

발간등록번호

11-1541000-001710-01

기후변화대응 콩 자외선(Ultraviolet-B) 저항성 유전자  
연관마커 개발

(Development of DNA Marker for UV-B Resistance  
in Soybean)

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기후변화대응 콩 자외선(Ultraviolet-B) 저항성 유전자 연관마커 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 1 월 일

주관연구기관명 : 단국대학교

주관연구책임자 : 강성택

연 구 원 : 이재은

연 구 원 : 하보근

연 구 원 : 심현철

연 구 원 : 유민호

연 구 원 : 양나영

# 요 약 문

## I. 제 목

- 기후변화대응 콩 자외선(Ultraviolet-B) 저항성 유전자 연관마커 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

지구환경변화에 의해 남극상공의 오존층의 감소가 관측된 이래 최근 북반구 중위권 상공의 오존층 감소는 유해한 자외선(UV-B: 280-320nm)의 지표면 도달량을 증가시켜 식물의 생리 및 생화학적 대사기구에 장애와 주요농작물의 생육 및 수량감소를 초래하므로, 금후 예상되는 고 UV-B 환경 하에서 식량의 안정생산을 위해서는 변화된 환경에 적응성이 높은 품종의 개발이 필요하며 이를 위해서는 저항성 유전자원 확보와 효율적인 선발지표개발이 필수적이다. 본 연구는 자외선(UV-B)에 저항성인 콩 품종육성을 위해 저항성자원을 활용하여 콩에서 자외선(UV-B) 저항성과 연관된 분자마커를 개발하여 금후 분자유종 시스템을 통한 우수한 품종의 조기개발을 위한 기반을 제공하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구를 추진하기위해 저항성 자원과 감수성자원의 교배로 작성된 콩 근동질계통(Ricombinant inbred line)을 활용하여 계통별로 DNA 다형성변화와 자외선(UV-B)반응 차이를 탐색하고 유전자 지도에 근거한 자외선(UV-B) 저항성 유전자 근접 분자표지인자를 개발하였다. 세부연구내용은 인공자외선(UV-B) 조사시설에서 콩 RIL계통을 UV-B에 노출시켜 계통별 생육형태, 엽색변화 등 피해정도를 조사하고, RIL계통에 대한 DNA 마커의 genotyping을 실시하여 다형성검정을 실시한 후 유전자지도 작성에 근거한 UV-B 연관분자 마커탐색과 관련 QTL의 정확한 위치를 탐색하였다.

## IV. 연구개발결과

인공 자외선(UV-B) 조사에 의해 엽의 색상, 엽의 모양 및 엽병의 색상 등에서 변화를 보였는데 모본인 큰올콩은 심각한 피해증상을 보인 반면 부분인 익산10호는 자외선에 저항성을 보였고, RIL 계통은 피해정도에 따라 정규분포를 보였다. 자외선(UV-B)와 관련되는 유의한 마커들을 확인하기 위해 실시한 Single-factor 분석결과 연관군 C2(Chr.6), L(Chr.19), M(Chr.7) 및 N(Chr.3)등 에서 고도의 유의성을 나타내었다. Composite interval mapping 결과 UV-B 관련 major QTL을 연관군 L(Chr.19)의 satt238근처에서 확인하였고, 이러한 결과는 엽의 색상변화(Leaf Chlorosis), 엽의 형태변화(Leaf shape), 엽병의 색상변화(Petiole Chlorosis) 등의 형질에서 모두 유사하게 나타나 콩에서 자외선(UV-B)에 대한 저항성 유전자는 연관군 L(Chr.19)에 존재하고 Satt238이 연관된 마커임을 확인하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 시험결과 자외선(UV-B)에 저항성인 자원을 확인하였고 또한 연관군 L(Chr.19)의 Satt238 마커 근처에서 UV-B 저항성 유전자 연관 major QTL을 확인하였다. 이제까지 자외선(UV-B)에 저항성 유전자 탐색과 관련된 연구는 벼, 애기장대 등에서 수행되었으나 콩에서

는 자외선(UV-B)에 의한 피해양상 규명에 주로 연구가 이루어졌을 뿐 저항성 유전자 개발과 관련된 연구는 없었다. 따라서 본 연구에서 확인된 QTL은 세계적으로 처음으로 발견된 콩 유래 UV-B 연관마커로서 금후 기후변화에 따른 오존층파괴와 고 UV환경 하에서도 안정적으로 생산 가능한 자외선(UV-B) 저항성 콩 품종육성에 유용한 선발의 지표로 활용이 가능하며 나아가 세밀한 DNA 서열정보 확보를 통한 유전자 확인과정을 거쳐 타 작물로의 형질전환을 통한 새로운 기후변화대응 품종육성의 유전자로 기여할 수 있을 것이다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

The UV spectrum is consisted of three regions: UVC(<280 nm), UV-B and UV-A (>320 nm). The depletion of stratospheric ozone has resulted in increased amounts of ultraviolet-B radiation(UV-B: 280nm) reaching the Earth's surface(Blumthaler and Ambach, 1990). Even a small increase in incident UV-B radiation can have significant biological effects, since UV-B is readily absorbed by a number of important biological macromolecules, such as DNA and proteins.

Here we present the preliminary research results for identification of DNA marker associated with the resistance gene to enhanced UV-B radiation in soybean. We used RILs population derived from a cross between Keunolkong (a sensitive soybean variety) and Iksan 10(a resistance soybean line). we used SSR markers to construct a linkage map. RILs and both parent were grown under supplemental UV-B radiation in the green house.

we positioned the gene associated with UV-B resistance between two marker, Satt495 and Satt 238, with a LOD 7.0 in LG L(Ch 19). These markers will be useful for marker-assisted selection in the development of new UV resistance variety. .

# CONTENTS

<b>Chapter 1 Outline of research project</b> .....	7
Section 1. Purpose and significance of Research .....	7
1. Technological Aspect .....	7
2. Industrial and Economical Aspect .....	7
3. Social and Cultural Aspect .....	7
Section 2. Research Scope .....	8
<b>Chapter 2 Current status of domestic and foreign Technology</b> .....	9
Section 1. Domestic research status.....	9
Section 2. Foreign research status.....	9
Section 3. Research area to be.....	11
<b>Chapter 3 Contents of research and results</b> .....	12
Section 1. Materials and methods.....	12
1. Plant materials.....	12
2. Screening of UV-B response.....	12
3. SSR genotyping .....	13
4. Identification of QTL .....	14
Section 2. Results.....	15
1. UV-B response .....	15
2. Development of QTL for UV-B resistance.....	17
3. Summary.....	22
<b>Chapter 4 Achievement and Contribution to Related Industries</b> .....	24
Section 1. Achievements .....	24
Section 2. Technological aspect .....	24
Section 3. Industrial and Economical aspect .....	24
Section 4. Social and Cultural aspect .....	24
<b>Chapter 5 Application of the results</b> .....	25
Section 1. A paper publication and preparation.....	25
Section 2. Commercial product .....	25
Section 3. Further study and application to other studies.....	26
<b>Chapter 6 Research information collected during research progressing</b> ..	26
<b>Chapter 7 References</b> .....	27

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	7
제 1 절	연구개발의 목적, 필요성 .....	7
제 2 절	연구개발의 범위 .....	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	9
제 1 절	국내 연구 현황 .....	9
제 2 절	국외 연구 현황 .....	9
제 3 절	국내외 연구 수준비교 및 필요 연구분야 .....	11
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과 .....	12
제 1 절	연구개발 방법 .....	12
1.	실험재료 .....	12
2.	UV-B 반응 스크린 .....	12
3.	SSR genotyping .....	13
4.	Map 제작 및 QTL 탐색 .....	14
제 2 절	연구결과 .....	15
1.	모본 및 RIL 계통의 UV-B 반응조사 .....	15
2.	UV-B 저항성 관련 분자표지개발 .....	17
3.	적요 .....	22
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	24
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	25
제 1 절	특허, 논문 및 학회발표 성과 및 계획 .....	25
제 2 절	실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....	25
제 3 절	추가연구, 타연구에 활용 계획 등 .....	26
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	26
제 7 장	참고문헌 .....	27

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 기술의 목적, 경제적·산업적 중요성

#### □ 연구개발의 목적

- 콩은 전 세계적으로 단백질 및 지방공급원으로서 중요한 작물이며, 우리나라에서는 예로부터 우리 민족의 단백질 공급원으로서 우리민족의 식생활과 불가분의 밀접한 관계에 있고 세계적으로 가장 다양한 콩 음식문화와 전통을 가지고 있으며, 그에 따른 용도별 가공적성 품종도 잘 분화되어 있다.
- 지구환경변화에 의해 남극상공의 오존층의 감소가 관측된 이래 최근 북반구 중위권 상공의 오존층 감소가 심각한 지구환경의 문제로 대두되었다. 성층권의 오존감소는 유해한 자외선(UV-B: 280-320nm)의 지표면 도달량을 증가시켜 인간을 비롯하여 모든 생물에 피해가 예상된다. 특히 식물에서는 생리 및 생화학적 대사기구에 장애를 일으켜 주요농작물의 생육 및 수량감소를 초래하므로, 금후 예상되는 고 UV-B 환경 하에서 식량의 안정생산 저해로 인한 식량공급 부족은 경제적 산업적 막대한 피해를 유발할 것으로 예측되고 있다.
- 이상기상에 따른 기후변화환경에도 안정적인 작물재배를 위해서는 변화하는 기후환경에 적응하는 품종을 개발 보급하는 것이 가장 우선적인 과제이며, 이를 위해 본 과제에서는 자외선(UV-B)에 저항성인 콩 품종육성을 위해 저항성자원을 활용 콩 자외선(UV-B) 저항성과 연관된 분자마커를 개발하여 금후 이를 활용한 분자유종 시스템을 통해 우수한 육종소재에 기반을 제공하고자 한다.

