

청청벼에서 유래한 벼멸구 저항성관련 RAPD Marker의 개발

서지훈* · 김경민** · 김석만* · 손재근*†

*경북대학교 농업생명과학대학, **상주대학교 환경원예학과

Development of RAPD Marker Related to Brown Planthopper Resistance Gene Derived from Rice Cultivar, Cheongcheongbyeo

Ji-Hun Seo*, Kyung-Min Kim**, Suk-Man Kim*, and Jea-Keun Sohn*†

*Department of Agronomy Graduate School, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

**Department of Environmental Horticulture, Sangju National University, Sangju, Kyungbuk 742-711, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to select DNA markers closely linked to brown planthopper (BPH) resistance gene originated from a rice cultivar 'Cheongcheongbyeo'. For the mapping of resistant gene to BPH, a doubled-haploid (DH) population was developed by anther culture of F₁ plants from a cross 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo'. In BPH bioassay and marker screening for the DH population, the segregation of resistant and susceptible plants to BPH fitted to a 1:1 ratio. A total of 310 RAPDs of 520 markers showed polymorphism in parental survey using 'Cheongcheongbyeo' and 'Nagdongbyeo'. In the analysis of relationship between BPH resistance and marker pattern for 40 DH lines, the OPE16 produced a specific dominant fragment, 700 bp, which was closely linked with BPH resistance gene of 'Cheongcheongbyeo'. Based on the linkage analysis using 7 markers, BPH resistance of 'Cheongcheongbyeo' was mapped on chromosome 12, which was closely linked with OPE16₇₀₀ at a distance of 4.6 cM.

Keywords: BPH, RAPD, MAS, rice

우리나라에서 벼멸구는 출수기 이후에 큰 피해를 주는 문제 해충중의 하나이다. 1970년대에 보급된 통일형 품종 중에는 벼멸구에 저항성이 품종이 다수 있었으나, 오늘날에 재배되고 있는 양질성 품종 중에는 벼멸구에 안전한 저항성 품종이 없는 실정이다. 자포니카형 벼에서 벼멸구 저항성 품종 개발이 어려운 이유는 저항성원이 인디카에만 있다는 것과 검정방법의 복잡성, 벼멸구 저항성 인자가 도복이나 미질과 관련된 열 악형질과 연관되어 있다는 점 등이 지적되고 있다(Kim et al., 2003; Yeo et al., 2002). 최근에는 DNA marker에 의한 저항성 개체의 선발 즉, marker assisted selection(MAS)에 의

한 저항성 개체의 선발 방안이 제시되고 있다(Hirabayashi et al., 1995; Huang et al., 1997; Jena et al., 2002; Murata, et al., 1998). 이것은 MAS를 이용한 저항성 계통 선발법이 기존의 생물검정의 복잡성과 부정확성을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 저항성 인자와 밀접하게 연관된 열악형질의 배제에도 효과적으로 이용할 수 있기 때문이다(Sharma et al., 2004).

따라서 본 연구에서는 자포니카형 벼멸구 저항성개체의 선발에 필요한 연관 marker를 개발해 저항성 개체의 선발효율을 증진시키고, 이를 토대로 벼멸구 저항성 품종 육종을 위한 MAS 체계를 확립하고자 통일형 품종이면서 벼멸구에 저항성이 있는 '청청벼'와 자포니카형 감수성 품종인 '낙동벼'가 교배된 후 대를 대상으로 simple sequence repeat(SSR) marker와 RAPD marker를 이용한 저항성 유전자의 tagging 및 연관관계 분석 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료 및 생물검정

본 연구에 사용된 공시재료는 2004년 하계에 경북대학교 부속농장의 실습포장에서 표준재배법으로 재배한 '청청벼/낙동벼' 조합의 doubled haploid (DH) 계통이었다.

