콩 소청2호의 균주 특이적 역병 저항성 유전자좌

장영은¹ · 장익현¹ · 강인정² · 김지민³ · 강성택³ · 이성우^{1*}

¹충남대학교 식물자원학과, ²국립식량과학원 증부작물부 재배환경과, ³단국대학교 식물생명공학과

Two Isolate-specific Resistance Loci for *Phytophthora sojae* in the Soybean Socheong2

Young Eun Jang¹, Ik Hyun Jang¹, In Jeong Kang², Ji-Min Kim³, Sung-Taeg Kang³, and Sungwoo Lee^{1*}

¹Department of Crop Science, Chungnam National University, Daejeon, 34134, Republic of Korea

²Division of Crop Cultivation and Environment Research, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Suwon, Gyeonggi-do, 16613, Republic of Korea

³Department of Crop Science and Biotechnology, Dankook University, Cheonan, Chungnam, 31116, Republic of Korea

Abstract *Phytophthora* root rot attributable to infection by the soil-borne oomycete *Phytophthora sojae* causes serious damage to susceptible soybeans grown in poorly drained soil. Management of this disease depends primarily on *Rps* (resistance to *P. sojae*) resistance genes. The objective of this study was to map resistance to two *P. sojae* isolates (40412 and 2457) in a Daepung × Socheong2 recombinant inbred line population. Of these two varieties, Socheong2 is resistant to the two isolates, whereas Daepung is susceptible. Single-marker analysis of variance and linkage analyses using a high-density genetic map identified different resistance loci for each isolate. A genomic region of 36.2~37.4 Mbp on chromosome 3 was identified as being associated with resistance to isolate 40412, explaining 18% of the phenotypic variance (PV), whereas, a 2.1~2.6-Mbp region on chromosome 18 was significantly associated with resistance to isolate 2457, accounting for approximately 26% of the PV. An additional region of 53.1~53.3 Mbp on chromosome 18 was also significantly associated with resistance to isolate 2457. All three loci coincide with genomic regions where an *Rps* gene or partial resistance have been mapped in previous studies. The respective locus showed significance for only one or the other of the isolates, indicating an isolate-specific interaction. From this finding, it can be inferred that isolates 40412 and 2457 are characterized by different avirulence genes, and that Socheong2 has at least two *Rps* genes that interact with each isolate. The finding of multiple *Rps* loci specific to an isolate within a single soybean genotype is a unique discovery. Socheong2 will accordingly be a useful genetic source for breeding resistance to multiple *P. sojae* isolates.

Keywords Soybean, *Phytophthora sojae*, Disease resistance, Isolate specificity, High-density genetic map

Received on October 5, 2020. Revised on October 5, 2020. Accepted on October 12, 2020.

* Corresponding Author (E-mail: sungwoolee@cnu.ac.kr, Tel: +82-42-821-5727, Fax: +82-42-822-2631)

서 언

콩 [*Glycine max* (L.) Merr.] 역병은 토양에 생존하는 난균류인 콩 역병균(*Phytophthora sojae* Kauffmann and Gerdemann)에 의해 전염된다. 감수성 콩 식물체가 콩 역병균에 감염되면 뿌리와 줄기 썩음으로써 고사하게 되고 이는 결과적으로 수량을 감소시킨다. 특히, 북미지역에서 콩 역병은 수량 감소에 큰 영향을 미치고 있어 1996년부터 2014년 사이 매년 평균 백만 톤에 해당하는 생산량 손실의 원인이 되었으며, 이 외에도 브라질, 아르헨티나, 중국, 일본과 호주에서 발생이 보고되었다(Wrathier & Koenning 2006, Dorrance & Grünwald 2008, Allen et al.

2017, Akamatsu et al. 2019).

콩 역병균(*P. sojae*)은 습하고 배수가 불량한 토양에서 콩 뿌리가 분비하는 이소플라본에 대한 화학성(chemotaxis)에 의해 전파되는 것으로 알려져 있다(Morris & Ward 1992). 물 속에서 생성된 유주자낭이 빠르게 유주자를 퍼뜨리고 뿌리 표면에 닿은 유주자는 빠르게 뿌리의 관조직에 침입한다(Ranathunge et al. 2008). 또한 유성생식으로 난포자를 형성하는데, 이는 토양 내에서 휴면 상태로 살아남게 된다(Dorrance et al. 2008). 감염 증상은 식물의 전 생장 단계에서 관찰할 수 있는데 생장 초기에는 종자의 썩음이나 유묘의 시듦이 발생하고, 생장 후기 감수성 식물체의 뿌리가 역병균에 감염되면 뿌리와 줄기가 점차 썩고 잎과 줄기가

시들며 식물체가 죽게 된다(Schmitthenner 2000).

콩 역병의 방제법으로는 화학적, 생물학적, 경종적 방법이 연구되고 있고(Workneh et al. 1998, Xiao et al. 2002, Bradley 2008, Dorrance 2018), 가장 주된 방법은 병 저항성 품종을 재배하는 것이다. 콩의 역병 저항성 기작은 *Rps* (*Resistance to Phytophthora sojae*)라는 저항성 유전자(*R-gene*, *R*)에 의해 형성되는 저항성(qualitative resistance)에 대한 연구가 주를 이룬다. 식물체에서 *R* 유전자에 의해 생성되는 R 단백질은 병원균이 생성하는 비병원성(avirulence, *Avr*) 단백질을 특이적으로 인식하여 저항성을 가지게 되는데, 이러한 상호작용을 유전자-대-유전자(gene-for-gene) 저항성이라고 한다(Flor 1951, Holt et al. 2003). *Avr* 단백질은 동일한 병원균에서도 각각의 레이스에 따라 다른 구조를 가지며 이러한 특성이 단백질을 암호화하는 유전자(*Avr*)에 의해 유지된다.

