

Microsatellite를 이용한 자포니카 벼의 다양성 분석

나소¹ · 상세티¹ · 양바로¹ · 이현숙¹ · 안상낙^{1*}

¹충남대학교 농학과

Diversity analysis of japonica rice using microsatellite markers

Luo Xiao¹, Sangshetty Balkunde¹, PaulYang¹, Hyun-Sook Lee¹, Sang-Nag Ahn^{1*}

¹Department of Agronomy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 6 February 2012, revised on 17 February 2012, accepted on 23 March 2012

Abstract : The study was conducted to evaluate the genetic similarity among commercial japonica rice varieties in Korea and China and to develop markers to differentiate between japonica cultivars developed in Korea and China. The genetic similarity and cluster of 38 accessions were analyzed using 47 SSR (simple sequence repeat) markers. The number of alleles by 47 SSR markers ranged from 2 to 9 with an average of 3.6. A total of 169 alleles were detected among these tested rice varieties. The PIC value varied from 0.05 to 0.79 with an average of 0.44. The Chinese japonica cultivars could be differentiated from the japonica cultivars in Korea by combining 2 SSR markers, RM223 and RM266. Cluster analysis showed that 38 tested varieties could be distinguished into japonica and indica based on the genetic distance.

Key words : Rice, SSR marker, Genetic distance, Cluster analysis

I. 서론

쌀은 우리나라에서 단일 작목으로 최대 면적을 차지하며 국내 생산으로 거의 자급이 가능한 주곡이다. 지속적인 소비 감소와 수요량을 초과하는 쌀 생산으로 인한 가격 하락 등은 재배면적의 감소를 가져왔고 최근 10년 동안 재배면적의 감소는 그 폭이 1.8%로 이전에 비해 가장 컸다(Rural Development Administration 2011). 1993년 UR 농업협상을 통해 우리나라는 쌀의 관세화를 유예하는 대신 최소 시장접근 물량을 허용하였고, 2004년 도하개발 아젠다 농업협상에서 관세화 유예를 10년간(2005-2014) 추가 연장하는데 합의하였다(Rural Development Administration 2011). 관세화 유예의 대가로 쌀을 수입하고 있으며 수입된 쌀은 가공용과 밥쌀용으로 판매하고 있다. 수입쌀은 중국 및 미국산 중단립종의 수입이 증가하고 있으며 국제곡물가격 상승으로 수입가격도 상승하고 있다. 특히 밥쌀용으로 수입되는 중국 쌀은 주로 단립종으로 동북3성(흑룡강성,

요령성, 길림성)에서 재배되고 수확시기는 8 - 10월 경이며 외관상 국내산과 유사하기 때문에 판별이 어려운 실정이다(Rural Development Administration, 2011).

동·식물의 염색체에 고르게 분포하고 있는 microsatellite는 이들과 인접한 염기서열이 매우 보존적이며 생성되는 allele의 수가 많아 품종 간 높은 다형성을 보이기 때문에 계통 연구에 중요하게 이용되고 있다. Microsatellite 유전자좌의 다형성은 단순 반복 염기서열의 반복 횟수의 차이로 관찰되므로 이를 SSR 마커라고도 부르며, DNA 복제시 unequal crossing over 등으로 생겨난다고 보고되고 있다(Richards와 Sutherland, 1994). SSR 마커는 RFLP 보다 품종 간에 높은 다형화 현상을 보이며(Panaud 등, 1996) 근연간의 품종 차이를 검정하는데 RAPD 보다 효율적이고(Kwon 등, 1999a) 벼에서는 마커 간 평균거리가 3-4cM이면서 전체 계통을 대표하는 SSR 마커가 개발되어 있다(McCouch 등, 2002).

자포니카 벼의 다양성과 근연관계 분석 연구로는 Kwon 등(1999a)이 SSR 마커와 RAPD 마커를 이용하여 품종간 분류 및 유전적 다양성을 분석하였다. Ji 등(1998)이 51개의

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

자포니카 벼에 대해 85개의 SSR 마커를 이용하였고 Kwon 등(2002)은 80개의 자포니카 벼에 대해 65개의 SSR 마커를 이용하여 80개 품종을 9개의 그룹으로 분류하였다. Suh 등(2004)은 자포니카 벼 94 품종을 81개의 SSR 마커를 이용하여 근연관계를 분석한 결과 6개의 그룹으로 분류하였다. 그러나 중국 동북3성에서 육성된 자포니카 벼 품종의 다양성과 국내 품종과의 판별을 시도한 연구는 별로 없는 실정이다.

