

최 종
연구보고서

콩 불마름병 저항성 기작 구명 및 내병성 콩 계통 개발
Genetic Analysis for Bacterial Leaf Pustule Resistance
for Improvement of Soybean Varieties

콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성
Genetic Analysis for Bacterial Leaf Pustule Resistance for
Improvement of Soybean Varieties

콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발
Molecular Genetic Analysis of Bacterial Pustule Disease Resistance
in Hypernodulating Soybean Mutant

콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발
Search for Molecular Markers for Bacterial Leaf Pustule Resistance
through the Analysis of Disease resistance and
Phathogenesis-Related Genes

연 구 기 관
서 울 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “콩 불마름병 저항성 기작 구명 및 내병성 콩 계통 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 이 석 하

세부연구책임자 : 백 남 천

세부연구책임자 : 허 성 기

연 구 원 : 최 민 선

연 구 원 : 박 윤 희

연 구 원 : 박 종 호

연 구 원 : 노 규 진

연 구 원 : 이 선 영

연 구 원 : 나 의 식

연 구 원 : 김 명 준

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 윤 성 중

요 약 문

I. 제 목

콩 불마름병 저항성 기작 구명 및 내병성 콩 계통 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 콩의 불마름병을 일으키는 주요 균계들에 대한 복합저항성 및 감수성인 콩 계통을 선발하여, 교배를 통한 분리세대에서 저항성 유전자의 유전양식을 구명하고, 내병성 계통 선발의 효율성을 높이기 위한 분자표지 (molecular marker)를 개발하여, 우수한 콩 장려품종에 이들 유전자를 도입, 집적함으로써 다수의 콩 불마름병 균계에 대한 복합 내병성 계통을 육성하고자 한다. 또한, 우리 나라에서 이용하고 있는 콩 품종에 대한 다양한 균계를 수집, 조사하고 그 균계들의 분화형을 조사한다.

나. 우리나라의 콩 불마름병 균계에 저항성을 나타내는 콩 품종들에서 공통적으로 발현되는 저항성 관련 유전자들을 분리하여 그 유전자들의 내병성 기능을 검정하고 분리한 유전자들 자체가 내병성 계통선발의 효율을 높이는 마커들으로써 개발하고자 하며 또한 우리나라 고유의 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 저항성 유전자로써 확립 및 특허등으로 보유하고자 한다.

다. 진균, 세균 바이러스 병해에 대한 식물의 저항성 유전자에는 구조적 공통성이 존재하며 병해 저항성과 관련된 단백질 유전자도 다수 알려져 있다. 식물의 병해 저항성 유전자에 존재하는 구조적 공통성 및 병 저항성 단백질 유전자의 발현 양상과 저항성과의 관련성을 조사하여 불마름병 저항성 분자표식자를 개발하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 필요성

1) 콩의 생육기간중에 다양한 종류의 병이 발생하는데, 특히 불마름병원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)에 의한 세균병(bacterial pustule)은 전세계적으로 발생하고 있으며, 심하게 발생되면 콩의 수량구성요소중 협당립수 및 백립중을 감소시켜 7~15%의 수확량 감소를 가져올 수 있다(Laviolette et al., 1970; Hartwig and Johnson, 1953). 특히 우리나라에서 널리 재배되고 있는 황금콩과 장엽콩 뿐만 아니라, 최근 장려품종으로 지정된 진품콩, 검정콩 1호, 무한콩, 태광콩, 보광콩 등 공시된 거의 모든 품종에서 감염되는 것으로 조사되어(이, 1999), 향후 불마름병에 저항성이 높은 콩 유전자원의 탐색 및 품종육성이 시급하다. 국내에서 다양하게 균계가 분화된 불마름병에 대한 저항성 콩 계통육성은 여러 종의 균계 저항성을 다수 보유한 유전자원간 교배방법이 필수조건이다. 그러나, 다양한 균계에 대한 각각의 저항성 유전양식 구명은 교배에 의한 수 개의 분리집단 양성 및 후대검정에 의한 allelism test등이 전제되어야 하기 때문에, 기주저항성 검정을 효율적으로 할 수 있는 선발체계를 개발해야한다. 최근 DNA 마커 개발이 진전됨에 따라, 이와 같이 다수의 저항성유전자를 보유하는 계통의 선발이 동시에 대단위로 가능하게 되었다.

2) 현재 국내에서 불마름병을 방제하기 위하여 몇가지 항생물질과 동수화제 등이 방제효과가 있는 것으로 알려져 있으나 그 효과가 거의 미미하여 실용적이지 못한 것으로 알려져 있다. 따라서, 불마름병에 대한 저항성이 높은 품종을 개발하여 재배하는 것이 경제적으로 피해를 최소화할 것으로 기대된다.

3) 불마름병 내병성 콩품종 조기육성에 의한 우수한 식용콩의 생산공급으로 외국산콩 수입억제와 우리콩 보급을 확대하여 콩 생산기반 붕괴를 방지할 수 있다.

나. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1) 최근 콩 불마름병이 전국적으로 확산되고 있는 실정이며, 전국 조사지역의 90%가 감염되는 것으로 나타나, 그 피해는 심각하나(이, 1999), 콩 불마름병 저항성계통 육성에 관한 연구는 미미한 실정이다. 한편 국외 및 국내에서 수집된 콩 불마름병 병원균주 6계통에 대한 예비실험에서(허, 1999), 콩 17개 계통 및 품종에 적용한 결과 병원균계에 따른 콩 계통간 저항성 반응의 차이가 있었다.

2) 콩 불마름병은 미국의 남부 및 중서부에서 광범위하게 발생하는 병으로 알려져 있다(Bernard and Weiss, 1973). 유전자 *rxp*를 보유하고 있는 콩 계통은 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*에 저항성을 나타내며, 자연포장에서 재배할 경우에도 콩 불마름병

에 감염이 잘되지 않는다. 특히 미국의 콩 CNS가 콩 불마름병 저항성유전자를 보유하고 있으며, 이 콩 계통이 미국의 남부지방 및 미국 중서부의 남부와 중앙지방에서 재배되는 장려품종들의 저항성원으로 이용되었다(황등, 1998). 최근 DNA 마커를 이용한 유전자지도 를 이용하여 거의 모든 주요 병해에 관련된 유전자의 염색체상 위치가 확인되었다. Bacterial blight(*rpg*), frog-eye leaf spot(*rsc*), downey mildew(*rpm*), powdery mildew(*rmd*), phytophthora rot(*rps*), soybean rust(*rpp*), soybean mosaic virus(*rsv*), peanut mottle virus(*rpv*), cyst nematode(*rhg*) 등 거의 모든 유전분석등이 광범위하게 이루어지고 있다.

3) 내병성 콩 계통 선발시 특수계통의 병원균주 분리, 접종 및 감염정도를 판단하기 위한 고도의 정밀기술이 필요하기 때문에 식물병리학자와의 협동연구가 선결되어야 한다. 동시에 식물유전자가 콩 불마름병 저항성과 연관된 마커의 개발을 위한 식물분자유전학자와 다른 여러 식물병과 관련된 연구로부터 알려진 식물병 저항성에 관련된 후보유전자의 탐색에 의한 마커 개발을 위한 식물분자생물학자의 도움으로 내병성 계통 선발을 위한 molecular 마커 개발이 필요하다. 이와 같이 개발된 마커들은 유전자지도 작성을 하지 않고, 직접 분리세대에서 선발하는데 이용함으로써, 내병성 저항계통을 효율적으로 선발할 수 있다. 또한 내병성 계통의 선발이 단기간 내에 이루어져야 하므로, 현재 선진국이 쓰는 방법을 도입하여 우리나라 고유의 기타 다른 육종목표의 변화에도 신속하게 대처해야만 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

가. 콩 유전자원의 불마름병 저항성 평가

콩 불마름병 생리적 균계분화 및 발병기작 연구'의 실험결과(농과원 허성기)에 의거하여 선발된 주요 균계에 대한 저항성을 각국의 우수한 계통, 새롭게 육성된 계통 및 야생콩을 대상으로 종합적으로 수집하여 평가한다. 동시에, 지금까지 많은 작물에서 보고된 바에 의하면 동일한 병원균계에 대한 검정결과가 지역간, 연차간 변이에 의한 상이한 결과가 나오는데 이는 안정적인 검정방법이 확립되어 있지 않기 때문에 정확하게 분리된 불마름병 균주에 대한 효과적이고 반복성이 뛰어난 검정체계를 확립한다.

나. 불마름병 저항성 유전연구

콩 불마름병에 저항성인 계통을 선발하여 수 개의 교배조합을 작성하고 분리세대에

서 저항성에 관여하는 유전자의 수와 유전양식을 분석하며, 각각의 유전양식에 적합한 육종방법을 결정하는 자료로 이용한다.

다. 불마름병 저항성 유전자와 연관된 분자표지 개발

'99년도 하계기간중 F₂ 종자를 확보한 다음 태국의 Kasetsart 대학교의 Dr. Peerasak Srinives에 송부하여 '99/2000 동계기간 및 2000 하계기간에 SSD(single seed decent)에 의한 세대를 진전(연간 자연포장 상태에서 3-4 세대 촉진가능)시켜 RIL(recombinant inbred line)으로 이루어진 mapping을 위한 집단(조합당 100여 계통으로 구성)을 만든다. 세대진전 기간중 SSR 마커를 이용한 모본간의 DNA 다형현상(polymorphism)을 조사한다, 2001년(동계)에 fluorescencce-labelled primer set와 automatic DNA sequencer를 이용한 유전자 지도를 제작하고 동시에 각각의 계통에 대한 불마름병 저항성을 조사하여, 2002년에 여러 종류의 균계에 대한 저항성 유전자와 밀접하게 연관된 표지인자를 탐색하여 내병성 계통의 선발에 이용한다.

라. 불마름병 저항성 콩 계통의 육성

SSD에 의하여 세대가 진전된 후기세대의 집단(조합당 500 계통이상)으로부터 이미 탐색된 DNA 표지인자를 이용하여 선발하고, 선발효율을 검정하는 동시에 다양한 균계에 대한 저항성을 육성한다. 선발방법은 유전자지도에서 탐색된 마커와 제 2 세부과제에서 개발된 콩 불마름병 특이적 저항성 유전자 마커와 협동과제에서 개발된 후보유전자 마커를 이용하여 간접선발을 한다.

마. 콩 불마름병균의 수집 및 분리

전국에서 불마름병에 걸린 콩잎을 수집하여 병원균을 분리한 뒤 동정한다. 모든 시료들은 지역별, 품종별로 분리·보존하며, 각각의 분리된 병원균들은 Biolog와 fatty acid test등을 통하여 정확한 동정을 한다. 각각의 동정된 병원균들은 다시 비기주 식물에 접종하여 과민반응을 검정하거나 직접 기주에 접종하여 병원성을 확인한다. 비기주 식물을 이용한 간이 병원성 검정방법은 최근 널리 인정되는 방법으로, 병원성을 가진 세균만이 비기주 식물에서 대표적 저항성 기작인 과민반응을 유도하여 접종 부위에 식물세포의 괴사를 일으키는 현상을 이용한다.

바. 콩 불마름병균의 균계 분화형 조사 및 균계형지표 작성

현재 콩 불마름병균의 균계분화는 거의 알려져 있지 않았다. 특히 균계형은 그 나라 또는 지역마다 다를 수가 있으므로 지역이나 품종에 맞춰 조사를 하여야 한다. 우리나라에서 널리 사용하는 콩 품종의 유전적 모본을 중심으로 품종을 선택하고 또한 동시에 외국의 균계 분화 연구시 사용한 품종을 비교품종으로 같이 사용하여 균계분화형을 조사할 것이다.

2. 제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

가. 콩 불마름병 저항성관련 콩 유전자의 분리

식물체의 기주 특이적 병의 발생은 병원균과 기주식물의 상호적 신호전달체계를 가지고 있으며 저항성 식물은 이러한 병의 신호전달에 의해 신속히 발현되어 병의 침입과 동시에 저항성 유전자를 발현시켜 병에 감염된 식물세포를 죽이거나 병의 침입 또는 증식을 억제하는 물질을 만들게 된다. 현재 식물의 이러한 신호전달에 관한 많은 연구가 보고되고 있으며 콩 이외의 식물에서 저항성 계통으로부터 이미 분리되어 보고된 유전자들 또한 다수가 있다. 따라서 불마름병에 저항성을 보이는 콩 품종에서 기존의 분자생물학적 분리 방법을 이용하여 콩의 불마름병 저항성 유전자들의 염기서열과 기존의 다른 식물에서 분리된 저항성 유전자들과의 유사성을 비교하고 병 감염시 그 유전자들의 발현특성을 조사한다. 본 연구진의 예비실험 결과에 의하면 공시한 우리나라 콩 품종 중 단백콩과 SS2-2에서 불마름병 균계에 대하여 복합저항성을 나타내고 그와 반대로 장엽콩과 수원 157호는 모든 균계에 대하여 감수성을 나타낸다. 따라서 이들 두 품종들의 병에 대한 차이를 병저항성 유전자 발현의 차이로 볼 수 있다. 연구 방법은 무균상에서 키운 저항성 두두 품종과 감수성 두 품종들을 이용, V2 생육 시기에 제 4 세부과제로부터 분양받은 균계를 접종한다. 대조구로 접종시키지 않은 것과 접종 후 24, 48 그리고 72 시간 후의 식물 잎들을 수확하여 분자생물학적인 방법으로 식물 잎에서 total RNA를 추출하여 DDRT-PCR(differential display reverse transcription-PCR)과 Clontech(주)에서 판매되는 SSH(suppression subtraction hybridization) kit으로 병의 감염에 의해 신속하고 새롭게 발현되는 유전자들을 분리하여 pGem-T vector(Promega)에 subcloning하여 northern blot으로 재확인한다. Subcloning된 DNA fragment들을 자동염기서열 분석장치(ABI automatic sequencer)를 이용, sequencing하여 염기서열을 확인한 뒤 GenBank내의 다른 식물에서 이미 분리된 병저항성 유전자와의 유사성 탐색 및 5'-RACE (5'-randomly amplified cDNA ends)방법을 이용, full-length cDNA를 분리해낸다.

나. 콩에서 분리된 저항성 유전자들의 기능검정

분리된 콩의 불마름병 저항성 유전자들의 기능을 확인하기 위하여 형질전환이 매우 쉬운 담배나 아기장대(*Arabidopsis*)에 콩 특이적 저항성관련 유전자들을 *Agrobacterium*을 통해 주입하여 세균에 대한 병저항성 검정을 실시한다. 방법으로는 분리한 full-length cDNA의 염기서열을 확인한 후 pBI transformation vector를 이용, CaMV35S::coding sequence로 제작하여 담배나 아기장대에 콩 저항성 유전자를 도입시키어 감수성인 담배나 아기장대가 저항성으로 형질전환이 되는 지를 검정하여 검증된 유전자는 특허 등으로 보호하여 차후 우리 농업발전을 위한 유전자 재산으로 보유하고자 한다.

다. 콩 불마름병 저항성 유전자를 이용한 내병성 육종의 유전자 마커 개발

위에서 분리하고 검증된 불마름병 저항성 콩 유전자들의 염색체상의 위치와 내병성 유전자간의 연관정도를 RFLP 방법을 이용하여 연관이 높은 유전자를 찾아 마커로서의 이용을 조사한다. 이는 제 1 세부과제에서 사용하는 분리집단의 두 양친의 genomic DNA에서 각각의 분리된 저항성 유전자에 대하여 polymorphism을 보이는 제한효소를 찾아 분리집단에서 RFLP mapping을 실시하여 연관정도를 알아낸다. 98% 이상의 정확도를 갖는 마커를 불마름병 저항성 육종의 유전자 마커로서 이용한다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

가. 병 저항성 관련 유사 유전자를 이용한 분자표지 개발

진균, 세균 바이러스 병해에 대한 식물의 저항성 유전자 구조를 분석하고 공통적 서열을 이용하여 유전자 단편을 cloning하고 분자적 특성을 조사한다. 저항성유전자 유사체의 발현 양상을 저항성과 이병성 품종에서 비교 분석하여 저항성유전자 유사체의 불마름병 저항성과의 관련성을 조사한다. 불마름병 저항성과 저항성유전자 발현 양상이 유의한 관계에 있는 저항성유전자 유사체를 선발하여 불마름병 저항성과의 연관도를 조사한다.

나. 세균 및 진균병 저항성관련 유전자의 발현 양상 비교를 통한 분리 분자표지 개발

진균 및 세균 병저항성 유전자 또는 EST clone을 확보하여 유전자의 발현 양상을 저항성과 이병성 품종에서 비교 분석하여 유전자의 불마름병 저항성과의 관련성을 조사한다. 불마름병 저항성과 유전자 발현 양상이 유의한 관계에 있는 유전자를 선발하고 불마름병 저항성 분리집단을 이용하여 선발된 유전자와 저항성과의 연관도를 조사한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

가. 콩 불마름병 유전자 탐색을 위한 분자유전자지도 제작

1) 수원157 X 단백콩 집단의 유전자 지도 제작을 위하여 20개 연관군 가운데 158개의 SSR마아커를 선정하여 모부분간 DNA변이를 조사하였으며, 그 가운데 모부분간 polymorphism을 보이는 것은 93종으로서 전체적으로 59%를 나타내었다.

2) 모부분간(수원157, 단백콩) polymorphism이 보이고 있는 93종의 SSR marker를 이용하여 79개의 SSR marker의 유전자형을 결정하였다.

3) 유전자형 분리조사 자료를 MAPMAKER 3.0 프로그램을 이용하여 유전자지도를 제작한 결과, 69개의 마아커가 18개의 연관군으로 분류되었으며, 두 marker간의 간격은 13.0cM으로 세밀한 유전자 지도를 제작하였다. 7개의 MARKER로 구성된 LGD2는 85.5cM, 8개의 marker로 구성된 LGH는 134.4cM이었다. 그리고, Satt426등 10개의 SSR marker는 연관되어 있지 않았다.

나. 콩 불마름병 저항성 유전 분석

1) 콩불마름병에 감수성인 수원157호와 저항성인 단백콩간의 교배를 통해 얻어진 369개체의 F2 집단을 온실에서 파종하여 콩 개체간의 DNA를 추출한 후 콩 불마름병 병원균주 OCS-F 계통을 가지고 저항성 반응의 차이를 조사하였다. OCS-F 콩 불마름병 병원균에 대한 F2개체간의 병반응 조사결과는 정규분포곡선을 그리고 있으며, hetero의 평균값이 모본인 수원157호에 가까운 것으로 보아 감수성 유전자가 우성이며 저항성 유전자가 열성임을 알 수 있었으며, 유전적 분리 데이터와 병반응 데이터를 SAS를 이용한 single anova factor anova 분석결과 Satt372마커가 OCS-F 콩 불마름병 저항성에 15%의 높은 상관관계를 가지고 있음이 확인되었다.

2) 온실에서 모부분과 RILs에 콩불마름병 병원균주 6계통을 각각 접종하였을 때, 각 균주에서 모부분간 BLP resistance score가 다양하게 나타났다. 수원157(BLP-susceptible)과 단백콩(BLP-resistance)에서 8ra에 대해서는 1.3과 1.8, LMG7403에 대해서는 4.2과 2.3의 score를 보여주고 있다. 이러한 결과를 볼 때 RIL 계통에서의 pathogenic variability of X. axonopodis를 예상할 수 있고, 또한 그 다양성을 확인할 수 있었다.

3) RILs계통들에 대한 불마름병 균계별 저항성 조사와 SSR마커들의 분리비 자료를 이용하여 SAS를 이용한 Single factor anova 분석을 한 결과 각 균계별로 연관군 D2에서 가장 높은 상관관계를 가지며 ocsF군에서는 LGD2인 Satt372마아커에서 43.5%의 상관값을

가지고 있었다.

4) LG(linkage group) D2/R에 속하는 Satt372 locus는 콩불마름병 병원균주 6계통 모 두에 반응을 하고 있다. 또한 LMG7403에서는 18%, OCS-F에 대해서는 43%의 수치를 보이고 있다. 이는 Satt372가 BLP resistance에 대한 QTL에 밀접하게 연관되어 있다는 것을 보여준다.

5) PI96188은 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (8ra)에 대하여 다른 품종과는 확연히 다른 반응(novel response)를 보인다. 이것은 병의 침입에 대한 과민 반응의 일종으로 보이면서 이 과민 반응도 식물의 자기 방어반응 중 하나로 생각되어 지고 있다. 그리고 이 과민 반응을 일으키는 유전자는 기존의 불마름병에 대해서 저항성을 일으키는 기작과는 다르므로 기존의 불마름병저항성등이 더 이상 이용할 수 없을 때 대안으로 이용되어 질 수 있을 것이라 생각되어진다. 하지만 아직은 마커로 사용되어지기에는 거리가 너무 멀리 떨어져 있으므로 더 근접한 마커를 찾는 것이 중요하겠다.

다. 주요 콩 유전자원의 불마름병원 균계별 저항성 조사

1) 콩불마름병균의 유전적 다양성을 조사하기 위하여, 본 과제 수행기간 매년 우리나라 전역에서 콩불마름병 시료를 채취, 병원균을 분리, 동정하였다. 또한 품종과 병원균 분화형과의 차이점을 알기 위하여 연구소 또는 시험장 단위의 포장에서 자연 발생한 이병시료를 채취, 병원균을 분리 동정하였다.

2) 병원균이 가지는 *avrBS3* 상동 유전자 profile과 분리된 품종간의 유의성을 알아보았다. 결과, 품종간에 *avrBS3* 상동 유전자 즉, 비병원성 유전자 profile은 차이가 많았으나 같은 품종에서도 유전자 profile이 다른 균들이 분리되어 품종과 유전자 profile 간의 유의적 관계는 발견하지 못하였다.

3) 몇몇 품종에서는 콩각지 및 줄기에서도 병징을 발견, 균을 분리 할 수 있었다 (그림 5). 콩각지, 줄기 와 잎에서 각각 분리된 균들의 비병원성 유전자 profile을 비교 한 결과 같은 조직에서도 각기 다른 유전자 profile이 발견되어 조직에 대한 비병원성 유전자의 특이성은 발견되지 않았다.

4) 우리나라 전역에서, 또 각기 다른 품종에서 수집된 155종의 콩불마름병균의 비병원성 유전자 profile을 분석한 결과 6개의 group으로 나눌 수 있었다.

5) 각각의 group에서 대표균주를 선발하여 우리나라에서 수집한 몇몇 콩 품종에 접종한 뒤 그 병원성을 검정하였다. 국내 육성 품종들에 대하여 field에서 이병 정도를 조사하였다. 그 결과 푸른콩, 단백콩 등은 포장에서 저항성을 보였다.

6) 콩불마름병균의 비병원성 유전자의 기능을 알아보기 위하여 상동성을 보이는 *avrBS3* 유전자를 mutation 시킨 뒤 비병원성 유전자의 기능을 knock out 시키기로 하였

다. 결과 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* sdl1018 strain에서 한 band가 mutation되며 저항성 반응이 감수성으로 변함을 확인하였다.

7) 콩 불마름병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)의 chromosomal gene을 *avrBS3* gene과 southern blotting을 통하여 상동성을 조사한 바, 고추반점병원세균인 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 유전자인 *avrBS3* 유전자와의 상동성이 매우 높아 그 상동성을 이용하여 콩 불마름병균의 비병원성 유전자를 탐색하였다.

2. 제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

가. 신평달 2호와 SS2-2를 근류균 처리군과 무처리군으로 나눠 본엽 3엽기때 sampling 하였다.

나. 신평달 2호와 SS2-2에서 mRNA를 추출하여 SSH 방법에 의해 screening 하였다.

다. 77개의 SS2-2 specific clone들을 찾아 plasmid에서 insert를 확인했다.

라. 이들 DNA를 probe로 만들어 ³²P로 Northern Blot으로 재확인 했다.

마. 그 결과 vsp A, B gene의 발현이 많았고 이와 관련하여 vsp B promoter binding gene 과 transcript factor 들을 찾을 수 있었다. vsp gene의 일별 발현량을 조사한 결과 SS2-2에서 더 오래 지속됨을 알 수 있었다.

바. gene 동정 결과 SS2-2 특이적인 JA dependent defence gene(vsp gene)을 찾았고 SA dependent defence gene(PR 1a)도 찾았으나 신평달 2호에서 더 특이적인 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 SS2-2의 저항성은 Jasmonate와 연관이 있을 것으로 보이며 salicylic acid와의 상호작용이 예상되어 각 개체에 SA와 JA를 각각 100uM씩 처리하여 시간대별로 gene의 발현 정도를 판단코자 실험 중에 있으며 병원균 침입에 급속도로 JA level이 증가함에 따라 SAR(systemic acquired resistance)도 판단이 가능하리라 본다. 또한 병원균이 침입을 하게 되면 JA production이 증가하는 것이 아니라 JA sensitivity가 증가한다는 보고에 따라 실험에서 찾은 Homeodomain leucine zipper protein의 JA response domain의 affinity가 높아지는 것이 아닌가 추측해본다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

가. 병 저항성 관련 유사 유전자를 이용한 분자표지 개발

1) 진균, 세균 바이러스 병해에 대한 식물의 저항성 유전자 구조를 분석하여 공통적 서열 부분의 서열을 이용하여 콩의 병해저항성유전자 유사체인 pSRGA3, 4, 5, 6, 7, 8 등 6종의 병해저항성 유전자 유사체를 익산나물콩으로부터 분리하였다. 이들 병해저항성 유전자 유사체의 염기서열은 GenBank에 등록된 염기서열 중 콩과 완두의 병해 저항성 단백질

상동 유전자의 부분 염기서열과 각각 82-96%의 높은 상동성을 나타내었다.

2) 감수성과 저항성 품종조합인 수원 157과 단백콩에 불마름병균 (*X. campestris* pv. *glycines* 8ra)을 접종하여 병해저항성 유전자 유사체의 발현 양상을 비교하였다. 병해저항성 유전자 유사체의 발현은 감수성과 이병성 품종에서 극히 낮았으며 불마름병균에 의해 발현이 유도되지 않았다.

3) 감수성과 저항성 품종조합인 수원 157 과 단백콩, 장엽콩과 SS2-2 등 2조합에 대한 생물적(yeast extract) 및 비생물적(paraquat, H₂O₂, 상처, UV) 스트레스와 호르몬(ABA, SA, ethylene) 처리 하에서 이들 병해저항성 유전자 유사체의 발현 양상을 비교 분석하였는데 병해저항성 유전자 유사체의 발현은 어느 품종, 어느 처리조건에 의해서도 유도되지 않았다.

