

# 방사선조사 유래의 조기출수 식물(*Oryza sativa* L.) 계통의 유전적 변이 분석

류재혁<sup>1,2</sup>, 소현수<sup>1</sup>, 류재일<sup>1,3</sup>, 권오도<sup>4</sup>, 이영일<sup>5</sup>, 진일두<sup>6</sup>, 이효연<sup>7</sup>, 배창휴<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 웰빙자원학과, <sup>2</sup>국립축산과학원 축산자원개발부 초지사료과, <sup>3</sup>한국생명공학연구원, <sup>4</sup>전라남도 농업기술원, <sup>5</sup>한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, <sup>6</sup>순천대학교 식물외과, <sup>7</sup>제주대학교 생명공학부

## Genetic Variation Analysis of Early-heading Plant (*Oryza sativa* L.) Lines Derived from Gamma-ray Irradiation

Jaihyunk Ryu<sup>1,2</sup>, Hyun-Su So<sup>1</sup>, Jae Il Lyu<sup>1,3</sup>, Oh Do Kwon<sup>4</sup>, Young-il Lee<sup>5</sup>,  
Jin Il Doo<sup>6</sup>, Hyo-Yeon Lee<sup>7</sup> and Chang-Hyu Bae<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioresources Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea

<sup>3</sup>Division of Biosystems Research, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

<sup>4</sup>Jeollanam-do Agricultural Research and Extension Services, Naju 520-715, Korea

<sup>5</sup>Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

<sup>6</sup>Department of Plant Medicine, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>7</sup>Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

**Abstract** - This study was carried out to evaluate genetic variation of early-heading rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin 1) lines derived from gamma-ray (<sup>60</sup>Co, 300 Gy) irradiation. The average heading date of the 5 early-heading lines in M<sub>7</sub> and M<sub>8</sub> generation was faster than that of untreated control as 11 (line γ-2), 10 (line γ-5), 6 (γ-1 line), 5 (γ-3) and 4 days (line γ-4), respectively. According to ISSR analysis, polymorphic rate of the early-heading lines (from 5.9% to 23.4%) was higher than that of control (4.3%). The result indicates that the gamma-ray promote variation at DNA level. When genetic variations of *rps16-trnK* region were evaluated by nucleotide analysis, nucleotide length of the *rps16-trnK* region was 664 bp in all the early-heading lines and control. Out of 5 sites of nucleotide transposition detected in the region, however, 2 sites were appeared only in the early-heading lines.

**Key words** - *Oryza sativa*, Early-heading mutation, ISSR, cpDNA

## 서 언

식물자원의 변이 창출을 위한 돌연변이원으로는 감마선, X선, 이온빔 등의 물리적 방사선류와 MNU, EMS 등과 같은 화학물질이 이용되고 있다. 감마선, X-선 등 방사능 잔류에 대한 안전성이 검증된 다양한 방사선을 이용하여 식물 종에 따라 적정 선량을 조사하여 단기간에 다양한 기능변이를 갖는 식물자원 소재를 육성할 수 있다(Hiroyasu *et al.*, 2009; Jia and Li, 2008). 이를 확대적용하면 기존

품종의 형질개량, 중간모본용 육종 소재와 유전자 풀(pool)을 확대(Sung *et al.*, 2010)할 수 있다. 또한 일년생, 영년생, 종자번식 및 영양번식 등 다양한 부류의 식물과 식물체, 종자, 삽수, 조직배양체, 화분 등에 목적에 맞게 적용이 가능하며(Kang *et al.*, 2007), 특히 조기출수나 내병성 형질과 같은 단순 유전자에 의하여 지배되는 형질의 개선에 활용도가 높은 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1998).

FAO-IAEA 돌연변이 품종 데이터베이스에 의하면 2010년 현재 돌연변이 품종개발은 세계 63개국 172종의 식물에 3,000여 품종에 달하며, 우리나라는 '월미벼', '수원155' 등

\*교신저자(E-mail) : chbae@sunchon.ac.kr

벼를 비롯하여 보리, 콩, 참깨, 구기자 및 무궁화 등 33품종이 등록되어 있다. 그 밖에 식물체나 식물세포에 돌연변이원을 이용하면 많은 돌연변이 유전자원을 확보할 수 있기 때문에 식물의 다양한 기능을 구명하는데 유용하다(IAEA, 2010; Bae *et al.*, 2005a; Bae *et al.*, 2005b; Lee *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2000a). 이러한 돌연변이 유발은 고갈되어 가고 있는 유전자원 확보 차원에서 매우 바람직한 접근 방법이다(IAEA, 2010; Bae *et al.*, 1999; IAEA, 1970).

변이식물체의 유전적 해석에는 다양한 분자생물학적 분석 방법이 이용되고 있다. PCR 기법은 고온에서도 활성화되는 DNA 중합효소 및 DNA의 연쇄 증합 반응을 이용하여 특정 DNA 염기 서열을 반복 증폭하여 나타나는 변이를 이용하여 분석하는 기법으로 새로운 분자 마커가 각광을 받고 있다. 이 중 ISSR 기법은 반복염기서열이 4~10회 반복적으로 genome 상의 SSR이 상보적으로 증폭되어 품종 간에 다형성을 보이고, RAPD의 낮은 재현성, AFLP의 고비용, SSR의 복잡함을 극복 할 수 있으며, SSR을 프라이머 결합부위로 이용하므로 증폭산물에 대한 정보를 유추할 수 있는 장점을 가지고 있다(Tsumura *et al.*, 1996; Russel *et al.*, 1997).

감마선 조사에 의한 색소체 관련 유전자의 손상이 보고되고 있는데, 엽록체 DNA의 손상으로 토마토(*Lycopersicon esculentum*)에서는 1000 Gy 이상의 선량으로 환형구조가 파괴되며, 300 Gy 선량에서는 비대칭 등의 다양한 변이가 유발되었으며(Derks *et al.*, 1992), *Dunaliella salina* 식물체에서도 감마선 조사에 따른 엽록체 DNA의 변이가 연구되었다(Tamman *et al.*, 2005). 본 연구에서 선발된 일부 계통에서도 잎의 녹색이 지속되는 등 색소체 관련 형질 변이로 추정되는 계통이 있어 감마선 조사에 따른 영향으로 추정되었다.

