

남일벼 돌연변이 후대 계통 ‘Namil(SA)-flo1’의 분질배유 특성에 대한 유전분석

모영준 · 정지웅[†] · 강경호 · 이점식 · 김보경

국립식량과학원 답작과

Genetic Analysis on Floury Endosperm Characteristics of ‘Namil(SA)-flo1’, a Japonica Rice Mutant Line

Young-Jun Mo, Ji-Ung Jeung[†], Kyung-Ho Kang, Jeom-Sig Lee, and Bo-Kyeong Kim

Rice Research Division, NICS, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT Rice varieties with suitable flour-making quality are required to promote rice processed-food industry and boost rice consumption in Korea. ‘Namil (SA)-flo1’ is an advanced mutant line with floury endosperm which shows good flour-making quality under dry-milling process. Genetic analysis was carried out to localize the chromosomal region responsible for the floury endosperm of ‘Namil (SA)-flo1’. By using 94 F₂ progenies, which were derived from ‘Namil (SA)-flo1’ × ‘Milyang 23’, floury grains percentage was investigated as phenotypic data, and genotyping was conducted with 54 SSR markers. Association analysis showed that the target genetic region for floury endosperm is on middle-low region of chromosome 5. Through further association analysis with increased number of SSR markers on chromosome 5, we found that genotypic variation in RM164 explains 79.7% of the variation in floury grains percentage of F_{2:3} seeds. The floury endosperm locus was localized on 17.7-20.7 Mbp region of chromosome 5 and will be further analyzed for fine mapping and gene identification.

Keywords : rice, floury endosperm, mutant, sodium azide (SA), genetic locus

쌀은 우리나라 국민 1일 에너지공급량의 약 40%를 차지하는 주식이며 국내 농업소득의 70%에 달하는 농가 주요 소득원이나 식생활의 서구화·다양화로 인하여 소비량이 지속적으로 감소하고 있다(Kim, 2011). 국민 1인당 연간 쌀 소비량은 1970년 136.4 kg에서 2012년 69.8 kg로 감소하였

으며, 이에 따라 벼 재배면적 역시 1975년 121.8만 ha에서 2012년 84.6만 ha로 줄어들어 생산기반이 취약해지고 있다(KOSTAT, 2013). 식량안보 차원에서 쌀 생산기반을 유지하기 위해서는 쌀 가공식품산업 활성화를 통한 소비촉진이 절실하나 국내 생산 쌀이 가공에 이용되는 비율은 6%에 불과하여 15%에 달하는 일본과 비교할 때 매우 미흡한 실정이다(Kim, 2010; Shin, 2010). 쌀 가공산업의 활성화와 소비 진작을 위해서는 밀가루를 대체할 수 있는 쌀가루의 제조 및 가공기술이 필수적으로 뒷받침되어야 한다.

쌀가루 제조에는 건식 및 습식제분이 활용되는데, 건식제분은 공정이 간단하나 손상전분이 증가하는 것이 문제점인 반면 습식제분은 가공성은 향상되지만 수침과 건조에 소요되는 시간과 비용이 제한요인으로 작용한다(Shin, 2010; Lee *et al.*, 2006; Jun *et al.*, 2008). 육종 측면에서 쌀 가공산업 활성화에 기여하기 위해서는 각 용도에 적합한 특성을 갖춘 가공용 품종의 다양화와 제분적성이 뛰어난 품종의 개발이 요구된다.

미질을 다양화하기 위한 시도로써 화학약품이나 방사선 처리를 통한 배유 돌연변이가 육종에 유용하게 활용되고 있다. Satoh & Omura(1981)는 ethyl methanesulfonate(EMS), ethylene imine(EI), N-methyl-N-nitrosourea(MNU)를 벼 종자 또는 수정란에 처리하여 찰(waxy), 중간찰(dull), 분질(floury), 당질(sugary) 등 다양한 배유 돌연변이 계통을 보고하였다. 국내에서는 농촌진흥청이 ‘일품벼’ 수정란 MNU 처리를 통하여 뽕안땀쌀(opaque)인 ‘설갱’, 중간찰인 ‘백진주’, 아밀로스 함량이 높은 ‘고아미2호’, 거대배아인 ‘큰눈’ 등을 육성하였고(Hong *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012a; Hong *et al.*, 2012b), 한국원자력연구원은 방사선을 활용하여 ‘녹

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6728 (E-mail) jrnj@korea.kr

<Received 22 April, 2013; Revised 26 July, 2013; Accepted 5 August, 2013>

원찰벼'를 비롯한 10여 품종을 개발하였다(Kang *et al.*, 2008). 또한 최근 Jeung *et al.*(2011b)은 '남일벼' 종자에 아지드화나트륨(sodium azide(SA); NaN_3)을 처리하여 'Namil(SA)-flo1'으로 명명된 분질계통을 육성하였다. 'Namil(SA)-flo1'은 건식제분 시 원품종인 '남일벼'의 이화학적 특성과 호화특성을 유지하면서도 쌀가루 입자 크기가 곱고 손상 전 분함량은 낮아 쌀가루 원료곡으로 활용하기 위한 건식제분 적합성을 보유한 것으로 확인되었다(Jeung *et al.*, 2011b).

