-1-4	247	48	19.4	"	"	"
73	SS01415-64-1-1	147	33	22.5	"	"	Y
74	SS01415-64-1-2	156	36	23.1	"	"	"
75	SS01415-64-1-3	196	41	20.9	"	"	"

Entry No.	Experimental materials	Seeds per a plant(no.)	Yield per a plant(g)	100seed weight (g)	PSD resistance	Hilum color	Cracking
76	SS01415-64-1-4	154	36	23.4	R	Yellow	Y
77	SS01415-64-2-1	174	42	24.2	"	"	N
78	SS01415-64-2-2	91	24	26.4	"	"	"
79	SS01415-64-2-3	162	39	24.1	"	"	"
80	SS01415-64-2-4	189	45	23.8	"	"	"
81	SS01415-65-4-1	212	43	20.3	"	"	Y
82	SS01415-65-4-2	161	36	22.4	"	"	"
83	SS01415-65-4-3	214	43	20.1	"	"	"
84	SS01415-65-4-4	224	46	20.5	"	"	"
85	SS01415-69-2-1	130	34	26.2	"	"	N
86	SS01415-69-2-2	153	38	24.8	"	"	"
87	SS01415-69-2-3	128	33	25.7	"	"	"
88	SS01415-69-2-4	170	41	24.1	"	"	"
89	SS01415-80-1-1	116	33	28.4	"	Yellow	"
90	SS01415-80-1-2	114	32	28.1	"	"	"
91	SS01415-80-1-3	139	38	27.3	"	"	"
92	SS01415-80-1-4	120	33	27.6	"	"	"
93	SS01415-87-3-1	142	32	22.6	"	Light brown	Y
94	SS01415-87-3-2	217	43	19.8	"	"	"
95	SS01415-87-3-3	120	28	23.4	"	"	"
96	SS01415-87-3-4	238	49	20.6	"	"	"
97	SS01415-91-3-1	139	38	27.3	"	"	N
98	SS01415-91-3-2	99	28	28.2	"	"	"
99	SS01415-91-3-3	166	44	26.5	"	"	"
100	SS01415-91-3-4	87	25	28.7	"	"	"

Entry No.	Experimental materials	Seeds per a plant(no.)	Yield per a plant(g)	100seed weight (g)	PSD resistance	Hilum color	Cracking
101	SS01415-96-4-1	149	42	28.2	R	Light brown	N
102	SS01415-96-4-2	127	36	28.4	"	"	"
103	SS01415-96-4-3	143	39	27.3	"	"	"
104	SS01415-96-4-4	106	30	28.4	"	"	"
105	SS01415-110-4-1	258	54	20.9	"	"	Y
106	SS01415-110-4-2	206	44	21.4	"	"	"
107	SS01415-110-4-3	194	41	21.1	"	"	"
108	SS01415-110-4-4	128	29	22.6	"	"	"
109	SS01415-115-1-1	161	39	24.2	"	"	N
110	SS01415-115-1-2	226	50	22.1	"	"	"
111	SS01415-115-1-3	217	49	22.6	"	"	"
112	SS01415-115-1-4	165	38	23.0	"	"	"
113	SS01415-127-2-1	173	39	22.6	"	"	"
114	SS01415-127-2-2	157	37	23.6	"	"	"
115	SS01415-127-2-3	104	24	23.1	"	"	"
116	SS01415-127-2-4	215	44	20.5	"	"	"
117	SS01415-130-4-1	199	44	22.1	"	"	"
118	SS01415-130-4-2	217	44	20.3	"	"	"
119	SS01415-130-4-3	252	52	20.6	"	"	"
120	SS01415-130-4-4	214	46	21.5	"	"	"

