

GWAS 분석을 이용한 벼 지엽각 관련 SNP 동정 및 발현 분석

김미선 · 유익수 · 강권규 · 조용구

Gene expression and SNP identification related to leaf angle traits using a genome-wide association study in rice (*Oryza sativa* L.)

Me-Sun Kim · Yeisoo Yu · Kwon-Kyoo Kang · Yong-Gu Cho

Received: 7 March 2018 / Revised: 15 March 2018 / Accepted: 15 March 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was conducted to investigate a morphological trait in 294 rice accessions including Korean breeding lines. We also carried out a genome-wide association study (GWAS) to detect significant single nucleotide polymorphism markers and candidate genes affecting major agronomic traits. A Manhattan plot analysis of GWAS using morphological traits showed that phenotypic and statistical significance was associated with a chromosome in each group. The significance of SNPs that were detected in this study was investigated by comparing them with those found previously studied QTL regions related to agronomic traits. As a result, SNP (S8-19815442), which is significant with regard to leaf angle, was located in the known QTL regions. To observe gene mutations related to leaf angle in a candidate gene, Os08g31950, its sequences were compared with sequences in previously selected rice varieties. In Os08g31950, a single nucleotide mutation occurred in one region. To compare relative RNA expression levels of candidate gene Os08g31950, obtained from GWAS analysis of 294 rice accessions and related to lateral leaf angle, we investigated

relative levels by selecting 10 erect leaf angle varieties and 10 horizontal leaf angle varieties and examining real-time PCR. In Os08g31950, a high level of expression and various expression patterns were observed in all tissues. Also, Os08g31950 showed higher expression levels in the erect leaf angle variety group and higher expression rates in the leaf than in the root. The candidate gene detected through GWAS would be useful in developing new rice varieties with improved yield potential through future molecular breeding.

Keywords GWAS, core-collection, rice, leaf angle, SNP

서 언

차세대 염기서열 분석(NGS)은 유전체를 수많은 조각으로 나눈 뒤 각각의 염기서열을 조합하여 게놈을 해독하는 기술로써, 지난 십년간 그 분석기술이 비약적으로 발전해왔으며 식물육종분야에 있어서 새로운 혁명을 초래하고 있다(Perez-de-Castro et al. 2012; Blawid et al. 2017). NGS 장비의 발달은 많은 주요 작물들에 대한 게놈 정보의 해독을 가속화시키고 있으며, 다양한 작물에서 재래종, 야생종 등 resequencing 분석이나 GBS (genotyping by sequencing) 등의 분석 방법으로 데이터를 대량 생산하고 있다. 또한, 벼 유전체 해독 프로젝트(IRGSP)에 의해 벼의 게놈 해독이 완료됨으로써 표준게놈을 기반으로 한 GWAS를 수행하여 SNP, InDel 등을 단기간에 개발할 수 있게 되었다(Huang et al. 2009; Nicolae et al. 2010; Kim et al. 2016). 한 예로, 중국에서는 재래종 벼를 이용한 교배집단에 대한 resequencing 분석을 통해 대량의 SNP를 탐색하여 GWAS를 이용하여 14개의 주요 농업형질에 연관된 유전자

M.-S. Kim · Y.-G. Cho (✉)
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju 28644, Korea)
e-mail: ygcho@cbnu.ac.kr

Y. Yu
(✉)DNACARE
(DNACARE, Seoul 06730, Korea)

K.-K. Kang
한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Science, Hankyong National
University, Ansong 17579, Korea)

를 보고하였다(Ma et al. 2016). 한편, 일본 Iwate 생물공학연구센터에서는 Iwate 현에 적합한 벼 품종을 개발하기 위해서 돌연변이 계통과 원품종과의 교배 후 F2 집단에서 돌연변이형을 가진 개체들의 DNA-bulk를 resequencing함으로써 표현형의 원인 유전자를 분리하는 MutMap 또는 MutMap-Gap 방법이 개발되었다(Abe et al. 2012; Takagi et al. 2013).

GWAS는 자연에 존재하는 개체나 계통을 대상으로 연속변이를 보이는 표현형과 연관성을 나타내는 변이 게놈 전체에서 탐색하는 방법이다(Altshuler et al. 2008). GWAS가 수행되기 위해서는 최소 30,000개에서 최대 1,000,000개의 SNP가 요구되며, 인공적인 교배를 사용하지 않고 진화 과정에서 자연스럽게 발생하여 누적된 재조합 연관 분석을 실시하여 농업적으로 중요한 형질 관련 유전자를 동정할 수 있다(Hunter and Crawford 2008; Kruglyak 2008). 이러한 대규모 SNP마커 정보를 이용하여 복합적인 표현형 변이를 일으키는 유전적 변이들의 발견에 대해 많은 GWAS 연구들이 보고되어 왔다(Sladek et al. 2007; Weedon et al. 2007; Li et al. 2008; Wallace et al. 2008). 또한, 현재까지 발표된 변이는 표준 품종으로 자포니카인 Nipponbare를 기준으로 하였으나 IRRI의 생물정보탐색에서는 Kasalath, IR64, DJ123 등 추가로 전장계능에 대하여 유전 변이지도도를 작성함으로써 유전적 변이를 발굴하고 있다(Sakai et al. 2014; Schatz et al. 2014; Alexandrov et al. 2015).

벼의 수량은 식물체의 광합성에 의해 동화산물이 생성되고 전류되는데 관여하는 능력인 source와 종실에 축적될 수 있는 잠재력인 sink의 상호작용으로서, 전 생육과정을 통해 이루어지는 건물생산과 그 분배과정의 최종적인 결과라고 할 수 있다(Park et al. 2015). 벼의 주요 기관을 통하여 수량과 관련한 다양한 유전자 및 QTL이 보고되었다. 인디카 Habataki 품종에서 유래한 Gn1a (Grain number 1a)는 1번 염색체 단완에 위치하면서 사이토키닌 산화효소를 암호화하며, Gn1a의 발현이 줄어들게 되면 이삭 분열조직에 사이토키닌이 축적되고 수당립수가 증가하게 된다(Ashikari et al. 2005). DEP1 (DENSE AND ERECT PANICLE1)은 9번 염색체에 존재하며 대립유전자의 말단 부위에 절단 변이가 발생하여 phosphatidylethanolamine-binding protein-like domain protein의 기능을 상실하게 되면 수당립수가 증가된 고밀도 직립 이삭형태를 가져오게 된다(Huang et al. 2009). 또한, 현재까지 반단간 유전자로 알려진 sd-1을 비롯하여 줄기와 관련된 유전자와 QTL을 활용하여 벼의 생산성과 도복 저항성이 우수한 품종을 육성(Asano et al. 2007)하는 등의 접근이 많이 이루어지고 있다.

벼 수량관련 형질뿐만 아니라 종자의 휴면과 수발아성은 다양한 유전자와 환경의 상호작용에 의해 조절되는 양적형질이다. 최근 유전지도 기반 유전자 분석(map-based cloning)을 통해서 qSDI-2/qPHI 유전자가 GA 생합성에 관여하는 OsGA20ox2 유전자라는 것이 규명되었다(Ye et al. 2015). 그 밖에 qLTG-3-1 (Fujino et al. 2014), Sdr4 (Sugimoto et al. 2010), qSd1-2와 같은 종자 휴면 관련 QTL이 확인되었으며 이들은 종자 등숙, 종자

수명, 종자 발아 등 다양한 종자 형질과 밀접하게 관련되어 있을 뿐 아니라 출수기, 초장 등 종자 이외의 농업형질과 관련성이 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 전세계에서 수집한 벼 294개 유전자원 핵심 집단을 대상으로 엽 형태 특성에 대한 조사를 수행하였고 GWAS 분석을 실시하여 형질 관련 SNP 마커를 탐색하고, 벼의 생육 및 수량 증대에 이용할 수 있는 유전자원들을 탐색하여 유전체 육종에 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 형태적 특성 조사

본 연구에서 이용한 벼 유전자원은 세계 각국에서 수집된 24,000여점의 유전자원 중 도입종(introduced), 국내에서 수집된 유전자원 중 육성종(breeding line), 잡초성벼(weedy) 및 IRRI(International Rice Research Institute) 자원을 이용하여 166점의 핵심집단을 선발하였다. 일부 국내에서 유래된 벼의 출수되지 않는 자원을 제외한, 실제 국내에서 육성되고 이용 가치가 큰 육성종을 추가로 선발하여 최종적으로 294점의 벼 유전체재분석 집단을 공주대학교 박용진 교수팀에서 선발하여 resequencing에 사용하였다(Kim et al. 2016). 전체 벼 유전체재분석 집단 294점 중 국내 육성종(Korean breeding line)은 225점으로 인디카(Indica) 38점, 자포니카(Japonica) 178점, 열대자포니카(Tropical Japonica) 9점으로 구성되어 있다(Table 1). 선발된 전체 294점의 벼 유전체재분석 집단은 2015년과 2017년에 충북대학교 실험농장에 재배하여 특성 조사 및 종자 증식을 수행하였으며, 엽 형태 특성에 대한 조사를 위하여 5반복으로 농촌진흥청 조사기준 및 국립종자원에서 규정한 벼 표준조사법에 따라 조사하였다.