나. 세균 및 진균병 저항성관련 유전자의 발현 양상 비교를 통한 분자표지 개발

1) 병해 저항성 유도물질인 phytoalexin의 생합성에 관련된 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)와 chalcone synthase (CS), isoflavone synthase (IFS)를 단백콩으로부터 분리하였다. 또한 진균과 세균병 저항성 관련 유전자인 PR-a, peroxidase (Per), SAM 등의 유전자를 분양 또는 분리하여 확보하였다.

2) 감수성과 저항성 품종조합인 수원 157과 단백콩에 불마름병균 (*X. campestris* pv. *glycines* 8ra)을 접종하여 병저항성관련 유전자 발현 양상을 비교하였다. 병저항성관련 유전자의 발현은 불마름병균에 의하여 유도되었으나 저항성 품종과 이병성 품종에서의 발현 정도에 일반적으로 유사하였다.

3) 이들 병 저항성관련 유전자의 발현 양상을 감수성과 저항성 품종조합인 수원 157 과 단백콩, 장엽콩과 SS2-2, 진주1호와 PI96188 등 3조합에 대한 생물적(yeast extract) 및 비생물적(paraquat, H₂O₂, 상처, UV) 스트레스와 호르몬(ABA, SA, ethylene) 처리 하에서 비교 분석하였다. 감수성과 저항성 품종의 이들 병저항성관련 유전자의 발현 양상이 각 처리조건에서 유사하여 이들 유전자의 발현 양상과 불마름병 저항성 사이에는 뚜렷한 연관성이 관찰되지 않았다.

4. 활용에 대한 건의

가. 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

1) 최근 개발된 DNA의 자동염기서열 분석장치와 fluorescence-labelled primer set을 이용함으로써, 1회 전기영동에 의한 10여개 SSR 마커를 동시에 분석하여 식물의 유전자지도 작성을 신속하게 할 수 있는 기술 발달을 꾀할 수 있다.

2) 콩 세대진전을 위한 최적지인 태국(년간 자연상태에서 3-4세대 진전 가능)

Kasetschart 대학교의 Prof. Peerasak Srinives의 협조로 향후 주요 콩 집단의 SSD에 의한 세대축진의 영속성을 확보함으로써 기타 육종 목표의 변화에 대처하여 우수한 품종을 조기에 육성이 가능하다.

3) 여러 가지 다양한 관계가 분화되고 있는 우리나라의 상황에서, 기존 육종방법으로 다양한 관계에 저항성을 나타내는 내병성 계통의 선발은 어렵다. 따라서 콩에서 DNA 마커에 의한 간접선발로 육종효율을 향상시킬 수 있는 기술을 도입할 필요가 있다.

나. 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

콩불마름병 저항성 유전자의 동정 결과 Jasmonic acid와 관련이 있는 것으로 추측됨에 따라 콩에서 Jasmonic dependent defence gene을 찾아 확인하여 그 mechanism을 분석할 필요가 있다. 그리고 defence pathway에는 salicylic acid, jasmonic acid, ethylene 이 각기 상호작용하며 일부분에서는 억제 작용을 일으키므로 콩에서 작용들을 분석할 필요가 있겠다. 본 실험 결과에 따라 Jasmonate defence pathway를 중심으로 단계별로 작용하는 세부적인 factor들과 signal molecule에 대한 연구가 더 수행되어야 할 것이다.

다. 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

병해저항성 유전자 유사체와 병저항성관련 유전자의 발현과 불마름병 저항성간에는 뚜렷한 상관관계가 발견되지 않았으나 본 연구에서 확보된 이들 유전자들은 복합저항성 콩 품종 육성에 유용유전자 또는 표식자로 개발 소재로 활용이 가능하다.

SUMMARY

Genetic Analysis for Bacterial Leaf Pustule Resistance for Improvement of Soybean Varieties

Bacterial leaf pustule (BLP) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* is one of the most prevalent bacterial diseases in plants. Early symptoms are characterized by small, yellow-to-brown lesions with a raised pustule in the center. The lesions progressively merge to form large necrotic areas, which cause premature defoliation and subsequently a loss of grain yield. The first goal of this research was performed to identify quantitative trait loci (QTL) for resistance to BLP as well as to understand the resistance of soybean genotypes to different BLP isolates. Also, candidate gene analysis and differential display between resistant and susceptible soybean genotypes was performed to develop BLP-specific DNA markers.

1. Genetic Analysis for Bacterial Leaf Pustule Resistance for Improvement of Soybean Varieties

Quantitative trait loci (QTLs) for resistance to BLP in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) were identified using simple sequence repeat (SSR) markers, and the consistency of QTL detection across bacterial isolates as well as across greenhouse and field experiments were examined. Recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross of BLP-susceptible 'Suwon157' and BLP-resistant 'Danbaekkong' were utilized to identify QTL conditioning the resistance to BLP with 76 SSR markers. For phenotypic analysis, six isolates of *X. axonopodis* were collected from different geographic origins (ocsF, ocsG and sd12178 from Korea, 8ra from USA, LMG7403 from Zambia, and LMG7404 from Zimbabwe). A combination of single-factor analysis of variance and multiple regression analysis revealed that three QTLs conditioned resistance to BLP in the field. Under greenhouse condition, one to four QTLs were revealed to be associated with resistance to each isolate. Satt372 on linkage group (LG) D2 was detected across six isolates under both greenhouse and field conditions, an indication that resistance to BLP was mainly controlled by a single major gene tightly linked to Satt372. Several minor QTLs on LG A1, C1, F, L, and O were also

found depending on the isolates.

seventy-five different soybean cultivars were tested for the response to several different *X.campestris* pv. *glycines* races collected worldwide. Among tested cultivars, one cultivar, *G. max* cv. PI96188 showed very different response to all *X. campestris* pv. *glycines* races. It showed HR-like necrosis without halos but still carried pustules in the back of the necrosis symptom. *Rxp* gene conferring resistance to bacterial pustule was reported to be on linkage group (LG) D2. The gene controlling the novel response in PI96188 was mapped to whether the gene was the same as *Rxp*. An RIL population from a cross of PI96188 and Jinju 1 was constructed. Five markers on LG D2 were not associated with novel response in PI96188, indicating that the gene controlling this specific response was different from *Rxp*. Further mapping study revealed that Sat_108 on LG O was identified as being associated with novel response in PI96188.

2. Molecular Genetic Analysis of Bacterial Pustule Disease Resistance in Hypernodulating Soybean Mutant

One of the most important diseases of soybean in Korea is bacteria pustule, which is caused by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*.

SS2-2, hypernodulating soybean mutant, was isolated from Sinpaldal 2 treated with ethyl methanesulfonate (EMS) (Ha B.K. 2002). SS2-2 has more nodules than the wild type (Sinpaldal 2) and is resistant to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, whereas the wild type is susceptible. The experiment was performed to analyze the resistance genes. First, specific expressed genes were selected through Suppression Subtractive Hybridization (SSH) of Sinpaldal 2 and SS2-2. 77 specific genes in SS2-2 were selected.

To identify the genes, Northern blot was done with probes. This result showed that Vegetative Storage Protein (*vsp A*, *vsp B*), Homeodomain Leucine Zipper Protein, Glycine max repressor protein (*Dr1*), cytochrome P450 like_TBP and *A.thaliana* putative RING Zinc Finger Protein were SS2-2 specific and Glycine max PR1a precursor (*PR1a*) was Sinpaldal 2 specific. The expression of *vsp A* and *vsp B* genes, plant defence genes, was activated by jasmonic acid (JA). Homeodomain Leucine Zipper Protein has four DNA-binding sites of the soybean *vsp B* promoter: one in the JA response domain, two in the phosphate response domain, and one binding site in the sugar response domain (Zhijun Tang et al). cytochrome P450 is induced by SA and

detoxify allelochemicals in response to plant defence (Li X et al). In addition, *Dr1* and Ring Zinc Finger Protein have a role for transcription factor.

However, *PR1a* is responsive for Salicylic acid (SA) and is Sinpaldal 2 specific expression gene. Therefore the resistance of hypernodulating mutant soybean is related to JA defense pathway and may be induced by Rhizobacteria. After pathogen infection, JA induces the defence genes and suppresses SA-dependent defence gene.

3. Search for Molecular Markers for Bacterial Leaf Pustule Resistance through the Analysis of Disease resistance and Pathogenesis-Related Genes

Recent infestation of bacterial leaf pustule in Korea has recalled need for serious research efforts for the development of resistant variety. Molecular markers can aid conventional breeding programs for better returns from their efforts. However, lack of basic information on the mechanism of resistance to bacterial leaf pustule and any markers confers research priority on the development of efficient molecular markers. To develop molecular markers linked to pustule resistance, we took an approach to take advantage of molecular information on general and specific disease resistance in plants. We cloned and examined expression patterns of disease resistance gene analogues sharing structural features in common with disease resistance genes and some well known pathogenesis-related genes in soybean varieties showing susceptibility or resistance to pustule.

Six resistance gene (R gene) analogues, pSRGA 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, were cloned from Iksannamul-kong. Their sequences shared 82 to 96% similarity with those reported from soybean and pea. Expression of R gene analogues was examined in the susceptible (Suwon 157) and resistant (Danbaek-kong) varieties. R gene expression was nil or very low, and was not induced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (*8ra*) in both varieties. R gene expression was not induced by biotic (yeast extract), abiotic (paraquat, H₂O₂, wounding, UV) stresses or phytohormone (ABA, SA, ethylene) treatments in the three sets of resistant (Danbaek-kong, SS2-2, PI96188) and susceptible (Suwon 157, Jangyeop-kong, Jinju 1) varieties tested, indicating no involvement of R gene analogues in pustule resistance in soybean.

Expression of pathogenesis-related genes (PR-a, peroxidase, SAM; PR genes) and genes involved in phytoalexin production (phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CS), isoflavone synthase (IFS); PP genes) were compared in the three sets of resistant (Danbaek-kong, SS-2, PI96188) and susceptible (Suwon 157,

Jangyeop-kong, Jinju 1) varieties under biotic (yeast extract), abiotic (paraquat, H₂O₂, wounding, UV) stresses or phytohormone (ABA, SA, ethylene) treatment conditions. PR and PP gene expression was induced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (8ra) in the resistant and susceptible varieties, but with little difference in their expression patterns. Differential induction of these genes by the treatments was observed, but the patterns were little different in the three sets of resistant and susceptible varieties tested, indicating little relationship between these gene expression and resistance to pustule. The results indicate the existence of specific mechanism for pustule resistance and genes related to general disease resistance may play a minor role in pustule resistance in soybean.

CONTENTS

Ch.1.	Introduction -----	21
	Sec.1 Subject of research -----	21
	Sec.2 Necessary of research -----	21
Ch2.	Situation of international technology development -----	23
	Sec.1 Situation of international technology development -----	23
	Sec.2 Further vision -----	25
	Sec.3 Reasonability of technology introduction -----	26
Ch3.	Contents and Results -----	27
	Sec.1 Methods and Plan -----	27
	Sec.2 Forward system of research development -----	28
	Sec.3 Contents -----	29
	Sec.4 Results -----	33
	1. Subtitle1 : Genetic Analysis for Bacterial Leaf Pustule	
	Resistance for Improvement of Soybean Varieties -----	33
	A. Construction of genetic linkage map for identification of Bacterial	
	Leaf Pustule Resistance gene -----	33
	B. Genetic analysis for Bacterial Leaf Pustule Resistance -----	39
	C. Resistance survey of Bacterial Leaf Pustule races for major genetic	
	resources in soybean -----	46
	2. Subtitle2 : Molecular Genetic Analysis of Bacterial Pustule Disease	
	Resistance in Hypernodulating Soybean Mutant -----	55
	A. Introduction -----	55
	B. Materials and Methods -----	55
	C. Results -----	55
	1) Differential Screening by SSH(Suppression Subtractive	
	Hybridization) -----	55

2) Specific expressed gene sequence analysis -----	58
3) Result of Northern hybridization -----	62
D. Discussion -----	66
3. Subtitle3 : Search for Molecular Markers for Bacterial Leaf Pustule Resistance through the Analysis of Disease resistance and Phathogenesis-Related Genes-----	68
A. Search for molecular markers from disease resistance gene analogues -----	68
B. Search for molecular markers from bacterial and fungal disease resistance- or pathogenesis-related genes -----	74
Ch4. Achievement or contribution for related field -----	84
Ch5. Application plan for the results -----	86
Sec1. Application plan -----	86
Sec2. Further study -----	87
Ch6. Reference -----	88

목 차

제1장	연구개발과제의 개요	21
제1절	연구개발의 목적	21
제2절	연구개발의 필요성	21
제2장	국내외 기술개발 현황	23
제1절	국내·외 관련기술의 현황	23
제2절	앞으로 전망	25
제3절	기술도입의 타당성	26
제3장	연구개발수행 내용 및 결과	27
제1절	연구개발 방법 및 설계	27
제2절	연구개발 추진체계	28
제3절	연구내용	29
제4절	연구결과	33
1.	제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성	33
가.	콩 불마름병 유전자 탐색을 위한 분자유전자지도 제작	33
나.	콩 불마름병 저항성 유전 분석	39
다.	주요 콩 유전자원의 불마름병원 균계별 저항성 조사	46
2.	제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발	55
가.	서론	55
나.	재료 및 방법	55
다.	결과	55
1)	subtraction library 제작 및 differential screening	55
2)	발현 차이를 보이는 유전자의 염기서열 결정 및 분석	58
3)	Northern Blot 결과	62
라.	토의	66
3.	제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발	68

가. 병 저항성 관련 유사 유전자를 이용한 분자표지 개발 -----	68
나. 세균 및 진균병 저항성관련 유전자의 발현 양상 비교를 통한 분자표지 개발 -----	74
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	84
제5장 연구개발결과의 활용계획 -----	86
제1절 활용방안 -----	86
제2절 추가적 연구 -----	87
제6장 참고문헌 -----	88

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

콩의 불마름병을 일으키는 주요 균계들에 대한 복합저항성 및 감수성인 콩 계통을 선발하여, 교배를 통한 분리세대에서 저항성 유전자의 유전양식을 구명하고, 내병성 계통 선발의 효율성을 높이기 위한 분자표지 (molecular marker)를 개발하여, 우수한 콩 장려품종에 이들 유전자를 도입, 집적함으로써 다수의 콩 불마름병 균계에 대한 복합 내병성 계통을 육성하고자 한다. 또한, 우리 나라에서 이용하고 있는 콩 품종에 대한 다양한 균계를 수집, 조사하고 그 균계들의 분화형을 조사한다.

우리나라의 콩 불마름병 균계에 저항성을 나타내는 콩 품종들에서 공통적으로 발현되는 저항성 관련 유전자들을 분리하여 그 유전자들의 내병성 기능을 검정하고 분리한 유전자들 자체가 내병성 계통선발의 효율을 높이는 마커들로서 개발하고자 하며 또한 우리나라 고유의 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 저항성 유전자로서 확립 및 특허등으로 보유하고자 한다.

불마름병에 대한 저항성 기작이 밝혀져 있지 않고 저항성에 연관된 분자 표지도 개발되어 있지 않으므로 진균, 세균 바이러스 병해에 대한 식물의 저항성 유전자 그리고 병저항성관련 유전자의 발현 양상을 저항성 품종과 이병성 품종에서 비교 분석하여 이들 유전자의 불마름병 저항성과의 관련성을 조사하여 불마름병 저항성 분자표식자를 개발한다.

제2절 연구개발의 필요성

1.기술적 측면

콩의 생육기간중에 다양한 종류의 병이 발생하는데, 특히 불마름병원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)에 의한 세균병(bacterial pustule)은 전세계적으로 발생하고 있으며, 심하게 발생되면 콩의 수량구성요소중 협당립수 및 백립중을 감소시켜 7~15%의 수확량 감소를 가져올 수 있다(Laviolette et al., 1970; Hartwig and Johnson, 1953). 콩 불마름병은 1970년대 우리나라에서 7~8월부터 수확기까지 발생하며 4.5%의 병 발생률을 보였으나(이등, 1994), 근래 우리나라 콩재배지에서 불마름병은 전국적으로 확산되고 있는 실정이다. 최근 2개년(1997~1998)에 걸쳐 전국적으로 조사한 바에 의하면 경기, 강원, 충북, 충남, 경북, 전북 등 콩 재배지 106개소 가운데, 약 90%인 94개소가 불마름병에 감염되었다. 특히 심한 발생을 보인 경기도의 수원 및 화성, 강원도의 춘천, 충북의 청

원에서는 재식개체수의 61~78%가 감염된 것으로 알려져 있어, 현재 우리나라의 콩 불마름병에 의한 수량감소는 심각하다(이, 1999). 특히 우리나라에서 널리 재배되고 있는 황금콩과 장엽콩 뿐만 아니라, 최근 장려품종으로 지정된 진품콩, 검정콩 1호, 무한콩, 태광콩, 보광콩 등 공시된 거의 모든 품종에서 감염되는 것으로 조사되어(이, 1999), 향후 불마름병에 저항성이 높은 콩 유전자원의 탐색 및 품종육성이 시급하다.

국내에서 다양하게 균계가 분화된 불마름병에 대한 저항성 콩 계통육성은 여러 종의 균계 저항성을 다수 보유한 유전자원간 교배방법이 필수조건이다. 그러나, 다양한 균계에 대한 각각의 저항성 유전양식 구명은 교배에 의한 수 개의 분리집단양성 및 후대검정에 의한 allelism test 등이 전제되어야 하기 때문에, 기주저항성 검정을 효율적으로 할 수 있는 선발체계를 개발해야한다. 최근 DNA 마커 개발이 진전됨에 따라, 이와 같이 다수의 저항성유전자를 보유하는 계통의 선발이 동시에 대단위로 가능하게 되었다. 본 연구진이 우리나라에서 수집한 5계통의 불마름병 균주와 미국 Iowa주에서 수집된 8ra 균주계통을 공시하여 17개의 콩 품종에 대한 병원성 변이를 온실에서 수행한 예비실험 결과, 각 균주의 병원성이 다양함을 알 수 있었다. 특히 미국에서 불마름병에 강한 콩 품종으로 알려진 CNS도 국내수집의 수종의 불마름병 균주에 대한 감수성으로 판명되어, 향후 국내에서 불마름병에 대한 문제가 점차 확대될 것으로 확실시된다.

2. 경제·산업적 측면

국내에서 콩 재배시 병충해 방제를 위한 농약은 콩나방, 굽벙이, 뿌리혹선충 등 해충 방제용, 종자소독용, 제초용 농약등 일부에 국한되고 있는 실정이며, 병을 방제하기 위한 농약의 개발 및 보급은 상대적으로 미흡하다. 현재 국내에서 불마름병을 방제하기 위하여 몇가지 항생물질과 동수화제 등이 방제효과가 있는 것으로 알려져 있으나 그 효과가 거의 미미하여 실용적이지 못한 것으로 알려져 있다. 따라서, 불마름병에 대한 저항성이 높은 품종을 개발하여 재배하는 것이 경제적으로 피해를 최소화할 것으로 기대된다. 콩 불마름병에 의한 수입대금으로 비교할 경우, 매년 약 100만불에 해당하는 외화가 낭비되고 있는 것으로 예측되고 있다. 따라서 외화유출을 억제하기 위하여 불마름병 저항성 콩 계통을 조기에 개발할 필요가 있다.

3. 사회·문화적 측면

불마름병 내병성 콩품종 조기육성에 의한 우수한 식용콩의 생산공급으로 외국산콩 수입억제와 우리콩 보급을 확대하여 콩 생산기반 붕괴를 방지할 수 있다. 또한 수입콩과 국산콩 차별화로 국민건강 유지에 기여함으로써 소비자에게 우리콩을 인식시킬 필요가 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내·외 관련기술의 현황

1. 국내 연구현황

최근 콩 불마름병이 전국적으로 확산되고 있는 실정이며, 전국 조사지의 90%가 감염 되는 것으로 나타나, 그 피해는 심각하나(이, 1999), 콩 불마름병 저항성계통 육성에 관한 연구는 미미한 실정이다. 본 연구진의 예비실험에 의하면(허, 1999) 국외 및 국내에서 수집된 콩 불마름병 병원균주 6계통을 가지고, 콩 17개 계통 및 품종에 접종한 결과(표 1), 병원균계에 따른 콩 계통간 저항성 반응의 차이가 있었다.

표 1. 미국 및 국내에서 수집된 불마름병균에 대한 콩 품종의 저항성 반응

콩계통 및 품종명	불마름병원 균계					
	미국균주 8ra	국내수집균주 (1997-1998)				
		F	G	980	2178	2179
Pella	+	++	++	+	++	++
Williams 82	±	±	±	±	±	±
Harosoy	-	++	±	±	±	±
Mukden 1	+	+++	+++	++	+	+
Mukden 2	+++	+++	+++	+	++	++
CNS 1	+	++	±	+++	+	++
CNS 2	+	++	++	+	+	+
단백콩	+	+	+	+	+	+
수원 157호	+	+++	+++	+++	+++	+++
김정콩 1호	+++	+++	++	±	+++	+++
태광콩	±	+++	+++	+++	++	+
진품콩 2호	-	+++	+	++	++	+++
푸른콩	-	+	+	+	+	+
신팔달 2호	±	++	++	±	±	++
장엽콩	+++	+++	+++	+++	+++	++
nts 382	-	++	+	+	±	±
SS2-2	-	±	±	-	±	±

(+++; very susceptible, ++; susceptible, +; mid, ±; resistant, -; very resistant)

국내에서 콩바구미 저항성 및 콩 모자이크 바이러스 저항성 콩 육종은 부분적으로 이루어 졌으나, 콩 불마름병 저항성 계통육성을 위한 콩 육종은 전무한 실정으로 향후 불마름병원 균계의 다양한 분화로 강력한 균계가 출현되면 콩의 안정적인 생산에 치명적인

영향을 가져올 것으로 예측하고 있다.

2. 국외 연구현황

콩 불마름병은 미국의 남부 및 중서부에서 광범위하게 발생하는 병으로 알려져 있다 (Bernard and Weiss, 1973). 불마름병에 감염된 초기증세는 잎에 작고 황갈색의 움기된 돌출부위가 생성된다. 심하게 감염될 경우에는 잎이 죽게 되고 그 잎에는 커다란 괴저부위가 생성되어, 잎의 조기낙화 및 수량손실을 가져온다(Weber et al., 1966). 유전자 *rxp*를 보유하고 있는 콩 계통은 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*에 저항성을 나타내며, 자연포장에서 재배할 경우에도 콩 불마름병에 감염이 잘되지 않는다. 특히 미국의 콩 CNS가 콩 불마름병 저항성유전자를 보유하고 있으며, 이 콩 계통이 미국의 남부지방 및 미국 중서부의 남부와 중앙지방에서 재배되는 장려품종들의 저항성원으로 이용되었다(황등, 1998).

Clark 63과 PI-437477B의 교배조합의 F₂ 650여 개체들에 대한 *rxp* 유전자와 동위효소간의 연관조사에 의하면, malate dehydrogenase(*Mdh*) 유전자와 15.18%의 조환가율로 연관 되어 있으며, 이는 고전연관군(CLG) 20에 해당되는 것으로 나타났다(Palmer 등, 1992). 그러나, 최근 세밀화된 콩의 분자유전자지도 발달로 거의 모든 내병성과 관련된 유전자의 위치가 확인된 것과는 달리, *rxp* 유전자는 분자유전자지도의 연관군(MLG)에 의하면, MLG D2 혹은 MLG H에 속하는 것으로 알려져 있어, 아직까지 정확한 염색체상의 *rxp* 유전자의 위치가 밝혀지지 않고 있는 실정이다(Cregan, 1999, personal comm.). 따라서, 콩 불마름병의 정확한 유전자의 위치는 현재까지 확인되지 않고 있다. 최근 DNA 마커를 이용한 유전자지도를 이용하여 거의 모든 주요 병해에 관련된 유전자의 염색체상 위치가 확인되었다. Bacterial blight(*rpg*), frogeye leaf spot(*rsc*), downey mildew(*rpm*), powdery mildew(*rmd*), phytophthora rot(*rps*), soybean rust(*rpp*), soybean mosaic virus(*rsu*), peanut mottle virus(*rpv*), cyst nematode(*rhg*) 등 거의 모든 유전분석등이 광범위하게 이루어지고 있다.

Soybean mosaic virus와 같이 다양하게 분화된 병의 경우, 기존 육종방법에 의하면 복잡한 선발방법 확립 및 유전분석으로 그 과정이 복잡하여 내병성 계통의 선발이 어렵기 때문에 DNA 마커를 이용한 효율적인 선발을 제시하였으며, *rsu1* 유전자를 보유하는 품종을 구분하였다(Yu 등, 1996).

3. 문제점

본 연구과제를 수행할 수 있는 기간은 3년으로 제한되어 있다. 따라서 유전자지도를 제작할 수 있는 mapping 집단의 양성과 DNA 마커를 이용한 선발을 하기 위한 후기세대의 분리집단 생성에는 어려움이 있으나, 자연포장에서 연간 3-4세대 진전시킬 수 있는 태

국의 Kasetschart 대학교의 Prof. Peerasak Srinives의 협력이 약속되어 최소한의 자금으로 본 연구의 문제점을 해결할 수 있다(첨부: e-mail 편지 참조바람).

내병성 콩 계통 선발시 특수계통의 병원균주 분리, 접종 및 감염정도를 판단하기 위한 고도의 정밀기술이 필요하기 때문에 식물병리학자(농과원 허성기, 최성호)와의 협동연구가 선결되어야 한다. 동시에 식물유전자가 콩 불마름병 저항성과 연관된 마커의 개발을 위한 식물분자유전학자(서울대 백남천)와 다른 여러 식물병과 관련된 연구로부터 알려진 식물병 저항성에 관련된 후보유전자의 탐색에 의한 마커 개발을 위한 식물분자생물학자(전북대 윤성중)의 도움으로 내병성 계통 선발을 위한 molecular 마커 개발이 필요하다. 이와 같이 개발된 마커들은 유전자지도 작성을 하지 않고, 직접 분리세대에서 선발하는데 이용함으로써, 내병성 저항계통을 효율적으로 선발할 수 있다.

본 연구의 내병성 계통의 선발은 3년이란 단기간내에 이루어져야 하므로 DNA 표지인자 탐색을 위한 자동염기서열 분석장치의 사용은, 기존 염기서열 장치보다 약 5배 이상 신속한 mapping을 가능하게 하기 때문에 자동염기서열 분석장치의 이용은 필수적이다. 그러나 1회 전기영동때마다 10개의 SSR primer set를 파악할 수 있는 fluorescence-labelled primer 구입을 필요로 한다. 이 primer들은 1 set 당 약 160,000원으로 고가이나, 콩에서 개발된 약 700개 가운데 본 연구에 의하여 매년 150개 씩 구입함으로써(14항 연구개발비 소요명세서의 시약 및 재료비 참조) 현재 선진국이 쓰는 방법을 도입하여, 우리나라 고유의 기타 다른 육종목표의 변화에도 신속하게 대처해야만 한다.