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

구분	연도	연구개발 목표	달성 내용	달성도(%)
1차 년도	2003	○ 균주 분리 및 확인	○ 균 분리 13종	100
		○ 야생콩 유전자원 탐색	○ 205계통 균 집중	100
		○ 교배조합 선발 및 후대양성	○ 인공교배 5조합 ○ F ₂ 3조합 전개 후 1조합 선발 (2,250립)	100
2차 년도	2004	○ AFLP analysis	○ Marker 9개 선발	100
		○ SSR analysis	○ Marker 8개 선발	100
		○ RIL 및 NIL 조성	○ 인공교배 4조합 ○ F ₁ 양성 5조합 ○ F ₂ 2조합 선발(1,667립) ○ F ₃ 230 계통 선발 ○ BC ₁ F ₂ 및 BC ₂ F ₂ 양성 (2조합)	100
3차 년도	2005	○ 콩 미이라병 저항성 관련 linkage group mapping	○ SSR marker 이용 mapping ○ AFLP marker 이용 mapping ○ 콩 미이라병 저항성 관련 Marker 4종 선정	100
		○ 콩 미이라병 저항성 우량계통 육성	○ F ₂ 1조합 선발(9930립) ○ F ₃ 5조합 전개(2,050개체) ○ 우량계통 116 line을 생산력 검정 예비선발시험에 공시	100
최종 평가				100

제 2 절 관련분야에의 기여도

가. 기술적 측면

◆ 콩 내병성 분자 육종 기술 확립에 기초 제공

- 현재 활발히 진행되고 있는 국내 농업분야의 게놈연구가 기능면에는 아직 취약한 형편이며, 그나마도 몇 가지 작물에 치우치고 있어 콩에 대한 연구는 미흡함
- DNA marker 개발 → 기초적 유전자 지도 작성 → MAS 기술의 실용화가 분자육종 기술의 전반인 바, 본 연구에서 개발된 몇 가지 DNA marker는 콩 내병성 품종 육종에 도움을 줄 것임
- 기초적 유전자 지도들의 통합으로 콩 유전자의 기능적 map 작성이 가능하며, 따라서 본 연구의 결과물은 콩 게놈의 기능연구에 일조를 할 것임

◆ 농업생명공학 원천기술의 산업화

- 21세기에 집중적으로 연구, 발전될 genome에 관한 이론과 기술을 습득함으로써 국내 생명과학의 발전에 일조를 할 수 있을 것이며, 특히 genome 관련 연구를 통하여 농업생산성을 향상시킬 수 있는 토대가 마련될 수 있을 것임
- 본 연구의 결과물을 토대로 추후 관련 연구가 심도있게 진행된다면 연관된 유전자 지도에 의거한 질적, 양적 유전자의 분리 및 특허 획득이 가능할 것임

나. 경제·산업적 측면

◆ 안정적 식량 공급 기반 마련

- 콩 미이라병에 저항성인 콩 품종 육성으로 콩의 수량성 및 품질 제고, 특히 풋콩 재배 농가의 소득 향상에 일익을 담당할 수 있을 것임
- 우량 단기성 품종 개발로 콩 작부체계 개선에 도움을 줄 수 있을 것임. 이는 콩을 이용한 2모작 재배의 기회를 증가시킴으로써 콩 재배면적의 확대와 함께 농가 수익 향상에 도움을 줄 것임

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 계량적 성과

(2006. 7월 현재)

전문학술지		학회발표		인력양성 (명)				특허	
국외	국내	국외	국내	박사		석사		국외	국내
				졸업	재학	졸업	재학		
-	2	-	4	-	-	2	2	-	-

2. 성과내용

가. 학술논문

1) 국내

가) 김용호, 윤홍태. 2004. AFLP marker를 이용한 콩의 유전적 다양성과 유전분리 분석. 한국자원식물학회지 17(3): 265-271

나) 엄상미, 윤홍태, 김용호. 2003. 콩 미이라병의 유전적 분리. 순천향자연과학연구 9(2): 147-150

나. 학회 발표

1) 국내

가) 이재도, 남시훈, 윤홍태, 김용호. 2006. DNA marker를 이용한 콩 미이라병 저항성 유전자 탐색 및 연관지도 작성. 한국작물학회지51(별1):142-143. 2006 한국작물학회, 한국약용작물학회 공동 춘계 학술발표회,

나) Lee JD, Nam SH, Yun HT, and Kim YH. 2005. Mapping of DNA markers

associated with resistance to PSD in soybean. Proceedings of the Intl. Symposium on plant genetic resources and annual meeting of the Korean Breeding Society and the Korean Academy of Native Species. p 220.

