

고부가가치 콩 유용유전자 발굴 및 실용화  
Identification and application of economically and  
agronomically useful genes in soybean

콩 유전체 분석

Soybean genome analysis

콩 유용유전자 발굴과 기능 분석

Identification of useful genes from soybean

콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발

Development of function added crops using useful gene from soybean

서울대학교

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고부가가치 콩 유용유전자 발굴 및 실용화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 이 석 하

세부연구책임자 : 천 충 일

세부연구책임자 : 김 울 호

연 구 원 : 반 규 정

연 구 원 : 김 문 영

연 구 원 : 김 동 현

연 구 원 : 신 진 희

연 구 원 : 김 경 도

연 구 원 : 김 윤 경

연 구 원 : 신 윤 정

연 구 원 : 문 중 경

연 구 원 : 구 자 환

연 구 원 : 박 향 미

# 요 약 문

## I. 제 목

고부가가치 콩 유용유전자 발굴 및 실용화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 필요성

○ 주곡 작물에 있어서 전통적 육종방법인 교배육종법과 유전공학적 분자 육종 방법을 효율적으로 활용한 가능성이 향상된 신품종의 개발은 고부가가치 농산물의 생산 및 공급 측면에서 매우 중요하다.

○ 콩은 세계적인 작물로서, 밀, 벼, 옥수수에 이어 4번째로 많이 재배되고 있는 작물이며, 우리나라에서는 화곡류, 두류, 서류, 채소류, 과실류를 모두 포함하여 단위 작목으로는 벼에 이어 두 번째로 많이 재배되고 있는 중요한 작물이다. 따라서, 콩의 구조유전체 분석을 위한 국제 컨소시엄 참여로 향후 기대할 수 있는 기능유전체 분석 산물은 국내뿐만 아니라 세계적으로 경제, 산업적인 측면에서 파급효과는 지대하다.

○ 특히 콩의 원산지가 한반도와 만주일대로서, 국내 야생종 및 고유종에는 유용 유전자원이 상대적으로 풍부하므로 구조유전체 분석 이후 유용유전자 발굴 및 기능분석에는 콩 국제컨소시엄 참여한 다른 국가에 비하여 상대적으로 유리한 여건에 있다. 또한, 콩은 유전체정보가 잘 알려진 애기장대, 벼와는 달리 종실의 단백질 및 지질의 대량생산능력을 가지고 있으며, 토양 중 뿌리혹 세균(*Bradyrhizobium japonicum*)과의 공생작용으로 공중 질소를 고정하는 능력을 가지고 있어 20세기의 환경 친화형 작물로 각광을 받고 있어서, 콩 유전체 해석에 의한 개발 기술의 미래 지향성, 진보성, 유용성 등에 있어서 탁월할 것으로 판단된다.

○ 콩의 유용유전자 발굴은 유전체 실험기법이 개발됨에 따라 유전자에 대한 전체적 접근에 의한 연구가 용이해 졌고, 이전의 기술로 밝혀지지 않았던 새로운 유전자들이 분리되고 그 기능들이 연구되어 지고 있다. 유전자들의 대량 분리에 따라, 응용 가능성이 높은 유용 유전자들이 많이 발굴되고 있으며, 또한 염기서열 결정에 의한 유전체를 이해하여 유용유전자의 발굴이 가능하다.

○ 유용유전자들을 이용한 기능성 작물 제작 등의 가능성이 제기되고 있다. 최근에 개발된 예로, 비타민 A가 강화된 Golden Rice, 지방산 조성을 개량한 콩, 전분 함량이 증가된

감자 등을 들 수 있다. 현재로서는 이러한 작물들이 안전성을 점검하는 과정이나, 유전자 변형식품 등에 대한 규제 등의 문제점들을 갖고 있지만, 유용성 있는 item들을 개발하는 노력을 국가적인 차원에서 경주해야할 상황이라고 생각된다. 유용성 있는 유전자원을 개발 및 확보하는 것이 중요한 부분이고, 기능성이 풍부한 주요 작물들에서 그러한 유전자원을 발굴하는 것이 적절한 접근이다.

○ 콩의 기능성 물질은 저장단백질, 다당류, 트립신저해제, 아이소플라본을 포함한 페놀류 화합물 및 파이토에스테르 등이 있으며 이 중에서 아이소플라본은 항암효과, 골다공증, 항산화효과가 우수하다고 알려져 있다. 그러나 현재 아이소플라본 고함유 콩을 목적으로 육성된 품종은 없는 실정이므로 이들 형질이 강화된 신품종의 개발은 국산콩의 경쟁력을 제고시키는 한 방안이 될 수 있다.

○ 형질전환 기술을 이용한 유전공학적 분자 육종 방법은 우수한 품종의 유전형질을 그대로 유지하면서 유용 유전자를 직접 도입하는 것이 가능하여 콩 유용유전자의 발굴과 함께 신기능성 신품종 개발에 적극적으로 활용되어 향후 개발된 기술로, GMO에 대한 소비자의 긍정적인 반응을 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. 연구개발의 목적

콩 연관군 (LG) D2 지역의 Satt486에서 *Mdh*까지 약 5,000 kb 구간의 염기서열 결정하고자 한다. 이때, 약 50 여개의 BAC clones의 염기서열로 결정되며 1개 BAC clone 당 10X, 즉 양방향으로 약 800 여개의 subclone 염기서열 결정 및 어셈블리 과정을 거쳐 약 5,000 kb 구간의 염기서열을 결정하게 된다. 결정된 콩 염기서열 중에서 유용유전자 2~3종 발굴과 그 기능 분석을 하고자 하며, 콩 유용 유전자를 이용한 신기능성 형질 전환 콩 혹은 벼 계통 개발하게 된다. 또한, 현재 아이소플라본 함량이 높은 신평달콩 2호 수준 이상의 품종 육성중이며, 아이소플라본 고함유 non-GMO 장류콩 및 나물콩 2품종이 최종적으로 육성될 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 콩 BAC clones의 염기서열 결정

콩 BAC clone의 염기서열 결정 후 목표부위의 콩 국제 표준 수준의 콩연관군 D2 부위의 물리지도 완성하며, 염기서열 정보를 바탕으로 구조유전체 정보 분석과 유전자 주석 달기 및 해석한다. *rxp* 유전자 등과 같은 유용유전자 발굴 및 실용화에 기여하며, 콩 유전체 염기서열 자료 디베이스 구축한다.

### 2. 콩 유용 유전자 대량 발굴, 분리, 기능 조사 및 형질 전환

뿌리혹 발달과 xanthophyll cycle enzyme의 관련성을 조사하기 위해, RT-PCR과 real time PCR를 통해 xanthophyll cycle enzyme을 encode하는 유전자들의 발현 양상을 조사하였다. 앞에서 높은 발현을 보이는 BCH isoform을 RACE기법을 통해 분리하였으며, HPLC를 통해 BCH효소활성도를 검증하였다. 여러 BCH isoform들의 세포내 위치를 조사하여, 각각의 기능을 유추하였다. 뿌리혹 발달에서 BCH유전자의 역할 조사하기 위해 RNAi기법을 이용하여 BCH의 발현이 감소된 뿌리혹을 제작하여, 표현형을 관찰하였다. 한편 ACP기술을 통해 시기특이적으로 발현되는 26개의 유전자의 fragments를 분리하였고, 이에 대한 기능성 여부를 조사하였다. 이렇게 얻어진 여러 유전자들 중, 실용 가능성 유전자들의 full-length cDNA를 발굴하고 이 유전자들의 기능을 조사하여 유용성을 확인하였다.

### 3. 콩 유용 유전자 형질전환을 위한 기반 구축, 형질전환 작물의 기능평가 및 작물 개발

콩 유용유전자는  $\beta$ -carotene hydroxylase과 thioredoxin으로 Gate-way 방법으로 항시 발현 및 스트레스 유도 프로모터가 부착된 벡터에 콩 유용 유전자를 도입하여 형질전환 운반체 제작한다. 콩 유용유전자의 기능 평가 및 작물에 형질전환을 수행한다. 모델식물인 담배에 형질전환 후 항산화 능력 평가한 후 형질전환 작물은 벼와 콩, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 사용한다. 형질전환 확인은 basta 살포, Southern blot 등으로 하며, 항산화 정도로 형질전환 작물의 기능성을 평가하게 되며, RT-PCR, Northern blot 등으로 형질전환 유전자의 발현을 평가하게 될 것이다. 표준 조사 기준을 참조하여 농업적 형질을 평가하게 되며, 교배 모부분 이용하여 형질전환작물 계통의 실용화를 수행할 것이다.

### 4. 아이소플라본 고함유 계통의 품종 성능 평가 및 등록

고함유 아이소플라본 장류 및 나물콩 고세대 계통의 생산력검정 및 함량 분석한 뒤, 유망계통의 지역적응 시험 및 지역간 아이소플라본 함량분석을 수행하게 된다. 지역적응시험 및 지역, 년차간 안정적 유망계통 선발 뒤 국가등재품종등록을 하게 될 것이다.

## IV. 연구개발결과

### 1. 제1세부과제: 콩 유전체 분석

○ 3개의 SSR 마커를 토대로 선발된 6개의 BAC 클론중에서 3개의 클론에 대해 염기서열을 분석하여, 3개 중 2개의 BAC 클론은 align이 되어 전체 264,239 bp의 염기서열을 획득하였다. 확보된 염기서열 정보의 029F06와 024M16의 SP6에서의 BAC end 염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작, 4개의 BAC 클론이 선발되었고, 20010 과 89M01의 시퀀

싱을 실시하였다. 이 두 BAC의 염기서열이 기존의 29F06과 024M16의 염기서열과 100% 일치하지 않는 것을 알게 되었다. 그러나 콩의 유전체는 duplication에 의해서 비슷한 염기서열이 다른 곳에 존재하는 사실을 토대로 M077P21을 선발하고 염기서열을 얻어서 20O10과 89M01를 이용한 하나의 contig를 만들었다. 이 contig는 SNP genotyping에 의해서 LG A1에 존재하고 있음을 알게 되었고, 이는 D2와 A1간의 염기서열 유사성이 있음을 보여준다. 지금까지 미국에 의존했던 BAC선발을 자체적으로 수행할 수 있도록, BAC pooling system을 확립하였으며, 기존의 확보된 I024M16의 염기서열과 Satt372와 SNP 21191, SNP 22037, SNP 40963을 이용하여 5개의 BAC (41L11, 50G15, 86G06, 17L20, 18K23)을 선발하였다. 새로운 시퀀싱 장치인 GS FLX를 이용하여 염기서열을 분석한 18K23과 86G06에서 SNP 22037과 SNP 40963을 확인하였고, 각각을 annotation하였다. 추가로 선발한 4개의 BAC (17L20, 28C15, 65G21, 104A17)은 현재 GS FLX를 이용하여 염기서열 분석하였다. LG D2와 A1, 이 두 부분과 synteny를 나타내는 부분, 즉 orthologous pair를 콩과 모델 식물인 *Medicago truncatula*에서 찾았으며, 이는 Medicago contig962C로 나타났다. Medicago contig962C의 sequence를 이용하여 이전의 두 부분이 외에도 LG C1에 위치한 61M05가 또 다른 homeologous pair로 밝혀졌으며, 이는 콩과 작물들의 종 분화 이전에 공통적으로 겪은 whole genome duplication의 증거라 예상된다. 미국에서 발표한 콩의 염기서열을 분석한 결과 86G06과 17L20의 위치가 변동되었고, 기존의 65G21의 BES를 이용하여서 35J03과 81B18를 선발하여서 GS FLX를 이용하여 염기서열을 분석하고 각각 annotation하였다. D2의 Satt372와 Satt486사이의 염기서열은 미국에서 발표한 scaffold 25에서 약 700kbp정도이고 중간부분의 여러 개의 gap이 있다. BAC염기서열을 분석한 본 연구결과는 DNA research 15, 93~102(2008)에 게재되었다.

○ Lipoxygenase cDNA를 이용하여 6개의 BAC을 선발하였으며, GS FLX를 이용하여 시퀀싱하여 2개 BAC의 염기서열을 결정하였으며, 염기서열 분석을 통해서 리폭시게나아제 1, 2, 3의 염색체상의 위치를 확인하고 진화적으로 어떠한 관계에 있는지 분석했다. 또한 콩의 리폭시게나아제 1, 2, 3이 위치하는 염색체 부분과 synteny를 나타내는 Medicago 염색체 부분을 찾아 콩과 Medicago의 분화 및 분화 이후의 콩의 진화 과정 및 시기에 대해 분석했다. 콩과 메디카고에서 리폭시게나아제 유전자 ( $Lx$ )가 있는 염색체 부분을 분석한 결과 콩의 염기서열 변화 속도가 메디카고에 비하여 느린 것이 밝혀졌다. 그리고 콩과 메디카고의 종 분화가 이루어지기 이전에 공통조상에서 먼저 염색체배가 (polyploidy) 사건이 있었다. 콩은 종 분화 이후에 개별적인 염색체배가 사건이 더 일어났기 때문에 메디카고와 신테니를 보이는 부분이 두 군데씩 있었다. 콩과 메디카고에서 찾은 34개의  $Lx$ 유전자간의 유연관계 분석 결과 공통조상에서 2개의  $Lx$ 가 염색체배가 사건, 종 분화, 콩에서의 염색체배가 사건 및 Tandem duplication에 의하여 진화된 것으로 나타났다. 또한 콩의 리폭시게나아제 1, 2, 3이 위치하는 염색체 부분과 synteny를 나타내는 Medicago 염색체 부분을 찾아 콩과 Medicago의 분화 및 분화 이후의 콩의 진화 과정 및 시기에 대해 분석하여 BMC Plant Biology 학술지에 The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula* 라는 제목으로 게재되었다.

○ LG D2 (Chromosome 17)와 A1 (Chromosome 5), 이 두 부분과 synteny를 나타내는 부분, 즉 orthologous pair를 콩과 모델 식물인 *Medicago truncatula*에서 찾았으며, 콩의 4번, 6번 염색체에도 또 다른 homeologous pair로 밝혀졌으며, 이는 콩과 작물들의 종 분화 이전에 공통적으로 겪은 whole genome duplication의 증거라 예상된다. 대광/단백콩의 RIL을 이용하여 불마름병 저항성 유전자의 세부적인 맵핑을 수행하여 4가지의 후보 유전자를 선발하였으며, 추가적인 SSR마커를 선발중이며, VIGS를 이용하여 확증할 예정이다. 또한, 이미 시퀀싱을 마친 5개의 BAC에서 annotation을 한 후 각각의 유전자 정보를 유용유전자 발굴을 위하여 제 2 세부과제에 제공했다.

## 2. 제2세부과제: 콩 유용 유전자 발굴

○  $\beta$ -carotene hydroxylase(BCH)는  $\beta$ -carotene을  $\beta$ -cryptoxanthin으로 또 연속적 zeaxanthin으로 전환하는 역할을 한다. 이러한 carotenoids는 항산화제로 작용하여 photooxidation에 대해 방어해주는 것으로 알려져 있다. 선행 연구를 통해 뿌리혹이 발달함에 따라  $\beta$ -carotene hydroxylase의 유전자 발현이 증가함을 확인하였고 또한  $\beta$ -carotene hydroxylase에 의해 합성된 carotenoids의 전체 양이 뿌리혹이 발달함에 따라 확연하게 증가함이 관찰된 바 있다.  $\beta$ -carotene hydroxylase에 의해 합성된 zeaxanthin은 xanthophyll cycle에서 zeaxanthin epoxidase (ZEP)에 의해 violaxanthin으로 전환되며, 이렇게 합성된 violaxanthin은 violaxanthin de-epoxidase (VDE)에 의해 다시 zeaxanthin으로 바뀌게 된다. 뿌리혹 발달동안, BCH의 발현과는 달리, ZEP을 암호화하는 유전자의 발현량은 감소된다. 이를 통해, 광합성에 의해 형성되는 항산화제의 방어역할로만 알려져 있는 zeaxanthin이 뿌리혹 발달동안 증가될 것이라는 것을 예상할 수 있다. 최근 진행되고 있는 콩과식물의 genome sequence의 완성으로, 기존의 *GmBCH1*과 유사한 isoform을 찾을 수 있었으며, 이를 *GmBCH3*라 명명하였으며, *GmBCH3*의 발현도 뿌리혹의 발달에 따라 증가됨이 확인되었다. 따라서 뿌리혹 발달동안 xanthophyll cycle과 관련된 효소들의 발현패턴과 함께,  $\beta$ -carotene hydroxylase의 발현을 억제시킨 뿌리혹의 표현형 등을 통해, 뿌리혹 발달동안, BCH가 중요한 기능을 할 것임을 예측할 수 있다.

○ *GmLRK1*의 kinase assay를 통하여 유전자를 정의하였고 애기장대의 ortholog인 *atlrk-1* mutant에서 나타나는 여러 가지 표현형 관찰과 GENEVESTIGATOR database를 이용한 *AtLRK1*의 발현 양상을 통하여 *GmLRK1*의 기능을 유추하였다. 또한 두 유전자 간의 서열 alignment를 통하여 애기 장대에서만 나타나는 특이적 서열을 발견하여 추후 실험에 대한 가설도 제시해 주었다.

○ 항산화 합성 효소인 Thioredoxin의 결합단백질을 밝혀 이들의 상호작용이 갖는 생화학적 의미를 알아내고자 하여 *GmTRX*의 novel target protein을 찾아 interaction을 확인하고 이들의 상호작용이 콩의 nodulation에서 어떠한 역할을 할 것인지 밝히고자 하였다.

### 3. 제3세부과제: 콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발

#### 가. 형질전환에 의한 신기능성 작물 개발

콩 유용유전자 중 특히, 뿌리혹 감염시 콩 뿌리에서 발현되는 유전자  $\beta$ -carotene hydroxylase1 (*bCHI*, Antioxidant 합성효소)를 이용하여 형질전환백터를 작성하고 형질전환 담배 식물체를 이용하여 유전자의 기능을 확인하였다. 이 후 기능이 확인된 *bCHI* 유전자를 대상으로 주요 작물인 벼와 콩에 도입하여 형질전환 식물체를 작성하였으며, 이들 중 벼 형질전환 계통들을 대상으로 생물적 및 비생물적 스트레스에 대한 내성 증진기능이 있는지를 확인한 결과 염과 건조스트레스에 내성이 증진되면서 포장조건하에서 농업적 형질 또한 개선된 형질전환 벼 2계통 및 6파생계통을 선발하였다. 이들 계통들은 향후 고정계통으로 육성하여 중간모본으로 활용할 계획이다.

#### 나. 아이소플라본 고함유 장류콩 품종개발

항암, 항산화 기능이 있는 아이소플라본을 고함유한 장류콩 품종개발을 위하여 공시재료로 GC83006×신팔달콩2호 유래 F<sub>11</sub> RIL 유래 8계통을 이용하였으며, 생산력검정과 지역적응시험을 실시하고 품종으로의 개발 가능성을 평가하였다. 생산력검정 공시기준으로는 외관품질(대립; 20g/100립, 제색; 담갈~황색), 다수, 내도복, 고아이소플라본 함량(1,500 $\mu$ g/g)을 조사하였고, 지역적응시험 선발기준으로는 외관품질우수, 다수(250kg/10a), 고아이소플라본, 지역 및 연차간 안정성을 고려하였다.

#### 다. 아이소플라본 고함유 나물콩 품종개발

항암, 항산화 기능이 있는 아이소플라본을 고함유한 나물콩 품종개발을 위하여 공시재료로 소원콩/V94-5152, 소원콩/PI96983, 소원콩/L29 BC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> 여교배 집단 유래 8계통을 사용하였으며, 생산력검정 공시기준으로는 외관품질(소립; 14g/100립, 제색; 담갈), 다수, 내도복, 고아이소플라본 함량(1,500 $\mu$ g/g)을 분석하였고, 지역적응시험 선발기준으로는 외관품질우수, 다수(220kg/10a), 고아이소플라본, 지역 및 연차간 안정성을 평가하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

#### 가. 학술지 게재

Lee M-Y, Shin K-H, Kim Y-K, Suh J-Y, Gu Y-Y, Kim M-R, Hur Y-S, Son O, Kim J-S, Song E, Lee M-S, Nam KH, Hwang KH, Sung M-K, Kim H-J, Chun

J-Y, Park M, Ahn T-I, Hong CB, Lee S-H, Park HJ, Park J-S, Verma DPS, Cheon C-I (2005) Induction of thioredoxin is required for nodule development to reduce reactive oxygen species leaves in soybean roots. *Plant Physiology* 139: 1881-1889

Van K, Kim D, Cai CM, Kim MY, Shin JH, Graham MA, Shoemaker RC, Choi B-S, Yang T-J, Lee S-H (2008) Sequence level analysis of recently duplicated regions in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] genome. *DNA Research* 15: 93-102

Kim S, Kim S-J, Shin Y-J, Kang J-H, Kim M-R, Nam K-H, Lee M-S, Lee S-H, Kim Y-H, Hong S-K, Verma DP, Chun J-Y, Cheon C-I (2008) An atypical soybean leucine-rich repeat receptor-like kinase, *GmLRK1*, may be involved in the regulation of cell elongation. *Planta* 229: 811-821

Shin JH, Van K, Kim DH, Kim KD, Jang YE, Choi B-S, Kim MY, Lee S-H (2008) The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* 8: 133

Kim KH, Kim MY, Van K, Moon J-K, Kim DH, Lee S-H (2008) Marker-assisted foreground and background selection of near isogenic lines for bacterial leaf pustule resistant gene in soybean. *J Crop Sci Biotech* 11: 263-268

## 나. 특허 및 품종출원

- 국내특허 출원 (특허-2007-0119028), 대두의 산토피 대사에 필요한 제아산틴 에폭시다제 유전자, 천충일, 박종석, 김윤경

- 품종 출원 (출원 2009-86) 문중경 등. 2009. 작물명 : 콩, 품종명칭 : 신강콩, 대한민국 품종보호 출원번호 : 출원 2009-86, 출원일자 (2009/1/12) (출원인 : 국립식량과학원)

## 2. 성과활용 계획

콩 기능 유전체 연구 및 생물정보 연구를 위한 데이터 제공이 가능하며, 국내 유전 정보학 발전에 기여뿐만 아니라, 분자생물학, 기능 유전체학, 생물 정보학 간의 유기적인 협조 체제 구축에 이바지 할 것이다. 발현 유전자들 간 상보적 분석을 통하여 애기 장대의 유전정보와 비교 • 활용하고, 콩과 작물 특이 유전자에 대한 연구에도 활용될 것이다. 발굴된 유전자들을 형질전환 등을 통해 새로운 품종개발이나 실용화에 도움이 되며, 본 연구의 결과들이 생산성 높은 유용식물체 개발 또는 기능성이 강화된 콩을 개발하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 기능성이 향상된 신품종은 다양한 육종소재로 활용 가

능하며, 또한 기능성 식품으로 개발하여 고부가가치 농산물 생산에 활용될 수 있다. 투입된 기술은 새로운 형질의 작물개발에 적극 활용하게 될 것이다. 고함유 아이소플라본 콩계통은 품종 등록 후 농가에 보급하며 농가의 고소득에도 기여할 것이다.

# SUMMARY

## Identification and application of economically and agronomically useful genes in soybean

### 1. Soybean genome analysis

1) Sequence level analysis of recently duplicated regions in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]genome

A single recessive gene, *rxp*, on linkage group (LG) D2 controls bacterial leaf pustule resistance in soybean. We identified two homoeologous contigs (GmA and GmA') composed of five bacterial artificial chromosomes (BACs) during the selection of BAC clones around *Rxp* region. With the RIL population from the cross of Pureunkong and Jimpunkong 2, SNP and SSR marker genotyping was able to locate GmA' on LG A1. Based on information in the Soybean Breeders Toolbox and our results, parts of LG A1 and LG D2 share duplicated regions. Alignment and annotation revealed that many homoeologous regions contained kinases and proteins related to signal transduction pathway. Interestingly, inserted sequences from GmA and GmA' had homology with transposase and integrase. Estimation of evolutionary events revealed that speciation of soybean from *Medicago* and the recent divergence of two soybean homoeologous regions occurred at 60 and 12 million years ago, respectively. Distribution of synonymous substitution patterns,  $K_s$ , yielded a first secondary peak (mode  $K_s = 0.10$  to  $0.15$ ) followed by two smaller bulges were displayed between soybean homologous regions. Thus, diploidized paleopolyploidy of soybean genome was again supported by our study.

2) The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula*

Soybean lipoxygenases (*Lxs*) play important roles in plant resistance and in conferring the distinct bean flavor. *Lxs* comprise a multi-gene family that includes *GmLx1*, *GmLx2* and *GmLx3*, and many of these genes have been characterized. We were interested in investigating the relationship between the soybean lipoxygenase isozymes from an evolutionary perspective, since soybean has undergone two rounds of polyploidy. Here we report the tetrad genome structure of soybean *Lx* regions produced by ancient and recent polyploidy. Also, comparative genomics with *Medicago truncatula* was performed to estimate *Lxs* in the common ancestor of soybean and *Medicago*.

Two *Lx* regions in *Medicago truncatula* showing synteny with soybean were analyzed. Differential evolutionary rates between soybean and *Medicago* were observed and the median Ks values of Mt–Mt, Gm–Mt, and Gm–Gm paralogs were determined to be 0.75, 0.62, and 0.46, respectively. Thus, the comparison of Gm–Mt paralogs (Ks=0.62) and Gm–Mt orthologs (Ks=0.45) supports the ancient duplication of *Lx* regions in the common ancestor prior to the *Medicago–Glycine* split. After speciation, no *Lx* regions generated by another polyploidy were identified in *Medicago*. Instead tandem duplication of *Lx* genes was observed. On the other hand, a lineage–specific duplication occurred in soybean resulting in two pairs of *Lx* regions. Each pair of soybean regions was co–orthologous to one *Lx* region in *Medicago*. A total of 34 *Lx* genes (15 *MtLxs* and 19 *GmLxs*) were divided into two groups by phylogenetic analysis. Our study shows that the *Lx* gene family evolved from two distinct *Lx* genes in the most recent common ancestor.

This study analyzed two pairs of *Lx* regions generated by two rounds of polyploidy in soybean. Each pair of soybean homeologous regions is co–orthologous to one region of *Medicago*, demonstrating the quartet structure of the soybean genome. Differential evolutionary rates between soybean and *Medicago* were observed; thus optimized rates of Ks per year should be applied for accurate estimation of coalescence times to each case of comparison: soybean–soybean, soybean–*Medicago*, or *Medicago–Medicago*. In conclusion, the soybean *Lx* gene family expanded by ancient polyploidy prior to taxon divergence, followed by a soybean–specific duplication and tandem duplications, respectively.

### 3) Chromosomal rearrangement and conservation of bacterial disease resistance among homeologous loci in soybean

Bacterial leaf pustule (BLP), caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), is a prevalent bacterial disease of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] that has been reported in many soybean–growing regions of the world where high temperature and humidity prevail. Range and severity of the disease are expected to increase due to global warming and climate change. Soybean is an ancient tetraploid whose genome has gone through at least two rounds of polyploidy events. Many studies revealed the structure produced by a relatively recent polyploidy, but still few are reported regarding an ancient polyploidy due to high frequency of gene loss after duplication events. In our previous study, we reported two homeologous regions of *Rxp* locus produced by recent duplication and their paralogous region in *M. truncatula*. Here we report more comprehensive soybean genome structure anchored by *Rxp* genes and evolutionary history of *Rxp* regions from the most recent common ancestor legume through comparative genomics with *M. truncatula*. Our data show that the ancestral genome of soybean had experienced dynamic genome rearrangement

followed by recent polyploidy event. Moreover, multiple *Rxp* quantitative trait loci (QTLs) in different soybean LGs are actually comprised of homeologous regions produced by two rounds of polyploidy events.

## 2. Identification of useful genes from soybean

To investigate the relationship between nodule development and xanthophyll cycle enzymes, the expression level of genes encoding xanthophyll cycle enzymes was examined using RT-PCR and real time PCR. The full-length cDNA of the putative  $\beta$ -carotene hydroxylase, GmBCH2, showing increased expression in leaves, was then isolated using RACE technique. To check whether GmBCH1 and GmBCH2 actually have the enzymatic activity of  $\beta$ -carotene hydroxylase, HPLC analysis was performed. To ascertain the subcellular localization of both  $\beta$ -carotene hydroxylases of *Glycine max* in plants, GmBCH1 and GmBCH2 genes were fused to GFP reporter gene under the control of CaMV35S promoter, respectively and then the resulting plasmids were transfected into arabidopsis protoplasts. Development of transgenic nodules containing GmBCH RNAi constructs targeting both GmBCH1 and GmBCH2 was observed to investigate the role of GmBCH in nodule development.

$\beta$ -carotene hydroxylase catalyzes the formation of zeaxanthin from  $\beta$ -carotene. Carotenoids act as antioxidants in biological systems. Carotenoids are the most effective quenchers of the reactive oxygen species (ROS) found in nature. In addition, carotenoids can inhibit lipid peroxidation and thus stabilize membranes. The expression level of  $\beta$ -carotene hydroxylase was induced during nodulation in response to rhizobial inoculation, implying that antioxidants may be important for proper development of root nodules. The expression level of a gene encoding zeaxanthin epoxidase (ZEP), an enzyme that promotes the conversion of zeaxanthin to violaxanthin via antheraxanthin, was found to be decreased during nodulation. This indicates that zeaxanthin may play a certain role in nodulation. Recently, whole genome sequence of *Glycine max* has been identified. From the results of BLAST search with GmBCH1 cDNA sequence, sequences of another isoform, GmBCH3, with highest similarity could be found. Consistent with expression pattern of GmBCH1, expression level of GmBCH3 was also increased in mature nodules compared with root. To investigate the roles of zeaxanthin in nodulation, transgenic hairy roots containing construct for GmBCH RNAi were used. Nodulation of these transgenic hairy roots was poor compared to that of control. This result suggests that these genes may be associated with nodule development. Further study will find the mechanism related to zeaxanthin in nodule development.

We isolated 26 fragments of differentially expressed genes during soybean seed formation and examined their functions. Of the genes, the full-length cDNAs of the useful gene were isolated and studied further possible functions.

GmLRK1, identified to be a genuine kinase by phosphorylation assay, and its Arabidopsis ortholog At2g36570 may be essential for all the stages of soybean development, rather than in a specialized developmental procedure such as seed development. Together with the observations made from the mutant phenotypes for the Arabidopsis ortholog At2g36570, we propose that the function of GmLRK1 may be involved in the regulation of cell elongation/expansion. Thioredoxins (Trxs) are redox-active small proteins forming a disulfide bridge with targets. We identified the targets of Trx from soybean nodules and then examined the its interaction with them. Interaction between the two proteins suggest a putative function during nitrogen fixation, assimilation and nodule development.

### **3. Development of function added crops using useful gene from soybean**

#### 1) Development of value added crops by transformation using useful gene from soybean

We used a beta-carotene hydroxylase1 gene (*GmbCHI*) from *Glycine max* for developing of value added crop, and investigated novel *GmbCHI* function in relation to tolerance to abiotic and biotic stress. We constructed two transformation vectors under the control of constitutive (CaMV 35S promoter) and seed specific/inducible promoter (globulin promoter). We produced transgenic plants using colored rice (Heuknambyeo), rice (Ilmiby eo) and soybean (Iksannamulkong).

In abiotic stress assay, we found that homozygous T2 Heuknambyeo transgenic lines had novel functions of enhanced tolerance to salt and drought, whereas those of Ilmiby eo transgenic rice did not show any clear effect on abiotic stress. These results may implicate that abiotic functions of *GmbCHI* gene is likely to be associated with the pathway of anthocyanin synthesis and further study should be needed to verify the relationship between anthocyanin pathway and *GmbCHI* gene expression. When *GmbCHI* gene was expressed under the control of globulin promoter, transgenic rice plants showed a significant increase in biomass under salt and drought stress. In addition, agronomic trait of the transgenic rice in the filed condition showed that the number of panicles was increased while plant height and the length of panicle were similar to wild type plants. We selected two promising lines of transgenic *GmbCHI* colored rice, Heuknambyeo, they could provide a useful genetic resource for developing stress tolerant rice varieties.

#### 2) A new sprout-soybean cultivar "Shingang (Suwon 242)" with high isoflavone content

Isoflavone, an important nutraceutical molecule, has a potential function of

anti-cancer and anti-oxidant effects. To release sprout-soybean varieties enriched for isoflavone levels, four cultivars or breeding lines of soybeans were chosen to develop three segregating populations. These populations were field tested for yield across five locations in Korea from 2006 to 2008. "Shingang(Suwon 242)" was selected from crossing between Sowon/V94-5152, Sowon/PI96983, Sowon/L29 BC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> backcross population. This cultivar has a determinate growth trait with seed size (11.0 g/100 seeds). It has good seed quality for sprout soybean. The average yield of "Shingang" was 2.78 ton per hectare in the regional yield trials (RYT) for three years from 2006 to 2008. The isoflavone content of "Shingang" was 2,921 $\mu$ g/g in sprout seedling.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b>	19
Sec. 1. Necessary of research	
<b>Chapter 2. Situation of national and international technology development</b>	22
Sec. 1. Soybean genomics research	22
Sec. 2. Identification of useful genes	24
Sec. 3. Transformation and development of soybean varieties	24
<b>Chapter 3. Research contents and results</b>	26
Sec. 1. Soybean genome analysis	26
1. Soybean DNA sequencing around region of bacterial leaf pustule resistant gene	26
2. Bacterial leaf pustule resistant gene	42
3. Lipoxygenase gene analysis	51
Sec. 2. Identification of useful genes from soybean	66
1. Analysis of $\beta$ -carotene hydroxylase and other enzymes on plant metabolism	66
2. Isolation and functional analysis of useful genes	71
Sec. 3. Development of function added crops using useful gene from soybean	82
1. Theoretical and methodological strategy for obtaining research goal	82
2. The contents of the research	83
3 Results	84
A. Establishment of the platform technology for crop transformation using useful genes	84
B. Generation iteration and selection of homozygous lines of <i>GmbCHI</i> transgenic rice plants	87
C. Bioassay of abiotic stress tolerance for new value added transgenic crops	88
D. Bioassay of biotic stress resistance for new value added transgenic crops	95
E. Characteristic evaluation of soybean lines with high isoflavone content	100
<b>Chapter 4. Achievement and contribution to related areas</b>	109
<b>Chapter 5. Application plans of the study results</b>	110
Sec. 1. Potentiality of research project	110
Sec. 2. Further research plan	110
<b>Chapter 6. Internationally collected information related to research project</b>	112
Sec. 1. GS FLX (GS 20 sequencer, 454 sequencing)	112
Sec. 2. Soybean genetics and genomics	113

Sec. 3. Attendance and presentation on SOY2008. -----	114
Sec. 4. Attendance and presentation on Plant Biology 2005. -----	115
Sec. 5. Attendance on Plant & Animal Genome Conference and collection of information on world biotechnology research trends. -----	118
Sec. 6. Training course in molecular biological analysis of plant responses to environmental stress -----	120
<b>Chapter 7. References</b> -----	125

# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	19
제 1 절 연구개발의 필요성	19
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b>	22
제 1 절 콩유전체 연구	22
제 2 절 유용유전자 발굴연구	24
제 3 절 형질전환 및 품종개발연구	24
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b>	26
제 1 세부과제 : 콩 유전체 분석 (서울대 이석하)	26
1. 불마름병 저항성 유전자(rx <sub>p</sub> ) 염기서열 분석	26
2. 불마름병 저항성 유전자(rx <sub>p</sub> )	42
3. Lipoxygenase 염기서열분석	51
제 2 세부과제: 콩 유용 유전자 발굴 (숙명여대 천충일)	66
1. $\beta$ -carotene hydroxylase와 동일 대사경로상의 효소 연구	66
2. 실용가능성 유전자의 분리 및 기능 조사	71
제 3 세부과제: 콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발 (국립식량과학원 김윤희)	82
1. 이론적, 실험적 접근방법	82
2. 연구내용	83
3. 연구결과	84
가. 콩 유용 유전자 형질전환을 위한 기반 구축 및 작물 형질전환	84
나. 콩 유용유전자 bCH1 유전자 도입 형질전환 벼의 세대진전 및 고정계통 선발	87
다. 신기능성 형질전환 작물 개발을 위한 내재해성 기능 평가	88
라. 콩 유용유전자 도입 신기능성 형질전환 작물 개발을 위한 내병성 기능 평가	95
마. 아이소플라본 고함유 콩 계통의 특성 평가 및 품종 출원	100
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	109
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b>	110
제 1 절 연구개발 성과	110
제 2 절 성과활용 계획	110
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	112

제 1 절 GS FLX (GS 20 sequencer, 454 sequencing) -----	112
제 2 절 콩 유전학 및 유전체학 -----	113
제 3 절 SOY2008 학회 참석 및 발표 -----	114
제 4 절 Plant Biology 2005 학회 참석 및 발표 -----	115
제 5 절 Plant & Animal Genome Conference 참석 및 세계 생명 공학연구 동향 정보 수집 -----	118
제 6 절 환경스트레스에 대한 식물반응의 분자생물학적 해석 방법 연수 -----	120
제 7 장   참고문헌 -----	125

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

○ 주곡 작물에 있어서 전통적 육종방법인 교배육종법과 유전공학적 분자 육종 방법을 효율적으로 활용한 가능성이 향상된 신품종의 개발은 고부가가치 농산물의 생산 및 공급 측면에서 매우 중요하다.

○ 특히 콩의 원산지가 한반도와 만주일대로서, 국내 야생종 및 고유종에는 유용 유전자원이 상대적으로 풍부하므로 구조유전체 분석 이후 유용유전자 발굴 및 기능분석에는 콩 국제컨소시엄 참여한 다른 국가에 비하여 상대적으로 유리한 여건에 있다. 또한, 콩은 유전체정보가 잘 알려진 애기장대, 벼와는 달리 종실의 단백질 및 지질의 대량생산능력을 가지고 있으며, 토양 중 뿌리혹 세균(*Bradyrhizobium japonicum*)과의 공생작용으로 공중 질소를 고정하는 능력을 가지고 있어 20세기의 환경 친화형 작물로 각광을 받고 있어서, 콩 유전체 해석에 의한 개발 기술의 미래 지향성, 진보성, 유용성 등에 있어서 탁월할 것으로 판단된다.

○ 콩의 유용유전자 발굴은 유전체 실험기법이 개발됨에 따라 유전자에 대한 전체적 접근에 의한 연구가 용이해 졌고, 이전의 기술로 밝혀지지 않았던 새로운 유전자들이 분리되고 그 기능들이 연구되어 지고 있다. 유전자들의 대량 분리에 따라, 응용 가능성이 높은 유용 유전자들이 많이 발굴되고 있으며, 또한 염기서열 결정에 의한 유전체를 이해하여 유용유전자의 발굴이 가능하다.

○ 콩의 유전체 크기는 1,115 Mb로 벼 유전체(430Mb)의 2.6배에 해당하므로 단일 국가에서 전체 염기서열을 결정하기는 어렵기 때문에, 2003년과 2004년에 미국 샌디에이고에서 열린 Plant and Animal Genome Conference에서 2차에 걸쳐 미국, 호주, 한국, 중국, 일본 등 세계적인 과학자들이 모여 콩 유전체의 염기서열 분석에 관한 국제 컨소시엄 결성에 대한 구체적인 논의가 진행되었으며, 한국 측에서는 콩 연관군(LG) D2의 일부분 유전체 분석 참여를 협의하였음..

○ 본 연구과제에서 염기서열 분석이 될 콩 유전체에는 콩 불마름병 저항성 유전자(*rxp*) (Van et al., 2004; Navel et al., 2001) 부위의 유전체 분석은 우리나라 콩 연구에서 중요하다. 콩 불마름병은 우리나라에서 7~8월부터 수확기까지 발생하는데, 근래에는 불마름병 발생지역이 전국적으로 확산되고 있는 실정이다. 1997~1998의 2년에 걸쳐 전국적으로 조사한 바에 의하면 콩 재배지 106개소 가운데, 약 90%인 94개소가 불마름병에 감염되었으며, 특히 심한 발생을 보인 수원, 화성, 춘천, 청원에서는 재식개체수의 61~78%가 감

염된 것으로 알려져 있어, 현재 우리나라의 콩 불마름병에 의한 수량감소는 심각하다 (Lee, 1999).

○ 현재 US Soybean Sequencing Consortium에서는 gene rich 계놈의 유전체 분석을 위한 methylation sequencing 등과 BAC sequencing 등 여러 가지의 방법으로 염기서열 분석을 계획하고 있으나, 한국 측이 BAC sequencing에 참여하여 국제사회에서 콩 염기서열 결정을 선도적으로 주도할수 있다. 서울대학교 농업생명과학대 농업과학공동기기센터 (NICEM)의 참여로 본 연구과제의 성공적인 수행이 가능할 것으로 판단된다.

○ 유용유전자들을 이용한 기능성 작물 제작 등의 가능성이 제기되고 있다. 최근에 개발된 예로, 비타민 A가 강화된 Golden Rice (Ye et al., 2000; Potrykus, 2001), 지방산 조성을 개량한 콩, 전분 함량이 증가된 감자 등을 들 수 있다. 현재로서는 이러한 작물들이 안전성을 점검하는 과정이나, 유전자 변형식품 등에 대한 규제 등의 문제점들을 갖고 있지만, 유용성 있는 item들을 개발하는 노력을 국가적인 차원에서 경주해야할 상황이라고 생각된다. 유용성 있는 유전자원을 개발 및 확보하는 것이 중요한 부분이고, 기능이 풍부한 주요 작물들에서 그러한 유전자원을 발굴하는 것이 적절한 접근이다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

○ 콩은 세계적인 작물로서, 밀, 벼, 옥수수에 이어 4번째로 많이 재배되고 있는 작물이며, 우리나라에서는 화곡류, 두류, 서류, 채소류, 과실류를 모두 포함하여 단위 작목으로는 벼에 이어 두 번째로 많이 재배되고 있는 중요한 작물이다. 따라서, 콩의 구조유전체 분석을 위한 국제 컨소시엄 참여로 향후 기대할 수 있는 기능유전체 분석 산물은 국내뿐만 아니라 세계적으로 경제, 산업적인 측면에서 파급효과는 지대하다.

○ 콩의 기능성 물질은 저장단백질, 다당류, 트립신저해제, 아이소플라본을 포함한 페놀류 화합물 및 파이토에스테르 등이 있으며 이중에서 아이소플라본은 항암효과, 골다공증, 항산화효과가 우수하다고 알려져 있다. 그러나 현재 아이소플라본 고함유 콩을 목적으로 육성된 품종은 없는 실정이므로 이들 형질이 강화된 신품종의 개발은 국산콩의 경쟁력을 제고시키는 한 방안이 될 수 있다.

## 3. 사회 · 문화적 측면

○ 지금까지의 유전체정보 연구는 대량 염기서열 결정이 필수적이기 때문에, 국제 컨소시엄을 통해 공동으로 이루어지고 있다. 특히 미국 측이 콩의 염기서열 결정을 시작하려고 하는 2005년 말보다 한 단계 먼저 시작함으로써 이 분야의 연구에서 주도적인 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 콩 물리지도 완성을 위한 NSF 연구비의 지원에 따라서, 2004년 1월 미국 샌디에이고

에서 미국, 캐나다, 한국, 중국, 일본, 멕시코, 호주, 브라질 등 다수의 과학자가 모여서 국제 컨소시엄 결성을 논의하였으며, 2005년 미국 NSF에 연구비 지원 신청을 논의하였으며, 미국 NSF측에서는 콩의 염기서열 결정을 이제 착수할 수 있는 만큼의 단계에 이르렀다는 긍정적인 인식을 모두 가지고 있음을 확인하여 국제 컨소시엄의 연구 활동이 시작되고 있다.

○ 형질전환 기술을 이용한 유전공학적 분자 육종 방법은 우수한 품종의 유전형질을 그대로 유지하면서 유용 유전자를 직접 도입하는 것이 가능하여 콩 유용유전자의 발굴과 함께 신기능성 신품종 개발에 적극적으로 활용되어 향후 개발된 기술로, GMO에 대한 소비자의 긍정적인 반응을 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 콩 유전체 연구

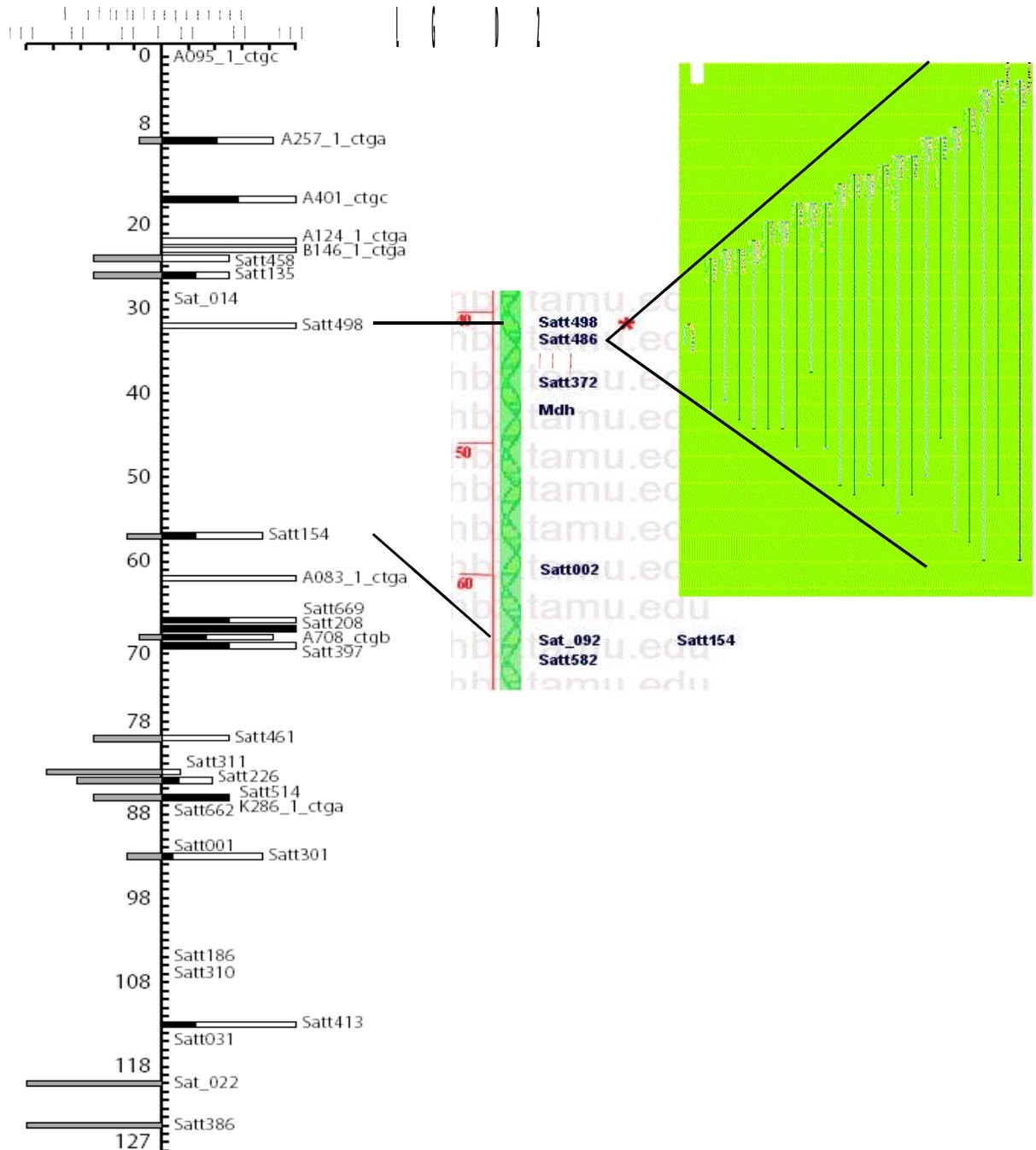
○ 1970년대 중반 이후에 유전체의 염기서열 결정 방법이 개발된 이후, 1995년에는 세균인 *Haemophilus influenzae*를 시작으로 30 여종의 생물체에 대한 유전체 염기서열이 분석 완료되었다. 이들 염기서열 분석에서 주로 이용되고 있는 방법은 무작위 혹은 샷건(shotgun) 염기결정 방법이다. 이 방법은 실험 및 컴퓨터에 의한 해석절차가 단순하여 대량 염기서열을 결정하는 전 게놈 염기서열 결정에 널리 사용되었다. DNA 결합 편집기에 의하여 다수의 무작위 클론의 염기서열 자료를 상동성을 이용하여 서로 연결한다.

