

벼의 이상적인 초형에 관여하는 QTL 분석

정일경¹, 김경민^{2*}

¹대구가톨릭대학교 생명공학과, ²경북대학교 농업생명과학대학 응용생명학부

QTL Analysis of Concerned on Ideal Plant Form in Rice

Il Kyung Chung¹ and Kyung-Min Kim^{2*}

¹Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan-Si 38430, Korea

²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Abstract - Rice is the staple food of at least half of the world's population. Due to global warming, the weather is difficult to forecast nowadays. Therefore, it is necessary to breed various breeding to respond to such changes in the environment. This study was conducted to analyze the QTL about plant form, culm length, ear number and ear length by using 120 lines by anther culture, a cross between the *Indica* variety Cheongcheong and *Japonica* variety Nagdong. DNA marker was selected on the QTLs gene, and the following results were obtained. CNDH (Cheongcheong Nagdong Doubled Haploid) lines frequency distribution table curves about culm length, ear number and ear length exhibited showed a continuous variation close to a normal distribution. QTL analysis result, on culm length qPIL1-1 and qPIL1-2 were detected on the chromosome 1 and qPIL5 was detected on the chromosome 5. However, on ear length qPL2, qPL3 and qPL10, were detected on the chromosome 2, 3 and 10, while on ear number qPN1-1 and qPN1-2 were detected on the chromosome 1, qPN9 was detected on the chromosome 9. The QTLs related to culm length was found to chromosomes 5 and LOD scores were 3.81. The QTLs related to ear length was found to chromosomes 2 and 3 LOD scores were 7.13 and 3.20. The QTLs related to ear number was found to chromosome 9 and LOD scores were 4.27. Twenty two (22) *Japonica* cultivars and 12 *Indica* cultivars were analyzed polymorphisms, using selected 9 markers from the result about plant form analysis. RM5311, RM555 and RM8111 about the culm length, the ear length and number of ear were selected on the standard of Cheongcheong and Nagdong. Each rate of concordances about the culm length, the ear length and number of ear are 44.11%, 41.17% and 44.11%.

Key words - Anther Culture, QTL, DNA marker, Plant form, Chromosome

서 언

벼는 한국뿐만 아니라 동아시아 지역과 동남아, 나아가 전 세계에서 옥수수과 밀에 이어 세 번째로 많이 재배하며 세계 인구의 과반수가 주식으로 먹는 중요한 작물이다. 최근 세계 인구의 증가, 경작지의 감소, 물 부족 현상, 증가하는 토양 염도, 살충제 저항성 해충과 병원균의 증가, 그리고 기후 변화와 중위도 지역에서의 연평균온도 상승으로 환경 변화를 예측하기가 어려워졌다(Khush, 1999; Lee *et al.*, 2015). 따라서 이런 환경 변화에 대응하기 위한 여러 가지 품종을 육종하는 것이 필수적이며 보

다 증가된 생산 능력 및 안정성을 갖는 벼 품종 생산이 요구된다 (Khush, 1997). 식물의 초형이라 하는 식물체 지상부의 구조는 생산성에 중요한 영향을 미친다. 이상적인 초형(ideotype)은 작물 육종의 중요 목표 중에 하나이며 이는 간장, 수장, 개체당 이삭수, 분얼자 및 엽신의 열 개 정도, 엽각 등에 의해 결정되게 된다(Guo *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008; Peng, 2008). DNA 마커를 이용하는 분자생물학적 기술 중 DNA를 증폭하여 유전자를 분석하는 PCR이 보편화되면서 유전자 지도가 광범위하게 작성되었으며, 이를 이용하여 양적형질에 관련되어있는 유전자좌(Quantitative trait loci)를 분석할 수 있게 되었다. Tanksley (1993)는 양적형질유전자좌를 이용하여 각각의 형질발현에 영향을 미치는 정도를 분석할 수 있게 되면서 QTL이 보편적으로