분질배유(floury endosperm)는 찰벼와 유사하게 뿌영고 불투명한 외관을 지니면서 전분립 배열이 영성한 특성을 갖는 돌연변이로, 현재까지 염색체 1, 3, 4, 5, 8번 등에서 분질배유 특성을 지배하는 유전자좌들이 보고되고 있다. *flo-1*과 *flo-2*는 'Kinmaze' 품종에 수정란 MNU 처리를 통해 유기되었으며 각각 5번과 4번 염색체 상에 위치하는 것으로 보고되었다(Satoh & Omura, 1981; Kaushik & Khush, 1991). She *et al.*(2010)은 *flo-2*에 해당하는 유전자가 단백질 간의 상호작용(protein-protein interaction)을 매개하는 *FLOURY ENDOSPERM2(FLO2)*임을 밝혔다. *flo-3*는 16-kDa polypeptide 함량을 낮추는 분질배유 돌연변이로 3번 염색체 상에 위치한다(Nishio & Iida, 1993). *flo4*와 *flo5*는 각각 5번 염색체의 *OsPPDKB*와 8번 염색체의 *OsSSIIIa*에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체로 역시 전분립 배열 구조가 느슨한 분질배유 특성을 보였다(Kang *et al.* 2005, Ryoo *et al.* 2007). *flo(a)*는 '화청벼' MNU 처리를 통해 유기된 분질배유 돌연변이로 4번 염색체 상의 *OsTPR* 유전자로 동정되었다(Qiao *et al.* 2010). *flo6*는 'Nipponbare' 종자 EMS 처리로 유기되었으며 1번 염색체 상의 *OsAGPL2-3* 유전자에 G→A SNP가 유발된 분질배유 돌연변이임이 밝혀졌다(Zhang *et al.* 2012).

본 연구에서는 아지드화나트륨 처리로 유기한 분질배유 돌연변이 계통인 'Namil(SA)-flo1'의 분질립 발현에 대한 유전 분석을 수행하여 분질배유 관련 유전자좌의 염색체 상 위치를 파악하고 주동유전자의 정밀한 위치 결정을 위한 분자마커를 탐색함으로써 쌀가루 가공에 활용할 수 있는 분질배유 특성의 효율적 분자육종을 위한 육종소재를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 DNA 추출 및 분질립 비율 검정

Namil(SA)-flo1은 자포니카계 조생 다수성 품종인 '남일벼'의 종자에 인산가리완충용액에 희석한 아지드화나트륨을 처리하여 확보한 분질배유 돌연변이 후대계통이며 계보는 'Namil(SA)2652-RGA-1-1-1'에 해당한다(Jeung *et al.*, 2011b; Shin *et al.* 2009). 'Namil(SA)-flo1'의 분질배유 관련 유전

자위에 대한 유전분석을 위하여 'Namil(SA)-flo1' × '밀양23호'로부터 유래한 F₂ 식물체 94 개체를 육성하였다. F₂ 식물체와 모본, 부분으로부터 CTAB 방법(Murray & Thompson, 1980)을 약간 변형하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였으며 NanoDrop spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 정량 후 5 ng/ul로 희석하여 PCR에 이용하였다. 분질배유 관련 유전분석을 위한 표현형으로는 F₂ 식물체로부터 수확한 F_{2:3} 종자의 분질립 비율을 조사하여 분석에 활용하였다.

분리후대집단을 이용한 유전자지도 작성

기존에 보고된 SSR 마커 정보에 의거하여(McCouch *et al.* 2002) 12개 벼 염색체 상에 균등하게 위치하면서 'Namil(SA)-flo1'과 '밀양23호' 간에 다형성을 보이는 SSR 마커들을 선정하였다. 이를 위하여 각 SSR 마커에 의해 표지되는 벼 유전체 정보 상의 물리적 위치를 e-Landing(Jeung *et al.* 2007) 기법으로 파악하였다. 확인된 물리적 위치에 대응하는 BAC/PAC 클론들에 대한 정보와 유전자지도 상의 위치들은 Rice Genome Annotation Project(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)에서 제공하는 Rice Pseudomolecule Information을 참조하였다. 최초 54개 SSR 마커들에 대하여 F₂ 식물체의 유전자형을 조사하여 유전자지도 초안을 작성하였다. 차후 각 개체의 유전자형과 분질립 비율(표현형) 간의 연관성 분석(association analysis)에 의해 확인된 5번 염색체 상의 목표 유전자위에 핵산지문표지인자의 밀도를 높이기 위하여 7개 SSR 마커를 추가로 분석하였다(Table 1, Fig. 3). 각 SSR 마커들에 대하여 F₂ 식물체들로부터 조사된 유전자형의 분리비가 기대치에 부합하는지 평가하기 위하여 카이제곱검정(χ^2 test)을 실시하였다.

PCR은 10 ng의 DNA와 5 pmol의 forward 및 reverse 프라이머, 0.2 mM dNTP mix, 1X PCR buffer[50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂] 및 1 unit의 Taq polymerase(Nurotics, Korea)를 이용하여 총 부피 20 ul로 실시하였다. PTC-100[®] thermocycler(Waltham, USA)를 사용하여, 95°C에서 3분간 초기 변성 후 95°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초로 총 35회 반복하고, 72°C에서 5분간 반응하였다. PCR 산물은 Sequencing gel[5% polyacrylamide(19:1, acrylamide:bis-acrylamide), 6 M Urea, 1X TBE, 80W]을 이용하여 전기영동 한 후 Silver Sequence[™](Promega, USA)로 염색한 후 유전자형을 판정하였다.

분질배유 관련 유전자위 표지를 위한 유전통계분석

'Namil(SA)-flo1'의 분질배유 관련 유전자위를 염색체 상

Table 1. List of SSR markers used, their *e*-Landing mediated physical positions on Rice Pseudomolecule 7, corresponding BAC/PAC clones with their determined cM positions, and the segregation test (χ^2) results on the F₂ progenies derived from 'Namil(SA)-flo1' × 'Milyang 23'. (Continued)

