CNU Journal of Agricultural Science Vol. 38, No. 2, pp. 199-204, June 2011

벼 일품벼/모로베레칸 조합의 이입계통을 이용한 내건성 유전자 탐지

강주원[1] · 구홍광[2] · 양바오로[1] · 안상낙[1]*

[1]충남대학교 농학과, [2]Agricultural Dept. Agricultural College of Yanbian Univ., Longjing, Jilin 133400, China

Mapping QTLs for drought tolerance using an introgression line population from a cross between Ilpumbyeo and Moroberekan in rice

Ju-Won Kang[1], Hong-Guang Ju[2], Paul Yang[1], Sang-Nag Ahn[1]*

[1]Department of Agronomy, Chungnam national University, Daejeon 305-764, Korea
[2]Agricultural Dept., Agricultural College of Yanbian Univ., Longjing, Jilin 133400, China

Received on 15 April 2011, revised on 4 May 2011, accepted on 20 June 2011

Abstract : This study was conducted to map quantitative trait loci (QTLs) related to drought stress tolerance. An introgression line population derived from a cross, "Ilpum" / "Moroberekan" was used in this study. F_1 plants were backcrossed three times to Ilpum to produce BC_3F_1 plants. These plants were advanced by selfing for four generation and a total of 117 BC_3F_5 introgression lines were developed. These lines were evaluated for percent seed set and spikelets per panicle under the control (field) and drought condition. To identify QTLs related to drought tolerance, 134 SSR markers showing polymorphisms between the parents were genotyped for the 117 BC_3F_5 lines. A total of 6 QTLs associated with drought stress were detected on chromosomes 1, 3, 4, 7 and 10. These include two QTLs for phenotypic acceptability, two QTLs for percent seed set (R^2 = 19.0 - 20.9%), and two QTLs for spikelets per panicle (R^2 = 22.3 - 23.10%). The Moroberekan alleles at three loci contributed the positive effect for drought tolerance. The SSR markers linked to drought stress tolerance can not only facilitate the selection of valuable genes from Moroberekan, but also allow identification of lines with drought tolerance.

Key words : Drought tolerance, QTLs, Rice, Introgression line

I. 서 론

벼는 전 세계적으로 다양한 환경에서 재배되어 지고 있으며 여러 가지 불량한 환경조건에서 스트레스를 받는다. 아시아에서 재배되는 대부분의 벼 품종은 염해, 건조해, 저온 스트레스와 같은 불량 환경스트레스에 대하여 감수성인데, 불량 환경 특히 한발에 의해 벼의 생육이 지연되며 수량이 감소되는데 인도에서만 매년 1.2MT 가량 감소시킨다(Widawsky와 O'Toole 1996). 현재 재배되어지고 있는 재배벼의 유전적 다양성은 매우 협소하고, 여러 가지 병해충이나 각종 불량한 환경에 대한 내성 등 유용한 특성이 부족하다.

재배벼의 유전적 변이를 확대하고, 내재해성을 증진시키기 위해서는 지금까지 육종 모본으로 관심을 받지 못했던 야생 및 반야생 유전자원의 활용이 필요하다. 또한 계통육종 등 전통육종법으로는 내재해성 품종의 육성이 매우 어려운데 이는 내재해성 기작의 복잡성, 낮은 선발 효율, 내재해성 유전자의 유전 양식에 대한 불충분한 지식 등에 기인한다.

내건성과 내염성 품종 육성의 경우가 대표적인데 Pokkali, Nona Bokra, 모로베레칸 등이 대표적인 내건성 혹은 내염성 품종이다. 그러나 이들 품종에서 내성 인자를 도입하기 위해 자포니카 품종과 교잡할 경우, 그 후대 계통의 작물학적 특성이 열악할 뿐만 아니라, 2~3회 여교잡할 경우 선발 과정에서 목표 형질이 소실되는 등 많은 문제점이 있다. 또한 계통육종법을 이용하여 내건성 및 내염성 품종을 육성하기 위해서는 오랜 기간과 넓은 포장, 많은 인력이 필요하다(Heu와 Koh, 1991; Price 등, 2002; Zhang 등, 2006;

***Corresponding author:** Tel: +82-42-821-5728
E-mail address: ahnsn@cnu.ac.kr

Thanh 등, 2011). 내건성 및 내염성 품종의 육성을 위해서는 형질의 효율적인 선발 방법의 개발, 다양한 유전자원 탐색 및 유전 분석이 선행이 되어야 한다. 이를 위해서는 유전자원의 평가, 특성 검정 체계와 방법을 확립, 내건성 형질과 밀접하게 연관된 분자표지마커 및 후보 유전자를 선발하여 이용하는 분자 육종 기술 개발이 절실히 필요하다.

