

MITE-AFLP를 이용한 자포니카 벼의 다양성 검정

홍성미* · 권수진** · 오창식* · Susan R. Wessler*** · 안상낙*†

*충남대학교 농업생명과학대학, **농촌진흥청 농업생명공학연구원, ***조지아주립대학교

Diversity Analysis of Japonica Rice using MITE-transposon Display

Seong-Mi Hong*, Soo-Jin Kwon**, Chang-Sik Oh*, Susan R. Wessler***, and Sang-Nag Ahn*†

*Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**National Institute of Agricultural Biotechnology (NIAB), RDA, Suwon 441-707, Korea

***Department of Botany, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

ABSTRACT Miniature inverted transposable elements (MITEs) are abundant genomic components in plant including rice. MITE-transposon display (MITE-TD) is an Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-related technique based on MITE sequence. In this study, we used the MITE-AFLP for the analysis of diversity and relationship of the 114 japonica accessions. Of the several MITEs, the *mPing* family was applied to detect polymorphisms based on PCR amplification. The *BfaI* adaptor primer and the specific primer derived from *mPing* terminal inverted repeat (TIR) region were used to PCR amplification of 114 accessions. Nine primer pairs produced a total of 160 polymorphic bands. PIC values of the polymorphic bands generated by nine primer pairs ranged from 0.269 (*BfaI* + ACT) to 0.426 (*BfaI* + T). Each accession revealed a distinct fingerprint with two primer combinations, *BfaI* + G and *BfaI* + C. Cluster analysis using marker-based genetic similarity classified 114 accessions into five groups. MITE-AFLP markers were genetically mapped using a population of 80 BILs (BC1F7) derived from a cross between the rice accessions, Milyang 23 and Hapcheonangmi 3. Eight of the markers produced with the primer pair *BfaI* + 0 were mapped on chromosomes 1, 2, 4, 5, 7, and 9. Considering that one MITE-AFLP marker on chromosome 7 was tightly linked to the *Rc* gene, the MITE-AFLP markers will be useful for gene tagging and molecular cloning.

Keywords : miniature inverted transposable elements (MITE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), transposon display (TD), *mPing*, terminal inverted repeat (TIR)

Transposable element 혹은 transposon은 진핵생물 게놈의 일부로 진화 및 종내 변이의 원인으로 알려져 있다. Transposable element는 원래의 위치에서 새로운 위치로 전위하는 방식에 따라 class 1과 class 2로 분류된다. Class 1 element는 RNA를 이용하여 이동하며, class 2 element는 DNA를 이용하여 원 위치에서 분리되어 새로운 위치로 삽입된다(Finnegan 1992; Flavell *et al.*, 1994). Turcotte *et al.*(2001)은 910kb 내에서 transposable elements를 조사하여 class 1과 2는 각각 22개와 166 개가 존재하며, 이들은 전체 genome의 12.2%와 6.6%를 차지하고 있다고 보고하였다.

Transposable elements의 한 형태인 miniature inverted transposable element (MITE)는 벼에서 매 4.4 kb 당 1~78 개의 빈도로 발견되고 있고, 전체 게놈에서 100,000개의 MITE로 전환될 수 있다고 보고하였다(Tarchini *et al.*, 2000). 또한 염기서열 상동성 분석을 이용한 결과에서도 500 bp 이하의 작은 MITE들이 다수 존재하는 것이 보고되었다(Bureau & Wessler, 1992; Bureau & Wessler 1994a; Bureau & Wessler 1994b; Bureau *et al.*, 1996; Wessler *et al.*, 1995).

MITE는 class 2에 속하며(Park *et al.*, 2003a) 옥수수, 애기장대, 벼 등 식물 및 인간, 곤충 그리고 선충의 게놈에도 일부 존재하는 것으로 보고되었다(Kikuchi *et al.*, 2003).

MITE family에 속하는 부류로는 tourist, stowaway, gaijin, castaway, ditto, wanderer, explorer, heartbreak 등이 알려져 있으며, 이들은 각각의 고유 target site를 가지고 있다. 예를 들면, Tourist-like의 표적 위치는 5'-TAA-3'이며, Stowaway-like는 주로 5'-TA-3'을 표적위치로 이용한다(Le *et al.*, 2000). 최근에 보고된 MITE 중에서 miniature *Ping*

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5728

(E-mail) ahnsn@cnu.ac.kr

<Received May 11, 2006>

은 Tourist-like MITE로 분류되는 430 bp의 transposable element로 15 bp terminal inverted repeats(TIRs)를 가지고 있다. 기존에 알려진 *Ping*의 경우 ORF 영역이 존재하나, 이들과 유사한 *mPing* 내에는 ORF 영역이 존재하지 않는다(Kikuchi *et al.*, 2003).

MITE-Transposable display(TD) 또는 MITE-AFLP 분석은 이미 옥수수 계통 간의 유전적인 근연관계를 조사하는데 이용되었으며(Casa *et al.*, 2000), 벼에서도 MITE-TD를 이용한 연구가 수행된 바가 있으나(Wessler *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003a; Park *et al.*, 2003b) 아종 내 품종의 다양성 분석 및 유전자지도 작성에 이용된 보고는 없는 실정이다.

본 연구에서는 *mPing* family를 이용한 MITE-AFLP 분석을 이용하여 자포니카 벼의 다양성과 근연관계를 밝히고, 개발된 marker들의 분자표지 이용 가능성을 검토하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

공시계통

본 실험에서 국내 육성종 65개와 일본도입종 49개 등 전체 114개 계통을 공시하였다(Table 1). 이들 계통들은 국내 및 일본에서 육성된 양질미 및 특수미 계통으로서 양질미 육종모본으로 널리 이용되는 계통들이다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA 추출은 Causse *et al.*(1994) 및 Doyle & Doyle (1987)의 방법을 수정하였다. 3주 정도 자란 어린 잎을 액체질소에서 마쇄한 후, CTAB 완충용액 [50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.7 M NaCl, 50 mM EDTA(pH 8.0), 140 mM β -mercaptoethanol]을 첨가한 후, 60°C 1시간 방치하였다. 이후, 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가한 후, 13,000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다. 상등액에 동량의 isopropanol을 넣어 DNA를 침전시켜 시료로 사용하였으며, 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 순도 검정 및 정량을 실시하였다.