Marker	Ch	Physical information ^a					Mirror map ^b		Segregation test ^c				
		Start	Stop	e-PCR	e%	BAC/PAC	cM	cM%	A	H	B	M	χ^2
RM3252	1	302,879	303,050	172	0.7	AP002818.2	0.3	0.2	22	47	25	0	0.09
RM600	1	9,464,568	9,464,788	221	21.9	AP001081.1	49.6	27.3	29	38	27	0	2.98
RM449	1	15,124,290	15,124,405	116	35.0	AP006530.3	73.1	40.2	27	43	24	0	0.64
RM1349	1	25,071,234	25,071,452	219	57.9	AP002744.2	103.1	56.7	27	47	20	0	0.77
RM1003	1	33,476,952	33,477,079	128	77.4	AP003345.3	136.6	75.1	27	43	24	0	0.64
RM6321	1	42,924,171	42,924,338	168	99.2	AP003277.2	181.8	100.0	19	51	24	0	0.94
RM154	2	1,083,895	1,084,077	183	3.0	AP005851.2	5.8	3.7	31	48	15	0	4.81
RM5699	2	8,981,411	8,981,577	167	25.0	AP005803.3	42.1	26.7	33	39	22	0	4.69
RM1211	2	18,456,296	18,456,457	162	51.4	AP005299.3	60.9	38.5	28	48	18	0	1.75
RM3220	2	28,463,977	28,464,117	141	79.2	AP004118.4	118.1	74.8	22	47	25	0	0.09
RM3850	2	35,431,667	35,431,776	110	98.6	AP003989.4	157.9	100.0	17	46	30	1	3.10
RM6301	3	2,652,360	2,652,502	143	7.3	AC090485.3	13.3	8.0	18	52	24	0	1.49
RM7	3	9,829,489	9,829,659	171	27.0	AC134232.2	44.4	26.7	8	47	39	0	19.15***
RM6266	3	23,823,769	23,823,928	160	65.4	AC091246.8	94.9	57.0	17	45	32	0	4.30
RM1350	3	28,683,340	28,683,508	169	78.8	AC087181.9	126.8	76.2	24	45	25	0	0.09
RM3585	3	36,141,626	36,141,794	169	99.3	AC128647.8	163.1	98.0	22	50	22	0	0.22
RM551	4	178,080	178,271	192	0.5	AL606442.3	3.1	2.3	22	52	20	0	0.86
RM5633	4	13,084,092	13,084,302	211	36.9	AL731595.1	20.4	15.4	21	52	21	0	0.77
RM3839	4	24,089,850	24,090,067	218	67.9	AL606614.3	72.8	54.9	24	45	25	0	0.09
RM559	4	35,336,720	35,336,879	160	99.5	AL606637.3	129.6	97.7	23	47	24	0	0.01
RM5693	5	463,830	464,029	200	1.5	AC129716.3	4.6	3.8	21	51	22	0	0.47
RM3322	5	4,262,754	4,262,874	121	14.2	AC087553.3	32.0	26.2	24	35	34	1	7.12*
RM5140	5	13,541,687	13,541,870	184	45.2	AC093953.2	54.6	44.6	25	31	38	0	13.49***
RM3838	5	16,553,562	16,553,759	198	55.3	AC136221.2	60.7	49.6	24	38	32	0	4.26
RM6024	5	17,812,759	17,812,936	178	59.5	AC104707.2	67.5	55.2	21	44	28	1	0.99
RM164	5	19,258,988	19,259,252	265	64.3	AC132483.2	74.5	60.9	26	46	22	0	0.22
RM3351	5	20,759,270	20,759,403	134	69.3	AC109595.2	80.7	66.0	30	41	22	1	2.24
RM5558	5	21,251,913	21,252,085	173	70.9	AC105769.2	86.0	70.3	24	49	21	0	0.22
RM5642	5	22,246,931	22,247,059	129	74.3	AC093919.2	92.0	75.2	25	47	22	0	0.09
RM3870	5	22,962,885	22,963,077	193	76.6	AC108503.4	95.3	77.9	26	47	21	0	0.35
RM1054	5	29,227,307	29,227,456	150	97.6	AC098598.2	122.0	99.8	22	50	22	0	0.22
RM3353	6	436,581	436,696	116	1.4	AP001129.1	1.4	1.1	12	48	33	1	8.67*
RM3370	6	6,435,835	6,436,011	177	20.6	AP005545.3	34.3	27.6	5	39	50	0	43.75***
RM3628	6	23,738,029	23,738,154	126	76.0	AP003612.2	85.4	68.6	17	42	35	0	7.11*
RM5753	6	30,967,848	30,968,048	201	99.1	AP004685.3	124.4	100.0	22	47	24	1	0.03

Table 1. List of SSR markers used, their *e*-Landing mediated physical positions on Rice Pseudomolecule 7, corresponding BAC/PAC clones with their determined cM positions, and the segregation test (χ^2) results on the F₂ progenies derived from ‘Namil(SA)-flo1’ × ‘Milyang 23’. (Continued)

