

## Simple sequence repeat (SSR) marker를 이용한 벼 품종 식별

권용삼\* · 박은경 · 박찬웅 · 배경미 · 이승인 · 조일호

농림부 국립종자관리소 재배시험과

Received July 31, 2006 / Accepted September 11, 2006

**Identification of Rice Variety Using Simple Sequence Repeat (SSR) Marker.** Yong-Sham Kwon\*, Eun-Kyung Park, Chan-Ung Park, Kyung-Mi Bae, Seung-In Yi and Il-Ho Cho. *Variety Testing Division, National Seed Management Office, MAF, Suwon, 443-400, Korea* – The objective of this study was carried out to evaluate the suitability of simple sequence repeat (SSR) markers for genetic diversity assessment and identification of rice varieties. The 23 primers selected from 50 SSR primers showed polymorphisms in the 21 rice varieties. The 2 to 9 SSR alleles were detected for each locus with an average of 3.00 alleles per locus. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.091 to 0.839. Based on band patterns, UPGMA cluster analysis was conducted. These varieties were separated into 4 groups corresponding to rice ecotype and pedigree information and genetic distance of cluster ranging from 0.59 to 0.92. The 4 SSR primer sets (RM206, RM225, RM418, RM478) selected from 23 polymorphic primers were differentiated all the rice variety from each other by markers genotypes. These markers may be used wide range of practical application in variety identification of rice

**Key words** – Genetic assessment, molecular marker, SSR, variety identification.

### 서 론

우리나라의 쌀 산업은 쌀 소비의 지속적인 감소와 연속된 풍년 및 수입증가로 인한 공급확대로 재고량이 매년 증가하고 있기 때문에 가격이 안정적이지 못하다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 생산자와 소비자가 선호하는 고품질 벼 품종을 개발하고 이에 대한 재배법과 수확 후 관리기술을 확립하는 것이 선결과제라고 할 수 있다. 이에 따라 1990년대부터 고품질을 가진 벼 품종을 육성하기 위하여 유전적 배경이 유사한 자포니카 품종을 교배모본으로 하여 여러 가지 품종들이 육성되어 오고 있기 때문에 근래에 육성된 벼 품종은 유전적 근연관계가 가까운 것으로 추정되고 있다.

벼 품종의 유전적 근연관계나 품종 판별에 RAPD, AFLP, SSR 등과 같은 PCR-based marker가 활용되고 있는데, RAPD 나 AFLP 분석 방법은 분석의 재현성과 비용뿐만 아니라 marker의 특성이 dominant 형태를 나타내기 때문에 이용에 제한요소가 되고 있다[3,8]. 그러나 SSR 분석 방법은 식물체 genome상에 존재하는 단순반복 염기서열의 반복횟수의 차이로 인해 다형성이 나타나며, 기존에 개발된 marker보다 다형성 정도가 아주 높고 marker가 co-dominant한 상태를 나타내기 때문에 검정 계통의 heterozygous 여부를 쉽게 확인할 수 있는 등과 같은 장점이 있다[1,5]. 실제로 국제신품종 보호연맹 (UPOV)내의 분자생물학 실무 작업반 (BMT) 내에서도 품종식물에 SSR marker가 가장 효과적임을 재안한 바 있다[15].

벼의 경우 SSR marker를 이용하여 유전자 지도 작성, 내재해성과 관련된 유전자의 mapping, DNA marker에 의한 유용 형질을 가진 개체의 간접 선발 (marker-assisted selection), 유전적 유연관계 분석, 품종판별 등과 같은 분야에 다양한 연구결과가 보고되고 있다[5]. 벼 품종간 유전적 유연관계 유연관계 분석 및 품종식별에 SSR marker의 이용에 대한 연구가 보고되고 있는데, 국내에서는 자포니카 벼 품종의 다양성과 농업형질과의 연관분석과 벼 품종의 육성 계보의 추정 등에 대한 연구를 수행한 바 있고 [4,13,14], 외국에서는 벼 1대 잡종 품종의 순도 검정[6], 향미 품종의 구별성, 균일성, 안정성의 판단에 SSR의 활용 가능성을 제시하고 있다 [10]. 그러나 최근 보급되고 있는 우리나라의 고품질벼 품종을 대상으로 하여 분자표지인자를 활용하여 품종간 유전적 유연관계 분석이나 품종식별에 활용한 예는 거의 없는 실정이다. 한편, 분자표지인자에 의해 최근 육성된 벼 품종 식별 방법이 구체적으로 구명된다면 보급종의 순도를 높일 수 있을 뿐만 아니라 분쟁 발생시 이를 조정하는 보조자료로 활용될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 분자표지인자에 의한 벼 품종 판별 방법에 대한 가능성 여부를 검토하기 위하여, 염색체상에 위치가 확인된 SSR marker를 이용하여 고품질 벼 21품종을 분석하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 식물재료

