

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000748-01

쌀 원산지 검정을 위한 신속 유전자분석 기술 개발
(Development of rapid genetic testing method for
rice origin authentication)

쌀 원산지 검정기술의 유용성 검증 및 기술 보급
(Validation and dissemination of genetic testing method
for rice origin authentication)

(주)코젠바이오텍

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “쌀 원산지 검정을 위한 신속 유전자분석 기술 개발에 관한 연구” 과제 (협동과제 “쌀 원산지 검정기술의 유용성 검증 및 기술 보급에 관한 연구”) 의 보고서로 제출합니다.

2011 년 2 월 1 일

주관연구기관명 : (주)코젠바이오텍

주관연구책임자 : 남 용 석

연 구 원 : 김 수 복

연 구 원 : 백 묘 아

연 구 원 : 홍 성 원

연 구 원 : 최 선 미

연 구 원 : 김 진 혁

협동연구기관명 : 동국대학교 식품공학과

협동연구책임자 : 홍 광 원

요 약 문

I. 제 목

쌀 원산지 검정을 위한 신속 유전자분석 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근에는 가공용 쌀 뿐만 아니라 밥쌀용 쌀까지 수입이 되면서 일부 낮은 품질의 수입쌀을 국내 고품질 쌀로 속여 팔거나 혼합해서 판매하여 소비자를 속이는 등, 국내 고품질 브랜드 쌀에 대한 소비자의 인식을 나쁘게 할 가능성이 커지고 있다. 현재 쌀품종 및 원산지 검사방법은 모두 국내산 벼 품종에만 제한되어 있으므로 수입산 쌀에 대한 원산지 확인에는 부적절한 실정이다. 이에 투명한 유통질서를 확립하고 소비자에게 알권리를 제공하며 우리 쌀의 고품질화와 경쟁력을 확보하기 위해서 다양한 국내외 품종판별 기술의 개발이 절실한 상황이다. 즉, 수입쌀과 국내산 쌀 품종 구분을 위한 신속하고 간편화된 과학적인 원산지 DNA 검정기술을 개발함으로써 농민과 농가를 보호하는 것 뿐 아니라 시장의 신뢰성을 확립하는 것이 요구된다.

본 연구개발에서는 이러한 문제점들을 해결하기 위한 방안으로 국내산 쌀 뿐만 아니라 수입산 쌀 품종을 확인하기 위한 새로운 유전자 검정방법을 개발함과 동시에 검정결과의 정확성을 확보하고 노동력과 검사시간 소모를 최소화하기 위한 분석 시스템을 구축하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

쌀 원산지 검정을 위한 신속 유전자분석 기술 개발을 위하여 국내 재배 품종 및 수입 품종을 확보하여 유전정보를 분석하였다. 이를 바탕으로 각 품종을 구별할 수 있는 SNP 마커들을 선별하여 특이적 프라이머 및 프로브를 개발하고 단일 Real-time PCR 방법을 확립하였다. 이어서 동시 다중 마커 분석용 multiplex Real-time PCR 방법을 최적화하였다. 또한, 결과 판정의 정확도 향상, 노동력 소모 및 검사시간의 단축, 그리고 검사법의 자동화를 위하여 유전자 분석 데이터를 연동하여 결과를 판정할 수 있는 소프트웨어도 함께 개발하였다.

개발된 새로운 유전자분석 기술을 이용하여 국내 유통되고 있는 브랜드 쌀 모니터링 및 중국 및 외국산 쌀의 검정을 통하여 개발된 원산지 검정기술의 유효성을 검증하였으

며, 각 지방 단위별 농산물품질관리원, 농업기술원, 농업기술센터 등을 대상으로 기술보급 워크숍을 개최하였다. 또한, 개발된 쌀 원산지 검정기술을 적용한 Real-time PCR 키트의 시제품을 제작하고 상용화하였다.

IV. 연구개발결과

쌀 원산지 검정기술 개발을 위하여 국립농산물품질관리원 시험연구소와 경기도 여주군 농업기술센터로부터 분양받은 국내산 374 개 품종과 수입산 249개 품종을 확보하였다. 이들 시료로부터 최적의 DNA를 추출할 수 있도록 CTAB 법 및 silica column을 이용한 추출법을 비교, 적용하여 원산지 유전자 검사법의 쌀 DNA 추출법을 최종 개발, 선정하였다.

수집한 국내산 374개 및 수입산 249개 쌀 품종의 순도 및 품종 신뢰성 확인을 위하여 국내산 품종구별에 사용되고 있는 9개의 SNP 마커를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 결과 각 품종별로 80% 이상의 순도를 나타내는 시료만을 선발하였는데, 확보한 국내산 374개, 수입산 249개의 시료 중 국내산 286개 품종, 수입산 227개 품종이 이에 해당하는 것으로 확인하고 원산지 검정용 표준시료로 사용하였다.

일차적으로 21개의 SNP 마커를 후보군으로 선정하고 이에 대한 특이적 프라이머 및 프로브 세트를 개발하여 위 513개 품종을 대상으로 Real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 국내산과 수입산 품종을 구별할 수 있는 원산지 검정법에 가장 적합한 15개의 SNP 마커를 최종 선발하였다. 선발된 15개의 SNP 마커는 DK2394, DK50, DK2401, DK1412, DK17-1, DK34, DK63, DK560, DK2171, DK2708, DK1361, DK1123, DK601, DK2511, DK600 이다. 품종 및 원산지에 대한 판정을 용이하게 하기 위해 이들 15개의 각 마커에 score를 부여함으로써 각 품종 당 증폭된 마커에 대한 score의 합으로 각각을 구별할 수 있게 하였다.

이와 같이 쌀 원산지검정을 위하여 최종적으로 15개의 마커를 선별하였으며, 각 마커에 대하여 개발한 프라이머와 프로브 세트를 이용하여 single Real-time PCR 방법을 확립하였다. 이를 기반으로 본 연구개발의 최종 목표인 multiplex Real-time PCR 법을 개발하고자 15개 마커를 세 개씩 조합한 멀티플렉스 세트를 구성하고 각 조합 내 프라이머 및 프로브들의 간섭현상이 없으며 single Real-time PCR 결과와 비교하여 delta Rn 값, Ct 값 및 amplification plot 등이 유지될 수 있도록 다중 마커 조합을 결정하고 최적의 반응 조건을 확립하였다.

쌀 원산지 검정 시 한 개의 시료로부터 취한 24립의 쌀 낱알을 각각 15개의 SNP 마커로 Real-time PCR 을 수행할 경우 총 320개 이상의 데이터가 발생하게 되는데, 이

모든 데이터를 실험자가 직접 확인하고 판정하려면 많은 시간이 필요하며 오류를 범할 우려가 있다. 따라서 방대한 양의 수치 데이터를 자동화된 방식으로 일괄적으로 분석하여 벼 품종을 판별하고 그 혼입률을 계산할 수 있도록 자동 분석 소프트웨어를 개발하였다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

본 연구에 의하여 개발된 쌀 원산지 검정용 신속 유전자분석기술은 Real-time PCR 장비별 최적화 과정을 거쳐 그 적용성을 확인하였으며, 현재 쌀 원산지 관리 감독기관인 국립농산물품질관리원 원산지 품종에 대한 데이터베이스와의 비교를 통하여 일치하는 결과로 그 유효성을 확인하였다.

개발기술을 이용하여 관련 기관으로부터 획득한 시료 및 유통 브랜드 쌀 시료를 대상으로 원산지표시제 현황을 점검한 결과, 국내 유통 중인 주요 브랜드 쌀에 대한 모니터링 결과 본 검정기술에 의하여 해당품종이 모두 구별되었으며, 중국산 쌀의 경우에도 모두 국내산 품종과 구분되어 검정되었음을 확인하였다.

개발된 쌀 DNA 추출법 및 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 기술의 표준화를 위하여 사용자에게 최적화된 매뉴얼을 제작하였다. 또한, 'One-Stop Analysis'가 가능하도록 최적의 DNA 추출키트를 개발, 키트로 상용화하였으며 쌀 원산지 검정용 유전자 분석키트인 Multiplex Real-Time PCR 키트를 개발, 상용화 완료하였다.

또한, 기술보급을 위하여 지방자치단체 별 농업기술센터 및 농업기술원을 대상으로 기술이전 워크숍 및 방문교육을 수시 개최하였으며, 향후 연 4회 이상의 정기교육 및 수시교육을 실시할 계획이다.

본 연구 과제를 통하여 개발된 쌀 원산지 검정용 Real-time PCR Kit인 Power Chek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit는 원산지 검정 관리 감독 기관인 국립농산물품질관리원의 시험연구소에서 현재 사용하고 있는 원산지 검정법과의 비교 검증 후 표준 검정법으로 채택할 것이며, 해당 기술이 고시되면 본격적으로 제품을 홍보하고 기술영업을 시행할 계획이다.

SUMMARY

In recent years, it has been suggested that imported or inferior varieties of rice are being mixed in with rice labeled and circulated as domestic varieties with high quality. National Agriculture Products Quality Management Service had therefore revised the labeling law based on the so-called Standards for Quality Labeling of Rice introduced. However, to ensure fair labeling of rice origin and protect farmer and agriculture, it is additionally necessary to identify scientifically the international rice varieties.

In the present study, in order to develop genetic testing method for rice origin, 374 varieties of Korean domestic rice and 249 varieties of foreign rice were collected and to confirm the purity of variety they were tested by Real-time PCR assay using 9 SNP markers which is a standardized method of rice variety identification in Korea. As results, 286 domestic varieties and 227 foreign varieties that the ratio of single rice cultivar was over than 80 %, were selected and used as reference samples in this study. We examined the suitable methods of DNA extraction from rice grains and finally adopted new DNA extraction method which have been modified and optimized by using silica column. To distinguish rice origin, 21 SNP markers were candidated and the specific primer and probe sets for the markers were developed. Through the performance of Real-time PCR assay using 21 SNPs, 15 SNP markers of them were able to effectively identify rice origin authentication. The following 15 markers were finally selected: DK2394, DK50, DK2401, DK1412, DK17-1, DK34, DK63, DK560, DK2171, DK2708, DK1361, DK1123, DK601, DK2511 and DK600. As specific scores were given to each marker, the sum of scores for amplified marker could distinguish variety and origin of rice. To allow multiplex Real-time PCR assay, specific primers and TaqMan probes labeled with the various fluorescent dyes were designed. We've successfully distinguished the origin of above 513 international rice varieties using developed multiplex Real-time PCR method. Furthermore, automatic Real-time PCR analysis software has been developed which can analyze data extracted after Real-time PCR run. The entire procedure can be completed in less than

5 hours including DNA extraction. In addition, we've validated the effectiveness of developed assay through the monitoring test for selling brand rice in Korea and China and completed the commercialization as PowerChek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit.

In conclusion, we have described a rapid genetic testing method for rice origin authentication using multiplex Real-time PCR assay. This new assay will provide us rapid, simple, specific, labor saving and effective monitoring method and be efficiently applied to the standardized method for rice origin authentication in Korea.

CONTENTS

Part I. Introduction	11
Chapter 1. The Need for Research and Development, Research objectives and Goals	11
Part II. Current Status of Technical Development	15
Part III. Results of Research and Development	18
Chapter 1. Introduction	18
Chapter 2. Rice Materials of Domestic and International cultivar	19
Chapter 3. Selection of Developed SNP Markers	26
Chapter 4. DNA Extraction Method	43
1. Sampling	43
2. CTAB Method	43
3. Silica Column Method	44
4. Development of the Optimized DNA Extraction Method from Rice	44
Chapter 5. Development and Optimization of Real-time PCR method for Rice Origin Authentication	46
1. Selection of Collected Rice Cultivar	46
2. Development of Single Real-time PCR Method Optimized to Each SNP Marker	51
3. Marker Selection	53
4. Development and Optimization of Multiplex Real-time PCR Method	81
Chapter 6. Development of Auto-analytical Software	84
1. Extraction of Real-time PCR Data	84
2. Specification of Developed Software	84
3. Manual for Software	86
Chapter 7. Validation of Effectiveness of Developed New Method for Rice Origin Authentication	89
1. Optimization to Various Real-time PCR Instruments	89
2. Validation of Effectiveness	96
3. Standardization of Developed New Method	105
4. Monitoring Test for Rice Origin Authentication	110

Chapter 8. Development and Commercialization of Multiplex Real-time PCR Kit for Rice Origin Authentication	114
1. DNA Extraction Kit	114
2. Multiplex Real-time PCR Kit	117
Part IV. Target Achievement Ratio and Contribution Ratio	120
Chapter 1. Target Achievement Ratio of Research Goals	120
1. Development and Selection of SNP Markers and Specific Primer/Probe Sets	120
2. Validation of Effectiveness for Developed Primer/Probe Sets	120
3. Development and Commercialization of Rapid Genetic Testing Technology for Rice Origin Authentication	121
4. Validation of Effectiveness and Dissemination of Rapid Genetic Testing Technology for Rice Origin Authentication	121
Chapter 2. Contribution Ratio	124
1. Technical Aspects	124
2. Economical and Social Aspects	124
Part V. Performance of R&D and Applicable Planning	125
1. Product Commercialization and Standardization of Developed Technology	125
2. Planning for Dissemination of Developed Technology	125
3. Applicable Planning for Additional and Other Researches	126
4. Patent	126
Part VI. Foreign Technical Information Gathered on Research	128
Part VII. Reference	129

Appendix

1. Real-time PCR Data of Rice Origin Authentication for 513 Rice Varieties
2. Results of Monitoring Test for Brand Rice Sold in Korean Domestic Market and Chinese Market

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구개발의 필요성, 목적 및 범위	11
1. 연구개발의 필요성	11
2. 연구개발의 목적	12
3. 연구개발의 범위	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절 서설	18
제 2 절 쌀 원산지 검정용 유전자 분석기술 개발을 위한 국내외산 시료 확보	19
제 3 절 SNP 마커 개발 및 선정	26
제 4 절 DNA 추출	43
1. 시료의 전처리	43
2. CTAB 법	43
3. Silica column 법	44
4. 최적의 쌀 DNA 추출법 선정	44
제 5 절 원산지 검정용 Real-time PCR 방법 개발 및 최적화	46
1. 수집한 국내외산 쌀 품종 선발	46
2. 마커 별 최적화된 single Real-time PCR 법 개발	51
3. 원산지 검정을 위한 마커 선발	53
4. 쌀 원산지 검정을 위한 multiplex Real-time PCR 법 개발	81
제 6 절 자동분석 소프트웨어 개발	84
1. Real-time PCR 데이터 추출	84
2. 자동분석 소프트웨어의 스펙	84
3. 자동분석 소프트웨어 사용법	86
제 7 절 쌀 원산지검정용 신기술의 유효성 검증	89
1. 기기별 최적화	89
2. 개발된 시스템의 유효성 검증	96
3. 개발된 쌀 원산지 검정법의 표준화	105

4. 쌀 원산지 모니터링 검사	110
제 8 절 쌀 원산지검정용 신속 유전자분석키트 개발	114
1. 쌀 DNA 추출키트 개발	114
2. 쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 키트 개발	117
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	120
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	120
1. 쌀 원산지 검정용 SNP 마커 및 특이 프라이머, 프로브 세트의 개발	120
2. 개발된 원산지검정용 프라이머, 프로브 시스템의 유용성 검증	120
3. 쌀 원산지 검정용 신속 유전자 분석기술 개발 및 실용화	121
4. 쌀 원산지 검정용 신기술의 유용성 검증 및 기술보급	121
제 2 절 관련 분야에의 기여도	124
1. 기술적 기여도	124
2. 경제, 사회적 기여도	124
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	125
1. 개발 기술의 상용화 및 표준 검정법 등재	125
2. 개발기술의 보급 계획	125
3. 추가 연구 및 타 연구에 활용계획	126
4. 특허	126
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	128
제 7 장 참고문헌	129

[별책 부록]

부록 1. 국내외 513 품종에 대한 Real-time PCR 결과

부록 2. 국내 유통 브랜드 쌀 및 중국 유통 쌀 모니터링 검사 결과

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성, 목적 및 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 경제, 사회적 측면

쌀은 오랜 역사를 거쳐 많은 사회에서 음식 수단과 경제뿐 아니라 문화와도 친숙하게 관련되어 있으며, 30억 인구가 그 문화와 전통, 잠재성 등을 공유하고 있는 주곡작물이다. 특히 우리나라는 쌀수입시장 개방 압력에 따라 수입쌀에 대하여 우리 농민과 농업을 보호하기 위하여 지속적으로 국내 쌀의 경쟁력을 높이기 위한 정책들을 전개하고 있다.

정부는 쌀품질 고급화를 유도하고 우수한 품종을 양성하며 투명한 거래질서 확립을 목적으로 벼의 품종에 대한 정보를 포장지에 표시 하도록 하는 '포장양곡표시제'를 2004년도 1월부터 실시하여 품목, 생산연도, 중량, 품종, 원산지, 도정년월일, 생산자, 가공자 또는 판매원 등의 내용을 의무적으로 표기하도록 하고 있다. 또한, 2007년 1월부터 포장양곡표시제 개정안을 시행하여 쌀 현미에 "품종 명"을 표시하였을 경우 품종의 순도가 80% 이상, "계통 명"을 표시하였을 경우에는 계통의 순도가 90% 이상이어야 한다고 규정하고 있으며 해마다 브랜드쌀 평가제를 실시하고 있다.

이러한 제도적 장치는 쌀 품질에 대한 소비자의 알권리 충족을 위한 것이며, 생산과 소비, 투명한 유통과정의 확립을 목적으로 하고 있다. 이와 같이 쌀의 품종을 식별하는 것이 매우 중요한 사안이 되었으며 과학적 검정 기술이 절실히 필요하게 되었다. 이에 국립농산물품질관리원은 국내 벼 품종 식별을 위한 유전자 검사기술을 개발하여 표준화 검사방법을 고시하였으며 쌀·현미품종검정기관을 지정하여 운영, 감독하고 있다. 본 연구의 주관기관인 (주)코젠바이오텍은 2007년 2월, 국립농산물품질관리원으로부터 쌀품종검정기관으로 지정되어 국내 79 품종이상의 검정서비스를 수행하고 있다.

그러나 우리 쌀 품질 향상과 보호를 위한 여러 정책들이 적극적으로 전개되고 있음에도 불구하고 육안으로 식별 불가능한 중국 및 수입쌀에 대한 우리 쌀의 원산지 검정 기술은

아직 마련되어 있지 못한 실정이다. 최근에는 가공용 쌀 뿐만 아니라 밥쌀용 쌀까지 수입이 되면서, 일부 낮은 품질의 수입쌀을 국내 고품질 쌀로 속여 팔거나 혼합해서 판매하여 소비자를 속이는 등, 국내 고품질 브랜드 쌀에 대한 소비자의 인식을 나쁘게 할 가능성이 커지고 있다.

따라서 쌀 원산지 검정기술을 통하여 투명한 유통질서를 확립하고 소비자에게 알권리를 제공하며 우리 쌀의 고품질화와 경쟁력을 확보해야 하는 매우 중요한 시점이다. 이러한 목적을 위해서, 과학적인 원산지 DNA 검정기술을 개발함으로써 농민과 농가를 보호하는 것 뿐 아니라 시장의 신뢰성을 확립하는 것이 절실히 요구된다.

나. 기술적 측면

국내 품종의 고품질 쌀 브랜드가 자리 잡히기 위해서는 다양한 품종판별 기술의 개발이 절실한 상황이다. 즉, 수입쌀과 국내산 쌀 품종 구분을 위한 신속하고 간편화된 실시간 유전자 분석기술을 통해 국내 품종의 고품질 쌀 브랜드를 지킬 수 있다.

현재 쌀품종 유전자 검사방법은 SSR 마커를 이용한 방법과 SNP 마커를 이용한 판정 방법, 두 가지로 분류할 수 있다. SSR 마커를 이용한 PCR 식별법은 특이적 단일 밴드를 형성할 수 없어 혼합된 품종들로부터 각각의 품종을 식별하기가 어렵고, 분석 결과의 판정이 명확하지 않다는 단점이 있기 때문에 SNP 마커를 이용한 판정법을 표준화 검정방법으로 널리 사용하고 있다. 그러나 SNP 마커를 이용한 검사법도 PCR 산물에 의한 오염 발생 및 노동력과 검사시간의 소모 등이 그 문제점으로 지적되고 있다.

또한, 이와 같은 품종 검정법들은 모두 국내산 벼 품종에만 제한되어 있으므로, 수입산 쌀에 대한 원산지 확인에는 부적절한 실정이다. 본 연구개발에서는 이러한 문제점들을 해결하기 위한 방안으로 국내산 쌀 뿐만 아니라 수입산 쌀 품종을 확인하기 위한 새로운 유전자 검정방법을 개발함과 동시에 검정결과의 정확성을 확보하고 노동력과 검사시간 소모를 최소화하기 위한 자동화 분석 시스템을 구축하고자 한다.

2. 연구개발의 목적

본 연구개발은 육안으로 식별 불가능한 중국산 및 수입산 쌀과 국내산 쌀에 대한 신속하고 간편화된 DNA 식별법을 개발하며, 현재 벼 원산지검정에 사용되고 있는 검사시

시스템의 혁신적 개선 및 업그레이드를 통해 검사시스템의 선진화에 기여하고자 한다. 또한, 쌀 원산지 검정용 신속 실시간 유전자 분석기술을 개발하여 검사 시간 및 노동력 소모를 최소화할 수 있도록 한다. 궁극적으로 쌀 원산지 구별을 위한 새로운 유전자 검정 기술을 개발함으로써 수입쌀 개방에 대한 우리쌀 품질의 국제경쟁력 강화와 농민 보호 및 대 국민 신뢰성확보에 기여함을 목적으로 한다.

3. 연구개발의 범위

쌀 원산지 검정을 위한 신속 유전자분석 기술 개발을 위하여 국내 재배 품종 및 수입 품종을 확보하여 유전정보를 분석하였다. 이를 바탕으로 각 품종을 구별할 수 있는 SNP 마커들을 선별하여 특이적 프라이머 및 프로브를 개발하고 단일 Real-time PCR 방법을 확립하였다. 이어서 동시 다중 마커 분석용 multiplex Real-time PCR 방법을 최적화하였다. 또한, 결과 판정의 정확도 향상, 노동력 소모 및 검사시간의 단축, 그리고 검사법의 자동화를 위하여 유전자 분석 데이터를 연동하여 결과를 판정할 수 있는 소프트웨어도 함께 개발하였다.

가. 쌀 원산지 검정용 마커 선별 및 특이적 프라이머, 프로브 세트 개발

확보한 200 여종의 수입 품종 및 300 여종의 국내 품종을 대상으로 이들을 식별할 수 있는 SNP 마커를 개발, 선정하였으며, 마커 특이적 프라이머 및 프로브 세트를 개발하였다. 개발된 마커별 프라이머 및 프로브 세트들을 이용하여 Real-time PCR을 수행하고, 이들 중 최적의 세트를 선별하여 단일 Real-time PCR 방법을 확립하였다.

나. 쌀 원산지 검정용 신속 유전자 분석기술 개발

각 단일 마커를 대상으로 선별된 프라이머 및 프로브 세트를 사용하여 동시 다중 마커 분석용 multiplex Real-time PCR 방법을 개발하였으며, 다중 검사 조건을 최적화하기 위하여 마커 별 다양한 형광표지인자 세트를 구성하였다.

세트로 구성된 각 마커들을 이용하여 Real-time PCR 장비 별, PCR Mastermix 내의 Rox reference dye, $MgCl_2$ 농도 조절 및 PCR 반응액 조성 과 온도 조건 등을 조절하여 검정 시스템을 최적화 하였다.

다. 원산지 검정용 자동 분석 소프트웨어 개발

Real-time PCR 수행 후 추출되는 데이터를 분석하여 자동으로 결과를 판정 할 수 있는 소프트웨어를 개발하였다. 또한 소프트웨어를 통한 수입품종의 확인 위하여 국산 품종의 유전자 데이터베이스를 구축하였다.

라. 검정법의 유효성 검증

국내 유통되고 있는 브랜드 쌀 모니터링 및 중국 및 외국산 쌀의 검정을 통하여 개발된 원산지 검정기술의 유효성을 검증하였다.

마. 쌀 원산지 검정기술의 실용화 및 기술 보급

개발된 쌀 원산지 검정기술을 적용한 Real-time PCR 키트의 시제품을 제작하였다. 또한, 각 지방 단위별 농산물품질관리원, 농업기술원, 농업기술센터 등을 대상으로 기술 보급을 위한 워크숍을 개최하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

벼는 화본(*Gramineae*)과 벼속(genus *Oryza*) 식물로서, 국제 미작연구소(IRRI, Int'l Rice Research Institute)에 의하면 60,000여종이 있는 것으로 알려져 있다. 2004년 농림부의 보고에 따르면, 국내에는 정부에서 공급한 113개 품종과 195개 육종 품종이 있다. 이들 국내산 쌀과 함께 주로 중국산 수입쌀이 유통되고 있으며, 새로운 수입 품종들이 지속적으로 유입되고 있다. 쌀은 식물체의 외형이 유사하여 육안식별이 불가능 할 뿐 아니라 근연간 교잡으로 인한 품종 육성 등으로 인하여 타 작물에 비하여 유전자형이 거의 동일하기 때문에 식별법 개발에 어려움이 있다.

각 국의 우수 품종 개발 및 분자유종을 위한 목적으로 벼 품종을 식별하기 위하여 DNA 마커를 이용한 많은 연구들이 진행되었다. 초기에는 RAPD(random amplified polymorphic DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism)와 마이크로세틀라이트(microsatellite)가 품종 식별에 사용되었다. 예로, Wang 등의 RFLP(restricted fragment length polymorphism) 마커를 이용한 품종 식별 방법(Wang, Z.Y., Tanksley, S.D. 1989 L. Genome. 32, 1113-1118), Ryu의 단백질 모세관 전기영동 방법을 이용한 품종 식별 방법(Ryu, D.J. 1998 J. Food Science and Nutrition. 3, 43-347), 6개의 마이크로세틀라이트 마커를 이용한 유전자 지도에서의 위치 확인으로 자포니카 벼 51개 품종의 식별 방법(Ji, H.S. et al., 1998 Korean J. Breed. 30, 350-360) 등이 보고되었으며, RAPD, 마이크로세틀라이트, STS(sequence tagged site), 및 PCR(polymerase chain reaction) 방법을 이용한 국내산 40개의 품종 식별 방법과 각 방법의 장단점이 비교되기도 하였다(Jeong O.Y. et al., Korean 1998 J. Breed. 30, 136-137). 아울러, RAPD와 마이크로세틀라이트를 이용한 31개 벼 품종의 식별 방법(Kwon, S.J. et al., 1999 Korean J Crop Science 44, 112-116), 화상분석기술을 이용한 벼 품종의 식별 방법 Kwon, S.J. et al., 1998 Korean J Crop Science 43, 33-34)들도 보고되었으나 이러한 식별 방법들과 이미지 기술은 특이적인 단일 밴드를 형성할 수 없으므로, 혼합된 품종들로부터 각각의 품종을 식별하기가 어렵고, 분석 결과를 논의하기가 어려운 단점이 있다. 또한, 어려운 실험과정 그리고 낮은 재현성 등의 문제가 있어 표준화된 방법으로 사용하기에는 어려움이 있다.

일본은 벼 계놈 프로젝트의 중추적 역할을 수행하였으며, 이에 따라 방대한 유전자 정보를 기반으로 농림수산성에서 개발한 SSR 마커를 이용한 품종검정법이 표준화 방법으로 고시되어 있다. 이에 일본의 VisionBio 사는 일본 내 210 품종 이상의 벼를 일반

PCR 방법을 이용하여 구분하는 검정서비스를 수행하고 있다. 이 외에 Shirasawa, K. 등은 2007년 SNP 마커를 이용한 품종 검정법을 *Theoretical and Applied Genetics* 에 보고하였는데 SNP의 차이를 이용하여 품종을 검정하는 방법으로 PCR-RF-SSCP를 제안하고 있다. 그러나 이 논문의 검정대상은 일본 품종으로 목표하는 SNP의 위치에 차이점이 있다. 또한, 같은 해 Ohtsubo, K. 등은 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 에 14개의 STS-primer를 이용한 PCR을 수행하여 일본 내 60여 품종을 구별하는 방법을 게재하였다. 이와 같이 일본의 연구실적은 본 “쌀 원산지 검정을 위한 신속 유전자 분석기술”인 대한민국 고유 벼 품종과 중국산 및 외산을 포함한 쌀품종에 대한 원산지 다중분석기술과 중복되는 부분이 없다. 또한 다중분석데이터에 대한 자동연동분석프로그램까지 개발한다는 측면에서 매우 독창적이며 차별화된 기술이라 판단된다.

2007년 대한민국의 국립농산물품질관리원 연구진에 의하여 발명, 등록된 특허(등록번호 100713669)는 벼 품종 검정을 위하여 SNP 마커를 발굴한다는 점에서 제안기술개발의 모태가 된다. 이 발명은 9개의 SNP 마커를 개발하여 국내산 주요 27품종에 대한 품종을 검정하는 방법으로 일반 PCR 방법을 사용하였다. 그러나, 상기한 방법은 1개의 벼 시료를 검사하였을 경우, 무작위적으로 선별된 24립의 벼(또는 쌀)로부터 각각 추출된 24개의 DNA를 주형으로 하여 9가지의 SNP 분석용 프라이머로 쌀 내재유전자를 포함하여, 총 240번 이상의 PCR 반응을 수행하여야 한다. 아울러, PCR 종료 후, 240개의 PCR 산물에 대하여 27 웰 아가로스 젤 10장의 전기영동이 요구되며, 1인의 검사원이 3일간 수행해야 하는 등 검사시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.

또한, 우리나라의 (주)솔젠트 사에서는 위 9개의 SNP 마커를 동시에 분석할 수 있는 multiplex PCR 방법을 개발하여 상용화하였는데, 이 방법은 일반 PCR 법을 적용하고 있어 PCR 산물에 의한 오염 및 전기영동 과정 추가, 노동력 및 시간 소모의 측면에서 다소 불리한 것으로 알려져 있다.

이러한 한계를 극복하고자 본 연구개발을 주관하고 있는 (주)코젠바이오텍은 국립농산물품질관리원과 함께 2007년에 쌀품종 검정을 위한 실시간 유전자분석기술을 공동 개발하였으며, 2010년 발명특허를 획득하였다(등록번호 100956323). 본 발명은 9개의 SNP 마커를 동시에 분석할 수 있는 multiplex Real-time PCR 방법으로 70 품종 이상의 쌀을 검정할 수 있으며 국립농산물품질관리원의 표준화된 검정법으로 고시, 상용화하였다. 이와 더불어 본 연구진은 10개의 마커를 동시에 multiplex PCR 하여 자동전기영동장치를 이용하여 분석하는 쌀 품종 검정법을 발명하여 특허 등록한 선행연구가 있다(등록번호 100974264).

이와 같이 유전자를 이용한 품종 식별법은 RFLP, RAPD, SSR, SNP 등의 방법이 제시되어 있으며 현재 SNP법을 이용한 원산지식별법이 쌀 원산지 검정법으로 적용되고

있다. 그러나 원산지를 구별할 수 있는 품종의 수가 적고 새롭게 수입되고 있는 품종에 대한 검정법이 부재한 실정이다.

본 연구개발에 의하여 발명된 신기술은 국내산 및 외산 쌀 품종을 대상으로 여러 개의 유전자 마커를 실시간으로 동시에 검사할 수 있으며 전 과정을 자동화 및 간편화시킴으로써 분석시간 감소와 노동력 집약을 해소할 수 있다는 점이 장점으로 꼽힐 수 있다. 또한, 시험 후 Real-time PCR 기기로부터 추출되는 데이터를 자동연동 프로그래밍하여 판정함으로써 결과의 신뢰성과 간편성을 극대화 시켜 상용화하였다

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서설

SNP는 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이로 염기의 결손(Deletion), 삽입(Insertion) 또는 치환에 의해 발생하며 질병 진단, 약물 개발, 동·식물 등을 포함한 다양한 종에서 유전자 분석, 분자유종, 품종 구분용 분자 마커로 널리 사용되고 있다.

SNP 마커를 이용하여 유전자를 분석하는 방법에는 allele specific PCR, PCR-SSCP, PCR-RFLP, Sequencing, Pyrosequencing 등이 있는데, conventional PCR 방법의 경우 PCR 산물에 의한 오염이 발생할 수 있는 문제점이 있으며, 염기서열 분석의 경우 정확한 분석을 수행할 수 있으나 실험의 번거로움과 노동력 및 시간의 소모가 크다는 단점이 있다.

최근에는 PCR 후 전기영동 과정이 필요 없으며, 각 SNP allele에 특이적인 probe 및 primer를 사용하여 보다 신속하고 정확하게 SNP를 분석할 수 있는 Real-time PCR 방법이 널리 사용되고 있다. 특히 한 번에 많은 시료를 처리할 수 있고 분석의 자동화가 가능하다는 측면에서 매우 용이한 기술이다.