DH 계통을 육성하기 위하여 '청청벼/낙동벼' 조합 F₁의 약을 NAA(1.0 mg/l)와 kinetin(2.0 mg/l)이 첨가된 N₆-Y₁배지에 배양하여 캘러스를 형성시키고, 배양 30일 후에 캘러스를 kinetin(5.0 mg/l)과 NAA(2.0 mg/l)가 첨가된 N₆-Y₁배지에 이식하여 식물체를 분화시켰다. 재분화된 식물체중에 반수체는 Chung & Sohn(1995)의 방법에 따라 염색체를 배가시켜 doubled haploid 계통을 양성하였다.

벼멸구 저항성 개체 선발을 위한 생물검정은 영남농업연구소로부터 분양받은 3~4령기의 벼멸구 유충(생태형 I)을 이용하여 수행하였다. 벼멸구는 한 개체당 10~15마리씩의 밀도로

[†]Corresponding author: (Phone) +82-53-950-5711 (E-mail) jhsohn@knu.ac.kr
<Received August 8, 2005>

접종하였다. 검정시기를 결정하기 위하여 10계통마다 감수성 품종인 ‘낙동벼’와 TN1을 check 품종으로 과종하였으며, 벼멸구 접종후 이들이 고사하는 시점을 생물검정 시기로 정하였다. 한편 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 F₂ 접단의 저항성 조사는 Kim *et al.*(2003)의 방법에 준하여 개체별로 조사하였고, X²-test에 의해 그 분리비의 적합성을 검정하였다.

DNA marker의 탐색과 유전자 지도

벼멸구 저항성과 밀접하게 연관된 DNA marker를 개발하기 위하여 520개의 RAPD marker를 이용하였다. 먼저 벼멸구 저항성과 연관된 candidated marker를 선발하기 위해 식물체 DNA를 저항성 계통(resistance bulk: RB)과 감수성 계통(susceptible bulk: SB), 자방친(resistance parent: RP)과 화분친(susceptible parent: SP) 등 4가지 type으로 나누고, 저항성군과 감수성군 간의 다형성을 비교하는 방식으로 marker 선발 작업을 수행하였다. 그리고 벼멸구 저항성 유전자를 mapping 하기 위하여 벼의 12번 염색체 상에 존재하는 38개의 SSR marker를 이용하였다. ‘청청벼’와 ‘낙동벼’에 대한 다형성 검정을 통해 marker를 선별하였으며, MAPLE program을 이용하여 DH 접단과의 연관분석 및 유전자 지도를 작성하였다.

결과 및 고찰

벼멸구 저항성의 분리비 검정

벼멸구 생물검정을 통하여 ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서 유래한 DH 계통과 F₂ 접단에 대한 분리비를 조사한 바, 두 접단에서 저항성과 감수성의 분리비가 각각 130:44, 33:30으로 나타나 이론적 분리비인 3:1($\chi^2=0.008$, $P>0.05$), 1:1($\chi^2=0.14$, $P>$

0.05>)에 각각 적합한 것으로 조사되었다. 본실험에서 저항성 검정에 사용된 벼멸구는 *Bph1*을 가진 ‘청청벼’와 ‘삼강벼’를 가해하지 못했으며, *bph2*를 포함하고 있는 ‘ASD7’ 역시 가해하지 못하였는데 이는 벼멸구 생태형 I의 특성을 보여주는 것이다. 이는 Kim *et al.*(2003)이 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 F₂ 및 DH 접단을 대상으로 검정한 유전분석 결과와 일치한다.

DNA marker와 벼멸구 저항성과의 관계분석

DNA marker의 선발 – ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 DH 계통에 대한 벼멸구 저항성과 marker간의 관계를 분석하였다. 공시된 520개의 RAPD marker 가운데 양친에 다형성을 나타내는 것은 310개 였으며, 이를 중 저항성 그룹과 감수성 그룹간에 다형성을 나타낸 marker는 총 17개였다. 그리고 유전자 지도 작성을 위해 벼의 12번 염색체상에 위치한 38개의 SSR marker를 사용하여 모·부분에 대한 다형성 검정을 실시한 바, 구분이 가능했던 17개의 SSR marker를 선별할 수 있었다. 선별된 17개의 SSR marker는 동일 조합의 DH 65계통에서 분리비 검정을 수행한 결과, 6개의 SSR marker를 12번 염색체 상에 위치시킬 수 있었다.