본 연구에서는 2005년에 고품질벼로 선정되어 농가에 보급되고 있는 '주남벼'의 20품종을 공시하여 (Table 1), 공시품

\*Corresponding author

Tel : +82-31-273-4147, Fax : +82-31-203-7431

E-mail : yskwon@seed.go.kr

Table 1. Major agronomic characteristics of rice varieties surveyed in this studies

No.	Varieties	Heading date (Mon.day)	Culm length (cm)	No. of panicles per hill	1000-grain weight (g)
1	Odaebyeo	7.26	79.0	18.0	24.8
2	Junghwabyeo	7.30	77.0	16.0	20.2
3	Taebongbyeo	7.27	74.0	15.0	21.8
4	Saasangjubyeo	7.28	79.0	19.0	21.1
5	Hwayeongbyeo	8.10	77.0	14.0	22.8
6	Surabyeo	8.12	75.0	17.0	21.5
7	Hwaseongbyeo	8.11	82.0	16.0	21.3
8	Samdeogbyeo	8.14	76.0	15.0	21.6
9	Dongjin1	8.12	81.0	16.0	22.7
10	Chucheongbyeo	8.18	100.0	19.0	20.9
11	Nampeongbyeo	8.15	80.0	15.0	21.7
12	Junambyeo	8.16	73.0	14.0	23.2
13	Ilmibyeo	8.19	79.0	17.0	19.8
14	Saechucheongbyeo	8.19	95.0	19.0	20.5
15	Ilpumbyeo	8.14	79.0	15.0	21.3
16	Daeanbyeo	8.15	76.0	17.0	21.7
17	Saegeohwabyeo	8.11	73.0	14.0	23.2
18	Donganbyeo	8.14	78.0	15.0	24.5
19	Shindongjinbyeo	8.14	80.0	12.0	27.7
20	Dongjinchalbyeo	8.13	80.0	15.0	22.3
21	Sinseonchalbyeo	8.05	85.0	16.0	20.5

종의 종자 2립을 마쇄한 다음 Nucleospion<sup>®</sup> Plant Kit (Cat no. 740.270.540.)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 비색 정량하고 최종 농도가 5 ng/μL가 되도록 희석한 다음 SSR 분석에 이용하였다.

### SSR 분석

SSR marker에 의한 벼 보급종의 유전적 유연관계 및 순도 검정에 적합한 primer를 선발하기 위하여, 국제 벼 유전체 D/B(<http://www.gramene.org/>)로부터 SSR primer의 정보를 확인하여 염색체상에 고르게 위치하면서 대립유전자의 수가 많은 50개의 marker를 최종 선정하였다. SSR marker의 다형성 정도를 조사하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 PIC (polymorphism information content) 값을 산출하였다. 여기에서  $P_{ij}$ 는 마커  $i$ 의 밴드들 중에서  $j$ 번째 공통 밴드 패턴의 빈도수이다[11].

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

본 연구에서 SSR 분석에 이용된 PCR의 반응액 조성은 벼 genomic DNA 25 ng을 template DNA로 이용하여, 2.5 mL 10×buffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2.0 mL의 dNTP mixture(2.5 mM), 50 pmol의 SSR