본 연구는 우리나라 남부지방의 벼 장려품종의 하나인 동진 1호 벼에 감마선을 조사하여 조기출수계통을 선발하고, 선발한 변이식물체의 유전적 다양성과 변이성을 분석하여 효율적인 식물자원을 개발하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료 및 방사선 처리

전남농업기술원에서 분양받은(2004년 4월) 동진 1호

(*Oryza sativa* L. cv. Dongjin 1)의 건조종자에 감마선을 조사한 종자를 M<sub>0</sub>로 하여 M<sub>6</sub>세대까지 전개하면서 조기출수 5계통을 선발하였다(Table 1). 감마선 조사는 2004년 4월 한국원자력연구원(KAERI, 대전)의 감마선(<sup>60</sup>Co) 조사장치를 이용하여 300 Gy 선량으로 실시하였다.

### 재배방법 및 출수기 조사

노지에서 보온절충못자리를 이용하여 매년 4월 30일경 파종하여 36일간 육묘한 후 순천대학교 벼 시험포장에서 난괴법 3반복으로 30 × 15 cm의 재식거리로 계통당 8열씩 주당 1본으로 이앙하고, 시비량은 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 7-4.5-5.7 kg/10a로 하였다. 그 밖의 재배관리는 농촌진흥청 기능성작물부 벼 표준재배법(RDA, 2010)에 준하여 재배하였다. 출수기는 작물별 신품종의 출원 및 심사를 위한 특성조사 기준 18-1(국립종자원, 2005)에 따라 2010년(M<sub>7</sub>)과 2011년(M<sub>8</sub>)에 걸쳐 조사하였다.

### Genomic DNA의 분리 및 정제

DNA 추출은 CTAB 법(Fang *et al.*, 1992)으로 실시하였다. DNA 농도 측정은 UV/VIS Spectrophotometer(Ultaspec<sup>®</sup> 2000, Pharmacia Biotech, UK)를 이용하였으며, 최종 농도는 20 ng/μl로 희석하였다.

### ISSR 분석

조기출수 5계통(M<sub>8</sub>)과 X-선 조사 유래의 1계통 및 동진 1호에서 각 3개씩 총 21 개체에 대하여 ISSR 분석을 실시하였다.

20개의 ISSR 프라이머(UBC primer Set No. 9, University of British Columbia, Canada)로 예비실험을 실시한 후의

Table 1. Early heading rice (*Oryza sativa* L.) lines and control rice plants used in this study

No.	Name of lines	Dosage of radiation (Co <sup>60</sup> )
1	γ-1	γ-ray 300 Gy
2	γ-2	γ-ray 300 Gy
3	γ-3	γ-ray 300 Gy
4	γ-4	γ-ray 300 Gy
5	γ-5	γ-ray 300 Gy
6	Cont*	-

\**Oryza sativa* L. cv. Dongjin 1.

Table 2. Heading characteristics of early heading rice (*Oryza sativa* L.) lines with gamma-ray irradiation

Line *	Transplanting		First heading date			Heading date (50%)		
	2010	2011	2010	2011	Mean	2010	2011	Mean
γ-1			6 Aug	1 Aug	3 Aug	10 Aug	5 Aug	7 Aug
γ-2			27 Jul	22 Jul	24 Jul	4 Aug	31 Jul	2 Aug
γ-3			9 Aug	1 Aug	5 Aug	12 Aug	5 Aug	8 Aug
γ-4	6 Jun	4 Jun	9 Aug	1 Aug	5 Aug	13 Aug	5 Aug	9 Aug
γ-5			27 July	31 Jul	29Jul	3 Aug	3 Aug	3 Aug
Cont			13 Aug	7 Aug	10 Aug	16 Aug	10 Aug	13 Aug
Bos **			-	22 Jul	22 Jul	-	30 Jul	30 Jul
Chu ***			16 Aug	16 Aug	16 Aug	19 Aug	21 Aug	20 Aug

\*Most of line names were included in Table 1 and the other cultivars are; \*\* *Oryza sativa* L. cv. Boseog, \*\*\* *Oryza sativa* L. cv. Chucheong.

Table 3. Sequence of the ISSR primers, number of total bands and number of polymorphic bands amplified by each primer across all 21 individuals of rice (*Oryza sativa* L.) plants

ISSR Primer	Sequence *	TB **	PB ***	PR ****
UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	3	0	0.0
UBC 809	(AG) <sub>8</sub> G	2	1	50.0
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	8	5	62.5
UBC 812	(GA) <sub>8</sub> A	9	7	77.8
UBC 813	(CT) <sub>8</sub> T	2	1	50.0
UBC 816	(CA) <sub>8</sub> T	6	5	83.3
UBC 821	(GT) <sub>8</sub> T	3	0	0.0
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	6	4	66.7
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	5	2	40.0
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> TT	2	0	0.0
UBC 841	(GA) <sub>8</sub> YC	4	0	0.0
UBC 842	(CT) <sub>8</sub> RA	1	0	0.0
UBC 847	(CA) <sub>8</sub> RC	4	1	25.0
UBC 853	(ACC) <sub>5</sub>	2	0	0.0
UBC 861	(AGC) <sub>5</sub>	3	0	0.0
UBC 862	(ATG) <sub>6</sub>	4	1	25.0
UBC 864	(TC) <sub>8</sub> RT	6	1	16.7
UBC 873	(CTC) <sub>5</sub>	3	0	0.0
UBC 880	(GACA) <sub>4</sub>	3	1	33.3
UBC 889	DBD(AC) <sub>7</sub>	7	4	57.1
Total		83	33	39.8

\*B: C/G/T, D: A/G/T, R: A/G, Y: C/G.

\*\*TB: No. of total bands.

\*\*\*PB: No. of polymorphism bands.