다) Sang-Mi Eom, Hong-Tae Yun, and Yong-Ho Kim. 2003. Identification of DNA markers associated with resistance to phomopsis seed decay in soybean. Korea Conference on Innovative Science and Technology-223 : Agricultural & Fishery Genomics - Future Implication. The Korean Federation of Science and Technology Societies. pp 375-377

라) 엄상미, 윤홍태, 김용호. 2003. 콩 미이라병 저항성 유전자의 유전분리. 2003 한국작물학회 한국육종학회 공동 학술대회. p. 166

다. 인력 양성

이름	학교	학위	졸업논문
엄상미	순천향대	이학석사	DNA marker를 이용한 콩 미이라병 관련 유전자 탐색
이재도	순천향대	이학석사	DNA marker를 이용한 콩 미이라병 저항성 유전자 탐색 및 연관지도 작성

제 2 절 연구개발의 활용 계획

○ 농촌진흥청 등 실질적 육종기관과의 지속적인 공동연구

- 분자유종기술 확립을 위한 기초자료 제공 및 기술 이전

⇒ 추가되어야 할 연구 : MAS 기술 적용 내병성 콩 품종 육성 체계 개발

- 콩 미이라병 저항성 품종 육성 및 품종 등록

⇒ 본 연구에서 선발된 우량계통이 현재 생산력검정시험 수행 중

○ 연구 결과물의 국내외 전문학술지 게재

제 6 장 참고 문헌

1. Akkaya MS, Shoemaker RC, Specht JE, Bhagwat AA, Cregan PB. 1995. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.* 35: 1439-1445
2. Athow KL and Laviolette FA. 1973. Pod protection effectes on soybean seed germination and infection with *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and other microorganism. *Phytopathology.* 63: 1021-1023
3. Balducchi AJ and McGee DC. 1987. Environmental factors influencing infection of soybean seeds by Phomopsis and *Diaporthe* species during seed maturation. *Plant disease.* 71: 209-212
4. Berger, G. U., and H. C. Minor 1999. An RFLP marker associated with resistance to phomopsis seed decay in soybean PI 417479. *Crop Sci.*, 39(3): 800 - 805.
5. Blears MJ, Grandis SA, Lee H, and Trevors JT. 1998. Amplified fragment length polymorphism(AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 21: 99-114.
6. Brown EA, Minor HC, and Calvert OH. 1987. A soybean genotype resistant to *phomopsis* seed decay. *Crop Sci.* 27: 895-898.
7. Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR. 1997. Development of a microsatelite framework map providing genomewide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 95: 553-567
8. Choi IY, Lim SH, Kim DW, Choi YS, Shin YB, and Kim NS. 2000. Classification of diverse soybean germplasm with morphological characters and molecular markers. *Korean J. Genetics* 22(2): 87-100
9. Chu YH, Chung KW, Oh JH, Yun ST, and Lee DJ. 1995. Seed characteristics and seed infection rate of pod and stem blight in germplasm of summer type of soybeans. *Korean J. soybean* 12(2) : 65-73.
10. Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes DG, Chung J, and Specht JE. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39:

