

벼의 Doubled-haploid 집단육성과 SSR 마커를 이용한 유전자 지도작성

김경민¹, 남우일², 권용삼³, 손재근^{2*}

¹경북대학교 유전공학연구소, ²경북대학교 식물생명과학부, ³국립종자관리소 재배시험과

Development of Doubled-haploid Population and Construction of Genetic Map Using SSR Markers in Rice

Kyung-Min Kim¹, Wu-Il Nam², Yong-Sham Kwon³, Jae-Keun Sohn^{2*}

¹Institute of Genetic Engineering, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

²Division of Plant Biosciences, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

³Department of Variety Testing, National Seed Management Office, Suwon, 442-400, Korea

ABSTRACT A doubled-haploid (DH) population was developed through anther culture of F₁ plants obtained from a cross between a *japonica* cultivar, 'Nagdongbyeo', as male parent and a *indica* cultivar, 'Samgangbyeo', as female parent. Segregation modes for plant length, culm length, panicle length, third internode length, and days to heading in the DH lines showed nearly normal distribution with wide range of variation. A molecular map with 136 simple sequence repeat (SSR) markers was constructed using the DH population. The total map distance was 1,909 cM and the average interval of marker distance was 14 cM.

Key words: Anther culture, doubled-haploid population, rice, simple sequence repeat (SSR)

서 론

식물의 유전자지도 작성에는 F₂ 집단, 근동질 계통 (NILs; near isogenic lines), 재조합 자식성 계통 (RILs: recombinant inbred lines) 및 반수체를 이용한 doubled haploid (DH) 집단 등이 이용되고 있다 (Quattire et al. 1997; Eujayl et al. 1998). F₂ 집단의 경우 유전변이의 폭이 넓다는 장점은 있으나 DNA 재료의 반복적인 취득이나 유지가 어렵다는 단점이 있다. NILs의 경우 육성을 위해서는 반복적인 여교잡이 이루어져야 하고, RILs의 경우는 SSD (single seed descent) 방법을 이용하더라도 최소 6세대 이상의 세대 진전이 이루어져야 하므로 그 집단의 개발에 시간과 노력이 많이 소요된다는 단점이 있다. 최근 식물의 약을 기내에 배양하여 소포자 유래의 반수체를 생산하고 이 반수체의 염색체를 배가시켜 단 한세대만에 homo 개

체를 얻는 방법이 벼 (Chung and Sohn 1995)를 포함한 여러 식물에서 이용되고 있다. 약배양에 의해 양성된 DH 집단을 유전자 지도작성에 이용할 경우 NIL이나 RIL 집단의 형질고정에 드는 노력과 비용을 크게 절감시킬 수 있는 장점이 있다 (Lu et al. 1996). 이렇듯 여러 가지 방법 및 집단을 이용한 분자 유전자 지도작성의 최종적인 목표는 바로 육종으로의 활용에 있다. 즉 분자 유전자 지도상에 작물학적으로 중요한 농업형질을 지배하는 유전자들을 mapping하고 이와 관련된 DNA 마커를 선별하게 되면 마커검정에 의해 실용형질을 선별하는 분자유종기술의 실용화가 가능하게 될 것이다. 특히 환경에 영향을 많이 받는 양적형질의 개량이나 생물검정에 의해 선별하는 내병 충성 육종분야에서 DNA 마커의 이용 효율은 더욱 높아지게 될 것이다.

본 연구에서는 분자유전학적 기법을 이용한 육종연구의 효율성 증가를 위해 벼의 분자 유전자 지도 작성을 위한 DH 집단의 개발과 SSR (simple sequence repeat) 마커를 이용한 유전자 지도 작성에 관한 몇 가지 실험을 수행하