#### □ 경제·산업적 측면

- 콩의 원산지는 한반도를 포함한 만주 지방이며 중국에서는 기원전 2,500년경부터 재배가 시작되었고 서양에서는 1950년대에 들어서면서 콩의 영양성분과 재배에 관한 연구가 활발히 진행되었다. 콩이 서구인들에게 많이 발생하는 성인병, 즉, 심장병, 동맥경화, 암, 골다공증의 발병을 줄인다는 사실이 알려지면서 급속히 재배가 늘어나게 되었다.
- 전 세계의 콩 재배면적은 약 8,361만 ha이며, 미국은 2,981만 ha로 세계 제1위, 브라질은 1,844만 ha로 세계에서 제2위, 아르헨티나는 1,240만 ha로 제3위, 그리고 중국은 980만 ha로 제4위를 차지하고 있다. 전 세계의 콩 생산량은 약 25,369만 톤이며, 미국의 총생산량은 6,579.5만 톤, 브라질은 5,154만 톤, 아르헨티나는 3,550만 톤, 그리고 중국은 1,650만 톤이다.
- 콩의 교역량은 7,725만 톤으로 세계 수출량 중에서 미국이 41.6%, 브라질이 32.8%, 아르헨티나가 14.2%의 비중을 차지하여, 이들 3국의 수출비중이 88.6%에 이른다.
- 콩의 용도는 식용, 약용, 공업용, 사료용 등 다양하며 전 세계 식물성 단백질섭취량의 60%를 담당하고 콩기름은 전 세계 식물성오일의 29%이다. 우리나라는 콩의 원산지에 속해 있어서



된장, 간장, 청국장, 두부, 순두부, 비지, 콩나물, 콩국, 콩가루, 콩기름 등 콩을 이용한 음식들이 매우 다양하게 발달되어 있다.

- 우리나라는 매년 약 156만 톤의 콩을 수입하고 있으며 국내 생산량은 약 13만 톤 정도로 국내 콩 자급률은 약 8% 정도이다. 이 가운데 18%는 식용으로 82%는 사료용으로 이용된다.
- 오존층 파괴에 따른 자외선(UV-B) 함량 증가는 작물의 성장과 발육에 저해하여 수량감수를 초래한다. 특히 UV-B는 특히 작물에 심각한 피해를 초래하나 아직까지 저항성 자원은 발견되지 않아 안정적인 콩 생산을 위해서는 분자유종방법을 활용한 저항성 품종 개발이 시급한 실정이다.

#### □ 연구개발의 필요성

- 이상기상과 기후변화에 대응하여 안정적인 식량공급을 위해서는 변화된 환경에 적응성이 높은 품종을 개발하여 안정적인 생산을 위한 기반을 갖추어야 한다.
- 지구온난화의 가속화로 이상기상의 발생, 기후공황 등의 자연재해가 우려되는 가운데 지구온난화에 따른 오존층의 파괴로 자외선(UV-B) 투과량이 증가하고 있어 피해가 우려되고 있다.
- 오존층파괴는 자외선(UV-B) 투과량을 증가시켜 작물의 생육에 해를 끼치고 있어 이에 대비한 저항성 품종 개발이 시급한 실정이다.
- 다양한 사회환경 변화와 소비자의 수요에 신속히 대응하기 위해서는 작물별로 분자생물학적인 기술을 활용한 분자표지육종방법 개발과 적용이 요구되고 있다.

### 제 2절 연구개발의 범위

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도 (2012)	- 콩 근동질계통 (Recombinant inbred line)에 대한 자외선 (UV-B) 반응 조사	- 인공자외선(UV-B) 조사시설에서 콩 RIL계통에 대한 UV-B 반응을 조사 - 식물체의 생육형태, 엽중 엽록소함량 및 피해정도를 조사하여 저항성 여부 판정	- 인공자외선(UV-B) 조사를 통해 모부본 및 150여 근동질계통(RIL)의 UV-B 반응을 조사 - 식물체의 생육형태, 엽중 엽록소함량 및 피해정도를 조사하여 저항성 여부 판정
	- 유전자지도 작성을 통한 저항성 유전자 근접 분자표지 인자 개발	- UV-B 저항성과 감수성 모본으로 만들어진 F <sub>12</sub> RIL계통에 대한 DNA 마커 genotyping 실시 - DNA 마커를 활용하여 유전자 지도작성 및 연관분자마커 개발	- DNA 마커를 활용하여 유전자 지도 작성 및 근접마커 개발

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내 연구 현황

- 국내 육성된 콩 5품종에 11.32kJ/m<sup>2</sup>의 UV-B를 조사하여 경장, 엽수, 건물중 등의 감소에 따른 작물생육이 심각하게 저해되었으며, 피해정도는 품종간에 차이가 있었다. (2007 농촌진흥청)
- 콩에 10kJ/m<sup>2</sup> UV-B 와 오존 처리시 진품콩은 다소 내성을 보였으나, 장엽콩과 명주나물콩은 다소 약하였고 다원콩은 내성이 가장 약하였다.(2007 농촌진흥청)
- 벼 유묘에 UV-B 조사한 결과 노화 기작인 에틸렌 생합성은 증가하고 방어기작인 polyamine 기작은 감소하였다.
- 콩에서 UV-B 및 O<sub>3</sub>에 의해 반응하는 전사체 및 프로테옴 해석을 통해 UV-B 및 오존 스트레스에 따른 콩의 생리 변화를 해석하고, 내성품종 선발을 위한 관련 유전자의 기능 분석과 동정을 위한 관련단백질의 동정을 실시한 결과, UV-B에 반응한 특이 유전자는 cellular process와 metabolic process가 주된 기능을 하였고, 특히 Cytoplasmic part가 주된 기능을 하는 것으로 분석되었으며, 콩잎의 단백질 분석결과 주로 광합성, 효소, metabolism 관련 단백질이 증가하였다.

### 2. 국외 연구 현황

- 2002년 UNEP는 오존층 파괴로 현재 지표면의 UV-B 강도는 2~12kJ/m<sup>2</sup>/day이며 이는 1980년대 초의 UV-B의 양보다 6~12% 증가하였다고 하였고, 일부 과학자는 한반도를 포함한 지역에서 향후 50년간 지속적인 피해가 있을 것을 예측하였다.(UNEP, 2002.)
- 미국의 cotton belt지역에서 여름시즌 UV-B의 강도는 4~11kJ/m<sup>2</sup>수준이고 중국에서 콩 작기중에 UV-B 강도는 평균 8.85kJ/m<sup>2</sup>로 30%정도의 UV-B의 강도가 높아 지면 심각한 정도의 문제가 야기될 수 있다고 보고하였다.(Frederick 등 2000, Li 등 2002)
- 미국에서 콩 품종 Williams 와 Essex를 6년간 포장에 재배하면서 UV-B의 조사(오존층 16~25% 파괴시 선량)가 콩의 수량과 품질에 미치는 영향을 조사한 결과, 감수성 품종인 Essex는 20%정도의 수량감수가 예상되었으나 저항성 품종인 williams는 내성을 보였다. 방사선조사에 의한 피해는 환경조건 특히 수분의 조건에 의해 다소 변화하는 것으로 확인되었다.(Teramura 등1990)
- 강한 UV-B 처리시 직접적으로는 광합성 광계에 영향을 미치고 간접적으로는 광합성색소와 엽면적을 줄여 광합성을 감소시키고 대부분의 작물에서 생체량과 수량감소를 초래하였다. UV-B 스트레스에 식물의 생리학 변화와 생장 및 바이오메스에 미치는 영향에 대해 밀, 콩, 벼에서 연구가 수행되었고, 식물의 종과 품종에 따라 그 반응이 상이하였다.(Mazza 등, 2000)