○ 미국 USDA에서 제작된 콩 BAC library는 약 40,000개의 clones으로 구성되어 있으며 최소한 콩 게놈의 5배를 포함하고 있다. 무작위로 추출한 약 224개의 clones에 대하여 조사한 결과 평균 삽입단편의 크기가 150kb이었으며, 하나의 유전자를 찾을 확률이 98%이었다 (Marek and Shoemaker, 1997).

○ 콩의 물리지도(품종 Forrest)는 완성 단계에 있으며 (<http://soybeangenome.siu.edu/>, [http://hbz7.tamu.edu/homelinks/phymap/soybean/soytool\\_4.htm](http://hbz7.tamu.edu/homelinks/phymap/soybean/soytool_4.htm)), 일부 불완전한 부위에 대하여는 USDA의 지원으로 아이오와 대학의 Randy Shoemaker, USDA의 Perry Cregan, 조지아 대학의 Roger Boerma 등이 SNP 마커를 이용한 물리지도 작성이 진행중으로 마무리 단계에 있다. 또한, 미국 NSF와 United Soybean Board (USB)의 연구비 지원으로 미쥬리대학의 Gary Stacey와 USDA의 Perry Cregan이 26,000개의 BAC end sequencing을 수행하고 있다.

○ 본 연구진이 목표하고 있는 콩 LG D2는 현재 88개의 DNA 마커로 약 133cM에 걸쳐 유전자 지도가 완성되었다 (Cregan, 2003; personal communication). 총 88개의 DNA 마커 가운데 22개의 마커에 대해서는 이미 발현 유전자 부위인지 아니면 반복 염기서열인지에 대한 정보가 알려져 있으며, 지금도 BAC clones간에 contig map이 계속하여 만들어지고 있고 그 정보가 실시간으로 웹상에 공개되고 있다. 본 연구진이 설정한 목표 부위에 있는 Satt498은 2004년 5월, Satt486은 2004년 6월에 각각 마커에 대한 contig map 정보가 업데이트되었다. 따라서 본 연구진이 시작 초기점으로 설정한 Satt486에 대한 contig map은 이미 확보한 상태이다 (그림 참조).

- 국내·외 연구기관의 계량화된 수치비교



기술 분야	국내 기술 수준	
	미국 대비 (%)	일본 대비
○ 작물 유전체 구조 분석		
- 작물 유전체 분석	30	30
- 콩 유전체 분석	10	30
- 생물 정보 해석	10	15
○ 국내		
- 유전자 분리	40	50
- 유전자 기능 검정/확인	30	40

\* 생명공학 연구소 (1999); 새천년 한국 농업과학의 방향 (2000)에서 계량화 하였으나, 콩 유전체 분석은 타 분야에 비교하여 상대적으로 추정함.

○ 1999년, 2000년에 예측된 작물 유전체 구조 및 기능 분석 기술은 선진국 대비 30% 정도인 것으로 판단되고 있으나, 국내에서 벼 염기서열 결정 국제컨소시엄 참여로 인해 국내 연구진의 작물 유전체 분석 기술이 많이 향상되어 현재는 선진국 대비 50%정도의 수준일 것으로 추정됨.

## 제 2 절 유용유전자 발굴 연구

○ 본 연구팀의 경우에도, 콩과식물과 박테리아간의 상호관계에 작용하는 유전자들을 찾기 위해, false positives가 없는 효율적인 방법 (Annealing-controlled primer에 의한 기술)을 이용하여 유전자들을 분리하여 왔고, 그 중에서 항산화단백질들 (Thioredoxin,  $\beta$ -carotene hydroxylase)에 대한 연구를 진행시켜 왔다.  $\beta$ -carotene hydroxylase의 경우, 식물체에서 과잉발현하였을 때 애기장대에서 stress tolerance가 관찰되었고(Davison et al., 2002), 담배에서는 UV tolerance가 강화되었고, 토마토에서도 대사산물이 증가된 것이 보고되었다 (Dharmapuri et al., 2002).

○ 형질전환 기술은 작물에 유용 유전자를 도입하기 위한 가장 기본적인 기술로써 그 효율을 높이기 위한 많은 연구가 국내·외 여러 연구자에 의해 진행되고 있으나 콩을 비롯한 일부 작물의 형질전환은 아직 세계적으로 몇몇 실험실에서만 성공적으로 행해지고 있다. 본 연구진들은 2004년도에 고효율 벼 형질전환 시스템과 재현성 있는 콩 형질전환 방법을 개발하였으며 이러한 형질전환 기술을 바탕으로 대량의 신기능성 형질전환 식물체를 신속하게 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

○ Xanthophyll 계열의 화합물은 항산화성질이 강하고 화학적 안정성이 높아 활용가치가 매우 높으나 인위적 합성이 어려워 최근에는 유전공학적 대사공학방법으로 식물체 내에 발현시키고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다.

## 제 3 절 형질전환 및 품종개발 연구

○  $\beta$ -carotene hydroxylase 유전자는 Xanthophyll 계열의 Antioxidant 화합물을 합성하는 효소로서 이 유전자를 식물에 형질전환하여 항산화기능이 강화된 토마토와 UV 스트레스에 저항성을 보이는 담배식물체를 개발한 예가 있다 (Dharmapuri et al, FEBS Letters 519: 30-34, Gotz et al, PMB 50: 129-142).

○ 아이소플라본은 genistein, diadzein, glycitein의 3가지 아글리콘이 주요 구성성분이며, 이중 daidzein과 genistein의 생리적 효과가 큰 것으로 알려져 있다. 또한, 품종간 변이폭이 크고 재배환경에 따른 함량변이폭도 크나, 품종별 상대적 함량 순위는 유지하는 유전

력이 비교적 큰 형질이다. 이러한 형질의 선발을 위해서 작물과학원에서는 Quantitative trait loci (QTL)을 측정하기 위하여 분자표지를 이용한 육종프로그램을 구축한 바 있어 이들을 이용하여 간접선발의 도구로 사용하고 있으며, 본 연구진들은 아이소플라본 함량이 높은 품종이 모본으로 사용된 재조합 근동질 계통 및 여교배집단군을 보유하고 있다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 세부과제 : 콩 유전체 분석 (서울대 이석하)

##### 1. 불마름병 저항성 유전자(*rxp*) 염기서열 분석

###### 가. *rxp* 주변 마커들을 이용한 BAC 선발

본 연구진이 설정한 목표 부위에 있는 DNA 마커들은 Satt498와 Satt486이며, Satt498에 의해서 I029F06 BAC클론을 선발하였고, Satt486에 의해서는 I024M16을 선발하였다. I029F06와 I024M16 BAC 말단염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머로 Iowa State Univ.-USDA BAC library를 스크린한 결과 I20010 (120 kb), I089M01 (175 kb), I104A17 (175 kb)이 선발되었으며, Univ. of Missouri BAC library에서는 M071B12 (150 kb)가 선발되었다. FPC를 수행한 결과, I20010는 I029F06와 7개의 밴드만이 겹치고, M071B12는 I029F06와 99개의 밴드 중 47개 밴드가 동일한 것으로 나타났다. 또한, I089M01는 I024M16가 25 밴드 중 8개만이 일치하며, I104A17는 22개중 20개가 일치하는 것으로 나타났다. 그리하여, 제작된 프라이머로 I020010과 I089M01을 선발하였고, 두 개의 BAC의 말단 염기서열을 이용하여 다시 프라이머를 제작하여 BAC pooling을 실시하여 공통적으로 존재하는 M077P21 을 선정하였다 (Fig. 1).

###### LG D2

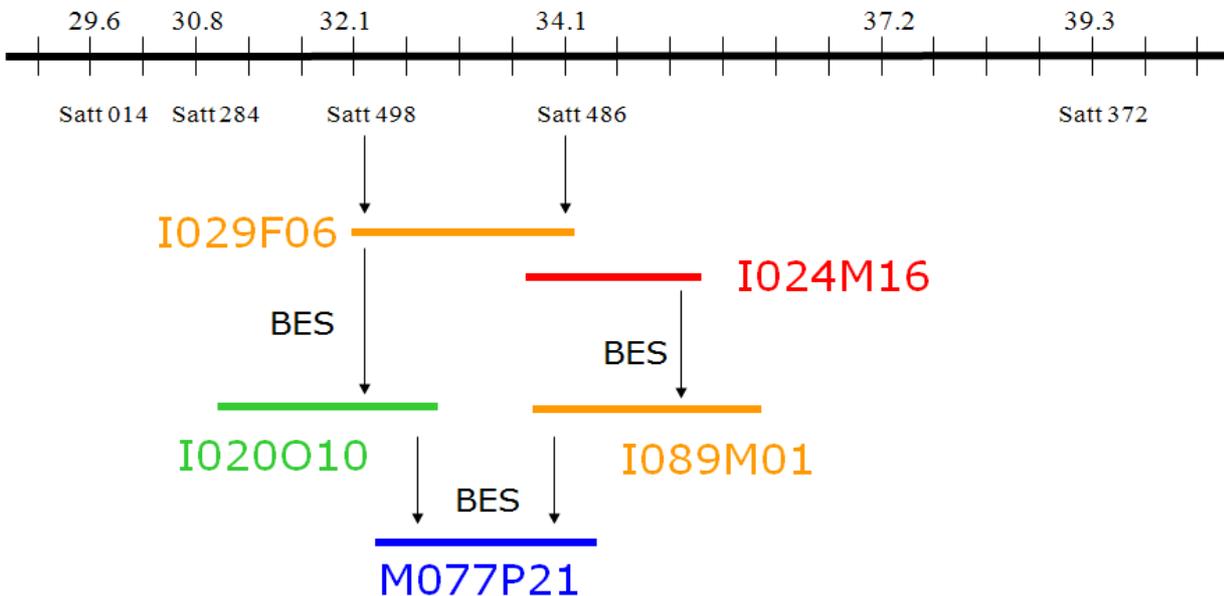


Figure 1. BAC 말단염기서열을 이용한 BAC 선발

결정된 BAC의 염기서열을 비교하여 보니, I029F06과 I024M16은 염기서열이 연결되어 하나의 contig1 (I029F06, I024M16)로 연결이 되었고, I020010과 M077P21과 I089M01이 다른 contig2 (I020010, M077P21, I089M01)로 연결이 되었다. 이 두 개의 contig는 약 90% 정도의 염기서열 유사성을 보였으며, 같은 부분으로 예상했지만, 염기서열이 비슷한 다른 부분일 것이라고 예상

하게 되었다. 염기서열을 아미노산 서열로 번역하고, 이 아미노산 서열을 이용하여 FgeneSH (<http://www.softberry.com>)에서 유전자예측을 수행하였고 이 유전자의 아미노산서열을 이용하여 EBI(<http://www.ebi.ac.uk/uniref/>)의 Uniprot에서 주석달기를 수행하였다 (Tables 1 & 2). contig1 (I029F06, I024M16)에서는 총 54개의 유전자가 예측되었으나, 순차적으로 같은 유전자의 결과를 보인 것은 같은 유전자의 다른 엑손부분일 가능성이 있으므로 약 50개의 유전자가 있을 것으로 추정할 수 있다.

Table 1. Contig1 (I029F06, I024M16) 유전자 주석달기

Query ID	Identity	BLAST Results
contig1_1	58.85	Putative receptor-like protein kinase INRPK1 [Oryza sativa]
contig1_3	62.02	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_4	42.13	ETEA-like protein [Brachypodium sylvaticum (False brome)]
contig1_7	66.43	SEC14 cytosolic factor-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig1_10	52.07	IMP dehydrogenase/GMP reductase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_11	44.72	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_13	66.67	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin; Integrase [Medicago truncatula]
contig1_14	66.49	Integrase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_15	62.96	Integrase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_16	37.06	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_17	58.51	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_18	52.83	Hypothetical protein P0685E10.6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig1_19	72.73	ATP-binding region, ATPase-like [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_21	54.99	ATP-binding region, ATPase-like [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_23	49.64	ATP-binding region, ATPase-like [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_27	46.75	Receptor-like serine/threonine kinase [Arabidopsis thaliana]
contig1_29	74.38	Hypothetical protein At5g63000 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_30	67.96	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5 [Arabidopsis thaliana]
contig1_31	64.44	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_32	77.25	Hypothetical protein P0685E10.9 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig1_33	83.33	Phosphate/phosphoenolpyruvate translocator [Nicotiana tabacum]
contig1_35	46.95	Transcription factor MYB98 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_36	63.6	Similarity to isoamyl acetate-hydrolyzing esterase [Arabidopsis thaliana]
contig1_37	71.65	Boron transporter 1, putative, expressed [Oryza sativa]
contig1_39	74.71	Putative iron-sulfur cofactor synthesis protein iscU [Oryza sativa]
contig1_40	53.31	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 1 [Arabidopsis thaliana]
contig1_41	48.87	Putative polyprotein [Solanum demissum (Wild potato)]
contig1_42	70.92	OSJNBa0009P12.21 protein [Oryza sativa (Rice)]
contig1_43	62.04	WD40-repeat protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_45	85.08	Pantothenate kinase 2 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_46	42.61	Dof zinc finger protein DOF5.6 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_47	53.51	IMP dehydrogenase/GMP reductase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_49	39.13	Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold [Medicago truncatula]
contig1_50	43.75	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_52	83.54	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [Lycopersicon esculentum]
contig1_54	46.5	PEX14 protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]

Table 2. Contig2 (I020010, M077P21, I089M01) 유전자 주석달기

Query ID	Identity	BLAST Results
contig2_01	78.15	FKBP12-like protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_03	82.83	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR [Medicago truncatula]
contig2_04	38.3	Hypothetical protein [Oryza sativa (Rice)]
contig2_05	35.19	Hypothetical protein T24C20_90 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_06	38.16	PREDICTED: similar to CG30100-PA [Canis familiaris]
contig2_07	37.7	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_10	60.78	Putative receptor-like protein kinase INRPK1 [Oryza sativa]
contig2_11	62.73	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_13	34.51	ETEA-like protein [Brachypodium sylvaticum (False brome)]
contig2_14	42.11	Putative nucleosid phosphatase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_15	27.87	hydrolase [Arabidopsis thaliana]
contig2_17	71.04	SEC14 cytosolic factor-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_18	28.26	Hypothetical protein ETR1 [Candida albicans (Yeast)]
contig2_19	62.69	Hypothetical protein P0702F03.34 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_20	33.33	SNF7 family protein [Tetrahymena thermophila SB210]
contig2_21	33.43	Hypothetical protein F22K18.120 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_22	46.65	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_23	47.28	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_25	54.02	unknow protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_26	62	Hypothetical protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_27	41.46	Hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_29	64.74	Hypothetical protein At5g63000 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_30	68.25	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5 [Arabidopsis thaliana]
contig2_31	66.57	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_32	77.73	Hypothetical protein P0685E10.9 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_34	88.16	Phosphate/phosphoenolpyruvate translocator [Nicotiana tabacum]
contig2_35	48.26	Transcription factor MYB98 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_36	48.32	Similarity to isoamyl acetate-hydrolyzing esterase [Arabidopsis thaliana]
contig2_38	76.76	Boron transporter 1, putative, expressed [Oryza sativa]
contig2_39	86.94	HAT dimerisation [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_40	77.84	NifU-like protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_41	28.18	Coat protein [Peanut stunt virus]
contig2_42	73.58	WD40-repeat protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_43	62.98	WD40-repeat protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_44	27.03	Anthranilate synthase component I [Bacillus cereus G9241]
contig2_45	77.14	ATP binding / pantothenate kinase [Arabidopsis thaliana]
contig2_46	30	PREDICTED: similar to CASP8 associated protein 2 [Canis familiaris]
contig2_47	40.95	Dof zinc finger protein DOF5.6 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_48	46.13	IMP dehydrogenase/GMP reductase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_49	42.27	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_50	42.55	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_51	82.95	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [Lycopersicon esculentum]
contig2_52	44.61	AtPex14p [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig2_53	81.4	MYB family transcription factor [Gossypium hirsutum (Upland cotton)]
contig2_54	61.54	Homeodomain-like [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig2_55	55.43	Putative kinesin light chain [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig2_56	75	Hypothetical protein P0005A05.28 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

contig2 (I020010, M077P21, I089M01)에서는 56개의 유전자가 예측되었으나, 순차적으로 같은

결과를 가진 유전자들을 고려하면, 실제적으로는 약 48개의 유전자가 있을 것으로 추정할 수 있다. 이렇게 FgeneSH와 Uniprot을 이용한 유전자 예측을 통해서 얻어진 결과를 가지고, contig2 과 contig1을 비교하였다 (Fig. 2). Figure 2에서 알 수 있듯이 두 개의 contig가 synteny가 있음을 볼 수 있다. synteny를 확인하기 위해서 contig2 (I020O10, M077P21, I089M01)을 데이터베이스로 만들어 contig1 (I029F06, I024M16)과 유사성을 분석하여 서로간의 유사성이 40% 이상이면서 200bp 이상인 유전자들을 선별하여 다시 주석달기를 수행하였다 (Table 3). 그리고, 공통적인 유전자들의 아미노산 서열에서 Ks 값을 계산하였는데, Ks 값은 아미노산은 변하지 않지만 염기서열은 변하는 비율을 계산하여 비교하는 염기서열의 유사성을 보여주는 값이다 (Table 4).

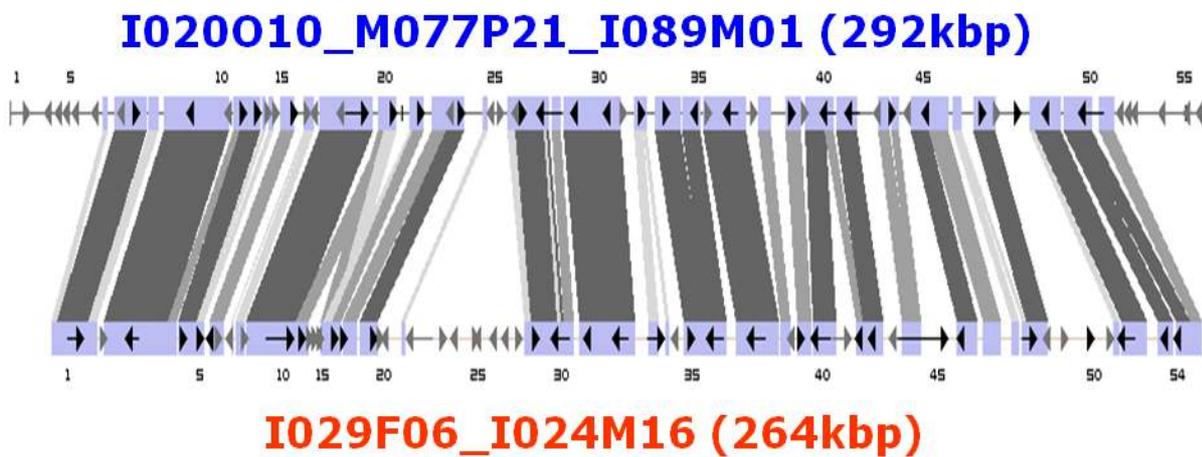


Figure 2. BAC 아미노산서열 비교

Table 3. 공통 유전자 주석달기

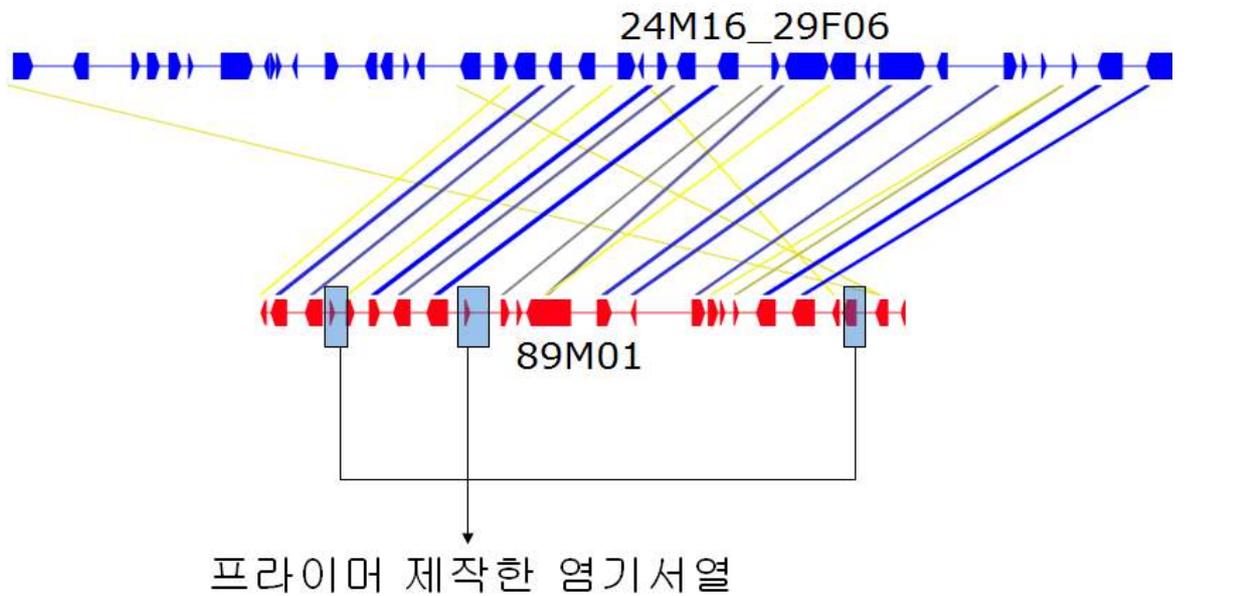
contig1	contig2	Identity	BLAST result
contig1_01	contig2_10	93.24	Putative receptor-like protein kinase INRPK1 [Oryza sativa]
contig1_01	contig2_25	34.62	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase [Arabidopsis thaliana]
contig1_03	contig2_11	74.96	Putative carboxyl-terminal proteinase [Gossypium hirsutum]
contig1_04	contig2_13	66.67	ETEA-like protein [Brachypodium sylvaticum (False brome)]
contig1_05	contig2_14	68.09	Putative nucleosid phosphatase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig1_07	contig2_17	90	SEC14 cytosolic factor-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig1_09	contig2_19	86.36	Hypothetical protein P0702F03.34 [Oryza sativa ]
contig1_10	contig2_21	85.84	IMP dehydrogenase/GMP reductase [Medicago truncatula]
contig1_17	contig2_23	81.05	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_18	contig2_10	35.45	Putative receptor protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
contig1_18	contig2_25	93.28	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase [Arabidopsis thaliana]
contig1_27	contig2_10	33.33	Receptor-like serine/threonine kinase [Arabidopsis thaliana]
contig1_29	contig2_29	74.55	Hypothetical protein At5g63000 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_30	contig2_30	92.41	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5 [Arabidopsis thaliana]
contig1_31	contig2_31	79.42	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_32	contig2_32	95.18	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_33	contig2_34	74.01	Phosphate/phosphoenolpyruvate translocator [Nicotiana tabacum]
contig1_35	contig2_35	89.26	Transcription factor MYB98 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_36	contig2_36	82.81	Similarity to isoamyl acetate-hydrolyzing esterase [Arabidopsis thaliana]
contig1_37	contig2_38	88.82	Boron transporter 1, putative, expressed [Oryza sativa]
contig1_39	contig2_40	95.15	Putative iron-sulfur cofactor synthesis protein iscU [Oryza sativa]
contig1_40	contig2_42	92.34	ositol-tetrakisphosphate 1-kinase 1 [Arabidopsis thalianas]
contig1_43	contig2_43	85.5	WD40-repeat protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_45	contig2_45	92.23	Pantothenate kinase 2 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_46	contig2_47	85.05	Dof zinc finger protein DOF5.6 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_47	contig2_48	70.05	IMP dehydrogenase/GMP reductase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
contig1_52	contig2_51	95.78	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [Lycopersicon esculentum]
contig1_53	contig2_52	72.41	AtPex14p [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
contig1_54	contig2_52	88.66	PEX14 protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]

Table 4. 공통유전자의 Ks 및 Ka 값 비교

29F06_24M16	20O10_M77P21_89M01	K <sub>a</sub>	K <sub>s</sub>	K <sub>a</sub> /K <sub>s</sub>	PROT_PERCENTID
contig1_01	contig2_10	0.0223	0.1472	0.1514	95.16
contig1_01	contig2_25	0.9408	15.7546	0.0597	30.18
contig1_03	contig2_11	0.0275	0.0804	0.3421	94.09
contig1_05	contig2_14	0.2807	0.4797	0.5852	65.33
contig1_07	contig2_17	0.0522	0.1893	0.2761	90.73
contig1_10	contig2_21	0.0411	0.1194	0.3446	92.1
contig1_18	contig2_10	0.9194	65.3346	0.0141	30.59
contig1_18	contig2_25	0.0332	0.0956	0.3475	93.18
contig1_27	contig2_10	0.9434	61.158	0.0154	24.62
contig1_29	contig2_29	0.0306	0.0982	0.3111	94.35
contig1_30	contig2_30	0.0496	0.1935	0.2565	90.54
contig1_31	contig2_31	0.0356	0.1293	0.275	93.2
contig1_32	contig2_32	0.0207	0.1208	0.1712	95.45
contig1_33	contig2_34	0.2787	0.4506	0.6186	67.93
contig1_35	contig2_35	0.0414	0.1219	0.3392	90.7
contig1_36	contig2_36	0.0222	0.0677	0.3282	95.05
contig1_37	contig2_38	0.1246	0.2355	0.529	84.87
contig1_39	contig2_40	0.0493	0.0318	1.5479	95.15
contig1_40	contig2_42	0.0574	0.2246	0.2554	89.73
contig1_43	contig2_43	0.0455	0.1524	0.2984	92.11
contig1_45	contig2_45	0.1734	0.2494	0.6955	79.4
contig1_46	contig2_47	0.0426	0.1585	0.2687	90.61
contig1_47	contig2_48	0.1642	0.3433	0.4784	76.65
contig1_52	contig2_51	0.0168	0.0802	0.2093	96.19
contig1_53	contig2_52	0.1506	0.341	0.4417	79.26
contig1_54	contig2_52	0.0351	0.108	0.3252	93.75

나. 선발된 BAC을 이용한 mapping

contig1은 LG D2에 있는 마커에 의해서 선발되었으나, contig2는 기존의 염기서열의 유사성에 의해서 선발되었기 때문에 contig2의 단일염기서열변이 유전형결정 (genotyping)을 통하여 그 위치를 파악했다. 먼저 contig2에만 존재하는 염기서열에서 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머를 사용하여 본 실험실에서 보유하고 있는 푸른콩과 진품콩 2호를 모부분으로 하는 96개의 집단을 사용하여서 단일염기서열변이 유전형결정을 실시하였고, contig2의 위치가 LG A1임을 알게 되었다.



PCR primer (5'-3')	SNP position	SNP type (P/J)*	SNP primer sequence (5'-3')
F: TTCGTGCTAAGTGGAAGTCTG	205	-/A	GTTTTTCATCAATCTTCCTCTAAA [+]
R: TACAACAACGATGTTTCATGACG			

\* P, 푸른콩; J, 진품콩 2호

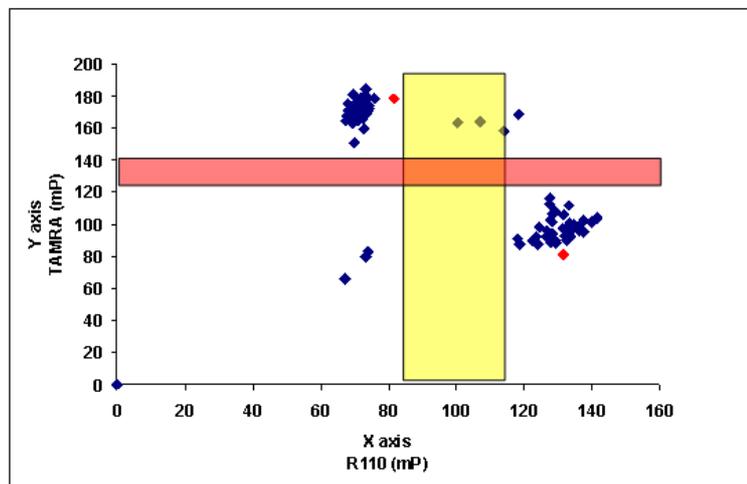


Figure 3. contig2 의 SNP 유전형결정

#### 다. BAC 선발방법 도입

이번 연구에서 사용한 콩 BAC library는 미국 Iowa State Univ.-USDA에서 Williams 82 품종으로 제작된 것으로, 약 40,000개의 clone들로 구성되어 있으며 콩 게놈의 5.4배를 포함하고 있다. 무작위로 추출한 약 224개의 clones에 대하여 조사한 결과 평균 삽입단편의 크기가 150kb이었으며, 하나의 유전자를 찾을 확률이 98%이었다. 이번 연구에서 지금까지 BAC의 선발은 미국의 Iowa State Univ.-USDA의 Shoemaker LAB에서 수행해 주었으나, 자체적인 BAC 선발기술을 습득하여, 본 실험실에서 BAC 선발을 할 수 있도록 BAC pool을 만들었다. BAC pool은 크게 세 가지로 구분되며, 첫 번째는 library의 각 플레이트를 5개씩 모아서 BAC 추출한 Full Plate Pool이다 (Fig. 4).

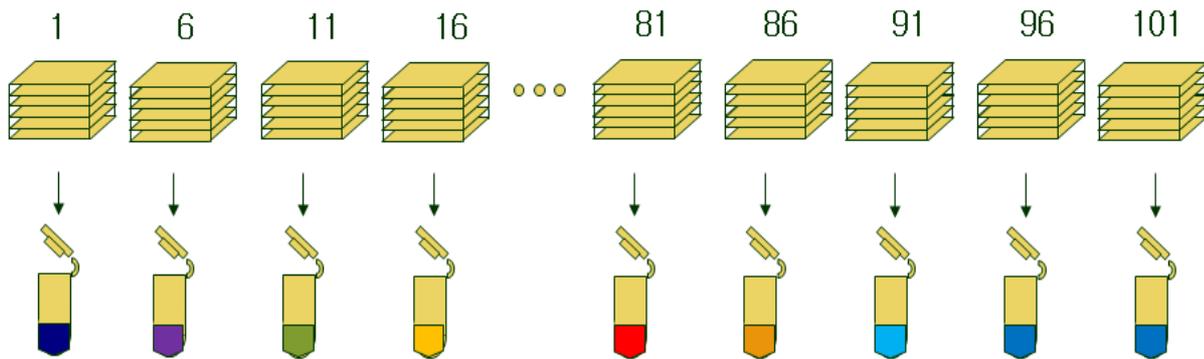


Figure 4. Full Plate Pool

두 번째는 105개의 library 플레이트를 20개씩 묶어서 A부터 F까지의 6개의 Group으로 나누고, 세로줄의 클론들을 모아서 BAC 추출한 것이 Column Pool이다 (Fig. 5).

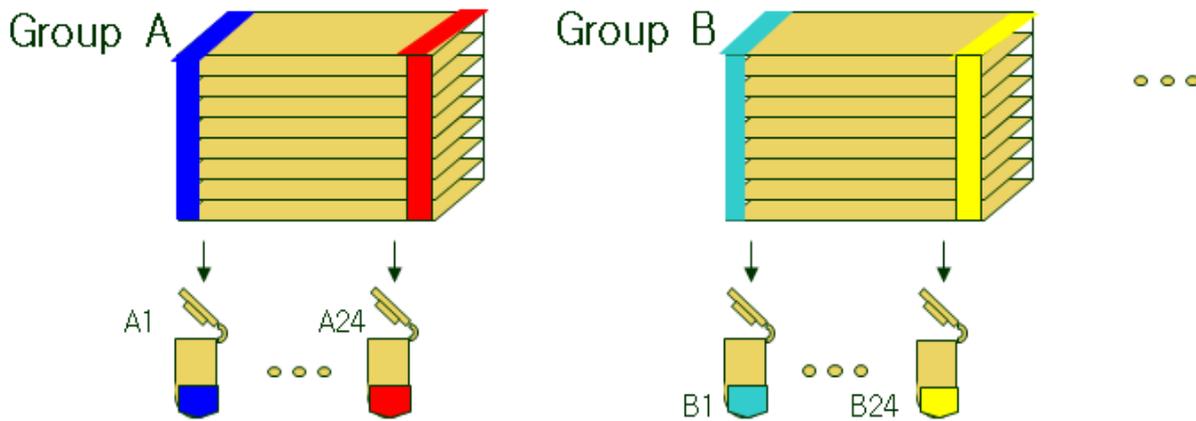


Figure 5. Column Pool

세 번째는 20개씩의 묶음에서 가로줄의 클론들을 모아서 BAC을 추출한 것이고, 이것이 Row Pool이다 (Fig. 6). 이렇게 만든 세 가지의 pool을 이용하면, 전체 플레이트와 가로줄, 세로줄의 클론들을 선발하여, 중복된 클론들을 Clonal PCR로 확인하면 대조구인 Williams 82와 같은 크기의 PCR 결과를 통해서 원하는 유전자가 포함된 BAC을 선발할 수 있다. 선발된 BAC을 유전자 예측을 하고, 결정된 염기서열을 이용하면 유용유전자 예측이나, 클로닝을 좀 더 쉽게 할 수 있다. 하지만, 콩의 유전자는 중복된 경우가 많기 때문에 BAC pooling의 결과를 완

전히 신뢰하기는 어려운 실정이고, FPC 나 BAC 말단염기서열 확인과 같은 다른 실험의 결과들과 병행해야 한다. 그럼에도 불구하고, 지금까지 미국에 의존적이던 BAC 선발을 자체적으로 할 수 있다는 것은 고무적이다.

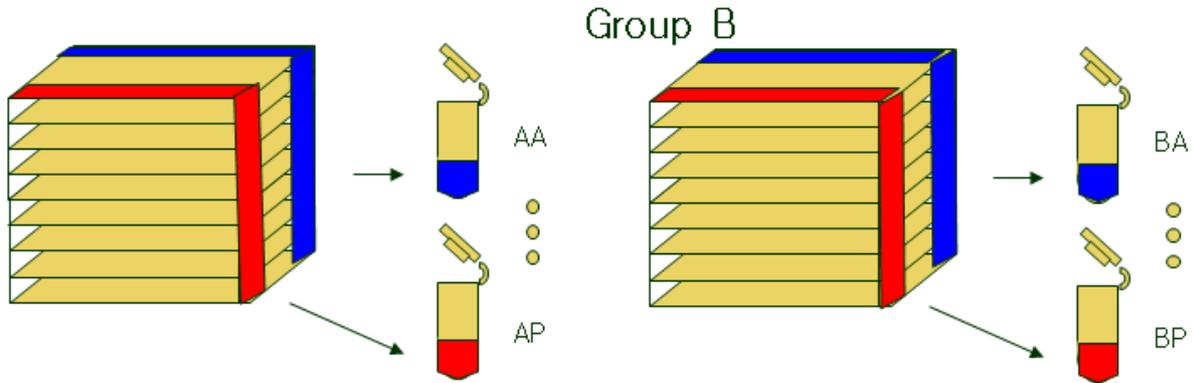
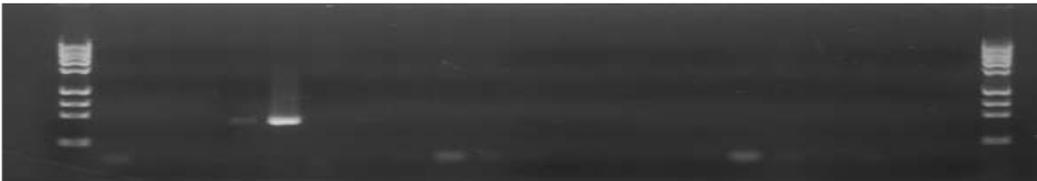


Figure 6. Row Pool

**라. SNP 마커들을 이용한 BAC 선발**

SSR 마커 Satt486과 Satt372 사이에 2개의 single nucleotide polymorphism (SNP, 단일염기서열변이) 마커가 탐색되었다. 이 단일염기서열변이 마커는 인간은 물론 식물 및 작물에서서도 다량으로 발견되는 유전적 마커로, 단일염기서열의 변이가 바로 표현형으로 나타나는 경우가 많이 탐색되어 유용적인 마커로 최근에 각광을 받고 있다. 그리고, 탐색 방법이나 Genotyping 방법 또한 빠르고 저비용으로 분석이 가능하여 세계적으로 여러 연구실에서 이 마커에 관한 연구가 수행중이다. 이 마커는 SNP 021191 과 SNP 022037 이다. 이 마커를 이용해서 BAC Pooling을 수행하였다. 먼저 68°C에서 Full Plate SuperPool 을 이용하여 PCR했다.

**SNP 21191 - 68°C**



1 6 11 16 21 26 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101

**SNP 22037 - 68°C**

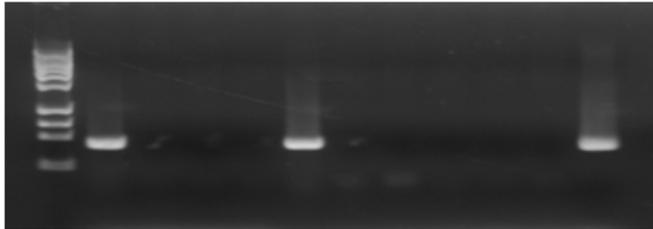


1 6 11 16 21 26 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 w82

Figure 7. Full Plate SuperPool PCR 결과

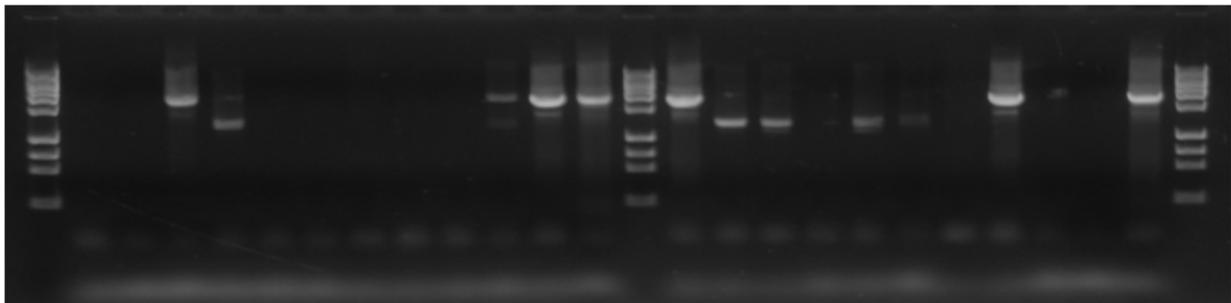
PCR 결과, SNP 21191에서는 21번에서 밴드가 보였기 때문에 Group B를 선택하여 추후 PCR을 진행하였으며, SNP 22037에서는 16번과 26번이 밴드가 보였기 때문에 Group A와 B를 선택하여 다음 PCR을 수행하였다.(Fig. 8) 젤 사진에서는 대조구인 Williams 82와 같은 크기이지만, 적은 밴드도 있고, 다른 크기의 밴드도 확인할 수 있지만, 대조구와 같은 밴드가 아니면, 비슷한 염기서열을 가진 다른 부분이 증폭된 것으로 간주하여 선정하지 않았다.

### SNP 21191 - 68°C



**BA BE BI BM B1 B5 B9 B13 B17 B21 W82**

### SNP 22037 - 68°C

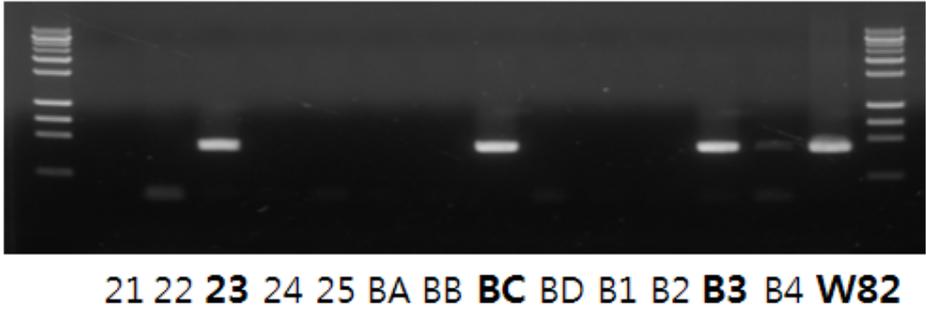


**AA AE AI AM A1 A5 X A9 A13 A17 A21 W82 BA BE BI BM B1 B5 B9 B13 B17 B21 W82**

Figure 8. Row and Column SuperPool PCR 결과

SNP 21191에서는 Row PCR에서 BA에서, Column PCR에서 B1에서 밴드가 나왔으므로 다음 과정은 BA, BB, BC, BD과 B1, B2, B3, B4에서 PCR을 수행하고, SNP 22037에서는 Row PCR에서 AI, BA에서 밴드가 나왔으므로 AI, AJ, AK, AL, BA, BB, BC, BD에서, Column PCR에서는 A17, A21, B13에서 밴드가 나왔으므로 A17, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24 B13, B14, B15, B16에서 PCR을 수행했다 (Fig. 9). 지금까지의 PCR결과를 종합하면 SNP 21191에서 선발된 것은 I023C03 으로 작년에 미국 Iowa State Univ.-USDA의 결과와 일치하여 본 연구실에서 만든 BAC Pool 시스템이 정상적으로 기능하고 있음을 알 수 있고, SNP 22037에서 선발된 것은 I018K23, I028C15이다.

SNP 21191 - 68°C



SNP 22037 - 68°C

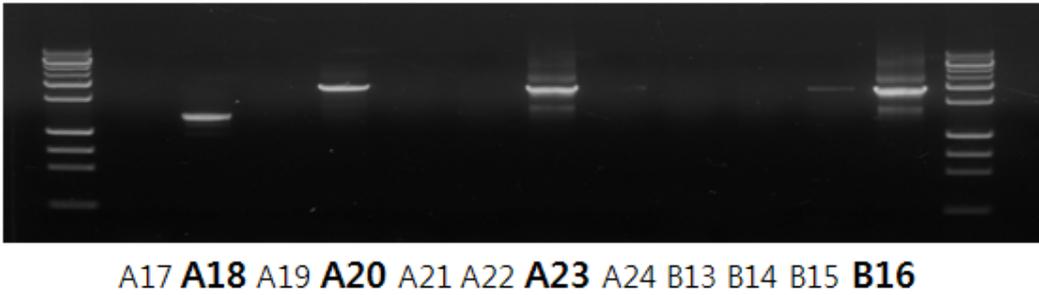
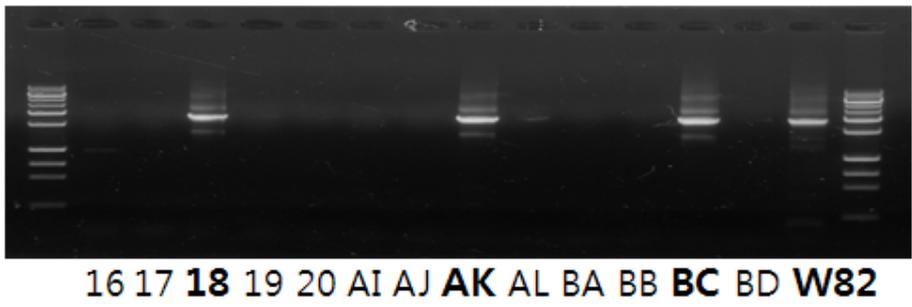


Figure 9. Plate, Row and Column PCR 결과

마. BES을 이용한 추가 BAC 선발

본 연구진이 설정한 목표 부위에 있는 DNA 마커들은 SSR 마커인 Satt486과 Satt372, SNP 마커인 SNP22037과 SNP40963이다. 이 마커들을 이용하여 Satt486을 통해서 I029F06과 I024M16을 선발하여 염기서열분석을 완료하였으며, Satt 372를 통하여 I065G21 (102kbp)을 선발하였고, SNP22037과 SNP 40963으로 각각 I018K23 (112kbp)과 I086G06 (107kbp)을 선발하였고, 선발한 BAC의 말단염기서열(BES)을 이용하여 추가로 I017L20 (114kbp)과 I028C15 (47kbp), I104A17 (168kbp)을 선발하였고 (Fig. 1), 염기서열을 분석하여 기존의 염기서열과 일치하는 것을 확인하였다.