AFLP 분석

정량된 DNA를 *Bfal*(New England Biolabs, USA)으로 절단한 다음, *Bfal* adaptor를 접합시킨 후 AFLP를 수행하였다. AFLP에 사용된 primer는 Table 2에 제시하였다. AFLP는 Vos *et al.*(1995)의 방법을 변형하여 실시하였으며, 1, 2 차 PCR을 수행하였다. 1차 PCR 반응은 *Bfal* adaptor가 접

합된 시료에 10×PCR Buffer(10 mM Tris-HCl, pH8.8, 50 mM KCl, Triton×100), 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP(Promega, USA), 10 pmol adaptor primer, 10 pmol *mPing* I primer, 1.5 unit Taq DNA polymerase(ABgene, England)를 첨가한 후, i-Cycler(Bio RAD, USA)를 이용하여 PCR 반응을 진행하였다. PCR 조건은 72°C 2분, 94°C 3분으로 1회 반응 후, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분을 1cycler로 24회 반복하였다. Selective amplification을 위한 2차 PCR 반응은 1차 PCR 반응 산물에 10×PCR Buffer(10 mM Tris-HCl, pH8.8, 50 mM KCl, Triton×100), 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 10 pmol adaptor primer, 10 pmol *mPing* II primer, 0.5 unit Taq polymerase를 부가하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 94°C 30초, 63°C 30초, 72°C 1분을 2회 반복한 후, 매 반복 회마다 annealing 온도를 59°C까지 1°C씩 감소시키면서 5회 반복시킨 다음, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분을 29회 반응시켰다.

최종 PCR 산물을 95°C에서 5분간 가열하여 변형시킨 후, 6% polyacrylamide gel(acrylamide : bisacrylamide(19:1), 7.5 M Urea, 1×TBE(0.89 M Tris-HCl, pH8.3, 0.89M boric acid, 0.02 M EDTA, pH8.0)에서 전기영동하였다. 이를 silver staining kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 염색한 후 밴드를 분석하였다.

자료 분석

자포니카 벼의 근연관계를 분석하기 위하여 Nei & Li (1979)의 방법을 사용하였다. 계통 X와 Y의 유사정도는 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 의 공식에 의해 계산하였는데, N_{xy} 는 두 계통 X와 Y에서 공통적으로 관찰되는 밴드의 수이고 N_x 와 N_y 는 각 계통 X와 Y에서 발생된 총 밴드 수이다.

계통간 유사성은 NTSYS(Numerical Taxonomy and Multi Analysis System)-pc(version 2.1) 프로그램(Rohlf, 1992)을 이용하였고, 품종간 유연관계는 UPGMA(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic average)를 이용한 SHAN clustering 방법으로 dendrogram을 작성하였다. 마커의 효율성을 알아보기 위해 PIC (polymorphic information content) 값 산출을 다음의 식을 이용하였다.

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

이 식에서 P_{ij} 는 마커 i 의 밴드들 중에서 j 번째 공통 밴드 패턴의 빈도수이다(Anderson *et al.*, 1993).

Table 1. List of 114 Japonica rice accessions used in this study.

No.	Accession	Origin	Group*	No.	Accession	Origin	Group	No.	Accession	Origin	Group
1	Hokuhikari	Japan	I-1	39	Seoanbyeo	Korea	I-1	77	Junganbyeo	Korea	I-1
2	Hatsunushuki	Japan	I-1	40	Hwajungbyeo	Korea	I-1	78	Seolhyangchalbyeo	Korea	I-1
3	Norin 1	Japan	II	41	Chucheongbyeo	Korea	I-1	79	Anseongbyeo	Korea	I-1
4	Norin 8	Japan	I-1	42	Akisuho	Japan	I-2	80	Sujinbyeo	Korea	I-1
5	Norin 17	Japan	I-1	43	Asominori	Japan	I-1	81	Munjangbyeo	Korea	I-1
6	Norin 22	Japan	I-1	44	Fujiminori	Japan	I-1	82	Sampyeongbyeo	Korea	II
7	Norin 29	Japan	I-1	45	Fuji 269	Japan	I-1	83	Hwaanbyeo	Korea	II
8	Koshihikari	Japan	I-1	46	Jodongji	Japan	I-1	84	Jinbongbyeo	Korea	I-3
9	Ginboju	Japan	II	47	Damageum	Japan	I-1	85	Jeokjinjubyeo	Korea	I-1
10	Asahi	Japan	I-2	48	Eungu 6	Korea	I-1	86	Taebongbyeo	Korea	I-1
11	Kimmaze	Japan	I-1	49	Odaebyeo	Korea	I-1	87	Koami	Korea	I-1
12	Nagdongbyeo	Korea	I-1	50	Cheonmabyeo	Korea	I-1	88	Suwon 460	Korea	I-1
13	Mineyudaka	Japan	I-1	51	Anjungbyeo	Korea	I-1	89	Suwon 461	Korea	I-1
14	Chugoku 31	Japan	I-1	52	Daeanbyeo	Korea	I-1	90	Suwon 462	Korea	I-1
15	Sachicaze	Japan	I-1	53	Hwamyongbyeo	Korea	I-1	91	Hojinbyeo	Korea	I-1
16	Inabawase	Japan	I-1	54	Hwanambyeo	Korea	I-1	92	Junambyeo	Korea	I-1
17	Seolacbyeo	Korea	I-1	55	Heukmanbyeo	Korea	I-1	93	Haepyeongbyeo	Korea	I-1
18	Jaegun	Korea	I-1	56	Palgongbyeo	Korea	I-1	94	Jungsanbyeo	Korea	I-1
19	Honenwase	Japan	I-1	57	Donghaebyeo	Korea	I-1	95	Manpungbyeo	Korea	I-1
20	Totorokiwase	Japan	I-1	58	Yeongnambyeo	Korea	I-2	96	Heukhyang	Korea	I-1
21	Ssangyeob	Japan	I-1	59	Arangchalbyeo	Korea	I-1	97	Nihonbare	Japan	I-1
22	Sadominori	Japan	I-1	60	Mankyeong	Korea	I-1	98	Somewake	Japan	I-1
23	Iljin	Japan	I-1	61	Surabyeo	Korea	I-1	99	Norin 6	Japan	II
24	Tarehonami	Japan	I-1	62	Kwanganbyeo	Korea	I-1	100	Rikuu 132	Japan	I-1
25	Hokuriku 11	Japan	I-1	63	Wonhwangbyeo	Korea	I-1	101	Aegook	Korea	I-1
26	Fuji 280	Japan	I-1	64	Inweolbyeo	Korea	I-1	102	Yagyeb	Korea	I-1
27	Pi No. 25	Japan	I-1	65	Hoanbyeo	Korea	I-1	103	Norin 7	Japan	I-1
28	Reimei	Japan	I-1	66	Dongjinchalbyeo	Korea	I-1	104	Norin 25	Japan	I-1
29	BL 1	Japan	I-2	67	Mihyang	Korea	I-1	105	Sen-ichi	Japan	V
30	BL 7	Japan	III	68	Undoobyeo	Korea	I-1	106	Fujisaka 5	Japan	I-3
31	Nongbaeg	Korea	I-1	69	Hwabongbyeo	Korea	IV	107	Sasaminori	Japan	II
32	Sasanishiki	Japan	I-1	70	Nonghobyeo	Korea	I-1	108	Toyonishiki	Japan	I-1
33	Sasasigure	Japan	I-1	71	Mananbyeo	Korea	I-1	109	Akitakomachi	Japan	I-1
34	Dongjinbyeo	Korea	I-1	72	Sangmibyeo	Korea	I-1	110	Yamabiko	Japan	I-1
35	Jinbubyeo	Korea	I-1	73	Saechucheongbyeo	Korea	I-1	111	Hasusimo	Japan	I-1
36	Janganbyeo	Korea	I-1	74	Jinpumbyeo	Korea	I-1	112	Hitomebore	Japan	V
37	Ilpumbyeo	Korea	I-1	75	Sobeebyeo	Korea	I-1	113	Milyang 20	Korea	I-1
38	Jinmibyeo	Korea	I-1	76	Sindongjinbyeo	Korea	I-1	114	Sangpungbyeo	Korea	I-1