제2절 앞으로 전망

콩의 주요생산국인 미국은 재배되는 콩이 유전적으로 다양하지 않고, 또한 불마름병균의 분화가 단순하여 단지 저항성 콩계통인 CNS 유전자의 도입으로 불마름병에 의한 피해를 방지하였다. 그러나, 미국과는 달리 우리나라는 콩의 원산지로서, 다양한 콩이 재배되고 있어, 이에 따른 다양한 불마름병의 균계가 생리생태적으로 분화될 것이다. 따라서, 최근 우리나라의 거의 모든 장러품종에 불마름병이 감염되었으며, 거의 모든 콩 재배지에 병이 나타나고 있어, 향후 불마름병에 의한 콩의 수확손실은 점차 증대될 것이다.

DNA 마커 개발등으로 유전자지도 작성이 용이해지고, DNA 추출을 위한 자동화(automation) 기술이 점차 발달되고 있다. 본 연구진에서는 형광으로 염색된 primer와 자동 DNA 염기서열 분석기를 이용한 초고속으로 유전자지도를 작성할 수 있는 기술을 개발하고 있으며, 이는 아직까지 국내에서 식물의 유전자지도 작성시 이용되지 못했던 최신기술로서, 본 기술의 개발로 벼 및 기타 타작물의 신속한 유전분석 및 분리집단에서 정확한 선발을 가능하게 할 것이다. 또한 육종초기세대에 DNA marker-assisted breeding이 보편화되어 불마름병원균 다계 저항성 관련 마커 개발에 의한 콩 계통의 육성으로, 품종육성을

위한 귀중한 재료로 이용될 수 있을 것이다.

본 연구진의 실험결과는 식물병리학자, 식물분자유전학자, 식물분자생물학자와 콩 육종가간의 긴밀한 협력으로, 짧은 시간내에 분화하여 병원성이 달라지는 다양한 균계에 신속하게 대처하여 내병성 작물계통을 육성하는 기본모델을 제공할 것이다.

제3절 기술도입의 타당성

최근 marker-assisted selection의 장애는 신속한 유전자 표지가 어려우나, 본 연구진이 개발중에 있는 automatic DNA sequencer를 이용한 microsatellite의 유전자지도를 신기법으로 단시일내에 작성할 수 있어 신품종 육성에 필요한 시간을 단축 할 수 있다.

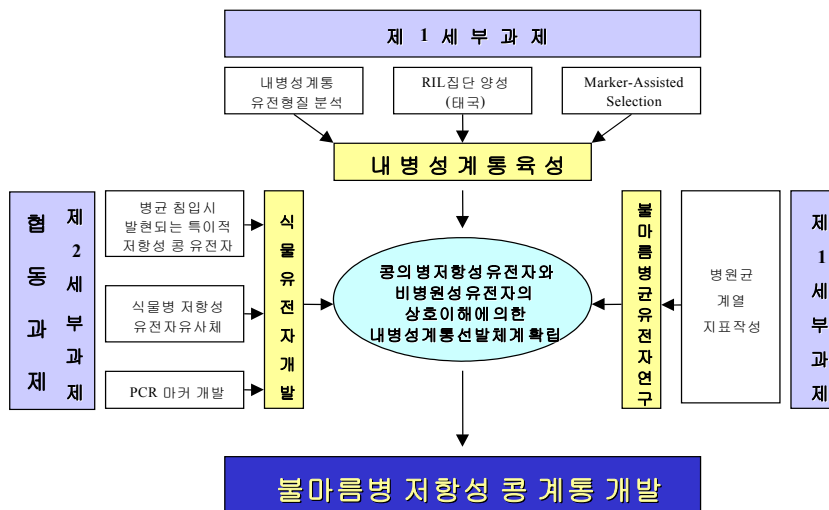
세대단축을 위해서 국내의 경우 동계기간중 온실을 사용하여 2세대까지를 경과시킬 수 있으나 고가의 연료비 등이 요구된다. 태국의 경우 자연포장 상태에서 연간 3-4세대 진전이 가능하여, 본 연구의 일환으로 태국과 협력이 성사될 경우, 기타 세대에 따른 육종목표에 신속하게 대처할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

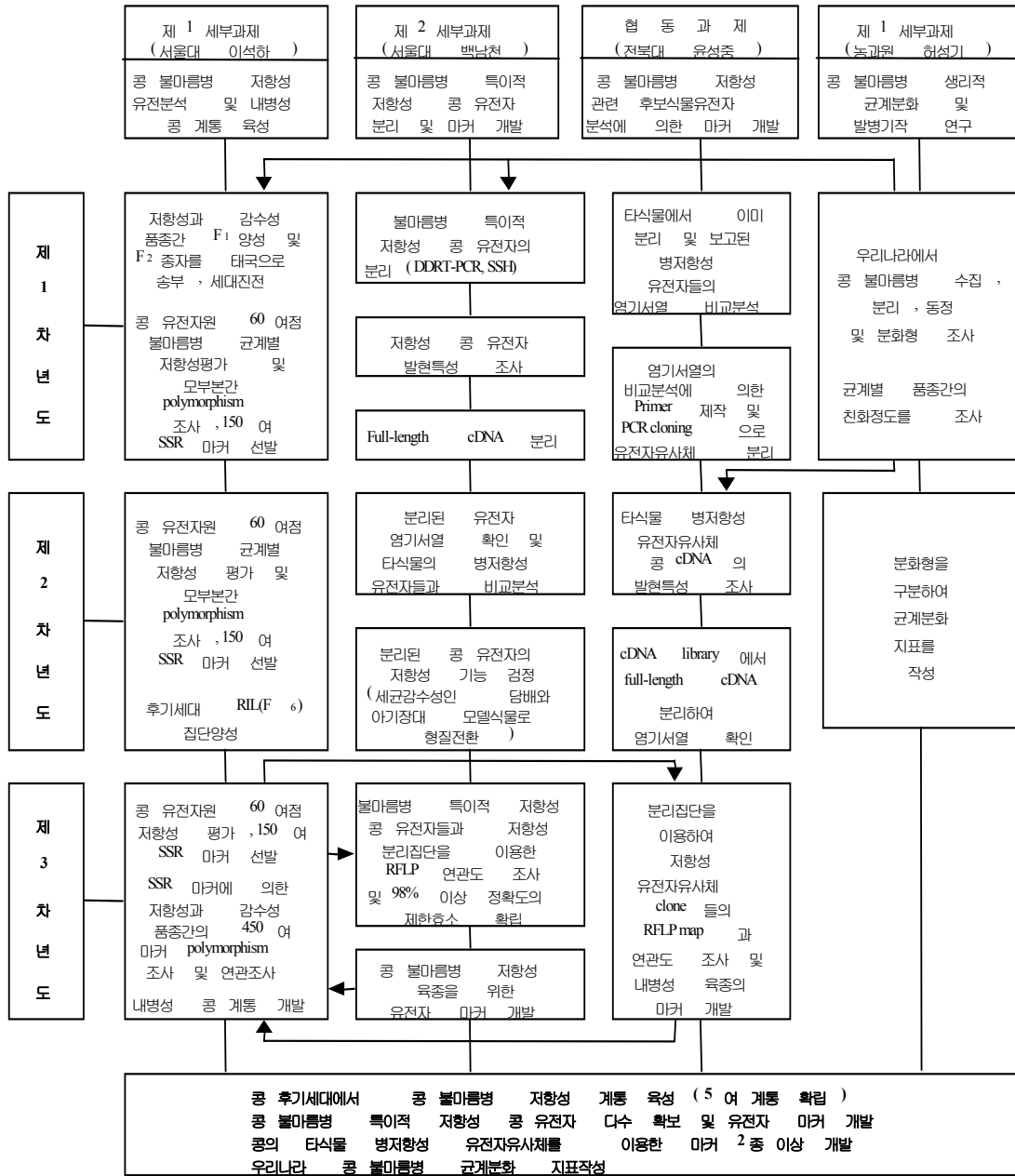
제1절 연구개발 방법 및 설계

내병성 콩 품종의 육성은 기주식물의 병저항성 유전자(resistance gene)와 비병원성 유전자(avirulence gene)간의 상호작용에 대한 정확한 이해를 필요로 한다. 따라서 본 연구의 성공적인 결과를 가져오기 위해서는, 기주식물인 콩의 불마름병 저항성 유전 및 내병성 계통을 선발할수 있는 집단을 양성하는 콩 육종가(서울대 이석하)와 불마름병 균계의 분리, 접종, 병징해석 등을 정확하게 하고 발병기작을 구명할 수 있는 식물병리학자(농업과학기술원 허성기, 최성호)의 협력이 필연적이다. 또한, 여러 가지 균계에 대한 복합저항성을 가진 계통의 선발을 위해서는 DNA 표지인자를 이용하는 것이 가장 효율적이기 때문에, 다른 작물보다 콩에서 더 많이 개발된 SSR 마커를 이용한 유전자지도 제작 및 각각 계통에 대한 여러 가지 균계에 대한 저항성을 조사하여 복합저항성 유전자를 선발할 수 있는 분자표지를 탐색한다. 그러나 여러 균계의 저항성 및 유전자지도를 제작하기 위해서는 F₂ 집단에서 불가능하기 때문에, 태국의 Kasetsart 대학교에서 1999년 동계부터 SSD 방법에 의한 세대진진을 하여 2001년 동계에 RIL 집단을 만들어 국내에서 유전자지도를 작성한다.

분리집단에서 내병성계통을 좀더 정확하고 효율적인 선발을 위해서, 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 마커(서울대 백남천) 및 식물병 저항성관련 후보식물유전자 탐색에 의한 마커(전북대 윤성중)를 개발하여, 콩 불마름병 저항성계통 육성을 위한 분리집단에서 선발(서울대 이석하)시 내병성에 연관된 SSR 마커 뿐만 아니라, 분자생물학자들이 개발한 마커를 이용함으로써 그 선발을 더욱더 정교하게 하여 목적하는 내병성계통을 육성한다.



제2절 연구개발 추진체계



제3절 연구내용

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

가. 콩 유전자원의 불마름병 저항성 평가

콩 불마름병 생리적 균계분화 및 발병기작 연구의 실험결과(농과원 허성기)에 의거하여 선발된 주요 균계에 대한 저항성을 각국의 우수한 계통, 새롭게 육성된 계통 및 야생콩을 대상으로 종합적으로 수집하여 평가한다. 동시에, 지금까지 많은 작물에서 보고된 바에 의하면 동일한 병원균계에 대한 검정결과가 지역간, 연차간 변이에 의한 상이한 결과가 나오는데 이는 안정적인 검정방법이 확립되어 있지 않기 때문에 정확하게 분리된 불마름병 균주에 대한 효과적이고 반복성이 뛰어난 검정체계를 확립한다.

나. 불마름병 저항성 유전연구

콩 불마름병에 저항성인 계통을 선발하여 수 개의 교배조합을 작성하고 분리세대에서 저항성에 관여하는 유전자의 수와 유전양식을 분석하며, 각각의 유전양식에 적합한 육종방법을 결정하는 자료로 이용한다.

다. 불마름병 저항성 유전자와 연관된 분자표지 개발

본 연구진의 예비실험 결과에 의하면 SS2-2와 단백콩이 거의 모든 균계에 비교적 저항성이고 장엽콩과 수원 157호는 거의 모든 균계에 감수성인 것으로 알려져 있다. 이미 본 연구진은 SS2-2 x 장엽콩, 수원 157호 x 단백콩의 두 조합에 대하여 '98년도 인공교배를 실시하여 현재 F₁종자를 확보하고 있다. 따라서 '99년도 하계기간중 F₂ 종자를 확보한 다음 태국의 Kasetsart 대학교의 Dr. Peerasak Srinives에 송부하여 '99/2000 동계기간 및 2000 하계기간에 SSD(single seed decent)에 의한 세대를 진전(연간 자연포장 상태에서 3-4 세대 촉진가능)시켜 RIL(recombinant inbred line)으로 이루어진 mapping을 위한 집단(조합당 100여 계통으로 구성)을 만든다. 세대진전 기간중 SSR 마커를 이용한 모본간의 DNA 다형현상(polymorphism)을 조사한다, 2001년(동계)에 fluorescencce-labelled primer set와 automatic DNA sequencer를 이용한 유전자지도를 제작하고 동시에 각각의 계통에 대한 불마름병 저항성을 조사하여, 2002년에 여러 종류의 균계에 대한 저항성 유전자와 밀접하게 연관된 표지인자를 탐색하여 내병성 계통의 선발에 이용한다.

라. 불마름병 저항성 콩 계통의 육성

SSD에 의하여 세대가 진전된 후기세대의 집단(조합당 500 계통이상)으로부터 이미 탐색된 DNA 표지인자를 이용하여 선발하고, 선발효율성을 검정하는 동시에 다양한 균계에 대한 저항성을 육성한다. 선발방법은 유전자지도에서 탐색된 마커와 제 2 세부과제에서 개발된 콩 불마름병 특이적 저항성 유전자 마커와 협동과제에서 개발된 후보유전자 마커를 이용하여 간접선발을 한다. 아직까지 DNA 추출의 자동화는 이루어지지 않았으나, 본 연구진의 실험실에서 적용 가능한 large-throughput system(Virk 등, 1999)을 이용하여 SSD방법으로 세대가 진전된 분리집단에서 대량으로 선발한다.

마. 콩 불마름병균의 수집 및 분리

전국에서 불마름병에 걸린 콩잎을 수집하여 병원균을 분리한 뒤 동정한다. 모든 시료들은 지역별, 품종별로 분리·보존하며, 각각의 분리된 병원균들은 Biolog와 fatty acid test등을 통하여 정확한 동정을 한다. 각각의 동정된 병원균들은 다시 비기주 식물에 접종하여 과민반응을 검정하거나 직접 기주에 접종하여 병원성을 확인한다. 비기주 식물을 이용한 간이 병원성 검정방법은 최근 널리 인정되는 방법으로, 병원성을 가진 세균만이 비기주 식물에서 대표적 저항성 기작인 과민반응을 유도하여 접종 부위에 식물세포의 괴사를 일으키는 현상을 이용한다. 이 방법은 병원균의 분화형을 잘 모르는 상태에서 균의 병원성 여부를 확인하기 위하여 널리 사용되는 방법으로, 병원균의 분화형이 밝혀지지 않은 상황에서는 일일이 모든 품종을 전부 키운 뒤 병원성 검정을 할 수 없으므로 간단히 그 균이 병원성이 있는지만을 가려 낼 수 있는 빠르고 정확한 방법의 하나이다.

바. 콩 불마름병균의 균계 분화형 조사 및 균계형지표 작성

현재 콩 불마름병균의 균계분화는 거의 알려져 있지 않았다. 특히 균계형은 그 나라 또는 지역마다 다를 수가 있으므로 지역이나 품종에 맞춰 조사를 하여야 한다. 우리나라에서 널리 사용하는 콩 품종의 유전적 모본을 중심으로 품종을 선택하고 또한 동시에 외국의 균계 분화 연구시 사용한 품종을 비교품종으로 같이 사용하여 균계분화형을 조사할 것이다. 현재 본 연구진의 예비실험에 의하면 우리나라 병원균의 대부분이 미국의 저항성 품종인 CNS를 침해하는 것으로 나타나 있다. 이는 우리나라에 널리 분포하고 있는 균들의 대부분이 CNS가 가지고 있는 *rxp* 유전자를 극복할 수 있다는 뜻이 되며 이는 우리나라에 존재하는 균계의 분화가 훨씬 진전 되어있음을 시사한다. 또한 우리나라에 존재하는 균계들도 각각의 품종에 상이한 이병정도를 나타내어 균계에 상당한 분화가 이루어져 있음을 알 수가 있다.

제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

신팔달 2호의 EMS 처리로 얻어진 SS2-2는 hypernodulating mutant로 bacterial pustule disease에 저항성이다. 신팔달 2호와 SS2-2의 형태적으로 가장 큰 차이점이 nodule의 수에 있으므로 Nodule과 resistance와의 연관성 여부를 판단할 필요가 있다. 따라서 신팔달 2호와 SS2-2를 근류균 처리군과 무처리군으로 나눠 실험설계를 한다.

본업 3엽이 전개되면 잎을 sampling하여 RNA를 추출한다. 추출한 RNA를 정량하여 mRNA를 얻은 후 신팔달 2호 처리군과 SS2-2 처리군을 forward(신팔달 2호: driver, SS2-2: tester), reverse(신팔달 2호: tester, SS2-2: driver)로 하여 SSH(suppression subtraction hybridization)을 시행하였다. secondary PCR 산물을 transformation 하여 384 well 에 분주하여 membrane을 만든다. 각각 SS2-2 처리와 신팔달 2호를 probe로 하여 screening 하였다. screen을 통해 SS2-2에서 발현차이를 보이는 개체를 표시한다. 표시한 부분의 384 well 의 clone에서 plasmid를 추출하고 restriction enzyme으로 inserted DNA를 확인한 후 ABI 3700으로 sequence를 검색한다.

inserted DNA를 probe로 만든다. 이미 추출한 신팔달 2호와 SS2-2의 처리 무처리 RNA로 transfer하여 Northern Blot을 시행한다. 위에서 확인된 77 probe중 일부를 ³²P로 labelling 하여 develop한 결과 근류균 처리와 무처리 간에는 발현양의 차이가 없었다. 또한 mapping 결과 nodule과 콩불마름병이 독립적인 것으로 나타났다.

이 결과에 따라 나머지 probe는 신팔달 2호와 SS2-2만으로 발현정도를 비교 하였다. Northern Blot을 통해 확인 된 gene 중 병저항성과 연관이 있는 partial gene을 cDNA library를 통해 full length gene을 찾고 sequencing 결과에 의거하여 병저항성 기작과의 연관성을 조사 분석하여 marker 개발의 기초 작업을 시행한다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

가. 병 저항성 관련 유사 유전자를 이용한 분자표지 개발

불마름병에 대한 저항성 기작이 알려져 있지 않으므로 이미 알려져 있는 진균, 세균 바이러스 병해에 대한 식물의 저항성 유전자와 불마름병 저항성과의 관계를 조사한다. 진균, 세균 바이러스 병해에 대한 식물의 저항성 유전자 구조를 분석하고 공통적 서열을 이용하여 유전자 단편을 cloning하고 분자적 특성을 조사한다. 저항성유전자 유사체의 발현양상을 저항성과 이병성 품종에서 비교 분석하여 저항성유전자 유사체의 불마름병 저항성과의 관련성을 조사한다. 불마름병 저항성과 저항성유전자 발현 양상이 유의한 관계에 있는 저항성유전자 유사체를 선발하여 불마름병 저항성과의 연관도를 조사하여 유용한 분자표지를 개발한다.

나. 세균 및 진균병 저항성관련 유전자의 발현 양상 비교를 통한 분자표지 개발

발병관련 유전자와 phytoalexin 생합성관련 유전자는 세균과 진균의 병해 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있지만 불마름병과의 관련성에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 발병관련 유전자와 phytoalexin 생합성관련 유전자 또는 EST clone을 확보하여 유전자의 발현 양상을 저항성과 이병성 품종에서 비교 분석하여 유전자의 불마름병 저항성과의 관련성을 조사한다. 불마름병 저항성과 유전자 발현 양상이 유의한 관계에 있는 유전자를 선발하고 불마름병 저항성 분리집단을 이용하여 선발된 유전자와 저항성과의 연관도를 조사하여 유용한 분자표지를 개발한다.

제4절 연구결과

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

가. 콩 불마름병 유전자 탐색을 위한 분자유전자지도 제작

1) 유전자지도 제작용 집단 양성 (RIL)

콩 불마름병 유전자 탐색을 위한 분자유전자지도 제작용 및 내병성계통 선발집단 양성을 위해 단백콩/수원157호, SS2-2/장엽콩의 F₂ 종자를 태국에 송부하여 현재까지 F₇ 세대까지 진전중에 있다.

2) 모부분간 polymorphism 조사 및 유전자 지도 제작

(1) 현재까지 20개 연관군 가운데 158개의 SSR마아커를 선정하여 모부분간 DNA변이를 조사하였으며, 그 가운데 모부분간 polymorphism을 보이는 것은 93종으로서 전체적으로 59%를 나타내고 있다.

(2) 모부분간 polymorphism이 보이고 있는 93종의 SSR marker를 이용하여 79개의 SSR marker의 유전자형을 결정하였다.(표 1-1)

표 1-1. 수원157호/단백콩 75RILs 유전자형 분리조사

	Marker	LG	수원157호	단백콩	합	$\chi^2_{test}(0.05)$
1	satt155	A1	38	29	67	1.209
2	satt236	A1	31	38	69	0.710
3	satt276	A1	35	37	72	0.056
4	satt545	A1	36	32	68	0.235
5	satt177	A2	36	30	66	0.545
6	satt187	A2	37	34	71	0.127
7	satt409	A2	31	19	50	2.880
8	satt197	B1/S	38	28	66	1.515
9	satt415	B1/S	36	30	66	0.545
10	satt426	B1/S	28	30	58	0.069
11	satt509	B1/S	39	28	67	1.806
12	satt168	B2/P	40	27	67	2.522
13	satt556	B2/P	37	31	68	0.529
14	satt577	B2/P	32	37	69	0.362
15	sat-085	C1	17	33	50	5.120

	Marker	LG	수원157호	단백콩	합	$\chi^2_{test}(0.05)$
16	satt180	C1	30	35	65	0.385
17	satt294	C1	34	35	69	0.014
18	satt396	C1	38	30	68	0.941
19	satt134	C2	40	34	74	0.486
20	satt202	C2	37	27	64	1.563
21	satt277	C2	38	34	72	0.222
22	satt286	C2	33	34	67	0.015
23	satt291	C2	41	30	71	1.704
24	satt322	C2	41	27	68	2.882
25	satt147	D1a/Q	33	33	66	0.000
26	satt179	D1a/Q	32	34	66	0.061
27	satt408	D1a/Q	30	34	64	0.250
28	satt532	D1a/Q	35	34	69	0.014
29	satt189	D1b/W	33	30	63	0.143
30	satt290	D1b/W	32	31	63	0.016
31	satt186	D2/R	36	28	64	1.000
32	satt226	D2/R	36	30	66	0.545
33	satt372	D2/R	36	30	66	0.545
34	satt458	D2/R	38	33	71	0.352
35	satt389	D2/R	31	24	55	0.891
36	satt397	D2/R	36	33	69	0.130
37	satt154	D2/R	33	19	52	3.769
38	sat-112	E	40	23	63	4.587
39	satt185	E	30	39	69	1.174
40	satt411	E	36	26	62	1.613
41	sat-074	F	26	36	62	1.613
42	satt114	F	30	39	69	1.174
43	satt160	F	40	28	68	2.118
44	satt269	F	32	33	65	0.015
45	satt224	G	36	24	60	2.400
46	satt288	G	38	35	73	0.123
47	satt324	G	29	40	69	1.754
48	sat_122	H	24	39	63	3.571
49	satt192	H	25	42	67	4.313
50	satt279	H	33	37	70	0.229

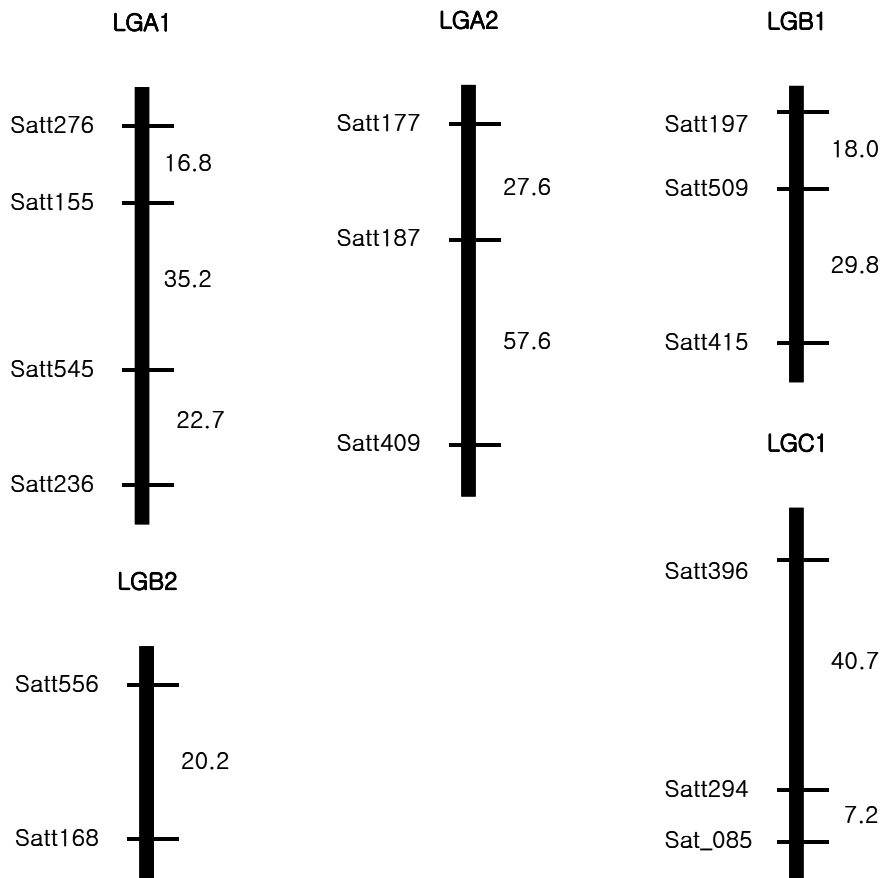
	Marker	LG	수원157호	단백콩	합	$\chi^2_{test}(0.05)$
51	satt317	H	28	34	62	0.581
52	satt353	H	30	37	67	0.731
53	satt434	H	18	30	48	3.000
54	satt442	H	24	37	61	2.770
55	satt541	H	29	33	62	0.258
56	satt239	I	40	28	68	2.118
57	satt292	I	38	34	72	0.222
58	satt571	I	37	23	60	3.267
59	satt183	J	37	29	66	0.970
60	satt215	J	32	30	62	0.065
61	satt244	J	29	40	69	1.754
62	satt285	J	35	30	65	0.385
63	satt414	J	34	33	67	0.015
64	satt431	J	27	42	69	3.261
65	satt167	K	32	36	68	0.235
66	satt196	K	35	30	65	0.385
67	satt441	K	34	36	70	0.057
68	satt143	L	26	35	61	1.328
69	satt156	L	35	36	71	0.014
70	satt373	L	36	33	69	0.130
71	satt462	L	29	39	68	1.471
72	satt336	M	29	39	68	1.471
73	satt590	M	33	37	70	0.229
74	GMABAB	N	33	23	56	1.786
75	satt584	N	34	38	72	0.222
76	satt188	O	37	35	72	0.056
77	satt243	O	25	38	63	2.683
78	satt259	O	31	32	63	0.016
79	satt445	O	44	28	72	3.556