\*\*\*\*PR: polymorphism rate (%).

밴드가 명확하고 다형성이 우수한 15개의 프라이머를 선택하여 ISSR 분석에 이용하였다(Table 3). PCR 반응액의 조성은 총 25  $\mu$ l로 주형 DNA 20 ng/ $\mu$ l, *Taq* polymerase 1 unit, 10 $\times$ PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2mM dNTP, 10 pmol 프라이머를 혼합하여 사용하였다. PCR 반응은 Gene Amp<sup>®</sup> 2700(Applied Biosystem UK)을 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 45초간 preden에서 uration, 48 $^{\circ}$ C에서 45분간 anneal atg, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 extension을 40회 수행한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR이 완료된 후의 증폭산물 15  $\mu$ l를 1.6% agarose gel에 loading하여 전기영동(50 V, 60분간)한 후 EtBr로 염색하여 Gel Doc XR(Bio-rad, USA)을 사용하여 주요 밴드를 확인하였다.

### *rps16-trnK* 영역의 PCR 증폭 및 추출

조기출수 5 계통에서 각 1개체씩 5개체와 동진 1호 3개체를 포함한 총 8개체를 사용하여 *rps16-trnK* 영역을 분석하였다.

분석과정은 Neuhaus와 Link(1987)가 고안한 프라이머(*rps16F*-AAAGGKGCTC ARCCTACARGAA; *trnK5R*-TACTCTACCRITGAGTTAGCAAC)로 PCR을 이용하여 *rps16-trnK* 부위를 증폭시켰다. PCR 반응액의 조성은 총 50  $\mu$ l로 주형 DNA 20 ng/ $\mu$ l, *Taq* polymerase 2.5 unit, 10 $\times$ PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM dNTP, 20 pmol 프라이머를 혼합하여 사용하였다. PCR 반응은 Gene Amp<sup>®</sup> 2700(Applied

Biosystem)을 사용하여 94°C에서 5분간 초기 변성시킨 후 94°C에서 1분간 predenaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 35회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR이 완료된 후의 증폭산물 50  $\mu$ l를 agarose gel(1.6%)에 loading하여 전기영동(50 V, 60분간)한 후 EtBr로 염색하여 Gel Doc XR(Bio-rad, USA)을 사용하여 밴드를 확인한 후 젤에서 DNA를 Gel Extraction Kit(Bioneer, Korea)로 추출하였다.

### 클로닝 및 염기서열 결정

*rps16-trnK* 영역의 추출된 PCR 산물은 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 ligation 하였다. 이를 42°C에서 30초간 열충격(heat-shock) 방법을 통해 Top 10F' competent cell에 형질전환 시킨 후, X-gal(50  $\mu$ g/ml)과

IPTG(50  $\mu$ g/ml) 및 ampicillin(50  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 배지에 도말하여 18시간 클로닝하였다. 클로닝 후 선별한 white colony를 ampicillin(50  $\mu$ g/ml)이 들어 있는 LB-broth 배지에서 24시간 동안 배양한 후 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA는 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

### 데이터 분석

ISSR로 분석된 DNA 밴드 양상은 이진수를 이용하여 밴드가 있으면 (1), 없으면 (0)으로 data를 표시하여 통계 프로그램에 입력하였다. 분석에 이용된 통계프로그램은 SPSS Ver. 12(SPSS Inc., USA)로서 단순일치계수(simple-matching coefficient)로 유전적 유사도지수를 산출하였다. 변이원을 처리한 벼의 *rps16-trnK* 영역의 염기서열에서 서열 배