콩 역병에 대한 연구는 미국, 중국, 일본 등에서 활발하게 이루어졌다(Sugimoto et al. 2008, Sun et al. 2018, Dorrance 2019). 복수의 유전자원에서 9개 염색체에 분포하는 30개 이상의 역병 저항성 유전자 또는 대립유전자가 알려졌고, 이 중 염색체 3번, 13번, 18번에서는 복수 유전자좌가 탐색되었다(Demirbas et al. 2001, Weng et al. 2001, Burnham et al. 2003, Sandhu et al. 2004, Sugimoto et al. 2008, Yu et al. 2010, Sugimoto et al. 2011, Sun et al. 2011, Lin et al. 2013, Sun et al. 2014, Cheng et al. 2017, Li et al. 2017, Niu et al. 2017, Sahoo et al. 2017, Zhong et al. 2018, Jang & Lee 2020).

우리나라에서는 충남 홍성과 청양 지역에서 처음 콩 역병이 발견, 분리되었으나(Jee et al. 1998) 이후 연구가 많이 수행되지는 않았다. Kang et al. (2019)는 20개 국내 주요 콩 품종은 하나 이상의 역병 균주에 대해 감수성을 보였고, 대풍을 비롯한 10개 품종은 4개의 균주에 대해 모두 감수성을 나타냈다고 보고했다. 최근에는 배수가 비교적 불량한 논에서의 콩 재배가 확대됨에 따라 토양 병해의 발생 보고가 증가하고 있으나, 여전히 국내 저항성 품종에 대한 유전 분석은 보고되지 않았다. 이에 본 연구에서는 역병 저항성 유전자 탐색을 위해, 대풍×소청2호 재조합 자식 계통(recombinant inbred line, RIL) 집단을 이용하여 2개의 균주에 대한 저항성 검정 및 연관분석을 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

본 연구에서는 대풍×소청2호 RIL집단에 대한 역병 저항성

검정과 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전자형 분석을 통해 콩 역병 저항성 유전자의 유전체 상의 위치를 탐색하였다. 장류용 콩인 대풍을 모본, 밥밀용 검정종피 녹색자엽콩인 소청2호를 부분으로 2012년 여름 단국대학교 실험 포장에서 처음 인공교배를 실시하였다. 2012년 가을 20개의 F₁ 종자를 수확하였고, 그 해 겨울에 온실에서 세대 진전시켜 F₂ 종자를 얻었다. 2013년 여름 노지 포장에 179개의 F₂ 종자를 파종하였고, F₂ 세대부터 1개체 1계통(single seed decent, SSD) 육종법으로 하계 및 동계에 각각 세대를 진전시켰다. 2017년 동계 온실에서 F₆ 세대 개체로부터 F_{6:7} 종자를 수확하여 총 114개 계통으로 이루어진 RIL 집단을 육성하였다. 단국대학교로부터 분양 받은 집단을 2019년 충남대학교 실험 포장에서 증식하여 본 연구에 이용하였다.

본 연구에 이용한 역병균은 균주 40412(KACC. 40412)와 2457로 선행연구에서 국내 품종 20개에 대한 저항성 검정에 이용된 바 있다(Kang et al. 2019). 대풍은 콩 역병 균주 40412와 2457에 대해서 모두 감수성을 보였고(Kang et al. 2019), 소청2호는 두 균주에 대해 모두 저항성을 보였다(Fig. 1).

콩 역병 저항성 검정

대풍, 소청2호, 대풍×소청2호 RIL 집단을 대상으로 콩 역병 균주 40412와 2457에 대한 저항성 검정을 실시하였다. 이용 가능한 종자 수의 제한으로 인해 균주당 각각 75, 65개의 계통만 저항성 검정에 이용되었다. 각 집단에 대해 난괴법(Randomized complete block design, RCBD)으로 실험을 설계하였고, 전체 실험을 3번 반복하였다. 저항성 검정은 Dorrance et al. (2004)에 기술된 하배축 접종(Hypocotyl inoculation) 방법으로 수행하였다. 접종 전 10일에 V8 배지에 *P. sojae* 균주 40412와 2457을 치상하고 배지들을 25℃, 암조건에서 향온 배양하였다. 각 계통

Fig. 1. Reactions of Socheong2 (left) and Daepung (right) following inoculation with *P. sojae* isolates 40412 (A) and 2457 (B).

당 10~15립의 종자를 상토를 채운 플라스틱 포트(지름 13 cm, 높이 10 cm)에 파종하고 온실에서 발아시켰다. 파종 7~8일 후 하배측 상단의 중심부를 의료용 칼날을 이용하여 1 cm 길이로 세로로 절개한 후, 유묘의 절개부위에 마쇄한 배지를 접종하였다. 배지의 마쇄는 50 ml 주사기에 2~3회 통과시키는 방법으로 시행한 후 10 ml 주사기와 18 게이지(G) 굵기의 바늘을 이용하여 하배측 절개 부위 내부 관다발계에 충분한 양의 배지가 닿을 수 있도록 약 0.2~0.4 ml씩의 배지를 충전하였다. 접종 후 식물은 약 16시간 동안 고습처리 후, 생장상(25℃, 낮/밤 14/10시간)에서 배양하였다.

접종 7일 후 유묘의 저항성과 감수성 반응을 관찰하고, 각 계통별로 전체 유묘 개수에 대한 고사 유묘 개수의 비율(%)을 다음과 같이 계산하였다 [고사한 유묘/전체 유묘 개수 $\times$ 100(%)]. 고사한 유묘의 비율이 20% 이하면 저항성(resistant), 80% 이상이면 감수성(susceptible), 20% 초과 80% 미만인 경우 중간형(intermediate)으로 각 계통의 표현형을 결정하였다.