*Corresponding author Tel 053-950-5711 Fax 053-958-6880

E-mail jhsohn@knu.ac.kr

여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료

‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₁식물체의 이삭을 출수전에 채취하여, 1핵성 소포자기의 약을 2,4-D (1 mg/L), zeatin (0.1 mg/L), sorbitol (20 g/L) 및 gelrite (5 g/L)가 첨가된 Chu (1977) 배지에 배양하여 캘러스를 형성시켰다. 30~40일 동안 형성된 캘러스를 kinetin (2.0 mg/L), IAA (0.2 mg/L), sucrose (30 g/L) 및 gelrite (5 g/L)가 첨가된 Chu (1977) 배지에 이식하여 50일 동안 식물체를 재분화시켰다. 약으로부터 재분화된 식물체를 충분히 성장시킨 다음 순화처리 후 활착이 양호한 개체를 플라스틱 포트에 재배하여 개체별로 채종하고 반수체의 경우는 풀히친 처리로 염색체를 배가시켰다. 1998년부터 2002년까지 양성된 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 DH 집단을 2002년과 2003년 하계 포장에 각 계통별로 주당 1본씩, 30×15 cm의 재식 밀도로 이앙하고 출수기, 간장, 수장을 포함한 주요 특성을 계통별로 조사하였다.

식물재료의 DNA 추출

양친과 잡종세대 및 DH집단의 종자를 파종하고 25℃에서 3주간 재배한 후 기존의 CTAB법 (Murray and Thompson 1980)을 변형하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. 각 식물체의 건전한 잎 1~3 g을 막자사발에 넣고 액체질소로 급냉동시킨 상태에서 미세한 분말로 마쇄하고, 2×CTAB buffer 2 mL과 1×CTAB 1 mL를 넣어 혼합한 다음, 15 mL cap-tube에 옮겨서 55℃에 30~60분 동안 반응시키면서 2~3회 가볍게 혼합한다. 여기에 동일한 양의 chloroform을 넣어 30분간 shaking한 다음 원심분리 (4,000 rpm, 7분, 15℃)한 후 상층액을 15 mL의 falcon tube로 옮겨서, 10% CTAB-NaCl 325 μL와 chloroform 3.5 mL을 넣고 잘 혼합하고 원심분리 (4,500 rpm, 10분, 15℃)하여 상층액을 15 mL의 새로운 falcon tube에 옮긴다. ppt (precipitation) CTAB 용액 (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA) 3.5 mL을 넣어 12시간 이상 상온에 방치한 후 원심분리 (2,500 rpm, 5분, 20℃)하여 상등액을 버리고 1 M NaCl-TE 0.7 mL와 isopropanol 0.42 mL를 넣어 DNA를 엉키게 한 다음 회수하였다. 회수된 DNA를 80% 에탄올로 세척하여 건조시키고 TE buffer로 100배 희석하여 PCR 증폭의 template로 이용하였다.

양친에 대한 SSR marker 검정

본 실험에 사용되어진 SSR 마커는 Panaud 등 (1996)의 SSR primer중 일부의 sequence를 사용하였다. PCR은 Gene Amp PCR system 9600을 사용하였으며, 증폭을 위한 시약의 조성은 genomic DNA가 10~15 ng/μl이고, dNTP 및 taq-polymerase는 각각 200 μM과 0.1 unit 농도였으며 각각의 primer는 SSR marker를 이용하였다 (McCouch et al 2002). PCR 증폭은 96℃에 5분간, 그 후의 변성은 96℃에서 30초, annealing은 55~60℃에서 30초, 그리고 DNA 합성은 72℃에서 1분간으로 총 45 cycle을 실행하였고, 최종 DNA 합성은 72℃에서 7분간으로 하였다. 합성된 DNA는 3%의 agarose gel로 전기영동 후 band의 분리여부를 비교·분석하거나 5%의 denaturing polyacrylamide 젤로 전기영동 후 silver staining kit를 이용하여 관찰하였다. ‘삼강벼’와 ‘낙동벼’에 다형성을 보이는 marker 선발을 위하여 SSR marker 598개의 DNA marker와 양친의 genomic DNA간의 관계를 분석하였다.