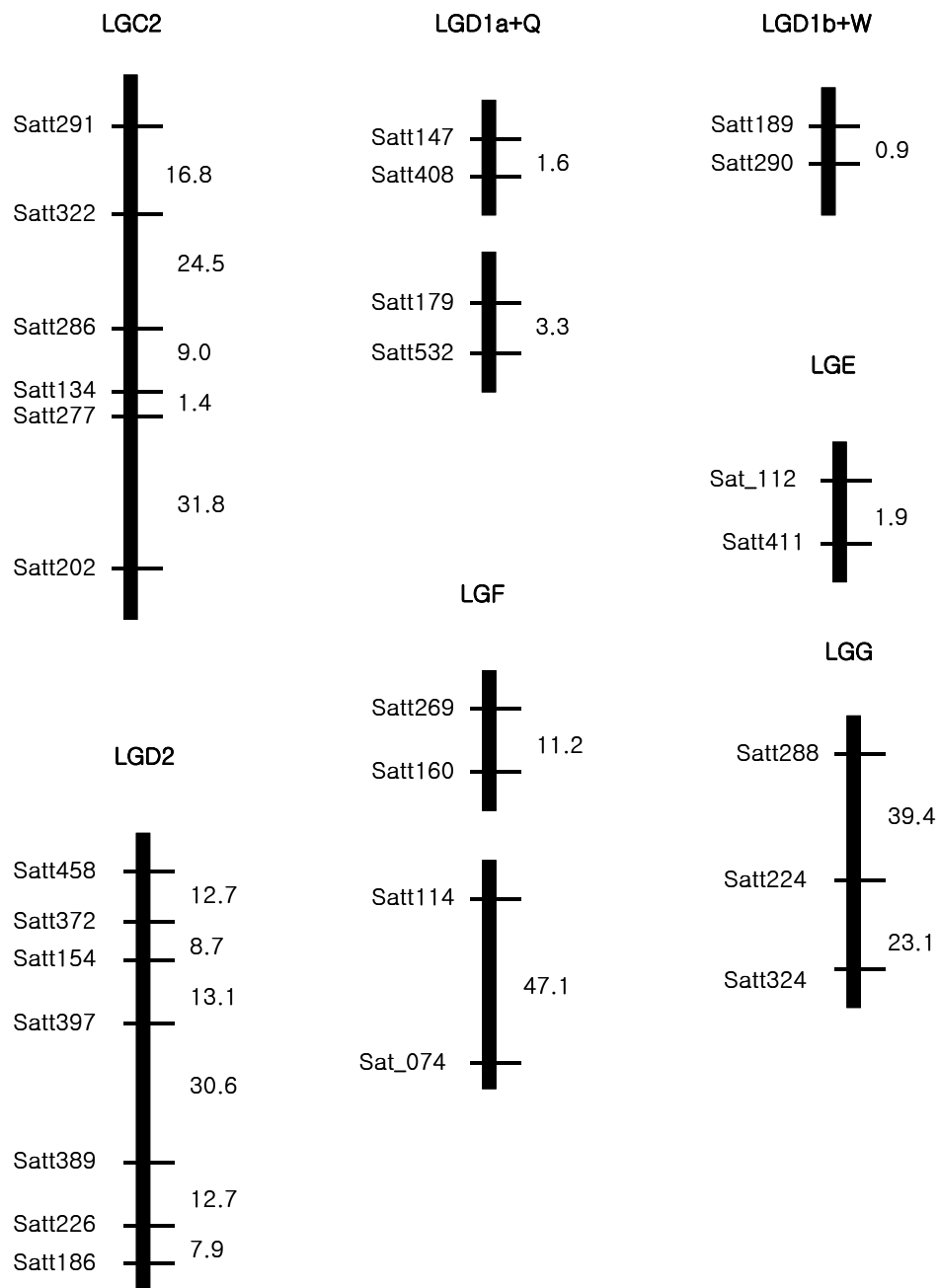
(3) 이 자료를 MAPMAKER 3.0 프로그램을 이용하여 유전자 지도를 제작한 결과, 표 1-2와 같이 69개의 마커가 18개의 연관군으로 분류되었으며, 두 marker간의 간격은 13.0cM으로 세밀한 유전자 지도를 제작하였다. 그림1-1에서와 같이 7개의 마커로 구성된 LGD2를 85.5cM, 8개의 marker로 구성된 LGH는 134.4cM이었다. 그리고, Satt426등 10개의 SSR marker는 연관되어 있지 않았다.

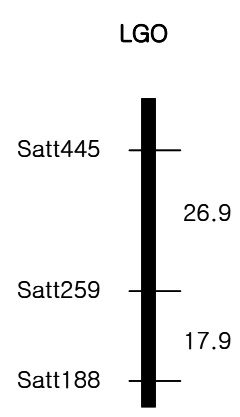
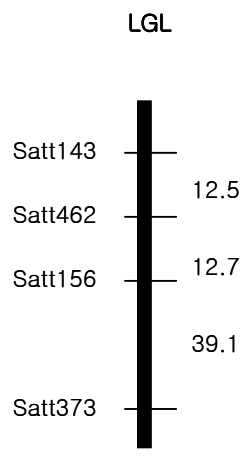
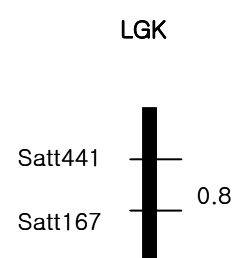
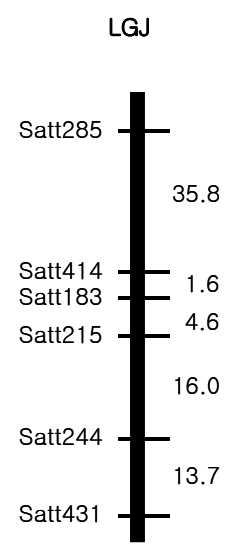
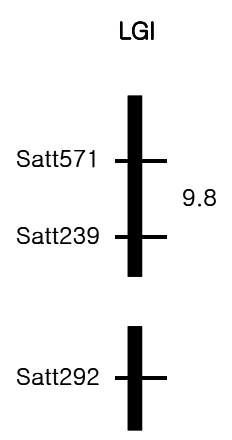
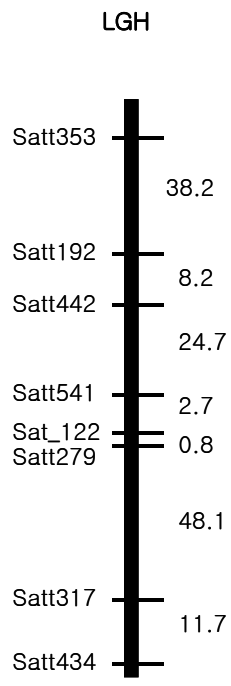
표 1-2. 수원157호×단백콩의 유전자 지도 특성

Characteristics	수원157호×단백콩
Progeny(no.)	75
SSR loci(no.)	79
Linked SSR loci(no.)	69
Linked Groups(no.)	18
Estimated genome size(cM)	899.3
Average two marker interval(cM)	13.0

그림 1-1. 유전자지도(수원157호×단백콩)







나. 콩 불마름병 저항성 유전 분석

1) 수원157 X 단백질콩 F2 집단 불마름병 반응 조사

(1) 콩불마름병에 감수성인 수원157호와 저항성인 단백질콩간의 교배를 통해 얻어진 369개체의 F2 집단을 온실에서 과종하여 콩 개체간의 DNA를 추출한 후 콩 불마름병 병원균주 OCS-F 계통을 가지고 저항성 반응의 차이를 조사하였다(표1).

(2) OCS-F 콩 불마름병 병원균에 대한 F2개체간의 병반응 조사결과는 그림 1과 같이 정규분포곡선을 그리고 있으며, 표1에서와 같이 hetero의 평균값이 모본인 수원157호에 가까운 것으로 보아 감수성 유전자가 우성이며 저항성 유전자가 열성임을 알 수 있었으며, 유전적 분리 데이터와 병반응 데이터를 SAS를 이용한 single anova factor anova 분석결과 Satt372마커가 OCS-F 콩 불마름병 저항성에 15%의 높은 상관관계를 가지고 있음이 확립되었다.

표 1. 수원157×단백콩 F2개체에 대한 Satt372마커의 분리비와 병원균의 표현형.

Satt372	N	Mean
S/S	80	3.32
S/D	150	3.16
D/D	60	2.07

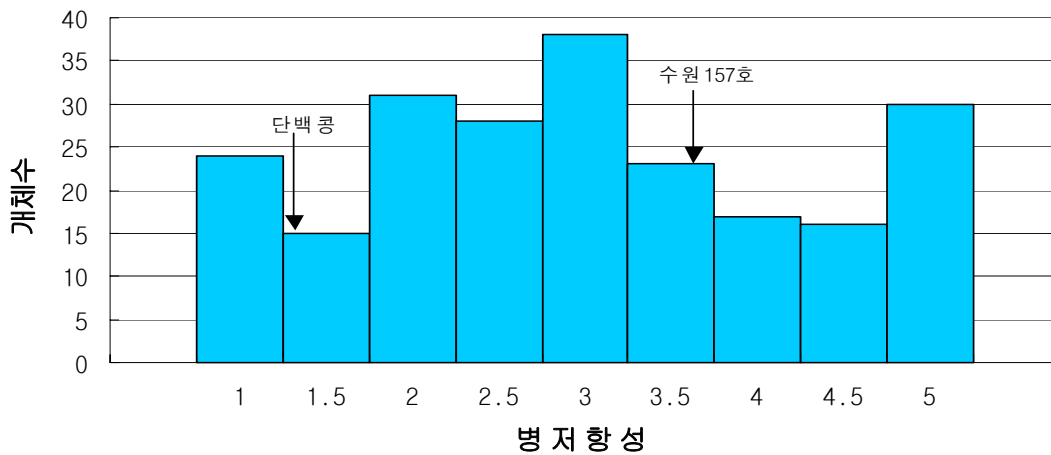


그림 1. 수원157×단백콩 F2개체에 대한 ocsF병원균의 표현형 분리.

2) 콩불마름병 6단계에 대한 수원157X단백콩과 모부본의 bacterial leaf pustule 저항성.

온실에서 모부본과 RILs에 콩불마름병 병원균주 6계통을 각각 접종하였을 때, 각 군주에서 모부본간 BLP resistance score가 다양하게 나타나고 있다(표2). 수원157(BLP-susceptible)과 단백콩(BLP-resistance)에서 8ra에 대해서는 1.3과 1.8, LMG7403에 대해서는 4.2과 2.3의 score를 보여주고 있다. 이러한 결과를 볼 때 RIL 계통에서의 pathogenic variability of *X. axonopodis*를 예상할 수 있고, 또한 그 다양성을 아래의 표를 통해 확인할 수 있다.

표2 . Means and ranges of parents and RIL progenies for the resistance to bacterial leaf pustule in soybean

	Isolate ^a						Field ^b
	8ra	OCS-F	OCS-G	SDL2178	LMG7403	LMG7404	
Female parent	1.3	2.7	3.7	2.4	4.2	3.3	4.1
Male Parent	0.8	1.2	1.3	1.5	2.3	1.3	1.0
Progeny	1.0~3.3	1.2~3.9	1.0~4.9	0.8~3.5	1.0~3.8	0.3~3.5	1.0~4.8
LSD _{0.05} Progeny	1.2	1.2	1.3	1.2	1.3	1.1	1.3
Mean	2.0	2.3	2.5	2.2	2.2	2.0	2.9
H2(%)	47	66	60	41	38	59	82

^a Disease severity was scored on the basis of the number of small, yellow-to-brown lesions with a raised pustule per leaflet on a scale of 0 to 5 (0 = no lesion, 1 = 1 to 25 lesions, 2 = 26 to 50 lesions, 3 = 51 to 75 lesions, 4 = 76 to 100 lesions, and 5 = more than 100 lesions).

^b Disease severity was scored on a scale of 0 to 5(0=no visible symptoms to 5=heavily infected)

3) 콩 불마름병 저항성 QTL 탐색에서 연관군 D2의 Satt372마커가 major gene으로 작용

LG D2/R에 속하는 Satt372 locus는 콩불마름병 병원균주 6계통 모두에 반응을 하고 있고, LMG7403에서는 18%, OCS-F에 대해서는 43%의 수치를 보이고 있다. 이는 Satt372가 BLP resistance에 대한 QTL에 밀접하게 연관되어 있다는 것을 보여준다.(표3, 그림2)

표3. Markers linked to QTLs associated with the resistance to BLP disease under greenhouse experiment using an RIL population derived from a cross of the susceptible Suwon157 and the resistant Danbaekkong in soybean

Isaolate	Locus	LG	SF-ANOVA ^a				SLG-Regr ^a		MLG-Regr ^a	
			<i>P</i>	<i>R</i> ²	Allelic means ^b		<i>P</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>	<i>R</i> ²
				%	S/S	D/D		%		%
8ra	Satt509	B1/S	0.027	7	2.1	1.8	NA ^c	-	-	-
	Satt372	D2/R	<0.001	17	2.2	1.7	<0.001	22	0.002	20
	Satt458	D2/R	<0.001	19	2.2	1.7	0.004	5	-	-
	Satt156	L	0.042	6	2.1	1.8	NA	-	-	-
	Satt243	O	0.022	9	2.2	1.9	NA	-	0.010	11
	Total									31
OCS-F	Satt134	C2	0.035	6	2.5	2.1	NA	-	-	-
	Satt372	D2/R	<0.001	44	2.8	1.8	<0.001	48	<0.001	43
	Satt458	D2/R	<0.001	28	2.6	1.9	-	-	-	-
	Satt353	H	0.047	6	2.5	2.1	NA	-	-	-
	Satt156	L	0.030	7	2.5	2.1	NA	-	-	-
	Total									43
OCS-G	Satt177	A2	0.011	10	2.7	2.3	NA	-	-	-
	Satt372	D2/R	<0.001	40	2.8	2.0	<0.001	44	<0.001	39
	Satt458	D2/R	<0.001	19	2.7	2.1	-	-	-	-
	Satt167	K	0.017	8	2.3	2.7	-	-	-	-
	Satt441	K	0.026	7	2.3	2.7	0.018	8	-	-
	Satt143	L	0.011	10	2.7	2.3	NA	-	0.036	6
Total									45	
SDL2178	Satt294	C1	0.019	8	2.4	2.1	0.019	9	0.027	7
	Satt396	C1	0.033	7	2.3	2.0	-	-	-	-
	Satt291	C2	0.016	8	2.4	2.0	NA	-	-	-
	Satt372	D2/R	<0.001	28	2.5	1.9	<0.001	29	<0.001	25
	Satt458	D2/R	0.008	10	2.4	2.0	-	-	-	-
	Satt336	M	0.025	7	2.4	2.1	NA	-	-	-
Total									32	
LMG7403	Satt155	A1	0.019	9	2.1	2.5	NA	-	0.007	13
	Satt134	C2	0.043	6	2.4	2.0	NA	-	-	-
	Satt372	D2/R	<0.001	24	2.5	1.9	<0.001	28	0.004	1.8
	Satt458	D2/R	<0.001	19	2.5	1.9	0.043	5	-	-
	Satt269	F	0.025	8	2.4	2.1	NA	-	0.015	8
	Satt156	L	0.021	8	2.4	2.1	NA	-	0.008	11
	Satt259	O	0.046	7	2.4	2.1	NA	-	-	-
Total									50	
LMG7404	Satt372	D2/R	<0.001	37	2.4	1.6	<0.001	39	<0.001	39
	Satt458	D2/R	<0.001	21	2.3	1.7	-	-	-	-
	Total									39

- ^a SF-ANOVA: single factor analysis of variance
 SLG-Regr: Multiple regression with markers on each linkage group
 MLG-Regr: multiple regression with all significant markers from the SLG-Regr model
- ^b S/S: homozygous Suwon 157, D/D : homozygous Danbaekkong
- ^c Not applicable. Not linked to other markers

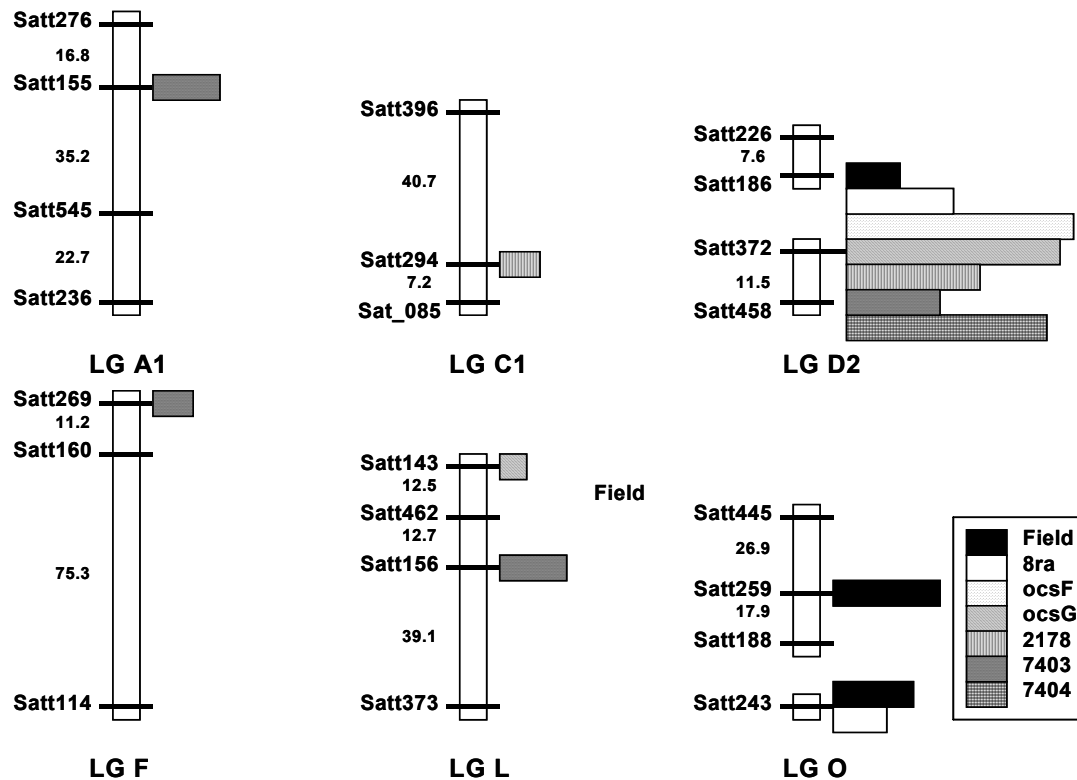


그림2. Soybean linkage groups (LG) showing marker positions and estimated map distance with the independent QTL conditioning the resistance to bacterial leaf pustule disease. Field resistance was evaluated through inoculation (a filled bar) with the mixture of three isolates(OCS-F, SDL2178, LMG7404), while greenhouse resistance was evaluated through individual inoculation with six strains(an open, a dotted, and four hatched bars). Length of horizontal bars indicates R^2 value for the

loci.

4) PI96188 × 진주1호 RIL 집단 불마름병 병특이적 반응 조사

(1)PI96188 이라는 품종은 *Xanthomonas campestris*에 대해서 기존 품종과는 확연히 다른 반응을 보인다. 식물에서 자기 방어기작의 일종인 과민 반응을 일으킨다. 특이적 반응으로서는 일반적 병징은 병에 걸린 주변부가 노랗게 되어서 병이 발달하는 형태를 보이지만 PI96188은 주변부가 발달하지 않고 검게 괴사하는 형태를 보인다. 그래서 기존에 알려진 Linkage Group(LG) D2에 *rxp*유전자에 의해서 조절되는지 아니면 다른 기작에 의해서 조절되는 지를 알아 보기 위하여 이 실험을 수행하게 되었다.

(2) 콩불마름병에 대해 병특이적 반응을 보이는 PI96188과 일반적 병징을 보이는 진주 1호간의 교배를 통해 얻어진 F₇의 RIL 종자 147개를 5반복으로 비닐온실에 파종후, 각 각의 식물체에서 DNA를 추출후, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (8ra)를 접종하였고, 병특이적반응을 조사했다. (Fig. 1)(Table 1)

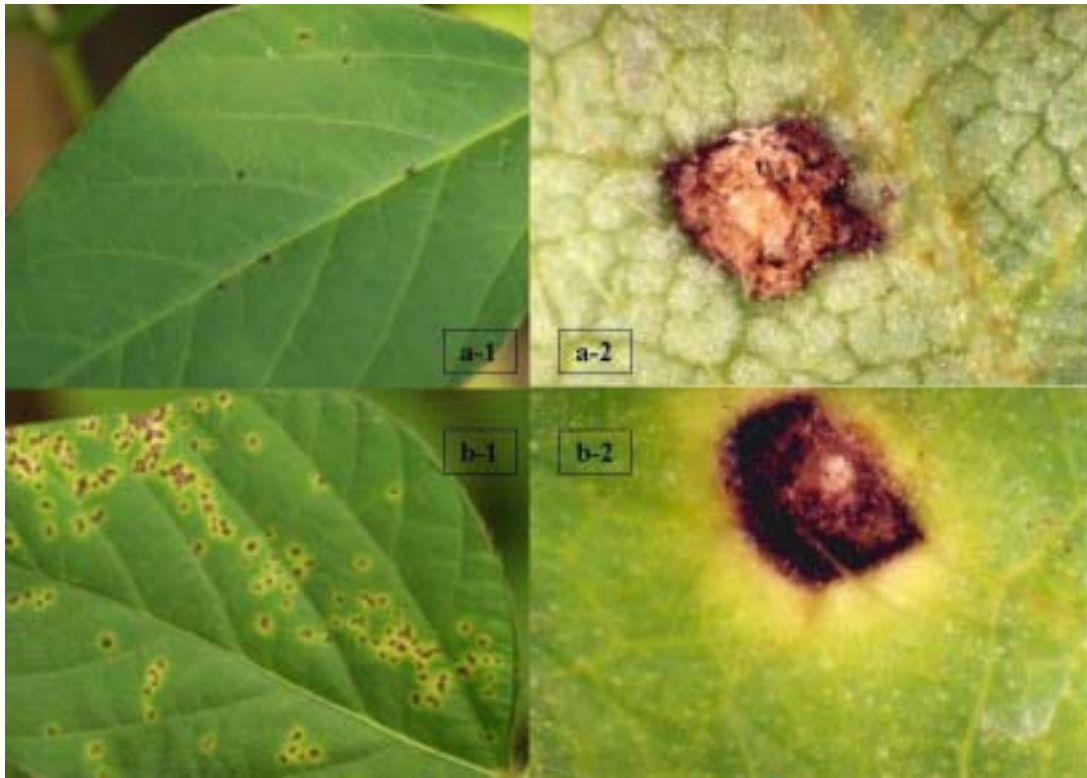


Fig. 1. Disease symptoms of PI96188 (a-1,a-2) and Jinju 1 (b-1,b-2)inoculated by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*

Table 1. The number of novel response and normal response in PI96188×Jinju1

	병특이적반응	일반병징	Hetero-type
Number	16	88	44

(3) DNA 추출후 먼저 모부분(PI96188×Jinju1)에 대해서 polymorphism을 조사했다.(Table 2).

Table 2. Percentage of SSR makers showing polymorphism from PI96188 X Jinju 1 population

	Markers screened	Markers selected	
	No.	No.	%
PI96188×Jinju1	126	80	63

(4) 콩 불마름병 저항성 유전자는 Linkage Group(LG) D2지역에 있는 *rxp*와 관련된 것으로 알려져 있고, PI96188에서 보이는 병특이적 반응도 LG D2에 연관되어 있을 것으로 예상되어 *rxp* 유전자가 있는 것으로 추정되는 Satt372 주변에 있는 마커들을 선택하여 polymorphism을 조사한 후 병특이적 반응과의 연관을 살펴 본 결과 관계가 없음이 나타났다(SAS8.1). (Table 3.)

Table 3. Five SSR markers on LG D2 in PI96188 X Jinju 1

Markers	LG	<i>P</i>
Satt014	D2	0.7654
Satt135	D2	0.3721
Satt226	D2	0.7799
Satt372	D2	0.6340
Satt458	D2	0.6339

(5) LG D2뿐만 아니라 전체 LG에 대해서 가지고 있던 마커를 이용하여 조사를 확대하였으며 조사를 하던 중 LG O에 위치한 Sat_108이 병특이적 반응과 연관을 보였다.(SAS8.1, 유의수준 95%) 그 지역에 있던 마커들을 좀 더 집중적으로 조사한 결과 Fig 2.과 같은 결과를 얻었다.(Fig. 2)

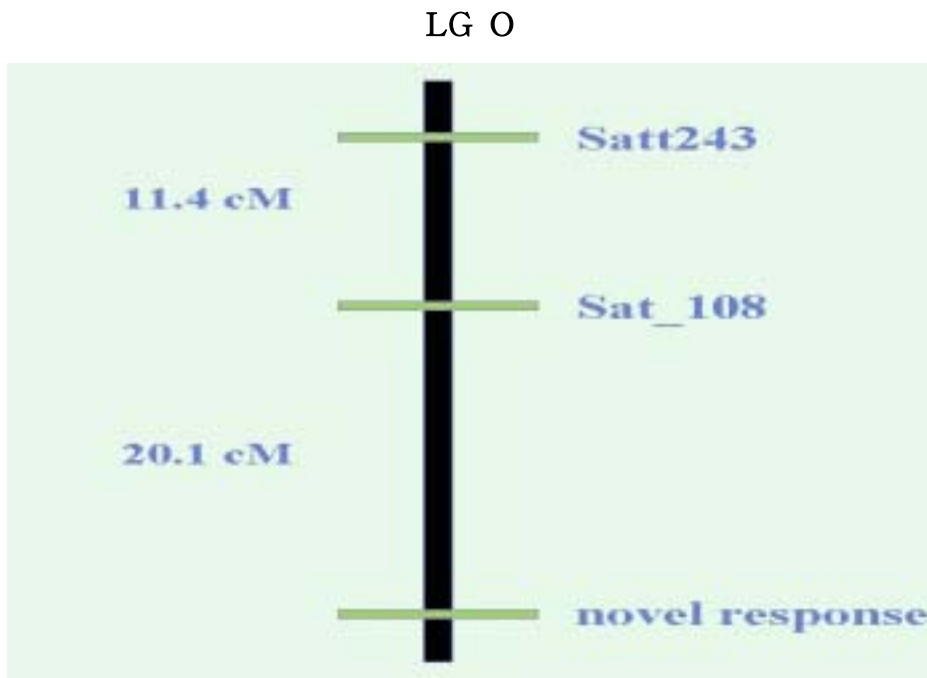


Fig. 2. Linkage map of markers used for detection of novel response

(6) 위 실험에서 PI96188은 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (8ra)에 대하여 다른 품종과는 확연히 다른 반응(novel response)를 보인다. 이것은 병의 침입에 대한 과민 반응의 일종으로 보이면 이 과민 반응도 식물의 자기 방어반응 중 하나로 생각되어 지고 있다. 그리고 이 과민 반응을 일으키는 유전자는 기존의 불마름병에 대해서 저항성을 일으키는 기작과는 다르므로 기존의 불마름병저항성등이 더 이상 이용할 수 없을 때 대안으로 이용되어 질 수 있을 것이라 생각되어진다. 하지만 아직은 마커로 사용되어지기에는 거리가 너무 멀리 떨어져 있으므로 더 근접한 마커를 찾는 것이 중요하겠다.