벼 분자표지와 유전자지도의 개발로 인하여 양적형질에 관여하는 유전자의 유전양식의 조사 및 목표 유전자 동정이 가능해지고, QTL(Quantantative trait loci)의 분석이 용이해졌으며(Tanksley, 1993; Yano와 Sasaki, 1997), 이미 출수기, 수량구성 요소 등의 양적유전자에 의하여 발현이 되는 주요 농업적인 형질들의 연구는 활발히 진행이 되고 있다. 하지만 내건성과 같은 내재해성 스트레스에 관한 연구 방법은 한발 처리 후의 plant survival score, plant vigour 등의 생리적인 조사에 중점을 두고 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 내건성 유전 분석을 통해 유전자(QTL)들의 유전 양식을 해석하고 개개의 유전자들의 영향력 및 연관 분자표지를 개발하고자 실시하였다. 개발된 QTL 분자표지를 이용하여 검정에 많은 노력과 시간이 소요되는 내건성 관여 유전자들의 선발 효율을 증진시킬 수 있을 뿐 아니라, MAS(marker-assisted selection)를 이용함으로써 우수한 품종의 육성 기간을 단축시킬 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 육성 및 특성 검정

양질이지만 도열병에 이병성인 일품벼를 반복친, 모로베레칸을 1회친으로 사용하였다. 일품벼/모로베레칸 조합의 F_1 식물체에 일품벼를 교배하여 10개의 BC1F1 종자를 확보하였다. 일품벼와 2회 여교배하여 2,000 여개의 BC_3F_1 종자를 확보하였다. 이들을 포장에 전개하여 일품벼와 유사한 표현형을 보이는 279 개체를 선발하여 BC_3F_2 계통을 육성하였다. 이들 계통을 2회 자식과 선발을 거쳐 BC_3F_4 계통을 육성하였으며, 이들 계통들의 유전자형을 SSR 표지인자로 검정하였다. 이들 계통 중에서 일품벼의 유전적 배경에 모로베레칸의 서로 다른 염색체단편을 2-7개 보유하는 117개 BC_3F_5 계통을 선발하였다(Ju 등, 2008). 이입계통과 양친의 내한발성 검정을 온실의 베드에서 실시하였다. 계통별 10개체를 완전임의배치 2반복으로 배치하였고 열과 식물체 간의 거리는 10 × 8 cm 간격으로 재식하였다. 습도계로 토양의 수분을 측정하여 베드의 수분 함량이 균등하게 유지되도록 하였다. 6월 15일에 40일 묘를 이앙하였으며, 이앙 후 20일에 관수를 중단하고 30일 간 유지하였다. 중단 후 약 20일 경에 일부 식물체 잎이 말림(rolling) 현상을 보이기 시작하였다. 약 30일 경에 잎 말림 등에서 계통 간 큰 변이가 관찰되었으며 이 때 내건성 정도인 phenotypic acceptability(1 – 9 등급, 1: 양호, 9: 고사)를 조사하였다. 35일 후에 관수를 재개하였으며, 계통별 출수기, 임실율, 수당립수를 조사하였다. 대조구는 충남대 포장에서 실시하여 출수기를 조사하였다. 임실율과 수당립수는 반복당 3개체로부터 개체별 가장 큰 2 이삭을 채취하여 조사하였다.

2. DNA 추출 및 이입계통의 유전자형 검정

DNA 추출은 파종 후 30일에 BC_3F_5 계통별 20~30 개체의 어린 잎을 채취하여 Causse 등(1994)의 방법에 의해 추출하였다. SSR 분석에 사용된 primer들의 PCR 증폭은 각 primers 별로 annealing 온도는 다르지만 94℃에서 30초, 55~65℃에서 30초, 72℃에서 1분의 cycle을 35회 반복하여 4%의 denaturing polyacrylamide gel 로 전기영동한 후 Panaud 등(1996)의 방법으로 silver staining 하였다.