DNA 추출 및 SNP 유전자형 분석

모 · 부분과 각 계통의 어린 식물체로부터 어린잎을 채취하여, Doyle & Doyle (1987)에서 제시한 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 방법으로 DNA를 추출하였다. 각 DNA 시료에 대해 Axiom® 180K SoyaSNP array (Affymetrix, Santa Clara, USA)를 이용하여 SNP 유전자형 분석을 수행하였다. SNP 유전자형 분석으로부터, 114개 계통에 대해 169,028개의 SNP 유전자형 데이터를 얻었고 유전분석에 앞서 전처리 과정을 수행하였다. 먼저, 모부분 간 다형성을 보이지 않거나 모부분 유전자형이 불확실한 SNP 139,755개를 제거하였다. 다음으로, 결측치와 이형접합형(heterozygosity)의 비율이 전체의 10% 이상인 SNP 395개와 계통 4개를 각각 제거하였다. 최종적으로 분리 왜곡(segregation distortion)이 심한 1,302 SNP를 제외 후 114개 계통에 대한 27,576개의 SNP 유전자형 데이터를 추려 이를 다음 유전분석에 이용하였다.

SNP 유전자형에 대한 일원분산분석

SNP 유전자형과 각 군주에 대한 저항성 간 연관을 검정하기 위해 27,576개 SNP 유전자형에 대한 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 각 군주 저항성 반응에 이용한 75개와 65개 계통에 대해 수행하였다. 통계분석프로그램 R (R Team 2019)의 패키지 lme4(Bates et al. 2015)를 이용하였다.

유전자지도 작성과 유전자지도를 이용한 연관분석(Linkage analysis)

유전분석프로그램인 IciMapping version 4.1 (Meng et al. 2015)을 이용하여 대풍 $\times$ 소청2호 집단의 유전자지도를 작성하였다. BIN 기능을 이용하여 27,576개 SNP 중 중복 정도와 결측치가 높은 SNP를 제거하였다. 이후 MAP 기능을 이용하여 남아있는 10,477개 SNP를 연관 정도에 따라 20개 연관군으로 분류하고 위치를 계산하였다(Table 1). 계산된 유전자 연관지도를 이용한 연관분석은 BIP 기능의 ICIM (Inclusive composite interval mapping)-ADD 방법으로 수행하였고, 1,000번의 순열 검정(permutation test)을 수행하여 연관분석 결과의 통계적 유의성(log of odds, LOD)에 대한 기준(LOD threshold)을 결정하였다. 통계적 유의성을 보이는 유전자좌의 상가적 효과(additive effect)는 표현형에 미치는 소청2호 대비 대풍 대립유전자(allele)의 효과로 나타났다.

Table 1. Information of the genetic map of Daepung $\times$ Socheong2 population.

Chr ^z	Genetic length (a) (cM)	Number of markers integrated	Number of unique loci (b) ^y	Avg. interval (a/b) (cM) ^x
1	100.00	789	96	1.04
2	138.24	363	76	1.82
3	110.95	447	85	1.31
4	130.76	455	104	1.26
5	102.60	235	45	2.28
6	131.70	790	147	0.90
7	148.58	358	65	2.29
8	122.74	844	138	0.89
9	164.11	463	98	1.67
10	116.52	436	102	1.14
11	136.62	471	113	1.21
12	71.20	191	44	1.62
13	157.20	851	149	1.06
14	98.47	459	80	1.23
15	114.22	658	102	1.12
16	91.21	524	83	1.10
17	118.62	596	78	1.52
18	100.04	375	91	1.10
19	86.91	501	83	1.05
20	103.58	671	123	0.84

^zChromosome

^yActual number of loci where markers are actually positioned in the genetic map

^xAverage interval between unique loci.

결과 및 고찰

역병 군주 40412와 2457에 대한 저항성 검정 결과 및 표현형 분리

하배축 접종에 의한 저항성 검정에서, 대풍은 군주 40412와 2457에 대해 감수성을 보인 반면, 소청2호는 저항성을 보였다 (Fig. 1). RIL 집단에서는 저항성과 감수성이 분리하여, 군주 40412에 대한 검정 결과 저항성과 감수성 계통은 각각 20개, 55개로 판별되었고, 2457에 대한 검정 결과 23개, 42개 계통이 각각 저항성과 감수성으로 판별되었다(Table 2).

Table 2는 대풍 × 소청2호 집단의 계통에서 나타난 저항성과 감수성의 분리비에 대한 카이제곱검정(χ^2 -test) 결과를 보여준다. 단일 유전자에 의한 형질과 RIL임을 고려하여, 저항성과 감수성의 기대 분리비(Expected ratio)는 군주 40412와 2457에 대해 각각 37.5:37.5와 32.5:32.5로 적합도 검정(goodness-of-fit test)을 수행하였다. 카이제곱 값은 군주 40412와 2457에 대해 각각 15.4($p=0.00008$)와 4.98($p=0.025$)로 계산되었다(Table 2). 이는 각 군주에 대한 검정 결과에서 관찰 분리비와 기대 분리비가 통계적으로 유의미한 차이가 있음을 의미한다($p<0.05$). 이는 전체 집단 중 약 1/3에 해당하는 ~39개의 계통이 이용되지 않았기 때문으로 추정된다. 두 군주에서 공통적으로 감수성으로 판별된 계통들이 기대 값보다 많았다.