본 연구개발에서는 쌀 원산지 식별을 위한 품종 검정법으로 다중 SNP 마커를 이용한 multiplex Real-time PCR assay 를 채택하였다. 새롭게 개발된 쌀 원산지 검정기술은 400여종의 국내외산 품종을 15개 이상의 마커를 이용하여 구별할 수 있으며, 각 allele 의 score를 자동 소프트웨어로 분석함으로써 보다 신속하고 정확한 분석이 가능하게 하였다.

제 2 절 쌀 원산지 검정용 유전자 분석기술 개발을 위한 국내외산 시료 확보

국립농산물품질관리원 시험연구소와 경기도 여주군 농업기술센터에서 분양받은 국내산 374 개 품종과 수입산 249개 품종을 확보하였으며 그 목록은 Table 1과 같다.

Table 1. List of international rice varieties for developing DNA markers and multiplex Real-time PCR assay for origin authentication

번호	품종	원산지	번호	품종	원산지
1	남평	한국	2	삼백	한국
3	대안	한국	4	삼평	한국
5	동안	한국	6	상옥	한국
7	동진1호	한국	8	상주	한국
9	상미	한국	10	새상주	한국
11	세계화	한국	12	원황	한국
13	새추청	한국	14	중산	한국
15	수라	한국	16	해평	한국
17	신동진	한국	18	백진주	한국
19	오대	한국	20	고품	한국
21	일미	한국	22	운광	한국
23	일품	한국	24	간척	한국
25	주남	한국	26	개화	한국
27	중화	한국	28	고아미 2	한국
29	추청	한국	30	고아미	한국
31	화봉	한국	32	광안	한국
33	화성	한국	34	그루	한국
35	화영	한국	36	금남	한국
37	대진	한국	38	금안	한국
39	동진	한국	40	금오	한국
41	삼천	한국	42	만추	한국
43	운두	한국	44	미행	한국
45	태봉	한국	46	소백	한국
47	화동	한국	48	소비	한국
49	문장	한국	50	영안	한국
51	고시히카리	한국	52	운동	한국
53	히토메보레	한국	54	적진주	한국
55	내풍	한국	56	진부	한국
57	삼광	한국	58	향남	한국

59	삼덕	한국	60	향미1	한국
61	운광	한국	62	향미2	한국
63	평안	한국	64	흑향	한국
65	풍미1	한국	66	흑진주	한국
67	풍미	한국	68	눈보라	한국
69	황금누리	한국	70	다미	한국
71	말그미	한국	72	오대1	한국
73	철보	한국	74	온누리	한국
75	2869(16667)	한국	76	낙동벼	한국
77	가야벼	한국	78	남선102호	한국
79	간척9호	한국	80	남선13호	한국
81	계화벼	한국	82	남영벼	한국
83	고아미2호	한국	84	남일	한국
85	고아미3호	한국	86	남천벼	한국
87	고운	한국	88	남평벼	한국
89	관악벼	한국	90	남풍벼	한국
91	관옥	한국	92	냉도13	한국
93	금강벼	한국	94	냉조	한국
95	금안	한국	96	노인도	한국
97	금오벼	한국	98	노인조	한국
99	까락찰	한국	100	녹양	한국
101	농안	한국	102	농광	한국
103	다다조	한국	104	농림나1호	한국
105	다마금	한국	106	만승	한국
107	다미벼	한국	108	만풍	한국
109	다산1호	한국	110	문장벼	한국
111	다산벼	한국	112	미향벼	한국
113	다청	한국	114	밀성	한국
115	대구나	한국	116	밀양21호	한국
117	대립벼1호	한국	118	밀양22호	한국
119	도봉벼	한국	120	밀양23호	한국
121	동안벼	한국	122	밀양30호	한국
123	동진벼	한국	124	밀양42호	한국
125	동진찰	한국	126	배달	한국
127	동해진미	한국	128	백설찰	한국
129	돼지찰	한국	130	백양벼	한국
131	둔내	한국	132	백진주	한국
133	드래찬	한국	134	백진주1호	한국
135	만경	한국	136	백해달	한국
137	만나	한국	138	보라미	한국
139	만미	한국	140	보석	한국
141	만석벼	한국	142	보석찰	한국
143	산두도	한국	144	보석흑찰	한국
145	산들진미	한국	146	서안	한국
147	삼각립도	한국	148	서안1호	한국
149	삼강벼	한국	150	서진	한국
151	상남발벼	한국	152	석정	한국

153	상산	한국	154	선서	한국
155	상주찰	한국	156	설갱	한국
157	상풍벼	한국	158	설악벼	한국
159	새누리	한국	160	설향찰	한국
161	삿별벼	한국	162	소비벼	한국
163	생동찰	한국	164	수라벼	한국
165	애국	한국	166	수상조	한국
167	양조벼	한국	168	수정벼	한국
169	영광	한국	170	신광벼	한국
171	영남조생	한국	172	신농흑찰	한국
173	영덕벼	한국	174	신동진벼	한국
175	영안벼	한국	176	신명흑찰	한국
177	오대1호	한국	178	신선찰벼	한국
179	오봉	한국	180	신운봉1호	한국
181	용문벼	한국	182	신운봉벼	한국
183	용주벼	한국	184	신품	한국
185	운미	한국	186	쌀벼3호	한국
187	운봉벼	한국	188	아랑향찰벼	한국
189	원산찰벼	한국	190	아름벼	한국
191	원풍벼	한국	192	안산	한국
193	육우132호	한국	194	안성	한국
195	은구5호	한국	196	안중벼	한국
197	은구6호	한국	198	중산벼	한국
199	이리239호	한국	200	중원벼	한국
201	이리265호	한국	202	진미벼	한국
203	일미벼	한국	204	진봉	한국
205	일진	한국	206	진부울	한국
207	일품벼	한국	208	진부찰벼	한국
209	자광찰	한국	210	진수미	한국
211	자대흑	한국	212	진주벼	한국
213	장성벼	한국	214	진품	한국
215	장안	한국	216	진흥	한국
217	재건	한국	218	쪽재비찰벼	한국
219	조광	한국	220	차나락	한국
221	조동지	한국	222	청아	한국
223	조생통일	한국	224	청안	한국
225	조생흑찰	한국	226	청청벼	한국
227	조아미	한국	228	청청진미	한국
229	조안	한국	230	추풍벼	한국
231	주남조생	한국	232	팔기	한국
233	칠보벼	한국	234	팔달	한국
235	큰눈	한국	236	편영도	한국
237	탐진벼	한국	238	평원	한국
239	태백벼	한국	240	풍광	한국
241	태성	한국	242	풍산벼	한국
243	통일찰	한국	244	풍옥	한국
245	팔공벼	한국	246	하이아미	한국

247	팔링	한국	248	한강찰1호	한국
249	팔금	한국	250	흑광	한국
251	한강찰벼	한국	252	흑남벼	한국
253	한들	한국	254	흑설	한국
255	한아름벼	한국	256	ARC11895	한국
257	한양조	한국	258	BABUNIYA	한국
259	해오르미	한국	260	BKNFR 76106-16-0-1-0	한국
261	해찰물결	한국	262	CI5483-2	한국
263	해평찰	한국	264	CR126-42-5	한국
265	향남벼	한국	266	CR203-1-717	한국
267	향미벼1호	한국	268	Crass\pd8244	한국
269	향미벼2호	한국	270	F1-312 8223	한국
271	호광	한국	272	KAKAI 272/51	한국
273	호품벼	한국	274	KASHIMIR BASMATI	한국
275	홍진주	한국	276	Ling Ta 150	한국
277	화명	한국	278	LOP ledves type	한국
279	화선찰벼	한국	280	Lu Chin Tsi	한국
281	화진	한국	282	MANONG BALAY	한국
283	화청벼	한국	284	Pai Hsu	한국
285	황금노들	한국	286	YJ06-09	한국
287	황금벼	한국	288	YJ06-10	한국
289	황금보라	한국	290	YJ06-11	한국
291	HP904B-1 8212	한국	292	YJ06-12	한국
293	IR10179-23-1-3	한국	294	YJ06-13	한국
295	IR667-98-1-3-25	한국	296	YJ06-14	한국
297	IR9669-PP830-1	한국	298	YJ06-15	한국
299	PAIKANTAO 8217	한국	300	YJ06-16	한국
301	PEMBE	한국	302	YJ06-17	한국
303	Shin-Pa	한국	304	YJ06-19	한국
305	YJ06-02	한국	306	난쟁이벼	한국
307	YJ06-03	한국	308	녹원찰벼	한국
309	YJ06-04	한국	310	단미	한국
311	YJ06-05	한국	312	상남발벼	한국
313	YJ06-06	한국	314	생동찰	한국
315	YJ06-07	한국	316	자도	한국
317	YJ06-08	한국	318	주안	한국
319	화중	한국	320	중모1006	한국
321	황도	한국	322	화성벼	한국
323	Tillenag 8219	한국	324	해찰물결	한국
325	YJ06-01	한국	326	화안	한국
327	서안	중국	328	간도 10	중국
329	부토광	중국	330	용갱13	중국
331	용도4	중국	332	중국 9-23	중국
333	추천소정(아기다고마찌)	중국	334	공육 131	중국
335	요성 2102	중국	336	길농대 19	중국
337	길갱 9	중국	338	통육 308	중국
339	수갱 5	중국	340	용순 104	중국

341	용갱 12	중국	342	송경 3	중국
343	용도 3	중국	344	길갱 88	중국
345	수갱 7	중국	346	용도 2	중국
347	샤사니	중국	348	목단강 19	중국
349	수갱 6	중국	350	용갱 13	중국
351	간감도 8	중국	352	용도 5	중국
353	간도 9	중국	354	송갱 7	중국
355	반금 8	중국	356	송갱 2	중국
357	갱도(상주)	중국	358	길농대19	중국
359	갱도(의흥)	중국	360	길특	중국
361	갱도(천진)	중국	362	길향1호	중국
363	거배청향미	중국	364	도화향1호	중국
365	고도1호	중국	366	도화향2호	중국
367	고도2호	중국	368	동농415	중국
369	길갱61호	중국	370	동농416	중국
371	길냉2호	중국	372	운갱20호	중국
373	길농대12	중국	374	운남수집12	중국
375	장백6호	중국	376	고려한도	중국
377	동연2호	중국	378	장백7호	중국
379	복지	중국	380	통경808	중국
381	복지18	중국	382	통연5호	중국
383	연갱23	중국	384	통연6	중국
385	염도11호	중국	386	통우163	중국
387	염도11호	중국	388	통우192	중국
389	요갱151	중국	390	통육201	중국
391	요염241	중국	392	통육211	중국
393	요염283호	중국	394	합계35호	중국
395	요염나	중국	396	합계41	중국
397	용농1	중국	398	합계42	중국
399	용농4	중국	400	향도	중국
401	향연미	중국	402	향미벼	중국
403	향찰	중국	404	NANTA 16	중국
405	홍감미	중국	406	LIEN-CHAN-ZE-THOU	중국
407	홍혈나	중국	408	SAN BANG QSHI LUO	중국
409	흑각나	중국	410	PL3215	중국
411	흑도	중국	412	Daen-chon-Bir	중국
413	흑설감미	중국	414	Hung-Fam-Goo	중국
415	I24-212 CHUAN JU 1	중국	416	Low-Shun-Dau	중국
417	Pl161010	중국	418	Shan Gu	중국
419	97-39-1	중국	420	Shan-Tsan	중국
421	98-49-1	중국	422	천락도	중국
423	SHOA-MOA-FAN	중국	424	백점	중국
425	BIR-HO	중국	426	세간황도	중국
427	NAN-TA-HOW	중국	428	대장망한도	중국
429	백모수경	중국	430	ARIETE	스페인
431	Boteswar(2)	방글라데시	432	CAIAPO	브라질
433	Dharga Sail	방글라데시	434	MARAVILHA	브라질

435	Mati Char	방글라데시	436	NAR163 F3-1-4	가이아니
437	Bui Tap49	베트남	438	NAR8F5-1-3-2	가이아니
439	JMANG PAI HAUTAO	베트남	440	TOX3027-42-1-E-2-1-1-1	나이지리아
441	Bajo Kaapl	부탄	442	TOX3133-59-1-2-4-1	나이지리아
443	Chumro	부탄	444	POKHARELIMASINO	네팔
445	서해13	북한	446	Tadukan	네팔
447	염주4호	북한	448	Krasnodarskill	러시아
449	평도1호	북한	450	Novoselskill	러시아
451	함주	북한	452	HO459	러시아
453	Taipei	타이완	454	ANG IN AFOTSY	마다가스
455	SEENATTY	스리랑카	456	WIR 7085	마다가스
457	SUDAHALOW	스리랑카	458	California Blue Rose	미국
459	Bakshin Ali	아제르바이잔	460	Jasmine 85	미국
461	kessa red	아제르바이잔	462	무명1	미국
463	LUNOOPUN	아프가니스탄	464	무명2	미국
465	SPINMERE	아프가니스탄	466	무명3	미국
467	Avavgard	우즈벡	468	무명4	미국
469	Debzere	우즈벡	470	19b1014b-9n-1	미국
471	DOMSO FOOD	이란	472	IRRI16302	미국
473	HASSNAY	이란	474	NAHNGMON S-4 SELECTION	미국
475	GIZA	이집트	476	Bashtus	방글라데시
477	GIZA 170	이집트	478	BR1543-9-2-1	방글라데시
479	ARIRTE	이탈리아	480	OS248	태국
481	ZENA	이탈리아	482	TAI MOCHITO	태국
483	ARGO	이탈리아	484	BASMATI	인도
485	CERVO	이탈리아	486	KAGI	인도
487	CAROLINA	페루	488	Mayang	인도네시아
489	개량 13호	일본	490	Mendawak	인도네시아
491	개량 41호	일본	492	오백만석	일본
493	경북곡량도	일본	494	웅정	일본
495	고가네모찌	일본	496	육도2호	일본
497	고성	일본	498	육도농립11호	일본
499	고시히카리	일본	500	육도농립16호	일본
501	곡량도	일본	502	육도농립19호	일본
503	국광나	일본	504	육도농립21호	일본
505	대도1호	일본	506	육도농립9호	일본
507	대도3호	일본	508	육도농립나13호	일본
509	대도4호	일본	510	육도농립나18호	일본
511	마우레쓰	일본	512	육도농립나1호	일본
513	자나	일본	514	육도농립나3호	일본
515	자도	일본	516	육도농립나4호	일본
517	전도1호	일본	518	육도신력1호	일본
519	조신력	일본	520	육도육	일본
521	주부지	일본	522	일야모나	일본
523	중생도나	일본	524	TACHIMINAMI	일본
525	충승록도	일본	526	DOIKU 154	일본
527	충승재래	일본	528	단은방주	일본

529	풍년나	일본	530	육도나부지풍	일본
531	홍소륙도5호	일본	532	SANTAMOMI	일본
533	BOZUY AKAN	일본	534	Hoshiyudaka	일본
535	GINSUKEYAKAN	일본	536	Kanto PL3	일본
537	HATA HONAMMI	일본	538	KOGYOKA	일본
539	HATA KOGANE MOCHI	일본	540	MIYAMAMOCHI	일본
541	HATA KOGANEMOO	일본	542	Nippon bare	일본
543	HINODE	일본	544	ONJOHAKAMODOSHI	일본
545	Hitome bare	일본	546	OTSUKAMODOSHI	일본
547	Satominori	일본	548	RIKUTO SAKUMAI	일본
549	모나	일본	550	사사니시끼	일본
551	밀키퀸	일본	552	사향도	일본
553	북해적모	일본	554	신력	일본
555	사국나	일본	556	Cgi-Csing	헝가리
557	Diamaute	칠레	558	DAMA	헝가리
559	QUILLA	칠레	560	Blue bell	콜롬비아
561	Suag	카자흐	562	Lemont	콜롬비아
563	Zarya	카자흐	564	GIANT GRAIN	필리핀
565	BP176-1	필리핀	566	IRRI 10320	필리핀
567	IR12780	필리핀	568	KINAGA YKAY	필리핀
569	KINAGAYKAY	필리핀	570	IR1487-194--3-4	필리핀
571	IR1552	필리핀	572	IR1750-F5B-22	필리핀
573	BASAMATI	파키스탄	574	Muzzaffar-8	파키스탄

제 3 절 SNP 마커 개발 및 선정

국제 벼 게놈 염기서열해석 프로젝트(IRGSP: International rice genome sequencing project)에 따라 확인된 니퉁바레의 염기서열을 기초로 하여 대상 SNP 마커 후보군을 선발하였다(IRGSP, <http://rgp.dna.affrc.go.jp>). 선발 기준은 국립농산물품질관리원의 쌀 품종 구별용 마커 13개를 포함하여 상기 웹사이트에 등록된 9개의 마커를 추가하였으며, 선발된 21개 마커들에 대한 SNP 부위 및 Insertion /Deletion 부위를 Figure 1에 도시하였다.

SNP 마커는 allele-specific 프라이머 또는 프로브로 사용하여야 하므로 프라이머나 프로브가 제대로 개발되지 않았을 경우에는 non-specific dimer가 형성될 우려가 있다. 따라서 Real-Time PCR을 위한 프라이머, 프로브의 디자인은 Primer Express[®] Software for Real-time PCR (Version 3.0; Applied Biosystems)를 사용하여 개발하였다. 또한 Primer Express[®] Software에서 디자인되지 않는 마커의 경우에는 프라이머 및 프로브의 온도 및 위치 등을 계산하여 개발한 후 Primer Express[®] Software를 통하여 검증하였다.

후보군의 SNP 마커를 기반으로 Real-time PCR assay 개발을 위한 PCR 프라이머 및 프로브들을 제작, 점검하여 최종적으로 선별하였다.

21개 마커에 대하여 특이적으로 개발된 프라이머 및 프로브의 위치는 Figure 2와 같으며 해당 염기서열을 Table 2에 정리하였다.

(1) DK6

1 TTACAGACTC TCAGATCTGG AATAGTTTTT CTGTTTTTTT GTCTGCTTGG AAGTTATACA
61 GTTTCTGGCG AGAATTTTCC TCCTGGGAGA AGAGATTATT AGTTCTTTTT TGCTTGAAAA
121 TCTTGGGGAT TAGTTATGAA TTTGAGCGAC AATCACATAG AACAGCAGTG AACAGCTTTT
181 TTCTGGTTTA GTTCTGCATT TTGGAGATCT CTGTATATAC TGGCAGTACA ACTATATCAA
241 TTTCAACATC ACATTGTTTT GTTCTGATGT TTTATTGAAA GAATAATTCT TTTTAACTT
301 TAGTGCAGGG TTTTCATCAC ATTATTTTCG CAACTGCTGC AATAA**A**TACCT AGAGGCTAGA
361 ACTACAAGCT CAAGTCAAGC CCCAGAAGGT AATCAGTCTC AAATGTTTGC ATCCTCTCAT
421 ATATTTATCT CTTTGGCTGA TGTATATATG AGTTGCTACG GCCATCTGCT TCAGTTTAGA
481 TAAAGAATTC TCATTAGTAA CAATCCCAAT AATTTCCCTG CAATGTAGTT TGACATCACC
541 CTGTA**A**CTTGG GTGAAAGCAC AA**A**CTTAGAG AATAAAATAA AAGTTACAGG ATAAATTAGT
601 TTGGCGACAT AAAGAGACAG AAACATGCCA ACTTGTTCC TAGGTCCTTG GCTAAACTGC
661 TGATGCTCAT GCATTTAGCA GCGGCCACAT TAACTGA

(2) DK17

1 CATCATGCTG CTGCTGAAGT TCGTCGACCT CAGCACGCAA GTCCTTGATC GCGGCTTCAA
61 CTTGGGGTCG CCATCCACTA ACCCCTTCGT CCAACTTCGC CACCGCCACC TGCATCTCCG
121 CCTGCTTGTT GTTCAACGCC ACCAGCGACT CCTGGATGTC GCCGAGCAAC TTGCCGAAAT
181 CGAGATTCTG CTTCTCCATT GCCTCAACCT GCGATTGCAA ACGAGAAGTG TACCTTGTT
241 TCTCCAGGAT CGCTGCTCTG ATACCAATG TCACGGCACT TGTGGAATTC ACGCC**A**AGAC
301 GATGACGAAA CCATGGGAAT TCGAAGAGGA ATTCGTGAAT TGAGAAGAGA AACAGAGGAA
361 GAACAGAGGA AGCAATAGAA CAGAGAGAGA GAGAGAGATT TGAATTGAAT TGGAATTTA
421 GTTGT**T**TCTA CAATGTT**C**GA TTCCTTCTCT CTCTACTTTG CCGATCTTAT ATAGCGATGT
481 GCCAAAAGAT CTCGCTCCCT CTCTGACAGT GGCCCGGTCG ACAGCTACCG GGTCCACTCA
541 CTCGACACAT ACTTGCTCGT GGGCCGCCGA TCTCGCATGG ATCGTCTGGG CTGGGCTTCC
601 TCTTGCTTTC CTCTTGTCAC CGGTCGAGAC GTTGCCGATT GTTTGTTGG TTAGCCGAG
661 GTTGTGGCCA CCGGCGCGGT CTGGTAACTT

(3) DK17-1

1 CTAAAAATTT TCTTTTCGCG AACTAAACAA ACAGGCCCTA AGTCCACCCA AAAATAGTAT
61 TAGACCTAAT GTATATAAAT AAGCAAGCTA TTTCATTGTC CATGCTTTTC TTATCCACAA
121 TCTTTATCTC ACTTATATAT TTAATTAATG CATGTATCCA AGCTATTTTT TTTTATCTCG
181 TTTCTACATT TGTTTATAGT TAGCCTATAA CCTAAGATAA AATATTCTAT GGTAATTTGG
241 AACCATGCCA TTATAATTTT GCAAAATTTG AGATATGCCA TCGGTATCTC AATGACATGT
301 AGGACCCACA TGAGTCAATG ACATGTGAGT CAGGATGGTA CATCTCAAAT TTTGCAAAT

361 ATAATGACAT GGTCCAATT TTCTCAATAT TCTAAGGCAC TCTAGTTTTA CGGTTTTATC
421 ACAGGATTGC GGTCTTTTGC CAAAAGACAC TTGACCTATT ACTTTACATA CTTGCTATTT
481 TACTACTGTA GAAAAGTGGA GGAAAACTT TTGGATTTTT ATCGTTGGAT TGGCTAGGAG
541 ATTCGTGCGC ATGATCAAGA ATAAAAAGTT GATAGCGTGC GCTGTGGGTA GGTGTCGTCG
601 TGTCGAAATC GTGATGCGAA GCTAGTGTGG GAACGTGCTG ATCTCCCACT GTGTTACAAA
661 GCAAATCTTA ATTTACATAG CAGTTGCATC TAATATACAC TATAGTTAAA ATATAAGTAC
721 ACTATATTTA TATTATAGTT ATGGTGACAT TTATAAGTAC GCTAAAAATT ATTCGTCAGG
781 AGTTATATAG GTAGTCCCTT ATTTTTCCCT ATCCTCTTCA ATTGGAAAGA GAGAACTTTT
841 GAAAAGACAA AATTGCCCTC AGGCTCACTT GGTAGGTTGA AGGGCAATTT CTTCTTTTAG
901 AAAATCTCTC ATTTGAAGAG GATATGTCAA AGCAATGGCC AAAATGTATT TTGGCAAAGA
961 GAAGCAAAC TGTACCATCA TACGGCAAAC CGCAAACCTA TATCTTAGAG TGAATGTCAT
1021 AATTATAGAG TTACCTAGAG CAAATTTTGT CAGGTTATAA AACTCTTTAA AGTGATTGAT
1081 AACGTAACCT ACTATTTCTT ATAGCGAAAA AATAGATCAA GTTATTTTTT TTTGTCTAGA
1141 TAGAGAAACA AAGGTACTCC CAACAAATCT AAACGTATGA TAACCTAGCT GCTAACGATG
1201 AAATCCCCAT AATCTTGAC AATCCTGTTT GTCGCGGA^AGA ACATATCTTA GGACCAAGAC
1261 TTCTAGTTGT CGCTAGGATC GGTGAAGGT GAACTTTACA ACGATATTTG TTTTTCGAA
1321 TTTATCACAA ATCAAGACGG ATTCCCTGTT TGTCAAAGGG AATCCGTTAG GGAAGTCTAG
1381 ATCTGTTGTA GTGCGTGAAT CCAAATCCAA TTGTA^GCTTTT TATGGTCTAC CTTTTTTTTT
1441 TTTT^TTGTTA TTGATAGAAA CTAATCTAC GTTGTGAGCT TTTGTTTTTC TCAACTATTT
1501 CGATCACATT CAAGAAACGT TGCCACATGC CTCTAAGAGT TAAGAGACCG AGATGTATCA
1561 CAAAACAACT ATATGGTGGT AGCAAAGAC GATAGTAAAA AAAA^ACTTAA ATAAATGGC
1621 AATATCATTC TCATTC^CCCCGGTAAGGTTGA TGTCCAGAAA TAGGTCTCCA ACCATGTGAC
1681 ATCAA^AACTA GTTGAAGAA ATGGTAACAA GAATTGCCAC TCACTAAACA

(4) DK26

1 AATAGTTTCA CTATGAGAAT TCGGGATATA TATATTTTCC TAGAAAATCA TGA^ACTACAA
61 TTAGGAGTCC TATCTTCTCG AGTTAGCATG CAAATATTTT TTTTAAAGAG ATTTCTTATA
121 TGAATCCTCT TGTATTTGCA AAAGCGAACA AACTTAAAAC CCAACTCAA TACAGATCTG
181 TATTTCCAAA AGCGAACGAA TTTAAAAACC GACTCATACA CGGATGACGT ACCAAAGTAC
241 TGATAAAAAAC ATCTTCAATT TTTATAATAG TAGAGATAGT GATATAGATA TATATAGGTA
301 TGGATATGGA TTTATTTTAT TTTTATAGAA AAGAAAAGAG ACCGGAAGGG GAGGAGAAGC
361 GAAGCGAGCG CGGATGTGGT GGGATGTATT TTTGTCTTTT GTGATTAGAT CTTTTATTAT
421 TC^GTTTGTGA TTAGGAATTC AGATTATTGA TTTATTTATT TATTAAAATA AAAAGAGAGA
481 AAAAAGAAGA GATCGGGAGG GAAGCGCGA AACTCCTAAT GGGCGATCGA TT^GCCACTAG
A

541 CGATCGGGTC GCCCCCCCTC TCCTCCATGT GGTTCCTTTT TTTTGGCACC GCATTAATTT
601 CCTATTTTAG TAAATTTATG CACCTAAAGT TTGTACACCT CAAGTTTACA CATCTAAAGT
661 TTAGATACCCA AAGTTTATAA ATCAAAAGTT TATATATCC

(5) DK34

1 ACTTAGCTTC ATGTCATGTG GCTTGTCTGG TTTCATTGAT CCCTCCTTCT CACGACTCCG
61 TTCACTGACA ATGATCAACG TCAGACTCAA TGTCATCAGT GGCATGGTTC CTGAGTTCTT
121 TGCCAACTTC TCTTTCTTAA CAATTCTGGA GCTATCTGGC AATGCTTTTG AGGGTCAGTT
181 CCCCACAAAG ATCTTCCAAC TAAAAAGGCT GCAGTTTATT GATTTATACT GGAACAATAA
241 GCTTTGTGTG CAGTTGCCAG AATCCTACC TGGTAGTCGT CTGGAAGTGT TGGATCTCAT
301 ATTGACCAAC CGTTCCTAAC CCATACCAGC ATCAGTGGTC AATCTCAAGT ATCTAAAGCA
361 TTTGGGCCTT ACAACAGTAG AGGCTTCAAT GAATTCTGAT ATCCTTTTGA TCAGAGAACT
421 CCACTGGCTG GAAGTTCTCC GGCTCTATGG AGGATCAGGA CAAGGGAAGC TGGTGTCTGT
481 CTCTTGATA GGCAGCCTTA AACATTTGAC ATACCTGGAG CTTGGCAATT ACAACTTCTC
541 TGGATTGATG CCCTCTTCGA TTATCAATCT TACAAATCTG ACAAGTTTAA CGCTCTACAA
601 TTGCAGCATG TCTGGGCCCA TACCTTCTTG GATTGGGAAC TTGATCCAAC TCAATAATTT
661 GAACTTCAGA AACAACAACC TCAATGGTGA GATCCCTACA AGAATTTGAA ATCTCAATCA
721 TAGCTCAACA GTTTCT

(6) DK50

1 TAAGAAGTAA TTTAGTAAA TCTTAAGTAA TTTAGATATA TTATAAAAGT AATTTCTAAT
61 TTTTTATCAA ATATAATCAT GTGAGATCTT GTTATAAAGA TTCAATTCTT ACGAACACAA
121 CGGTGTAATC AGATCGTAGA TCGGATGATT AGTTCAATTG CATCGATCCG TGCAATCATC
181 GCTTGCCTTT GATGTTGTAC GTGTCTTACT TTTATGATGC TATCCCTAGG ATATCATGAA
241 ATTTCGGGCT TGTTTAGTTC GCGAAAAGAA AATTTTTGGG TGT**T**TACAT**C**A**G** GATGTTT**G**GAC
301 AG**G**A**T**AT**C**CG**G** AAGGGTTTTT CGGATAGGAA TGAAAAAACT AATTTTATAA CTCGCCTGGA
--TGTTACATCAGATGTTTGACAGG--
361 AACTGCGAGA CGAATCTTTT GAGCCTAATTA ATCCGTCAT TAGCG**T**ATGT GGGTTACTGT
421 AGCACTTATA GCTAATCATG GCCTAGTTAGG CTTAAAAGA TT**C**T**T**CTCAT GATTTACATG
481 CAACTGTGC AATTAATTTT TCTTTTTATCT ATATTTAAT GCTCTATATA TATGTCAAAG
541 ATTCGATGTG ATGTTTTTGG GAAAAGTTTTT GGGTAGCCC GAAGTGTCTC AGAACTTTGT
601 CAGTTGTCAA GTTTGAACTT GGGGAGAGGCA ACCAGGTGG GGAATTTTTT TTTCATTTTA

(7) DK63

1 TCTTGCAGCA GCAGCTCCTG AGCAGCAGGC GCCATGGATC GATCGATCGA CCGATGGGTT
61 CTTGCTGGCT AACACCCAGA GCTGAAAGCT GATCGAGTGC TTGGTAGATC TAGCAGCGCC
121 CGGCCGTCTT CGACACACAC GCAATGAGTG TGGCAGTGTG GCTATGTATG GCTTTGTAC
181 CGTGCCAGAA AGTGTGGAGG CAGGAGAGAA CAGTAGGTAA ACACATGGCC GCCTTCGTGC
241 GACGTACGGG TGATAGACGG CCAAACTCA AGAGTTAGGT GGTGAATAAT CCCAGATTTT
301 CCTGGATGAT ATCTACCTAG CTAGGACGGC GCACCAGCAG CGAGGCGTTA ATCAAGGGCC
361 CCCGTTGTAT GCATAAAAAAT GCCTCTACAG AATGAAATGC GCCTTAAATC CAACAAAATT
421 TCCACTCCAG ATACAGAAAC ATGTCTCGTG CTCTGCCTCC GCCACCGCTT TCCTCTGTTC
481 TTCGTGTCTC TCGCTGGTCG TCTTCTCGTC TCATCTCATC TGCCCCAAC TGATATGGGC
541 CGCGAAATTT GTTGAGATCT CAGTGCGGTC TGGGCCAGTG GCTATCTCGT ACGGGCCGCG
601 ATCTGGGCCT CATGTGATTA GCACACGGCG TTTACCACCA CTCCTGAGCA TCGCAGTTGC
661 GTTGCTCTCT CCCCTCTGAT CTTTCTCTAT GGAATAATTG T

(8) DK372

1 CGTTCAAAGT AGCTGGATTT TCTCTCAGAG GGGGAAGTT TGTTTTCAAG GAATGATGAA
61 CTTCGTTCAT GACATTAGAT GCTTCACTCT CAATATTCAG TGTCTCTTTT GCCACACGAA
121 CCTCAACACC AGTCTTAGCA CTGGGAACTC CTGCAATGAG TTGCTGTTCT TCAAGTTGAG
181 TCGCACTGAC AAGAACAACCT CTCAGCTTAT TCTCCTCGAT ATATCTTCCC ACTTCTTTGG
241 AAAACTGCAA AGAGGAATCA GGAGGGTTTA AGATCTGGGT GAAAGATGCA AAACGTAGAA
301 TCCCATAAGC GAAACATAAA TTGCTGCATA CTTAATTACT TACAAAAGCA GGAGCAATGT
361 CTTCGTCAGC TGTACC AAAA GGAACAACCTG TGGTCTGCAC AAGAACTTG TCTCTATTTT
421 GCAGATCTGG TGGAGCAATC ATTTGTGCTT GCATAATAAC TACATTTAGT TAAATAATAA
481 AGTCAACAAG CATAAAATGC AAGGAAAATA TACTATATTG AACAAATCAA ATTAACAGA
541 TAAAACAATA ACAGAAACGT CGAGCTCATT CATGTCTTCC ACAAAGTAA GATGGCGTCC
601 ATTGATGAA CAAACCAAGT AATAAAGCAA TACTGTAAGA GTTAATTTAT CATCAGCAGA
661 GAGCAGATTT CGTGCTGAAA AGAAATAGAT GCTAACTTCA T