1464-1490

11. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Mirissette J, and Weissenbach J. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature(London)* 380:152-154
12. Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, DamronBoles D, Hu sain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ, Evans CA, DeAngelis MM, Levinson DM, Kruglyak L, Goodman N, Copelalang NG, Jenkins NA, Kawkins TL, Stein L, Page DC, and Lander ES. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome *Nature(London)* 380: 149-152
13. Hartman, G. L., J. B. Sinclair, and J. C. Rupe. 1999. Compendium of soybean diseases. 4th edition, APS press.
14. Hepperly PR, and Sinclair JB. 1980. Detached pods for studies of *Phomopsis sojae* pod and seed colonization. *J. Agri. Univ. PuertoRico.* 64: 330-337
15. Hepperly, P. R., and J. B. Sinclair. 1978. Quality losses in phomopsis -infectd soybean seeds. *Phytopathology.* 68 1684-1687
16. Hobbs, T. W., A. F. Schmitthenner, and G. A. Kuter. 1985. A new phomopsis species from soybean. *Mycologia.* 77 : 535-544
17. Hong EH, Kim SD, Ko MH, Ryu YH., Lee YH, Lee SY, and Kim HS, 1994. Research on the Exportable vegetable soybean Production and Marketing system. 3rd Report Published by Crop Experiment Station, Suwon, Korea.
18. Innis MA and Gelfand. 1990. Optimizat on of PCR In: PCR protocols a guide to methods and application. Academic Press. pp. 3-20
19. Jackson, E. W., P. Fenn and P. Chen. 2005. Inheritance of resistance to phomopsis seed decay in soybean PI 80837 and MO/PSD-0259 (PI 562694). *Crop Sci.*, 45(6): 2400 - 2404.
20. Jeffers DL and Schmitthenner AF. 1981. Germination and disease in soybean seed as affected by rotation, planting time, K fertilization and tillage. *Agronomy Abstact.* 73: 119
21. Jeffers DL, Schmitthenner AF, and Kroetz ME. 1982. Potassium fertilization

- effects on *Phomopsis* seed infection, seed quality and yield of soybeans. *Agron. J.* 74: 886-890
22. Jones N, Ougham H, Thomas H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New phytol.* 137: 165-177
 23. Kang BC, Yu JW, Lee MH, and Kim BD. 1996. Applicability of AFLP in hot pepper genetic analysis. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38(6): 698-703
 24. Keim P, Schupp JM, Travis SE, Clayton K, Zhu T, Shi L, Ferreira A, and Webb DM. 1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci.* 37: 539-543.
 25. Kim HS, Lee SH, and Lee YH. 2000. A genetic linkage map of soybean with RFLP, RAPD, SSR and morphological markers. *Korean J. Crop Sci.* 45(2): 123-127.
 26. Kmetz KT, Schmitthenner AF, and Ellett CW. 1978. Soybean seed decay: Prevalence of infection and symptom expression caused by *Phomopsis* sp. *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and *Diaporthe phaseolorum* var. *caluivora*. *Phytopathology* 69: 798-801
 27. Kulik MM. 1984. Symptomless infection, persistence and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae* *Phomopsis phaseoli* and *Phomopsis sojae* and the taxonomic implications. *Mycologia.* 76: 274-291.
 28. Kulik MM and Schoen JF. 1981. Effect of seedborne *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* on germination, emergence, and vigor of soybean seedlings. *Phytopathology*, 71(5): 544-547
 29. Kwon SJ, Ahn SN, Choi HC, and Moon HP. 1999. Evaluation of genetic relationship and fingerprinting of rice varieties using microsatellite and RAPD markers. *Koreana J. Crop Sci.* 44(2): 112-116
 30. Lee CS, Park EW, Hong EH, and Kim SD. 1992. Effects of early maturing soybean cultivars and planting dates on the development of pod and stem blight caused by *phomopsis spp.* *Korea J. Plant Pathol.* 8(1): 47-56
 31. Lee GB and Kim HS. 1995. Review of factors affection the severity of pod and stem blight in soybean and it's controls. *Korean J. Soybean* 12(2): 1-15