Marker	Ch	Physical information ^a					Mirror map ^b		Segregation test ^c				
		Start	Stop	e-PCR	e%	BAC/PAC	cM	cM%	A	H	B	M	χ^2
RM1093	7	669,862	670,011	150	2.3	AP003746.2	2.5	2.1	28	46	20	0	1.07
RM1377	7	12,784,523	12,784,703	181	43.0	AP004305.3	49.7	41.9	19	45	30	0	2.26
RM3743	7	19,344,028	19,344,207	180	65.1	AP003815.2	67.0	56.5	19	48	27	0	1.07
RM172	7	29,562,285	29,562,443	159	99.5	AP005199.3	118.6	100.0	22	43	29	0	1.37
RM408	8	126,282	126,410	129	0.4	AP005406.3	0.0	0.0	23	47	24	0	0.01
RM547	8	5,592,402	5,592,635	234	19.7	AP004746.3	41.6	34.3	18	44	32	0	3.92
RM3262	8	22,381,176	22,381,342	167	78.7	AP005483.3	86.7	71.5	25	45	24	0	0.09
RM5545	8	28,274,770	28,274,926	157	99.4	AP004623.3	121.2	100.0	24	46	24	0	0.01
RM316	9	1,075,933	1,076,126	194	4.7	AP005860.2	0.8	0.9	25	45	23	1	0.09
RM219	9	7,888,585		NA	34.3	AP005912.3	20.7	22.1	22	45	26	1	0.26
RM566	9	14,705,799	14,706,037	239	63.9	AP005397.2	50.7	54.2	22	46	17	9	0.88
RM205	9	22,721,127	22,721,282	156	98.7	AP005546.3	93.5	100.0	25	47	22	0	0.09
RM7492	10	54,866	55,010	145	0.2	AC108883.1	0.0	0.0	17	47	30	0	3.07
RM311	10	9,818,621	9,818,917	297	42.3	AC090482.3	17.2	20.5	19	51	24	0	0.94
RM1375	10	16,716,154	16,716,333	180	72.0	AC025905.3	42.7	51.0	24	49	21	0	0.22
RM590	10	23,114,684	23,114,821	138	99.6	AC018727.10	83.8	100.0	21	55	18	0	2.43
RM286	11	384,837	384,958	122	1.3	BX000497.1	1.4	1.2	17	48	29	0	2.60
RM536	11	8,990,534	8,990,776	243	31.0	AC138197.3	49.1	41.6	21	39	34	0	5.62
RM3428	11	13,945,470	13,945,626	157	48.1	AC128642.3	56.2	47.7	21	40	33	0	4.52
RM5349	11	19,650,313	19,650,435	123	67.7	AC134925.4	79.1	67.1	18	45	31	0	3.20
RM5961	11	19,926,656	19,926,784	129	68.7	AC108223.5	79.9	67.8	17	45	32	0	4.30
RM144	11	28,804,933	28,805,157	225	99.3	AC134045.2	116.2	98.6	17	49	28	0	2.26
RM8215	12	1,586,781	1,587,001	221	5.8	BX000498.1	10.8	9.9	23	42	28	1	1.12
RM1337	12	11,935,984	11,936,165	182	43.4	BX000556.3	51.5	47.2	14	51	29	0	4.77
RM277	12	18,319,022		NA	66.5	AL831799.3	63.3	58.0	12	40	42	0	19.84***
RM17	12	26,988,269	26,988,436	168	98.0	AC027133.3	107.4	98.4	7	54	33	0	15.24***

^aThe primer sequences were used as queries to localize on the Rice Pseudomolecules Release 7. When both primer sequences were successfully recognized for their physical locations to be annealed, the expected PCR product size (*e*-PCR: ‘Stop’-‘Start’+1bp, NA=not available) was used to judge PCR products. If any primer failed for *e*-Landing, the other primer’s location was used to estimate the corresponding point. The determined physical regions followed by *e*-Landing were used to match corresponding BAC/PAC clones according to the ‘Rice Pseudomolecule Information and Gene Search’ (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>).

^bThe determined cM positions for each BAC/PAC clones was directly adopted from the ‘Rice Pseudomolecule Information and Gene Search’, which were estimated using the marker sequences obtained from the Cornell Rice Genes Database and the Japanese Rice Genome Program. To compare the cM positions from various mapping populations with different total lengths, the percentage relative genetic positions, ‘cM%’, was also calculated.

^cA and B are homozygous for ‘Namil(SA)-flo1’ and ‘Milyang 23’ allele types, respectively, H is for heterozygous progenies at the tested locus, and M indicates the number of plants with missing allele. Segregation distorted loci are indicated with asterisk; ****P*<0.0001, ***P*<0.01, and **P*<0.05.

Table 2. Summary of association analysis between the SSR marker genotypes of F₂ progenies and floury grains percentage (FGP) of F_{2:3} seeds derived from 'Namil(SA)-flo1' × 'Milyang 23'.

Locus ^a		Mirror-map ^b			Mean FGP (%) ^c			Single-locus ANOVA				Genetic effect ^d	
Marker	Ap	Ch	cM	cM(%)	A	H	B	SSM	SSE	F	R ²	Add	DeD
RM5693	1	5	4.6	3.8	41.6	42.3	27.2	3758.1	134369.6	1.3	0.027	-7.2	-1.1
RM3322	2	5	32.0	26.2	60.3	37.0	26.0	16788.8	119832.2	6.3**	0.123	-17.2	0.4
RM5140	1	5	54.6	44.6	66.6	38.3	20.4	32067.4	106060.3	13.8***	0.232	-23.1	0.2
RM3838	2	5	60.7	49.6	81.7	36.4	8.9	73007.8	65119.9	51.0***	0.529	-36.4	0.2
RM6024	2	5	67.5	55.2	86.1	35.8	8.8	72538.1	64082.9	50.9***	0.531	-38.6	0.3
RM164	2	5	74.5	60.9	91.7	26.2	1.9	110066.0	28061.7	178.5***	0.797	-44.9	0.5
RM3351	2	5	80.7	66.0	64.2	28.9	22.2	29489.2	108572.0	12.2***	0.214	-21.0	0.7
RM5558	1	5	86.0	70.3	78.3	30.2	12.9	55226.7	82901.0	30.3***	0.400	-32.7	0.5
RM5642	2	5	92.0	75.2	71.3	30.3	19.3	38229.3	99898.4	17.4***	0.277	-26.0	0.6
RM3870	2	5	95.3	77.9	70.8	34.5	8.1	47209.1	90918.6	23.6***	0.342	-31.3	0.2
RM1054	1	5	122.0	99.8	44.0	39.3	31.7	1705.1	136422.5	0.6	0.012	-6.1	-0.2
RM7492	1	10	0.0	0.0	31.7	38.1	43.4	1491.0	136636.7	0.5	0.011	5.8	0.1
RM311	1	10	17.2	20.5	32.2	42.9	34.7	2081.7	136046.0	0.7	0.015	1.2	7.6
RM1375	1	10	42.7	51.0	37.6	47.6	18.9	12109.5	126018.1	4.4*	0.088	-9.3	-2.1
RM590	1	10	83.8	100.0	49.5	34.3	39.1	3528.3	134599.3	1.2	0.026	-5.2	1.9

^aDNA markers were tested on 94 F₂ progenies of 'Namil(SA)-flo1' × 'Milyang 23'. After the first round of association analyses with well defined 54 anchor markers (application: Ap=1), additional 7 markers were applied to narrow down the putative location of floury endosperm gene on chromosome 5 (Ap=2). Markers with significant F value were found only on chromosomes 5 and 10.