3. QTL 분석

분석된 SSR 마커의 위치와 마커 간 거리는 기 보고된 유전자지도에 의거하여 표시하였다(Temnykh 등, 2000, 2001; McCouch 등, 2002). QTL 분석은 Q-Gene 프로그램(Nelson, 1997)을 이용하여 분석하였다. 1개의 유전자좌에서 일품벼 동형접합체 계통과 이형접합체 계통 간의 표현형 차이가 1개의 SSR 유전자좌에서 0.1% 수준에서 유의하거나, 인접한 두 개의 마커에서 동시에 1% 수준에서 유의하거나 혹은 세 개의 인접한 마커가 5% 수준에서 유의할 때 QTL이 존재한다고 결정하였다.

4. 마커 개발 및 분석

내건성유전자 DREB 1의 유전자 염기서열 정보를 이용

Table 1. Sequences of primer based on the drought response gene (Sequence information was provided by Dr. K. McNally (IRRI).

Gene	Function	primer designation	Sequence	Amplicon
DREB1	Drought responsive element binding protein 1	DREB 1upL	acgtcaaaacccaaccccaaccat	969 bp
		DREB 1upR	gattgaatcagggccatcgcttttc	

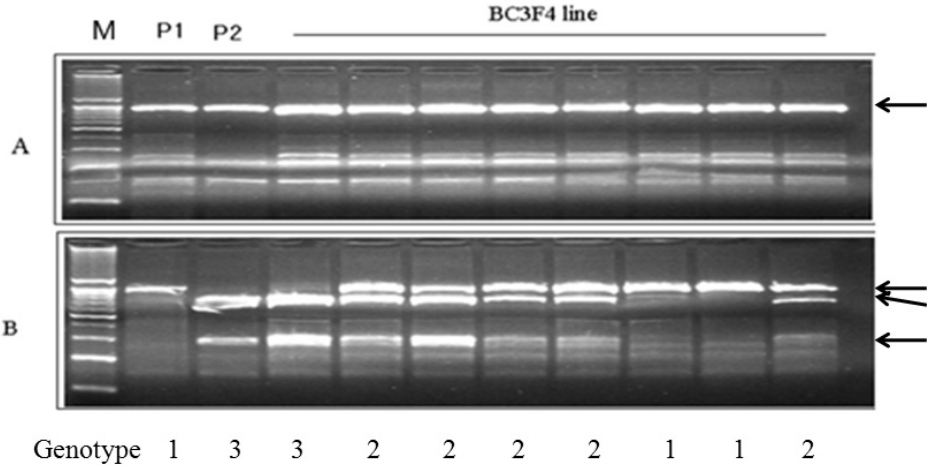

Fig. 1. Detection of polymorphisms between the parents by digesting the amplified products with a restriction enzyme (P1: Ilpum, P2: Moroberekan). A: DNA of the parents and BC_3F_4 lines were amplified and no polymorphism was detected. An arrow indicates the 969-bp band. B: Amplified DNA was digested with an enzyme, *Ava I* and the parents showed polymorphisms indicating the presence of SNP between them (Note: The P2 band was cleaved into two bands. The two lower bands indicate bands cleaved by the enzyme). M: Size marker DNA. Genotype; 1: P1 homozygote, 2: heterozygote, 3: P2 homozygote.

하여 프라이머를 제작하였다(Table 1; Liu 등, 1998; Kim 등, 2007). 이 프라이머를 이용, 양친의 DREB 1 유전자를 증폭하고, 증폭된 밴드에 제한효소를 처리하여 양친간 다양성을 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 내건성 유전자 이용 기능성 마커 개발

내건성 유전자 DREB 1을 이용하여 제작된 프라이머를 이용하여 양친(일품벼, 모로베레칸)의 유전자를 증폭한 결과 두 품종에서 약 969-bp에 해당하는 밴드가 증폭되었는데, 이 밴드를 제한효소(*Ava I*)로 처리한 결과 모로베레칸의 밴드만 절단되어 두 개의 작은 밴드들이 발생되었다(Fig. 1). 이 결과는 일품벼와 모로베레칸 간에 SNP가 존재한다는 것을 의미하며, 이들 간의 교잡후대인 BC_3F_4 계통에서도 동일한 결과를 얻었다. 이 SNP가 이들 조합의 후대에서 내건성 형질과 연관이 있는지는 검정이 필요하다.