(9) DK560

1 TATTAGAAAT GCCCAAAAAA TATCATATTC GTGAAGCAGA AACATAAATG TACTCCCAT
61 AATGTGGAAT AGGCGGAACT GAATTAGTCA ATTCAAGTCA GCATTGTCAA TTTATACAGA
121 ATTTCTCTCT TTTCTTGGT GAAACAAGGA TCGGTTTTTC TCAAACCAA GGGCTTAGTT
181 TAGCCTTTGT TTCCTCTTTG CCACGTCTTC TTTAAAGATT CATCCAATAG AATCCCGACC
241 CCCTTTCTTT TTGATTTCTT TTCTATTTAG GTATGGTGGA GACATAATTC TTATAGAAAC
301 AAAACTCTCT CGCTTCACTT TGTCTCATTT TCTCTAGAAT CTCTAGAAAA AGGAATAAAA

361 GCGAAAATAC TACGAATTA GAGCCTAATT AAGATAGGAT GAGTAATGTA TGCAGCCTAAT
421 GAGGAGTAAT TCTATAAAA ATAAAGAACT CTATTTTCTAGA ACGTAGATCG ATTTAGATTTA
481 GGTAATCTAT AGATATAGA TAAGCAAAGT AATATACTTC AAACAAAGTA GGAATTCGCAA
541 GATGGAGAAC ATCTTGACAG TTGATTTGAT AGAAATTCAT TTTTCTTTTC CTGTCTCTATA
601 ATTTTTCGATG AATGAGCCT CTGGTAATCA TTTTATCTCT ATTTTATGGG GCAGACGCCTG
661 TCCAGTCTAT AAACAAGTA CTAATAGGGA AGCTCTTCTA TTGACTCT

(10) DK600

1 CCCGGCCGGC GAGCAGGC GGAGGCCATC ACCGTCGCCG TCGCCGGCGA GGGTTTCGCGT
61 GCTGCTGCTG CTGCGCTGG CGAGAGTGGG TGGATCCGCA CGGGGAAAGG GGAGAAGCCGA
121 GGAGATATTT TTTTCTCT CTCTGTGGCG GGTGGATGTG CCCGAGGCGA GATCCTGACCG
181 TTGATGTCTA TTCGGAGGC AGATCGAACG GTGGAGATCT GCGTAGAGTT GCCCGCGGGCA
241 GTGGGGAGTG GACGGCTAG GATGTTGGTA ATGGTGTGAC GTGGCAAGAT CTTGCTGCGTG
301 ATCGTTATGA CGTGATTCG TGAACATATA ACGGTAGTGA AGGTGCAACT GGGTTATTATT
361 TGAGTGATTA GACTAGTT TAAGTCTTAC TACGTGATTG TACATTTGCA CTTAGCTTATT
421 ACTCCATCTG TTCTATATT ACTCGTTGCT TTGATTTTTT TCGTAGTCA ACTTTTTAAAA
481 TATGATAGAA AAATATAGC AACATTTGAA ACACAAAATT AGTTTGATTA AATCTAATATT
541 GTATATATTT TGATGATAT GTTTAATTGG TGTGAAAAT GCTACTATTT TTTCTCTAAAC
601 TTAGTTAAAT ATAAAGAAA TTTGATTATG AAAAAGAAAT AAAAAACTT ATAACATAAAA
661 TGGGGTCGTA TTTTTTTAC ACACTTAGC

(11) DK601

1 TTCCGACCGA TTCCGAGTTC CGACGGAAAC TGATATTATC ATATTCGATT CCGTTTCCGA
61 AAAAATATTT CCGTTTTCGA TTCCGTTTCC GCGAAATTCC GAAAAAATTC CGACCGGCTG
121 ATTCCGTTTT CGAAAACAGG TCCGGAATCC GGAAAAATTC CGAACCGTTT TCACCCCTAG
181 CTCCAAGTCG AGGGCTGAAG CCTTGAAGGA AGCTACTACA TCCTAATAGT AGTATAATAT
241 TTAGGAAAAT AGAATTTAGT TGAAGTGTAA ACCTGTCCAG AGATAATATC GTACATTCTG
301 TATGGTAGTA TTAATACATT GTTCAGCTGC ACCGAATTGT GCATTATGTA AACGTACAAC
361 TACTTGTCAT AAATTGTTGT TGTAGTAGGA GTAACTTTGT GTAACAATAG CTTGTTTCAGC
421 TGCACCGAAT TGTGCATTAT GTAAACGTAG AACTAGTACT TGTCATAAAT TGTTGTAGTA
481 GTAGGAGTAA CTTTGTGTAA CAATAGCGTG AGAAATCAAT ACAGGAATAC TTCCCAATTC
541 GCAGTGTFFF TGCCAGTCGT TTCAGTTAT ATATTATATT CGTCAACGTA ATGGGAGTTT
601 GAATTCAATG GTGATACCTG CTGGTCATTA GATTGTAAAG AACTCAACTG CAGTCAATAA
661 GGTGAAAAC TACAGTACTC AGAATACGAA CACTTGAATT AAACATGGTT TGGGTTTTTCG

721 AAATACAACA CTCGAAGACA ACCAAATGTT TTAGAACAAT ACAGGTAGGA GCATCACAAG
781 CTAACAGATG GCTGGATGGG T

(12) DK721

1 TTATTCCCAG GCCCCAGCAC AATCTATGAA ATTGAAGGAA CTTAAGGTAG CTGTTGAAGC
61 ACATTCCAGAG TCTATGTTCT CCAACTTCTC TTGTAGGCGT GAAGCTCTAT TGTTCTTAAA
121 GAGGAAGGTA CGGGTTTTCT TTTTCATTTG GCAGAGGCTT TGCGAATCTTT CTCTCTTTCG
181 TTATGGAGTA ATTAGGGAGC ACCTACTATA GAAGGTATGG TATGTAGTTG CATAAAGAAA
241 AACAGATAGC AGATTTGGTT GCAATGTAAC TTGTTGGGAT CTTACCATA GCCATTGTAT
301 CATCAGCGTG ACCTCATTGA ATTAGAACAG AAGCTCTATT GAGCTACATG TTGCTACTGG

(13) DK1123

1 ACCCTGGTAC GAGGTTGCCA AATGTGTCAT CCTGTCTTGC AGACATACAT TATATACCAA
61 GGTTATGGCA AAATAGTTCA GGCCTGAACA TGCTCATGAT ATGGCCAAAA AGAAATGGTA
121 GACACACTCG AGCTCTGGCT CTGACTATCA GTTCCACGTA TTTACACAATT CTTAGTTGAG
181 TGATTTTATG GTTATGAGG AGGTATCGGG AGGTACATAT TTTTGTAGTCT AACTTTAGTA
241 TCTCTGGTAT GAGGAGGTGT TATAACTTAA ACTAAAAATG TTGGTACCTC CCGATATCTC
301 TCAAGGACTG TAAAATTACT CTTCTGTAG CCAAATAACC AGTTATAGAC ATGCTCATGT
361 TTTATCAAAA TCGCAAGACT ACATTCTCTG AACTTCTGAA TACACACATG AGTTGCTTCT
421 GAAACAGGAT GCGATAAAGC TTTCCATACT TATTTCTCGC ATGCATGGTG TTGTGTAGTG
481 TAGCCACCTG ACCATTAACT GAACTTTATT CATTACATCA GCATTGCTAT TAATTCATAT
541 AACCTGACTT GTTACATACT CCCTCCGTAC TCGTAAAAGA AGTCGTTTGG GACAGCGACA

(14) DK1361

1 TCCCCGACAG GACTTCACA CAATCTTCAA GTTGGCCTCT TATCCACCAA ATCTATGAGG
61 AGGGAGTTGC GTAAGCAGAA GCGCCTTGCT GCTGAGAAAG CTTGTGATAT TTGTGGGCGA
121 CCAATGCTTC TTGAAAAGGA TGTAGCTACC TTGCTCAACT GCAAGACAGG AAATCTAGCC
181 TGCAGCAGTA GAAACTCAAG CGGGGTAAGT TATTTCAAAC ATTCTTTGCC TTTGCAGTTT
241 CTTAGTATTT CTTGAAGATA GCAACGCATG ACATGCTTAG CATTCTCAC AGATAAATAA
301 ATTAAGCAA ACCTAAAAA TTAGGCATTT GACTAATTTT CATTATTAG TTATGGTAAC
361 TTCTTCACTG TTGTAATGGA ATTACAGTTC TCACAAACCA GGGATTCCAA ACCGTATAAT
421 GCGAAGTGGT TGAATTCATT TCAAGCAAAA CATAGACAGT GTATAGTTTC TTCTTTAAAA
481 ATTTGTAGTA TTCTGCTTCA ACCTCCAATG ACTTTGTACG GCTAATTTTG CAGGCATTTT
541 ATTTGTTTCA CACTTCTTGC CTTGTGCACT GGACTATTTT ATGCCAATAT GAGATGCTAG
601 CAGACAAAAT TGCAAGCAAG GGAAAAAGCA ATCGAGGAAG AAAGGCAAAA AATGCACCTA

661 AGAAAATAAC ATCCATCCTT TGCCAGAAT GCCAGGTAC T

(15) DK1412

1 ACCATTTCGAC GGAAACTAA CTAACACAAG GTGAATCCAT CAGAGCTAAA CAGGTCAACA
61 AACACCGGAA ATCTCGCGCA CGGCTCCACC AAACAGAACA ACAGAACGGC GCCAAATCGG
121 CGAGATGCCT GACGAGCGCA CGAACTATCC GGGGGAGGGA CGAGGGGGAG CTTGCGGCGG
181 CGAGGCTTAC CGGATTGGAT CGGCGGCGAG GGGAGGAGGA GGAGAGGCAG CGGCGGCGGC
241 TGCTGGCGAC GGC GCGGTGT AGGAGCGGCG AGACGCAGCG GGGGGCGAGC GAATATATAT
301 TGAGGGTTTG TGTGGCTGGT CTCAGCCGTC GGATCGGATC CAACGGTGAG GGGGATTCCT
361 TCTCGGGGAC GGGATCTGAT GGGCCGTCGT ATTGCATCTG GATTGATGGG CCGTCCTATT
421 GGCATCTGGA TTATTGGGCC GAATCTGATT CGTATGCTTG AATCGCAGTA CCGGATATCT
481 C GACTCTCCA ACTATTAAAC CCTAAGCCCT AACTGTTCGG AGATATGGGC CCGGGGGTAT
541 GCGAAGTGAG GGGAACTAC CTTTCCATCC TACCACGTGT CCCTACAGCA TGGTCTGTCT
601 CCCGCATTCC ACGAACC GCA GGAGCGGCCG GGGTGTCTGG GCCTCGGGGT GCCACGTCAT
661 GCCCCTCGGG CCCTTGCACT GCTTTGCCCC GAGGCCCTCG CCCAGCCGCC GTTTGGCGGG
721 GGGAGCAAGC GAGGAGGGGC CCCAGGCTGA ACTTCCTTTA ATCCGCACAG CGCCTCAACT
781 GCCCATGTC ACATTTAATG C

(16) DK1854

1 CTCAGCATGC TTAATGGTAA TTTTCTAATT TTATATATGG ATATCAAATA CACAATAAAT
61 AAATATAAAT AAACAGCAGC TGAAAATAAA TAAATTCCAA CAAGAAAGGC AAATAATTAA
121 TAGCATGGTC CCAGACAAAT GTCGTTTTTC TTGATGATAA ATTGCTCTCA GTACTTGAAC
181 CACTAACAGA AATCATCCAT ATCAAAACTC TGTCAGAACA ACTGTAAATT TTATTGCAAG
241 ATGCAGAGCT TGGTTGGAAT GGCAAAAGAA AGCCAAACAT TCCACATATA TCCCTTTGGT
301 TGTCTCTCTA TTTCCACTGT TATTATTCAT TAAAACCTCC AACTCTTTAA ACTATGACAG
361 CAACAACGCG ACTAAAATA TGAGCGAGCA CTGCGGTCTT CTCGGTTTCT AACAAAGCCTA
421 AAAACTAAGC ATATACAGTA AAAAAGGGCA TAATACTGGT GTGCAGAGGT AGCATAATAA
481 GCTTTAGGTT GATCAAGATT TCCCCAAAG AAGAGGATGC ACGTTTGTCT CCCATCCCAA
541 TACCCACCACC CTAAACATGA AACTAAACCA CAAAGCCATT ATTTCCAGCA TCTGGCATTG
601 ATTTCCCCCT TTCCACCACA TATATTATAA TTTTTCATGT AGAAACAGGC ACCAGTGTAG
661 CAGATCAAAA ATTAACAAGT GCGGAATTAA TTAGAGCAGGG

(17) DK2171

1 GGACGGAGGT AGTATATATT TTTTGTCTG AACTTCTAAA CTCTGACAAA TATGCACACA
61 AAAAAGTGGG TGGCACATTG GCATTACACA AGTAGATTTG TCATCAAAAG TACTTCTAGA
121 CTAATAATAT GTTTTTTACT TTTCCATACA TATAATCTAT ACTACTTTAA AAGGTAGTAG
181 TGGTGATGGC AGTAAATCTG TCTCCACTAC CTCTATCACT AACGTATGGG CCCTATGTGT
241 TGATGAAACT CCAATGCTCA ATAAATTTAA ACGATCCCCA AAATAACAAT GTCTACACAA
301 AATAATGTCC ATATTATTTG GTAAGATCTT TACAAGTATG TAGTGAAGGA ATCAATATAG
361 TTGAAGGGGT CAGAAAGAGC AGGTCTACAT ATTCTTTAAA TGATGAGCGT GCAGTGCACA
421 TAGCATGATT TTTTTTTCAA CGCATAGGCA ATTTGCTAGT TAGAAAATAA ATTGCAGATG
481 GGTGTACGGG AGGCATTGTC TGAAAAGGCA ATTAAAGGGG TACAGAGGTG GTAATTAATA
541 TATATGATCA TGTTTACAAT ACTAAGTGTA GTTATTCATT AGTTTATCAA TTTTCTATAC

(19) DK2394

1 TAGTAAACA AAATGTGAGA ATCCAGAGCA AACAAGACTA CTATTGAAA GCCATAGTTA
61 GGTGGAGGG TCAGGTCAGG CTGAGGAGTA TACCCTAAGT GCATGCTTCT TGAAGTTGTT
121 CATCACAGAG AATTGTTGAA GTCTGGCCTT AACAGTTTCG CCTAAATTTA CATTGGAGC
181 CTTCTTAATG TTCTGTAACC AAGGATGATC TGGAAGAAAT ACAAGATAAG GTTGTCAGCC
241 AAAACAACC AAGTTAAATG ATATAAGGGA TAACATCTTC AGAAAATCAT TAAGCTTTAT
301 CATTCTTTA CTCATCCTTT TGCAAGGTCT GTGATATCTT GGATTAGAAG TTAACAAGTT
361 ATAGATCTTT GTAACCTAGA ACCACAAACAT TTTCAAGCTT GAAAATTTTT GGTATTGTTA
421 AAGAACAAA GAAATACCAA TGGTTGGAAA GTTTCTGTAT CAGTCAAGAA CAGAAGGAAA
481 AAAATACAAT ATATTAAACC AGTGTGCAAA TTGATTATTAC CAAGCACTT GTTGAGCATT
541 TAGCCGCCGC CTAGGGTCTG GATTGAGCAT TCCCTTGACA AGATCCTTTG CATTATCTGA
601 GACCCTTGGC CATGGGCTC TCTGAAGTC AATGACAGAA CGGATAATTG CCTGAGCAAC
661 ACCCTGTCA GTTTCTGCAT TATAACATGG AAACAAAAGA A

(20) DK2401

1 TGCTAATCAT GCACGGTACT ACTCCAGTAG TGATTTTTGT ACAGCCAGCT GGTACTAATT
61 TCCTCCTAAA CATAGGGTTG TTGTTAGCAT TTTGTTCTCT CATCAGCTTC TACCTGCTCT
CATGGGGTGT AGCATTTTGT TCTCTCATCA GCTTCTACCT GCTCTTGAAA TAAAAGTAGGA
CTGCAATCTG TTGTACCTTA CTATGGCTGT GTTTAGATCT AAAGTTTGGG TCCAAACTTCA
121 TGAATAAAA GTAGGACTGC AATCTGTTGT ACCTTACTAT GGCTGTGTT AGATTTAAAG
181 TTTGGATCCA AACTTCAGTC CTTTTCCATC ACATCAACCT GTCATACACA CACAACTTT
241 CAGTCACATC ATCTTCAATT TCAACCAAAA TCTAAACTTT GCGCTGAACT AAACACAACC
301 TATATAAAA AGCTCTGCGT TGTGTTTTTC CATTTAGAGA AATCAATGGT GTATATATAA

661 TGAGATATGT TAATAGGGGG GTATAGACCA AAAGAGAATT G

Figure 1. SNPs, insertions and deletions in rice genomic DNA.

a. DK2401

CAGTCACATC ATCTTCAATT TCAACCAAAA **TCTAAACTTT** **GCGCTGAACT** **AAACACAACC** 60
TATATAAAAA AGCTCTGCGT TGTGTTTTTC CATTTAGAGA AATCAATGGT GTATATATAA 120

G

GAGTACAGTT TAG**TTGGACT** **GTGTATGTAT** **GTTTCGTGGAA** TAGGAGCCTG CTTAGGGCCC 180
CTTTGAATCG CATGATTGAA AAAAACGTAG GAATAGAAAA AACGTAGAAT TTTGATATGA 240
ATGTAAGTGG AAAATAGAGC ATTGCAAAAC ACAGGAAAAA CACAGGAATA ACCGTTTGAT 300

b. DK50

TTTTTATCAA ATATAATCAT GTGAGATCTT GTTATAAAGA TTCAATTCTT ACGAACACAA 60
CGGTGTAATC AGATCGTAGA TCGGATGATT AGTTCAATTG CATCGATCCG TGCAATCATC 120
GCTTGCCTTT GATGTTGTAC GTGTCTTACT TTTATGATGC TATCCCTAGG ATATCATGAA 180
ATTT**CGGGCT** **TGTTTAGTTC** **GCGAAAAGAA** AATTTTGGG TGTTACATCA GATGTTTGAC 240

G

AGGTGTTACA **TCAGATGTTT** **GACAGGAGGA** TATCGGAAGG GTTTTTCGGA TAGGAATGAA 300
AAAACATAAT TTATAACTCG CCTGGA

c. DK2171

TGGTGATGCC AGTAAATCTG TCTCCACTAC CTCTATCACT AACGTATGGG CCCTATGTGT 60
TGATGAAACT CCAATGCTCA ATAAATTTAA ACGATCCCCA AAATA**CAAT** **GTCTACACAA** 120
TAATAATGTC **CATATTATTT** GGTAAGATCT TTACAAGTAT GTAGTGAAGG AATCAATATA 180

T

GTTGAAGGGG **TCAGAAAGAG** **CAGGTCTACA** TATTCTTTAA ATGATGAGCG TGCAGTGCAC 240
ATAGCATGAT TTTTTTTTCA ACGCATAGGC AATTTGCTAG TTAGAAAATA AATTGCAGAT 300

d. DK17-1

CTTACTATTT CCTATAGCGA AAAAATAGAT CAAGTTATTT TTTTTGTCT AGATAGAGAA
ACAAAGGTAC TCCCAACAAA TCTAAACGTA TGATAACCTA GCTGCTAACG ATGAAATCCC
CATAATCTTT **GACAATCCTG** TTGTGCGCG AGAACATATC TTAGGACCAA **GACTTCTAGT**

G

TGTCGCTAGG **ATCGGT** TGAA GGTGAACTTT ACAACGATAT TTGTTTTTGC GAATTTATCA
CAAATCAAGA CGGATTCCTT GTTTGTCAAA GGGAAATCCG TAGGGAAGTC TAGATCTGTT

e. DK1412

TCTCGGGGAC GGGATCTGAT GGGCCGTCGT ATTGCATCTG GATTGATGGG CCGTCCTATT 60
TGGCATCTGG **ATTATTGGGC** **CGAATCTGAT** **TCGTATGCTT** GAATCGCAGT ACCGGATATC 120

T

TCGACTCTCC AACTATTAAA CCCTAAGCCC TAAACTGTGC GAGATATGGG CCCGGGGGTA 180
TGCGAAGTGA **GGGAATCTA** **CCTTTCCATC** CTACCAGTG TCCCTACAGC ATGGTCTGT 240
CCCCGCATTC CACGAACCGC AGGAGCGGCC GGGGTGTCGG GGCCTCGGGG TGCCACGTCA 300

f. DK34

ACTTAGCTTC **ATGTCATGTG** **GCTTGTCTGG** TTTCAATTGAT CCCTCCTTCT CACGACTCCG 60
TTCATGACA ATGATCAACG TCAGACTCAA TGTCAT**CAGT** **GGCATGGTTC** **CTGAGTTCTT** 120
TGCCAACTTC TCTTCTTAA CAATTCTGGA GCTATCTGGC AATGCTTTTG AGGGTCAGTT 180
CCCCACAAAG ATCTTCCAAC TAAAAAGGCT GCAGTTTATT GATTTATACT GGAACAATAA 240

GCTTTGTGTG CAGTTGCCAG AATTCCTACC TGGTAGTCGT CTGGAAGTGT TGGATCTCAT 300

g. DK560

ATTTCTCTCT TTTCTTGGT GAAACAAGGA TCGGTTTTTC TCAAACCAA GGGCTTAGTT 60
TTAGCCTTTG TTTCTCTTT **GCCACGTCTT CTTTAAAGAT** TCATCCAATA GAATCCCGAC 120

T

CCCCTTTCTT TTTGATTTC TTTCTATTTA GGTATGGTGG AGACATAATT CTTATAGAAA 180
CAAACTCTC TCGCTTCACT TTGTCTCATT TTCTCTAGAA TCTCTAGAAA AAGGAATAAA 240
AGCGAAAATA CTACGAATA GAGCCTAATT AAGATAGGAT **GAGTAATGTA TGCAGCCTAA** 300

h. DK2394

CATTTCTTTA CTCATCCTTT TGCAAGGTCT GTGATATCTT GGATTAGAAG **TTAACAAGTT** 60
ATAGATCTTT GTAACTCAGA ACCACAACAT TTTCAAGCTT GAAAATTTTT GGTATTGTTA 120

C

AAGAACAAAA GAAATACCAA TGGTTGGAAA GTTCTGTGAT CAGTCAAGAA CAGAAGGAAA 180
AAAATACAAT ATATTAAACC AGTGTGCAAA TTGATTATTA **CCAAGCACTT GTTGAGCATT** 240
TAGCCGCCGC CTAGGGTCTG GATTGAGCAT TCCCTTGACA AGATCCTTTG CATTATCTGA 300

i. DK63

CTTGTGGCT AACACCCAGA GCTGAAAGCT GATCGAGTGC TTGGTAGATC TAGCAGCGCC 60
CGGCCGTCTT CGACACACAC GCAAT**GAGTG TGGCAGTGTG** GCTATGTATG GCTTTTGTAC 120

A

CGTGCCAGAA AGTGTGGAGG CAGGAGAGAA CAGTAGGTAA ACACATGGCC **GCCTTCGTGC** 180
GACGTACGGG TGATAGACGG CAAAACTCA AGAGTTAGGT GGTGAATAAT CCCAGATTTT 240
CCTGGATGAT ATCTACCTAG CTAGGACGGC GCACCAGCAG CGAGGCGTTA ATCAAGGGCC 300

j. DK1123

GGTTATGGCA AAATAGTTCA GGCCTGAACA TGCTCATGAT ATGGCCAAAA AGAAATGGTA 60
GACACACTCG **AGCTCTGGCT CTGACTATCA** GTTCCACGTA TTTACACATT CTTAGTTGAG 120

G

TGATTTTATG GTTATTGAGG AGGTATCGGG AGGTACATAT TTTTGTAGTCT AACTTTAGTA 180
TCTCTGGTAT GAGGAGGTGT TATAACTTAA ACTAAAAATG TTGGTACCTC CCGATATCTC 240
TCAAGGACTG TAAAATTACT CTTCTTGTAG CCAAATAACC AGTTATAGAC ATGCTCATGT 300

k. DK1361

ATTAAAGCAA ACCTAAAAA TTAGGCATTT GACTAATTTT CATTCATTAG TTATGGTAAC 60
TTCTTCACTG TTGTAATGGA ATTACAGTTC **TCACAAACCA GGGATTCAA ACCGTATAAT** 120
GCGAAGTGGT TGAATTCATT TCAAGCAAAA CATAGACAGT GTATAGTTTC TTCTTTAAAA 180

A

ATTTGTAGTA TTCTGCTTCA **ACCTCCAATG ACTTTGTACG** GCTAATTTTG CAGGCATTTT 240
ATTTGTTTCA CACTTCTTGC CTTGTGCACT GGAATTTTT ATGCCAATAT GAGATGCTAG 300

l. DK600

GGAGATATTT TTTTCTCTC TCTGTGGCGG GTGGATGTGC CCGAGGCGAG ATCCTGACCG 60
TTGATGTCTA TTCGGAGGCA GATCG**AACGG TGGAGATCTG** **CGTAGAGTTG** CCGCGGGCA 120

GTGGGGAGTG GACGGCTAGG ATGTTGGTAA TGGTGTGACG TGGCAAGATC **TTGCTGCGTG** 180
ATCGTTATGA CGTGATTCGT GAACATATAA CGGTAGTGAA GGTGCAACTG GGTATTATT 240
TGAGTGATTA GTACTAGTTT AAGTCTTACT ACGTGATTGT ACATTGCAC TTAGCTTATT 300

m. DK2511

ATGCATTGCT TTACATTCTC TTGTGTCATT ACGCCAGGCA AAAGACAGAG **CAATGCTGAT** 60
AATGAAAGCT CAAGTATAAC AATATTGTGG AGACTACTTA GACAACAATG **CTCCTTTCAT** 120

T

ACTTACAATT **GGAAG**CTTTA TTTGATATTT AGTCTTTATC AGGTTGACAC CTTGATATTC 180
GGTCATAATC AAATGAGATG GCTTACGTAA ATATGTGAGA TCTCAAAAAG TTTAGTTTG 240
GGCTCCCAA AATTTTCTA TTTGGCCGCT TCAGCAGCT TAAACAGAA AAGACAGCAT 300

n. DK601

ATTCCGTTTT CGAAAACAGG TCCGGAATCC GGAAAAATTC **CGAACCGTTT** **TCACCCCTAG** 60
CTCCAAGTCG AGGGCTGAAG CTT**GAAGGA** **AGCTACTACA** **TCCTAATAGT** AGTATAATAT 120
TTAGGAAAAT AGAATTTAGT TGAAGTGTAA ACCTGTCCAG AGATAATATC GTACATTCTG 180
TATGGTAGTA TTACTACATT GTTCAGCTGC ACCGAATTGT GCATTATGTA AACGTACAAC 240
TACTTGTCAT AAATGTTGT TGTAGTAGGA GTAACTTGT GTAACAATAG CTTGTTCCAGC 300

o. DK2708

TAATATCGTA GAATGGTGAG AGTTTTTTTT **GATAATGGAA** **TAGTCATCCC** **GGCCTTTGCT** 60
CAAAGAGAGC TACATCCCAT TATTACAATT TAGCACTCTA AAACGAGTGT **AGTTCAGAAA** 120

C

TGATAGAAAA AATGACCACA CAAAGGTAAA TTTAACCAA ACAAGATCAG AAGAACACAT 180
TATTGAAGTC TATTTGTAAA TTTTCATCCA TAATTGGCAA AAAGCTGCAT AACCGTCGTC 240
TCAAGCTTAC AACATGCAGC TTTTAAAAGC TCACCGTCTT CATCACACCT TTGTAGTTGT 300

p. DK1854

AAATATAAAT AAACAGCAGC TGAAAATAAA TAAATCCAA CAAGAAAGGC AAATAATTAA
TAGCATGGTC **CCAGACAAAT** **GTCGTTTTTC** TTGATGATAA ATTGCTCTCA **GTACTTGAAC**
CACTAACAGA **AATCATCCAT** ATCAAACTC TGTCAGAACA ACTGTAAATT TTATTGCAAG
ATGCAGAGCT TGGTTGGAAT GGCAAAAGAA AGCCAACAT TCCACATATA TCCCTTTGGT
TGTCCTCTA TTTCCACTGT TATTATTCAT TAAAACCTCC AACTCTTAA ACTATGACG

q. DK6

CAATCACATA GAACAGCAGT GAACAGCTTT TTTCTGGTTT AGTTCTGCAT TTTGGAGATC 60
TCTGTATATA CTGGCAGTAC AACTATATCA ATTTCAACAT CACATTGTTT TGTCTGATG 120
TTTTATTGAA AGAATAATC TTTTT**AACT** **TTAGTGCAGG** **GTTTTCATCA** CATTATTTG 180
CCAACTGCTG CAATAATACC TAGAGGCTAG **AACTACAAGC** **TCAAGTCAAG** **CCCCAGAAGG** 240

C

TAATCAGTCT CAAATGTTT CATCCTCTCA TATATTTATC TCTTTGGCTG ATGTTATATT 300

r. DK721

ACATTCAGAG TCTATGTTCT CCAACTTCTC TTGTAGGCGT GAAGCTCTAT TGTCTTAAA 60

GAGGAAGGTA **CGGGTTTTCT** **TTTTCAATTG** GCAGAGGCTT TGCCATCTTT CTCTCTTTTCG 120

C

TTATGGAGTA **ATTAGGGAGC** **ACCTACTATA** **GAAGGTATGG** TATGTAGTTG CATAAAGAAA 180

AACAGATAGC AGATTTGGTT GCAATGTAAC TTGTTGGGAT CTTACCATA GCCATTGTAT 240

CATCAGCGTG ACCTCATTGA ATTAGAACAG AAGCTCTATT GAGCTACATG TTGCTACTGG 300

s. DK372

TCGCACTGAC AAGAACAACCT CTCAGCTTAT TCTCCTCGAT ATATCTTCCC ACTTCTTTGG 60

AAAAGTGCAA AGAGGAATCA GGAGGGTTTA AGATCTGGGT **GAAAGATGCA** **AAACGTAGAA** 120

TCCCATAAAGC GAAACATAAA TTGCTGCATA CTTAATTACT **TACAAAAGCA** **GGAGCAATGT** 180

A

CTTCGTCAGC TGTACCAAAA GGAACAACCTG TGGTCTGCAC AAGAAACTTG TCTCTTATTT 240

GCAGATCTGG TGGAGCAATC ATTTGTGCTT GCATAATAAC TACATTTAGT TAAATAATAA 300

t. DK17

CCTGCTTGTT GTTCAACGCC ACCAGCGACT CCTGGATGTC GCCGAGCAAC TTGCCGAAAT 60

CGAGATTCTG CTTCTCCATT GCCTCAACCT GCGATTGCAA ACGAGAAGTG TACCTTGTT 120

TCTCCAGGAT CGCTGCTCTG ATACCAAATG **TCACGGCACT** **TGTGGAATTC** ACGCCAAGAC 180

G

GATGACGAAA CCATGGGAAT TCGAAGAGGA **ATTTCGTGAAT** **TGAGAAGAGA** **AACAGAGGAA** 240

GAACAGAGGA AGCAATAGAA CAGAGAGAGA GAGAGAGATT TGAATTGAAT TGGGAATTTA 300

u. DK26

TGGATATGGA TTTATTTTAT TTTTATAGAA AAGAAAAGAG ACCGGAAGGG GAGGAGAAGC 60

GAAGCGAGCG CGGATGTGGT **GGGATGTATT** **TTTGTCTTTT** **GTGATTAGAT** CTTTTATTAT 120

TCGTTTGTGA TTAGGAATTC AGATTATTGA TTTATTTATT TATTAAAATA AAAAGAGAGA 180

T

AAAAAGAAGA GATCGGGAGG GAAGGCGCGA AACTCCTAAT GGGCGATCGA **TTGCCACTAG** 240

CGATCGGGTC GCCCCCCCTC TCCTCCATGT GGTTCCTTTT TTTTGGCACC GCATTAATTT 300

Figure 2. Developed primer and probe sets for selected 21 SNP markers.

Table 2. Primer and probe sequences specific to SNP markers.