본 연구에서는 microsatellite를 이용하여 자포니카 벼의 다양성과 근연관계를 밝히고, 국내 품종과 중국 품종을 판별할 수 있는 마커를 개발하기 위해 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시계통

본 실험에서 국내 육성종 16개, IRRI 육성종 3개 그리고 중국품종 19개 등 전체 38개 계통을 공시하였다(Table 1). 이들 계통들은 국내 및 중국에서 육성된 양질미 및 특수미

계통들이다.

2. DNA 추출

Genomic DNA는 Causse et al.(1994)의 방법을 수정하였다. 분얼기에 잎을 액체질소로 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°C에서 1시간 방치하였다. 이후, 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25: 24: 1)을 첨가한 후, 13,000rpm으로 5 분간 원심분리하였다. 상등액을 취한 후 상등액과 동량의 isopropanol을 넣어 DNA를 침전시켜 시료로 사용하였으며, 260nm와 280nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 순도 확인 및 정량을 실시하였다.

3. SSR 분석

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°C에

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

No.	Accession	Origin	Group*	No.	Accession	Origin	Group*
1	Hwaseongbyeo	Korea	II-1	20	Jisheng 202	China(Jilin)	II-2
2	Ilpumbyeo	Korea	II-1	21	Jijing 81	China(Jilin)	II-2
3	Joonambyeo	Korea	II-1	22	Liaojing 294	China(Liaoning)	II-1
4	Hopumbyeo	Korea	II-1	23	Yanjing 25	China(Jilin)	II-2
5	Hwayeongbyeo	Korea	II-1	24	Yanjing 294	China(Jilin)	II-3
6	Samgwangbyeo	Korea	II-1	25	Jijing 88	China(Jilin)	II-2
7	Boramchan	Korea	II-1	26	Tong 88-7	China(Jilin)	II-3
8	Hanareum	Korea	I	27	Songjing 10	China(Jilin)	II-2
9	Deurecham	Korea	II-1	28	Liaoyan 214	China(Liaoning)	II-1
10	Milyang23	Korea	I	29	Songjing 6	China(Heilongjiang)	II-2
11	Taebaegbyeo	Korea	I	30	Liaojing 8	China(Liaoning)	II-2
12	Dasanbyeo	Korea	I	31	Kongyu 131	China(Heilongjiang)	II-2
13	Andabyeo	Korea	I	32	Kenjiandao 8	China(Heilongjiang)	II-2
14	Dasan2	Korea	I	33	Dongnong 409	China(Heilongjiang)	II-3
15	Segyejinmee	Korea	I	34	Longdao 8	China(Heilongjiang)	II-2
16	Areum	Korea	I	35	Longjing 21	China(Heilongjiang)	II-5
17	IR66	IRRI	I	36	Wuyoudao 4	China(Heilongjiang)	II-6
18	IR64	IRRI	I	37	Dongnong 423	China(Heilongjiang)	II-4
19	IR72	IRRI	I	38	Dongnong 7007	China(Heilongjiang)	II-4

* Refer to Fig. 2 for group.

서 30초, 72°C에서 1분을 29회 반응시켰다. 최종 PCR 산물을 95°C에서 5분간 가열하여 변형시킨 후, 6% polyacrylamide gel(acrylamide : bisacrylamide(19:1), 7.5M Urea, 1×TBE (0.89M Tris-HCl, pH8.3, 0.89M boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0)에서 전기영동하였다. 이를 silver staining kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 염색한 후 밴드를 분석하였다. Silver staining는 Panaud 등(1996)의 방법으로 실시하였다.

4. 자료 분석

벼의 근연관계를 분석하기 위하여 Nei와 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 각각 두 계통 X와 Y에서 발생된 총 밴드 수이다.

품종간 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 산출은 다음의 식을 이용하였다.

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

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

III. 결과 및 고찰

1. 벼 품종의 다양성 분석

기존의 연구에서 벼 품종의 다양성 분석에 이용된 47개의 microsatellite(Table 2)를 38 품종의 genomic DNA 증폭에 이용하였다(Fig. 1). 전체 169개의 allele이 탐지되었고 마커별로 allele이 2-9개 분포를 보였으며, 평균 allele 수는 3.6개였다. RM266는 9개의 allele을, RM234, 12LESSR-1는 6개, RM180, RM169 등 11개 마커는 2개의 allele을 발생시켰다.