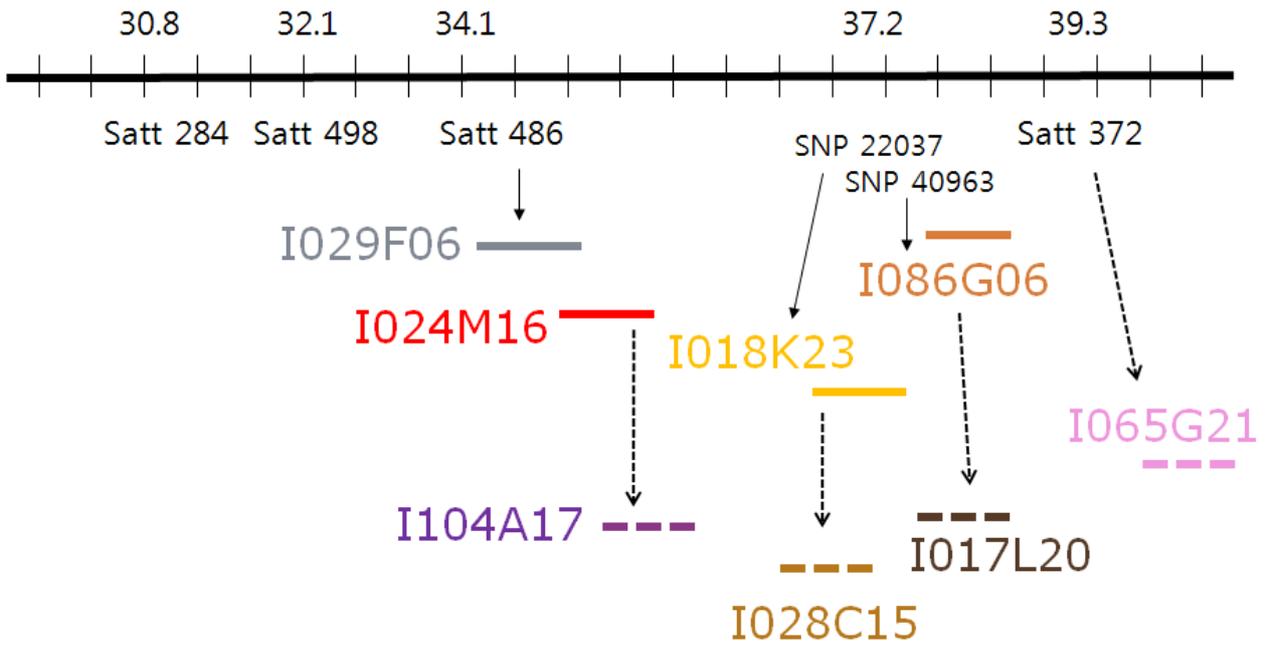


Figure 10. BAC 말단염기서열을 이용한 BAC 선별

염기서열을 아미노산 서열로 번역하고, 이 아미노산 서열을 이용하여 FgeneSH (<http://www.softberry.com>)에서 유전자예측을 수행하였고 이 유전자의 아미노산서열을 이용하여 EBI(<http://www.ebi.ac.uk/uniref/>)의 Uniprot에서 주석달기를 수행하였다. (Tables 1, 2, & 3) I018K23은 염기서열로 SNP 22037을 확인하였으며 19개의 유전자를 갖고 있는 것으로 예측되었다. I065G21은 Satt372를 확인하였으며, 다른 BAC보다 많은 수의 retroelement 및 transposon이 발견되었으며, 13개의 유전자가 예측되었다. I086G06은 23개의 유전자가 예측되었다. I017L20은 I086G06과 겹치는 부분을 제외하고 염기서열 분석을 하였으며, I028C15은 I018K23과 겹치는 부분이 대부분고, I0104A17은 24M16과 대부분이 겹치는 염기서열이어서 제외했다. 이번 염기서열분석에 있어서는 기존의 ABI3730 이 아닌, GS FLX (16 lanes)를 사용하였고 Gap-filling목적으로 ABI3730을 이용하였다.

Table 5. 18K23 유전자 주석달기

ID	Identity	Description
18K23_1	87.15	Rac-like GTP-binding protein ARAC10 [Arabidopsis thaliana]
18K23_2	67.61	Putative DegP2 protease [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
18K23_3	35.48	Nodulin-like protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
18K23_4	48.08	Hypothetical protein [Medicago truncatula (Barrel medic)]
18K23_5	38.78	Nodulin-like protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
18K23_6	48.71	Peptidase S8 and S53, Integrase, catalytic region; Zinc finger, CCHC-type; Peptidase aspartic, catalytic [Medicago truncatula]
18K23_7	78.43	ATP binding / cysteine-tRNA ligase [Arabidopsis thaliana]
18K23_8	81.95	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-21 kDa 1 [Arabidopsis thaliana]
18K23_9	48.55	RING-H2 finger protein ATL1D [Arabidopsis thaliana]
18K23_10	27.51	Zinc finger, CCHC-type; Plant MuDR transposase; Zinc finger, SWIM-type [Medicago truncatula]
18K23_11	37.68	hydrolase/ protein serine/threonine phosphatase [Arabidopsis thaliana]
18K23_11	31.58	Putative mutator-like transposase [Oryza sativa]
18K23_12	52.35	RNA-dependent RNA polymerase [Zea mays]
18K23_13	48.04	NHL repeat-containing protein-like [Oryza sativa]
18K23_14	66	Trehalose 6-phosphate synthase [Gossypium hirsutum]
18K23_15	48.98	Expressed protein, 3'-partial [Lycopersicon esculentum (Tomato)]
18K23_16	61.15	Spermidine synthase [Lycopersicon esculentum (Tomato)]
18K23_17	56.25	Chloroplast lumen common protein family [Arabidopsis thaliana]
18K23_18	86.64	Protein kinase [Arabidopsis thaliana]
18K23_19	22.79	Serine/threonine-protein kinase TAO1-B [Xenopus laevis]

Table 6. 65G21 유전자 주석달기

ID	identity	Description
65G21_2	77.08	Calcium-dependent protein kinase [Arabidopsis thaliana]
65G21_4	53.9	ubiquitinthiolesterase [Arabidopsis thaliana]
65G21_5	63.64	Putative uncharacterized protein [Oryza sativa]
65G21_7	71.05	Putative uncharacterized protein [Oryza sativa]
65G21_8	84.32	Putative uncharacterized protein [Oryza sativa]
65G21_9	55.84	galactosyltransferasefamilyprotein [Arabidopsis thaliana]
65G21_10	51.1	Dynein light chain - Vicia faba (Broad bean)
65G21_11	42.29	Polyprotein-like,putative [Medicago truncatula]
65G21_12	35.71	Putative retroelement polyprotein [Arabidopsis thaliana]
65G21_13	66.67	BHLH transcription factor [Gossypium hirsutum]

Table 7. 86G06 유전자 주석달기

ID	Identity	Description
86G06_1	72.59	Uridine kinase-like protein [Oryza sativa]
86G06_3	55.73	Agmatine deiminase [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
86G06_5	86.76	Putative high mobility group-like nuclear protein 2 [Oryza sativa]
86G06_6	64.95	Strictosidine synthase [Medicago truncatula (Barrel medic)]
86G06_7	63.23	Probable phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
86G06_8	35.29	Kinetochore protein [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
86G06_9	34.17	F12A21.25 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
86G06_10	81.95	CD9/CD37/CD63 antigen [Medicago truncatula (Barrel medic)]
86G06_11	70.71	Cell growth defect factor-like [Solanum tuberosum (Potato)]
86G06_12	80.65	Rhodanese-like [Medicago truncatula (Barrel medic)]
86G06_12	57.34	Extracellular calcium sensing receptor [Oryza sativa]
86G06_13	45.6	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]
86G06_14	40.27	Hypothetical protein F22K18.100 [Arabidopsis thaliana]
86G06_15	39.64	Phloem specific protein [Vicia faba (Broad bean)]
86G06_16	45.78	Putative ubiquitin-associated (UBA) protein [Oryza sativa]
86G06_17	46.48	Protein At5g50175 [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)]
86G06_19	52.31	Octicosapeptide/Phox/Bem1p [Medicago truncatula]
86G06_20	44.33	Probable serine/threonine-specific protein kinase [Arabidopsis thaliana]
86G06_21	45.87	Putative FRO1 and FRO2 protein [Arabidopsis thaliana]
86G06_21	28.69	Phenol hydroxylase reductase; Ferric reductase-like transmembrane component [Medicago truncatula (Barrel medic)]
86G06_22	31.82	similar to ubiquitin ligase mind bomb [Rattus norvegicus]
86G06_23	33.01	Hypothetical protein B1066D09.23 [Oryza sativa]

Table 8. 17L20 유전자 주석달기

ID	identity	Description
17L20_1	36.86	Similarity to ring finger protein [Arabidopsis thaliana]
17L20_2	70.37	BZIP transcription factor bZIP125 Glycine max
17L20_3	64.4	Putative protease IV [Arabidopsis thaliana]
17L20_4	42.52	Putative uncharacterized protein [Vitis vinifera]
17L20_5	52.17	NUDIX hydrolase [Paracoccus denitrificans]
17L20_6	32.22	Putative uncharacterized protein [Vitis vinifera]
17L20_7	83.58	Serine/threonine protein kinase; n=1; Gossypium hirsutum
17L20_8	86.76	Putative high mobility group-like nuclear protein 2 Oryza sativa
17L20_9	68.2	Uridinekinase-likeprotein;n=2; Oryzasativa

**마. JGI Soybean sequence를 이용한 SSR마커 개발**

미국 JGI(Joint Genome Institute)에서 콩(Williams82)의 염기서열을 분석하여 발표/공개하였

다 (<http://www.phytozome.net/soybean>). 여기서 받은 염기서열을 SSR 분석프로그램 Sputnik (<http://cbl.labri.fr/outils/Pise/sputnik.html>) 이용하여 프라이머를 제작하였다. 229개의 태광/단백 교배집단을 사용하여 PCR하였으며, Satt486과 Satt372 사이에서 7개의 새로운 SSR 마커를 개발하였다. PCR결과 자료를 Mapmaker 3.0 을 이용하여 마커사이의 유전적 거리를 측정하였다 (Fig. 10).

#### 사. 교배집단을 이용한 불마름병 표현형조사

새로 만들어진 마커와 함께 QTL분석을 위한 표현형 (Phenotype)을 조사하기 위해서 229개의 각 개체에 불마름병 병원균 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycine*)을 접종하였다. 접종후 2주, 3주후에 각각 병반의 수를 측정하였고, 이 병반수에 따라서 저항성과 감수성을 구분하였다. 0 부터 5까지 등급을 이용하여, 한 잎에 5개 이하의 병반을 가지고 있어서 저항성을 보이

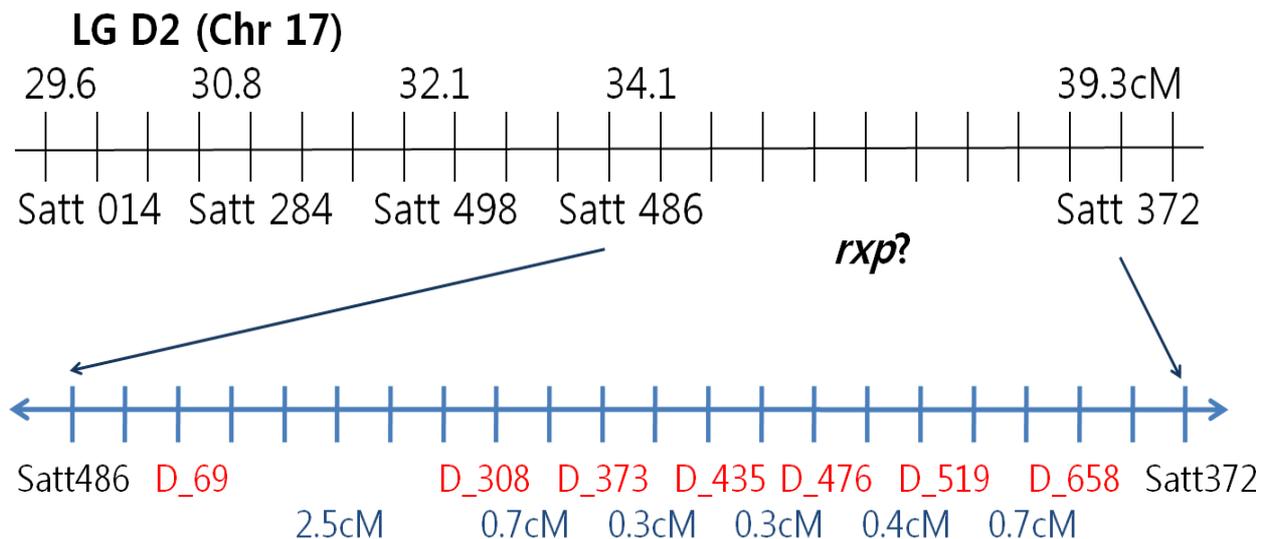


Figure 11. rxp fine mapping을 위한 SSR마커 개발

는 것을 0으로 하고, 5~20 개의 병반을 가지고 있으면 1, 20~50개의 병반을 가지고 있으면 2, 50~80개의 병반을 가지고 있으면 3, 잎의 반이상이 병반으로 덮이면 4, 잎이 거의 괴사할 정도면 5로 나타내었다 (Fig. 12). 불마름병에 대한 표현형과 함께 새로 개발된 마커들의 PCR결과를 이용하여 Mapmaker QTX 프로그램을 이용하여 QTL 분석을 실시하였다. D-69와 D-308사이에서 rxp의 QTL이 가장 크게 나와서 그 두 마커의 사이에서 SNP를 찾아서 추가 맵핑을 실시하였다.

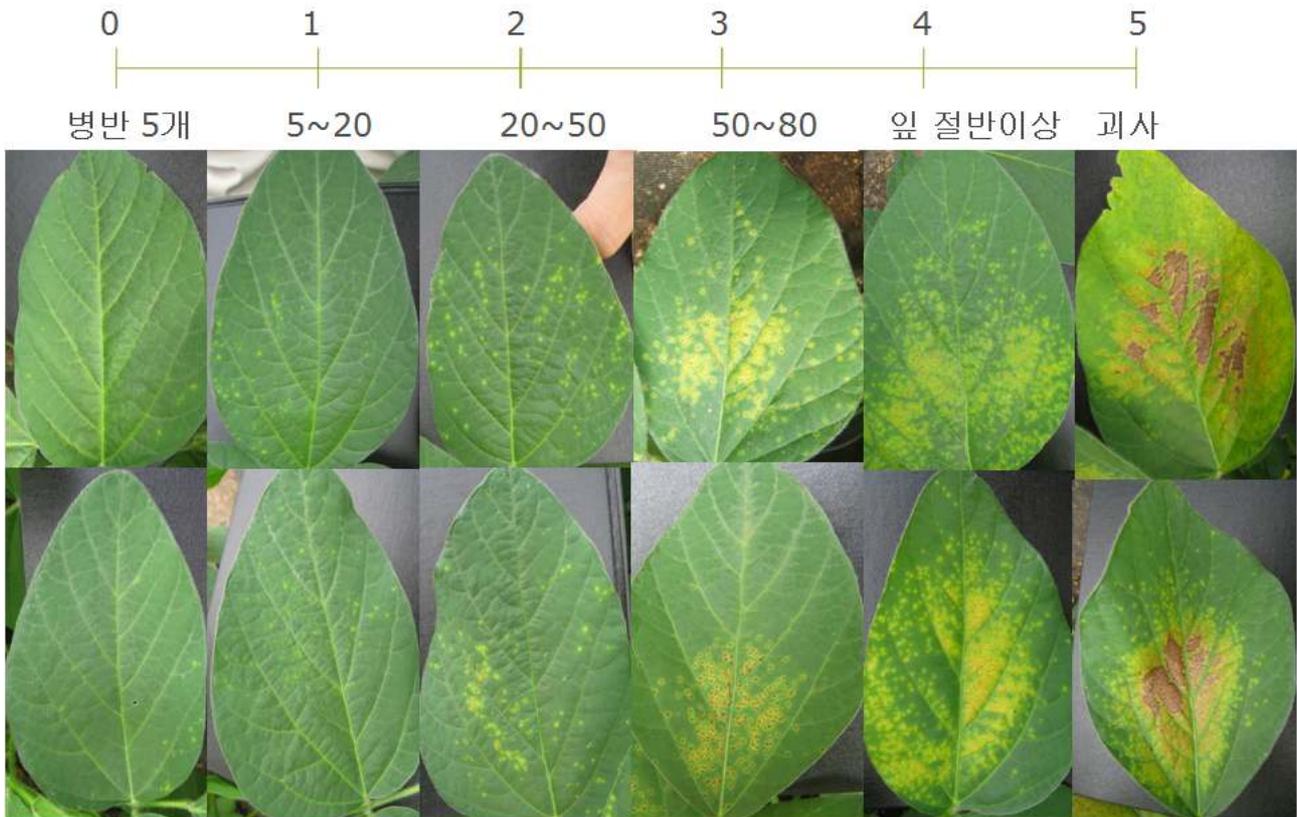


Figure 12. 병반수에 의한 감염도 조사 기준

#### 아. QTL 분석

태광/단백 집단을 이용한 맵핑결과를 표로 나타내었다 (Table 9). QTL분석 프로그램으로 분석한 결과 D-69와 D-308 사이에 rxp가 존재하는 것으로 나왔고, 저항성/감수성 표현형을 보인 개체들과 PCR결과를 봐도 D-69와 D-308 사이에 저항성 유전자가 있을 것을 예측할 수 있다.

Table 9. 새 마커들을 이용한 SSR 결과

	TD_245	TD_243	TD_113	TD_166	TD_145	TD_178	TD_182	TD_242	TD_156	TD_121	TD_74	TD_196	TD_256	TD_297	TD_35
M178	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3
D-69	1	1	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3
D2_17	1	1	1	3	2	2	3	2	2	1	3	3	3	3	3
D-308	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3
D-373	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	3
D-435	1	1	1	1	2	1	1	1	3	3	3	1	1	3	3
D-476	1	1	1	1	3	3	1	1	3	3	3	1	1	3	3
D-519	1	1	1	1	1	2	1	1	2	3	3	1	1	1	3
D-658	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	1	1	1	1

추가로 개발한 SNP 마커(D2\_17)와 함께 분석한 결과는 D2\_17과 D-308사이에서 QTL이 분석되었다. 두 개의 마커 사이에는 50여개의 유전자가 예측되었으며 전형적인 저항성 유전자의 형태를 가진 kinase 계열의 유전자도 2개가 있어서 후보 유전자 선발도 가능할 수 있다.

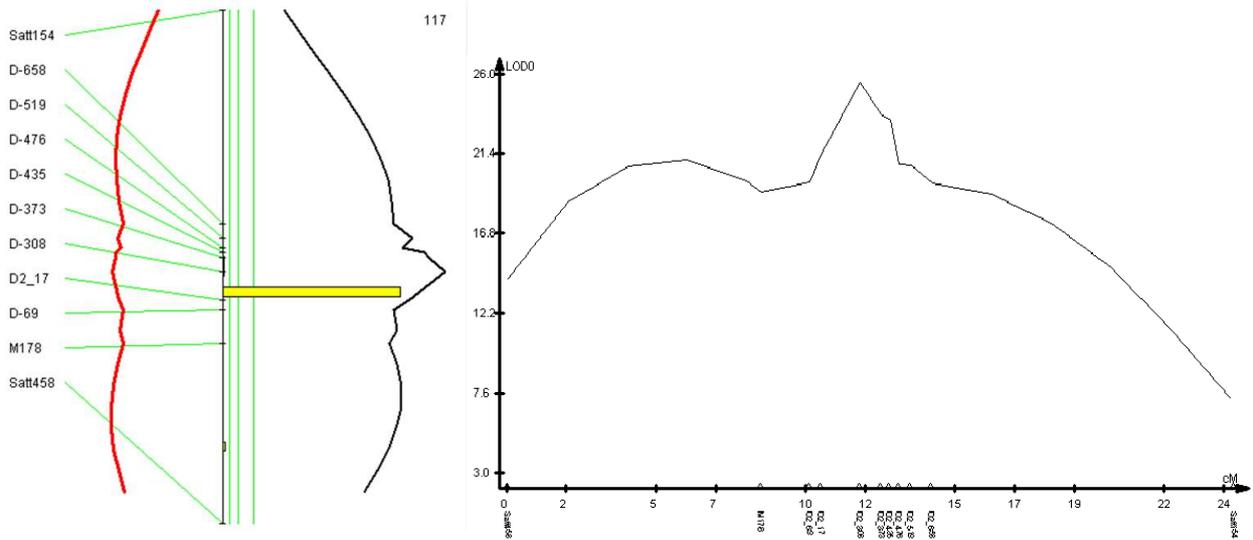


Figure 13. QTL 분석결과(왼쪽 : Map Maker QTX, 오른쪽 : QTL Cartographer)

## 2. 불마름병 저항성 유전자(*rxp*)

### 가. 연구 배경 및 목적

콩은 진화과정에서 적어도 두 번 이상의 염색체배가(polyploidy)를 겪은 것으로 보고되고 있다. 이러한 이유 때문에 현재 콩의 유전체 구조는 매우 중복(duplicated) 되어 있으며 이는 *rxp* 유전자 부근 또한 마찬가지이다. 두 번의 염색체배가 사건을 통해 이론적으로는 *rxp* 유전자 부근 염기서열과 매우 유사한 부분이 콩 유전체 상에서 모두 3군데나 더 있을 것으로 예상된다. 이들의 위치와 염기서열을 밝혀낸다면 *rxp* 유전자의 기작과 진화뿐만 아니라 더 나아가 콩 유전체 전체의 진화에 대하여 많은 정보를 쉽게 얻을 수 있을 것이다. 먼저 이를 위해 본 연구진이 밝혀낸 *rxp* 유전자 부근 염기서열과 최근 많은 분야에서 각광받고 있는 비교 유전체학(Comparative Genomics)을 이용하여 중복된 부분을 식별할 수 있는 분자마커를 개발하였다.

### 나. 중복부분 특이분자마커 (region-specific molecular marker) 개발

콩과의 모델 식물인 *Medicago truncatula*와 *Lotus japonicus*의 염기서열은 전 세계적인 유전체 프로젝트를 통해 이미 대부분이 밝혀진 상태이다. 이 두 모델 식물의 염기서열 정보를 이용하여 콩의 염기서열과 비교, 분석하면 원하는 부분의 염기서열을 예상할 수 있다. 이 과정에서 여러 생물 정보학 (Bioinformatics) 도구들이 사용되며 간략한 과정을 모식도로 나타내었다 (Fig. 14).

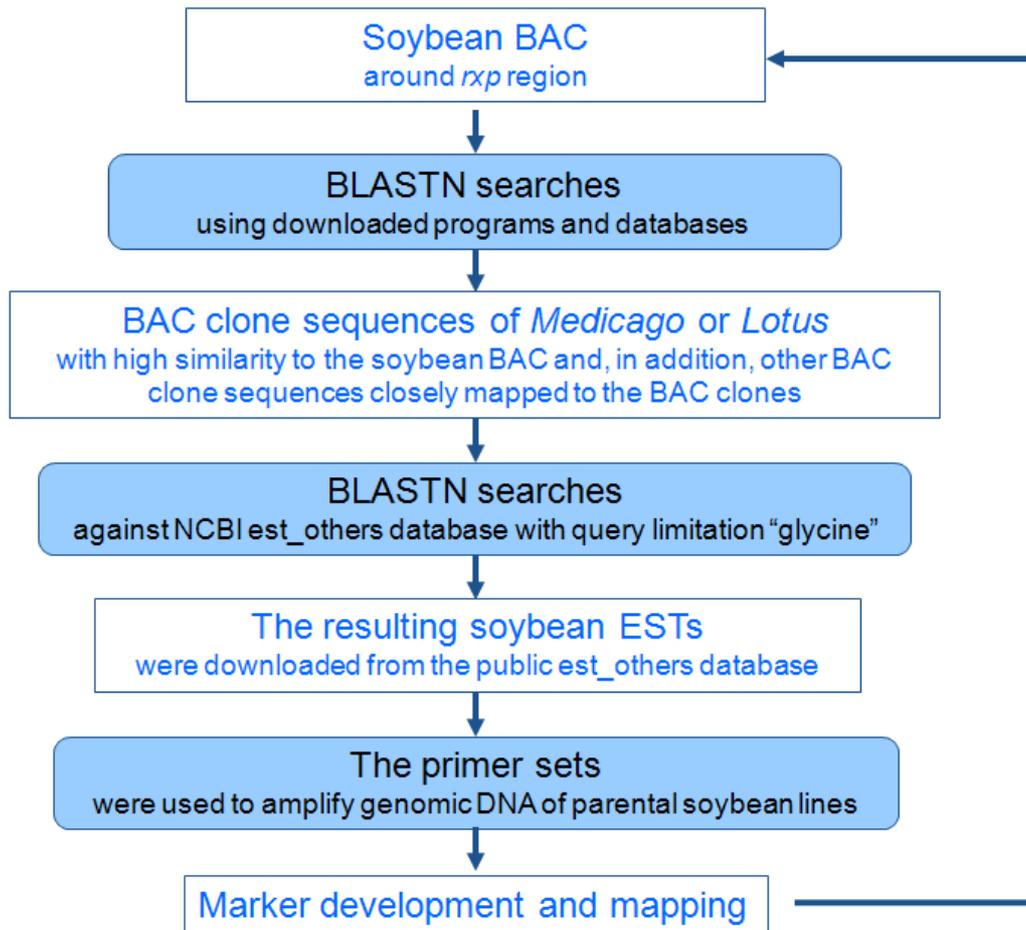


Figure 14. 생물정보학 실험과정 모식도

본 연구진이 구축한 BLAST 프로그램과 모델 식물의 염기서열 데이터베이스를 이용하여 이미 밝혀낸 contig1 (I029F06, I024M16)의 염기서열과 유사한 부분을 콩과 모델 식물인 Medicago에서 찾아낼 수 있었다. Medicago contig 962는 contig1 (I029F06, I024M16)과 많은 부분이 유사하여 synteny를 나타내고 있으며 contig2 (I020O10, M077P21, I089M01)와도 그러한을 알 수 있다 (Fig. 15). Medicago contig 962는 현재 모두 5개의 BAC clone (CT573365, AC147877, AC140849, CU062477, CT954236)을 포함하고 있다. NCBI의 BLASTN 프로그램을 이용하여 Medicago contig 962의 염기서열과 유사한 콩의 EST (Expressed Sequence Tag)를 찾아내었다. 모두 15개의 EST(BU550513, CO979743, AI736758, BI974385, BG362780, DT082967, BI973781, BE021935, CD409435, CF808793, CK769034, CO984272, BQ743128, CD413457, DO979133)를 찾았으며 이들의 염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작하였다 (Table 10).

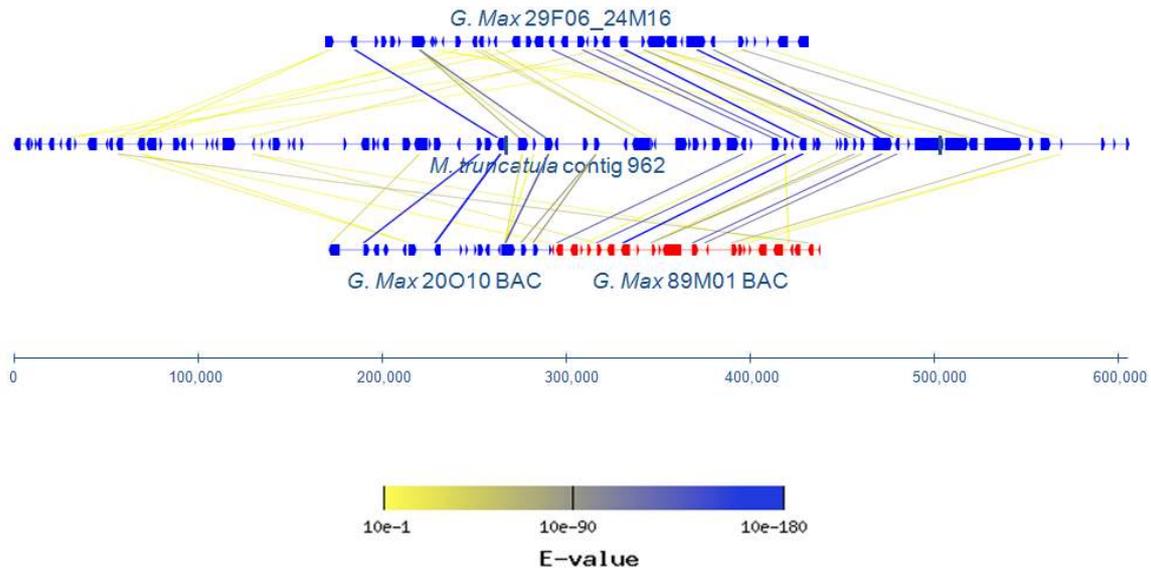


Figure 15. Medicago와 contig의 염기서열 비교

Table 10. EST 증폭용 프라이머

primer	Primer sequence (5'-3')		Expected amplicon size(bp)
BU550513	F: AACAAATTACATGCCCTTGGAG	R: ATAAAGGGATCTCACGGAAA	277
CO979743	F: CACAACCACCATCAGACTCAAT	R: TGTCAGTTGGTGTTCATAAGC	524
AI736758	F: ATTCTCCTGGGACTAGGCTTTC	R: ATCAGGCGATGCACTTCTAAAT	404
BI974386	F: GTCTATTATCCGGTCCAGGTTT	R: GGGATTAACAGCAGTGACACAA	481
BG362780	F: AGGTTCTTCTCAGCTCTTTCTT	R: GGAATCCTTAGACACTCCAAT	463
DT082967	F: CAGGCATAGCGTATGAGATCAG	R: AACTCTACACAGGGAGAAGGAAA	429
BI973781	F: CTCTGGATTCTGCTACGTC AAC	R: CACCCAAGACCATTAAAGGAAC	458
BE021935	F: ATATGCACCAGTTCATCAGCAC	R: TAGTCTTTTACCAACACGTGGA	439
CD409435	F: ATATCAGCAGCACAGAGCCATA	R: CGAGAACATGCAATAGAACTGG	518
CF808793	F: GAGGAGGAGATTGATCGAGAGA	R: TCTTCTCAGCGATCTTGAAAT	432
CK769034	F: GAGAGAGAAGAGCGGAAGAGAA	R: TCTTCTCAGCGATCTTGAAAT	423
CO984272	F: TGTGTTGGACCTTCACCTCATA	R: CTTGCACTATTTGGATGCTCAC	528
BQ743128	F: GAGGAAGTCAACGAAGAGGTTG	R: GCTTACATCCAACCTCCACCAAT	351
CD413457	F: CTTGATTTTCGTCCTTTGCTCTT	R: AAACAGTCAAGCTACCGGATTT	533
CO979133	F: CTCCTCTTTGCTGTTTCTAT	R: GAACCTTCTGATTCTATTTCGAG	489

### CO979743

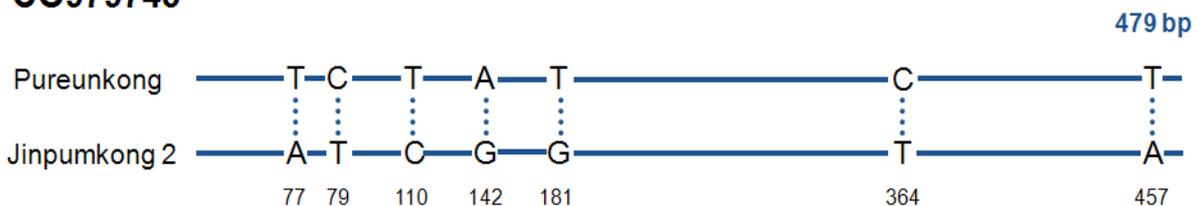


Figure 16. CO979743의 단일염기서열 변이

염기서열 분석 결과, 2개의 EST(CO979743, BE021935)가 푸른콩과 진품콩 2호 사이에서 총 9개의 단일염기변이를 나타내었으며 각각 염색체 4번 (LG C1)과 6번 (LG C2)에 위치하는 것

을 확인하였다 (Fig. 16 & 17).

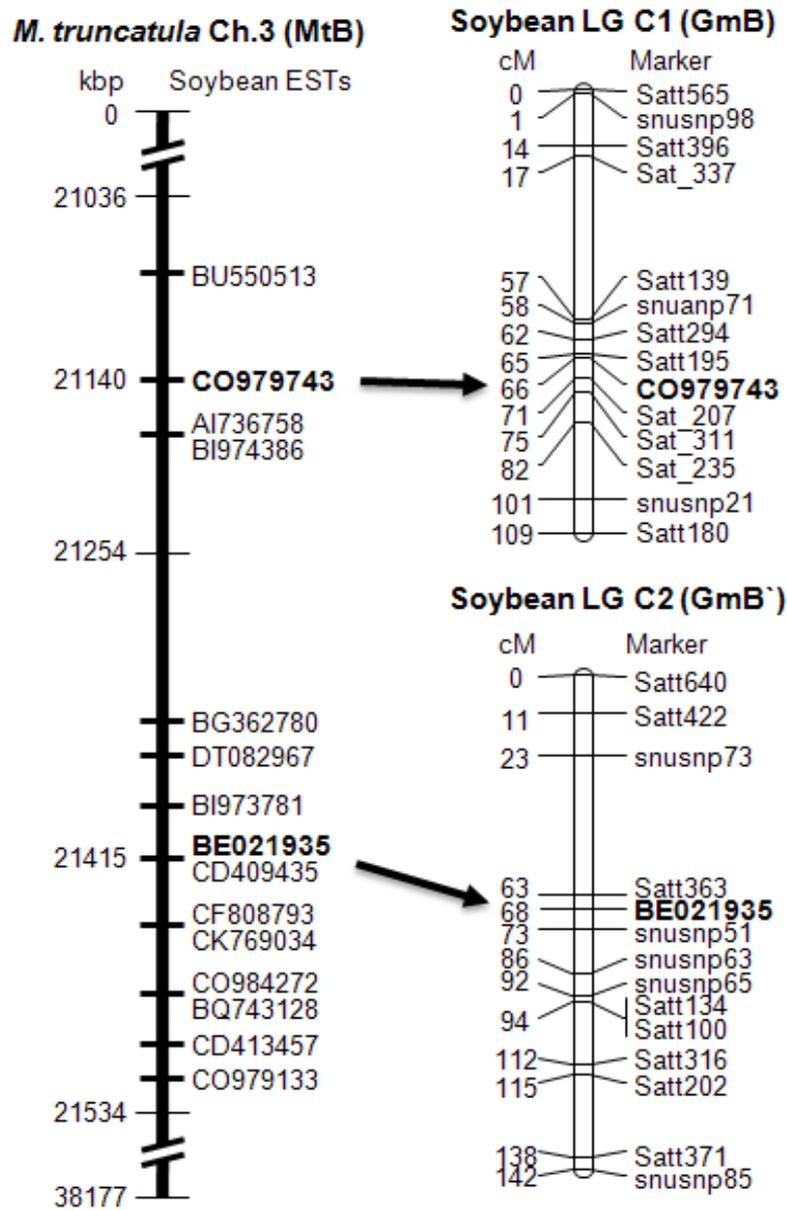


Figure 17. EST 기반 단일변이마커 맵핑 (mapping) 결과

#### 다. 중복부분 염기서열 탐색

본 연구를 통해 개발된 중복부분 특이분자마커를 이용하여 *rxp* 유전자 부근과 염기서열이 유사한 부분의 BAC clone을 선발하였다. EST CO979743을 이용하여 모두 5개의 BAC clone (gmw1-28M13, gmw1-28O12, gmw1-38P12, gmw1-61M05, and gmw1-102F24)이 선발되었으며, 이 중 가장 크기가 큰 gmw1-61M05의 염기서열을 GS FLX sequencer를 이용하여 밝혔다. 다시 gmw1-61M05의 염기서열을 이용하여 추가적으로 3개의 BAC clone (gmw1-54G20, gmw1-75B18, and gmw1-86A12)이 선발되었으며, 그 중 gmw1-54G20의 염기서열을 밝혔다. contig3 (gmw1-61M05, gmw1-54G20)은 contig1과 contig2에 이어 추가적으로 밝혀진 *rxp* 유사부분이다. 이들의 염기서열을 2008년 1월에 발표된 콩 유전체 정보 (www.phytozome.com)와

접목시켜 각 염색체별로 약 2~4Mbp 정도 되는 대량의 염기서열 정보를 손쉽게 얻을 수 있었다. 마지막 네 번째 *rxp* 유사부분은 이 세 군데의 염기서열을 이용한 BLAST 검색을 통해 알 수 있었으며, Medicago에서 *rxp* 유전자 부분의 orthologous regions 또한 유사한 방법으로 찾을 수 있었다. 본 연구를 통해 추가적으로 밝혀진 *rxp* 유사부분은 기존에 밝혀진 유전자 지도에 자체적으로 개발한 생물정보학 도구를 이용하여 모두 *in silico* mapping을 수행하였으며, 그 결과 최종적으로는 *rxp* 유전자 유사부분이 콩에서 네 군데, 그리고 이들의 orthologous region에 해당하는 부분이 Medicago에서 두 군데로 밝혀졌다 (Fig. 18).

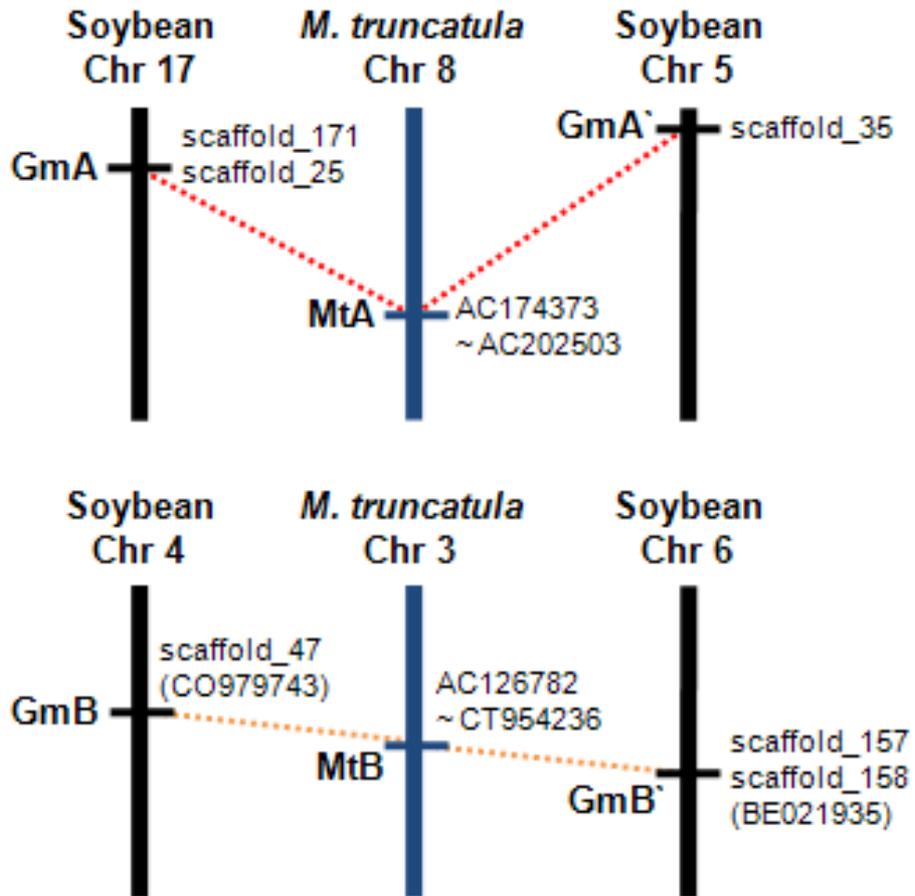


Figure 18. 콩과 Medicago에서의 *Rxp* 유전자 유사부분

Table 11. *rxp* 인접 유전자 쌍의 Ks value

Combinations of pairs	Median Ks (No. gene pair)
Ancient polyploidy	
Mt-Mt paralog	0.85 <sup>a</sup> (2)
MtA-MtB	0.85 (2)
Gm-Mt paralog	0.75 <sup>b</sup> (65)
GmA-MtB	0.72 (14)
GmA'-MtB	0.80 (15)
GmB-MtA	0.77 (15)
GmB'-MtA	0.71 (21)
Gm-Gm paralog	0.65 <sup>c</sup> (251)
GmA-GmB	0.67 (58)
GmA-GmB'	0.66 (66)
GmA'-GmB	0.66 (62)
GmA'-GmB'	0.62 (65)
Taxon divergence	
Gm-Mt ortholog	0.59 <sup>d</sup> (186)
GmA-MtA	0.63 (62)
GmA'-MtA	0.54 (56)
GmB-MtB	0.59 (33)
GmB'-MtB	0.58 (35)
Recent polyploidy	
Gm-Gm paralog	0.17 (407)
GmA-GmA'	0.16 (211)
GmB-GmB'	0.17 (196)

<sup>a, b, c</sup> The median Ks value of paralogous genes show differential evolutionary rates between *G.max* and *M.truncatula*

<sup>b, d</sup> A comparison of Gm-Mt paralogs and Gm-Mt orthologs indicates a polyploidy in the common ancestor of *G.max* and *M.truncatula*

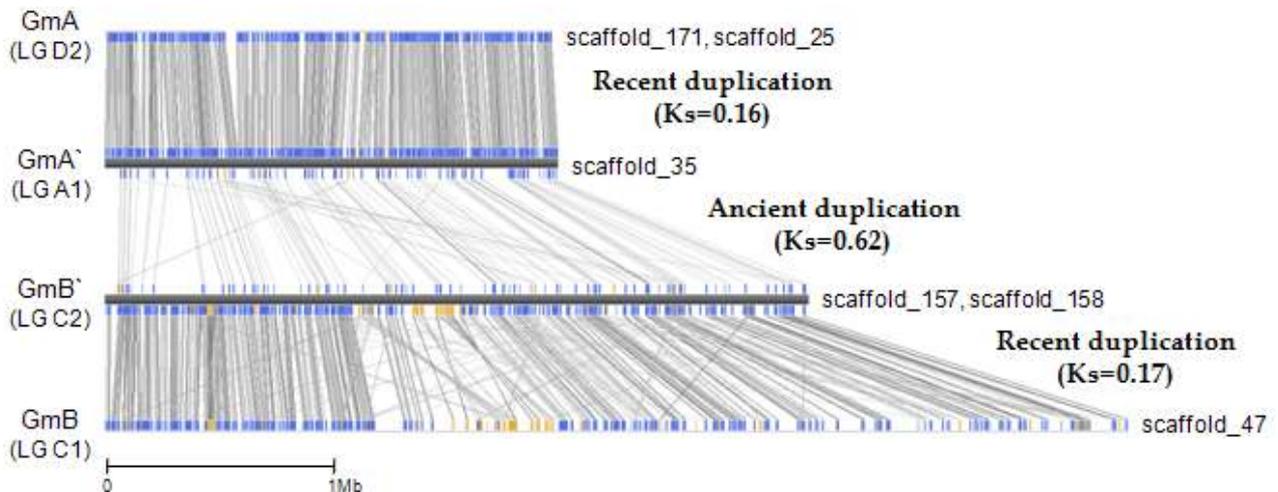


Figure 19. *rxp* 유전자 유사부분

**라. *rxp* 유전자 유사부분 간의 염기서열 분석**

콩과 Medicago 간의 진화적 유연관계를 밝히기 위해 Ks와 Ka 값을 계산하였다 (Table 11). 먼저 모두 6개 부분에 해당하는 *rxp* 유전자 관련 부분의 주변 유전자들을 예측 프로그램인 FgeneSH (<http://www.softberry.com>)을 이용하여 그 구조를 밝혔으며, 예측된 유전자 간에 유사성이 높은 것들을 묶어 그룹화 하였다. 또한 콩과 Medicago 염색체 간의 상호관계에 따라 paralog와 ortholog를 구분하였으며 모든 유전자 쌍들은 PAML package를 이용하여 독립적으로 Ks와 Ka 값을 구하였다. 계산된 Ks value를 통해 콩과 Medicago의 분화시기가 0.59인 것을 밝혀내었으며, 이는 상대적으로 오래된 염색체배가 사건이 콩과 Medicago의 종 분화 이전 (0.75)에 발생하였다는 것을 나타내고 있다. 기존에 보고된 결과와 같이 Mt-Mt paralog와 Gm-Gm paralog이 일치하지 않는 것으로 나타났으며, 두 종의 염기서열 변화 속도가 차이가 있다는 것을 증명하였다. 또한 가까운 과거에 콩에서만 독립적으로 일어난 염색체배가 사건의 시기 또한 0.17로 밝혀졌으며, 이는 기존에 보고된 연구와 거의 일치하는 결과이다.

콩에서의 4개의 *rxp* 유사부분의 염기서열을 BLASTZ 분석을 통해 비교분석하여 이를 GBrowse 및 SynBrose (<http://www.synbrowse.org>) 프로그램을 통해 시각화 (Visualization)하였다 (Fig. 19). 그 결과 GmA와 GmA` 또는 GmB와 GmB` 간에는 상대적으로 매우 높은 synteny를 나타내었으며, GmA` 과 GmB` 간에는 상대적으로는 앞의 두 쌍보다 낮은 synteny를 보였으나 여전히 많은 수의 유전자들이 두 부분 간에 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 콩과 Medicago 간의 염기서열 분석에서도 많은 수의 유전자들이 여전히 보존되어 있는 것을 확인하였으며, Medicago의 유전체는 상대적으로 콩보다 이배체화 (diploidization)가 상당히 많이 진행된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 20).

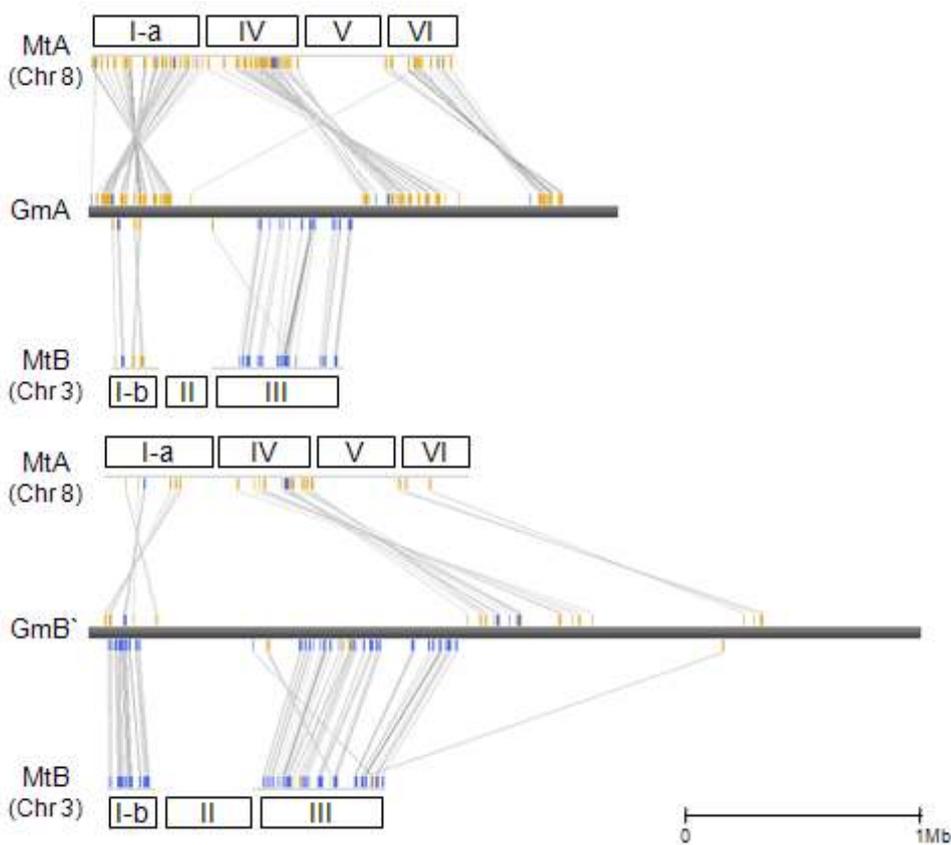


Figure 20. 콩과 Medicago 간의 염기서열 분석

**마. *rxp* 유전자 인근 부분의 진화 모식도**

콩과 *Medicago*와의 비교유전체 분석을 통해 두 종의 공통 조상이 가지고 있었던 유전체 구조를 예상하였으며, 본 연구를 통해 밝혀낸 염색체배가 사건들을 겪으며 일어났었던 두 유전체의 구조 변화를 예측하여 다음의 모식도로 나타냈다 (Fig. 21).

