

최 중
연구보고서

저온담수 직파 적응 벼 선발 및 분자생물학적 이용 연구

**Selection of Lines Suitable for Wet Direct
Seeding Culture and Their Application
in Molecular Studies in Rice**

연구 기관

충남대학교	농업생명과학대학
단국대학교	생명자원과학부
작물시험장	벼 유전육종과
(주) 유니젠	생명과학연구소

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저온담수 직파 적응 벼 선발 및 분자생물학적 이용 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 12 월 27 일

주관연구기관명 : 충남대학교 농업생명과학대학

총괄연구책임자 : 안 상 낙

협동연구기관명 : 단국대학교 생명자원과학부

협동연구책임자 : 황 철 호

협동연구기관명 : 작물시험장 벼유전육종과

협동연구책임자 : 정 응 기

협동연구책임원 : 황 흥 구

협동연구책임원 : 정 오 영

협동연구기관명 : (주) 유니젠 생명과학연구소

협동연구책임자 : 우 성 식

요 약 문

I. 제 목

저온담수 직파 적응 벼 선발 및 분자생물학적 이용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리 나라의 벼 수량성과 미질의 수준에 비해 생산비가 높아 가격 경쟁력이 떨어지며 또한 농촌 노동력의 감소로 벼 생산력의 생력화가 요구되고 있어 이에 따른 직파 재배 적성 품종 개발이 절실한 실정이다. 현재 농안벼, 주안벼 등 여러 직파재배 품종이 개발 보급되고 있으나 이들은 대부분 기계이앙 재배 조건에서 육성된 품종들로서 저온발아 및 출아 등 직파적성 관련 형질의 보완이 시급한 실정이다. 직파적성 품종의 육성을 위해서는 직파적성 형질의 효율적인 선발 방법 개발, 다양한 유전자원 검정 및 유전분석이 선행되어야 한다. 이를 위해서는 직파적성 유전자원의 탐색, 특성 검정 체계와 방법을 확립하고, 아울러 직파적성 형질과 밀접 연관된 DNA marker 및 후보유전자를 선발에 이용하는 분자유종 기술의 개발이 필요하다.

작물의 야생 및 반야생 유전자원들은 병해충 저항성, 내재해성 등의 유용유전자를 가지고 있으며, 이러한 유전자원의 다양한 유전적 변이를 활용하고, 유용한 유전자를 재배종으로 이전시키기 위해 DNA 표지인자 및 관련 생명공학기술을 이용하는 연구가 진행되고 있다. 또한 지금까지 병해충저항성 등 질적 형질을 개선시키기 위해 제한적으로 이용되어 왔던 야생 및 반야생 유전자원들이 양적 형질을 개선시킬 수 있는 중요한 대립유전자들을 가지고 있음이 밝혀지고 있어 이들의 교배모본으로서의 가치는 매우 크다.

야생 유전자원 중에서 잡초성 벼는 오랫동안 우리나라의 기후 풍토에 적응하여 잡초 형태로 생존해왔기 때문에 저온발아성, 담수저항성, 심토저항성 등 생육 불량 환경에 견딜 수 있는 우량한 유전자를 많이 보유하고 있다. 또한 잡초성 벼는 재배벼와 유전적으로 유사하여 교잡친화성이 높기 때문에 유용형질을 탐색.

이용하는 것이 용이하다.

본 연구는 다양한 벼 유전자원의 직파 관련 특성을 검정하고, 잡초성벼인 합천앵미3호의 저온발아성 등 직파적성 관련 유용유전자를 탐색하고 이를 재배벼로 이전하여 직파 적성 계통을 육성하며, 합천앵미3호의 저온발아성 유전자 및 기타 유용유전자를 분리하기 위한 단계로서 합천앵미3호의 박테리아 인공염색체 작성을 그 목표로 하고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 (i) 잡초성 벼인 합천앵미3호의 직파적성인 저온발아성 등의 유전자를 탐색, 고밀도 유전자지도를 작성하고 MAS를 이용 저온발아성이 양호한 계통을 육성하고, (ii) 저온처리시 유도되는 유전자들을 RT-DD-PCR (reverse transcriptase-differential display) 방법을 통해 확보하고, (iii) 다양한 벼 유전자원의 직파 특성 검정 및 직파계통 육성과 유전자 분석을 위한 집단 육성, 그리고 (iv) 합천앵미3호의 저온발아성 등 유용유전자를 분리하기 위한 수단으로서 박테리아 인공염색체를 작성하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

저온담수 직파적성 벼 품종이 갖추어야 할 저온발아성 등의 유전양식을 구명하고 직파적성 관련 유전자 연관 분자표지를 개발하며, 직파계통 선발 효율을 제고시키는 MAS (marker-assisted selection) 방법을 육종에 활용하는 체계를 개발하기 위해 저온발아성, 담수저항성 등 불량 환경에 적응하는 능력이 높은 합천앵미 3호와 통일형 벼인 밀양 23호 (반복친) 간 80개의 BC1F6 계통을 육성하였다. 양친과 80개의 BC1F6 계통을 충남대학교 및 춘천출장소 포장에 공시하여 묘초장, 적고 등 15개의 주요 농업적 특성을 검정하였다. QTL 분석을 이용 저온발아성 등에 관여하는 유전자 분석과 연관 DNA marker를 탐색한 결과 염색체 11번에 위치하는 합천앵미3호의 유전자가 밀양23호의 저온발아성을 증진시키는 것으로 분석되었다. 저온발아성 유전자의 유전양식 분석 및 근동질 유전자계통 육성을 위해 저온발아성이 양호한 계통을 선정, 여교잡을 이용, 근동질 유전자계

통 (QTL-NILs)을 육성하였다. 또한 직파적응성 품종 육성을 위해서는 저온발아성이나 출아성 등 직파적성 형질의 검정 방법 개발 및 적절한 육종방법 등 정보를 제공할 수 있는 유전분석 및 직파적성 유전자원의 탐색이 시급한 실정이다. 이를 위해 다양한 벼 유전자원의 직파적성을 검정하고 유전 분석 및 직파적성 계통 육성을 위해 집단을 육성하였다. 그리고 저온에 내성이 강한 품종 특이 발현 단백질을 이용한 마커와 벼 저온 유도성유전자를 바탕으로 한 벼 내냉성 DNA 마커 개발을 시도하였으며 합천앵미3호의 저온발아성 등 유용유전자를 분리하기 위한 수단으로서 박테리아 인공염색체를 작성하였다. 합천앵미3호의 저온발아성 유전자와 연관된 마커를 이용하여 BAC 클론을 선발하고 이들의 말단 염기서열 정보를 이용하여 contig를 작성하였는데, 이 정보는 추후 저온발아성 유전자의 분리에 중요한 도구로 이용될 수 있을 것이다.

잡초성벼는 아직 본격적인 연구가 진행되고 있지 않으나, 재배벼의 유전적 다양성이 협소해지는 점을 고려할 때 다양한 종류의 대립유전자를 확보하기 위해 잡초성벼 등 유전자원의 이용이 활발해질 것이다. 본 연구에서 밝혀진 합천앵미3호의 저온발아성, 적고 등의 유용유전자에 대한 유전 분석, 연관 분자표지, 근동질 유전자계통 육성, 고밀도 유전자지도 등의 정보는 앞으로 직파적성 품종 육성에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 저온처리시 특이적으로 발현되는 유전자는 저온 스트레스에 가한 계통의 육성에 중요한 자료로 이용될 수 있으며, 기타 다른 유전자에 대한 보다 자세한 연구가 요구된다. 개발된 벼 유전자원의 직파적성 검정 방법은 앞으로 직파적성 계통 선발을 위한 중요한 지표로 이용 가능하며 작성된 합천앵미3호의 BAC library와 저온발아성 유전자가 위치하는 염색체 지역을 포함하는 BAC 클론 contig는 이 유전자의 분리에 귀중한 재료가 될 수 있을 것이다.

SUMMARY

Weedy rice is reported to possess useful genes tolerance to various adverse conditions. Furthermore, the sterility problem is not encountered when crossed with elite cultivars because it is genetically more similar to the elite cultivar than wild rice. Tolerance to low temperature during the germination to the seedling stages is an important trait for stable germination and early growth of rice plants and also during the booting and heading stages in the low temperature area. Particularly, in the case of direct seeding cultivation in the low temperature areas of Korea, germination and early growth of seedlings take place under relatively low temperature conditions. It is thus necessary to improve the tolerance of rice cultivars to low temperature stress during those germination to seedling stages. The advent of molecular marker technology such as RFLP and SSR (simple sequence repeats) has accelerated investigation of the inheritance of quantitative traits. In rice, several research groups carried out the analysis of QTL underlying cold tolerance: seedling growth at 18°C, seedling vigor at 18°C, and cold tolerance at the booting stage.

The present study was conducted to identify and characterize QTLs associated with cold tolerance using a BC1F6 population derived from the Milyang23**2/Hapcheonaengmi3 cross. Molecular markers were used to map and characterize quantitative trait loci (QTLs) for traits related to cold tolerance in an intrasubspecific backcross population of rice. The parents of the cross were a cold susceptible Tongil-type cultivar "Milyang23" and a cold tolerant Korean *japonica* weedy accession "Hapcheonaengmi3". A total of 80 BC1F6 lines were evaluated for 15 traits including germinability at low temperature. A genetic linkage map was constructed for the same population using three morphological, 125 microsatellite markers. Interval analysis identified 31 significant QTLs for 11 traits with a range of 1- 5 QTLs detected per trait. Direction of additive gene effect for the cold tolerance-related traits coincided with that predicted by phenotypes of the parents. The percentage of phenotypic variation associated with single QTLs ranged from 8.5 to 27.7%. The identification of QTLs underlying the cold tolerance at the early growth stage may be useful in selecting lines with enhanced cold tolerance at low temperature. One QTL for low temperature germinability, lgt11 explaining 10.6% of the phenotypic variation

was detected and this QTL shared the genomic region with the QTLs for panicle exertion, discoloration and seed shedding. Because these three traits except for seed shedding seem to be related, it is quite possible that a single gene has pleiotropic effects on all three traits. Fine mapping of these clusters would be needed to differentiate between gene linkage and pleiotropy. For such traits the Hapcheonaengmi3 allele should be useful in the cultivar background. The information on the genetic basis of some desirable traits possessed by the wild parent may be useful for facilitating the utilization of these traits in the rice breeding programs. QTLs detected in this study were significant, but still putative. The relative importance of linkage and pleiotropy to explain QTL clusters should be clarified. Also, the trait-improving QTLs should be tested in a near isogenic backgrounds of Milyang23. For these purposes, nearly isogenic lines are being developed with a chromosomal segment harboring QTL for low temperature germinability from Hapcheonaengmi3 in the background of Milyang23. These NILs can not only facilitate the utilization of valuable genes from the Hapcheonaengmi3, but also allow identification and fine mapping of QTLs for low temperature germinability and discoloration.

In an effort to develop molecular markers related with tolerance to low temperature stress in rice, the genes induced in response to the stress were evaluated for their expressions at the levels of transcript as well as protein. Some correlations were observed in amounts of extracellular proteins including the proteins of 28 and 35 KDa to low temperature-tolerance degrees among various cultivars of rice upon cold treatment. Ten genes showing low temperature inducibility were selected and tested for the levels of transcript by RT-PCR using the BC₁F₃ lines developed from the cross Milyang23**2/Hapcheonaengmi3. As the results of the RT-PCR, seven DNA fragments corresponding to Hapcheonaengmi3 were found to suggesting them as putative candidates as a marker of tolerance to low temperature. Cloning and sequencing of the fragments showed that they are fragment of the expected genes such as pBC121(ARF), Lip5, Lip19, AOX1a. Genomic PCRs of the genes indicated that only one, pBC121 identified as ADP Ribosylation Factor (ARF), showed fragment difference between Hapcheonaengmi3 and Milyang23. In addition, BC₁F₆ lines in Hapcheonaengmi3 and Milyang23 were retested for the levels of transcript by RT-PCR and able to confirm the result obtained from the BC₁F₃ to some extent with

some inconsistencies. In the light of that ARF has a role in signal transduction with a close contact with G-protein and another role in secretion through forming membrane vesicles from ER to Golgi, the possibility of ARF in tolerance to low temperature in rice remains to be studied. It appears that the ARF gene can be used as a molecular marker for tolerance to low temperature in rice.

Sixty-four rice accessions were evaluated for direct seeding related traits including germinability at low temperature, and these accessions showed a wide amount of variations. These accessions were also evaluated for diversity based on AFLP analysis and classified into subgroups based on the genetic distances among the accessions. Advanced backcross populations are being developed using Hapcheonaengmi3 as a donor parent and other elite cultivars as the recurrent parent to identify QTLs underlying direct-seeding related and other agronomic traits as well as to develop lines suitable for direct seeding.

A BAC library was developed consisting of 36,864 clones, an average insert size of 156.6 kb, covering 13.4X of entire rice genomes from a weedy *Japonica* type rice, 'Hapcheonaengmi3'. Traits related to high germination rate in low temperature were mapped on a genetic map using BC populations from the Hapcheonaengmi3 and Milyang23 cross. Seven RFLP markers on chromosomes 11 and 5 linked to the target trait, low temperature germinability were selected from a Nipponbare genetic map based on synteny and comparative relationship between *Japonica* type rice. Overgo markers were generated from the RFLP markers and used as probes for screening the BAC library. A total number of 95 clones were selected and subjected to HICF (high-information-content fingerprinting) using EcoRI and TaqI endonuclease. Fluorescent-labeled fragments between 50 to 500bp were analyzed by ABI3700 capillary automatic sequencer. Fingerprints were assembled by FPC program into 10 contigs. Every group of BACs selected by individual markers were assembled into one contig except the clones selected by C1991 which selected 37 BACs from screening of the library and resulted in 4 contigs from 23 BACs. It indicated that C1991 is either duplicated somewhere in the 'Hapcheonaengmi3' genome or non-specific to this region. Individual physical maps were presented here as output of FPC analysis.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	13
Chapter II. Status of research development in the world	20
Chapter III. Experimental strategies and the results	23
Chapter IV. Achievements and contribution of the research	104
Chapter V. Application of the results	112
Chapter VI. Research information collected during research processing	114
Chapter VII. References	118

목 차

제 1 장	연구개발 과제의 개요
제 2 장	국내외 기술 개발 현황
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과
제 4 장	목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도
제 5 장	연구 개발 결과의 활용 계획
제 6 장	연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술 정보
제 7 장	참고 문헌

제 1 장 연구개발 과제의 개요

1. 서 언

우리 나라의 벼 수량성과 미질의 수준에 비해 생산비가 높아 가격 경쟁력이 떨어지며 또한 농촌 노동력의 감소로 벼 생산력의 생력화가 요구되고 있어 이에 따른 직파 재배 적성 품종 개발이 절실한 실정이다. 벼 직파재배 기술 보급 초기 (1993) 7,600 ha였던 직파 면적은 '95년 전체 벼 재배면적의 11.1%인 11,760 ha까지 급격히 증가했다. 이후 직파재배 면적은 약간 감소하여 재배면적의 7 - 8%에 머무르고 있는 실정이나 벼 재배면적의 약 70% 정도를 직파재배 가능 면적으로 보고 있다.

현재 농안벼, 주안벼 등 여러 직파재배 품종이 개발 보급되고 있으나 이들은 대부분 기계이앙 재배 조건에서 육성된 품종들로서 저온발아 및 출아 등 직파적성 관련 형질의 보완이 시급한 실정이다.

직파적성 품종의 육성을 위해서는 직파적성 형질의 효율적인 선발 방법 개발, 다양한 유전자원 검정 및 유전분석이 선행되어야 한다. 이를 위해서는 직파적성 유전자원의 탐색, 특성 검정 체계와 방법을 확립하고, 아울러 직파적성 형질과 밀접 연관된 DNA marker 및 후보유전자를 선발에 이용하는 분자유종 기술의 개발이 필요하다.

작물의 야생종, landrace 등은 병해충 저항성, 내재해성 등의 유용유전자를 가지고 있으며 전세계적으로 다양한 야생종 유전자원을 국제연구기관을 중심으로 보유하고 있다. 이러한 유전자원의 다양한 유전적 변이를 활용하고, 새로운 병해충 저항성 유전자를 재배종으로 이전시키기 위해 DNA 표지인자 및 관련 생명공학 기술을 이용하는 연구가 진행되고 있다.. 또한 지금까지 병해충저항성 등 질적 형질을 개선시키기 위해 제한적으로 이용되어 왔던 야생 및 반야생 유전자원들이 양적형질을 개선시킬 수 있는 중요한 대립유전자들을 가지고 있음이 밝혀지고 있어 이들의 교배모본으로서의 가치는 매우 크다고 할 수 있다 (Huang 등 2001, Khush 등 1977, Li and Zhu 1988, Xiao 등 1998).

야생 유전자원 중에서 잡초성벼는 오랫동안 우리나라의 기후 풍토에 적응하여 잡초 형태로 생존해왔기 때문에 저온발아성, 담수저항성, 심토저항성 edmd 생육 불량 환경에 견딜 수 있는 우량한 유전자를 많이 보유하고 있다 (서 와 하

1993). 잡초성벼는 재배벼와 유전적으로 유사하여 교잡친화성이 높기 때문에 유용형질을 탐색. 이용하는 것이 용이하다.

최근, 서 등(1992)은 우리나라의 101개 군에서 1,113개 계통의 적미를 수집하여 분석한 결과, 장립형 계통들은 경상남북도의 낙동강 유역과 전라남북도의 섬진강 유역에 주로 분포하였고 단립형 적미는 전국에 분포한다고 하였다. 이 결과는 1942년 Harashi에 의한 보고와 일치하였는데, 이는 벼 신품종 보급과 관계없이 적미는 토착적인 성질이 크다는 것을 시사한다고 하였다.

2. 양적형질 관련 유전자 분석 및 분리

2.1. 양적형질 관련 유전자 분석

지난 10여년 간 벼 genome 연구를 위한 다양한 기술이 개발되었는데, 대표적인 것들은 5,000개 이상의 DNA marker가 위치한 유전자지도(Causse 등 1994), 화분과 작물 내의 비교유전자지도 (Wilson 등 1999), YAC과 BAC을 이용한 전체 genome의 90% 이상을 대표하는 물리적지도 작성, 질적.양적 유전자의 mapping 그리고 벼 전체염기서열 해독을 위한 국제컨소시움 구성 등이다. 이 중 DNA 표지인자를 이용한 기술은 전통적인 육종 방법으로 해결하기 힘든 여러 문제들에 대해 해법을 제시해 주고 있는데 대표적인 것들로 i) 양적형질(QTLs)의 분석 ii) 야생종 등의 유전자원에서 유용 유전자의 탐색 및 이용 그리고 iii) 유전자와 환경간의 상호작용에 대한 이해 등을 들 수 있음. 식물 genome 분석 기술의 진보로 양적형질 (QTL)에 관여하는 유전적 변이의 연구가 가능해졌으며, 분자 수준에서 QTL을 정확하게 mapping하고 cloning하고 있다. 최근에는 수량 등 여러 개의 유전자들이 관여하고 또한 환경에 의해 영향을 받는 QTLs에 대한 연구가 많이 수행되고 있으며 목표유전자의 이전 및 선발에 MAS가 효율적으로 이용될 수 있음을 보고하고 있다.

방대한 양의 식물 유전자 및 생합성 경로에 대한 정보로부터 농업적으로 중요하고 이용 가능한 유전정보를 효율적으로 탐색하는 것은 매우 어려운 과제인데, 지금의 기능유전체 연구로도 기초적인 분자유전학 현상에 대한 이해를 작물 육종에서의 실질적이고 실용적인 결과로 결부시키는데 커다란 격차가 있다. 이러한 문제에 대한 여러 이유 중의 하나는 작물 육종가가 관심을 가지고 있는 대부분의 형질은 복잡하고 따라서 분자유전학적인 해석이 쉽지 않다는 것이다. 수량성과 수량구성 요소가 좋은 예인데, 이들은 개개의 형질에는 다수의 유전자가 관여

하고 환경의 영향을 받기 때문에 표현형 값이 연속적인 분포를 보인다. 돌연변이체 검정 등의 전통적인 유전분석 방법이나 전체 게놈 염기서열 분석을 포함하는 포괄적인 기능체 유전학도 작물의 양적형질에 관여되어 있는 분자 수준의 기작을 해석하는데 큰 도움이 되지 못한다. 이에 비해, 양적형질 유전자좌 (QTLs: quantitative trait loci) 분석은 분자표지인자를 이용, 측정이 가능한 형질에 관여하는 염색체의 특정 부분을 확인함으로써 주요 농업형질의 유전적 배경에 대한 직접적인 정보를 제공하여 준다.

특정 환경에서 수량성, 과실 무게, 출수기 등 주요 형질의 유전분석에 QTL 분석을 이용함으로써 관여하는 유전자의 수 및 염색체 위치, 개개 유전자의 영향력, 상위작용, QTL과 환경과의 상호작용, 그리고 QTL과 유전적인 배경과의 상호작용 등에 대한 전반적인 정보를 얻을 수 있다.

식물에서 QTL 연구를 통해 자연 유전변이 (naturally occurring allelic variation)를 분자유전학적으로 분석하는 연구는 기능유전체 연구의 연구 결과를 실제적인 농업문제의 해결로 연결시킬 수 있는 가교 역할을 할 수 있다. QTL 분석이 돌연변이체 분석 연구보다 유리한 점은 표현형의 차이가 자연 유전변이에 의해 조절되고 특정한 농업 환경에서 관찰되기 때문에 돌연변이 분석보다는 표현형의 차이를 실제적으로 파악할 수 있다는 것이다. 또한 QTL 분석은 돌연변이 분석 결과를 확인해 줄 수 있는데 이는 분리된 QTL 관련 유전자좌가 돌연변이 유전자좌에 대립관계에 있는지를 밝힘으로써 알 수 있다.

돌연변이를 통한 연구 결과와 농업환경에서의 자연 유전변이 정보를 서로 결합함으로써, QTL 분석은 식물 육종과 분자유전학을 연결해주는 가교 역할을 할 수 있다. 이러한 가교 역할의 출발점은 QTL을 조절하는 유전자의 기능을 밝히는 것인데, 이는 QTLs 관여 유전자의 고밀도 유전자지도 작성과 이 정보를 이용한 QTL 유전자의 positional cloning 및 기능 분석을 통해 가능하다.

F_2 , RIL 등의 기본 집단을 이용 유전자지도 상에 QTL의 잠정적인 위치를 결정할 수 있는데 이 때 통계적인 방법을 이용하기 때문에 QTL의 정확한 위치를 알 수는 없다. 특정 형질에 관여하는 QTLs의 정확한 위치를 밝히기 위해서는 여러 QTL들을 개별적으로 분리하는 과정이 필요하다. 양적형질 관여 유전자의 분석을 위해서는 먼저 F_2 여교배 후대 등 기본 집단을 이용 QTL의 잠정적인 위치를 밝힐 수 있다. QTL은 여러 개의 유전자가 관여하고 또한 환경의 영향을 받기 때문

에 형질의 표현형은 정규분포를 보인다. 이들 여러 개의 QTL들을 개별적으로 분리하기 위해 목표 QTL과 연관된 DNA 표지와 연속적인 여교배를 수행하여 (MAS: marker aided selection) 근동질 유전자계통 (NILs: near isogenic lines) 을 작성할 수 있다. 여교잡 육종은 수여친 (1회친)의 한두 가지 우수한 특성을 반복친에 도입하는 경우 매우 효과적인 육종법인데, 지속적인 여교잡과 목적 형질에 대한 선발의 결과 육성된 계통을 근동질 유전자계통이라 한다. 근동질유전자 계통의 육성시 반복친이 수회 교잡에 이용되었기 때문에 육성된 근동질 유전자계통은 목표 유전자 및 근접해 있는 염색체 단편을 제외하고는 모든 부분이 반복친과 유전적 배경이 동일하다. 육성된 근동질 유전자계통을 이용하여 개개 QTL의 효과를 검정할 수 있는데, 특히 환경의 영향을 많이 받는 QTL은 F₂ 단일 개체의 평가보다는 이에서 유래한 F₃ 혹은 F₄ 계통을 평가함으로써 (후대 검정) 보다 정확한 평가가 가능하다. F₂ 개체별 QTL 유전자형이 밝혀지면 연관분석 혹은 substitution mapping을 통해 QTL 유전자를 포함하는 염색체 단편을 확인할 수 있다 (chromosome landing). 이 때 분석 집단의 규모를 늘림으로써 QTL을 포함하는 염색체 단편의 크기를 최소화 (약 50 kb 내외)할 수 있다. 일단 QTL을 포함하는 염색체 지역이 결정되면, 여러 분자생물학적 기법 (염기서열 결정, 유전자 예측, 후보유전자 이용 complementation 검정, SNP 검정 등)을 이용하여 목표 유전자의 여부를 확인할 수 있다.