마커 별 PIC value는 0.05 - 0.79의 분포를 보였고 평균 0.44이었다. Ji 등(1998)이 51개의 자포니카 벼에 대해 85개의 SSR 마커를 이용하여 분석한 결과 마커의 평균 PIC 값이 0.330이라고 보고하였고, Kwon 등(2002)은 80개의 자포니카 벼에 대해 65개의 SSR 마커를 이용하여 분석한 결과 평균 PIC 값이 0.43이라고 보고하였다. 본 연구에서의 PIC 평균값은 인디카 품종을 포함하여 0.44였는데, 인디카 품종을 제외할 경우 평균 PIC 값이 0.221로서 본 연구에 이용된 자포니카 품종의 유전적 다양성이 매우 낮은 것으로 판단된다. 38개 품종에서 가장 많은 allele (9개)과 높은 PIC 값 (0.79)을 갖는 RM266는 품종 판별에 유용한 마커로 이용될 수 있을 것이다.

2. 벼 품종간 유연 관계

38개 품종에 대해 발생된 전체 169개의 밴드를 이용, 밴드 유무를 1과 0으로 코드화한 후 NTSYS-pc(version

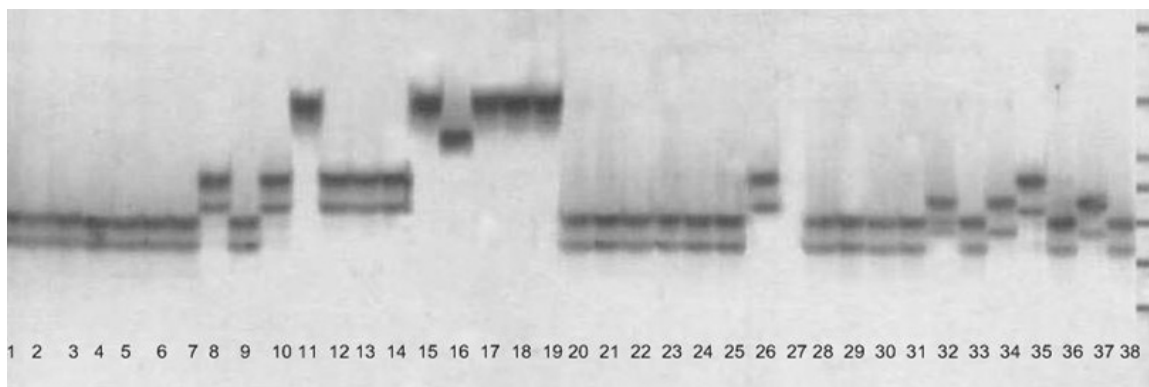


Fig. 1. Polymorphic pattern of an SSR marker, RM270. Refer to the Table 1 for the lane designation. The DNA ladder is shown on the right.

Table 2. Allele number and PIC value of microsatellite markers in 38 accessions.

No.	Marker	Chr.	Allele no.	PIC	No.	Marker	Chr.	Allele no.	PIC
1	RM84	1	3	0.4	25	RM274	5	2	0.13
2	RM240	2	3	0.3	26	RM265	1	2	0.35
3	RM180	7	2	0.35	27	RM5	1	4	0.5
4	RM253	6	5	0.62	28	RM81A	3	3	0.22
5	RM270	12	5	0.57	29	RM345	6	3	0.45
6	RM223	8	5	0.66	30	RM231	3	5	0.43
7	RM264	8	5	0.68	31	RM495	1	2	0.37
8	RM258	10	3	0.36	32	RM444	9	4	0.41
9	RM278	9	3	0.36	33	RM629	7	4	0.56
10	RM332	11	5	0.52	34	RM434	9	2	0.33
11	RM263	2	5	0.62	35	RM502	8	3	0.43
12	RM6	2	3	0.27	36	RM234	7	6	0.59
13	RM13	5	3	0.4	37	RM146	5	2	0.35
14	RM153	5	3	0.55	38	RM228	10	3	0.58
15	RM237	1	4	0.48	39	12LESSR-1*	12	6	0.76
16	RM185	4	2	0.14	40	RM409	9	2	0.05
17	RM127	4	3	0.38	41	RM571	3	4	0.48
18	RM291	5	2	0.36	42	RM210	8	4	0.41
19	RM211	2	3	0.33	43	RM247	12	4	0.46
20	RM177	4	2	0.37	44	RM232	3	3	0.15
21	RM341	2	4	0.48	45	RM220	1	4	0.6
22	RM169	5	2	0.37	46	RM17	12	4	0.48
23	RM266	2	9	0.79	47	RM1	1	4	0.61
24	RM261	4	5	0.1					
Total			169	20.6	Mean			3.6	0.44

* 12LESSR-1: Chromosome 12 말단 AL928780 BAC clone에 속함.