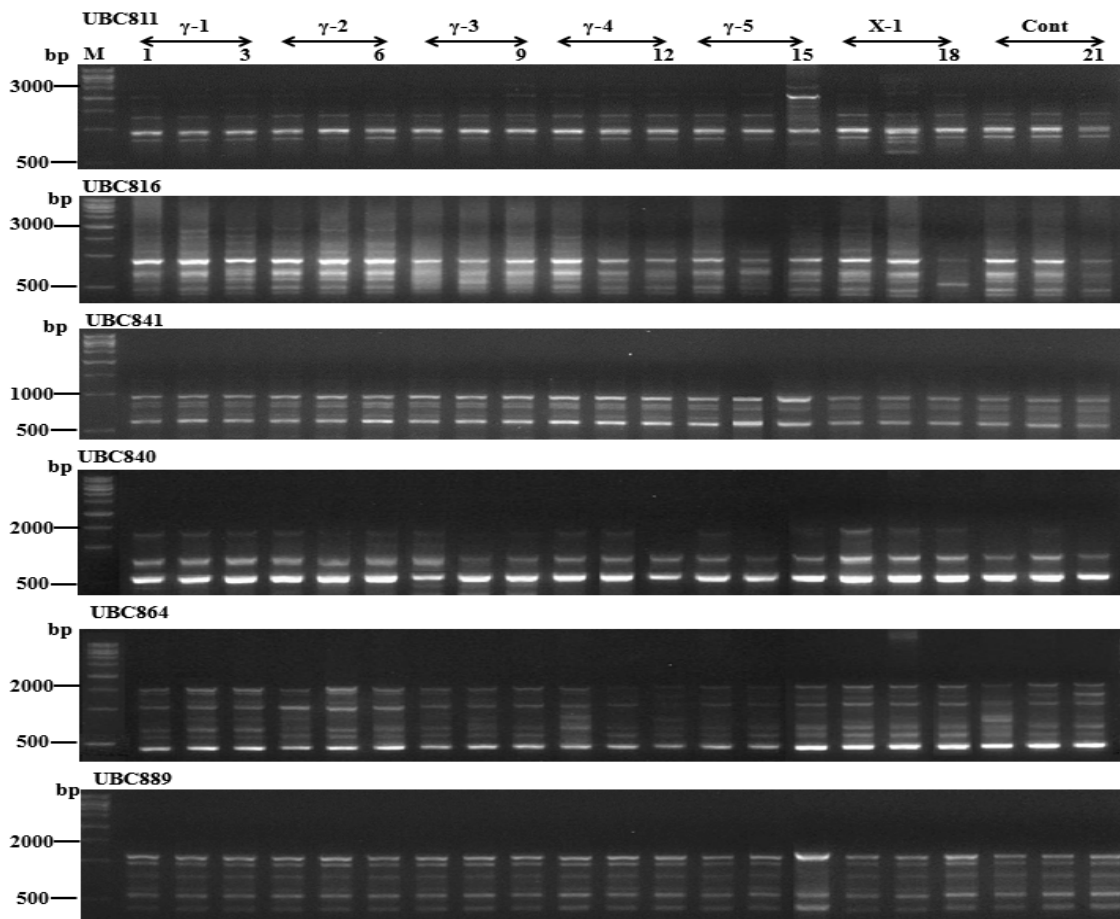


Fig. 1. Electrophoresis profile of PCR products in early heading lines of *Oryza sativa* L. produced by ISSR primer. Amplification products were separated on 1.6% agarose gels in 1xTAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Lane M: 1 kb ladder marker. Primer names were included in Table 12. 1~21; 1~3:  $\gamma$ -1, 4~6:  $\gamma$ -2, 7~9:  $\gamma$ -3, 10~12:  $\gamma$ -4, 13~15:  $\gamma$ -5, 16~18: X-1, 19~21: Cont.

당은 Bioedit version 7.0로 하였고, 분류군간 유전적 동질성(D)은 분류군간 염기쌍의 비교로 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 선발계통의 출수기

벼의 출수기는 품종의 조만성을 나타내는 지표로 품종의 적응성과 재배시기 결정을 지배하는 중요 형질(Yang *et al.*, 2004)로서 품종이 지니고 있는 기본영양생장성(grade of basic vegetative growth), 감온성(thermo-sensitivity), 감광성(photo-sensitivity)과 벼가 자라는 지역의 온도 및 일장환경과의 상호작용에 의하여 결정된다(Choi *et al.*, 1983; Vergara *et al.*, 1965). 감사선 조사 식물개체로부터 조기 출수 개체를 선발하여 M<sub>6</sub>세대까지 고정하고, M<sub>7</sub>(2010년)과 M<sub>8</sub>(2011년) 세대에서 출수기를 조사하였다.

동진 1호의 종자에 감마선을 조사한 후 출수가 빠른 5계통을 선발한 결과(Table 2), 대조품종인 동진 1호(중만생)의 순천지역에서 2년간 평균 출수기는 8월 13일이었고, 중만생종인 추청 품종의 출수기는 8월 20일, 조생종 품종인 보석벼 출수기는 7월 30일로 조사되었다. 반면 조기출수 계통의 출수기는  $\gamma$ -2 계통(8월 2일),  $\gamma$ -5 계통(8월 3일),  $\gamma$ -1 계통(8월 7일),  $\gamma$ -3 계통(8월 8일),  $\gamma$ -4 계통(8월 9일) 순으로 출수하였다. 조기출수 계통의 출수기를 대조품종인 동진 1호(중만생종)와 비교하면 대조품종 보다 11일( $\gamma$ -2 계통), 10일( $\gamma$ -5 계통), 6일( $\gamma$ -1 계통), 5일( $\gamma$ -3 계통), 4일( $\gamma$ -4 계통)이 빠르게 나타났다. 이 중  $\gamma$ -2 계통과  $\gamma$ -5 계통의 조만 정도는 내냉성 조생 품종인 보석벼 보다 2~3일 출수기가 늦었으며, 직접 비교는 어렵지만 남부지방 순천 지역에서 재배 시 중부지방 장려 품종인 추청벼 보다 18일 정도 빨리 출수되었다.

### ISSR marker를 이용한 유전적 다형성 분석

#### 1) 유전적 다형성

ISSR 마커를 이용하여 조기출수 계통의 유전적 다형성을 분석한 결과는 표 3과 같다. 20개 프라이머를 사용하여 공시한 21 개체를 분석한 결과, 프라이머 당 밴드수는 최저 1개(UBC 842)에서 최고 9개(UBC 812)로 한 프라이머 조합당 평균 4.15개였으며, 8개 프라이머(UBC 808, UBC 821, UBC 840, UBC 841, UBC 842, UBC 853, UBC 861, UBC 873)에서는 모두 동일한 밴드패턴을 보였다. 다형성 밴드

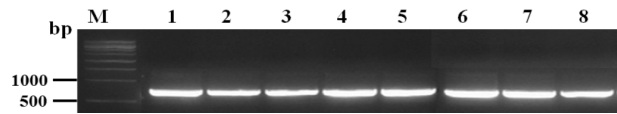


Fig. 2. Electrophoresis profile of PCR products in early heading lines of *Oryza sativa* L. cpDNA produced by *rps16-trnK* region primer. Amplification products were separated on agarose gels (1.6%) in 1xTAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Lane M: 1 kb ladder marker. 1:  $\gamma$ -1, 2:  $\gamma$ -2, 3:  $\gamma$ -3, 4:  $\gamma$ -4, 5:  $\gamma$ -5, 6: Cont 1, 7: Cont 2, 8: Cont 3.

의 수는 최소 1개(UBC 809, UBC 813, UBC 847, UBC 862, UBC 864, UBC880)에서 최대 7개(UBC 812) 사이로 평균 다형성 밴드는 1.65개가 검출되었다(Fig. 2). 대조품종과 조기출수 계통간 총 83개의 증폭된 밴드 중 33개의 다형성 밴드가 나타나 39.8%의 다형성 비율을 나타내 계통 및 개체간 차이가 있음을 보였다. 이는 Lee *et al.*(2003)이 250 Gy의 감마선을 조사한 M<sub>8</sub> 세대의 대청벼(*Oryza sativa* L cv. Daechong)에 내염성 형질 등 12 개체의 변이체를 대상으로 RAPD 분석하여 30.2%의 다형성을 보인 것과 유사한 유전적 다형성 정도이며, 중성자빔을 조사한 벼 식물체의 RAPD 분석에서 다형성이 검출되지 않은 결과(Bae *et al.*, 2005a)와는 다른 경향을 나타낸 것이다.