2.2. 자연변이의 탐색 및 육종적 이용

지금까지 대부분 QTL의 탐색 연구에 F₂, RILs (recombinant inbred lines), DH (doubled haploid) 집단 등 기본 유전분석 집단이 이용되어 왔으나 이들 집단으로는 목표 QTL의 고밀도 유전자지도 작성, 특성 규명 및 분리 등의 연구를 수행하는 것이 불가능하다. 이를 위해서는 근동질유전자계통, 혹은 염색체 단편 이입 계통 등의 2차 분석집단이 요구된다. 이러한 2차 유전분석 집단은 애기장대, 토마토, 벼 등 몇몇 식물에서 육성되어 QTL 분석에 이용되고 있다.

식물 계놈에는 약 30,000~60,000개의 유전자를 포함한다고 보고하고 있는데, 각 유전자좌 별로 다양한 형태의 대립유전자들이 존재한다. 다양한 유전자원에 내재하는 유용한 대립유전자들을 적절하게 한 계통으로 집적시키는 한편 정확하게 평가하는 것이 육종의 성과를 좌우하기 때문에 유전자원을 확보하고 평가하는 작업은 매우 중요하다. 특히 유전분석을 위한 집단의 육성에 야생유전자원을 교

배모본을 이용하는 경우가 많다. 이는 특정한 환경 조건에 적응성이 높은 야생종 및 반야생종을 육종 모본으로 이용함으로써 이들이 가지고 있는 다양한 유전 변이를 탐색할 수 있는데, 이는 야생 유전자원이 재배종보다 다양하고 지금까지 육종적으로 이용되지 않았던 대립유전자를 가지고 있기 때문이다. 벼의 경우 전체 유전변이의 약 75%를 보유하고 있는 야생벼 유전자원은 지금까지 병해충 저항성 및 내재해성 source로서 주로 이용되어 왔는데 최근에는 DNA marker를 이용하여 야생벼로부터 재배벼의 양적형질을 개선시키는 유전자를 탐색하는 연구가 수행되고 있다. 옥수수, 토마토, 벼 등의 작물에서 QTL을 대상으로 동질유전자 계통을 작성하는 연구가 수행되었는데, 이 연구는 주로 유망 계통의 유전적 배경에 수여친의 염색체 단편을 포함하는 근동질 유전자계통을 작성하는 것인데 각 근동질 유전자계통마다 수여친의 서로 다른 염색체 단편을 가지고 있는 것이 된다. 이렇게 육성된 동질유전자 계통은 중간모본이나 품종으로 이용될 뿐 아니라 QTL의 확인 및 mapping에 좋은 재료가 될 수 있다. 이러한 방법을 이용함으로써 지금까지 육종에서 제한적으로 이용된 야생종의 유용유전자를 탐색할 수 있는데 이 방법을 이용 옥수수, 토마토, 벼 등의 작물에서 유용유전자를 이전시킨 동질유전자 계통을 육성하였다. 염색체단편 이입 계통 하나 하나는 반복친의 유전적 배경에 서로 다른 수여친의 염색체 단편들을 가지고 있다. 따라서 반복친과 이입 계통 간의 차이는 이입된 염색체 단편들에 존재하는 유전자의 영향에 의한 것으로 생각할 수 있다.

2.3. 유전자지도를 이용한 QTL 유전자 분리

QTL 유전자의 정밀지도 작성을 위해서는 유전자와 밀접하게 연관된 DNA 분자 표지의 개발이 중요하다. 애기장대, 벼, 토마토 등 주요 식물의 경우 유전자의 기능 분석을 위한 다양한 방법이 개발되어 있다. 벼의 경우 개발된 ESTs를 이용하여 유전자의 기능을 추정할 수 있고 RFLP, microsatellite 등으로 작성된 고밀도 유전자지도는 양적형질에 관여하는 개개 QTL의 위치를 밝히는데 중요한 수단이 되고 있다. 유전자 분석 및 분리를 위한 다른 도구는 벼 전체 게놈의 약 60% 이상을 대표하는 YAC, BAC 등을 포함하는 물리지도 (physical map), YAC contig 에 위치한 5,000 개 이상의 cDNA 클론 등이다. 또한 거의 완성된 벼 전체 게놈 염기서열 정보를 이용하여 목표 QTL과 초밀접한 분자 표지를 제작할 수 있다. 이와 같이 목표로 하는 유전자를 중심으로 한 지역의 physical map을 작성하는

한편 거대 외래 DNA를 복제할 수 있는 vector (YAC 혹은 BAC)를 이용하여 library를 만들어야 한다. 목표로 하는 유전자에 연관된 RFLP marker들과 overlapping 되는 YAC 혹은 BAC clones을 가지고 점차적인 chromosome walking을 시작할 수 있다. 고밀도 유전자지도가 개발된 작물에서는 목표 유전자를 포함하는 YAC 혹은 BAC 클론을 선발할 수 있으며, 클론에 위치하는 유전자를 여러 가지 방법으로 확인 분리할 수 있다.

본 과제에서는 잡초성벼인 합천앵미3호의 유용유전자를 chromosome landing 방법에 의해 분리하기 위해 합천앵미3호의 박테리아 인공염색체 (Bacterial Artificial Chromosome, BAC)를 개발하였다. 박테리아 인공염색체는 작물 계통의 분석 연구와 농업적으로 중요한 유전자의 클로닝에 핵심적인 도구로 이용되고 있다. 박테리아 인공염색체가 1992년도에 소개된 이래 (Shizuya 등 1992), 식물에서는 최초로 1994년에 수수의 BAC library가 개발되었다 (Woo 등, 1994). 잡초성벼에서 BAC library의 개발은 세계적으로도 보고된 바 없고, 특히 한국 고유의 유전자원인 합천앵미3에서 BAC library의 개발이 성공적으로 이루어진다면 일본과 미국이 주도하는 벼 전체염기서열 분석 연구에서 나오는 막대한 양의 유전정보를 손쉽게 이용할 수 있도록 하고 직파적성 관련 형질뿐 아니라 여러 유용형질에 대한 분자생물학적 연구를 통하여 유전자원으로서의 활용 가치를 극대화할 수 있다.

3. 금후 연구 방향

최근 Genomics 분야에서 개발되는 신기술의 이용으로 양적형질에 관여하는 유전적 요인들을 분자 수준에서 탐색할 수 있게 되었다. 자연변이 연구는 인위적 돌연변이체를 이용하여 식물 유전자의 기능을 밝히는 지금까지의 연구가 가지고 있는 단점을 보완해줄 뿐 아니라 수량, 내재해성, 품질 등 농업적으로 중요한 형질에 대한 보다 효율적, 체계적인 분석 수단을 제공할 것이다. 많은 유전자원을 대상으로 이러한 양적형질을 정밀하게 평가하기 위해서는 대규모의 포장실험, 온실 및 실내 실험 등이 요구되기 때문에 작물에 적용하는 것은 많은 시간과 노력이 소요된다. 반면에 목적 형질에 대해 다양한 변이를 보이는 교배모본을 이용해 육성된 기본 유전분석 집단, 염색체 단편 치환계통 그리고 근동질 유전자계통을 평가함으로써 적은 노력, 시간을 들이고 자연변이의 정확한 평가 및 이용이

가능하다. 특히 교배모본의 선정시 유전적으로 다양한 양친 (야생종과 재배종간))을 이용하여 육성된 집단을 이용하는 것이 지금까지 육종적으로 이용되지 않았던 자연변이를 효율적으로 활용하는 방안이 될 것이다. 또한 유전자의 기능을 검정하는 과정에서 형질의 정밀하고 신뢰성있는 특성치를 얻기 위해서는 정확한 검정 방법이 확립되어야 할 것이다. 실험실 분석 기법의 자동화화와 이에 따른 비용 및 시간의 절감은 양적형질에 관련된 자연변이를 이용하는데 기여를 할 것이다. 결론적으로 교배와 선발 등의 전통적인 기술과 DNA 표지와 염기서열 분석 등 신기술의 결합은 작물의 양적형질에 관련된 자연변이에 대한 우리의 이해를 크게 증진시킬 것으로 기대한다. 이러한 연구는 작물을 연구하는 전문가들 즉 육종가, 분자유전학자 등 여러 분야의 전문가들의 공동연구가 절실히 요구되는 분야이며 각 전문분야의 강점을 최대한 살리는 방향으로 추진되어야만 단독으로는 불가능했던 연구 과제도 개발할 수 있고, 우수한 연구 결과의 확보와 작물 신 품종의 육성도 가속화될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 자연변이의 탐색 및 육종적 이용

전통적인 육종 방법으로 해결하기 힘든 여러 문제들에 대해 DNA 표지인자 등의 방법이 해법을 제시해 줄 수 있는데, 대표적인 것들로 i) 질적형질 관련 유전자 연관표지 개발 ii) 양적형질의 분석 iii) 야생종 등의 유전자원에서 유용 유전자의 탐색 및 이용, iv) 잡종강세의 유전적, 생화학적 기작에 대한 이해, 그리고 v) 유전자와 환경간의 상호 작용에 대한 이해 등을 들 수 있다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 DNA 표지인자 개발 등에 많은 노력을 기울여 왔으며, 이를 통해 선발의 정확성과 효율성이 크게 증진되었다.

식물 계통에는 약 30,000~60,000개의 유전자를 포함한다고 보고하고 있는데, 각 유전자와 별로 다양한 형태의 대립유전자들이 존재한다. 다양한 유전자원에 내재하는 유용한 대립유전자들을 적절하게 한 계통으로 집적시키는 한편 정확하게 평가하는 것이 육종의 성과를 좌우하기 때문에 유전자원을 확보하고 평가하는 작업은 매우 중요하다. 특히 유전분석을 위한 집단의 육성에 야생유전자원을 교배모본을 이용하는 경우가 많다. 이는 특정한 환경 조건에 적응성이 높은 야생종 및 반야생종을 육종 모본으로 이용함으로써 이들이 가지고 있는 다양한 유전 변이를 탐색할 수 있는데, 이는 야생 유전자원이 재배종보다 다양하고 지금까지 육종적으로 이용되지 않았던 대립유전자를 가지고 있기 때문이다. 벼의 경우 전체 유전변이의 약 75%를 보유하고 있는 야생벼 유전자원은 지금까지 병해충 저항성 및 내재해성 source로서 주로 이용되어 왔는데 최근에는 DNA marker를 이용하여 야생벼로부터 재배벼의 양적형질을 개선시키는 유전자를 탐색하는 연구가 수행되고 있다. 옥수수, 토마토, 벼 등의 작물에서 QTL을 대상으로 동질유전자 계통을 작성하는 연구가 수행되었는데, 이 연구는 주로 유망 계통의 유전적 배경에 수여친의 염색체 단편을 포함하는 근동질 유전자계통을 작성하는 것인데 각 근동질 유전자계통마다 수여친의 서로 다른 염색체 단편을 가지고 있는 것이 된다. 이렇게 육성된 동질유전자 계통은 중간모본이나 품종으로 이용될 뿐 아니라 QTL의 확인 및 mapping에 좋은 재료가 될 수 있다. 이러한 방법을 이용함으로써 지금까지 육종에서 제한적으로 이용된 야생종의 유용유전자

를 탐색할 수 있는데 이 방법을 이용 옥수수, 토마토, 벼 등의 작물에서 유용유전자를 이전시킨 동질유전자 계통을 육성하였다. 염색체단편 이입 계통 하나 하나는 반복친의 유전적 배경에 서로 다른 수여친의 염색체 단편들을 가지고 있다. 따라서 반복친과 이입 계통 간의 차이는 이입된 염색체 단편들에 존재하는 유전자의 영향에 의한 것으로 생각할 수 있다.

DNA 표지를 이용한 QTLs 분석이 품종 육성에 직접적으로 이용된 보고는 별로 없는데, 그 원인으로 i) QTLs의 탐색과 품종 육성이 별개의 과정이고, ii) 육종가들이 이미 이용해왔던 기존의 육종 집단에 존재하는 QTL을 대상으로 분석했으며, 그리고 iii) 수량 등 양적형질의 발현은 품종의 유전적 배경에 의해 크게 영향을 받기 때문이라고 지적하고 있다. 이러한 점을 보완하기 위해 Tanksley & Nelson (1996)은 AB-QTL 분석을 제안하였는데, 이 방법의 목적은 유망 계통의 유전적 배경에 수여친의 염색체 단편을 포함하는 근동질계통을 작성하는 것이다. AB-QTL은 앞의 방법과 BC1 및 BC2 세대에서 표현형 선발을 실시한다는 점에서 차이가 있다. 따라서 선발을 할 경우 우량유전자가 linkage drag에 의해 도태될 염려가 있다는 것이 단점으로 지적될 수 있다. 현재 AB-QTL 분석을 이용 벼, 토마토, 옥수수 등 주요 작물에서 품종, 중간모본 등 우수한 계통을 육성하고 있다.

제 2 절 차등발현 유전자 탐색

유전자 발현양상이 외부 조건에 따라 달라지는 유전자의 기능 및 발현 연구는 유전자 연구에 있어서 무척 중요한 의미를 가진다. 차등 발현유전자를 분리하기 위한 많은 방법이 개발되어 왔는데, 다음의 Differential display 방법이 많이 이용되고 있다. 이 방법은 RT-PCR을 기본으로 하는 기법으로, mRNA를 cDNA로 전환시킨 다음 3'end, 5'end primer를 이용하여 증폭하는 것인데, 일반적으로 10-mer arbitrary primer를 사용하고 있다, 증폭된 산물을 Polyacrylamide gel에서 전기영동을 통해 분리시킨 다음, 강도 차이 및 band 유무에 의해 차등발현 여부를 판정, gel에서 분리하여 염기서열 분석 및 기능 분석을 실시한다. 이 방법에는 몇 가지 장점이 있다. 우선 2 가지 이상의 재료에서의 차등발현 여부를 동시에 확인할 수 있다. 또한 한번의 전기영동에서 발현 증가와 감소 양상을 동시에 확인할 수 있게 된다. 그리고 PCR을 이용하기 때문에 소량의 total RNA로

부터 실험을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 하지만 이와 같은 장점에도 불구하고 몇 가지 단점을 내포하고 있어, 실험 진행이 용이하지 않다. 짧은 길이의 random primer를 사용하기 때문에 수많은 false positive band가 생길 수 있고, 실험의 재현성을 확보하기 어려우며, 발현 양이 적은 유전자의 경우 민감도가 떨어지게 된다. 또한 많은 노동력을 필요로 한다는 점이 단점이다. (Byers et al., 2000; Carson et al., 2002; Liang and Pardee, 1992; Liang et al., 1993; Rhode et al., 1997).

제 3 절 박테리아 인공염색체 개발

박테리아 인공염색체는 작물 게놈의 분석 연구와 농업적으로 중요한 유전자의 클로닝에 핵심적인 도구로 이용되고 있다. 박테리아 인공염색체가 1992년도에 소개된 이래 (Shizuya 등 1992), 식물에서는 최초로 1994년에 수수의 BAC library가 개발되었고 (Woo 등, 1994) 그 이후 벼, 옥수수, 토마토 등 주요 작물에서 BAC library가 개발되었다. 잡초성벼에서 BAC library의 개발은 세계적으로도 보고된 바 없고, 특히 한국 고유의 유전자원인 합천앵미3에서 BAC library의 개발이 성공적으로 이루어진다면 일본과 미국이 주도하는 벼 전체염기서열 분석 연구에서 나오는 막대한 양의 유전정보를 손쉽게 이용할 수 있도록 하고 직파적성 관련 형질뿐 아니라 여러 유용형질에 대한 분자생물학적 연구를 통하여 유전자원으로서의 활용 가치를 극대화할 수 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 벼 저온담수 직파적성 관련 형질 유전분석 및 분자표지 개발

1. 실험 재료 및 방법

가. 실험재료

저온담수 직파적성 벼 품종이 갖추어야 할 저온발아성 등의 유전양식을 구명하고 직파적성 관련 유전자 연관 분자표지를 개발하며, 직파계통 선발 효율을 제고시키는 MAS (marker-assisted selection) 방법을 육종에 활용하는 체계를 개발하기 위해 저온발아성, 담수저항성 등 불량 환경에 적응하는 능력이 높은 합천앵미 3호를 부분으로, 통일형 벼인 밀양 23호를 모본으로 교잡을 실시하여 F1 개체를 육성하였다. F1에 밀양23호를 여교배하여 80개의 BC1F1 개체를 육성하였으며 이들을 일수일렬법에 의해 세대를 전개시켜 80 개의 BC1F6 계통을 육성하였다. 세대진전 과정에서 밀양23호의 표현형 방향으로 약선발을 실시하였으며, 열악 형질을 보이는 개체 (장간, 불임, 개화기가 늦은 개체 등) 등은 도태시켰다.

나. 특성 검정

양친과 80개의 BC1F6 계통을 충남대학교 포장에 공시하여 묘초장, 출수기 등 주요 농업적 특성을 검정하였다. 시험구배치는 완전임의배치법 2반복으로 하였으며 반복의 평균치를 통계분석에 이용하였다. 영색, 주두색, 기부색, 부선색 그리고 까락의 유무 등 5개의 질적형질도 조사되었다. 저온발아성 검정은 멸균된 상토를 넣은 pot에 종자를 계통당 30립씩 2mm 깊이로 파종하여 10°C (암조건)로 조절된 성장상에서 30일 동안 생육시킨 후 상토 위로 çıkar된 묘수를 2반복으로 조사하여 출아율의 평균치 (%)를 저온발아성으로 계산하였다. 유묘기 내냉성은 계통당 2반복으로 20립 씩 육묘상자에 파종하여 2- 3 엽기 까지 생육시킨 후 성장상으로 옮겨 5°C 광조건에서 3일간 저온처리한 후 30°C 광조건에서 회복시키고 피해 정도를 조사하였다. 각 계통별 피해 정도를 1 (피해가 없음)에서 9 (고

사)까지의 범위로 조사하고 평균치를 각 계통의 유묘기 냉해 저항성으로 나타내었다. 휴면성은 수확한 종자를 파종 후 5일 후의 평균발아율로 하였다. 기타 특성 조사는 농촌진흥청 특성조사표에 준하여 조사하였다.

또한 양친과 BC1F6 계통을 춘천출장소 내냉성 검정 포장 (17°C)에 공시하여 적고, 간장 단축율, 출수 지연일수, 임실율 등 내냉성 정도를 조사하였다.

다. DNA 추출 및 SSR 분석

양친과 80개의 BC1F6 계통의 DNA (계통당 30개 개체)를 Causse 등 (1994)의 방법으로 추출하였다. SSR 분석은 RM21 등 (Chen 등 1997, Temnykh 등 2000, 2001, McCouch 등 2002) 257개의 마커를 이용하여 양친의 다형성을 검정한 후 양친간 차이를 보이는 마커를 선정하여 BC1F6 계통의 유전자형을 결정하였다. PCR 및 silver staining 과정은 Panaud 등 (1996) 방법에 준하였다.

라. 유전자지도 작성 및 QTL 분석

형태적 표지인자 (*Rc*, *Rd*, *C*, *Awn*, *Pc*), Tella (Yang 등 2003, 염기서열 5'-tggattaaatggagctcgg -3' 및 5'-ccgatctgaaccatcgatct-3'), PBC121 (Hwang 등, 제 2절 참조) 및 SSR 표지인자의 연관분석은 MAPMAKER 프로그램 (Lander 등 1987)을 이용하였다. 표지인자 간의 유전적거리는 Kosambi centiMorgans으로 표시하였고, 순서는 LOD > 2.0을 이용하여 배열하였다. QTL 분석은 Q-Gene 프로그램 (Nelson 1997)을 이용하였으며, 한 개의 표지인자에서 두 유전자형간의 표현형 값의 차이가 $P \leq 0.001$ 수준에서 유의성이 인정될 경우, 혹은 인접한 두 개의 표지인자에서 $P \leq 0.05$ 수준에서 유의성이 인정될 경우, 혹은 인접한 세 개의 표지인자에서 $P \leq 0.1$ 수준에서 유의성이 인정될 경우에 목표 형질에 관여하는 QTL이 존재한다고 가정하였다. 한 개의 표지인자가 전체 표현형 변이의 일정한 부분을 설명하는데 이용하는 결정계수의 계산에는 목표 QTL에 가장 근접한 표지인자를 이용하였고, 형질 간의 상관계수를 구하였다.

마. QTL-NIL 육성

양친의 교배집단 (BC1F5)을 이용하여 저온발아성 등에 관여하는 유전자 분석과 연관 DNA marker를 탐색한 결과 염색체 5 및 11번에 위치하는 합천앵미3호의 유전자가 밀양23호의 저온발아성을 증진시키는 것으로 분석되었다. 유전자의 유

전양식 분석 및 근동질 유전자계통 육성을 위해 저온발아성이 양호한 계통을 선정하였는데, 이들 계통들은 저온발아성 유전자와 연관된 DNA 마커에서는 합천앵미3 대립유전자를, 기타 다른 유전자좌에서는 밀양23호 대립유전자를 높은 비율로 가진 개체로 저온발아성이 양호한 계통이다. 각 계통 중 1-2 개체를 선발하여 밀양23호로 여교배하여 BC1F6BC1을 육성하였으며 이들 BC1을 파종하여 밀양23호로 여교배를 실시하였다. 교배립을 자식시켜 얻은 개체의 유전자형을 검정하여 연관 마커에서 합천앵미3호 동형접합체 유전자형을 보이는 개체를 선발하여 근동질 유전자계통 (QTL-NILs)로 이용할 계획이다.

2. 결과

가. 양친의 DNA 다형성

전체 257개의 SSR 마커가 양친의 다형성 검정에 이용되었는데, 이 중 182개 (70.8%)의 SSR이 양친인 밀양23호와 합천앵미3호 간 다형성을 보였다 (Fig.1). 182개의 SSR 마커 중 125개의 SSR이 BC1F6 RILs의 유전자형 검정에 이용되었다. 양친간 다형성 비율이 70.6%로 높았는데, 이는 양친인 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 통일형과 자포니카형 벼로서 서로 다른 생태형에 속하기 때문에 유전적으로 차이가 많기 때문으로 판단되며 기존의 다른 연구 보고와 잘 일치하고 있다 (Chen 등 1997, Cho 등 1998).

(P1:Milyang 23, P2:Hapcheonaengmi 3).

나. 유전자지도 작성

5개의 형태적 표지인자, 124개의 SSR 마커 그리고 1개의 telomeric marker (Yang 등 2003)를 이용하여 유전자지도를 작성하였는데, 유전자지도의 전체 길이는 1491.5cM, 마커 간 평균 거리는 10.7cM였으며 염색체별로 위치한 마커의 수는 5개 (12번 염색체)에서 14개 (1번 염색체)의 분포를 보였다 (Fig. 2). 4개의 질적형질에 관여하는 유전자들이 표지되었는데 이들은 영색에 관여하는 *Rc* (7번), 기부색에 관여하는 *C* (6번), 주두색에 관여하는 *Pc* 그리고 까락의 유무에 관여하는 유전자 (4, 6, 7번 염색체) 등이다.