군주 40412에 대한 저항성 유전분석

분산분석에는 총 27,513개 SNP에 대해서 SNP별 대립유전자 형에 따른 그룹 간 평균을 비교하였다. 군주 저항성에 대한 분산분석에서 군주 40412의 경우 염색체 3번에 위치한 13개 SNP가 유의성을 나타냈다($p<0.001$). Table 3은 통계적으로

유의한 SNP들의 염색체상 위치와 R^2 와 P 값을 제시하고 있다. 염색체 3번의 37,335,337 번째 염기쌍(base pair, bp)에 위치한 SNP AX-90450060은 군주 40412에 대한 표현형 분산의 18%를 설명하고 인접지역(37,333,127~37,469,105 bp)에 위치한 SNP들이 모두 유의성을 보이는 것으로 볼 때 저항성 유전자가 존재할 가능성이 높다.

대풍 × 소청2호 RIL 집단의 SNP 유전자형 데이터를 이용하여, 군주 40412에 대한 저항성 연관 유전자좌를 확인하기 위해 고밀도 유전자지도를 작성하였다. 분산분석에서 탐색된 염색체 3번의 447개 SNP가 같은 연관군으로 통합되었고 유전적 거리는 110.95 cM으로 계산되었다(Table 1). 이 유전자지도를 이용하여, 표현형과 SNP 유전자형 간 연관분석을 수행한 결과, 분산분석과 동일한 염색체 3번의 1.1 Mb (36,200,178~37,333,337 bp) 지역에서 통계적으로 유의미한 LOD 값을 보였다(LOD=3.5, $R^2=18.6\%$)(Table 4). 측면 마커 사이에 존재하는 다른 마커에 대해서도 모 · 부분이 다형성을 보이지 않아, 측면 마커의 간격(47.76~74.33 cM)을 더 좁힐 수 없었다(Fig. 2). 타겟 저항성 유전자와 측면 마커 사이의 유전적 거리가 여전히 클 것으로 생각되고, 이로 인해 R^2 값이 상대적으로 작아진 것으로 생각된다(Table 3). 양의 상가적 효과는 실험에 사용된 RIL 집단에서 해당 유전자좌에 대풍의 대립인자를 가지는 경우 소청2호의 대립인자를 가질 때보다 유묘의 고사율이 높다는 것을 나타낸다(Table 4).

해당 유전자좌는 다수의 선행 연구에서 보고한 염색체 3번 (3.8~4.8 Mbp)의 *Rps1*, 7이 위치한 곳과는 물리적 거리가 상당히 차이가 난다. 단, 타 연구에서 plant introduction (PI) 408211B에서 미국 군주 OH25에 대한 저항성 유전자가 SSR 마커 Satt660과 Satt549 사이 지역(37.3~37.6 Mbp)에 위치하는 것으로 보고된

Table 2. Goodness-of-fit test for segregation ratio of reactions of the 75 and 65 recombinant inbred lines (RILs) in the Daepung × Socheong2 population following inoculation with the respective *P. sojae* isolates 40412 and 2457.

Isolates	Parents and RIL population	Numbers ^z				Goodness-of-fit ^y	
		Observed		Expected		χ^2	p
		R	S	R	S		
40412	Daepung		12				
	Socheong2	12					
	RIL population	20	55	37.5	37.5	15.4	0.00008
2457	Daepung		12				
	Socheong2	12					
	RIL population	23	42	32.5	32.5	4.98	0.025

^zR, resistance; S, susceptibility.

^yYates's correction (Yates 1934) for continuity is used to adjust the formula for Pearson's chi-square test.

Table 3. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers significantly associated with resistance to the respective *P. sojae* isolates 40412 and 2457.

Chr ^z	Position (bp) ^y	SNP ID ^x	Daepung allele	Socheong2 allele	Isolate 40412		Isolate 2457	
					<i>p</i> -value ^w	<i>R</i> ^{2v}	<i>p</i> -value	<i>R</i> ²
3	37,333,127	AX-90503578	GG	AA	2.59E-04	0.17	0.46 ^{ns}	0.01
3	37,334,818	AX-90519491	TT	GG	3.29E-04	0.16	0.47 ^{ns}	0.01
3	37,335,337	AX-90450060	GG	TT	1.61E-04	0.18	0.41 ^{ns}	0.01
3	37,344,323	AX-90342280	TT	CC	5.08E-04	0.15	0.47 ^{ns}	0.01
3	37,363,386	AX-90474027	CC	TT	9.09E-04	0.14	0.50 ^{ns}	0.01
3	37,368,009	AX-90388967	AA	GG	2.59E-04	0.17	0.47 ^{ns}	0.01
3	37,368,208	AX-90494336	CC	AA	9.09E-04	0.14	0.38 ^{ns}	0.01
3	37,370,680	AX-90446372	TT	CC	9.09E-04	0.14	0.31 ^{ns}	0.02
3	37,439,152	AX-90495209	AA	CC	7.34E-04	0.15	0.61 ^{ns}	0.00
3	37,444,515	AX-90509464	TT	CC	5.08E-04	0.15	0.36 ^{ns}	0.01
3	37,459,809	AX-90519469	TT	GG	3.29E-04	0.16	0.47 ^{ns}	0.01
3	37,467,706	AX-90356936	CC	AA	2.59E-04	0.17	0.47 ^{ns}	0.01
3	37,469,105	AX-90453921	CC	TT	3.29E-04	0.16	0.38 ^{ns}	0.01
18	2,171,155	AX-90398103	TT	AA	0.26 ^{ns}	0.02	4.9E-05	0.23
18	2,230,149	AX-90414070	AA	GG	0.26 ^{ns}	0.02	4.9E-05	0.23
18	2,596,324	AX-90476798	GG	AA	0.29 ^{ns}	0.02	1.4E-05	0.26
18	2,600,739	AX-90392402	AA	GG	0.29 ^{ns}	0.02	1.4E-05	0.26
18	2,601,706	AX-90340260	CC	TT	0.29 ^{ns}	0.02	1.4E-05	0.26
18	2,623,988	AX-90380020	CC	TT	0.29 ^{ns}	0.02	1.4E-05	0.26
18	2,628,360	AX-90523863	TT	GG	0.36 ^{ns}	0.01	4.4E-05	0.23
18	2,678,291	AX-90465601	CC	TT	0.36 ^{ns}	0.01	4.4E-05	0.23
18	2,679,563	AX-90470626	TT	CC	0.36 ^{ns}	0.01	4.4E-05	0.23
18	2,692,919	AX-90321765	GG	AA	0.36 ^{ns}	0.01	4.4E-05	0.23