2. 내건성 관련 형질 검정

이입계통과 양친의 내건성 형질의 분포도를 Fig. 2에 제시하였다. 임실율을 제외한 3형질 phenotypic acceptability, 출수까지 일수, 수당립수는 정규분포를 보였다. 거의 모든 계통이 반복친인 일품벼의 표현형과 유사한 값을 보였는데 이는 반복적인 여교배를 통해 계통들의 유전자형이 일품벼로 치환되었기 때문으로 해석된다. 임실율은 한발 조건에서 모로베레칸이 일품벼보다 높았으며, 일부 계통이 일품벼보다 높은 초월변이를 보였다. 출수기는 일품벼가 포장보다 온실조건에서 빨랐으나 모로베레칸은 두 조건에서 출수까지의 일수가 약 134일로 유사하였다. 일품벼의 경우 온실조건에서 빨리 출수한 것은 중만생종으로 온실의 밀식조건에 의한 효과로 판단된다. Phenotypic acceptability는 모로베레칸이 5, 일품벼가 7로 조사되었으며 모로베레칸보다 내건성 정도가 양호한 계통이 다수 관찰되었다.

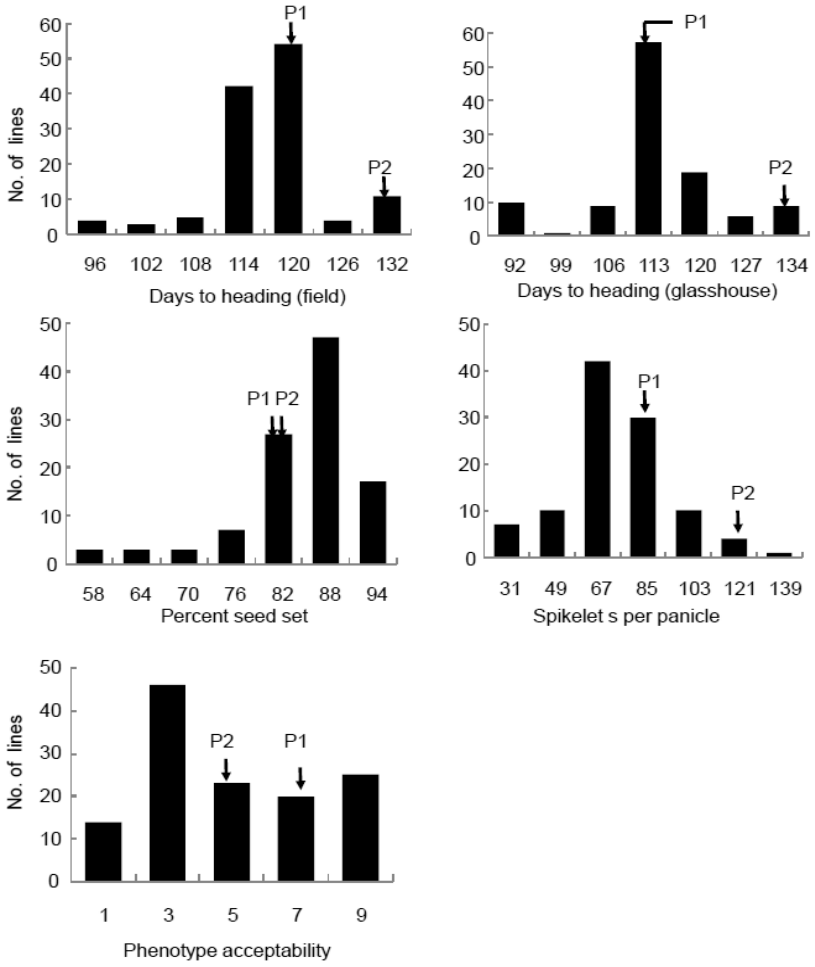

Fig. 2. Frequency distribution of four traits in the introgression lines. P1 and P2 denote Ilpumbyeo and Moroberekan, respectively. Percent seed set, spikelets per panicle and phenotypic acceptability were evaluated in the glasshouse.

Table 2. QTL detected for three traits based on single-point analysis in the BC_3F_5 population.