전체 마커들 중 14개 (11.2%)가 유전자형 기대 분리비인 1 : 1과 유의한 차이 ($P \leq 0.01$)를 보였는데 이들 중 12개는 밀양23호 유전자형으로 그리고 2개는 합천앵미3호 유전자형 쪽으로 편이된 분포를 보였다 (Fig. 2). 이들 편이된 마커들은 1, 2, 6, 9, 10 및 12번 염색체의 특정 부분에 위치하였는데 이들 지역은 최소 1개 이상의 편이된 마커를 포함하고 있었다. 이와 같은 대립유전자의 편이 분리는 아종간 교잡 (McCouch 등, 1988, Xu 등 1997) 및 종간 교잡 후대 (Causse 등 1994, Lorieux 등 2000)에서 보고된 결과와 일치하고 있다. 편이 분리는 gamete

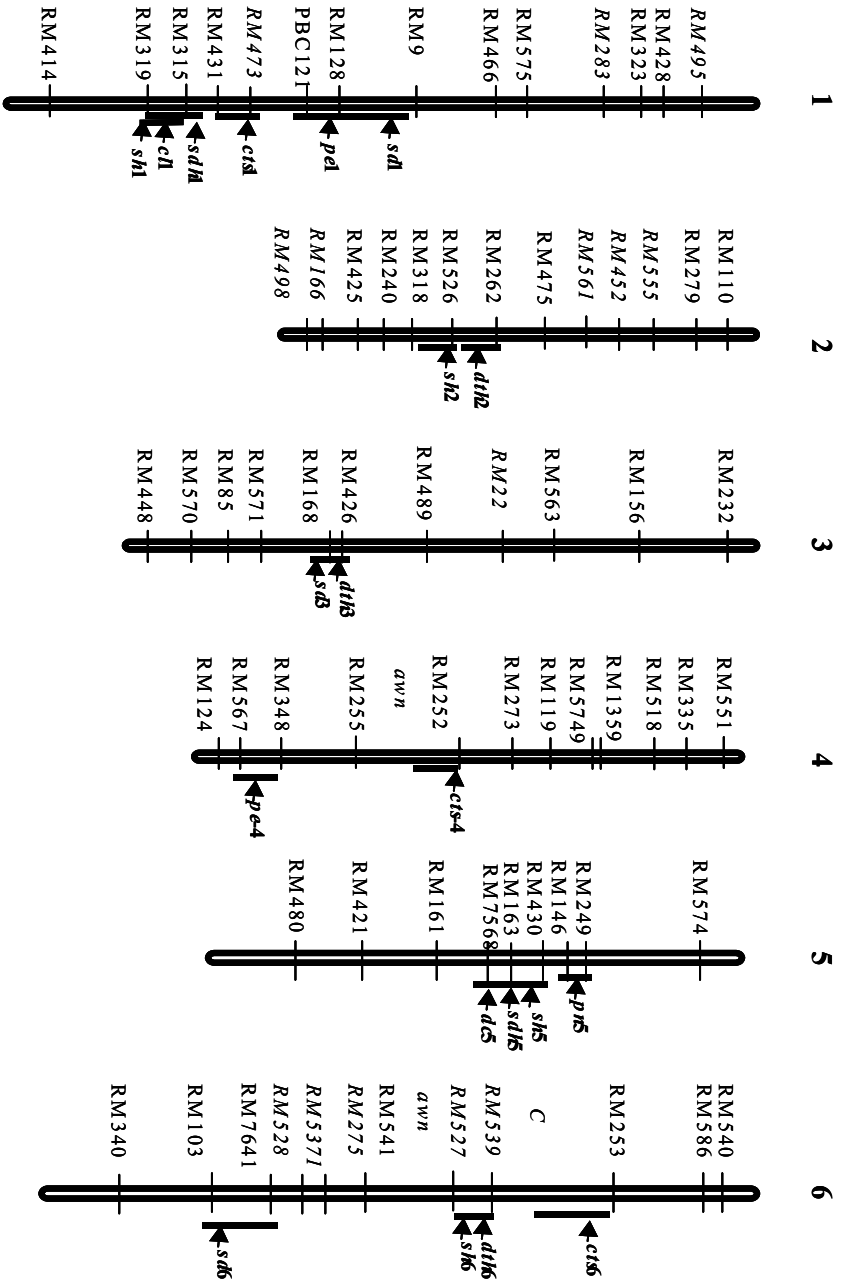


Fig. 2. A molecular linkage map was constructed using the *Mapmaker* 3.0 software (Lincoln et al. 1992). Markers are indicated on the left of the chromosomes and location of *QTLs* indicated on the right of the chromosomes. The markers showing segregation distortion are indicated italics (in favor of *Manjyam* underlined (in favor of Hapcheonaengmi3)).

실질적인 유전적 요인과 세대진전 과정에서 실

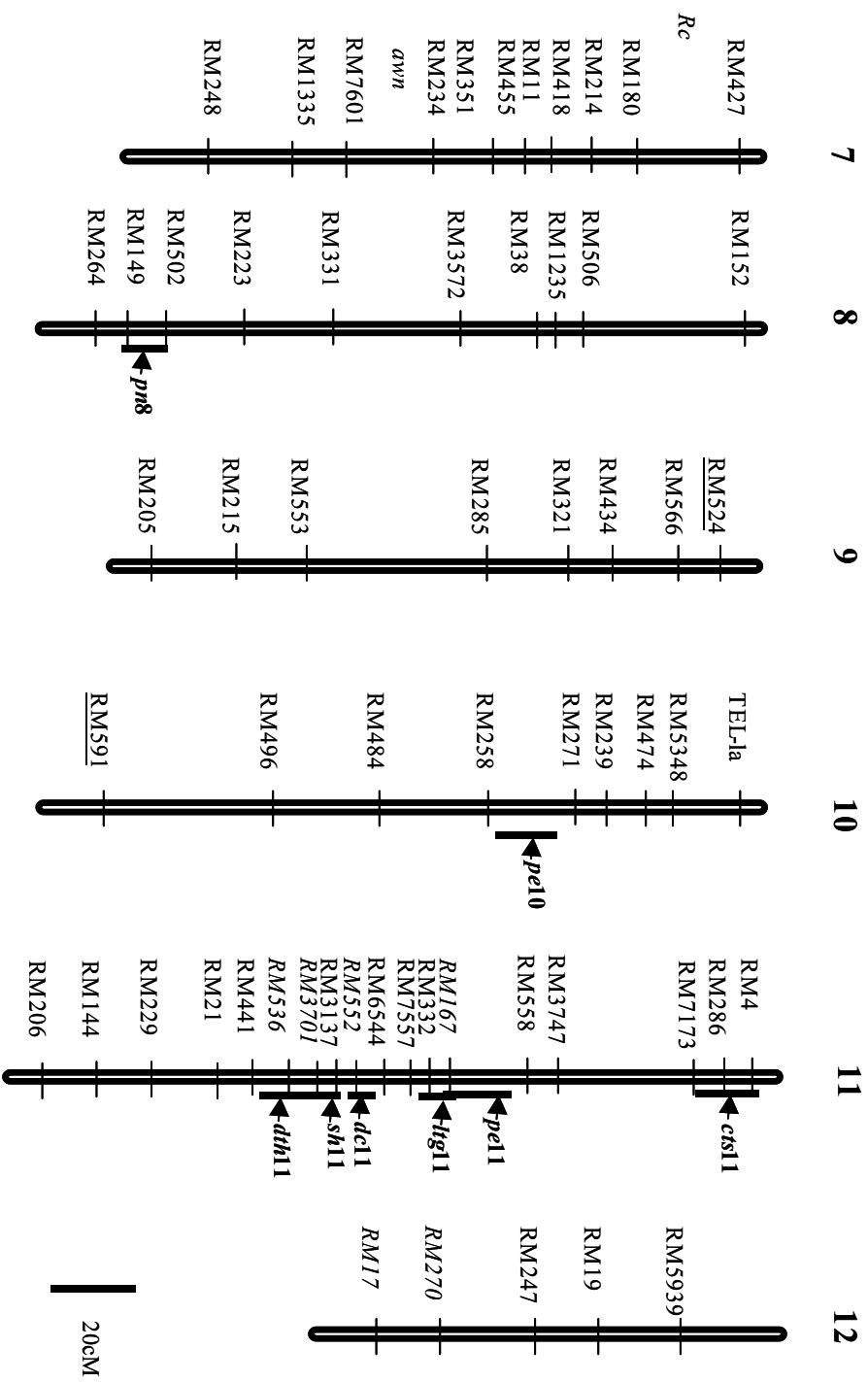


Fig. 2. Continued

시된 밀양23호 표현형으로의 선발 등에 기인하는 것으로 판단된다.

다. 질적 및 양적형질의 표현형 변이

조사된 14개 질적 및 양적형질의 빈도 분포를 Fig. 3에 제시하였다. 10개의 양적형질은 정규분포를 보였으며 양친의 표현형의 범위를 벗어나는 초월변이 계통들이 다수 관찰되었는데, 이는 이들 형질에 여러 개의 유전자들이 관여함을 제시해 준다.

밀양23호와 합천앵미3호의 출수까지 일수는 각각 111일, 114일 이었으며 BC1F6 계통은 99일에서 132일 까지의 분포를 보였다. 간장은 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 60cm, 96cm 였으며 BC1F6 계통은 평균이 72cm이며 53cm 에서 103cm의 분포를 보였다. 묘초장은 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 11cm, 15cm 였으며 BC1F6 계통은 평균이 12cm이며 9cm 에서 16cm의 분포를 보였다. 탈립성 정도는 밀양23호와 합천앵미3호가 같이 7로서 탈립이 쉬웠으며 BC1F6 계통은 양친형으로 편의되는 경향을 보였으나 몇몇 계통은 탈립이 매우 어려운 계통도 관찰되었다. 이삭목 길이는 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 -5cm, 3cm 였으며 BC1F6 계통은 평균이 -1cm이며 -7cm 에서 3cm의 분포를 보였다. 분얼수는 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 8개, 16개였다. 휴면성은 30립의 종자를 파종 후 10일 경과를 시켜 발아된 종자의 비율로 하였는데 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 0%, 100%, BC1F6 계통은 평균이 31%이며 0%에서 100%의 분포를 보였다. 춘천출장소 내냉성 검정포에서 조사한 적고는 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 7, 9였으며 유묘기 내냉성은 밀양23호와 합천앵미3호가 각각 9, 1로 합천앵미의 내냉성이 강하게 나타났다.

라. 형질간 상관

조사된 14개 질적 및 양적형질 간의 상관계수를 구하고 이를 Table 1에 제시하였다. 묘초장은 간장, 적고 및 휴면성과 고도로 유의한 정의 상관을 보였다. 출수까지의 일수는 묘초장, 적고 및 탈립성과 고도로 유의한 부의 상관을 보였다.

마. QTL 분석

조사된 14개 질적 및 양적형질 중에서 기부색, 주두색 및 영색을 조절하는 유전자를 제

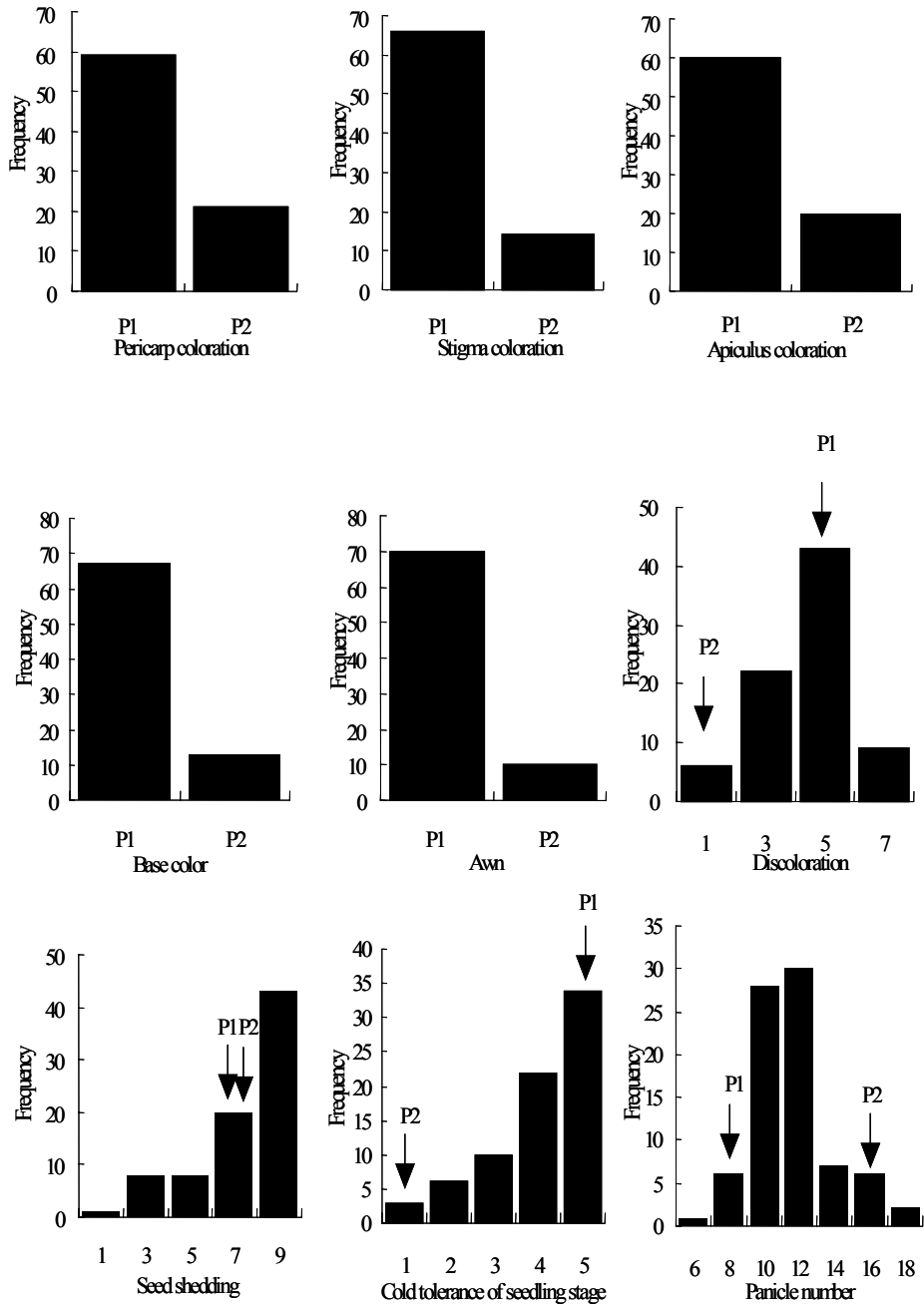


Fig. 3. Frequency distribution of the 15 traits in the 80 RILs (P1: Milyang 23, P2: Hapcheonqengmi 3).

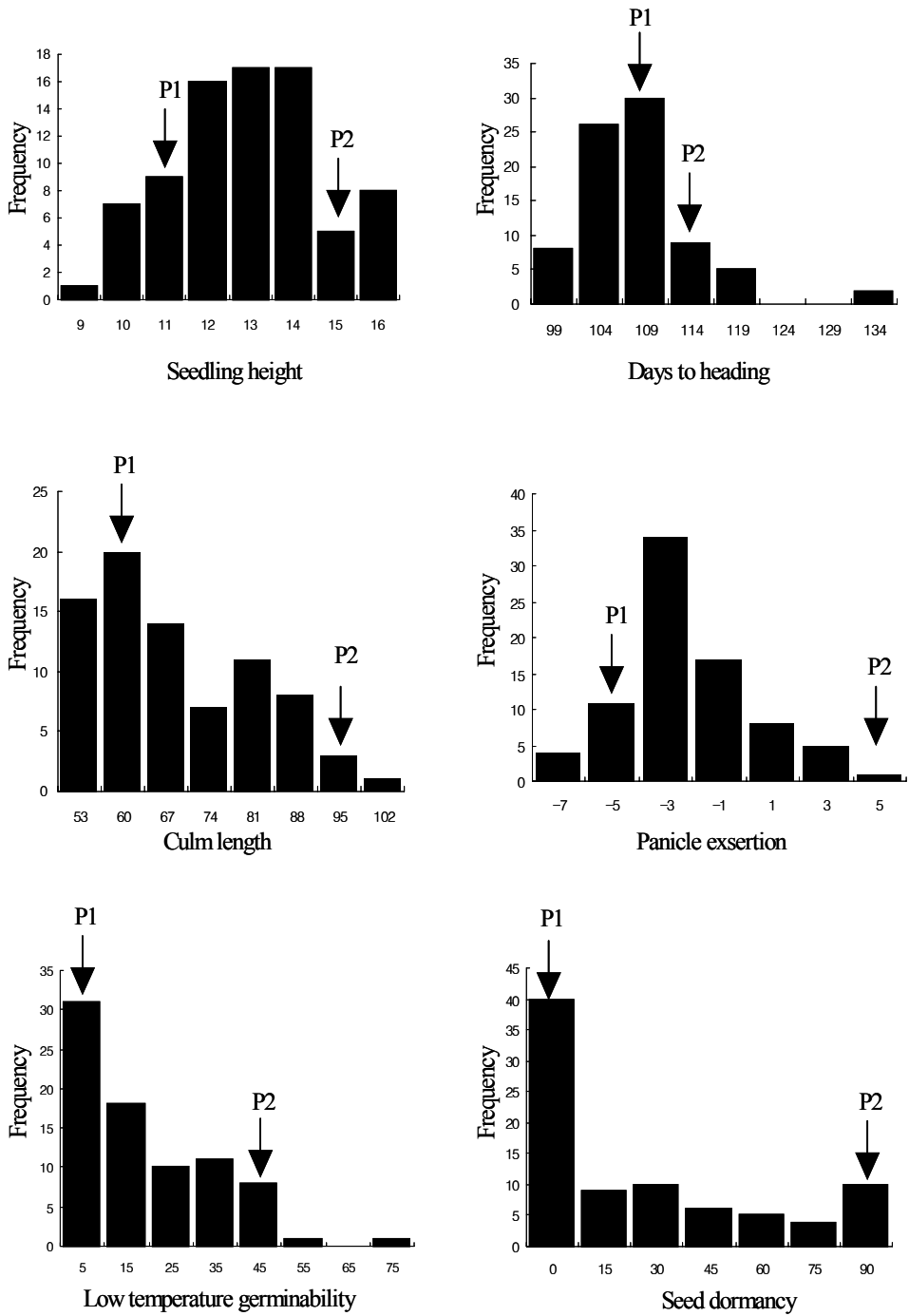


Fig.3. Continued

Table 1. Significant correlation coefficients among 15 traits in population

Traits	sdh	dth	dc	pc	sh	pn	cts	sc	apc	bc	cl	pe	awn	ltg
dth	-0.340**													
dc	0.402**	-												
pc	-	-0.283*	-											
sh	0.259*	-	0.262*	-										
pn	-	0.283**	-	-	-									
cts	-	-	-	-	-	0.224*								
sc	-	-	-	-	-	-	-							
apc	-	-	-	-	-	-	-0.231*	0.797**						
bc	-	-	-	-	-	-	0.237*	0.778*	0.684**					
cl	0.563**	-	-	-	0.220*	-	-	-	-	-				
pe	0.342**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.473**			
awn	-	-	-	-	-0.322**	-0.228*	-	-	-	-	-	-		
ltg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sd	0.419**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.232*	-	-	0.242*

sdh: seedling height; dth: days to heading; dc: discoloration; pc: panicle length; sh: seed shedding; pn: panicle number; cts: cold tolerance at seed stage; sc: stigma abortion; apc: apical abortion; bc: base color; cl: length; pe: panicle length; awn: awn length; ltg: low temperature inhibition of seed dormancy.

*, **: Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

외한 11개 형질에 대해 QTL 분석을 실시하였다. 11개 형질을 분석한 결과 31개의 QTL이 탐색되었으며, 형질 별 탐색된 QTL 수는 1개에서 5개의 분포를 보였다 (Table 2).

1) 출수까지의 일수

출수기에 관여하는 4개의 QTL이 탐색되었으며 이들은 2, 3, 6 그리고 11번 염색체에 위치하였다. 각각의 QTL은 전체 표현형 변이의 최소 8.5% (*dth11*), 최대 16.0% (*dth6*)를 설명하였고, 이들 4개의 QTLs은 전체 변이의 29.1%를 설명하였다. *dth3* 유전자좌에서는 밀양23호의 대립유전자가 출수까지의 일수를 증가시켰으며, 다른 3개의 유전자좌에서는 밀양23호의 대립유전자가 출수까지의 일수를 감소시켰다. 이 집단에서 탐색된 4개의 QTLs들은 기존의 연구에서 보고한 QTL들과 비슷한 위치에서 탐색되었는데, 특히 6번 염색체에서 탐색된 *dth6*은 Yano 등 (2000)이 보고한 *Hd-1*과 대립유전자로 판단된다.

2) 간장

간장에 관여하는 1개의 QTL이 염색체 1번에서 탐색되었는데 이 QTL은 전체변이의 27.3%를 설명하였다. 이 QTL 유전자좌에서는 밀양23호의 대립유전자가 간장을 감소시켰으며 그 위치로 보아 *sd-1*과 상이한 유전자로 보인다.

3) 묘초장

묘초장에 관여하는 2개의 QTL이 염색체 1, 5번에서 탐색되었는데 이 QTL은 각각 전체변이의 20.2, 16.2%를 설명하였다. 두 QTL 유전자좌에서는 밀양23호의 대립유전자가 묘초장을 감소시켰으며, 특히 *sdh1*은 간장에 관여하는 *cl1*과 유사한 위치에서 탐색되었다.

4) 수수

수수에 관여하는 2개의 QTL이 염색체 5번 및 8번에서 탐색되었는데 이들 QTL은 각각 전체변이의 13.5%, 11.5%를 설명하였다. 두 개의 유전자좌에서 밀양23호의 대립유전자가 수수를 감소시키는 방향으로 작용하였다.

Table 2. QTLs detected for each trait by SPA

Traits	QTL	Chr	Marker	R^2 ^a	Total	M/M ^b	H/H	Allele effect
Seedling height	<i>sh1</i>	1	RM315-RM319	20.2		12.4	14.2	-0.90
	<i>sh5</i>	5	RM163-RM7568	16.2	32.2	12.4	14.0	-0.80
Days to heading	<i>dth2</i>	2	RM262-RM526	10.7		109.4	115.0	-2.80
	<i>dth3</i>	3	RM426-RM168	13.3		110.6	106.1	2.25
	<i>dth6</i>	6	RM527-RM529	16.0		109.5	119.8	-5.15
	<i>dth11</i>	11	RM536-RM3701	8.5	29.1	108.9	113.1	-2.10
Discoloration	<i>dc5</i>	5	RM7568-RM430	14.4		4.72	3.33	0.70
	<i>dc11</i>	11	RM552-RM3137	17.8	22.5	4.61	2.50	1.06
Seed shedding	<i>sh1</i>	1	RM315-RM319	15.3		6.84	7.73	-0.45
	<i>sh2</i>	2	RM262-RM526	17.8		7.86	5.62	1.12
	<i>sh5</i>	5	RM163-RM7168	12.9		7.64	7.22	0.21
	<i>sh6</i>	6	RM527-RM539	15.2		7.81	6.20	0.81
	<i>sh11</i>	11	RM3137-RM3701	9.2	33.3	7.62	5.91	0.86
Panicle number	<i>pn5</i>	5	RM249-RM146	13.5		11.4	13.3	0.95
	<i>pn8</i>	8	RM502-RM149	11.5	17.2	11.6	13.7	-1.05
Cold tolerance at seedling stage	<i>cts1</i>	1	RM473-RM431	13.1		3.85	0.50	1.68
	<i>cts4</i>	4	RM255-RM252	13.9		3.70	2.93	0.39
	<i>cts6</i>	6	RM253-C	11.5		3.98	3.20	0.39
	<i>cts11</i>	11	RM286-RM4	8.5	17.4	4.00	2.73	0.64
Culm length	<i>cl1</i>	1	RM315-RM319	27.3		67.1	86.3	-9.6
Pericarp. C.	<i>Re</i>	7	RM180-RM214	71.4		1.04	2.68	-0.82
Seed dormancy	<i>sdl1</i>	1	RM466-PBC121	27.7		27.7	68.6	-20.5
	<i>sd3</i>	3	RM168-RM571	13.6		24.4	50.6	-13.1
	<i>sd6</i>	6	RM7641-RM103	10.3	31.1	26.2	53.8	-13.8
Base coloration	<i>C</i>	6	RM253-RM539	21.0		1.18	2.00	-0.41
Apiculus. C.	<i>C</i>	6	RM253-RM539	42.1		1.21	2.62	-0.71
Stigma. C	<i>C</i>	6	RM253-RM539	35.0		1.14	2.25	-0.56
L. T. G	<i>ltg11</i>	11	RM332-?	10.6		8.03	12.2	-2.09
AWN	<i>awn4</i>	4	RM252-RM273	13.2		1.10	1.67	-0.29
	<i>awn6</i>	6	RM539-RM527	11.6		1.21	2.33	-0.56
	<i>awn7</i>	7	RM1335-RM7601	20.3	26.4	1.10	1.57	0.24
Panicle exertion	<i>pe1</i>	1	PBC121-RM128	17.5		4.46	6.71	-1.13
	<i>pe4</i>	4	RM348-RM567	14.6		4.69	6.69	-1.00
	<i>pe10</i>	10	RM271-RM258	15.6		4.56	7.56	-1.50
	<i>pe11</i>	11	RM3747-RM167	9.3	28.9	4.63	6.59	-0.98

^a: Percentage of the phenotypic variance explained by the QTL, ^b: Phenotypic mean of the Milyang 23 homozygotes, ^c: Phenotypic mean of the Hapcheonaengmi 3 homozygotes.