^bBoth cM positions and percentage-expressed (cM%) are indicated (see Table 2).

^cMean floury grains percentage (FGP) for each genotype categories revealed by SSR markers. A and B are homozygous for Namil(SA)-flo1 and Milyang 23 allele types, respectively, and H indicates heterozygous progenies at the tested locus.

^dAdditive effect (Add), and degree of dominance (DeD) were then estimated at the declared loci: Add=(Bmean-Amean)/2 and DeD=Do/Add, where A and B are homozygous F₂ individuals for 'Namil(SA)-flo1' and 'Milyang 23', H is heterozygous individuals at the tested locus, and Do(dominant effect) = Hmean-(Bmean+Amean)/2.

***P<0.0001, **P<0.01, and *P<0.05.

에서 탐색하기 위하여 'Namil(SA)-flo1' × '밀양23호'의 F₂ 개체들로부터 확보된 SSR 마커 유전자형과 F_{2:3} 종자 분질립 비율 사이의 연관성분석(association analysis)을 수행하였다. SAS 프로그램(SAS Institute, 2000)의 PROC MEANS를 이용하여 기술통계량을 산출하였고, PROC GLM을 이용하여 각 SSR 마커들에 의해 표지되는 유전자좌가 분질립 비율에 관여하는 정도를 판정하였다. 각 유전자좌에 대한 F 분석 결과 P 값이 0.05보다 작으면 유의하다고 판정하고, F₂ 분리집단에서 관찰된 F_{2:3} 종자 분질립 비율의 분산에 대한 해당 유전자좌의 기여도(R²), 유전적 작용가(additive effect), 기작양상(degree of dominance) 등을 추정하였다(Jeung *et al.*, 2011a).

결과 및 고찰

'Namil(SA)-flo1' × '밀양23호' 교잡후대를 이용한 유전자 지도 작성

'Namil(SA)-flo1' × '밀양23호'의 교배립으로부터 유래한 F₁ 식물체를 자가수정시켜 F₂ 종자를 확보하고 94개의 F₂ 식물체를 전개하였다. 이로부터 수확한 F_{2:3} 종자의 분질립 비율(Fig. 1)과 분포(Fig. 2)를 조사하였다. 94개의 F₂ 개체 중 종자 분질립 비율이 10% 이하인 개체가 24개로 전체의 25.5%, 종자 분질립 비율 90% 이상인 개체가 역시 24개로 전체의 25.5%를 차지하였다. 나머지 약 49%에 해당하는 F₂ 개체의 종자 분질립 비율은 대부분 15~35%임을 알 수 있었으며, 이를 통하여 'Namil(SA)-flo1' 분질배유는 열성의 단일 유전자에 의해 지배된다는 것을 추론할 수 있었다.

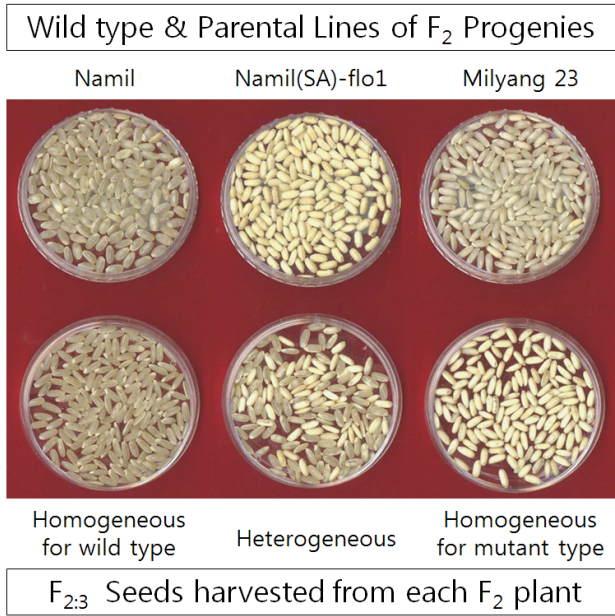


Fig. 1. Grains of Namil, Namil(SA)-flo1, Milyang 23, and F_{2:3} seeds derived from ‘Namil(SA)-flo1’ × ‘Milyang 23’.

유전자지도 작성에는 처음부터 전 염색체에 고밀도의 핵산표지인자를 배치하는 대신, 각 염색체마다 최소한의 개수로 이루어진 SSR 마커를 균등하게 배치하여 유전자지도 초안(linkage map skeleton)을 작성하였다. 염색체별 마커 배치에는 Jeung *et al.*(2007)이 제시한 *e-Landing* 기법을 활용하여 각 SSR 마커에 대응하는 벼 유전체 정보를 파악하고 ‘mirror map’을 구축함으로써 추가적인 유전통계분석 절차를 생략하였다. 약 250여 개의 SSR 마커들에 대하여 ‘Namil(SA)-flo1’과 ‘밀양23호’ 간의 다형성을 검토한 후 각 염색체마다 균등한 위치에 다형성을 나타내는 마커를 4~6개씩 배치하여 총 54개의 SSR 마커로 이루어진 유전자지도 초안을 작성하였다(Table 1). 조사된 유전자형의 분리비를 검정한 결과 비정상적인 분리(segregation distortion)는 3번 염색체 상단, 5번 염색체 중단, 6번 염색체 상단, 12번 염색체 하단 부위에서 두드러졌다(Table 1; Segregation test).