DH집단을 이용한 유전자 지도의 작성

유전자 지도의 작성은 Macintosh iMac의 MAPMAKER 2.0 program을 이용하여 분석하였으며, LOD (logarithm of odds) score는 3.0, 마커간 거리 한계는 10 cM을 기준으로 분석하였다. 분석 방법은 모, 부분을 따르는 SSR 마커를 분석하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 183개의 DH계통 중에서 무작위로 선발되어진 94개 DH계통의 DNA를 이용하여 map을 작성하였다. 우선 group 명령을 이용하여 각 염색체별로 나눈 뒤 three point와 order를 LOD>3.0 이상에서 분석하여 각 marker의 배열 순서를 결정하였다. LOD>3.0에서 구분되지 않은 marker는 LOD 값을 올려 1차적으로 작성된 map 상에 try 명령을 이용하여 최종 map상에 삽입시켰다. 이러한 방법을 이용하여 각 염색체 별로 최적의 map을 작성하였다.

결과 및 고찰

DH 집단의 육성

유전자 지도의 작성을 위한 DH 집단을 육성하고자 버멸구에 저항성 품종인 ‘삼강벼’를 자방친으로 감수성 품종인 ‘낙동벼’를 화분친으로 인공교배하여 양성된 두 조합 F₁의 1핵성 소포자기의 약을 배양하였다. ’98/’99 동계에서부터 2003년 하계까지 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서 54,000 약 이상을 배양하였으나 조합이 원연교잡된 관계로 식물체 분화율은 저조한 경향이었다. 약배양 후 30일 동안 조사된 교배

Table 1. Frequency of callus formation and plant regeneration in anther culture of F₁ plants from 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.

Cultivar and cross	No. of anthers inoculated	% of callus formation	% of green plant regeneration	% of albino regeneration
Nagdongbyeo	1,500	28.5	7.6	1.3
Samgangbyeo	1,000	5.9	0.4	0.0
Samgangbyeo/ Nagdongbyeo (F ₁)	54,120	21.7	0.9	0.3

Table 2. Ploidy level of plants regenerated from anther culture.

Cross	Polyploid level of regenerated plants (%)	
	Doubled haploid	Haploid & Polyploid
Samgangbyeo/Nagdongbyeo	73.5	26.5

Table 3. Number of doubled haploid (DH) lines produced by anther culture of F₁ plants from 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.

Cross	Total	No. of DH lines		
		'98~'99	'00~'01	'02~'03
Samgangbyeo/Nagdongbyeo	201	50	89	62

친과 F₁의 캘러스 형성률은 양친의 평균치보다 다소 높게 나타났으나, 캘러스를 명상태로 옮긴 후 50일 동안 조사된 녹색체 분화율은 양친의 평균치보다 낮은 경향을 나타내었다 (Table 1).

약으로부터 재분화된 식물체는 시험관에서 충분히 생장시킨 다음 수경액에 20일 동안 재배한 후 활착이 양호한 개체를 온실에 재배하면서 각 조합별로 배수성을 조사한 바, 전체의 약 73.5%가 2배체로 조사되었다 (Table 2).

1998년부터 2003년 하계까지 '삼강벼/낙동벼' 조합 F₁의 약배양에서 채종 가능한 DH 계통은 201 계통이었다 (Table 3). 이 중 포장시험이 가능할 정도로 종자량이 충분히 채종된 183계통에 대해서만 주요 포장 생육특성을 조사하였다.

벼 약배양에서 식물체 재분화 능력이 genotype간에 큰 차이를 보인다는 것은 약배양이 시작된 초기부터 보고되기 시작하였는데, 자포니카형 품종이 인디카형 품종보다 재분화율이 높게 나타나며, 동일 품종 생태형내에서도 다양한 변이를 나타낸다고 하였다 (Kwon and Sohn 2000). Shen 등 (1982)은 벼 약배양에서 자포니카 > 인디카/자포니카 > 인디카형 품종의 순으로 식물체 재분화율이 높다고 보고하였다. 본 실험에서도 자포니카형 품종들의 녹색체 재분화율이 통일형 품종에 비해 높게 나타나 기존의 연구와 동일한 결과를 나타내었다.