5) 이삭목 길이

이삭목의 길이에 관여하는 4개의 QTL이 염색체 1, 4, 10 그리고 11번에서 탐색되었는데 이들 QTL은 전체 표현형 변이의 9.3% - 17.5%를 설명하였다. 모든 유전자좌에서 합천앵미3호의 대립유전자가 이삭목 길이를 증가시키는 방향으로 작용하였다. 특히 저온 처리시 특이적으로 발현되는 PBS121 (2협동과제 제공)이 1번 염색체의 이삭목 길이를 조절하는 QTL,, pe1과 밀접하게 연관을 보였는데, 이 유전자가 이삭목의 신장과 관계가 있는지의 여부는 추후 검토가 필요하다.

6) 적고

적고에 관여하는 2개의 QTL이 염색체 5 그리고 11번에서 탐색되었는데 이들 QTL은 각각 전체 표현형 변이의 14.4%, 17.8%를 설명하였다. 모든 유전자좌에서 합천앵미3호의 대립유전자가 적고를 감소시키는 방향으로 작용하였다.

7) 탈립성

탈립성에 관여하는 5개의 QTL이 염색체 1, 2, 5, 6 그리고 11번에서 탐색되었는데 이들 QTL은 전체 표현형 변이의 9.2% - 17.8%를 설명하였다. *sh1* 유전자좌에서는 합천앵미3호의 대립유전자가 탈립성을 증가시키는 방향으로 작용하였으나 다른 4개의 유전자좌에서는 밀양23호의 대립유전자가 탈립성을 증가시켰다.

8) 유묘내냉성

유묘내냉성에 관여하는 4개의 QTL이 염색체 1, 4, 6 그리고 11번에서 탐색되었는데 이들 QTL은 전체 표현형 변이의 8.5% - 13.9%를 설명하였다. 모든 유전자좌에서 합천앵미3호의 대립유전자가 유묘내냉성을 증가시키는 방향으로 작용하였다.

9) 영색

염색체 7번에서 탐색된 영색에 관여하는 유전자는 전체 표현형 변이의 71.4%를 설명하였는데, 이 유전자는 *Rc*와 동일한 유전자로 판단된다.

10) 휴면성

휴면성에 관여하는 3개의 QTL이 염색체 1, 3 그리고 6번에서 탐색되었는데 이들

QTL은 전체 표현형 변이의 10.3% - 27.2%를 설명하였다. 모든 유전자좌에서는 합천앵미3호의 대립유전자가 휴면성을 감소시키는 방향으로 작용하였다.

11) 저온발아성

저온발아성에 관여하는 1개의 QTL이 염색체 11번에서 탐색되었는데 이 QTL은 전체 표현형 변이의 10.6%를 설명하였다. 이 유전자좌에서는 합천앵미3호의 대립유전자가 저온발아성을 증가시키는 방향으로 작용하였다.

12) 까락의 길이

까락의 길이에 관여하는 3개의 QTL이 염색체 4, 6 및 7번에서 탐색되었는데 이들 QTL은 전체 표현형 변이의 11.6% - 20.3%를 설명하였다. 모든 유전자좌에서는 합천앵미3호의 대립유전자가 까락의 길이를 증가시키는 방향으로 작용하였다.

바. 저온발아성 QTL-NIL 육성

양친의 교배집단 (BC1F6)을 이용하여 저온발아성 등에 관여하는 유전자 분석과 연관 DNA marker를 탐색한 결과 염색체 11번에 위치하는 합천앵미3호의 유전자가 밀양23호의 저온발아성을 증진시키는 것으로 분석되었다. 이 결과는 서 등 (1999)이 동일한 조합의 98개 BC1F1 계통을 이용, 저온발아성에 관여하는 QTL을 분석한 결과 염색체 11번에 위치한 SSR 표지인자 RM167 부근에 합천앵미3호의 대립유전자가 저온발아성을 증진시킨다고 보고한 결과와 잘 일치하고 있다. 이 염색체지역은 저온발아성 관여 QTL 외에도 이삭목 길이, 적고 그리고 출수까지의 일수 등에 관여하는 QTL들도 위치하고 있었는데 이들 내냉성에 관여하는 형질들이 동일한 유전자에 의한 다면발현인지 혹은 밀접하게 연관된 몇몇 유전자들의 독립적인 작용에 의한 것인지에 대해서는 추후 자세한 검토가 요구된다. 저온발아성 관여 유전자의 특성 및 유전양식 분석을 위해서는 밀양23호의 유전적 배경에 목표 유전자좌에서만 합천앵미3호의 대립유전자를 가진 근동질 유전자계통의 육성이 필요한데 이를 위해 저온발아성이 양호한 계통을 선정하였다. 이들 계통들은 저온발아성 유전자와 연관된 DNA 마커에서는 합천앵미3 대립유전자를, 기타 다른 유전자좌에서는 밀양23호 대립유전자를 높은 비율로 가진 저온발아성이 양호한 계통들이다 (Table 3).

이들 계통들의 출수기 등 특성을 Table 3에 제시하였는데 영색, 부선색 등 질적

Table 3. Agronomic characteristics of selected BC1F6 lines with enhanced low temperature germinability

Line	dth*	dc	pc	ss	ctss	bc	cl	awn	ltg	Remarks
CR19	115	1	1	3	5	1	67	3	14	
CR29	108	1	1	5	3	1	63	1	10	<i>ltg11</i>
CR33	105	3	1	9	1	3	81	1	23	<i>ltg11</i>
CR47	107	1	1	9	5	1	61	1	14	<i>ltg11</i>
CR53	122	3	1	9	4	1	89	1	16	<i>ltg11</i>
CR68	109	5	1	3	4	1	69	3	21	<i>ltg11</i>
Milyang23	112	7	1	9	5	1	62	1	6	
Hapch. 3	116	1	3	9	1	3	100	3	20	<i>ltg11</i>

* dth: days to heading, dc: discoloration, pc: pericarp color, ss: seed shedding, ctss: cold tolerance at seedling stage, bc: base color, cl: culm length, awn: awns, ltg: low temperature germinability

형질 및 양적형질에서 밀양23호와 유사하였으며 적고, 저온발아성 등은 밀양23호보다 우수하였다. CR19는 적고와 탈립성이 각각 1, 3으로 밀양23호에 비해 내냉성이 강하며 탈립도 잘 되지 않는 편이나 부선이 자색이고 까락이 있는 특성을 나타내었다. CR29는 적고와 탈립성이 각각 1, 5로서 CR19와 유사하였으나 영, 기부 그리고 부선에 안토시아닌 색소가 형성되지 않으며 유묘기 내냉성도 양호하였다. CR33은 적고는 3으로 밀양23호보다 강하였으나 탈립성은 9로 밀양23호와 유사하였고 영, 기부 그리고 부선에 안토시아닌 색소가 형성되었으나 까락은 없었다. CR47은 영, 기부 그리고 부선에 안토시아닌 색소가 형성되지 않은 특성을 제외하고는 CR33과 유사한 표현형을 나타냈다. 이들 계통들 중에서 두 계통의 SSR 유전자형을 Fig. 4에 제시하였는데 저온발아성에 관여하는 목표 유전자 좌와 일부 염색체 지역에서는 합천앵미3호의 유전자형을 가지고 있었지만, 기타 지역에서는 밀양23호의 유전자형으로 치환되어 있었다. 이는 F1 개체를 밀양23호로 여교배하였고 또한 세대 진전 과정에서 밀양23호의 표현형 방향으로 선발을 했기 때문으로 판단된다. 그러나 염색체의 여러 부분에서 합천앵미3호의 단편을 가지고 있기 때문에 밀양23호로 여교배를 하는 과정이 필요하다. 각 계통 중

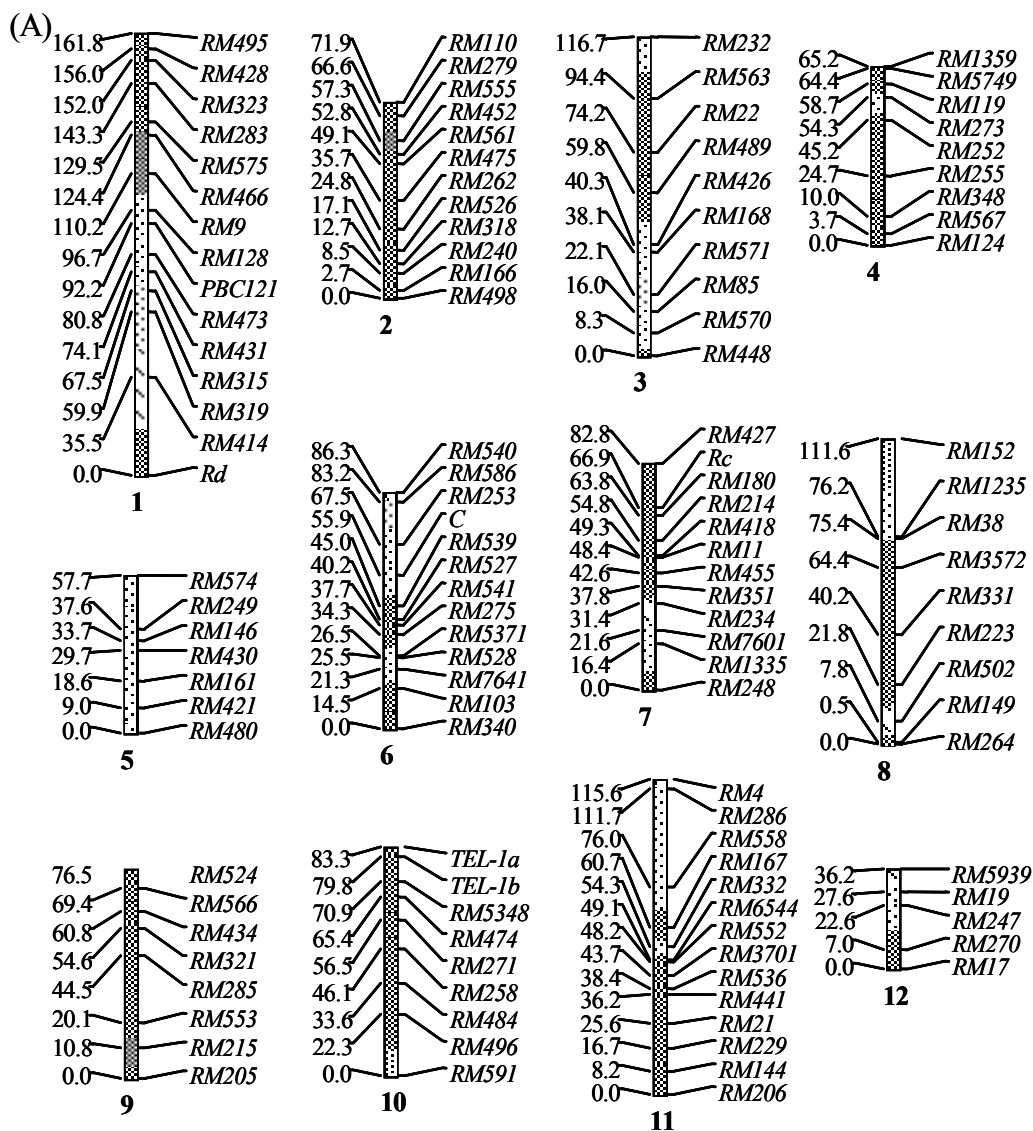


Fig. 4. Graphical genotypes of two BC1F6 lines (A: CT33, B: CR47)

■ Milyang23 homo ▨ Hapcheon.3 homo ▤ Hetero

(B)



Fig. 4. Continued.

1-2 개체를 선발하여 밀양23호로 여교배하여 BC1F6BC1을 육성하였으며 이들 BC1을 파종하였다. BC1F6BC1 개체의 DNA 유전자형을 검정하여 교잡된 개체를 선발하여 밀양23호로 여교배를 실시하였다 (Table 4). 이들 BC1F6BC2 개체를 자식시켜 얻은 개체를 포장에 전개하여 유전자형을 검정하고 표현형으로는 밀양 23호와 유사하나 목표형질인 저온발아성 등과 연관된 마커 유전자좌에서 합천앵미3호 동형접합체 유전자형을 보이는 개체를 선발, 근동질 유전자계통 (QTL-NILs)으로 이용할 계획이다 (Fig. 5 참조).

Table 4. List of advanced backcross breeding lines and their cross combinations for low temperature germinability

Cross combinations	Generation	No. of plants	Status	Remarks
CR19 x Milyang23	BC1F6BC1	26	GH*	<i>ltg11</i>
CR29 x Milyang23	BC1F6BC1	6	GH	<i>ltg11</i>
CR33 x Milyang23	BC1F6BC2	5	GH	<i>ltg11</i>
CR47 x Milyang23	BC1F6BC1	10	GH	<i>ltg11</i>

3. 고찰

본 실험은 합천앵미3호와 밀양23호 간의 교배집단 (BC1F6)을 이용하여 저온발아성 등에 관여하는 유전자 분석과 연관 DNA marker를 탐색하여 MAS를 통한 내냉성 품종 육성을 목표로 실시하였다. 적고, 저온발아성 등 내냉성에 관여하는 양적형질 유전분석 결과 이들 특성에 관여하는 유전자를 탐색하였으며 연관 분자표지를 개발하였다. 탐색된 QTLs에서 합천앵미3호의 대립유전자가 내냉성을 증진시키는 것으로 나타났으며 특히 염색체 11번에 위치하는 합천앵미3호의 유전자가 밀양23호의 저온발아성을 증진시키는 것으로 분석되었는데, 이 결과는 이 결과는 서 등 (1999)이 보고한 결과와 잘 일치하고 있다. 이 염색체 지역은 저온 발아성 관여 QTL 외에도 이삭목 추출도, 적고 그리고 출수까지의 일수, 탈립성

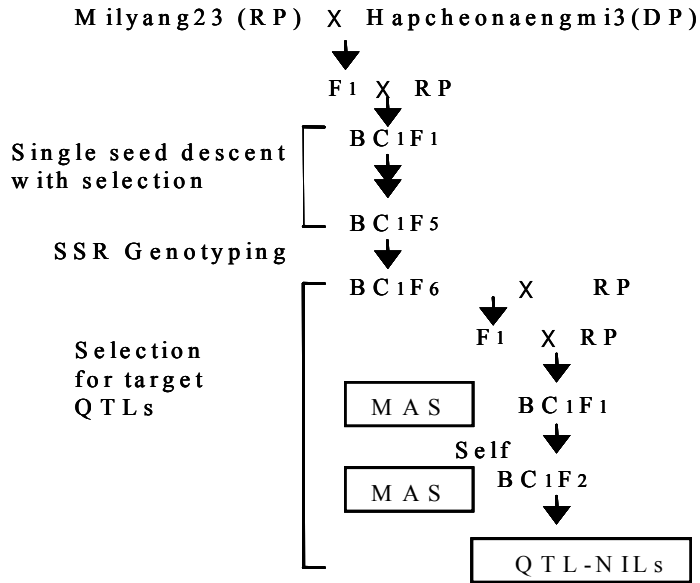


Fig. 5. Breeding scheme for developing QTL-NILs

등에 관여하는 QTL들도 위치하고 있었는데 이들 내냉성에 관여하는 형질들이 기능적으로 유사하기 때문에 동일한 유전자에 의한 다면발현일 가능성이 높다. 그러나 연관된 몇몇 유전자들의 독립적인 작용에 의한 가능성도 존재하기 때문에 고밀도 유전자지도에 의한 자세한 검토가 요구된다. 특히 탈립성 QTL *sh11*에서는 합천앵미3호의 대립유전자가 탈립성을 감소시키는 방향으로 작용을 하였고 또한 이 지역은 잡초성벼인 합천앵미3호의 열악형질이 위치하지 않았기 때문에 밀양23호의 유전적 배경에서도 나쁜 영향을 미치지 않을 것으로 기대되나 조사가 되지 않은 열악 형질이 존재할 가능성도 있어 추후 자세한 검토가 요구된다.

염색체 11번에 위치하는 저온발아성 관여 유전자는 수차례의 반복 실험을 통해 그 영향력이 확인되었다. 이 저온발아성 관여 QTL은 전체 변이의 약 10 - 18% 정도를 설명하는 QTL로서 내냉성이 약한 통일형 품종의 유전적 배경에 이입되었을 경우 통일형 품종의 내냉성을 증가시켜줄 것으로 기대된다. 이 QTL의 정확한 위치를 알기 위해서는 QTL-NIL의 육성과 이 QTL-NIL과 밀양23호를 교잡 육성한 대규모의 분리세대 (F2:3)가 필요하다. 이 집단을 이용하여 저온발아성

QTL의 정밀지도 작성이 가능한데 이미 벼 11번 염색체의 염기서열이 밝혀져 있기 때문에 분자표지의 개발이 용이하다. 고밀도 유전자지도 작성 후의 단계는 substitution mapping을 이용 저온발아성 관여유전자가 어느 마커들 간에 위치하는지의 정보를 얻을 수 있으며, 유전자를 포함하는 거대 DNA 단편을 분리하여 chromosome landing의 방법을 통해 유전자의 분리가 가능하다. 이를 위해서는 합천앵미3호의 BAC library가 필요하다. 목표로 하는 유전자에 연관된 RFLP marker들과 overlapping 되는 YAC 혹은 BAC clones을 가지고 점차적인 chromosome walking을 시작할 수 있다. 고밀도 유전자지도가 개발된 작물에서는 목표 유전자를 포함하는 BAC 클론을 선발할 수 있으며, 클론에 위치하는 유전자를 여러 가지 방법으로 확인 분리할 수 있다. 이를 위해 합천앵미3호의 BAC library가 작성되었으며 특히 이 연구에서 목표로 저온발아성 QTL이 위치하는 염색체지역의 BAC clone을 선발하고 이들의 end-sequence 정보를 이용하여 이들 clone들을 연결하는 작업을 제4세부과제에서 수행하였다. 이에 대한 내용은 제4절에서 보고하고 있다.

제 2절 벼 저온담수 직파 적성 후보 유전자 분석 및 마커개발

1. 서 언

벼는 전 세계적으로 다양한 환경에서 재배되면서 그 성장 및 발달과정 중 다양한 환경 스트레스에 노출되어 있다. 환경 스트레스 중에서 저온 스트레스는 식물의 생화학적, 생리학적 대사에 큰 영향을 주고 최종적으로 수량 감소를 초래한다. 1980년 국내에서 발생한 벼 냉해에 의한 피해면적은 788천ha, 감수량은 1,183,4천 톤에 달하였고, 1993년에는 234천ha, 430톤의 피해 면적과 감수량을 보였다. 주변 국가인 일본과 중국에서도 냉해 피해가 빈번하게 발생하여 벼 내냉성 연구의 국내 및 국제적 중요성이 강조된다. 이에 본 연구는 벼의 내냉성 관련 유전자들을 기초로, 잡초성벼의 내냉성 연관 마커의 개발을 목적으로 실시하였다.

식물의 냉해는 0℃ 이상 15℃ 이하의 온도에 노출된 식물체에 일련의 과정을 거쳐 대사가 저해되거나 조직이 손상되는 현상이다. 식물체가 저온에 노출되면 먼저 생체막의 정상적인 활성이 가능한 sol 교질상에서 gel 교질상으로 전환되어 생체막에 결합된 효소들의 활성이 떨어지고, 생체막의 투과성이 증가하면 원형질 유동성이 감소하게 된다. 그리고 생체막 효소의 불활성화에 의해 대사의 불균형이 생기고 활성산소 등의 독성 물질이 축적되어 세포의 손상을 초래한다. 식물은 저온스트레스에 대한 반응으로 세포막 지질구성의 변화뿐만 아니라 탄수화물 대사에 관련된 효소들과 proline 등의 삼투조절물질 대사에 변하게 된다. 저온처리에 따른 효소의 활성변화는 저온스트레스에 대응해 내성을 획득하는 과정에서 탄수화물, 프롤린, 폴리아민과 같은 수용성 구성 성분의 증가 또는 감소와 관련된다.

식물은 저온에 노출되었을 때 다양한 저온 유도성 유전자의 발현을 통해 환경 변화에 적응한다. 이에 저온 처리시 저항성 품종과 감수성 품종 간의 발현되는 전사체 및 단백질의 질적 또는 양적 차이를 이용한 내냉성 분자 마커 개발이 가능하다. 이러한 연구의 예로 자포니카형 벼 품종을 대상으로 15℃에서의 저온발아성 연관 분석을 실시한 결과 wx(I), d2(II), d6(III), I-Bf(V) 등의 표지 유전자를 밝혀진 바 있다. 또한 벼 22개 품종 (japonica, javanica, indica)의 유묘 5℃ 처리시 RC167, RC235 mRNA의 양이 증가되었으며 이것이 내냉성과 관련이 있음을 확인한 바 있으며 다양한 품종과 처리에서 이용 가능한 마커가 개발된 바 있다. 그밖에 QTL 분석과 RAPD 마커 등을 이용한 내냉성 유전자 탐색연구가 활발히

진행되고 있다.

벼의 내환경성 관련 유전자를 획득하기 위한 재료로서 오랜 기간동안 다양한 환경 조건에 적응하여 균집을 이룬 야생벼의 이용 가치가 높아지고 있다. 현재 재배종인 *Oryza sativa* 는 벼 속에 속하는 20여개 종의 전체 유전적 다양성의 일부분 (25%)만 가지고 있기 때문에 야생벼의 유용한 유전변이를 활용하는 연구가 필요하다. 본 연구에서는 야생벼 (*Oryza rufipogon*)와 잡초성벼 (*Oryza sativa*, 합천앵미3), 그리고 이들과 재배벼 (화영벼, 밀양23호)를 여교배 한 후대 집단 (BC_1F_3 , BC_1F_5)을 이용하여 내냉성 계통 선발을 위한 내냉성 연관 분자 마커의 개발을 목표로 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

농촌진흥청 작물시험장에서 분양받은 단립형 잡초성벼 합천앵미3(*Oryza sativa*)과 영남대학교 작물육종학연구실에서 수집보존 중인 W1944(*Oryza rufipogon* Griff.)를 일품벼, 추청벼, 다산벼, 밀양23호, 화성벼와 내냉성 정도를 비교하였다. 후대분석에는 밀양23호/합천앵미3 조합의 F1에 밀양23호를 여교배한 BC_1F_3 , BC_1F_5 와 화영벼/*Oryza rufipogon* 조합의 F1에 화영벼를 여교배한 BC_1F_3 를 공시하였다. 이들 재료를 단국대학교에 5m×2m의 인공 포장을 만든 후 Wagner pot에서 담수 재배하였다.

나. 실험 방법

1) 저온 처리

종자의 휴면을 타파하기 위해서 50℃에서 1주간 처리 후 상온에서 2일간 둔 다음 20℃에서 4일간 침중한 후 30℃에서 24시간 최아시켜 Wagner pot에 파종하여 25℃/20℃ (주/야, 16시간/8시간)조건에서 재배하였다. 2~3엽기에 도달한 식물체를 12℃/10℃ (주/야, 16시간/8시간) 조건으로 5, 7, 14일 동안 저온에서 처리하였다.

2) Apoplastic protein 추출

Mouth 등 (1994)의 방법에 따라 식물체 잎을 2~3cm로 절단하여 추출 용액 (20mM ascorbic acid, 20mM CaCl₂)을 진공상태로 침투시킨 후 800g에서 30분간 원심분리 하여 추출된 용액을 acetone을 이용하여 -20℃에서 침전시킨 후 12,000rpm에서 원심분

리하여 얻은 pellet을 조직 1g 당 10 μ l의 PBS (phosphate-buffer saline)에 녹여서 추출하였다.

3) Western 분석

동일 양의 잎 조직에 해당하는 apoplastic protein을 Laemmli (1970)의 방법에 의해 15% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Towbin buffer를 사용하여 70V에서 2시간 동안 blotting하였다. Blotting이 끝난 membrane을 상온에서 완전히 건조시킨 후, TBST (100mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 5% nonfat dry milk를 넣은 용액에서 blocking시켰다. Blocking된 membrane을 2회 TBST로 씻은 후 1차 항체를 1:10,000의 비율로 TBST에 희석하여 30분간 흔들어 주고 다시 TBST로 20분씩 4회 씻어주고, 2차 항체 (anti-rabbit IgG AP conjugate, PROMEGA)를 TBST에 1:7,500의 비율로 희석한 후 30분간 반응시켰다. 20분간 4회 TBST로 membrane을 씻어주고 물기만 마를 정도로 건조시킨 다음 10ml AP solution(100mM Tris HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)에 66 μ l NPT (nitroblue tetrazolium, 50 mg/ml)와 33 μ l BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, 50mg/ml)를 첨가해 암상태의 상온에서 발색 반응을 하여 분석하였다.