- 최근 Arabidopsis에서 UV-B 반응경로에서 특이하게 반응하는 UV resistance locus8 (*UVR8*) 단백질과 COP1, HY5 등이 밝혀져 있다.(Rizzini 등, 2011)
- 벼의 UV-B 저항성은 유전하며 유전자는 두 개의 상가적 우성적 유전자에 의해 지배되며, QTL분석결과 3개의 QTL을 확인하였으며 관련유전자 규명을 위한 연구가 추진 중에 있음.(Sato 등 2003)
- 약 400여종의 식물을 대상으로 UV-B 조사결과 2/3는 형태적 및 생리적으로 예민하게 반응하였으며, 식물에서 반응은 광합성저해, biomass 축적 감소, 엽록체 기능손상 및 단백질 합성저해, DNA 손상 등으로 나타났다. 또한 UV-B 조사는 UV-B 흡수물질과, 플라보노이드 안토시아닌 SOD, POD 같은 항산화물질의 증가를 야기했다.
- 기후변화와 환경파괴에 따른 오존층 파괴로 인해 지구의 자외선(UV-B) 조사량의 증가가 식물에 피해를 끼친다는 보고 이후 다수의 작물에서 관련 피해양상 및 피해해석을 위한 연구를 추진한 바 있으나, 저항성품종개발 및 유전자탐색을 위한 연구는 제한적으로 이루어지고 있다.
- 2010년 미국에서 식물에서 UV-B 저항성을 증가시키는 203KB 염기서열에 대해 특허 등록하였다.(US Patent 60/819,763)
- 벼에서 UV-B 반응에 대한 QTL은 양적형질로 존재하며 강하게 연관된 CPD photolyase의 변이가 유전적 변이의 상당부분을 차지하는 것으로 보아 CPD photolyase activity가 벼에서 UV-B의 반응도를 결정하는 결정적인 factor로 추정하였고 형질전환을 통해 이를 확인하였다.(Ueda 등. 2005, Hidema 등 2007,)
- uv-b처리로 발현이 변동된 광합성 관련 단백질은 Rubisco, Rubisco large subunit, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit 였다. rubisco 는 Calvin회로의 가장 중요한 효소이다. 식물은 rbcL 유전자에 의해 암호화되는 8개의 큰 소 단위체와 rbcS 유전자에 의해 암호화 되는 8개의 작은 소단위체로 구성되어 있다. (Gutteridge & Gatenby, 1995).
- UV-B 처리로 발현이 감소한 단백질인 ATP synthase CF1 alpha chain 은 엽록체 ATP synthase의 다섯 개의 소단위체 구성요소중 하나다. (Fritsche & Junge, 1996).
- 엽록체 ATP synthase는 틸라코이드막에 존재하는 두 개의 기능적 구성물인 CF0와 CF1을 가진 복합체로 CF0 는 양성자의 이동통로로 소단위체의 구성, 구조, 기능이 미토콘드리아의 F0 와 유사한 막주변 단백질 복합체 (peripheral membrane protein complex) (Nelson & cox, 2002)이다.
- CF1은 여러개의 막에 고정된 단백질로 ATP 합성 장소이다. (Grossman et al., 1995).
- Catalase I는 superoxide dismutase, peroxidase와 함께 식물체 내 항산화 방어시스템의 중요효소로 UV-B에 의하여 생성된 활성산소를 무해화 시키는 항산화 방어체계에 관여

하는 효소이다.(Santos et al., 2004)

- S-adenosyl-L-methionine synthetase는 salicylic acid carboxyl methyl기 전이효소 (SAMT)로 꽃의 방향성분 생성과 식물방어에 관여하는 새로운 식물의 methyl기 전이효소이다. (Ross et al., 1999).

### 3. 국내외 연구 수준비교 및 필요 연구분야

- FAO는 1990년대 기후변화에 따른 환경변화분석을 통해 지구환경변화에 따른 작물별 피해를 분석하였고 특히 오존층 파괴로 인해 UV-B 및 오존함량 증가에 따른 많은 작물의 피해를 예측하였다.
- 미국의 EPA (환경보호국)은 국제미작연구소와 공동으로 환경변화 특히 UV-B 방사선량 증가에 따른 쌀 생산량 변화에 대한 연구프로젝트를 수행 중이며 이외에도 환경보호국은 환경변화에 따른 임목, 어류 등에 미치는 영향에 대해 연구를 수행 중에 있다.
- 외국에서는 이미 최근까지 다수의 연구에서 오존층 파괴로 인한 자외선(UV-B)량의 증가를 예측하였고 이에 따른 각 작물별 피해양상과 관련 요인에 대한 연구를 다수 추진한 바 있다. 특히 벼, 옥수수, 밀 등에서는 저항성 품종육성을 위해 관련 유전양성과 저항성 품종개발을 위한 관련 유전자탐색연구가 일부 시행되었고 특히 Arabidopsis를 이용하여 관련유전자를 tagging한 연구도 시도 중에 있으나, 콩은 유전연구나 관련유전자 연관 마커 및 QTL 등에 연구는 이루어지지 않고 있다.
- 다수의 연구를 통해 콩에서 UV-B에 의한 피해정도는 품종간 저항성 정도에 따라 피해 정도의 차이가 있음을 보고하였고 피해를 최소화 하기 위해서는 저항성 품종의 개발이 시급함을 보고하고 있으며, Arabidopsis에서 보고된 저항성 유전자의 염기서열이 미국 내에서 특허출원되는 등 국가별로 중요 유전자원 및 유전자에 대한 보호를 강화하고 있는 상황에서 우리나라도 향후 예상되는 환경변화에 능동적으로 대응하면서 자원보호를 강화하고 유용 유전자를 개발한다는 차원에서 콩에서 UV-B 저항성 자원을 활용한 근접 DNA개발과 유전자 확보는 시급한 실정이다.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1절 연구개발 방법

#### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 재료는 UV-B에 저항성 감수성을 보인 큰올콩과 UV-B에 저항성을 나타내는 익산10호를 교배한 F<sub>2</sub> 유래 F<sub>10</sub> RIL 집단을 활용하였다. 큰올콩은 지방수집종에서 선발된 품종이고, 익산10호는 광고/Pattern//PI171450///Elf///Will 조합 후대와 KW552/방사콩 후대의 교배조합에서 육성된 계통이다. RIL 계통육성을 위해 큰올콩과 익산 10호를 교배한 F<sub>1</sub>에서 생성된 F<sub>2</sub> 종자를 SSD(single seed descent) 방법을 통해 F<sub>10</sub>세대까지 양성 후 계통별로 F<sub>13</sub>세대까지 증식된 종자를 사용하였다.

#### 2. UV-B 반응 스크린

##### 가. 식물재배

큰올콩, 익산10호 와 115RIL 계통의 종자를 재배하기위해 원예용 상토를 채운 pot에 포트당 3립씩 과중후 2주만 남기고 제거한 다음 비가림온실에서 재배하였다.

##### 나. UV-B 처리방법



Fig 1. UV-B Screening facilities

UV-B는 각 처리구당 8개의 자외선(UV-B)램프(G40T10E UV-B lamps, Sankyo Denki, Japan)로 구성된 인공조사장치를 제작하여 사용하였다(Fig. 1). 자외선(UV-B)램프는 UV-B (280~320 nm) 영역뿐만 아니라 UV-C (200~280 nm) 영역의 광도 포함하고 있기 때문에 UV-B 처리구에는 0.13 mm 두께의 cellulose diacetate 필름(Cadillac Plastics Co., Baltimore, MD, USA)을 램프에 감아 290 nm 이하의 자외선(UV-C)을 제거하였으며 필름

은 1주에 1회 교환하였다. 식물체는 파종 후 첫 복엽이 완전히 전개하는 V2 stage부터 1일 5시간(10시~16시) 씩 4주간 UV-B 조사 실험을 수행하였다. 자외선(UV-B)램프와 식물체의 간격은 식물 생장에 맞추어 20 cm를 유지시켜 UV-B의 강도를 일정하게 유지시켰다. UV-B의 강도는 a LP 471 UVB, LP 471 UVC sensor가 장착된 UV-radiometer (DO 9847, Delta OHM)로 측정하였다.