Marker	Primer/probe set	Sequence	SNP
DK2401	Forward	ATC TAA ACT TTG CGC TGA ACT AAA CAC	A/G
	Reverse	TTA GGC TGC ATA CAT TAC TCA TCC	
	Probe	CCT ATA TAA AAA AGC TCT GC	
DK50	Forward	TCG GGC TTG TTT AGT TCG CG	A/G
	Reverse	TCA AAC ATC TGA TGT AAC ACC T	
	Probe	TGT TAC ATC AGA TGT TTG	
DK2171	Forward	CAA TGT CTA CAC AAT AAT AAT GTC CAT	G/T
	Reverse	TGT AGA CCT GCT CTT TCT GAC CC	
	Probe	CTT TAC AAG TAT GTA GTG AAG GA	
DK17-1	Forward	CCC ATA ATT CTT GAC AAT CCT	A/G
	Reverse	AAG ACT TCT AGT TGT CGC TAG GAT CG	
	Probe	TTT GTC GCG GAG AAC ATA TC	
DK1412	Forward	TAT TGG GCC GAA TCT GAT TCG	C/T
	Reverse	GGA AAG GTA GAT TCC CCT CA	
	Probe	CAG TAC CGG ATA TC	
DK34	Forward	ATG TCA TGT GGC TTG TCT GG	in/del
	Reverse	AAC TCA GGA ACC ATG CCA CTG	
	Probe	TGA TCA ACG TCA GAC TC	
DK560	Forward	GCC ACG TCT TCT TTA AAG A	C/T
	Reverse	TTA GGC TGC ATA CAT TAC TCA TCC	
	Probe	AAT CCC GAC CCC CTT T	
DK2394	Forward	GAA GTT AAC AAG TTA TAG ATC TTT G	A/C
	Reverse	TGT AGA CCT GCT CTT TCT GAC CC	
	Probe	AGA ACC ACA ACA TTT TC	
DK63	Forward	GAG TGT GGC AGT GTG GCT A	T/A
	Reverse	CCG TAC GTC GCA CGA AGG	
	Probe	TGT ATG GCT TTT GTA CCG TG	
DK1123	Forward	CGA GCT CTG GCT CTG ACT ATC A	A/G
	Reverse	CGA TAC CTC CTC AAT AAC CAT AAA ATC	
	Probe	CGT ATT TAC ACA TTC TTA GTT	
DK1361	Forward	ACA AAC CAG GGA TTC CAA ACC	G/A
	Reverse	CGT ACA AAG TCA TTG GAG GTT GA	
	Probe	TAT AAT GCG AAG TGG TTG AA	
DK600	Forward	AAC GGT GGA GAT CTG CGT AGA	in/del
	Reverse	ACG ATC ACG CAG CAA GAT CTT	
	Probe	CTA GGA TGT TGG TAA TGG TGT	
DK2511	Forward	AGC AAT GCT GAT AAT GAA AGC TCA A	C/T
	Reverse	TGC TCC TTT CAT ACT TAC AAT TGG AAG	

	Probe	ATA TTG TGG AGA CTA CTT	
DK601	Forward	GAA CCG TTT TCA CCC CTAG	in/del
	Reverse	GAA GGA AGC TAC TAC ATC CTA A	
	Probe	CAA GTC GAG GGC TGA AG	
DK1854	Forward	AGC ATG GTC CCA GAC AAA TG	in/del
	Reverse	TGG ATG ATT TCT GTT AGT GGT TCA AG	
	Probe	TTC TTG ATG ATA AAT TGC TCT CA	
DK2708	Forward	GAT AAT GGA ATA GTC ATC CCG GCC TTT GCT	T/C
	Reverse	ATT TTT TCT ATC ATT TCT GAA CTA CAC TCG	
	Probe	ATT ACA ATT TAG CAC TCT A	
DK6	Forward	AAC TTT AGT GCA GGG TTT TCA TCA C	C/G
	Reverse	GAA CTA CAA GCT CAA GTC AAG CCC	
	Probe	AGC CTC TAG GTA TTA TTG	
DK721	Forward	ACG GGT TTT CTT TTT CAT TTG G	A/C
	Reverse	TAG GGA GCA CCT ACT ATA GAA GGT ATG	
	Probe	TT TGC GAT CTT TC	
DK372	Forward	GGG TGA AAG ATG CAA AAC GTA GA	G/A
	Reverse	ACT TAC AAA AGC AGG AGC AAT GTC T	
	Probe	CCA TAA GCG AAA CAT	
DK17	Forward	TGT CAC GGC ACT TGT GGA A	A/G
	Reverse	TTC GTG AAT TGA GAA GAG AAA CAG A	
	Probe	TCA CGC CAA GAC G	
DK26	Forward	GGG ATG TAT TTT TGT CTT TTG TGA TTA G	G/T
	Reverse	GAC CCG ATC GCT AGT GGC	
	Probe	CTT TTA TTA TTC GTT TGT GAT TA	

제 4 절 DNA 추출

유전자 분석법을 이용한 쌀 원산지 검정에서 가장 먼저 진행되는 과정은 DNA(유전자)추출이다. 일반적으로 쌀 품종 및 원산지 검정을 위하여 한 개의 시료에 대하여 24립의 낱알로부터 DNA를 추출하여 분석하여야 하기 때문에 동등한 수준의 DNA가 회수되어야 한다.

이에 쌀 DNA를 추출하기 위하여 식물 DNA 추출에 일반적으로 사용되는 CTAB 법과 연구진이 개발한 silica column 법을 사용한 후 두 방법을 비교하여 최적화된 쌀 DNA 추출법을 선정하였다.

1. 시료의 전처리

시료로부터 유전자를 추출하기 위하여 쌀 낱알을 곱게 파쇄하는 과정이 필요하다. 각 시료의 파쇄 정도에 따라 추출되는 DNA의 양 및 순도가 달라질 수 있기 때문에 표준화된 DNA 추출법 정립이 필요하다. 쌀 낱알을 파쇄하는 방법으로는 기름종이에 싼 쌀 낱알을 망치 등을 이용하여 곱게 파쇄하는 고전적인 방법과 Homogenizer를 이용하는 방법이 있다. 본 연구개발에서는 균질한 DNA의 회수를 위하여 고전적 파쇄 방법보다 Homogenizer를 이용한 방법이 검정법의 표준화에 보다 적합하다고 판단하였다.

확보한 국내외 쌀 품종들을 대상으로 각각 무작위적으로 24립씩을 취하였다. 품종별로 선별된 24립의 쌀은 시료 간 오염을 방지하기 위하여 각각 별도의 튜브에 준비하여 분쇄하였다. 시료의 분쇄정도를 균일화하기 위하여 Steel bead (4.97 mm)와전용 Homogenizer를 사용하였다. Precellys 24(Bertin Technologies)와 Tissue Lyser II(Qiagen), 두 종류의 Homogenizer를 사용하였으며, 각각 5,000 rpm에서 40 초 간, 30 rps 에서 45 초 간 분쇄하였다.

2. CTAB 법

시료의 전처리를 통하여 곱게 분쇄된 시료(약 30 mg)에 CTAB 용액 500 μ l를 첨가하여 교반기(vortex)를 사용하여 잘 섞은 후 65 °C 항온수조에 30분간 반응하였다. CTAB 용액의 조성은 다음과 같다. DNA 추출 완충액(Sorbitol 63.75 g, Tris-base 12.1 g, EDTA-Na₂ 1.68 g/1 l)과 핵용해 완충액(CTAB 20 g, 1M Tris(pH 8.0) 200 ml, 0.25M EDTA 200 ml, 5M NaCl 400 ml/1 l)을 1:1로 섞고, 0.2 부피 10 % 사르코실, 0.2 부피 식염수, 1 % 2-머르캡토에탄올을 65 °C 항온 수조에서 혼합하였다.

14,240 x g(15,000 rpm)에서 10분 동안 원심분리한 후, 상등액에 3.8 g/l 소듐바이설파이트 1 부피와 페놀: 클로로포름: 이소아밀알콜(25:24:1) 1 부피를 섞어서 상온

에서 5분 동안 방치한 후, 14,240 x g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 1.5 ml 튜브로 옮기고 클로로포름: 이소아밀알콜(24:1) 1 부피를 섞어서 상온에서 5분 동안 회전시켜 섞어주었다. 14,240 x g에서 5분 간 원심분리 하여, 상등액을 1.5 ml 튜브로 옮겼다. 상기의 절차를 경계면이 투명해질 때까지 반복하였다.

동량의 이소프로판올을 넣고 5분 동안 잘 섞어주고, -20 °C에 20분간 넣어두었다가 4 °C에서 15분 동안 원심분리를 실시하였다. 상등액을 버리고 DNA 펠렛을 70 % 에탄올 200 µl를 넣어서 4 °C에서 5분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 남은 에탄올을 건조시켰다. 여기에 멸균 증류수 65 µl와 RNase A(1 mg/ ml) 15 µl를 넣어 37 °C 수조에 15분 동안 넣어둔 후 DNA를 회수하여 Real-time PCR 반응에 사용하였다.

3. Silica column 법

시료의 전 처리를 통해 곱게 분쇄된 시료(약 30 mg)에 Lysis Buffer A 300 µl, Lysis Buffer B 30 µl, Proteinase K 10 µl, RNase 10 µl 를 넣고 vortex 후, 65 °C 항온 수조에서 30분간 반응하였다.

항온 수조에서 반응 후, Chloroform을 300 µl 넣고 vortex후 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상층액 200 µl를 조심스럽게 취하여 새로운 1.5 ml tube에 담고, 여기에 400 µl의 Binding Buffer를 첨가하여 잘 혼합하였다.

혼합액 600 µl를 취하여 DNA Binding column tube에 넣고, 12,000 rpm에서 2 분간 원심분리 하였다. 여과액은 따라버리고 column에 600 µl의 Wash buffer 를 첨가하여, 12,000 rpm에서 2분간 centrifuge하여 여과액을 따라버렸다. 75%의 EtOH 600 µl를 첨가하여 같은 조건에서 한 번 더 wash 하였다. 빈 column을 12,000 rpm에서 2 분간 centrifuge하여 ethanol이 완전히 제거되도록 하였다. Column을 새로운 1.5 ml tube로 옮긴 후 100 µl 의 Elution Buffer를 넣고 1분 동안 상온에서 방치하였다. 8,000 rpm에서 3분간 centrifuge 하여 DNA을 얻어 Real-time PCR 반응에 사용하였다.

4. 최적의 쌀 DNA 추출법 선정

CTAB 법의 경우 매뉴얼 방식으로 대부분의 실험실에서 직접 제조하여 사용할 수 있는 장점이 있으나, 다수의 시료를 동시에 처리할 경우 매우 번거로우며 추출 시간과 노동력 소모가 크다. 또한, 시료 간에 추출된 DNA의 순도 및 농도의 차이가 나타나며 실험자의 숙련도에 영향을 받는다.

Silica column 법은 각 스텝이 매우 단순하고 짧기 때문에 키트의 형태로 공급하기

가장 쉬운 방법이며 시료의 수에 상관없이 모든 시료에서 동일한 결과를 확인 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 실험자의 숙련도에 거의 영향을 받지 않는다. 따라서 원산지 유전자 검사법의 쌀 DNA 추출법으로 silica column법을 최적화하여 최종 선정하였다.

제 5 절 원산지 검정용 Real-time PCR 방법 개발 및 최적화

1. 수집한 국내외산 쌀 품종 선발

수집, 분양에 의하여 확보한 국내산 374개 및 수입산 249개 쌀에 대하여 해당 품종의 순도 및 품종 신뢰성 확인을 위하여 국내산 품종구별용으로 표준화된 9개의 SNP 마커를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다.

우선, 각 시료에서 무작위적으로 24립씩을 선발하여 silica column 법으로 DNA를 추출하고 9개의 SNP 마커 즉, DK2394, DK50, DK2401, DK1412, DK17-1, DK34, DK63, DK560, DK2171에 대한 특이적 프라이머, 프로브 세트를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다.

Real-time PCR 결과 각 품종별로 80% 이상의 순도를 나타내는 시료만을 선발하였으며, 국내산 374개, 수입산 249개의 시료 중 국내산 286개 품종, 수입산 227개 품종이 80% 이상 일치하는 것으로 확인되었다. 선발된 국내산 286개 시료(품종) 내에는 2008년, 2009년, 2010년 국립종자원 종자 보급 품종 및 2009년 벼 국가목록 등재 품종 중 고품질 품종, 최고품질 품종들이 모두 포함되어 있음을 확인하였다.

최종 선발된 국내산 286개 품종 및, 수입산 227개 품종 목록은 Table 3과 같다.

Table 3. Selected rice varieties over 80 % quantitative result by Real-time PCR assay using 9 SNP markers.

국가	품종			
한국 (286)	2869(16667)	보라미	장성벼	흑남벼
	가야벼	보석	장안	흑설
	간척 9 호	보석찰	재건	ARC11895
	계화벼	보석흑찰	조광	BABUNIYA
	고아미 2 호	산두도	조동지	BKNFR76106-16-0-1-0
	고아미 3 호	삼각립도	조생통일	CI5483-2
	고운	삼강벼	조생흑찰	CR126-42-5
	관악벼	상남발벼	조아미	Crass-pd8244
	관옥	상산	조안	F1-312 8223
	금안	상주찰	중원벼	HP904B-1 8212
	까락찰	상풍벼	진미벼	IR10179-23-1-3
	낙동벼	새누리	진봉	IR667-98-1-3-25
	남선 102 호	셋별벼	진부울	IR9669-PP830-1
	남선 13 호	생동찰	진부찰벼	KAKAI 272/51
	남영벼	서안	진수미	KASHIMIR BASMATI
	남일	서안 1 호	진품	Ling Ta 150
	남천벼	서진	진흥	LOP ledves type
	남풍벼	석정	쪽재비찰벼	Lu Chin Tsi
	냉도 13	선서	차나락	MANONG BALAY
	냉조	설갱	청아	Pai Hsu
	노인도	설악벼	청안	PAIKANTAO 8217
	노인조	설향찰	청청벼	PEMBE
	녹양	수상조	청청진미	Shin-Pa
	농광	수정벼	추풍벼	Tillenag 8219
	농림나 1 호	신광벼	큰눈	YJ06-01
	농안	신농흑찰	탐진벼	YJ06-02
	다다조	신명흑찰	태백벼	YJ06-03
	다마금	신선찰벼	태성	YJ06-04
	다산 1 호	신운봉 1 호	통일찰	YJ06-05
	다산벼	신운봉벼	팔공벼	YJ06-06
	대구나	신평	팔평	YJ06-07
	대립벼 1 호	쌀벼 3 호	팔금	YJ06-08
	도봉벼	아랑향찰벼	팔기	YJ06-09
	동진찰	아름벼	편영도	YJ06-10
동해진미	안산	평원	YJ06-11	

둔내	안중벼	풍광	YJ06-12
드래찬	애국	풍산벼	YJ06-13
만경	양조벼	풍옥	YJ06-14
만나	영광	하이어미	YJ06-15
만미	영남조생	한강찰 1 호	YJ06-16
만석벼	영덕벼	한강찰벼	YJ06-17
만풍	오봉	한들	YJ06-19
문장벼	용문벼	한아름벼	난쟁이벼
밀성	용주벼	한양조	녹원찰벼
밀양 21 호	운미	해오르미	단미
밀양 22 호	원산찰벼	해찰물결	자도
밀양 23 호	원풍벼	호광	중모 1006
밀양 30 호	옥우 132 호	홍진주	화안
밀양 42 호	은구 5 호	화명	화중
배달	은구 6 호	화진	황도
백설찰	이리 239 호	화청벼	남평
백양벼	이리 265 호	황금노들	대안
백진주	일진	황금벼	동안
백진주 1 호	자광찰	황금보라	새추청
백해달	자대흑	흑광	품미
동진 1 호	상미	세계화	황금누리
수라	삼광	금오	말그미
신동진	삼덕	만추	칠보
오대	삼백	그루	평안
일미	삼평	소백	품미 1
일품	상옥	소비	미향
주남	상주	영안	운봉
중화	새상주	금남	호품
추청	원황	적진주	화랑
화봉	중산	진부	고품
화성	해평	향남	고시히카리
화영	해평찰	향미 1	내풍
대진	운광	향미 2	눈보라
동진	간척	흑향	다미
삼천	고아미	흑진주	화동
운두	광안	오대 1	히토메보레
태봉	온누리		
고도 1 호	복지 18	Low-Shun-Dau	연경 23
고도 2 호	향도	Shan-Tsan	길농대 12

중국 (93)	갱도(천진)	홍감미	염도 11 호	용도 3
	합계 35 호	PI161010	갱도(상주)	통연 6
	요염 241	97-39-1	길농대 19	서안
	요염나	98-49-1	용농 1	흑각나
	홍혈나	SHOA-MOA-FAN	용농 4	Shan Gu
	길향 1 호	BIR-HO	통우 192	동농 415
	도화향 1 호	NAN-TA-HOW	향연미	세간황도
	운남수집 12	NANTA 16	백점	장백 7 호
	통경 808	LIEN-CHAN-ZE-THOU	요갱 151	SAN BANG QISHI LUO
	통우 163	Daen-chon-Bir	향미벼	갱도(의흥)
	합계 42	Hung-Fam-Goo	통연 5 호	흑도
	동연 2 호	향찰	길특	흑설감미
	운갱 20 호	통육 201	길냉 2 호	동농 416
	합계 41	통육 211	길갱 61 호	복지
	도화향 2 호	요염 283 호	천락도	수갱 5
	샤사니	수갱 7	부토광	용도 4
	중추전소정	용도 2	간도 10	용갱 13
	중국 9-23	간도 9	수갱 6	송갱 7
	용갱 12	공육 131	용도 5	송갱 2
	통육 308	용순 104	요성 2102	송경 3
반금 8	길갱 88	긴감도 8	길갱 9	
목단강 19				
일본 (62)	Hitome bare	육도농림나 3 호	육도농림 19 호	HATA KOGANEMOO
	Kanto PL3	밀키퀸	육도농림 21 호	고성
	단은방주	곡량도	육도농림 9 호	홍소록도 5 호
	Hoshiyudaka	샤사니시끼	육도농림나 13 호	OTSUKAMODOSHI
	육도육	마우레스	육도농림나 1 호	Satominori
	SANTAMOMI	오백만석	육도농림나 4 호	DOIKU 154
	조신력	개량 41 호	일야모나	KOGYOKA
	Nippon bare	고가네모찌	자나	대도 4 호
	경북곡량도	국광나	자도	중생도나
	RIKUTO SAKUMAI	대도 1 호	충승록도	개량 13 호
	주부지	대도 3 호	풍년나	사향도
	HINODE	모나	GINSUKEYAKAN	육도 2 호
	신력	복해적모	HATA KOGANE MOCHI	육도신력 1 호
	용정	사국나	MIYAMAMOCHI	BOZUY AKAN
	충승재래	육도농림 11 호	ONJOHAKAMODOSHI	
육도나부지풍	육도농림 16 호	TACHIMINAMI		
가이아니 (2)	NAR163 F3-1-4	NAR8F5-1-3-2		

나이지리아 (2)	TOX3027-42-1-E-2-1-1-1	TOX3133-59-1-2-4-1		
네팔 (2)	Tadukan	POKHARELIMASINO		
러시아 (3)	Krasnodarskill	Novoselskill	HO459	
마다가스 (2)	WIR 7085	ANG IN AFOTSY		
멕시코 (1)	OM987-1			
미국 (9)	California Blue Rose	19b1014b-9n-1	NAHNGMON S-4 SELECTION	무명 4
	Jasmine 85	IRRI16302	무명 1	무명 2
	무명 3			
방글라데시 (5)	Mati Char	Boteswar(2)	Bashtus	BR1543-9-2-1
	Dharga Sail			
베트남 (2)	Bui Tap49	JMANG PAI HAUTAO		
부탄 (2)	Bajo Kaapl	Chumro		
북한 (4)	함주	염주 4 호	서해 13	평도 1 호
브라질 (2)	CAIAPO	MARAVILHA		
스리랑카 (2)	SUDAHALOW	SEENATTY		
스페인 (1)	ARIETE			
아제르바이잔 (1)	kessa red			
아프카니스탄 (2)	LUNOOPUN	SPINMERE		
우즈베키스탄 (1)	Debzere			
이란 (2)	DOMSO FOOD	HASSNAY		
이집트 (2)	GIZA	GIZA 170		
이탈리아 (3)	ZENA	ARGO	ARIRTE	
인도 (2)	BASMATI	KAGI		
인도네시아 (2)	Mayang	Mendawak		
칠레 (2)	QUILLA	Diamaute		
카자흐스탄 (1)	Zarya			
콜롬비아 (2)	Blue bell	Lemont		
태국 (1)	OS248			
파키스탄 (2)	BASAMATI	Muzzaffar-8		
페루 (1)	CAROLINA			
필리핀 (7)	IR1552	IRRI 10320	IR1750-F5B-22	IR1487-194--3-4
	IR12780	KINAGAYKAY	GIANT GRAIN	
헝가리 (2)	DAMA	Cgi-Csing		

2. 마커 별 최적화된 single Real-time PCR 법 개발

각 마커에 대하여 개발된 프라이머와 프로브에 대한 최적의 Real-time PCR이 구현될 수 있도록 표준품종을 이용하여 PCR 조건 및 프라이머, 프로브 조성 등을 최적화하였다. 확립된 Real-time PCR 조건은 Table 4와 같다. 21개 SNP 마커에 대한 단일 Real-time PCR 결과는 Figure 3과 같으며 각각 정상적인 Ct 값 내에서 amplification plot을 형성하였다.

Table 4. Reaction condition of Real-time PCR

Temperature	Time	Cycle
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	

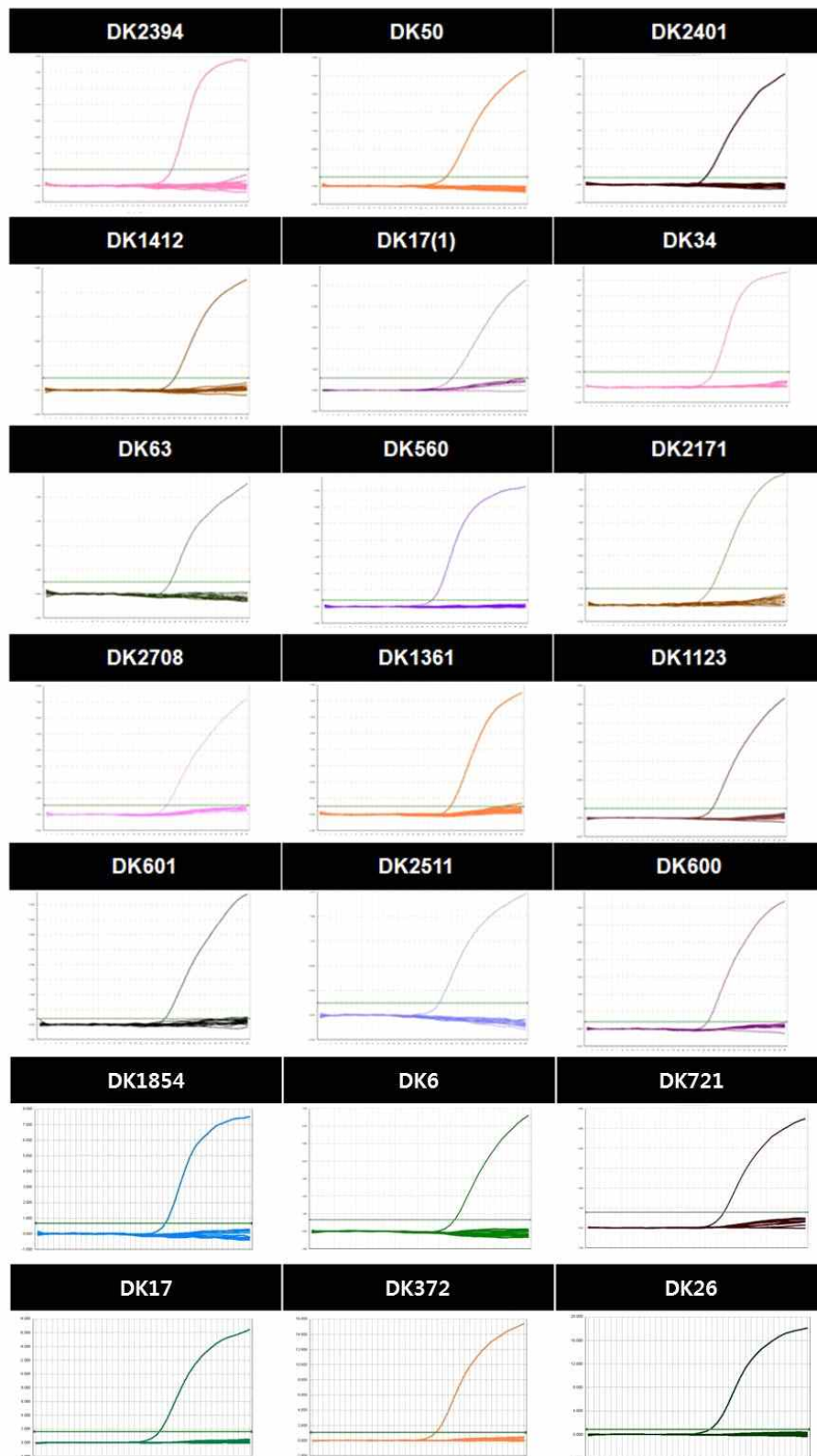


Figure 3. Single Real-time PCR analysis of 21 SNP markers by using each developed primer and probe set.

3. 원산지 검정을 위한 마커 선발

최종 선발된 국내산 286개 품종 및, 수입산 227개 품종을 대상으로 21개 SNP 마커 특이적 프라이머, 프로브 세트를 이용하여 Real-Time PCR을 수행하였다.

그 결과, 국내산과 수입산 품종을 구별할 수 있는 원산지 검정법에 가장 적합한 15개의 SNP 마커를 선발하였다. 선발된 15개의 SNP 마커는 DK2394, DK50, DK2401, DK1412, DK17-1, DK34, DK63, DK560, DK2171, DK2708, DK1361, DK1123, DK601, DK2511, DK600 이다.

원산지 및 품종에 대한 판정은 15개 마커의 증폭 여부에 따라 결정되는데, 각 품종은 증폭된 마커의 조합이 다르게 나타나도록 하였다. 위 513개 품종에 대한 15개 SNP 마커의 Real-time PCR 결과는 Table 5와 같다. 해당 마커에 대하여 PCR 증폭이 일어난 경우에는 + 로, 그렇지 않은 경우는 - 로 표기하였다.

또한, 품종 및 원산지에 대한 판정을 용이하게 하기 위해 각 마커에 score를 부여함으로써 각 품종 당 증폭된 마커에 대한 score의 합으로 구별을 할 수 있게 하였다. 해당 마커 별 스코어는 Table 6과 같으며, 본 연구개발에서 구별하고자 하는 국내외산 쌀 품종 500 여종에 대한 마커 판정표는 Table 7과 같다.

Table 5. The results of Real-time PCR assay for 513 international rice varieties by using 15 SNP markers.

순번	품종	국가	DK 2394	DK 50	DK 2401	DK 1412	DK 17-1	DK 34	DK 63	DK 560	DK 2171	DK 1123	DK 600	DK 1361	DK 601	DK 2511	DK 2708
1	간척	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	수라벼	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	담진벼	한국	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	대안	한국	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	보라미	한국	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	보석찰	한국	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	금안	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	청청진미	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	풍미1호	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	눈보라	한국	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11	화선찰벼	한국	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
12	신선찰벼	한국	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
13	고아미2	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
14	ARC11895	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
15	청안	한국	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
16	그루	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
17	금오	한국	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
18	조광	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
19	CI5483-2	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
20	삼덕	한국	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
21	금남	한국	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
22	화명	한국	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
23	화진	한국	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
24	광안	한국	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
25	고아미	한국	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
26	YJ06-01	한국	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
27	흑남벼	한국	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
28	영덕벼	한국	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
29	팔공벼	한국	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
30	일미	한국	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
31	까락찰	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
32	해찰물결	한국	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
33	서안	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
34	고운	한국	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
35	진흥	한국	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

36	풍미	한국	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
37	호품벼	한국	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
38	편영도	한국	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
39	호광	한국	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
40	상옥벼	한국	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
41	YJ06-14	한국	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
42	새계화	한국	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
43	삼평	한국	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
44	화영	한국	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
45	백진주1호	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
46	신품	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
47	영광	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
48	하이아미	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
49	팔기	한국	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
50	재건	한국	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
51	풍옥	한국	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
52	다미벼	한국	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
53	PAIKANTA+ 8217	한국	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
54	L+P ledves type	한국	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
55	은구6호	한국	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
56	애국	한국	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
57	소비벼	한국	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
58	냉조	한국	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
59	백설찰	한국	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
60	신동진	한국	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
61	흑광	한국	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
62	설악벼	한국	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
63	YJ06-02	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
64	안산	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
65	YJ06-04	한국	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
66	YJ06-15	한국	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
67	청아	한국	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
68	조아미	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
69	Koshihikari	한국	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
70	황금누리	한국	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
71	삼백	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
72	황금노들	한국	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
73	칠보벼	한국	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
74	팔금	한국	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
75	동해진미	한국	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
76	말그미	한국	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
77	주남	한국	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
78	농광	한국	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
79	평안	한국	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
80	아랑향찰벼	한국	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
81	조생흑찰	한국	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
82	흑향	한국	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
83	해평찰	한국	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+

84	팔굉	한국	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
85	새누리	한국	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
86	해오르미	한국	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
87	해평벼	한국	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
88	동진1호	한국	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
89	고아미3호	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
90	백진주	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
91	설갱	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
92	일품벼	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
93	큰논	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
94	관옥	한국	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
95	고품	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
96	상풍벼	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
97	설향찰	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
98	진부울	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
99	다다조	한국	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
100	선서	한국	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
101	난쟁이벼	한국	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
102	대구나	한국	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
103	삼각립도	한국	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
104	조동지	한국	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
105	YJ06-07	한국	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
106	홍진주	한국	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
107	장안	한국	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
108	문장벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
109	Hitomebore	한국	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
110	원산찰벼	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
111	도봉벼	한국	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
112	남풍벼	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
113	YJ06-10	한국	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
114	YJ06-06	한국	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
115	이리239호	한국	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
116	녹원찰벼	한국	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
117	운미	한국	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
118	배달	한국	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
119	한들	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
120	남선102호	한국	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
121	오봉	한국	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
122	PEMBE	한국	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
123	Tillenag 8219	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
124	YJ06-03	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
125	YJ06-17	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
126	노인도	한국	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
127	운봉벼	한국	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+

128	일진	한국	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
129	삼천	한국	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
130	생동찰	한국	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
131	상산	한국	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
132	오대	한국	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
133	운두	한국	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
134	신운봉벼	한국	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
135	신농흑찰	한국	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
136	관악벼	한국	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
137	노인조	한국	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
138	남선13호	한국	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
139	적진주	한국	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
140	중산벼	한국	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
141	둔내	한국	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
142	다마금	한국	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
143	백해달	한국	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
144	서안1호	한국	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
145	운광벼	한국	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
146	MAN+NG BALAY	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
147	상주	한국	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
148	신운봉1호	한국	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
149	삼광벼	한국	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
150	새상주	한국	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
151	진부	한국	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
152	상미	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
153	진품	한국	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
154	진미벼	한국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
155	YJ06-16	한국	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
156	보석	한국	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
157	진봉	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
158	만나	한국	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
159	내풍벼	한국	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
160	중화	한국	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
161	황금보라	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
162	화동	한국	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
163	새추청	한국	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
164	동안	한국	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
165	원황벼	한국	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
166	진수미	한국	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
167	추청	한국	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-

168	안중벼	한국	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
169	화안	한국	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
170	남평	한국	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
171	만경	한국	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
172	만풍	한국	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
173	화성	한국	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
174	낙동벼	한국	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
175	증모1006	한국	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
176	화청벼	한국	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
177	황도	한국	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
178	만추	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
179	영안벼	한국	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
180	동진	한국	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
181	YJ06-11	한국	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
182	태봉	한국	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
183	석정	한국	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
184	동진찰	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
185	한양조	한국	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
186	밀성	한국	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
187	은구5호	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
188	신명흑찰	한국	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
189	육우132호	한국	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
190	화중	한국	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
191	남일	한국	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
192	서진	한국	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
193	이리265호	한국	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
194	만미	한국	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
195	자도	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
196	간척9호	한국	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
197	풍광	한국	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
198	자광찰	한국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
199	자대흑	한국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
200	진부찰벼	한국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
201	F1-312 8223	한국	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
202	YJ06-13	한국	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
203	흑설	한국	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
204	흑진주	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
205	계화벼	한국	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
206	남천벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
207	아름벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+

208	YJ06-05	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
209	YJ06-08	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
210	농림나1호	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
211	상남밭벼	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
212	온누리	한국	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
213	YJ06-12	한국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
214	Ling Ta 150	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
215	Shin-Pa	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
216	YJ06-09	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
217	밀양30호	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
218	삼강벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
219	용문벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
220	원풍벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
221	한강찰1호	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
222	IR10179-23-1-3	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
223	향미벼1호	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
224	IR667-98-1-3-25	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
225	다산1호	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
226	다산벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
227	영남조생	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
228	조생통일	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
229	황금벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
230	남영벼	한국	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
231	드래찬	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
232	백양벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
233	장성벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
234	중원벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
235	통일찰	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
236	풍산벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
237	한아름벼	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
238	대진	한국	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
239	양조벼	한국	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
240	화봉	한국	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
241	미향벼	한국	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
242	KASHIMIR BASMATI	한국	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
243	산두도	한국	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
244	태성	한국	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
245	보석흑찰	한국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
246	조안	한국	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
247	오대1호	한국	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+