* Refer to Fig. 2 for group classification

MITE-AFLP 마커의 연관 분석

밀양 23호/합천앵미 3호 조합의 RILs(Recombinant Inbred Lines) 80계통을 이용하여 작성된 유전자지도를 이용하여 MITE-AFLP 마커의 염색체 위치를 검토하였다(Oh *et al.*, 2004a, 2004b). 탐색된 마커들은 밴드들의 대략적인 크기(bp)를 “M” 뒤에 붙여 명칭을 부여하였다. 지도 작성은 Mapmaker 프로그램(Version 2.0)으로 분석하였으며 표지 인자 간의 유전적 거리는 Kosambi centiMorgans으로 표시하였고, 순서는 LOD > 3.0을 이용하여 배열하였다.

MITE-AFLP 분석은 밴드의 수가 가장 많이 관찰된 *BfaI*+0 selective primer와 *mPingII* primer 조합(Table 2)을 이용하여 유전자 분석을 수행하였다.

결 과

다양성 분석

MITE-AFLP 분석에서 430bp의 transposon인 *mPing* 영역 내에서 19bp인 *mPingI* primer와 21bp인 *mPingII* primer를 1, 2차의 PCR 증폭에 사용하고 selective primer(Table 2)의 염기서열에 임의적으로 염기를 첨가한 결과 최대 100bp~800bp의 범위에서 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

전체 밴드 중에서 다형성을 나타내는 밴드의 선발은 육안 구별이 명확하고 염색의 강도가 대략 30%이상 나타난 밴드

를 기준으로 하였으며 primer 조합에 따라 관찰되는 밴드의 분포도 차이를 나타내었다.

총 9개의 selective primer와 *mPingII* primer와의 조합으로 169개의 다형성 밴드가 관찰되었는데, 이는 한 개의 primer 조합 당 평균 19개였다(Table 2). 관찰된 전체 밴드 중에서 최소한 한 개 이상의 품종에서 차이를 보이는 밴드를 조사한 결과 *BfaI*+C의 primer 조합에서 55.8%의 최대값을, *BfaI*+AT에서 27.1%의 최소값을 보여주었다. 가장 많은 밴드수를 보인 조합은 *BfaI*+AT(59개)와 *BfaI*+AC(63개), 그리고 *BfaI*+TG(63개)였다. 전체 밴드에 대한 다형성율은 *BfaI*+A를 비롯한 1개의 염기가 첨가된 primer 조합에서는 평균 41.5%를 나타내었고, 2개의 염기가 첨가된 primer 조합에서는 36.6%를, 그리고 3개의 염기가 첨가된 primer의 조합에서는 32.2%를 나타내었다(자료미제시). 각각의 primer에 의해 증폭된 밴드에 대한 다양성을 PIC 값으로 산출한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 최소값 0.269에서 최대값 0.426의 범위에 있었고 평균 0.363이었다. 최대값 0.426을 보인 primer의 조합은 *BfaI*+T이었고, 최소값을 나타내는 primer 조합은 *BfaI*+ATC였다. Selective primer에 첨가되는 염기의 수가 3개인 *BfaI*+AGC와 *BfaI*+ATC는 PIC 값이 0.317과 0.269로 selective primer에 첨가되는 염기의 수가 1~2개인 primer의 조합보다 낮게 나타났다.

사용된 9개 primer 조합을 이용하여 발생된 밴드를 분석

Table 2. AFLP-MITE adaptors and primers used in this study and averaged PIC value of the bands generated by each primer.