다. 식물체 반응조사

식물체 반응조사는 UV-B 처리 2주 및 4주 후에 각각 실시하였으며, 주요 조사형질은 엽의 색상변화정도, 엽의 형태적 변화정도, 엽맥의 색상변화정도 및 전체 식물체의 생육 및 형태적 변화 정도를 1, 3, 5, 7, 9로 등급을 나누어 측정하였다.(Fig.2)

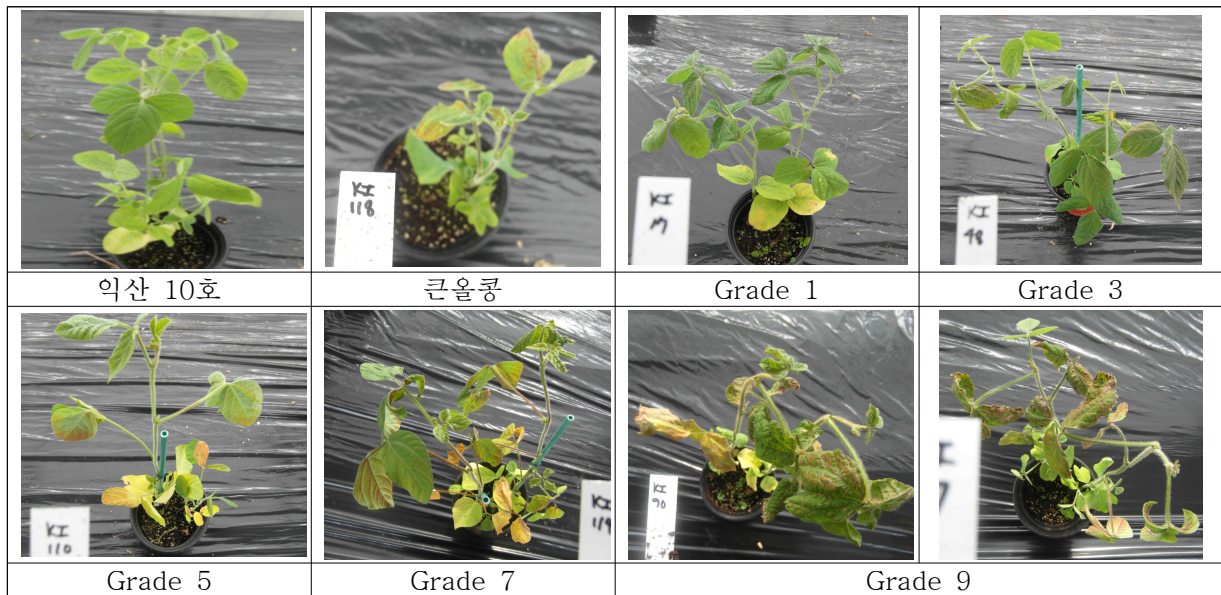


Fig 2. Damaged degree by supplemental UV-B

3. SSR 마커의 Genotyping

가. SSR 마커 스크린

콩에서 기개발되어 Soybase(www.Soybase.org)에서 공유되고 있는 SSR 마커를 연관군 별로 10CM 정도의 거리로 선별하여 모부분의 다형성을 검정 후 다형성이 인정된 마커를 선별하여 genetic linkage mapping에 활용하였고 특히 1차 예비실험에서 QTL이 존재가 예상되는 연관군 L(Chr.19)의 주위의 마커를 추가로 확보하여 스크린을 실시하였다.

나. DNA 추출 및 PCR

SSR 마커분석을 위해 어린 엽으로부터 Genomic DNA를 추출하고 모부분의 다형성이

확인된 110 SSR마커를 모부본과 RIL 계통에 대해 genotyping을 실시하였다. PCR은 50ng의 DNA, 0.15M forward 및 reverse primer, 200 M의 dNTP, 2 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 1X reaction buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.5, 100mM KCl) 및 0.5 U of Taq DNA polymerase (BioBasic Taq Polymerase, Applied Bio Basic, Canada)을 포함하여 전체 10 $\mu$ l를 맞추었다. PCR 조건은 denature(94°C, 2min) 후 denaturation(94°C, 25 s)-annealing(47°C, 25 s) - extension(68°C, 60 s)의 과정을 40회 반복하였다. 이후 polyacrylamide(4%) 또는 agarose gels(3%)에서 전기영동을 통하여 SSR 마커의 분리하였는데 모부본간에 base pair 차이가 경우 큰 것은 3% EtBr이 포함된 3% Agarose gel을 이용하고 base pair 차이가 적은 것은 4% acrylamide gel로 전기영동 후 DNA silver staining system (Promega)를 이용하여 silver staining을 실시하였다. SSR 증폭물의 폴리 아크릴아마이드 전기영동이 끝나면, 겔을 10% ethanol에 20 분간 고정시킨 후, 1% HNO<sub>3</sub> 용액에 10 분간 담그고, 이어 staining solution(Silver nitrate 1 g, 37% formaldehyde 1.5 ml/1 l)에 30분간 부드럽게 흔들어 준 후 DW로 가볍게 행구어 주었다. 다음에 developer solution (Sodium carbonate 30 g, 37% formaldehyde 900  $\mu$ l; 1% Sodium thiosulfate 500  $\mu$ l/1 l)을 처리하여 밴드가 나타날 때 까지 둔 후, 10% acetic acid로 반응을 중단시켰다.

#### 4. Map 제작 및 QTL 탐색

RIL 계통에서 나타난 SSR 마커 data와 형태적 마커(화색 및 제색) 데이터에 근거하여 Map Manager QTX (Mainly et al., 2001)방법으로 유전자지도를 작성하였다. 유전자지도 작성에 필요한 기본정보는 public USDA map(Song et al., 2004)에 근거하였고 유전자지도는 Halden map function의 기능을 활용하여 작성되었다.

QTLs 분석을 위해 Statistical Analysis System version 9.2(SAS Institute 2001)를 이용한 분산분석과 QTL Cartographer version 2.5를 이용한 CIM(composite interval mapping)을 이용하였다(Wang, 2007). SAS를 이용한 QTL 연관 분석을 위해 SSR 마커의 genotype group을 분류변수로 사용하여 single factor analysis of variance(SF-ANOVA)를 실시하였는데, 각 마커 allelic group별 평균은 SAS GLM procedure로부터 얻은 type-III mean square의 F-test를 이용하여 비교하였다. 표현형과 유의적인 관련을 보이는 두개 이상의 마커가 같은 연관군에 연관되어 있을 때, multiple regression analysis(SLG-Regr)를 수행하였고 이때 forward and stepwise selection procedures를 적용하였다. SLG-Regr로부터 얻은 모든 유의성 있는 마커와 SF-ANOVA로부터 나온 unlinked single 마커는 2-3개의 QTLs에 의해 설명되는 표현형 변이의 비율을 결정하기 위해 P<0.05에서 multiple linkage group regression model(MLG-Regr)을 실시하였다. 또한 정확한 QTL의 위치를 파악하기 위하여 QTL Cartographer V. 2.5 을 이용한 CIM을 실시하였고 이때 work speed는 2.0 cM, permutation test는 300회 실시하였다(Churchill & Doerge 1994).

## 제 2절 연구결과

### 1. 모본 및 RIL 계통의 UV-B 반응조사

UV-B 처리에 의해 식물체는 Fig3에서 보는 바와 같이 엽의 색상과 엽의 형태에서 변화를 보였고 또한 엽맥 부위에서 녹색에서 자색으로 변색되는 현상을 관찰할 수 있었으며 이러한 현상은 모부본간에 차이를 보였고, RIL 계통 내에서도 다양한 차이를 보였다(Fig 3). 계통별 피해 정도를 구분하기위해 Fig 2와 같이 피해의 정도에 따라 1 ~ 9의 등급 구분을 실시하였다. 등급 1은 모본인 익산 10호와 같이 UV-B 처리에도 불구하고 식물체의 생육과 외형에서 전혀 변화가 없었으며 등급 9는 엽의 형태와 색상, 엽병의 색상 등에서 심각한 피해를 나타내고 있었다.

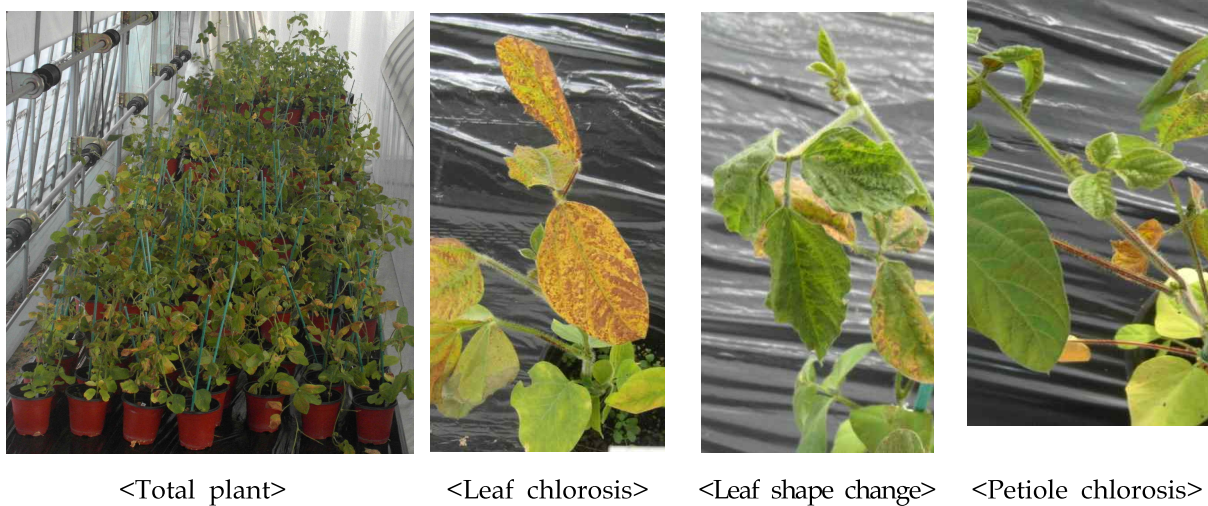


Fig 3. Photograph of damaged plants by supplemental UV-B

UV-B의 피해에 따라 전체 계통이 입은 피해정도의 분포를 엽의 색상변화, 엽의 형태변화 및 엽병의 색상변화 및 이들을 종합한 식물체의 생육변화로 나누어 살펴보면 다음과 같다. 먼저 엽의 색상의 변화는 Fig4-A와 같이 모본인 익산 10호는 1 이고 큰울콩은 7로 나타났고 RIL 계통은 보부분의 범위를 벗어난 1~9로 나타나 초월분리 현상을 보였다. 분포는 5를 중심으로 정규분포의 양상을 보여 양적형질의 특성을 보여주고 있었다.