primer, 1 units의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 실시하였다. PCR은 UNO II Thermocycler (Biometra, Germany)에서 35 cycle을 실시하며, denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 55~60℃에서 1분, 그리고 extension을 72℃에서 1분간 수행하였다. 증폭된 DNA 산물은 6% polyacrylamide sequencing gel에 2시간 전기 영동한 다음 Silver sequence<sup>TM</sup> staining reagents (Promega, USA)로 염색하여 band를 확인하고 다형성 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 수치화 하여 기록하였다. 공시된 벼 품종에 대한 유전적 유사도는 NTSYSpc (version 2.10b)[7] 컴퓨터 프로그램을 이용하여 Dice 방법[12] 의해 산출하였고, 이 값을 근거로 비가중산술방식 (UPGMA : unweighted pair group method using arithmetic averages) 의해 집괴분석 하여 dendrogram을 작성한 다음 품종간 유연관계를 비교 분석 하였다. 그리고 벼 21 품종의 식별 및 순도 검정에 필요한 최소 set의 SSR marker를 선정하기 위하여 다형성을 보인 marker중에서 대립유전자 패턴이 선명하고 PIC 값이 높은 것을 선발하여 공시품종에 대해 고유한 밴드 특성을 나타내는지를 비교·분석하였다.

## 결과 및 고찰

### SSR 분석

벼의 품종간 유연관계 분석 및 품종식별에 적합한 SSR marker를 선발하기 위하여, 2005년에 종자관리소에서 보급된 21품종의 genomic DNA와 SSR marker를 이용하여 다형성 정도를 조사한바 (Table 2), 총 50개의 SSR primer중에서 공시품종 간에 다형성을 나타내는 SSR marker는 23개로 조사되었다. 이들 marker에 의해 검출된 대립유전자의 수는 2~9개였고, 총 68개의 대립유전자가 분석되었으며, marker 당 평균 대립유전자의 수는 3.00개로 나타났다. 그리고 각 marker의 유전적 다형성 정도를 나타내어 주는 PIC 값은 0.091~0.839까지 나타났으며, 평균값은 0.460으로 조사되었다. 한편 보급종 21품종은 RM206의 21개 marker에서 한 개씩의 대립유전자를 나타내어 동형접합체임을 알 수 있었으나, RM418의 경우 '오대벼'와 '동진찰벼'에서 2개의 대립유전자가 검출되었다.

벼의 품종 및 유전자원의 분석에 유연관계 분석에 SSR marker를 이용한 예는 미국, 인도, 우리나라에서 여러 가지 연구결과가 보고되고 있다. 미국의 Garris 등[2]은 아시아, 아메리카, 유럽, 오세아니아에서 수집된 234개의 유전자원을 169개의 SSR marker를 이용하여 분석하였을 때 평균 대립유전자의 수는 11.8개였고, PIC 값은 0.70으로 나타남을 보고하였고, 인도의 Singh 등[10]은 향미 23품종과 55개의 SSR marker와의 관계분석에서 대립유전자의 수는 2~4개 정도 검출되며 평균 PIC 값은 0.338로 나타남을 지적하였다. 우리나라의 Kwon 등[4]도 자포니카 벼 80품종을 65개의 SSR mark-

Table 2. Description, number of alleles, and polymorphism information content (PIC) values of the SSR markers selected for the variety identification of rice

SSR markers	Repeat motif	Annealing Temp(°C)	Chromo. no.	No. of alleles	PIC value
RM5	(GA)14	56	1	3	0.324
RM7	(GA)19	56	3	2	0.091
RM20	(ATT)14	55	12	2	0.308
RM25	(GA)18	53	8	2	0.308
RM72	(TAT)5C(ATT)15	55	8	3	0.744
RM164	(GT)16T(GT)4	55	6	2	0.245
RM190	(CT)11	50	6	2	0.408
RM202	(CT)30	55	11	4	0.571
RM206	(CT)21	50	11	9	0.839
RM224	(AAG)8(AG)13	55	11	3	0.474
RM225	(CT)18	55	6	4	0.581
RM229	(TC)11(CT)5C3(CT)5	55	11	3	0.744
RM232	(CT)24	57	3	2	0.091
RM234	(CT)25	55	7	2	0.444
RM335	(CTT)25	56	4	3	0.669
RM415	(AT)21	55	12	3	0.590
RM418	(ATT)21	55	7	3	0.618
RM422	(AG)30	57	3	2	0.245
RM474	(AT)13	57	10	2	0.444
RM478	(AG)12	60	7	2	0.472
RM481	(CAA)12	55	7	5	0.671
RM488	(GA)17	57	1	3	0.336
RM517	(CT)15	55	3	2	0.308
<b>Mean</b>				<b>3.00</b>	<b>0.460</b>