	Sequence	No of polymorphic band (%)*	PIC value
Adaptors	5'GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'TACTCAGGACTCAT-5'		
Primers			
<i>BfaI</i> +0	5'GACGATGAGTCCTGAGTAG-3'		
<i>BfaI</i> +A	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGA-3'	17 (42.5)	0.411
<i>BfaI</i> +T	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGT-3'	16 (37.2)	0.426
<i>BfaI</i> +G	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGG-3'	15 (30.6)	0.382
<i>BfaI</i> +C	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGC-3'	24 (55.8)	0.411
<i>BfaI</i> +AT	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGAT-3'	16 (27.1)	0.422
<i>BfaI</i> +AC	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGAC-3'	29 (46.0)	0.295
<i>BfaI</i> +TG	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGTG-3'	23 (36.5)	0.337
<i>BfaI</i> +AGC	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGAGC-3'	15 (31.9)	0.317
<i>BfaI</i> +ACT	5'GACGATGAGTCCTGAGTAGACT-3'	14 (32.6)	0.269

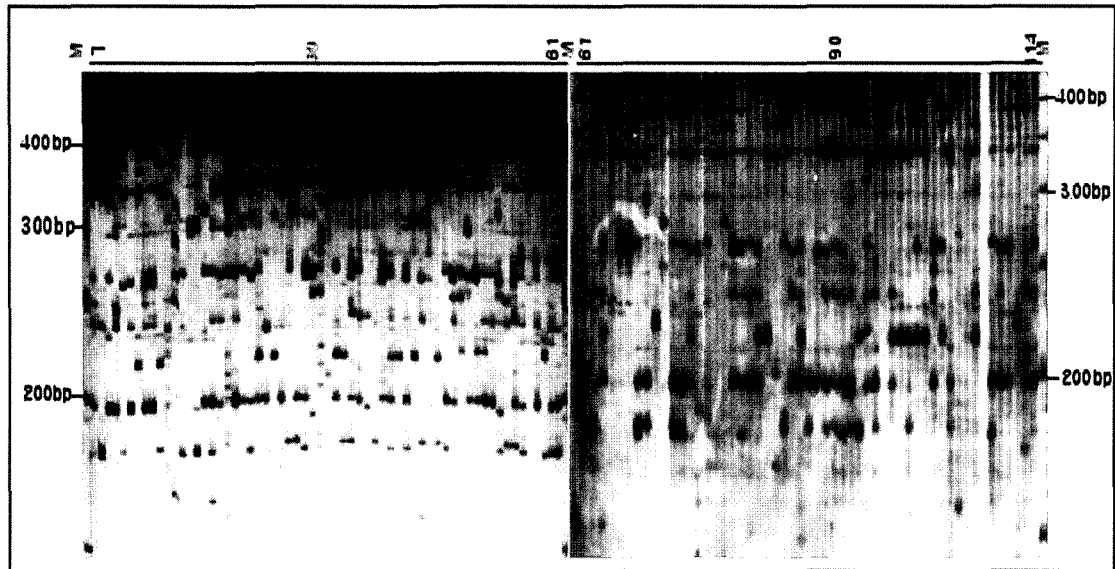


Fig. 1. Polymorphisms of MITE-AFLP bands. The primer was *Bfal* + C. Refer to the Table 1 for the lane designation. M, 50bp DNA ladder.

한 결과, 전체 114개 자포니카 벼의 구분이 가능하였다. Primer 조합별로는 동일한 밴드 패턴을 보여주는 몇몇 자포니카 벼 계통이 발견되었다. Sasanishiki와 Fujiminori 두 계통은 Primer *Bfal*+A에서 발생된 밴드에서 동일한 양상을 보였으며, *Bfal*+TG 조합에서는 Koshihikari, Sasanishiki 및 Fujiminori 세 개의 벼 품종에서 동일한 밴드 패턴을 보였다. *Bfal*+T 조합은 서안벼와 추청벼에서, *Bfal*+ACT 조합은 Ssangyeob과 농백, 서안벼와 Chucheongbyeo, 삼평벼와 화안벼, Rikuu 132와 Norin 7, Sasasigure와 화남벼, 그리고 Rikuu 132와 Norin 7에서 동일한 양상을, *Bfal*+AGC 조합은 호안벼와 동진찰벼, Ssangyeob과 농백, Norin 6호와 Rikuu 132, 그리고 해평벼와 Norin 7에서 동일한 양상을 보였다. 그리고 *Bfal*+AT 조합에서는 안성벼와 호진벼, 삼평벼와 화안벼에서, 그리고 *Bfal*+AC 조합은 Sasasigure와 화남벼에서 동일한 경향을 보였다. 따라서 이들 7개의 primer 조합으로는 전체 114개의 자포니카 벼를 각각 구분이 불가능하였다. 그러나 *Bfal*+G와 *Bfal*+C의 2개의 primer는 어느 두 품종 간에도 동일한 밴드 패턴이 발생되지 않아 공식된 자포니카 벼 전체를 구분할 수 있는 유용한 마커로 판단되었다.

근연관계 분석

114개의 자포니카 계통에 대해 발생된 전체 169개의 밴드를 이용, 밴드 유무를 1과 0으로 코드화한 후 NTSYS-pc

(version 2.1)(Nei & Li, 1979) UPGMA 분석에 의한 근연계수를 계산한 결과, 유사계수는 최소 0.802(Norin 8과 Norin 22 간)에서 최대 0.081(Chugoku 31과 삼평벼 간)의 분포를 보였으며, 평균 유사계수는 0.353이었다(자료 미제시). 공식계통의 dendrogram 작성 결과, 크게 5개 그룹으로 분류되었고, 이들 중 그룹 I은 다시 세 개의 소그룹으로 구분할 수 있었다(Fig. 2). 그룹 I-1에 속하는 Norin 8과 Norin 22는 유사계수가 0.802로 가장 유사성이 높은 품종이었다. 그룹 I-1에는 안성벼, 호진벼, 서안벼, Chucheongbyeo, Sasanishiki, Fujiminori, Rikuu 132, Norin 6 등이 속했는데 원산지별로 구분이 잘 나타나지 않았다. 그룹 I-2에는 영남벼, Asahi, BL 1, Akisuho가 속했고, 진부벼, Hokuriku 11, Fujisaka 5가 그룹 I-3으로 분류되었다. 그룹 II에는 6계통이 분류되었는데, 국내 육성종인 삼평벼와 화안벼, 그리고 일본 육성종인 Asahi 등이 속했다. 그룹 III과 IV에는 BL 30과 화봉벼 각각 1개의 품종이 속하였으며 Senichi와 Hitomebore가 그룹 V로 분류되었다(Fig. 2).