선발한 조기 출수 계통별 유전적 다형성 비율을 분석한 결과(Table 4), 계통별 유전적 다형성은  $\gamma$ -2 계통이 5.9%,  $\gamma$ -1 계통 7.5%,  $\gamma$ -4 계통 15.1%,  $\gamma$ -3 계통 15.3%,  $\gamma$ -5 계통 23.4% 순으로, 대조품종의 4.3% 보다 높은 다형성을 나타내었다. X-ray 조사 계통 또한 19.4%의 다형성을 나타내어 감마선 조사에 의해 DNA 수준의 변이가 증대되었음을 확인하였다. 또한 Bae(2011)가 전자빔을 조사한 양란 심비디움(*Cymbidium* spp.)과 춘란(*Cymbidium goeringii*)의 원괴체 및 근경에서, Lee(2005)가 감마선을 조사한 자란(*Bletilla striata*)에서, Lee *et al.*(1996)이 감마선을 조사한 들깨(*Perilla frutescens*)에서 방사선을 처리한 후 유전적 다형성이 증가한 결과와는 유사하였다.

#### 2) 유전적 유사도 지수

대조품종과 선발한 조기출수 계통간의 유전적 차이 및 계통별 변이 정도를 파악하고자 유전적 유사도 지수를 산출하였다(Table 5).

총 21개체간의 유전적 유사도 지수는 최저 0.723( $\gamma$ -5

Table 4. Sequence of the ISSR primers, number of total bands and number of polymorphic bands amplified by each lines

Primer	Sequence*	No. of total bands							No. of polymorphism bands							Polymorphism rate (%)						
		1**	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 809	(AG) <sub>8</sub> G	2	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	50.0	0	50.0	0	0	0	0
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	4	4	4	4	7	6	4	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	42.9	33.3	0	0
UBC 812	(GA) <sub>8</sub> A	4	6	8	8	8	4	5	0	3	5	5	3	0	1	0	50.0	62.5	62.5	37.5	0	20.0
UBC 813	(CT) <sub>8</sub> T	1	2	2	2	2	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	50	50	50	0	0
UBC 816	(CA) <sub>8</sub> T	5	5	5	5	5	6	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	83.3	0
UBC 821	(GT) <sub>8</sub> T	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	4	4	6	5	6	6	5	3	0	4	3	4	5	0	75.0	0	66.7	60.0	66.7	83.3	0
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	4	4	4	4	5	4	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	40.0	0	0	0
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> TT	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 841	(GA) <sub>8</sub> YC	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 842	(CT) <sub>8</sub> RA	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 847	(CA) <sub>8</sub> RC	4	4	3	4	4	4	4	0	1	0	1	0	0	0	0	25	0	25	0	0	0
UBC 853	(ACC) <sub>5</sub>	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 861	(AGC) <sub>5</sub>	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 862	(ATG) <sub>6</sub>	3	3	3	3	4	4	4	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	25	25	25	0
UBC 864	(TC) <sub>8</sub> RT	5	5	5	6	5	5	6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	16.7	0	0	16.7
UBC 873	(CTC) <sub>5</sub>	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UBC 880	(GACA) <sub>4</sub>	3	2	2	3	2	3	3	1	0	0	0	0	1	0	33.3	0	0	0	0	33.3	0
UBC 889	DBD(AC) <sub>7</sub>	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	57.1	0	0	0
Total		67	68	72	73	77	72	70	5	4	11	11	18	14	3	7.5	5.9	15.3	15.1	23.4	19.4	4.3

\*B: C/G/T, D: A/G/T, R: A/G, Y: C/G.

\*\*1~7; 1:  $\gamma$ -1, 2:  $\gamma$ -2, 3:  $\gamma$ -3, 4:  $\gamma$ -4, 5:  $\gamma$ -5, 6: X-1, 7: Cont 1, 8: Cont 2, 9: Cont 3.

계통 15번과 X-1계통 18번)에서 최고 1.00( $\gamma$ -1 계통 2번과 X-ray 계통 16번;  $\gamma$ -2 계통  $\gamma$ -4과  $\gamma$ -5 계통) 사이로, 전체 유전적 유사도 평균은 0.900이었다. 이는 국내 벼 21개 품종의 SSR 분석에서 최소 0.59에서 최대 0.92 사이(Kwon *et al.*, 2006)와 비교하여 유전적 유사도가 높은 수준이며, 전자빔을 조사한 심비디움(*Cymbidium* spp.) 원괴체 18개체의 ISSR 분석에서 유전적 유사도 지수가 0.677~1.000 사이로 평균 0.828을 나타낸 결과(Bae, 2011)보다 높은 유전적 유사도 지수로서 방사선 종류, 생물종, 재배 환경 차이에 따라 방사선 감수성에 차이를 보인 것에 기인한 것으로 판단된다(Bae *et al.*, 2005a; Bae *et al.*, 2005b; Bae *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2000b).

계통별 유전적 유사도 지수 평균은  $\gamma$ -2 계통이 0.968,  $\gamma$ -1 계통 0.960,  $\gamma$ -3 계통 0.912,  $\gamma$ -4 계통 0.904,  $\gamma$ -5 계통 0.847 순으로, 대조품종의 유전적 유사도 지수 평균 0.968 보다는 대체로 낮게 나타났다. 이러한 각 계통별 유전적 유사도 지수에 기초하여 선발한 조기출수 계통 중  $\gamma$ -2계통은 출수기가 매우 빠르면서 유전적으로 안정화된 계통으로 사료된다. 이는 선종은 다르나 전자빔을 조사한 춘란과 양란 심비디움에서 ISSR 분석하여 유전적 유사도 지수(GSM)가 춘란과 양란 심비디움 모두에서 대조구보다 낮게 나타나 전자빔 처리로 개체들 간의 변이성이 높게 나타난 결과(Bae, 2011)와 유사한 경향이다.