DNA 추출 및 resequencing

벼 294점의 DNA 추출은 이앙 후 15일된 어린잎으로부터 0.5g의 조직을 채취하여 CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 법을 이용하였다(Kump and Javomik 1996; Cho et al. 1998). 추출한 DNA는 λDNA (100 ng/ul)와 함께 1% agarose gel에서 확인하였고 20 ng/ul로 정량하여 실험에 사용하였다(Abdula et al. 2013). 벼 유전자원의 resequencing은 HiSeq 2500 (Illumina) NGS (Next Generation DNA Sequencer)을 이용하여 short read sequence를 공주대학교 박용진 교수팀에서 생산하였다(Kim et al. 2016). 생성된 fastq형식의 raw data 파일은 Cutadapt, sickle 등의 분석 프로그램을 이용하여 adaptor, low quality reads를 제거하였으며, 변이분석은 벼의 표준유전체 염기서열인 IRSGP1.0 (International Rice Genome Sequencing Project)와 비교하여 분석을 수행하였다.

Table 1 List of 294 rice accessions used for GWAS analysis

No.	Accession name	Ecotype ^z	Origin	No.	Accession name	Ecotype	Origin	No.	Accession name	Ecotype	Origin
1	Namseon 52	TeJ	KOR	101	Sodajo	TrJ	KOR	201	Heugkwang Byeo	TeJ	KOR
2	Suweon 159	TeJ	KOR	102	Sando	TrJ	KOR	202	Norinmochi 1	TrJ	KOR
3	Suweon 255	I (T)	KOR	103	Bori Byeo	TeJ	KOR	203	Sangnambat Byeo	TrJ	KOR
4	Suwon 301	TeJ	KOR	104	Naengjo	TeJ	KOR	204	Anda Byeo	I (T)	KOR
5	Suweon 347	I (T)	KOR	105	Bikom	Ad	NGA	205	Taebaeg Byeo	I (T)	KOR
6	CT9993-5-10-1-M	I	COL	106	British Honduras Creole	TrJ	HND	206	Gaya Byeo	I (T)	KOR
7	Rathal	Ad	LKA	107	Cartuna	TrJ	IDN	207	Baegyong Byeo	I (T)	KOR
8	Tchampa	Au	IRN	108	Sahak	Au	PRI	208	Cheong Cheong Byeo	I (T)	KOR
9	Jejubukjeju-2002-99	TeJ	KOR	109	Taichung-Woo-Tsan	I	TWN	209	Jungwon Byeo	I (T)	KOR
10	Jejubukjeju-2002-171	I	KOR	110	Zilanica	Ar	RUS	210	Nampung Byeo	I (T)	KOR
11	Jejubukjeju-2002-340	TeJ	KOR	111	Xao Bai Mang Sue Dao	TeJ	TWN	211	Hangangchal	I (T)	KOR
12	Jejubukjeju-2002-420	TeJ	KOR	112	Di jiao wu jian	I	TWN	212	Goun	TeJ	KOR
13	Jejubukjeju-2002-521	I	KOR	113	Spin Mere	Au	AFG	213	Pungmi	TeJ	KOR
14	Incheonkanghwasujip-16	TeJ	KOR	114	Norin 22	TeJ	JPN	214	Boseogchal	TeJ	KOR
15	Muando	TeJ	KOR	115	Ssalbyeo 16	TeJ	KOR	215	Hanmaeum	TeJ	KOR
16	Dadajo	TeJ	KOR	116	Nian Chi Shi	I	CHN	216	Hwasin 1	TeJ	KOR
17	Okcheong	TeJ	KOR	117	Sung Pan Tao	TeJ	CHN	217	Onnuri	TeJ	KOR
18	Sando	TrJ	KOR	118	Tsong-Gan-Shun	I	CHN	218	Gangbaek	TeJ	KOR
19	Batnarak	TrJ	KOR	119	San-Li-Shun	I	CHN	219	Hwangkeumnuri	TeJ	KOR
20	Orido	TeJ	KOR	120	Yang-Sha-Tsan	I	CHN	220	Dami	TeJ	KOR
21	Saducho	I	KOR	121	Chungdo 23	I	KOR	221	Hongjinju	TeJ	KOR
22	Seon	I	KOR	122	Chungdo Hwayang 12	I	KOR	222	Sinmyunghuegchal	TeJ	KOR
23	Haryangjo	Au	KOR	123	Chungdo Hwayang 14	I	KOR	223	Hoban	TeJ	KOR
24	Inbujido	TeJ	KOR	124	Sungju 3	I	KOR	224	Heugseol	TeJ	KOR
25	Beobpanhwa	TeJ	KOR	125	Jangsung 1	I	KOR	225	Danmi	TeJ	KOR
26	Janmochal	TeJ	KOR	126	Soonchun 5	I	KOR	226	Nokwonchal	TeJ	KOR
27	Pyodo	TeJ	KOR	127	Daegu Damti 6-2	TeJ	KOR	227	Younghojinmi	TeJ	KOR
28	Yuljojo	TeJ	KOR	128	Guechang 15	TeJ	KOR	228	Honong	TeJ	KOR
29	Sangyeongjo	TeJ	KOR	129	Danyang 9	TeJ	KOR	229	Joun	TeJ	KOR
30	Backgogna	I	KOR	130	Chungsongaengmi 4	TeJ	KOR	230	Wolbaek	TeJ	KOR
31	Mondonchalbyeo	Ad	KOR	131	Sulhyeonghando	I	CHN	231	Gangchan	TeJ	KOR
32	Agbede	TrJ	NGA	132	Xiao zao huang	TrJ	CHN	232	Shinbaeg	TeJ	KOR
33	Anbaw C7	TeJ	MMR	133	Namseon 34	TeJ	KOR	233	Geongganghongmi	TeJ	KOR
34	Bala	I	IND	134	Namseon 126	TeJ	KOR	234	Sodami	TeJ	KOR
35	Bellardone	TeJ	FRA	135	Milyang 88	TeJ	KOR	235	Sukwang	TeJ	KOR
36	Chiem Chank	I	VNM	136	Dudo	TeJ	KOR	236	Seonhyangheukmi	TeJ	KOR
37	Dharial	Au	NPL	137	IR40	I	PHL	237	Pungok	TeJ	KOR
38	Dular	Au	IND	138	Jinbu Byeo	TeJ	KOR	238	Wase Gingbouzu	I	U/N ^a
39	IR38	I	PHL	139	Palgong Byeo	TeJ	KOR	239	Palgoeng	TeJ	KOR
40	Magnolia	TrJ	USA	140	Hopyung	TeJ	KOR	240	Jinheung	TeJ	KOR
41	Mala	I	BGD	141	Dongjin Chal Byeo	TeJ	KOR	241	Milseong	TeJ	KOR
42	Mushkan 41	Ar	PHL	142	Gopum	TeJ	KOR	242	Yusin	I (T)	KOR
43	Pukhi	Au	PAK	143	Unkwang	TeJ	KOR	243	Satbyeol Byeo	I (T)	KOR
44	Red Rice	I	IRN	144	Haiami	TeJ	KOR	244	Milyang 42	I (T)	KOR
45	Tun Sart	TrJ	VNM	145	Samgwang	TeJ	KOR	245	Dobong	TeJ	KOR
46	Victoria F.A	TeJ	ARG	146	Hopum	TeJ	KOR	246	Seolag Byeo	TeJ	KOR
47	Bai Cyue Hwa Lue	I	TWN	147	Chilbo	TeJ	KOR	247	Samnam Byeo	TeJ	KOR
48	Yangmyeon	I	TWN	148	Ilpum Byeo	TeJ	KOR	248	Seonjin Byeo	TeJ	KOR
49	Belle Patna	I	USA	149	Chucheong Byeo	TeJ	JPN	249	Youngdeok	TeJ	KOR
50	Pyeongbuk 3	TeJ	PRK	150	Junam Byeo	TeJ	KOR	250	Seohae	TeJ	KOR
51	Yupul	TrJ	LBR	151	Shindongjin Byeo	TeJ	KOR	251	Mimyoon	I (T)	KOR
52	Liman Belozernij	TeJ	RUS	152	Odae Byeo	TeJ	KOR	252	MS11	TeJ	KOR
53	Kagi	Au	IND	153	Nam II	TeJ	KOR	253	Koshihikari	TeJ	JPN
54	Hatadani	I	LKA	154	Hwaseong Byeo	TeJ	KOR	254	Sobaeg Byeo	TeJ	KOR
55	Tai Mochito	TrJ	THA	155	Boramchan	TeJ	KOR	255	Sangju Byeo	TeJ	KOR
56	Waiyakushi	I	TWN	156	Hwayeong Byeo	TeJ	KOR	256	Samcheon Byeo	TeJ	KOR
57	Upland	TrJ	NGA	157	Dongjin Byeo	TeJ	KOR	257	Munjang Byeo	TeJ	KOR