*교신저자: kkm@knu.ac.kr

Tel. +82-53-950-5711

이용되기 시작했다. 양적형질유전자좌를 이용하여 간장, 수장 개체당 이삭수와 같은 식물 생육특성과 더불어 수량에 대한 보고가 이루어졌다(Cho *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2014). DNA 마커와 양적형질유전자좌를 이용하여 DNA 마커의 체계적인 관리로 양적형질유전자좌를 이용한 도복저항성 벼와 수량의 관계를 보고한 새로운 접근법이 연구되었으며 도복저항성의 개량을 목적으로 하는 QTL 분석 연구가 이루어졌다(Ookawa *et al.*, 2010). QTL mapping과 DNA 마커로 작물의 양적형질에 관여하는 유전자좌 연구에서 DNA 마커를 선발하여 특정 형질을 개량하는 방법인 MAS (marker-assisted selection)는 육종연한 단축과 형질전환하는 목적으로 사용되고 있다(Xiao *et al.*, 1996; Sasaki, 2001). 따라서 본 연구에서는 분자 유전학적 기법을 이용한 육종 연구의 효율성 증가를 위해서 벼의 유전자지도 작성을 통한 주요 농업형질인 간장, 수장, 개체당 이삭수 등의 양적형질유전자좌를 탐색하고 MAS를 위한 마커 선발에 관련된 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

경북대학교 농업생명과학대학에서 청청/낙동 F₁ 조합에서 약 배양으로 양성된 120계통의 Doubled haploid (DH) 집단을 2015년에 경북대학교 부속실험실습장의 하계 포장에 전개하였다 (Fig. 1). 5월 1일에 파종하고 5월30일에 재식거리 30 × 15 cm로 주당 1본씩 이앙하였다. 시비량은 N-P₂O₅-K₂O=9-4,5-5,7 kg/10a 로 농촌진흥청 농업과학기술연구조사기준에 따라 재배하였다.

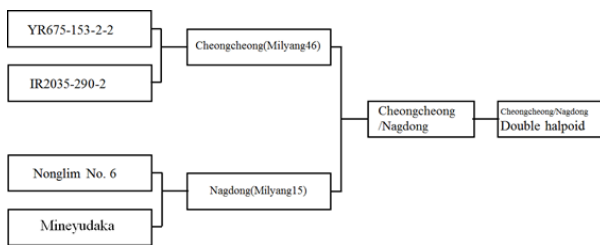


Fig. 1. Genealogical diagram of CNDH.

생육 특성 조사

2015년 9월 22일에 초형에 영향을 미치는 생육 특성인 수장, 간장, 개체당 이삭수를 각각 조사하였다. 간장은 논바닥인 벼 포기 기부로부터 벼 이삭의 이삭 목 마디까지를 측정하였으며, 수장은 이삭목부터 이삭 끝까지의 길이를 측정하였다. 개체당 이삭수는 이삭이 달린 유효수만을 측정하였으며, 세가지 특성은 각각 식물체 10 주씩 반복하여 조사하였다.

유전자 지도 작성 및 초형 관련 QTL 분석

이상적인 초형 관련 QTL을 분석하기 위하여 Window QTL cartographer 2.5를 이용하였으며, 분자유종학연구실에서 222개의 DNA 마커로 Mapmaker version 3.0을 이용하여 만든 마커 간 평균거리가 10.6 cM인 유전자 지도를 사용하였다. CNDH 집단의 120계통에 대한 간장, 수장, 개체당 이삭수에 대한 값은 Kosambi Function에서 Composite Interval Mapping (CIM) 방법을 사용하였으며, threshold LOD는 3.0을 설정하여 QTL 분석을 실시하였다. QTL 명명은 McCouch (2008)가 제안한 방법에 따랐다.