AFLP marker 연관분석

MITE-AFLP 결과 관찰된 밴드의 염색체 위치를 확인하기 위해 밀양 23호/합천앵미 3호 조합의 RIL(BC1F7 세대) 80계통을 이용하여 작성된 유전자지도를 이용하였다(Oh *et al.*, 2004a, 2004b). 분석 결과 전체 36개의 밴드가 양친인 밀양 23호와 합천앵미 3호 간에 다형성을 보였는데, 이들

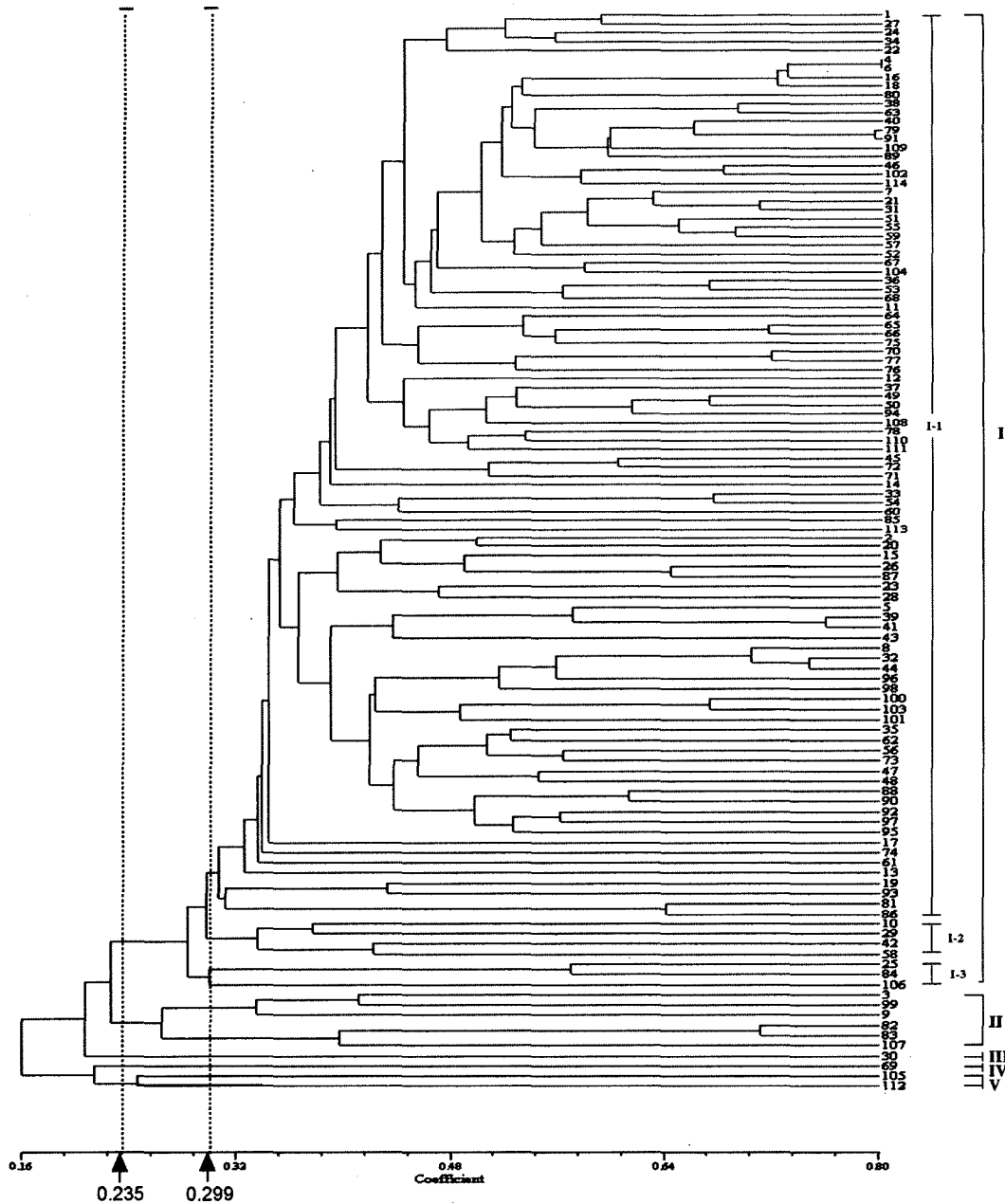


Fig. 2. Dendrogram showing the relationship among 114 Japonica rice accessions based on MITE-AFLP analysis. Refer to the Table 1 for the line designation. Vertical dashed lines indicate similarity values used for the group and sub-group classifications, respectively.

중 8개 단편의 염색체 위치를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 유전자 지도 분석에 이용된 마커중 염색체상에 나타나지 않은 마커들은 각각의 염색체상에서 SSR 마커와 함께 명확하게 그룹화되지 않았으므로 이는 추후 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

8개 마커는 각각 염색체 1번(2개), 2번(1개), 4번(1개), 5번(1개), 7번(1개) 그리고 9번(2개)에 위치하였다(Fig. 4).

주목할 점은 이들 마커들이 염색체에 골고루 분포하고 있다는 것이다. 9개 중 2개의 마커는 염색체의 말단 부근에 위치하였는데, 이들은 각각 2번 및 4번 염색체에 위치한 M220과 M242였다. M280과 M125는 1번 염색체에서 약 4 cM의 거리로 위치하였다. 염색체 7번의 M422는 가장 상단부에 위치한 RM427과 14.2 cM 떨어진 아래에 위치하였으며, Rc와는 1.9 cM의 거리로 연관되어 있었는데, 이 마커는