288	서안	중국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
289	Shan Gu	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
290	흑실감미	중국	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
291	염도11호	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
292	중수갱5	중국	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
293	요염나	중국	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
294	SAN BANG QISHI LU+	중국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
295	샤사니	중국	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
296	수갱7	중국	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
297	부토광	중국	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
298	요염241	중국	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
299	용도4	중국	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
300	홍혈나	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
301	운남수집12	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
302	합계42	중국	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
303	복지18	중국	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
304	항찰	중국	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
305	요염283호	중국	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
306	중추전소정(아기다고마찌)	중국	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
307	용농1	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
308	용도2	중국	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
309	길특	중국	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
310	간도10	중국	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
311	연갱23	중국	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
312	용갱13	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
313	통경808	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
314	용농4	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
315	통우163	중국	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
316	중국9-23	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
317	백점	중국	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
318	천락도	중국	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
319	장백7호	중국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
320	간도9	중국	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
321	도화향2호	중국	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
322	길냉2호	중국	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
323	운갱20호	중국	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
324	합계41	중국	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
325	중수갱6	중국	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
326	통육201	중국	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
327	통육211	중국	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+

328	송경7	중국	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
329	합계35호	중국	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
330	길경61호	중국	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
331	용경12	중국	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
332	홍감미	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
333	흑각나	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
334	공육131	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
335	용도5	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
336	동농416	중국	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
337	길농대19	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
338	송경2	중국	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
339	흑도	중국	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
340	복지	중국	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
341	동연2호	중국	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
342	통육308	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
343	향연미	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
344	용순104	중국	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
345	요경151	중국	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
346	요성2102	중국	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
347	송경3	중국	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
348	통우192	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
349	통연5호	중국	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
350	반금8	중국	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
351	세간황도	중국	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
352	고도1호	중국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
353	동농415	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
354	97-39-1	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
355	98-49-1	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
356	BIR-H+	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
357	Hung-Fam-Goo	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
358	LIEN-CHAN-ZE-TH+U	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
359	NANTA16	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
360	NAN-TA-H+W	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
361	PI161010	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
362	SH+A-M+A-FAN	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
363	고도2호	중국	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
364	길경88	중국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
365	경도(천진)	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
366	간감도8	중국	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
367	길경9	중국	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+

368	통연6	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
369	경도(의흥)	중국	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
370	길항1호	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
371	도화항1호	중국	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
372	항미벼	중국	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
373	길농대12	중국	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
374	Daen-chon-Bir	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
375	Low-Shun-Dau	중국	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
376	Shan-Tsan	중국	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
377	항도	중국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
378	경도(상주)	중국	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
379	목단강19	중국	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
380	K+GY+KA	일본	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
381	육도나부지풍	일본	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
382	단은방주	일본	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
383	육도육	일본	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
384	신력	일본	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
385	용정	일본	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
386	Hitomebare	일본	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
387	경북곡량도	일본	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
388	충승재래	일본	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
389	밀키권	일본	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
390	고가네모찌	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
391	D+IKU 154	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
392	조신력	일본	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
393	곡량도	일본	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
394	북해적모	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
395	중생도나	일본	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
396	사사니시끼	일본	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
397	일야모나	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
398	자나	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
399	Hoshiyudaka	일본	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
400	SANTAM+MI	일본	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
401	Kanto PL3	일본	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
402	Nippon bare	일본	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
403	마우레스	일본	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
404	오백만석	일본	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
405	차도	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
406	풍년나	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
407	RIKUT+ SAKUMAI	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+

408	GINSUKEYAKAN	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
409	HATA K+GANEM M+CHI	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
410	+NJ+HAKAM+D+SHI	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
411	TACHIMINAMI	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
412	국광나	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
413	대도3호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
414	육도농림16호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
415	육도농림19호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
416	육도농림21호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
417	육도농림나13호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
418	육도농림나1호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
419	육도농림나4호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
420	총승륙도	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
421	HATA K+GANEM++	일본	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
422	+TSUKAM+D+SHI	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
423	Satominori	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
424	고성	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
425	홍소륙도5호	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
426	대도4호	일본	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
427	B+ZUY AKAN	일본	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
428	개량13호	일본	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
429	육도2호	일본	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
430	육도신력1호	일본	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
431	HIN+DE	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
432	주부지	일본	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
433	MIYAMAM+CHI	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
434	대도1호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
435	사국나	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
436	육도농림9호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
437	사향도	일본	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
438	개량41호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
439	육도농림11호	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
440	모나	일본	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
441	육도농림나3호	일본	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
442	NAR8F5-1-3-2	가이아니	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
443	NAR163 F3-1-4	가이아니	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
444	T+-3133-59-1-2-4-1	나이지리아	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
445	T+-3027-42-1-E-2-1-1-1	나이지리아	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
446	Tadukan	네팔	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
447	P+KHARELIMASIN+	네팔	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-

448	Krasnodarskill	러시아	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
449	Novoselskill	러시아	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
450	H+459	러시아	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
451	ANG IN AF+TSY	마다가스	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
452	WIR 7085	마다가스	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
453	+M987-1	멕시코	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
454	IRRI16302	미국	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
455	Jasmine 85	미국	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
456	California Blue Rose	미국	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
457	19b1014b-9n-1	미국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
458	NAHNGM+N S-4 SELECT+N	미국	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
459	무명4	미국	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
460	무명1	미국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
461	무명2	미국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
462	무명3	미국	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
463	Bashtus	방글라데시	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
464	Boteswar-2	방글라데시	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
465	Mati Char	방글라데시	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
466	Dharga Sail	방글라데시	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
467	BR1543-9-2-1	방글라데시	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
468	JMANG PAI HAUTA+	베트남	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
469	Bui Tap49	베트남	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
470	Chumro	부탄	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
471	Bajo Kaapl	부탄	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
472	염주4호	북한	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
473	서해13	북한	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
474	평도1호	북한	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
475	함주	북한	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
476	CAIAP+	브라질	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
477	MARAVILHA	브라질	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
478	SUDAHAL+W	스리랑카	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
479	SEENATTY	스리랑카	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
480	ARIETE	스페인	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
481	kessa red	아제르바이잔	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
482	SPINMERE	아프가니스탄	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
483	LUN++PUN	아프가니스탄	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
484	Debzere	우즈벡	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
485	D+MS+ F++D	이란	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
486	HASSNAY	이란	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
487	GIZA	이집트	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+

488	GIZA170	이집트	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
489	ZENA	이탈리아	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
490	ARIRTE	이탈리아	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
491	ARG+	이탈리아	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
492	KAGI	인도	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
493	BASMATI	인도	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
494	Mendawak	인도네시아	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
495	Mayang	인도네시아	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
496	QUILLA	칠레	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
497	Diamaute	칠레	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
498	Zarya	카자흐	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
499	Blue bell	콜롬비아	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
500	Lemont	콜롬비아	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
501	+S248	태국	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
502	BASAMATI	파키스탄	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
503	Muzzaffar-8	파키스탄	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
504	CAR+LINA	페루	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
505	GIANT GRAIN	필리핀	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
506	KINAGAYKAY	필리핀	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
507	IR1552	필리핀	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
508	IR1750-F5B-22	필리핀	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
509	IR1487-194--3-4	필리핀	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
510	IRRI 10320	필리핀	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
511	IR12780	필리핀	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
512	Cgi-Csing	헝가리	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
513	DAMA	헝가리	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Table 6. Each score of 21 SNP markers

SNP marker	Score
DK2394	1
DK50	2
DK2401	4
DK1412	8
DK17-1	16
DK34	32
DK63	64
DK560	128
DK2171	256
DK2708	512
DK1361	2048
DK2511	131072
DK601	524288
DK600	1048576
DK1123	2097152

Table 7. The criteria of 15 SNP marker for rice origin authentication

NO.	품종	국가	DK 2394	DK 50	DK 2401	DK 1412	DK 17-1	DK 34	DK 63	DK 560	DK 2171	DK 1123	DK 600	DK 1361	DK 601	DK 2511	DK 2708	Score 합계
			1	2	4	8	16	32	64	128	256	2097152	1048576	2048	524288	131072	512	
1	간척	한국			4					128								132
2	수라벼	한국			4					128								132
3	탐진벼	한국		2	4	8				128								142
4	대안	한국		2	4		16			128								150
5	보라미	한국				8	16	32		128								184
6	보석찰	한국		2	4	8	16	32		128								190
7	금안	한국							64	128								192
8	청청진미	한국							64	128								192
9	풍미1호	한국			4					128	256							388
10	눈보라	한국	1		4					128	256							389
11	화선찰벼	한국		2		8				128							512	650
12	신선찰벼	한국		2	4	8				128							512	654
13	고아미2	한국							64	128							512	704
14	ARC11895	한국					16		64	128	256						512	976
15	청안	한국		2	4		16	32		128				2048				2230
16	그루	한국								128				2048			512	2688
17	금오	한국						32		128				2048			512	2720
18	조광	한국								128	256					131072		131456
19	CI5483-2	한국					16		64	128	256					131072	512	132048
20	삼덕	한국		2	4		16			128					524288			524438
21	금남	한국		2	4	8	16		64	128					524288			524510
22	화명	한국		2	4	8	16		64	128					524288			524510
23	화진	한국		2	4	8	16		64	128					524288			524510
24	광안	한국					16	32	64						524288		512	524912
25	고아미	한국	1			8	16			128					524288		512	524953
26	YJ06-01	한국	1	2	4	8			64	128					524288		512	525007
27	흑남벼	한국	1	2	4	8			64	128					524288		512	525007
28	영덕벼	한국		2				32	64	128				2048	524288			526562
29	팔공벼	한국		2				32	64	128				2048	524288			526562
30	일미	한국			4	8	16	32		128	256			2048	524288			526780
31	까락찰	한국								128				2048	524288		512	526976
32	해찰물결	한국		2						128			1048576					1048706
33	서안	한국			4					128			1048576					1048708
34	고운	한국	1		4					128			1048576					1048709
35	진흥	한국	1		4					128			1048576					1048709
36	풍미	한국		2			16			128			1048576					1048722

37	호품벼	한국		2			16			128			1048576				1048722
38	편영도	한국	1		4		16			128			1048576				1048725
39	호광	한국	1		4		16			128			1048576				1048725
40	상옥벼	한국		2	4		16			128			1048576				1048726
41	YJ06-14	한국	1		4	8	16			128			1048576				1048733
42	새계화	한국							32				1048576				1048736
43	삼평	한국	1		4				32				1048576				1048741
44	화영	한국	2	2	2	2	16		32				1048576				1048754
45	백진주1호	한국								64	128		1048576				1048768
46	신평	한국								64	128		1048576				1048768
47	영광	한국								64	128		1048576				1048768
48	하이아미	한국								64	128		1048576				1048768
49	팔기	한국	1							64	128		1048576				1048769
50	재건	한국				8				64	128		1048576				1048776
51	풍옥	한국				8				64	128		1048576				1048776
52	다미벼	한국		2			16			64	128		1048576				1048786
53	PAIKANTAO 8217	한국	1		4		16			64	128		1048576				1048789
54	LOP ledves type	한국				8	16			64	128		1048576				1048792
55	은구6호	한국				8	16			64	128		1048576				1048792
56	애국	한국	1			8	16			64	128		1048576				1048793
57	소비벼	한국		2		8	16			64	128		1048576				1048794
58	냉조	한국	1		4	8	16			64	128		1048576				1048797
59	백설찰	한국					16	32	64	128			1048576				1048816
60	신동진	한국	2	2			16	32	64	128			1048576				1048818
61	흑광	한국		2			16	32	64	128			1048576				1048818
62	설악벼	한국	1				16			64	128	256	1048576				1049041
63	YJ06-02	한국			4		16			64	128	256	1048576				1049044
64	안산	한국			4		16			64	128	256	1048576				1049044
65	YJ06-04	한국			4	8	16	32	64	128	256		1048576				1049084
66	YJ06-15	한국			4	8	16	32	64	128	256		1048576				1049084
67	청아	한국	1										1048576			512	1049089
68	조아미	한국								128			1048576			512	1049216
69	Koshihikari	한국	1							128			1048576			512	1049217
70	황금누리	한국		2						128			1048576			512	1049218
71	삼백	한국			4					128			1048576			512	1049220
72	황금노들	한국		2	4					128			1048576			512	1049222
73	칠보벼	한국	1				16			128			1048576			512	1049233
74	팔금	한국	1				16			128			1048576			512	1049233
75	동해진미	한국		2			16			128			1048576			512	1049234
76	말그미	한국		2			16			128			1048576			512	1049234
77	주남	한국	2	2	2		16			128			1048576			512	1049234
78	농광	한국	1		4		16			128			1048576			512	1049237
79	평안	한국		2	4		16			128			1048576			512	1049238
80	아랑향찰벼	한국				8	16			128			1048576			512	1049240
81	조생흑찰	한국			4	8	16			128			1048576			512	1049244
82	흑향	한국	1		4	8	16			128			1048576			512	1049245
83	해평찰	한국		2		8		32		128			1048576			512	1049258
84	팔굉	한국			4	8		32		128			1048576			512	1049260

85	새누리	한국		2		4	16	32		128			1048576			512	1049274
86	해오르미	한국		2			16	32		128			1048576			512	1049266
87	해평벼	한국		2			16	32		128			1048576			512	1049266
88	동진1호	한국		2		8	16	32		128			1048576			512	1049274
89	고아미3호	한국							64	128			1048576			512	1049280
90	백진주	한국							64	128			1048576			512	1049280
91	설갱	한국							64	128			1048576			512	1049280
92	일품벼	한국							64	128			1048576			512	1049280
93	큰눈	한국							64	128			1048576			512	1049280
94	관옥	한국				8			64	128			1048576			512	1049288
95	고품	한국					16		64	128			1048576			512	1049296
96	상풍벼	한국					16		64	128			1048576			512	1049296
97	설향찰	한국					16		64	128			1048576			512	1049296
98	진부울	한국					16		64	128			1048576			512	1049296
99	다다조	한국	1				16		64	128			1048576			512	1049297
100	선서	한국				8	16		64	128			1048576			512	1049304
101	난쟁이벼	한국	1			8	16		64	128			1048576			512	1049305
102	대구나	한국	1			8	16		64	128			1048576			512	1049305
103	삼각립도	한국	1			8	16		64	128			1048576			512	1049305
104	조동지	한국	1			8	16		64	128			1048576			512	1049305
105	YJ06-07	한국			4			32	64	128			1048576			512	1049316
106	홍진주	한국			4		16	32	64	128			1048576			512	1049332
107	장안	한국					16	32			256		1048576			512	1049392
108	문장벼	한국								128	256		1048576			512	1049472
109	Hitomebore	한국	1		4		16			128	256		1048576			512	1049493
110	원산찰벼	한국					16		64	128	256		1048576			512	1049552
111	도봉벼	한국	1				16		64	128	256		1048576			512	1049553
112	남풍벼	한국			4		16		64	128	256		1048576			512	1049556
113	YJ06-10	한국						32	64	128	256		1048576			512	1049568
114	YJ06-06	한국			4	8	16	32	64	128	256		1048576			512	1049596
115	이리239호	한국				8				128			1048576	2048			1050760
116	녹원찰벼	한국	1				16			128			1048576	2048			1050769
117	운미	한국		2			16			128			1048576	2048			1050770
118	배달	한국	1			8	16			128			1048576	2048			1050777
119	한들	한국					16		64	128			1048576	2048			1050832
120	남선102호	한국				8	16		64	128			1048576	2048			1050840
121	오봉	한국					16				256		1048576	2048			1050896
122	PEMBE	한국		2			16		64	128	256		1048576	2048			1051090
123	Tillenag 8219	한국			4		16		64	128	256		1048576	2048			1051092
124	YJ06-03	한국			4		16		64	128	256		1048576	2048			1051092
125	YJ06-17	한국			4		16		64	128	256		1048576	2048			1051092
126	노인도	한국	1		4		16	32	64	128	256		1048576	2048			1051125
127	운봉벼	한국	1							128			1048576	2048		512	1051265
128	일진	한국				8				128			1048576	2048		512	1051272

129	삼천	한국					16			128			1048576	2048			512	1051280
130	생동찰	한국	1				16			128			1048576	2048			512	1051281
131	상산	한국						32		128			1048576	2048			512	1051296
132	오대	한국	1						32		128		1048576	2048			512	1051297
133	운두	한국	1				16	32		128			1048576	2048			512	1051313
134	신운봉벼	한국			4		16	32		128			1048576	2048			512	1051316
135	신농흑찰	한국	1	2	4	8				64	128		1048576	2048			512	1051343
136	관악벼	한국	1		4		16			64	128		1048576	2048			512	1051349
137	노인조	한국	1						32	64	128		1048576	2048			512	1051361
138	남선13호	한국	1				16	32	64	128			1048576	2048			512	1051377
139	적진주	한국					16				256		1048576	2048			512	1051408
140	증산벼	한국			4		16			128	256		1048576	2048			512	1051540
141	둔내	한국	1							64	128	256	1048576	2048			512	1051585
142	다마금	한국	1				16	32	64	128	256		1048576	2048			512	1051633
143	백해달	한국				8	16	32	64	128	256		1048576	2048			512	1051640
144	서안1호	한국			4			32					1048576			131072		1179684
145	운광벼	한국		2		8	16			128			1048576			131072		1179802
146	MANONG BALAY	한국					16			64	128	256	1048576			131072		1180112
147	상주	한국					16						1048576			131072	512	1180176
148	신운봉1호	한국					16						1048576			131072	512	1180176
149	삼광벼	한국		2	4		16	32					1048576			131072	512	1180214
150	새상주	한국	1		4					128			1048576			131072	512	1180293
151	진부	한국	1							64	128		1048576			131072	512	1180353
152	상미	한국					16			64	128		1048576			131072	512	1180368
153	진품	한국		2	4		16			64	128		1048576			131072	512	1180374
154	진미벼	한국					16			128	256		1048576			131072	512	1180560
155	YJ06-16	한국			4		16	32	64	128	256		1048576			131072	512	1180660
156	보석	한국	1										1048576	2048		131072	512	1182209
157	진봉	한국								128			1048576	2048		131072	512	1182336
158	만나	한국					16			128			1048576	2048		131072	512	1182352
159	내풍벼	한국	1		4		16			128			1048576	2048		131072	512	1182357
160	증화	한국	1		4		16			128			1048576	2048		131072	512	1182357
161	황금보라	한국									256		1048576	2048		131072	512	1182464
162	화동	한국					16				256		1048576	2048		131072	512	1182480
163	새추청	한국			4		16						1048576		524288			1572884
164	동안	한국			4	8				128			1048576		524288			1573004
165	원황벼	한국			4	8				128			1048576		524288			1573004
166	진수미	한국		2			16			128			1048576		524288			1573010
167	추청	한국			4		16			128			1048576		524288			1573012
168	안중벼	한국	1					32		128			1048576		524288			1573025

169	화안	한국	1					32		128			1048576		524288			1573025
170	남평	한국			4		16	32		128			1048576		524288			1573044
171	만경	한국	1		4		16	32		128			1048576		524288			1573045
172	만풍	한국						32	64	128			1048576		524288			1573088
173	화성	한국						32	64	128			1048576		524288			1573088
174	낙동벼	한국		2				32	64	128			1048576		524288			1573090
175	중모1006	한국		2				32	64	128			1048576		524288			1573090
176	화청벼	한국		2				32	64	128			1048576		524288			1573090
177	황도	한국					16	32	64	128			1048576		524288			1573104
178	만추	한국								128	256		1048576		524288			1573248
179	영안벼	한국		2	4	8				128	256		1048576		524288			1573262
180	동진	한국		2	4			32		128	256		1048576		524288			1573286
181	YJ06-11	한국		2	4	8		32		128	256		1048576		524288			1573294
182	태봉	한국	1		4		16						1048576		524288		512	1573397
183	석정	한국	1	2	4			32					1048576		524288		512	1573415
184	동진찰	한국			4					128			1048576		524288		512	1573508
185	한양조	한국			4					128			1048576		524288		512	1573508
186	밀성	한국	1		4			32		128			1048576		524288		512	1573541
187	은구5호	한국							64	128			1048576		524288		512	1573568
188	신명흑찰	한국			4				64	128			1048576		524288		512	1573572
189	육우132호	한국	1			8	16		64	128			1048576		524288		512	1573593
190	화중	한국		2	4			32	64	128			1048576		524288		512	1573606
191	남일	한국		2				32			256		1048576		524288		512	1573666
192	서진	한국	1		4					128			1048576	2048	524288			1575045
193	이리265호	한국	1		4					128			1048576	2048	524288			1575045
194	만미	한국			4	8				128			1048576	2048	524288			1575052
195	자도	한국					16		64	128			1048576	2048	524288			1575120
196	간척9호	한국			4	8	16		64	128			1048576	2048	524288			1575132
197	풍광	한국				8		32	64	128			1048576	2048	524288		512	1575656
198	자광찰	한국					16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575824
199	자대흑	한국					16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575824
200	진부찰벼	한국					16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575824
201	F1-312 8223	한국	1			8	16	32		128	256		1048576	2048	524288		512	1575865
202	YJ06-13	한국			4		16	32	64	128	256		1048576		524288	131072		1704436
203	흑실	한국			4		16	32	64	128			1048576		524288	131072	512	1704692
204	흑진주	한국			4		16		64	128	256		1048576		524288	131072	512	1704916
205	계화벼	한국			4		16		64	128		2097152						2097364
206	남천벼	한국								128	256	2097152					512	2098048
207	아름벼	한국								128	256	2097152					512	2098048
208	YJ06-05	한국					16		64	128	256	2097152					512	2098128

209	YJ06-08	한국				16		64	128	256	2097152				512	2098128
210	농림나1호	한국				16		64	128	256	2097152				512	2098128
211	상남발벼	한국				16		64	128	256	2097152				512	2098128
212	온누리	한국	2	4		16			128		2097152	2048			512	2099862
213	YJ06-12	한국				16		64	128	256	2097152	2048				2099664
214	Ling Ta 150	한국								256	2097152				131072	2228480
215	Shin-Pa	한국								256	2097152				131072	2228480
216	YJ06-09	한국								256	2097152				131072	2228480
217	밀양30호	한국								256	2097152				131072	2228480
218	삼강벼	한국								256	2097152				131072	2228480
219	용문벼	한국								256	2097152				131072	2228480
220	원풍벼	한국								256	2097152				131072	2228480
221	한강찰1호	한국								256	2097152				131072	2228480
222	IR10179-23-1-3	한국							128	256	2097152				131072	2228608
223	향미벼1호	한국									2097152				131072	512 2228736
224	IR667-98-1-3-25	한국								256	2097152				131072	512 2228992
225	다산1호	한국								256	2097152				131072	512 2228992
226	다산벼	한국								256	2097152				131072	512 2228992
227	영남조생	한국								256	2097152				131072	512 2228992
228	조생통일	한국								256	2097152				131072	512 2228992
229	황금벼	한국								256	2097152				131072	512 2228992
230	남영벼	한국						64		256	2097152				131072	512 2229056
231	드래찬	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
232	백양벼	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
233	장성벼	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
234	증원벼	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
235	통일찰	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
236	풍산벼	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
237	한아름벼	한국							128	256	2097152				131072	512 2229120
238	대진	한국		4	8	16				256	2097152	2048			131072	512 2231068
239	양조벼	한국		4	8			64	128		2097152		524288			2621644
240	화봉	한국		4	8	16	32		128		2097152	2048	524288			2623676
241	미향벼	한국	2			16		64	128		2097152	2048	524288		512	2624210
242	KASHIMIR BASMATI	한국					32		128	256	2097152		524288	131072		2752928
243	산두도	한국	1		4		16		64	128		2097152	1048576			3145941
244	태성	한국					16		64			2097152	1048576			512 3146320
245	보석흑찰	한국							128			2097152	1048576			512 3146368
246	조안	한국	1		4		32		128			2097152	1048576			512 3146405
247	오대1호	한국						64	128			2097152	1048576			512 3146432
248	녹양	한국								256	2097152	1048576				512 3146496

249	CR126-42-5	한국		2				32	64	128	256	2097152	1048576				512	3146722
250	KAKAI 272/51	한국		2				32	64	128	256	2097152	1048576				512	3146722
251	단미	한국	1		4		16			128		2097152	1048576	2048				3147925
252	쪽재비찰벼	한국					16		64	128		2097152	1048576	2048				3147984
253	Crass-pd8244	한국	1		4		16		64	128		2097152	1048576	2048				3147989
254	소백	한국								128		2097152	1048576	2048			512	3148416
255	YJ06-19	한국	1		4	8	16			128	256	2097152	1048576	2048			512	3148701
256	냉도13	한국			4		16	32	64	128	256	2097152	1048576	2048			512	3148788
257	수상조	한국			4		16	32	64	128	256	2097152	1048576	2048			512	3148788
258	쌀벼3호	한국			4	8	16	32	64	128	256	2097152	1048576	2048			512	3148796
259	BKNFR 76106-16-0-1-0	한국									256	2097152	1048576			131072		3277056
260	Pai Hsu	한국									256	2097152	1048576			131072		3277056
261	용주벼	한국									256	2097152	1048576			131072		3277056
262	한강찰벼	한국									256	2097152	1048576			131072		3277056
263	BABUNIYA	한국						32				256	2097152	1048576			131072	3277088
264	항미벼2호	한국										2097152	1048576			131072	512	3277312
265	IR9669-PP830-1	한국									256	2097152	1048576			131072	512	3277568
266	Lu Chin Tsi	한국									256	2097152	1048576			131072	512	3277568
267	밀양42호	한국									256	2097152	1048576			131072	512	3277568
268	추풍벼	한국									256	2097152	1048576			131072	512	3277568
269	태백벼	한국									256	2097152	1048576			131072	512	3277568
270	가야벼	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
271	만석벼	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
272	밀양23호	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
273	셋별벼	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
274	수정벼	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
275	신랑벼	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
276	청청벼	한국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
277	밀양21호	한국	1							128	256	2097152	1048576			131072	512	3277697
278	밀양22호	한국	1							128	256	2097152	1048576			131072	512	3277697
279	농안	한국						32		128	256	2097152	1048576			131072	512	3277728
280	2869(16667)	한국							64	128	256	2097152	1048576			131072	512	3277760
281	평원	한국			4			32	64	128		2097152	1048576		524288			3670244
282	상주찰	한국			4		16		64	128		2097152	1048576		524288		512	3670740
283	항남벼	한국		2			16			128	256	2097152	1048576		524288		512	3670930
284	대립벼1호	한국						32	64	128		2097152	1048576	2048	524288			3672288
285	HP904B-1 8212	한국			4		16			128		2097152	1048576	2048	524288		512	3672724
286	차나락	한국			4	8	16	32	64	128	256	2097152	1048576	2048	524288		512	3673084
287	용도3	중국	1		4		16	32										53
288	증서안	중국								128								128

289	Shan Gu	중국					16		64	128	256							464	
290	흑설감미	중국					16	32	64	128	256							496	
291	염도11호	중국					16		64	128	256						512	976	
292	수갱5	중국					16	32		128	256			2048			512	2992	
293	요염나	중국	1			8			64	128			1048576					1048777	
294	SAN BANG QISHI LUO	중국			4		16		64	128	256		1048576					1049044	
295	샤사니	중국	1		4			32					1048576				512	1049125	
296	수갱7	중국	1		4		16	32					1048576				512	1049141	
297	중부토광	중국	1		4			32		128			1048576				512	1049253	
298	요염241	중국	1		4		16	32		128			1048576				512	1049269	
299	용도4	중국	1		4		16	32		128			1048576				512	1049269	
300	홍혈나	중국					16		64	128			1048576				512	1049296	
301	운남수집12	중국	1				16		64	128			1048576				512	1049297	
302	합계42	중국			4		16		64	128			1048576				512	1049300	
303	복지18	중국	1		4		16	32	64	128			1048576				512	1049333	
304	향찰	중국					16				256		1048576				512	1049360	
305	요염283호	중국			4			32			256		1048576				512	1049380	
306	추전소정(아기다고마찌)	중국	1							128	256		1048576				512	1049473	
307	용농1	중국					16			128	256		1048576				512	1049488	
308	용도2	중국	1				16			128	256		1048576				512	1049489	
309	길특	중국			4			32		128	256		1048576				512	1049508	
310	간도10	중국	1		4		16	32		128	256		1048576				512	1049525	
311	연갱23	중국	1		4				64	128	256		1048576				512	1049541	
312	용갱13	중국	1				16		64	128	256		1048576				512	1049553	
313	통경808	중국	1				16		64	128			1048576	2048				1050833	
314	용농4	중국					16			128	256		1048576	2048				1051024	
315	통우163	중국			4		16		64	128			1048576	2048			512	1051348	
316	중국9-23	중국					16			128	256		1048576	2048			512	1051536	
317	백점	중국	1				16			128	256		1048576	2048			512	1051537	
318	천락도	중국							64	128	256		1048576	2048			512	1051584	
319	장백7호	중국			4		16		64	128	256		1048576	2048			512	1051604	
320	간도9	중국				8	16		64	128	256		1048576	2048			512	1051608	
321	도화향2호	중국	1				16	32	64	128			1048576				131072	1179889	
322	길냉2호	중국					16	32		128	256		1048576				131072	1180080	
323	운갱20호	중국	1		4		16		64	128			1048576				131072	512	1180373
324	합계41	중국	1	2	4		16		64	128			1048576				131072	512	1180375
325	수갱6	중국	1					32			256		1048576	2048			131072	512	1182497
326	통육201	중국	1					32			256		1048576	2048			131072	512	1182497
327	통육211	중국	1					32			256		1048576	2048			131072	512	1182497
328	송갱7	중국	1				16	32		128	256		1048576	2048			131072	512	1182641

329	합계35호	중국			4		16			128			1048576		524288			1573012
330	길갱61호	중국	1				16	32		128	256		1048576		524288			1573297
331	용갱12	중국	1							128	256		1048576		524288		512	1573761
332	홍감미	중국					16		64	128	256		1048576		524288		512	1573840
333	흑각나	중국					16		64	128	256		1048576		524288		512	1573840
334	중공육131	중국	1				16		64	128	256		1048576		524288		512	1573841
335	중용도 5	중국	1				16		64	128	256		1048576		524288		512	1573841
336	동농416	중국	1				16	32	64	128	256		1048576		524288		512	1573873
337	길농대19	중국					16			128	256		1048576	2048	524288			1575312
338	송갱2	중국					16	32		128	256		1048576	2048	524288			1575344
339	흑도	중국						32	64	128	256		1048576	2048	524288			1575392
340	복지	중국			4	8	16	32	64	128	256		1048576	2048	524288			1575420
341	동연2호	중국	1		4		16		64	128			1048576	2048	524288		512	1575637
342	통육308	중국					16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575824
343	향연미	중국					16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575824
344	용순104	중국	1				16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575825
345	요갱151	중국			4		16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575828
346	요성2102	중국			4		16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575828
347	송갱3	중국	1		4		16		64	128	256		1048576	2048	524288		512	1575893
348	통우192	중국					16			128	256		1048576		524288	131072	512	1704848
349	통연5호	중국	1					32		128	256		1048576		524288	131072	512	1704865
350	반금8	중국			4		16	32		128	256		1048576	2048	524288	131072	512	1706932
351	세간황도	중국		2			16		64	128	256	2097152						2097618
352	고도1호	중국								128		2097152					512	2097792
353	동농415	중국	1				16		64	128	256	2097152					512	2098129
354	중 97-39-1	중국									256	2097152				131072		2228480
355	중 98-49-1	중국									256	2097152				131072		2228480
356	BIR-HO	중국									256	2097152				131072		2228480
357	Hung-Fam-Goo	중국									256	2097152				131072		2228480
358	LIEN-CHAN-ZE-THOU	중국									256	2097152				131072		2228480
359	NANTA 16	중국									256	2097152				131072		2228480
360	NAN-TA-HOW	중국									256	2097152				131072		2228480
361	P1161010	중국									256	2097152				131072		2228480
362	SHOA-MOA-FAN	중국									256	2097152				131072		2228480
363	고도2호	중국								128		2097152			524288			2621568
364	길갱88	중국								128	256	2097152			524288		512	2622336
365	갱도(천진)	중국					16			128		2097152	1048576				512	3146384
366	간감도8	중국	1					32		128	256	2097152	1048576				512	3146657
367	길갱9	중국			4			32		128	256	2097152	1048576				512	3146660
368	통연6	중국					16		64	128	256	2097152	1048576				512	3146704