Trait	QTL	SSR marker	Chr.	R^2 (%)	Mean*	
					I/I	M/M
Phenotypic acceptability	*qph1*	RM140 - RM5	1	10.5	6.8	4.2
	qph7	RM234 - RM5426	7	12.0	6.3	4.1
Percent seed set	*qpss3*	RM60 - RM545	3	20.9	85.2	78.3
	qpss4	RM273 - RM252	4	19.0	85.5	80.6
Spikelets per panicle	*qspp4*	RM255 - RM317	4	23.1	66.7	83.2
	qspp10	RM333 - RM6673	10	22.3	74.8	29.3

*I/I: Ilpumbyeo homozygote, M/M: Moroberekan homozygote. R^2 : The proportion of the phenotypic variance explained by the QTL.

3. 내건성 형질 QTL 분석

온실 조건에서 조사된 내건성 형질에 대한 QTL 분석을 실시한 결과, 일품벼/모로베레칸 조합에서 내건성 정도를 나타내는 phenotypic acceptability(PH), 임실율과 수당립수 QTL이 각각 2개씩 탐지되었다(Table 2, Fig. 3). 이들 중 3개 양적형질유전자좌에서는 일품벼의 대립유전자가 임실율 및 수당립수를 증가시키는 방향으로 작용하였으며, 1번과 7번 염색체의 PH와 관련된 QTL과 4번 염색체의 수당립수와 관련된 QTL *qspp4*에서는 모로베레칸의 대립

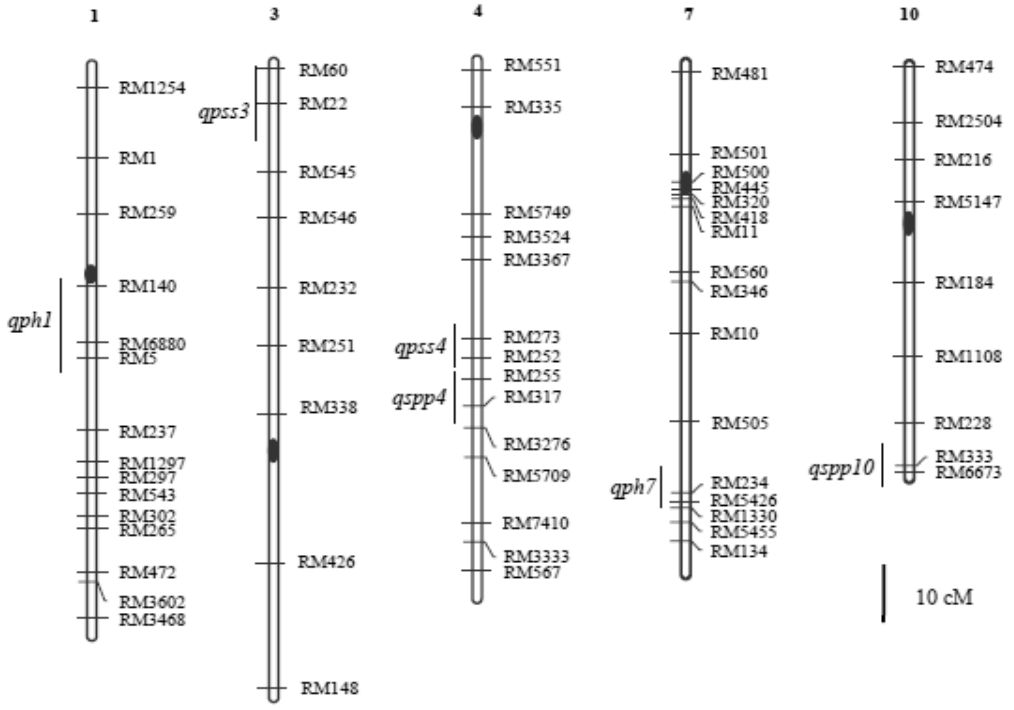

Fig. 3. The position of the QTLs detected in the IL population from a cross between Ilpumbyeo and Moroberekan.

유전자가 각각 PH와 수당립수를 개선시키는 방향으로 작용하였다.