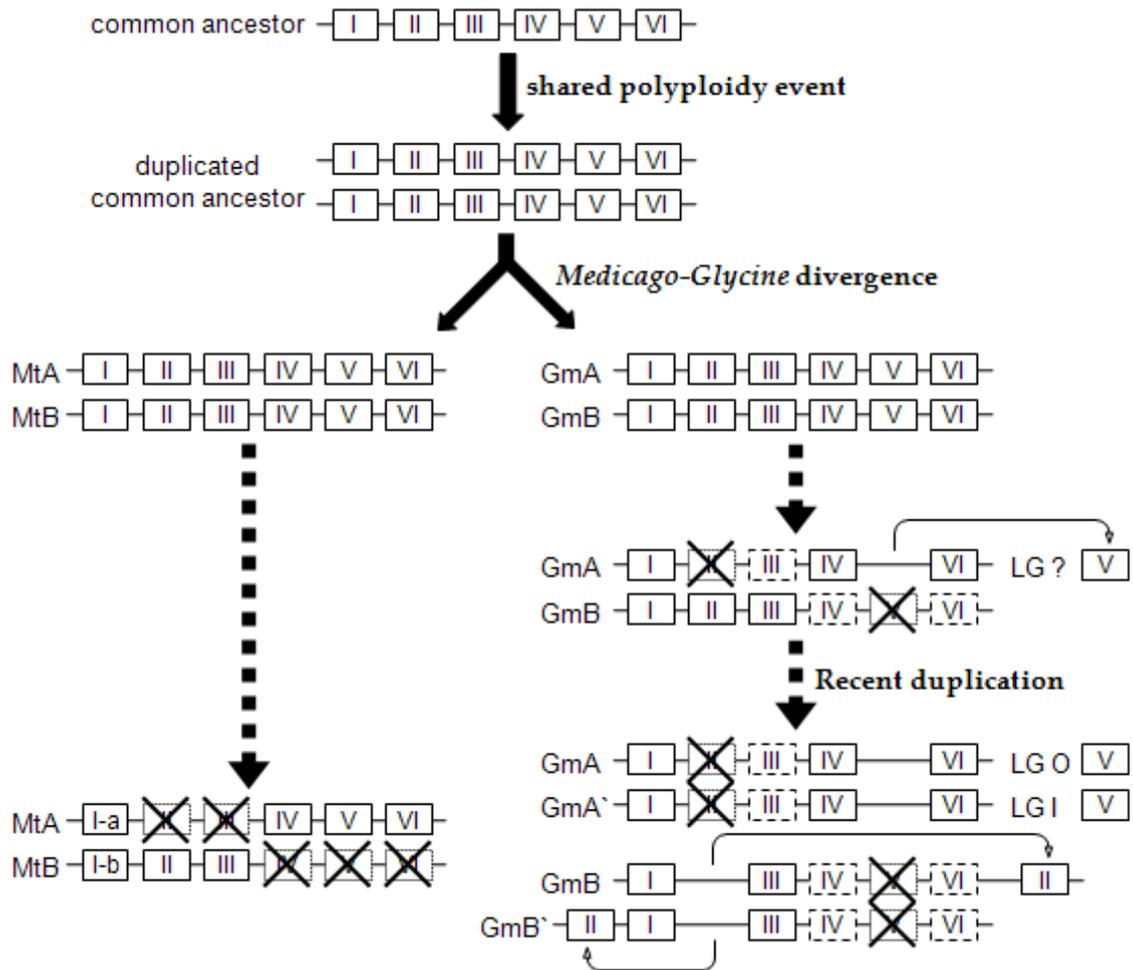


Figure 21. *rxp* 유전자 인근 부분의 진화 모식도

위의 모식도를 통해 콩의 diploidization 과정이 *Medicago*에 비해 느리며 보다 많은 구조적 변화를 겪은 것을 알 수 있다. 특히 Block II과 V는 다른 염색체 부분으로 이동하는 translocation을 겪은 것으로 예상하고 있다.

**바. *rxp* 유사부분의 양적형질 보존**

본 연구에서 밝혀진 바와 같이 *rxp* 인근 유전체는 진화 과정에서 많은 구조적 변화를 겪었다. 하지만 이들 간에는 여전히 높은 synteny를 나타내고 있으며 많은 유전자들이 보존되어 있다. 그러하기에 불마름병 저항성을 포함하여 이 네 부분에서 발현되는 유전자들이 유사한 기능을 하는지에 대해 조사하였다. 그 결과 불마름병 저항성은 물론 많은 수의 양적형질들이 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 22).

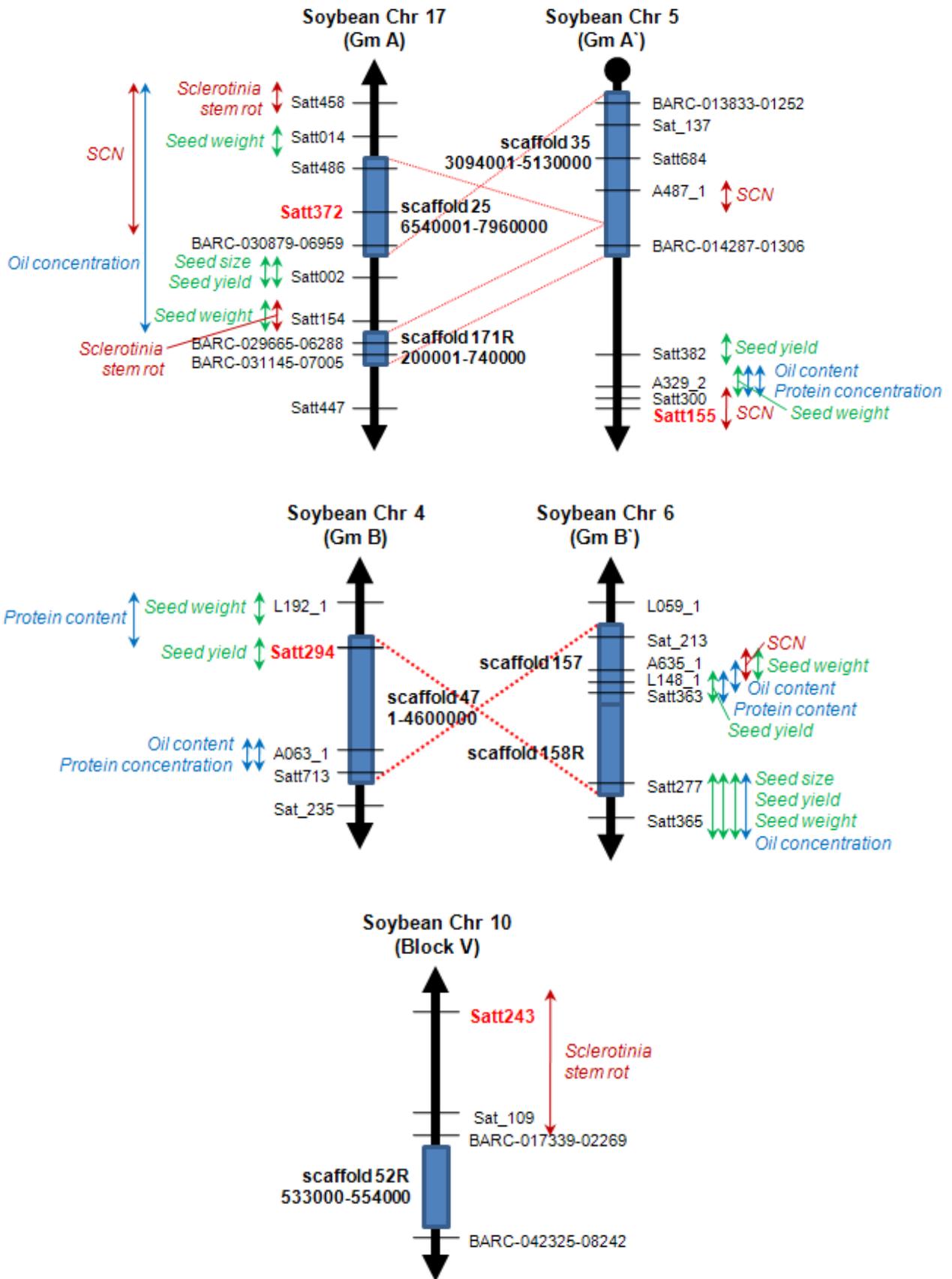


Figure 22. *rxp* 유전자 유사부분에 보존되어 있는 양적형질

## 사. 결론

지난 몇 년 사이에 유전자 분석 기술 향상을 통해 현재 엄청난 양의 유전체 정보들이 매일 쏟아지고 있다. 이제는 유전체 정보를 얻는 방법보다는 이들 가운데서 옥석을 가려내는 방법이 더 중요해지고 있다. 이미 밝혀진 *rxp* 인근 부근의 유전체 정보를 토대로 이와 유사한 부근에 대한 분석을 수행하였다. 이러한 종 안에서의 중복부분과 종간의 유사 부분에 대한 비교유전체 분석을 통해 밝혀진 많은 정보들이 앞으로의 *rxp* 유전자 동정과 그 기작을 밝히는데 큰 역할을 하리라 기대한다.

## 3. Lipoxygenase 염기서열분석

### 가. 기존 연구현황

콩의 종실에는 단백질이 풍부하고 지방 함량이 다른 곡물에 비하여 높아 영양상으로도 그 가치가 높다. 콩을 이용한 식품을 만들 때에 가공 과정에서 가장 문제가 되는 것이 콩의 종실에서 나는 특유의 비린내이다. 이를 없애기 위해 열처리, 화학물질 처리 등의 다양한 식품 가공적 방법이 개발되어 왔으나 이러한 방법들은 비린내를 완벽하게 없애지 못하며, 또한 처리 과정에서 영양성분을 파괴시키는 등의 단점이 있다. 이 비린내는 콩에 존재하는 리폭시게나아제(lipoxygenase)라는 효소가 리놀레산과 리놀렌산 등의 불포화 지방산을 산화시키는 과정에서 발생하며 여러 가지의 동위 효소 (isozyme)가 존재하여 유전자군 (gene family)을 이루고 있다.

유전자군을 이루는 유전자의 숫자가 늘어나는 기작은 크게 세가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째로는 생물체의 염색체 자체가 배가됨으로 인하여 개별 유전자의 숫자가 늘어나는 염색체 배가 (polyploidy)가 있고, 두 번째로는 유전자 하나가 숫자가 늘어나는 tandem duplication이다. 그리고 다른 주요한 기작으로는 유전자가 염색체상에서의 위치가 변하게 도와주는 transposable elements의 작용으로 인한 것이 있다. 콩은 두 번의 염색체 배가 사건을 겪은 polyploid crop으로 보고되었으며 (Blanc and Wolfe, 2004; Schlueter et al. 2004), 이로 인해 하나의 유전자 마커로 탐색되는 염색체 부분이 한 군데 이상인 것으로 알려져 있다 (Shoemaker et al. 1996).

현재까지 콩의 리폭시게나아제의 유전자는 상당히 많은 숫자가 보고되고 각각의 특성에 대한 연구가 수행되어왔다. 그러나 각각의 리폭시게나아제 유전자들이 염색체상에 어떤 위치에 존재하며 어떠한 진화적 과정을 통하여 여러 개로 증가되어 multigene family를 이루게 되었는지는 현재까지 명확하게 밝혀지지 않았다. 이를 밝히기 위하여, 종실에서 주요하게 발현이 되는 것으로 알려진 콩의 리폭시게나아제 1, 2, 3의 염색체상의 위치를 확인하고 진화적으로 어떤 관계에 있는지 알아보는 것을 실험의 주요 목적으로 한다. 동시에 콩의 리폭시게나아제 부분과 신데니를 나타내는 메디카고의 염색체 부분을 찾아 콩과 메디카고의 비교 유전체학을 수행하여 콩과 메디카고의 분화 및 진화적인 사건을 구명해내도록 한다.

### 나. 연구방법 및 절차

#### (1) BAC clone을 이용한 리폭시게나아제 유전자 탐색

콩의 게놈은 크기가 크고 반복서열이 많아 구성이 복잡하므로 genomic DNA를 직접 연구

에 사용하는 대신, 이를 제한효소를 이용하여 적당한 길이로 잘라 만든 Bacterial artificial chromosome (BAC) library를 사용하였다. 이후 미국 에너지성에서는 바이오에너지 개발의 일환으로 콩의 염기서열을 분석하는 연구를 지원하였고 그 첫 번째 결과로 지난 1월 Public database에 그 초안 결과를 공개하였다 (Fig. 23. [www.phytozome.com](http://www.phytozome.com)). 이 데이터베이스에는 염기서열 분석단편들을 모아 contig를 만들고 이들을 gap size를 추정하여 연결한 scaffold들을 검색할 수 있도록 되어 있다. 이를 이용하여, 2007년에 시퀀싱하였던 BAC의 염기서열을 포함하고 있거나 비슷한 서열을 가지고 있는 scaffold를 다운로드 받아 분석에 사용하였다. 2007년에 BAC을 선발하여 시퀀싱 할 때에는 시간이 오래 소요되고 얻을 수 있는 염기서열의 길이도 평균 150kb였으나, Scaffold의 길이는 훨씬 길어 연구의 속도를 빠르게 하였고 밝혀지지 않은 염기서열로 인한 연구의 제한점을 많은 부분에 있어 해소하여주었다.

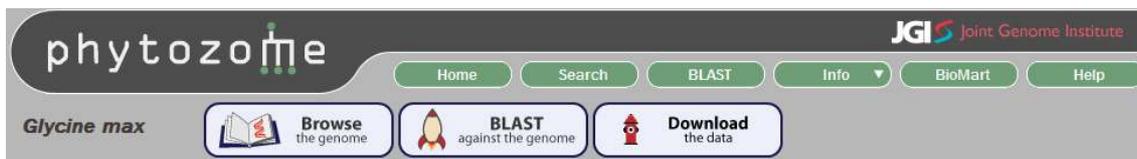


Figure 23. Phytozome

#### (2) 메디카고와의 비교유전체학

콩에서 리폭시게나아제를 가지고 있는 부분 및 이와 신테니를 가지고 있는 메디카고 부분의 진화적인 관계를 구명하기 위하여  $K_s$  및  $K_a$  값을 구하였다. 단백질을 코딩하는 부분인 엑손 (exon) 염기에 변화 (mutation)이 생겼음에도 불구하고 합성되는 단백질이 변하지 않았을 때 이러한 변화는 synonymous mutation이라고 한다. Synonymous mutation은 단백질의 변화를 수반하지 않기 때문에 생명체의 표현형에 차이를 나타내지 않으므로 시간이 지날수록 더 많이 게놈 상에 축적이 되게 된다. 따라서 이 값이 얼마나 많이 축적되었는가를 계산하는 방법을 이용하여 콩과 메디카고에 존재하는 ortholog, paralog와 같은 homolog 들의 분화 시기를 추정할 수 있게 된다. 이 Synonymous substitution rate는  $K_s$  value라고 한다.

#### (3) $K_s$ value를 통한 진화적 사건의 시기 추정 방법

$K_s$  value를 구하기 위하여 콩과 메디카고의 리폭시게나아제 부분들을 Dot-Plot (<http://pipmaker.bx.psu.edu/cgi-bin/pipmaker?basic>) 분석을 하고, 좀 더 자세히 유전자 체계 (structure)를 비교하기 위하여 BLASTZ분석을 한 후 이를 GBrowse 및 SynBrose (<http://www.synbrowse.org>) 프로그램을 이용하여 시각화 (Visualization)하였다. 또한 시퀀스 안에서 유전자 부분을 예측하는 프로그램은 FgeneSH (<http://www.softberry.com>) 를 사용하였다.

#### (4) 리폭시게나아제 유전자들의 진화적인 유연관계 분석 (Phylogenetic analysis)

콩에서와 메디카고에서 탐색한 6개의 리폭시게나아제 부분에 존재하는 리폭시게나아제 유전자들 간의 유연 관계를 분석하기 위하여 phylogenetic analysis를 수행하였다. Gene family 유전자들은 상호간에 유사도가 매우 높으므로 Maximum Likelihood 방법으로 1000반복 비교하도록 하였다. 프로그램은 PAUP을 사용하였다.

## 다. 연구결과 및 고찰

리폭시게나아제 유전자 중 종실에서 주요하게 발현이 되는 *Lx1*, *Lx2*, *Lx3*는 콩의 연관군 LG E와 LG F에 있는 것으로 조사되었다. 선발된 BAC의 염기서열은 GS FLX를 이용하여 밝혀졌으며 이들은 NCBI GenBank에 등록되어 accession을 받은 상태에 있다. (gmw1-45b2 (EU028318), gmw1-91g6 (EU028319), gmw1-6b18 (EU028314), gmw1-9c4 (EU028315), gmw1-22a20 (EU028316), and gmw1-22f19 (EU028317)). 염기서열의 초기 자료는 Additional file2에 나타나있다. 이 부분 이외에 추가적으로 콩에서 LG A2와 LG M의 두 곳이 염기서열의 유사성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다.

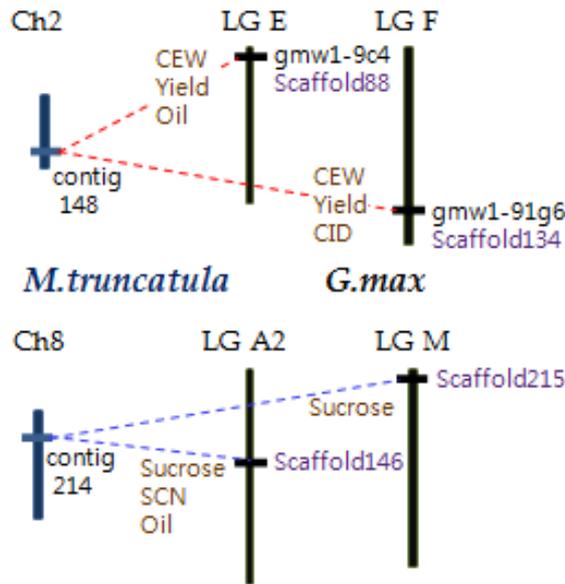


Figure 24. Comparative map of six *Lx* regions from soybean and *Medicago*.

또한 메디카고에는 콩의 리폭시게나아제 유전자부분과 염기서열 유사성을 가지고 있는 부분이 두 곳 탐색이 되었는데 Chr2번은 콩의 LG E와 LG F와 유사도가 높았고, Chr8은 콩의 LG A2와 LG M과 유사도가 높았다. 즉 메디카고의 한 부분에 해당하는 콩의 부분은 2곳이 존재하는 것으로 나타나 Co-orthologous regions인 것으로 보인다.

그리고 콩의 네 부분에 기존에 밝혀진 양적형질 (QTL)에 대한 조사를 수행하였을 때, Corn earworm resistance, yield, oil, sucrose, soybean cyst nematode 저항성과 관련된 양적형질들이 네 부분간에 공통적으로 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 부분들 사이에 공통적으로 나타나는 양적형질들은 위의 네 부분이 원래는 한 부분이었으나 염기서열 배가 사건으로 인해 중복된 부분임을 뒷받침해준다.

메디카고와 콩의 여섯 개 염색체 부분의 염기서열의 유사도를 Pip Maker의 Dot Plot analysis를 이용하여 그래프를 그려보았다 (Fig. 25). MtA와 MtB는 서로 리폭시게나아제 부분을 제외하면 신테니를 나타내는 부분이 거의 없을 정도로 Diploidization이 많이 이루어진 것이 확인되었다.

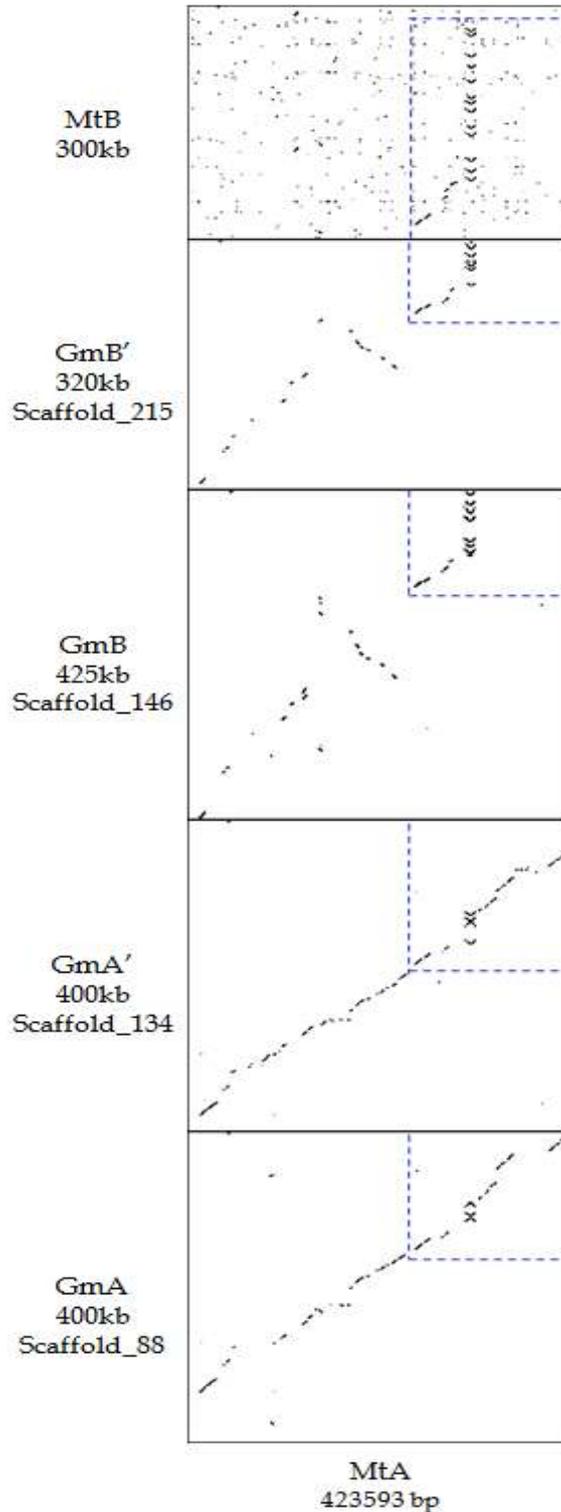


Figure 25. Dot plot alignments of six *Lx* regions between soybean and *Medicago*.

Dot Plot analysis에서 리폭시게나아제 유전자가 있는 부근을 BLASTZ 프로그램을 이용하여 유전자의 레벨에서 염기서열을 비교하여보았다 (Fig. 26). 유전자의 방향과 길이는 화살표의 방향과 길이로 나타내었으며, 리폭시게나아제 유전자는 검은색 박스와 흰 화살표로 다른 유전자와 구분이 되도록 표현하였다. 6개의 부분에서 처음의 3유전자는 모두 공통적으로 존재하는 것으로 나타났지만 뒷부분으로 갈수록 리폭시게나아제 유전자가 반복적으로 나타나 총 34개가

탐색되었다.

이 부분들이 언제 분화가 되었는지 시기를 추정하기 위한 방법으로 PAML package를 이용하여 Ks value를 구해보았다. 6개의 부분을 상호 비교하였고 이는  ${}^6C_2=6 \times 5/2=15$ 로 총 열다섯 개의 값을 얻었다. 이 때, Ks value를 비교하여 보았을 때 Mt-Mt paralog, Gm-Gm paralog를 비교한 값은 기존의 보고들에서 일치하지 않는 것으로 나타났으며 본 연구에서도 Mt-Mt값은 0.75였고 Mt-Gm의 값은 0.46으로 두 값의 차이가 컸다 (Table 12 and Additional file 1). 이러한 값의 차이의 원인으로 기존 연구들에서는 메디카고가 콩과 분화된 이후에 allopolyploidy에 의해 다른 염색체를 가지게 되었을 가능성과 두 종의 염기서열의 변화 속도가 다를 가능성을 제시하였다. 이번 연구에서는 Mt-Gm paralog의 값을 구하여 Mt-Mt값과 Gm-Gm값을 비교함으로써 두 종간의 염기서열의 변화 속도가 다르다는 것을 증명하였다 (Table 13).

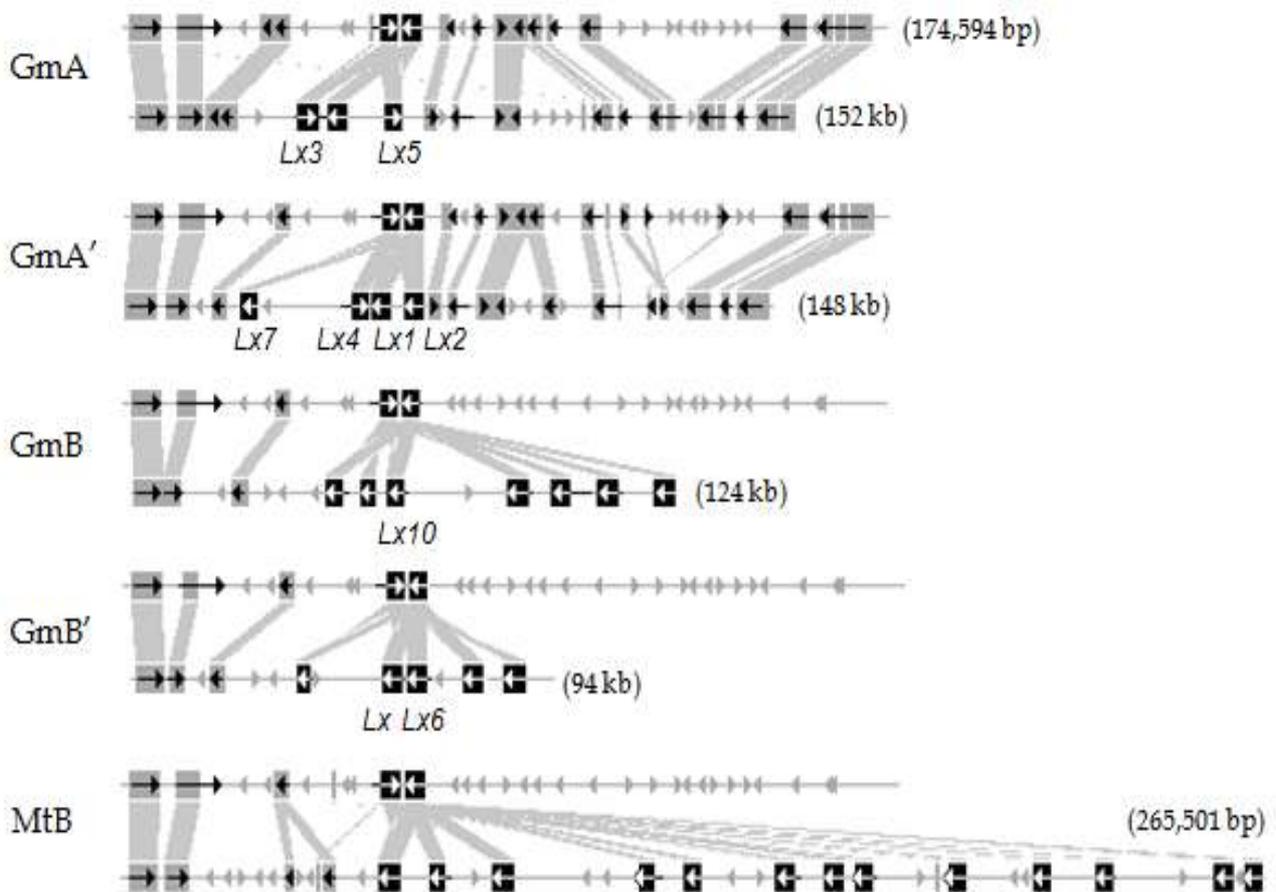


Figure 26. Diagrammatic representation of gene conservation between the six *Lx* regions by BLASTZ.

따라서, 진화적인 사건을 추정을 할 때에 기존에는 Mt-Mt paralog의 값과 Gm-Gm paralog의 값이 다르고, 또한 Gm-Mt ortholog의 값이 Gm-Gm paralog값과 비슷하였기 때문에 콩에서 일어났던 두 번의 염색체 배가 사건이 메디카고와의 종분화 이전인지 이후인지 명확하지 않았다. Table 12에서 밝혀진 바와 같이 두 종간의 염기서열의 변화 속도와 다르기 때문에, 진화적

인 사건의 시기를 비교할 때에는 반드시 같은 category 안에서 비교를 해야만 정확한 비교가 가능하다는 것을 알 수 있다. 따라서 종분화를 의미하는 값인 Gm-Mt ortholog (Median Ks=0.46) 값과 염색체 배가 사건을 나타내는 값인 Gm-Mt paralog (Median Ks=0.62) 값을 비교하면 염색체 배가 사건이 먼저 일어났다는 것이 확실하다. 종분화 이후에는 콩에서는 한 번의 염색체 배가 사건이 더 있었고, 메디카고에서는 염색체 배가 사건으로 중복된 부분이 탐색되지 않았다. 즉 콩의 두 부분은 메디카고의 한 부분에 해당하는 2:1 구조를 이루고 있는 것으로 보인다.

Table 12. Median Ks values for combinations of pairs between six *Lx* regions from *Medicago* and soybean

Combinations of pairs		Median Ks
<b>Ancient polyploidy</b>		
<b>Mt-Mt paralog</b>		
	MtA-MtB	0.75
<b>Gm-Mt paralog</b>		
	MtA-GmB	0.58
	MtA-GmB'	0.60
	MtB-GmA	0.64
	MtB-GmA'	0.67
<b>Gm-Gm paralog</b>		
	GmA-GmB	0.46
	GmA-GmB'	0.45
	GmA'-GmB	0.48
	GmA'-GmB'	0.46
<b>Taxon divergence</b>		
<b>Gm-Mt ortholog</b>		
	MtA-GmA	0.40
	MtA-GmA'	0.41
	MtB-GmB	0.49
	MtB-GmB'	0.50
<b>Recent polyploidy</b>		
<b>Gm-Gm paralog</b>		
	GmA-GmA'	0.11
	GmB-GmB'	0.10

Table 13. Ks estimations of ancient polyploidy and taxon divergence

Materials	Mt-Mt paralogs <sup>a</sup>	Gm-Mt paralogs <sup>a</sup>	Gm-Gm paralogs <sup>a</sup>	Gm-Mt orthologs <sup>b</sup>	References
ESTs	0.65-0.70	-	0.45-0.50	0.40-0.50	Blanc and Wolfe, 2004
ESTs	0.71	-	0.54	-	Schlueter <i>et al.</i> ,2004
39 Gene families	-	-	0.57±0.05	0.57±0.02	Pfeil <i>et al.</i> ,2005
Lipoxygenases	0.75	0.62 <sup>c</sup>	0.46	0.45 <sup>d</sup>	This study

<sup>a</sup> The median Ks value between paralogs represents polyploidy events.

<sup>b</sup> The median Ks value between orthologs denotes taxon divergence between soybean and *Medicago*.

<sup>c, d</sup> The median Ks values between Gm-Mt paralogs and Gm-Mt orthologs are compared to rule out skewing estimates caused by differential substitution rates.

염색체 부분의 Ks value와 더불어 본 연구에서 탐색된 34개의 리폭시게나아제 유전자의 유연관계를 분석하였다 (Fig. 27). 34개 리폭시게나아제들의 유사도를 볼 때 크게 두 부류로 나누어볼 수 있었고 이는 흰색과 검은색의 네모 상자로 표시하였다. 각각 흰색과 검은색의 유전자들을 보았을 때, GmB에 있는 유전자들은 GmA보다 MtB에 있는 유전자들과 더 유사한 것으로 나타났고, 그 이후에 tandem duplication에 의해 리폭시게나아제 유전자들의 숫자가 증가한 것을 알 수 있었다. 즉, 6개의 homologous regions에 있는 유전자들의 유연관계 역시 종분화 이전과 이후에 한 번씩 염색체 배가 사건이 있었던 것을 지지하는 결과를 나타냈다.

또한 종분화 이전에 공통조상 상태에서 이미 적어도 두개 이상의 독립적인 리폭시게나아제 (흰색과 검은색) 유전자가 존재했던 것으로 보인다. 따라서 리폭시게나아제 유전자는 공통조상에서 리폭시게나아제 유전자가 2개 있었고, 공통조상에서 염색체 배가 사건으로 인하여 A genome과 B genome으로 나누어졌으며, 그 이후에 종분화가 일어나고 종분화 이후 콩에서 염색체 배가 사건이 한 번 더 일어나 GmA, GmA', GmB, GmB'이 생겨난 것으로 밝혀졌다 (Fig. 28).

그리고 tandem duplication이 현재의 콩과 메디카고의  $L_x$  regions에 여러 개의  $L_x$  가 존재하게 만든 것을 알 수 있다 (Fig. 28). 특히나 MtB에는 흰색 네모상자로 표시된  $L_x$  유전자가 11개나 되어 총 13개의  $L_x$  유전자가 존재하고 다른 유전자들은 사라져 다른 염색체 부분과의 염기서열 유사성을 잃은 것으로 나타났다. NCBI에서 콩의 리폭시게나아제 유전자로 등록된 13개 중에서 9개가 이번에 연구된 부분에 존재하는 것으로 나타났으며 이는 9개의 유전자가 중복된 이후에도 발견되고 있다는 것을 나타낸다 (Additional file 1).

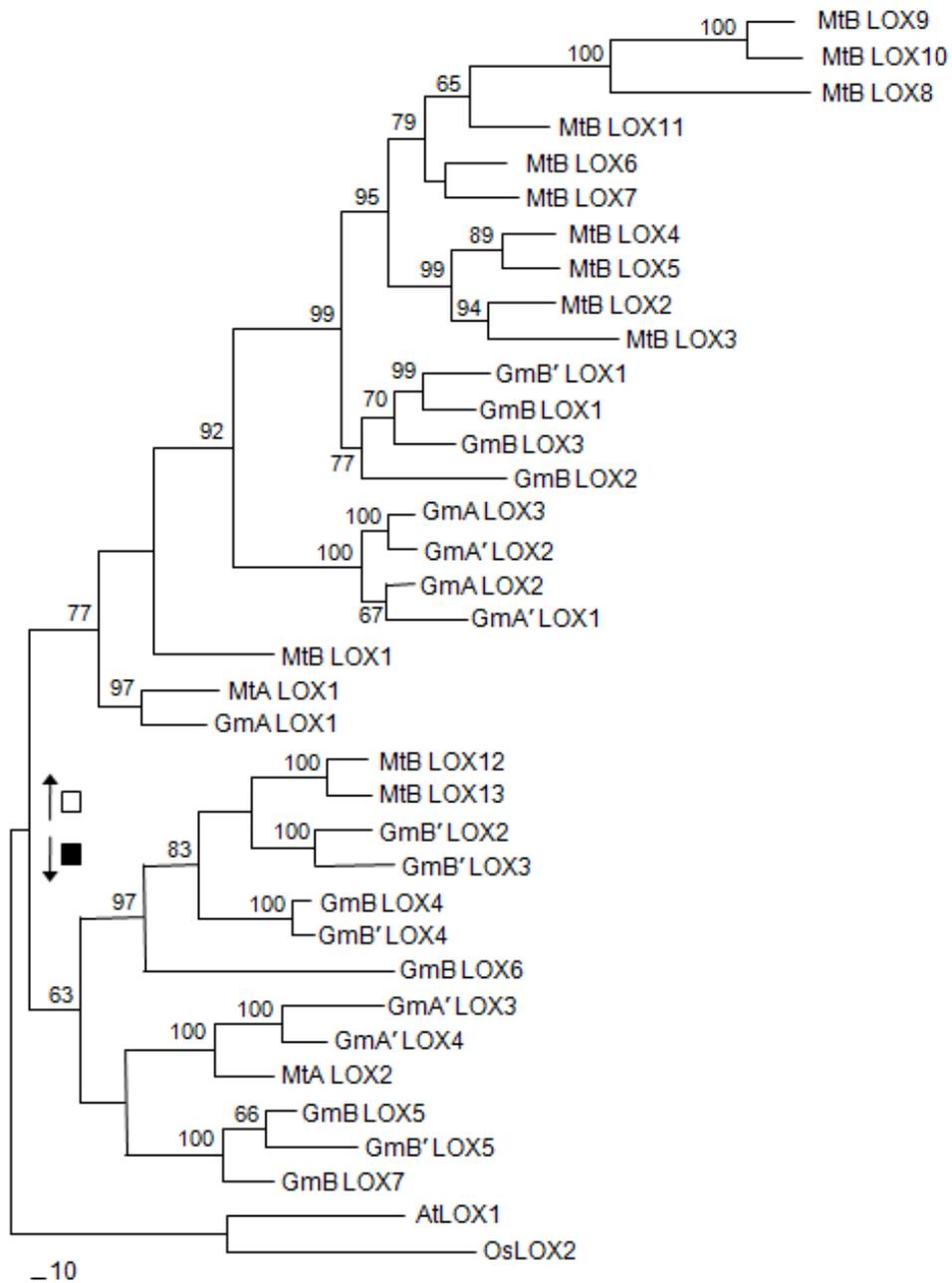


Figure 27. Phylogenetic analysis of 34 *Lx* proteins.

## 라. 결론

이번 연구에서는 콩에서 리폭시게나아제 유전자를 이용하여 콩에서 있었던 두 번의 염색체 배가 사건으로 인해 생성된 염색체 부분을 염기서열 수준(Sequence level)에서 연구함으로써, 콩의 유전체가 GmA, GmA', GmB, GmB'의 네 가지로 나누어볼 수 있다는 것을 밝혔다. 현재 콩을 보았을 때에는 2배체로 보이지만 실제로는 4배체의 흔적이 염색체에 남아있는 것이다. 따라서 콩을 유전육종 하고자 할 때에는 한 가지 유전자에 해당하는 부분이 이론적으로 네 부분 있을 것으로 생각하고 다른 부분에 존재하는 유전자가 발현될 가능성에 대하여 연구를 함께 해나가야 효율적이라는 것을 보여준다.

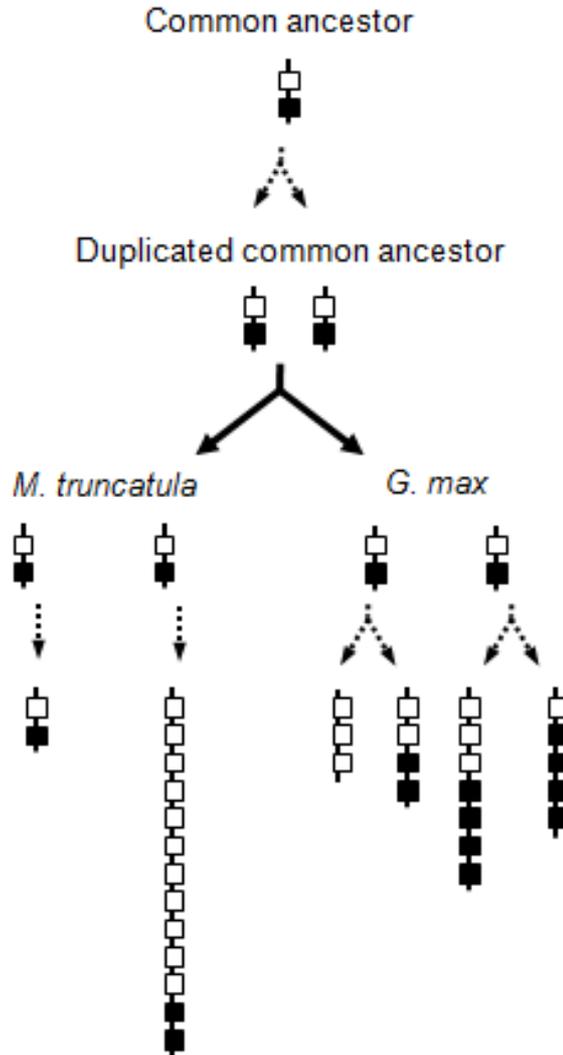
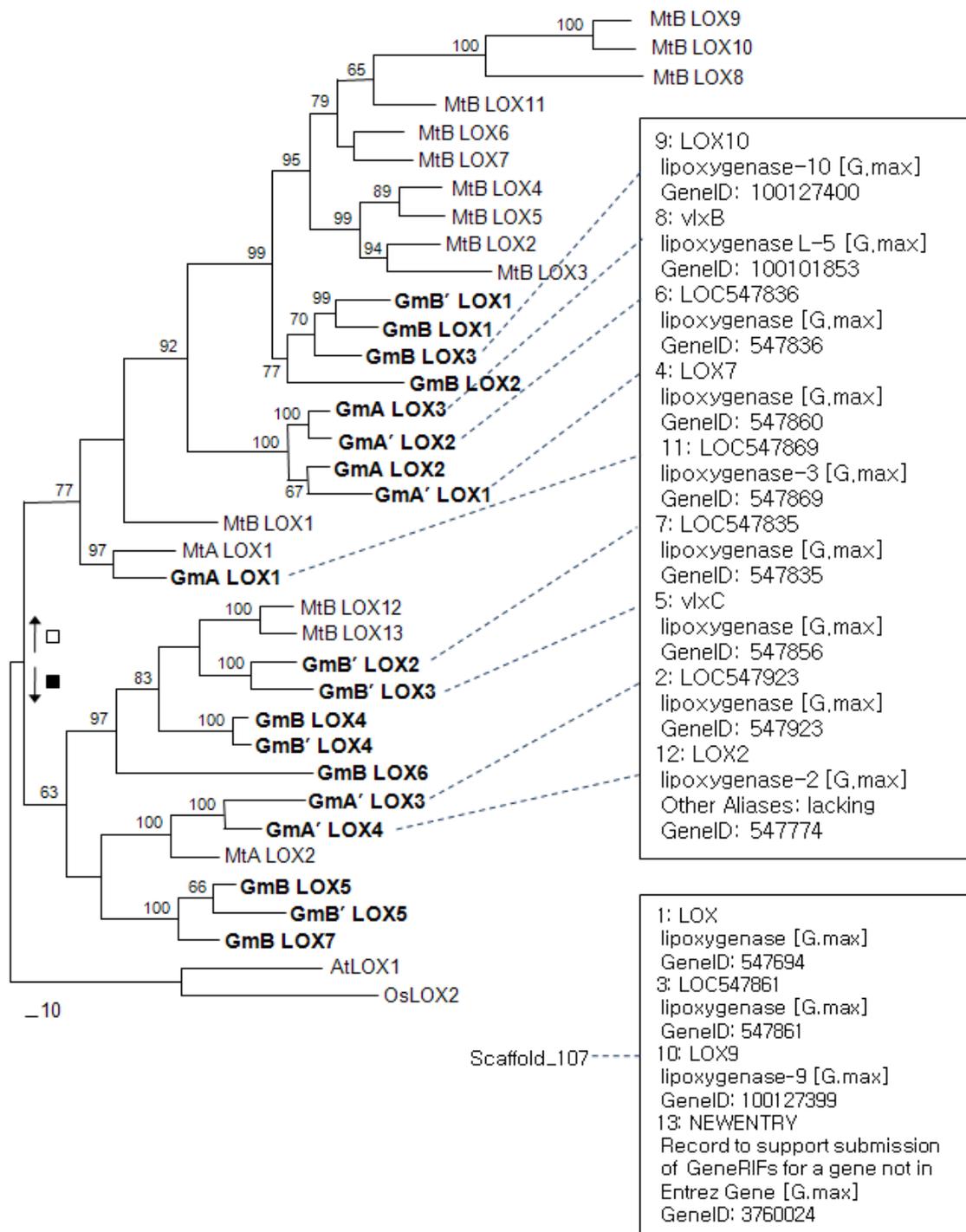


Figure 28. Expansion of the lipoxygenase gene family in soybean and Medicago homologous regions in relation to the evolutionary events in the six regions

또한 이번 연구에서 밝혀낸 메디카고와 콩의 공통조상은 대부분의 콩과 작물들의 공통조상일 것으로 추정된다. 왜냐하면 메디카고는 완두, 메디카고, 로투스 등을 포함하는 Hologalegina clade에 속하고, 반면 콩은 콩, 강낭콩, 팥등이 속한 Phaseoloid-millettioid clade에 속하기 때문이다 (Shoemaker et al. 2006). 따라서 위의 두 clades에 속하는 작물을 연구할 때에는 본 연구에서 밝혀진 콩과 작물의 공통조상에서 있었던 염색체 배가 사건에 대한 정보가 도움이 될 것으로 예상된다.

**Additional file 1.** Lists of GenBank GeneIDs corresponding to soybean *Lx* genes with their phylogenetic relationships.