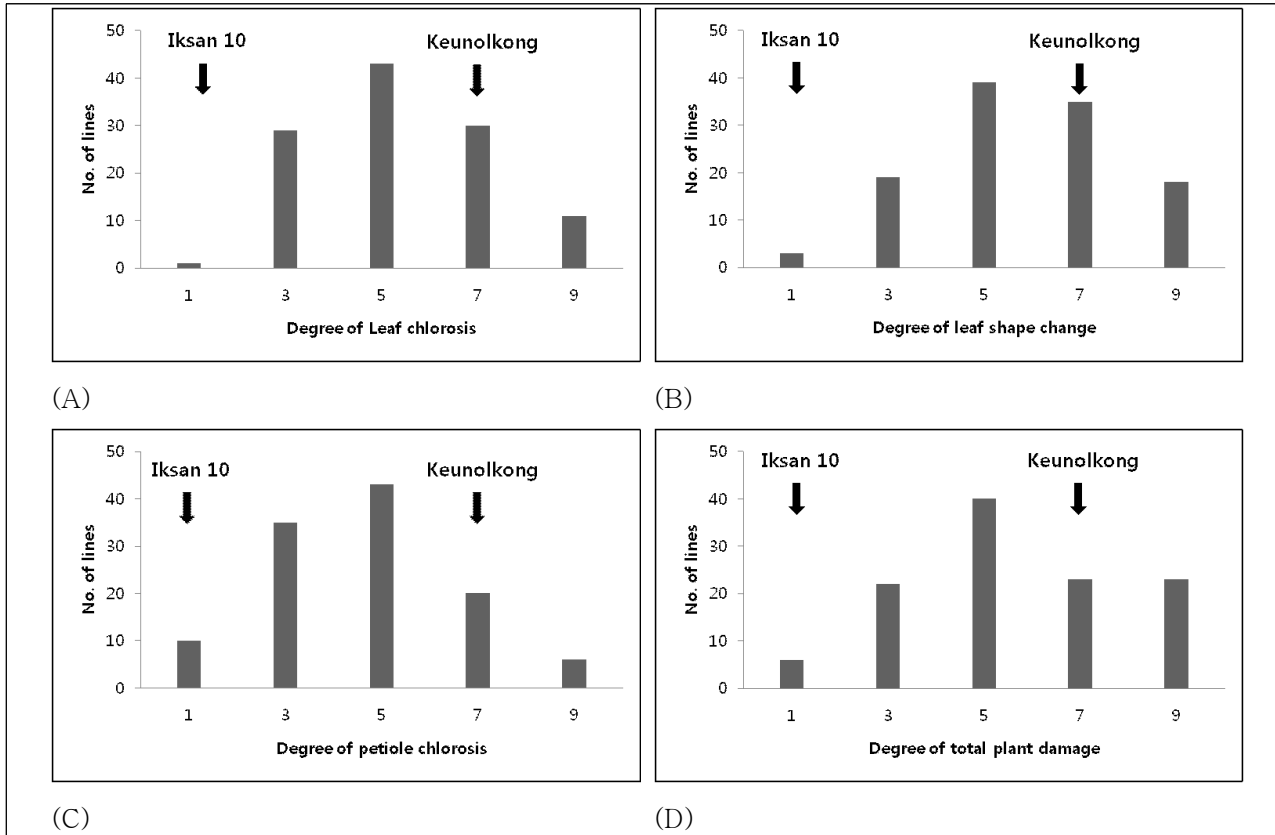


Fig 4. Frequency distribution for UV-damage in RIL population

엽의 모양의 변화정도는 Fig4-B에서 나타나듯이 모본인 익산10호는 1로서 변화가 없었으나 큰울콩은 7로서 엽의 찌그러드는 현상이 다소 심하게 나타났고 RIL 계통은 모본의 범위를 벗어난 1~9의 분포를 보여 초월분리현상을 나타내었으며 엽의 색상변화와는 달리 변화가 심한 쪽으로 치우치는 정규분포 양상을 보였다. 엽병 및 일부 줄기부분에서 나타나는 색상의 변화정도는 Fig 4-C 와 같이 저항성모본인 익산 10호는 변화가 없었으나 감수성모본인 큰울콩은 7로소 다소 심하게 색상의 변화를 보였고 RIL 계통은 1~9의 분포를 보여 초월분리 현상을 나타내었고 분포모양은 피해가 적은 쪽으로 치우친 정규분포모양을 나타내었다.

식물체의 엽의 색상, 엽의 모양, 엽병의 색상변화 등을 종합한 식물체의 외부형태변화를 종합한 피해정도는 Fig4-D와 같이 나타나는데 저항성모본인 익산10호는 피해가 없었고 감수성 모본인 큰울콩은 7로 다소 심하게 피해를 받았다. 전반적으로 정규분포의 형태를 나타내고 있으나 피해가 심한 계통이 다수를 차지하고 있었으며 초월분리현상을 나타내었다.

## 2. UV-B 저항성 관련 분자표지개발

### 가. 다중회귀에 의한 UV-B 저항성 연관마커 탐색

UV-B에 저항성인 익산10호와 감수성인 큰올콩을 이용하여 작성된 RIL 계통을 비가림 온실에서 UV-B를 인공조사한 후 그에 대한 피해반응을 조사하고, SSR 마커를 이용하여 각 RIL 계통의 DNA 다형성을 분석하여 콩에서 UV-B의 반응과 연관된 양적형질유전자좌(QTLs)를 분석하였다. 양적형질분석은 피해 증상에 따라 나누어 분석하였는데 엽의 변색 정도, 엽의 형태 변화정도, 엽병의 변색정도 및 전체 식물체의 피해정도로 나누어 조사하였다.

먼저 식물체 전체 피해정도에 대한 연관마커 탐색을 위해 SF-ANOVA 분석을 한 결과, 4개 연관군(N(Chr.3), C2(Chr.6), L(Chr.19), M(Chr.7))에서 8개 마커들이 콩 UV-B 저항성 반응과 유의적인( $P < 0.05$ ) 관계를 보였고, 이중 연관군 M(Chr.7)에서 2개의 마커, 연관군 L(Chr.19)에 4개의 마커가 위치해 있었으며, 이러한 마커들은 표현형 변이의 3.8 ~ 20.4%를 설명하였고 전체적으로 64%의 표현형 변이를 설명하였다. 이중 연관군 C2(Chr.6), D2(Chr.17), L(Chr.19), M(Chr.7)에서 확인된 마커는 큰올콩 allele가 콩 UV-B 피해를 증가시키는 것으로 나타났다.

Table 1. Markers linked to QTLs associated with total plant damage by supplemental UV-B radiation in F2-derived F12 RILs of Keunolkong  $\times$  Iksan 10

Marker	LG(Chr.) <sup>a</sup>	SF-ANOVA <sup>b</sup>		Allelic means <sup>c</sup>		SLG-Regr <sup>d</sup>		MLG-Regr <sup>e</sup>	
		<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	K/K	I/I	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)
satt371	C2(6)	0.0241	4.5	4.5	5.2	NA		0.0156	4.3
satt238	L(19)	<.0001	20.4	5.3	3.6	<.0001	17.9	<.0001	21.5
satt462	L(19)	0.045	3.5	5	4.3				
satt495	L(19)	0.0034	8	5.2	4.2				
satt523	L(19)	0.0081	6.6	5.1	4				
satt567	M(7)	0.017	5	5.2	4.4				
satt590	M(7)	0.0001	12.5	5.2	4.5	0.0002	12		
satt022	N(3)	0.0362	3.8	5.2	4.5	NA			
Total			64.3						25.8

a: Chr chromosome; LG linkage group b: Single factor analysis of variance, c: K/K: homozygous Keunolkong, S/S : homozygous Iksan10, d: Multiple regression with makers on each linkage group, e: Multiple regression with all significant markers from the SLG-Reg model and unlinked markers, f: Not applicable. Not linked to other markers.