다. 주요 콩 유전자원의 불마름병원 균계별 저항성 조사

1) 콩 불마름병균의 수집 및 분리

콩불마름병균의 유전적 다양성을 조사하기 위하여, 본 과제 수행기간 매년 우리나라 전역에서 콩불마름병 시료를 채취, 병원균을 분리, 동정하였다. 또한 품종과 병원균 분화형과의 차이점을 알기 위하여 연구소 또는 시험장 단위의 포장에서 자연 발생한 이병시료를 채취, 병원균을 분리 동정하였다.

표 1. 전국에서 수집, 동정 된 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*의 수와 채집장소

채집장소	채집균수		
	2000	2001	2002
강원 (춘천, 화천, 홍천)	4	3	2
경기 (수원, 화성, 안성, 강화, 파주, 포천, 이천, 용인)	38	22	27
충북 (청원)	3	1	2
충남 (서산, 청양, 논산, 당진, 아산)	12	0	1
경북 (문경, 영양, 청송, 영덕, 경주)	6	0	0
경남 (창녕, 김해, 밀양, 거창, 함양, 합천)	9	0	0
전북 (정읍, 진안, 장수, 무주)	9	0	0
전남 (보성, 해남, 나주, 강진, 장흥, 진도, 무안, 영광)	16	0	0
총계	97	26	32

표 2. 콩불마름병균이 분리된 콩 품종

년도	품 종	
2000	보광, 진품, 진품2호, 검정콩 1호, 검정콩 2호, 광교, 태광, 무한, 황금, 장엽	10 품종
2001	장엽, 대원, 장원, 황금콩, 다원, 선흑콩, 만리콩, 진율, 소원, 단백, 소담, 장수	12 품종
2002	단백, 황금, 대원, 장원, 다원, 소원, 선흑콩, 태광, 무한, 황금, 백천, 광교, 충북백콩, 진율, 검정콩 3호, 팔달, 석냥, 만리	19 품종

2)콩 불마름병균의 동정

이병 시료의 병반 부위를 마쇄한 뒤 PSA 배지에서 28℃에서 키운 뒤 노랗고 mucoid 한 conoly를 선별하여 동정하였다. 동정 시에는 다음 표와 같은 생화학적 방법과 Biolog (Bio-rad co.)를 이용하여 동정하였다. (표) 또한 부생균과 병원성 균을 선별하기 위하여 비기주 식물인 토마토에서의 과민성 반응인 HR (Hypersensitive response)을 조사하였다.

표 3. 분리된 병원균의 생화학적 성질

성질	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	성질	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>
35℃에서의 성장	+	산의 생성	
Starch 가수분해	+	arabinose	+
colony	황색, slimy	glucose	+
gelatin 액화	+	sucrose	+
유화수소 생산	+	mannose	+
urease 활성	-	galactose	+
NaCl 내성	3-5	threhalose	+
		cellobiose	+
		fructose	+



그림 1. PSA 배지에서 노란 colony를 형성하는 *X. axonopodis* pv. *glycines* (1), 토마토에서의 HR 반응 (2)

3) 균계 분화형 조사

가) 고추반점세균병원균의 비병원성 유전자 *avrBS3*와의 상동성 조사

비병원성 유전자의 profile을 검색하기 위하여 대부분의 *Xanthomonas* sp. 가 상동 유전자를 가지고 있는 고추세균성 반점병균 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 유전자인 *avrBS3* 유전자를 probe으로 사용하여 chromosomal DNA profile을 검색하였다 (그림 2). 총 155 균주에서 chromosomal DNA를 분리하여 제한 효소로 digestion 한 뒤 *avrBS3* 유전자를 probe으로 한 southern blotting을 한 결과는 그림 3과 같다.

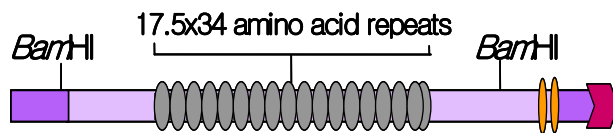


그림 2. 고추세균성반점병균에서 분리한 비병원성 유전자 *avrBS3*, BamHI site를 이용하여 probe을 만들었다.

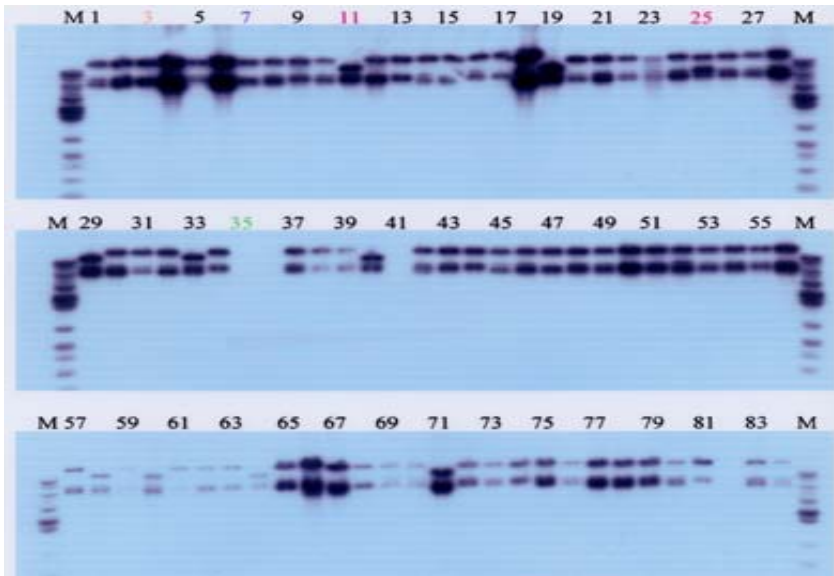


그림 3. 전국에서 수집된 콩불마름병균의 *avrBS3* 유전자에 대한 상동성을 조사 한 결과. 대부분의 세균들이 2개 이상의 상동 유전자를 가지고 있었다.

나) 각기 다른 품종에서 분리된 콩불마름병균의 *avrBS3* 상동성 pattern

(1) 병원균이 가지는 *avrBS3* 상동 유전자 profile과 분리된 품종간의 유의성을 알아보았다. 결과, 품종간에 *avrBS3* 상동 유전자 즉, 비병원성 유전자 profile은 차이가 많았으나 같은 품종에서도 유전자 profile이 다른 균들이 분리되어 품종과 유전자 profile 간의 유의적 관계는 발견하지 못 하였다 (그림 4).



그림 4. 각기 다른 품종에서 분리한 병원균의 비병원성 유전자 profile. lane1. marker. 2, 3 & 28: 장엽, 4 & 5: 대원, 6, 7 & 8: 장원, 9 & 27: 황금, 10: 다원, 11: 선흑콩, 12: 만리콩, 13: 진울, 14 & 15: 소원, 16: 단백, 17: 소담, 18: 장수, 19: 보광, 20 & 21: 진품, 22: 검정콩 1호, 23: 검정콩 2호, 24: 광고, 25: 태광, 26: 무한.

(2) 몇몇 품종에서는 콩깍지 및 줄기에서도 병징을 발견, 균을 분리 할 수 있었다 (그림 5). 콩깍지, 줄기 와 잎에서 각각 분리된 균들의 비병원성 유전자 profile을 비교 한 결과 같은 조직에서도 각기 다른 유전자 profile이 발견되어 조직에 대한 비병원성 유전자의 특이성은 발견되지 않았다 (그림 6).



그림5. 콩 깍지에 발견된 콩불마름병

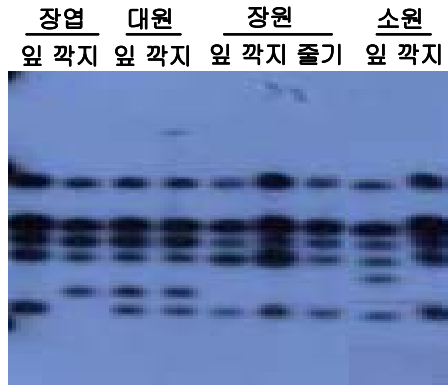


그림 6. 잎, 줄기 및 콩깍지에서 분리된 균들의 *avrBS3* 비병원성 유전자에 대한 상동성

다) 국내 수집 불마름병균의 비병원성 유전자 profile에 따른 grouping

(1) 우리나라 전역에서, 또 각기 다른 품종에서 수집된 155종의 콩불마름병균의 비병원성 유전자 profile을 분석한 결과 6개의 group으로 나눌 수 있었다 (그림 7). 특히 *avrBS3* 상동 유전자들은 제한 효소 BamHI으로 자르면 비병원성 유전자 특이 size의 반복 유전자를 알 수 있다. BamHI 특이 size가 다르면 다른 비병원성 유전자로 간주되며 대부분의 경우 이 크기에 따른 품종간의 저항성의 차이가 발견된다.

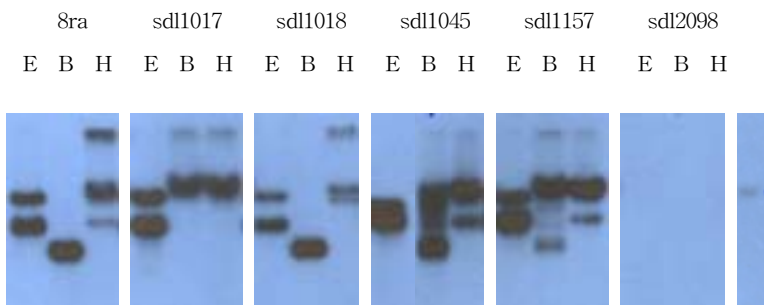


그림 7. 여섯 개의 대표 group 병원균의 chromosomal DNA를 3가지 다른 제한 효소로 처리시 비병원성 유전자 profile

(2) 우리나라 수집 균주들의 80 % 가 넘는 대부분의 균주가 8ra group에 속하며 *avrBS3* 상동 유전자가 전혀 보이지 않는 균주도 있다.

표 4. 국내 수집병원균의 비병원성 유전자형 별 분포율

	group 별 대표 균주					
	8ra	sdl 1017	sdl 1018	sdl 1045	sdl 1157	sdl 2098
국내 분포율	85 %	3.5 %	7 %	2 %	2 %	0.5 %

라) 비병원성 유전자형 별 병원성 검정

(1) 각각의 group에서 대표균주를 선발하여 우리나라에서 수집한 몇몇 콩 품종에 접종한 뒤 그 병원성을 검정하였다. (표 5)

표 5. 국내 대표 균계의 대표 콩품종에 대한 병원성

cultivars	Isolates					
	8ra	1017	1018	1045	1157	2098
수원157	1.5*	3.5	3.3	4.2	2.8	0.0
신팔달2호	3.0	3.2	1.0	3.2	3.3	0.0
푸른콩	3.0	1.5	1.8	1.2	3.0	0.5
검정콩1호	2.0	4.2	4.7	2.7	2.7	0.0
광안	0.8	0.8	2.2	0.3	3.7	0.1
다원	5.0	5.0	3.8	4.2	3.8	0.0
단백	1.0	3.7	3.5	1.3	3.3	0.0
만리	4.0	1.8	3.7	3.7	3.2	0.0
무한	1.5	2.7	3.8	4.7	2.5	0.1
밀양68	2.0	4.7	1.7	3.5	3.5	0.0
밀양78	3.0	5.0	4.0	3.5	3.5	0.0
신팔달1호	1.0	1.3	0.8	0.3	1.3	0.2
장엽	2.5	4.7	4.0	3.3	3.7	0.0
한남	3.0	4.0	1.2	3.5	4.8	0.0
peking	3.5	4.8	4.1	4.5	4.0	0.0
CNS1	1.0	3.3	4.2	3.8	2.3	0.0
CNS2	1.0	0.2	0.5	0.8	0.5	0.0
Mukden	2.5	3.0	3.5	4.5	4.5	0.0
Chippewa	3.0	2.8	4.5	2.8	3.7	0.0
Williams82	0.8	2.2	0.5	0.2	0.2	0.0
Harosoy	2.0	3.3	3.3	3.3	2.8	0.0
Pella	2.0	3.2	2.2	2.8	1.3	0.0

(2)국내 육성 품종들에 대하여 field에서 이병 정도를 조사하였다. 그 결과 푸른콩, 단백콩 등은 포장에서 저항성을 보였다 (표 6).

표 6. 국내 육성 품종의 콩불마름병균에 대한 이병정도

	저항성 정도		
	저항성	감수성	매우 감수성
품종	푸른콩, 소명콩, 광안콩, 신팔달2호, 장수콩, 단백콩	소담콩, 진율콩, 선흑콩, 백운콩, 명주나물콩, 황금콩	만리콩, 보광콩, 장원콩, 소원콩, 다원콩, 장엽콩

4) 비병원성 유전자와 품종의 저항성과의 관계 조사

가) 비병원성 유전자의 mutation 유기

(1) 콩불마름병균의 비병원성 유전자의 기능을 알아보기 위하여 상동성을 보이는 *avrBS3* 유전자를 mutation 시킨 뒤 비병원성 유전자의 기능을 knock out 시키기로 하였다.

(2) 먼저 EZ::Tn transposon kit를 이용하여 비병원성 유전자 *avrBS3*가 insertion 되어있는 clone을 mutation 시켰다. In vitro mutation 결과 수천개의 kanamycin, ampicilin 저항성을 보이는 putative mutants를 선발하였으며 염기서열을 통하여 *avrBS3* 반복 유전자 부위에 transposon이 insertion 되어 있는 clone을 하나 선택하였다.

(3) *avrBS3*에 transposon이 insertion 되어있는 plasmid를 다시 wild type *X. campestris* pv. *glycines*에 transformation 시키고 비병원성 유전자 specific한 mutation이 일어나게 한 뒤 southern blotting을 통하여 변화된 위치를 추적하였다.

(4) 결과 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* sdl1018 strain에서 한 band가 mutation 되며 저항성 반응이 감수성으로 변함을 확인하였다.

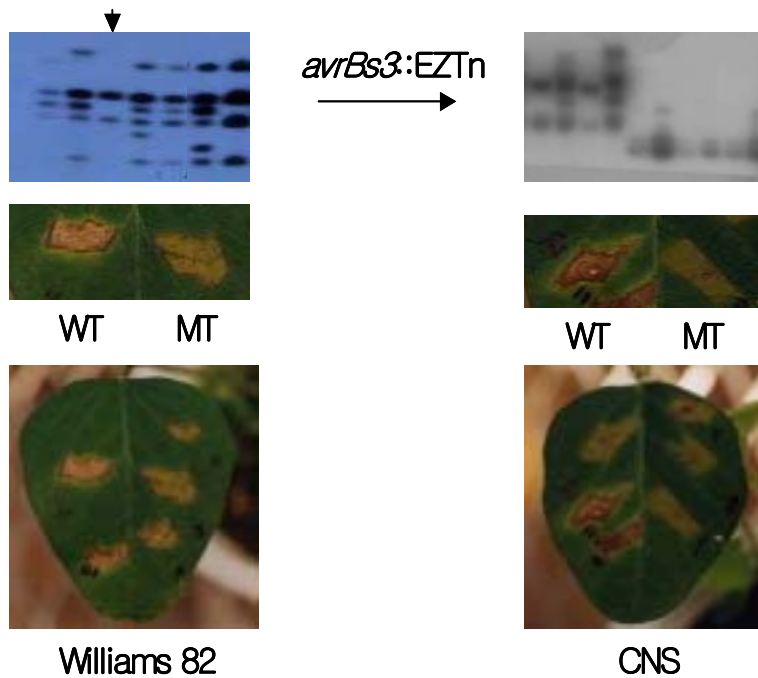


그림 8. 콩불마름병균 *X. axonopodis* pv. *glycines* sdl1018::EZTn mutants와 wild type의 저항성 품종 Williams 82와 CNS 에 대한 반응

(5) 비병원성 유전자의 변화와 품종 저항성의 변화는 관계가 있으며 좀더 자세한 연구가 진행 중이다.

5) 비병원성 유전자의 분리 및 분석

가) 콩 불마름병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)의 chromosomal gene을 *avrBS3* gene과 southern blotting을 통하여 상동성을 조사한 바, 고추반점병원세균인 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성 유전자인 *avrBS3* 유전자와의 상동성이 매우 높아 그 상동성을 이용하여 콩 불마름병균의 비병원성 유전자를 탐색하였다.

나) 6개의 Type strain 들 중 *avrBS3* 상동성 유전자가 가장 많이 보이는 *X. campestris* pv. *glycines* SL1045 strain을 선발하여 genomic library를 제작하였다.

다) Genomic library는 pLAFR3 cosmid를 이용하여 sucrose gradient density를 이용하여 분리한 20-25kb 의 DNA fragment를 ligation 시킨 뒤 phage에 packing하고 *E. coli*에 transfection 하여 제작하였다. Cosmid library의 평균 insertion size는 20-25 kb

정도였다.

라) 약 2000 개의 genomic library clone들을 *avrBS3* 유전자를 probe으로 하여 screen 한 결과 1차 screen에서 20개의 clone들이 상동성을 보임을 알았다 (그림 9).

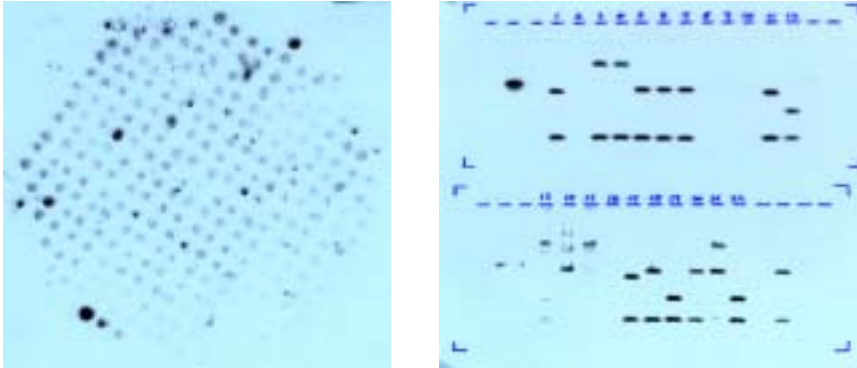


그림 9. 콩불마름병균 *X. axonopodis* pv. *glycines* s이 1045의 genomic cosmid library를 이용한 비병원성 유전자의 분리. conoly hybridization을 한 결과 와 conoly hybridization 결과에서 선별된 clone들을 재 분리 하여 southern blotting 한 결과

마) 1차 screen에서 선별된 clone들을 다시 cosmid를 분리하여 2차 선별을 들어갔으며 2차 선별에서 RFLP 결과가 같이 보이는 clone들은 일단 같은 clone으로 간주하여 제외 시켜 최종 6개의 clone들이 선별되었으며 현재 분석 중이다.

2. 제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

가. 서론

식물체에 병원체가 침입을 하게 되면 식물은 HR(hypersensitive response)와 SAR(systemic acquired resistance), ISR(induced acquired resistance)반응을 일으키게 된다는 것은 이미 알려진 사실이며 식물재료로 쓴 SS2-2의 경우 신팔달 2호에 EMS 처리를 통해 얻어지 변이체로 nodule 수와 크기가 크다. 콩불마름병에 대해서도 신팔달 2호가 감수성인데 비해 SS2-2는 저항성이다. SS2-2는 *nts*, *rxp* mutation,으로써 nodule을 제어하는 유전자와 병저항성 유전자가 관련이 있으리라 판단되었으나 서로 독립적인 유전을 함을 알게 되었다.

나. 재료 및 방법

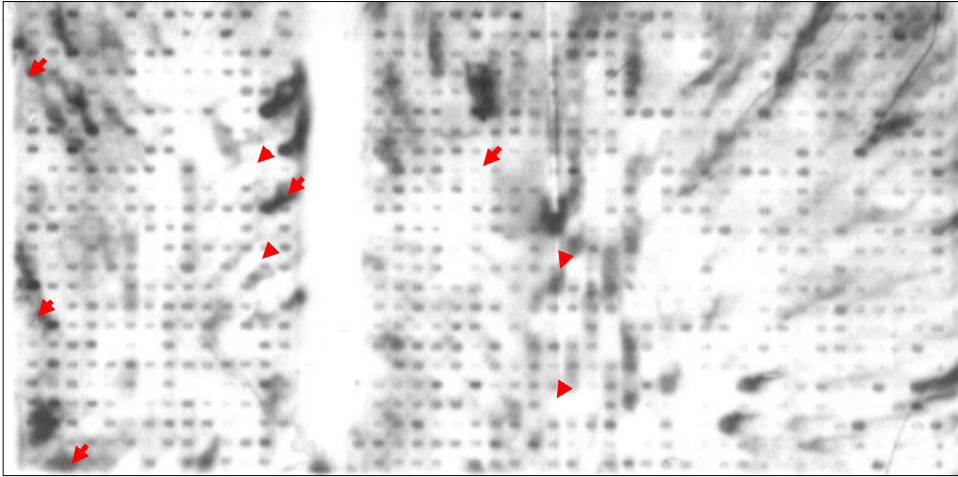
신팔달 2호와 SS2-2를 Sample로 하였으며 *rxp* plant(Line: PI547404, Cultivar:L61-4180) 도 병저항성과의 관련성을 확인하기위한 재료로 썼다. 신팔달 2호와 SS2-2는 잎 전체, 잎 부위별로 채취하였고 salicylic acid와 Methy-jasmonic acid를 처리하여 RNA를 추출했다. 병저항성과 관련하여 신팔달 2호에는 없으나 SS2-2는 가지고 있는 유전자라든지 그 발현 정도가 더 큰 gene이나 transcription factor가 있으리라는 판단 하에 SSH라는 방법을 썼다. SSH에서 분리해낸 유전자는 Northern Hybridization을 통해 재확인 하였다.

다. 결과

1) subtraction library 제작 및 differential screening

SSH(suppression subtraction hybridization) 방법으로 신팔달 콩 2호와 SS2-2에서 차이를 보이는 유전자를 분리하였다. subtraction된 3500여개 clone에 대한 differential screening 결과는 다음과 같다

(A)



(B)

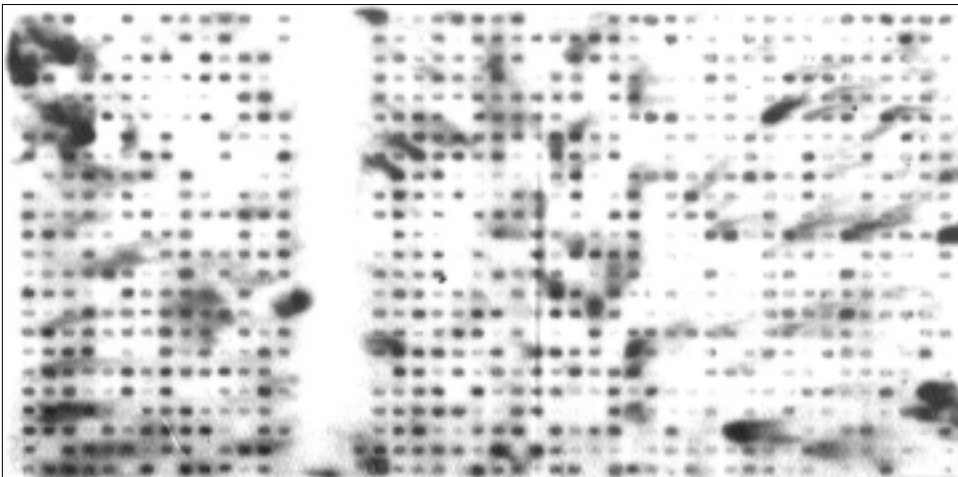


Figure 1. The results of differential screening. Panel A. The duplicated blots hybridized with forward-subtracted cDNA probes made from tester (SS2-2) and driver (sinpaldal) RNA. Panel B. The duplicated blots hybridized with backward-subtracted cDNA probes made from tester (sinpaldal) and driver (SS2-2) RNA.

위의 그림에서 보듯이 일단 각 spot의 signal 정도로 볼 때 cDNA의 normalization은 잘 된 것으로 보인다, 이는 subtraction 과정에는 별 문제가 없었음을 보여준다. 그러나 표시한 몇 개의 clone 이외에는 SS2-2와 신팔달 2호의 mRNA 사이에는 거의 차이가 없는데, 이는 EMS mutation line인 SS2-2와 신팔달 2호를 같은 환경과 같은 stage에서 sampling 하였으므로 mutation이 일어난 유전자와 이 유전자와 직접 연결되는 유전자만이 차이가 날 것임을 예상할 때 가능한 결과로 볼 수 있다. 그러므로 일단 뚜렷이 구분되는 유전자의 결과를 보고 발현양의 차이가 적은 유전자의 경우도 분석하기로 하고 차이가 뚜렷한 24개의 clone을 1차로 선정하여 분석을 진행 하였고 2차로 53개의 clone를 선별하였다.