**Additional file 2.** Assembly statistics of six BAC clones from GS-FLX.

BAC	Number of reads <sup>a</sup>	Contigs	Total length <sup>b</sup> (bp)	Average contig length(bp)	Largest contig(bp)
gmw1-45b2	9,654	25	142,680	5,707	35,726
gmw1-91g6	5,749	15	116,356	7,757	19,573
gmw1-6b18	6,228	18	159,654	8,869	27,116
gmw1-9c4	5,192	20	130,993	6,549	15,468
gmw1-22a20	6,554	1	36,048	36,048	36,048
gmw1-22f19	7,771	1	35,942	35,942	35,942

<sup>a</sup> Number of reads assembled

<sup>b</sup> Total length in assembly

**Additional file 3.** Pairwise comparisons of Ks values between homologous genes.

SEQ1	SEQ2	Ka	Ks	Ka/Ks	PROT_%	CDNA_%
<b>Mt-Mt paralog</b>						
1. MtA-MtB						
MtA_1	MtB_1	0.0949	0.6456	0.1471	83.14	83.42
MtA_2	MtB_2	0.0917	0.7759	0.1181	83.69	83.19
MtA_5	MtB_8	0.2207	0.7556	0.2921	68.52	75.1
MtA_5	MtB_11	0.0215	0.7506	0.0286	94.19	86.44
	Median		0.7531			
<b>Gm-Mt paralog</b>						
2. MtA-GmB						
MtA_1	GmB_1	0.0793	0.5821	0.1363	85.12	85.04
MtA_2	GmB_2	0.0960	0.6501	0.1476	83.69	84.04
MtA_5	GmB_4	0.0212	0.4733	0.0448	94.19	88.86
	Median		0.5821			
3. MtA-GmB'						
MtA_1	GmB'_1	0.0809	0.5967	0.1356	84.87	84.79
MtA_2	GmB'_2	0.0899	0.6217	0.1447	84.32	84.6
MtA_5	GmB'_4	0.0213	0.4576	0.0465	94.19	89.1
	Median		0.5967			
4. MtB-GmA						
GmA_1	MtB_1	0.0913	0.6267	0.1457	83.87	83.78
GmA_2	MtB_2	0.0832	0.5737	0.1450	85.53	85.53
GmA_4	MtB_8	0.2204	0.6929	0.3181	68.83	75.62
GmA_4	MtB_11	0.0168	0.6446	0.0260	95.88	88.22
	Median		0.6357			
5. MtB-GmA'						
MtB_1	GmA'_1	0.0908	0.6545	0.1387	84.03	83.57
MtB_2	GmA'_2	0.0803	0.5830	0.1378	84.38	85.16
MtB_8	GmA'_4	0.2199	0.7526	0.29227	68.83	75.1
MtB_11	GmA'_4	0.0170	0.6903	0.0246	95.88	87.73
	Median		0.6724			
Median Ks value of all Gm-Mt paralog			0.6242			
<b>Gm-Gm paralog</b>						
6. GmA-GmB						
GmA_1	GmB_1	0.0719	0.5132	0.1401	85.39	85.69
GmA_2	GmB_2	0.0858	0.4606	0.1862	84.89	86.6
GmA_4	GmB_4	0.0097	0.4603	0.0211	97.34	90.4
	Median		0.4606			
7. GmA-GmB'						
GmA_1	GmB'_1	0.0738	0.5009	0.1473	85.92	86.2
GmA_2	GmB'_2	0.0844	0.4471	0.1888	84.68	86.88
GmA_4	GmB'_4	0.0097	0.4455	0.0219	97.34	90.64
	Median		0.4471			
8. GmA'-GmB						
GmA'_1	GmB_1	0.0654	0.5358	0.1220	86.69	85.78
GmA'_2	GmB_2	0.0833	0.4673	0.1783	84.15	86.32
GmA'_4	GmB_4	0.0098	0.4827	0.0202	97.34	90.07
	Median		0.4827			
9. GmA'-GmB'						
GmA'_1	GmB'_1	0.0671	0.5263	0.1275	87.32	86.33
GmA'_2	GmB'_2	0.0802	0.4573	0.1753	84.38	86.64
GmA'_4	GmB'_4	0.0098	0.4559	0.0215	97.34	90.8
	Median		0.4573			
Median Ks value of all Gm-Gm paralog			0.4640			

Additional file 3. Continued

SEQ1	SEQ2	Ka	Ks	Ka/Ks	PROT_%	CDNA_%
Gm-Mt ortholog						
10.	MtA-GmA					
MtA_1	GmA_1	0.0560	0.3899	0.1437	88.63	88.98
MtA_2	GmA_2	0.0614	0.4091	0.1501	84.74	86.08
MtA_4	GmA_3	0.1183	0.4056	0.2916	78.35	85.57
MtA_5	GmA_4	0.0212	0.4035	0.0524	94.19	90.15
	Median		0.4046			
11.	MtA-GmA'					
MtA_1	GmA'_1	0.0547	0.3996	0.1368	89.36	88.87
MtA_2	GmA'_2	0.0642	0.4347	0.1476	87.21	87.91
MtA_5	GmA'_4	0.0212	0.4126	0.0515	94.19	89.59
	Median		0.4126			
12.	MtB-GmB					
MtB_1	GmB_1	0.0802	0.4758	0.1685	85.77	86.15
MtB_2	GmB_2	0.0760	0.4540	0.1674	86.62	87.47
MtB_8	GmB_4	0.2154	0.5470	0.3938	68.83	77.26
MtB_11	GmB_4	0.0184	0.5087	0.0361	95.4	89.75
	Median		0.4923			
13.	MtB-GmB'					
MtB_1	GmB'_1	0.0813	0.4680	0.1738	85.53	86.15
MtB_2	GmB'_2	0.0735	0.4454	0.1650	87.05	87.47
MtB_8	GmB'_4	0.2230	0.5963	0.3740	68.52	76.44
MtB_11	GmB'_4	0.0157	0.5314	0.0296	95.88	89.67
	Median		0.4997			
	Median Ks value of all Gm-Mt ortholog		0.4454			
Gm-Gm paralog						
14.	GmA-GmA'					
GmA_1	GmA'_1	0.0159	0.1055	0.1507	96.62	96.54
GmA_2	GmA'_2	0.0250	0.0766	0.3269	94.87	96.43
GmA_4	GmA'_4	0.0001	0.1300	0.0010	100	96.85
	Median		0.1055			
15.	GmB-GmB'					
GmB_1	GmB'_1	0.0127	0.1000	0.1270	97.3	96.84
GmB_2	GmB'_2	0.0170	0.0874	0.1948	96.2	96.77
GmB_4	GmB'_4	0.0029	0.1263	0.0228	99.52	96.77
	Median		0.1000			

Additional file 4. Descriptions of predicted genes based on UniRef results.

MtA	GmA	GmA'	Descriptions
MtA_1	GmA_1	GmA'_1	Putative phospholipid-transporting ATPase4
MtA_2	GmA_2	GmA'_2	Putative uncharacterized protein - <i>Vitisvinifera</i>
MtA_3			Putative polyprotein - <i>Oryzasativa</i>
MtA_4	GmA_3		-
		GmA'_3	-
MtA_5	GmA_4	GmA'_4	Eukaryotic initiation factor 4A-11 - <i>Nicotianatabacum</i>
MtA_6			MYB transcription factor MYB107 - <i>G.max</i>
MtA_7			-
MtA_8			Putative uncharacterized protein - <i>O.sativa</i>
	GmA_5		-
MtA_9 (MtA_Lx1)			Seed lipoxygenase-3 - <i>Glycinemax</i>
MtA_10 (MtA_Lx2)			Lipoxygenase - <i>G.max</i>
	GmA_6 (GmA_Lx1)		Seed lipoxygenase-3 - <i>G.max</i>
	GmA_7 (GmA_Lx2)		Lipoxygenase - <i>G.max</i>
	GmA_8 (GmA_Lx3)		Lipoxygenase-5 - <i>G.max</i>
		GmA'_5(GmA'_Lx1)	Lipoxygenase - <i>G.max</i>
		GmA'_6	Lipoxygenase - <i>G.max</i>
		GmA'_7 (GmA'_Lx2)	Lipoxygenase-4 - <i>G.max</i>
		GmA'_8 (GmA'_Lx3)	Seed lipoxygenase-1 - <i>G.max</i>
		GmA'_9 (GmA'_Lx4)	Seed lipoxygenase-2 - <i>G.max</i>
MtA_11	GmA_9	GmA'_10	-
MtA_12			-
	GmA_10		-
MtA_13	GmA_11	GmA'_11	-
MtA_14	GmA_12	GmA'_12	-
MtA_15	GmA_13	GmA'_13	Threonine synthase, chloroplast precursor
		GmA'_14	-
		GmA'_15	PHD3 - <i>G.max</i>
	GmA_14		-
	GmA_15		-
	GmA_16		F3N23.2 protein - <i>A.thaliana</i>
MtA_16	GmA_17	GmA'_16	PHD3 - <i>M.truncatula</i>
MtA_17	GmA_18		-
		GmA'_17	-
MtA_18	GmA_19	GmA'_18	-
		GmA'_19	Endochitinase PR4 precursor - <i>Phaseolusvulgaris</i>
MtA_19		GmA'_20	Class IV chitinase precursor - <i>M.truncatula</i>
MtA_20			Class IV chitinase precursor - <i>M.truncatula</i>
MtA_21			-
MtA_22			-
MtA_23			-
MtA_24			-
MtA_25			-
MtA_26			-
	GmA_20		-
MtA_27	GmA_21	GmA'_21	Expressed protein - <i>A.thaliana</i>
MtA_28			-
	GmA_22	GmA'_22	-
MtA_29	GmA_23	GmA'_23	NIN-like protein 2 - <i>Lotusjaponicus</i>

Additional file 4. Continued

MtB	GmB	GmB'	Descriptions
MtB_1	GmB_1	GmB'_1	Putative phospholipid-transporting ATPase4
MtB_2	GmB_2	GmB'_2	Putative uncharacterized protein - <i>V.vinifera</i>
MtB_3			-
MtB_4			-
MtB_5			-
MtB_6			-
MtB_7			-
	GmB_3	GmB'_3	-
MtB_8	GmB_4	GmB'_4	Eukaryotic initiation factor 4A-9 - <i>N.tabacum</i>
MtB_9			-
MtB_10			RNA-directed DNA polymerase , putative
MtB_11			-
	GmB_5	GmB'_5	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	GmB_6	GmB'_6	MYB transcription factor MYB91 - <i>G.max</i>
	GmB_7		Lipoxygenase-10 - <i>G.max</i>
MtB_12			MYB transcription factor MYB91 - <i>G.max</i>
MtB_13 (MtB_Lx1)			Lipoxygenase - <i>Viciafaba</i>
MtB_14 (MtB_Lx2)			Lipoxygenase - <i>Lensculinaris</i>
MtB_15			-
MtB_16 (MtB_Lx3)			Lipoxygenase - <i>Pisumsativum</i>
MtB_17			-
MtB_18			-
MtB_19 (MtB_Lx4)			Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>
MtB_20 (MtB_Lx5)			Lipoxygenase - <i>Caraganajubata</i>
MtB_21			Lipoxygenase-10 - <i>G.max</i>
MtB_22			-
MtB_23 (MtB_Lx6)			Lipoxygenase - <i>L.culinaris</i>
MtB_24 (MtB_Lx7)			Lipoxygenase - <i>L.culinaris</i>
MtB_25 (MtB_Lx8)			Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>
MtB_26			-
MtB_27 (MtB_Lx9)			Lipoxygenase loxN2 - <i>P.sativum</i>
MtB_28			-
MtB_29			-
MtB_30 (MtB_Lx10)			Lipoxygenase loxN2 - <i>P.sativum</i>
MtB_31 (MtB_Lx11)			Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>
MtB_32			-
MtB_33 (MtB_Lx12)			Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>
MtB_34 (MtB_Lx13)			Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>
	GmB_8 (GmB_Lx1)		Lipoxygenase-10 - <i>G.max</i>
	GmB_9 (GmB_Lx2)		Lipoxygenase-10 - <i>G.max</i>
	GmB_10 (GmB_Lx3)		Lipoxygenase-10 - <i>G.max</i>
	GmB_11		-
	GmB_12 (GmB_Lx4)		Seed lipoxygenase - <i>G.max</i>
	GmB_13 (GmB_Lx5)		Seed lipoxygenase-2 - <i>G.max</i>
	GmB_14 (GmB_Lx6)		Seed lipoxygenase - <i>G.max</i>
	GmB_15 (GmB_Lx7)		Seed lipoxygenase-2 - <i>G. max</i>
		GmB'_7 (GmB'_Lx1)	Lipoxygenase - <i>C.jubata</i>
		GmB'_8	-
		GmB'_9 (GmB'_Lx2)	Seed lipoxygenase - <i>G.max</i>
		GmB'_10 (GmB'_Lx3)	Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>
		GmB'_11	-
		GmB'_12 (GmB'_Lx4)	Seed lipoxygenase - <i>G.max</i>
		GmB'_13 (GmB'_Lx5)	Lipoxygenase - <i>P.sativum</i>

## 제 2 세부과제: 콩 유용 유전자 발굴 (숙명여대 천충일)

### 1. $\beta$ -carotene hydroxylase와 동일 대사경로상의 효소 연구

#### 가. 뿌리혹 발달과 xanthophyll cycle enzyme의 관련성 조사

$\beta$ -carotene hydroxylase (BCH)는  $\beta$ -carotene을  $\beta$ -cryptoxanthin으로 또 연속적 zeaxanthin으로 전환하는 역할을 한다. 이러한 carotenoids는 항산화제로 작용하여 photooxidation에 대해 방어해주는 것으로 알려져 있다. 본 연구팀은 선행 연구를 통해 뿌리혹이 발달함에 따라 BCH의 유전자 발현이 증가함을 확인하였다.

BCH에 의해 합성된 zeaxanthin은 xanthophyll cycle에서 zeaxanthin epoxidase (ZEP)에 의해 violaxanthin으로 전환된다. 이렇게 합성된 violaxanthin은 violaxanthin de-epoxidase (VDE)에 의해 다시 zeaxanthin으로 바뀌게 된다. 뿌리혹 발달동안 이들 효소들의 발현 pattern을 조사하기 위해 2 d.p.i., 7 d.p.i., 27 d.p.i. (days postinoculation) 시기의 nodules을 이용해 RT-PCR과 real-time PCR를 수행하였다. 그 결과 Fig. 1A와 같이 뿌리혹이 발달함에 따라서 BCH의 발현은 증가되는 반면, ZEP는 오히려 감소하였다. 이를 통해, 뿌리혹 발달동안 BCH에 의해 합성된 zeaxanthin이 violaxanthin으로 전환되기 보다는 그대로 유지되면서 뿌리혹 발달과정에 영향을 미칠 것이라는 것을 예상할 수 있다. 콩의 여러 조직별로 real-time PCR를 수행한 결과, 다른 부위에서는 어느 정도의 ZEP발현을 볼 수 있었지만, 뿌리혹에서는 거의 발현이 되지 않음을 다시 확인할 수 있었다 (Fig. 1B).

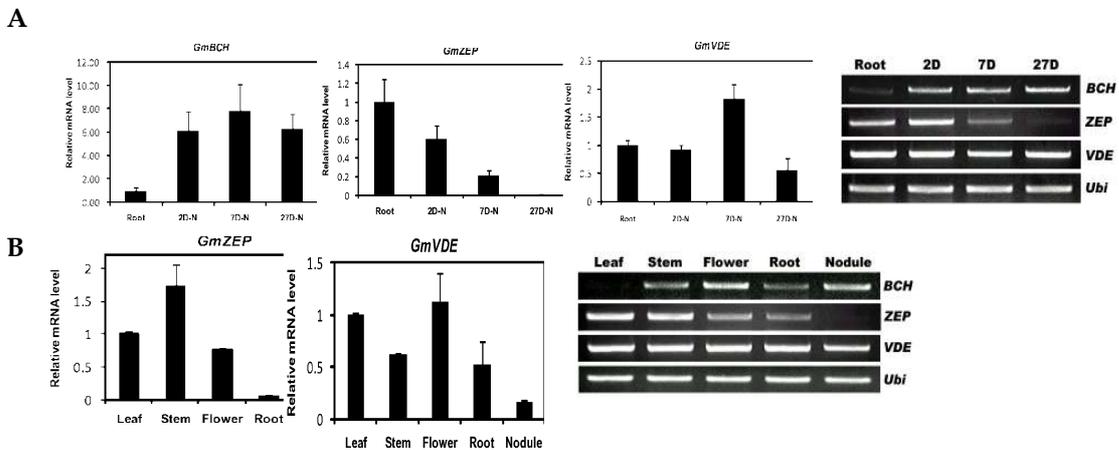


Figure 1. 뿌리혹 발달과 조직에 따른 xanthophyll cycle enzyme을 encode하는 유전자들의 발현 양상. (A) 뿌리혹 발달동안 xanthophyll cycle enzyme 유전자의 발현 패턴. (B) 식물의 여러 기관에서의 xanthophyll cycle enzyme 관련 유전자의 발현 패턴.

#### 나. 잎에서 높은 발현을 보이는 BCH isoform의 분리

식물에서  $\beta$ -carotene hydroxylase와 xanthophyll cycle enzyme에 의해 형성되는 carotenoid는 강한 빛에 의해 형성되는 ROS에 대한 방어의 역할을 주로 하기 때문에 관련 유전자들의 발현이 잎에서 높게 나타난다. 따라서 뿌리혹 발달에 따라 발현이 증가되는 BCH유전자

(*GmBCH1*) 이외에 잎에서 높은 발현을 보이는 BCH isoform의 존재가 예상되어 확인한 결과, BCH isoform (*GmBCH2*)을 확인할 수 있었다. Real-time PCR로 발현을 확인한 결과, 뿌리혹과 flower에서 높은 발현을 보이는 *GmBCH1*유전자와는 달리 *GmBCH2*유전자는 뿌리혹을 제외한 나머지 기관에서 전체적으로 높은 발현을 보이며, 특히 뿌리에서 발현이 가장 많이 증가되었다 (Fig. 2B and C). 이를 통해 이 두 BCH유전자가 식물 내에서 각각 조직특이적인 기능을 할 것으로 예상할 수 있다. RACE 기법을 통해 *GmBCH2*유전자의 full-length cDNA를 클로닝하여 *GmBCH1*과 비교한 결과, 67%의 homology를 보이며, N-terminus부분에 차이가 존재하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2A). *In situ hybridization*을 통해, *GmBCH1*유전자가 뿌리에서는 발현되지 않으나, 뿌리혹 발달에 따라 발현이 증가됨을 다시 확인 할 수 있었다 (Fig. 2D). *GmBCH2*는 뿌리의 pericycle부분뿐만 아니라, 뿌리혹에서도 발현을 관찰 할 수 있었다. 이는 *GmBCH2*유전자의 발현이 식물의 다른 기관에서 워낙 높기 때문에 뿌리혹에서 발현이 상대적으로 감소된다고 하더라도, 어느 정도는 유지 될 것이라는 것을 예상 할 수 있다.

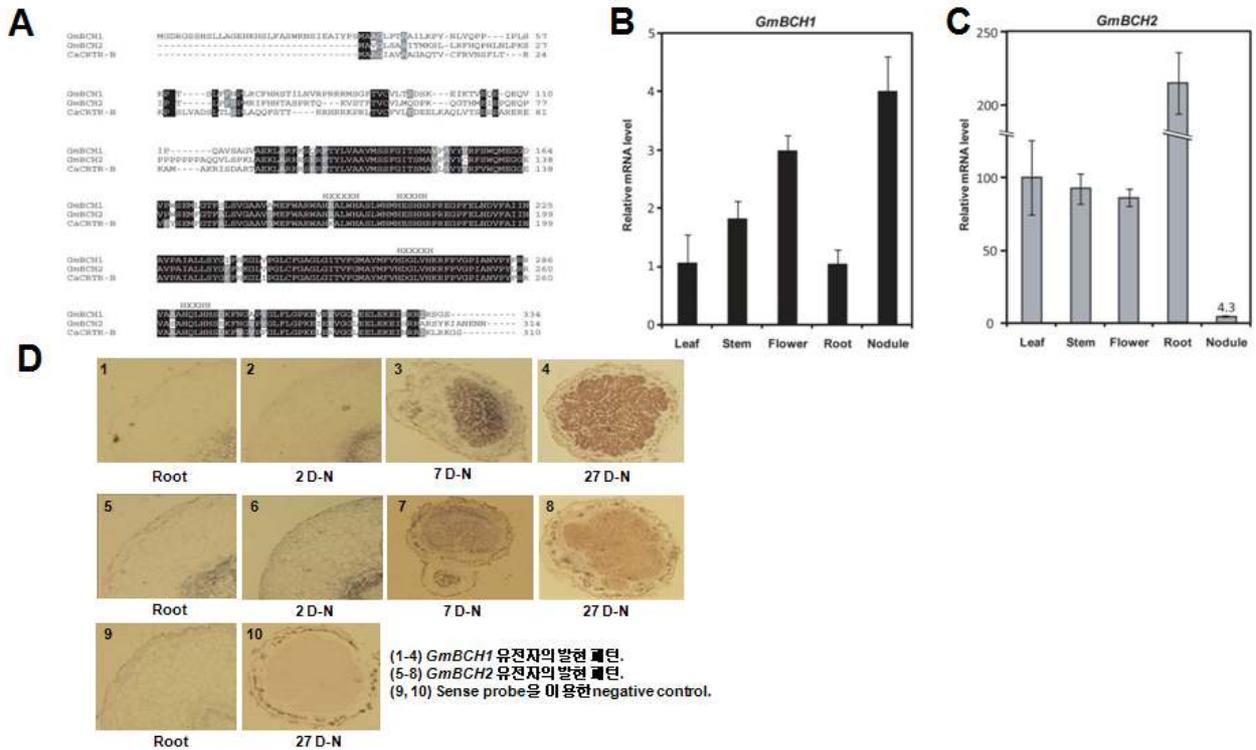


Figure 2. 조직에 따른 *GmBCH1*과 *GmBCH2*유전자의 발현 양상과 아미노산서열 분석. (A) *GmBCH1*과 *GmBCH2*유전자의 아미노산서열의 alignment. (B and C) 식물의 여러 기관에서의 *GmBCH1*과 *GmBCH2*유전자의 발현 패턴. (D) *In situ hybridization*을 통한 뿌리혹 발달에 따른 *GmBCH1*과 *GmBCH2*유전자의 발현 양상.

#### 다. $\beta$ -carotene hydroxylase의 효소활성도의 측정

$\beta$ -carotene hydroxylase의 기능을 연구하고자, *Nicotiana tabaccum*을 이용하여, GmBCH1을 과잉 발현하는 형질전환체가 만들어 졌고 (제 3세부과제팀, Fig. 3A), 이 형질전환체에 대한 분석을 위해 HPLC를 통해 carotenoid의 양을 측정하였다. 그 결과, GmBCH1이 과잉 발현되는 식물체에서  $\beta$ -carotene의 양은 감소되고, violaxanthin 및 다른 xanthophylls의 양은 증가되었다

(Fig. 3B). *E. coli*를 이용한 효소활성도 측정에 의해서, *GmBCH1* 뿐만 아니라, *GmBCH2* 유전자도  $\beta$ -carotene을 zeaxanthin으로 전환시키는 기능을 함을 알 수 있었다 (Fig. 3C).

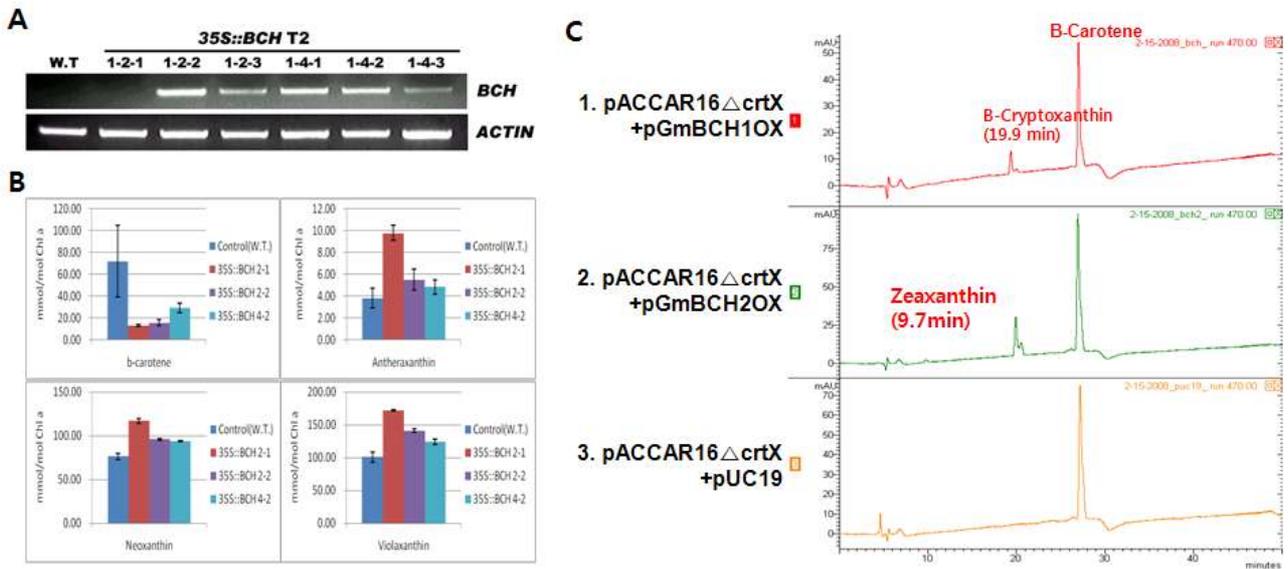


Figure 3. *GmBCH1*과 *GmBCH2*의 효소활성도를 조사하기 위해 *GmBCH1*과 *GmBCH2*가 과잉 발현되는 식물과 *E. coli*에서 carotenoids를 HPLC를 이용하여 측정. (A) RT-PCR를 이용하여  $\beta$ -carotene hydroxylase 과잉발현체를 확인. (B) *GmBCH1*이 과잉 발현되는 식물체내의 carotenoid의 변화. (C) *GmBCH2*가 발현되는 *E. coli*에서  $\beta$ -carotene의 변화.

### 라. *GmBCH1*과 *GmBCH2*의 세포내 위치 조사

기존에 알려져 있던  $\beta$ -carotene hydroxylase 유전자들은 chloroplast transit peptide를 가지고 있어, chloroplast에 위치한다고 알려져 있다. *GmBCH1*는 chloroP server 프로그램을 이용하여, chloroplast transit peptide를 확인한 결과, 기존의 BCH 유전자들과는 달리 chloroplast transit peptide가 존재하지 않는다는 것을 알 수 있다. 그래서 실제로 *GmBCH1*과 *GmBCH2*의 세포내 위치를 알고자 protoplast transformation 방법을 이용하였다. 그 결과, *GmBCH1*은 예상대로, chloroplast가 아닌 cytoplasm에 존재하였으며, chloroplast transit peptide를 가지고 있는 *GmBCH2*는 chloroplast에 위치한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

Chloroplast transit peptide의 sequence가 세포내 localization에 중요한 역할을 하는지 조사하기 위해, *GmBCH2*의 chloroplast transit peptide를 제거한 상태로 위치를 관찰하였다. 그 결과, *GmBCH2*의 위치는 chloroplast에서 cytoplasm으로 변화하였다. 이로써, chloroplast transit peptide가 BCH 유전자가 chloroplast에 위치하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5).

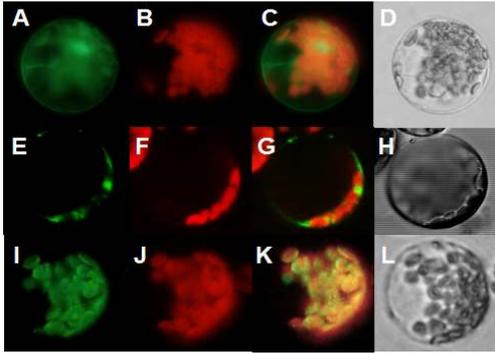


Figure 4. (A-D) 35S-GFP construct로 형질 전환된 protoplast (E-H) 35S-GmBCH1-GFP construct로 형질 전환된 protoplast. (I-L) 35S-GmBCH2-GFP construct로 형질 전환된 protoplast.

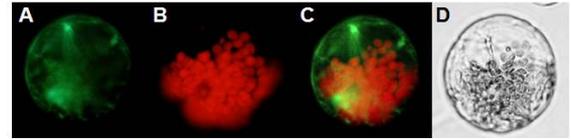


Figure 5. (A-D) 35S- $\Delta$ N-GmBCH2-GFP construct로 형질 전환된 protoplast. Cytoplasm에  $\Delta$ N-GmBCH2가 존재함.

#### 마. GmBCH1의 새로운 isoform의 확인

최근에 밝혀진 soybean의 genome sequence에 GmBCH1 유전자를 alignment해본 결과, N-terminal region만 차이가 나는 homology가 매우 높은 다른 isoform (GmBCH3)을 찾을 수 있었다. 뿌리혹에서 GmBCH3의 발현패턴을 조사한 결과, GmBCH1과 약간의 차이가 났지만, 발현의 증가를 확인할 수 있었다. 이를 통해, 뿌리혹에서 GmBCH1과 GmBCH3가 유사한 기능을 할 것이라는 것을 예측 할 수 있다 (Fig. 6).

GmBCH3는 GmBCH1과는 달리, chloroplast transit peptide sequence를 가지고 있었다. 실제로 실험을 통해 조사한 결과, chloroplast에 위치하였다 (Fig. 7). 이를 통해, 두 유전자에서 차이가 나는 N-terminal region 때문에 위치의 변화가 나타난다는 것을 알 수 있었다.

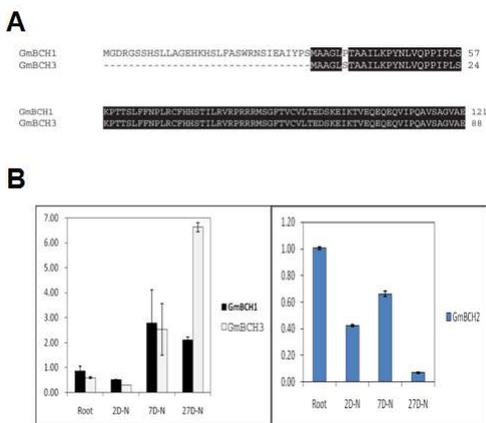


Figure 6. GmBCH1과 GmBCH3 유전자의 N-terminal 부분의 아미노산 서열 분석과 뿌리혹 발달에 따른 발현 양상.

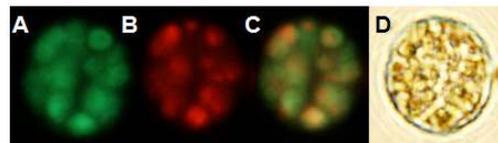


Figure 7. 35S-GmBCH3:GFP construct로 형질 전환된 protoplast.

## 라. 뿌리혹 발달과정에서 $\beta$ -carotene hydroxylase 유전자의 기능 조사

뿌리혹 발달과정에서  $\beta$ -carotene hydroxylase의 기능을 조사하기 위해, RNA interference 기법을 이용하여, *GmBCH1*과 *GmBCH3*의 발현이 동시에 감소되는 형질전환뿌리혹을 만들어서, 뿌리혹의 발달정도를 관찰하였다. 그 결과, *GmBCH*의 발현이 감소될수록, 뿌리혹의 발달이 잘되지 않음을 확인할 수 있었으며, TEM을 이용한 뿌리혹 내부의 관찰 결과도 뿌리혹의 발달이 control에 비해 저해되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 8A-C and 10). 뿌리혹 발달과 관련 있는 유전자인 *Lbc3*의 발현을 조사한 결과 RNAi nodule에서 발현이 감소되었다 (Fig. 8). BCH유전자가 뿌리혹 발달에 중요한 기능을 할 것임을 추측할 수 있다. 뿌리혹 발달에서 acetylene이 ethylene으로 변화하는 과정이 일어난다. 뿌리혹의 발달 정도를 확실히 조사하기 위해, acetylene reduction assay를 통해 *GmBCH* RNAi 뿌리혹에서 생성되는 ethylene량을 측정하였다. 그 결과, 대조군에 비해 많이 감소됨을 확인할 수 있었다. BCH과 ROS와의 관련성을 조사하기 위하여 *GmBCH1*과 *GmBCH3*의 발현이 감소된 뿌리혹에서  $H_2O_2$ 와 superoxide의 양을 염색을 통해 조사한 결과, 대조군에 비해 증가됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 이를 통해, *GmBCH*가 뿌리혹 발달 동안 생성되는 ROS의 양을 감소시켜 뿌리혹의 발달을 돕는 다는 것을 예측할 수 있다.

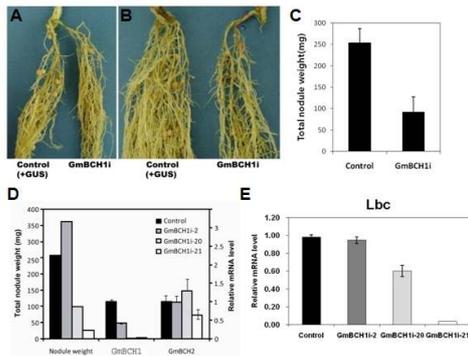


Figure 8. BCH1 RNAi 뿌리혹의 phenotype. (A, B) *GmBCH1-1*과 *GmBCH1*을 동시에 target으로 하는 RNAi construct를 가지고 형질 전환시킨 뿌리혹의 표현형. (C) *GmBCH1i* lines의 total nodule weight. (D) 선발된 *GmBCH1i* line들의 각각의 뿌리혹의 무게, *GmBCH1*, *GmBCH2* 유전자의 발현 정도. (E) Leghaemoglobin gene의 expression level를 측정.

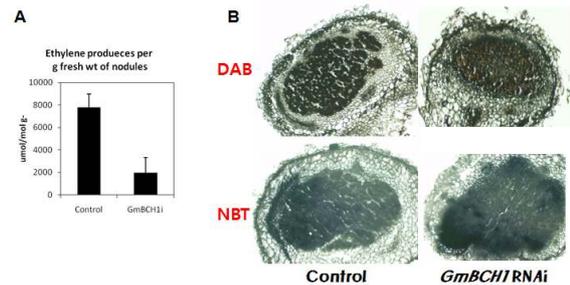


Figure 9. (A) Acetylene reduction assay (B) In situ localization of  $H_2O_2$  and superoxide anions in nodules.

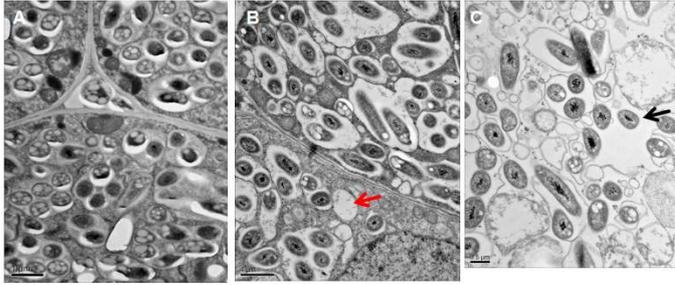


Figure 10. TEM을 이용한 BCH1 RNAi 뿌리혹의 phenotype. (A) Control nodule. (B, C) GmBCH1 RNAi nodule.

## 2. 실용가능성 유전자의 분리 및 기능 조사

### 가. ACP기술을 이용한 유전자 분리

#### (1) ACP기술을 이용한 26개의 유전자 분리

콩의 배아 발달 과정(R1-R6에 따른 분류)에서, R3, R4, R5, R6 stage의 sample을 harvest하였고, RNA 분리 후에 ACP 기술을 이용하여 Differentially expressed genes (DEGs)를 분리하였다 (Fig. 11).

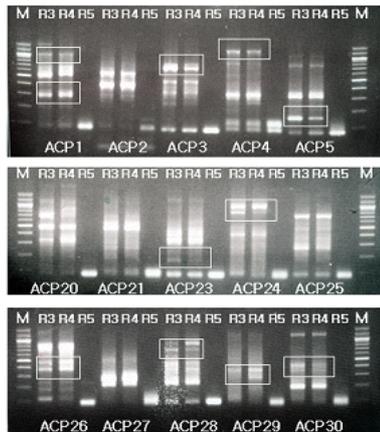


Figure 11. 다른 발달 시기의 RNA로부터 ACP 기술을 이용해 시기특이적 DEG를 얻게 된 실험 결과.

이와 같은 과정을 통하여 찾아낸 총 26개의 DEGs를 T-vector에 cloning하고 sequencing하였고, 이를 NCBI BLAST에 의해 분석하여 그 예상 기능을 조사하였다 (Table 1).

Table 1. Cloning된 DEGs의 NCBI-BLAST를 통한 분석 결과

No.	accession No.	Putative Gene ID	Score(bits)	E value	Identities
1	AA024839	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	347 bits	2.00E-94	161/237 (76%)
2	AAM62480	zinc finger(-like) protein [Arabidopsis thaliana]	154 bits	2.00E-36	80/133 (52%)
3	AAF88746	phosphatidic acid phosphatase beta [Vigna unguiculata]	92.4 bits	4.00E-06	28/47 (59%)
4	AAMB1389	putative 2-oxoglutarate-dependent oxygenase [Oryza sativa]	113 bits	3.00E-24	59/122 (48%)
5	XP476828	armadillo/beta-catenin repeat family protein [Oriza sativa.]	105 bits	1.00E-21	56/71 (78%)
6	CAB89241	putative zinc finger protein [Arabidopsis]	125 bits	4.00E-28	53/61 (86%)
7		No significant similarity found			
8	AAO08321	hypothetical protein, Cell wall-associated hydrolase [Vibrio]	125 bits	6.00E-28	66/91 (72%)
9	AAM62422	Drm4/ ultraviolet-B-inducible auxin-related protein [Pisum]	42.7 bits	0.011	37/77 (48%)
11		No significant similarity found			
12		No significant similarity found			
13	BAD37908	putative metalloproteinase [Oryza sativa ]	156 bits	5.00E-37	77/113 (68%)
15	AAD34814	DNA-directed RNA polymerase IIb [Nicotiana tabacum]	143 bits	2.00E-53	69/69 (100%)
16		No significant similarity found			
17	AAB41815	proline rich protein [Medicago sativa].	41.2 bits	0.01	21/44 (47%)
18	AAO08321	hypothetical protein, Cell wall-associated hydrolase [Vibrio]	125 bits	6.00E-28	66/91 (72%)
20		No significant similarity found			
21	AAF04891	Mutator-like transposase [Arabidopsis thaliana]	65.5 bits	5.00E-10	28/28 (100%)
22	AAG50783	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	122 bits	6.00E-27	58/94 (61%)
23	AAN28813	homocysteine S-methyltransferase AHMT-1 (At3g25910)	155 bits	2.00E-36	105/197 (53%)
24		No significant similarity found			
25	AAC49889	Kunitz-type protease inhibitor precursor	80.8 bits	6.00E-09	47/149 (31%)
26	CAB79626	putative wound induced protein [arabidopsis]	32.7 bits	3.8	12/16 (75%)

(2) 후보 유전자 *GmSKTI*, *GmSTRX*의 발현 양상 확인

위 실험에서 분리된 DEGs 중에 kunitz trypsin inhibitor를 encoding하는 *GmSKTI*와 seed에서 발견된 thioredoxin (*GmSTRX*)에 연구 초점을 맞추었다. ACP를 이용해서 찾아진 *GmSTRX*는 nodule에서 발견된 *GmTRX*와 동일한 sequence를 가지고 있었는데 nodule에서와 마찬가지로 seed에서도 항산화제로서의 역할을 할 것으로 예상된다. *GmSKTI*와 항산화제로 알려진 thioredoxin을 encoding 하는 *GmSTRX* 역시 항암효과를 나타낼 것으로 기대되므로 연구 가치가 있다고 사료되어 그 발현 양상 확인은 2차년도에 계획되어 있지만, 그 중요도를 조사하기 위하여 1차년도에 실시하기로 하였고 그 결과는 Figs. 13과 14에 보여지고 있다.

그 중 *GmSKTI*의 ACP기술을 이용해 찾아진 partial cDNA sequence는 Fig 7과 같다. *GmSKTI*의 콩 종자 발달 단계에 따른 발현 정도를 확인하기 위해 R1에서 R6 단계의 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 13에서 보는 것과 같이 early stage인 R1 ~R3에서 *GmSKTI*의 발현이 지속되다가 종실의 filling 이 일어나는 R4 stage에서 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

```
GGGGGGCCACATCGTCCCCTAGCCCAATACGTTCTCGACACAAACCGCGAACGCGTCGACAGCG
ATGATGAGTACTACATCCGGCCAGCCATAACGGACAACGGAGGGCGTTTTTACATTGATCAACA
GAAACAGGTCGTGTCCTTTGTACGTTGGTCTCGAAAACACCGACACGCCACTAGGCTATCCTGTG
AAATTCACCCCTTTTTCCCGCAACAACAACGATGATGACGACGACGACATAAGGGTGAATAGGG
ACCTCAGAGTGGCGTTCGATGAAGTTTCCACAACGTGTGTGCAATCCACAGAATGGAGAGTGGG
TGAGAACGACNCGAGGAGTGGAAGGAGGCTTATTATCACTGGCCGAGACGAAACCACGGGATCA
TACGGTAACTATTTTAGAATTGTGGAACAGAAAATGTTGGTATCTATAACATTCAGTGGTGC
CCTACCGAAGTGTGCCCACTTGTAGATTCAATTTGTGGCACTGGTGGTATTCTGAGGGAGAATG
GAAGGATTTTGTGGCCTTGGATGGTACTCCTCTCCAGTTATGTTCCAGAAAAAAGATGATTG
ATTTGAAGAGATATTGTGGGGTTTCTCCCCCTTGTGCTAATAACTTCTTTCTTATGGTGTGGC
TAATAATATATGATGGAGCTATCATCCATTTTATTGGATGAAATAAAGATACATGTATAGAG
ATGTATTCAGTATTATTCAGTTCTTGATTTGTAGAATAAAGCTCCAAATTGTTATGAGCATGT
GATTCATTTACTACTTGGATTTTGTAAATAATAATAATAACATTTTTATTGTTGTTGTTGTTG
TTAAAAAATATATGATGGAGCTATCATCCATTTTATTGGATGAAATAAAGATACATGTATAGAG
```

Figure 12. ACP기술에 의해 찾아진 *GmSKTI*의 partial cDNA sequence.

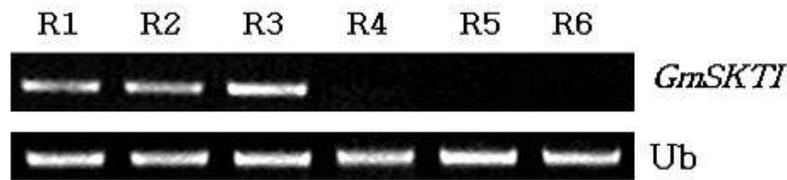


Figure 13. *GmSKTI*의 콩 종실의 발달 단계에 따른 발현 양상.

Fig. 14. 에서 보는 바와 같이 *GmSTRX* 역시 RT-PCR을 통해 종실 발달 시기의 초기 단계에 더 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 *GmSKTI*와 *GmSTRX*가 콩의 발달 시기에서 필요한 유전자임을 확인할 수 있었다. 위에서 언급된 것과 같은 의의를 가지고 있는 이 유전자들의 더 자세한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

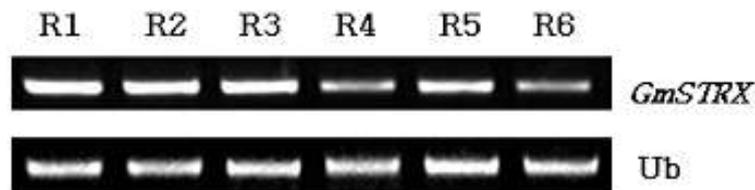


Figure 14. *GmSTRX*의 콩의 종자 발달 단계에 따른 발현 양상

#### 나. 종실 특이성 프로모터 분리

##### (1) 종실 특이적 발현을 보이는 globulin promoter의 확보

본 과제의 계획 단계에서는 종실 특이성 프로모터를 분리하여, 유용유전자의 종실 발현을 조절하고자 하였다. 그러나, 공동으로 과제를 수행중인 제3세부과제의 김울호 박사팀(작물과학원)에서 최근 종실특이성 프로모터인 globulin promoter를 확보하였고, 그 발현이 검증되어서, **새로운 종실 특이성 프로모터의 분리가 불필요**하게 되었다. 김울호 박사팀은 본 세부과제에서 제 공한  $\beta$ -carotene hydroxylase의 cDNA의 형질전환체 제작에 globulin promoter를 이용하여 이미 형질전환체를 선발하였다. 그러므로 세부과제별 협력을 통하여 종실 특이성 프로모터가 확보를 통하여 불필요한 실험을 줄이고, 오히려 2차년도에 계획하였던 실험의 일부 (“2. ACP기술에 의한 유전자들의 분리”의 “2) 후보 유전자 *GmSKTI*, *GmSTRX*의 발현 양상 확인”)를 추가로 수행하는 시너지 효과를 얻게 되었다고 사료된다.

##### (2) *GmLRK* 5' upstream region 일부 분리

차후의 해당 유전자에 대한 기능 연구에 필요한 프로모터를 얻기 위해 선택된 유전자 중 먼저 *GmLRK*의 프로모터를 DNA walking기술을 이용하여 발굴하기 위해 시도하였다. 그리하여 프로모터 일부를 얻을 수 있었고 이 유전자를 보다 깊이 연구하는 것이 필요시 프로모터를 확보할 수 있을 것이라고 생각된다.

#### 다. 실용가능성 유전자의 full-length 분리

전년도에 ACP 기술을 이용하여 콩의 배아 발달 과정(R1-R6에 따른 분류)에 따라 특이적

으로 발현하는 26개의 genes을 분리하였다. 그 중 연구가치가 있다고 판단하였던 3개의 유전자 중 putative *GmLRK* (*Glycine max* Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase)와 kunitz trypsin inhibitor를 encode하는 *GmSKTI* 2개의 유전자에 대한 full-length를 CapFishing 기술을 이용하여 분리하였다. 먼저 식물체에서 다양한 기능을 하는 것으로 알려진 leucine-rich repeat receptor-like kinase를 encoding하는 *GmLRK*의 약 500bp의 fragment에서 5' RACE를 통해 약 2kb size의 full-length cDNA를 분리하였다 (Fig. 16). 그 sequence는 Fig. 16과 같다.