DH 계통의 주요 특성 조사

2002년과 2003년 하계 포장에 재배된 DH 집단 183계통의 간장은 25.4~87.5 cm범위로 넓은 변이폭을 가지면서

정규분포에 가까운 연속적인 변이 분포양상을 보였고, 수장의 경우도 11.2~28.7 cm범위로 연속적인 변이 분포양상을 나타내었다.

수수는 주당 5~20 개의 범위로, 삼절간장의 경우는 2.9~18.8 cm의 넓은 변이폭을 가지면서 간장 및 수장에서와 같이 정규분포에 가까운 연속적인 변이 분포양상을 보였다. 출수일수의 경우에도 81~136일의 범위로 정규분포에 가까운 연속적인 변이 분포를 나타내었다 (Figure 1).

이러한 연속적인 변이분포 양상은 벼의 출수기, 간장, 수장, 수량성 등과 같은 양적형질에 대한 기존의 유전분석 결과와 일치되는 경향이였다 (Brondani et al. 2002; Hittalmani et al. 2002).

양친에 대한 SSR marker 검정

'삼강벼'와 '낙동벼'의 어린잎 (30일묘)의 DNA를 추출하고 PCR 증폭을 위한 DNA량을 조절하여 총 598개의 SSR marker를 사용하여 parent screening한 결과 다형성을 보이는 136개의 SSR marker를 선발할 수 있었다 (Table 4, Figure 2).

분석된 SSR marker의 유전자좌들의 분리비는 53%만 DH계통의 기대 분리비인 1:1에 적합하였고 나머지 47% ($P \leq 0.05$)는 삼강벼나 낙동벼에 치우치는 경향을 나타내었다. 이 결과는 Xiao 등 (1996)이 F₈ 재조합자식성 유전집단을 이용하여 얻은 36.9% ($P \leq 0.05$) 나 Cho 등 (1998)이 F₁₁ 재조합자식성 유전집단을 이용하여 얻은 22.5% ($P \leq 0.05$) 보다는 높은 비율을 나타내었는데, 이는 분석집단의 genotype이 다른데서 비롯된 결과로 보여진다.