연관성분석(association analysis)을 이용한 분질배유 관련 유전자위 표지

유전자지도 초안의 54개 SSR 마커를 대상으로 각 마커의 유전형에 따른 표현형(분질립 비율)에 대하여 분산분석을 실시하고 *F* 값과 함께 *R*² 값(표현형 분산이 유전형에 의하여 설명되는 비율)을 제시하였다(Table 2). 각 마커가 표지하는 유전자위 별로 분산분석 결과 통계적으로 유의한 *F* 값을 가질 경우 근접부위에 F₂ 분리집단의 표현형 변이에

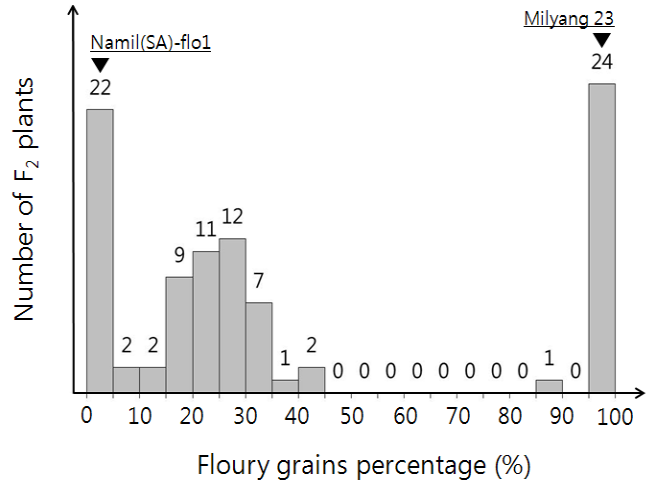


Fig. 2. Histograms of floury grains percentage in F_{2:3} seeds derived from the 94 F₂ progenies lines of ‘Namil(SA)-flo1’ × ‘Milyang 23’.

영향을 끼치는 유전자가 존재하는 것으로 판단하였다.

총 54개의 SSR 마커들 중 통계적으로 유의한 *F* 값을 가지는 마커는 3개로, 5번 염색체 중단의 RM5140(*F*=13.8), 5번 염색체 하단의 RM5558(*F*=30.0), 10번 염색체 하단의 RM1375(*F*=4.4)이었다(Table 2). RM5140과 RM5558의 경우 ‘Namil(SA)-flo1’의 유전자형을 homo로 보유한 F₂ 개체들의 그룹이 hetero 그룹이나 ‘밀양23’호의 유전자형을 homo로 보유한 그룹에 비하여 평균 분질립 비율이 2배 이상 높았으며, 두 마커의 유전자형은 F₂ 개체들의 분질립 비율 변이를 각각 23.2%, 40.0% 설명하였다. 반면 RM1375의 경우 hetero 유전자형을 보유한 F₂ 개체들의 그룹이 가장 높은 분질립 비율을 보였으며, RM1375의 유전자형에 의하여 F₂ 개체들의 분질립 비율 변이가 설명되는 정도는 8.8%로 상대적으로 낮았다.

분질배유 관련 유전자위를 5번 염색체 중~하단 부위로 추정하고 목표부위에 7개의 SSR 마커를 추가하여 연관성 분석을 재실시한 결과 RM164가 최대의 *F* 값(178.5)을 가지면서 F₂ 개체들의 분질립 비율 변이를 79.7% 설명하는 것으로 확인되었고, RM164를 정점으로 하여 위아래로 멀어질수록 *R*²가 점차로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이에 따라 ‘Namil(SA)-flo1’의 분질배유 특성을 지배하는 유전자위는 RM164에 근접한 부위에 존재하는 것으로 추측할 수 있었다. RM164에 대하여 ‘Namil(SA)-flo1’의 유전자형을 homo로 보유한 F₂ 개체들(n=26)의 평균 분질립 비율은 91.7%, ‘밀양23호’의 유전자형을 homo로 보유한 F₂ 개체들(n=22)의 평균 분질립 비율은 1.9%로 나타났으며, 두 유전자형을 hetero로 보유한 F₂ 개체들(n=46)의 평균 분질립 비율은