Table 1 Continued

No.	Accession name	Ecotype ^z	Origin	No.	Accession name	Ecotype	Origin	No.	Accession name	Ecotype	Origin
58	Newrex	TrJ	USA	158	Nakdong Byeo	TeJ	KOR	258	Taebong Byeo	TeJ	KOR
59	Doan Guang Hwa Lue	TeJ	TWN	159	Gihw Byeo	TeJ	KOR	259	Dunnae Byeo	TeJ	KOR
60	Wu Cyue	I	TWN	160	Hwacheong	TeJ	KOR	260	Saasangju	TeJ	KOR
61	Binato	I	PHL	161	Jopyeong	TeJ	KOR	261	Manchu Byeo	TeJ	KOR
62	Avangard	TeJ	UZB	162	Chinnong	TeJ	KOR	262	Nongan Byeo	TeJ	KOR
63	Debzera	TeJ	UZB	163	Hanareum	I (T)	KOR	263	Sura Byeo	TeJ	KOR
64	Hawm Supan	I	THA	164	Dasan Byeo	I (T)	KOR	264	Bonggwang	TeJ	JPN
65	Ssal Byeo 22	TeJ	KOR	165	Milyang 23	I (T)	KOR	265	Hwaseonchal Byeo	TeJ	KOR
66	Urasan	TrJ	JPN	166	Samgang Byeo	I (T)	KOR	266	Dongan Byeo	TeJ	KOR
67	Xi Gua Bai	I	CHN	167	Nokyang	TrJ	KOR	267	Daesan Byeo	TeJ	KOR
68	Yung Yuen Chuen Zim	I	CHN	168	Tongil	I (T)	KOR	268	Nongho Byeo	TeJ	KOR
69	Keng Chi Ju	TeJ	CHN	169	Unbong Byeo	TeJ	KOR	269	Mangum Byeo	TeJ	KOR
70	Qua 77 Wuan-Dau	I	CHN	170	Sinumbong Byeo	TeJ	KOR	270	Saegyehwa	TeJ	KOR
71	Chih-Tsao-He	I	CHN	171	Sambaek Byeo	TeJ	KOR	271	Manweol Byeo	TeJ	KOR
72	Hsiang-Ha-Tsan	I	CHN	172	Junghwa Byeo	TeJ	KOR	272	Hyangmi Byeo 1	I (T)	KOR
73	Cheongdo-donggok-4	I	KOR	173	Geuru Byeo	TeJ	KOR	273	Hwangkeumbora	TeJ	KOR
74	Golyeong-2	TeJ	KOR	174	Inwol Byeo	TeJ	KOR	274	Cheonga	TeJ	KOR
75	Golyeong-6	TeJ	KOR	175	Sangmibyeo	TeJ	KOR	275	Cheongdam	TeJ	KOR
76	Danyang-7	TeJ	KOR	176	Geum Byeo	TeJ	KOR	276	Keunseom	I (T)	KOR
77	Danyang-38	TeJ	KOR	177	Jinbuol Byeo	TeJ	KOR	277	Saenuri	TeJ	KOR
78	Hwaseong-5	TeJ	KOR	178	Jinmi Byeo	TeJ	KOR	278	Hwanggeumnodeul	TeJ	KOR
79	Gou 405	TeJ	JPN	179	Heuginju Byeo	TeJ	KOR	279	Cheongan	TeJ	KOR
80	Baeksami	TeJ	CHN	180	Jeuginju Byeo	TeJ	KOR	280	Deuraechan	TeJ	KOR
81	Akaine	TrJ	JPN	181	Naepung Byeo	TeJ	KOR	281	Jinbaek	TeJ	KOR
82	Syarebye-61-1-B	TeJ	KOR	182	Donghae Byeo	TeJ	KOR	282	Cheongnam	TeJ	KOR
83	Syalebye-94-1-B	TeJ	KOR	183	Seoan Byeo	TeJ	KOR	283	Suan	TeJ	KOR
84	Syalebye-163-1-B	TeJ	KOR	184	Gancheok Byeo	TeJ	KOR	284	Dongbo	TeJ	KOR
85	Milyang 50	I (T)	KOR	185	Juan Byeo	TeJ	KOR	285	Seolemi	TeJ	KOR
86	Yeongpung Byeo	I (T)	KOR	186	Yeonghae Byeo	TeJ	KOR	286	Jungsaenggold	TeJ	KOR
87	Iri 336	TeJ	KOR	187	Sobi Byeo	TeJ	KOR	287	Saeilmi	TeJ	KOR
88	Mihyang Byeo	TeJ	KOR	188	Haepyeong Byeo	TeJ	KOR	288	Seokwang	TeJ	KOR
89	Moroberekan	TrJ	GIN	189	Sinseonchal Byeo	TeJ	KOR	289	Saenara	TeJ	KOR
90	Jejubukjeju-2002-115	TrJ	KOR	190	Daelip Byeo 1	TeJ	KOR	290	Paldal	TeJ	KOR
91	Jejubukjeju-2002-550	TeJ	KOR	191	Seolhyangchal Byeo	TeJ	KOR	291	Nongbaeg	TeJ	KOR
92	Jejubukjeju-2002-561	TeJ	KOR	192	Ilmi Byeo	TeJ	KOR	292	Chupung Byeo	I (T)	KOR
93	Huindadak	TeJ	KOR	193	Nampyeong Byeo	TeJ	KOR	293	Kwanak Byeo	TeJ	KOR
94	Jotajo	TeJ	KOR	194	Gyehwa Byeo	TeJ	KOR	294	Seonam Byeo	TeJ	KOR
95	Pocheon Jangmang Mebyeo	TeJ	KOR	195	Yeongnam Byeo	TeJ	KOR				
96	Dongo Byeo	TeJ	KOR	196	Yangjo Byeo	TeJ	KOR				
97	Seorianjeunbaengi	TeJ	KOR	197	Aranghangchal Byeo	TeJ	KOR				
98	Neul Byeo	TrJ	KOR	198	Heugnam Byeo	TeJ	KOR				
99	Jwiipari Byeo	TeJ	KOR	199	Goamy Byeo	TeJ	KOR				
100	Jeongjionghwa	TeJ	KOR	200	Manmi	TeJ	KOR				

^zAd: *Admixture*, Ar: *Aromatic*, Au: *Aus*, I: *Indica*, I (T): *Idica (Tongil type)*, J: *Japonica*, TeJ: *Temperate japonica*, TrJ: *Tropical japonica*; *U/N: USDA/NGRL (Introduced)

GWAS 분석 및 유전자 기능 분석

GWAS분석은 코넬대학교에서 개발한 식물의 양적 형질에 적용할 수 있으며 대용량의 데이터를 처리할 수 있는 GAPIT (Genomic Association and Prediction Integrated Tool) (Lipka et al. 2012) 및 GAPIT의 혼합선형모형(Zhang et al. 2010)을 이용하

여 분석하였다. 후보유전자 영역에서 발견된 유전자들을 후보유전자로 선정하고, 각각의 유전자의 mRNA 전사체에 대한 cDNA 서열과 genomic DNA 서열을 Rice Genome Annotation Project와 NCBI database에서 검색하여 추출하였다. 선발된 위치상 후보유전자 내 SNP 마커들 간의 연관성을 보기 위해 Haploview version 4.2를 이용하였다.

Table 2 Sequence information of primers used in RT-PCR for expressional analysis

Primer	Candidate gene	Orientation	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
LLA1	<i>Os08g31950</i>	Fw	GAGGAGGAGGAGGATCAGG	59
		Rv	CTACGACGAGCTTCCACTCC	59
PL1	<i>Os04g19540</i>	Fw	CGCAAGCAATGATGAAAGAA	57
		Rv	AAGTCAAATTCAAGGGCCCT	57
Actin	<i>actin</i>	Fw	CCAGCAAGGTCGAGACGAA	56
		Rv	TGTATGCCAGTGGTCGTACCA	56

Table 3 Basic statistical values and number of lateral leaf angles with 294 rice accessions

Statistical focus	Statistic	Lateral leaf angle (°)	No. of accession
Total	294	Erect (0 - 10)	39
Maximum (°)	83.5	Semierect (10 - 30)	188
Minimum (°)	5	Horizontal (31 < x)	46
Average (°)	22.61		
Standard deviation	14.46		
CV	0.64		

* Accession names are provided in Supplementary Table 1

RT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석

RT-PCR을 통하여 목표유전자의 증폭량을 확인한 후, mRNA 발현량을 분석하기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다(Table 2). PCR은 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Japan) 와 Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)를 사용하였다. 모든 표본들은 실험의 정확성을 높이기 위하여 3 반복으로 진행하였으며 PCR 반응은 95°C에서 3분간 pre-denaturation을 시행한 후 95°C에서 10초간 denaturation, 55°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension하고, scanning하는 과정을 50회 반복하였으며, melting curve 분석은 65~95°C에서 0.5°C씩 5초간 실행하였다.

결과 및 고찰

벼 유전자원의 지엽각 특성

벼 294점의 유전자원 중 국내에서 출수가 진행되지 않은 자원 21점을 제외한 273점 유전자원의 지엽각에 대한 기초통계량 수치를 비교 분석하기 위하여 표현형을 분도기를 이용하여 조사한 결과는 Table 3과 같다. 이삭을 기준으로 지엽의 각도가 0~10°는 직립형, 11~30°는 반직립형, 31°이상의 각도를 보이는 것은 수평형으로 분류하였다.