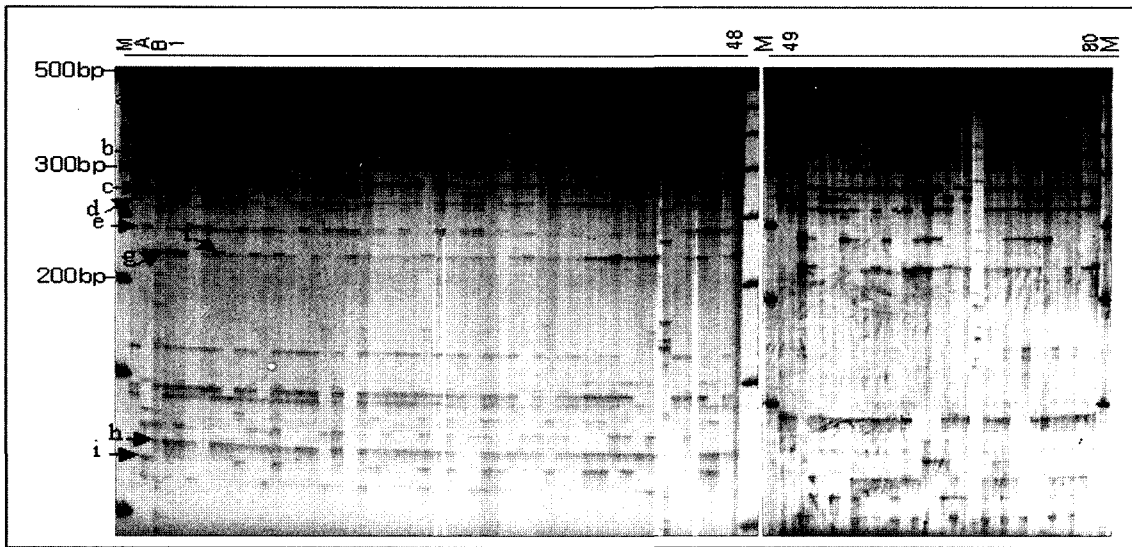


Fig. 3. Polymorphism of MITE-AFLP. The primer was *Bfa*I+0base. Arrows indicate specific marker for a molecular linkage map construction. a, M425. b, M325. c, M280. d, M265, e, M242. f, M222. g, M220. h, M125. i, M120. Lane A, Milyang 23. Lane B, Hapcheonaengmi 3. Lane 1~80, BC1F7 backcross inbred lines. M, 50bp DNA ladder.

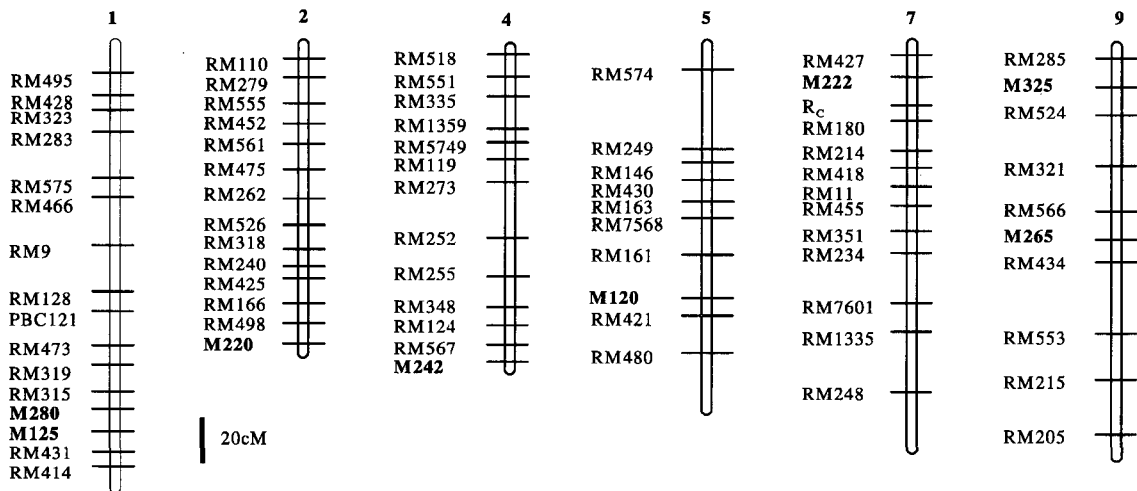


Fig. 4. The integrated map based on SSR and AFLP markers. A molecular linkage map was constructed using the 80 BC1F7 lines. Markers are indicated on the left of the chromosomes. Eight AFLP markers are shown in bold.

Rc 유전자의 선발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

발에도 유용하게 이용되고 있다.

고 찰

MITE는 벼 genome내에서 짧은 단편(100bp~500bp)으로 존재하는 transposable element로 반수체 계층 당 1,000~15,000개의 copy 수가 존재한다(Komori & Nitta, 2003). MITE에 관한 연구는 식물 유전자의 구조와 기능 그리고 진화 연구에 이용되고 있으며 PCR을 기초로 한 marker 개

본 연구에서는 MITE 중에서 Tourist-like인 *mPing* family를 이용한 AFLP 분석을 통하여 자포니카 벼 114 품종 간의 다양성과 근연관계를 분석하였고, 발생된 마커의 효용성을 알아보기 위해 연관분석을 실시하였다. 분석 결과 *Bfa*I+G와 *Bfa*I+C의 2개 primer로 공시된 전체 114개의 자포니카 벼 계통을 구분할 수 있었다. 증폭되는 전체 밴드수는 예를 들면, RAPD 분석시 일반적으로 primer의 G+C의 함량이 높을수록 많은 수를 얻을 수 있다고 알려져 있고,

AFLP 분석에서는 selective primer의 첨가되는 염기의 수가 1개 첨가될 때마다 전체 밴드 수는 4배로 감소하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 전체 밴드수와 다형성을 나타내는 밴드의 선발에 있어서 2개의 염기가 첨가된 selective primer가 1개가 첨가된 selective primer보다 많은 밴드수가 관찰된 것은 *BfaI*+A와 *BfaI*+G의 조합은 100bp~500bp 범위, *BfaI*+C의 조합은 100bp~700bp의 범위내에서 밴드를 관찰하였고 *BfaI*+AT와 *BfaI*+AC, 그리고 *BfaI*+TG의 primer의 경우 100~800bp의 범위내에 관찰하여 보다 적은 수의 밴드가 선발된 것도 하나의 요인으로 작용한 것으로 판단되었다. Kwon *et al.*(2003)은 무와 배추의 품종식별을 위한 primer 조합별 선발과정에서 E+3/M+3 primer의 조합이 E+2/M+3 primer 조합보다 다형성 밴드의 분포가 적당하고 밴드의 차이를 육안으로 인지할 수 있어 적합한 primer로 선발한 것처럼 primer에 따라서 염색되는 밴드의 강도와 단편의 수 및 분포 등이 다형성을 선발하는 요인으로 작용하는 것을 알 수 있었다.