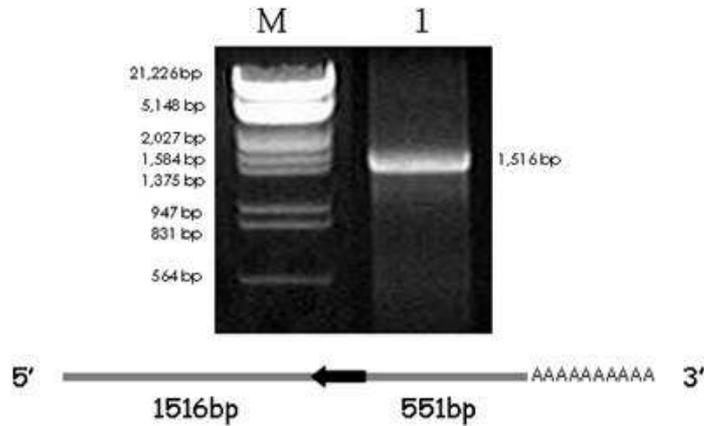


Figure 15. 5' RACE를 통한 *GmLRK*의 full-length cDNA분리

```

CCCTTCCCGGACCATAACATGAAAAAAGTTTGTTCATTGTCCCATATTCCTGGC
ACTGGCCTTGTGCTTGTGCATCCTCTGTGTTGCTGCAGAGGCTGCAGGGCAA
ATGATACTACTCGCTCTCACCGAATTCCGTCTCCAAACCGACACCCACGGCAAC
CTCCTCACCAACTGGACCGGCGCCGACGCCTGCCCGCCGCGTGGCGCGGCGTG
GAATGCTCCCCAAACGGCAGAGTAGTGGGCCTCACTCTCCCTTCCCTCAACCT
CCGCGGCCCAATTGATACCCTCTCCACACTAACCTACCTTCGCTTTCTCGACCT
CCACGAAAACCGCTTAAACGGCACCATTTTCACCTCTCTTAAACTGCACAAGCC
TGGAATACTGTACCTCTCCCGCAACGATTTCTCCGGCGAGATTCCGGCGGAG
ATATCCTCGCTCCGCCTTCTCCTCCGCCTTGACATCTCCGACAACAACATCCGC
GGCCCAATCCCCACACAAGTAGCGAACTAACCCACCTCCTCACGTTGAGGTT
ACAGAACAACGCACTCTCCGGCCACGTCCCCGACCTTTCCGCTTCCCTCCTTAA
TCTCACCGTACTCAACGTCACCAACAACGAACTCCGCGGCCACGTCCCCGATTC
CATGCTCACCAAATTCGGCAATGTAAGCTTCTCCGGAAACCACGCCCTCTGTG
GGTCCACCCCGCTACCCAAATGCTCCGAAACAGAGCCAGACACAGAGACTACC
ACGATAACCGTTCCCTGCAAAACCGAGCTCGTTCCCGCAAACAAGTAGCGTAAC
CGTTCCTGACACTCCGAGAAAGAAAGGGTTGAGCGCCGGTGTTCATCGTGGCGA
TCGTGGTGGCGGTTTTCGTGGCGGTGCTGGTGGCGACGTCGTTCCGCGGTGGCG
CATTGTTGCGCCAGAGGATCCACCTCTGGTTCGGTGGTGGGGAGCGAGACCGC
GAAGAGAAAAAGTGGGAGTAGTTCTGGGAGCGAGAAGAAGGTGTATGGGAAC
GGTGGAACTTGGATAGAGATAGTGATGGGACGAACACTGAGACGGAACGAA
GCAAGCTTGTGTTTTTCGATAGGAGGAACCAGTTTGAGTTGGAGGATCTGCT

```

TCGAGCTTCGGCGGAGATGCTCGGAAAAGGAAGCTTGGGAACGGTTTACAGA  
GCGGTGCTCGATGATGGTTGCACTGTGGCTGTGAAGAGACTCAAAGACGCTA  
ACCCCTGCGAGAGGAACGAGTTTGAACAGTACATGGATGTTGTAGGGAAGCT  
CAAGCACCCCAACATTGTTAGACTAAGAGCTTATTATTACGCTAAGGAAGAA  
AAACTTCTTGTCTATGATTATCTCCCAATGGAAGCTTGCATGCTCTTCTTC  
ATGGGAACCGGGACCAGGAAGGATTCCGTTAGATTGGACCACGAGAATAAG  
CTTGATGTTAGGTGCAGCTAGAGGTTTGGCACGGATTCATGCGGAGTATAAC  
GCATCAAAGATACCTCACGGGAACGTGAAATCTTCCAACGTGCTTCTTGACA  
AAAACGGCGTCGCTTTAATATCTGACTTTGGCCTTTCGCTGCTTTTAAACCCT  
GTTACGCGATTGCAAGGTTGGGAGGGTACAGGGCGCCGGAGCAAGTTGAGGT  
GAAGAGGCTGTGCGCAGGAGGCTGACGTGTACGGCTTCGGGGTGCTACTGTTGG  
AGGTTCTGACGGGTGCGGCTCCGTCGAAGGAGTACACTTCTCCGGCGCGTGAG  
GCTGAGGTGGATCTTCCGAAGTGGGTGAAATCGGTGGTGAAGAAGAGTGGA  
CTTCGGAGGTGTTTGACCAGGAGCTGCTGAGGTACAAGAACATAGAGGATGA  
GTTGGTGGCGATGCTGCACGTGGGACTGGCGTTCGTGGCGGCGCAGGCGGAGA  
AGAGGCCGTGCATGTTGGAGGTTGTGAAGATGATTGAGGAGATCAGAGTGGA  
AGAGTCTCCTCTGGGAGATGATTACGATGAGGCTCGCTCGCGCACTTCGCTTT  
CGCCTTCCCTTGCCACCACCGAAGACAACCTCGCTTGATTATTGTCTCAT

Figure 16. *GmLRK*의 full-length cDNA sequence

Full-length sequence를 통해 kinase domain과 LRR region, transmembrane domain을 가  
지고 있음을 확인하였고 기능 연구를 수행할 수 있었다.

또한 *GmSKT1*의 full-length cDNA도 동일하게 RACE를 통하여 분리하였다. Fig. 17 에  
서 나타난 바와 같이 618 bp의 DNA fragment를 cloning하였다.

TGTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGATAGGGGAACCCATAAAAACCTGCCTCAAATA  
AACCTCAACTCATTGTGTGACCAAAGTTATTATTACATTGCATAATCAACCATGTCA  
ATGAAGTTGTACGCTTCCCTTACCTTTGTGGTGTGGCTTTTCATGGCCACATCGTCCC  
TAGCCCAATACGTTCTCGACACAAACCGCGAACGCGTCGACAGCGATGATGAGTACTA  
CATCCGGCCAGCCATAACGGACAACGGAGGGCGTTTTCACATTGATCAACAGAAACAGG  
TCGTGTCCTTTGTACGTTGGTCTCGAAAACACCGACACGCCACTAGGCTATCCTGTGA  
AATTCACCCCTTTTTCCCGCAACAACAACGATGATGACGACGACGACATAAGGGTGAA  
TAGGGACCTCAGAGTGGCGTTCGATGAAGTTTCCACAACGTGTGTGCAATCCACAGAA  
TGGAGAGTGGGTGAGAACGACCGAGGAGTGGAAGGAGGCTTATTATCACTGGCCGAG  
ACGAAACCACGGGATCATACGGTACTATTTTAGAATTGTGGAAACAGAAAATGTTGG  
TATCTATAACATTCAGTGGTGCCCTACCGAAGTGTGCCCACTTGTGATTCAATTTGTG  
GCACTGGTGGTATTCTGAGGGAGAATGGAAGGATTTTGTTCCTTGGATGGTACTC  
CTCTCCCAGTATGTTCCAGAAAAAAGATGATTGATTTGAAGAGATATTGTGGGGTTT  
CTCCCCCTTGTGCTAATAACTTCTTTCTTATGTGTGGCTAATAATATATGATGGAG  
CTATCATCCATTTTTATTGGATGAAATAAAGATACATGTATAGAGATGTATTCATA

TTATTCAGTTCTTGATTTGTAGAATAAAGCTCCAAATTGTTATGAGCATGTGATTCA  
 TTTACTACTTGGATTTTGTATAATAATAATAATACATTTTTATTTTTGTGGAGTTT  
 TTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 17. *GmSKTI*의 full-length cDNA sequence

## 라. *GmLRK*의 기능 연구

### (1) *GmLRK* 발현 양상 확인

*GmLRK*의 발현 양상을 확인하기 위해 콩 종자 발달 시기(Fig. 18A)와 기관별(Fig. 18B)에 따른 RT-PCR을 수행하였다. Flower 단계인 R1, R2 단계에서 *GmLRK*의 발현이 높은 것을 확인할 수 있었고 seed 단계에서도 발현됨을 확인하였다. 또한 기관에 따른 RT-PCR 결과를 통해 flower에서 높은 발현을 나타냄을 볼 수 있었다.

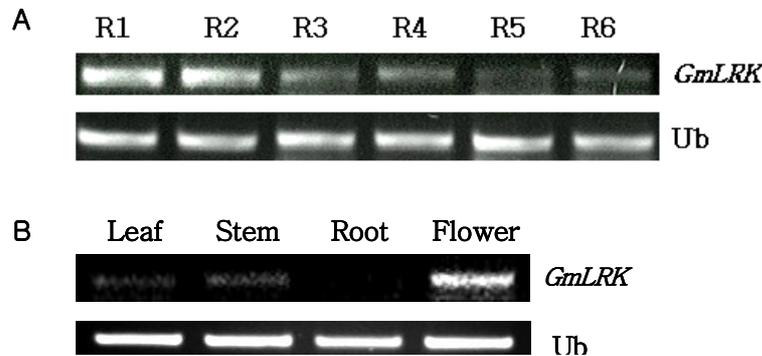


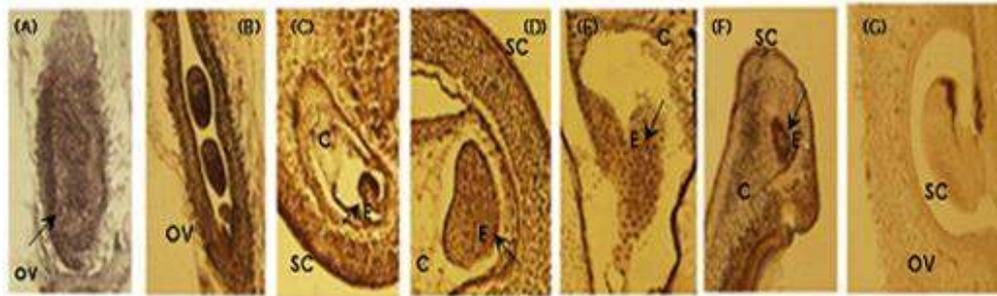
Figure 18. *GmLRK*의 발현 양상. (A) 콩 종자별 단계에 따른 발현 양상  
 (B) 콩의 기관에 따른 발현 양상

위의 발현은 pod를 빼지 않은 상태에서 채취한 sample에서 뽑은 RNA를 이용한 것이다. 이는 R1과 R2 시기에서 pod가 될 부분을 제거하기가 용이하지 않기 때문이며, 그래서 위의 발현 수준은 그러한 점을 고려하여서 해석하여야 한다. 보다 정확한 발현 양상을 확인하고 pod에서도 이 유전자가 발현하는지를 확인하고자 *in situ* hybridization을 실시하고자 하였다.

*GmLRK*의 specific한 antisense probe를 이용하여 종자의 단계별에 따른 *in-situ* hybridization을 수행하였다 (Fig. 19). 이 결과를 통해 콩 종자의 embryo에서 발현이 높으며 또한 pod에서도 발현됨을 확인할 수 있었다.

### (2) *GmLRK1*의 kinase activity

ACP 기술을 이용하여 콩의 배아 발달 과정에 따라 특이적으로 발현하는 유전자 중 하나인 *GmLRK1*은 전형적인 식물의 발달 과정에서 일어나는 신호 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 LRR-RLK의 구조를 가지고 있었다. *GmLRK1*이 실제로 이러한 과정에서 kinase로



단계. (E),(F) R5 단계. (G) R3 단계의 sense probe를 이용한 negative control.

씨의 역할을 할 수 있는지 확인하기 위하여 kinase assay를 시행하였다. 우선 단백질을 정제하기 위하여 GmLRK1의 kinase domain만을 클로닝하여 GST와 융합을 시킨 후 단백질을 분리하였다. Figure 1에서 보여주는 것처럼 GmLRK1은 autophosphorylation assay에서 어떠한 결과도 나타나지 않았다 (lane 1). 하지만 콩과 애기장대에서 직접 분리한 단백질과 함께 kinase assay를 한 결과 GmLRK1의 kinase activity를 확인할 수 있었다 (lane 3, 6). 이를 통하여 GmLRK1은 atypical kinase로 자체적인 kinase activity는 없지만 임의의 protein과의 상호 작용을 통하여 dimerization이 일어나면 인산화가 일어나는 것이다.

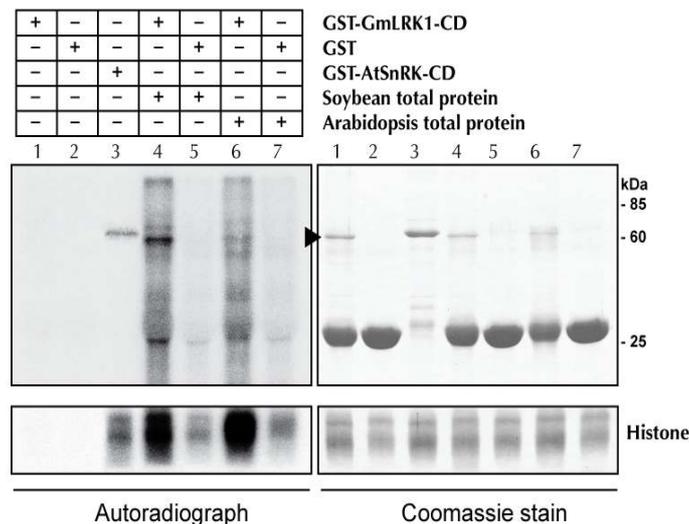


Figure 20. GmLRK의 in vitro kinase assay.

한편 GmLRK1과 대표적인 atypical kinase로 알려져 있는 유전자들인 MARK, TMKL1과 SUB와의 alignment를 통하여 연관성을 살펴보았다. Figure 21에서 보여주는 것처럼 VIb domain의 asparagine이 atypical kinase를 결정하는데 매우 중요한 아미노산일 것으로 여겨진다 (Fig. 21). GmLRK1와 At2g36570의 sequence alignment은 atypical receptor kinase임을 증명해준다.

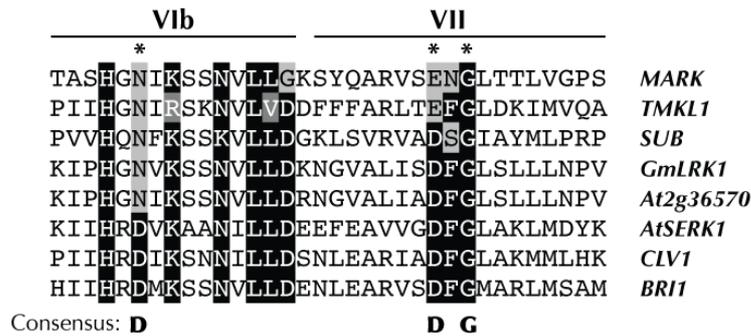


Figure 21. Sequence alignment of *GmLRK1*.

마. *AtLRK* mutant를 통한 기능 연구

*GmLRK*에 대한 기능 연구 수행을 위하여 이 유전자와 높은 homology를(Identity 63%) 가지고 있는 *Arabidopsis*의 유전자, *AtLRK* (At2g36570)를 BLAST search하여 찾았고 이 유전자의 DNA sequence에 기초한 단백질의 domain에 대한 예측은 아래와 같다.

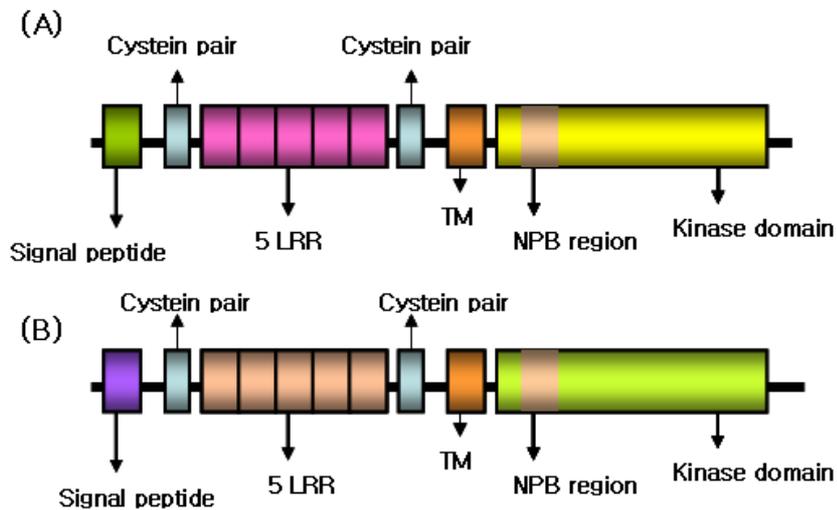


Figure 22. *GmLRK*와 *AtLRK*에 대한 domain 예측. (A) *GmLRK* (B) *AtLRK*

Fig. 22와 같은 연관성에 의해 기능적으로 orthologue일 가능성이 매우 높은 것으로 생각되었다. 따라서 *AtLRK*의 기능을 유추하고자 *AtLRK*의 T-DNA knock-out mutant를 분리하고자 하였다. T-DNA의 insertion은 Fig. 23과 같이 첫 번째 exon에 위치한다.

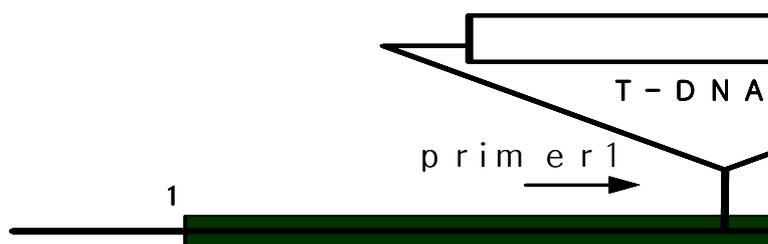


Figure 23. *AtLRK* T-DNA insertion 위치

이 mutant에 해당하는 homozygous line을 찾기 위해 genomic PCR을 수행하였다. RIKEN Genomic Science Center로부터 받은 seeds를 일차적으로 항생제 배지에서 선별하여 genomic PCR을 시도하였다. 이 때 사용한 primers는 Fig. 9에 나타난 바와 같다. T-DNA insertion lines이라면 T-DNA edge에 specific한 primer 2를 이용한 PCR결과에서는 (Fig. 24) band가 detection되어야 하고 homozygous라면 primer 1과 3의 PCR 결과에서 band가 detection되지 않아야 한다 (Fig. 25). Wild-type 이거나 heterozygous mutant일 경우에는 primer 1과 3에 의한 PCR product가 증폭된다. Wild-type을 control로 사용하였고 대부분의 lines이 homozygous라고 추측하였다. 그 중 #11-1과 #12-10의 PCR product (primer2 & 3)를 sequencing하여 T-DNA insertion을 확인하였다.

GmLRK1의 애기장대 ortholog로 여겨지는 At2g36570의 transposon-tagged mutant인 *atalk-1*는 전년도 연구에서 밝혔듯이 늦은 개화시기와 잎이 구부러지는 특징을 보여주었다 (Fig. 24-A,B). 특히 잎에서 나타나고 있는 표현형을 자세히 관찰하기 위하여 Technovit을 이용하여 조직을 자른 후 Toluidine-blue staining을 한 결과 잎 조직 안의 세포들이 WT에 비해 밀도가 높고 크기가 작은 것으로 나타났다 (Fig. 24-C).

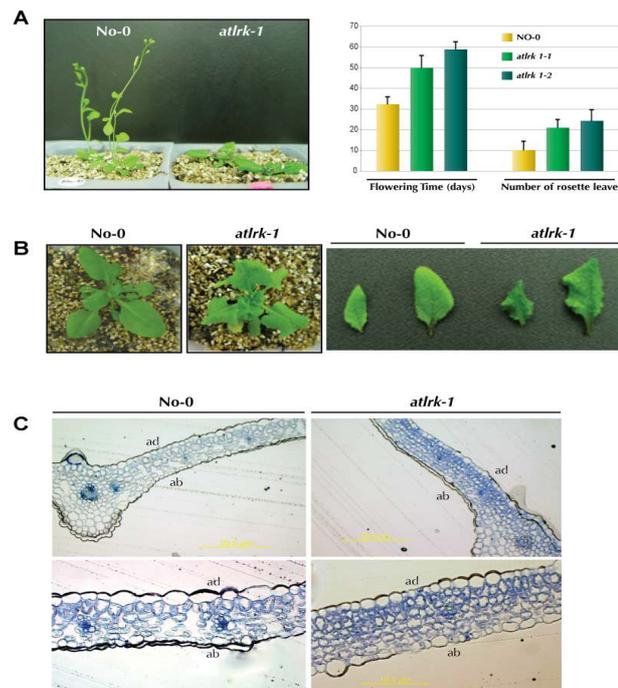


Figure 24. *atlrk-1* mutant의 특징 (A) *atlrk-1*은 늦은 개화시기를 갖는다. (B) *atlrk-1*은 잎이 구부러지는 표현형을 갖는다. (C) *atlrk-1*의 잎의 단면.

*GmLRK1*과 *AtLRK1*과의 관계를 통하여 그 기능을 유추하기 위하여 *AtLRK1*의 연구를 수행하였다. GENEVESTIGATOR에서 제공하는 Arabidopsis microarray database를 이용하여 *AtLRK1*의 발현 양상을 살펴보았다. *AtLRK1*의 경우 이전 연구에서 보여줬던 조직별 RT-PCR 결과와 유사하게 나타났으며 특히 cellulose 합성의 inhibitor로 알려져 있는 isoxaben을 처리했을 때 발현이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 25).

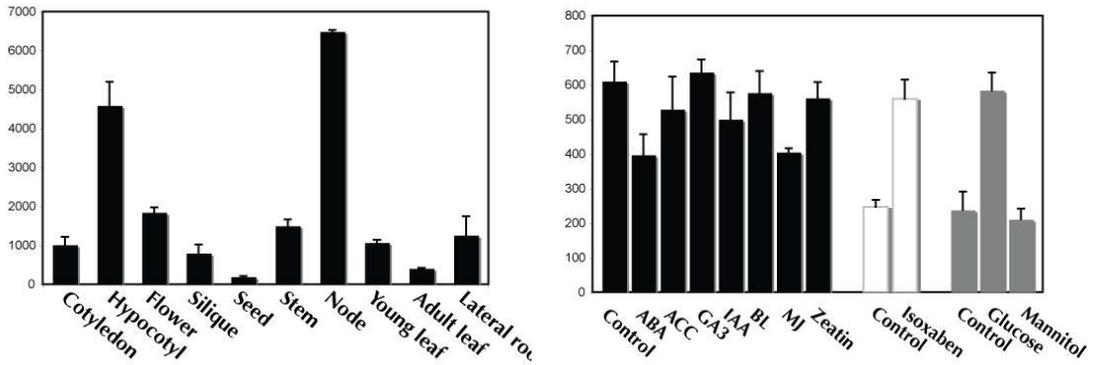


Figure 25. GENEVESTIGATOR data에서 보여준 At2g36570의 발현 양상

*AtLRK1*이 *GmLRK1*의 ortholog로 여겨지기에 유사한 기능을 가질 것으로 예상하여 *GmLRK1* 역시 isoxaben을 처리했을 때 발현이 증가하는지 알아보기 위하여 100nM의 isoxaben이 처리된 MS 배지에 콩을 발아시킨 뒤 3일 후 harvest하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 예상했던 것처럼 *GmLRK1*은 isoxaben을 처리하였을 때 발현이 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 26).

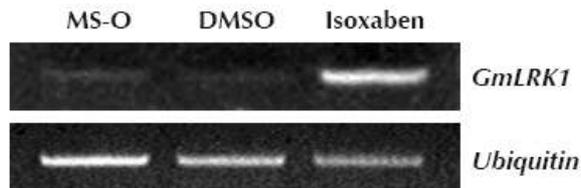


Figure 26. Isoxaben 처리 후 *GmLRK1* 발현.

## 바. *GmTRX*의 기능 연구

### (1) *GmTRX*의 단백질 추출 및 상호결합체 분석

*GmTRX*의 interaction partner는 *GmTRX*에 Avi-tag을 붙여 biotinylation을 시킨 후 avidin agarose resin을 이용하여 단백질을 추출하였다. 이렇게 추출된 *GmTRX*는 콩의 nodule 추출물과의 incubation 후 pull-down assay를 하였다. SDS-PAGE 상에서 보여지는 specific한

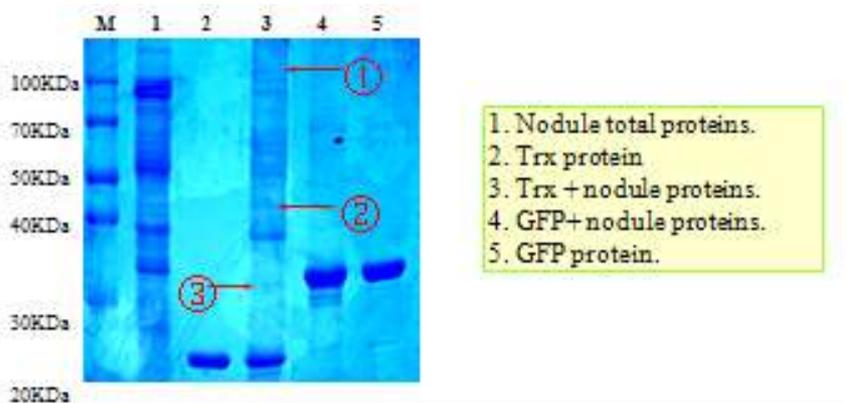


Figure 27. Isolation of Trx targets from Soybean nodules

band를 취하여 Maldi-Tof를 이용한 분석을 통해 novel한 상호 단백질을 찾아내었다.

GmTRX의 상호단백질을 찾고, 그 단백질들을 이용하여 in vitro pull-down assay를 시행하고 있다. 또한 이렇게 확인된 결합이 식물 내에서도 일어나는지를 확인하기 위하여 in vivo system 중 하나인 protoplast를 이용한 BiFC를 시행하고자 한다.

### 제 3 세부과제: 콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발 (국립식량과학원 김윤희)

#### 1. 이론적, 실험적 접근방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
○ 콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발		
콩 유용유전자를 이용한 형질전환체 작성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기 개발된 형질전환용 운반체를 이용하여 벼, 콩에 형질전환하고 형질전환체를 작성</li> <li>- 콩 유용유전자 형질전환체의 분자생물학적 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 콩 유용유전자               <ul style="list-style-type: none"> <li>·<math>\beta</math>-carotene hydroxylase1 (bCH1)</li> </ul> </li> <li>- 형질전환 운반체 : 2종               <ul style="list-style-type: none"> <li>·<i>bCHI/GGB</i>(Globulin프로모터)</li> <li>·<i>bCHI/GB</i>(P35S프로모터)</li> </ul> </li> <li>- 형질전환대상 작물               <ul style="list-style-type: none"> <li>·벼 (일미벼, 흑남벼)</li> <li>·콩 (익산나물콩)</li> </ul> </li> <li>- 형질전환 방법               <ul style="list-style-type: none"> <li>·<i>Agrobacterium</i> 법</li> </ul> </li> </ul>
아이소플라본 고함유 계통의 평가	고함유 아이소플라본 계통의 지역적응성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시 계통 : 장류콩 및 나물콩</li> <li>- 평가 지역               <ul style="list-style-type: none"> <li>·장류콩 : 전국 10개소</li> <li>·나물콩 : 전국 5개소</li> </ul> </li> <li>- 주요조사내용 : 농업적 형질 및 아이소플라본 함량</li> </ul>

## 2. 연구내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2005년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콩 유용 유전자 형질전환을 위한 기반 구축 및 작물에 형질전환</li> <li>○ 아이소플라본 고함유 계통의 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콩 유용유전자의 형질전환용 벡터 제작               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콩 유용유전자 : <math>\beta</math>-carotene hydroxylase1</li> <li>- 형질전환 운반체 제작 : Gate-way 방법으로 항시발현 및 스트레스 유도 프로모터가 부착된 벡터에 콩 유용 유전자를 도입하여 형질전환 운반체 제작</li> </ul> </li> <li>○ 콩 유용유전자의 기능 평가 및 작물에 형질전환               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모델식물인 담배에 형질전환 후 항산화 능력 평가</li> <li>- 형질전환 작물 : 벼, 콩</li> </ul> </li> <li>○ 고함유 아이소플라본 장류 및 나물콩 고세대 계통의 생산력검정 및 함량 분석</li> </ul>
2차년도 (2006년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콩 유용유전자 형질전환 작물 개발</li> <li>○ 아이소플라본 고함유 계통의 품종 성능 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콩 유용유전자의 형질전환               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환 작물 : 벼, 콩</li> <li>- 형질전환 방법 : <i>Agrobacterium</i> 이용법</li> <li>- 형질전환 확인 : basta 살포, Southern blot 등</li> </ul> </li> <li>○ 장류 및 나물콩 유망계통의 지역적응 시험 및 지역간 아이소플라본 함량분석</li> </ul>
3차년도 (2007년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 작물의 기능평가</li> <li>○ 아이소플라본 고함유 계통의 품종 성능 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 작물의 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 평가 : 항산화 정도</li> <li>- 형질전환 유전자의 발현 : RT-PCR, Northern blot 등</li> </ul> </li> <li>○ 형질전환운반체 제작 및 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자 기능확인 : 담배 식물체</li> </ul> </li> <li>○ 장류 및 나물콩 유망계통의 지역적응 시험 및 지역간 아이소플라본 함량분석</li> </ul>
4차년도 (2008년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 작물 개발</li> <li>○ 아이소플라본 고함유 계통의 품종 등록</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 작물의 고정 및 농업적 형질 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환 작물의 고정 정도 구명 : Southern blot, Basta 살포를 통한 분리정도</li> <li>- 농업적 형질 평가 : 표준 조사 기준 참조</li> </ul> </li> <li>○ 지역적응시험 및 지역, 년차간 안정적 유망계통 국가등재품종등록</li> </ul>

### 3. 연구결과

#### 가. 콩 유용 유전자 형질전환을 위한 기반 구축 및 작물 형질전환

##### (1) 형질전환에 사용된 운반체 및 아그로박테리움 계통

벼와 콩에  $\beta$ -carotene hydroxylase1(*bCHI*) 유전자를 도입하기 위해 2005년도에 제작된 2종의 형질전환용 운반체 (그림 1), *bCH*/GGB (Globulin 프로모터: 종자발현)와 *bCH*/GB (P35S 프로모터: 항시발현)를 사용하여 벼와 콩에 형질전환 하였다. 선발마커는 제초제저항성인 *bar* 유전자, 아그로박테리움 계통은 LBA4404를 이용하였다.

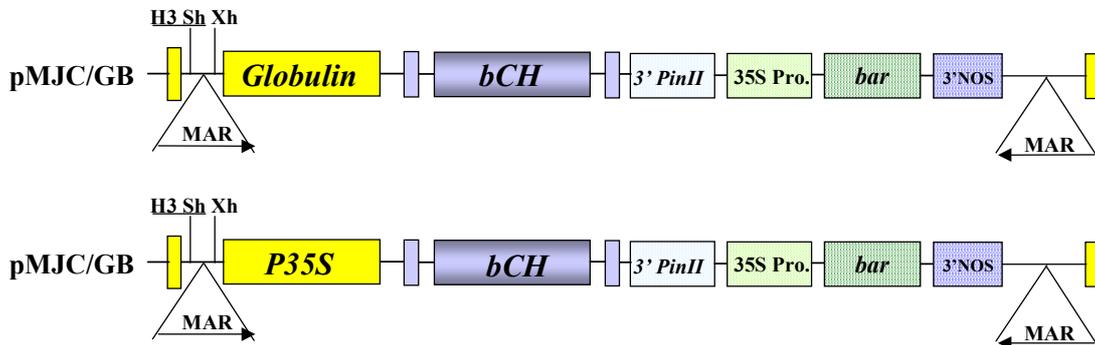


그림 1. 형질전환용 운반체 모식도

##### (2) 유용유전자 도입 형질전환 벼, 콩 식물체 작성

###### (가) *bCHI* 유전자 도입 형질전환 벼 작성

그림 1의 운반체를 사용하여 벼에 형질전환을 하였다. 형질전환 대상품종으로 유색미인 흑남벼와 양질미인 일미벼를 사용하였으며 형질전환방법은 김 등(특허 출원번호: 2005-71372)의 방법을 활용하였다. 표 1은 *bCHI* 유전자가 도입된 형질전환 벼의 품종별 작성 수를 나타낸 것으로 사용된 두 개의 운반체에서 독립라인으로 100개 이상의 T0 벼를 작성(그림 2 참조)하였으며 이들 계통으로부터 50계통 이상의 T1 종자를 확보하였다. 확보된 T1 종자를 대상으로 세대진전하여 homozygous line을 선발하고 생물적 또는 비생물적 스트레스 내성 증진 기능평가를 실시하여 기능이 확인된 계통을 중심으로 최종 선발할 계획이다.

표 1. *bCHI* 유전자가 도입된 형질전환 벼의 원품종별 계통수

품종명	<i>bCHI</i> /Glb	<i>bCHI</i> /35S
일미벼	T0 130 계통	T0 141 계통
	T1 68 계통	T1 66 계통
흑남벼	T0 144 계통	T0 106 계통
	T1 84 계통	T1 52 계통



(일미벼 형질전환체)                      (흑남벼 형질전환체)

그림 2. *bCHI* 유전자가 도입된 형질전환 벼 포장생육 상황 (출수기)

(나) *bCHI* 유전자 도입 형질전환 콩 작성

먼저 콩에 도입유전자를 안정적으로 형질전환을 위해서 그림 3과 같은 embryonic tip을 이용한 콩 형질전환방법을 개발하였다. 이 방법은 기관분화법 (Organogenesis)으로 짧은 시간 안에 형질전환체를 개발할 수 있다는 점과 콩 품종에 상관없이 적용가능하다는 점, 그리고 형질전환 방법이 매우 간단하다는 장점이 있다 (표 2 참조). 형질전환단계는 아그로박테리움을 접종하고 공동배양하는 과정, 접종된 분화조직에서 Multi-shoot을 유도하는 과정, 형질전환된 shoot을 선별하고 신장하는 과정 끝으로 뿌리유도와 순화과정으로 이루어져있다. 그림 3은 pMJ-GUS/35S 벡터를 사용하여 익산나물콩에 형질전환 후 형질전환 단계별로 GUS 유전자의 발현 정도를 나타낸 것으로 모든 단계에서 형질전환된 GUS 유전자가 강하게 발현되어 도입유전자가 효과적으로 콩 조직 내로 전이되고 안정적으로 삽입되었음을 확인하였다. 따라서 이 방법은 목표로 하는 유전자를 콩에 도입하기 위한 콩 형질전환 방법으로 매우 유용하게 사용될 것으로 판단되었다.

Embryonic tip을 이용한 콩 형질전환 방법 및 유전자 도입 확인(2006)

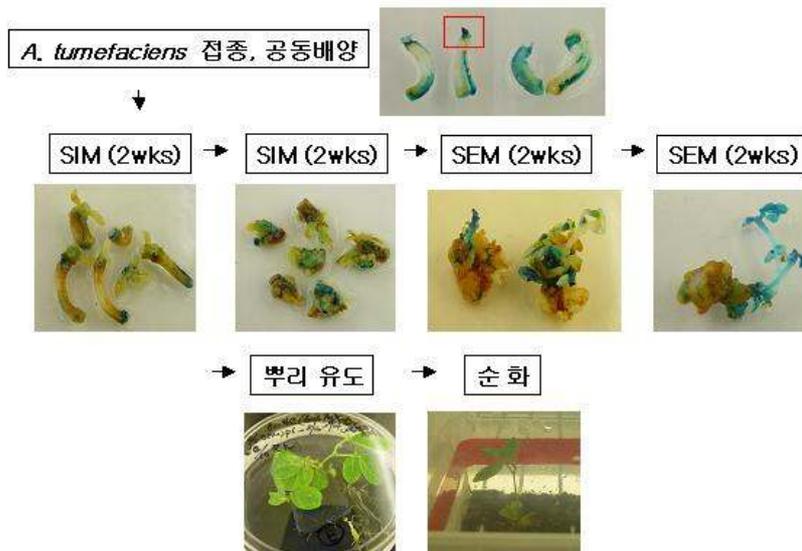


그림 3. Embryonic tip을 이용한 콩 형질전환 과정(GUS 유전자)

표 2. Embryonic tip을 이용한 콩 형질전환 방법과 미숙자엽법의 비교

미숙자엽법	Embryonic tip법
형질전환체 개발에 소요되는 시간이 길다	형질전환체 개발에 소요되는 시간이 짧다
외국 품종인 Jack 만 형질전환이 가능	국내 품종을 대상으로 형질전환이 가능
형질전환 과정이 복잡하다	형질전환 과정이 간단하다
미숙 종자를 사용함으로 온실 등의 공간이 필요하고 재료 확보가 어려움	완숙 종자 종자를 사용함으로 재료 확보가 용이

콩에 *bCH1* 유전자를 형질전환하기 위해서 기 개발된 형질전환용 운반체 *bCH1/P35S*를 사용하여 익산나물콩에 형질전환 하였다. 콩 형질전환 방법은 위에서 언급한 embryonic tip 방법을 사용하였다. 그 결과 콩 형질전환체 두 주를 작성하였으며 PCR 및 Bar strip 검정을 통해 유전자가 콩 식물체내에 삽입되고 안정적으로 발현되고 있는 것으로 나타났다 (그림 4). 그러나 T1 seed를 확보하는 과정에서 조기 개화로 인해 3립의 종자만 얻을 수 있었으며, 세대진전 결과 도입 유전자가 유전되지 않았다 (자료 미제시).

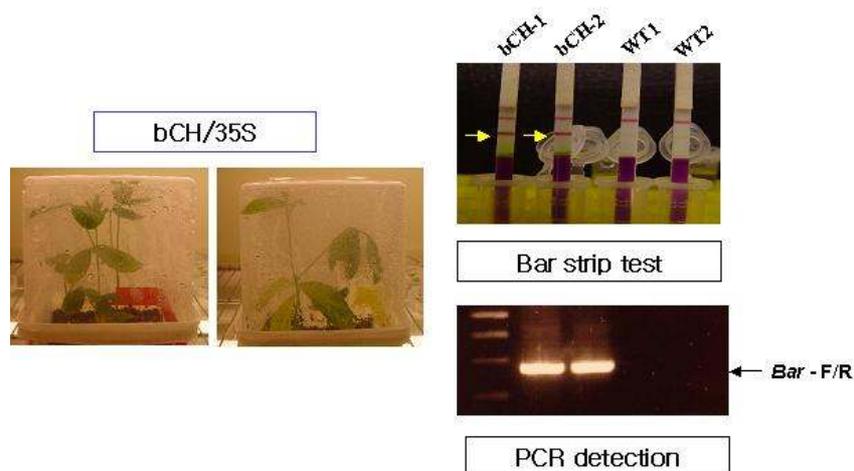


그림 4. *bCH1* 유전자 형질전환 콩 및 유전자 도입 확인

## 나. 콩 유용유전자 *bCHI* 유전자 도입 형질전환 벼의 세대진전 및 고정계통 선발

### (1) *bCHI* 유전자 도입 흑남벼 형질전환체의 세대진전 및 고정계통 선발

작성된 형질전환 흑남벼 일부를 대상으로 세대진전을 하면서 bar strip을 이용하여 homozygous 계통을 선발하였다 (표 3). 대부분의 형질전환 벼는 *bCHI* 유전자가 1개 또는 2개 도입된 것으로 조사되었다. Southern blot의 결과를 바탕으로 유전자 삽입수가 1개인 계통을 선발하여 세대를 진전하였다.

표 3. *bCHI* 유전자 도입 흑남벼 형질전환체의 세대진전 및 고정계통 선발

벡터명	T0 계통번호	T1 계통번호	T2 계통 번호	Genotype
35S:: <i>bCHI</i>	64-2	64-2-1	64-2-5-1	Homo
35S:: <i>bCHI</i>	99-1	99-1-1	99-1-6-2	Homo
Glb:: <i>bCHI</i>	117-2	117-2-1	117-2-1-1	Homo
Glb:: <i>bCHI</i>	73-2	73-2-1	73-2-9-1	-
Glb:: <i>bCHI</i>	111-1	111-1-1	111-1-1-1	Hetero
Glb:: <i>bCHI</i>	120-1	120-1-2	120-1-2-1	Homo
Glb:: <i>bCHI</i>	123-1	123-1-1	123-1-4-3	Homo
Glb:: <i>bCHI</i>	123-1	123-1-3	123-1-5-1	Homo
Wild type	흑남벼			원품종

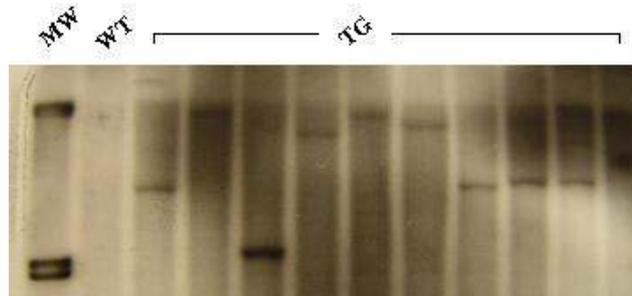


그림 5. 형질전환 벼의 *bCHI* 유전자 도입 수 확인 (probe, *bar*이용)

### (2) *bCHI* 유전자 도입 일미벼 형질전환체의 세대진전 및 고정계통 선발

작성된 형질전환 일미벼 일부를 대상으로 세대진전을 하면서 bar strip을 이용하여 homozygous 계통을 선발하였다 (표 4). 선발된 homozygous line을 이용하여 도입유전자의 기능평가를 위하여 생물검정을 실시하였다.

표 4. *bCHI* 유전자 도입 일미벼 형질전환체의 세대진전 및 고정계통 선발

벡터명	T0 계통번호	T1 계통번호
35S:: <i>bCHI</i>	24-2	24-2-3
35S:: <i>bCHI</i>	24-2	24-2-5
35S:: <i>bCHI</i>	24-2	24-2-6
35S:: <i>bCHI</i>	14-1	14-1-2
35S:: <i>bCHI</i>	14-1	14-1-3
35S:: <i>bCHI</i>	102-1	102-1-2
35S:: <i>bCHI</i>	102-1	102-1-5
35S:: <i>bCHI</i>	1-2	1-2-4
35S:: <i>bCHI</i>	1-2	1-2-5
35S:: <i>bCHI</i>	1-2	1-2-6
Glb:: <i>bCHI</i>	83-1	83-1-5
Glb:: <i>bCHI</i>	83-1	83-1-6
Glb:: <i>bCHI</i>	92-1	92-1-7
Glb:: <i>bCHI</i>	102-1	102-1-6
Glb:: <i>bCHI</i>	102-1	102-1-7
Glb:: <i>bCHI</i>	106-1	106-1-6
Glb:: <i>bCHI</i>	106-1	106-1-7
Glb:: <i>bCHI</i>	106-1	106-1-8
Glb:: <i>bCHI</i>	106-1	106-1-9
Wild type	일미벼	원품종

#### 다. 신기능성 형질전환 작물 개발을 위한 내재해성 기능 평가

##### (1) *bCHI* 유전자 도입 벼 형질전환체의 자외선에 대한 내성 기능 검증

그림 1의 운반체를 사용하여 형질전환된 유색벼 계통 (흑남벼)과 양질벼 계통 (일미벼)를 대상으로 자외선 내성 증진 기능평가를 수행하였다. 자외선 내성 증진 기능평가는 파종 후 6주된 묘에 UV-B를  $10 \text{ KJ m}^{-2}$ 의 선량으로 24시간 처리하고 4주 후에 초장, 생체중, 건물중을 측정하여 원품종에 대한 백분율로 표시하였다. 유색벼인 흑남벼의 경우 UV-B 처리에 따른 형질전환체의 반응 양상은 프로모터의 종류에 따라 큰 차이를 보였다 (그림 6). *bCHI*/GB (P35S 프로모터) 형질전환체의 경우 대조(WT)로 사용한 벼에 비해 생체중, 건물중이 현저히 떨어져 UV-B 처리에 약한 반응을 보였으나 *bCHI*/GGB (Globulin 프로모터) 형질전환체는 실험에 사용된 9계통 중에서 4계통은 원품종에 비해 생체중과 건물중이 많았으며, 2계통은 비슷하였고 나머지 3계통은 다소 작은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *bCHI* 유전자가 UV-B처리에 내성을 보이거나 유효기에 발현량이 매우 낮은 Globulin 프로모터를 사용하였을 때 효과가 있는 것으로 판단되었다.

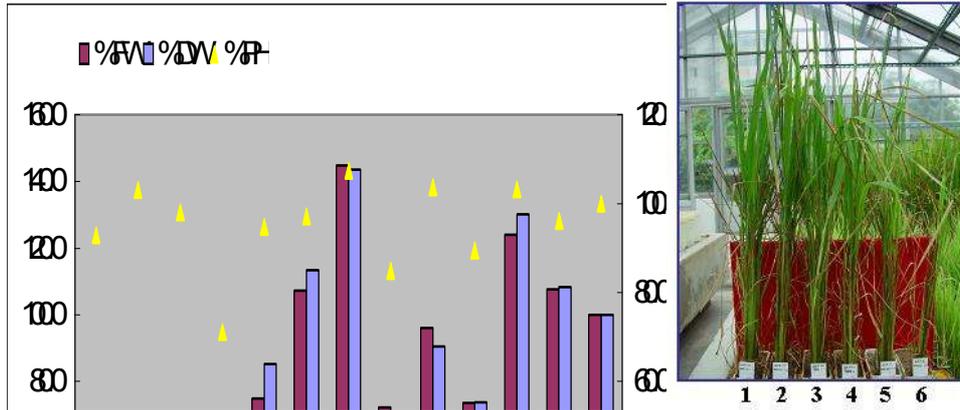


그림 6. *bCHI* 유전자 형질전환 흑남벼 T2 계통의 UV-B 스트레스 처리 회복 후 초장과 바이오매스(좌), 및 생육상황(우)

따라서 이들 자외선 처리에서 내성증진 효과가 나타난 계통들을 선발한 후 세대진전을 시켰다. 이들 계통들에서 도입유전자의 유전적 안정성을 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 실시한 결과 도입된 유전자가 안정적으로 유전되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 7. 좌). 또한 자외선 처리에 따른 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, 35S 프로모터를 연결시킨 계통 (64-2-5-1)에서는 자외선 처리에 관계없이 도입유전자가 발현하였으나 글로불린 프로모터를 연결시킨 계통들 (117-2-1-1, 73-2-10-1)에서는 자외선 처리에 의해 유전자의 발현이 유도됨을 확인하였다(그림 7. 우).