32. Lee SH. 2000. Development and Utilization of DNA Markers. Korean. J. Crop Sci. 45(1): 16-20
33. Lehman SG. 1922 Pod and stem blight of soybean. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society. 38: 13
34. Marshall E. 1999. Drug firms to create public database of genetic mutations. Science 284: 406-407
35. Maughan PJ, Maroof MA, Saghai BGR, and Huestis GM. 1995. Amplified fragment length polymorphism(AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet. 93: 392-401.
36. McCouch SR, Panaud O, Chen X, and Xu Y. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism in rice (*Oryza sativa* L.). In: Rice Genetics III. pp. 549-559
37. Nam SH, Yu JW, Kang BC, and Kim BD. 1997. Selection of parental lines for hot pepper mapping population using RFLP and AFLP analyses. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(6): 693-697.
38. Oh JH and Kim DY. 2001. Effect of cultural practices on the occurrence of and stem blight and purple blotch, and on soybean growth. Res. Plant Dis. 7(2): 107-111.
39. Park EW, Lee CS, and Hong EH. 1992. Forecasting phomopsis seed decay by the soybean pod infection Test. Korean J. Plant Pathol. 8(2): 96-100
40. Pascal II EH and Elliss MA. 1978. Variation in seed quality characteristics of tropically grown soybean. Crop sci. 18: 837-840
41. Richards L, Macaulay M, Ivanissevich S, Maclean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuvevsson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, and Waugh R. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics 156: 1997-2005
42. Richards R and Sutherland GR. 1994. Simple repeat DNA is not replicated simply. Nat. Genet. 6: 114-116
43. Ridout JA and Donini P. 1999. Use of AFLP in cereals research. Trends in Plant Sci. 4(2): 76-79
44. Shoemaker RC, Guffy R D, Lorenzen LL, and Specht JE. 1992. Molecular

- genetic mapping of soybean: map utilization. *Crop Sci.* 32: 1091-1098.
45. Sinclair JB. 1993. *Phomopsis* seed decay of soybeans-A prototype for studying seed disease. *Plant disease* 77(4): 329-334
 46. Sinclair JB. 1992. Discoloration of soybean seeds. *Plant disease.* 76(11): 1087-1091
 47. Sinclair JB and Backman PA. 1989. *Compendium of soybean diseases.* 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
 48. Sinclair JB. 1976. Seed-borne bacteria and fungi in soybeans and their control. p. 470-478. In L. D Hill(ed) J. The Interstate Printers and Publishers, Inc., Danville, Illinois.
 49. Snyder HE and Kwon TW. 1987. *Soybean utilization.* van Nostr and Reinhold co., New York.
 50. Spilker DA, Schmittener AF, and Ellett CW. 1981. Effect of humidity, temperature, fertility, and cultivar on the reduction of soybean seed quality by *Phomopsis* spp. *Phytopathology.* 71:1027-1029
 51. Tanksley SD. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205-233
 52. Tekrony, DM, Egli DB, Strckey RE, and Loeffler TL. 1985. Effect of benomyl applications on soybean seedborne fungi, seed germination, and yield. *Plant Disease.* 69 : 763-765.
 53. Tekrony DM, Egli DB, Balles J, Tomes L, and Stuckey RE. 1984. Effect of data harvest maturity on soybean seed quality and *Phomopsis* sp. seed infection. *Crop science* 24: 189-193
 54. Tekrony DM, Egli DB, Stuckey RE, and Balles J. 1983. Relationship between pod and stem blight seed infection and environmental conditions. *Phytopathology.* 73: 914-918
 55. Wrather, J. A., A. Sleper, W. E. Stevans and J. G. Shannon. 2003. Planting date and cultivar effects on soybean yield, seed quality, and *Phomopsis* sp. seed infection. *Plant Disease.* 87(5) : 529-532.
 56. Thomison PR. 1983. *Phomopsis* seed infection and seed quality in soybeans as influenced by soil moisture, fruit load out nutrient accumulation. Ph. D. Dissertation. Ohio State Univ. Columbus.