벼 DNA 분리 및 PCR 분석

DNA는 DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 추출하였다. 신선한 벼의 잎 100 mg 정량하여 막자사발에 넣고 액체질소와 막자를 이용하여 마쇄 하였으며, RNase A가 포함된 450 µl RLT buffer를 첨가하여 뒤 65 °C에서 10분간 정치하였다. 130 µl AP2 buffer를 첨가하였으며 0 °C에서 5분간 정치하였다. 교반하여 Qiashadder spin column으로 옮기고 13,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. DNeasy mini spin column에 옮겨 재차 원심분리 하였고, 500 µl AW buffer로 column을 세척 한 후 50 µl nuclease free water로 용해하였다. 유전자 발현양상을 조사하기 위해 염기서열 분석결과를 바탕으로 primer set (Table 1)를 각각 제작한 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 45 °C에서 20분간 reverse transcription한 후, 94 °C 2분간 반응하고 다시 94 °C에서 15초, 64 °C에서 30초, 72 °C 1분으로 40 cycle 증폭하고 72 °C 5분간 추가로 반응하였다.

Table 1. The sequence of SSR marker detected from QTL analysis

Marker	Forward primer (5' -3')	Reverse primer (3' -5')	Tm (°C)
RM5311	CGTCTTGTCTAATCAGCTTAGGG	CACATCAAAGATATCGGGTTGG	55.0
RM555	TTGGATCAGCCAAAGGAGAC	CAGCATTGTGGCATGGATAC	55.0
RM14330	GGTTTGGGAGCCCATATCT	CTGGGCTTCTTTCACTCGTC	55.0

결과 및 고찰

생육 특성 분석

Table 2는 모부분인 청청, 낙동과 CNDH 120계통의 간장, 수장, 개체당 이삭수를 조사하여 빈도분포표로 나타내었다(Fig. 2). 모부분인 청청과 낙동의 간장의 평균은 75.3 ± 6.72 cm, 수장의 평균은 20.6 ± 2.08 cm이었으며 개체당 이삭수의 평균은 16.0 ± 2.37개로 나타났다. 120계통의 CNDH의 간장의 평균은 71.6 ± 17.38 cm이었으며, 수장의 평균은 20.3 ± 2.24 cm였으며, 개체당 이삭수의 평균은 16.1 ± 7.17개로 나타났다. CNDH 계통의 빈도분포표의 곡선은 정규분포에 가까운 연속변이를 나타내었다. 유전력은 간장이 91.0%, 수장이 91.1%, 개체당 이삭수가 92.3%로 조사되었다. 이러한 결과는 세가지 형질 모두 양적형질이기 때문에 환경변이에 많은 영향을 받아 비교적 높게 나타났다(Lu *et al.*, 1996).

초형 관련 QTL 분석

벼의 초형과 관련 형질인 간장, 수장, 개체당 이삭수에 관여하는 QTL을 분석한 결과 LOD 3.0 이상의 QTL이 9개 발견되었

으며, 간장에서는 qPIL1-1, qPIL1-2, qPIL5, 수장에서 qPL2, qPL3, qPL10, 개체당 이삭수에서 qPN1-1, qPN1-2, qPN9이 탐색되어 작성된 CNDH 계통의 유전자지도를 작성하였다(Fig. 3). LOD peak는 수장 5번 염색체의 ‘RM14330 -’의 예로 Fig. 2와 같다. 이 QTL들은 각각 1번, 2번, 3번, 5번, 9번, 10번 염색체에서 탐색되었다(Table 3). 간장은 1번염색체의 ‘- RM8235’와 ‘RM8235 -’, 5번 염색체의 ‘RM5311 -’에서 발견되었고, 각각의 LOD값은 7.71, 7.69, 3.81이었다. 수장은 2번 염색체의 ‘- RM555 -’, 3번 염색체의 ‘RM14330 -’, 10번 염색체의 ‘RM25890 -’와 ‘RM5806’에서 발견되었고, LOD값은 각각 7.13, 3.20, 3.24이었다. 개체당 이삭수는 1번 염색체의 ‘RM3530 -’, ‘- RM8111 -’, 9번 염색체의 ‘- RM3769 -’에서 발견되었고, 각 LOD 값은 3.67, 4.27, 3.44이었다. Ookawa *et al.* (2010)은 도복저항을 높이기 위해 인디카 품종인 Habataki의 culm strength QTL을 분석한 결과, 1번 염색체의 STRONG CULM1 (SCM1), 6번 염색체의 STRONG CULM2 (SCM2)가 간장에 관여한다고 보았고, Zhang *et al.* (2015)은 Nipponbare에 WS3를 여교잡하여 BC3F2를 QTL분석한 결과 QTL qPL6이 수장(Panicle length)에 관여한다고 했으며, Redoña *et al.* (1998)은 SA Labelle (LB)와 Indian Black Gora (BG)를