벼 273점 유전자원 중에서 인디카(*Indica*) 14점, 자포니카(*Japonica*) 25점으로 총 39개 품종이 직립형으로 나타났고, 열대자포니카(*Tropocjal Japonica*) 9점을 포함한 209개 품종이

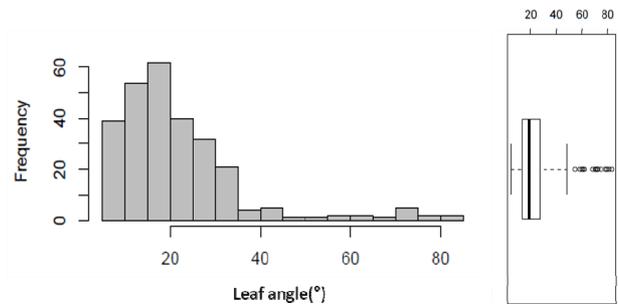


Fig. 1 Phenotypic distribution and statistics of lateral leaf angle (°)

반직립형으로 나타났으며, 수평형을 나타내는 품종은 46개 품종이 조사되었다(Table 3). 구간별 분포도 조사 결과, 15° < x ≤ 20° 이하의 지엽각 구간에서 가장 높은 분포도를 보였으며, 273개 품종 중 베트남에서 기원된 TUN SART이 83.5°로 가장 큰 지엽각을 나타냈고 큰섬이 5°로 가장 작은 지엽각을 나타내었다(Fig. 1).

Jung 등(2008)의 연구에 따르면 자포니카 품종과 인디카 품종의 영양생장시기가 서로 다르며 잎에서 감광성 유전자의 발현에 차이를 보인다고 하였고, Fan et al. (2007)은 높은 CO₂ 조건하에 자포니카 품종의 지엽각과 인디카 품종의 지엽각이 서로 다른 형태를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서 지엽각의 분포도가 다르게 나타난 것은 품종별로 유전자의 조성이 다르고 식물의 주요 canopy structure인 지엽에서 생태형별로 일장 및 CO₂와 같은 외부환경 변화에 서로 다르게 반응함으로 인한 것으로 사료된다.

GWAS 분석에 의한 SNP 마커 개발

벼 resequencing 유전자원 294점에 대한 형질 관련 특이적 SNP들의 선별을 위한 기준을 선정하기 위하여 quality control 을 수행하였다. 총 6,243,699개의 SNP들 중, read depth가 $4\times$ 이상, $200\times$ 이하이며 $MAF > 0.05$, $genotyping\ quality \geq 20$, Hardy-Weinberg equilibrium($P\text{-value} \leq 0.001$)를 만족시키는 1,842,515개(전체 SNP의 29.50%)의 SNP를 확인할 수 있었다. 벼 273점에 대한 지엽각 표현형 데이터를 이용하여 GWAS 를 실시하였으며, GWAS의 Manhattan plot 결과 분석을 통해, 각 집단에서 염색체를 대상으로 지엽각과 통계적 유의도를 나타내 연관성을 보이는 SNP를 발굴하였다.

지엽각에 대한 연관분석으로 나온 유의적인 SNP들의 $-\log_{10}P$ 값을 토대로 Manhattan과 QQ plot은 Figure 2에 나타난 바와 같다. Manhattan plot에서 $-\log_{10}P > 8$ 을 기준으로 볼 때 유의적인 SNP가 탐지됨을 확인할 수 있었으며 벼 염색체 8번에

위치한 해당 SNP(S8_19815442)가 어떤 SNP보다도 유의적인 SNP임을 알 수가 있었다(Table 4). 또한, QQ plot에서는 x축의 기대값 P-value보다 유의적으로 나타난 SNP들에서 관측된 P-value가 더 높은 형태를 취하고 있었으며 이는 발굴된 SNP들이 유의적이라고 볼 수 있으며 해당 형질을 잘 표현하고 있다는 것을 의미한다.

본 연구에서 지엽각과 연관성을 보이는 SNP를 탐색한 결과 벼 염색체 8번에 위치한 SNP(S8_19815442)가 지엽각의 발현과 연관이 있는 유의적인 SNP로 밝혀졌다(Fig. 3). 이 결과와 관련하여 Kobayashi 등(2003)에 따르면 RIL 집단의 지엽 형질과 관련한 QTL 분석 결과, 9번 염색체를 제외한 11개 염색체에서 총 64개의 QTL이 탐색되었으며 그 중 8번 염색체에서 LOD 4.1로 RFLP 마커인 XNpb187과 XNpb135사이의 엽각 관련 QTL이 발굴되었다. 또한 Cai et al. (2015)에 따르면 ‘인디카/자포니카’ 조합 DH 집단을 이용한 유전자 지도 작성에서 총 30개의 QTL이 탐색되었으며 1번, 2번, 6번, 7번, 8

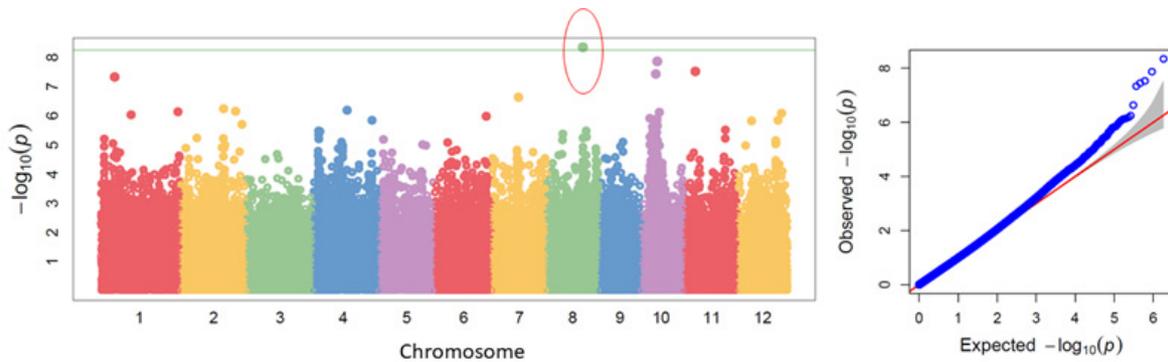


Fig. 2 Manhattan plots and high associated peaks of lateral leaf angle using 294 rice accessions. The $-\log_{10}(P)$ value from a genome-wide scan are plotted against the position on each of 12 chromosomes

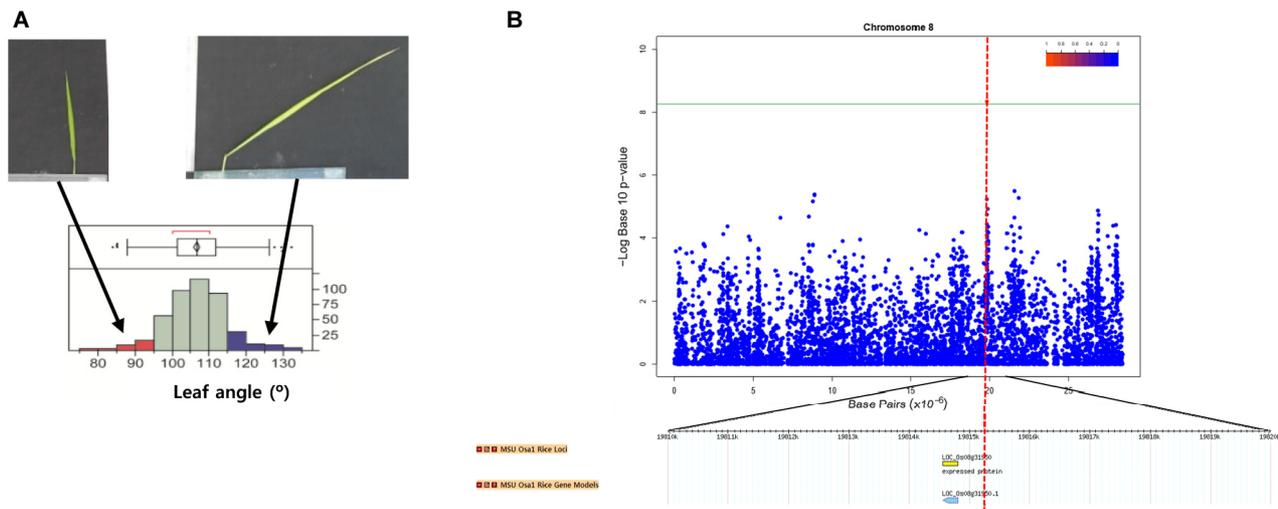


Fig. 3 (A) Phenotypic distribution and statistics of lateral leaf angle ($^{\circ}$), (B) Regions of the genome showing strong association signals near previously lateral leaf angle-related genes. Top of each panel shows a chromosome region of the peak SNP (SNP with the lowest P value), whose position is indicated by a vertical red line. Bottom of each panel shows a 5-kb region on each side of the peak SNP, with annotated genes indicated by color boxes

Table 4 SNP locations associated with lateral leaf angle in 294 rice accessions

Chr.	SNP	Location (bp)	P-value	MAF	R2*	R2 [†]	FDR adjusted P-values
8	S8_19830086	19,830,086	7.99×10 ⁻⁵	0.152015	0.319690902	0.35982231	4.18×10 ⁻¹
8	S8_19815381	19,815,381	7.18×10 ⁻⁶	0.172161	0.319690902	0.372092035	2.51×10 ⁻¹
8	S8_19815442	19,815,442	5.22×10 ⁻⁹	0.12088	0.319690902	0.410768507	8.58×10 ⁻³
8	S8_19817220	19,817,220	1.11×10 ⁻⁴	0.108059	0.319690902	0.358178076	4.54×10 ⁻¹
8	S8_19817228	19,817,228	4.90×10 ⁻⁵	0.100733	0.319690902	0.362281852	4.10×10 ⁻¹
8	S8_19817814	19,817,814	2.96×10 ⁻⁵	0.126374	0.319690902	0.364833449	3.89×10 ⁻¹
8	S8_19828553	19,828,553	1.93×10 ⁻⁴	0.111722	0.319690902	0.355407434	4.89×10 ⁻¹
8	S8_19811866	19,811,866	1.70×10 ⁻⁴	0.131868	0.319690902	0.356041467	4.73×10 ⁻¹
8	S8_19830240	19,830,240	3.16×10 ⁻⁴	0.190476	0.319690902	0.352988153	5.35×10 ⁻¹
8	S8_19830510	19,830,510	3.68×10 ⁻⁴	0.131868	0.319690902	0.352235208	5.57×10 ⁻¹
8	S8_19838535	19,838,535	1.19×10 ⁻⁴	0.216117	0.319690902	0.357819034	4.59×10 ⁻¹
8	S8_19851668	19,851,668	3.35×10 ⁻⁴	0.117216	0.319690902	0.352693654	5.41×10 ⁻¹
8	S8_19879513	19,879,513	1.79×10 ⁻⁵	0.124542	0.319690902	0.367383556	3.51×10 ⁻¹
8	S8_19899305	19,899,305	2.61×10 ⁻⁴	0.437729	0.319690902	0.35393741	5.11×10 ⁻¹
8	S8_19899360	19,899,360	5.02×10 ⁻⁵	0.437729	0.319690902	0.362163554	4.10×10 ⁻¹

Chr., Chromosome; MAF, minor allele frequency
 *R square of model without SNP. †R square of model with SNP.