369	궤도(의흥)	중국				8	16		64	128	256	2097152	1048576				512	3146712
370	궤향1호	중국	1				16		64	128		2097152	1048576	2048				3147985
371	도화향1호	중국	1				16		64	128		2097152	1048576	2048				3147985
372	향미벼	중국	1		4	8	16			128	256	2097152	1048576	2048			512	3148701
373	궤농대12	중국					16		64	128	256	2097152	1048576	2048			512	3148752
374	Daen-chon-Bir	중국									256	2097152	1048576			131072		3277056
375	Low-Shun-Dau	중국							64		256	2097152	1048576			131072		3277120
376	Shan-Tsan	중국							64		256	2097152	1048576			131072		3277120
377	궤도	중국									256	2097152	1048576			131072	512	3277568
378	궤도(상주)	중국					16			128	256	2097152	1048576		524288		512	3670928
379	궤단강19	중국			4		16			128		2097152	1048576	2048	524288		512	3672724
380	KOGYOKA	일본	1		4		16		64	128	256							469
381	궤도나부시푹	일본				8	16	32	64	128					524288		512	525048
382	궤은방주	일본					16			128			1048576					1048720
383	궤도궤	일본		2	4		16			128			1048576					1048726
384	궤신력	일본	1		4		16		64	128			1048576					1048789
385	궤정	일본	1		4		16		64	128			1048576					1048789
386	Hitome bare	일본	1										1048576				512	1049089
387	궤북궤궤궤	일본				8			64	128			1048576				512	1049288
388	궤궤궤궤궤	일본	1		4		16		64	128			1048576				512	1049301
389	궤궤궤궤	일본	1							128	256		1048576				512	1049473
390	궤궤궤궤궤궤	일본					16		64	128	256		1048576				512	1049552
391	DOIKU 154	일본			4		16		64	128	256		1048576				512	1049556
392	궤궤궤궤궤궤	일본	1		4		16	32		128			1048576	2048				1050805
393	궤궤궤궤궤	일본	1				16			128	256		1048576	2048				1051025
394	궤궤궤궤궤궤	일본					16		64	128	256		1048576	2048				1051088
395	궤궤궤궤궤궤	일본	1			8	16		64	128	256		1048576	2048				1051097
396	궤궤궤궤궤궤궤	일본			4		16			128	256		1048576	2048			512	1051540
397	궤궤궤궤궤궤궤	일본					16		64	128	256		1048576	2048			512	1051600
398	궤궤궤궤궤궤궤	일본					16		64	128	256		1048576	2048			512	1051600
399	Hoshiyudaka	일본			4		16			128			1048576			131072		1179796
400	SANTAMOMI	일본			4			32		128			1048576		524288			1573028
401	Kanto PL3	일본				8	16	32					1048576		524288		512	1573432
402	Nippon bare	일본			4	8	16	32		128			1048576		524288		512	1573564
403	궤궤궤궤궤궤궤	일본			4	8	16			128	256		1048576		524288		512	1573788
404	궤궤궤궤궤궤궤궤	일본	1				16	32		128	256		1048576		524288		512	1573809
405	궤궤궤궤궤궤궤궤	일본					16		64	128	256		1048576		524288		512	1573840
406	궤궤궤궤궤궤궤궤	일본					16		64	128	256		1048576		524288		512	1573840
407	RIKUTO SAKUMAI	일본					16		64	128		2097152					512	2097872
408	GINSUKEYAKAN	일본					16		64	128	256	2097152					512	2098128

409	HATA KOGANE MOCHI	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
410	ONJOHAKAMODOSHI	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
411	TACHIMINAMI	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
412	국량나	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
413	대도3호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
414	육도농림16호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
415	육도농림19호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
416	육도농림21호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
417	육도농림나13호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
418	육도농림나1호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
419	육도농림나4호	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
420	충승록도	일본				16		64	128	256	2097152					512	2098128
421	HATA KOGANEMOO	일본	1			16		64	128	256	2097152					512	2098129
422	OTSUKAMODOSHI	일본		4		16		64	128	256	2097152					512	2098132
423	Satominori	일본		4		16		64	128	256	2097152					512	2098132
424	고성	일본		4		16		64	128	256	2097152					512	2098132
425	홍소록도5호	일본		4		16		64	128	256	2097152					512	2098132
426	대도4호	일본			8	16		64	128	256	2097152					512	2098136
427	BOZUY AKAN	일본		4	8	16		64	128	256	2097152					512	2098140
428	개량 13호	일본		4	8	16		64	128	256	2097152					512	2098140
429	육도2호	일본		4	8	16		64	128	256	2097152					512	2098140
430	육도신력1호	일본		4	8	16		64	128	256	2097152					512	2098140
431	HINODE	일본		4		16		64	128		2097152		2048			512	2099924
432	주부지	일본		4		16		64	128		2097152		2048			512	2099924
433	MIYAMAMOCHI	일본				16		64	128	256	2097152		2048			512	2100176
434	대도1호	일본				16		64	128	256	2097152		2048			512	2100176
435	사국나	일본				16		64	128	256	2097152		2048			512	2100176
436	육도농림9호	일본				16		64	128	256	2097152		2048			512	2100176
437	사항도	일본		4	8	16		64	128	256	2097152		2048			512	2100188
438	개량 41호	일본				16		64	128	256	2097152	1048576				512	3146704
439	육도농림11호	일본				16		64	128	256	2097152	1048576				512	3146704
440	모나	일본				16		64	128	256	2097152	1048576	2048			512	3148752
441	육도농림나3호	일본								256	2097152	1048576			131072		3277056
442	NAR8F5-1-3-2	가이아니							128	256		1048576			131072		1180032
443	NAR163 F3-1-4	가이아니								256	2097152				131072	512	2228992
444	TOX3133-59-1-2-4-1	나이지리아							128	256	2097152				131072		2228608
445	TOX3027-42-1-E-2-1-1-1	나이지리아								256	2097152				131072	512	2228992
446	Tadukan	네팔		2			32			256	2097152				131072		2228514
447	POKHARELIMASINO	네팔						64		256	2097152				131072		2228544
448	Krasnodarskill	러시아				16		64	128	256		1048576	2048				1051088

449	Novoselskill	러시아	1				16		64	128	256		1048576	2048				1051089
450	HO459	러시아		2			16	32	64	128	256	2097152	1048576				512	3146738
451	ANG IN AFOTSY	마다가스					16			128	256					131072	512	131984
452	WIR 7085	마다가스	1		4		16		64	128		2097152	1048576	2048				3147989
453	OM987-1	멕시코								128	256	2097152				131072		2228608
454	IRR116302	미국		2			16		64	128	256		1048576	2048				1051090
455	Jasmine 85	미국						32		128	256		1048576		524288	131072	512	1704864
456	California Blue Rose	미국	1				16		64	128		2097152						2097361
457	미19b1014b-9n-1	미국									256	2097152				131072	512	2228992
458	NAHNGMON S-4 SELECTION	미국									256	2097152	1048576			131072		3277056
459	무명4	미국								128	256	2097152	1048576			131072	512	3277696
460	무명1	미국			4		16		64	128	256	2097152	1048576			131072	512	3277780
461	무명2	미국			4		16		64	128	256	2097152	1048576			131072	512	3277780
462	무명3	미국			4		16		64	128	256	2097152	1048576			131072	512	3277780
463	Bashtus	방글라 데시						32		128	256	2097152						2097568
464	Boteswar-2	방글라 데시						32			256	2097152				131072		2228512
465	Mati Char	방글라 데시						32			256	2097152				131072		2228512
466	Dharga Sail	방글라 데시						32		128	256	2097152				131072		2228640
467	BR1543-9-2-1	방글라 데시						32		128	256	2097152	1048576			131072	512	3277728
468	JMANG PAI HAUTAO	베트남					16		64	128	256		1048576			131072		1180112
469	Bui Tap49	베트남	1		4	8				128	256	2097152				131072		2228621
470	Chumro	부탄					16		64	128	256							464
471	Bajo Kaapl	부탄									256	2097152				131072		2228480
472	염주4호	북한					16	32		128			1048576					1048752
473	서해13	북한			4		16			128	256		1048576	2048	524288		512	1575828
474	평도1호	북한			4		16			128	256	2097152	1048576			131072	512	3277716
475	함주	북한			4		16	32				2097152	1048576		524288	131072	512	3801652
476	CAIAPO	브라질			4		16		64	128	256	2097152				131072	512	2229204
477	MARAVILHA	브라질			4		16		64	128	256	2097152				131072	512	2229204
478	SUDAHALOW	스리랑카		2							256	2097152						2097410
479	SEENATTY	스리랑카		2				32		128	256	2097152	1048576			131072		3277218
480	ARIE TE	스페인			4		16		64	128	256		1048576					1049044
481	kessa red	아제르바이잔		2				32		128	256	2097152	1048576				512	3146658
482	SPINMERE	아프가니스탄						32		128	256	2097152						2097568
483	LUNOOPUN	아프가니스탄	1		4		16		64	128		2097152	1048576	2048				3147989
484	Debzere	우즈베크					16		64	128	256	2097152	1048576	2048				3148240
485	DOMSO FOOD	이란						32		128	256	2097152						2097568
486	HASSNAY	이란		2				32	64	128	256	2097152	1048576				512	3146722
487	GIZA	이집트									256	2097152				131072		2228480
488	GIZA 170	이집트					16				256	2097152	1048576			131072	512	3277584

489	ZENA	이탈리아					16		64	128	256		1048576						1049040	
490	ARIRTE	이탈리아			4		16		64	128	256		1048576						1049044	
491	ARGO	이탈리아					16		64	128	256		1048576	2048				512	1051600	
492	KAGI	인도						32				256	2097152						2097440	
493	BASMATI	인도						32				256	2097152	1048576				131072	3277088	
494	Mendawak	인도네시아						32		128		256	2097152					131072	2228640	
495	Mayang	인도네시아										256	2097152					131072	512	2228992
496	QUILLA	칠레	1	2			16			128	256		1048576	2048					1051027	
497	Diamaute	칠레		2			16		64	128	256		1048576	2048					1051090	
498	Zarya	카자흐	1	2			16		64	128		2097152	1048576	2048					3147987	
499	Blue bell	콜롬비아					16		64	128	256		1048576					512	1049552	
500	Lemont	콜롬비아					16		64	128	256		1048576					131072	512	1180624
501	OS248	태국						32		128	256	2097152						131072		2228640
502	BASAMATI	파키스탄						32		128	256	2097152						131072		2228640
503	Muzzaffar-8	파키스탄						32		128	256	2097152			524288			131072		2752928
504	CAROLINA	페루					16			128	256	2097152						131072		2228624
505	GIANT GRAIN	필리핀					16		64	128	256									464
506	KINAGAYKAY	필리핀					16		64	128	256								512	976
507	IR1552	필리핀										256	2097152					131072	512	2228992
508	IR1750-F5B-22	필리핀								128	256	2097152						131072	512	2229120
509	IR1487-194--3-4	필리핀							64	128	256	2097152						131072	512	2229184
510	IRRI 10320	필리핀										256	2097152	1048576				131072	512	3277568
511	IR12780	필리핀			4				64	128	256	2097152	1048576					131072	512	3277764
512	Cgi-Csing	헝가리	1				8	16		64	128			1048576					512	1049305
513	DAMA	헝가리	1				8	16		64	128	256		1048576	2048					1051097

판정표 내 동일한 마커의 증폭으로 스코어가 같아 품종을 구별할 수 없는 몇몇 품종이 확인되었다. 이 품종들 중 국내산의 경우 국가 육성품종 및 국가목록 등재 품종 이외의 품종으로 확인 되었으며, 수입산 품종과 동일한 스코어를 나타내는 품종은 확인되지 않아 원산지 판정에는 문제가 없는 것으로 간주하였다. 또한 동일한 스코어를 나타내는 수입산 품종의 경우 동 국가의 품종 내에서만 나타나는 것을 확인하였기 때문에 이 역시 국내산 품종과 구별할 수 있으며 원산지 검정 결과에 영향을 미치지 않는 으로 판단하였다.

4. 쌀 원산지 검정을 위한 multiplex Real-time PCR 법 개발

쌀 원산지 검정을 위해서는 한 시료 당 24립의 낱알로부터 각각 DNA를 추출하고, 선정된 15개의 SNP 마커를 분석해야 하므로 최소한 총 360번의 Real-time PCR 을 수행하게 되어 시간과 노동력 소모가 매우 크다. 또한, 한 번에 분석하는 시료의 수가 증가할수록 검사시간과 인력은 배로 소모된다. 따라서 본 연구개발에서는 많은 벼 시료를 신속, 정확, 간편, 경제적으로 검정할 수 있는 방법으로 multiplex Real-time PCR 방법을 제안, 개발하였다.

Multiplex Real-time PCR 법 개발을 위하여 위에서 선정한 15개 마커를 세 개씩 조합한 multiplex set를 구성하였다. 즉, 5개 multiplex set를 이용한 검정으로 PCR 반응수를 1/3 수준으로 절감하였다. 이것은 한 multiplex set 내에 포함된 TaqMan 프로브들을 서로 다른 파장과 color를 나타내는 형광인자, 즉 FAM, VIC, NED 로 표시하여 동시 분석이 가능한 것이다. 최적의 다중 마커 조합을 위하여 먼저 각각의 프로브들에 대하여 다양한 형광인자로 표시한 뒤 이들 마커를 여러 경우의 수로 조합한 세트를 이용하여 multiplex Real-time PCR을 수행하였다.

Multiplex Real-time PCR 결과 각 조합 내 프라이머 및 프로브들의 간섭현상이 없고, single Real-time PCR 결과와 비교하여 delta Rn 값, Ct 값 및 amplification plot 등을 고려하여 최적의 다중 마커 조합을 확정하였다(Table 8). 최적의 멀티플렉스 조합을 구성하기 위하여 각 마커 당 여러 종류의 프라이머 및 프로브를 제작하여 검토한 뒤 각각의 농도를 조절하여 최종적으로 조건을 결정하였다. 멀티플렉스 검정에 최적화된 프라이머 및 프로브의 농도는 Table 9과 같다.

Table 8. Multiplex sets and labeling with the fluorescent dyes for 15 SNP markers.

Set	SNP marker	Fluorephore
Triplex 1	DK2401	FAM
	DK50	VIC
	DK2171	NED
Triplex 2	DK17-1	FAM
	DK1412	VIC
	DK34	NED
Triplex 3	DK560	FAM
	DK2394	VIC
	DK63	NED
Triplex 4	DK1123	FAM
	DK1361	VIC
	DK600	NED
Triplex 5	DK2511	FAM
	DK2708	VIC
	DK601	NED

Table 9. Concentration of each primer and probe set specific for 15 SNP markers.

Multiplex set	SNP marker	Primer/probe	Final concentration (pmol/rxn)
Triplex 1	DK2401	Forward primer	7
		Reverse primer	7
		Probe	1.5
	DK50	Forward primer	5
		Reverse primer	5
		Probe	1
	DK2171	Forward primer	15
		Reverse primer	15
		Probe	1
Triplex 2	DK17-1	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	1
	DK1412	Forward primer	5
		Reverse primer	5
		Probe	1
	DK34	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	1
Triplex 3	DK560	Forward primer	5
		Reverse primer	5
		Probe	2
	DK2394	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2
	DK63	Forward primer	5
		Reverse primer	5
		Probe	2
Triplex 4	DK1123	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2
	DK1361	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2
	DK600	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2
Triplex 5	DK2511	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2
	DK601	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2
	DK2708	Forward primer	10
		Reverse primer	10
		Probe	2

제 6 절 자동분석 소프트웨어 개발

Real-time PCR 방법은 high throughput technology 로 많은 수의 마커와 시료를 동시에 분석하는데 매우 유용한 검사법으로 각광받고 있다. 본 연구개발에서는 multiplex Real-time PCR 후 추출되는 방대한 양의 수치 데이터를 자동화된 방식으로 일괄적으로 분석하여 벼 품종을 판별하고 그 혼입률을 계산할 수 있도록 BT와 IT가 결합된 효율적인 소프트웨어를 개발하였다.

즉, 쌀 원산지 검정 시 한 개의 시료로부터 취한 24립의 쌀 낱알을 각각 15개의 SNP 마커로 Real-time PCR 을 수행할 경우 총 320개 이상의 데이터가 발생하게 되는데, 이 모든 데이터를 실험자가 직접 확인하고 판정하려면 많은 시간이 필요하고 판정의 오류를 범할 우려가 있다. 따라서 본 자동분석 소프트웨어를 이용하여 추출된 데이터를 자동으로 연동시킴으로써 30초 내에 결과를 판정할 수 있도록 개발하였다(Figure 4).

1. Real-time PCR 데이터 추출

대부분의 Real-time PCR 결과 데이터는 Ct value 와 delta Rn으로 표현된다. Ct value는 증폭 여부 및 정량적인 의미로 사용하며, dRn은 증폭된 정도를 의미한다. 따라서 원산지 검정법에 사용되는 데이터는 증폭정도의 확인이 아니라 각 마커의 증폭여부를 정성적으로 확인 하는 것이므로 추출되는 대상 데이터는 Ct value를 기준으로 하였다.

2. 자동분석 소프트웨어의 스펙

- Real-time PCR 장비로부터 추출되는 Ct value의 export file 의 format는 "*.csv", "*.txt" 등의 파일형식이므로 자동분석 소프트웨어에서는 두 가지 파일을 모두 지원하도록 개발하였다.

- 쌀 원산지 검정을 위해서 15 SNP 마커를 분석할 경우 두 개의 데이터 파일이 추출되므로 각기 다른 2개의 파일 data를 함께 분석할 수 있도록 제작하였으며, 실험자의 실수 또는 시료의 오류로 인해 일부 마커의 재실험이 필요한 경우가 생길 가능성에 대비하여 2개의 데이터 파일을 병합하거나 덮어 씌워 분석 할 수 있도록 개발하였다. 또한 분석에 사용되는 마커의 수차, 수정 및 제거가 자유롭게 하였다.

- Real-time PCR 에서 추출되는 Ct value 에 대한 threshold를 설정하여 cutoff 이 내의 값은 유효값으로 인정하고, 그 미만 또는 초과 값은 “재실험” 또는 “오염”으로 판정 하도록 제작하였다.

- 자동분석 소프트웨어로 분석된 결과는 이미지 파일 “*.jpg” 또는 문서 파일인 “.xls” 등의 파일 형식으로 저장, 프린터 출력이 가능하도록 하였고, 분석되는 시료명 및 분석

시료번호, 시험자를 표기할 수 있도록 개발하였다.



KoRAS™ (Kogene Real-time Analysis System) 2010-09-29 23:23:44

실험 Setup

결과 파일 열기

불러 온 파일명 :

T2(NEW2)-plex

Marker Add Or Delete

Upgrade 사용 (체크지 사용)

재검사 사용

Real-Time PCR Machine & Operation Type :

AB-7500-Rice-NP24

의뢰업체 :

의뢰시료명 :

시료번호 :

문서번호 :

관정표 수정 및 보기

Plate Setup

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	7	15	23	N	7	15	23	N	7	15	23
B	P	8	16	24	P	8	16	24	P	8	16	24
C	1	9	17	25	1	9	17	25	1	9	17	25
D	2	10	18	26	2	10	18	26	2	10	18	26
E	3	11	19	27	3	11	19	27	3	11	19	27
F	4	12	20	28	4	12	20	28	4	12	20	28
G	5	13	21	29	5	13	21	29	5	13	21	29
H	6	14	22	30	6	14	22	30	6	14	22	30

***** 그라드 화면에서 마우스 오른쪽 클릭 하면 메뉴를 볼 수 있습니다. *****

Well 번호 보기 Default Setup Auto Default Setup ANALYZE

Figure 4. Developed auto-analytic software for rice origin authentication.

3. 자동분석 소프트웨어 사용법

소프트웨어 사용 방법은 아래와 같으며, 자세한 매뉴얼을 Figure 5에 나타내었다.

- (가) Real-time PCR을 수행한 후 PCR이 완료 되면 software의 "Analysis" 버튼을 클릭하여 자동 분석한다.
- (나) Software에서 "Amplification plot"을 확인 하여 정상적으로 증폭되었는지 확인한다.
- (다) Software에서 "Export" 기능을 이용하여 Ct value를 Export 한다.
- (라) "KoRAS software" 아이콘을 클릭하여 software를 구동시킨다.
- (마) KoRAS 초기 setup 화면에서 "결과파일열기"를 클릭하여 Export한 파일을 불러온다.
- (바) Export 파일을 불러온 후 "Real-time PCR Machine"에서 사용한 Real-time PCR을 선택한다.
- (사) Plate Setup 에서 Real-time PCR에서 실험한 내용과 일치 하도록 setup한다.
- (아) "Analyzer" 를 클릭하여 분석을 시작한다. 이때 화면에는 "결과분석중" 이라는 안내창을 확인 할 수 있다.
- (자) 분석이 완료되면 결과 페이지를 확인 한다.
- (차) "Print Preview"를 클릭하여 전체 화면으로 확인한다.
- (카) 각 마커의 NTC 및 positive control을 확인하여 모두 "통과"로 표시되는지 확인하여 모두 통과로 표시되었을 경우 실험이 정상적으로 수행된 것으로 판단한다. 만약 "오염" 또는 "재실험"이라는 메시지가 확인 될 때는 Real-time PCR을 다시 수행한다.
- (타) 분석된 품종 및 혼입률을 확인 하고 "Print"를 클릭하여 결과 분석 페이지를 인쇄한다.

IV. KoRAS 를 이용한 결과확인

1. KoRAS icon을 double click 한다.

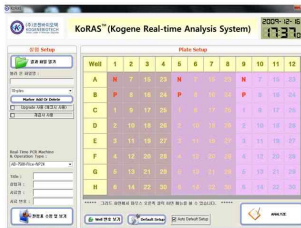


2. KoRAS 가 시작화면이 보인후 Setup 화면이 보인다.

KoRAS 초기화면



KoRAS Setup 페이지

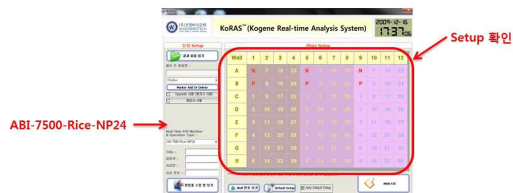


3. "결과 파일 열기" 를 click하여 Export 한 파일을 불러온다.
4. 불러온 파일명이 맞는지 확인한다.

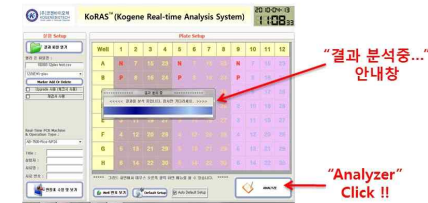


실험정보의 입력
 "Title": 미 입력시 "벼 품종 식별 분석 결과" 로 표시됩니다.
 "실험자", "시료명", "시료번호": 미입력시 Blank 로 처리됩니다.
 예제사진은 "Title=Quick Guide", "실험자=kogene", "시료명=Sample" 로 입력한 사진입니다.

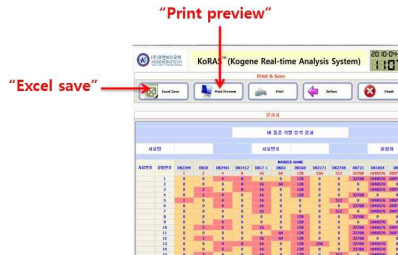
5. 파일을 불러온 후 "Real-Time PCR Machine" 에서 "ABI-7500-Rice-NP24" 를 선택한다.
6. 선택 후 오른쪽의 Plate 에 setup이 되었는지 확인한다.



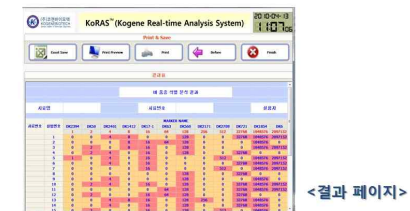
7. Plate 가 6의 그림과 같이 설정 되었다면, 오른쪽 밑의 Analyze button 을 눌러 분석을 실시한다.
 ; 분석 button을 누르면 아래 그림처럼 "결과분석중"이라는 안내창이 뜨면서 분석이 수행된다.



9. "Print preview" 를 click 하여 전체화면으로 확인한다.
 ; 확인 전 "Excel Save" button을 눌러 Excel File로 저장할 수 있으며 preview 페이지에서는 "Export JPG"를 click하여 그림파일(jpg)로도 저장할 수 있다.



8. 분석이 완료되면 결과 페이지를 볼 수 있다.



"Print preview" 페이지



10. 결과 확인 시 각 Marker의 NTC(No Template Control)와 Positive 가 모두 "통과"로 표시 되었는지 확인하여 모두 통과 되었을 경우 실험이 정상적으로 수행된 것으로 판단한다.
 ; 각 시료에 대한 품종 판정은 자동으로 분석되며 프로그램 하단의 판정란에 시료에 대한 품종 혼입율이 표시된다.



11. 모든 결과분석과정이 종료되면 "Print" button을 click하여 인쇄한다.

Figure 5. User manual of auto-analytical software.

제 7 절 쌀 원산지검정용 신기술의 유효성 검증

개발된 기술의 유효성 검증 연구는 협동기관인 동국대학교 식품공학과 홍광원 교수 팀에 의하여 수행되었다.

1. 기기별 최적화

현재 국립농산물품질관리원에서 고시한 쌀품종 검정법은 두 가지 방법으로 구분되는데, conventional PCR 방법과 Real-time PCR 방법이 사용되고 있다. 쌀품종 검정기술로서 Real-time PCR 법을 채택한 비중이 전체의 70 % 이상을 차지하고 있으며, Real-time PCR 법을 사용하는 실험실에서는 모두 Life Technologies 사의 AB7500 장비를 사용하고 있다. 이들 실험실은 모두 본 연구개발에 의한 새로운 쌀 원산지 검정기술의 수요처가 될 것이기 때문에 기타 장비에 대한 최적화가 필수적이지는 않지만 해외 시장 진출 및 기타 장비에서의 적용성을 검토하기 위한 목적으로 다양한 장비들에 대한 기기별 최적화 작업을 수행하였다.

장비별 최적화 작업은 본 연구개발을 통하여 선정된 15개 SNP 마커를 기준으로 고정하였으며, 각 장비별로 검출할 수 있는 파장 대를 고려하여 프라이머와 프로브를 조정하고 각 농도와 조건을 수립하였다.

(가) Real-time PCR 장비의 선정

Real-time PCR 장비의 종류는 매우 다양하지만 여러 개의 형광 표지 probe를 multiplex로 확인 할 수 있도록 다양한 파장대를 검출할 수 있는 장비는 한정적이다. 또한, 세 개 이상의 형광 표지 probe를 multiplex로 확인 할 수 있는 장비는 더욱 제한적 이므로 Life Technologies 사의 AB7500, AB7500 Fast, StepOne Plus, AB7900 과 Roche 사의 LightCycler 480, 그리고 Qiagen 사의 Rotor-Gene 6000 등이 적용 가능 장비의 범주 내에 포함되어 있다. 특히, AB7900 과 LightCycler 480의 경우 다른 장비에 비하여 고가이므로 많은 시험자가 쉽게 접근할 수 없는 단점을 가지고 있다.

(나) AB7500

본 연구개발인 쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 분석법 개발에 기반이 된 장비로서 AB7500 의 분석 결과를 기준으로 다른 장비의 최적화 작업을 수행하였다.

(다) AB7500 Fast

AB7500 Fast 장비는 AB7500 장비와 많은 부분이 유사한 formation을 갖추고 있다. AB7500과 가장 큰 차이점은 유전자를 증폭시키는 PCR 장비의 큰 부분을 차지하는 block의 모양 및 종류가 다르며 이에 따라 사용되는 tube의 종류도 다르다. 또한 block을 heating 하는 방식 역시 AB7500 과 차이를 보인다. 따라서 다른 방식의 block와 heating 방식에 대한 PCR 조건을 최적화하였다.

해당 장비에 본 연구를 통해 개발된 쌀 원산지 검정법을 적용하여 Real-time PCR을 수행한 결과는 Figure 6과 같다.

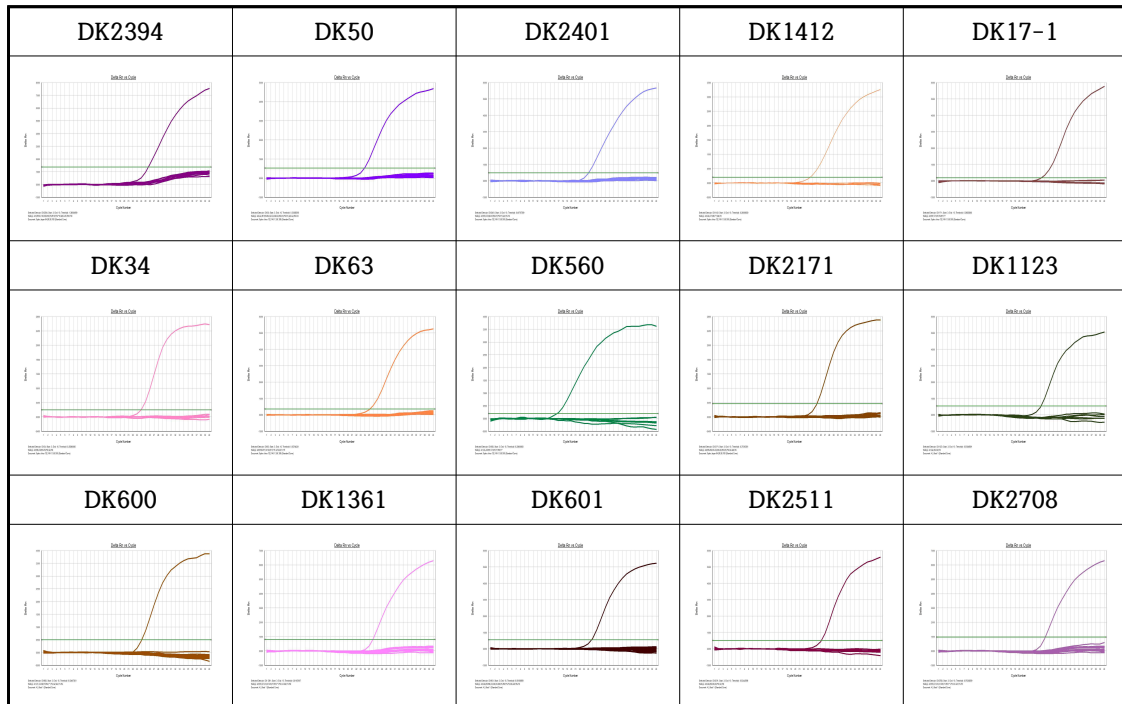


Figure 6. Application of the developed Real-time PCR method on AB7500 Fast instrument.

(라) StepOne Plus

StepOne Plus 장비 역시 AB7500 과 상당히 유사한 formation을 가지고 있는 장비이지만 각각의 장비에 따라 형광 dye를 detection 하는 정도의 차이는 존재 하므로 형광 표지 probe의 사용 양을 조절 하였고, 운용되는 operator software 역시 AB7500

과 많은 차이를 보이므로 추출되는 export Ct value 데이터 파일을 자동분석 소프트웨어에 적용할 수 있는 방향으로 최적화를 실시하였다.

해당 장비에 본 연구를 통해 개발된 쌀 원산지 검정법을 적용하여 Real-time PCR을 수행한 결과는 Figure 7과 같다.

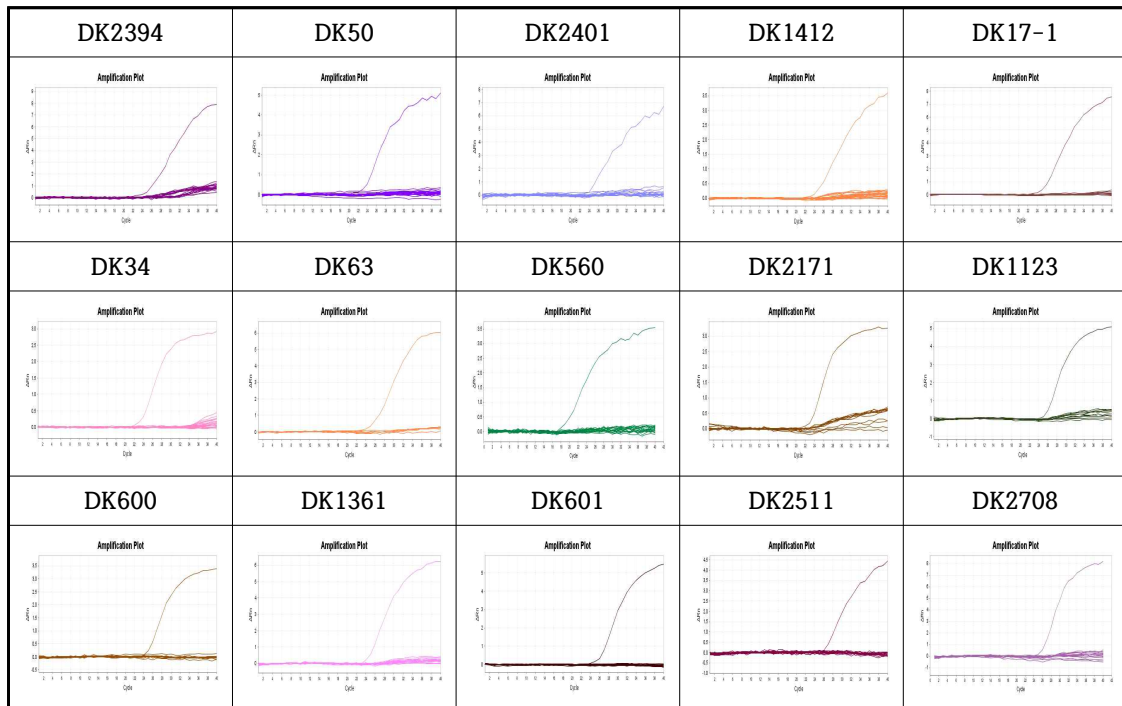


Figure 7. Application of the developed Real-time PCR method on AB StepOne Plus instrument.