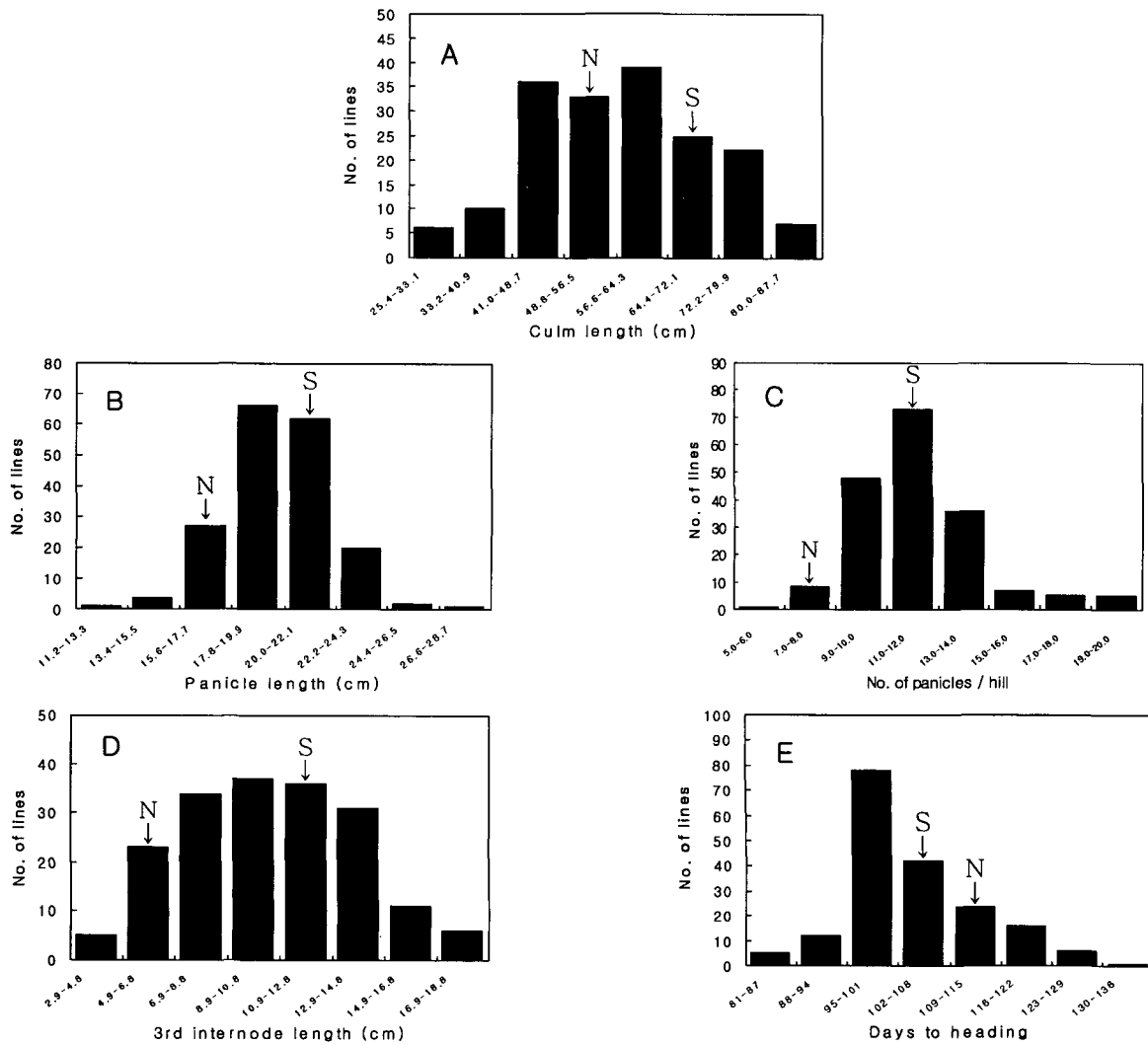


Figure 1. Frequency distribution of culm length (A), panicle length (B), no. of panicles/hill (C), third internode length (D), and days to heading (E) in DH population derived from Samgangbyeo (S)/Nagdongbyeo (N).

Table 4. DNA markers shown polymorphism between ‘Samgangbyeo’ and ‘Nagdongbyeo’.

Markers	No. of markers tested	No. of markers shown polymorphism
S S R	5 9 8	1 3 6

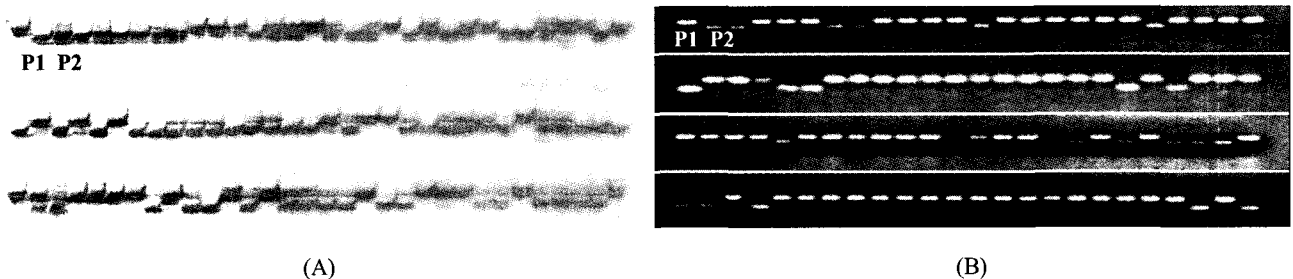


Figure 2. SSR genotypes of the Samgangbyeo/Nagdongbyeo 94 DHLs. RM233 (A) and RM2125 (B) genotypes running at 5% denaturing polyacrylamide gel certified by silver staining (A) and 3% agarose gel certified by UV lamp (B).