Forward: 5'CTATCTTAGGTGTTATGGTGTAT3', Reverse: 5'AAGCAGCAGCAGAAGCAGCAC3'

2.1)(Nei와 Li, 1979) UPGMA 분석에 의한 근연계수를 계산한 결과, 유사계수는 최소 0.022 (주남벼와 호품벼 간)에서 최대 0.956 (IR64와 Kongyu 131 간)의 분포를 보였으며, 평균 유사계수는 0.491이었다(자료 미제시).

공시계통의 dendrogram 작성 결과, 크게 *indica*와 *japonica* 2개 그룹으로 분류되었다. 이들 중 자포니카 그룹은 약 0.14의 유전적거리에서 다시 6개의 소그룹으로 구분할 수 있었다(Fig. 2). *Indica* 군에는 한아름, 다산벼 등 국내육성 통일형 품종과 IRRI 육성 3계통 등 전체 11개 품종이 속했다. *Japonica* 그룹 I-1에는 일품벼 등 국내 육성 8 품종과 요령성에서 재배되는 중국 2품종(Liaojing 294, Liaoyan214)이 속했다. II-2에는 Jisheng 202 등 중국 10 품종이 속했는데 이들은 길림성과 흑룡강성에서 주로 재배되는 품종들이다. 길림성에서 재배되는 Yanjing294와

Tong88-7 그리고 흑룡강성에서 재배되는 Dongnong 409 등 3품종이 II-3에 속했으며, II-4에는 2 품종이 속했다.

Fig. 2에서와 같이 국내 육성 *japonica* 8품종은 II-1에 속한 반면 중국에서 육성된 20품종은 II 군에서 골고루 분포하였다. 특히 동북3성에서 육성된 중국품종들은 육성모지별로 분포하였는데 요령성에서 육성된 2품종은 II-1에, 그리고 길림성과 흑룡강성에서 육성된 품종들은 II-2, 3 군에 분포하였다.

국내 육성종과 중국 육성종들의 품종간 다양성을 분석하기 위해 품종간 평균 유전적거리를 구한 결과 중국 육성종간의 유전적거리는 0.285로 국내 육성종의 유전적거리인 0.140에 비해 약 2배 정도 높았다. 이 차이가 공시된 품종수의 차이(국내육성종 8품종과 중국육성 20품종)에 의한 것인지 혹은 품종의 다양성에 기인하는지는 추후 다양한