2) 발현 차이를 보이는 유전자의 염기서열 결정 및 분석

Table 1. The results of sequence analysis

	clone No	검색결과	SS2-2 특이적 발현
			(by northern blot)
1	4C23	G.max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	Y
2	4C21	unknown	Y
3	4N14	G.max vegetative storage protien mRNA (VSP27) putative acid phosphatase	Y
4	4O04	Glycerate dehydrogenase (NADH-DEPENDENT HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE	N
5	4J06	unknown	Y
6	4D23	Arabidopsis thaliana putative adenylate translocator ADP,ATP carrier protein, Mitochondrial precursor (ADP/ATP translocase) (Adenine nucleotide translocator)	reverse
7	1F19	unknown wound inducive gene [Nicotiana tabacum]	reverse
8	2A06	putative membrane transporter [Arabidopsis thaliana putative permease 1 [Oryza sativa]	Y
9	3I09	Pisum sativum (clone PsRCI22-3) callus protein P23 Rtranslationally controlled tumor protein homolog (TCTP)	reverse
10	3I08	unknown probable acyl-CoA dehydrogenase [Mesorhizobium loti] low homology	Y
11	3I07	unknown, SERINE CARBOXYPEPTIDASE	Y

	clone No	검색결과	SS2-2 특이적 발현
			(by northern blot)
12	3I05	G.max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	Y
13	4G24	lactoylglutathione lyase, glyoxalase	N
14	5N08	G.max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	Y
15	5M11	G.max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	Y
16	5J11	chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor	Y
17	5M06	G.max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	Y
18	5M17	Glycine max gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	Y
19	5F11	unknown protein	N
20	5K11	allene oxide cyclase	N
21	7K22	OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 1	
22	7A22	unknown	
23	7L6	Glycine max ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit ,	Y
24	7H02	unspecific monooxygenase ,cytochrome P450 like_TBP	Northern 시행중

	Clone No.	검색 결과	SS2-2 특이적 발현 (by northern blot)
1	1D02	Glycine max glycine-rich RNA-binding protein (GRP) mRNA	N
2	1A05	Glycine max ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	Y
3	1B08	unknown	N
4	1D15	Glycine max 28 kDa protein mRNA	Y
5	2A19	Glycine max ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	Y
6	3K02	Glycine max ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	Y
7	3N02	G.hirsutum light regulated unknown reading frame DNA	Y
8	3I05	Glycine max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	N
9	3O14	unknown(Arabidopsis thaliana photosystem I PSI-N mRNA)	Y
10	3A15	Glycine max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	N
11	3A19	Glycine max vspA gene	Y
12	4P04	M.sativa 26S rRNA Choristylis rhamnoides 26S ribosomal RNA gene	N
13	4J06	unknown (Pseudomonas aeruginosa)	N
14	4N14	G.max vegetative storage protien mRNA (VSP B)	Y
15	4O15	Glycine max repressor protein (Dr1) mRNA, complete cds	Y
16	4I16	Arabidopsis thaliana unknown protein (F19P19.2) mRNA	N
17	4C23	Glycine max 28 kDa protein mRNA	Y
18	4G23	unknown	N
19	5F2	Arabidopsis thaliana chromosome 2	N
20	5M6	Glycine max 28 kDa protein mRNA	Y

21	5N08	Glycine max 28 kDa protein mRNA	Y
22	5M11	G.max vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	Y
23	5A15	Glycine max 28 kDa protein mRNA	Y
24	5B17	Glycine max gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	Y
25	5B22	Glycine max 28 kDa protein mRNA	Y
26	6L12	Vigna radiata chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor (CipCp24) mRNA	Y
27	6H23	Atlantic salmon mRNA for myostatin, isoform II	Y
28	7C05	Pseudomonas aeruginosa	Y
29	7D06	hypothetical protein XP_104599 [Homo sapiens]	N
30	7O07	unknown	N
31	7F20	unknown	N
32	7L22	Arabidopsis thaliana mRNA for putative beta-galactosidas	Y
33	7L23	putative senescence-associated protein [Pisum sativum]	N
34	7M24	Glycine max Homeodomain Leucine zipper protein	Y
35	8A02	Arabidopsis thaliana clone 37689 mRNA	Y
36	8I07	unknown	N
37	8I13	(NM_115671) putative protein [Arabidopsis thaliana]	N
38	8D14	Arabidopsis thaliana unknown protein mRNA	Y
39	8J14	cysteine proteinase tpp (EC 3.4.22.-) - garden pea	N
40	8C16	(AC022472) Contains similarity to CaLB protein from A. thaliana gb X96598 and contains multiple C2 PF 00168 domains	N
41	8K16		N
42	8L16	imidazoleglycerol-phosphate synthase subunit H - like [Arabidopsis thaliana]	N
43	8G21	Arabidopsis thaliana unknown protein (MSJ11.24/AT3g15840) mRNA,	N
44	8A22	(NM_101113) ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpR2)[Arabidopsis thaliana]	N
45	8L24	(AC005169) hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	N

46	9I01	(AF136636) PR1a precursor [Glycine max]	reverse
49	9C23	(NM_115343) vacuolar protein sorting protein 33a-like protein [Arabidopsis thaliana]	N
50	10E13	Arabidopsis thaliana putative RING zinc finger protein (At1g63900)	Y
51	10O17	(AP002460) gene_id:F1D9.26~unknown protein [Arabidopsis thaliana]	N
52	10G19	gene_id:F1D9.26~unknown protein [Arabidopsis thaliana]	Y
53	1B05	(X85130) catalase [Campylobacter jejuni]	N

3) Northern Blot 결과

Table 1의 clone에서 plasmid를 추출했고 모두 inserted DNA가 확인되었다. SSH를 통해 얻어진 유전자들을 확인하기 위해 Probe로 만들어 Northern Blot을 시행하였다. 다음은 Northern Blot 결과이다.

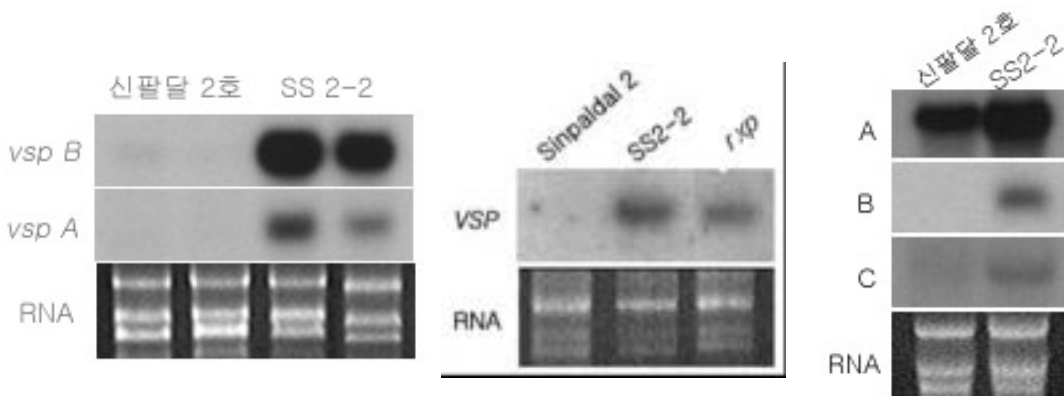


Figure 2. *vsp A* : *Glycine max* vegetative storage protein gene A, *vsp B* : *Glycine max* vegetative storage protein gene B, A : *Glycine max* homeodomain--leucine zipper protein gene, B : *Glycine max* repressor protein Dr1, C : *A.taliana* putative RING zinc finger protein

table 1 에서 보듯이 총 77개의 clone중 17개의 vegetative storage protein (VSP) 이 나왔으며, 이들 Sequence들을 이미 알려진 Soybean vsp gene (*vspA*, *vspB*)과 multiple alignment 해본 결과, 1개의 *vspB*와 16개의 *vspA* 두 group으로 구분되었다. Northern Blot을 한 결과, Figure 2 에서처럼 vsp gene이 SS2-2에서 확연히 많이 발현됨을 볼 수 있다. 특히, *vspA* 와 *vspB* gene은 각각 28kD의 VSP-alpha와 31kD의 VSP-beta polypeptide를 암호화하고 서로 간에 80%의 homology를 나타낸다(Hugh S.Mason et al).

Soybean vegetative storage protein은 polyphosphate에서 acid phosphatase 활성을 나타내며(Daryll B et al) hypocotyl, young leaves, flower 와 pod에 고농도로 축적되어 있으며 jasmonate(JA) 나 wounding에 의해 activation 되는 것으로 보고 되고 있다(Hugh S. Mason et al). 이는 이 단백질이 병원균 침입 시 신호전달의 역할에 참여할 가능성이 있음을 시사하는 결과이다. vsp gene의 병저항성과의 관련여부를 확인하기 위하여 *rxp* 식물체를 Northern 해본 결과 SS2-2에서처럼 발현이 되는 것을 확인 할 수 있었다.

Glycine max homeodomain-leucine zipper protein gene의 경우 4개의 DNA binding site를 가지고 있는 *vspB* promoter와 반응을 한다. 1개의 JA response domain과 2개의 phosphate response domain과 1개의 sugar response domain으로 이들이 phosphate modulated gene의 transcription factor로 작용함을 알 수 있다(Zhijun Tang et al). 즉, 병원균이 침입을 하게 되면 jasmonic acid에 의해 *vspB*가 activate되고 phosphate domain과 반응하여 down-regulation 작용을 하여 defence response를 유도하게 된다. 또한 jasmonate는 병원균이 침입을 하게 되면 product가 증가하는 것이 아니라 sensitivity,가 높아진다는 보고에 따라 JA response domain의 affinity가 높아지는 것으로 예상된다.

*Dr1*의 경우, rice에서 Dr1/DrAP1 transcriptional repression complex가 연구된 바에 의하면 상호작용을 통해 외부 환경 변화에 transcriptional repressor로 작용하는데, Dr1은 transcription 과정에서 TATA box와 binding되는 protein에 직접 작용하여 TBP(TATA binding protein)의 작용을 차단하게 된다(Wen Song et al). *A.taliana* putative RING zinc finger protein의 경우는 nuclear receptor로 작용하여 protein-protein interaction의 motif로 작용할 것으로 추측된다.

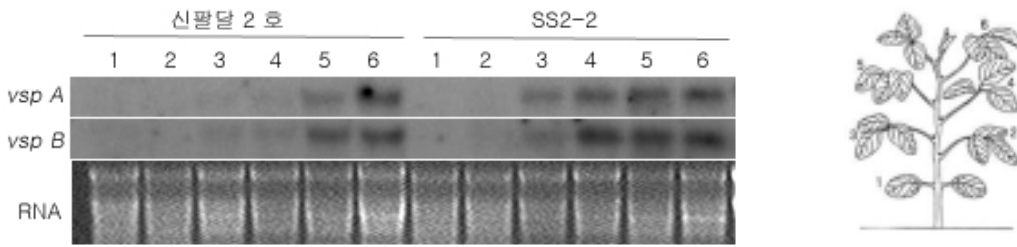


Figure 3 . 신팔달 2호와 SS2-2에서 잎 별 *vsp* gene expression 실험

1: 제 1엽, 2: 제 2엽, 3: 제 3엽, 4: 제 4엽, 5: 제 5엽, 6 : 제 6엽

Figure 3 은 신팔달 2호와 SS2-2를 잎별로 채취하여 실험한 결과로 신팔달 2호보다 SS2-2에서 *vsp* gene이 하위엽 즉 old leaves에서도 지속적으로 발현됨을 알 수 있다. 이는 성장 기간동안 SS2-2가 보다 더 오랫동안 저항성 능력을 가짐을 추측할 수 있게 한다.

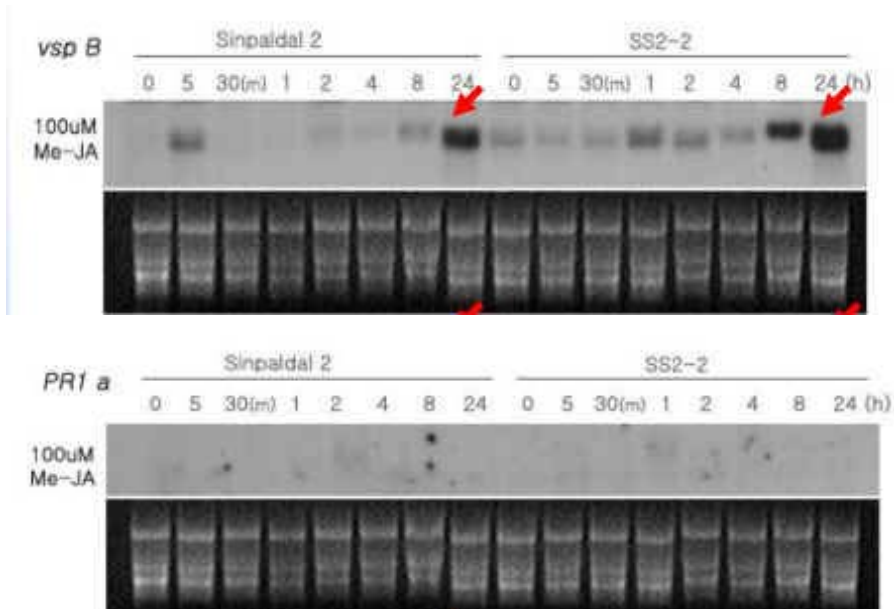


Figure 4. Me-JA 처리에 따른 *vspB*와 *PR1a* expression

Methyl jasmonate를 처리하여 시간별로 채취하여 *vspB*와 *pr1a*를 처리한결과 *vspB*의 경우 SS2-2가 기본으로 가지고 있는 발현량이 많았고 신팔달에서는 24시간부터 SS2-2는 처리후 8시간부터 확연히 발현됨을 볼수 있다. 그리고 *pr1a*는 발현차이를 보이지 않은 것으로 보아 *vspB*와 Jasmonate와의 관련성을 확인 할 수 있다.

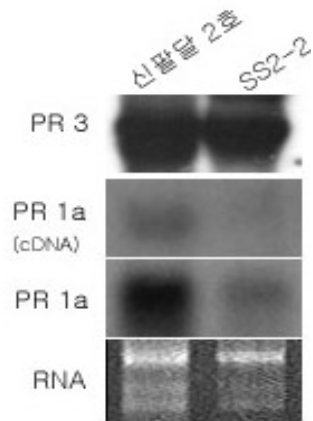


Figure 5. 신팔달 2호와 SS2-2에서 *PR1a* 와 *PR3*의 gene expression 차이

PR group중에는 Salicylic acid (SA) pathway와 관련이 있는 *PR1* (acidic type)와 *PR3* (chitinase), *PR2* (β -glucanase)등이 있다. SSH를 통해 분리된 *PR1a*를 가지고 Northern Blot한 결과 오히려 신팔달 2호에서 많이 발현됨을 알 수 있었다. cDNA library를 통해 얻은 PR gene도 같은 결과를 보였고 그 외 Salicylic acid defense pathway와 관련된 다른 PR group (chitinase, β -glucanase) 또한 같은 결과를 보였다.

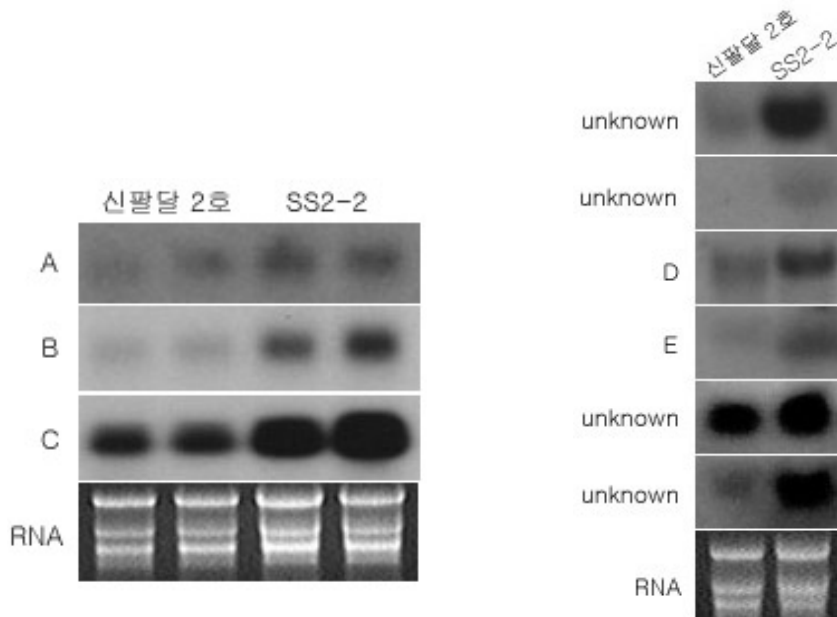


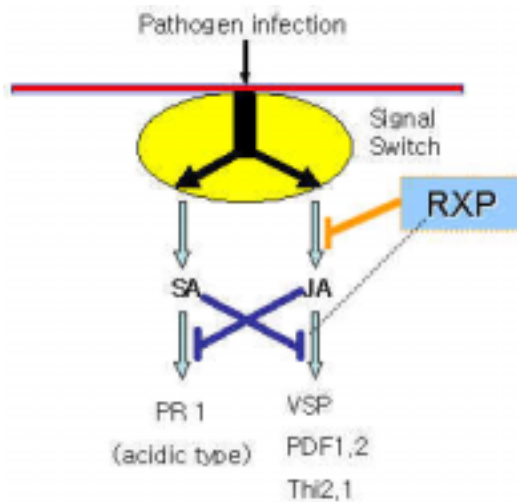
Figure 6. A : *G.hirutum* light regulated unknown reading frame DNA, B : *A. thaliana* photosystem PS1- N mRNA, nuclear gene encoding chloroplast protein, C : *Vigna*

radiata chlorophyll a/b binding protein CP24 precursor, D : myostatin isoform II, E : putative membrane transporter

아직 그 기능이 밝혀지지 않은 gene들은 cDNA library를 통해 full sequence를 찾아 그 기능을 알아내야 할 것이다 Figure 5 A B C는 모두 SS2-2가 광합성과 관련되어 있는 것으로 이들을 질소고정능력과 관련이 있는 것으로 보인다. 또한 membrane transporter의 경우, signal transduction 과정에서 식물체와 병원균사이의 상호작용에 있어서 membrane을 거쳐 signal molecule이 이동되는 것으로 예상됨에 따라 더 연구할 필요가 있겠다.

4) Discussion

위의 그림 2, 그림 3, 그림 4를 통해 SS2-2의 콩불마름병 저항성은 JA defence pathway와 연관이 있으며 SA dependent defence gene의 activation이 억제됨을 확인 할 수 있었다.



JA는 plant defence system에서 중요한 신호 전달 매개 물질로 wounding이나 병원균의 침입에 의해 세포막으로부터 방출되는 Linolenic acid(LA) 으로부터 생합성되는 cyclopentanone 이다. 이전의 연구 논문에 의하면 JA defense pathway와 SA defense pathway가 모두 병저항성과 관련되어 있지만, 서로 상호 억제 작용한다는 보고가 있어 본 실험결과도 그 결과와 연관이 있는지 확인할 필요가 있겠다(ohn G. Turner et al). 따라

서 SA와 JA의 영향을 확인하기 위해 시간별로 SA와 JA를 처리하여 분석하고 있으며 JA defence pathway와의 연관성을 확실히 하기 위해 논문(서학수)에 의거하여 JA와 관련된 gene (PR1 basic type, Lox, AOS(Allen Oxide synthase), DHS1(3-deoxy-D-arabio-heptulosonate 7-phosphate synthase), HEL(Hevine like protein))들로 Primer 제작하여 Northern Blot으로 확인 중에 있다..

그리고 Bean (*Phaseolus vulgaris*)에서 rhizobacterium *Bacillus pumilus* SE34 는 root-rot fungus *F.oxysporum* f.sp. *pisi*.대해 ISR을 유도하며 root tissue를 형태적으로 변화시키는 것이 아니라 root cell wall을 단단히 하여 병원균을 침입을 막는다고 한다. (Benhamou, N. et al) Arabidopsis에서 Rhizobacteria mediated induced systemic resistance(ISR) 이 jasmonate inducible gene Atvsp expression에 관여한다는 연구 논문 (Van Wees, S.C.M. et al) 에 따라 hypernodulating mutant인 SS2-2가 ISR에 의해 jasmonate와 관련하여 vsp gene expression이 많은 것으로 추측되어 뿌리혹이 생성되는 환경을 배제하고 vsp gene expression을 분석 해본 결과 관련이 없는 것을 나타냈다.

위의 실험에서 볼때, 식물체가 SA dependent pathway와 JA dependent pathway를 다 작동하고 있으나 RXP가 JA pathway를 차단하고 있는 상태로 신평달 2호에서는 SA 관련 유전자들의 발현이 많은 것으로 예상되며 rxp gene이 나간 SS2-2의 경우는 RXP의 blocking 작용이 되지 않아서 JA pathway가 'switch on' 되어 상대적으로 JA 관련 유전자가 발현됨을 알 수 있다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

가. 병 저항성 관련 유사 유전자를 이용한 분자표지 개발

1) 병해 저항성관련 유전자유사체 분리

콩으로부터 병해 저항성관련 유전자유사체를 분리하기 위하여 GenBank에 수록되어 있는 주요 병해 저항성 유전자의 아미노산 서열을 염기서열 및 아미노산 서열 분석 프로그램 (DNASIS, NCBI의 Blast Search, Multiple sequence alignment program)을 이용하여 비교 분석하였다. 담배의 N 유전자, 아마의 L6 유전자, 일일초의 RPM1, RPS2 유전자, 벼의 Xa21 유전자, 토마토의 Pto, Cf-9 유전자등 이미 분리된 진균, 세균 및 바이러스에 대한 병해 저항성 유전자의 구조를 분석하여 식물의 병해 저항성 유전자간에 공통성 (consensus sequence)이 높은 부위를 탐색하였다 (Fig. 1). 이러한 저항성 유전자의 보존부위는 콩의 저항성 유전자에서도 보존되어 있을 가능성이 매우 높으므로 이들 보존부위에 대하여 8쌍의 primer를 작성하였다 (Table 1).

Flax L6	(241)	DDHITAVLEKLSLDSENVTMVGLYGM GGIGKT TTAKAVYNKI-SSCFDCCCFFIDNIRETQ
Tobacco N	(192)	DTHLEKIESLLEIGINGVRIMGIWGM GGVGKT TIARAIPTLLGRMDSSYPFDGACFLKD
Arab RPS2	(159)	TTMMEQVLEFLSEEEERGIIGVYGP GVGKTT LMQSIINNELITKGHQYDVLIVVQMSREF
Arab RP1	(180)	DAAGKGLIGWLLSPEPQRIVVSVVGM GGSGKT TLSANIFKSQTVRKHAFASYAWVTISKSY
Flax L6	(300)	EKDGVVVLQKKLVSEILRIDSGSVGFNNDSGGRKTIKER-VSRFKILVVLDDVDEKFKFE
Tobacco N	(252)	IKENKRMHSLQNALSELLREKANYNNEEDGKHQMASR-LRSKKVLIVLDDIDNKDHYL
Arab RPS2	(219)	GECTIQQAVGARLGLSWDEKETGENRALKIYRALRQKRFLLLDDVWEEIDLEKTGVPRP
Arab RP1	(240)	VIEDVFRMTIKEFYKEAETQIPGELYSLTYRELVEKLVVEYLHRSKRYFVMLDDVWNTGLWR
Flax L6	(359)	DMLGSPKDFISQSRFLITSRSMRVLGTLNENQCKLYEVGSMKPRSLELFSKHAFKKNTP
Tobacco N	(311)	EYLAGDLDFWFGNGSRIITTRDKHL---IEKNDIIEVETALPDHESIQLFKQHAFGKEVP
Arab RPS2	(279)	DRENKCKVMF-TTRSIALCENNMGAEYKLRVEFLEKKHAWELFCSKVWRKDLLE-----
Arab RP1	(300)	EISIALPDGI-SGSRVMVTTRSNNMASFSYSGSRKHEIELLKEDEAWALFCNKAFSGSL
Flax L6	(419)	PSYYETLANDVVDTTAGLPLT LKVI GSLLFKQEIAVWEDTLEQLRRTLNLDEVDRLKIS
Tobacco N	(368)	NENFEKLSLEVVNAYAKGLPLA LKV WGSLLHNLRLTEWKSATIEHMK-NNSYSGIIDKLLKIS
Arab RPS2	(331)	----SSSIRRLAEIIVSKCG LPL ALITLGGAMAHRETEBEWIHASEVLRFPFAEMKGMN
Arab RP1	(359)	ECCRRLNEVWARKLVERCQ LPL AIASLGSMMSTKRESEWKQVYNSLNWELNNNLELK

Fig. 1. Alignment of amino acid sequences of the various plant disease resistance genes. Conserved regions (bold characters) among genes were targeted by the primers designed based on the sequences deduced from the conserved amino acid sequences.

Table 1. Sequences of primers designed to target soybean disease resistance gene analogues.

Primer code	Foward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
SRGA1	AGTTTATAAATCCATTGCT	ACTACTATTCAAGACGTCCT
SRGA2	AGTTTATAAATCCATTGCT	CACACGGTTTAAAATTCTCA
SRGA3	AGTTTATAAATCCATTGCT	CTCTCGATTCAAAATATCAT
SRGA4	TGTTACTGCTTTGTTTGGTA	TACATCATGTGTTACCTCT
SRGA5	TGCTAGAAAAGTCTATGAAG	TCAATCATTTCTTTGCACAA
SRGA6	AGCCAAAGCCATCTACAGT	AACTACATTTCTTGCAAGT
SRGA7	AGTTTATAAATCCATTGCT	CCGAAGCATAAGTTGCTG
SRGA8	AGCGAGAGTTGTATTTAAG	AGCCACTTTTGACAACCTGC

익산나물콩의 어린 잎으로부터 Rogers 등(1988)의 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 작성된 primer쌍과 일반적 PCR조건을 이용하여 genomic DNA에 대한 PCR을 실시하여 얻은 결과는 그림 2와 같았다. SRGA1과 2 primer쌍을 제외한 모든 primer쌍으로부터 약 450 ~ 500bp의 특이적 단편이 증폭되었다.

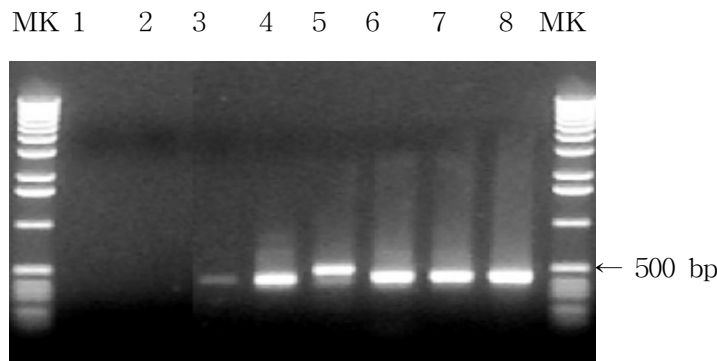


Fig. 2. PCR amplification of Iksannamul-kong genomic DNA with the eight SRGA primer pairs. About 450 to 500 bp fragments were specifically amplified by all the primer pairs except 1F/R(lane 1) and 2F/R (lane 2). MK: 1kb ladder DNA marker.