(마) AB7900

AB7900은 형광 표지 probe의 detection에 사용되는 광원으로 할로겐을 사용하는 다른 multiplex Real-time PCR 장비들과 달리 광원으로 레이저를 이용한다. 이에 따라 각 마커에 대한 프로브의 형광인자가 검출되는 정도의 차이가 생길 것으로 예측하고 각 마커 조합 내의 프로브 사용량을 조절하여 최적화를 실시하였다.

해당 장비에 본 연구를 통해 개발된 쌀 원산지 검정법을 적용하여 Real-time PCR을 수행한 결과는 Figure 8과 같다.

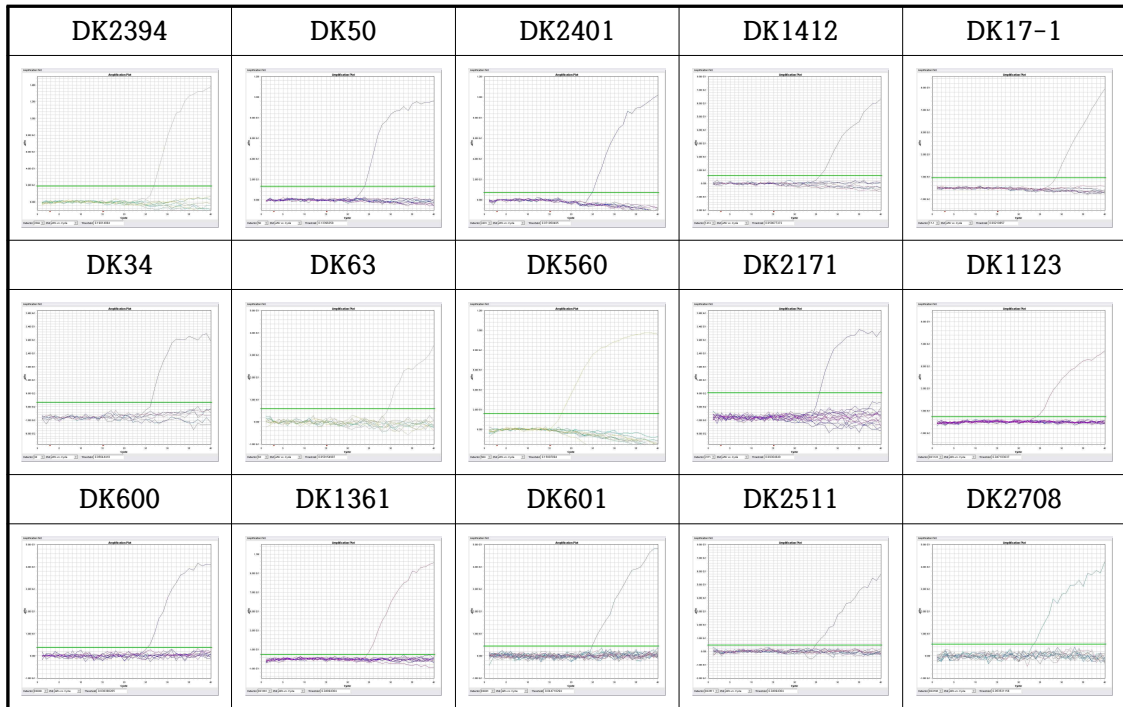


Figure 8. Application of the developed Real-time PCR method on AB7900 instrument.

(바) LightCycler 480

LC480 (LightCycler 480) 장비는 프로브의 형광을 검출하는 정도 차이 뿐 아니라 데이터 형식 및 포맷에서 다른 장비들과 큰 차이를 보인다. 따라서 추출되는 export Ct value 데이터 파일을 자동분석 소프트웨어에 적용을 시키기 위한 방법과 장비별로 다른 광원 및 검출 효율에 따른 프로브 사용량을 조절 하여 최적화를 수행하였다. 그러나, 해당 장비의 경우 운용 소프트웨어 및 데이터의 폐쇄성 때문에 본 연구에서 개발된 자동분석용 소프트웨어 적용에는 한계가 있는 것을 확인하였다.

해당 장비에 본 연구를 통해 개발된 쌀 원산지 검정법을 적용하여 Real-time PCR을 수행한 결과는 Figure 9과 같다.

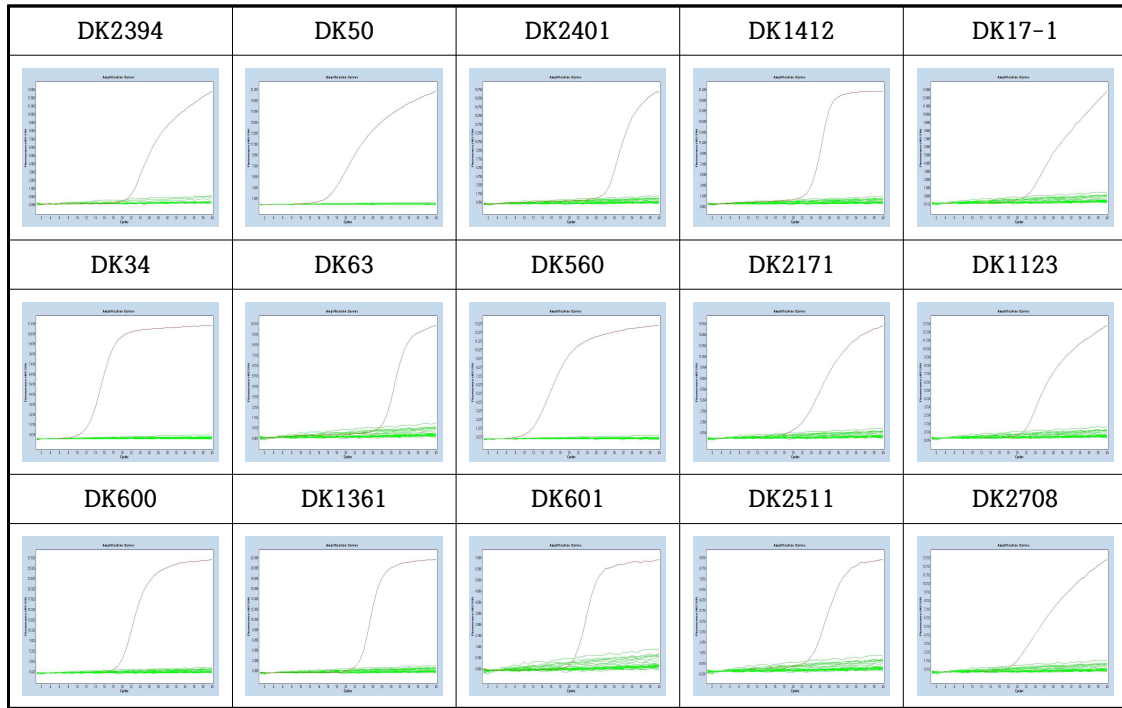


Figure 9. Application of the developed Real-time PCR method on LC480 instrument.

(사) Rotor-Gene 6000

Rotor-Gene 6000 장비는 rotor 형 플랫폼을 보유하고 있어 block type의 장비에 비하여 프로브의 형광인자를 검출하는 거리가 가장 짧아 보다 정확한 값을 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 프로브의 형광을 검출하는 광원으로서 LED를 사용하며 모든 tube로부터 광원 및 detection filter 간의 거리가 동일하여 block type의 장비에서 사용되는 reference dye를 사용하지 않아도 된다. 해당 장비에서의 최적화를 위하여 2X Real-Time MasterMix의 조성을 변경하였으며, 마커별 프라이머와 프로브의 농도 및 PCR condition을 조정하여 최적화 하였다.

해당 장비에 본 연구를 통해 개발된 쌀 원산지 검정법을 적용하여 Real-time PCR을 수행한 결과는 Figure 10과 같다.

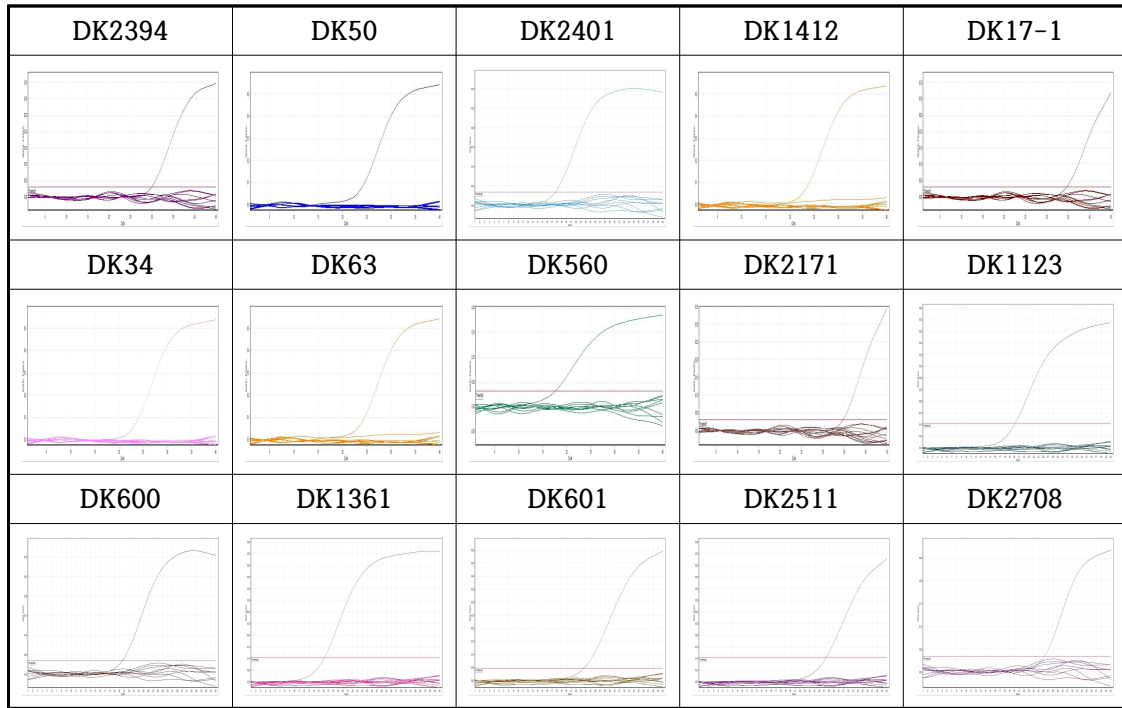


Figure 10. Application of the developed Real-time PCR method on Rotor-Gene 6000 instrument.

각 장비에 최적화된 프라이머 및 프로브의 농도를 Table 10에 정리하였다.

Table 10. Concentrations of primer and probe sets optimized to various Real-time PCR instruments.

Multiplex set	Marker	Primer /probe	Final concentration (pmol/rxn)				
			AB7500 Fast	StepOne Plus	AB7900	LC480	Rotor-Gene
Triplex 1	DK2401	Forward	7	10	7	10	7
		Reverse	7	10	7	10	7
		Probe	1.5	2	1.5	2	2
	DK50	Forward	5	10	5	5	5
		Reverse	5	10	5	5	5
		Probe	1	1	1	1	1
	DK2171	Forward	15	15	15	20	20
		Reverse	15	15	15	20	20
		Probe	1	2	2	1	1
Triplex 2	DK17-1	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	1	2	1	1	1
	DK1412	Forward	5	10	10	5	5
		Reverse	5	10	10	5	5
		Probe	1	1	1	1	1
	DK34	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	1	2	2	2	2
Triplex 3	DK560	Forward	5	10	5	5	5
		Reverse	5	10	5	5	5
		Probe	2	1	2	2	2
	DK2394	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	2	2
	DK63	Forward	5	10	10	10	10
		Reverse	5	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	4	4
Triplex 4	DK1123	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	2	2
	DK1361	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	2	2
	DK600	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	4	4
Triplex 5	DK2511	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	2	2
	DK601	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	2	2
	DK2708	Forward	10	10	10	10	10
		Reverse	10	10	10	10	10
		Probe	2	2	2	4	4

3. 개발된 쌀 원산지 검정법의 표준화

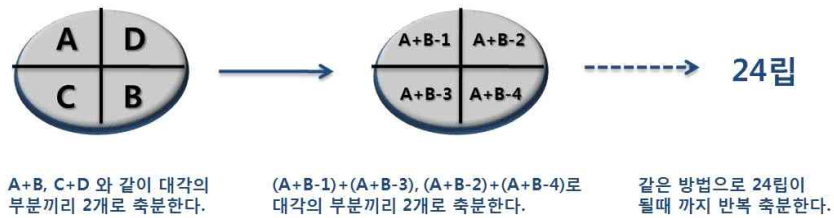
(가) 시료의 샘플링

시료의 채취 및 샘플링방법은 국립농산물품질관리원 고시 제 2000-8호에 따른 4분법을 사용한다.

(1) 4분법

① 시료는 축분 전에 충분히 혼합한다.

② 혼합한 시료는 그림과 같이 원형으로 평평히 얇게 펴고 종횡으로 선을 그어 4등분한다.



③ 4등분된 시료는 대각의 부분끼리 모아 2개로 축분한다.

④ 2개로 축분된 시료 중 그 하나를 임의로 선택하여 이와 같은 방법으로 소요량 24립이 될 때 까지 반복 축분한다.

(2) 균분기를 사용한 방법

① 시료는 축분 전에 충분히 혼합한다.

② 혼합한 시료는 그림과 같이 균분기에 시료를 넣고 2등분 한다.



③ 2등분된 시료 중 1개만 선택하여 균분기에 넣고 다시 2등분한다.

④ 2개로 축분된 시료 중 그 하나를 임의로 선택하여 이와 같은 방법으로 소요량 24립이 될 때 까지 반복 축분한다.

(나) 유전자(DNA) 추출

(1) 기기

미량원심분리기(12,000 rpm 이상), 항온수조, Vortex, 균분기, 분쇄기 등

(2) 시약 및 완충용액

① Powerprep™ DNA Extraction Kit form Rice Kit Components

- ㉠ Lysis Buffer A
- ㉡ Lysis Buffer B
- ㉢ Binding Buffer
- ㉣ Wash Buffer
- ㉤ Elution Buffer
- ㉥ Proteinase K
- ㉦ RNase
- ㉧ DNA Binding Column

② 기타 시약

- ㉠ Chloroform
- ㉡ 에탄올(Absolute)

(3) DNA 추출법

- ① 시료분쇄기 또는 기타의 방법으로 뼈 또는 쌀 낱알을 곱게 분쇄한다.
- ② Lysis A 250 μl , Lysis B 25 μl , Proteinase K (10 mg/ml) 10 μl , RNase (10 mg/ml) 10 μl 를 넣고 vortex 한 다음, 65°C water bath 에서 1시간 동안 반응한다. 찰벼의 경우 α -amylase(10 mg/ml)를 추가 하여 진행한다.
- ③ Chloroform을 300 μl 넣고 vortex후 12,000 rpm, 10분간 centrifuge한다.
- ④ 1.5 ml tube에 chloroform을 첨가한 후 원심분리한 용액의 상층액 200 μl , Binding Buffer를 400 μl 씩 첨가한다.
- ⑤ 4)의 용액 600 μl 을 DNA Binding column에 넣고, 12,000 rpm에서 1분간 centrifuge 한 후, 통과한 여액은 버린다.
- ⑥ Column에 Wash Buffer 600 μl 을 넣고, 12,000 rpm에서 1분간 centrifuge 한다.
- ⑦ 통과한 여액은 버리고, 빈 column을 12,000 rpm에서 2분간 centrifuge한다.
- ⑧ Wash Buffer가 완전히 제거된 것을 확인 한 후, column을 새로운 1.5 ml tube

에 옮긴 후 100 μ l의 Elution Buffer를 넣는다.

⑨ 실온에서 1분간 방치 후, 8,000 rpm에서 3 분간 원심분리하여 DNA를 얻는다.

⑩ 추출된 DNA는 농도 및 순도를 확인하여 이용한다.

(다) 쌀 원산지 검정을 위한 multiplex Real-time PCR 법

(1) 기기 및 장치

Real-Time PCR, 원심분리기 등

(2) 시약 (Kit Components)

① 2X Real-time PCR Master Mix (2XM)

Real-Time PCR을 통한 유전자 증폭에 필요한 DNA Taq. Polymerase, Reaction Buffer, dNTPs 등이 포함 되어있다.

② Triplex Mixture 1 (P1)

SNP 마커 중 DK2401, DK50, DK2171, 3개 마커에 대한 primer, probe mixture 이다.

③ Triplex Mixture 2 (P2)

SNP 마커 중 DK17-1, DK1412, DK34, 3개 마커에 대한 primer, probe mixture 이다.

④ Triplex Mixture 3 (P3)

SNP 마커 중 DK560, DK2394, DK63, 3개 마커에 대한 primer, probe mixture 이다.

⑤ Triplex Mixture 4 (P4)

SNP 마커 중 DK1123, DK1361, DK600, 3개 마커에 대한 primer, probe mixture 이다.

⑥ Triplex Mixture 5 (P5)

SNP 마커 중 DK2511, DK601, DK2708, 3개 마커에 대한 primer, probe mixture 이다.

⑦ Positive Control DNA 1 (C1)

SNP 마커에 대한 positive control 로서 Triplex Mixture 1의 DK2401, DK50, DK2171, 3개 마커에 대한 positive control DNA 이다.

⑧ Positive Control DNA 2 (C2)

SNP 마커에 대한 positive control 로서 Triplex Mixture 2의 DK17-1, DK1412, DK34, 3개 마커에 대한 positive control DNA 이다.

⑨ Positive Control DNA 3 (C3)

SNP 마커에 대한 positive control 로서 Triplex Mixture 3의 DK560, DK2394, DK63, 3개 마커에 대한 positive control DNA 이다.

⑩ Positive Control DNA 4 (C4)

SNP 마커에 대한 positive control 로서 Triplex Mixture 4의 DK1123, DK1361, DK600 3개 마커에 대한 positive control DNA 이다.

⑪ Positive Control DNA 5 (C5)

SNP 마커에 대한 positive control 로서 Triplex Mixture 5의 DK2511, DK601, DK2708, 3개 마커에 대한 positive control DNA 이다.

(3) multiplex Real-time PCR

① Real-time PCR Reaction Mixture (반응액) 의 조제

1.5 ml tube를 준비하여 시료 1점에 대한 반응용액을 20 µl 기준(template DNA 추가량 포함)으로 PCR 분석 시료 수 및 각각의 primer, probe mixture 수에 대한 반응액을 조제한다. 분석 시료 수 계산은 (전체 시료수+2)로 각 시약의 양을 계산하며 분석 시료 수에는 no template control 과 positive control을 포함 시키도록 한다. PCR 반응액의 조제 예시는 다음과 같다.

Components	Volume (1 tube)	반응액 volume (x 28)
2X Master Mix	10 µl	280 µl
Primer / Probe Mixture	3 µl	84 µl
D.W.	3 µl	84 µl
Template DNA	4 µl	-
Total	20 µl	448 µl

② Real-time PCR 증폭

㉞ Real-time PCR 전용 200 µl 8 well strip tube 또는 96 well plate에 PCR reaction mixture (반응액)을 16 µl 씩 분주 한 후, 검사시료로부터 추출한 template DNA를 각 well 에 4 µl 씩 분주한다. Quadruplex Mixture 1, Triplex

Mixture 2, Triplex Mixture 3을 먼저 분주, 반응한 후 Triplex Mixture 6의 반응액을 분주, 반응한다. 다음 그림과 같은 순서로 No template control, positive control 및 template DNA를 분주하여 반응한다.

④ Primer, probe mixture의 각 마커에 대한 probe fluorescent dye 설정을 한다. 각 마커에 대한 fluorescent dye는 다음과 같다.

Quadruplex Mixture 1 (P1+)	Triplex Mixture 2 (P2)	Triplex Mixture 3 (P3)	Triplex Mixture 4 (P4)	Triplex Mixture 5 (P5)
DK2401 - FAM	DK17-1 - FAM	DK560 - FAM	DK1123 - FAM	DK2511 - FAM
DK50 - VIC	DK1412 - VIC	DK2394 - VIC	DK1361 - VIC	DK2708 - VIC
DK2171 - NED	DK34 - NED	DK63 - NED	DK600 - NED	DK601 - NED

④ Real-time PCR 반응은 50 °C에서 2분, 95 °C에서 10분간의 DNA 변성 (pre-denaturation) 반응 후, 95 °C에서 15초, 60 °C에서 1분의 반응을 40 cycle 반복 한다.

③ Real-time PCR 결과의 확인

Real-time PCR 이 완료된 뒤 각각의 마커에 대한 Amplification plot의 확인을 통하여 각 시료에 대한 마커의 증폭 유무를 확인한다.

(4) 데이터 분석

Real-time PCR 완료 후 Ct value data를 export하여 자동분석 소프트웨어인 KoRAS(Kogene Real-time PCR Analysis System)를 사용하여 품종 판별 및 원산지를 확인한다.

4. 쌀 원산지 모니터링 검사

개발된 쌀 원산지 검정법을 이용하여 관련 기관으로부터 획득한 시료 및 유통 브랜드 쌀 시료를 대상으로 원산지표시제 현황을 점검하였다. 본 연구를 수행하면서 얻어진 결과를 바탕으로 개발기술의 specificity와 sensitivity를 검증하였다.

국내 유통 중인 주요 브랜드 쌀에 대한 모니터링 결과 본 검정기술에 의하여 해당품종이 모두 구별되었으며, 중국산 쌀의 경우에도 모두 국내산 품종과 구분되어 검정되었음을 확인하였다. 국내산 및 중국산 쌀에 대한 모니터링 검사의 결과는 부록 2와 부록 3에 첨부하였다.

가. 모니터링 검정법

모니터링 검사에 사용된 분석법은 본 연구에서 개발된 15개 SNP 마커를 이용한 쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 법을 사용하였으며 검사과정 및 방법은 다음과 같다.

(1) 시료의 채취

시판되고 있는 브랜드 쌀 1 kg 이상의 제품을 구매하여 시료를 준비하였으며, 검정에 사용될 시료의 채취는 균분기를 이용한 이분법으로 24립을 채취하였다.

(2) 검정 방법

- 본 연구에서 개발된 쌀 유전자 추출키트(PowerChek™ DNA Extraction Kit from Rice, Cat. E0003)를 사용하여 제품 매뉴얼에 따라 쌀 DNA를 추출하였다.
- 본 연구에서 개발된 PowerChek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit (Cat. R0711)의 제품 매뉴얼에 따라 AB7500 Real-time PCR 장비를 사용하여 수행하였다.
- Real-Time PCR을 통해 추출된 Ct value 데이터는 "*.csv" 파일 포맷으로 자동 분석 소프트웨어인 KoRAS (Kogene Real-time PCR Analysis System)를 사용하여 최종 분석하였다.

나. 국내 브랜드 쌀 모니터링

총 70 개의 제품으로부터 추출, 분석한 결과 70 개 제품 모두 원산지는 국내산으로 확인 되었으며, 70 개의 모든 제품은 양곡표시법에 의한 표시 사항 중 품종의 표시에 있어 80% 이상의 순도를 나타내는 것을 확인 하였다. 결과는 부록 2에 첨부하였다.

Table 12. Results of monitoring test for commercialized brand rice in Korea

No.	시료명	결과
1	이마트우리쌀, 이마트우리쌀골드	일품 100 %
2	연천쌀	고시히까리 91.7 %, 대안 8.3 %
3	파주 임진강골드	추청 95.8 %, 새추청 4.2 %
4	우수여주쌀	추청 87.4 %, 새추청 8.4 %, 상미 4.2 %
5	홍천강수라쌀	수라 100 %
6	백옥쌀	추청 91.7 %, 새추청 8.3 %
7	익산 순수미	신동진 95.8 %, 황금누리 4.2 %
8	큰들의 꿈	신동진 100 %
9	굴비골진상미	일미 95.8 %, 동진1호 4.2 %
10	지평선 상상예찬쌀	일미 95.8 %, 신동진 4.2 %
11	해조은쌀 하동꽃살	일미 95.8 %, 동진1호 4.2 %
12	뜸부기와 함께자란쌀	삼광 100 %
13	아산맑은쌀	삼광 100 %
14	철원오대미	오대 100 %
15	사계절이 사는집	일미 95.8 %, 남평 4.2 %
16	대숲맑은쌀 plus	일미 87.5 %, 남평 4.2 %, 대안 4.2 %, 주남 4.2 %
17	임금님표이천쌀	추청 100 %
18	단풍미인쌀	호품 95.8 %, 주남 4.2 %
19	하늘아래한쌀	일미 100 %
20	미황	삼광 91.7 %, 주남 8.3 %
21	김포금쌀	추청 100 %
22	다올찬쌀	추청 83.3 %, 삼광 8.3 %, 대안 4.2 %, 동진1호 4.2 %
23	지평선	호품 83.3 %, 주남 16.7 %
24	청원생명쌀(골드)	추청 95.8 %, 상미 4.2 %
25	해나루쌀	삼광 100 %
26	안성마춤쌀	추청 100 %
27	행복한아침	주남 100 %
28	지평선 상상예찬	신동진 95.8 %, 남평 4.2 %
29	드림생미	일미 95.8 %, 주남 4.2 %
30	생거진천쌀	추청 95.8 %, 삼광 4.2 %
31	한눈에반한쌀	히토메보레 100 %
32	대왕님표여주쌀	추청 100 %
33	아르미쌀	일미 80.1 %, 주남 10 %, 동진1호 3.3 %, 화영 3.3 %, 동안 3.3 %
34	탑라이스	일미 100 %
35	용인백옥쌀	추청 95.8 %, 삼광 4.2 %
36	아산 맑은 쌀 골드	삼광 83.3 %, 주남 12.5 %, 대안 4.2 %
37	햇살좋은쌀	일미 87.5 %, 화영 8.3 %, 주남 4.2 %

38	수퍼오닝쌀	고시히카리 100 %
39	미다옴쌀	추청 100 %
40	토토미	추청 83.3 %, 삼광 16.7 %
41	함박명품 안성마춤쌀	추청 100 %
42	이천쌀	추청 100 %
43	당진 해나루쌀	삼광 91.7 %, 주남 8.3 %
44	미황	삼광 100 %
45	아르미쌀	일미 100 %
46	슈퍼오닝	고시히카리 100 %
47	생거진천쌀	추청 92 %, 주남 4 %, 삼광 4 %
48	임금님표이천쌀	추청 100 %
49	지평선	신동진 100 %
50	햇살드리	추청 100 %
51	이사금	삼덕 100 %
52	다올찬 쌀	추청 100 %
53	굴비골진상미	일미 100 %
54	김포금쌀	고시히카리 100 %
55	용인플러스 백옥쌀	추청 92 %, 삼광 4 %, 새추청 4 %
56	양반쌀	철보 96 %, 호품 4 %
57	임금님표이천쌀	추청 100 %
58	해나루쌀	삼광 96 %, 주남 4 %
59	햇살드리	추청 100 %
60	고시히카리	고시히카리 100 %
61	야심작	신동진 96 %, 대안 4 %
62	밥맛이거창합니다	추청 100 %
63	해나루쌀	삼광 96 %, 주남 4 %
64	임금님표이천쌀	추청 96 %, 새추청 4 %
65	햇살좋은쌀	일미 100 %
66	하늘아래한쌀	일미 100 %
67	갯벌에 여문쌀	일미 96 %, 남평 4 %
68	철원오대쌀 헤모라이스	오대 100 %
69	철원D.M.Z 비무장지대 철원오대쌀	오대 100 %
70	드림생미	일미 96 %, 동진1호 4 %

다. 중국내 유통 쌀에 대한 모니터링 검사

중국 현지에서 유통되고 있는 쌀 20개의 제품을 수집하여 모니터링 검사를 실시하였다. 모니터링 검사 결과 20개의 제품 중 일부 제품에서 국내품종과 동일한 히토메보레 및 고시히카리 품종을 확인 할 수 있었으며, 나머지 제품들은 모두 중국산 품종으로 확인 되었다. 그러나 일부 품종확인이 어려운 쌀도 존재하였는데, 이는 본 연구개발에서 대상으로 한 중국산 93 개 이외의 기타 품종으로 간주된다. 중국 유통 쌀에 대한 데이터는 부록 3에 첨부하였다.

Table 13. Results of monitoring test for commercialized brand rice in China

No.	시료명	결과
1	나미	기타 : 100 %
2	홍미	BKNFR : 83.3 %, 기타 : 16.7 %
3	검정쌀 동북	YJ06-13 : 12.5 %, YJ06-16 : 8.3 %, 기타 : 79.2 %
4	검정쌀 동북	YJ06-19 : 50.0 %, 기타 : 50.0 %
5	강소성 찹쌀	자도 : 4.2 %, 기타 : 95.8 %
6	흑룡강성 우창쌀	용도4 : 58.3 %
7	동북 길림성 쌀	길갱88 : 50.0 %, 기타 : 50.0 %
8	남방쌀 상해	염도11호 : 50.0 %, 백점 : 4.2 %, 기타 : 45.8 %
9	흑룡강성 무공해 향미	부토광 : 16.7 %, 용갱13 : 33.3 %, 염도11호 : 4.2 %, 요염241 : 8.3 %, 강향1호 : 4.2 %, WIR7085 : 4.2 %, 기타 : 29.1 %
10	강소성 쌀	염도11호 : 45.8 %, 중추전소정 : 16.7 %, 기타 : 37.5 %
11	흑룡강성 우창 향미	도화향 2호 : 33.3 %, 기타 : 66.7 %
12	녹색식품동부길림성쌀	도화향2호 : 54.2 %, 통육308 : 8.3 %, 기타 : 37.5 %
13	녹색식품흑룡강성향미	도화향2호 : 37.5 %, 통육308 : 8.3 %, 기타 : 54.2 %
14	우창긴 찹쌀	DaenChon : 83.3 %, 기타 : 16.7 %
15	녹색식품풍성미업(길림)	길향1호 : 8.3 %, 기타 : 91.7 %
16	추전소정하북성길림대미	추전소정 : 62.5 %, 용농4 : 8.3 %, 중국9-23 : 12.5 %, 기타 : 16.7 %
17	월광대미하북성요염	Koshihikari : 58.3 %, 추전소정 : 4.2 %, 기타 : 37.5 %
18	농색식품길양미업	추전소정 : 4.2 %, 통경808 : 4.2 %, 용농4 : 41.6 %, SAN BANG : 4.2 %, 통육 308 : 4.2 %, 중국9-23 : 41.6 %
19	경성구수 흑룡강	삼평 : 54.2 %, 부토광 : 29.2 %, 간도10 : 16.6 %
20	향미 유기, 상해	기타 : 100 %

제 8 절 쌀 원산지검정용 신속 유전자분석키트 개발

유전자 분석을 하기 위한 첫 단계인 쌀 시료로부터 유전자를 추출 할 수 있는 쌀 유전자 추출 키트인 PowerChek™ DNA Extraction Kit from Rice 와 SNP 마커를 이용한 Multiplex Real-time PCR 키트인 PowerChek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit 마지막으로 Real-time PCR 수행 후 추출되는 데이터를 이용하여 자동으로 분석되는 자동분석 소프트웨어 제품인 KoRAS (Kogene Real-time PCR Analysis System)를 개발하였으며, 이 제품들은 각각의 제품으로 판매가 되면 또한 사용자가 저렴하게 구매하여 쉽게 사용할 수 있도록 하나의 패키지로 구성하였다. 또한, 자동분석 소프트웨어 제품의 경우 초기 설치 후 데이터베이스의 수정 등을 용이하게 제작 하여 제품의 업그레이드 및 추가 구매, 설치 없이 사용할 수 있도록 제작하였고, 자동분석 소프트웨어를 제외한 유전자 추출 키트와 Multiplex Real-time PCR 키트를 또 하나의 패키지로 구성하여 쉽게 사용할 수 있도록 개발하였다.

1. 쌀 DNA 추출키트 개발

앞서 언급한 바와 같이 본 연구개발에서는 silica column 법을 기반으로 한 DNA 추출 키트를 개발하였다. 쌀 유전자 추출키트(PowerPrep™ DNA Extraction Kit from Rice, Cat. E0003)는 Lysis Buffer A, Lysis Buffer B, Binding Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, Proteinase K, RNase, DNA Binding Column 으로 구성된다.

Table 14. Component parts of Rice DNA extraction Kit

Components	Volume
Lysis Buffer A	40 ml
Lysis Buffer B	5 ml
Binding Buffer	50 ml
Wash Buffer	15 ml
Elution Buffer	10 ml
Proteinase K	1 ml
RNase	1 ml
DNA Binding Column	100 ea

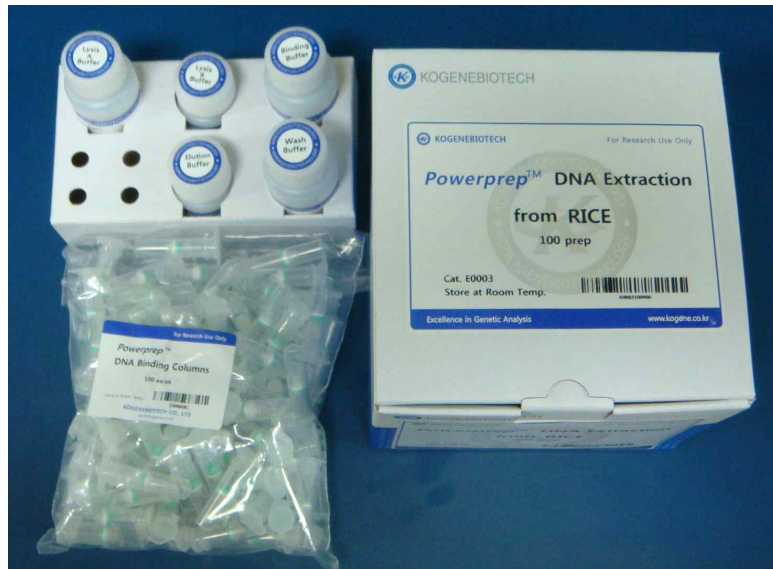


Figure 11. PowerChek™ DNA Extraction Kit from Rice, Cat. E0003.