Table 2. The Plant phenotypes of 120 DH lines from a cross of Cheongcheong and Nagdong

Plant traits (cm)	Parents		Means	DH population	
	Cheongcheong	Nagdong		Means	Heritability (%)
Culm length	75.6 ± 8.86 ²	75.0 ± 3.72	75.3 ± 6.72	71.6 ± 17.38	91.0
Panicle length	22.4 ± 0.90	18.6 ± 0.72	20.6 ± 2.08	20.3 ± 2.24	91.1
No. of panicle	16.1 ± 2.91	16.0 ± 1.84	16.0 ± 2.37	16.1 ± 7.17	92.3

²The data are presented in mean ± standard deviation.

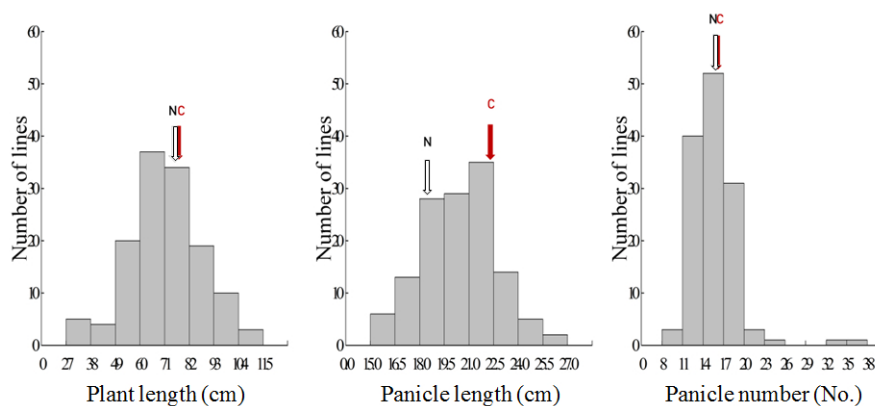


Fig. 2. Frequency distributions of analysis of general growth characteristics of 120 lines CNDH. Means of the parents are marked at the top of each histogram; C: Cheongcheong, N: Nagdong.

Table 3. The main effect QTLs of the agronomy traits in CNDH population

Trait	QTL	Chr.	Marker interval ^z	LOD	Additive effect ^y	R ² (%) ^x	Increasing effects
Culm length	qPIL1-1	1	- RM8235	7.71	9.86	57	Cheongcheong
	qPIL1-2	1	RM8235 -	7.69	10.17	60	Cheongcheong
	qPIL5	5	RM5311 -	3.81	5.49	48	Cheongcheong
Panicle length	qPL2	2	- RM555 -	7.13	-2.58	49	Nagdong
	qPL3	3	RM14330 -	3.20	0.88	32	Cheongcheong
	qPL10	10	RM25890 - RM5806	3.24	1.02	34	Cheongcheong
	qPN1-1	1	RM3530 -	3.67	-1.63	44	Nagdong
No. of panicle	qPN1-2	1	- RM8111 -	4.27	-1.60	32	Nagdong
	qPN9	9	- RM3769 -	3.44	1.82	44	Cheongcheong

^zInterval marks are the markers within the significance threshold on each border of the QTL range. ^yPositive and negative values indicate additive effects contributed by Cheongcheong and Nagdong alleles, respectively., ^xThe proportion of evaluated phenotype variation attributable to a particular QTL was estimated by the coefficient of determination (R²).