Table 5. Genetic similarity matrix of early heading rice (*O. sativa* L.) lines by ISSR analysis\*

No.**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.964	1.000								
3	0.964	0.952	1.000							
4	0.940	0.928	0.952	1.000						
5	0.940	0.928	0.952	1.000	1.000					
6	0.892	0.880	0.904	0.952	0.952	1.000				
7	0.928	0.916	0.892	0.892	0.892	0.892	1.000			
8	0.916	0.928	0.904	0.952	0.952	0.928	0.940	1.000		
9	0.928	0.916	0.940	0.940	0.940	0.916	0.880	0.916	1.000	
10	0.928	0.916	0.940	0.940	0.940	0.940	0.904	0.916	0.976	1.000
11	0.928	0.940	0.940	0.916	0.916	0.892	0.928	0.916	0.880	0.904
12	0.904	0.892	0.940	0.940	0.940	0.892	0.880	0.916	0.904	0.904
13	0.904	0.892	0.916	0.940	0.940	0.892	0.880	0.916	0.928	0.904
14	0.940	0.952	0.952	0.928	0.928	0.880	0.916	0.928	0.916	0.916
15	0.783	0.819	0.795	0.819	0.819	0.771	0.759	0.795	0.783	0.783
16	0.964	1.000	0.952	0.928	0.928	0.880	0.916	0.928	0.916	0.916
17	0.952	0.964	0.940	0.916	0.916	0.867	0.904	0.916	0.904	0.904
18	0.867	0.855	0.904	0.855	0.855	0.807	0.795	0.807	0.892	0.867
19	0.904	0.916	0.940	0.916	0.916	0.867	0.855	0.867	0.928	0.904
20	0.904	0.916	0.940	0.916	0.916	0.867	0.855	0.867	0.928	0.904
21	0.880	0.892	0.916	0.892	0.892	0.892	0.855	0.843	0.904	0.904

No.**	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
11	1.000										
12	0.904	1.000									
13	0.880	0.976	1.000								
14	0.916	0.940	0.940	1.000							
15	0.783	0.783	0.783	0.819	1.000						
16	0.940	0.892	0.892	0.952	0.819	1.000					
17	0.928	0.880	0.880	0.940	0.807	0.964	1.000				
18	0.843	0.867	0.867	0.855	0.723	0.855	0.843	1.000			
19	0.928	0.928	0.928	0.892	0.783	0.916	0.880	0.892	1.000		
20	0.904	0.928	0.928	0.892	0.807	0.916	0.880	0.916	0.976	1.000	
21	0.904	0.904	0.904	0.867	0.783	0.892	0.855	0.892	0.952	0.976	1.000

\*Genetic similarity was calculated on the basis of simple-matching coefficients.

\*\*1~21; 1~3:  $\gamma$ -1, 4~6:  $\gamma$ -2, 7~9:  $\gamma$ -3, 10~12:  $\gamma$ -4, 13~15:  $\gamma$ -5, 16~18: X-1, 19~21: Cont.

**엽록체 DNA *rps16-trnK* 영역의 변이 분석**

1) 엽기서열의 차이

선발된 조기출수계통과 대조품종을 대상으로 엽록체 DNA의 *rps16-trnK* 영역을 증폭한 PCR 산물(Fig. 2)을 클로닝하여 엽기서열을 분석한 결과는 Table 6과 같다. 엽기

길이는 대조품종과 방사선 조사 유래의 조기출수 계통이 모두 664 bp를 나타내었다. 엽기조성은 퓨린계의 아데닌이 최소 28.16%( $\gamma$ -1,  $\gamma$ -3)에서 최대 28.46%(모품종 1)로 11개체의 평균 아데닌 함량은 28.29%였고, 구아닌은 최소 16.87% ( $\gamma$ -2,  $\gamma$ -3)에서 최대 17.17%( $\gamma$ -1) 사이로 평균

Table 6. Nucleotide frequencies of early heading rice (*Oryza sativa* L.) lines using *rps16-trnK* regions analysis

Lines*	Nucleotide (%)				G+C (%)	A+T (%)	Length (bp)
	A	C	G	T			
γ-1	28.16	15.96	17.17	38.70	33.13	66.87	664
γ-2	28.31	16.11	16.87	38.70	32.98	67.02	664
γ-3	28.16	15.96	17.02	38.86	32.98	67.02	664
γ-4	28.31	16.11	16.87	38.70	32.98	67.02	664
γ-5	28.31	16.11	17.02	38.55	33.13	66.87	664
Cont 1**	28.46	15.96	16.87	38.70	32.83	67.17	664
Cont 2	28.31	16.11	17.02	38.55	33.13	66.87	664
Cont 3	28.31	16.11	17.02	38.55	33.13	66.87	664
Mean	28.29	16.05	16.98	38.68	33.02	66.98	664

\*Lines were included in Table 1.

\*\**Oryza sativa* L. cv. Dongjin 1.

16.99%였다. 피리미딘계의 티민은 최소 38.55%(γ-5, 대조품종 2번, 대조품종 3번)에서 최대 38.86%(γ-3) 사이로 평균 38.68%였고, 시토신은 최소 15.96%(γ-1, γ-2, 대조품종 1)에서 최대 16.11%(γ-2, γ-4, γ-5, 대조품종 2, 대조품종 3) 사이로 평균 16.04%였다. 전체염기조성에서 피리미딘계가 평균 54.72%로 퓨린계의 45.28% 보다 높은 함량을 나타냈다. <G+C> 함량 평균은 최소 32.83%(대조품종 1)에서 최대 33.13%(γ-1, γ-5, 대조품종 2번, 대조품종 3번) 사이로 전체 평균 GC 함량은 33.04%를 나타내었다. Hiratsuka *et al.*(1989)은 벼의 엽록체 DNA 전체 염기의 길이가 134,525 bp이며, *rps16-trnK* 영역은 664 bp로 본 연구와 염기의 길이와 일치하였으며, 동진 1호 품종에 X-ray 500 Gy를 조사하여 선발한 계통의 *rps16-trnK* 분석에서 염기의 길이가 664 bp로 나타난 결과(So, 2012)와도 일치하여, 감마선 조사 유래의 조기출수 계통의 *rps16-trnK* 영역에서 염기의 삽입과 결실에 의한 염기의 길이의 차이는 일어나지 않았다.