이들 증폭 단편을 전기영동과 gel purification을 통하여 순수 분리한 다음 T4 DNA 연결 효소를 이용하여 pGEMT-Easy vector (Promega, USA)에 증폭된 DNA 단편이 삽입된 pSGRA clone들 선발하고 선발된 clone의 삽입단편의 염기서열을 결정하였다 (Fig. 3).

pSRGA3

AGTTTATAATTCCATTGCTGATCATTTTGAAGCTTCTTGCTTTCTAGAAAAATGTGAGAGAAACTACCA
ATAAGAAGGGGTTAGAAGATCTCCAAAGTGCTTTCTTTCTAAAACAGTTGGAGAGAAGAAAATTAAG
TTAACAAATTGGAGAGAAGGAATTCACATAATAAAGCGTAAGCTCAAGGAAAAAGAAGGTTCTTTTATGAT
TCTAGATGATGTTGACGAACAAAAACAGTTACAAGCAATTATTGGCAGCCCTGATTGGTTTTGGTGGTGG
AAGTAGAGTCATCATCACCCTCGAGATGAACATTTGTTAGCACTTCACAATGTTAAAAATAACATATA
AGGTGAGAAAGTTGAATGAGAAACATGCTCTCAATTACTTAGTCAGAAGGCTTTTGAATTGGAAAAA
GAAGTTGATCCAAGTTACCATGATATTTTGAATCGAGAG

pSRGA4

GTCCGGCGCATGGCGGCGCGGAATTCGTTTGTNCTGCTTTGTTTTGGTAAAAATCTCTCCTCAATATGA
TGCTCGTTGTTTTATTGATGATTTAAACAAAAAATGTCGGGAATTTTGGAGCAATAAGTGCACAAAAA
CAACTTCTTTCTCTAGCTCTACATCAAGGAAAATATGGAGATACACAATCTTTCCCTCGGNACCATGTTG
ATAAGAAGTGGCTATGTCACNTAAAGACACTTATTGCTCNGGATAATGTTGATCAGGTTGAACAATT
AAGAGAATTTGGCTTTGCATCGTAAATATTTAGGTGAAGGGAGTAGAATCANCATAATCTCTACAAAT
TGCATATCTTAAGAAATTTCTGGAGC

pSRGA5

TGCTAGAAAAGTCTATGAAGCAATCAAAGGGGATTTTCGATGTTAGTTGCTTTCTTGAAAACATTAGAG
AGGTGCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTTCAAAGGAACTTTCTAATCTTGGTGTTAGTTGCTTT
CTTGAAAAGTGTAAAGACAAATGGCTTAGTTCCCATAGTAGAGGAAGTTTTTCGTGATCAATTAAGAAT
CGTTGATTTTGATAAATCTTCATGATGGGAAAATGATAATAGCAAACCTTTAAGCAACAAAAAGGTTT
TTCTTGTCTTGATGATGTAAGTGAGTTAAGCCAATTTGGAGAATTTAGCTGGAAAAGCAAGAATGGTTT
GGTCCAGGAAGCAGAGTAATAATCACAACACTAGAGATAAGCACCTGCTGAAGACACATGGAGTGCACCTA
ACTTGTAAGGCTAGAGCCTTAGCCCAAAATGAAGCCCTTCAGCTCATTGTTGAAAGCATTAAACGA
GATCAACCTAAAAAAGGGTATTTGAATTTGTGCAAAGAAATGATTGA

pSRGA6

AGCCAAAGCCATCTACAGTCGAATTCATCGTAGATTCACGGGTAGATGTTTCATTGAAGATATTCCGAGA
AGTTTGTGAAACAGATCGAAGAGGGCATGTTTCATTTGCAAGAACAACCTCTTTCAGATGTCCTTAAAAC
AAAGGTGAACATAAAAAAGCGTTGGGATAGGAAGAGCTATGATGGAGAGCAAACCTTCTGGAACAAAGG
TCACTCATTGTACTTGATGATGTTAATGAGTTTGGTCAGTTAAAAAGTCCATATGCGGAAATCGTAAATG
GTTTGGTCAAGGTAAGTATAGTAATCATTACAACACTAGAGATGTACGCCTACTTCACAAACTTAAAGTT
GATTTTGTATAAAAAAGGAGAAATGGACGAAAATAAGTCCCTTGAGCTTTTGTAGTTGGCATGCTTT
TGGAGAAGCAAAAACCAATAGAAGAGTTTCGATGAACTTGCAAGAAATGTAGTT

pSRGA7

AGTTTATAATTCCATTGCTGACCATTTTGAAGCTTTGTGTTTCTTGAAAACGTGAGAGAAACTTCAA
AAAAACATGGGTTACAACATCTCCAAAGCAACCTTCTTTCTGAAACAGTTGGAGAGCATAAGTTAATA
GGTGTGAAACAAGGAATTTCCATAATACAGCATAGGCTTCAGCAACAGAAAGATTCTTTTGATTCTAGA
TGATGTTGACAAAAGGGAGCAGCTACAGGCGCTTGGTCAGTTAAAAAGTCCATATGCGGAAATCGTAAATG
AGTCATCATCACGACTCGGGACAAACAATTTGCTAGCATGTCACGGTGTGAAACGAACATATGAGGTGAA
TGAATTTGAATGAGGAACATGCTCTTGAATTAATTAAGTTGGAAGG
TTTCAAGTTGGAAAAAGTTGATCCATTTACAAGGATGTTCTGAATCGAGCAGCAACTTATGCTTCGG

pSRGA8

AGCGAGAGTTGTATTTAAGAAAATACGTAACAAATTTGATATTAGTTGCTTCTTGAAAACGTAAAGG
AGATTTCTCAGAATAGTGATGGCATGCTTAGCTTACAAGGAAAACCTTCTTTCTCACATGAAAATGAAA
GACTTGAAAATACAAAATTTGGACGAAGGAAAAAGCATCATAGGAGGTATCTTATTCAACAACAAAGT
TCTCTGGTCTTGTATGATGTTAATGACATAAGACAACACTAGAGAATTTGAGTGTGAATGATCAAAAGT
GGTTAGGCCCTGGAAGCAGGATTATAATAATTACAAGAGACATGGAAGTACTAAGATCACATGGAACA
GTTGAAAGTTACAAAATTTGATCTCTTAAATTTCTGATGAATCCCTTCAACTCTTCAGTCAGAAAGCATT
TAAAAGAGATCAACCATTAGAACATCTATTGCAGTTGTCAAAAGTGGCT

Fig. 3. Nucleotide sequence of disease resistance gene analog clone, pSRGAs, from Iksan namul-kong

pSRGA의 염기서열은 GenBank에 등록된 염기서열 중 콩과 완두의 병해 저항성 단백질 상동 유전자의 부분 염기서열과 각각 82-96%와 83%의 높은 상동성을 나타냈었다 (Table 2).

Table 2. Summary of sequence comparison results of pSRGAs isolated from Iksannamul-kong

	Sequence identity
pSRGA3	93% to <i>Glycine max</i> clone RLG3 disease resistance protein homolog gene; 94% to <i>Medicago sativa</i> clone MSRGA46 resistance gene analog protein gene
pSRGA4	96% to <i>Glycine max</i> clone RLG4 disease resistance protein homolog gene; 83% to <i>Pisum sativum</i> putative NBS-LRR type disease resistance protein gene
pSRGA5	99% to <i>Glycine max</i> clone RLG5 disease resistance protein homolog gene; 93% to <i>Vigna unguiculata</i> DNA, nucleotide-binding site sequence (resistance gene analog) linked to the Cry locus
pSRGA6	83% to <i>Glycine max</i> clone RLG6 disease resistance protein homolog gene; 95% to <i>Vigna unguiculata</i> DNA, nucleotide-binding site sequence (resistance gene analog)
pSRGA7	98% to <i>Glycine max</i> clone RLG7 disease resistance protein homolog gene; 82% to <i>Vigna vexillata</i> disease resistance protein homolog gene sequence
pSRGA8	98% to <i>Glycine max</i> clone RLG8 disease resistance protein homolog gene; 81% to <i>Vigna unguiculata</i> DNA, nucleotide-binding site sequence

전체 pSRGA의 상동성은 28.5%로 매우 낮았으며 pSRGA3과7번 사이의 상동성이 가장 높았고 pSRGA3과 4번의 상동성이 가장 낮았다 (Fig. 4).



Fig 4. Phylogenetic similarity among pSRGAs isolated from Iksannamul-kong.

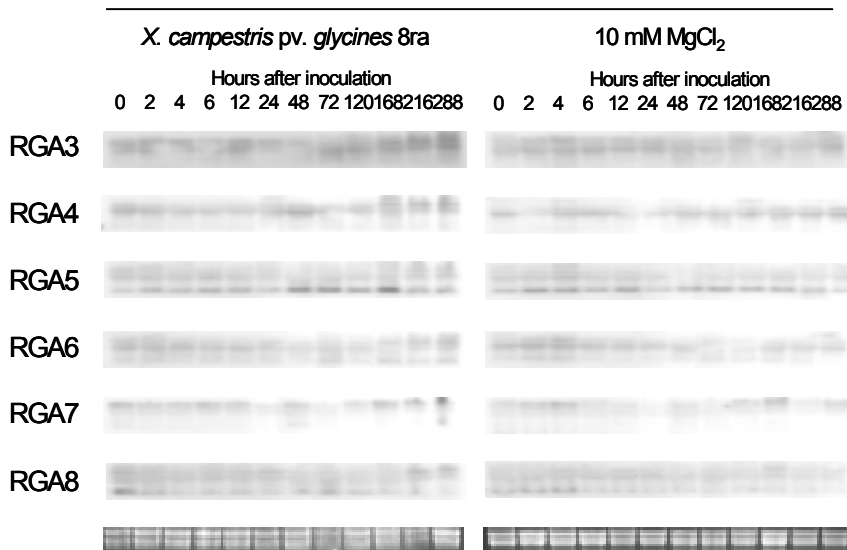
2) 병해 저항성관련 유전자유사체의 발현

분리된 pSRGA 클론의 발현양상을 저항성 품종과 이병성 품종에서 비교 분석하여 병해 저항성관련 유전자유사체의 불마름병 저항성 관련 여부를 조사하였다.

(1) 병 저항성 유전자유사체의 불마름병균에 대한 반응

불마름병원균 복합저항성 품종인 단백콩과 감수성 품종인 수원157에 불마름병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra)을 접종하여 병저항성 유전자 유사체 6종 (RGA3, 4, 5, 6, 7, 8)의 발현양상을 비교하였다. 불마름병균(2×10^8 /ml)을 접종하고 36시간 동안 습실처리한 후 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 216, 288 시간 경과 후에 잎을 채취하였다. 채취한 잎으로부터 분리한 전체 RNA를 formaldehyde/agrose gel을 이용하여 분리하고 Northern 분석을 실시하였다. 대조처리는 10mM MgCl₂를 사용하였다. 병 저항성 유전자유사체는 발현이 되지 않거나 매우 낮게 발현되었으며 불마름병균의 접종에 의해서는 발현이 유도되지 않았다 (Fig. 5). 이러한 결과는 병 저항성 유전자 유사체는 불마름병 저항성과 깊은 관계가 있지 않음을 의미하는 것으로 해석된다.

Glycine max cv. *Suwon 157*



Glycine max cv. Danbaek

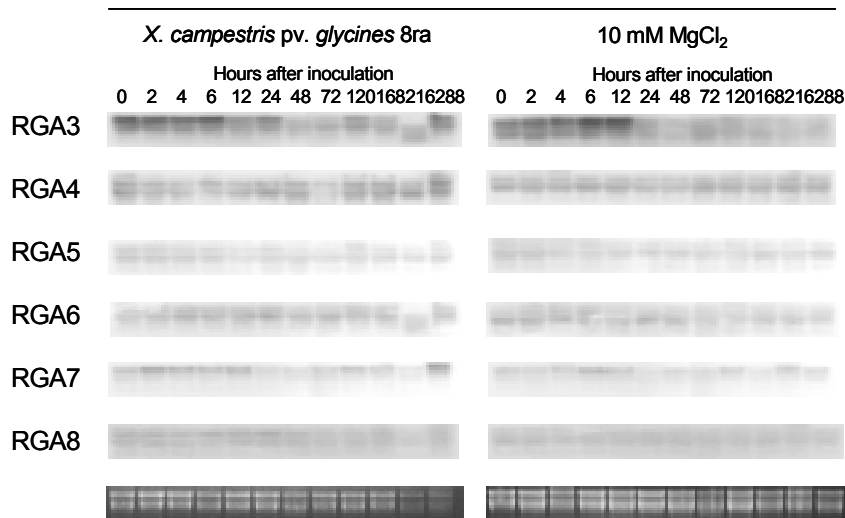


Fig. 5. Expression of resistance gene analogues (RGAs) in response to *X. campestris* pv. *glycines* 8ra in the mid-resistant variety Danbaek and the susceptible variety Suwon 157.

(2) 병 저항성 유전자유사체의 산화적 장애 및 스트레스 호르몬에 대한 반응

각종 생물적, 비생물적 산화적 장애와 스트레스 호르몬에 의한 유전자 발현 유도조건에서의 병 저항성 유전자유사체의 발현 양상을 불마름병 저항성 감수성과 저항성 품종조합인 수원 157 과 단백콩와 장엽콩과 SS2-2 등 조합에서 비교 조사하였다. 완전 전개한 제 1본엽에 대하여 상처, UV, yeast extract (elicitor, 25 mg/ml), 0.1 mM paraquat (PQ), 5 mM H₂O₂, 0.7 mM jasmonic acid (JA), 10 mM salicylic acid (SA), 5 mM ethephon, 100 uM abscisic acid (ABA) 등 발현 유도처리를 하였다. 병 저항성 유전자유사체의 발현은 어느 품종에서도 어떠한 처리에 의해서도 유도되지 않았다 (Fig. 6). 이러한 결과는 병 저항성 유전자유사체의 발현이 본 실험에서 사용한 검출한계 이하로 매우 낮게 발현되거나 발현이 유도되지 않으며 이는 병 저항성 유전자유사체가 불마름병 저항성 기작에 중요한 역할을 수행하지 않음을 나타낸다.

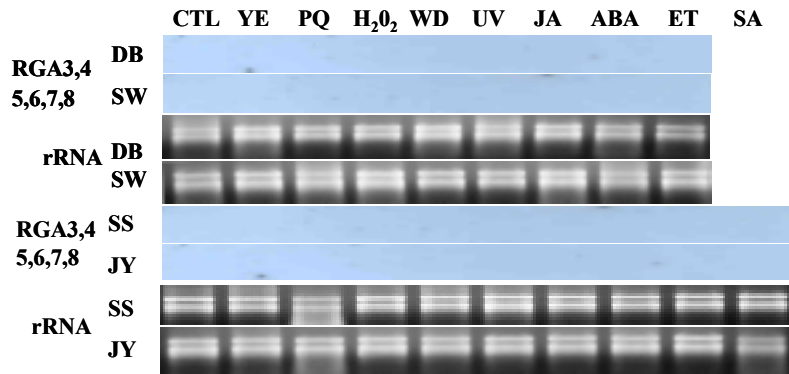


Fig. 6. Expression of resistance gene analogues (RGAs) in response to biotic and abiotic stresses and stress phytohormones in the mid-resistant varieties Danbaek (DB) and SS2-2 (SS) and the susceptible varieties Suwon 157 (SW) and Jangyeop (JY).

나. 세균 및 진균병 저항성관련 유전자의 발현 양상 비교를 통한 분자표지 개발

발병관련 유전자와 phytoalexin 생합성관련 유전자는 세균과 진균의 병해 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있지만 불마름병과의 관련성에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 발병관련 유전자와 phytoalexin 생합성관련 유전자 또는 EST clone을 확보하여 유전자의 발현 양상을 저항성과 이병성 품종에서 비교 분석하여 유전자의 불마름병 저항성과의 관련성을 조사하였다.

1) 세균 및 진균병 저항성관련 유전자의 분리

병해 저항성 유도물질인 phytoalexin의 생합성에 관련된 phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CS), isoflavone synthase (IFS), 그리고 세균병 저항성과 관련된 SAM의 불마름병 저항성과 관련성을 조사하기 위하여 이들 유전자를 분리하였다. 유전자의 분리는 생물정보학적 방법을 이용하여 기존의 동일 또는 다른 식물종에서 알려져 있는 동일 유전자군의 서열을 비교하여 각 유전자에 특이적인 primer를 제작하고 일반적인 RT-PCR 또는 일반 PCR 방법을 이용하여 증폭된 유전자 단편을 cloning 하였다. 익산나물콩에서 분리된 PAL, CS 및 IFS의 염기서열은 그림과 같다 (Fig. 7) 본 연구에서 분리된 PAL2, CS 및 IFS의 아미노산 서열은 기존의 알려진 유전자의 아미노산 서열과 각각 98, 92, 100%의 상동성을 나타내었다. 발병관련 유전자인 PR-1a와 peroxidase(Per) 유전자는 고려대학교에서 분양받아 사용하였다.

A. Soybean PAL2 amino acid sequence

```

      5      10      15      20      25      30
1 MEHI LEGSS YVKA AKKLREIDPLDKPKDDR
31 YALRTSPDWLGPLIEVIRFSTKSIEREINS
61 VNDNPLIDVSRNKALHGGDFDGTPIGVSMND
91 NTRLALASIGKLMFAQFSELVNDYYNNGLP
121 SNLTASRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELD
151 YLANPVTSHVQSAEDHNDVNSLGLISSRK
181 THEAIEILKLMSSSTFLVALCOAIDLRLHLEE
211 NLKNTVKNVVSQVAKRTLTTGVNGELHPSR
241 FCEKDLLKVVVDREYTFAYIDDPSCSGTYPLM
271 QKLRQVLVDYALANGENEKNTNTSIFOKIA
301 TFEELKTL LPKVEVEGARVAYENDOCAIPN
331 KIKECRSYPLYK FVREELGTALLTGERVIS
361 PGEECDKVFTALCQGKIIDP LLECLGEWNG
391 APLPIC

```

B. Soybean CS sequence

```

      5      10      15      20      25      30
1 MCAYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAAVK
31 AIKEWGPSPKSKITHLIFCTTSGVDMPGADY
61 OLTKDLGLRPYVKRYMMYDQCFAGGTVLR
91 LAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPS
121 DTHLDSLVGOALFGDGA AAVIVGSDPIPOV
151 EKPLYELVWTAQTIAPDSEGAIDGHLREVG
181 LTFHLLKDVPGIVSKNIDKALFEAFNPLNI
211 SDYNSIFWIAHPGGPAILDQVEOKLGLKPE
241 KMKATRDKVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRK
271 SAENGHKT TGEGL EWGVLF GFGPGLTIETV
301 VLHSAVAI

```

C. Soybean IFS sequence

```

      5      10      15      20      25      30
1 MLLELALGLFVLALFLHLRPTPSAKSKALR
31 HLPNPPSPKPRLPFIGHLHLKDKLLHYAL
61 IDLSKKHGPLFSLSFGSMPTVVASTPELKF
91 LFLOTHEATSFNTRFOTSAIRRLTYDNSVA
121 MVPFGPYWK FVRKLI MNDLLNATTVNKLRP
151 LRTQDIRKFLRVMAQSAEAQKPLDVTEELL
181 KWTNSTISMMMLGEAEEIRDIAREV LKIFG
211 EYSLTDFIWP LKYLKVGKYEKRIDDILNKF
241 DPVVERVIKKRREIVRRRKNGEVVEGEASG
271 VFLDTLLEFAEDETMEIKITKEOIKGLVVD
301 FFSAGTDSTAVATEWALAE LINNPRVLOKA
331 REEVYSVVGKDR LVDEVDTONLPYIRAIVK
361 ETRFMHPPLPVVKRKCTEECEINGYVIPEG
391 ALVLFNVWQVGRDPKYWDRPSEFRPERFLE
421 TGAEGEAGPLDLRGQHFOLL PFGSGRRMCP
451 GVNLATSGMATLLASLI DCFDLOVLGPOGD
481 ILKGDDAKVSMEERAGLTV PRAHSLVCVPL
511 ARIGVASKLLS

```

Fig. 7. Amino acid sequences of phenylalanine ammonia-lyase (A), chalcone synthase (B), and isoflavone synthase (C) deduced from DNA sequences of corresponding clones isolated from Iksannamul-kong.

익산나물콩에서 분리된 CS의 염기서열은 기존의 알려진 콩의 CS와 전체염기서열이 84.4% 동일하였다(Fig. 7). 익산나물콩에서 분리한 아미노산 서열은 N-말단 30개가 부족하였으며 나머지 서열은 100% 동일하였다.

2) 세균 및 진균병 저항성 및 발병관련 유전자의 발현

(1) 불마름병균에 의한 병 저항성 및 발병관련 유전자의 발현

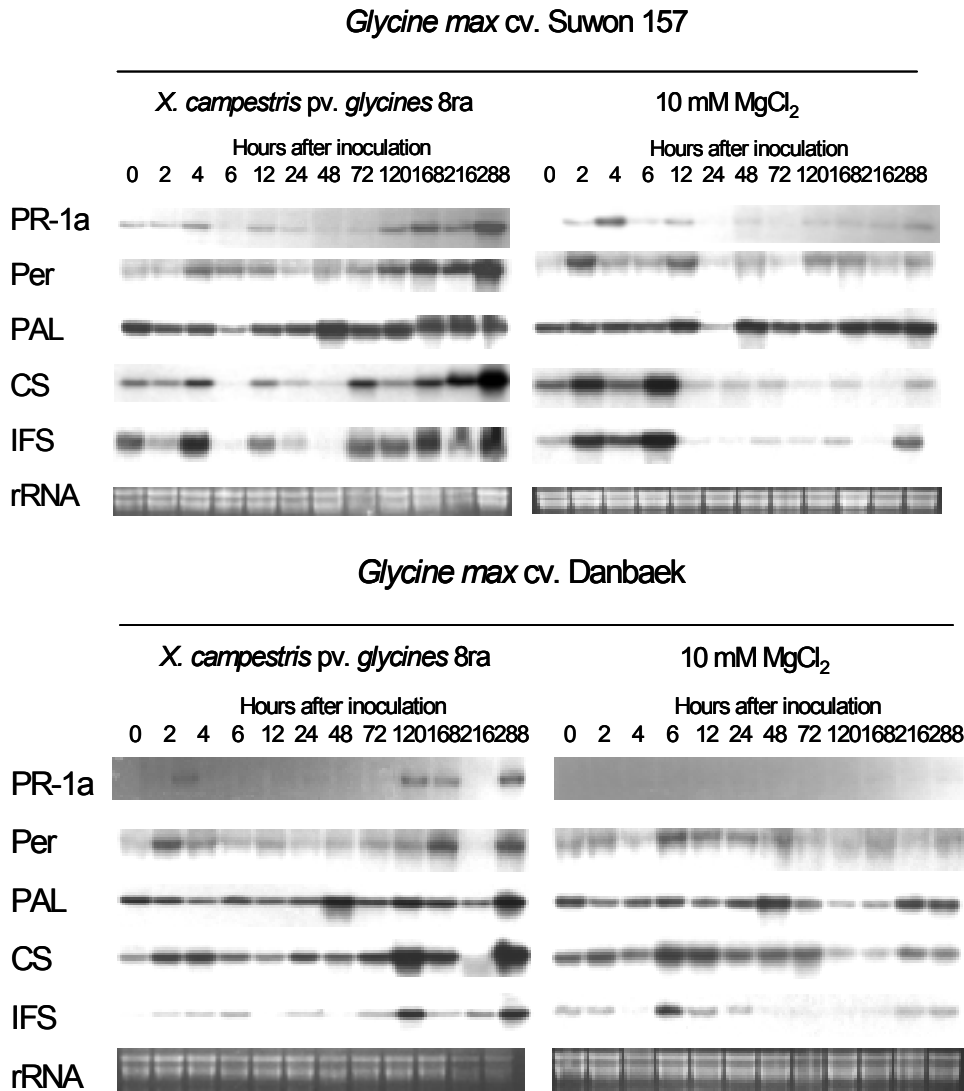


Fig. 8. Expression of genes related to pathogenesis and phytoalexin biosynthesis in

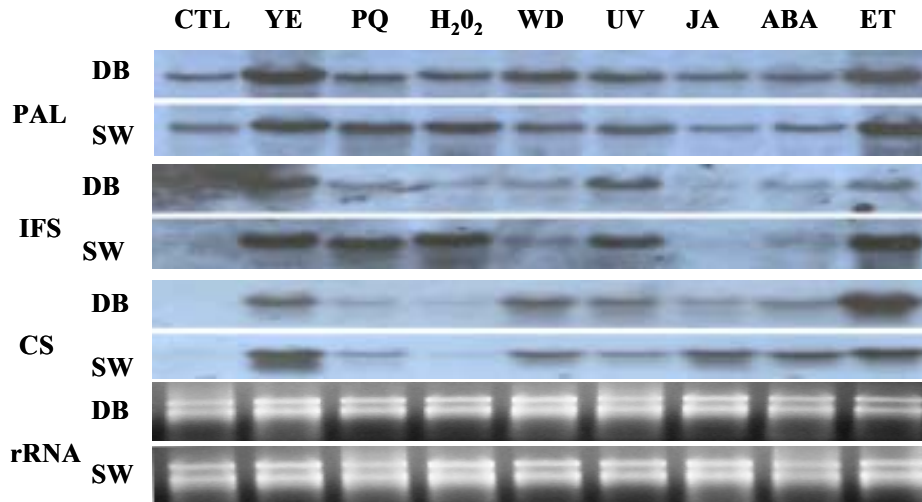
response to biotic and abiotic stresses and stress phytohormones in the mid-resistant varieties Danbaek and the susceptible varieties Suwon 157.

불마름병원균 복합저항성 품종인 단백콩과 감수성 품종인 수원157에 불마름병원균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines* F)을 접종하여 발병관련 유전자 5종 [pathogenesis related protein-1 (PR-1a), peroxidase (Per), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CS), isoflavone synthase (IFS)]의 발현 양상을 조사 비교하였다. 불마름병원균(2×10^8 /ml)을 접종하고 36시간동안 습실처리한 후 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 216, 288 시간 경과 후에 잎을 채취하였다. 채취한 잎으로부터 분리한 전체 RNA를 formaldehyde/agrose gel을 이용하여 분리하고 Northern 분석을 실시하였다. 대조처리는 10mM MgCl₂를 사용하였다.