4) Carrier ampholytes를 이용한 2-D gel electrophoresis

Apoplastic protein 침전물을 UREA/NP40 buffer(9M urea, 4% NP-40, 1% pH 9~11 ampholines, 2% β -mercaptoethanol)로 재현탁시켰다. 이것을 tube gel을 이용하여 200V에서 1시간동안 prefocusing하였다. 다시 500V에서 20시간동안 focusing한 후 tube gel을 빼내서 equilibration buffer로 평형화하고, O'Farrel(1975)방법에 따라 15% polyacrylamide gel에서 2차원 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 다음, gel을 coomassie brilliant blue R-250(SIGMA)을 사용하여 염색하였다.

5) Immobilized pH gradients를 이용한 2-D gel electrophoresis

Apoplastic protein을 ReadyPrepTM sequential extraction reagent 3(Bio-Rad)를 사용하여 녹였다. 이를 rehydration buffer(8M urea, 4% CHAPS, 10mM DTT, 0.2% Bio-lyte)에 혼합한 후 IPG strip(3~10, 17cm) 위에 스며들도록 한 다음 mineral oil로 그 위를 덮었다. PROTEAN[®] IEF Cell(Bio-Rad)을 사용하여 20 $^{\circ}$ C에서

rehydration(50V, 10시간)한 후 250V에서 15분(20℃), 250V에서 5시간(20℃), 10,000V에서 6시간(20℃)동안 focusing하였다. Focusing이 끝난 strip을 equilibration buffer I (6M urea, 0.375M Tris pH8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% DTT)에서 10분간, equilibration buffer II (6M urea, 0.375M Tris pH8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2.5% idoacetamide)에서 10분간 평형화하였다. 평형화가 끝난 strip을 PROTEAN[®] II xi 2-D Cell(Bio-Rad)을 이용하여 2차원 전기영동을 실시한 후, gel을 coomassie brilliant blue R-250(SIGMA)을 사용하여 염색하였다.

6) Silver staining (Silver stain plus, Bio-Rad)

전기영동이 끝난 gel에 fixative enhancer solution(50% methanol, 10% acetic acid, 10% fixative enhancer concentrate, 30% DD H₂O)을 400ml 부어준 후 20분간 균일하게 흔들어서 주었다. fixative enhancer solution을 제거 한 후 DD H₂O 400ml로 10분간 2회 씻어주고, staining solution(DD H₂O 105ml, silver complex solution 15ml, reduction moderator solution 15ml, image development reagent 15ml, development accelerator reagent 150ml) 300ml로 염색과정과 발색반응을 동시에 실시하였다. 어느 정도 발색이 되었을 때 5% acetic acid 400ml로 반응을 중지한 다음 DD H₂O 400ml로 gel을 씻어주었다.

7) RNA추출

벼 잎조직 0.1g을 액체질소와 막자사발을 이용하여 마쇄한 후 TRI REAGENT[®] (MRC)를 사용하여 total RNA를 추출하였다.

미세한 분말에 1ml의 TRI REAGENT를 넣고 간 다음, 1.5ml eppendorf tube에 넣고 15초 동안 가볍게 섞어 주었다. 상온에서 2~15분 둔 다음, 12,000g(4℃)에서 15분 동안 원심분리 한 다음 상층액을 새 eppendorf tube에 옮겼다. 그런 다음 0.2ml의 chloroform을 넣고 15초 동안 세게 흔들고 상온에서 2~15분 반응시켰다. 12,000g (4℃)에서 15분 동안 원심분리 한 후 상층액을 새 eppendorf tube로 옮기고 isopropanol 0.5ml를 넣고 5~10분 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 12,000g (4℃)에서 8분 동안 원심분리 후 pellet을 얻고, 75% ethanol로 4℃ 7500g에서 원심분리하여 씻었다. Ethanol을 제거한 후 3~5분 상온에서 건조시킨 후 diethyl pyrocabonate (DEPC) 처리된 물로 녹이고 55~60℃로 가열 한 다음, 얼음에 두고 분광광도계를 이용하여 260nm에서 O.D.값을 측정한 후 정량하였다.

8) cDNA 합성

Total RNA 1 μ g을 가지고 1st strand synthesis kit (Roche)을 이용하여 random priming방법으로 cDNA를 합성하였다. cDNA합성의 시료준비는 10 \times reaction buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, deoxynucleotide mixture 2 μ l, random primer p(dN)₆ 2 μ l, RNase inhibitor (Ambion) 1 μ l, AMV reverse transcriptase 0.8 μ l, RNA 1 μ g을 섞은 다음 반응용액이 총 20 μ l로 되게 만든 후 반응시켰다. 반응은 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 두고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 4 $^{\circ}$ C에 5분간 식혀 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

9) Primer 합성

NCBI (National center for biotechnology information)의 blast search를 통해서 벼 내병성 관련 유전자를 검색하여 10개 유전자 전체의 염기서열을 확보하였다. 그리고 RT-PCR시 동일 양의 cDNA가 사용되었음을 확인할 수 있는 벼의 β -actin 유전자의 primer를 사용해 정량에 이용하였다. 확보한 유전자의 염기서열을 기초로 하여 primer analysis software oligo ver. 6.35 (Molecular biology insights)를 이용해 염기수가 15~25개 정도 되고 GC ratio(%)가 45~60정도 되는 5'와 3' primer를 작성하였다 (Table 4). 이 외에도 보리의 내병성 관련 유전자인 CLP (chitinase-like protein)의 primer를 제작하였고, DD-RT PCR을 통해 cloning된 저온유도성 유전자들의 염기서열을 분석하여 얻은 결과로 pBC121이 ARF (ADP-Ribosylation Factor)임을 알아내어 이의 유전자 Promoter 부위의 밀양23호와 합천앵미3호 간의 차이점을 밝혀내기 위해 해당 유전자의 4종의 primer를 제작하였다.

10) DD-RT PCR 반응

합성된 cDNA를 가지고 벼 저온관련 유전자 primer들을 사용하여 PCR을 수행하였다 [template 0.5 μ l, 10X reaction buffer 5 μ l, 10mM dNPT 1 μ l, 50 pmol 3' primer 1 μ l, 50 pmol 5' primer 1 μ l, 15mM MgCl₂ 5 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l(5U)] . 94 $^{\circ}$ C 1분, 94 $^{\circ}$ C 1분, 50~65 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 5분의 조건에서 30 cycle을 반응시켰다.

11) 저온 유도성 유전자 크로닝 및 동정

DD-RT PCR를 통해서 전사수준에서 발현되는 특이적 밴드와 비특이적인 밴드를 pGEM T-Easy vector 1 μ l(50ng), ligase 1 μ l(3U), 2 \times rapid buffer, DNA를 25 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응 시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켜 JM109 competent cell에 Heat Shock방법을 이용하여 형질전환하여 크로닝된 유전자를 sequencing하여 얻어진 염기서열을 NCBI에서 동정하였다.

Table 4. Nucleotide sequence of the specific primers for RT-PCR derived from the low temperature-inducible genes in rice

Primers	Nucleotide Sequence	Anneal. Temp. ($^{\circ}$ C)
PPDK	5' GGA GCG ACG GCA ACA AGA C 3' 3' AAG TTG AGT ACC CTG TCG CG 5'	53
CGR	5' GCG GCG CTC ACC TGG 3' 3' CTG TCG CGT TCC CGT TTC TT 5'	51
AOX1a	5' GCG GAG AAG GAG GTG GTG 3' 3' AGT TGC GGA TGA AGG ACC CA 5'	56
AOX1b	5' AGC AAC ACA AGC CAA CCA AC 3' 3' CCT CCT GCC GTG CCT TA 5'	55
OsCDPK7	5' GCG GCG GTT GTG AGG TT 3' 3' GTT CAG GTA AAG GTT CGC GT 5'	51
LIP5	5' AGG CGT GGT GGA GAA GA 3' 3' TAC CAA ACG GAA ACA CTA CA 5'	55
LIP19	5' CCA CGC CGC CTG ACA C 3' 3' TCT ACC GCC TAT CCG CTC TC 5'	50
pBC121	5' GCG ACA TCT GGT GAA GG 3' 3' ATA CAT GGG CAA ACA GAC TC 5'	55
pBC442	5' ATA GAA GAT ACG GCG TGC AG 3' 3' GTT TAA GGC TGG GAG GG 5'	57
pBC601	5' GAT GCG CCT CCA CCC 3' 3' CTC CTT TCT TTC CGC ATC CG 5'	58
ARF1	5' GAG CTT CAC AGG ATG CTG AAC 3' 3' AAC AAC TTC CGG ATA AGA CCG 5'	55
ARF2	5' ACA TGG AGT GAT GGA GTG AGC A 3' 3' TCC GTG ACC ATT CCT TGA GGT ATA 5'	51
ARF3	5' CAG CTA TAT TAT CTC ACA CGA CTC G 3' 3' CGT ATA CGA TGA TGT GAA GAC ATC G 5'	51
ARF4	5' ATT TGG TCG TGT TGG GGT CTT GG 3' 3' GCA TCA GAG GTG CGA GAT AAC C 5'	53
Rice β -actin	5' ACT GTC CCC ATC TAT GAA GGA 3' 3' AGA GAG TCT TGT AAG GTC GTC 5'	52

3. 결과 및 고찰

가. 내성품종 특이 발현 단백질 유전자를 이용한 마커 개발

저온 스트레스에 의한 세포벽과 원형질을 보호하는 기능의 단백질이 많이 축적되는 세포 밖 공간의 단백질을 재배벼, 야생벼, 잡초성벼로부터 추출하여 차이를 보이는 단백질 마커를 탐색하였다. 재배벼(화성벼, 밀양23호)와 잡초성벼 (합천앵미3호), *O. rufipogon*의 세포 밖 공간의 단백질의 비교를 통해 야생벼와 잡초성벼에서 28 및 35 KDa 단백질이 재배벼보다 많이 존재함을 확인하였다 (Figs. 5, 6).

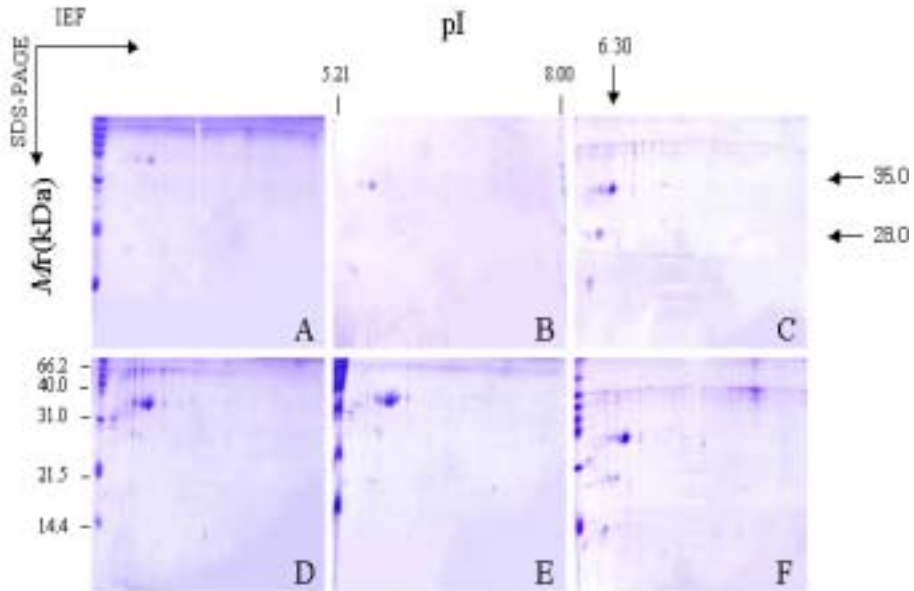


Figure 5. 2D-IEF/SDS-PAGE of the apoplast proteins accumulated in leaf of rice. A: non-acclimated Hwaseongbyeo at 25°C/20°C; B, C: cold-acclimated Hwaseongbyeo at 10°C/8°C for 3, 14 days, respectively; D: for non-acclimated *O. rufipogon* at 25°C/20°C; E, F: cold-acclimated *O. rufipogon* at 10°C/8°C for 3, 14days, respectively.

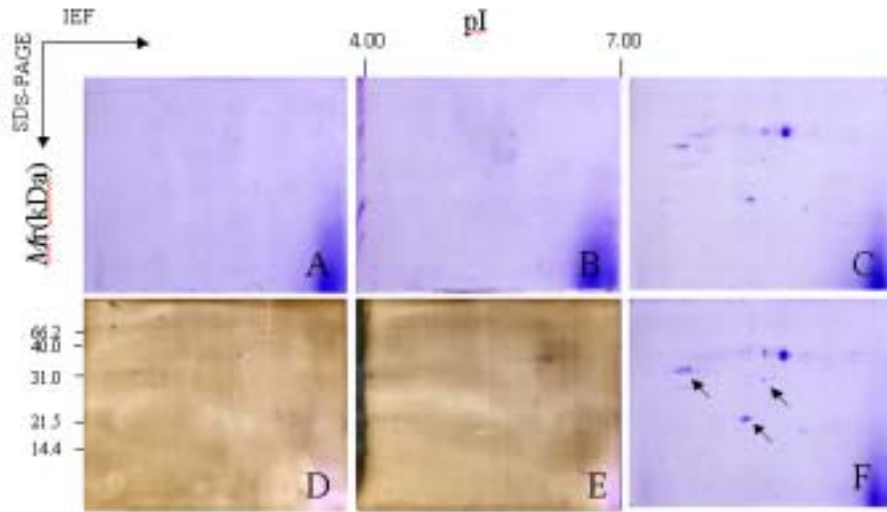


Fig 6. 2D-IEF/SDS-PAGE of the apoplast proteins accumulated in leaf of rice. A, B, C: non-acclimated in Hapcheonaengmi3, Milyang23, *O. rufipogon* at 25°C/20°C respectively; D, E, F: cold acclimated Hapcheonaengmi3, Milyang23, *O. rufipogon* at 10°C/8°C for 14days, respectively.

*O. rufipogon*과 화성벼 간 여교배 후대 BC1F3 개체들의 세포 밖 공간의 단백질이 무처리 조건에서 화성벼보다 많이 존재하였다. 또한 F3 개체들 간에도 다소 양적인 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 8). 합천앵미3호와 밀양23호의 여교배 후대인 BC1F3 개체간 비교에서도 양적인 차이를 보였는데, 저온 처리시 증가하는 단백질을 확인할 수 있었으며 9, 16, 21, 30, 73, 90 번 개체는 그 양이 다른 재배벼보다 많았다(Fig 9). 이 개체들은 아직 유전적으로 고정이 되지 않았으나 식물체 수준에서 저온신장성, 유묘내냉성, 유아내냉성, 저온발아성이 강한 것으로 확인되어 Apoplast 단백질과의 연관 가능성을 보여준다.

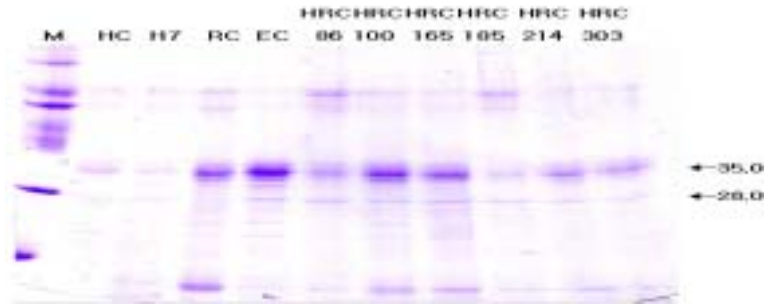


Figure 8. SDS-PAGE of apoplast protein from the three accessions and the backsross progenies from the cross between Hwaseongbyeo and *O. rufipogon*. M; Marker, HC: Hwaseongbyeo Control, H7: Hwaseongbyeo treated, RC: *O.rufipogon* Control, HRC: BC₁F₃ plants from the Hwaseongbyeo/ *O.rufipogon* cross (Control).

Cold acclimation treatment: 5day, 14hr light(10°C)/10hr dark(8°C).

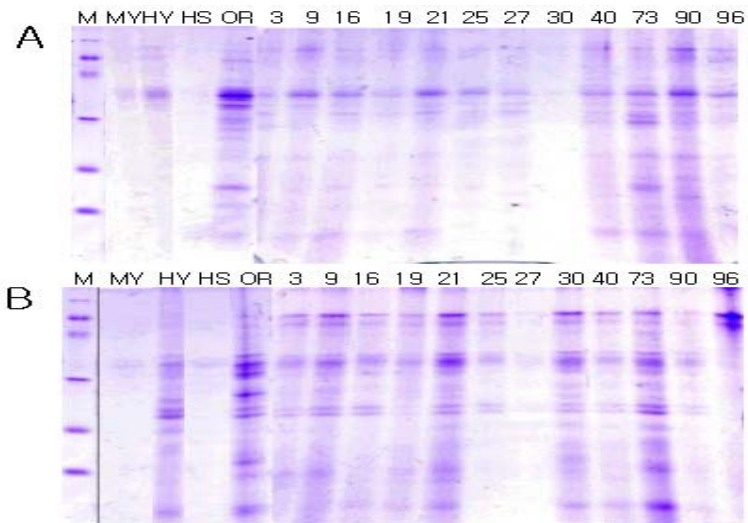


Fig. 9. SDS-PAGE of apoplast protein the four cultivars and 12 BC₁F₃ plants from the cross of Milyang23/Hapcheonaengmi3(numbered one) M: Marker; MY: Milyang23; HY: Hapcheonaengmi3; HS: Hwaseongbyeo; OR: *O. rufipogon*; A: control; B: cold acclimated for 5 days (14D/10N in 10°C/8°C)

나. 저온 유동성 유전자를 기초로 한 내냉성 마커 개발

1) BC1F3세대 분석

4 품종의 재배벼 (일품, 추청, 다산, 화성), *O. rufipogon* 그리고 화성벼/*O. rufipogon* 후대 BC1F3 개체, 합천앵미3호로부터 무처리 조건에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성 후 세포밖 공간 단백질인 CLP의 primer로 RT-PCR을 수행한 결과 모든 공시 계통에서 410bp의 band가 관찰되었고, 재배벼에서는 490bp 및 410bp 크기의 두 band가 관찰되었다 (Fig 10). *O. rufipogon*에서는 560bp 크기의 band가 특이적으로 나타났는데 이와 같은 결과는 화성벼/*O. rufipogon* 유래 BC1F3 개체에서도 동일하였으나 490bp 크기의 band가 재배벼보다 더 많이 발현되었다. 잡초성벼인 합천앵미3호도 두 개의 band가 나타났지만 재배벼와는 달리 490bp의 band가 강하게 발현되었다. 따라서 CLP primer를 이용 발현된 band의 크기에 근거하여 야생벼, 잡초성벼 그리고 재배벼의 구별할 수 있었다.

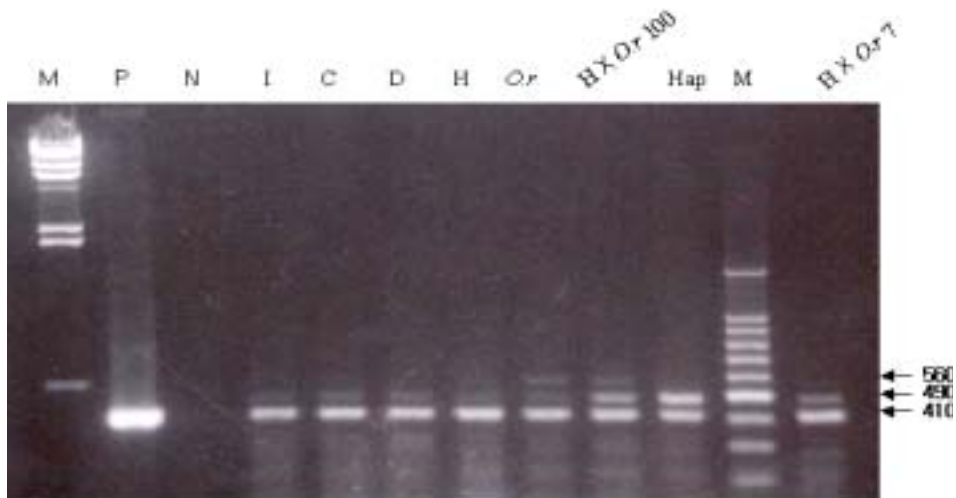


Figure 10. RT-PCR of CLP using total RNA from leaf of non-acclimated rice. M: marker, P: positive control (pGA748CLP), N: negative control(pGA748) I: Ilpumbyeo, C: Chuchungbyeo, D: Dasanbyeo, H: Hwaseongbyeo, *O.r*: *Oryza rufipogon*, Hap: Hapcheonaengmi 3, H_r X *O.r* : *O. rufipogon* X Hwaseong BC1F3 Plants

벼 저온저항성 관련유전자를 이용한 specific primer를 작성하기 위해 문헌을 통해 보고된 10개 저온 유도성 발현 벼 유전자의 sequence 정보를 확보하여 상응하는 primer를 제작하였다 (Tables 4, 5). 재배벼 5품종(일품, 추청, 다산, 화성, 밀양23호), 합천앵미3호, 그리고 밀양23호와 합천앵미3호 간 여교배후대 F3 및 F5 개체를 대상으로 10종의 유전자의 발현을 확인하기 위한 DD-RT PCR을 수행하여 저온직파적성과의 관련성을 찾고 이를 이용하여 여교배 후대들의 내냉성 정도를 비교하였다. 이들 primer와 담수직파적성 중 저온저항성과의 연관성을 확인하기 위하여 밀양23호와 합천앵미3호 간 교잡후대 여교배집단(BC1) 중 저온 발아성, 저온신장성, 유아내냉성, 유묘내냉성 등에서 전체적으로 강, 중, 약을 보이는 계통을 선정하였다. 재배벼(일품, 추청, 다산, 화성, 밀양23호), 합천앵미 3호를 재배하여 유식물 수준에서 저온처리시 발현하는 RNA를 추출하고 있으며 이들 RNA로부터 제작한 cDNA를 주형으로 위의 specific primer를 사용한 DD-RT PCR을 수행하였다.

BC₁F₃ 세대의 DD-RT PCR을 한 결과 저온 처리에 따라 저온 유도성 유전자의 발현이 증가하였다. 저온처리 없는 조건에서는 *O. rufipogon*과 합천앵미3호에서 유전자 발현 정도가 높았고 *O. rufipogon*과 합천앵미3호를 재배벼와 여교배한 후대에서 저온처리 시 재배벼보다 해당 유전자의 발현이 많은 개체를 확인하였다(Figs. 11, 12). 밀양23호와 합천앵미3호 여교배 후대집단에서 저온 처리시 여러 유전자의 발현 정도의 증가가 두드러진 개체 (7, 19, 25, 53, 71, 73, 85) 들은 저온신장성, 저온발아성, 유아내냉성, 유묘내냉성 등이 강한 계통에서 유래한 개체를 확인할 수 있었다 (Fig. 11). *O. rufipogon*과 화성벼의 여교배 후대집단에서 저온처리 시 해당유전자들의 발현이 두드러진 계통은 34, 72, 77번으로 이들은 내냉성이 강한 계통으로 예상되었다 (Fig. 12). 이 결과를 기초로 총 10개의 저온 유도성 유전자를 벼 저온담수 직파 적성 후보 유전자 분석 및 마커로 선발한 것 중에서 7개인 pBC121, 442, 601과 LIP5, 19 그리고 AOX1a, AOX1b 유전자의 primer는 벼 품종간이나 교잡후대에서 계통의 내냉성 정도를 측정할 수 있는 marker로 확인하였다. 그러나 분석한 여교잡 후대가 유전적으로 완전히 고정되지 않았으므로 여교잡 후대인 BC₁F₅ 세대의 분석을 재실시하였다.