SSR marker를 이용한 유전자 지도의 작성
선발된 SSR marker 136개를 이용하여 Mapmaker program

에 의한 연관관계를 분석하여 ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’
DH 집단 유전자 지도를 작성하였다 (Figure 3). 작성된
유전자 지도의 총 길이는 1,909 cM이고 마커간 평균

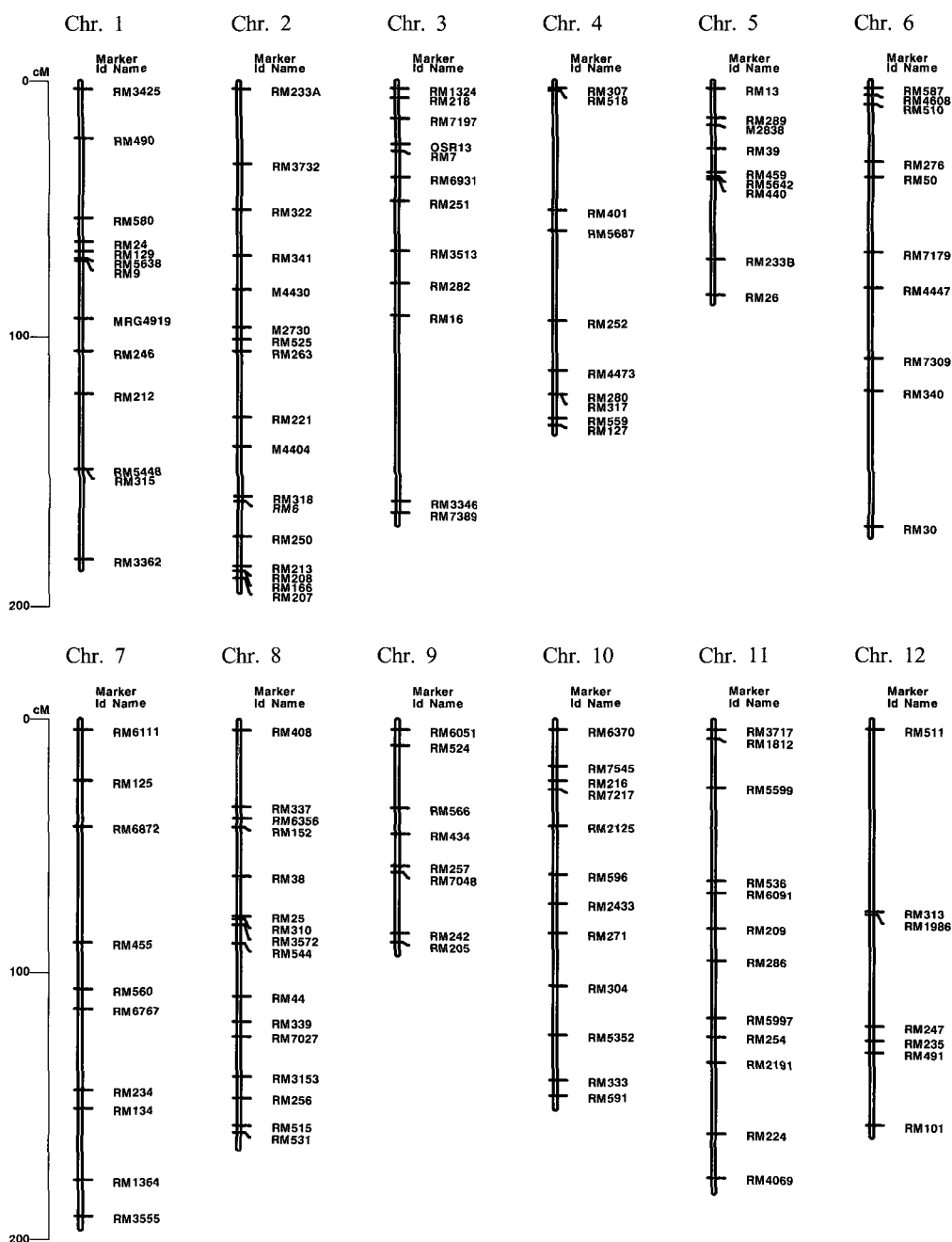


Figure 3. Genetic linkage map of SSR markers in DH lines derived from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.