cr로 분석하였을 때 발생한 대립유전자의 수는 2~18개로 비교적 다양한 분포를 보이며 PIC 값도 0.02~0.86의 범위에 속하고 평균치는 0.43으로 나타남을 보고한 바 있다. 본 연구의 결과와 미국의 Garris 등[2]과 인도의 Singh 등[10] 및 우리나라의 Kwon 등[4]이 보고한 내용보다 대립유전자의 수와 PIC 값이 본 연구의 결과와 차이를 보였는데 이는 분석에 이용된 marker의 수나 종류 및 분석대상 집단의 유전적 조성이 다르기 때문에 나타난 결과라고 추정된다. 한편, SSR marker RM418의 경우 오대벼와 동진찰벼에서 2개의 대립유전자가 검출되었는데, Kwon 등[4]도 국내벼 품종의 SSR 분석시 특이적인 marker에서 몇몇 품종이 이형집합성을 나타낸다고 보고한 바 있다.

#### 품종간 유연관계 분석

SSR marker를 이용하여 벼 21품종에 대한 유전적 유연관계를 조사한 바 (Fig. 1), 공식품종의 전체 유사도 지수는 0.59~0.92의 범위로 나타났으며, 유사도 지수 0.65를 기준으로 할 때 21개 품종은 4개의 그룹으로 구분할 수 있었다.

제 I 그룹은 '오대벼', '새상주벼', '중화벼', '태봉벼'와 같은 조생종 품종과 '밀양 95호'를 교배모본으로 육성된 '남평벼', '일미벼', '동안벼', '동진찰벼'와 나머지 2품종이 포함되었다.

그리고 제 II 그룹은 'Chukei 803'이 교배모본으로 활용된 '화영벼'와 '세계화벼', '화영벼'가 교배모본으로 이용된 '동진 1호', '주남벼', '신동진벼'와 나머지 4품종이 속하였으며, 특히, '추청벼'와 제반형질이 유사하며 도열병 저항성을 가진 '새추청벼'의 유전적 유사도가 가장 높게 나타났다. 그리고 'Aichi 37/삼남벼' 조합의 약배양 기법에 의해 육성된 '화성벼'와 '수원345호/KantoPL4' 조합에 '수원345호'가 여교배되어 육성된 '수라벼'는 어느 품종군에도 속하지 않고 다른 품종들과 유전적 거리가 먼 것으로 분석되었다. 따라서 본 연구에서 SSR marker의 genotype에 의해 작성된 dendrogram을 분석해 볼 때 벼 품종의 생태형이 비슷하거나 품종육성에 이용된 교배모본의 계보가 유사한 품종이 동일한 그룹 내에 위치하는 것으로 분석되었다.

#### 품종식별을 위한 최소 마커의 설정

벼 21품종에 대한 품종판별을 위한 최소 SSR marker를 설정하기 위하여, 품종간 유전적 유연관계 분석에서 다형성을 보인 23개의 marker 중에서 밴드가 선명하고 PIC 값이 높은 marker를 선정하여 각 품종간 대립유전자의 특성을 비교한 바(Fig. 2), RM206, RM225, RM418, RM478은 대립유전자의 패턴이 선명할 뿐만 아니라 PIC 값도 0.47~0.86의 높은 범위에 속하였다. 또한 이들 4개의 marker genotype에 의해 21품