Table 6. Rice genes reported to be induced by low temperature

Designation	Expression type	Acc. number	References
PPDK (pyruvate orthophosphate dikinase)	seedling at 4°C for 42 hrs, translational level	AJ004966	Plant J. (1998) 15(1): 89-98
Cytosolic glutathione reductase	seedling at 10°C for 3- 48 hrs, transcriptional level	AB009592	Plant Cell Physiol. 39(2): 1269-1280
ADH1 (alcohol dehydrogenase-1)	seedling at 10°C for 4 hr- 4 days, transcriptional level	AF133666	Plant Physiol. (1991) 95: 699-706
AOX1a AOX1b	seedling at 4°C for 1-7 days, transcriptional level	AB004864	Gene (1997) 203:121- 129
OsCDPK7	at 4°C for 8- 24 hrs, transcriptional level	AB42550	Plant J. (2000) 23(3): 319-327
LIP5 LIP9	callus at 5°C and 10°C for 0-30 hrs, transcrip. level	AB011368 D63955	Plant Cell Physiol. (1991) 32(8): 1285-1289
Os chilling tolerance related proteins (pBC121, pBC442, pBC601)	3-leaf stage, at 4°C for 2, 4, 7 days, transcrip. level	D08610 D10859 Z54153	Plant Physiol. (1992) 99: 1146-1150

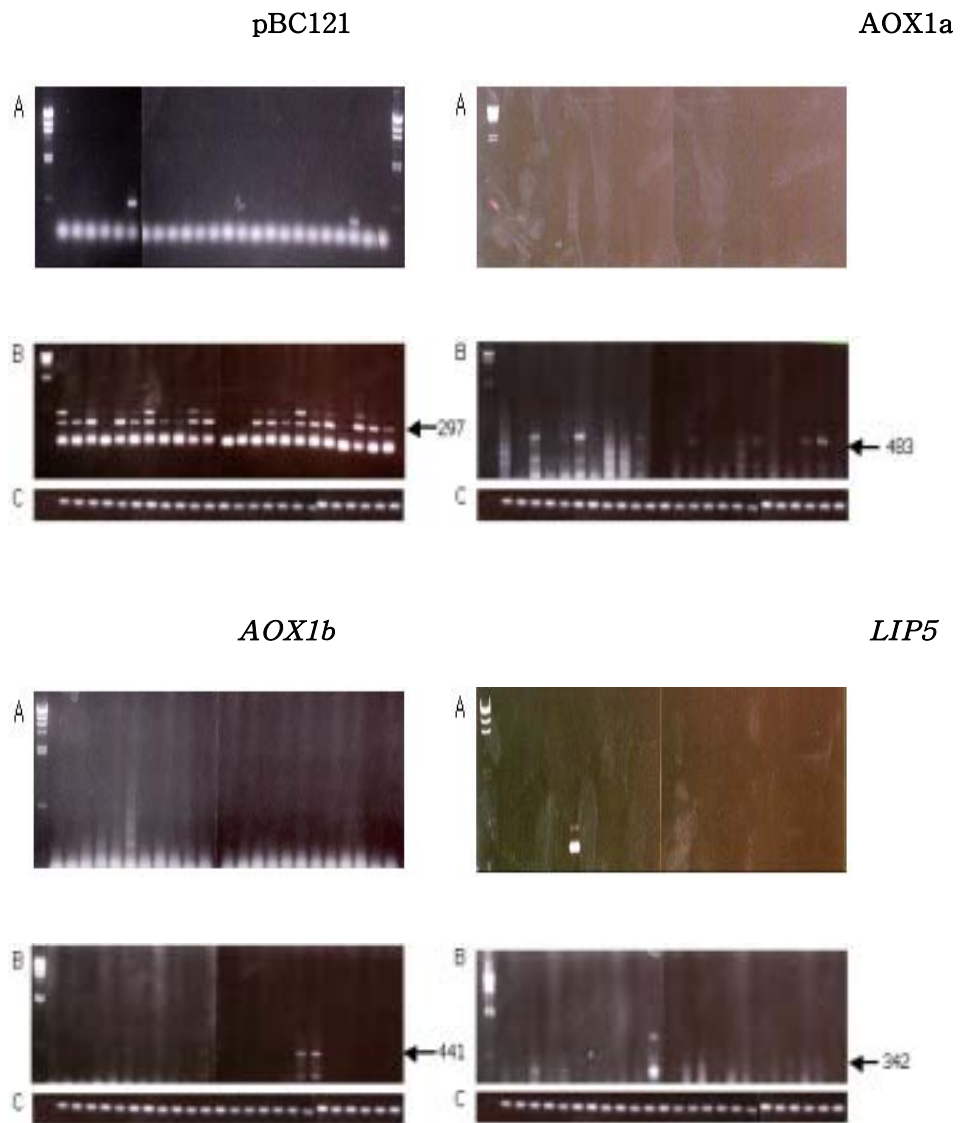


Fig 11. RT-PCR of the corresponding gene as a target using total RNA from leaf of non-acclimated rice. (M: Marker, I: Ipumbyeo, C: Chuchungbyeo, D: Dasanbyeo, H: Hwaseongbyeo, Y: Milyang 23, W: Hapcheonaengmi 3(A: non-treatment, B; 5 days cold acclimation, C: rice actin loading control). (Lanes from left to right: M-I-C-D-H-Y-W-3-7-16-19-21-25-27-30-40-41-47-53-71-73-82-85-98-M)

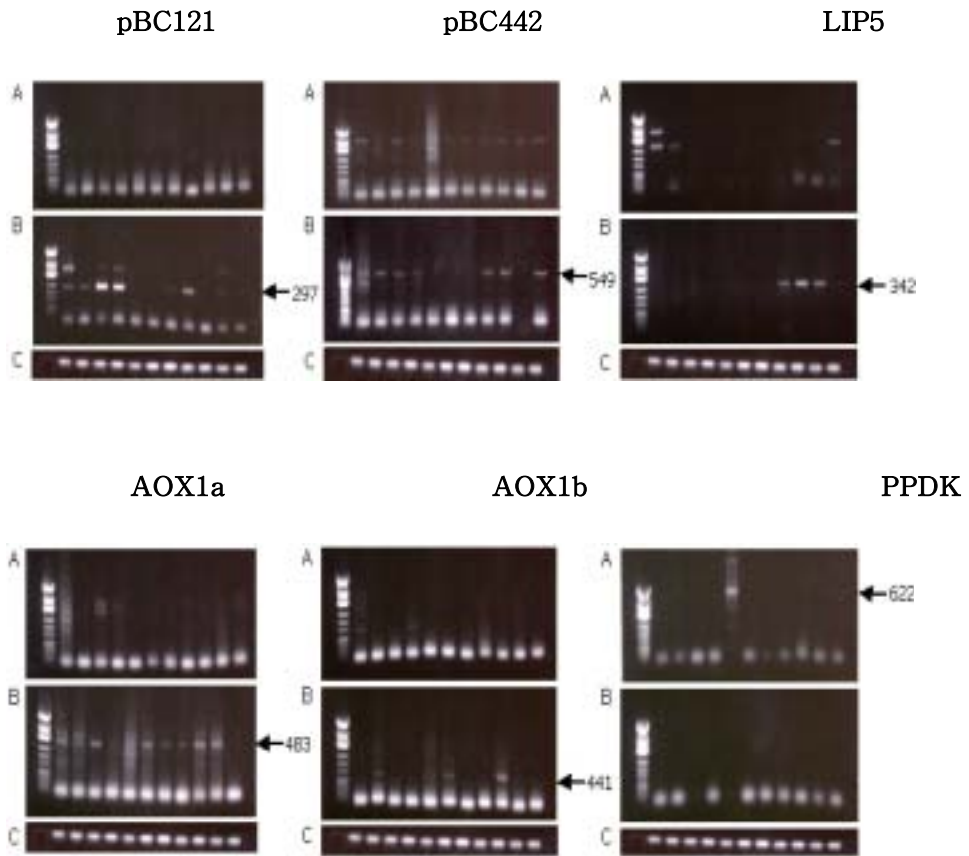
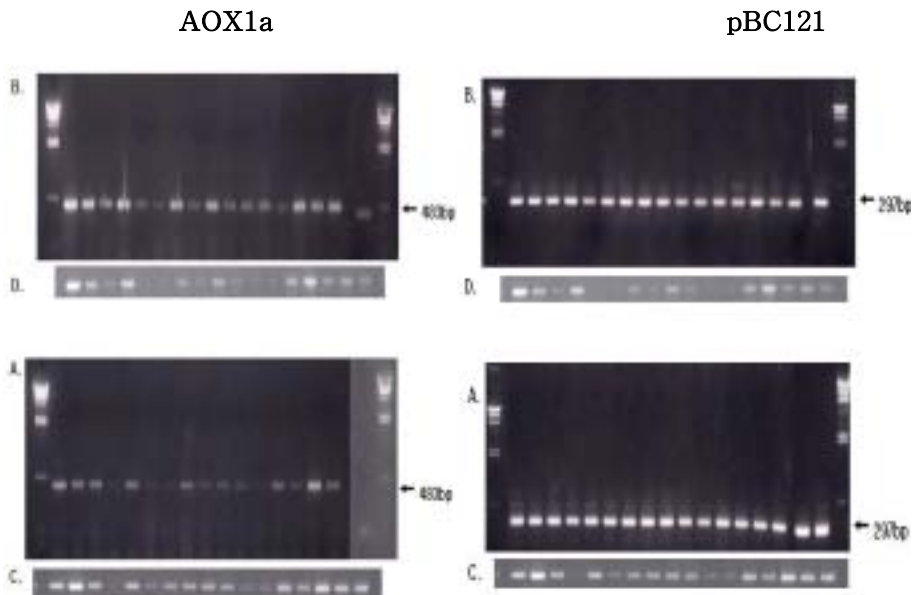


Fig 12. RT-PCR of the corresponding gene as a target using total RNA from leaf of the cold-acclimated rice.. (M: Marker, I: Ilpumbyeo, C: Chuchungbyeo, D: Dasanbyeo, H: Hwaseongbyeo, O; *O. rufipogon* (A; non-treatment, B; 5 days cold acclimation, C; rice actin loading control) (Lanes from left to right: M-I-Ch-D-H-O-2-9-34-72-77-90)

2) BC1F5 세대 분석

여교잡의 부모본이 되는 밀양23호와 합천앵미3호 그리고 그것들의 여교잡 5세대인 BC1F5를 가지고 DD-RT PCR의 재현성을 확인하였다 (Fig. 13). 실험결과 LIP19의 경우는 무처리외 모든 계통에서 유전자의 발현이 이뤄지지 않았으나 저온처리에 의해 밀양23호, 합천앵미3호, 82번계통에서 LIP19의 전사체가 나타남을

알 수 있었다. AOX1b의 경우에도 무처리의 계통에서는 전사체가 나타나지 않았으나 저온처리에 의해 19번, 25번, 27번, 30번, 53번, 85번에서 전사체가 나타남을 알 수 있었다. 또한 pBC121, AOX1a, LIP5의 경우는 밀양23호와 합천앵미3호 간의 저온처리에 따른 전사체의 상대적 증가 여부를 확인하기 위하여 scion image program을 이용하여 정량화 하였다 (Table 7). pBC121, AOX1a, LIP5의 경우 저온처리 시 무처리보다 상대적으로 내냉성이 약한 밀양에서 각각의 유전자들의 전사체가 감소하였으나, 내냉성이 강한 합천앵미3호의 경우는 저온처리에서 저온 연관 유전자들이 전사수준에서의 발현이 증가하였다(Figure 13). 그러므로 밀양 23호와 합천앵미3호의 여교잡후대인 BC1F3와 BC1F5의 저온 유도성유전자의 전사체가 증가하거나 유도된 이들 LIP19, pBC121, AOX1a, LIP5, AOX1b가 저온담수 직파 적성 내냉성 유전자 마커로 이용될 수 있음을 보여준다.



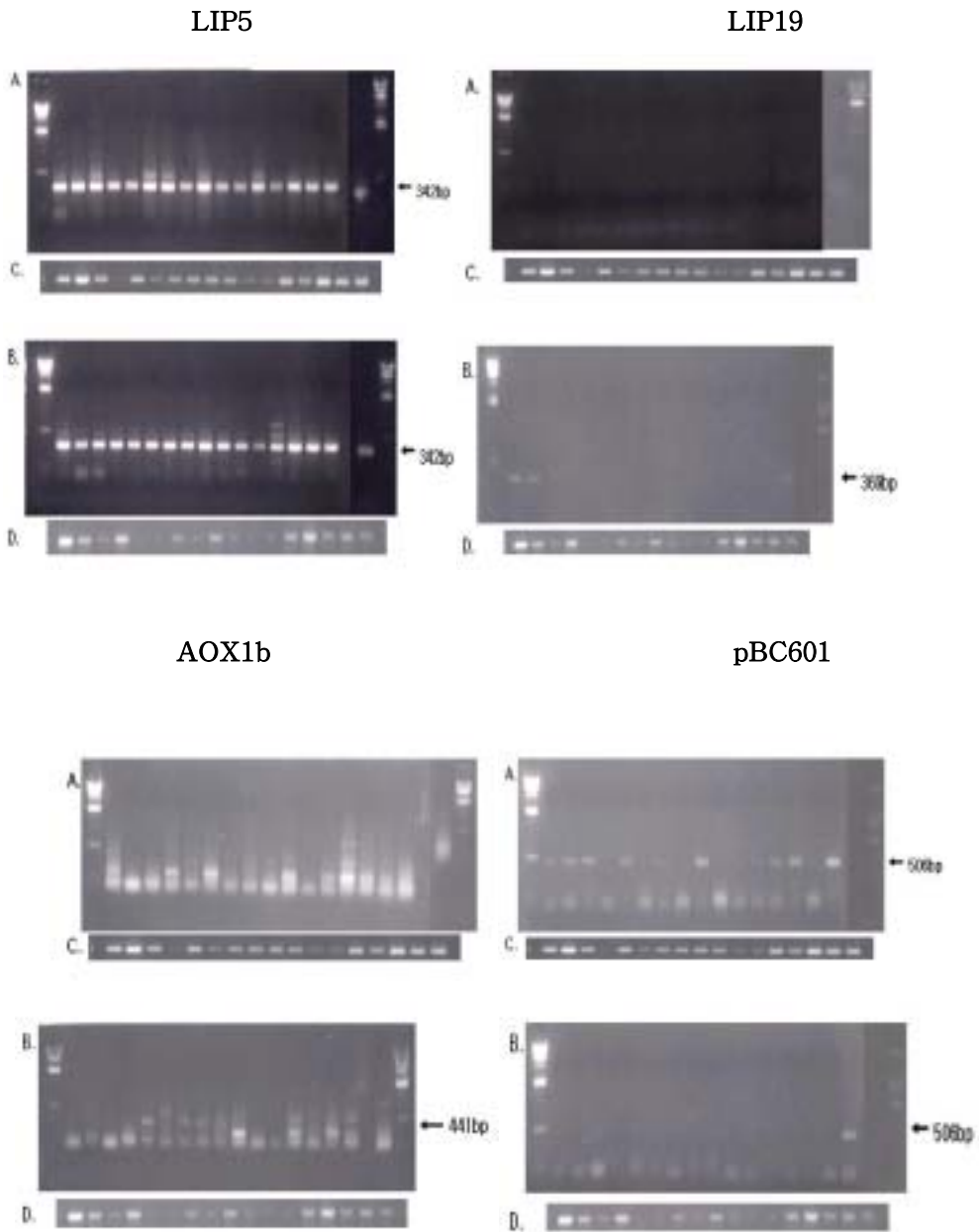


Fig 13. RT-PCR of the corresponding gene as a target using total RNA from leaf of rice. Primers were designed from the known gene sequences. (M: Marker, Y: Milyang 23, W: Hapcheonaengmi 3 (A; non-treatment, B; 5 days cold acclimation, C&D; rice actin loading control) (Lane from left to right : M-Y-W-3-16-19-21-25-27-30-40-41- 47-53-73-82-85-98-M)

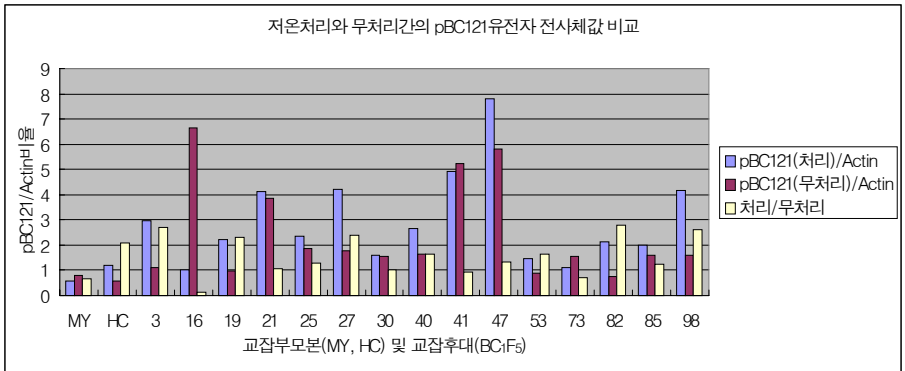
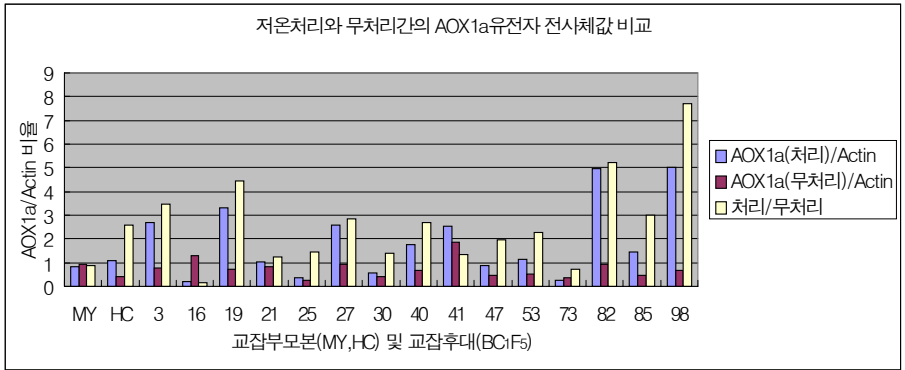
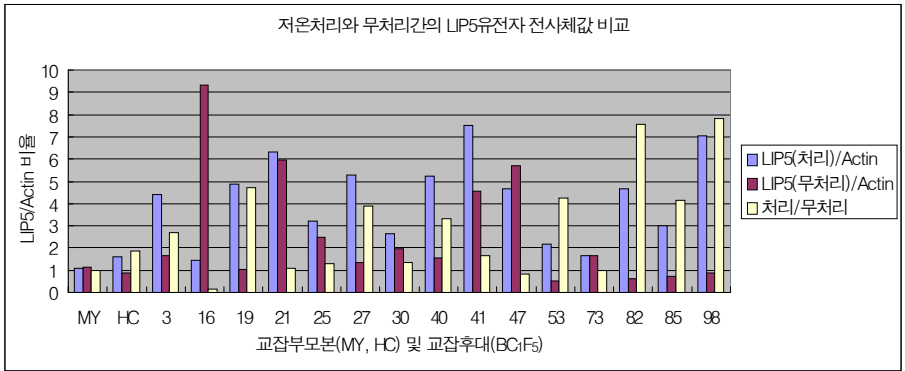


Fig 14. Quantitative analysis by Scion image of PCR product from Figure 13

3) 차등발현 마커 유전자 분석

BC₁F₃ 세대의 DD-RT PCR을 한 결과 저온 처리를 함에 따라 저온 유도성 유전자의 발현이 증가하는 것들의 specific band를 회수하여 이들 유전자가 Gene Bank를 통해 얻은 유전자와의 상동성을 보기위하여 T-vector cloning하여 염기서열을 분석하였다 (Fig. 15).

pBC121

```
GCGACATCTGGTGAAGGTTGTATGAGGGTCTTGACTGGCTTTCCAACAACATTGCCAGCAAGGCTTGAGCG
TTTTGGCAGCTGGATATCTGAACAATTCAGTAGTGCCGTTTACATATTATATAACATATACACCTACCAC
ACATAGTGTGGGTGCCCTGTGAAGGAAAAAACTCCTTTGTGGAGGCTAGTACCAGATTGTTCCTTTTTCGTGGG
CACTATAAGTGTCTTATATTATGTTGGTTTTACAACATTTACTGTGCTGTCCATATGTACCCGTTTGTC
```

————— pBC121
————— Cloning된 pBC121

Identities : 144/150 (96%) 38/38 (100%) 26/26 (100%)

LIP5

```
AGGCGTGGTGGAGAAGATCAAGGACAAGATCACCGGCGACCACGGCGACGGCGGCGAGCACAAGGAGAAGAAGGACA
AGAAGAAGAAGAAGGAGAAGAAGCACGGCGAGGAGGGCCACCACCACGACGGCCACAGCAGCAGCAGCAGCGACAGC
GACTGAGCCGCCGCCCCACACCGGCGCCGTGCGTGCATGCAGGTGATGCTGCAGATGATTGGAGGAGTTC
GTAGCAGGATTAATTAGTATCTGTGCAATACGTGATGCAGTATCTGTCTCATGCATGTATCTGTGCTTGATTGCAA
GAAAAAAAAAAGGCATGGTTTGCCTTTGTGATGT
```

————— LIP5
————— Cloning된 LIP5

Identities : 231/242 (95%) 61/61 (100%)

LIP19

```
CCACGCCGCTGACACGGGGGACACCCCTGTCAATCCCCCATTAAATAGATGGAGAATTATGGTGGTGGTCCCTCTCAT
GGGAGGACCTCGAATGACCCTTCCGATGGGACGGGTCATACCTACCTCCACTCCGCCGGAGGCAGATGCGACGTGG
GGGCGCAGCTGTCTGTCCAGTCAGCTGTGACCGGTGACAGGCCGGTCACAGACCGGTCATTCTGACCGCCGCGCAC
CAGTCGGGCACACCGCACGTCTTCTCCTACCGCATTGAATACGGCAGGGAGCAGTTGGGGCGCTGCAGTCATTAAG
GAGGTTGGGCTTCGGCCTTCTCCCCGCTTGTCCCCCGCCAGATGGCGGATAGGCGAGAG
```

LIP19

Cloning된 LIP19

Identities : 369/369 (100%)

AOX1a

```
GCGGAGAAGGAGGTGGTGTCAACAGCTACTGGGGCATCGAGCAGTCGAAGAAGCTGGTGCGGGAGGACGGCACGG
AGTGGAAGTGGTCTTGCTTTAGGCCATGGGAGACCTACCCGCGGACACTTCGATCGATCTGACGAAGCACCACGTG
CCCAAGACGCTGCTCGACAAGATCGCCTACTGGACCGTCAAGTCGCTGCGCTTCCCCACTGATATCTTCTTCCAGAG
GAGGTATGGCTGCCGCGCGATGATGCTGGAGACGGTGGCGCGGTGCCGGGGATGGTGGGCGGCATGCTGCTCCACC
TCCGGTCCCTCCGGCGCTTCGAGCAGAGCGGGCTGGATCCGCACGCTGCTGGAAGAGGCCGAGAACGAGCGCATG
CACCTGATGACCTTCATGGAGGTGGCGAACCCTAAAGTGGTACGAGCGCGCCCTCGTCATCACCGTCCAGGGCGTCTTC
TTCAACGCCTACTTCTCTGGGT
```

AOX1a

Cloning된 AOX1a

Identities : 483/483 (100%)

Fig. 15. RT-PCR의 차등발현을 통해 크로닝한 벼 내냉성 연관 유전자들의 sequence 분석

LIP5, LIP19, AOX1a의 염기배열은 target이었던 벼 저온 유도성 유전자와 일치함을 보였다. pBC121은 염기서열 비교를 통해 *Triticum aestivum* ARF mRNA for ADP-ribosylation factor (ARF), *Hordeum vulgare* subsp. vulgare mRNA for ADP-ribosylation factor 1-like protein 그리고 *Oryza sativa*

(japonica cultivar-group) mRNA for ADP-ribosylation factor임을 확인하였다. ARF는 Ras-like GTP-binding 단백질로 모든 진핵생물에서 높은 수준으로 보존되어 존재하여 ER로부터 Golgi체로 연결되어 단백질을 분비하는 membrane traffic과 세포내 골격을 결정하는 actin polymerization을 조절한다. 또한 GDP 또는 GTP 결합에 차등적으로 변하는 conformational switch로 작용하여 G protein과 연관된 수용체의 신호조절에 관여하는 것으로 알려졌다. 포유동물에서의 연구와는 별도로 식물에서는 벼, *Arabidopsis*, 감자, 옥수수, 당근, 밀 등에서 ARF 유전자가 분리되었다. 특별히 12°C에서 처리후 1시간 내에 벼의 뿌리에서 발현유도가 확인되어 뿌리 내냉성과 관련한 신호전달 기능에 참여하는 것으로 예상된다.