SF-ANOVA 분석결과에 기초하여 각 연관군에서 최적의 마커 조합을 선정하기 위해 연

관군 M(Chr.7)에 있는 각 2개씩의 마커와 연관군 L(Chr.19)에 있는 4개 마커에 대한 SLG-Regr 분석 결과 연관군 M(Chr.7)에 Satt590, L(Chr.19)에 Satt238이 가장 유의한 마커로 나타났다. 각 연관군에서 나타난 유의한 4개 마커(Satt022, Satt371, Satt590, Satt238)를 이용하여 MLG-Regr 분석을 한 결과 Satt371, Satt238이 콩 UV-B 반응과 관련된 대표적인 QTL로 나타났고 이들은 각각 4.3, 21.5%로 표현형 변이를 설명하였다. 이중 연관군 L(Chr.19)에서 확인된 Satt238은 R<sup>2</sup>이 21.5%의 major QTL로 추정되고, C2(Chr.6)에서 확인된 QTL(Satt371)은 minor QTL로 추정되었으며 전체적으로 이들 QTL은 UV-B에 대한 반응의 25.8%를 설명하였다(Table 1).

UV-B 인공조사에 의한 엽의 모양(Leaf shape)변화와 연관된 유의한 마커는 SF-ANOVA 분석결과 연관군 A2(Chr.8), C2(Chr.6), F(Chr.13), L(Chr.19), M(Chr.7), N(Chr.3)에서 탐색되었고 이들은 전체적으로 표현형 변이의 52.7%를 설명할 수 있었다. 이중 SLG-Regr 과 MLG-Regr 분석을 통한 최적마커 조합선정결과 A2(Chr.8), C2(Chr.6), L(Chr.19)에 위치한 Satt187, satt100, Satt238 각각 R<sup>2</sup> 3.9%, 5.3%, 11.5%로 유의한 마커로 확인되었다.(Table 2)

UV-B 인공조사에 의한 엽의 색상(Leaf chlorosis)변화와 관련된 유의한 마커는 single factor 분석결과 연관군 B1(Chr.11), B2(Chr.14), F(Chr.13), L(Chr.19), M(Chr.7)에서 탐색되었고 이중 최적마커는 L(Chr.19)에 위치한 Satt238로 나타났고 이들은 전체 변이의 11.4%를 설명할 수 있었다.(Table 3)

Table 2. Markers linked to QTLs associated with leaf shape change by supplemental UV-B radiation in F<sub>2</sub>-derived F<sub>12</sub> RILs of Keunolkong × Iksan 10

Marker	LG(Chr.) <sup>a</sup>	SF-ANOVA <sup>b</sup>		Allelic means <sup>c</sup>		SLG-Regr <sup>d</sup>		MLG-Regr <sup>e</sup>	
		<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	K/K	I/I	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)
satt187	A2(8)	0.0146	5.3	3.3	3.8	NA <sup>f</sup>		0.041	3.9
satt100	C2(6)	0.0404	4.1	3.7	4.5	NA		0.019	5.3
satt114	F(13)	0.0162	5.2	3.5	4.4	NA			
satt238	L(19)	0.0005	10.4	4.5	3.1	0.004	8.5	0.0009	11.5
satt462	L(19)	0.0208	4.9	4.3	3.4				
satt495	L(19)	0.0319	4.2	4.4	3.6				
satt523	L(19)	0.0242	4.8	3.7	3.0				
satt567	M(7)	0.0404	3.8	4.4	3.7				
satt590	M(7)	0.009	6.1	4.4	3.4	0.006	7.1		
satt022	N(3)	0.0356	3.9	4.4	3.7	NA			
Total			52.7						20.7

a: Chr chromosome; LG linkage group b: Single factor analysis of variance, c: K/K: homozygous Keunolkong, S/S: homozygous Iksan10, d: Multiple regression with markers on each linkage group, e: Multiple regression with all significant markers from the SLG-Reg model and unlinked markers, f: Not applicable. Not linked to other markers.

Table 3. Markers linked to QTLs associated with leaf chlorosis by supplemental UV-B

radiation in F2-derived F12 RILs of Keunolkong × Iksan 10

Marker	LG(Chr.) <sup>a</sup>	SF-ANOVA <sup>b</sup>		Allelic means <sup>c</sup>		SLG-Regr <sup>d</sup>		MLG-Regr <sup>e</sup>	
		<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	<i>K/K</i>	I/I	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)
satt197	B1(11)	0.0297	4.3	3.1	3.9	NA <sup>f</sup>			
satt577	B2(14)	0.0404	3.8	3.1	3.9	NA			
satt114	F(13)	0.0188	5.0	3.0	3.9	NA			
satt238	L(19)	0.0012	9.2	3.9	2.3	0.0009	10	0.0004	11.4
satt495	L(19)	0.0198	4.9	3.8	3.0				
satt590	M(7)	0.0408	3.8	3.8	3.0	NA			
Total			31.0						11.4

a: Chr chromosome; LG linkage group b: Single factor analysis of variance, c: *K/K*: homozygous Keunolkong, *S/S*: homozygous Iksan10, d: Multiple regression with makers on each linkage group, e: Multiple regression with all significant markers from the SLG-Reg model and unlinked markers, f: Not applicable. Not linked to other markers.

Table 4. Markers linked to QTLs associated with petiole chlorosis by supplemental UV-B radiation in F2-derived F12 RILs of Keunolkong × Iksan 10

Marker	LG(Chr.) <sup>a</sup>	SF-ANOVA <sup>b</sup>		Allelic means <sup>c</sup>		SLG-Regr <sup>d</sup>		MLG-Regr <sup>e</sup>	
		<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	<i>K/K</i>	I/I	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)	<i>p</i>	R <sup>2</sup> (%)
satt185	E(15)	0.0344	4.1	3.0	2.3	NA <sup>f</sup>			
satt114	F(13)	0.0397	3.9	2.3	3.0	NA			
satt137	K(9)	0.0225	4.7	3.0	2.2	NA			
satt238	L(19)	<0.0001	14.3	3.2	1.7	<.0001	16.6	<.0001	20
satt462	L(19)	0.0142	5.5	3.0	2.0				
satt495	L(19)	0.023	4.7	3.0	2.2				
satt590	M(7)	0.0026	8.0	3.2	2.1	NA			
satt022	N(3)	0.0291	4.2	3.1	2.4	NA			
Total			49.38						23.4

a: Chr chromosome; LG linkage group b: Single factor analysis of variance, c: *K/K*: homozygous Keunolkong, *S/S*: homozygous Iksan10, d: Multiple regression with makers on each linkage group, e: Multiple regression with all significant markers from the SLG-Reg model and unlinked markers, f: Not applicable. Not linked to other markers.

엽병의 색상(Petiole chlorosis)변화와 관련된 유의한 마커는 single factor 분석결과 연관군 E(Chr.15), F(Chr.13), K(Chr.9), L(Chr.19), M(Chr.7), N(Chr.3)에서 유의한 마커가 탐색

되었고 이중 최적마커는 L(Chr.19)에 위치한 Satt238로 나타났고 이들은 전체 변이의 20.0%를 설명할 수 있었다.(Table 4)

#### 나. Interval mapping에 의한 UV-B 저항성 연관마커 탐색

콩 UV-B와 관련된 QTL의 정확한 위치를 탐색하고자 엽색의 변화, 엽모양의 변화, 엽병의 변색 및 전체 식물체의 피해정도 4가지의 형질에 대하여 QTL Cartographer를 이용하여 Composite interval mapping을 실시하였다(Fig 5, Table 5). QTL 탐색 결과 전체적으로 QTL의 강도 및 위치의 차이는 조금 있으나 대체로 연관군 L(Chr19)에서 Satt495와 satt238을 flanking 마커로 하여 UV-B와 연관된 QTL이 탐색되었다. 각각의 형질별로 QTL의 정확한 위치와 강도를 살펴보면 엽의 색깔의 변화는 연관군 L(Chr19)에서 satt238을 근접마커로하여 1.3cM 떨어진 위치에서 LOD 3.0정도의 QTL이 위치하였고 이 QTL은 전체 변이의 약 11%를 설명할 수 있었다.

엽의 모양은 엽의 색상변화관련 QTL 보다는 위치는 유사하나 좀 더 강한 QTL이 탐색되었는데 satt238에서 4.3cM 떨어진 위치에서 확인되었고 LOD 4.61의 값을 가지고 R<sup>2</sup> 값이 21.48%로서 전체 표현형 변이의 약 22%를 설명할 수 있는 major QTL이 확인되었다. UV-B의 조사에 의해 나타나는 식물체 변화중 엽병의 변색과 관련된 QTL도 유사한 위치에서 확인 되었는데 근접 마커인 satt238과 거의 유사한 위치에서 LOD 5.22의 값을 가지는 QTL을 확인 하였다.

전체 식물체의 성장 및 피해정도를 종합한 QTL은 연관군 L(Chr19)의 satt238을 근접 마커로 하여 LOD 값이 6.90이며 R<sup>2</sup>값이 32.8%로 전체 표현형 변이의 32.8%를 설명하는 major QTL이 satt238에서 5.3cM 떨어진 위치에서 확인되었다.