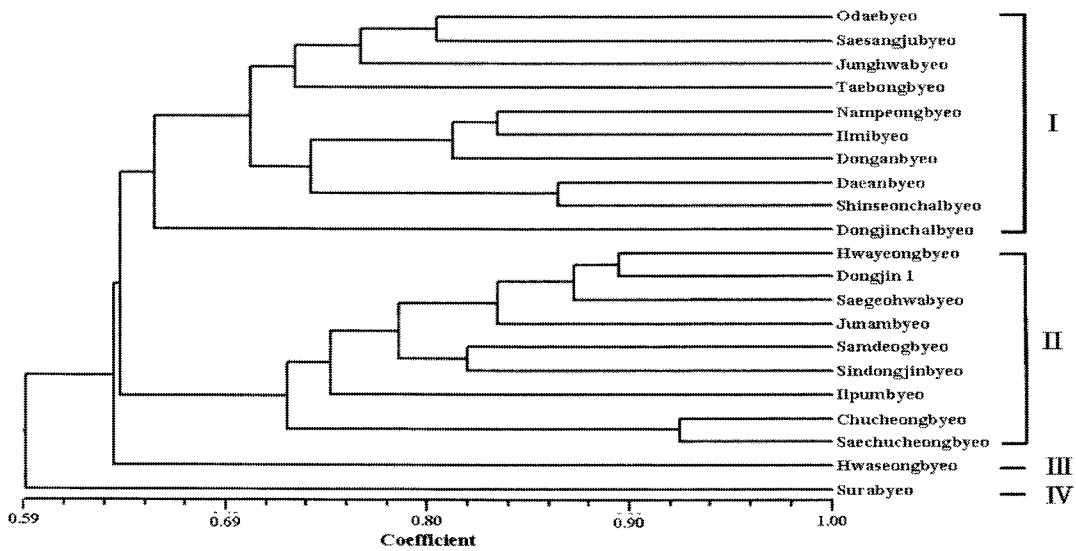


Fig. 1. Dendrogram of 21 rice varieties by cluster analysis based on the SSR markers. The major clusters are marked on the right side of the dendrogram. The scale at the bottom is Dice's coefficient of similarity.

중은 각각의 고유한 밴드 특성을 나타내어 이 4개의 marker 만으로 벼 21품종의 식별이 가능할 것으로 나타났다.

벼 품종 판별을 위해 여러 가지 유형의 분자표지가 개발 되어 보고되고 있는데, 인도에서는 향미 23품종에 순도검정에 SSR marker 55개를 활용하여 품종의 구별성 검정에 활용 가능성을 제시하였고[10], 일본에서는 15개의 STS marker를 4조합의 multiplex PCR marker로 개발하여 벼 130품종의 식별 방법을 개발하였다[9]. 그러나 인도에서 개발된 품종식별

방법은 분석에 이용된 marker의 수가 너무 많아 효율적이지 못한 것으로 사료되었고, 일본에서 개발된 분자표지 인자의 경우 marker가 dominant 형태를 나타내기 때문에 heterozygous한 상태를 알 수 없는 문제점이 있다. 그러나 본 연구에서 분석 대상 품종의 수가 21품종에 불과하지만, 최근에 보급되고 있는 벼 육종 목표가 고품질미 육성에 주력하고 있기 때문에 이들 품종군의 유전적 거리가 아주 좁은 것으로 추정되고 있어 이들 품종을 판별할 수 있는 SSR marker라면 다른 품종의 식별에도 충분히 활용 될 수 있을 것이라고 사료된다. 앞으로 본 연구에서 선발된 4개의 marker를 이용하여 최근에 육성되고 있는 고품질 벼를 대상으로 보다 구체적인 분석이 이루어진다면 벼 보급종의 순도를 높일 수 있을 뿐만 아니라 수입쌀을 국내산으로 둔갑시켜 유통시키는 유통질서의 교란에도 적극적으로 대처할 수 있을 것이며, 나아가 종자분쟁 발생시 하나의 보조적 해결 수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 요 약

SSR markers를 이용하여 벼의 품종간 유전적 유연관계 분석과 품종식별 방법에 대한 연구를 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

SSR primer 50개와 벼 보급종 21품종을 PCR 반응시킨 결과 다형성을 뚜렷하게 나타내는 primer는 23개였으며, 각 marker에 의해 발생된 대립유전자의 수는 2~9까지 검출되었고, 평균값은 3.00개로 나타났다. 유전적 다형성 정도를 나타내어 주는 SSR marker의 PIC 값은 최소 0.091에서부터 최대 0.839까지 다양하게 분석되었다. SSR marker를 이용하여 분석된 벼 21품종에 대한 전체 유전적 유사도는 0.59~0.92의 범