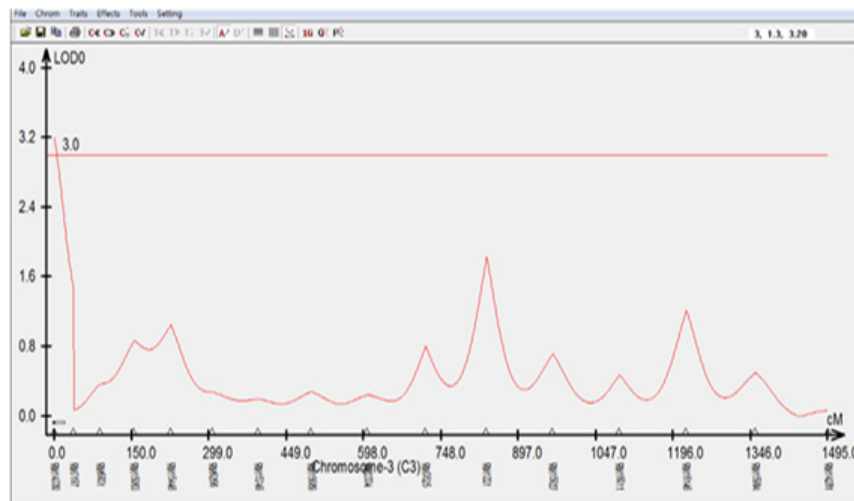


Fig. 3. Analysis of QTL associated with panicle length on chromosome 3.

교배한 F₂를 QTL분석하여 3번 염색체가 Panicle size (The number of spikelets per panicle)에 가장 영향을 끼친다고 보고 하였다. Fig. 3에 나타낸 것과 같이 qPIL1-1, qPIL1-2는 염색체 1번에 탐색한 간장 관련 QTL (Ookawa *et al.*, 2010)과 1번 염색체가 일치하는 경향을 보였고 수장 관련 qPL2, qPL3, qPL10은 염색체 6에 탐색한 수장 관련 QTL (Zhang *et al.*, 2015)과 다르게 탐색되었다. qPN1-1, qPN1-2, qPN9은 염색체 3번 개체당 이삭수 관련 QTL (Redoña *et al.*, 1998)과 다르게 탐색되었다. 이와 같은 실험결과에 따라 차이가 나는 것은 공시재료와 유전적 차이 및 환경에 따른 것으로 추정되고 있다(Xiao *et al.*, 1996).

MAS를 위한 분자마커 선발

초형 관련 분석 결과에서 탐색된 9개 마커를 토대로 간장에 대한 RM5311, 수장에 대한 RM555, 개체당 이삭수에 대한 RM8111을 선발하여 모부분인 청청, 낙동을 기준으로 자포니카형 22 품종, 인디카형 12 품종에 다형성을 분석하였다. Fig. 4와 같이 청청과 낙동과 같은 밴드양상을 나타내거나 다른 크기상태의 밴드양상을 나타내었다. Fig. 4가 나타내는 밴드양상과 Table 4의 청청, 낙동 외 22개의 자포니카형 벼와 12개의 인디카형 벼의 표현형에 대한 일치도를 조사한 결과 마커 RM5311에서 44.11%의 일치율을 보였고, RM555에서는 41.17%의 일치율을 보였고, RM8111은 44.11%의 일치율을 보여 일치하지 않는 품종