^zChromosome

^yPhysical positions are based on the soybean genome Glyma2 (<http://soybase.org>)

^xMarkers significantly associated with the resistance to *P. sojae* via linkage analysis are indicated in bold.

^wThe letter "ns" following numbers denotes statistical insignificance.

^vPhenotypic variance explained by the marker.

Table 4. Three genomic regions conferring resistance to the respective of *P. sojae* isolates 40412 and 2457 identified in the Daepung × Socheong2 population.

Isolate	Chr ^z	Physical position 1 ^y	Physical position 2 ^y	Flanking marker 1	Flanking marker 2	LOD ^x	PV (%) ^w	Additive effect ^v
40412	3	36,200,178	37,335,337	AX-90519747	AX-90450060	3.5	18.6	25.0
2457	18	2,171,155	2,623,988	AX-90398103	AX-90380020	4.6	26.5	23.6
	18	53,164,051	53,329,388	AX-90459925	AX-90347283	2.6	14.7	17.5

^zChromosome.

^yPhysical position (bp) based on the genome version Glyma2 (<http://soybase.org>).

^xLogarithm of odds (LOD). A LOD threshold was determined by a 1,000-permutation test at $\alpha=0.05$, which is 2.51 and 2.19 for isolate 40412 and 2457, respectively.

^wPhenotypic variance explained by the locus.

^vAdditive effect. The positive value indicates that Socheong2 provides the resistance allele.

적이 있다(Zhang 2009). 추가적으로, 불완전한 형태(defeated form)의 *R* 유전자가 부분적 저항성(partial resistance)에 기여하

는 것은 잘 알려진 사실이다(Poland et al. 2009, St.clair 2010). 콩 역병 partial resistance에 대한 선행 연구에서 PI 407861A의

A. Isolate 40412

B. Isolate 2457

Fig. 2. Graphical presentation of genomic regions associated with resistance to the respective of *P. sojae* isolates 40412 (A) and 2457 (B) in the Daepung × Socheong2 RIL population. The genetic map is presented with a plot of logarithm of odds (LOD) score from linkage analysis with quantitative scales. Hatched lines on the LOD plots indicate the LOD threshold. The 1- and 2-LOD intervals are displayed as black bars and solid lines, respectively.

균주 OH25에 대한 partial resistance 유전자좌를 Sat_091과 Sat_125 사이(37.0~44.8 Mbp) 위치에서 탐색하였고 이 연구에서 PI 407861A는 OH25에 대해 *Rps* 저항성을 가지지 않았기 때문에, defeated *R*-gene이 partial resistance에 기여하는 것으로 추정되었다(Lee et al. 2013a). Abeysekara et al.(2016)는 역시 PI 399036 × AR-2 집단에서 BARC-050433-09624와 BARC-010179-00543 사이 지역(37.0~38.0 Mbp)이 역병 partial resistance와 유의성을 보인다고 보고하였다.

균주 2457에 대한 저항성 유전분석

균주 저항성에 대한 분산분석에서 균주 2457의 경우 염색체 18번에 위치한 8개 SNP가 유의성을 보였고($p < 0.00005$), 4 개의 SNP AX-90476798, AX-90392402, AX-90340260와 AX-90380020은 균주 2457 저항성에 대한 표현형 분산의 26%를 설명하는 것으로 파악되었다(Table 3). Bin mapping 방법으로 고밀도 유전자지도를 작성한 결과 18번 염색체에는 375개 SNP가 통합되었고 전체 유전적 거리는 100.04 cM로 계산되었다(Table 1). 균주 2457에 대한 저항성은 염색체 18번 상에 452 Kb (2,171,555~2,623,988 bp) 지역에서 LOD 값 4.6를 가지고 26.5%의 표현형 분산을 설명하는 것으로 분석되었다. 또한 이 분석에서 18번 염색체의 165 kb (53,164,051~53,329,388 bp) 지역이 LOD값 2.6을 가지고 14.7%의 표현형 분산을 설명하는 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 2). 그러나 염색체 18번의 53 Mbp 주변 지역에서 가장 낮은 p -value를 나타낸 AX-90470858는 $p = 0.00018$ 의 값을 가져 균주 2457에 대한 저항성 분산분석 유의 수준($p < 0.00005$)에서는 연관성이 기각되었다(data not shown).

염색체 18번의 2 Mbp 근처에서는 아직 *Rps* 유전자가 보고되지 않았지만, SNP 마커 BARC-025777-05064과 BARC-047665-10370 사이 지역(2.3~2.8 Mbp)에서 partial resistance 주동 유전자좌가 보고되었다(Lee et al. 2014). 유사하게 Tucker et al. (2010) 역시 마커 Sat_163과 SLP142 사이의 2.4 Mbp 지역에서 partial resistance 주동 유전자좌를 보고하였다. 한편, 염색체 18번의 53~56 Mbp에는 *Rps4*, 5, 6을 비롯하여 복수의 *Rps* 유전자 또는 대립유전자가 보고되었다(Sandhu et al. 2004, Sun et al. 2014, Sahoo et al. 2017). 또한, 다수의 선행 연구에서 해당 지역에 콩 역병 partial resistance 연관 유전자가 존재한다고 보고하였다(Lee et al. 2013a, Lee et al. 2013b, Stasko et al. 2016).