번, 9번, 12번 염색체에서 각각 LOD 값 2 이상의 엽각 관련 QTL이 발굴되었다. 이와 관련하여 본 연구에서는 ‘S8-19815442’ SNP가 이미 확인된 QTL region(17.44 Mbp ~ 26.91 Mbp)에 유사하게 위치하는 것을 확인하였다.

지엽각 연관 후보 유전자 동정

본 연구에서 발굴된 유의적인 SNP들 중 $-\log P > 8$ 에 해당하는 SNP들에 대해 주변 지역에서 NCBI data base를 통하여 후보유전자를 탐색하였고, 그 중 관련 있는 후보유전자들을 선발하였다. 지엽각에 대하여 유의성이 높은 SNP S8_19815381 및 SNP S8_19879513 사이의 약 64 Kb 구간에서 13개의 유전자가 관찰되었다. 그 부위에서 Os08g31950.1 (Basic helix-loop-helix proteins (bHLHs)) 및 Os08g31970.1 (NHL(Ncl-1, HT2A, Lin-41)-repeat-containing protein), Os08g31970.2 (NHL(Ncl-1, HT2A, Lin-41)-repeat-containing protein), Os08g31980.1 (Trehalose-6-phosphate synthase) 등 4개의 후보유전자가 선발되었다 (Table 5).

Trehalose는 비환원당으로 널리 다양한 개체에 존재하며, 이 당의 경우 에너지와 탄소원, 그리고, 비생물학적 스트레스에 대항하는 보호분자 역할을 한다(Garg et al. 2002). Basic-helix-loop-helix(bHLH) 인자는 동·식물에서 다양한 역할을 하는 중요 전사인자로 알려져 있으며, 특히 Jang et al. (2017)에 따르면 bHLH 인자는 식물의 꽃과 줄기 등 측생기관의 형태 진화에서 매우 핵심적인 기능을 한다고 보고한 바 있다.

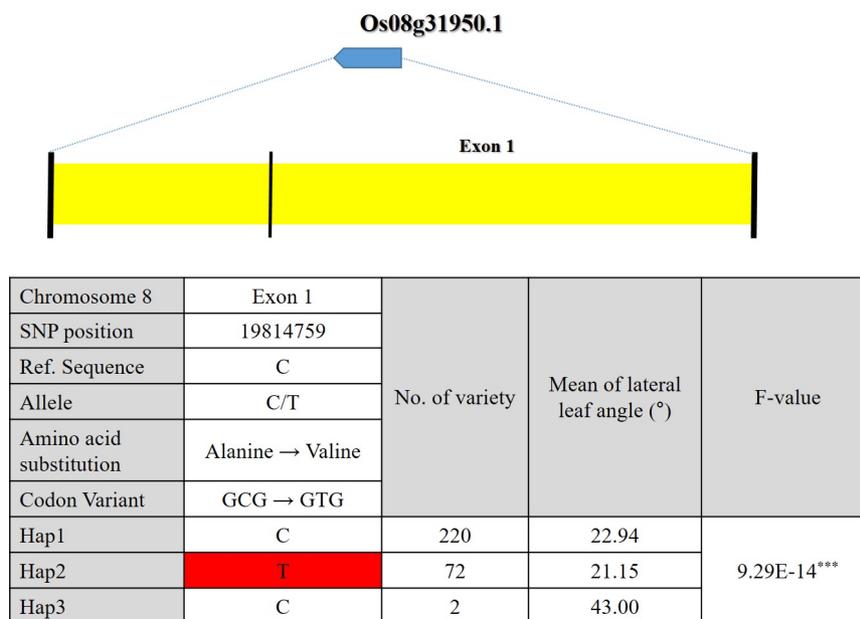
며 resequencing 294점에 대한 GWAS 분석 결과를 통해 얻

은 후보유전자에 대하여 haplotype 분석을 실시하였으며, haplotype 분석 시 Nipponbare (Tempera Japonica) 염기서열을 기준으로 하였다. Haplotype 분석결과 및 표현형 데이터를 비교 분석하여 벼 농업 형질과 후보유전자 간의 관련 여부에 대해 검정하였다.

벼 염색체 8번체의 high peak 위치를 기준으로 하여 선발된 후보유전자는 Os08g31950으로 haplotype 분석을 실시한 결과, Os08g31950 유전자는 3개의 그룹으로 나뉘었으며 각 그룹의 지엽각 평균은 22.94°, 21.15°, 43.00°으로 나타났다. 높은 지엽각을 보인 Os08g31950-Hap1과 Os08g31950-Hap3 그룹은 exon 부분에서 Nipponbare와 유사한 염기를 갖는 반면, 낮은 지엽각을 보인 Os08g31950-Hap2 그룹은 exon 부분에서 Nipponbare의 염기와 비교하였을 때 해당 exon부위가 위치하는 벼 8번 염색체 상의 19,814,759번 위치에서 C에서 T로 변환되었으며 Alanine(GCG)에서 Valine(GTG)으로 아미노산 서열이 바뀌었다. Os08g31950-Hap1 그룹에 속하는 품종은 220개로 지엽각의 범위가 6° ~ 86.5°의 범위였으며, Os08g31950-Hap2 그룹에 속하는 품종은 72개로 지엽각의 범위가 5° ~ 75°로 나타났다(Fig. 3). Os08g31950의 경우 GCG에서 GTG 부분으로 염기가 바뀌게 됨으로 인하여 아미노산 배열이 Alanine에서 Valine으로 치환이 되는 nonsynonymous SNP이다. Os08g31950은 bHLH의 전사인자로 Toledo-Ortiz et al. (2003)에 따르면 bHLH는 전사를 조절하는 메커니즘에서 G-박스 DNA sequence motif CACGTG에 특이적으로 결합할 수 있는 이중 및 동중 이합체의 배열 구성을 형성한다. 또한, Peng 등 (2014)은 벼에서 qPC1 유전자의 ORF (Open Reading Frame) 부

Table 5 Candidate gene information included *Os08g31950* gene between 19,815,381–19,879,513 (64 Kb) on chromosome 8

No.	Name	CDS Coordinates (5'-3')		Nucleotide length (bp)	Predicted protein length	Description
1	Os08g31950.1	19,814,562	19,814,816	255	85	Basic helix-loop-helix proteins (bHLHs)
2	Os08g31960.1	19,823,381	19,826,388	813	271	Uncharacterized protein
3	Os08g31970.1	19,826,775	19,829,675	1,263	421	NHL (Ncl-1, HT2A, Lin-41)-repeat-containing protein
4	Os08g31970.2	19,826,775	19,829,675	828	276	NHL (Ncl-1, HT2A, Lin-41)-repeat-containing protein
5	Os08g31980.1	19,836,087	19,830,328	2,589	863	Trehalose-6-phosphate synthase
6	Os08g31990.1	19,843,586	19,842,034	249	83	Uncharacterized protein
7	Os08g32000.1	19,852,088	19,852,354	267	89	Uncharacterized protein
8	Os08g32010.1	19,859,453	19,858,390	333	111	Hypothetical protein
9	Os08g32020.1	19,862,754	19,865,795	2,346	782	Retrotransposon protein
10	Os08g32030.1	19,869,343	19,866,410	2,217	739	Retrotransposon protein
11	Os08g32040.1	19,870,464	19,869,598	867	289	Retrotransposon protein
12	Os08g32050.1	19,872,534	19,871,416	1,119	373	Retrotransposon protein
13	Os08g32060.1	19,875,266	19,877,699	2,073	691	Spotted leaf 11

**Fig. 4** Haplotype analysis of the sequence covering the candidate gene *Os08g31950* on chromosome 8 coding regions in 294 rice accessions and phenotypic variation among different haplotype

분의 SNP에서 valine으로 치환되는 nonsynonymous SNP 유전자의 발현이 이루어지는 중요한 영역을 밝힌 바와 같이 *Os08g31950*의 기능에 관심을 가질 필요성이 있다고 여겨진다. 지엽각 연관 후보 유전자의 발현 분석

며 resequencing 294점에 대한 GWAS 분석 결과를 통해 얻은 후보유전자의 형질별 유전적 변이 및 연관성을 분석하기 위하여, 본 연구를 통해 조사된 직립형 지엽각 품종군과 수평형 지엽각 품종군을 각각 10개씩 선정하여 염기서열 분석을

수행하였다. 지엽각 형질 연관 후보유전자 *Os08g31950*에 대해 연관 유전자 변이를 관찰하기 위해서 직립형 지엽각 품종군과 수평형 지엽각 품종군 사이의 염기서열을 비교한 결과는 Figure 5와 같다.