Table 4. The list of 36 varieties for PCR

No.	Cultivar	No.	Cultivar	No.	Cultivar
1	Cheongcheong	13	Samgang	25	SM2-34
2	Nagdong	14	Nampyeong	26	293
3	Dongjin	15	Jowun	27	24A
4	Ilmi	16	Geumo 3	28	N32
5	Ilpum	17	Pungmi	29	N22
6	Junam	18	Koshihikari	30	Katuyhar Dhan
7	Chucheong	19	Gowun	31	Sufaida 172
8	Wungwang	20	Haepyeong	32	ADR 52
9	Chilbo	21	Hanareum	33	ARC 10239
10	Gopum	22	Sanggwang	34	Podiwi A8
11	Jogwang	23	Geunseong1	35	TN1
12	Hwayeong	24	Giho	36	N.DIANG MARIE

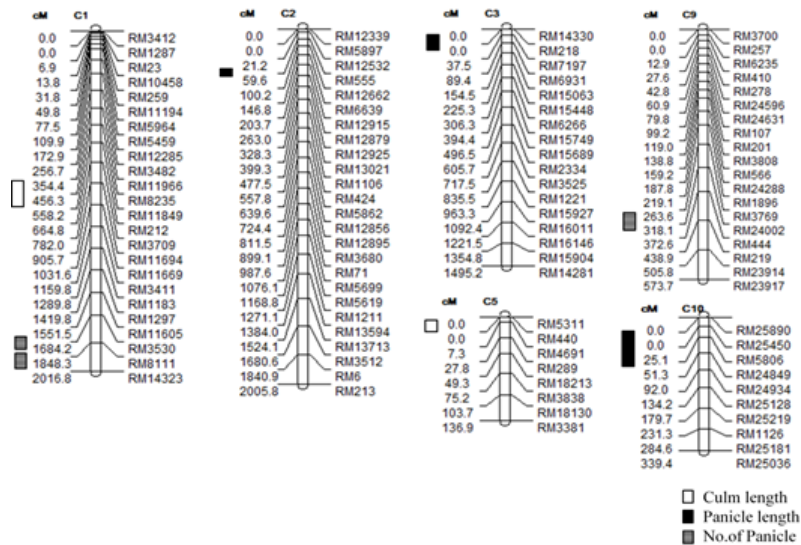


Fig. 4. The chromosomal location of QTLs associated with agronomic traits in CNDH population.

이 비교적 높은 비율로 존재하는 것으로 확인되었다.

적 요

본 실험은 청청과 낙동 조합을 약배양하여 육성한 120 계통을 이용하여 이상적인 초형에 관련된 간장, 수장, 개체당 이삭수에 대한 QTLs를 분석하고 탐색된 QTLs는 다음과 같은 결과를 얻었다. 모부분인 청청과 낙동의 간장의 평균은 75.3 ± 6.72 cm, 수장의 평균은 20.6 ± 2.08 cm이었으며 개체당 이삭수의 평균은 16.0 ± 2.37 개로 나타났다. 120 계통의 CNDH의 간장의 평균은 71.6 ± 17.38 cm였으며, 수장의 평균은 20.3 ± 2.24 cm였으며 개체당 이삭수의 평균은 16.1 ± 7.17 개로 나타났다. 이에

대한 CNDH 계통의 빈도분포표의 곡선은 정규분포에 가까운 연속변이를 나타내었다. 간장, 수장, 개체당 이삭수 QTL 분석결과 간장에서 1번 염색체의 qPIL1-1, qPIL1-2, 5번 염색체의 qPIL5, 수장에서 2번 염색체의 qPL2, 3번 염색체의 qPL3, 10번 염색체의 qPL10, 개체당 이삭수에서 1번 염색체의 qPN1-1, qPN1-2, 9번 염색체의 qPN9이 탐색되었다. 간장에 대한 QTL에서 5번 염색체의 LOD 값은 3.81, 상가적 값은 5.49였으며, 수장에 대한 QTL에서 2번 염색체의 LOD 값은 7.13, 상가적 값은 -2.58이었으며, 3번 염색체의 LOD 값은 3.20, 상가적 값은 0.88로 나타났다. 개체당 이삭수에 대한 QTL에서 9번 염색체의 LOD 값은 4.27, 상가적 값은 -1.60으로 나타났다. 초형 관련 분석 결과에서 탐색된 9개 마커를 토대로 간장에 대한 RM5311, 수장에 대