소청2호의 콩 역병 복수 저항성 유전자

소청2호가 가진 역병 균주 40412와 2457에 대한 저항성 유전

자좌가 염색체 3번과 18번에 각각 위치한 것으로 분석되었다. 흥미롭게도 균주 40412에 대한 저항성 연관 마커는 2457에 대한 저항성과는 연관되지 않았고, 이와 마찬가지로 균주 2457에 대한 저항성 연관 마커는 균주 40412에 대해서는 유의성을 보이지 않았다(Table 3).

각 *Rps* 유전자는 *P. sojae* 레이스(race)가 가지는 *Avr*에 따라 특이적으로 저항성을 가지며 이러한 분류가 표준화된 *P. sojae* 병원형(pathotype) 동정에 이용된다(Dorrance et al. 2016). 예를 들어 *Rps1a* 유전자를 가지는 콩 계통은 OHR1(병원형 7)에는 저항성을 나타내지만 OHR3(병원형 1a, 7)에 감수성을 나타내며, *Rps1k* 유전자는 OHR1, 3, 4(병원형 1a, 1c, 7)과 7(병원형 1a, 3a, 6, 7)에는 저항성을 나타내지만 OHR25(병원형 1a, 1b, 1c, 1k, 7)에는 저항성을 나타내지 못한다(Dorrance et al. 2004, Dorrance et al. 2008). 이런 점에서 이번 연구 결과는 균주 40412와 2457이 서로 다른 *Avr* 유전자들을 가지고 있으며 이번 연구에서 탐색된 염색체 3번과 18번의 유전자좌에 각 균주에 대한 저항성을 부여하는 다른 *Rps* 유전자가 있다는 사실을 말해준다.

최근의 연구에서 균주 2457에 대해 저항성을 가지는 품종인 대원과 감수성인 대풍 사이의 RIL 집단을 이용하여 저항성과 유전형과의 관계를 분석한 결과 소청2호에서와는 달리 염색체 3번의 3.8~4.8 Mbp 지역에 위치한 마커가 저항성과 연관이 있는 것으로 나타났다(Jang et al. unpublished). 이 위치는 소청2호의 균주 2457 저항성 유전자좌와는 다른 염색체에 분포하고 있어 두 품종(대원과 소청2호)이 동일한 균주 2457에 대해 가지는 저항성 역시 서로 다른 *Rps* 유전자가 관여하고 있는 것으로 드러났다.

이번 연구를 통하여 우리는 국내 품종인 소청2호가 최소 두 개의 다른 균주에 대해 저항성을 가진다는 것을 확인하였고, 소청2호에 존재하는 서로 다른 염색체 상에 의해 균주 특이적으로 반응하는 저항성 유전자좌를 탐색하였다. 해당 유전자좌는 선행 연구에서 역병에 대한 partial resistance와의 연관성이 알려진 위치인데, 선행 연구에서 이용된 모본과 부본은 각 연구에 이용된 균주에 대해 *Rps* 유전자를 가지지 않은 것들이었다. 이번 연구 결과는 해당 부위(특히, 염색체 18번의 2 Mbp)에 *Rps* 유전자가 존재함을 보임으로써 선행 연구에서 제시된 'defeated' *R*-gene에 의해 partial resistance가 부여될 수 있다는 가설을 뒷받침한다는 결과이다. 본 연구에서 탐색된 저항성 유전자좌들을 집적하여 향후 콩 역병 저항성 품종 개발에 이용될 수 있을 것이다. 본 연구의 결과는 콩-역병균의 분자적 상호작용에 대한 매우 중요한 기초 지식을 제공하고 향후 연구를 위한 중요 소재의 발굴 측면에서도 본 연구의 가치가 높다.

적 요

토양 유래 난균류인 *Phytophthora sojae*에 의해 발생하는 콩 역병은 배수가 불량한 토양에서 감수성인 콩에 심각한 피해를 주는 병으로서 한국에서도 논콩 재배 확대와 더불어 역병 저항성 품종 개발의 중요성이 커지고 있다. 콩 역병으로부터 피해를 최소화하는 가장 이상적인 방법은 역병 저항성 품종을 재배하는 것이고, 이에 콩 역병 저항성 유전자(resistance to *P. sojae*, *Rps*)에 대한 연구가 주를 이룬다. 본 연구는 대풍 × 소청2호 재조합 자식 계통 집단을 이용하여 두 균주에 대한 저항성 유전자좌를 탐색하기 위해 수행되었다. 두 역병 균주 40412와 2457에 대해 대풍은 모두 감수성을 보인 반면 소청2호는 모두 저항성을 보였고 집단의 계통들도 균주에 따라 차별적인 양상을 보였다. 각 균주에 대한 유전분석 결과, 저항성 유전자좌도 서로 다른 염색체에서 탐색되었다. 균주 40412에 대한 분석 결과, 염색체 3번(36.2~37.4 Mbp)에 위치한 SNP들이 높은 통계적 유의성을 보여 이 지역에 저항성 유전자가 존재할 것으로 여겨졌다. 균주 2457에 대한 저항성 분석에서는 염색체 18번(2.1~2.6 Mbp)에 존재하는 SNP들이 가장 높은 통계적 유의성을 가져 저항성 유전자가 존재하는 것으로 추정되었다. 염색체 18번의 또 다른 위치(53.1~53.3 Mbp)에서도 다소 낮지만 유의성을 보이는 유전자좌가 탐색되었다. 탐색된 세 위치는 모두 선행 연구에서 *Rps* 유전자좌로 이미 보고되었거나 또는 역병의 partial resistance과 연관된 지역이다. 본 연구에서 탐색된 SNP 마커들은 균주 40412와 2457 중 한 균주에 대해서만 유의성을 보였고 염색체상 위치도 분명히 다르다. 따라서, 균주 40412와 2457이 서로 다른 *Avr* 유전자를 가지고 있고, 소청2호는 염색체 3번과 18번에 각 균주에 특이적인 *Rps* 유전자를 가진다고 추정할 수 있다. 아직 유전자를 특정 지을 수는 없지만, 소청2호가 복수의 역병 저항성 유전자를 가진 품종으로 두 균주에 특이적으로 상호작용하는 두 개의 저항성 유전자좌의 발견이라는 점에서 본 연구가 시사하는 바가 크다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 계승활용사업단 연구과제인 「콩 핵심집단과 NAM 집단을 이용한 역병 저항성 유전자 탐색」 (과제번호: PJ01333701)에 의해 수행되었다.