염기서열 비교를 통하여 특정 염기의 삽입(Insert), 결실(Deletion), 치환(Substitution)을 확인한 결과, 직립형 지엽각 품종군과 수평형 지엽각 품종군의 특정 염기서열 부위에 염기치환이 확인되었다. *Os08g31950*의 직립형 지엽각 품종군에서의 염기서열 비교를 보면, 봉광 및 큰섬, Yusin, 수원 347

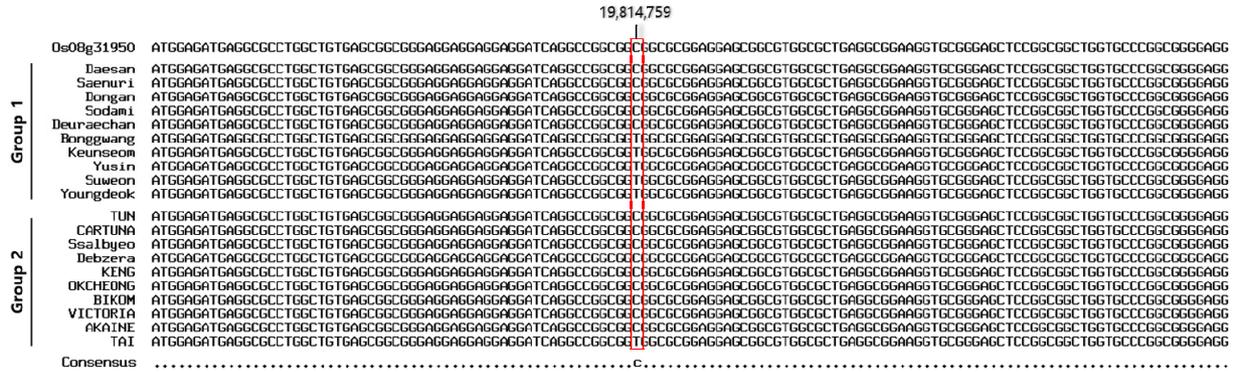


Fig. 5 Nucleotide sequence comparison of *Os08g31950* gene in twenty different varieties. The conserved sequences are shown as dots. Sequence variation is represented by corresponding nucleotides. The consensus sequence is indicated at the bottom of the alignment. Group 1, erect lateral leaf angle ($x < 5^\circ$) varieties; Group 2, horizontal lateral leaf angle ($x > 60^\circ$) varieties

호, 영덕 등 총 5개 품종에서 단일염기서열이 치환된 것을 확인할 수 있었으며 이들 중 대부분은 인티카(*Indica*) 생태형을 지닌 것으로 나타났다. *Os08g31950*의 수평형 지엽각 품종군에서의 염기서열 비교를 보면, 직립형 지엽각 품종군과는 다르게 TAI MOCHITO 1개 품종에서만 단일염기치환이 관찰되었으며 TAI MOCHITO의 생태형은 열대자포니카(*Tropical Japonica*)인 것으로 관찰되었다. 상기와 같이 발굴된 1개 SNP (S8_19814759)는 아미노산 합성에 직접적인 영향을 주는 coding 영역에 위치하는 것으로 확인되었다. 이와 같이 coding 영역에 위치한 SNP는 아미노산 합성뿐만 아니라 RNA splicing, nucleosome 형태, regulatory motif 등에 영향을 주어 유전자 발현을 조절하며(Castillo-Davis et al. 2002; Shabalina and Spiridonov, 2004; Cheong et al. 2006), 다른 유전자의 causative mutation과 연관되어 유전자 발현에 영향을 미칠 가능성이 있으므로(Li et al. 2008; Su et al. 2016), 이에 대한 분석 연구가 필요할 것으로 사료된다.

벼 294점에 대한 GWAS 분석 결과를 통해 얻은 지엽각 형질 관련 후보유전자 *Os08g31950*에 대해 조직별 발현 양상을 정량적으로 비교하기 위해 real-time PCR을 수행한 결과는 Figure 6과 같다.

직립형 지엽각 품종군 및 수평형 지엽각 품종군의 모든 조직에서 *Os08g31950*의 발현을 확인할 수 있었으며 조직별로 다양한 발현 양상을 관찰할 수 있었다. *Os08g31950*의 잎에서의 발현 양상을 보면, 직립형 지엽각 품종군이 수평형 지엽각 품종군보다 유전자의 발현량이 상대적으로 높았으며 가장 높은 발현율을 나타낸 품종은 Yusin으로 나타났고 가장 낮은 발현율을 나타낸 품종은 동안벼로 나타났으며 두 품종 모두 직립형 지엽각 품종군에 포함되어 있는 것으로 관찰되었다. 한편, *Os08g31950*의 뿌리에서의 발현 양상을 보면, 직립형 지엽각 품종군에 속해 있는 대부분의 품종이 수평형 지엽각 품종군에 속해 있는 품종들보다 높은 발현량을 나타내었다. 반면 잎에서와는 다르게 가장 높은 발현율을 나타내는 품종은 CARTUNA로 나타났고 가장 낮은 발현율을 나타

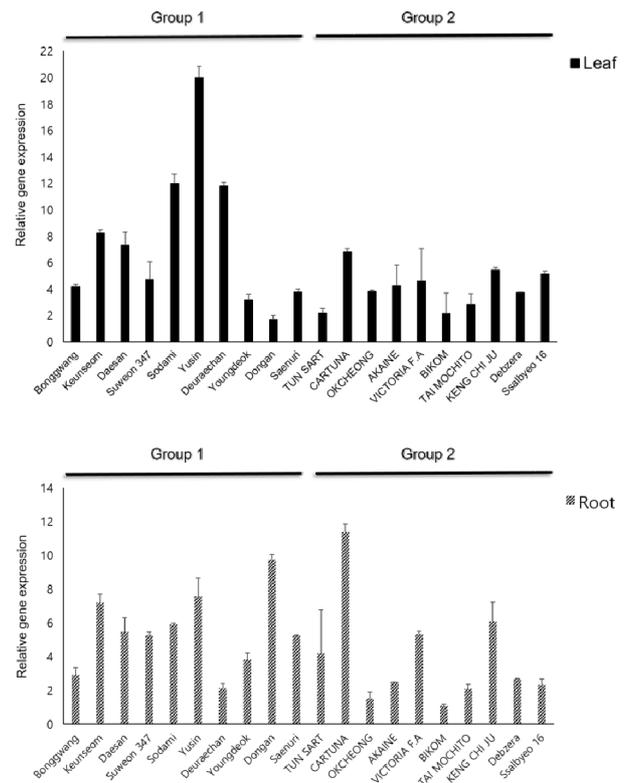


Fig. 6 RNA expression patterns in two organs (leaf and root) for *Os08g31950* gene in 20 selected rice accessions based on real-time PCR analysis using LLA1 and actin primers. Group 1, erect lateral leaf angle ($x < 5^\circ$) varieties; Group 2, horizontal lateral leaf angle ($x > 60^\circ$) varieties

내는 품종은 BIKOM으로 나타났으며 두 품종 모두 수평형 지엽각 품종군에 포함되어 있는 것으로 관찰되었다.

*Os08g31950*의 조직간 발현 양상을 보면, 잎에서의 유전자 발현량이 뿌리에서의 발현량보다 전체적으로 높게 나타났으며 잎에서 최고 발현량을 나타낸 Yusin의 발현율이 뿌리에서 최고 발현량을 나타낸 CARTUNA의 발현율보다 약 2배 가량 높게 나타났다. 또한 *Os08g31950* 유전자의 품종간 발현

양상을 보면, 수원347호 및, 영덕, 동안, 새누리, TUN SART, CARTUNA, VICTORIA F.A, KENG CHI FU 등 총 8개 품종을 제외한 나머지 12개 품종은 모두 잎에서 유전자의 발현량이 높게 나타났다.

본 연구에서 지엽각과 연관성을 보이는 SNP를 탐색한 결과 벼 염색체 8번에 위치한 SNP(S8_19815442)가 지엽 형질과 관련이 있는 QTL region에 유사하게 위치하는 것을 확인하였다(Kobayashi et al. 2003; Cai et al. 2015). 또한, Hu et al. (2012)은 전엽치리에 따른 수량을 높이기 위해 자포니카 품종을 이용하여 QTL을 분석한 결과 QTL qFLA8이 지엽의 크기 및 각도에 관여한다고 하였으며, Dong et al. (2004)에 따르면 8번 염색체에서 지엽의 형태 발달에 관여하는 QTL qDEF-8의 좌위를 확인하였다.