자포니카 벼의 다양성과 근연관계 분석 연구로는 Kwon *et al.*(1999)이 microsatellite marker와 RAPD를 이용하여 품종간 분류 및 유전적 다양성을 분석하였으며, Ji *et al.*(1998)이 51개의 자포니카 벼에 대해 85개의 microsatellite 마커를 이용 분석한 결과 marker의 평균 PIC 값이 0.330이고, 51개 품종은 열대 자포니카와 온대 자포니카 두 그룹으로 나뉘어졌으며 온대 자포니카 그룹 내에 한국과 일본 품종들이 속해 있다고 보고하였다. Kwon *et al.*(2002)은 80개의 자포니카 벼에 대해 65개의 SSR 마커를 이용하여 분석한 결과 평균 PIC 값이 0.43이었고, 80개 벼를 9개의 그룹으로 분류하였다. Suh *et al.*(2004)은 자포니카 벼 94종을 81개의 SSR 마커를 이용하여 근연관계를 분석한 결과 6개의 그룹으로 분류하였으며, 그룹 I, III, IV에는 대부분 한국 품종이 속하였고, 그룹 II, V, 그리고 VI는 새추청벼, 상미벼, 만풍벼 그리고 Damageum을 제외한 일본 품종이 속했다고 보고하였다. 본 연구에서는 SSR 마커를 이용한 품종 유연관계 분석연구(Suh *et al.*, 2004)의 에서 이용된 94 계통을 포함하는 114개의 자포니카 벼를 공시하였다. MITE-AFLP 분석 결과, 크게 5개의 그룹으로 분류되었고, I 그룹은 3개의 소그룹으로 구분되었다. I-1그룹에는 한국 품종과 일본 품종이 각각 61개와 37개가 속하였고, I-2그룹 및 I-3그룹은 각각 한 개씩의 한국 품종을 제외하고는 모두 일본 품종이었다. II 그룹은 Norin 1호 등 일본 4품종과 삼평벼와 화안벼 등 한국 2품종이 속했다. 그룹 III, IV 및 V는 각각 1-2 품종이 속했는데, 이들은 분석 결과 다른 공시계통들에 비

해 유연관계가 먼 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 다른 연구자들이 보고한 결과들과는 부분적으로 상이하였는데, 예로 추정되는 동질유전자계통인 새추청벼보다 서안벼와 유사하였으며, Koshihikari와 Hitomebore는 서로 유사하다고 알려진 것과는 달리 각각 I군과 V군에 속하였다. 이는 사용된 마커 기법 등의 차이로 인해 증폭된 밴드의 차이에 의한 것으로 판단된다.

벼의 *mPing* transposon 분석에 관한 연구 결과로 Jiang *et al.*(2003)은 *mPing* transposon은 식물체와 세포배양에서 각각 다르게 나타날 수 있다고 했으며, *mPing*의 copy수는 자포니카 벼의 경우 60~80개로 다른 식물이나 동물의 경우 1,000개에 비하여 적다고 보고하였다(Kikuchi *et al.*, 2003). 또한 다형성 분석에서, Park *et al.*(2003)은 56개의 *Oryza* 종에 대해 *pangrangja* transposon을 이용한 AFLP 분석에서 7개의 primer 조합으로 250개의 polymorphic band를 얻었는데, 이는 본 연구에서 이용한 *mPing* transposon의 밴드 수보다 높았다. 이는 Park *et al.*(2003)의 연구에서 이종 및 동종계놈 야생종을 포함한 다양한 유전자원을 공시하였기 때문에 본 연구 결과보다 높은 다형성 비율을 얻은 것으로 해석할 수 있다.

벼 품종간의 다양성을 비교하고 유전자 지도를 작성한 연구로는 Komori and Nitta(2003)는 MITE의 다형성을 이용하여, 이를 PCR-based marker로 발달시켰으며, Cho *et al.*(1998)은 밀양 23호와 기호벼의 조합 164개 recombinant Inbred(RI) 계통을 이용 231개의 AFLP를 RFLP 유전자지도에 위치시켰다고 보고하였다. 그러나 MITE-AFLP 분석을 통해 개발된 마커를 유전자지도 작성에 이용한 보고는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 밀양 23호/합천앵미 3호 조합에서 육성된 RIL 집단을 이용하여 MITE-AFLP 마커의 연관 분석을 실시한 결과, 8개의 마커가 염색체 1번, 2번, 4번, 5번, 7번 그리고 9번에 위치하였다(Fig. 4). 이들은 특히 염색체에 골고루 분포하였으며, 염색체 7번의 M422는 *Rc*와는 1.9 cM의 거리로 연관되어 있었는데, 이 마커는 *Rc* 유전자의 선발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 다른 마커들도 검토가 필요하나 밀양 23호/합천앵미 3호 조합에서 검정된 주요 농업형질과 연관된 유전자(QTL)와 연관된 분자표지의 개발에도 유용하게 이용될 수 있을 것이라 기대된다(Oh *et al.*, 2004a, 2004b). 또한 다른 primer 조합과 다양한 MITE family를 이용하여 검정한다면 새로운 MITE-AFLP marker의 개발과 이용이 가능할 것이다.

MITEs를 이용한 연구는 식물체 계놈 분석을 위한 유용한 유전적인 기법으로 이용되고 있으며, 식물체의 분류학과

계통발생학에 적용함으로써 연구의 발달을 진전시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 이용된 *mPing* MITE 이외에도 이후 다른 MITE를 이용하여 비교, 분석하고 더욱 많은 primer조합을 이용한 분석으로 얻어진 다형성을 바탕으로 종간의 특이적인 마커의 개발이 가능할 것이며, 분석 결과에서 확인된 다형성의 패턴으로 primer를 선별하여 다른 육성 계통에도 적용할 수 있을 것이다.

적 요

1. 자포니카 벼 114 계통에 대해 다양성과 근연관계를 확인하고자 MITE 중에서 *mPing* family를 이용하여 MITE-TD 기법으로 분석하여 품종간의 다양성 정도를 산출한 결과 마커들의 PIC 값이 0.293~0.499 범위로 나타났다.

2. 두 개의 *mPing* primer와 selective primer인 *Bfa*I+G와 *Bfa*I+C의 조합을 이용하였을 때, 공시계통인 114개의 자포니카 벼 전체를 구분할 수 있었다.

3. NTSYS-pc를 이용한 근연관계 분석결과, 유사계수의 범위는 0.802에서 부터 0.081까지였고, 자포니카 벼 114 품종은 크게 5개의 그룹으로 분류되었다.

4. 8개의 MITE-AFLP marker 연관분석을 밀양 23호/합천앵미 3호 조합 RIL을 이용하여 실시한 결과, 이들은 염색체 1번, 2번, 4번, 5번, 7번 그리고 9번에 각각 위치함을 확인하였다.