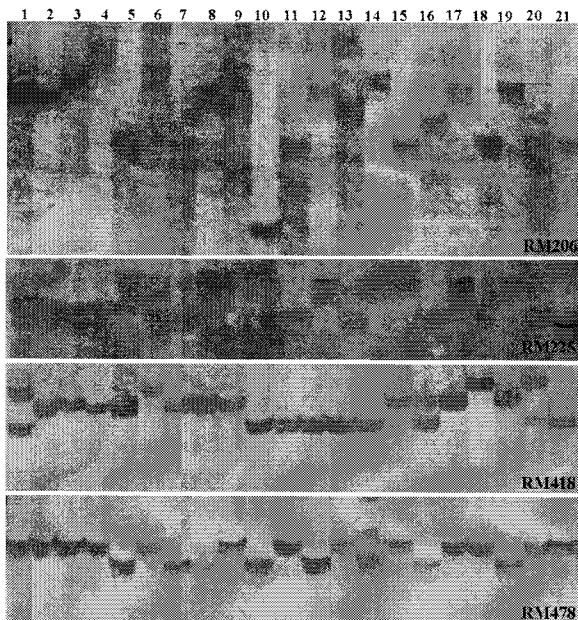


Fig. 2. Polymorphism for SSR marker RM206, RM225, RM418, and RM478. The amplified products were separated on 6.0% polyacrylamide gels. Numbers 1-21 refer to the list of varieties in Table 1.

우에 속하였고 유사도 지수 0.65를 기준으로 할 때 4개의 그룹으로 구분되었다. SSR marker중에서 RM206, RM225, RM418, RM478은 marker genotype에 의해 21 품종에 대해 각각 고유한 밴드 특성을 나타내어 품종판별이 가능한 것으로 나타났다. 금후 이 연구결과는 벼 보급종의 품종식별을 위해 효과적으로 이용될 수 있는 것으로 나타났다.

### 참 고 문 헌

- Coburn, J. R., S. V. Temnykh, E. M. Paul and S. R. McCouch. 2002. Design and application of microsatellite markers panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Sci.* **42**, 2092-2099.
- Garris, A. J., T. H. Tai, J. Coburn, S. Kresovich and S. McCouch. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* **169**, 1631-1638.
- Jeung, J. U., H. G. Hwang, H. P. Moon and K. K. Jena. 2005. Fingerprinting temperature japonica and tropical indica rice genotypes by comparative analysis of DNA markers. *Euphytica* **146**, 239-251.
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, H. C. Hong, H. G. Hwang and H. C. Choi. 2002. SSR diversity in Japonica rice cultivars and its association to several traits. *Korean J. Breed.* **34**, 57-63.
- McCouch, S. R., X. L. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. B. Xu, Y. G. Cho, N. Huang, T. Ishii and M. Blair, 1997. Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* **35**, 89-99.
- Nandakumar, N., A. K. Singh, R. K. Sharma, T. Mohapatra, K. V. Prabhu and F. U. Zaman. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* **136**, 257-264
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System- Version 2.10b. Applied Bio-statistics Inc., New York.
- Saini, N., N. Jain, S. Jain and R. K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica* **140**, 133-146.
- Shinmura, K., H. Kanagawa, T. Mikami and T. Fukumori. 2005. Development of multiplex PCR primer sets for the identification of rice varieties. *Breeding Research* **7**, 87-94.
- Singh, P. K., R. K. Sharma, A. K. Singh, V. P. Singh, N. K. Singh, S. P. Tiwari and T. Mohapatra. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* **135**, 135-143.
- Smith, J. S. C., E. C. L. Chin, H. Shu, O. S. Smith, S. J. Wall, M. L. Senior, S. E. Michell, S. Kresovick and J. Ziegler. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) : Comparison with data from RFLPs and pedigrees. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 163-173.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy : The Principles and Practice of Numerical Classification, W. H. Freeman, San Francisco.
- Song, M. T., J. H. Lee, Y. S. Cho, Y. H. Jeon, S. B. Lee, J. H. Gu, S. H. Choi and H. G. Hwang. 2002. Narrow genetic background of Korean rice germplasm as revealed by DNA fingerprinting with SSR markers and their pedigree information. *Korean J. Genetics.* **24**, 397-403.
- Song, M. T., K. M. Kim, S. K. Jong, J. H. Lee, Y. S. Cho, J. H. Gu, S. B. Lee, S. H. Choi and H. G. Hwang. 2003. Comparison of DNA-based and pedigree-based genetic similarity among Korean rice cultivars. *Korean J. Genetics.* **25**, 223-230.
- UPOV-BMT. 2002. BMT/36/10 Progress report of the 36th session of the technical committee, the technical working parties and working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular, Geneva.