PowerPrep™ DNA Extraction From Rice

Cat. No. : E0003
100 Preps

KOGENEBIOTECH

Kit Component

Buffer	Vol.
Lysis Buffer A	40 ml
Lysis Buffer B	5 ml
Binding Buffer	50 ml
Wash Buffer	15 ml add EtOH 50 ml to obtain 65 ml
Elution Buffer	10 ml
Proteinase K	1 ml
RNase	1 ml

Store at Room Temp.
But Proteinase K and RNase store at -20℃

DNA Extraction

1. Sample을 곱게 분쇄한 후 1.5 ml tube에 담는다.
2. Lysis Buffer A 300 μ l, Lysis Buffer B 30 μ l, Proteinase K 10 μ l, RNase 10 μ l 를 넣고 vortex 후, 65 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 반응한다.
(Lysis buffer 양은 sample에 따라 증가 또는 감소시킬 수 있다.)
3. Chloroform을 300 μ l 넣고 vortex 후 12,000 rpm, 10분간 centrifuge한다.
(Chloroform은 kit 안에 포함되어 있지 않다.)
4. 3의 상층액 200 μ l를 조심스럽게 취하여 새로운 1.5 ml tube에 담고, 여기에 400 μ l의 Binding Buffer를 첨가하여 잘 혼합한다.
5. 4번 용액 600 μ l를 취하여 DNA Binding column tube에 넣고, 12,000 rpm에서 2분간 centrifuge한다. 여과액은 따라버린다.
6. Column에 600 μ l의 (100% EtOH 50 ml을 첨가한) Wash buffer를 첨가하여, 12,000 rpm에서 2분간 centrifuge한다. 여과액은 따라버린다.
(Option!!: Column에 75%의 EtOH 600 μ l를 첨가하여 같은 조건에서 한번 더 wash 한다.)
7. 빈 column을 12,000 rpm에서 2분간 centrifuge하여 ethanol이 완전히 제거되도록 한다.
8. Column을 새로운 1.5 ml tube로 옮긴 후 100 μ l의 Elution Buffer를 넣고 1분 동안 상온에서 방치한다.
9. 8,000 rpm에서 3분간 centrifuge 하여 DNA을 얻는다.
10. DNA 농도를 측정하여 실험에 사용한다.

Procedures

Sampling



Lysis (incubation in 65 $^{\circ}$ C)



Chloroform 처리 (상층액 분리)



Bind (Binding buffer)



Wash (Wash buffer)



Option 2nd Wash (75% EtOH)



Elution



쌀(볍씨)에서의 genomic DNA 추출 결과



쌀(볍씨) 낱알 1개로부터 gDNA를 추출한 결과, 각 배치마다 일정한 회수율과 고순도를 나타내었다.

Figure 12. User manual of PowerCheck™ DNA Extraction Kit from Rice, Cat. E0003

2. 쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 키트 개발

본 연구에서 개발한 국내산 및 수입산 쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 검정법을 유전자분석 키트로 상용화하였다.

쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 키트는 해당 실험에 필요한 모든 시약, 즉 DNA Taq. polymerase, dNTP, Reaction buffer, MgCl₂, Reference dye 등을 최적의 조건으로 혼합하여 하나의 Real-time PCR Master Mix로 제공함으로써 실험자의 편의성을 최대한 고려하여 개발하였다. 또한, 각 multiplex set 의 프라이머 및 프로브는 최적의 농도로 미리 혼합되어 제공되며, 각각의 양성대조군 DNA도 포함시켰다. 해당 제품의 구성은 아래 Table 14과 같으며, 한 개의 키트는 4개의 시료에 대한 원산지를 검정할 수 있도록 구성하였다.

Table 15. Component parts of PowerChek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit, Cat. R0711

Components	Volume	Amount (# of tube)
2x Real-Time MasterMix	800 µl	8
Triplex Mixture 1 (P1)	90 µl	4
Triplex Mixture 2 (P2)	90 µl	4
Triplex Mixture 3 (P3)	90 µl	4
Triplex Mixture 4 (P4)	90 µl	4
Triplex Mixture 5 (P5)	90 µl	4
Positive Control 1 (C1)	30 µl	1
Positive Control 2 (C2)	30 µl	1
Positive Control 3 (C3)	30 µl	1
Positive Control 4 (C4)	30 µl	1
Positive Control 5 (C5)	30 µl	1



Figure 13. Commercialization of the developed multiplex Real-time PCR method for rice origin authentication. PowerChek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit, Cat. R0711.

PowerCheck™ Rice SNP Real-Time PCR Kit

[주]코젠바이오텍

Shipping at -20 ℃
Stored at -20 ℃

Cat. No. R0704

PowerCheck™ Rice SNP Real-Time PCR Kit 는

SNP 마커를 이용 벼(쌀) 품종을 구분할 수 있는 Real-Time PCR 키트입니다. (우리나라에 유통되는 대표적인 30 품종 이상 구분)

- **Fast** 15개의 SNP Maker 를 Triplex 로 묶어 검사함으로써, 실험시간과 노동력 소비를 최소화하였습니다.
- **Easy to operation** 추출한 DNA와 시약을 혼합하는 과정만으로 모든 반응이 종료됩니다. (일반 PCR법을 이용하면 반드시 거쳐야 했던 전기영동 과정이 필요 없습니다.)
- 본 키트에 구성된 시약들은 튜브당 한 건의 벼 시료를 검사하는데 필요한 양만큼만 담겨있어, 보다 편리하고 경제적으로 사용할 수 있습니다.

Component

Buffer	Vol.	Amount (# of tube)
2x Real-Time Master Mix	1.5 ml	4
Triplex Mixture 1 (P1)	90 μ l	4
Triplex Mixture 2 (P2)	90 μ l	4
Triplex Mixture 3 (P3)	90 μ l	4
Triplex Mixture 4 (P4)	90 μ l	4
Triplex Mixture 5 (P5)	90 μ l	4
Positive Control DNA 1 (C1)	30 μ l	1
Positive Control DNA 2 (C2)	30 μ l	1
Positive Control DNA 3 (C3)	30 μ l	1
Positive Control DNA 4 (C4)	30 μ l	1
Positive Control DNA 5 (C5)	30 μ l	1

PCR Reaction Mixture

Template	4 μ l
Primer/Probe Mixture	3 μ l
2x Master Mix	10 μ l
DW	3 μ l
Total	20 μ l

Instruction

- Template DNA 준비 :
검사하고자 하는 시료 (쌀 또는 벼) 한립으로 부터 추출한 DNA를 Template 로 사용한다.
- PCR reaction mixture 의 제조: (총 5종류의 mixture 제조)
Triplex Mixture 1, 2, 3, 4, 5 그리고 Rice specific primer probe mix 에 대하여 PCR reaction mixture 의 조성에 따라 각각의 Mixture 를 제조한다.
- 각각의 PCR tube 에 PCR reaction mixture 를 분주한 후, Template DNA 를 첨가 하고 뚜껑을 닫아 spin down 한다. (air bubble 생기지 않도록 주의)
- PCR reaction mixture 의 제조와 Template DNA 를 첨가할 때에는 서로 다른 pipette 을 사용하여 오염을 예방하도록 한다.
- Positive Control DNA 의 분주는 반드시 마지막에 하도록 한다.
- Positive Control DNA 1(C1) 은 Triplex Mixture 1(P1) 의 control DNA이며, C2는 P2의, C3는 P3의 C4는 P4의, C5는 P5의 control DNA이다.

Powerprep™ DNA Extraction Kit from RICE (코젠바이오텍 쌀 DNA 추출키트 Cat # E-4001) 로 추출한 DNA를 사용하였을 때 최상의 결과를 확인할 수 있습니다.

PCR Condition

Temp.	Time	Cycle
50℃	2 min	1
95℃	10 min	1
95℃	15 sec	40
60℃	1 min	

▶ 본 PCR condition 은 AB 7500, 7900 Real-Time PCR System 기준으로 작성되었습니다.

Fluorescent Dye

Triplex Mixture 1 (P1)	Triplex Mixture 2 (P2)	Triplex Mixture 3 (P3)
DK2401 - FAM	DK17-1 - FAM	DK560 - FAM
DK50 - VIC	DK1412 - VIC	DK2394 - VIC
DK2171 - NED	DK34 - NED	DK63 - NED
Triplex Mixture 4 (P4)	Triplex Mixture 5 (P5)	
DK1123 - FAM	DK2511 - FAM	
DK1361 - VIC	DK2708 - VIC	
DK600 - NED	DK601 - NED	

결과의 판정

- 자동 분석 소프트웨어 KoRAS(Kogene Real-Time Analysis Software) 를 사용하여 품종 및 혼합율을 분석 판정한다.

KOGENEBIOTECH

PowerCheck™ Rice SNP Series
www.kogene.co.kr

제품문의 ☎ (02)2026-2150
서울 금천구 가산디지털단지길 71 우림리이노스밸리C동 1203호

Figure 14. User manual of PowerCheck™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit, Cat. R0711.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

1. 쌀 원산지 검정용 SNP 마커 및 특이 프라이머, 프로브 세트의 개발

가. 수입 품종 및 국내 60-100여 품종 식별을 위한 SNP 마커 발굴 및 선정
국립농산물품질관리원 시험연구소와 경기도 여주군 농업기술센터로부터 분양 받은 국내산 및 수입산 품종을 구분할 수 있는 21개 후보의 SNP 마커를 선정하였다.

나. 선정된 마커 별 특이적 프라이머 및 프로브 세트의 개발 및 최적화
선정된 21개 SNP 부위에 대한 특이적 프라이머 및 TaqMan 프로브를 개발하였다.

다. Single 마커 대상 Real-time PCR 방법 개발 및 최적화
확보된 품종으로부터 DNA를 추출하였으며 개발된 SNP 마커에 대한 프라이머, 프로브 세트를 이용하여 single Real-time PCR 법을 개발하고 최적화하였다. 최종적으로 국내산과 수입산 품종을 구분할 수 있는 원산지 검정용 15 SNP 마커를 선별하였다.

2. 개발된 원산지검정용 프라이머, 프로브 시스템의 유용성 검증

가. Single Real-Time PCR 방법의 검증

국가목록등재품종 및 국내 재배면적에 따른 품종을 선별하여 이를 대상으로 SNP 프라이머 프로브 세트의 유효성을 검증하였다. 개발된 프라이머 및 프로브 시스템이 국내산 및 수입산 품종을 구분할 수 있음을 확인하였다.

나. Real-time PCR 기기별 구현을 통한 유용성 검증 및 최적화

AB7500, AB7900 장비에 대한 single Real-time PCR 법의 유효성을 검증하였으며 각 장비에 대한 single Real-time PCR 법의 최적화를 완료하였다.

3. 쌀 원산지 검정용 신속 유전자 분석기술 개발 및 실용화

가. 품종 구분 변별력을 높이기 위한 추가 마커 개발 및 선정

현재 원산지 관리, 감독기관인 국립농산물품질관리원에서 관리하는 국내산 67품종 및 수입산 품종 구분의 변별력을 높이기 위하여 추가 마커를 선정하여 각 품종에 대한 DNA profile을 확립하였다. 또한 수입산 품종의 각 마커에 대한 DNA profile을 확립하였으며, 최종적으로 국내산 품종 및 수입산 품종을 식별하기에 가장 적합한 15개의 SNP 마커를 이용한 원산지 검정 시스템을 확립하였다.

나. 동시 다중 마커 분석용 multiplex Real-time PCR 방법 개발 및 검사조건 최적화
동시 다중 마커의 분석을 위하여 각 마커의 프라이머, 프로브의 세트를 선정하였으며 멀티플렉스 조건을 최적화하였다.

다. 원산지 검정용 자동분석 소프트웨어 개발

Multiplex Real-Time PCR을 수행 후 추출되는 방대한 데이터의 자동 분석을 위하여 추출되는 데이터를 자동분석할 수 있는 소프트웨어를 개발 제작하였다.

라. 실시간 쌀 원산지 검정용 DNA 추출키트 및 Real-time PCR 키트 제작 및 실용화
개발된 쌀 원산지 검정 유전자 분석법의 'One-Stop Analysis'가 가능하도록 최적의 DNA 추출키트를 개발, 키트로 상용화하였다. 또한 쌀 원산지 검정용 유전자분석키트인 Multiplex Real-Time PCR 키트를 개발, 상용화 완료하였다.

4. 쌀 원산지 검정용 신기술의 유용성 검증 및 기술보급

가. 기기별 최적화 및 유용성 검증

개발된 Multiplex Real-time PCR 방법을 적용할 수 있는 Real-time PCR 장비를 선정하여 각각에 대한 최적화 조건을 수립하였다. 표준품종에 대하여 각 100립 이상씩을 대상으로 적용성 및 유효성을 확인하였다.

나. 쌀 원산지 검정기술의 실용화 및 기술보급

(1) 시판 쌀에 대한 원산지 표시 모니터링 검사

전국 지역별 브랜드 쌀 및 시판되고 있는 쌀, 그리고 중국산 쌀 시료에 대한 원산표

시 모니터링 검사를 수행하였으며, 개발된 원산지 검정 기술에 의하여 구별됨을 확인하였다.

(2) 기술보급

쌀 원산지 검정 유전자 분석법을 위한 쌀 시료로부터의 DNA 추출, multiplex Real-time PCR 및 자동분석 소프트웨어가 포함된 제품을 구성하여 쌀 원산지 검정 기술을 보급하였다. 2009년과 2010년, 지방자치단체 별 농업기술센터 및 농업기술원을 대상으로 기술이전 워크숍을 개최하였으며, 원산지 관리 감독기관인 국립농산물 품질관리원의 기술이전을 위한 세미나를 개최하였다. 워크숍 참가자는 아래와 같다. 효율적 기술이전을 위하여 사내 개최 워크숍 및 방문 교육을 병행하였으며, 경우에 따라 2회 이상의 교육을 수행하기도 하였다.

순번	성명	소속	직급	워크숍 일자
1	김OO	평택농기센터	농촌지도사	2009년 11월 19일
2	양OO	경기농기원	연구부원	2009년 11월 19일
3	박OO	경기농기원	-	2009년 11월 19일
4	임OO	김천농기센터	연구원	2009년 11월 19일
5	김OO	여주군농기센터	연구사	2009년 11월 19일
6	현OO	서산농기센터	농촌지도사	2009년 11월 19일
7	이OO	횡성농기센터	농촌지도사	2009년 11월 19일
8	김OO	횡성농기센터	농촌지도사	2009년 11월 19일
9	강OO	익산농기센터	직원	2009년 12월 17일
10	이OO	익산농기센터	직원	2009년 12월 17일
11	신OO	남원농기센터	직원	2009년 12월 17일
12	김OO	남원농기센터	직원	2009년 12월 17일
13	이OO	오뚜기	과장	2009년 12월 17일
14	고OO	오뚜기	사원	2009년 12월 17일
15	주OO	합천농기센터	사원	2009년 12월 17일
16	현OO	식품의약품안전평가원	연구사	2010년 2월 18일
17	신OO	식품의약품안전평가원	연구생	2010년 2월 18일
18	이OO	농업기술실용화재단	책임연구원	2010년 2월 18일

19	강OO	이천농기센터	-	2010년 2월 18일
20	박OO	울산과학기술대학교	-	2010년 2월 18일
21	이OO	평택농기센터	농촌지도사	2010년 3월 11일
22	김OO	여주 농기센터	농촌지도사	2010년 3월 19일
23	강OO	이천 농기센터	농촌지도사	2010년 3월 19일
24	윤OO	천안 농기센터	농촌지도사	2010년 3월 23일
25	이OO	화성 농기센터	농촌지도사	2010년 4월 8일
26	이OO	충북 농업기술원	연구사	2010년 4월 14일
27	황OO	국립농산물품질관리원 경북지원	주무관	2010년 7월 14일
28	윤OO	충남 농업기술원	연구사	2010년 7월 22일
29	권OO	구미 농기센터	-	2010년 7월 29일
30	송OO	전북 농업기술원	-	2010년 8월 11일
31	조OO	원주 농기센터	계장	2010년 8월 19일
32	박OO	영주 농기센터	-	2010년 9월 8일
33	이OO	안성 농기센터	-	2010년 10월 11일
34	신OO	신세계	연구원	2010년 10월 13일
35	손OO	울진 농기센터	-	2010년 10월 21일
36	백OO	포항 농기센터	-	2010년 11월 9일
37	조OO	강원도 농업기술원	연구사	2010년 11월 16일
38	최OO	국립농산물품질관리원 강원지원	주무관	2010년 11월 17일
39	이OO	여주농기센터	실무관	2010년 11월 25일
40	홍OO	횡성농기센터	-	2010년 11월 25일
41	윤OO	천안농기센터	-	2010년 11월 25일
42	이OO	군산농기센터	-	2010년 11월 25일
43	김OO	부여 농기센터	-	2010년 12월 7일
44	문OO	국립농산물품질관리원 서울시험소	연구사	2010년 12월 29일

제 2 절 관련 분야에의 기여도

1. 기술적 기여도

수입산 쌀의 보급과 유통이 확대됨에 따라 국내 쌀 생산 농가 보호와 소비자의 올바른 선택을 위한 목적으로 본 연구를 통하여 개발된 쌀 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR 법은 현 쌀 원산지 검정기술을 대체할 수 있도록 기존 검사법의 단점을 보완, 개선한 최신의 분석기술이다. 가장 향상된 요소는 검사시간의 혁신적 단축과 시험과정의 단순 및 간편화이다. 3~6일까지 소요되는 기존의 검정기술인 SSR-PAGE, SNP-PCR 법과 비교하여 5시간 이내 모든 분석을 완료 할 수 있으며, 노동력의 감소효과와 함께 분석의 자동화로 편의성 및 효율성을 향상시켰다.

개발 기술의 상용화 및 표준화를 통하여 최적의 실험과정과 자동분석에 의한 판정까지 일원화된 검사과정을 제공함으로써 국가적 차원에서의 표준화된 기술의 관리, 감독 확립에 일조할 수 있다. 또한, 최신의 원산지 유전자검사법에 대한 기반기술을 확보함으로써 농업생명공학기술 발전에 크게 기여할 것이다.

2. 경제, 사회적 기여도

개발기술은 최근 국가 정책으로 시행하고 있는 우리 쌀 고급화 브랜드전략 국가 정책 방향과도 상충되며, 쌀 수입시장 개방에 대한 우리 쌀 품질의 국제경쟁력 강화 및 농민 보호, 국민의 신뢰성 확보에 기여 할 수 있다. 특히, 과학적 검정에 의한 쌀 원산지 확인으로 농민의 이익을 증대 시킬 수 있으며 종자의 보급에서부터 농민의 쌀 재배에 이어 수매 및 유통과정의 투명화에 기여 할 수 있다.

또한, 개발된 원산지 검정용 유전자 검사법의 신기술 상용화 및 제품화에 따른 벼 원산지 검정기술의 해외 기술이전 및 제품 수출 등 해외시장(대만, 일본)으로의 진출을 기대할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 개발 기술의 상용화 및 표준 검정법 등재

- 본 연구 과제를 통하여 개발된 쌀 원산지 검정용 Real-time PCR Kit인 Power Chek™ Rice 15 SNP Real-time PCR Kit는 원산지 검정 관리 감독 기관인 국립농산물 품질관리원의 시험연구소에서 현재 사용하고 있는 원산지 검정법과의 비교 검증 후 표준 검정법으로 채택할 것이며 이에 대한 구매의사를 확인하였다.
- 본 개발 기술이 표준 검정법으로 고시되면 본격적으로 제품을 홍보하고 기술영업을 시행할 계획이다.

2. 개발기술의 보급 계획

- 본 연구 과제를 통하여 개발된 쌀 원산지 검정용 유전자 분석법은 시료로부터 최종 분석 결과에 이르는 모든 과정을 키트화 하여 편의성을 최대한 고려하여 상용화하였으며, 초기 기술 보급 시 모든 과정을 교육함으로써 새로운 기술을 쉽게 습득하여 현장에 사용할 수 있도록 하였다.
- 기술 교육 및 기술이전 : 초기 기술의 보급 시 시료의 채취부터 분석 까지 모든 과정을 교육함으로써 숙련되지 않은 시험자라 할지라도 쉽게 분석을 할 수 있도록 진행하였다. 또한 초기 기술 보급 및 제품의 구매 이후에도 본 기관에서 운영하는 정기 워크샵을 이용하여 쉽게 기술을 습득할 수 있도록 하였다.
- 기술 이전을 위하여 쌀 원산지 관리 기술 소개 및 세미나를 이미 개최하고 있으며, 또한 감독 기관인 전국 농산물품질관리원 및 전국 지방자치단체 별 농업기술센터 및 농업기술원을 대상으로 년 4회 기술이전 워크샵을 개최할 계획이다.
- 2010년 기술교육 내용 : 2010년 2월, 11월, 12월 본 기관에서 운영하는 'Real-Time PCR을 이용하는 벼 품종검정 분석법' 정기 워크샵을 통하여 쌀 시료로부터의 DNA 추출방법, Real-time PCR 운용 및 원산지 검정용 Real-time PCR Kit를 이용한 분석방법, 자동분석 소프트웨어 KoRAS를 이용한 자동화 분석방법을 주제로 전국 지자체 농업기술원 및 농업기술 센터의 벼 품종 담당자를 대상으로 교육하였다. 또한 국립농산물 품질관리원 시험연구소를 포함한 전국 지소 관계자를 대상으로 기술소개 및 세미나를 개최하였다.

- 2011년 기술교육 : 본 기관에서 운영하는 정기 워크샵을 계속해서 개최하며 각종 학회 발표를 통하여 기술소개에 최선을 다할 것이다. 아울러 기술이전을 희망하는 기관을 대상으로 방문 교육 및 세미나를 개최 할 것이다.
- 향후 기술교육 계획 : 기술이전 완료 기관을 대상으로 보수교육 및 세미나를 개최할 것이며, 정기 워크샵을 이용한 기술 소개 및 교육 역시 계속 진행할 것이다. 또한 매년 변경되는 재배 품종들을 대상으로 판정표의 upgrade를 통한 수정을 진행하며 변경된 정보에 대한 기술 교육을 정기적으로 진행 할 것이다.

3. 추가 연구 및 타 연구에 활용계획

가. 판정표 데이터베이스의 upgrade

보다 다양한 수입 품종 및 추가되는 국내 재배 품종에 대한 유전자형 데이터베이스를 확보하고 각 마커에 대한 판정표 upgrade를 수행 할 것이다.

나. 타 연구 활용계획

본 연구를 통하여 개발된 multiplex 기술 및 SNP 마커들을 타 주요 작물 및 질병 관련 연구 분야에 적용하여 새로운 유전자분석 시스템 개발에 활용할 것이다.

특히 각종 작물의 피해가 되는 식물 바이러스에 대한 시스템 개발에 주력할 계획이다. 각 작물별 바이러스는 수종에서 수십 종에 이르고 있는데, 본 연구 과제를 통하여 보다 확립된 multiplex Real-time PCR 법을 이용하여 각 작물별 바이러스 진단에 사용할 수 있는 진단법을 개발하여 농가 보호 및 소득 향상에 도움이 되고자 한다.

4. 특허

가. 국내산 쌀 품종 검정용 multiplex Real-time PCR System 개발

- 특허명 : 벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법
- 출원번호 : 10-2010-0140415
- 출원 등록자 : 주식회사 코젠바이오텍

나. 쌀 514 품종 원산지 검정용 multiplex Real-time PCR System 개발

- 특허명 : 벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법

- 출원번호 : 10-2010-0140451
- 출원등록자 : 주식회사 코젠바이오텍

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 일본의 쌀 품종 분석

가. VisionBio 사

SSR 마커를 이용한 쌀 품종 검정방법을 사용하여 총 210품종 이상을 검정할 수 있는 시스템을 보유하고 있다. 현재 일본 내 쌀 품종 분석시장 점유 1위 기관이다.

나. 일본 농림수산성

일본 정부부처인 농림수산성에서는 JAS (Japanese Agricultural Standard) 라는 기준규격에 따라 쌀 품종 검사 및 기타 작물에 대한 유전자 검사 뿐 아니라 모든 검사의 기준규격을 정하고 있다.

2. 유전자 분석법을 이용한 농산물의 검사

전 세계적으로 농산물을 대상으로 하는 유전자 검사는 유전자재조합농산물(GMO) 검사와 벼품종검사에 대하여 수행되고 있다. GMO 및 벼 품종검사는 PCR 법 과 Real-time PCR 법이 공인 검사법으로 지정되어 있다. 또한, 작물 및 화훼류에 병을 유발하는 병원체에 대한 유전자 진단 기술 개발이 본격화되고 있어 국가 간 수출입 및 검역 등의 진단시장규모가 증가할 것으로 전망하고 있다.

현재 농작물 및 병원체를 대상으로 하는 유전자분석기술은 주로 일반 PCR 방법에 의존하고 있다. 일반 PCR 방법은 최근 분석기술의 동향인 대량화와 자동화에 적용하기에 노동력, 간편성, 신속성, 재현성, 정확성 측면에서 그 경쟁력이 매우 떨어지는 것이 현실이다. 본 주관기관이 보유하고 있으며 해당 연구개발과제의 핵심기술인 Real-time PCR 분석법은 이러한 단점을 보완할 수 있는 세계적 분자진단기술의 트렌드이다. 특히 동시에 다수의 마커 및 목표 유전자를 신속하게 분석할 수 있는 멀티플렉싱 기술력은 본 주관기관이 보유한 경쟁력이며 세계적 수준에 이르는 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

1. Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A.C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M., and Lundeberg, J. (2000) Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem.* 280, 103-110.
2. Ahn, S.N., Park, H.W., Choi, H.C., and Moon, H.P. (1996) Fingerprinting of *Japonica* rice cultivars using RAPD markers. *Korean J. Breed.* 28, 178-183.
3. Alderborn, A., Kristofferson, A., and Hammerling, U. (2000) Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res.* 10, 1249-1258.
4. Batley, J., Barker, G., O'Sullivan, H., Edwards, K.J., and Edwards, D. (2003a) Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. *Plant Physiol.* 132, 84-91.
5. Batley, J., Mogg, R., Edwards, D., O'Sullivan, H., and Edwards, K.J. (2003b) A high-throughput SNUPE assay for genotyping SNPs in the flanking regions of *Zea mays* sequence tagged simple sequence repeats. *Mol Breed.* 11, 111-120.
6. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnich, and R.W. Davis. (1980) Construction of a genetic linkage map of man using restriction fragment length polymorphisms. *American J. Human Genetics* 32, 314-331.
7. Chen, X., Livak, K.J., and Kwok, P.Y. (1998) A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome Res.* 8, 549-556.
8. Chin, J.H. (2003) Identification of subspecies-specific RAPD markers in rice. *Korean J. Breeding.* 35, 102-108.

9. Cho, Y.C., Shin, Y.S., Ahn, S.N., and Gregorio, G.B. (1999) DNA fingerprinting of rice cultivars using AFLP and RAPD markers. *Korean J. Crop Science*. 44, 26-31.
10. Cho, Y.C., Chung, T.Y., and Suh, H.S. (1995a) Genetic characteristics of Korean weedy rice (*Oryza sativa* L.) by RFLP analysis. *Euphytica*. 86, 103-110.
11. Drenkard, E., Richter, B.G., Rozen, S., Stutius, L.M., Angell, N.A., Mindrinos, M., Cho, R.J., Oefner, P.J., Davis, R.W., and Ausubel, F. M. (2000) A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 124, 1483-1492.
12. Gupta, P.K., Roy, J.K., and Prasad, M. (2001) Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr Sci* . 80, 524-535.
13. Garg, K., Green, P., and Nickerson, D.A. (1999) Identification of candidate coding region single nucleotide polymorphisms in 165 human genes using assembled expressed sequence tags. *Genome Res* . 9, 1087-1092.
14. Goff, S.A. (2002) Collaborating on the rice genome. *Science*. 296, 45-46.
15. Hayashi, K., Hashimoto, N., Daigen, M., and Ashikawa, I. (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet*. 108, 1212-1220.
16. Jeong, O.Y., Lee, K.S., Song, M.T., Lee, J.H., Hong, J.H., and Moon, H.P. (1998) Comparison of PCR-based DNA fingerprinting methods using random, microsatellite and sequence tagged site (STS) primers for differentiation of Korean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Korean J. Breed*. 30, 136-137.
17. Ji, H.S., Koh, H.J., Park, S.U., and MaCouch, S.R., (1998) Varietal

identification in *Japonica* rice using microsatellite DNA markers. *Korean J. Breed.* 30, 350-360.

18. Kang, H.W., Park, D.S., Go, S.J. and Eun, M.Y. (2002) Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Molecules and cells.* 13, 281-287.

19. Kim, K.H., Cho, S.Y., Moon, H.P., and Choi, H.C. (1994) Breeding strategy for improvement and diversification of grain quality in rice. *Korean J. Breed.* 26, 1-15.

20. Kleppe, K. (1971) Studies on polynucleotides repair replication of short synthetic DNAs as catalysed by DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 56, 341-361.

21. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

22. Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., and Sninsky. (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18, 999-1005.

23. Kwon, S.J., Ahn, S.N., Choi, H.C., and Moon, H.P. (1998) Fingerprinting and genetic diversity of high quality rice cultivars based on PCR-based DNA marker. *Korean J. Crop Science.* 43, 33-34.

24. Kwon, S.J., Ahn, S.N., Choi, H.C., and Moon, H.P. (1999) Evaluation of genetic relationship and fingerprinting of rice varieties using microsatellite and RAPD markers. *Korean J. Crop Science.* 44, 112-116.

25. Kwon, Y.K., Cho, R.K. (1998) Development of identification method of rice

varieties using image processing technique. *Korean J. agri. chemistry and biotechnology*. 41, 160-165.

26. Lawyer, F.C., Stoffel, S. (1989) Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biologocal Chemistry*. 264, 6427-6437.

27. Livak, K.J. (1999) Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal.* 14, 143-149.

28. Mackill, D.J. (1995) Classification *japonica* rice cultivars with RAPD markers. *Crop Science*. 35, 889-894.

29. Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D., and Colowit, P.M. (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* . 39, 969-977.

30. Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., and Sasaki, T. (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol Breed.* 3, 87-103.

31. Murray, M.G. and W.F. Thompson. (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nuc. Acids Res.* 8, 4321-4325.

32. Nasu, S., Suzuki, J., Ohta, R., Hasegawa, K., Yui, R., Kitazawa, N., Monna, L., and Minobe, Y. (2002) Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza satva*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Res.* 9, 163-171.

33. Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia Univ. press. NY. pp. 107-107.

34. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C.,

Kalsheker, N., Smith, J.C., and Markham, A.F. (1989) Analysis of any point mutation in DNA the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503-2516.

35. Rafalski, A. (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol.* 5, 94-100.

36. Pietsch, K.H., Waiblinger, U., Brodmann, P., and Wurzel, A. (1997) Deutsche Lebensmittel Rundsch. 93, 35-38.

37. Russell, J.R., Fuller, M., Macaulay, B.G., Jahoor, A., Powell, W., and Waugh, R. (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs, *Theor Appl Genet.* 95, 714-722.

38. Ryu, D.J. (1998) Incidence of fusarium and other molds in Korean field crops. *J. food science and nutrition.* 3, 43-47.

39. Saiki, R.H. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230, 1350-1354.

40. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

41. Tsafaris, A.S., Polidoros, A.N. (2000) DNA methylation and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 18, 87-176.

Wang, Z.Y., Tanksley, S.D. (1989) Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. *Genome.* 32, 1113-1118.

42. Yu, J., Hu, S., Wang, J. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza*

sativa L. ssp. *indica*). *Science*. 296,79-92.

43. Zhou, Z., and Gustafson, J.P. (1995) Genetics variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 91, 481-488.

44. <http://frodo.wi.mit.edu>

45. <http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/geneticmap2000/html>

46. <http://rgp.dna.affrc.go.jp>

47. <http://www.cgiar.org/irri>

48. <http://www.ers.usda.gov>

49. <http://www.fao.org/rice2004>

50. <http://www.gramene.org>

51. <http://www.krei.re.kr>

52. <http://www.maf.go.kr>

53. <http://www.naqs.go.kr>

54. <http://www.nics.go.kr>

55. <http://www.rda.go.kr>

56. <http://www.riceweb.org>

57. IRGSP, <http://rgp.dna.affrc.go.jp>

[부 록]

1. 국내외 513 품종에 대한 Real-time PCR 결과
2. 국내 유통 브랜드 쌀 및 중국 유통 쌀 모니터링 검사 결과

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.