길이는 14 cM이었다. 이 유전자 지도는 321개의 SSR 마커를 이용하여 작성한 총 길이가 1,822 cM이고 마커간 평균 거리가 6 cM인 유전자 지도 (Temnykh et al. 2000)와, RFLP, SSR 및 AFLP 마커를 이용하여 작성한 총 길이 1,814 cM, 마커간 평균 거리 3.4 cM의 유전자 지도 (Cho et al. 1998) 보다 세밀하지는 못하였는데, 이는 지도 작성에 사용되어진 마커의 수가 적은데서 비롯된 결과로 보여진다.

적 요

본 연구에서는 1998년부터 2003년 하계까지 약배양 기법 및 콜히친 처리를 이용하여 개발한 '삼강벼/낙동벼' DH (doubled-haploid) 183계통의 주요 농업 형질을 조사·분석하였다. DH 집단의 주요 농업형질을 조사한바 초장, 간장, 수장, 삼절간장, 수수 및 출수일수는 양적형질의 특징인 넓은 범위의 변이폭, 연속적인 빈도 분포양상 및 양친을 초월하는 초월분리 현상을 보였다. SSR 마커를 이용한 유전자 지도의 작성에는 양친에 다형성을 나타내는 136개의 마커

를 사용하였다. 작성된 유전자 지도는 전체 길이가 1,909 cM이었으며, 마커간 평균길이는 14 cM을 나타내었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Brondani C, Rangel P, Brondani R, Ferreira M (2002) QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 104: 1192-1203
- Cho YG, McCouch SR, Kuiper M, Kang MR, Pot J, Groenen JTM, Eun MY (1998) Integrated map of AFLP, SSLP, and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 97: 370-380
- Chu QR, Cao HX, Linscombe SD (1977) A novel medium for induction of embryogenic callus in rice anther culture of southern us crosses. *Rice Biotechnology Quarterly* 33: 18-20
- Chung GS, Sohn JK (1995) Anther culture technology in rice. In : Kannaiyan S., ed, *Rice Management Biotechnology*, Associated Pub. Co. New Delhi, pp 1-9
- Eujayl I, Baum M, Powell W, Erskine W, Pehu E (1998) A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet* 97: 83-89
- Hittalmani S, Shashidhar HE, Bagali PG, Huang N, Sidhu JS, Singh VP, Khush GS (2002) Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. *Euphytica* 125: 207-214
- Kwon YS, Sohn JK (2000) Varietal difference and inheritance of plant regenerability in anther culture of rice. *Korean J Plant Biotechnol* 27: 163-167
- Lu C, Shen L, Tan Z, Xu Y, He P, Chen Y, Zhu L (1996) Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environment using a doubled haploid population. *Theor Appl Genet* 93: 1211-1217
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R; Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* 9: 199-207
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325
- Panaud O, Chen X, McCouch SR (1996) Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Gen* 252: 597-607
- Quarrie SA, Laurie DA, Zhu JH, Lebreton C, Seikhodskii A, Steed A, Witsenboer H, Calestani C (1997) QTL analysis to study the association between leaf size and abscisic acid accumulation in droughted rice leaves complisons across cereals. *Plant Mol Biol* 35: 155-165
- Ren F, Lu BR, Li S, Huang J, Zhu Y (2003) A comparative study of genetic relationships among the AA-genome *Oryza* species using RAPD and SSR markers. *Theor Appl Genet* 108: 113-120
- Shen JH, Li MF, Chen YQ, Zhang ZH (1982) Breeding by anther culture in rice varieties improvement. *Sci Agrcult Sin* 2: 15-19
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T, McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 100: 697-712
- Xiao J, Li J, Yuan L, Tanksley SD (1996) Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from subspecific rice cross. *Theor Appl Genet* 92: 230-244
- Yang H, Ren X, Weng Q, Zhu L, He G (2002) Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene. *Hereditas* 136: 39-43

(접수일자 2004년 2월 3일, 수리일자 2004년 6월 30일)