2번 염색체의 단완에서 탐지된 임실율 QTL *qpss4*는 그 위치가 Yue 등(2005)가 탐지한 drought respond index와 canopy temperature에 대한 QTL과 비슷한 지역이었다. 수당립수 QTL인 *qspp10*은 그 위치가 Yue 등(2005)가 탐지한 RY(relative yield) QTL과 그 위치가 유사하였다. 또한 1번 염색체에서 탐지된 *qph1*는 Thanh 등(2011)이 종간 잡종에서 유래한 재조합계통을 이용하여 탐지한 내건성 QTL(leaf rolling)과 위치가 유사하였고, Price et al. (2002)가 탐지한 leaf drying QTL과 위치가 유사하였다.

비록 본 연구에서 탐지된 QTL과 기존의 보고들에서 탐지된 QTL의 위치가 유사하지만 양친과 한발 처리조건이 다르기 때문에 이들 QTL들이 동일한 유전자인지 혹은 연관되어 있는지에 대해서는 알 수 없다. 이들 유전자들의 관계를 알기 위해서는 다양한 한발 조건에서 집단을 처리하는 한편 고밀도지도 작성을 통한 대립관계 규명 등의 연구가 필요하다.

IV. 결 론

1. 내건성 유전자 DREB 1의 프라이머로 증폭된 일품벼와 모로베레칸의 DNA 밴드를 제한효소, *Ava I*로 절단한 결과, 양친 간에 다형성이 탐지되었다.
2. 내건성 분석 결과, 일품벼/모로베레칸 조합에서 3개 형질별 각각 2개의 QTL이 탐지되었으며, 이들 중 4번 염색체의 수당립수와 관련된 QTL *qspp4*와 phenotypic acceptability 데 관여하는 유전자좌에서 모로베레칸의 대립유전자가 형질을 개선시키는 방향으로 작용하였다.
3. 이들 내건성 관련 QTL은 내건성계통 선발에 이용할 수 있을 것이다.

감사의 글

This study was supported by grants to S.N.A. from the BioGreen 21 project (Code No. 20070301034034) of the RDA.

참 고 문 헌

Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE et al. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138: 1251-1274.

Heu M, Koh HJ. 1991. Newly bred salt tolerant line in rice. Kor. J. Breed. 23: 59-63.

Ju HG, Kim DM, Kang JW, Kim MK, Kim YG, Ahn SN. 2008. Mapping QTLs for agronomic traits using an introgression line population from a cross between Ilpumbyeo and Moro-berekan in rice. Korean J. Breed Sci. 40(4): 414-421.

Kim HK, Lee SC, Choi HS, An KS, An GH, Kim SR. 2007. Generation of transgenic rice plants expressing OsDREB1 genes under Ubiquitin or OsPOX1 Promoter. Proc. Annual Symp. Korean Breed. Soc. 39(Supl. 1): 189.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1998. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell 10: 1391-1406.

Nelson JC. 1997. QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding, Molecular Breeding 3: 239-245.

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 Research 9: 199-207.

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. Genet. 252: 597-607.

Price AH, Townend J, Jones MP, Audebert A, Courtois B. 2002. Mapping QTLs associated with drought avoidance in uplandrice grown in the Philippines and West Africa. Plant Mol. Biol. 48: 683-695.

Tanksley SD. 1993. Mapping polygemes. Ann. Rec. Genet. 27: 205-233.

Temnykh S, Cartinhour S, Park W, Ayres N, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, McCouch SR. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100: 697-712.

Temnykh S, De Clerck G, Lukashova A, Lipovitch L, Cartinhour S, McCouch SR. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res. 11: 1441-1452.

Thanh PT, Phan PDT, Mori N, Ishikawa R, Ishii T. 2011. Development of backcross recombinant inbred lines between *Oryza sativa* Nipponbare and *O. rufipogon* and QTL detection on drought tolerance. Breeding Sci. 61: 76-79.

Widawsky DA, O'Toole JC. 1996. Prioritizing the rice research agenda for Eastern India. In: R. Evenson, R. Herdt and M. Hossain (eds.) *Rice Research in Asia: Progress and Priorities*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 109-129.

Yano M, Sasaki T. 1997. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. Plant Mol. Biol. 35: 145-153.

Yue B, Xiong L, Xue W, Xing Y, Luo L, Xu C. 2005. Genetic analysis for drought resistance of rice at reproductive stage in field with different types of soil. Theor. Appl. Genet. 111: 1127-1136.

Zhang X, Zhou A, Fu Y, Su Z, Wang X, Sun C. 2006. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice (*O. rufipogon* Griff.). Plant. Mol. Biol. 62: 247-259.