염기서열의 길이는 차이가 없었으나 자리바꿈은 관찰되었다. *rps16-trnK* 영역 염기서열에서 방사선 유래 조기출수 계통과 대조품종간에 나타난 치환(transposition)의 변이 부위는 Table 7과 같다. 검출된 변이 영역은 총 5개로 이 중 3개 영역은 대조품종의 개체 내에서도 변이가 나타났다. 대조품종 개체 내에서 나타난 변이를 제외한 조기출수 계통에 특이적인 염기 변이는 6 bp 및 587 bp 부위에서 발생하였다. γ-2, γ-3, γ-4 계통은 6 bp에서 구아닌이 티민으로 치환되었고, γ-2 계통은 587 bp에서 티민이 시

Table 7. Summary of variation encountered among chloroplast DNA sequences for the *rps16-trnK* region in early heading rice (*Oryza sativa* L.)

Lines*	bp				
	6	12	19	587	655
γ-1	G	G	G	T	T
γ-2	T	A	G	C	T
γ-3	T	G	G	T	T
γ-4	T	G	A	T	C
γ-5	G	G	A	T	C
Cont 1**	G	A	A	T	C
Cont 2	G	A	G	T	C
Cont 3	G	G	G	T	T

\*Lines were included in Table 1.

\*\**Oryza sativa* L cv. Dongjin 1.

토신으로 치환되어 γ-2 계통 특이적인 염기 변이로 보인다. 이는 동진 1호 품종에 X-ray 500 Gy를 조사하여 선발한 계통의 *rps16-trnK* 분석에서 선발 계통의 특이적인 변이 염기서열이 검출되지 않은 결과(So, 2012)와는 다른 경향을 보이고 있다.

## 2) 염기서열 유사도

방사선 유래 조기출수 5계통(5개체)과 대조품종 3개체를 대상으로 *rps16-trnK* 영역의 염기서열을 비교한 결과(Table 8), 선발한 조기출수 5 계통 및 대조품종간 염기서열의 유사도는 최저 0.992(γ-2번 계통과 γ-5번 계통)에서



Table 8. Sequence similarity of *rps16-trnK* region among 7 lines of *Oryza sativa* L.

No.*	$\gamma$ -1	$\gamma$ -2	$\gamma$ -3	$\gamma$ -4	$\gamma$ -5	Cont 1	Cont 2	Cont 3
$\gamma$ -1	ID							
$\gamma$ -2	0.995	ID						
$\gamma$ -3	0.998	0.996	ID					
$\gamma$ -4	0.995	0.993	0.996	ID				
$\gamma$ -5	0.996	0.992	0.995	0.998	ID			
Cont 1	0.996	0.995	0.995	0.995	0.996	ID		
Cont 2	0.996	0.993	0.995	0.995	0.996	0.996	ID	
Cont 3	0.998	0.993	0.996	0.996	0.998	0.995	0.998	ID

\*Lines were included in Table 1.

최대 0.998( $\gamma$ -1번 계통과  $\gamma$ -3번 계통, 대조품종 3;  $\gamma$ -4번 계통과  $\gamma$ -5번 계통;  $\gamma$ -5번 계통과 대조품종 3) 사이로 전체 염기서열의 유사도 평균은 0.995였으며, 선발한 조기출수 5 계통(5개체)간 염기 서열의 유사도 평균 역시 0.995로 대조품종의 염기서열 유사도 평균치 0.996 보다 낮게 나타났고, 선발한 조기출수 5 계통(5개체)과 대조품종 3개체 간 염기서열 유사도의 평균은 0.995로 *rps16-trnK* 영역의 염기서열의 유사도는 대조구내의 개체변이와 계통간 변이는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

### 적 요

식물유전자원의 소재를 확대하고자 동진 1호 벼의 건조종자에 감마선(<sup>60</sup>Co, 300 Gy)을 조사하여 선발한 조기출수 계통의 유전적 변이성을 분석하였다. 선발한 조기출수 계통의 M<sub>7</sub>(2010년)과 M<sub>8</sub>(2011년) 세대에서 평균 출수기는 대조품종인 동진 1호(중만생종) 보다 각각 11일( $\gamma$ -2 계통), 10일( $\gamma$ -5 계통), 6일( $\gamma$ -1 계통), 5일( $\gamma$ -3 계통), 4일( $\gamma$ -4 계통)이 빠르게 나타났다. ISSR 분석 결과, 선발계통의 유전적 다형성은  $\gamma$ -2 계통 5.9%,  $\gamma$ -1 계통 7.5%,  $\gamma$ -4 계통 15.1%,  $\gamma$ -3 계통 15.3%, X-1 계통 19.4%,  $\gamma$ -5 계통 23.4%로 대조품종의 4.3% 보다 높게 나타나 방사선 조사로 DNA 수준에서 변이가 증가되었음을 확인하였다. 염색체 DNA(*rps16-trnK* 영역) 분석 결과, 염기 길이는 대조품종과 같은 664 bp인 반면, 총 5개 염기서열 영역에서 치환 변이가 발생하였고 그 중 6 bp 및 587 bp 영역의 변이는 선발 계통에서만 나타났다.