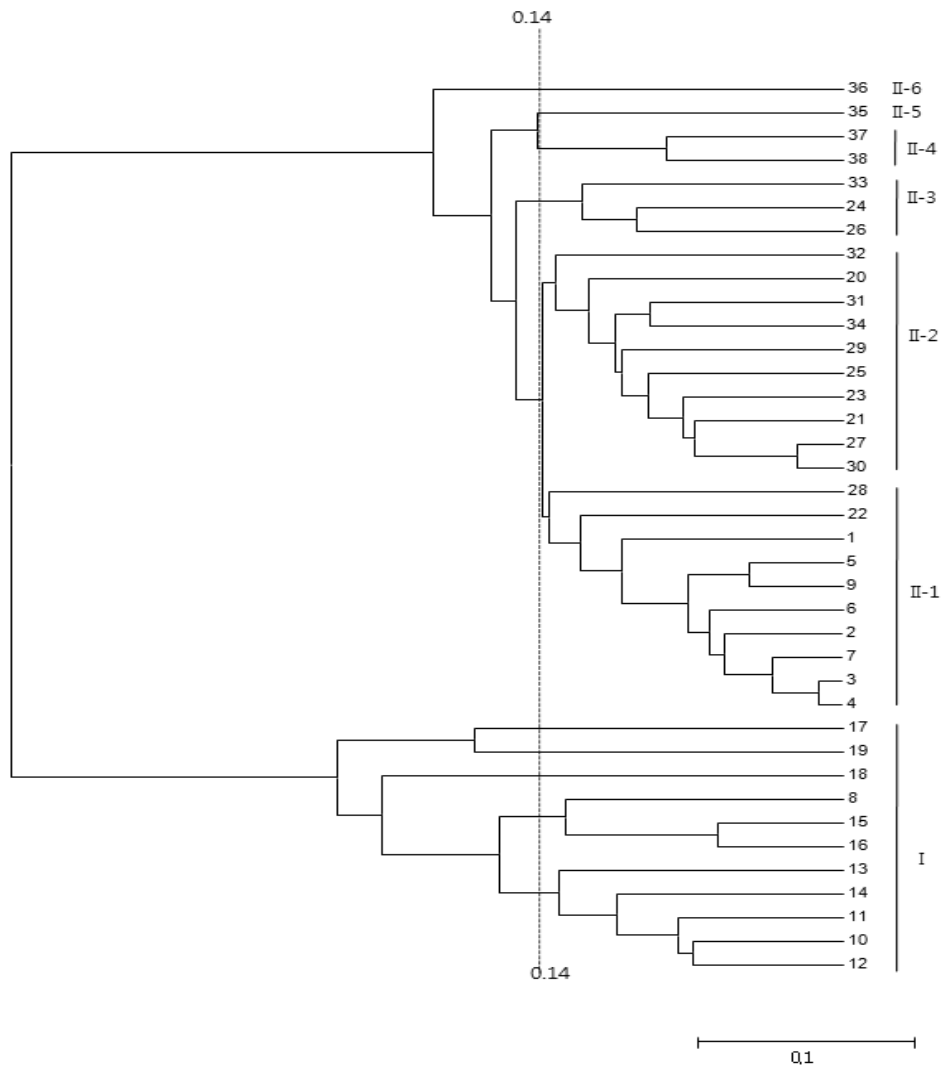


Fig. 2. Dendrogram showing the relationship among 38 rice accessions based on genetic distance. Refer to the Table 1 for the lane designation. Vertical dashed lines indicate similarity values used for the sub-group classification in group II.

품종을 이용한 검토가 필요하다.

3. 품종 판별

Fig. 1 은 38품종의 RM270 유전자좌에서의 밴드 양상을 보여주고 있다. 이용된 47개의 마커 중 RM223, RM253, RM278, RM6, RM444, RM234, RM228, RM571 등 8개 마커는 *indica*와 *japonica* 품종을 특이적으로 구분하는 특성을 보였다(자료 미제시). 이중 특이적인 마커에 관한 몇몇 연구 보고가 있으며 (Kwon 등, 1999b), 본 연구에서 탐지된 마커들은 더 많은 품종을 이용한 추가적인 검토가 필요하다.

중국품종과 국내품종을 판별하는 마커를 탐색한 결과,

RM266이 국내품종과 중국품종을 판별하는데 효과적이었다. RM266은 국내 품종 중에서 2품종(화성벼와 삼광벼)과 중국품종 중에서 4품종(Kenjiandao 8 등)으로 전체 6품종이 동일한 밴드를 보였고, Dongnong 409가 국내의 자포니카 품종들과 동일한 밴드를 보였지만, 중국품종들은 국내 자포니카품종과 서로 다른 밴드를 보였다. RM223은 중국 19 품종 내에서 3개의 밴드를 보였는데, 이들 3개의 밴드는 국내 *japonica* 품종이 보인 밴드와는 달랐지만 국내육성 *indica* 품종들이 보인 밴드와 크기가 일치하였다. 본 연구에서 사용한 47개의 마커 중에서는 한 개의 마커로 국내품종과 중국품종을 구분하는 것은 불가능하였다. 국내품종과 중국품종을 구별하기 위해서는 2개의 마커(RM223과 RM266)와 이중 특이적 마커의 조합을 이용하면 가능할 것으로 판

단된다.

Wang과 Tanksley(1989)는 10개의 RFLP 마커로 70개 벼 품종 중 58개를 구분하였다고 보고하였고, Ji 등(1998)는 6개의 SSR 마커 조합을 사용해서 51개 벼 품종을 모두 구분하였다. 또한, 농촌진흥청에서는 8개 SSR 마커 조합을 이용하여 국내의 벼 287 품종을 구분하는 기술을 개발해 특허를 출원한 바 있다. 본 연구에서 47개의 마커를 이용하였지만 공시된 38품종 전체를 구분하는 것은 불가능했고 4개의 마커를 조합하여 국내품종과 중국품종의 구분이 가능하였다. 최근 유전체 정보의 이용이 가능해짐에 따라 이를 이용한 새로운 형태의 마커들이 등장하고 있는 데 이 중에 하나인 SNP 마커는 최근 품종판별에 널리 이용되고 있다.