Table 7. Comparison of cold tolerance related traits with expression of the selected marker genes among BC1F6 lines

Line ¹	Trait ²			pBC121					LIP5			AOX1a			
	A	B	C	BC1F3	BC1F5			BC1F3	BC1F5			BC1F3	BC1F5		
					ratio ⁴	CA	NA		ratio	CA	NA		ratio	CA	NA
3	5	3	5.0	O ³	2.7	3.0	1.1	X	2.7	4.4	1.6	O	3.4	2.7	0.8
16	3	n/a	0.0	O	0.2	1.0	6.7	X	0.2	1.5	9.4	X	0.1	0.2	1.3
19	1	5	8.0	O	2.3	2.2	1.0	X	4.7	4.9	1.0	X	4.5	3.3	0.7
21	5	3	14.5	O	1.1	4.1	3.9	X	1.1	6.3	5.9	X	1.2	1.0	0.8
25	5	5	3.0	O	1.3	2.4	1.9	O	1.3	3.2	2.5	O	1.4	0.4	0.2
27	7	n/a	0.0	X	2.4	4.2	1.8	X	3.9	5.3	1.4	X	2.8	2.6	0.9
30	5	5	2.0	X	1.0	1.6	1.6	X	1.4	2.7	2.0	X	1.4	0.6	0.4
40	3	3	13.0	O	1.6	2.7	1.6	O	3.3	5.2	1.6	O	2.7	1.8	0.7
41	7	5	0.5	O	0.9	4.9	5.2	X	1.7	7.5	4.6	X	1.4	2.5	1.9
47	1	5	7.5	O	1.3	7.8	5.8	X	0.8	4.7	5.7	X	2.0	0.9	0.5
53	3	4	12.5	O	1.7	1.5	0.9	X	4.3	2.2	0.5	O	2.3	1.1	0.5
73	3	5	4.5	O	0.7	1.1	1.6	X	1.0	1.7	1.7	X	0.7	0.3	0.4

¹ The BC1F5 lines in bold (19, 41, 53) share a genomic PCR band specific for Hapcheonaengmi3. ² A: discoloration (1: strong, 3: good, 5: intermediate, 7: weak, 9: very weak), B: tolerance at seedling stage (1: tolerant, 5: susceptible), C: germinability at 10°C after one month in the 2cm deep in soil (No. of germinated seeds out of 30 seeds with two rep.) ³ O: PCR product observed, X: no PCR product observed ⁴ The ratio means rate of cold induction (CA/NA) of the corresponding gene.

pBC121 유전자(ARF)의 genomic PCR에서 함천앵미3호 특이적 band를 보이는 19, 41, 53번의 BC1F5 계통 중에서 19와 53번은 RT-PCR에 의한 발현 분석결과에서도 함천앵미3호와 일치한다. 또한 내냉성 관련 지표인 적고와 저온발아성에

서 강함을 보여준다. 단 유묘기 내냉성의 경우는 약한 것으로 나타나 ARF 유전자의 역할이 적고 및 저온발아성에 국한되는 것으로 여겨진다.

저온발아성, 유묘기내냉성 및 적고에서 모두 약함을 보여준 27과 30번 BC1F3 계통은 pBC121, Lip5, AOX1a 모두의 RT-PCR에서 발현되지 않은 것으로 나타났으나 BC1F5에서는 모두 일정수준 이상의 저온유도성 발현을 보였다. 이와는 반대로 BC1F3에서 발현되었으나 BC1F5에서 발현되지 않은 마커들도 일부 확인되었다. 이처럼 BC1F3와 BC1F5간의 보여진 불일치는 실험상의 오차보다는 여교잡 세대의 고정되어 가는 과정에서의 차이로 여겨진다.

4) ADP Ribosylation Factor (ARF) 유전자 구조 비교

Genomic DNA 상에서의 함천앵미3호와 밀양23호의 ARF 유전자의 크기의 차이를 분석하기 위해 상응 PCR 산물을 크로닝하여 sequencing하였다. 유전자 DB와의 비교를 통해 함천앵미의 ARF 유전자는 japonica type과 밀양23호는 indica type과 일치하는 것으로 확인되었다 (Figure 11). 구체적으로 ARF 유전자의 7번 intron 부분에서 13개의 염기가 함천앵미3호와 자포니카혀 벼에서 결실된 것으로 확인되었다. 이러한 intron에서의 차이는 유전자 발현에 직접적으로 영향을 미치는 부위가 아닌 것으로 알려져 있으므로 벼의 진화 과정 중의 차이 혹은 생태형간의 차이로 여겨진다. 단, intron 부위에서 enhancer 등으로 작용하는 부분이 발견된 예도 있으므로 위 차이로 인한 ARF 유전자 발현의 변화 가능성을 전적으로 배제할 수는 없다.

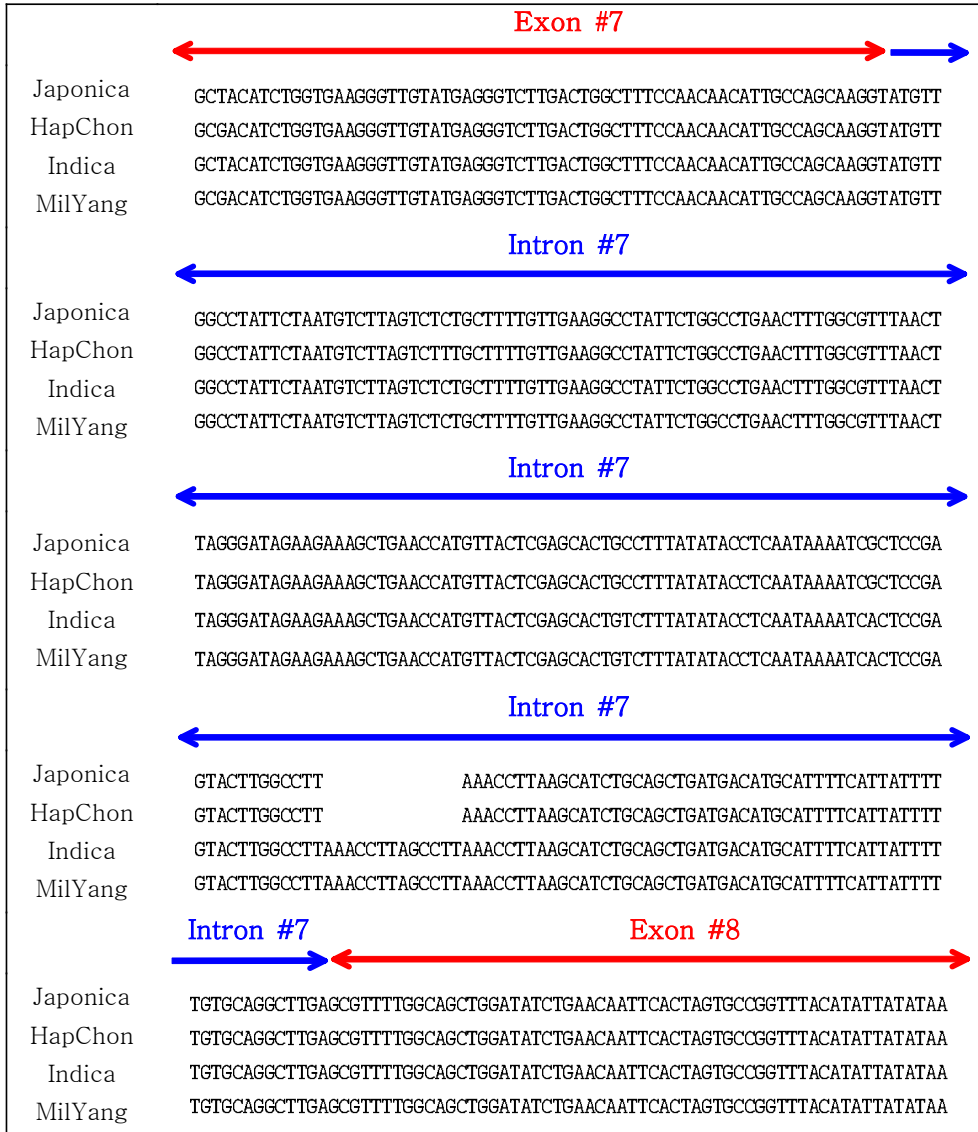


Fig. 16. Comparison of ARF genomic sequence showing difference between Hacheonaengmi3 and Milyang23.

제 3절 저온담수 직파적응 벼 선발 및 분자생물학적 이용 연구

1. 서 언

우리나라는 쌀의 수량성과 품질 수준에 비해 생산비가 높아 가격 경쟁력이 떨어지며 또 농촌 노동력의 감소로 벼 농사에서 획기적인 생산비 절감을 위해서는 육묘 및 이앙노력이 생략되며 논에 범씨를 직접뿌리는 직파재배로의 생산구조 전환이 요구되며 생산의 안전성을 높이기 위하여 직파 재배 적성 품종 개발이 절실한 실정이다.

벼 직파재배는 '90년대 기술보급 초기에 7,600ha이었던 면적이 '95년 전체 벼 재배면적의 11.1%인 117,600ha까지 급격히 증가했으나, '98년 63,900ha로 감소하면서 2000년대 초기까지 재배면적의 7~8%정도로 재배되고 있다(농촌진흥청, 2002). 직파재배면적의 감소 원인으로 연속적인 직파재배에 의한 잡초성 벼의 발생, 포장도복에 따른 품질의 저하 및 파종기의 저온에 의한 초기입모의 불안정 등이다 (농촌진흥청, 1997).

벼 종자의 출아 최적온도는 30~34℃, 최저온도는 10~13℃로 우리나라에서 벼 직파재배 파종시기의 기온이 13~15℃의 낮은 저온으로 경과되기 때문에 직파재배시 입모의 안정성을 높이기 위해서는 토중이나 저수온 조건에서 발아 및 출아가 양호한 품종이 요구된다 (농촌진흥청, 1999).

현재 직파재배품종으로 주안벼 등 12개 직파재배 품종이 개발 보급되고 있으나 이들은 대부분 이앙재배 조건에서 육성된 품종들로서 저온발아 및 출아 등 직파적성 관련 형질의 보완이 시급한 실정이다. 직파적성 품종의 육성을 위해서는 직파적성 형질의 효율적인 선발방법 개발 및 유전분석이 선행되어야 한다. 이를 위해서는 직파적성 유전자원의 탐색, 특성검정 체계와 방법을 확립하고, 아울러 직파적성 형질과 밀접 연관된 DNA marker 및 후보유전자 선발에 이용하는 분자유종 기술의 개발이 필요하다.

국내에서 직파적응성 품종 육성은 계통육종법을 이용하여 이루어지고 있으나, 저온발아나 출아성 등 직파적성 형질의 검정 방법 개발 및 적절한 육종방법 등 정보를 제공할 수 있는 유전분석이 시급한 실정이다. Shibata 등(1998)은 한국 잡초성 벼 376계통을 공시하여 저온발아성 등을 평가하여, 단립종이 일본 북부 지역의 직파품종 육성 교배모본으로 이용될 수 있다고 하였으며, 서 등(1999)은 저온발아가 양호한 잡초성벼 합천앵미3호와 밀양23호의 BC₁F₂에서 저온발아와 관련된 QTL을 보고하였다. 본 시험에서는 DNA maker를 이용한 직파적성관련 형질의 유전 분석 집단을 육성하고 검정방법을 개발하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시험재료

1). 직파적성 유전자원 탐색

직파적성 유전자원을 탐색하기 위하여 국내외에서 수집된 직파품종 27, 신초형 5, 통일형 8, 국내 주요 자포니카품종 12, 북한이나 동북지역에서 수집된 내냉성 품종 12 등 총 64개의 유전자원을 직파적성관련 특성 중에서 초기 입모에 영향을 미치는 저온조건에서 발아성, 토중출아성 및 담수출아성을 검정하였다. 또한 이들 유전자원에 대하여 AFLP를 통하여 유전적 유연관계를 분석하였다.

2) 직파적성관련 유전자 분석 및 mapping을 위한 계통육성

'01년 하계에 작물시험장 교배 초자실에서 저온발아성이 양호한 합천앵미3호를 편친으로 하고 통일형 밀양23호와 약배양이 잘 되고 재배환경에 적응이 높은 화성벼를 가지고 인공교배 하여 각각 30개의 교배립을 얻었다.

Double Haploid Line(DHL)을 육성하기 위하여 '02년 하계에 F₁ 화성벼/합천앵미3호 조합에서 2,800약, 밀양23호/합천앵미3호 조합에서 2,400약을 치상하여 약배양을 실시하였다. '02/'03년 동계온실에서 수경재배를 통하여 증식하고 '03년 하계에 포장에서 계통을 전개하여 DHL 집단육성을 하였다.

여교배 집단육성을 위하여 '02년 하계에 화성벼/합천앵미3호, 밀양23호/합천앵미3호 각각의 F₁ 식물체에 화성벼와 밀양23호를 여교배하였고, '02/'03년 동계에 BC₁F₁ 식물체를 양성을 하면서 일부개체는 화성벼와 밀양23호를 여교배하여 '03년 하계에 BC₁F₂ 계통전개와 BC₂F₁ 식물체 양성을 실시하여 여교배 집단을 육성하였다.

나. 재배법

직파적성 계통육성을 위하여 인공교배 및 F₁양성 등은 작물시험장 포장에서 파종은 4월25일 이앙은 5월25일에 실시하였으며 재식거리는 30×15cm이고 시비량은 질소-인산-가리를 11-4.5-5.7kg/10a 시용하였다. 기타 재배관리는 작물시험장 표준재배법에 준하여 실시하였다.

다. 직파적성 검정방법

저온 발아성 검정은 선종된 벼 100립을 샬레에 종이 필터를 깔아 치상하고 증류수를 넣었다. 생육상은 13℃로 유지하면서 수시로 수분을 공급하였다. 저온 발아성 조사는 유근이 돌출한 것을 기준으로 하여 2일 간격으로 3주간 실시하였고, 발아율은 치상한 벼알수에 대한 발아립수를 백분율로 환산하였다.

저온 토중출아성은 저온조건에서 초기 신장속도가 빠른 것을 선발하기 위한 방법으로 선종된 벼 100립를 가로 세로 5cm의 셀상자에 파종하여 기계이앙상토로 1cm를 복토하고 15℃의 생육상에서 100%의 수분을 유지하면서 지상으로 출아되는 정도를 조사하였다. 출아율 조사는 파종 후 2일 간격으로 3주간 실시하였으며, 출아율은 저온발아성과 같은 방법을 적용하였다.

벼 심수 발아 및 착근생리를 연구하기 위하여 인공기상실에서 평균온도를 15℃로하고 파종은 20×60×80cm 플라스틱 상자에 기계이앙상토를 10cm채우고 파종후 담수깊이 5cm로 하였으며 파종후 21일에 완전착근모, 불완전착근모, 든모, 치사모 등 담수출아성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 직파적성 유전자원 탐색

직파적성 품종의 구비조건은 직파 형태에 따라 다소 차이는 있으나 일반적인 특성으로 저온 발아성과 토중출아성, 담수출아성, 초기생육성, 내도복성, 잡초경합력 등이 있다. 우리나라의 벼 직파재배 파종시기는 평균이온이 15℃ 정도로 대체로 저온이 경과되기 때문에 직파재배시 입모안정을 높이기 위하여 저온조건에서 발아 및 출아가 양호한 품종이 요구된다(농진청, 1997). 파종방법에 따라 건답직파재배는 저온 발아율이나 토중출아율이 높으면 초기입모가 양호하나 담수직파재배에서 저온 발아율과 출아율이 높아도 뿌리의 발육상태에 따라 유모의 착근정도가 다르고 이는 담수직파에서 입모의 균일도에 영향이 클 것으로 판단된다.

1) 저온발아성 검정

합천앵미3호 등 64품종 및 계통의 유전자원에 대하여 13℃에서 발아특성을 검정한 결과 전체 64계통 중 13계통이 13℃의 저온에서 발아율이 90% 이상을 나타냈는데, 저온에서 발아율이 90%이상인 것은 안산벼, 간척벼, 조25호, 합천앵미3호, Pelde, IR69860-1-1-2 등으로 저온에 발아율이 양호하여 직파재배시 초기 입모 확보가 용이한 직파적성 품종육성을 위한 유전자원으로서의 유망해 보였다(Table 8.).

Table 8. 저온발아율에 따른 품종분포

발아율	50%이하	51~70%	71~90%	91%이상	계
품종수	2	4	45	13	64
(%)	(3.1)	(6.3)	(70.3)	(20.3)	(100)

나. 저온 출아성 검정

합천앵미3호 등 64품종 및 계통에 대하여 15℃에서 출아 특성을 검정한 결과 전체 64계통 중 5개의 유전자원이 출아율 51%이상이었다. 저온에서 출아율이 51%이상인 유전자원은 합천앵미3호, 안산벼, 화안벼, IR66161-121-4-4, Stejaree45 등 이었다. 이들 유전자원은 저온조건에서 출아성이 양호하여 직파 적성 중에서 출아성이 높은 유전자원으로의 유망해보였다(Table 9.).

Table 9. 공시품종의 저온출아율 분포

출아율	10%이하	11 ~ 20%	21 ~ 30 %	31 ~ 40 %	41 ~ 50 %	51%이상	계
품종수 (%)	5 (7.8)	6 (9.4)	12 (18.8)	24 (37.4)	12 (18.8)	5 (7.8)	64 (100)

다. 저온담수 출아성 검정

공시재료는 저온발아성과 토중출아성에서 공시된 유전자원과 저온담수출아성이 우수하다는(작물시험장, 2000) 잡초성벼 Arroz da Terra 등 68개의 유전자원에 대하여 담수조건과 20/10℃(주간/야간)의 저온에서 저온담수 출아성을 검정한 결과 잡초성벼인 WD-3, Arroz da Terra 등 2개의 유전자원이 출아율 81%이상으로 담수직파재배시 입모특성이 양호할 것으로 추정되며 합천앵미3호는 45%로 보통이었고, 수라벼, 주안벼, 밀양23호 등은 출아율이 낮고 치사모 발생이 많았다(Table 10).

Table 10. 저온담수 출아율에 따른 계통분포

출아율	20% 이하	21-40%	41-60%	61-80%	81% 이상	계
품종수 (%)	21 (29.7)	26 (40.6)	12 (18.8)	5 (7.8)	2 (3.1)	68 (100)

본 시험을 통하여 직파재배에서 초기입모에 영향을 미치는 저온에서 발아성, 토중출아성, 담수출아성 간의 상관분석에서 토중출아성과 담수출아성 간에는 서로 정의 상관이 인정되었으나 저온 발아성과 토중이나 담수출아성과는 상관이 인정되지 않았다(Table 11.). 따라서 벼 종자는 저온에서 발아, 출아 및 뿌리발

육에 따른 착근에 관련된 기작이 다른 것으로 판단되며 직파재배 적응 품종선발 시 저온출아성은 저온발아성과 별도로 검토되어야 할 것으로 판단된다.

Table 11. 직파적성 검정 방법간 상관

구 분	저온발아성	저온토중출아성	저온담수출아성
저온발아성	-	0.309	0.116
저온토중출아성	-	-	0.431**

Table 12. 저온조건에서 발아율, 토중출아율 및 담수출아율

번호	품 종 명	발아율	토중출아율	담수출아율
1	Asanbyeo	96	54	11.2
2	Juanbyeo	78	31	11.1
3	Nonganbyeo	88	42	11.2
4	Hwamyongbyeo	82	40	31.2
5	Kwanganbyeo	74	34	26.8
6	Junganbyeo	88	36	46.2
7	Hwaanbyeo	0	51	37.9
8	Donganbyeo	74	39	22.0
9	Daesanbyeo	62	32	28.3
10	Hoanbyeo	50	27	22.9
11	Nonghobyeo	90	34	22.9
12	S.466	98	35	40.0
13	S.467	96	35	39.8
14	S.475	86	36	35.5
15	Amaroo	78	44	47.9
16	Pelde	92	37	39.6
17	Langze	96	44	33.7
18	Jarrah	88	27	45.2
19	Mogkyo86-1894	62	39	46.2

Table 12. Continued

번호	품 중 명	밭아울	토중출아울	담수출아울
20	Hapgang 19	38	11	9.8
21	Hapgang 20	94	45	39.2
22	Hapgang 21	6	5	2.8
23	M-201	90	28	21.2
24	M-202	84	26	8.7
25	M-401	90	29	32.7
26	Calrose	90	46	46.2
27	Hapcheon 1	88	40	21.1
28	IR65600	94	16	3.7
29	IR71170	74	8	1.8
30	IR71179	84	13	3.8
31	IR66161	88	54	2.8
32	IR69860	100	44	6.0
33	S.472	88	46	-
34	Andabyeo	88	10	-
35	Namcheonbyeo	72	3	-
36	Aruumbyeo	50	9	-
37	Shindongjinbyeo	70	32	-
38	SR20267	86	26	-
39	Tongilbyeo	90	16	-
40	M.23	98	7	3.2
41	Hapcheonaengmi 3	100	80	45.3
42	Ilmibyeo	70	37	35.9
43	Ilpumbyeo	84	34	33.3
44	Dongjinbyeo	90	47	10.9
45	Hwayeongbyeo	74	32	23.3
46	Chucheonbyeo	84	25	31.2
47	Hwaseongbyeo	95	40	48.1
48	Daeanbyeo	96	39	22.9
49	Geunambyeo	86	42	6.9

Table 12. Continued.

번호	품종명	발아율	토중출아율	담수출아율
50	Odaebyeo	82	42	6.5
51	Gancheogbyeo	98	36	21.2
52	Hwanambyeo	82	39	10.1
53	Surabyeo	90	40	0.0
54	Pyeongyang12	88	36	31.2
55	Pyeongyang15	84	38	31.2
56	Pyeongyang 26	90	31	47.2
57	Pyeongyang 41	62	13	2.5
58	Hamnam 14	88	42	44.9
59	Dongnong 415	84	24	3.3
60	Dongnong 419	76	28	48.1
61	Dongnong 5083	90	30	2.5
62	Dongnong 93-16	84	23	37.9
63	Jo 25	98	44	35.2
64	Stejaree 45	96	86	53.2
65	샤레982114	-	-	85.7
66	샤레982107	-	-	54.2
67	샤레982108	-	-	56.2
68	샤레982115	-	-	65.2
69	샤레982336	-	-	67.2
70	샤레982212	-	-	66.2
71	WD-3	-	-	84.9
72	WD-4	-	-	51.2
73	Arroz da Terra	-	-	71.4
74	Guryeo1	-	-	65.2
75	Hyangmibyeo2	-	-	4.3

나. DNA 분자표지에 의한 유전적 유연관계

유전자원들간의 유전적 유연관계는 AFLP 마커(*Pst*I-AT+ *Mst*I I)을 가지고 실시하였으며 (Fig. 17) 유전적 유사도는 전체 마커들에 대한 공통된 밴드를 나타낸 마커들의 비율에 따라 구하고 이를 바탕으로 군집분석을 실시한 결과 나타난 유전자원들의 유연관계는 그림2와 같다. 크게 IRRI에서 도입된 초다수나 통일형 품종과 자포니카 품종 그룹으로 나뉘었고 자포니카 그룹중에서 국내 직파 재배품종, 일품벼 등 국내품종 및 미국이나 호주 등에서 재배되는 직파품종 그룹으로 70%정도에서 나뉘어졌다. 특히 합천앵미3호는 미국 등에서 재배되는 직파 재배품종과 유전적 유사도가 83%정도로 높은 경향이며, 이는 합천앵미3호가 직파재배지대에서 많이 발생하는 잡초성벼임을 간접적으로 추정할 수 있다. 본시험에서 모본으로 사용된 재료간의 유전적 유사도는 합천앵미3호와 화성벼는 73%, 합천앵미3호와 밀양23호는 44%정도였다.