사 사

이 연구는 작물유전체 과제(CG3112) 연구비로 수행되었음.

인용문헌

- Anderson, J. A., G. A. Churchill, J. E. Autrigue, and S. D. Tanksley. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage map. *Crop Sci.* 35 : 1439-1445.
- Bureau, T. E. and S. R. Wessler. 1992. Tourist, a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell.* 4 : 1283-1294.
- Bureau, T. E. and S. R. Wessler. 1994a. Mobile inverted-repeat elements of the Tourist family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 91 : 1411-1415.
- Bureau, T. E. and S. R. Wessler. 1994b. Stowaway, a new family of inverted repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell.* 6 : 907-916.
- Bureau, T. E., P. C. Ronald, and S. R. Wessler. 1996. A computer based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 : 8524-8529.
- Casa, A. M., S. E. Mitchell, O. S. Smith, J. C. Register III, S. R. Wessler, and S. Kresovich. 2000. Evaluation of Hbr (MITE) markers for assessment of genetic relationships among maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 104 : 104-110.
- Causse, M. A., T. M. Fulton, Y. G. Cho, S. N. Ahn, J. Chunwongse, K. Wu, J. Xiao, Z. Yu, P. C. Ronald, S. E. Harrington, G. Second, S. R. McCouch, S. D. Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138 : 1251- 1274.
- Cho, Y. G., S. R. McCouch, M. Kuiper, M. R. Kang, J. Pot, J. T. M. Groenen, and M. Y. Eun. 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.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19 : 11-15.
- Finnegan, D. J. 1992. Transposable elements *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2 : 861-867.
- Flavell, A. J., S. R. Pearce, and A. Kumar. 1994. Plant transposable elements and the genome. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 4 : 838-844.
- Ji, H. S., H. J. Koh, S. U. Park, and S. R. McCouch. 1998. Varietal Identification in Japonica Rice Using Microsatellite DNA markers. *Korean J. Breed.* 30(4) : 350-360.
- Jiang, N., Z. Bao, X. Zhang, H. Hirochika, S. R. Eddy, S. R. McCouch, and S. R. Wessler. 2003. An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421(6919) : 163-167.
- Kikuchi, K., K. Terauchi, W. Masamitsu, and H. Y. Hirano. 2003. The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* 421(6919) : 167-169.
- Komori, T., and N. Nitta. 2003. High frequency of sequence polymorphism in rice MITEs and application to efficient development of PCR-based markers. *Breeding Science* 53 : 85-92.
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, H. C. Choi, and H. P. Moon. 1999. Evaluation of genetic relationship and fingerprinting of rice varieties using microsatellite and RAPD markers. *Korean J. Crop Sci.* 44(2) : 112-116.
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, H. C. Hong, H. K. Hwang, and H. C. Choi. 2002. SSR Diversity in Japonica RICE Cultivars and its Association to Several Traits. *Korean J. Breed.* 34(1) : 57-63.
- Kwon, Y. S., J. Y. Moon, Y. S. Kwon, D. Y. Park, W. M. Yoon, I. H. Song, and S. I. Yi. 2003. AFLP Analysis for Cultivar Discrimination in Radish and Chinese Cabbage. *Korean J. Breed.* 35(5) : 319-328.

- Le, O. H., S. Wright, Z. Yu, and T. Butrau. 2000. Transposon diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 97 : 7376-7381.
- Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 : 5269-5273.
- Oh, C. S., Y. H. Choi, S. J. Lee, D. B. Yoon, H. P. Moon, and S. N. Ahn. 2004a. Mapping of Quantitative Trait Loci for Cold Tolerance in Weedy Rice. *Breed. Sci.* 54 : 373-380.
- Oh, C. S., S. J. Lee, D. B. Yoon, J. P. Suh, and S. N. Ahn. 2004b. QTLs for Domestication-related and Agronomic Traits in Temperate Japonica Weedy Rice. *Korea J. Breed.* 36(1) : 20-30.
- Park, K. C., C. S. Jeong, M. T. Song, and N. S. Kim. 2003a. A New MITE Family, Pangreanjain Gramineae Species. *Mol. Cells.* 15(3) : 373-380.
- Park, K. C., J. K. Lee, N. H. Kim, Y. B. Shin, H. J. Lee, and N. S. Kim. 2003b. Genetic variation in *Oryza* species detected by MITE-AFLP. *Genes Genet. Syst.* 78 : 235-243.
- Park, K. C., N. H. Kim, Y. S. Cho, K. H. Kang, J. K. Lee, and N. S. Kim. 2003. Genetic variation of AA genome *Oryza* species measured by MITE-AFLP. *Theor. Appl. Genet.* 107 : 203-209.
- Rohlf, F. J. 1992. NTSYS-pc : numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8 Exeter Software, New York.
- Suh, J. P., Y. H. Choi, K. J. Kim, Y. C. Cho, S. J. Kwon, Y. P. Jeong, J. U. Jeung, I. S. Choi, H. C. Choi, and H. G. Hwang. 2004. Genetic Diversity QTLs for Grain Quality in Japonica Rice. *Korean J. Breed.* 36(1) : 31-37.
- Tarchini R., P. Biddle, R. Wineland, S. Tingey, and A. Rafalski. 2000. The complete sequence of 349kb of DAN around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. *Plant Cell.* 12 : 381-391.
- Turcotte, K., S. Srinivasan, and T. Bureau, 2001. Survey of transposable elements from rice genomics sequences. *Plant J.* 25(2) : 169-179.
- Vos, P., R. Rogers, M. Bleeker, M. Reijans, van de T. Lee, M. Hornes, B. A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 : 4407-4414.
- Wessler, S. R., T. E. Bureau, and S. E. White. 1995. LTR retrotransposons and MITE: important players in the evolution of plant genomes. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 5 : 814-821.
- Wessler, S. R., A. Nagel, and A. Casa. 2001. Miniature inverted repeat transposable elements help to create diversity in maize and rice. *Rice Genetics IV. International Rice Research Institute, Philippines.* pp. 107-116.