QTL 탐색결과 엽의 색, 엽의 모양, 엽병의 색상변화 및 전체 식물체의 피해정도에 대한 QTL은 다수의 연관군에 존재하는 것으로 확인되었으나 모든 형질에서 공통적으로 연관군 L에 위치하는 결과로 판단할 때 콩에서 자외선(UV-B) 관여 QTL은 다수가 존재할 것으로 추정되고 있으며 이중 가장 기여도가 큰 주동유전자는 연관군 L(Chr19)의 satt238근처에 존재할 것으로 판단된다.

Table 5. The QTLs for UV-B identified by Composite interval mapping in F2-derived F12 RILs of Keunolkong × Iksan 10

Trait	Interval	LG <sup>a</sup> (Chr.)	Cloest Marker	Position <sup>b</sup>	Additive effect(%) <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> value(%)	LOD score <sup>d</sup>
Leaf chlorosis	Satt495-Satt238	L(19)	Satt238	1.3	-0.65	10.76	2.98
Leaf shape	Satt495-Satt238	L(19)	Satt238	4.29	-0.98	21.48	4.61
Petiole chlorosis	Satt495-Satt238	L(19)	Satt238	0.02	-0.87	17.6	5.22
Total plant damage	Satt495-Satt238	L(19)	Satt238	5.29	-1.07	32.8	6.90

a: Chr chromosome; LG linkage group b: QTL position from the closest marker (cM) c: Additive effect: positive values indicated that Keunolkong carries the resistant allele for UV-B, while negative values indicate that Sinpaldalkong contributed the resistant allele for UV-B d Maximum-likelihood LOD score for the individual QTL

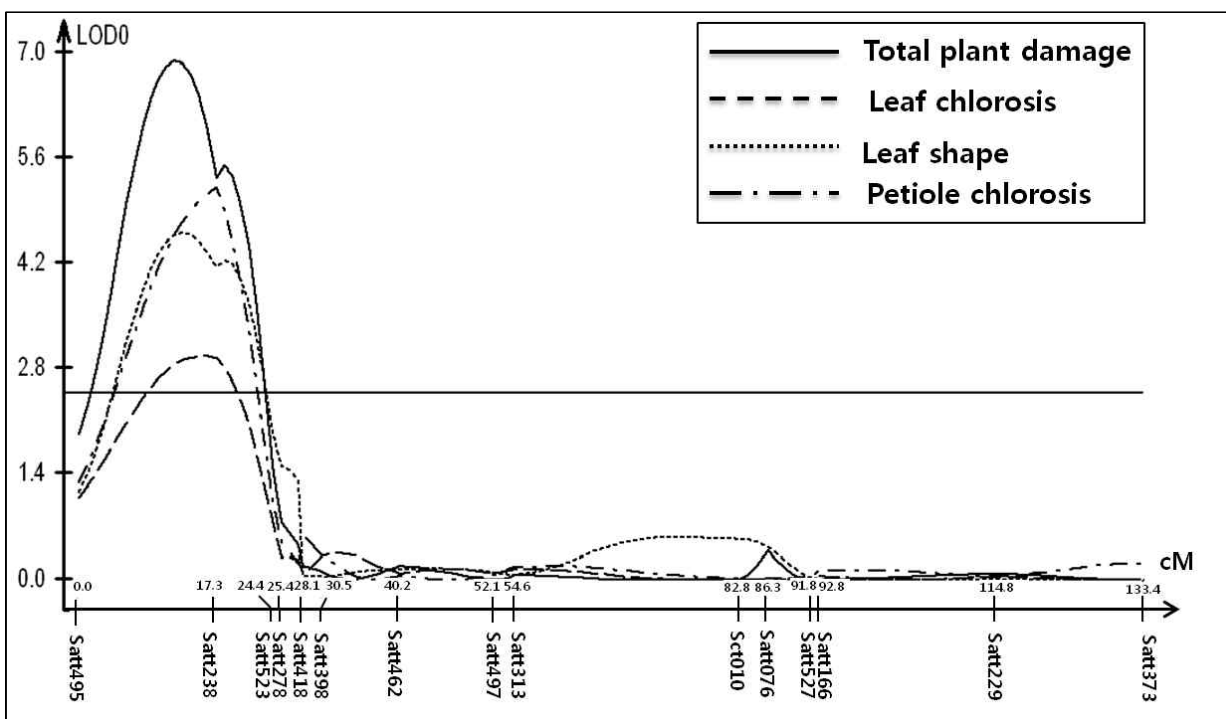


Fig. 5. Composite interval mapping of markers linked to QTL for resistance to UV-B resistance using Windows Cartographer (V. 2.5). Phenotypic data were obtained from the supplemental UV-B radiation

## 적 요

지구환경변화에 의한 오존층 감소로 지표면에 도달하는 자외선(UV-B: 280-320nm)이 증가된 환경에서 안정적인 생산이 가능한 자외선(UV-B) 저항성인 콩 품종육성에 필요한 자외선(UV-B) 저항성과 연관된 분자마커를 개발을 위해 수행된 연구과제의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 인공 자외선(UV-B) 조사에 의해 콩 식물체는 엽의 색상(Leaf Chlorosis), 엽의 모양(Leaf shape), 엽병의 색상(Petiole Chlorosis) 등에서 변화를 보였는데 모본인 큰올콩은 심한 피해 증상을 보인 반면 부분인 익산10호는 자외선(UV-B)에 저항성을 보였다.
2. RIL 계통은 계통별로 다양한 피해 증상을 보였는데, 엽의 색상(Leaf Chlorosis), 엽의 모양(Leaf shape), 엽병의 색상(Petiole Chlorosis) 및 전체 식물체의 피해증상에서 1~9의 등급 구분이 가능하였고 분포는 대체로 정규분포 양상을 나타내어 본 형질과 관련 다수의 유전자가 관여하는 것으로 추정된다.
3. UV-B 인공조사에 의한 엽의 모양(Leaf shape)변화와 연관된 유의한 마커는 single factor 분석결과 연관군 A2(Chr.8), C2(Chr.6), F(Chr.13), L(Chr.19), M(Chr.7), N(Chr.3)에서 탐색되었고 이중 최적마커 조합은 A2(Chr.8), C2(Chr.6), L(Chr.19)에 위치한 Satt187, Satt100, Satt238로 나타났고 이들은 전체 변이의 20.7%를 설명할 수 있었다.
4. 엽의 색상(Leaf Chlorosis)변화와 관련된 유의한 마커는 single factor 분석결과 연관군 B1(Chr.11), B2(Chr.14), F(Chr.13), L(Chr.19), M(Chr.7)에서 탐색되었고 이중 최적마커는 L(Chr.19)에 위치한 Satt238로 나타났으며 이들은 전체 변이의 11.4%를 설명할 수 있었다.
5. 엽병의 색상(Petiole Chlorosis)변화와 관련된 유의한 마커는 single factor 분석결과 연관군 E(Chr.15), F(Chr.13), K(Chr.9), L(Chr.19), M(Chr.7), N(Chr.3)에서 유의한 마커가 탐색되었고 이중 최적마커는 L(Chr.19)에 위치한 Satt238로 나타났고 이들은 전체 변이의 20.0%를 설명할 수 있었다.
6. UV-B 인공조사에 의한 엽의 색상(Leaf Chlorosis), 엽의 모양(Leaf shape), 엽병의 색상(Petiole Chlorosis) 변화를 포함한 전체 식물체의 UV-B 피해와 연관된 유의한 마커들은 Single-factor 분석결과 다수의 유의한 마커들이 연관군 C2(Chr.6), L(Chr.19), M(Chr.7) 및

N(Chr.3)에서 확인되었고, 이중 최적의 마커 조합은 연관군 C2(Chr.6)의 Satt371( $R^2=4.3\%$ )과 연관군 L(Chr.19)에 위치한 Satt238( $R^2=21.5\%$ )로 확인되었다.

7. 유전자 지도상에서 QTL의 정확한 위치를 탐색코자 실시한 Composite interval mapping 결과 엽의 색상(Leaf Chlorosis), 엽의 모양(Leaf shape), 엽병의 색상(Petiole Chlorosis) 변화 및 전체 식물체의 피해정도에 대한 major QTL을 연관군 L(Chr.19)의 satt238에서 0.02~5.29cM의 거리에서 LOD 값은 2.98~ 6.9로 나타나 콩에서 UV-B 반응과 관련된 major QTL이 연관군 L(Chr.19)의 satt238 근처에 존재함을 확인하였다.