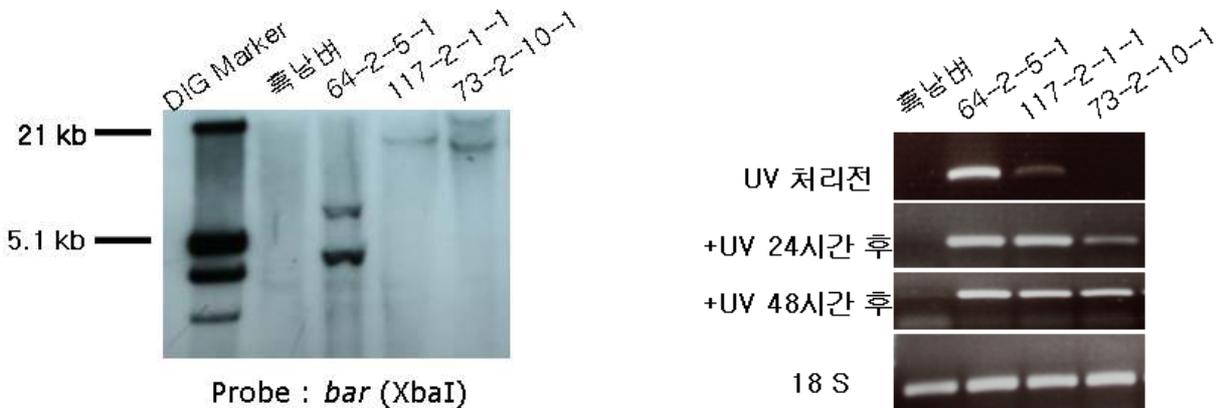


그림 7. *bCHI* 유전자 형질전환 흑남벼 T3 계통의 Southern blot 분석(좌), 및 UV-B 스트레스 처리에 따른 RT-PCR 분석(우)

반면에 양질벼 (일미벼) 형질전환체의 경우는 UV-B 처리에 대한 스트레스 내성 증진 효과가 없는 것으로 나타났다 (자료 미제시). 이러한 결과는 *bCHI* 유전자가 안토시아닌 색소를 합성하는 벼에서 UV-B 처리에 내성증진 효과가 있는 것으로 판단되었다. 특히 2세부과제를 수행하는 과정에서 밝혀진 결과로는 *bCHI* 유전자가 chloroplastic form으로 존재하는 것이 아니라 cytosolic form을 띠는 것으로 나타나 *bCHI* 유전자의 기능을 평가하기 위해서는 광산화 스트레스 처리보다는 염처리와 건조처리가 필요할 것으로 판단되었다.

(2) *bCH1* 유전자 도입 벼 형질전환체의 염과 건조 스트레스에 대한 내성 기능 검증

그림 1의 운반체를 사용하여 형질전환된 유색벼 계통 (흑남벼)과 양질벼 계통 (일미벼)를 대상으로 염 (NaCl) 스트레스에 대한 내성 증진 기능평가를 수행하였다. 염 스트레스에 대한 내성 증진 기능평가는 파종 후 4주된 어린묘에 2 수준의 NaCl (150mM과 300mM)을 24시간 처리하고 2주 후에 초장, 생체중, 건물중을 측정하였다. 유색벼인 흑남벼 형질전환체의 경우 초기 생육이 빠르게 나타났다 (그림 8, 좌). 또한, 염 처리에 따른 형질전환체의 성장반응 양상은 독립계통에 따라 큰 차이를 보였다. 실험에 사용된 6 계통 중에서 4계통은 원품종에 비해 초장이 길었으며 (그림 8, 우), 특히 2계통에서는 염처리에 따른 피해도 적은 것으로 나타났다 (그림 9). 이러한 결과는 *bCH1* 유전자가 염 (NaCl) 스트레스에 대한 내성증진 효과가 있는 것으로 판단되었다. 반면에 양질벼인 일미벼 형질전환체의 경우 염 스트레스에 대한 내성증진 효과는 없었다 (자료 미제시).

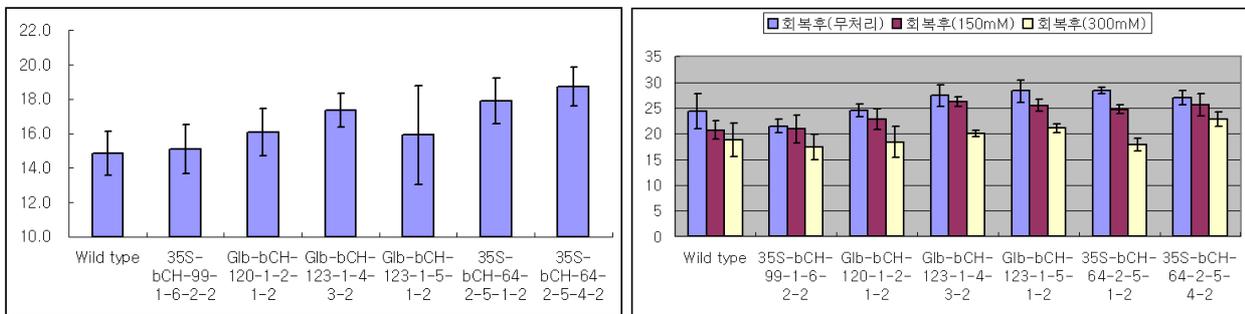


그림 8. *bCH1* 형질전환 벼 계통의 발아 후 2주째 초장(좌) 및 NaCl 처리 2주 후 초장(우)



그림 9. *bCH1* 형질전환 벼 계통의 NaCl 처리에 따른 성장반응(좌, *Glb::bCH1*-123-1-5-1-2; 우, *35S::bCH1*-64-2-5-1-2)

흑남벼 *bCHI* 유전자 형질전환계통을 대상으로 염(150mM NaCl)을 24시간 처리하고 2주간 회복시킨 후에 생체중과 건물중을 측정한 결과 원품종에 비하여 형질전환벼 계통에서 생체중 기준으로 12~51%가, 건조중 기준으로는 8~62%가 증대되었다(그림 10). 이상의 결과를 볼 때 흑남벼 형질전환체에서 *bCHI* 유전자는 염 스트레스에 대한 내성증진에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

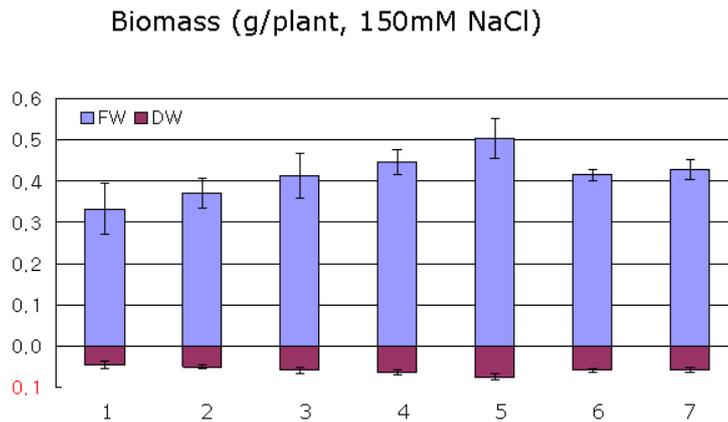


그림 10. 150mM NaCl 처리에 따른 *bCHI* 형질전환 벼 계통의 생체중(FW) 및 건조중(DW). 1, wild type; 2, 35S-*bCHI*-99-1-6-2-2; 3, Glb-*bCHI*-120-1-2-1-2; 4, Glb-*bCHI*-123-1-4-3-2; 5, Glb-*bCHI*-123-1-5-1-2; 6, 35S-*bCHI*-64-2-5-1-2; 7, 35S-*bCHI*-64-2-5-4-2.

흑남벼 *bCHI* 유전자 형질전환계통을 대상으로 건조스트레스 처리 (10% PEG-60, 24시간)를 하고 2일간 회복시킨 후에 생체중과 건물중을 측정한 결과 원품종에 비하여 형질전환벼 계통에서 생체중 기준으로는 지상부가 4~51%, 지하부가 9~80%, 건조중 기준으로는 지상부가 7~68%, 지하부가 16~88%가 증대되었다 (그림 11). 이상의 결과를 볼 때 흑남벼 *bCHI* 유전자는 건조 스트레스에 대해서도 내성을 증진시키는 데에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 스트레스 내성 검정 결과를 요약해 보면 *bCHI* 유전자는 일반벼에서는 기능을 보이지 않았던 반면, 안토시아닌 생합성 경로가 활성화되어 있는 흑남벼 형질전환체에서 염과 건조스트레스에 대한 내성을 증대시키는 효과가 큰 것으로 나타났다. 이러한 생물검정 결과가 Xanthophyll pool의 패턴변화에도 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)법 (Yamamoto et al. 1991)을 이용하여 분석하였다.

우선 일미벼와 흑남벼 형질전환체간의 xanthophyll pool의 패턴을 비교하기 위하여 스트레스 처리를 하지 않은 정상 조건에서의 식물체를 대상으로 분석한 결과 일미벼의 경우에는 xanthophyll pool은 원품종에 비해 오히려 낮았으며, 베타카로틴 함량은 원품종에 비해 높게 나타났다 (그림 12). 반면에 흑남벼의 경우에는 *bCHI* 유전자 형질전환체에서 원품종에 비해 Neoxanthin이 51~78%, Violaxanthin이 45~54%, Anthraxanthin이 6.4배에서 7.4배 정도 높았다 (그림 13).

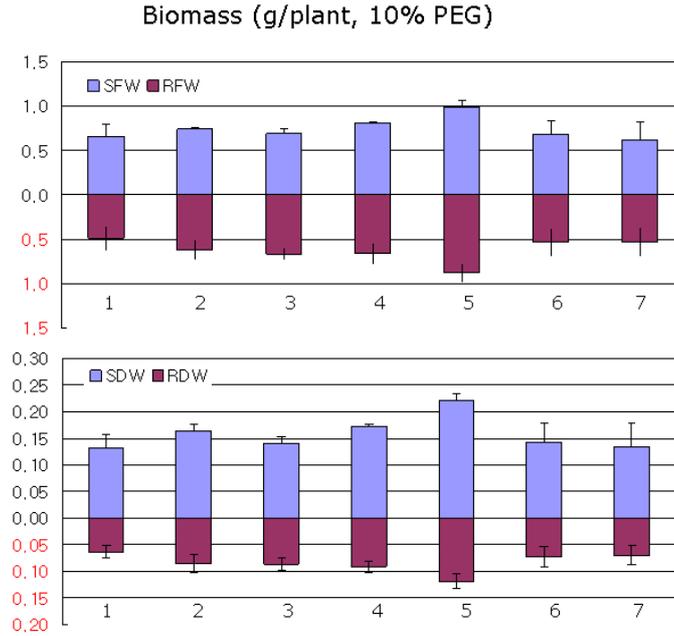


그림 11. 10% PEG 처리에 따른 *bCHI* 형질전환 벼 계통의 지상부(S) 및 지하부(R) 생체중과 건조중. 1, wild type; 2, 35S-*bCHI*-99-1-6-2-2; 3, Glb-*bCHI*-120-1-2-1-2; 4, Glb-*bCHI*-123-1-4-3-2; 5, Glb-*bCHI*-123-1-5-1-2; 6, 35S-*bCHI*-64-2-5-1-2; 7, 35S-*bCHI*-64-2-5-4-2.

이러한 xanthophyll pool 분석결과와 생물검정결과를 고려하여 선발된 흑남벼 형질전환 체들을 대상으로 자외선과 염스트레스 처리에 따른 xanthophyll pool의 패턴분석을 실시한 결과 자외선 처리시에는 형질전환 벼 계통들간에 xanthophyll pool의 변화가 일정한 경향으로 나타나지 않았으나 (그림 14, 상), 150mM의 NaCl을 24시간 처리하였을 때에는 Neoxanthin이 13~60%, Violaxanthin이 26~132%, Anthraxanthin은 최고 15% 정도 높았다 (그림 14, 하). 이러한 결과는 자외선 처리시에는 내성증진 효과가 적었으나 염 또는 PEG 처리에 따른 스트레스 내성 증진 효과가 양호하였던 생물검정 결과와 일치하는 것으로, 특히 바이오매스가 많았던 계통에서 이러한 xanthophyll pool의 함량이 증대되는 것으로 보아 염이나 건조 스트레스를 받게 되면 *bCHI* 형질전환 흑남벼에서는 도입 유전자의 기능에 의해 xanthophyll pool이 증대되면서 환경스트레스에 대한 내성이 증진됨으로써 바이오매스량 또한 많아지는 것으로 판단되었다. 특히 자외선을 처리하였을 때 도입유전자의 기능이 뚜렷하지 않는 것은 내재유전자의 발현에 의해 자외선 스트레스에 대한 방어기작이 활발히 작동되고 있거나, 도입유전자가 자외선 스트레스에 대해서는 반응할 수 없는 것으로 추측되었다. 이러한 이유에 대해서는 추후 실험이 더 필요한 것으로 판단된다.

이상의 내재해성 기능평가 결과로 볼 때, 콩 뿌리혹에서 분리된 *bCHI* 유전자는 염과 건조스트레스에 대한 내성증진 기능이 있다고 판단할 수 있으며 여기에서 선발된 3계통들은 염과 건조에 대한 내성이 증진된 새로운 유망 벼 유전자원으로 활용될 수 있을 것이다.

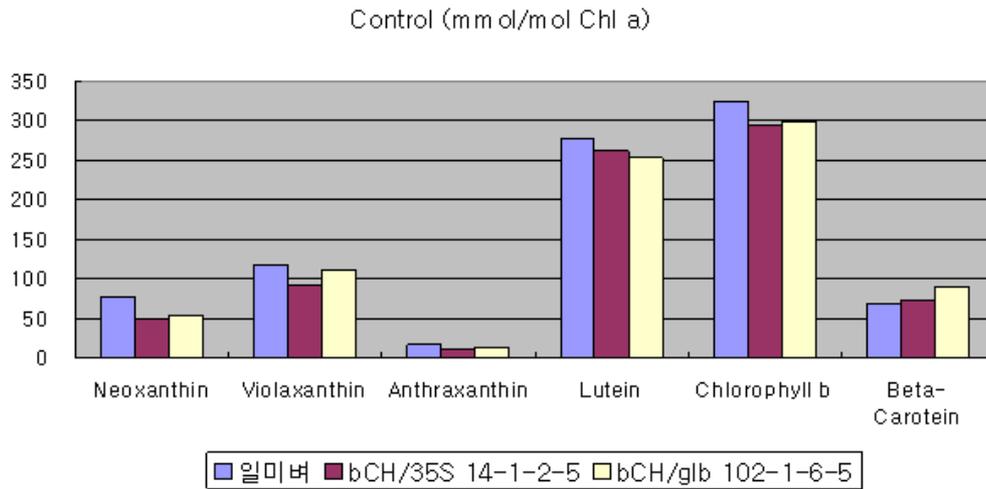


그림 12. *bCHI* 형질전환 벼 (일미벼) 계통의 Xanthophyll pool의 변화.

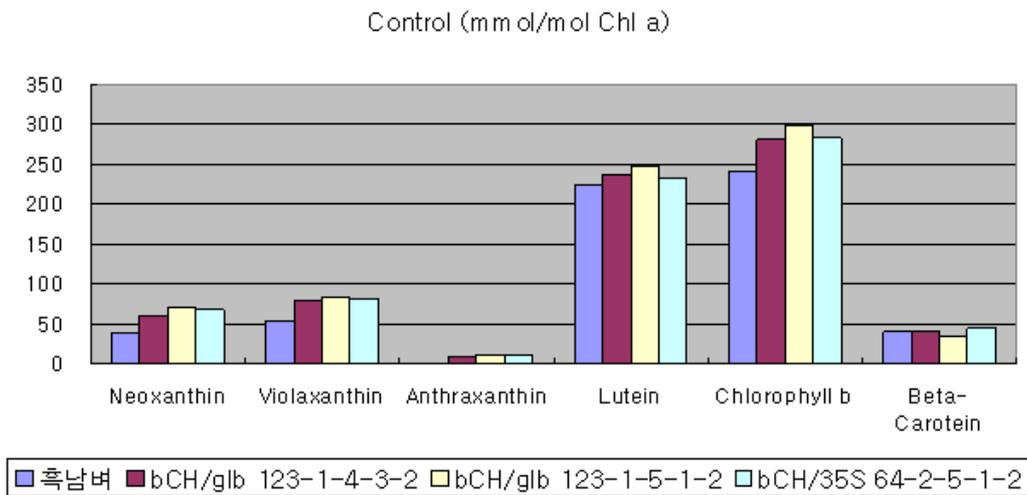


그림 13. *bCHI* 형질전환 벼(흑남벼) 계통의 Xanthophyll pool의 변화.

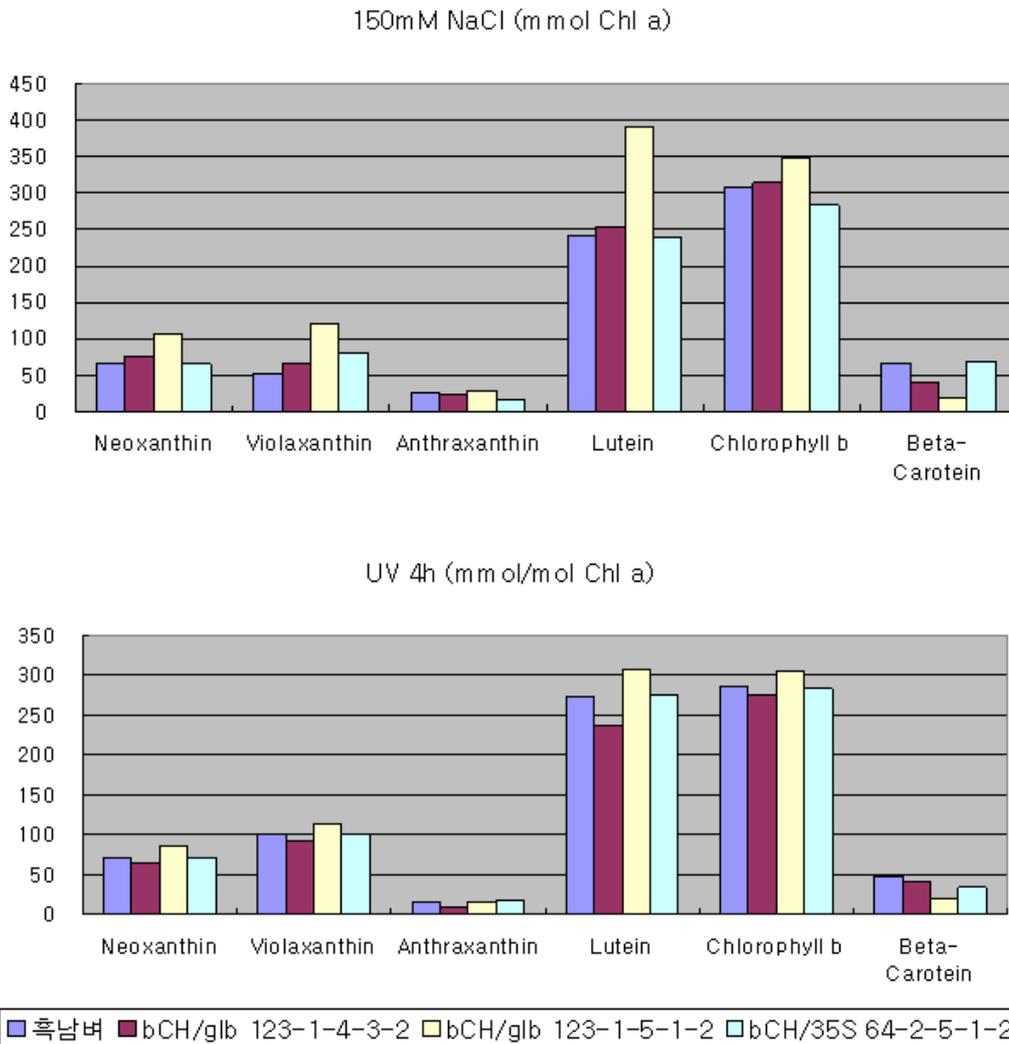


그림 14. 스트레스(상, 염; 하, 자외선) 처리에 따른 *bCH1* 형질전환 벼(흑남벼) 계통의 Xanthophyll pool의 변화.

(3) *bCH1* 유전자 도입 벼 형질전환체의 포장조건에서의 수확기 농업적 형질 특성

내재해성 기능평가 (자외선, 염 그리고 건조 스트레스 처리)에 이용된 흑남벼 형질전환 T3 계통들을 대상으로 포장조건에서 수확기 생육조사를 실시하였다. 그 결과, 35S프로모터가 연결된 64-2-5-1 계통을 제외하고는 원품종인 흑남벼에 비해 간장과 수장은 다소 짧아지고 수수는 많아지는 경향이였다. 특히, 염과 건조스트레스에 내성이 증진된 선발계통 123-1 과생계통들은 간장과 수장은 원품종과 유사하면서 수수가 7% 증가하여 전체 종자수가 증대되었다 (그림 15). 이상의 결과를 토대로 흑남벼 형질전환 계통들 중 2계통은 염과 건조스트레스에 대한 내성이 높으면서 농업적 형질 또한 개선되었음을 확인할 수 있었다.

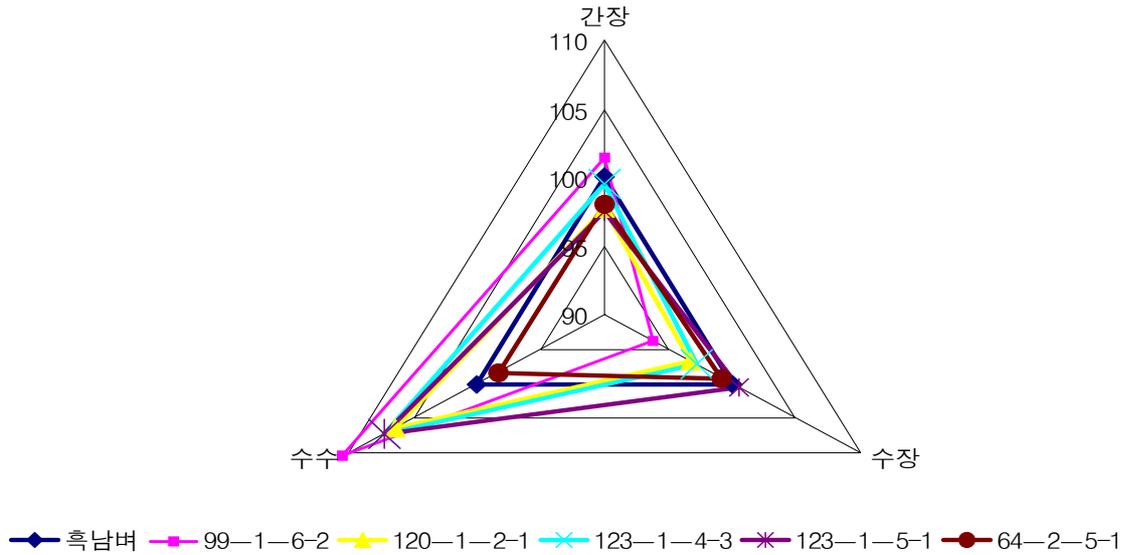


그림 15. 포장조건에서 *bCH1* 형질전환 벼(흑남벼) 계통의 수확기 생육상황 (원품종 대비 백분율로 표시함).

라. 콩 유용유전자 도입 신기능성 형질전환 작물 개발을 위한 내병성 기능 평가

(1) *bCH1* 유전자 도입 벼 형질전환체의 잎집무늬마름병 저항성 검정

*bCH1* 유전자의 내병성 기능을 알아보기 위해 벼 잎집무늬마름병, 흰잎마름병, 도열병 등을 대상으로 생물검정을 실시하였다. 먼저 벼 잎집무늬마름병 저항성 평가는 2차에 걸쳐 수행하였다. 그림 16과 17에서는 1차 검정의 결과를 나타낸 것으로 생물검정에 사용된 형질전환 2계통 (일미벼)의 경우 대조벼 (WT)에 비해 평균 병반길이는 비슷하였으나 형질전환 개체간에 다양한 저항성을 나타내어 표준편차에서 현저한 차이를 보였다.

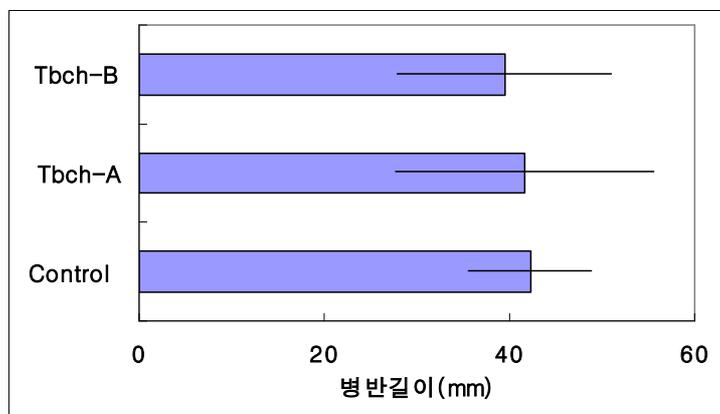


그림 16. *bCH1* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 벼 잎집무늬마름병 생물검정 결과(1차)

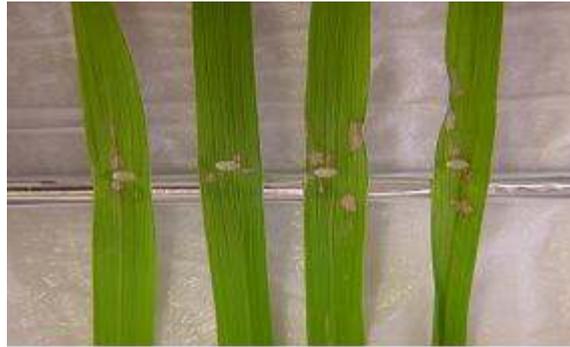


그림 17. *bCHI* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 벼 잎집무늬마름병 생물검정(균총 접종)

또한, 벼 잎집무늬마름병에 대한 저항성을 재확인하기 위해 2차 생물검정을 수행하였다(그림 18). 생물검정에 사용된 7계통 중에서 3, 4, 6, 8번 계통은 병반길이가 대조벼에 비해 짧은 것으로 조사되었으며 이 중에서 4, 6번 계통의 경우 병반 형성 수에서도 현저히 작아 벼 잎집무늬마름병에 저항성을 보이는 것으로 확인되었다.

계통	벼잎집무늬마름병	
	병반형성길이(mm)	
	40시간	64시간
<i>bCHI</i>	50	60
대조	~	~

그림 18. *bCHI* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 벼 잎집무늬마름병 생물검정(2차)

(2) *bCHI* 유전자 도입 벼 형질전환체의 흰잎마름병 저항성 검정

*bCHI* 유전자 형질전환 계통(흑남벼)에 대한 벼 흰잎마름병 저항성 정도를 알아보기 위해 파종 후 55일이 지난 형질전환벼를 대상으로 가위접종법으로 생물검정을 수행하였다. 생물검정에 사용된 6계통 중에서 11번 계통의 경우 병반길이에서 대조벼와 현저한 차이를 보였다(그림 19, 20). 이러한 차이가 유전자의 기능에 의한 것인지에 대한 검토는 세대진전 후에 계속적으로 구명해가야 할 것으로 생각되었다.

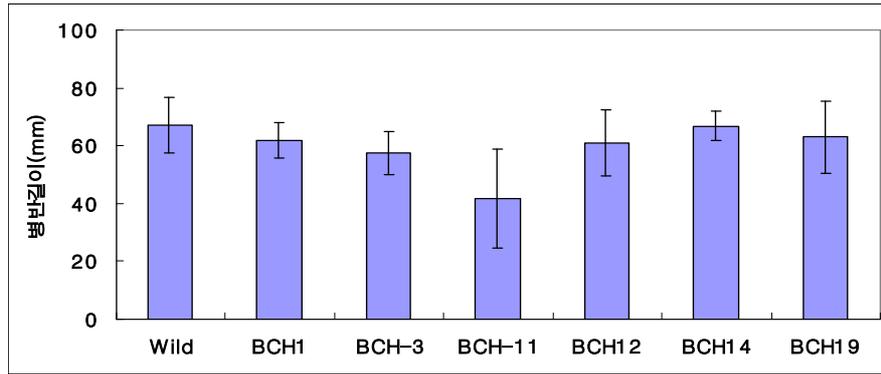


그림 19. *bCH1* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 벼 흰잎마름병 생물검정 결과

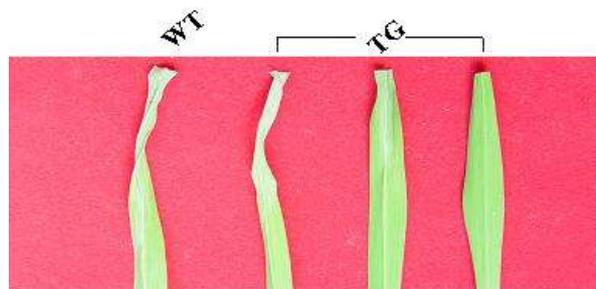


그림 20. *bCH1* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 벼 흰잎마름병 생물검정(가위접종법)

(3) *bCH1* 유전자 도입 벼 형질전환체의 도열병 저항성 검정

그림 9는 *bCH1* 유전자 형질전환 계통(흑남벼)에 대한 도열병 생물검정 결과를 나타낸 것으로 검정에 사용된 13계통 중에서 11, 18, 19, 20번 계통에서 발병지수가 매우 낮은 것으로 조사되어 저항성이 있는 것으로 확인되었다. 이 결과를 바탕으로 *bCH1* 유전자 형질전환 벼를 세대진전하면서 그 기능이 유전되는지를 확인해 본 결과, 벼 잎집무늬마름병, 흰잎마름병, 도열병 등 생물적 스트레스에 대해 초기 세대에서는 내성증진 기능을 가지는 것으로 확인되었으나(그림 21), 세대를 진전하면서 재확인 해 본 결과 그러한 기능이 유지되지 않았다(그림 22, 그림 23).

계 통	발 병 지 수 (0-9)
bCH-1-1	4
-2	4
-3	3
bCH-2-1	5
-2	5
-3	-
bCH-4-1	4
-2	5
-3	-
bCH-5-1	5
-2	-
-3	-
bCH-6-1	4
-2	-

그림 21. *bCHI* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 도열병 생물검정 결과

bCH	35s	64-2-5-6	5	5	5	5	
bCH	35s	64-2-5-6	5	5	5		
bCH	ggb	73-2-10-1	5	4	4	4	
bCH	ggb	117-2-1-1	4	5	5	5	5
bCH	ggb	117-2-1-1	5	5	5	5	5
bCH	ggb	73-2-10-2	5	4	5	5	
흑남벼			5	5	5	5	5
흑남벼			5	5	5	5	5
흑남벼			5	5	5	5	
흑남벼			5	5	5	5	

그림 22. *bCHI* 유전자 형질전환 벼 T3 계통의 도열병 생물검정 결과 (흑남벼)

bCH	35s	1-2-4	5	5	5	5		bCH	ggb	92-1-7	5	5	5	5	
bCH	35s	1-2-4	5	5	5	5	5	bCH	ggb	102-11-6	5	5	5	5	
bCH	35s	1-2-4	5	5	5	5	5	bCH	ggb	102-1-6	5	5	5	5	
bCH	35s	1-2-4	5	5	5	5		bCH	ggb	102-1-7	5	5	5		
bCH	35s	14-1-2	5	5	5	5		bCH	ggb	102-1-7	5	3	5	5	5
bCH	35s	14-1-2	5	5	5	5	5	bCH	ggb	102-1-7	5	5	5	5	5
bCH	35s	14-1-2	5	5	5	5	5	bCH	ggb	102-1-7	3	5	5	5	5
bCH	35s	14-1-2	5	5	5	5		bCH	ggb	106-1-6	5	5	5	5	5
bCH	35s	24-2-3	5	5	5	5	5	bCH	ggb	106-1-6	5	5	5	5	5
bCH	35s	24-2-3	5	5	5	5	5	bCH	ggb	106-1-6	5	5	5	5	5
bCH	35s	24-2-3	3	5	5	5		bCH	ggb	106-1-6	5	5	5	5	5
bCH	35s	24-2-3	5	5	5	5	5	bCH	ggb	106-1-8	5	5	5	5	5
bCH	35s	102-1-2	5	5	5	5	5	bCH	ggb	106-1-8	4	5	5	5	5
bCH	35s	102-1-2	5	5	5	5	5	bCH	ggb	106-1-9	4	5	5	5	4
bCH	35s	102-1-5	4	5	2	3	5	일미벼			5	5	5	5	5
bCH	35s	102-1-5	4	3	5	5		일미벼			5	5	5	5	
bCH	ggb	83-1-6	5	5	5	4		일미벼			5	5	5	5	
bCH	ggb	92-1-7	5	4	5	5	3	일미벼			5	5	5	5	5

그림 23. *bCHI* 유전자 형질전환 벼 T2 계통의 도열병 생물검정 결과 (일미벼)

마. 아이소플라본 고함유 콩 계통의 특성 평가 및 품종 출원

(1) 아이소플라본 고함유 계통의 지역적응성 평가

수원241호(장류용), 수원242호(나물용)를 공시재료로 사용하여 그림 11에 나타낸 지역에서 이들 계통에 대한 지역적응성을 평가하였다.



그림 24. 아이소플라본 고함유 계통의 지역적응성 평가 지역

2006년과 2007년에 공시한 계통의 2년차 평균의 농업형질특성에서 장류용으로 공시된 수원241호는 표준품종인 태광콩에 비하여 다소 늦은 만생종으로서 수량수준은 전국평균 94% 수준의 수량성을 보였다. 나물용으로 공시된 수원242호는 표준품종인 풍산나물콩에 비하여 2일 정도 일찍 수확할 수 있었고, 100립중이 다소 가벼웠으며, 수량수준은 전국 공시지역 평균 97%의 수량성을 나타내었다 (표 5).

표 5. 아이소플라본 고함유 계통의 주요 농업형질 (전국 10개소 평균, '06~'07)

구분	시험 년차	계통 및 품종명	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	SMV (0-9)	100립중 (g)	수량(kg/10a)			
							'06	'07	평균	지수
장류용	표준	태광콩	10. 2	68	0	22.7	278	206	242	100
	2년차	수원241호	10.16	70	1	22.7	272	184	228	94
나물용	표준	풍산나물콩	10.10	56	1	11.4	279	264	271	100
	2년차	수원242호	10. 8	58	1	11.0	276	252	264	97

공시된 지역적응 계통들의 지역별 연차별 수량성을 살펴본 결과, 공시된 계통들이 전국적으로는 수량성이 표준품종에 비하여 다소 적었으나, 수원241호의 경우, 춘천, 예산, 칠곡 및 진주에서는 표준품종보다 수량성이 높았다. 그러나, 수원242호는 제주도를 제외하고 전국적으로 다소 낮은 수량성을 보였다 (표 6).

표 6. 아이소플라본 고함유 계통의 지역별 누년수량 성적 (kg/10a, '06~'07)

지대 구분	시험 장소	장류용							나물용						
		태광콩			수원241호			지수	풍산나물콩			수원242호			지수
		'06	'07	평균	'06	'07	평균		'06	'07	평균	'06	'07	평균	
단작	수원	294	234	264	229	119	214	81	300	268	287	300	233	266	93
	연천	292	145	219	245	177	211	97							
	대구	308	243	275	351	200	259	94							
	춘천	281	262	272	<b>326</b>	<b>316</b>	<b>321</b>	<b>118</b>							
	평균	294	221	257	280	223	251	98	300	268	287	300	283	266	93
이모작	김제	235	249	242	242	181	212	87	233	265	249	233	256	244	98
	나주								275	251	263	264	237	251	95
	청원	338	246	292	258	258	191	77							
	예산	233	120	177	<b>240</b>	<b>117</b>	<b>179</b>	<b>101</b>							
	칠곡	308	266	287	<b>351</b>	<b>231</b>	<b>291</b>	<b>101</b>	319	294	306	308	294	301	98
	진주	310	175	243	<b>396</b>	<b>160</b>	<b>278</b>	<b>115</b>							
	북제주	184	116	150	210	64	137	91	262	241	251	<b>276</b>	<b>239</b>	<b>257</b>	<b>102</b>
	평균	268	195	232	274	283	157	95	279	264	271	276	252	264	97
전국	평균	278	206	242	282	184	233	96	279	264	271	276	252	264	97

장류용 지역적응 공시계통인 수원241호의 종실특성 및 품질특성에서는 수원241호의 일반 종실성분특성은 표준품종인 태광콩과 유사하였다. 종실의 총아미노산함량은 태광콩보다 유의하게 높았으며, 아이소플라본 함량역시 높았다. 가공특성에서는 수원241호가 두부수율은 다소 낮았으나, 청국장 수율은 태광콩에 비하여 높았다 (표 7).

표 7. 장류용 지역적응 계통의 종실성분 특성 및 품질특성

계통명	조단백 (%)	지방 (%)	회분 (%)	조섬유 (%)	포화지방산 (%)	불포화지방산 (%)	총아미노산함량 (mg/100g)	아이소플라본함량 (µg/g)	두부수율 (%)	청국장수율 (%)
태광콩	37.3	18.2	5.21	4.19	17.7	82.3	31,082	1,707	217.6	188
수원241호	37.9	14.4	5.51	4.48	15.1	84.9	34,146	1,816	205.4	199

나물용 지역적응 공시계통인 수원242호의 일반 종실 성분특성에서 조지방함량이 높아서 콩나물의 식미가 고소할 것으로 추정되며, 콩나물로 재배하였을 경우, 아이소플라본함량은 표준품종인 풍산나물콩보다 다소 높게 나타났다. 콩나물의 특성에서는 길이는 다소 짧으나, 통통한 특성을 보이었으나, 콩나물 수율은 다소 낮은 98%의 수준을 보이었다.

이상의 결과로서 수원242호를 선발하여 고아이소플라본 함유 콩 품종 (신강콩)으로 출원하였기에 그 품종출원자료를 첨부하였다.

표 8. 나물용 지역적응 계통의 종실성분 특성 및 품질특성

계통명	조단백 (%)	지방 (%)	발아세 (%)	발아율 (%)	콩나물건물 중의 아이소플라본함량 ( $\mu\text{g/g}$ )	100립중 (g)	콩나물배축장 (cm)	콩나물배축직경 (mm)	콩나물수율 (%)
풍산나물콩	37.8	16.82	97	100	2,907	12.3	9.5	1.98	610
수원242호	37.0	17.4	98	100	2,921	10.8	9.1	1.99	600

(2) 아이소플라본 고함유 계통의 품종출원

콩(*Glycine max*(L.) Merr.)  
(계통명 : 수원 242호)

(가) 구분 : 육성품종

(나) 육성내력

- ① 교배조합 : 소원콩/4/L29
- ② 교배년도 : 2002
- ③ 계통명 : SL-19-6-1M137
- ④ 생산력검정시험 : 2005~2006(2년)
- ⑤ 지역적응시험 : 2006~2008(3년)
- ⑥ 육성기관 : 국립식량과학원

(다) 주요특성

- ① 유한신육형, 중만생종
- ② 내도복, 내병(콩모자이크바이러스병, 불마름병), 종실 고균일
- ③ 콩나물 품질이 우수하고 수율이 높음
- ④ 용도 : 콩나물용
- ⑤ 분자표지 육종방법으로 *Rsv3* 유전자 집적

(라) 적응지역

- 전 국(강원제외)

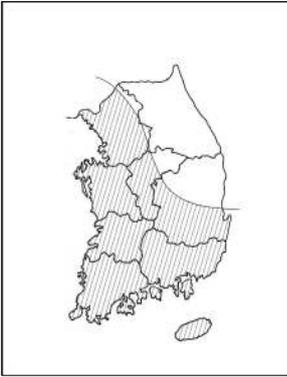
(마) 재배상 유의점

- 성숙기가 다소 늦으므로 안전 수확을 위하여 만과를 피하는 것이 좋음

(바) 보완을 요하는 특성

- 조숙화

▣ 적응지역



(사) 시험성적

① 고유특성

- 수원242호는 유한신육형으로 꽃색은 자색, 종피색은 황색, 배꼽색은 담갈색이며, 립형은 구형임
- 성숙 후 탈립이 잘 되지 않음 (‘06~’08, 식량원)

계통명	신육형	엽형	꽃색	모용색	종피색	배꼽색	립형	협개열성
수원242호	유한	피침	자	회	황	담갈	구	난
풍산나물콩	"	"	"	"	"	황	"	"

② 가변특성

- 수원 242호의 성숙기는 10월 7일로 풍산나물콩에 비해 약 3일 빠르고 도복에 강함
- 100립중은 11.0g으로 풍산나물콩과 비슷함 (‘06~’08, 지적)

계통명	개화기 (월·일)	성숙기 (월·일)	경장 (cm)	주경 절수	도복 (0-9)	100립중 (g)
수원242호	7. 30	10. 7	60	15	강(2)	11.0
풍산나물콩	8. 1	10. 10	58	15	강(2)	11.4

③ 내재해성 및 병충해 저항성

○ 내재해성

- 표준품종인 풍산나물콩에 비하여 내습성은 강하였으나, 내한발성은 약하였음
- 기계화 수확적응 형질인 탈립율은 풍산나물콩에 비하여 매우 낮았음 (‘06~’08, 지적)

계통명	내재해성		
	내습성 (무처리대비 수량, %)	내한발(0~9)	탈립율 (%)
수원242호	38	중(4)	2
풍산나물콩	26	중강(2)	23

○ 병충해 저항성

- 수원242호는 불마름병 및 검은뿌리썩음병에 저항성을 나타냈음

- 종실이병립률은 표준품종인 풍산나물콩과 유사하였으며, 콩나방 피해립율은 다소 낮았음. ('06~'08, 지적)

품종 및 계통명	불마름병저항성 (0-9)		검은뿌리썩음병 (0-9)	이병립율(%)				콩나방 피해립율 (%)
	유묘	포장		자반병	갈반병	미이라병	계	
수원242호	강(1)	강(1)	강(2)	0.1	0.2	0.0	0.3	0.5
풍산나물콩	강(1)	강(1)	중강(3)	0.0	0.2	0.0	0.2	1.1

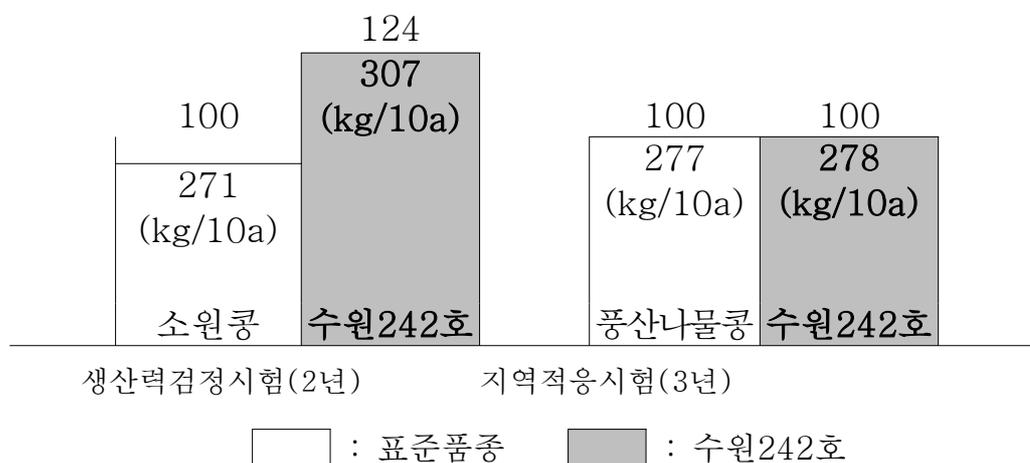
- 수원242호는 콩모자이크바이러스병에 강한 저항성을 보임
- 분자표지 육종방법으로 Rsv3 유전자 집적

계통명	콩모자이크바이러스저항성				
	유묘 저항성			포장 저항성*	
	G7H	G6H	G5	모자이크(0~9)	피저(%)
수원242호	M*	-	-	강(1)	0
풍산나물콩	N	-	-	강(1)	0

\* N : 피저, M : 모자이크, - : 무병징

#### ④ 수량성

- 생산력검정시험('05~'06)결과 307kg/10a로 표준품종 대비 13%증수.
- 전국 5개소 평균 지역적응시험('06~'08)의 수량은 278kg/10a로 표준품종과 대등



#### ○ 지역적응시험 성적('06~'08)

- 지역적응시험 성적 요약

구분	시험지수	대비품종 평균수량	추천계통(수원241호) 수량(kg/10a)							
			2006	2007	2008	평균	지수	범위	CV (%)	LSD (5%)
전국 (강원제외)	5	277	276	252	306	278	100	233 ~ 444	18.9	99.1

지대구분	시험지역	수원242호(kg/10a)				지수	풍산나물콩(kg/10a)			
		2006	2007	2008	평균		2006	2007	2008	평균
단작	수원	300	233	302	278	97	306	268	291	288
이모작	대구	308	294	275	292	100	319	294	266	293
	김제	233	256	282	257	105	233	265	237	245
	나주	264	237	226	242	95	275	251	238	255
	북제주	276	239	444	320	105	262	241	413	305
	평균	270	257	307	278	101	272	263	289	275
전국	평균	276	252	306	278	100	279	264	289	277
CV(%)					18.9					17.8
LSD(5%)					99.1					92.8

### ⑤ 품질특성

#### ○ 콩나물 품질 특성

- 수원242호의 콩나물재배 특성 중 전장과 배축장은 풍산나물콩 대비 짧았으나 발아세는 높았음.
- 콩나물 수율은 표준품종인 풍산나물콩과 대등하였음

(‘07~‘08, 식량원)

계통명	전장 (cm)	배축장 (cm)	배축직경 (mm)	발아세 (%)	부패립율(%)	경실립율 (%)	수율 (%)	지수
수원242호	17.7	8.8	2.0	<b>97</b>	0.2	0.0	<b>635</b>	101
풍산나물콩	18.3	10.1	2.0	<b>93</b>	0.3	0.5	<b>628</b>	100

#### ○ 일반성분 및 콩나물의 아이소플라본 함량

- 수원242호의 종실단백질함량은 풍산나물콩 대비 낮았으나, 콩나물의 총 isoflavone 함량은 풍산나물콩과 유사하였음

(‘07, 식량원)

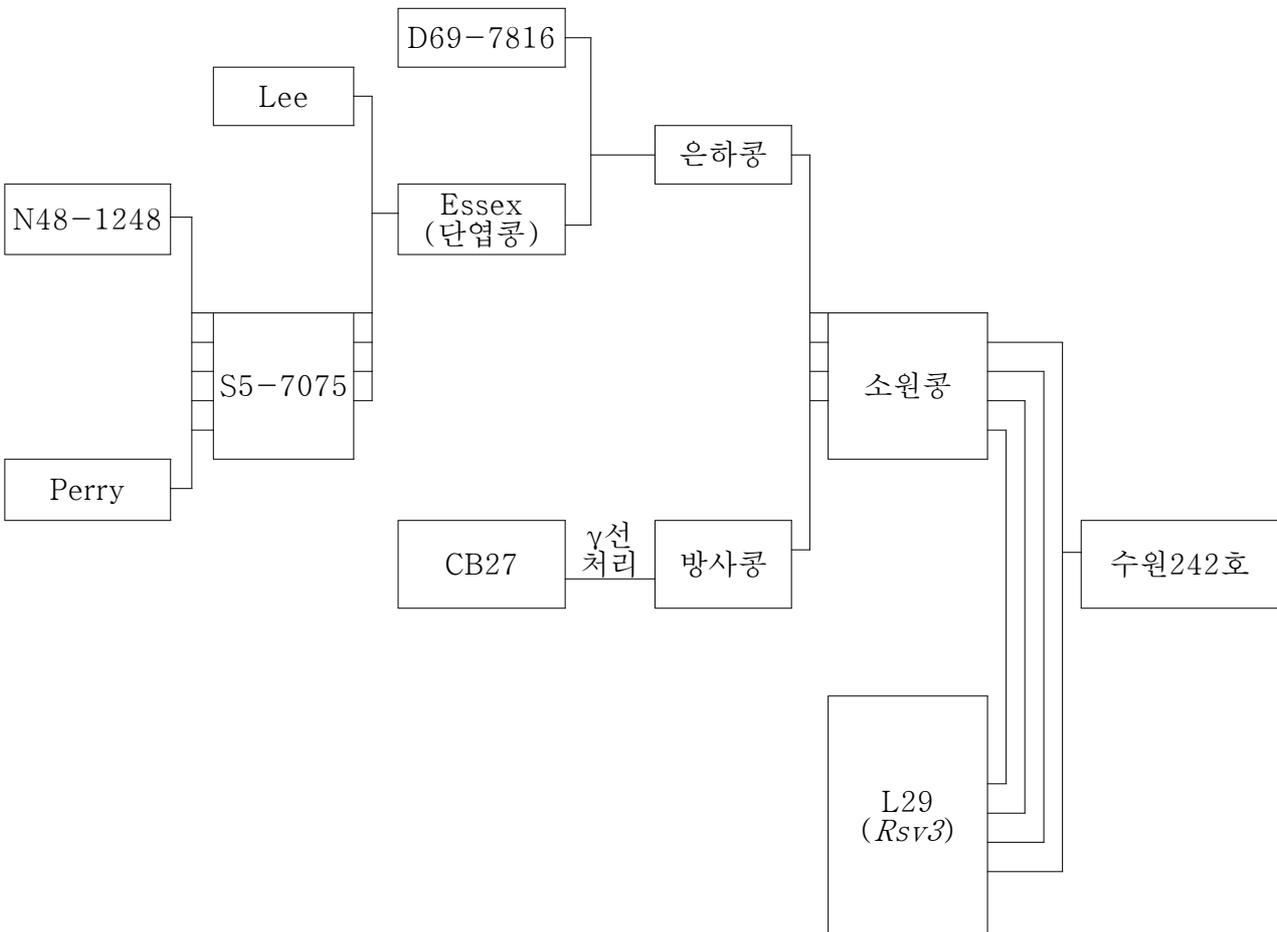
품종명	조단백 (%)	조지방 (%)	콩나물의 Isoflavone( $\mu\text{g/g}$ )			
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
수원242호	36.6	18.4	1,087	418	1,416	2,921
풍산나물콩	38.8	17.6	1,122	467	1,318	2,907

(아) 육성경과

① 육성계통도

연도	'02	'02	'03	'03	'03	'04	'05	'06	'07	'08
세대	교배	BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>5</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>6</sub>	BC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>
소원콩 × L29		1	1	1	1	1	1	1	1	1
		:	:	:	:	②	2	②	2	②
	SL	:	19	:	137		PYT	AYT	수원242호 (SL-19-6-1-137-2-3-2-3-2)	
		:	:	:	:					
	12	235	6		187					
주요과정	인공 교배	여교배			계통육성		생검	지적		

② 육성계보도



(자) 종자확보량

기본식물	원원종급	원종급	보급종
개체	2 kg	5 kg	-

(차) 대체품종

- 기존품종과 병행보급

(카) 기타참고 사항

① 품종명칭 추천안 및 명명사유(안)

작물명	계통명	명명안	명명사유
콩	수원242호	1안 : 무릉(Mureung)	바이러스에 저항성으로 손쉽게 재배가능
		2안 : 신화2호(Shinhwa 2)	신화콩과 같이 분자마커 활용 육성
		3안 : 신강(Shingang)	새롭게 육성되고 내병성에 강한 콩

② 추천계통 장려도 지정

- 작성기관 : 국립식량과학원 전작과

작물명	계통명	경기	강원	충북	충남	전북	전남	경북	경남	제주
콩	수원242호	○	×	○	○	○	○	○	○	○

③ 품종특성표

- 작성기관 : 국립식량과학원
- 대조품종명 : 풍산나물콩

No.	형질	표현형태									출원품종		대조품종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No.	실측치	No.	실측치
1	배축색	없거나 매우 약하다		약하다		중간		강하다		매우 강하다	3	자색	5	자색
14	제색	회색	황색	갈색	농갈	흑색					3	갈	2	황색
16	성숙기	매우 빠르다	매우 빠르다	빠르다	다소 빠르다	중간	다소 늦다	늦다	늦다	매우 늦다	6	10월 7일	7	10월 10일

#### ④ 추천계통 주요 특성표(수원242호)

용도	품종명	시험수		지적시험수	수량 (kg/10a)		주요특성('06~'08, 지적)						적응지역	특기사항
		생검	지적		생검	지적	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	도복 (0~9)	SMV (0~9)	조단백 (%)	100립중 (g)		
나물용	신강콩	2	3	5	307	278	10.7	60	2	1	36.6	11.0	전국 (강원 제외)	나물용, 분자표지 도움, 육종방법으로 콩모자이크바이러스 저항성 유전자 <i>Rsv3</i> 보유

#### (타) 품종출원 (출원 2009-86)

국립종자원 홈페이지에 오신 것을 환영합니다. - Windows Internet Explorer

http://www.seed.go.kr/newVariety/newVariety\_04\_01\_totalview.jsp

국립종자원 홈페이지에 오신 것을 환영합니다.