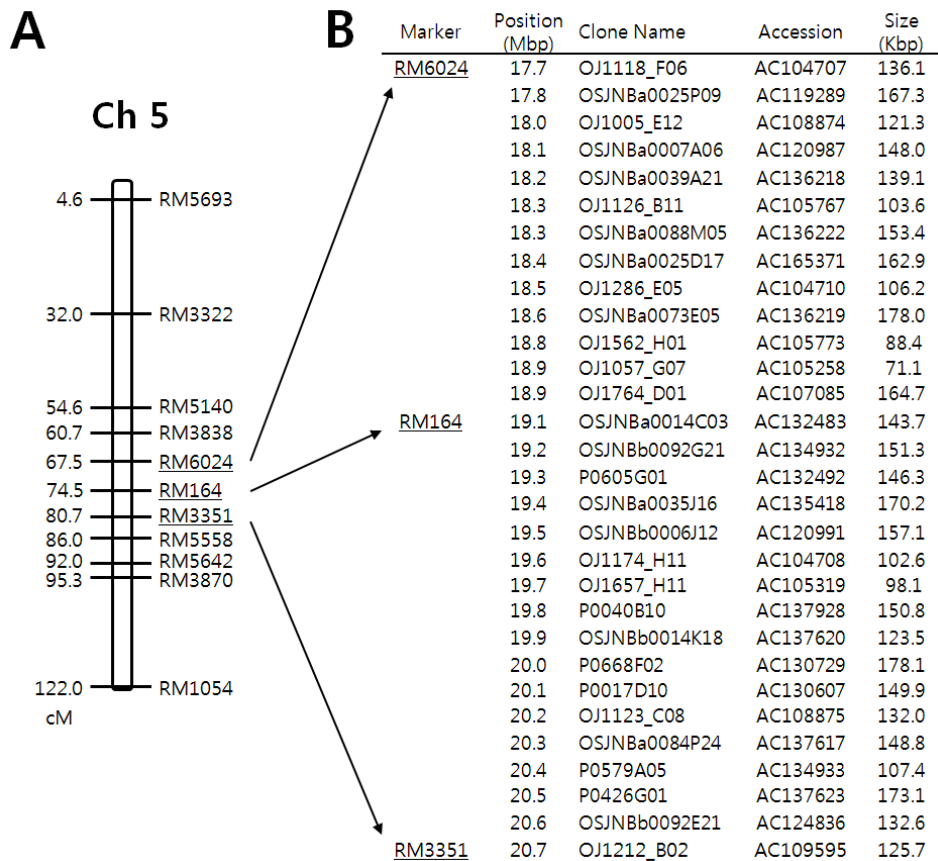


Fig. 3. High density linkage map for the target region on rice chromosome 5, the nest of the floury endosperm gene originated from Namil(SA)-flo1. **A.** Linkage map skeleton of chromosome 5 with 11 SSR markers used to narrow down the putative location. Markers were applied based on F-statistics from single-locus ANOVA results (see Table 2). **B.** High resolution map for the target region surrounded by SSR markers was determined through *e*-Landings. Based on the primer sequence information of SSR markers, the corresponding 3.0 Mbp virtual contig composed of BAC/PAC clones was determined.

26.2%였다. 이를 통하여 'Namil(SA)-flo1'의 배유 분질특성을 지배하는 유전인자는 열성으로 작용하는 단일 유전자임을 다시 확인할 수 있었다.

기준에 밝혀진 분질배유 관련 유전자위 중 5번 염색체 상에서는 *flo-1*과 *flo4*가 보고되었다(Kang *et al.* 2005; Kaushik & Khush, 1991). *flo-1*의 경우 삼염색체분석(trisomic analysis)를 통하여 5번 염색체에 위치하는 것이 밝혀졌으며 정밀위치나 유전자 수준의 분석은 이루어지지 않았다(Kaushik & Khush, 1991). *flo4*는 5번 염색체의 19.7 Mbp 부근에 위치한 *OsPPDKB* 유전자에 T-DNA 또는 *Tos17*이 삽입된 돌연변이이다(Kang *et al.* 2005).

***e*-Landing을 통한 목표유전자위 대응 벼 유전체 탐색**

각 SSR 마커에 대하여 *e*-Landing을 통하여 추정된 물리 위치를 참조한 결과(Table 1; Physical information), 5번 염색체의 RM6024-RM164-RM3351에 해당하는 부위는 17.7~

20.7 Mbp 사이의 약 3 Mbp 크기이며 30개의 BAC/PAC 클론들로 이루어진 부위임을 알 수 있었다(Fig. 3). 해당 부위는 19.7 Mbp 부근의 기준에 보고된 *flo4*를 포함하는 부위로(Kang *et al.* 2005), 'Namil(SA)-flo1'의 분질배유 지배 유전자가 *flo4*와 동일한 유전자의 대립인자인지 별개의 유전자인지는 추후 연구를 통하여 밝혀지게 될 것이다. 현재 해당부위에 대하여 hetero 유전자형을 보유하고 있는 F₂ 개체들을 자가수정시켜 목표 부위에 재조합이 일어난 F₃ 개체들을 추가분리집단으로 확보하는 작업이 진행 중에 있다. 이를 통하여 'Namil(SA)-flo1'의 분질배유 지배 유전자위를 보다 정밀하게 탐색하고 해당부위를 포함하는 BAC/PAC 클론의 전사부위(open reading frame; ORF) 정보를 활용하여 추가 연구를 진행함으로써 분질배유 관련 목적유전자의 동정이 이루어지게 될 것이다. 또한 이 과정에서 쌀가루 제분적성을 갖춘 가공용 품종 개발 시 분질배유 특성을 효과적으로 도입하기 위하여 활용할 수 있는 초정밀 핵산표지인

자도 개발할 수 있을 것으로 기대된다(Jeung *et al.* 2007).

적 요

쌀 가공산업을 활성화하고 소비를 촉진하여 국내 쌀 생산 기반을 유지하기 위해서는 쌀가루 제분적성을 보유한 가공용 벼 품종 개발이 시급하다. 농촌진흥청 국립식량과학원에서는 아지드화나트륨을 돌연변이원으로 활용하여 건식제분 적합성을 보유한 분질배유 돌연변이 후대계통인 ‘Namil(SA)-flo1’를 육성한 바 있다. 본 연구는 염색체 상에서 ‘Namil(SA)-flo1’의 분질배유 특성을 지배하는 유전자위를 탐색하고자 수행하였다. 주요 결과는 아래와 같다.

1. ‘Namil(SA)-flo1’ × ‘밀양23호’로부터 유래한 F₂ 94 개체로부터 종자 분질립 비율을 검정하고 54개 SSR 마커의 유전자형을 검정하여 연관성분석(association analysis)을 수행한 결과 목표 유전자위는 5번 염색체 중하단 부위로 추정되었다.
2. 목표 부위의 SSR 마커 밀도를 높여 추가 연관성분석을 실시하였고, F_{2:3} 종자 분질립 변이의 79.7%가 5번 염색체 상의 RM164의 유전자형 변이에 의하여 설명된다는 것을 확인하였다.
3. 이를 통하여 분질배유 지배 유전자위를 5번 염색체 17.7~20.7 Mbp 부위로 추정하였으며, 추후 추가 분리 집단을 이용하여 목표 유전자를 동정하고 쌀가루용 품종 개발에 활용할 수 있는 핵산정밀표지인자를 개발할 계획이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 작물시험연구사업(과제번호 PJ009 2622013)의 지원으로 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

Hong, H. C., H. P. Moon, H. C. Choi, H. G. Hwang, Y. G. Kim, H. Y. Kim, J. D. Yea, Y. S. Shin, K. H. Kang, Y. H. Choi, Y. C. Cho, M. K. Baek, C. I. Yang, I. S. Choi, S. N. Ahn, and S. J. Yang. 2011. New cultivar developed : A lodging tolerant, opaque rice cultivar “Seolgaeng”. *Kor. J. Breed. Sci.* 43(6) : 532-537.