REFERENCES

1. Abeysekara NS, Matthiesen RL, Cianzio SR, Bhattacharyya MK, Robertson AE. 2016. Novel sources of partial resistance against *Phytophthora sojae* in soybean PI 399036. *Crop Sci* 56: 2322-2335.
2. Akamatsu H, Kato M, Ochi S, Mimuro G, Matsuoka JI, Takahashi M. 2019. Variation in the resistance of Japanese soybean cultivars to *Phytophthora* root and stem rot during the early plant growth stages and the effects of a fungicide seed treatment. *Plant Pathol J* 35: 219-233.
3. Allen TW, Bradley CA, Sisson AJ, Byamukama E, Chilvers MI, Coker CM, Collins AA, Damicone JP, Dorrance AE, Dufault NS, Esker PD, Faske TR, Giesler LJ, Grybauskas AP, Hershman DE, Hollier CA, Isakeit T, Jardine DJ, Kelly HM, Kemerait RC, Kleczewski NM, Koenning SR, Kurle JE, Malvick DK, Markell SG, Mehl HL, Mueller DS, Mueller JD, Mulrooney RP, Nelson BD, Newman MA, Osborne L, Overstreet C, Padgett GB, Phipps PM, Price PP, Sikora EJ, Smith DL, Spurlock TN, Tande CA, Tenuta AU, Wise KA, Wrather JA. 2017. Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. *Plant Heal Prog* 18: 19-27.
4. Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67: 1-48.
5. Bradley CA. 2008. Effect of fungicide seed treatments on stand establishment, seedling disease, and yield of soybean in North Dakota. *Plant Dis* 92: 120-125.
6. Burnham KD, Dorrance AE, Francis DM, Fioritto RJ, St. Martin SK. 2003. *Rps8*, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. *Crop Sci* 43: 101-105.
7. Cheng Y, Ma Q, Ren H, Xia Q, Song E, Tan Z, Li S, Zhang G, Nian H. 2017. Fine mapping of a *Phytophthora*-resistance gene *RpsWY* in soybean (*Glycine max* L.) by high-throughput genome-wide sequencing. *Theor Appl Genet* 130: 1041-1051.
8. Demirbas A, Rector BG, Lohnes DG, Fioritto RJ, Graef GL, Cregan PB, Shoemaker RC, Specht JE. 2001. Simple sequence repeat markers linked to the soybean *Rps* genes for *Phytophthora* resistance. *Crop Sci* 41: 1220-1227.
9. Dorrance AE. 2018. Management of *Phytophthora sojae* of soybean: a review and future perspectives. *Can J Plant Pathol* 40: 210-219.