연관분석과 유전자 지도 작성

벼멸구 저항성과 DNA marker와의 관계 분석을 위해 선별된 17개의 RAPD marker와 DH 40계통 간의 연관분석을 수행한 결과, Fig. 1에서와 같이 OPE 16이 ‘청청벼’의 벼멸구 저항성과 가장 밀접하게 연관된 것으로 분석되었다.

한편, 벼멸구 저항성 유전자의 mapping을 위해 17개 marker중 선별된 6개의 SSR marker와 RAPD marker(OPE 16)를 이용하여 ‘청청벼’에서 유래한 벼멸구 저항성 유전자와

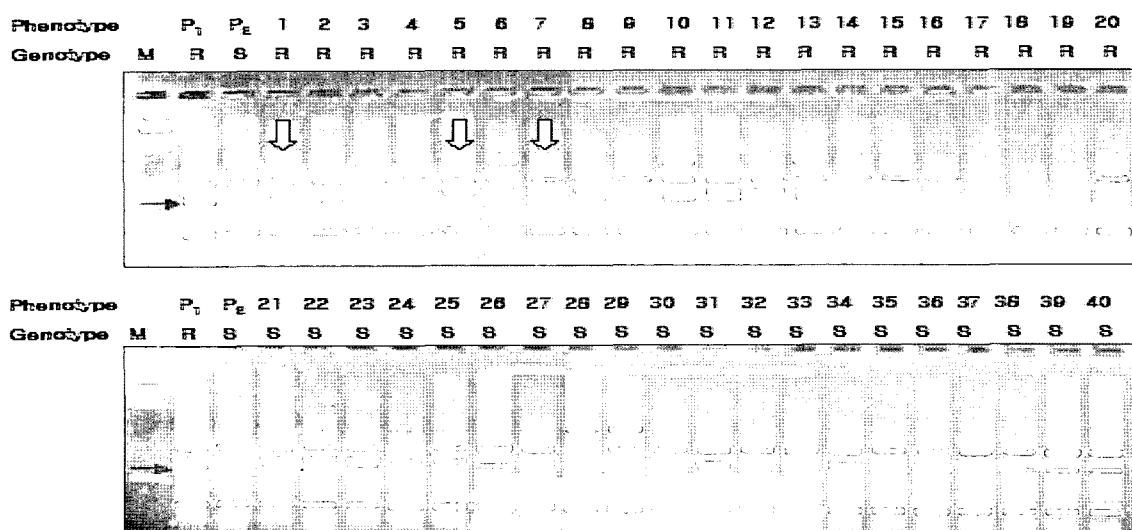


Fig. 1. Segregation of BPH resistance and a DNA marker, OPE 16, pattern (\rightarrow) in DH lines derived from ‘Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo’. Arrows (\downarrow) designated recombinants produced by crossing over in DNA region. 1-40 : 40 DH lines. M: λ Hind III, P₁:Cheongcheongbyeo, P₂:Nagdongbyeo, R:resistance, S:susceptibility.

Table 1. Linkage analysis between BPH resistance and 7 DNA markers in DH population derived from 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo' cross.

| Gene pair | Segregation mode | | | | χ^2 | Recombination value(%) | LOD | | | |
|----------------|------------------|---|-------|------|-------------------|------------------------|-----|---------|------------|-------|
| | A | B | Total | AABB | AA ^b B | | | | | |
| BPH - RM 4589 | | | 62 | 22 | 10 | 3 | 27 | 20.90** | 21.0 ± 5.2 | 4.84 |
| BPH - RM 6693 | | | 63 | 22 | 12 | 5 | 24 | 13.35** | 27.0 ± 5.6 | 3.01 |
| BPH - RM 6696 | | | 65 | 23 | 11 | 13 | 18 | 6.06* | 36.9 ± 6.0 | 1.97 |
| BPH - RM 6732 | | | 65 | 29 | 5 | 8 | 23 | 23.40** | 20.0 ± 5.0 | 5.44 |
| BPH - RM 5609A | | | 65 | 20 | 14 | 5 | 26 | 11.22** | 29.2 ± 5.6 | 2.51 |
| BPH - RM 5609B | | | 65 | 21 | 13 | 7 | 24 | 9.62** | 30.8 ± 5.7 | 2.14 |
| BPH - OPE 16 | | | 65 | 31 | 3 | 0 | 31 | 53.55** | 4.6 ± 2.6 | 14.29 |

**: Significant at 1% level.

이들 marker와의 연관관계를 분석한 바(Table 1), OPE 16의 조환가가 4.6cM으로 가장 낮았으며 LOD치는 14.29로 가장 높게 조사되었다.