Hong, H. C., Y. H. Choi, H. G. Hwang, Y. G. Kim, H. P. Moon, H. Y. Kim, J. D. Yea, Y. S. Shin, Y. H. Choi, Y. C. Cho, M. K. Baek, J. H. Lee, C. I. Yang, K. H. Jeong,

S. N. Ahn, and S. J. Yang. 2012a. New cultivar developed : A lodging-tolerance and dull rice cultivar “Baegjinju”. *Kor. J. Breed. Sci.* 44(1) : 51-56.

Hong, H. C., Y. G. Kim, Y. H. Choi, S. J. Yang, K. S. Lee, J. H. Lee, O. Y. Jung, C. I. Yang, Y. C. Cho, I. S. Choi, M. K. Baek, M. K. Kim, J. D. Yea, H. G. Hwang, J. H. Roh, S. R. Kim, H. C. Choi, Y. T. Lee, and S. H. Lee. 2012b. A medium-maturing, giant-embryo, and germination brown rice cultivar “Keunnun”. *Kor. J. Breed. Sci.* 44(2) : 160-164.

Jeung, J. U., B. R. Kim, Y. C. Cho, S. S. Han, H. P. Moon, Y. T. Lee, and K. K. Jena. 2007. A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 115(8) : 1163-1177.

Jeung, J. U. and Y. S. Shin. 2011a. Genetic analysis on the bacterial blight resistance gene from a wild relative, *Oryza minuta*. *Korean J. Crop Sci.* 56(1) : 57-63.

Jeung, J. U., T. H. Roh, K. H. Kang, Y. S. Shin, and Y. G. Kim. 2011b. Genetic analysis on the bacterial blight resistance gene from a wild relative, *Oryza minuta*. *Korean J. Crop Sci.* 56(2) : 124-133.

Jun, H. I., E. J. Yang, Y. S. Kim, and G. S. Song. 2008. Effect of dry and wet millings on physicochemical properties of black rice flours. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 37(7) : 900-907.

Kang, H. G., S. Park, M. Matsuoka, and G. An. 2005. Whitecore endosperm *floury endosperm-4* in rice is generated by knockout mutations in the C4-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (*OsPPDKB*). *Plant J.* 42(6) : 901-911.

Kang, S. Y., I. C. Shin, D. S. Kim, G. J. Lee, J. B. Kim, D. Y. Lee, S. Y. Lee, and D. J. Lee. 2008. A New Green-Kerneled glutinous rice mutant variety, “Nogwonchalbyeo” developed by gamma ray irradiation. *Korean J. Breed. Sci.* 40(3) : 303-307.

Kaushik, R. P. and G. S. Khush. 1991. Genetic analysis of endosperm mutants in rice *Oryza sativa L.* *Theor. Appl. Genet.* 83(2) : 146-152.

Kim, M. R. 2011. The status of Korean rice industry and the rice processing industry. *Food Industry and Nutrition.* 16(1) : 22-26.

Kim, T. H. 2010. Status of rice processing industry and rice processing products. *Food Preservation and Processing Industry.* 9(2) : 86-96.

KOSTAT. 2013. Survey results on the grain consumption of Korea in 2012. Statistics Korea.

Lee, M. H. and Y. T. Lee. 2006. Bread-making properties of rice flours produced by dry, wet and semi-wet milling. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 35(7) : 886-890.

McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, L. B. Lobos, K. Clare, and M. Walton *et al.* 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa L.*). *DNA*

- res. 9(6) : 199-207.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19) : 4321-4326.
- Nishio, T. and S. Iida. 1993. Mutants having a low content of 16-kDa allergenic protein in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor. Appl. Genet.* 86(2-3) : 317-321.
- Qiao, Y., S. I. Lee, R. Piao, W. Jiang, T. H. Ham, and J. H. Chin *et al.* 2010. Fine mapping and candidate gene analysis of the floury endosperm gene, *FLO (a)*, in rice. *Mol. Cells.* 29(2) : 167-174.
- Ryoo, N., C. Yu, C. S. Park, M. Y. Baik, I. M. Park, and M. H. Cho *et al.* 2007. Knockout of a starch synthase gene *OsSSIIIa/Flo5* causes white-core floury endosperm in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Cell Rep.* 26(7) : 1083-1095.
- Satoh, H. and T. Omura. 1981. New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice, *Oryza sativa L.* *Jpn. J. Breeding.* 31(3) : 316-326.
- She, K. C., H. Kusano, K. Koizumi, H. Yamakawa, M. Hakata, and T. Imamura *et al.* 2010. A novel factor FLOURY ENDOSPERM2 is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell.* 22(10) : 3280-3294.
- Shin, M. S. 2010. The activation of the rice processing industry for initiating green food industry in the future. *Food Preservation and Processing Industry.* 9(1) : 16-37.
- Shin, Y. S., C. S. Park, Y. W. and Seo, J. U. Jeung. 2009. Characteristics of endosperm starch of the rice mutant lines induced by sodium azide. *Korean J. Breed. Sci.* 41(2) : 84-91.
- Zhang, D., J. Wu, Y. Zhang, and C. Shi. 2012. Phenotypic and candidate gene analysis of a new floury endosperm mutant (*osagpl2-3*) in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30(6) : 1303-1312.