식물에서 bHLH (basic/Helix-Loop-Helix) 단백질은 세포의 증식에서 다양성을 조절하는 전자 네트워크에서 중요한 조절 요소로 알려져 있다(Grandori et al. 2000; Massari and Murre 2000). Feng et al. (2016)에 따르면 HLH 단백질인 OsBUL1은 lamina joint 부위에서 발현하여 잎의 형태에 관여함으로써 종실의 크기 및 수량성에 기여한다고 보고한 바 있으며, IL1 (Increased laminar inclination 1) 및 PGL1 (Positive regulator of grain length 1)과 같은 HLH 형태의 단백질들이 lamina 부위에서 발현함으로써 잎의 각도에 직접적으로 관여하는 것으로 나타났다(Tanaka et al. 2009; Zhang et al. 2009; Heang and Sassa 2012).

이러한 결과들을 종합해 볼 때 벼 resequencing 294점에 대한 GWAS 분석 결과를 통해 얻은 후보유전자 Os08g31950의 exon 영역의 SNP 유전자형은 지엽의 형태 발달에 관여하는 QTL 좌위와 유의적 연관성이 있는 것으로 추정되고 있으며, 직립형 지엽각 품종군 및 수평형 지엽각 품종군에서 Os08g31950의 서로 다른 발현 양상으로 미루어 볼 때 품종간 지엽각 차이에 상당한 영향을 줄 가능성이 있다고 판단된다.

따라서, 본 연구를 통하여 벼 유전자원 집단의 다양한 농업 형질과의 관련성 분석 및 유전적 지표인자 발굴에 도움이 될 것이며 이를 통해 분자유전학적 기법을 이용한 광합성 효율과 관련된 지엽(Cho et al. 1975)의 벼 육종전략을 확립하는데 기초 자료가 되는 것은 물론 유전자원 보존 및 분자유종학적인 연구에 기초 자료로서 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서는 국내외에서 수집한 벼 294개 유전자원 핵심 집단을 대상으로 벼의 지엽각 특성에 대한 조사를 수행하였고, GWAS를 이용하여 지엽각 연관 유전자를 추출 및 분석하였다. 표현형 데이터를 이용한 GWAS의 Manhattan plot 결과 분석을 통해, 각 집단에서 염색체를 대상으로 표현형과

통계적 유의성을 나타내 연관성을 보이는 SNP를 발굴하였다. 지엽각 관련 특성에 대하여 선행 연구된 QTL region과의 비교를 통하여 본 연구에서 발굴된 SNP간의 유의성을 조사한 결과, 지엽각과 유의성이 있는 SNP (S8-19815442)가 이미 확인된 QTL region에 위치하는 것으로 나타났으며, 후보유전자 Os08g31950 대해 연관 유전자 변이를 관찰하기 위해서 형질 특이적 품종군 간의 염기서열을 비교한 결과 1개의 지역에서 단일염기변이가 검출되었다. Os08g31950의 조직별 RNA의 상대적 발현량 수준을 비교한 결과, Os08g31950 유전자는 모든 조직에서 높은 발현량을 확인할 수 있었으며 조직별로 다양한 발현 양상을 관찰할 수 있었다. 또한, 모두 직립형 품종군에서 상대적으로 발현량이 높게 나타났으며 뿌리보다 잎에서의 발현율이 높게 나타났다. 본 연구를 통해 동정된 지엽각 연관 후보유전자 Os08g31950는 벼 생육 및 수량 증대에 이용할 수 있는 마커제작 및 육종의 기초자료가 될 것으로 기대된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(식물분자유종사업단 과제번호: PJ01320701)의 지원을 받아 이루어진 결과이며, 벼 294 점 핵심집단유전체재분석 데이터를 제공한 공주대학교 박용진 교수에게 감사드립니다.

References

- Abdula SE et al (2013) Development and identification of transgenic rice lines with abiotic stress tolerance by using a full-length overexpressor gene hunting system. *Plant Breed Biotechnol* 1:33-48
- Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S, Terauchi R (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nature Biotechnology* 30:174-178
- Alexandrov N, Tai S, Wang W, Mansueto L, Palis K, Fuentes RR, Ulat VJ, Chebotarov D, Zhang G, Li Z, Mauleon R, Sackville Hamilton R, McNally KL (2015) SNP-seek database of SNPs derived from 3000 rice genomes. *Nucleic Acids Research* 43(D1): 1023-1027
- Altshule D, Daly MJ, Lander ES (2008) Genetic mapping in human disease. *Science* 322:881-888.
- Asano K, Takashi T, Miura K, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M, Ashikari M (2007) Genetic and molecular analysis of utility of sd1 alleles in rice breeding. *Korean Journal of Breeding Science* 57:53-58
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M

- (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309:741–745
- Blawid R, Silva JMF, Nagata T (2017) Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. *Annals of Applied Biology* 170:301–314
- Cai J, Zhang M, Guo LB, Li XM, Bao JS, Ma LY (2015) QTLs for rice flag leaf traits in doubled haploid populations in different environments. *Genetics and Molecular Research* 14(2): 6786–6795
- Castillo-Davis CI, Mekhedov SL, Hartl DL, Koonin EV, Kondrashov FA (2002) Selection for short introns in highly expressed genes. *Nature Genetics* 31(4):415–418
- Cheong HS, Yoon DH, Kim LH, Park BL, Lee HW, Park BL, Choi YH, Chung ER, Cho YM, Park EW, Cheong IC, Oh SJ, Yi SG, Park TS, Shin HD (2006) Growth hormone-releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle. *BMC Genetics* 7:35–40
- Cho DS (1975) Studies on the productivity of individual leaf blade of paddy rice. *Korean Journal of Breeding Science* 18:1–27
- Cho YG, McCouch SR, Kuiper M, Kang MR, Pot J, Groenen JTM, Eun MY (1998) Integrated map of AFLP, SSLP, and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 97:370–380
- Dong Y, Kamiunten H, Ogawa T, Tsuzuki E, Terao H, Lin D, Matsuo M (2004) Mapping of QTLs for leaf developmental behavior in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 138:169–175
- Feng Z, Wu C, Wang C, Roh J, Zhang L, Chen J, Zhang S, Zhang H, Yang C, Hu J, You X, Liu X, Yang X, Guo X, Zhang X, Wu F, Terzaghi W, Kim SK, Jiang L, Wan J (2016) SLG controls grain size and leaf angle by modulating brassinosteroid homeostasis in rice. *Journal of Experimental Botany* 16(14): 4341–4253
- Fujino K, Obara M, Sato K (2014) Diversification of the plant-specific hybrid glycine-rich protein (HyGRP) genes in cereals. *Plant Science* 24:489
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25):15898–15903
- Grandori G, Cowley SM, James LP, Eisenman RM (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16:653–699
- Heang D, Sassa H (2012) Antagonistic actions of HLH/bHLH proteins are involved in grain length and weight in rice. *PLoS One* 7:e31325
- Hu WD, Zhang H, Jiang JH, Wang YY, Sun DY, Wang XS, Liang K, Hong DL (2012) Genetic analysis and QTL mapping of large flag leaf angle trait in Japonica rice. *Rice Scienc* 19(4):277–285
- Huang X, Feng Q, Qian Q, Zhao Q, Wang L, Wang A, Guan J, Fan D, Weng Q, Huang T, Dong G, Sang T, Han B (2009) High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Research* 19:1068–1076
- Huang X, Qian Q, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, Xia G, Chu C, Li J, Fu X (2009) Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics* 41:494–497
- Hunter KW, Crawford NPS (2008) The future of mouse QTL mapping to diagnose disease in mice in the age of whole-genome association studies. *Annual Review of Genetics* 42: 131–141
- Jang S, An G, Li HY (2017) Rice leaf angle and grain size are affected by the OsBUL1 transcriptional activator complex. *Plant Physiology* 173(1):688–702
- Jung KH, Dardick C, Bartley LE, Cao P, Phetsom J, Canlas P, Seo YS, Shultz M, Ouyang S, Yuan Q, Frank BC, Ly E, Zheng L, Jia Y, Hsia AP, An K, Chou HH, Rocke D, Lee GC, Schnable PS, An G, Buell CR, Ronald PC (2008) Refinement of light-responsive transcript lists using rice oligonucleotide arrays: evaluation of gene-redundancy. *PLoS ONE* 3:e3337
- Kim TS, He Q, Kim KW, Yoon MY, Ra WH, Li FP, Tong W, et al. (2016) Genome-wide resequencing of KRICE_CORE reveals their potential for future breeding, as well as functional and evolutionary studies in the post-genomic era. *BMC Genomics* 17:408
- Kobayashi S, Fukuta Y, Morita S, Sato T (2003) Quantitative trait loci affecting flag leaf development in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 53:255–262
- Kruglyak L (2008) The road to genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 9(4):314–318
- Kump B, Javornik B (1996) Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) population by RAPD markers. *Plant Science* 114:149–158
- Li J (2008) A novel strategy for detecting multiple loci in Genome-Wide Association Studies of complex diseases. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications* 4(2): 150–163
- Lipka AE, Tian F, Wang Q, Peiffer J, Li M, Bradbury PJ, Gore MA, Buckler ES, Zhang Z (2012) GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics* 28:2397–2399
- Ma X, Fu Y, Zhao X, Jiang L, Zhu Z, Gu P, Xu W, Su Z, Sun C, Tan L (2016) Genomic structure analysis of a set of *Oryza nivara* introgression lines and identification of yield-associated QTLs using whole-genome resequencing. *Scientific Reports* 6:27425
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology* 20:429–440
- Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan S, Eileen Dolan M, Cox NJ (2010) Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genetics* 6(4):e1000888
- Park HS, Ha KY, Kim KY, Kim WJ, Nam JK, Baek MK, Kim JJ, Jeong JM, Cho YC, Lee JH, Kim BK, Ahn SN (2015) Development of high-yielding rice lines and analysis of panicle and yield-related traits using doubled haploid lines derived from the cross between Deuraechan and Boramchan, high-yielding japonica rice cultivars in Korea. *Korean Journal*