출원품종의 아미노산함량은 13%로 대조품종 16%보다 적지만, 일반계 품종인 화형에 비해서 비타민 및 단백질, 아미노산 함량 등이 높다.	출원품종의 노화는 대조품종보다 늦게 진행된다.		
공개번호	2009 - 141	공개일자	2009.02.15
출원번호	출원 2009 - 86	출원일자	2009.01.12
우선결주장		심사관	유병천
출원인	농촌진흥청장		
육성자	문종경 서민정 이석기 강성택 구자환 김을호 이석하 윤홍태 조성근 오영진 김현태 한원영 김동관 김용덕 김재규 김시주		
품종명	신강		
학명 및 일반명	<i>Glycine max (L.) Merrill</i> / 콩		
품종특성	<p>1. 식물체의 주요 형태적 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>유한신속형이며, 엽형은 피침형임</li> <li>꽃색은 자색이고 모용색은 흰색이며 종피색은 황색임</li> <li>입형은 구형이며, 성숙 후 협의 개열이 잘 안됨</li> <li>성숙기는 대조품종(풍산나물콩)에 비해 약간 빠름.</li> <li>100립중은 11.0g정도로 대조품종(풍산나물콩)과 유사함.</li> </ul> <p>2. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성 (대조품종:풍산나물콩)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>신강은 배꼽색이 갈색으로 풍산나물콩의 황색과 구별됨</li> <li>신강의 배속색은 중간이고 풍산나물콩의 배속색은 약함으로 구별됨</li> <li>신강의 성숙기는 다소 늦으나 풍산나물콩의 성숙기는 늦음</li> </ul>		

#### (파) 수원 242호 (신강콩)의 외관특성



풍산나물콩

수원 242호



풍산나물콩

수원 242호

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ 우리나라 콩 국제 컨소시엄 참여에 의하여 콩 염기서열 결정함으로써 구조 유전체학의 발전을 기대할 수 있었고, 콩 유용유전자 발굴 및 실용화 연구를 활성화할 수 있었다.

○ 현재 염기서열 결정의 목표 지역에는 콩 불 마름병 저항성 유전자 (*rxp*)가 위치하고 있으며, 이번 연구과제에서 염기서열 결정을 거의 눈앞에 두고 있다. 불 마름병은 다수의 유전자에 의하여 지배되는 일반적인 병과는 달리 단일 주동유전자에 의하여 저항성이 지배되는 특이한 유전 양식을 가지고 있어, 염기서열 결정에 의한 병 저항성 기작 구명의 큰 효과를 가져 올 것으로 기대된다. LG D2와 LG A1, LG C1와 LG C2의 부분의 게놈이 중복되어 있는 것을 밝혀, 콩에서 게놈 중복에 관한 연구 효과를 가져 올 것으로 기대된다.

○ 뿌리혹 발달에 따른  $\beta$ -carotene hydroxylase과 xanthophyll 합성관련유전자들의 기능을 구체적으로 조사 하였다.  $\beta$ -carotene hydroxylase 유전자가 관여하는 대사경로상의 다른 효소들의 발현이 뿌리혹 발달과정에서 조사되어졌고, 뿌리혹 발달 과정에서  $\beta$ -carotene hydroxylase와 xanthophyll 합성과 관련 있는 ZEP와 VDE유전자의 연관성을 조사하였으며, 다른 발현양상을 보이는 BCH의 isoform을 클로닝하였다.  $\beta$ -carotene hydroxylase를 발현하는 담배 형질전환체와 *E.coli*를 이용하여, BCH의 효소활성도를 HPLC를 통해 측정하여,  $\beta$ -carotene hydroxylase의 기능이 검증되었다. RNAi을 이용하여, BCH유전자의 감소된 발현량을 가지는 뿌리혹의 표현형을 분석하여, 뿌리혹발달 동안, BCH기능의 중요성을 확인할 수 있었다.

○ 실용 가능성 유전자들의 full-length cDNA가 분리 및 실용 가능성 유전자들의 기능을 조사 하였다. CapFishing기술을 이용하여 2개의 full-length cDNA를 얻었고, GmLRK의 발현을 RT-PCR과 *in situ* hybridization을 이용해 확인하였다. GmRLK1의 kinase assay를 통하여 유전자를 분석하고, GmLRK1의 애기장대 ortholog로 여겨지는 AtLRK1의 transposon-tagged mutant와의 complementation test를 이용하여 기능을 유추하였다. Biotinylation을 이용하여 GmTRX의 novel target을 찾고, 두 단백질의 상호작용을 통하여 식물 내의 역할을 유추하였다.

○ 콩에서 분리된 고유의 유용유전자를 형질전환기술을 이용하여 여러 작물에서 성공적으로 형질전환체를 확보하였으며, 특히 항산화기능이 강화된 신기능성 작물의 개발은 대사공학적인 방법이 요구되는 고난이도의 기술로써 개발 성공하였다. 본 연구를 통해 분리되는 유전자는 이미 국내 특허를 출원하여 국산기술의 보호를 도모하였고, 고함유 아이소플라본 콩 계통은 이미 신강콩으로 품종 출원을 마쳤다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

- 콩 기능 유전체 연구 및 생물정보 연구를 위한 데이터 제공이 가능하여, 분자생물학, 기능 유전체학, 생물 정보학 간의 유기적인 협조 체제 구축을 할 수 있었다.
- 발현 유전자들간 상보적 분석을 통하여 애기장대의 유전정보와 비교, 활용하고, 콩과 작물 특이 유전자에 대한 연구에도 활용하여 발굴된 유전자들을 형질전환 등을 통해 새로운 품종개발이나 실용화에 도움이 될 것으로 사료되어 본 연구의 결과들이 생산성 높은 유용식물체 개발 또는 기능성이 강화된 콩을 개발하는데 활용되었다.
- 기능성이 향상된 신품종은 다양한 육종소재로 활용 가능하여, 이 연구과제에 투입된 기술은 새로운 형질의 작물개발에 적극 활용하였다.
- 이 연구과제를 통하여 국외논문 5건을 게재하였고, 그 중 4건은 SCI급이었다. SCI 급 여러 논문들을 준비 중이며, 특허 및 품종도 출원하였다. 특히, 품종 등록된 고함유 아이소플라본 콩 계통은 농가에 보급할 예정이다.

### 제 2 절 성과활용 계획

- 연구가 더 진전되면, GmTRX와 결합하는 단백질을 명확하게 규명하여 이를 논문으로 출간할 계획이며, 또한  $\beta$ -carotene hydroxylase의 경우도, 단백질 활성이 확인되면 지금까지의 결과들을 모아서 논문으로 출간할 계획이다.
- GmLRK1은 이 단백질이 Soybean 종실 발달시, 어떠한 신호전달에 관여하는지를 추가적으로 연구할 계획이다. 이 결과는 외부 자극이나 환경변화가 종실 발달에서 어떠한 영향을 미치는지를 규명하는 데 유용한 정보를 얻게 해 줄 것으로 기대된다.
- 고아이소플라본 함유 콩 계통을 선발하여 품종출원(신강콩)을 완료하였으며, 육종학회지에 논문으로 투고할 예정이다.
- 개발된 환경스트레스 내성증진 형질전환 벼 계통들은 “내한발, 내염성 형질전환 작물 소재개발”(농진청 15대 연구개발과제 200901FHT020813547에서 후속 실험들을 수행할 계획이다.
- 형질전환 작물의 안전성 검정이 반드시 필요하며, 농업생명공학연구원의 안전성과와 긴밀히 협조하여 환경에 대한 안전성, 식품으로서의 안전성 등에 대한 추가 조치가 필요할 것으로 기대된다.

○ 또한 형질전환작물의 육종기관에서 교배 모부본용 등으로 바로 이용될 수 있도록 조치를 취하며, 발굴된 유용유전자의 특허화와 산업화에 대한 지속적 조치를 취할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 GS FLX (GS 20 sequencer, 454 sequencing)

○ 지난 수년간 Sanger sequencing 기술의 큰 발전에도 불구하고 염기서열결정 비용을 더 줄이고 나아가 백만원으로 게놈 하나를 결정할 수 있는 장기적인 목적에 도달하기 위해서는 근본적으로 다른 염기서열결정 방법을 찾아야 했다. 보다 효율적이고 비용 절감적이면서 기존의 Sanger 방법의 정확성을 유지할 수 있는 방법이 필요하여 개발한 것이 최근에 PicoTiterPlate 이용한 반응 챔버에 이루어지는 pyrosequencing의 원리를 응용한 것이다. pyrosequencing이란 실시간으로 sequencing-by-synthesis 방법으로 Sanger dideoxy-sequencing 방법과 유사한 정확성을 제공한다. 이 기술을 개발한 회사(454 Life Science Corp.)의 이름을 따서 454-sequencing이라고 일컫어진다. 이것은 현재 최신식 Sanger sequencing과 capillary electrophoresis 플랫폼보다 100배 더 빠르게 염기서열을 결정할 수 있는 cloning 단계가 필요없는 pyrosequencing을 토대로 한 시스템이다.

○ 454 sequencing은 게놈 DNA를 기계적으로 수백 bp 정도의 단편으로 절단한 후 microbead를 1:1 비율로 붙인다. microbead는 유상액(乳狀液) 방울마다 들어있어서 주형 DNA를 증폭하기 위한 PCR 반응액으로 이용된다. 그리고 나서 PicoTiter-Plate라는 광섬유슬라이드에 microbead가 분배되고 네 개의 DNA 뉴클레오타이드가 되풀이되어 공급된다. 각 구멍마다 DNA 사슬에 뉴클레오타이드가 첨가되면 발광효소 luciferase에 의해 광시그널로 전환된다 (그림 1 참조). 454 sequencing에서 신호강도는 각 단계마다 첨가된 뉴클레오타이드의 갯수에 비례한다.

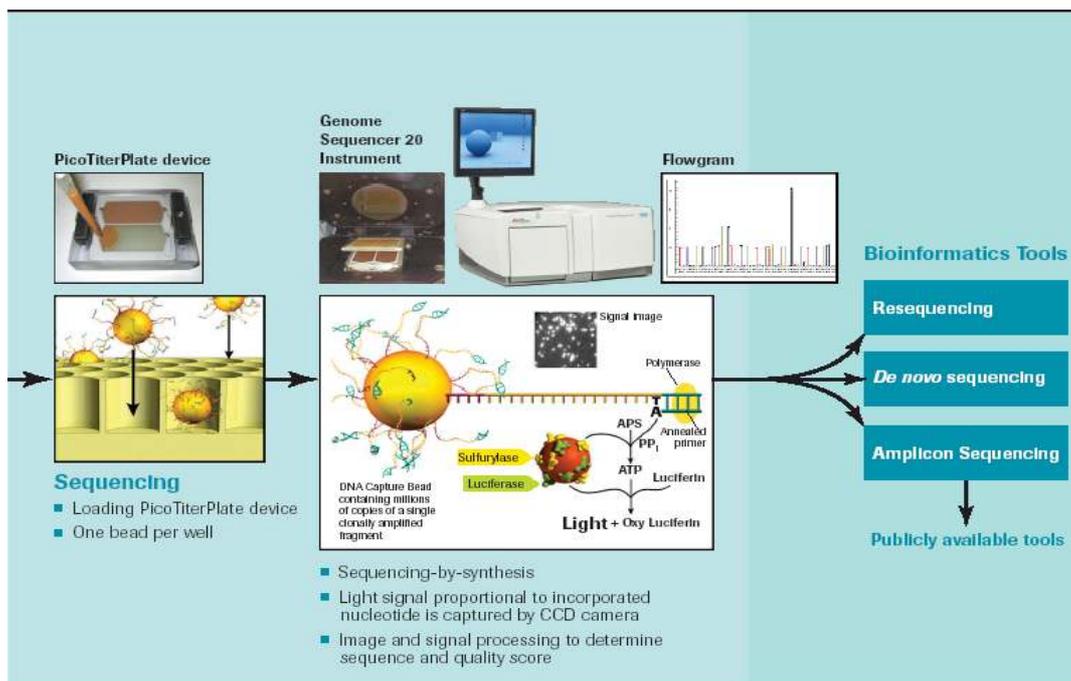


그림 1. GS 20 sequencer에 의한 454 sequencing 방법 전체 도식도

○ ABI Sanger와 454 염기서열결정 방법은 몇가지 단계는 유사하지만 많은 부분에서 다르다(표 1). 무엇보다 time-intensive한 몇 단계들을 생략할 수 있으므로 매우 빠르게 진행될 수 있다. 두 방법에 있어서 공통적인 점은 BAC DNA를 기계적으로 절단하여 ABI-Sanger의 경우는 2-10kb 정도로 454 sequencing의 경우는 몇 백bp 정도로 만든다. ABI-Sanger sequencing은 절단한 DNA 단편을 E.coli cell로 삽입하는 sub-cloning단계 (shotgun library라고 함)가 필요하다. 개개의 clone을 따서 액체배지에 키워서 plasmid DNA를 추출하여 염기서열결정반응의 주형 DNA를 사용한다. 현재 ABI-Sanger sequencer는 800-1,000bp 정도를 깨끗하게 읽어낼 수 있다. 반면 454 sequencing은 지금까지 100-200bp 정도만을 읽을 수 있다.

표 1. ABI-Sanger sequencing과 454 sequencing의 비교

Procedure	ABI-Sanger	454	time required
Isolation of BAC DNA	X	X	1 day
Mechanical shearing	X	X	2 h
Cloning	X		4 h
Clone picking	X		2 h
Plasmid DNA extraction	X		20 h
Reaction on thermocycler	X		36 h
Clean up reaction products	X		2 h
ABI 3730xl sequencer run	X		24 h
454 sequencing library		X	4 h
Amplification in PCR microreactors		X	6 h
GS 20 sequencing run		X	4 h
Assembly of raw sequences	X	X	days to weeks

○ 454 sequencing의 성능은 반복염기서열이 적은 미생물과 고등식물의 색소체 게놈에 대해 제한적으로 평가되었다. 큰 진핵생물체에 대해서는 오직 보존된 맘모스 게놈 DNA의 염기서열 결정에 이용되었다. 크고 반복적 염기서열이 많은 식물 게놈 염기서열 분석에 454 sequencing 방법을 이용한다는 것은 기술적인 도전으로서 앞으로 유전체학자들의 관심이 집중되리라 생각한다.

## 제 2 절 콩 유전학 및 유전체학

1970년대 이후로 DNA 염기서열을 밝히는 여러 방법들이 개발되면서 생물학을 연구하는 많은 실험실에서 혁명적인 변화가 일어났다. 생물학적 기능들을 밝히기 위해 생물의 표현형에서 나타나는 차이뿐만 아니라 염기서열에서의 차이를 살펴보기 시작한 것이다. 2000년대 또한 하나의 혁명적 변화가 있었고 그러한 지금을 post-genomics 시대라 말한다. 이는 곧 이전에 개별적으로 다루었던 염기서열 정보들이 이미 모두 밝혀져 누구나 쉽게 들여다 볼 수 있다는 것이다. 이제는 넘쳐나는 정보 속에서 필요한 정보만을 선택하는 것이 매우 중요한 일이다. 올해 초 콩의 유전체 정보가 거의 밝혀졌고, 웹상에 공개되어 있다

(<http://www.phytozome.net/soybean.php>). 콩 유전체 정보를 효과적으로 사용하기 위해서는 먼저 반복염기서열(repeat sequence)들을 제거하는 방법, 기존에 알려있는 반복염기서열의 데이터베이스를 이용하여 제거하는 방법과 RECON이라는 프로그램을 이용하여 새롭게 반복염기서열을 밝히는 방법이 있다. 콩에서는 아직 반복염기서열에 대한 연구가 많이 진행되어 있지 않아 아직은 두 번째 방법을 더 선호한다. 반복염기서열을 제거한 후에 Fgenesh, genemark 등의 여러 프로그램들이 사용 유전자의 구조를 예측 (gene prediction)하게 된다. 유전자 구조를 예측하는 데에는 EST 데이터베이스와 같은 전사체 (transcriptome)에 대한 정보도 아주 유용하게 사용될 수 있으며, PlantGDB (<http://www.plantgdb.org/>)에서는 GeneSequer라는 프로그램을 이용하여 전사체에 대한 정보를 유전자 구조 예측에 사용할 수 있다. 또한 yrGATE를 이용하여 연구자가 관심 있어 하는 특정 부분에 대해 자세한 분석도 가능하다. 이렇게 예측된 유전자 구조에 따라 이 유전자가 어떠한 기능을 가지는지에 대해 밝히게 된다. (gene annotation) 이는 기존에 밝혀져 있는 유전자들의 염기서열과 비교하여 알 수 있다. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 나 UniProt ([www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/))의 데이터베이스를 이용하면 완벽하게 일치하지는 않지만 유전자의 기능에 대해 여러 가지 정보를 얻을 수 있다.

### 제 3 절 SOY2008 학회 참석 및 발표

SOY2008은 전 세계의 콩 연구가는 물론 육종가, 농부 그리고 여러 종자 회사들이 참여하는 국제적인 콩 학술대회이며, 2년에 한 번씩 열리는 이번 학회에서 콩 유전체 연구에 대한 국제적인 흐름을 파악할 수 있다. 학회는 7월 20일부터 23일까지 나흘 간 인디애나폴리스 (Indianapolis, IN) 도심에 위치한 하얏트 호텔에서 진행되었다. 구두 발표는 모두 6개의 세션으로 나누어져 structural genomics, biotic stress, abiotic stress, functional genomics, compositional engineering 등 콩 연구의 모든 분야를 다루었다.

먼저 structural genomics 세션에서는 얼마 전에 발표된 soybean genome sequence에 대해 Stanford 대학의 Jeremy Schmutz로부터 2006년 미국 에너지성(Department of Energy, DOE) 산하의 협력 게놈 연구소(Joint Genome Institute, DOE-JGI) 주도로 시작된 콩 유전체 분석 프로젝트에 대해 현재까지의 진행 경과와 앞으로의 연구 계획을 발표하였다. 이어지는 발표에서는 USDA의 David Hyten이 대량의 분자마커를 이용하여 USDA가 보유하고 있는 유전자원을 분석한 결과를 발표하였으며, 이후 발표에서는 콩에서의 repeat elements와 콩과 가까운 콩과작물과의 비교유전체(comparative genomics)에 대해서도 발표가 있었다.

Biotic stress 세션에서는 대부분 병해충 저항성에 대한 발표가 이어졌으며, 특히 미국 본토에서 심각한 문제를 일으키고 있는 cyst nematode와 Asian soybean rust에 대한 발표가 주로 많았다. Abiotic stress 세션에서는 점점 더 문제가 되고 있는 전지구적 온난화에 대응하여 가뭄에 잘 견디는 콩을 개발하기 위해 콩의 물 이용효율에 대한 연구나 drought stress에 관한 발표가 이어졌다. 특히 주변 환경에 잘 적응하는 인자나 유전자를 콩에 어떻게 도입시키며, 도입된 콩을 이후에 어떠한 방법으로 선발하는가에 대해 발표가 있었다.

Functional genomics 세션에서는 특히 여러 가지 새로운 장비와 기술들을 이용하여 많은 양에 실험 결과를 도출하고 이를 분석하는 방법들이 소개되었다. 마지막으로 compositional engineering에서는 최근 대두되고 있는 바이오디젤에 관한 연구소개가 있었으며, 여기에선 어

떻게 하면 콩 종실에 더 많은 기름을 축적시킬 수 있는지, 다른 유전자원에서는 콩 종실의 구성이 어떻게 이루어져있는가에 대해 발표가 있었다. 또한 well-being 시대에 높아진 식물의 이차대사물 (secondary metabolites)에 대한 관심 때문에, 오메가3와 같이 사람에게 유익한 물질을 많이 함유하고 있는 콩을 만들어내는 연구에 대해서도 발표가 있었다.

## 제 4 절 Plant Biology 2005 학회 참석 및 발표

1. 여행기간 : 2005. 7. 16~21 (6일간)

2. 여행국 : 미국(시애틀)

3. 여행배경

- 식물 생명공학 분야의 최근 연구 동향 파악 및 정보 수집을 통하여 생산적이면서 파급효과가 높은 연구 과제를 발굴코자 함

4. 여행목적

- Plant biology 2005 학회 참석 및 발표

5. 수행내용

- 학회 발표

- High-Efficient Rice Transformation Method Mediated by *Agrobacterium*

*tumefaciens* ( 포스트 발표)

가. 심포지움(Symposium)

구 분	발표 주제 및 내용
주 제 1	식물 유전자 및 기능 해석을 위한 새로운 접근
	1. Characterizing regulatory networks in the VirtualPlant (Coruzzi, Gloria M, 뉴욕대학교, 미국) 2. Signal integration during seedling photomorphogenesis (Chory, Joanne, Salk 연구소, 캐나다) 3. A systems approach to understanding transcriptional networks in the root (Benfey, Phillip N, 듀크 대학교)
주 제 2	광합성: 광자로부터 당까지
	1. The evolutionary transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis and how it changed the Earth (Blankenship, Robert, 아리조나주립대, 미국) 2. Oxygen evolution: Intrusions into the inner sanctum of photosynthesis (Brudvig, Gary, 예일대학, 미국) 3. Improving photosynthesis by genetic manipulation of the photosynthetic carbon reduction cycle (Raines, Christine A, Essex 대학교) 4. Making sugar without photons: Conversion of starch to sucrose in leaves in the dark (Smith, Alison M, John Innes Centre, 영국)
주 제 3	유전자 발현의 epigenetic control
	1. Evidence for non-mendelian inheritance of ancestral sequences in Arabidopsis (Lolle, Susan J, 퍼듀대학교, 미국)

	<p>2. Genomic imprinting and PcG-mediated regulation during seed development (Grossniklaus, Ueli, Zurich 대학교)</p> <p>3. Genetic analysis of gene silencing in Arabidopsis (Jacobsen, Steven E, 캘리포니아 대학교, 미국)</p> <p>4. Heritable chromatin structures are established through trans-interactions between tandem repeats (Chandler, Vicki L, 아리조나대학교, 미국)</p>
주 제 4	식물 생육 및 성장의 Proteolysis controlling
	<p>1. The ubiquitin/26s proteasome system: The complex last chapter in the life of many plant proteins (Vierstra, Richard D, 위스콘신대학교, 미국)</p> <p>2. The F-box protein TIR1 functions as an auxin receptor in Arabidopsis (Dharmasiri, Nihal, 인디애나대학교, 미국)</p> <p>3. Cis and trans domains that direct ubiquitination (Callis, Judy, 캘리포니아대학교, 미국)</p>
전 체	4 주제 14과제 발표

나. 미니심포지움(Minisymposium)

구 분	주요 발표 주제 및 내용
주 제 1	Mineral Nutrition and Salinity
	- Identification of genetic loci responsible for ionomic phenotypes in Arabidopsis (Rus, Ana M, 퍼듀대학교) 등 5과제
주 제 2	Rhythms
	- Genetic analysis of the circadian clock in Arabidopsis (Schultz, Thomas F, Scripps Research Institute) 등 5과제
주 제 3	산화적 스트레스와 신호전달
	- The role of AtNOS1, a mitochondrion-localized nitric oxide synthase, in Arabidopsis leaf senescence (Guo, Fang-Qing, 캘리포니아대학교) 등 5과제
주 제 4	Reproductive Development
	- Calcium dependent protein kinase and ROP GTPase signaling pathways overlap to regulate the polarity of tip-growth in pollen tubes (윤경미, 워싱턴주립대학교) 등 5과제
주 제 5	Cytoskeleton and Cell Division
	- The cytoskeleton is required for maintaining two unique patterns of organelle partitioning for C4 photosynthesis in a single cell of Chenopodiaceae species (Chuong, Simon D, 워싱턴주립대학교) 등 5과제
주 제 6	유전자 조절 메카니즘
	- The in silico laboratory test of cis-regulatory elements for biological significance in Arabidopsis (Geisler, Matt, Umea 대학교) 등 5과제
주 제 7	광합성
	- The central roles of the protein circuit in maintaining and regulating photosynthesis (Kramer, David M, 워싱턴주립대학교) 등 5과제
주 제 8	세포벽

	- Uncovering novel cell wall-related genes in Arabidopsis (McCann, Maureen C, 퍼듀대학교) 등 5과제
주 제 9	오옥신
	- Integrating auxin and abscisic acid signal transduction (Strader, Lucia C, 라이스대학교) 등 5과제
주 제 10	식물과 미생물의 상호작용
	- Recognition specificity in the FLS2/flagellin interaction(Sun, 위신콘신대학교)
전 체	30 주제 150 과제 발표

다. 포스트 발표(Poster Sessions)

구 분	주요 발표 주제 및 내용
Session 31	Environment physiology
	- Foliar solute uptake from fog by yellow cypress (Lai, Phytosphere 연구소) 등 30과제
Session 32	Global change
	- Reduction of ozon flux and damage by elevated CO2 in soybean (Booker, USDA) 등 6과제
Session 36	산화적 스트레스
	- Analysis of anti-apoptotic function of plant Bax inhibitor-1 (kawai, 도쿄대학교) 등 30과제
Session 38	온도 반응
	- ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance (Xin, USDA) 등 40과제
Session 47	식물과 병원균의 상호작용
	- Signaling in the rice XA21-mediated defense response (Ronald, 캘리포니아대학교) 등 61과제
Session 55	종자생물학
	- A high-throughput screen for low phytic acid soybeans (Chappell, USDA) 등 36과제
Session 56	Metabolism
	- GWD homologues in Arabidopsis (Glaring, RVAU) 등 44과제
Session 66	Intracellular signaling
	-Characterization of MAPR homology in Arabidopsis (Yang, 국립대만대학교) 등 55과제
Session 75	식물 생명공학
	- Development of a transposon tagging system for soybean (Winters, 네브라스카대학교) 등 76과제
Session 77	생물공학의 안정성평가
	- Dynamics of transgenic rice plants with CryIAc1 gene (권순중, NIAB, RDA) 등 4과제
전 체	49 주제 1172 과제 발표

6. 출장성과

- 식물 생명공학 분야의 최근 연구 동향 및 정보 파악
- 세계적인 연구자들과의 직접적인 만남을 통한 연구 분야의 정보 교류
- 학회에서 획득한 새로운 지식과 정보를 바탕으로 효과적인 과제발굴이 가능하여 연구의 질적 향상에 도움이 될 것으로 생각됨.

## 제 5 절 Plant & Animal Genome Conference 참석 및 세계 생명공학연구 동향 정보 수집

1. 여행기간 : 2006. 1. 14~23 (10일간)

2. 여행국 : 미국

3. 여행배경

- Plant & Animal Genome Conference 참석 및 세계 생명공학연구 동향 정보 수집

4. 여행목적

- 농림기술연구과제 “콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발”의 성공적인 수행을 위해 최근 생명공학연구 동향 및 방법 등의 정보를 수집하고 세계 선도그룹 연구자들과의 직접적인 만남을 통해 연구역량을 높이고자 함.

5. 수행내용

- Plant & Animal Genome Conference 참석
- 세계 생명공학연구 동향 정보 수집

구 분	주요 발표 분야 및 제목
분야 1	Rice & Rice blast (7개 주제)
	1. Application of RNA silencing in <i>Magnaporthe oryzae</i> (Hitoshi, 고베대학교, 일본) 2. Cloning and functional analysis of GA receptor gene (Ashikari, 나고야대학교, 일본) 3. Rice genome resources as the core for implementation of a robust functional genomics platform (antonio 등, NIAS, 일본) 4. Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice(Ma 등, 퍼듀대학교, 미국)
분야 2	Legumes & Soybean genomics (9개 주제)
	1. Molecular cytogenetics of the soybean genome (Walling 등, 퍼듀대학교, 미국) 2. Sequence and marker-based diversity in common bean (McClellan 등, North Dakota 주립대학, 미국) 3. A physical map of the "williamas 82" soybean genome (Warren 등, The soybean mapping consortium, 미국) 4. Signal sensing for induction and autoregulation of nodulation in soybean (Peter 등, ARC center, 호주)
분야 3	Abiotic stress (6개 주제)

	<p>1. Functional genomics of phosphorus deficiency in Legumes (Claudia 등, 미네소타대학교, 미국)</p> <p>2. Discovery and development of an Nf-Y gene that confers drought tolerance in crops from a genome-wide reverse genetic screen of arabidopsis transcription factors (Oliver 등, 몬산토, 미국)</p> <p>3. Map-based cloning and characterization of AltSB, a major aluminum tolerance gene in Sorghum (Kochian 등, 코넬대학교, 미국)</p>
분야 4	Host-Pathogen interactions (5 주제)
	<p>1. Mechanisms of plant resistance to virus (Kumar, 예일대학교, 미국)</p> <p>2. Comparative genomics of plant-Pseudomonas interactions (Caldwell 등, 캘리포니아대학교, 미국)</p> <p>3. Functional genomic evaluation of swine responses to infectious pathogens (Lunney, USDA-ARS, 미국)</p> <p>4. Host-microbe interactions: addressing genetic and environmental interactions utilizing cloned pigs (Schook 등, 일리노이대학교, 미국)</p>
분야 5	Plant transgene genetics (4 주제)
	<p>1. <i>In planta</i> transformation of wheat as a genomics tool (Zale 등, 테네시대학교, 미국)</p> <p>2. Agrobacterium tumefaciens-mediated transient gene expression in nicotiana species (Li 등, 캔터키대학교, 미국)</p> <p>3. Transformation of rice plants using Bio-active beads with BACs (Wada 등, 오사카대학교, 일본)</p> <p>4. Traitexplorer, a high-throughput screening process of genomic fragments for systematic identification of useful traits (Katoh 등, Japan-Tobacco, 일본)</p>
분야 6	Plant interactions with pests and pathogens (6 주제)
	<p>1. Role of ALD1 in activating systemic defenses (Jung 등, 시카고대학교, 미국)</p> <p>2. Response of genes expressed in the Larval Hessian Fly during interactions with wheat (Shukle 등, USDA-ARS, 미국)</p> <p>3. Elucidating the Nhl1/Nrr-mediated disease resistance pathway in rice (Chern 등, UC Davis, 미국)</p> <p>4. Phylogenetic and genomic analysis of ERF transcription factors involved in disease resistance (Reuber 등, Mental biotechnology, 미국)</p>
주 제 4	Brassicas (5개 주제)
	<p>1. Analysis of expressed sequence tags of Brassica rapa (임 등, NIAB, 한국)</p> <p>2. Comparative genomics of B. oleracea and its allies: Integrating BAC hybridization data (Torres 등, 조지아대학교, 미국)</p> <p>3. Gene expression and network dynamics during embryo development in Brassica and arabidopsis (Datla, Plant Biotechnology 연구소, 캐나다)</p>

## 6. 출장성과

- 식물 생명공학 분야의 최근 연구 동향 및 정보 파악

- 세계적인 연구자들과의 직접적인 만남을 통한 연구 분야의 정보 교류
- 학회에서 획득한 새로운 지식과 정보를 바탕으로 효과적인 과제발굴이 가능하여 연구의 질적 향상에 도움이 될 것으로 생각됨.

## 제 6 절 환경스트레스에 대한 식물반응의 분자생물학적 해석 방법 연수

1. 여행 기간 : 2007. 4. 06~16 (11일간)

2. 여행국 : 미국

3. 여행 배경

- 최근 생명공학연구 동향 및 방법 등의 정보를 수집하고 세계 선도그룹 연구자들과의 직접적인 만남을 통해 연구역량을 높이고자 함.

4. 여행 목적

- 농림기술연구과제 “콩 유용유전자를 이용한 신기능성 작물 개발”의 성공적인 수행을 위해 환경스트레스에 대한 식물반응의 분자생물학적 해석 방법에 대한 최신기술을 연수코자 함.

5. 수행 내용

- 환경스트레스에 대한 식물반응의 분자생물학적 해석 방법 연수
  - 식물발달과정에서의 MicroRNA의 역할 구명 연구
  - 애기장대를 이용한 개화조절 유전자의 역할 구명 연구
  - 신초의 재분화를 조절하는 ESR2 유전자의 역할 구명 연구
  - 인공합성 microRNA를 이용한 바이러스 저항성 식물 개발 연구
- 관련 연구의 최신 정보 수집

가. 환경스트레스에 대한 식물반응의 분자생물학적 해석 방법 연수

현재 Chua 연구실에서 수행중인 연구과제를 중심으로 연구 목적, 방법 및 결과 해석 등 실험전반에 대한 내용을 참여 연구원들로부터 연수를 받았으며 주요 내용은 다음과 같다.

○ 식물발달과정에서의 MicroRNA의 역할 구명 연구

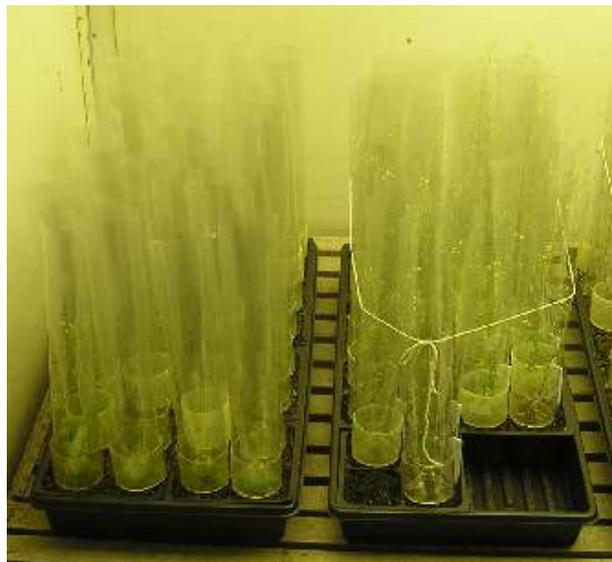
- 몇 개의 식물 MicroRNA가 식물의 발달과정에 관여하는 것으로 알려졌으나 구체적인 역할은 밝혀지지 않았다. 그러나 애기장대의 miR164가 endogenous 및 형질전환 NAC1(오옥신 신호와 관련이 있으며 뿌리의 세근 발달에 영향)의 mRNA 절단을 유도한다는 것을 구명하였다. 이러한 결과는 miR164의 오옥신 유도는 homeostatic 기작을 제공하여 NAC1의 mRNA를 제거하고 오옥신 신호를 조절함을 나타낸다.



(애기장대를 이용하여 microRNA의 역할을 구명하는 실험중임)

○ 애기장대를 이용한 개화조절 유전자의 역할 구명 연구

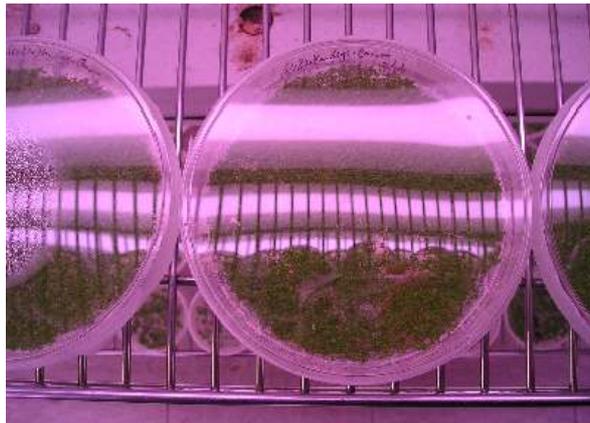
- 애기장대의 Phytochrome A는 종자발아, 신장 및 24시간주기리듬 및 개화시간 등의 조절에 관여한다. 구체적인 연구에서 식물에서 SPA1 유전자는 24시간주기리듬 및 개화시간 등에 관여하며 또한 종자가 발아할 때 phy-A 유래의 신호를 억제하는 것으로 밝혀졌다.



(애기장대를 이용하여 개화조절 유전자의 역할을 구명하는 실험중임)

### ○ 신초의 재분화를 조절하는 *ESR2* 유전자의 역할 구명 연구

- 식물조직배양 과정에서 사이토키닌은 신초의 재분화를 자극하는 것으로 알려져 있으나 어떤 유전자가 이 과정에 관여하는지에 대한 이해는 매우 부족했다. *ESR2* 유전자는 *CUC1* 유전자의 전사조절을 통해 신초의 재분화에 중요한 역할을 하는 것을 구명하였다.



(신초의 배분화를 조절하는 *ESR2* 유전자의 역할 구명하는 실험중임)

### ○ 인공합성 microRNA를 이용한 바이러스 저항성 식물 개발 연구

- 식물 miRNA는 절단을 유도함으로써 mRNA를 조절한다. 이러한 기작을 바이러스 저항성 식물 개발에 이용하였다. 애기장대의 miRNA159 전구체를 대상으로 TYMV의 P69유전자와 TuMV의 HC-Pro 단백질을 인공합성하여 형질전환하였으며 이들 형질전환체는 2종의 바이러스에 대해 효과적인 저항성을 보였다. 이러한 저항성은 세포수준에서 발현되었으며 후대에도 안정적으로 유전되었으며 15°C의 저온조건에서도 저항성이 유지되었다. 인공합성 microRNA를 이용한 바이러스 저항성 식물 개발 방법은 작물의 다양한 바이러스 저항성 형질전환체 개발에 광범위하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.



(신초의 배분화를 조절하는 *ESR2* 유전자의 역할 구명하는 실험중임)

## 나. 관련 연구의 최신 정보 수집

### (1) 논문

- *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc.* 2006;1(2):641-6.
- ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.* 2007 Feb;49(4):592-606.
- Regulation of *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate:coenzyme-A ligase-1 expression by artificial zinc finger chimeras. *Plant Biotechnol J.* 2006 Jan;4(1):103-14.
- Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 2006 Dec 1;20(23):3255-68.
- A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2006 Nov;18(11):3132-44.
- *Arabidopsis* DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell.* 2006 Dec;18(12):3386-98.
- Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol.* 2006 Nov;24(11):1420-8. Epub 2006 Oct 22. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2007 Feb;25(2):254.
- Prediction of trans-antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* 2006;7(10):R92.
- The *Arabidopsis* ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant*

J. 2006 Jul;47(1):1-9. Erratum in: Plant J. 2006 Aug;47(3):490.

## 6. 출장 성과

- 식물 생명공학 분야의 최근 연구 방법 및 정보 파악
- 세계적인 연구자들과의 직접적인 만남을 통한 연구 분야의 정보 교류

## 제 7 장 참고문헌

- Blanc G, Wolfe KH (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16:1667–1678
- Davison PA, Hunter CN, Horton P (2002) Overexpression of  $\beta$ -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 413:203–206
- De block M (1993) The cell biology of plant transformation : Current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica* 71:1–14
- Dharmapuri S, Rosati C, pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2002) Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Letters* 519:30–34
- Eichler EE, Sankoff D (2003) Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 301:793–797
- Groth D, Braun E (1986) Growth kinetics and histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in leaves of resistant and susceptible soybeans. *Phytopathology* 76:959–965
- Hartwig EE, Lehman SG (1951) Inheritance of resistance to the bacterial pustule disease in soybeans. *Agron J* 43:226–229
- Hartwig EE, Johnson HW (1953) Effect of the bacterial pustule disease on yield and chemical composition of soybeans. *Agron J* 45:22–23
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35:205–218
- Ingo P (2001) Golden rice and beyond. *Plant Physiol* 125:1157–1161
- Laviolette FA, Athow KL, Probst AH, Wilcox JR (1970) Effect of bacterial pustule on yield of soybeans. *Crop Sci* 10:150–151
- Narvel JM, Jakkula LR, Phillips DV, Wang T, Lee SH, Boerma HR (2001) Molecular mapping of *Rxp* conditioning reaction to bacterial pustule in soybean. *J Hered* 92:267–270
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401–437
- Pfeil BE, Schlueter JA, Shoemaker RC, Doyle JJ (2005) Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: a phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families. *Syst Biol* 54:441–454
- Schlueter JA, Dixon P, Granger C, Grant D, Clark L, Doyle JJ, Shoemaker RC (2004) Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. *Genome* 47:868–876
- Shoemaker RC, Polzin K, Labate J, Specht J, Brummer EC, Olson T, Young N, Concibido V, Wilcox J, Tamulonis JP, Kochert G, and Boerma HR (1996) Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). *Genetics* 144:329–338
- Shoemaker RC, Schlueter J, Doyle JJ (2006) Paleopolyploidy and gene duplication in

soybean and other legumes. *Curr Opin Plant Biol* 9:104–109

- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka SB, Tanaka H (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant Journal* 47:969–976
- Van K, Ha BK, Kim MY, Moon JK, Paek NC, Heu S, Lee SH (2004) SSR mapping of genes conditioning soybean resistance to six isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Korean Journal of Genetics* 26:47–54
- Van K, Kim DH, Cai CM, Kim MY, Shin JH, Graham MA, Shoemaker RC, Choi BS, Yang TJ, Lee SH (2008) Sequence level analysis of recently duplicated regions in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] genome. *DNA Res* 15:93–102
- Weber CR, Dunleavy JM, Fehr WR (1966) Effect of bacterial pustule on closely related soybean lines. *Agron J* 58:544–545
- Yamamoto HY, and Gilmore AM, (1991) Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-endcapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column. *J. Chromatography* 543:137–145
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303–305