Table 1의 연관분석 결과를 근거로 '청청벼'의 벼멸구 저항성 유전자를 mapping한 결과는 Fig. 2에서와 같다.

12번 염색체의 연관지도는 전체길이가 67.7cM이고 marker 간 평균거리는 9.67cM이었다.

'청청벼/낙동벼' 조합의 F₂ 174개체에 대한 생물검정을 실시하고 그 결과를 DNA marker pattern과 비교한 결과, 생물검정에서는 총 174개체 중 130개체가 저항성을, 44개체가 감수성 반응을 보였는데, OPE16의 band pattern은 생물검정에서 저항성으로 나타난 130 개체 중 117개체가 저항성으로 판별되었고 감수성 개체는 모두 감수성으로 구분함으로써 *Bph 1*과 OPE16간의 조환가는 4.6cM인 것으로 조사되었다. Jeon *et al.*(1999)은 '가야벼/낙동벼' 조합의 F₂ 집단을 대상으로 벼멸구 저항성과 marker와의 관계를 분석하여 *Bph 1*과 cosegregation 관계에 있는 RAPD marker(OPD7₇₀₀)를, Ha *et al.*(1999)은 '삼강벼/낙동벼' 조합의 F₂ 집단을 대상으로 *Bph 1*과 4.1cM 거리에 위치한 RFLP marker(G258, 4.1cM)와 Kim *et al.*(2003)은 '삼강벼/낙동벼' 조합의 DH 계통을 대상으로 *Bph 1*과 3.8cM 거리에 위치한 RAPD marker(OPE18)를 각각 선발하고 이들 marker는 벼멸구 저항성 개체선발에 이용할 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 *Bph 1*이 포함된 '청청벼/낙동벼' 조합을 이용하여 저항성 관련 marker의 선발을 수행하였으며 검정집단으로 F₂ 집단이 아닌 DH 계통을 이용하였다. F₂ 집단의 경우 유전변이의 폭이 넓다는 장점은 있으나 DNA 재료의 반복적인 취득이나 유지가 어렵다는 단점이 있다. 약 배양을 통해 양성된 DH 계통을 marker 선발에 이용하게 되면 genotype^{a/b} homo 형이라는 장점이 있을 뿐만 아니라 생물검정을 반복해서 수행할 수도 있어서 marker 선발 작업에 정확성과 신뢰성을 높이는데 도움이 될 것으로 사료된다.

본 연구에서 선발된 OPE16 marker는 dominant marker로서 약 700bp 위치에서 증폭되었는데, 벼멸구 저항성과의 연관분석 결과에서 *Bph 1*과 4.6cM 거리에 위치한 것으로 나타났는데, 이는 '삼강벼/낙동벼' 조합의 DH 계통에서 Ha *et al.*(1999)이 선발한 RFLP marker(G258, 4.1cM)와 Kim *et al.*(2003)이 선발한 STS marker(OPE 18, 3.8cM)와 함께 앞으로 벼멸구 저항성 개체 선발에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 본 연구에서 선발된 RAPD marker를 STS marker로 변환시키게 되면 벼멸구 저항성 개체 선발을 위한 MAS의 이용효율은 한층 더 높아지게 될 것이다.

적 요

본 연구에서는 벼멸구 저항성 품종인 '청청벼'와 감수성이면서 자포니카형 벼인 '낙동벼'를 교배한 DH 계통 및 F₂ 집단을 이용하여 벼멸구 저항성과 DNA marker와의 관계를 분석하였다.