본 실험의 38품종에 대해 국내 품종의 판별에 널리 이용되는 SNP 마커(Jung, 2005)를 이용하여 다형성을 분석한 결과, 마커 DK2171은 중국품종 Liaojing 8등 4품종에서만 국내품종과 동일한 SNP를 보였고 나머지 15품종은 국내품종과는 다른 양상을 보여 품종 구분에 좋은 효과를 보였지만, 국내품종과 중국품종을 완전히 판별하기 위해서는 최소한 4개 이상의 SNP 마커가 필요하였다(자료 미제시).

본 연구에 공시된 품종들이 각각 국내육성 품종과 중국 품종을 대표하는지에 대한 검토가 필요하며 다양한 중국품종을 이용한 추가적인 연구가 필요하다. 또한 중국품종을 보다 효율적으로 구분하기 위해 추가적인 SSR 및 SNP 마커의 개발이 요구된다.

IV. 결론

1. 47개의 microsatellite를 38 품종의 genomic DNA 증폭에 이용한 결과, 전체 169개의 allele이 탐지되었고 마커별로 allele은 2-9개의 분포를 보였다.
2. 품종간 근연계수를 계산한 결과, 최소 0.022 (주남벼와 호품벼 간)에서 최대 0.956 (IR64와 Kongyu 131 간)의 분포를 보였으며, 공시계통을 분류한 결과 크게 *indica*와 *japonica* 2개 그룹으로 분류되었다. 이들 중 자포니카 그룹은 약 0.14의 유전적 거리에서 다시 6 개의 소그룹으로 구분할 수 있었으며 특히 동북3성에서 육성된 중국품종들은 육성모지별로 구분되었다.
3. 공시된 국내품종과 중국품종을 구별하기 위해서는 2

개의 마커(RM223과 RM266)와 아종 특이적 마커의 조합을 이용하면 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

This work was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry of Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (No. 110065-3).

참고 문헌

- Anderson JA, Churchill GA, Autrigue JE, Tanksley SD. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage map. *Crop Sci.* 35: 1439-1445.
- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Ji HS, Koh HJ, Park SU, McCouch SR. 1998. Varietal Identification in Japonica Rice Using Microsatellite DNA markers. *Korean J. Breed.* 30(4): 350-360.
- Jung JK. 2005. Development of Single Nucleotide Polymorphism Markers for Discrimination of Rice Cultivar. M.S. Dissertation of Seoul National University, Seoul, Korea.
- Kwon SJ, Ahn SN, Choi HC, Moon HP. 1999a. Evaluation of genetic relationship and fingerprinting of rice varieties using microsatellite and RAPD markers. *Korean J. Crop Sci.* 44(2): 112-116.
- Kwon SJ, Ahn SN, Hong HC, Hwang HK, Choi HC, Moon HP. 1999b. Development of PCR markers for Indica and Japonica differentiation in *Oryza sativa* L. *Rice Genet. Newsletter* 16: 21-23.
- Kwon SJ, Ahn SN, Hong HC, Hwang HK, Choi HC. 2002. SSR Diversity in *Japonica* Rice Cultivars and its Association to Several Traits. *Korean J. Breed.* 34(1): 57-63.
- 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.
- Nei M, Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5269-5273.
- 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.
- Richards R, Sutherland GR. 1994. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genet.* 6: 114-116.
- Rohlf FJ. 1992. NTSYS-pc : Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8 Exeter Software, New York.
- Rural Development Administration (2011) Reflections on the strategy for the global food crisis based on RDA model of food demand and supply (ISBN: 978-89-480-1186-9). p. 302.
- [in Korean]
- Suh JP, Choi YH, Kim KJ, Cho YC, Kwon SJ, Jeong YP, Jeung JU, Choi IS, Choi HC, Hwang HG. 2004. Genetic Diversity QTLs for Grain Quality in *Japonica* Rice. *Korean J. Breed.* 36(1): 31-37.
- Wang ZY, Tanksley SD. 1989. Restriction fragment length polymorphism in *Oryza. sativa* L. *Genome* 32: 1113-1118.