57. Tragoonrung S, Kanazzin V, Hayes PM, and Blake TK. 1992. Sequence target site facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor Appl. Genet* 84: 1002-1008
58. Wallen VR and Seaman WL. 1963. Seed infection of soybean by *Diaporthe phaseolorum* and its influence on host development. *Can J. Bot.* 41: 13-21
59. Walters HA. 1980. Fungicides for control of foliar, pod and stem diseases of soybean. Report series 250. Agricultural Experiment Station, University of Arkansas. Fayetteville.
60. Wang DG et al. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphism in the human genome. *Science* 280: 1077-1082
61. Wilcox JR, Abney TS, and Frankenverger EM. 1985. Relationship between seed-borne soybean fungi and altered photoperiod. *Pytopathology* 75(7): 797-800
62. Wilcox JR, Laviolette FA, and Athow KL. 1974. Deterioration of soybean seed quality associated with delayed harvest. *Plant disease.* 58: 130-133
63. Williams JHK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535
64. Wu KS and Tanksley SD 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235
65. Zhang AW, Hartman GL, Riccioni L, Chen W D, Ma RZ, and Pedersen W L. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease* 8(10): 1143-1149.
66. Zhang AW, Riccioni, L, Pedersen WL, Kollipara KP, and Hartman GL. 1988. Molecular identification and phylogenetic grouping of *diaporthe phaseolorum* and *phomopsis longicolla* isolates from soybean. *American Phytophthological Society.* 88(12): 1306-1314.
67. Zimmerman MS and Minor HC. 1993 Inheritance of phomopsis seed decay resistance in soybean PI 417479. *Crop sci,* 32: 96-100
68. Zorrilla, G, Knapp AD and McGee DC. 1994. Severity of phomopsis seed decay, seed quality evaluation, and field performance of soybean. *Crop Sci.* 34: 172-177

69. 김홍식, 이홍식, 박은우, 홍은희, 김석동. 1996. 한국 고냉지와 일본에서 채종된 풋콩종자의 생육, 병해 및 수량비교. 한작지. 41(3) : 257-261
70. 김홍식, 홍은희, 김석동, 유용환. 1996. 재배지역 및 파종기가 풋콩종실의 발병정도 및 발아율에 미치는 영향. 한작지. 41(2) L: 178-182
71. 노재환, 김윤희, 김홍식, 김명기, 이길복, 김석동. 풋콩의 생육시기별 베노밀 처리가 미이라 감염율 및 수량에 미치는 영향. 42(3) : 299-303
72. 농림부. 2004. 농림업주요통계
73. 농촌진흥청. 1993. 輸出有望品目生豆生産 및 流通 研究. 농업특정연구 제3차년도 완결보고서
74. 박은우, 이충식, 홍은희. 1992. 콩 꼬투리 감염조사를 이용한 미이라병균 (Phomopsis spp.)의 종자감염예측. 한국식물병리학회. 8(2): 96-100
75. 이길복, 김홍식. 1995. 미이라병의 요인과 그 방제법에 대한 고찰. 한국콩연구회지 12(2) : 1-15
76. 작물시험장. 1994. 수출 유망품목 생두 생산기술 및 유통조사 연구. II 풋콩 양질종자 생산기술체계 확립. 농림특정연구 개발사업 완결연구보고서. 58-76
77. 작물시험장. 2001. 콩 용도별 고품질 신품종 육성. 시험연구보고서(전작물편)
78. 작물시험장. 2002. 내재해 단기성 신품종 개발. 시험연구보고서(전작물편). 87-99
79. 작물시험장. 2003. 양질 다수성 장류콩 신품종 개발. 시험연구보고서(밭작물편). 18-98
80. 작물과학원. 2004. 콩 미이라병 저항성 계통 육성. 시험연구보고서(밭작물편). 592-594
81. 작물과학원. 2005. 콩 미이라병 저항성 계통 육성. 시험연구보고서(작물기능개발과). 280-282
82. 작물시험장. 2003. 콩 육성계통 특성검정 시험. 시험연구사업 연구계획서(밭작물편). 269-272
83. 주용하, 정길웅, 오정행, 윤성탁, 이동진. 1995. 여름형콩 유전자원의 종실 특성 및 미이라병 이병율. 한국콩연구회지. 65-73
84. 홍은희, 김석동, 김홍식, 윤홍태, 고문환, 유용환, 이영호, 최경진. 1993. 풋콩 조생양질 다수성 신품종 "화엄풋콩". 농업과학논문집. 37(2): 131-135