한 RM555, 개체당 이삭수에 대한 RM8111을 선발하여 모부분인 청청, 낙동을 기준으로 자포니카형 22 품종, 인디카형 12 품종에 다형성을 분석하였다. 그림 4와 같이 청청과 낙동과 같은 밴드양상을 나타내거나 다른 크기상태의 밴드양상을 나타내었다. 간장, 수장, 개체당 이삭수의 일치율은 각각 44.11%, 41.17%, 44.11%로 나타났다.

사 사

본 연구는 2014 년 대구가톨릭대학교 연구년 중 수행한 것임.

References

- Cho, Y.G., H.J. Kang, J.S. Lee, Y.T. Lee, S.J. Lim, H. Gauch and S.R. McCouch. 2007. Identification of quantitative trait loci in rice for yield, yield components, and agronomic traits across years and locations. *Crop Sci.* 47(6):2403-2417.
- Guo, J., E.S. Seong, Y.H. Kim, H.J. Jo, J.H. Cho and M.H. Wang. 2007. Transformation of 'Ilmibyeo' using pCAMBIA 1300 and microstructural investigation of leaves. *Korean J. Plant Res.* 20(5):437-441.
- Jin, J., W. Huang, J.P. Gao, J. Yang, M. Shi, M.Z. Zhu, D. Luo and H.X. Lin. 2008. Genetic control of rice plant architecture under domestication. *Nature Genet.* 40:1365-1369.
- Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol. Biol.* 35(1-2):25-34.
- Khush, G.S. 1999. Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* 42(4):646-655.
- Lee, K.J., D.N. Nguyen, D.H. Choi, H.Y. Ban and B.W. Lee. 2015. Effects of elevated air temperature on yield and yield components of rice. *Korean J. Agric. For. Meteorol.* 17(2): 156-164.
- Lim, J., H. Yang, K. Jung, S. Yoo and N. Paek. 2014. Quantitative trait locus mapping and candidate gene analysis for plant architecture traits using whole genome re-sequencing in rice. *Molecules and Cells* 37(2):149-160.
- Lu, C.F., L.S. Shen, Z. Tan, Y. Xu, P. He, Y. Chen and L. Zhu. 1996. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments using a doubled haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 93(8):1211-1217.
- McCouch, S.R. 2008. Gene nomenclature system for rice. *Rice* 1(1):72-84.
- Ookawa, T., T. Hobo, M. Yano, K. Murata, T. Ando, H. Miura and M. Matsuoka. 2010. New approach for rice improvement using a pleiotropic QTL gene for lodging resistance and yield. *Nature Communications* 1:132.
- Peng, S., G.S. Khush, P. Virk, Q. Tang and Z. Yingbin. 2008. Progress in ideotype breeding to increase rice yield potential. *Field Crops Research* 108(1):32-38.
- Redoña, E.D. and D.J. Mackill. 1998. Quantitative trait locus analysis for rice panicle and grain characteristics. *Theor. Appl. Genet.* 96(6):957-963.
- Sasaki, T. 2001. The progress in rice genomics. *Euphytica* 118(2):103-111.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27:205-233 (Volume publication).
- Xiao, J., J. Li, L. Yuan and N. Iwata. 1996. Identification of QTLs affecting traits of agronomic in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor. Appl. Genet.* 92(2):230-244.
- Zhang, L., J. Wang, J. Wang, L. Wang, B. Ma, L. Zeng, Y. Qi, Q. Li and Z. He. 2015. Quantitative trait locus analysis and fine mapping of the qPL6 locus for panicle length in rice. *Theor. Appl. Genet.* 128(6):1151-1161.

(Received 8 November 2016 ; Revised 15 December 2017 ; Accepted 19 December 2017)