- of Breeding Science 47:384–402
- Peng B, Kong HL, Li YB, Wang LQ, Zhong M, Sun L, Gao GJ, Zhang QL, Luo LJ, Wang GW, Xie WB, Chen JX, Yao W, Peng Y, Lei L, Lian XM, Xiao JH, Xu CG, Li XH, He YQ (2014) OsAAP6 functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice. *Nature Communications* 5:4847
- Perez-de-Castro AM, Vilanova S, Canizares J, Pascual L, Blanca JM, Diez MJ, Prohens J, Pico B (2012) Application of genomic tools in plant breeding. *Current Genomics* 13:179–195
- Sakai H, Kanamori H, Arai-Kichise Y, Shibata-Hatta M, Ebana K, Oono Y, Kurita K, et al. (2014) Construction of pseudomolecule sequences of the Aus rice cultivar kasalath for comparative genomics of asian cultivated rice. *DNA research* 21(4): 397–405
- Schatz MC, Maron LG, Stein JC, Wences AH, Gurtowski J, Biggers E, Lee H, et al. (2014) New whole genome de novo assemblies of three divergent strains of rice (*O. sativa*) documents novel gene space of aus and indica. *bioRxiv* doi:<http://dx.doi.org/10.1101/003764>
- Shabalina SA, Spiridonov NA (2004) The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome Biology* 5(4):105
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445(7130):881–885
- Su JJ, Pang CY, Wei HL, Li LB, Liang B, Wang CX, Song MZ, Wang HT, Zhao SQ, Jia XY, Mao GZ, Huang L, Geng DD, Wang CS, Fan SL, Yu SX (2016) Identification of favorable SNP alleles and candidate genes for traits related to early maturity via GWAS in upland cotton. *BMC Genomics* 17:687
- Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M (2010) Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:5792–5797
- Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, et al. (2013) MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene Pii. *New Phytologist* 200:276–283
- Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, Shimatani Z, Ohtake M, Nomura T, Jiang CJ, Dubouzet JG, Kikuchi S, Sekimoto H (2009) BRASSINOSTEROID UPREGULATED1, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the lamina joint in rice. *Plant Physiology* 151:669–680
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15:1749–1770
- Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, Ahmadi K, et al. (2008) Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *American Journal of Human Genetics* 82(1):139–149
- Weedon MN, Lettre G, Freathy RM, Lindgren GM, Voight BF, Perry JR, Elliott KS, et al. (2007) A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population. *Nature Genetics* 39(10):1245–1250
- Y H, Feng J, Zhang L, Zhang J, Mispan MS, Cao Z, Yang J, Beighley DH, Gu X (2015) Map-based cloning of qSD1-2 identified a gibberellin synthesis gene regulating the development of endosperm-imposed dormancy in rice. *Plant Physiology* 169:152–165
- Zhang LY, Bai MY, Wu J, Zhu JY, Wang H, Zhang Z, Wang W, Sun Y, Zhao J, Sun X (2009) Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and Arabidopsis. *Plant Cell* 21:3767–3780
- Zhang Z, Ersoz E, Lai CQ, Todhunter RJ, Tiwari HK, Gore MA, Bradbury PJ, Yu J, Arnett DK, Ordovas JM, Buckler ES (2010) Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics* 42:355–360

Supplementary Table 1 Frequency distribution of flag leaf angle according to the measured value in 273 rice accessions

Flag leaf angle	No. of accession
Erect (0° - 10°)	Bonggwang, Daesan Byeo, Keunseom, Suweon 347, Sodami, Deuraechan, Taebaeg Byeo, Yusin, Youngdeok, MS11, Saesangju, Hwaseonchal Byeo, Dongan Byeo, Saenuri, Honong, Jinheung, Munjang Byeo, CT9993-5-10-1-M, Ilmi Byeo, Goamy Byeo, Joun, Geongganghongmi, Wase Gingbouzu, Milyang 42, Mimyeon, Sura Byeo, Cheongan, Xi Gua Bai, Milyang 88, IR40, Chinnong, Junghwa Byeo, Gancheok Byeo, Anda Byeo, Gaya Byeo, Jungwon Byeo, Gangchan, Seokwang, Chupung Byeo (39)
	Cheongdo-donggok-4, Nongan Byeo, Mondonchalbyeo (Mongdonjaerae), IR38, Golyeong-2, Mihyang Byeo, Shindongjin Byeo, Geuru Byeo, Cheong Cheong Byeo, Danmi, Shinbaeg, Satbyeol Byeo, Koshihikari, Sobaeg Byeo, Samcheon Byeo, Manguem Byeo, Manchu Byeo, Hwangkeumbora, Hanareum, Sangmibyeo, Suan, Wolbaek, Cheongdam, Cheongnam, Samnam Byeo, Nongho Byeo, Cheonga, Jinbaek, Urasan, Syarebye-61-1-B, Syalebye-163-1-B, Gopum, Baegyong Byeo, Milseong, Dobong, Seomjin Byeo, Saegye-hwa, Muando, Sangju Byeo, Younghojinmi, Palgoeng, Dongbo, Huindadak, Yeongpung Byeo, Chungdo Hwayang 14, Palgong Byeo, Chilbo, Junam Byeo, Hwacheong, Seolhyangchal Byeo, Yangjo Byeo, Seonhyangheukmi, Jungsaenggold, Saecilm, Neul Byeo, Donghae Byeo, Wu Cyue, Pocheon Jangmang Mebye, Suweon 159, Tchampa, Dongjin Chal Byeo, Samgwang, Sambaek Byeo, Geumo Byeo, Hwangkeumnuri, Pungok, Hwanggeumnodel, Naengjo, Dular, Jejubukjeju-2002-550, Jangsung 1, Boramchan, Jopyeong, Inwol Byeo, Haepyeong Byeo, Nampyeong Byeo, Hangangchal, Dunnae Byeo, Hanmaeum, Syalebye-94-1-B, Bala, Mala, Chungsongaengmi 4, Haiami, Hopum, Hwaseong Byeo, Nakdong Byeo, Dasan Byeo, Jinmi Byeo, Naepung Byeo, Seoan Byeo, Yeonghae Byeo, Gye-hwa Byeo, Manmi, Norinmochi 1, Seohae, Hyangmi Byeo 1, Kwanak Byeo, Sukwang, Seorianjeunbaengi, Seon, Norin 22, Jejubukjeju-2002-171, Jejubukjeju-2002-420, Dharial, Danyang-7, Hwaseong-5, Gou 405, Chungdo 23, Chucheon Byeo, Samgang Byeo, Jeogjinju Byeo, Juan Byeo, Sinseonchal Byeo, Nampung Byeo, Dami, Yangmyeon, Jinbu Byeo, Hopyung, Heugkwang Byeo, Taebong Byeo, Suweon 255, Sungju 3, Goun, Seolemi, Saenara, Paldal, Heugseol, Jeongjionghwa, Rathal, Jejubukjeju-2002-99, Jejubukjeju-2002-521, Pyeongbuk 3, Hwayeong Byeo, Daelip Byeo 1, Sangnambat Byeo, Pungmi, Boseogchal, Gangbaek, Hongjinju, Namseon 126, Manweol Byeo, Waikyakushi, Suhyeonghando, Ilpum Byeo, Milyang 23, Yeongnam Byeo, Seonam Byeo, Newrex, Binato, Yung Yuen Chuen Zim, Daegu Damti 6-2, Guechang 15, Xiao zao huang, Dongjin Byeo, Sinunbong Byeo, Baeksami, Unkwang, Giho Byeo, Sobi Byeo, Nokwonchal, Namseon 52, Jejubukjeju-2002-340, Chiem Chank, Red Rice, Hawm Supan, Hsiang-Ha-Tsan, Jejubukjeju-2002-561, Sahak, Nian Chi Shi, Soonchun 5, Namseon 34, Odae Byeo, Nokyang, Hoban, Agbede, Iri 336, Danyang 9, Heugnam Byeo, Onnuri, Sinmyungheugchal, Seolag Byeo, Xiao Bai Mang Sue Dao, Di jiao wu jian, Bellardone, Magnolia, Chih-Tsao-He, Nam II (188)
Semierect (10° - 30°)	
Horizontal (31° <)	Pukhi, Zilanica, Unbong Byeo, Mushkan 41, Danyang-38, British Honduras Creale, Tongil, Dudo, Jinbuol Byeo, Aranghangchal Byeo, Ssal Byeo 22, Belle Patna, Hatadani, Upland, Avangard, Qua 77 Wuan-Dau, Golyeong-6, Jejubukjeju-2002-115, Yang-Sha-Tsan, Chungdo Hwayang 12, Hwasin 1, Doan Guang Hwa Lue, Yupul, Moroberekan, Taichung-Woo-Tsan, Kagi, Nongbaeg, Heugjinju Byeo, Saducho, Tsong-Gan-Shun, Spin Mere, Incheonkangwasujip-16, Jwiipari Byeo, Anbaw C7, San-Li-Shun, Sung Pan Tao, Ssalbye 16, Victoria F.A, Keng Chi Ju, Debzera, Bikom, Tai Mochito, Cartuna, Akaine, Okcheong, Tun Sart (46)