### 사 사

이 논문은 2010년도(2010. 3~2011. 2) 순천대학교 학술연구비 공모과제 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 인용문헌

- Bae, C.H., T. Abe, N. Matsuyama, N. Fukunishi, T. Nagata, T. Nakano, Y. Kaneko, K. Miyoshi, H. Matsushima and S. Yoshida. 2001. Regulation of chloroplast gene expression is affected in *ali*, a novel tobacco albino mutant. *Ann. Bot.* 88:545-553.
- Bae, C.H., T. Abe, N. Nagata, N. Fukunishi, T. Matsuyama, T. Nakano and S. Yoshida. 2000a, Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L). *Plant Sci.* 151:93-101.
- Bae, C.H., T. Abe, D.C. Kim, Y.I. Lee, J.S. Jong, K.S. Min and H.Y. Lee. 2000b. Effect of a heavy-ion beam irradiation on anthers, calli and seeds of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4). *Plant Biotechnol.* 27(2):109-115.
- Bae, C.H., J.S. Chai, J.H. Kim, T.G. Yang, J.I. Lyu, H.Y. Lee and D.C. Yang. 2005a. Characteristics of tobacco and rice plants irradiated with neutron beam. *Plant Res.* 18(3):359-366 (in Korean).
- Bae, C.H., Y.I. Lee, D.C. Kim, K.S. Min, J.H. Kim, J.S. Jung, H.Y. Lee and S. Yoshida. 1999. Characterization of *in vitro* growth and differentiation of an albino mutant of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol.* 26(3):197-203.
- Bae, C.H., J.I. Lyu, M.S. Kim, T. Abe, H.Y. Lee and D.C.

- Yang. 2005b'. Growth and DNA alteration of heavy-ion beam irradiated tobacco (*Nicotiana plumbaginifolia*) plant. *Plant Res.* 18(1):169-178 (in Korean).
- Bae, S.H. 2011. Effect of electron beam irradiation on genetic variability of *in vitro* cultured organs in *Cymbidium goeringii* and *Cymbidium* spp. M.S. Thesis, Sunchon National Univ. (in Korean).
- Choi, K.G., Y.N. Chang and S.C. Lee. 1983. Ecological studies on heading of rice plant. *Korean J. Crop Sci.* 28(2):151-163 (in Korean).
- Derks, F.H.M., R.D. Hall and C.M. Colijn-Hooymans. 1992. Effect of gamma irradiation on protoplast viability and chloroplast DNA damage in *Lycopersicon peruvianum* with respect to donor-recipient protoplast fusion. *Environ. Bot.* 32(3):255-264.
- Fang, G., S. Hammar and R. Grumet. 1992. A quick inexpensive method of removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13:52-55.
- Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori, C. Kondo, Y. Honji, C.R. Sun, B.Y. Meng, Y.Q. Li, A. Kanno, Y. Nishizawa, A. Hirai, K. Shinozaki and M. Sugiura. 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217:185-194.
- Hiroyasu, Y., S. Akemi, H. Yoshihiro, D. Konosuke, T. Atsushi and M. Toshikazu. 2009. Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. *Euphytica* 165:97-103.
- IAEA. 2010. <http://www-mvd.iaea.org>.
- IAEA. 1970. Crop plant characters to be improved by mutation breeding. Manual on Mutation Breeding (Tech. Rep. Seri. No. 119). Vienna, Austria. pp. 149-176.
- Jia, C.F. and A.L. Li. 2008. Effect of gamma radiation on mutant induction of *Fagopyrum dibotrys* Hara. *Photosynthetica* 46(3):363-369.
- KAERI. 2010. [www.kaeri.re.kr](http://www.kaeri.re.kr).
- Kang, S.Y., D.Y. Kim and G.J. Lee. 2007. Genetic improvement of crop plants by mutation techniques in Korea. *Plant Mutation Rep.* 1(3):7-15 (in Korean).
- Kim, J.S., I.C. Shin, Y.K. Lee, J.K. Kim and H.S. Song. 1998. Effects of gamma ray on the seedling growth of rice varieties. *Korean J. Breed.* 30(3):227-231 (in Korean).
- Kwon, Y.S., E.K. Park, C.U. Park, K.M. Bae, S.I. Yi and I.H. Cho. 2006. Identification of rice variety using simple sequence repeat (SSR) marker. *Life Sci.* 16(6):1001-1005.
- Lee, I.S., D.S. Kim, S.J. Lee, H.S. Song, Y.P. Lim and Y.I. Lee. 2003. Selection agronomic traits of radiation-induced variants in rice. *Plant Biotechnol.* 30(1):19-25 (in Korean).
- Lee, K.H. 2005.  $\gamma$ -ray radiation on *Bletilla striata* R. seeds and occurrence of variation in the seedlings. M.A. Thesis, Chonbuk National Univ. (in Korean).
- Lee, Y.I., J.S. Kim, I.C. Shin and K.K. Kang. 1996. Selection from  $\gamma$ -ray-induced leaf mutants in *Perilla frutescens*. *Korean J. Breed.* 28(1):75-79 (in Korean).
- Neuhaus, H. and G. Link. 1987. The chloroplast tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Curr. Genet.* 11:251-257.
- RDA. National Institute of Crop Science. 2010. [www.nics.go.kr](http://www.nics.go.kr)
- Russel, T.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W.P. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722.
- So, H.S. 2012. Selection and characteristics of early heading rice (*Oryza sativa* L.) lines derived from gamma-ray irradiation. M.S. Thesis, Sunchon National Univ. (in Korean).
- Sung, S.Y., S.J. Chung, S.H. Kim, W.J. Kim, J.Y. Lee, D.S. Kim, J.B. Kim, H.G. Kim and S.Y. Kang. 2010. Analysis of genetic diversity among spray-type chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) 'Argus' and its flower-colored mutants. *J. Korean Radiation Ind.* 4(2):171-177 (in Korean).
- Tammam, A.A., M.M. Allam and M. Osman. 2005. Mutagenesis of *Dunaliella salina*. *Agricul. & Biol.* 7(3):477-481.
- Tsumura, Y., K. Ohba and S.H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92:40-45.
- Vergara, B.S., S. Puranabhabung and R. Lilis. 1965. Factors determining the growth duration of rice varieties. *Phyton. B. Aires.* 22:177-185.
- Yang, W.H., D.S. Kim, Y.H. Jeon, Y.C. Cho, J.K. Kim and H.L. Moon. 2004. Heading aspects of north Korean rice varieties in south Korea. *J. Korean Intl. Agri.* 16(1):68-75 (in Korean).

(접수일 2012.1.13; 수정일 2012.2.9; 채택일 2012.2.15)