10. Dorrance AE, Berry SA, Anderson TR, Meharg C. 2008. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. *Plant Heal Prog* 9: 35.
11. Dorrance AE, Grünwald NJ. 2008. *Phytophthora sojae*: Diversity among and within populations, pp. 197-212. In: Lamour K, Kamoun S. (Eds.) *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
12. Dorrance AE, Jia H, Pathology P, Ohio T. 2004. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2004-0309-01-RS
13. Dorrance AE, Kurlle J, Robertson AE, Bradley CA, Giesler L, Wise K, Bradley CA. 2016. Pathotype diversity of *Phytophthora sojae* in eleven states in the United States. *Plant Dis* 100: 1429-1437.
14. Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
15. Flor HH. 1951. Genes for resistance to rust in Victory Flax. *Agron J* 43: 527.
16. Holt BF, Hubert DA, Dangl JL. 2003. Resistance gene signaling in plants - complex similarities to animal innate immunity. *Curr Opin Immunol* 15: 20-25.
17. Jang IH, Lee S. 2020. A review and perspective on soybean (*Glycine max* L.) breeding for the resistance to *Phytophthora sojae* in Korea. *Plant Breed Biotechnol* 8: 114-130.
18. Jee H, Kim W, Cho W. 1998. Occurrence of *Phytophthora* root rot on soybean (*Glycine max*) and identification of the causal fungus. *RDA J Crop Prot* 40: 16-22.
19. Kang IJ, Kang S, Jang IH, Jang YW, Shim HK, Heu S, Lee S. 2019. Identification of new isolates of *Phytophthora sojae* and the reactions of Korean soybean cultivars following hypocotyl inoculation. *Plant Pathol J* 35: 698-704.
20. Lee S, Mian MAR, McHale LK, Sneller CH, Dorrance AE. 2013a. Identification of quantitative trait loci conditioning partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 407861A. *Crop Sci* 53: 1022-1031.
21. Lee S, Mian MAR, McHale LK, Wang H, Wijeratne AJ, Sneller CH, Dorrance AE. 2013b. Novel quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 398841. *Theor Appl Genet* 126: 1121-1132.
22. Lee S, Mian MAR, Sneller CH, Wang H, Dorrance AE, McHale LK. 2014. Joint linkage QTL analyses for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean using six nested inbred populations with heterogeneous conditions. *Theor Appl Genet* 127: 429-444.
23. Li Y, Sun S, Zhong C, Wang X, Wu X, Zhu Z. 2017. Genetic mapping and development of co-segregating markers of *RpsQ*, which provides resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Theor Appl Genet* 130: 1223-1233.
24. Lin F, Zhao M, Ping J, Johnson A, Zhang B, Abney TS, Hughes TJ, Ma J. 2013. Molecular mapping of two genes conferring resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean landrace PI 567139B. *Theor Appl Genet* 126: 2177-2185.
25. Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. 2015. QTL loci Mapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *Crop J* 3: 269-283.
26. Morris PF, Ward EWB. 1992. Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. *Physiol Mol Plant Pathol* 40: 17-22.
27. Niu J, Guo N, Sun J, Li L, Cao Y, Li S, Huang J, Zhao J, Zhao T, Xing H. 2017. Fine mapping of a resistance gene *RpsHN* that controls *Phytophthora sojae* using recombinant inbred lines and secondary populations. *Front Plant Sci* 8: 538.
28. Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci* 14: 21-29.
29. Ranathunge K, Thomas RH, Fang X, Peterson CA, Gijzen M, Bernards MA. 2008. Soybean root suberin and partial resistance to root rot caused by *Phytophthora sojae*. *Phytopathology* 98: 1179-1189.
30. Sahoo DK, Abeysekara NS, Cianzio SR, Robertson AE, Bhattacharyya MK. 2017. A novel *Phytophthora sojae* resistance *RpsI2* gene mapped to a genomic region that contains several *Rps* genes. *PLoS One* 12: e0169950.
31. Sandhu D, Gao H, Cianzio S, Bhattacharyya MK. 2004. Deletion of a disease resistance nucleotide-binding-site leucine-rich-repeat-like sequence is associated with the loss of the *Phytophthora* resistance gene *Rps4* in soybean. *Genetics* 168: 2157-2167.
32. Schmitthenner AF. 2000. *Phytophthora* rot of soybean. *Plant Health Prog* 1: 13.
33. St.clair DA. 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu Rev Phytopathol* 48: 247-268.
34. Stasko AK, Wickramasinghe D, Nauth BJ, Acharya B, Ellis

- ML, Taylor CG, McHale LK, Dorrance AE. 2016. High-density mapping of resistance QTL toward *Phytophthora sojae*, *Pythium irregulare*, and *Fusarium graminearum* in the same soybean population. *Crop Sci* 56: 2476-2492.
35. Sugimoto T, Yoshida S, Kaga A, Hajika M, Watanabe K, Aino M, Tatsuda K, Yamamoto R, Matoh T, Walker DR, Biggs AR, Ishimoto M. 2011. Genetic analysis and identification of DNA markers linked to a novel *Phytophthora sojae* resistance gene in the Japanese soybean cultivar Waseshiroge. *Euphytica* 182: 133-145.
36. Sugimoto T, Yoshida S, Watanabe K, Aino M, Kanto T, Maekawa K, Irie K. 2008. Identification of SSR markers linked to the *Phytophthora* resistance gene *Rps1-d* in soybean. *Plant Breed* 127: 154-159.
37. Sun J, Li L, Zhao J, Huang J, Yan Q, Xing H, Guo N. 2014. Genetic analysis and fine mapping of *RpsJS*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theor Appl Genet* 127: 913-919.
38. Sun S, Wu XL, Zhao JM, Wang YC, Tang QH, Yu DY, Gai JY, Xing H. 2011. Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae*. *Plant Breed* 130: 139-143.
39. Team R. 2019. Core R: A language and environment for statistical computing, version 3.5. 3. Vienna R Found Stat Comput.
40. Tucker DM, Saghai Maroof MA, Mideros S, Skoneczka JA, Nabati DA, Buss GR, Hoeschele I, Tyler BM, St. Martin SK, Dorrance AE. 2010. Mapping quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean interspecific cross. *Crop Sci* 50: 628-635.
41. Weng C, Yu K, Anderson TR, Poysa V. 2001. Mapping genes conferring resistance to *Phytophthora* root rot of soybean, *Rps1a* and *Rps7*. *J Hered* 92: 442-446.
42. Workneh F, Yang XB, Tylka GL. 1998. Effect of tillage practices on vertical distribution of *Phytophthora sojae*. *Plant Dis* 82: 1258-1263.
43. Wrather JA, Koenning SR. 2006. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *J Nematol* 38: 173-180.
44. Xiao K, Kinkel LL, Samac DA. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol Control* 23: 285-295.
45. Yates F. 1934. Contingency tables involving small numbers and the χ^2 Test. *Suppl to J R Stat Soc* 1: 217.
46. Yu A, Xu P, Wang J, Zhang S, Wu J, Li W, Chen W, Li N, Fan S, Wang X, Jiang L. 2010. Genetic analysis and SSR mapping of gene resistance to *Phytophthora sojae* race 1 in soybean cv. Suinong 10. *Chinese J Oil Crop Sci* 32: 462-466.
47. Zhang Z. 2009. Mapping multiple novel race-specific resistance genes for *Phytophthora sojae* in Soybean PI408211B. Doctoral Thesis. The Ohio State University.
48. Zhong C, Sun S, Li Y, Duan C, Zhu Z. 2018. Next-generation sequencing to identify candidate genes and develop diagnostic markers for a novel *Phytophthora* resistance gene, *RpsHC18*, in soybean. *Theor Appl Genet* 131: 525-538.