## 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 목표달성도, 평가의 착안점 및 실적

평가의 착안점 및 기준	가중치 (%)	실적	목표 달성도(%)
○ 콩 근동질계통에 대한 UV-B 스트레스 저항성 검정 여부	20%	○ 인공 자외선(UV-B) 조사장치를 활용하여 모부본을 비롯하여 120여 콩 근동질계통에 대한 UV-B 스트레스 저항성 검정을 완료하여 100% 목표 달성함	100%
○ 콩 UV-B 저항성 유전자 근접분자마커 선발을 RIL genotyping 여부	30%	○ 110여 SSR 마커를 활용하여 120여 계통에 대한 genotyping 실시 완료하여 100% 목표 달성함	100%
○ 콩 UV-B 저항성 유전자 근접분자마커 선발을 위한 QTL 탐색 여부	50%	○ 연관군 L(Chr.19)에서 satt238 마커 인접부위에서 UV-B 연관 major QTL 확인하여 100% 목표 달성함	100%

### 2. 관련분야 기여도

#### <기술적 측면>

- 최초로 자외선(UV-B)에 저항성인 콩 품종육성을 위한 핵심기술 및 자원 확보
- DNA 마커를 활용하여 단기간 내에 저항성 품종개발 가능
- 콩에서 저항성 품종개발에 필요한 저항성 유전자 정보는 금후 타작물의 자외선(UV-B) 저항성 품종개발에 유용한 유전자로 활용가능
- 기후변화에 대응 안정적인 콩 생산을 위한 품종적 기반 확보

#### <경제산업적 측면>

- 국내 및 국외시장 분석결과 콩에서 자외선(UV-B)저항성 품종개발에 대한 연구는 아직 수행되지 않았으나 지구환경변화에 의해 지구의 자외선(UV-B) 함량이 증가시 저항성 품종에 대한 수요는 폭발적으로 증가할 것 이므로, 본 연구과제에서 개발된 UV-B 저항성 품종육성을 위한 저항성자원과 저항성계통 선발마커는 신속한 저항성 품종개발이 가능하도록 기반확보와 조속한 시일 내에 UV-B 저항성 품종의 상품화가 가능하여 국가 경제적으로 기여할 수 있을 것임

#### <사회문화적 측면>

- 안정적인 식량생산기술 확보를 통한 사회안정화와 국민들에게 안전한 국산 먹거리 제공을 통한 국민 건강증진에 기여

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 특허, 논문 및 학회발표 성과 및 계획

#### 1. 논문게재 및 예정

연도	논문명	저자		학술지명	Vol. (No.)	구분
		교신저자	공동저자			
2012	Mapping QTLs with epistatic effects and QTL-by-environment interactions for seed coat cracking in soybeans	강성택	하보근, 김현경	Euphytica (SCI)	186(6): 933-942	완료
2013	Development of DNA Marker for UV-B Resistance in Soybean	강성택	심현철, 유민호	Crop Sci (SCI)	-	예정

#### 2. 학회발표

연도	논문명	저자		학회명	Vol.(No.)	구분
		교신저자	공동저자			
2012	Development of QTLs for Ultraviolet-B(UV-B) resistant gene in Soybean	강성택	심현철, 유민호	한국작물학회	v57(suppl.2): 135	완료

### 제 2 절 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

#### <자체 실용화>

본 연구에서 확인된 UV-B 저항성 자원과 연관 QTL정보는 금후 저항성 품종육성을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 본 연구실에서 자체적으로 저항성 품종육성을 위해서 저항성 Source로 익산 10호 등 저항성 자원을 활용하고 저항성 유전자 보유 계통 선발을 위해 본 과제에 저항성 유전자와 연관된 QTL 마커를 활용하여 분자육종체계를 활용한 여교 배방법을 이용하여 조속한 시기 내에 품종육성이 가능할 것으로 판단된다.

#### <기술이전을 통한 실용화>

국내 콩 품종육성과 관련된 사업을 추진하고 있는 농촌진흥청 또는 국내 대학 품종육성 담당 연구진과의 공동연구 또는 기술이전을 통해 본 과제에서 획득한 자원정보 및 마커정보를 공유함으로써 UV-B 저항성 신품종을 조기에 개발가능하고 개발된 신품종은 농가에 보급될 수 있을 것으로 판단된다.

## 제 3 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

### 1. 추가연구

현재 밝혀진 콩 UV-B 연관 QTL은 전체변이의 약 26%내외를 설명하는 수준이므로 추가적으로 좀 더 많은 DNA 마커를 확보하여 유전자 지도를 조밀화 한다면 좀 더 강도가 낮은 다수의 양적형질을 확보할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 현재 개발된 마커에 대한 Validation을 위해 다른 교배조합을 작성된 육종 집단에 본 마커를 적용하고 선발의 효율성을 검토함으로써 본 마커의 활용성에 대한 평가를 실시할 계획이다.

### 2. 타연구에 활용

본 연구에서 UV-B 저항성 유전자가 있을 것으로 추정되는 연관군 L(Chr.19) 근처에 유전자서열정보를 확보한 후 sequencing 또는 map base cloning 등의 방법을 활용하여 정확한 유전자를 규명하고, 규명된 유전자를 형질전환하여 유전자원 정확성을 검증하는 연구에 본 연구 결과를 활용할 수 있음

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

< 미국 USDA의 UV-B monitoring 및 연구 프로그램 >

- 1990년 미국 농무성은 북 아메리카 지역의 오존층 감소와 이에 따른 작물과 대기권의 UV-B 피해 가능성에 관심을 기울여 1992년 주연구소와 교육기관 등과 공동으로 Colorado 대학에 근거를 두고 UV-B Monitoring and Research Program(UVMRP)를 위한 network 결성
- 이들은 미국에서 UV-B의 지역적 분포와 변화에 대한 정보를 제공하여 산림과 농작물에 UV-B 증가에 따른 예상되는 피해를 예측할 수 있게 한다. 구체적으로 프로그램은 크게 연구부분(Research component)과 Climatologic Network으로 구성되며 Research Component는 1) UV-B에 대한 식물, 산림, 동물의 반응과 다른 기후 스트레스 요안과의 관계를 평가 2) 기후변화에 적응하는 작물개발자나 농업생산자를위한 climate crop model 을 개발 등을 수행중이고 Climatologic Network은 전국에 38개 정도의 균일한 거리에 측정 site를 두고 변화하는 UV-B의 농도를 상시 모니터링하고 정보를 제공하는 업무를 수행중에 있음.

## 제 7 장 참고문헌

- Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138:963 -971.
- Frederick, J.E., Slusser, J.R., Bigelow, D.W.. 2000. Annual and interannual behavior of solar ultraviolet irradiance revealed by broadband measurements. *Photochem. Photobiol.* 72, 488-496.
- Fritsche, O. and W. Junge. 1996. Chloroplast ATP synthase, the clutch between proton flow and ATP synthesis is at the interface of subunit CF1. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1274:94-100.
- Gutteridge, s. and A.A Gatenby. 1995. Structure of an effector-induced inactivated state of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; the binary complex between enzyme and xylulose 1,5-bisphosphate. *the Plant Cell*. 7:809-819.
- Grossman, A.R., D. Bhaya, K,E, Apt, and D.M. Kehoe. 1995. Kight-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis : diversity, control, and evolution. *Annual Review of Genetics*. 29:pp.231-288.
- Hidema, J., Taguchi, T., Ono, T., Teranishi, M., Yamamoto, K., Kumagai, T.: UV-B resistance and CPD photolyase activity in rice. - *Plant J*. 50: 70-79, 2007.
- Li, Y., Zu, Y., Chen, J., Chen, H., 2002. Intraspecific responses in crop growth and yield of 20 soybean cultivars to enhanced ultraviolet-B radiation under field conditions. *Field Crops Res*. 78, 1-8.
- Mainly KF, Olson JM. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome* 10:327 - 34
- Mazza CA, Boccalandro HE, Giordano CV, Battista D, Zima AM, Scopel AL, Ballare CL. 2000. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* 122: 117 - 25.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2002. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> Edition. p1336:728-729.
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, et al. 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science*. 332(6025):103-6.
- Ross, J.R., K.H. Nam, J.C. D'Auria, and E. Pichersky. 1999. S-adenosyl-L-methionine ; salicylic acid carboxyl ethyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferase. *Arch Biochemical Biophysica*. 367:9-16.
- Sato T, Ueda T, Fukuta Y, Kumagai T, Yano M. 2003. Mapping of quantitative trait loci associated with ultraviolet-B resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1003 - 008.
- Santos, I., F. Fialgo, J.A. Almeida, and R.S. Alema. 2004. Biochemical and ultrastructural change in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*. 167:925-935.
- Song QJ, Marek LF, Shoemaker RC, Lark KG, Concibido VC, Delannay X, Specht JE, Cregan PB (2004) A new integrated genetic linkage map of soybean. *Theor Appl Genet* 109:122 - 28

- Teramura AH, Sullivan JH, Lydon J. 1990. Effects of UV-B radiation on soybean yield and seed quality: a 6-year field study. *Physiologia Plantarum* 80: 5 - 1.
- Ueda T, Sato T, Hidema J, Hirouchi T, Yamamoto K, Kumagai T, Yano M. 2005. qUVR-10, a major quantitative trait locus for ultraviolet- B resistance in rice, encodes cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. *Genetics* 171: 1941 - 950.
- UNEP, 2002. Executive Summary. Final of UNEP/WMO Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002. Prepared by the Scientific Assessment Panel of the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. UNEP, Nairobi(released 23 August 2002).
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB. 2011. Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.