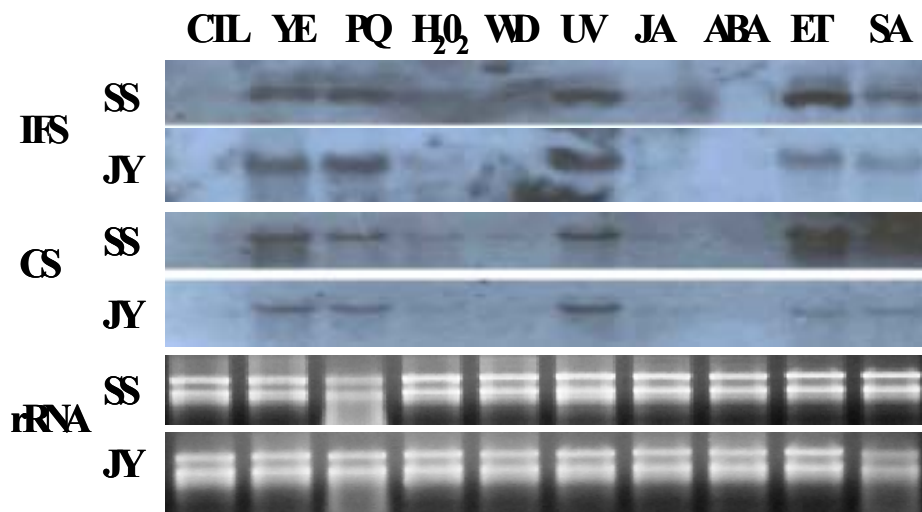
불마름병 접종에 의해 두 품종에서 모두 PR-1a, PAL, CS 유전자의 발현이 유도되었다. 불마름병 저항성 계통인 단백콩에서의 PR-1a, PAL, CS 유전자 발현은 불마름병원균 접종에 의해 72시간 이후부터 일반적으로 증가하는 경향이였다. 감수성 품종인 수원157에서도 유사한 발현 양상을 나타내었다. 일부 유전자의 경우 대조처리에 의해서도 유도되는 경향을 보였다 (Fig. 8). 실험의 반복 수행의 필요성이 있으나 이상의 결과는 일반적으로 알려져 있는 발병관련 유전자의 발현 정도가 불마름병 저항성 정도에 중요한 영향을 미칠 가능성이 낮은 것을 의미하는 것으로 생각된다.

(2) 병 저항성 및 발병관련 유전자의 산화적 장애 및 스트레스 호르몬에 대한 반응

A. Danbaek-kong (DB) and Suwon 157 (SS)



B. SS-2 (SS) and Jangyeop (JY)



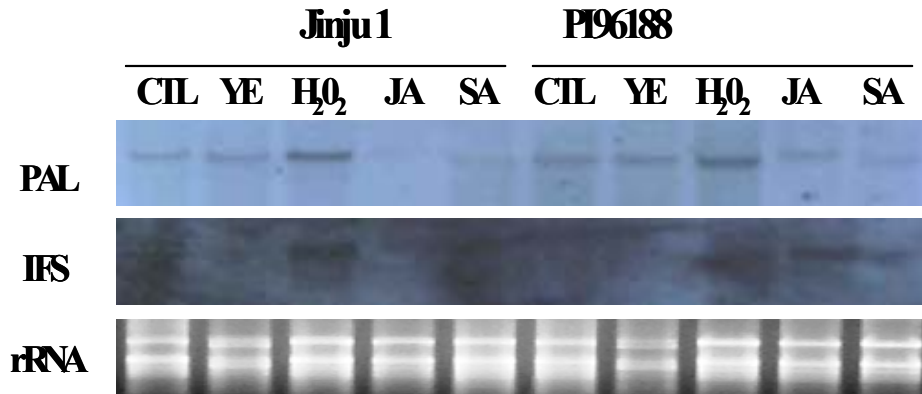


Fig. 9. Expression of genes related to pathogenesis and phytoalexin biosynthesis in response to biotic and abiotic stresses and stress phytohormones in the mid-resistant varieties Danbaek (DB), SS2-2 (SS), PI96188 and the susceptible varieties Suwon 157 (SW), Jangyeop (JY), and Jinju 1.

병 저항성 및 발병관련 유전자의 발현을 유도하는 조건에서 불마름병에 대한 감수성과 저항성 품종조합인 수원 157 과 단백콩, 장엽콩과 SS2-2, Jinju와 PI96188 등 3조합에 의 병 저항성 및 발병관련 유전자의 발현 양상을 조사하였다 (Fig. A, B, C). 완전 전개한 제 1본엽에 대하여 상처, UV, yeast extract (elicitor, 25 mg/ml), 0.1 mM paraquat (PQ), 5 mM H₂O₂, 0.7 mM jasmonic acid (JA), 10 mM salicylic acid (SA), 5 mM ethephon, 100 uM abscisic acid (ABA) 등 발현 유도처리를 하였다.

단백콩과 수원157에서 PAL은 각 처리에 대해 유사한 발현 양상을 보였으며, elicitor와 ethylene에 의해 발현이 크게 증가하였다. IFS는 elicitor, PQ, H₂O₂, UV, ethylene 등에 의해 발현이 유도되었으며, PQ와 H₂O₂에 대한 발현 양상이 상이한 경향이였다. CS는 두 품종에서 유사한 발현양상을 보였으며, elicitor, 상처, UV, JA, ABA, ethylene 등에 의하여 발현이 유도되었고 elicitor와 ethylene에 의한 발현 유도 정도가 높았다.

SS-2와 장엽콩에서 IFS는 elicitor, PQ, UV, ethylene 등에 의해 발현이 크게 유도되었으며, 상처, H₂O₂, JA와 ABA에 의해서는 발현이 유도되지 않거나 매우 낮게 유도되었다. CS의 발현 양상은 IFS와 매우 유사하였으며, elicitor, PQ, UV, ethylene 등에 의해 발현이 유도되었으며, 상처, H₂O₂, JA와 ABA에 의해서는 발현이 유도되지 않거나 매우 낮게 유도되었다. 각 유전자의 두 품종에서 발현 양상은 매우 유사하였다.

PI96188과 진주 1호에서 PAL과 IFS의 발현 양상은 다른 품종 조합과 다르게 H2O2에 의해 유도되었는데 두 품종의 발현 양상은 매우 유사하였다.

이상과 같이 3조합의 저항성과 감수성 품종에서 병 저항성 및 발병관련 유전자의 산화적 장애 및 스트레스 호르몬에 대한 반응 양상은 일반적으로 유사한 경향이였다. 이는 이들 유전자의 발현과 불마름병 저항성 정도와는 별다른 관계가 없는 것을 의미하는 것으로 해석된다. 몇가지 조건에서 일부 유전자의 발현이 품종간에 차이를 보이는 것을 불마름병 저항성보다는 품종고유의 특성이나 생리적 상태와 관련이 있는 것으로 생각된다.

(3) Isoflavone 함량과 불마름병 저항성과의 관계

Isoflavone 화합물은 phytoalexin의 일종이므로 불마름병 저항성과 isoflavone 함량과의 관계 여부를 불마름병 저항성 품종인 SS2-2와 감수성 품종인 장엽콩을 이용하여 조사하였다.

엽에 대한 각 처리 후 IFS 유전자 발현 양상과 isoflavone 함량의 변화를 조사하였다 (Fig. 10) 두 품종의 완전 전개한 제 1본엽에 대하여 상처, UV, yeast extract (elicitor, 25 mg/ml), 0.1 mM paraquat (PQ), 5 mM H2O2, 0.7 mM jasmonic acid (JA), 10 mM salicylic acid (SA), 5 mM ethephon, 100 uM abscisic acid (ABA) 등을 처리하여 phytoalexin의 생성을 유도하였다.

불마름병 저항성 정도가 다른 두 품종의 isoflavone 함량 변화 정도는 매우 유사하여 isoflavone 생합성 경로와 불마름병 저항성 정도와는 직접적인 관련성이 낮은 것으로 생각된다.

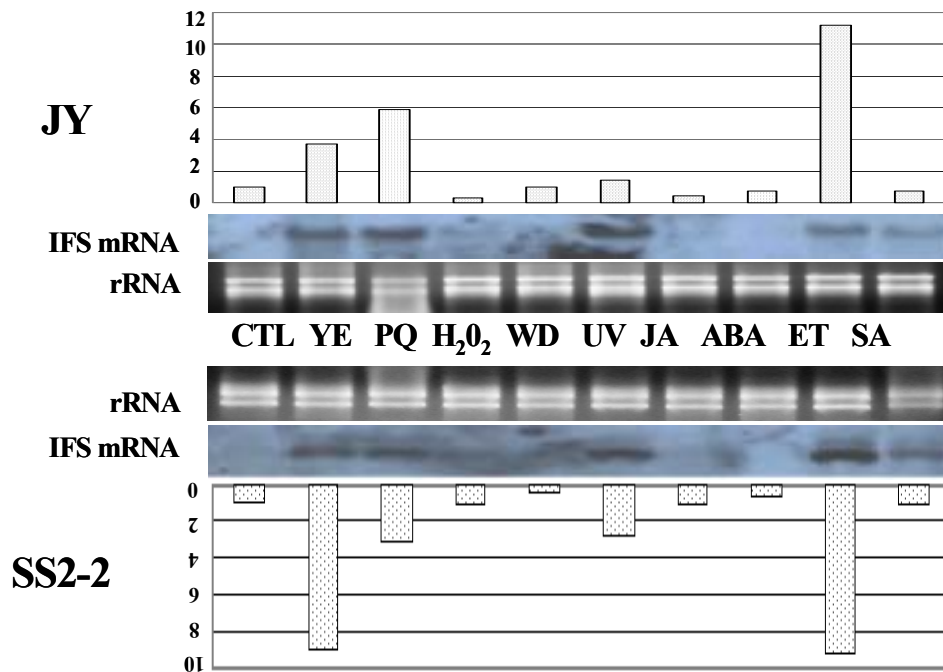


Fig. 10. IFS gene expression and changes in total isoflavone content in response to elicitor and abiotic stresses in Jangyeop-kong and SS2-2. YE (yeast extract, 25 mg/ml), PQ (0.1 mM paraquat), H₂O₂ (5 mM H₂O₂), WD (wounding), UV (1.35 uE/m²/s), JA (0.7 mM jasmonic acid), ABA (100 uM abscisic acid), ET (5 mM ethephon), SA (10 mM salicylic acid).

반응 양상이 품종 조합별로 매우 유사한 것으로 보아 SAM은 불마름병 저항성과 밀접한 관계가 없는 것으로 생각된다.

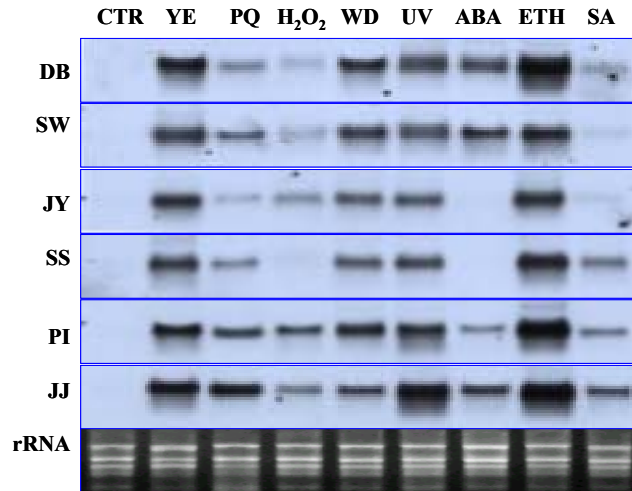


Fig. 12. Expression of SAM related to bacterial pathogenesis in response to biotic and abiotic stresses and stress phytohormones in the mid-resistant varieties Danbaek (DB), SS2-2 (SS), PI96188 (PI) and the susceptible varieties Suwon 157 (SW), Jangyeop (JY), and Jinju 1.

이상의 불마름병 저항성 정도와 유전자 유사체 및 병저항성 관련 유전자의 발현 양상에 대한 연구 결과로 미루어 보아 유전자 유사체 및 병 저항성 관련 유전자의 발현과 불마름병 저항성 정도는 직접적인 관련성이 낮은 것으로 생각된다. 이상의 결과와 같이 본 연구에서 검토한 유전자 유사체 및 병 저항성 관련 유전자가 불마름병 저항성과 직접적인 관련성이 낮은 것으로 판단되어 분리집단을 이용한 각 유전자와 불마름병 저항성과의 연관도를 조사하지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

최근 개발된 DNA의 자동염기서열 분석장치와 fluorescence-labelled primer set을 이용함으로써, 1회 전기영동에 의한 10여개 SSR 마커를 동시에 분석하여 식물의 유전자지도 작성을 신속하게 할 수 있는 기술을 발달시켰으며, 콩 세대진전을 위한 최적지인 태국(년간 자연상태에서 3-4세대 진전 가능) Kasetsart 대학과의 공동연구로 주요 콩 집단의 SSD에 의한 세대축진의 영속성을 확보하여 육종 목표의 변화에 대처하여 우수한 품종을 조기에 육성할수 있는 체계를 확립하였다. 한편, 우리나라의 교배 모부분으로 이용되고 있는 콩 계통에 대한 불마름병 저항성 정도를 균계별로 연구하여 향후 연구를 위한 기반을 육성하였다. 또한, 수원 157호 x 단백콩 및 PI96188 x 진주1호 집단에서 육성된 불마름병 콩 저항성 계통은 신품종 육성을 위한 재료로 이용될 것으로 기대된다.

2. 제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

본 실험은 현재 우리나라에서 문제시 되고 있는 콩불마름병과 관련하여 장려품종인 신평달 2호와 그 mutant인 SS2-2를 비교함으로써 저항성 유전자를 찾는 데 의의가 있다. 처음 이들 개체의 저항성 유전자 기작을 조사하기 위하여 Differential display 기법 중 RT-PCR 방법을 이용하여 개체간 mRNA 발현차이를 분석하였다. 증폭된 PCR 산물의 확인을 위해 polyacrylamide sequencing gel에 silver staining과정을 통해 band를 확인하였다. 실험규모에 비해 band 확인이 불분명하였고 실험과정상 주의를 요하는 부분이 많아 다른 방법을 시도하게 되었다. SSH라는 방법을 도입하여 실험상에서 빗어질 수 있는 오차를 최소한 줄일 수 있었고 이들 gene들을 Northern Blot을 통해 재확인하여 정확도를 높일 수 있었다. 이렇게 분리된 유전자는 타식물의 저항성 gene과의 유사성을 비교한 후, 콩이나 tobacco, Arabidopsis에서 병저항성이 검정되면 marker로써 이용할 수 있을 것이다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

연구 1차년도에는 병저항성 유전자유사체 5종 이상을 개발하였으나 유전자 유사체 6종을 개발하여 연구목표를 달성하였다. 유전자 유사체 6종의 불마름병 및 각종 산화스트레스 호르몬에 대한 반응 여부를 불마름병 저항성과 감수성 품종에서 조사한 결과, 유전자 유사체는 처리 및 품종에 불구하고 발현이 유도되지 않았다.

연구 2차년도에는 불마름병 저항성 콩으로부터 full-length cDNA 2종을 분리하여 그 발

현 특성을 조사하고자 하였으며, PAL, IFS, CS, SAM 등의 유전자를 분리하였다. 이들 병 저항성 유전자의 불마름병 및 각종 산화스트레스 호르몬에 대한 반응 여부를 조사하였으나 불마름병 저항성과 감수성 품종에서의 반응이 유사하여 이들 유전자는 불마름병 저항성과 직접적인 관련이 없는 것으로 나타났다.

연구 3차년도에는 1, 2차년도에서 조사한 유전자 중 불마름병 저항성과의 관련성이 인정되는 유전자에 대하여 분리집단을 이용하여 불마름병 저항성과의 연관도를 조사하고자 하였다. 그러나 1, 2차년도에서 조사한 병저항성 유전자유사체 및 발병관련 유전자 모두 불마름병과의 직접적인 관련성이 인정되지 않아 분자표지로서의 개발을 시도하지 못하였다.

결론적으로 3차년도의 연구목표인 불마름병 저항성 연관 분자표지 2종의 개발 목표는 달성하지 못하였다. 그러나 본 세부과제는 불마름병 저항성 기작이 알려져 있지 않은 상황에서 기존의 병저항성관련 정보와 불마름병 저항성과의 관계를 우선적으로 추구하는 생물정보학적 접근법을 사용하였으므로 이러한 결과도 예상할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 불마름병의 특이적 저항성 기작이 존재하며 이는 일반적 병해 저항성 기작과 차별적인 것임을 의미한다. 본 연구과정에서 얻어진 유전자 소재 및 연구방법 등은 콩의 복합저항성 증진 연구분야의 발전에 기여할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 활용방안

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

현재까지 우리나라 주요 콩 장러품종은 불마름병 감수성을 보여주고 있다. 본 연구에서 육성된 콩 불마름병 저항성 콩 계통은 교배 모부분으로 이용되어 불마름병 저항성 콩 계통 및 신품종 육성에 기여할 것으로 예상된다. 특히 본연구과제의 수행과정 중에 우리나라 불마름병원 균계를 대별하였으며, 이는 불마름병 저항성 판별에 기초가 될 것이며, 저항성 정도를 판별하는 양적 형질의 기준은 향후 식물병리학자 및 식물유전육종학자의 콩 불마름병 연구에 활용되리라 생각한다. 현재 수집 보관 중인 불마름병원균은 타 학문 분야의 이용 확대가 기대되며, 최종적으로 품종에 도입된 저항성 유전자는 농약사용 등에 따르는 위험부담, 물자 및 인건비를 줄이고, 농약사용을 감소시켜 건강한 국민 식생활에 제공할 것으로 전망된다.

2. 제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

SS2-2의 cDNA library를 구축함에 따라 partial gene에서 full length gene을 찾아 앞으로의 실험에서는 이미 찾은 gene을 콩이나 다른 작물에 transformation하여 재확인 한 후, marker로써 활용할 수 있을 것이다. 또한 기후나 환경조건이 변함에 따라 콩불마름병만이 문제가 되는 것이 아니라 병이 작물에 복합적으로 작용하는 경우가 많다. 따라서 병 저항성 기작을 통해 병원균에 직접적으로 작용하는 gene들의 기능뿐만 아니라 중간 인자들 즉, signal molecule에 대한 연구가 더 활성화 된다면 그 활용 가치는 더 높아질 것이다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

본 연구에서 분리한 유전자는 불마름병 이외의 병해 및 환경스트레스에 대한 저항성 증진에 기여할 수 있는 유전자 소재로 활용할 수 있다.

제2절 추가적 연구

1. 제1세부과제 : 콩 불마름병 저항성 유전분석 및 내병성 콩 계통 육성

본 연구 과정 중에서 새로 발견된 불마름병원균계에 특이한 반응을 보이는 PI96188의 반응은 아직까지 그 정확한 기작이 구명되지 않고 있다. 제한된 시간 및 유전자 집단 연구에 의하여 밝혀진 바에 의하면 PI96188 반응은 이미 보고되어 있는 불마름병 저항성 유전자 (rxp) 가 있는 연관군 D2와는 달리 연관군 O에 위치하여 있는 것으로 밝혀졌으나, 좀더 세밀한 연구가 필요하다. 한편, rxp 유전자와 연관된 Satt372와 Satt458 보다 더 근접한 마커를 개발하여 마커 선발에 좀더 효율적인 연구가 추가로 이루어져야 할 것으로 기대된다.

2. 제2세부과제 : 콩 불마름병 특이적 저항성 콩 유전자 분리 및 마커 개발

gene들의 기능을 알기 위해 signal molecule의 cascade mechanism 과 관련하여 protein 간의 상호작용도 조사할 필요가 있겠다. 그리고 SS2-2의 병저항성과 Jasmonate 와의 연관성이 판단되므로 Arabidopsis의 연구에 기초하여 콩에 있어서 JA dependant defence pathway에 대한 연구가 더 필요하며 SA나 ethylene defence pathway와의 상호작용 기작도 함께 수행해야 할 것이다.

3. 제3세부과제 : 콩 불마름병 저항성관련 후보식물유전자 분석에 의한 마커 개발

본 연구는 불마름병 저항성 기작이 알려져 있지 않은 상황에서 기존의 병저항성관련 정보와 불마름병 저항성과의 관계를 우선적으로 추구하는 생물정보학적 접근법을 사용하였다. 비록 본 연구에서 검토한 병 저항성관련 유전자유사체와 발병 및 phytoalexin 생합성 관련 유전자가 불마름병 저항성과 직접적인 관련성은 없는 것으로 나타났지만, 이들 유전자가 기타 병해 및 환경내성과의 관련성이 있는지의 여부를 조사하여 복합저항성 콩 품종 육종 소재로서의 가치를 평가할 필요가 있을 것으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

- Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ. 1994. RPS2 of Arabidopsis thaliana: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science 23:1856-1860.
- Bernard, R. L. and M. G. Weiss. 1973. Qualitative genetics. P. 117-146.
In B. E. Caldwell (ed.), Soybean: Improvement, production, and uses. Agron. monogr. 16. ASA, Madison, WI.
- Bellato CM. 1997. REGULATION OF THE EXPRESSION OF THE NOD BOX-INDEPENDENT NODULATION GENE, NOLX, IN SINORHIZOBIUM FREDII, A NITROGEN-FIXING SYMBIONT OF LEGUME PLANTS. FEMS Microbiology Letters, 157 (1):13-18.
- Benhamou, N. et al. (1996) Induction of defense related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol. 112 : 919-929.
- Buschges R, K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. van Daelen, T. van der Lee, P. Diergaarde, J. Groenendijk, S. Topsch, P. Vos, F. Salamini, P. Schulze-Lefert. 1997. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. Cell 7:695-705.
- Cregan, P. 1999. Personal comm.
- 차광홍 이용환 고속주 박종대 박인진. 1998. 농작물 병해 정밀조사 : 전남지역 주요 재배작물의 병해 종류 조사. 시험연구보고서, 전라남도농업기술원.
- Daryll B. DeWald, Hugh S. Mason and John E. Mullet. The Soybean Vegetative Storage Proteins Vsp α and Vsp β are Acid Phosphatase Active on Polyphosphates. The Journal Of Biological Chemistry. 267: 15958-15964.
- Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL. 1995. Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. Science 269:843-846
- Groth, D. E. and E. J. Braun. 1986. Growth kinetics and histopathology of

Xanthomonas campestris pv. *glycines* in leaves of resistant and susceptible soybeans. *Phytopathology* 76(10):959-965

Hartwig, E. E. and H. W. Johnson. 1953. Effect of the bacterial pustule disease on yield and chemical composition of soybeans. *Agron. J.* 45:22-23.

Hartwig, E. E. and S. G. Lehman. 1951. Inheritance of resistance to the bacterial pustule disease in soybeans. *Agron. J.* 43:226-229.

황인규 임승만. 1998. 콩 불마름병균의 병원성 변이. *Korean journal of plant pathology* Vol.14(1) pp.19-22.

Hugh S. Mason, Felix D. Guerrero. 1988. Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of dark grown soybean seedlings. *Plant Mol. Biol.* 11 : 845-856.

Hugh S. Mason and John E. Mullet. 1990. Expression of Two soybean Vegetative Storage Protein Genes during Development and in Response to Water Deficit, Wounding and Jasmonic Acid. *The Plant Cell.* vol 2 : 569-579.

Hwang, I and S. M. Lim. 1998. Pathogenic variability in isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Korean J. Plant Pathol.* 14(1):19-22.

John G. Turner, Christine Ellis. The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell* S153-S164.

Kanazin, V., L.F. Marek, R.C. Shoemaker. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11746-11750.

Lavolette, F. A., K. L. Athow, A. H. Probst, and J. P. Wilcox. 1970. Effect of bacterial pustule on yield of soybeans. *Crop Sci.* 10:150-151.

Li X. Schuler MA, Berenbaum MR. (2002) Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature* 2002 Oct 17;419(6908) : 712-715

Ludwig, A., and R. Tenhaken. 2000. Defense gene expression in soybean is linked to the status of the cell death program. *Plant Mol. Biol.* 44:209–218.

이승돈. 1999. 한국의 주요 식물세균병 발생 및 특성. Ph.D. Thesis. Seoul Nat'l Univ.

우정 허성기 조용섭. 1998. 콩 불마름병균의 생장 조건이 박테리오신인 glycinecin의 생성에 미치는 영향. *한국식물병리학회지* Vol.14(5) pp.376–381.

Manjaya JG. 1999. New genes for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and their inheritance. *Euphytica* ;106(3) 205–208.

Narvel, J.M., L.R. Jakkula, D.V. Phillips, T. Wang, S.H. Lee, and H.R. Boerma. 2000. Molecular mapping and pedigree analysis of *Rxp* conditioning reaction to bacterial pustule in soybean. Submitted to *J. Heredity*

Oh C. 1999. An *hrcU*-homologous gene mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra that lost pathogenicity on the host plant but was able to elicit the hypersensitive response on nonhosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* ;12(7) 633–639.

Ogarro LW. 1997. ONION LEAF BLIGHT CAUSED BY *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* – ALTERNATIVE HOSTS AND RESISTANT ONION GENOTYPES. *Plant Disease* ;81(9) 978–982.

Palmer, R. G., S. M. Lim, and B. R. Hedges. 1992. Testing for linkage between the *Rxp* locus and nine isozyme loci in soybean. *Crop Sci.* 32:681–683.

Pieterse, C.M.J. et al. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid and pathogenesis related gene expression. *Plant Cell* 8. 1225–1237

Pieterse, C.M.J. et al. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant cell* 10, 1571–1580.

Pieterse, C.M.J. et al.(2000) Rhizobacteria mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57 123-134.

Rukayadi Y.2000.Survival and epiphytic fitness of a nonpathogenic mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*.*Applied & Environmental Microbiology.*:66 (3):1183-1189.

서학수. 2001. JMT Gene of *Arabidopsis* Encoding a Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase that is a key Enzyme for Jasmonate-regulated Gene Expression. 서울대학교 박사학위 논문

Seehous, K., and R. Tenhaken. 1998. Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Mol. Biol.* 38: 1225-1234.

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 270:1804-1806

Van Wees, S.C.M, Mirjam Luijendijk. 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance(ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* 41 : 537-549.

Virk, P. S., H. S. Pooni, N. H. Syed, and M. J. Kearsey. 1999. Fast and reliable genotype validation using microsatellite markers in *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* 98:462-464.

Weber, C. R., J. M. Dunleavy, and W. R. Fehr. 1966. Effect of bacterial pustule on closely related soybean lines. *Agron. J.* 58:544-545.

Wen Song, Harry Solimeo. Functional Dissection of a Rice Dr1/DrAp1 Transcriptional Repression Complex. *The Plant Cell.* 14 : 181-195.

Yu, Y. G., M. A. Saghai Maroof, and G. R. Buss. 1996. Divergence and allelomorphic relationship of a soybean virus resistance gene based on tightly linked DNA microsatellite and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 92:64-69.

Zhijun Tang, Avi Sadka. 2001. Homeodomain Leucine Zipper Proteins Bind to the Phosphate Response Domain of the soybean Vsp B Tripartite Promoter. *Plant Physiology.* 125 : 797-809.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