1. 520개의 RAPD marker를 이용하여 양친에 다형성을 보이는 310개의 marker를 찾았고 이들을 대상으로 한 BSA를 통해 벼멸구 저항성과 관련있을 것으로 보이는 17개의 marker를 선발하였다.

2. 벼의 12번 염색체상에 위치한 38개의 SSR marker를 사

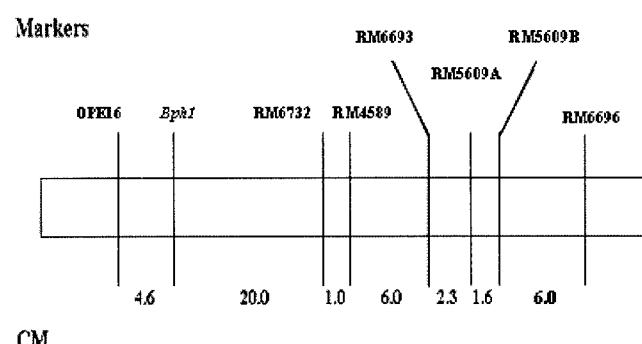


Fig. 2. Linkage map of *Bph 1* genomic region on chromosome 12. The map was constructed using DH population derived from 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo' cross.

용하여 모·부분에 대한 다형성 검정을 실시한 바, 17개의 SSR marker를 선발할 수 있었다.

3. BSA를 통해 선발된 17개의 RAPD marker와 DH 계통의 벼멸구 저항성과의 관계를 분석하여 벼멸구 저항성과 가장 밀접하게 연관된 OPE16₇₀₀을 선발하였다.

4. SSR marker 및 OPE16과 65 DH 계통의 벼멸구 저항성과의 연관분석을 실시한 결과 OPE16이 벼멸구 저항성 유전자와 4.6cM 거리로 가장 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 농촌 진흥청 바이오그린 21사업의 지원에 의해 수행된 결과의 일부임

인용문헌

- Chung, G. S. and J. K. Sohn. 1995. Anther culture technology in rice. In : Kannaiyan S., ed, Rice Management Biotechnology. Associated Pub. Co. New Delhi, pp 1-9.
- Ha W. H., K. M. Kim, and J. K. Sohn. 1999. Detection of resistance gene to brown planthopper(*Nilaparvata lugens* Stal.) using RFLP and Isozyme marker in rice. Korean J. Breed 32(4) : 319-322.
- Hirabayashi, H. and O. Tsugufumi. 1995. RFLP mapping of *Bph 1*

(Brown Planthopper Resistance Gene) in rice. Breeding Science 45 : 369-371.

Huang, Z., G. He, L. Shu, X. Li, and Q. Zhang. 2001. Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. Theor. Appl. Genet. 102 : 929-934.

Jena, K. K., I. C. Pasalu, Y. K. Rao, Y. Varalaxmi, K. Krishniah, G. S. Khush, and G. Kochert. 2002. Molecular tagging of a gene for resistance to brown planthopper in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 129 : 81-88.

Jeon, Y. H., S. N. Ahn, H. C. Choi, T. R. Hahn, and H. P. Moon. 1999. Identification of a RAPD marker linked to a brown planthopper resistance gene in rice. Euphytica 107 : 23-28.

Kim, S. M., S. J. Yang, and J. K. Sohn. 2003. Development of a DNA Marker for selection of resistant plants to brown planthopper (BPH) in rice. Korean J. Breed 35(5) : 277-282.

Murata, K., M. Fujiware, C. Kaneda, S. Takumi, N. Mori, and C. Nakamura. 1998. RFLP mapping of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph 2* of indica rice introgressed into a japonica breeding line Norin-PL4, Genes Genet. Syst. 73 : 359-364.

Sharma, P. N., A. Torii, S. Takumi, N. Mori, and C. Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. Hereditas. 140 : 61-69.

Yeo, U. S., D. Y. Kwak, S. J. Lim, W. G. Ha, J. H. Cho, and J. K. Sohn. 2002. Relationship between agronomic traits and resistance to brown planthopper in japonica RIL population. Korean J. Breed. 34(3) : 148-152.