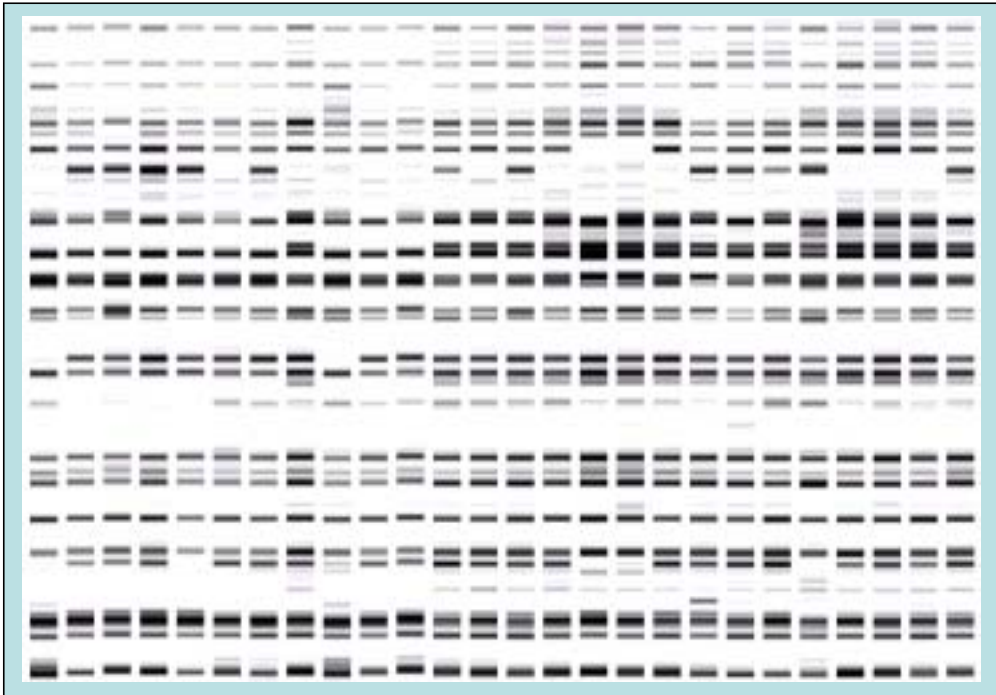


Fig 17. 64 계통의 AFLP 분석 프로파일 (프라이머 조합 : *Pst*I-AT+ *Mst*I I)

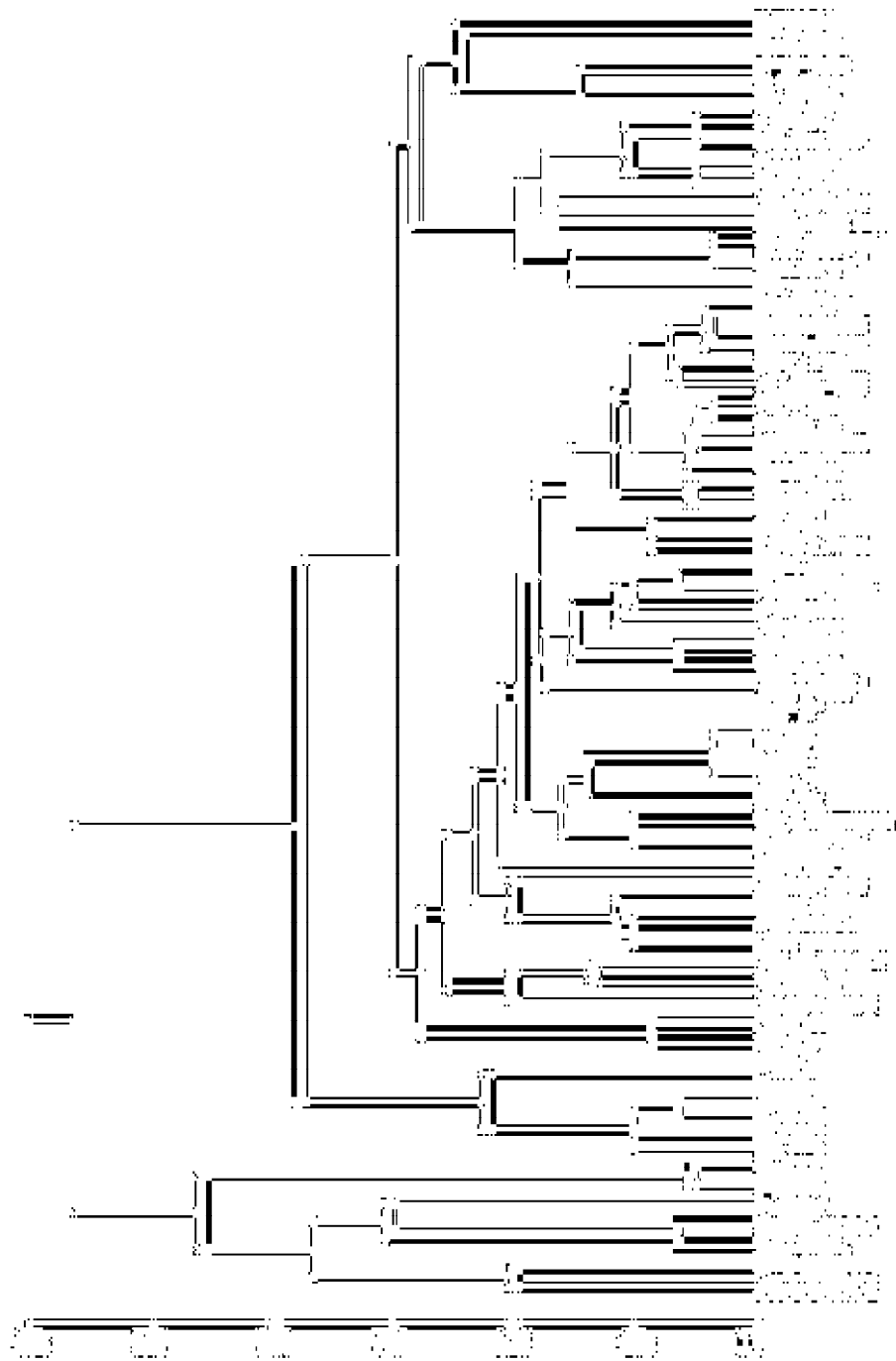


Fig 18. 유전자원들의 유전적 유사도에 따른 군집분석

다. 직파특성 유전자 mapping을 위한 집단육성 및 직파적성 계통육성

1) 인공교배

직파적성관련 유전자 연관 분자표지 개발용 교배집단을 육성하기 위하여 화성벼와 밀양23호에 저온발아성과 출아성이 양호한 합천앵미3호를 인공교배 하였으며, 직파적성 품종육성 위한 교배집단으로 수라벼, 주남벼와 잡초성벼인 Hao Zao 5, Wd-3 등을 교배하여 3조합 87립의 교배종자를 얻었다(Table 13).

Table 13. 직파적성 관여 유전자 연관 표지 개발용 집단(F₁) 육성 내역

교배번호	교배조합	교배립수	비 고
SR27439 SR27440	화성벼/합천앵미3호 밀양23호/합천앵미3호	30 30	분자표지 개발용 집단육성
SR27494 SR27517 SR27608	수라벼/Wd-3 Wd-3/주남벼 Hao Zao 5/주남벼	25 30 32	

2) 약배양

직파특성 유전자 분석 및 mapping을 위한 DHL 집단을 육성하기 위하여 약배양을 실시하였다. 합천앵미3호/화성벼 조합은 2,800약을 치상하여 223개의 식물체를 분화시켜 DHL 집단을 육성하였다. 합천앵미3호/밀양23호 조합은 2,400개의 약을 치상하였으나 캘러스형성율이 3.1%로 아주 낮았으며, 식물체 분화도 분화율이 0.3%로 거의 되지 않아 DHL 집단육성이 곤란했다(Table 14). 자포니카형보다 인디카나 통일형의 품종에서 약배양 효율이 낮다는 최 등(1986) 보고와 같이 본 시험에서도 통일형인 밀양23호 조합의 약배양 효율이 낮았다. 그 외에 직파적응성 품종육성을 위하여 저온담수착근이 양호한 Hao Zao 5, Wd-3에 주남벼와 수라벼를 인공교배하여 약배양을 실시하여 조합에 따라 98 ~ 289개의 식물체를 얻었다.

Table 14. 육성계통의 조합별 약배양 반응

교배번호	교배조합	치상약수	캘러스 형성율	식물체 분화수	식물체 분화율
SR27439	화성벼/합천앵미3호	2800	11.7	223	8.0
SR27440	밀양23호/합천앵미3호	2400	3.1	7	0.3
SR27494	수라벼/Wd-3	1200	21.3	98	8.2
SR27517	Wd-3/주남벼	2200	8.1	132	6.0
SR27608	Hao Zao 5/주남벼	2200	24.2	289	13.1

약배양을 통한 직파적용 계통육성을 위하여 SR27440(밀양23호/합천앵미3호) 등 4조합 526계통을 공시하여 4조합 85개체를 포장 선발하였다(Table 15). 포장에서 계통선발은 조합에 따라 교배 모본인 밀양23호, 주남벼, 수라벼의 초형을 기준으로 해서 실시하였으며, 실내검정으로 13℃ 생육상에서 저온발아율을 검정하여 저온발아성이 양호한 SR27608(Hao Zao 5/주남벼) 등 2조합에서 17개체를 선발하였다. 양친중 편친이 잡초성벼임을 감안하여 초형이 기존의 재배벼와 비슷하며 저온발아가 양호하고 현미외관까지 우수한 4계통을 SR27494(수라벼/Wd-3) 및 SR27608(Hao Zao 5/주남벼) 조합에서 선발하였다. 이들 계통에 대하여 수량성이나 병해충저항성 등을 검정하여 우량계통은 직파적용품종이나 중간모본으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 15. 육성계통의 조합별 선발내역

교배조합	교배조합	공시계통	선발계통		
			포장	저온발아	미질검정
SR27440	밀양23호/합천앵미3호	7	7	0	0
SR27494	수라벼/Wd-3	132	27	0	0
SR27517	수라벼/Wd-3	98	21	4	2
SR27608	Hao Zao 5/주남벼	289	30	13	2
계		526	85	17	4

약배양 계통육성 포장에서 우수한 초형의 계통을 선발하여 작물학적특성을 조사하였다(Table 16). 출수일수는 SR27440(밀양23호/합천앵미3호) 등 3조합이 중생이고 SR27517(Wd-3/주남벼)은 중만생이었다. 간장은 선발개체별 차이가

있으나 SR27440(밀양23호/합천앵미3호)은 단간이고 SR27494(수라벼/Wd-3)와 SR27517 (Wd-3/주남벼)은 장간 개체가 많았는데 이는 양친중 Wd-3이 장간으로 후대에도 영향을 미친 것으로 판단된다. 수장은 SR27440 와 SR27608 조합이서 장수 개체가 많았으며, 주당수수는 SR27494조합이 19.6개로 가장 많았고, 그 외의 조합은 비슷하였다. 선발계통의 저온발아성은 양친에 비하여 양호한 계통은 많지 않았으나 SR27517 조합이 82.3%으로 양호한 편이었다.

Table 16. 선발계통의 평균적 작물학적 특성

교배번호	교배조합	출수일수 (일)	간 장 (cm)	수 장 (cm)	주당수수 (개)	저온발아율 (%)
SR27440	밀양23호/합천앵미3호	109±4.7	66.7±5.	25.3±2	11.4±2.	63.9±7.0
SR27494			8	.8	4	
SR27517	수라벼/Wd-3	111±6.9	95.0±9.	20.5±2	19.6±3.	73.5±9.2
SR27608			1	.0	7	
	Wd-3/주남벼	121±5.6	82.7±13	21.9±2	12.9±2.	82.3±11.3
	Hao Zao 5/주남벼	114±1.8	.1	.0	8	76.2±13.4
			72.9±8.	24.1±1	13.5±3.	
			9	.3	6	

4. 여교잡 육종법에 의한 직파계통 육성

가. 여교배 계통육성

고세대 여교잡육종법을 이용한 직파적성 계통육성 및 분자표지개발용 집단 육성을 위하여 저온발아성이 양호한 합천앵미3호에 밀양23호와 화성벼가 교배된 F₁에 화성벼와 밀양23호를 여교배하여 각각 60개의 교배립을 획득하였으며, 이들 조합은 세대를 진전시켜 분자표지 개발집단으로 육성하였다(Table 17). 합천앵미3호에 화성벼와 밀양23호가 여교배된 교배립중 조합당 20립씩 저온발아성을 검정하여 저온발아성이 우수한 개체를 치상하고 육묘하여 초형이 우수한 BC₁F₁ 개체에 화성벼와 밀양23호를 인공교배하여 계통을 육성하였다.

Table 17. 인공교배 내역

교배조합	교배립수	비 고
화성벼/합천앵미3호//화성벼	60	BC ₁ F ₁
밀양23호/합천앵미3호//밀양23호	60	"

화성벼/합천앵미3호//2*화성벼	50	BC ₂ F ₁
밀양23호/합천앵미3호//2*밀양23호	40	"

합천앵미3호가 교배된 조합에 화성벼와 밀양23호를 여교배한 후 저온 발아성이 우수한 개체를 선발하고자, 각각의 조합당 20립을 치상하여 저온 발아성을 검정한 결과 화성벼 조합은 95%, 밀양23호 조합은 60%정도 였으며, 저온출아성 검정에서 화성벼 조합은 50%, 밀양23호 조합은 15%정도였다. 각각의 조합에서 저온출아성이 우수한 개체를 화성벼 조합에서는 10개체, 밀양23호는 3개체를 선발하였다 (Table 18). Briggs & Knowles(1969)는 우성유전자에 의해 지배되는 내병성은 저항성을 검정하여 연속 5회 여교잡 하는 방법을 제안하였다. 따라서 본 시험에서도 초기 입모가 양호한 직파적성 품종이나 중간 모본을 육성하기 위하여 여교잡 후대에 대한 저온 발아성이나 출아성 등 특성검정, 개발된 분자표지 이용 등 다양한 선발방법과 여교잡을 병행해야 할 것으로 판단된다.

Table 18. 여교배조합의 저온발아 및 출아성

구 분	저온발아율 (%)	저온출아율 (%)	선발개체 (선발/공시)
화성벼/합천앵미3호//화성벼	95	50	10/20
밀양23호/합천앵미3호//밀양23호	60	15	3/20
합천앵미3호	100	80	CK
화성벼	100	40	CK
밀양23호	90	7	CK

나. 직파적성 우량계통 선발

QTL 분석 및 유망계통 선발을 위해 밀양23호**2/합천앵미3호 유래 BC₁F₆ 80 계통들의 저온발아성과 출아성을 검정하였다 (Table 19). 공시된 계통들은 큰 변이를 보였으며, 저온발아율 평균이 52.2%이고, 저온출아율 평균은 24.5%였다. 신 등 (1998)은 벼 여교배 세대에서 몇가지 작물학적 형질의 회복정도는 회복친의 근연정도나 작물학적 특성에 따라 BC₁부터 BC₄까지 다르다고 하였다. 그러나 본 시험에서는 여교배 1회 후 계통을 고정시켜 저온발아나 출아성을 검정하여 선발된 계통들로 직파적성 품종이 구비해야 할 내도복성, 병충해 저항성 및 품질관련 특성 등을 조사하여 우량계통은 직파적성품종이나 중간모본으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 19. 여교잡에 의해 육성된 주요 우량계통

계 통 명	저온출아율 (%)	저온발아율 (%)
CR202 J	58	83
CR222	50	83
CR224	55	83
CR236	53	88
CR241	48	93
CR244	45	83
CR246	78	98
CR249	43	83
CR250	45	83
CR257	48	95
CR267	48	88
CR274	60	100
CR286	45	90
평균±SD	24.5±18.5	52.2±32.6
밀양23호	7	95
화성벼	40	98
합천앵미3호	80	100

J : BC₁F₆ (밀양23호**2/합천앵미3호)

4. 적요

본 연구는 국내외 주요 유전자원의 직파관련 특성 중 저온발아성과 출아성 등을 검정하고, 직파적성 연관 분자표지 개발 및 고밀도 유전자지도 작성을 위한 집단을 육성하며, 여교잡 육종법을 활용 저온발아성과 출아성 관련 유용 대립유전자를 집적함으로써 직파적성 계통을 육성하고자 실시하였다.

선정된 64개의 유전자원을 공시하여 직파 관련 특성 중 초기 입모에 영향을 미치는 저온발아성, 출아성 및 담수착근성이 우수한 유전자원으로 합천앵미 3호, Arroz da Terra 등을 선발하였다. 또한 공시된 64 계통의 유전적 다양성을 검토하기 위해 AFLP 분석을 실시한 결과, 국내 직파품종과 미국이나 호주에서 재배되는 직파품종은 70%정도에서 나누어지며 저온발아성이나 출아성이 양호한 합천앵미3호는 미국이나 호주에서 재배되는 직파품종과 유전적 유사도는 83%정도였다. 직파적성 유전자 연관 분자표지 개발을 위해 여교배를 통하여 SR27439 등 2집단을 육성하였고, 약배양을 통해 Double Haploid 집단으로 SR27439 (화

성벼/합천앵미3) 등을 육성하였다. 약배양을 실시하여 SR27517 등 4조합 526 계통을 육성 공시하여 포장에서 85계통을, 저온발아검정을 실시하여 17계통을 선발하였으며, 실내 미질 검정을 통하여 4계통을 각각 선발하였다.

밀양23호**2/합천앵미3호 유래 BC1F6 80 계통을 대상으로 저온발아성 및 출아성을 검정하였으며 QTL 분석 결과 저온발아성을 증진시키는 합천앵미3호의 대립유전자가 11번 염색체에서 탐색되었다. 저온발아성과 연관된 이 염색체 지역에서 합천앵미3호의 염색체 단편을 가지고 있는 BC1F6 계통을 선정하여 밀양23호로 2회 여교배를 실시하여 식물체를 확보하였다. 이 계통은 밀양23호와 근동질 유전자계통으로 반복친인 밀양23호와 주요 농업적 주요 형질 및 저온발아성 등의 특성을 비교 실험할 계획이다.

제 4 절 벼 저온 답수 직파적성 유전자의 분리

1. 서 론

박테리아 인공염색체 (bacterial artificial chromosome, BAC)가 1992 년도에 소개된 이래 (Shizuya 등 1992), 식물에서는 최초로 1994년에 본 연구자 등에 의하여 수수의 BAC library가 개발되었다 (Woo 등, 1994). 이로부터 BAC 은 특히 식량작물에서 복잡한 게놈의 분석연구와 농업적으로 중요한 유전자의 클로닝에 획기적이고도 중요한 도구로 이용되고 있다. 재배종이나 현재 이용되는 육종 재료에는 부재하는 직파적성 관련 유용유전형질들을 가진 잡초성벼(합천앵미3)에서 고품질의 BAC library를 제작하면, 정밀 유전자 연관 지도상의 직파적성 형질과 밀접하게 연관된 분자표지와 후보 유전자를 이용 BAC 클론들을 선발하여 물리적 유전자 지도를 작성하고, 향후 저온발아성을 결정하는 단일 또는 QTL 유전자들을 포함하는 BAC을 선발하여 유전자 분리를 가능케 하는데 기초 자료를 제공하며, 선발된 BAC의 염기서열정보를 활용하여 목표유전자에 초밀접하며 이용이 편리한 다양한 분자표지를 개발하는데 활용 할 수 있다. 본 연구에서는 합천앵미3에서 전체 게놈을 고루 포함할 수 있도록 벼의 전체 유전체를 5 배 이상 포함하고 평균 절편크기가 100-150 kb 정도 되는 고품질의 BAC library 제작을 목표로 하였으나, 연구 결과 평균 156.6 kb의 절편이 얻어졌으며, BAC library의 크기가 전체 벼 게놈의 13.4배인 36,864개의 clone을 획득하였다. 이 클론들은 Q-bot을 이용하여 96개의 384-well microtiter plate에 ordering 되었으며 2장의 membrane filter에 고정되었다. 이와 같은 BAC library를 검정하면 99% 이상의 확률로 원하는 유전자나 염기서열을 가진 BAC 클론을 획득할 수 있다.

Overgo Marker (<http://genome.wustl.edu/gsc/overgo/overgo.htm>)를 이용하면 8 bp의 염기서열이 중복되는 1쌍의 Overgo primer를 쉽게 설계할 수 있는데, 한번에 서로 다른 40쌍의 Overgo primer를 고밀도 BAC 필터 검정에 함께 이용할 수 있으므로, BAC 클론들로부터 단시일 내에 목표 유전자까지의 유전적인 거리를 물리적 거리 (bp 단위)로 전환하고, 서로 겹치는 BAC 클론들로 contig를 만들어 목표유전자의 물리적 유전자지도를 작성하기 위하여서는 Overgo(J.D. McPherson, Washington Univ. Genome Sequencing Center, St. Louis, Missouri)를

BAC library의 검정에 이용하는 것이 효과적이다. 제 1 세부과제에서 개발된 저온 발아성 등 직파적성 관련 유전자와 연관된 분자표지의 상대적 위치를 Nipponbare 고밀도 유전자 지도에서 확인하여 벼 염색체 11번 상의 저온 발아성 유전자위에 근접한 RFLP marker에서 제조된 5개의 overgo primers (C1350, S2712, G320, C794, R682)를 이용하여, 2장의 membrane filter에 고정되어 있는 36,864개의 clone을 검정하였다. 그 결과, 모든 overgo primers로부터 3개에서 16개의 BAC 클론을 선발 할 수 있었고, 제작된 BAC library의 깊이가 전체 벼 게놈의 평균 10X의 genome coverage를 나타내는 계산 결과를 이로부터 얻을 수 있었으며, 추가로 벼 염색체 5번 상의 저온발아성 관련 유전자에 근접한 RFLP marker에서 제조된 2개의 overgo primers (C43, C1991)를 이용하여 검정한 결과 각각 9개와 37개의 클론들을 선발 할 수 있었다.

HICF(high-information-content fingerprinting)시스템은 Type IIS 제한효소와 Type II 제한효소를 동시에 이용하여 BAC 클론을 절단하여 평균 500 bp 이하의 절편들을 만들고, Type IIS 제한효소에 의하여 만들어진 절편의 5' overhang을 형광 dideoxy terminator로 염기서열 분석원리를 이용하여 labeling 한 후, 자동염기서열 분석기와 size standard를 이용하여 절편의 크기와 말단염기서열 정보를 동시에 획득하는 효과적인 fingerprinting 시스템이다 (Ding등, 2001). 직파적성 관련 유전자와 연관된 overgo primers를 탐침으로 합천앵미3 BAC library를 검정하여 얻은 BAC 클론을 HICF 방법과 ABI3700을 이용하여 fingerprinting 하였으며, 획득된 절편들은 FPC program을 이용하여 10개의 contig로 연결시키고 물리적 유전자 지도를 작성하였다.

2. 재료 및 방법

가. 합천앵미3호 종자의 확보 및 재배

농촌진흥청 작물시험장으로부터 분양 받은 저온발아성의 형질을 가진 합천앵미3 (*Oryza sativa* cv. Hapcheon)으로부터 BAC library 제조에 사용할 거대 DNA 분리용 유묘를 다음과 같이 재배하였다.

- 1) 합천앵미3호 종자를 증류수에 담그어 상온에서 2-3일 발아시킨 후 유묘상자에 파종하였다.
- 2) 온실에서 4-6주 키운 후 잎을 수확하였다.

나. 거대 절편 DNA 분리법

- 1) 4-6주된 합천앵미3 (*Oryza sativa* ssp. japonica cv. Hapcheon)의 어린 잎 50-60g 을 막자사발에 넣고 액체 질소와 함께 분쇄하였다.
- 2) 분쇄한 시료는 미리 ice에 보관해 놓은 500ml의 NIB (Nucleic Isolation Buffer: 10mM Tris, 10mM EDTA, 100mM KCl, 500mM Sucrose, 4mM Spermidine, 1mM Spermine, 0.1% beta-mercaptoethanol)가 담긴 1L 플라스크에 넣고 (10ml NIB/1g tissue), ice에 10-12분간 두고. 이 때 2분마다 조심스럽게 흔들어 주었다.
- 3) 2겹의 cheesecloth와 2겹의 miracloth를 겹쳐 놓고 NIB와 분쇄한 시료의 혼합액을 여과시킨 후 1/20 volume의 lysis buffer (10% Triton X in NIB)를 가한 후 ice에 10분간 둔 후 2분 마다 조심스럽게 흔들어 주었다.
- 4) 위의 혼합액을 10개의 50ml falcon tube에 나누어 담고 table top centrifuge에서 3,200rpm으로 12분간 세포핵을 원심분리하였다.
- 5) 40ml 정도의 상층액을 조심스럽게 따라내고 paintbrush로 pellet을 조심스럽게 녹였다.
- 6) 여기에 새 NIB를 50ml 까지 가한 후 다시 원심분리하였다. 4)-6)의 단계를 2회 반복하였다.
- 7) 마지막 원심분리 후 1-2ml의 NIB만 남기고 상층액을 따라낸 후 세포핵 pellet을 resuspend하고 45°C에서 7분간 방치하였다.
- 8) 세포핵과 동량의 45°C의 1.5% low melting agarose를 혼합하고 재빨리 멸균한 plug mold에 부었다.
- 9) 상온에서 2-3시간 굳힌 후 plug를 mold로 부터 분리시키고 EPS buffer (0.5M EDTA pH9.2, 1.0% sarcosyl)가 담긴 50ml falcon tube에 담았다.
- 10) 1ml EPS 당 1mg의 proteinase K를 넣고 50°C oven에서 18-24시간 동안 rotation시켰다.
- 11) TE buffer (Trisma base 121.1g, 1M HCl 42ml, ddH₂O 800ml: pH8.0

with HCl)나 ddH₂O로 plug를 4차례 washing하고 마지막으로 TE buffer에 담그어 4°C에서 보관하였다.

다. pCUGI1 벡터의 순수분리, 완전절단 및 dephosphorylation

CUGI (Clemson University Genomics Institute)에서 분양받은 pCUGI1는 pBeloBAC11 (Figure 1)에서 LacZ site가 변형되어 형질전환이 되지 않았을 경우 blue colony의 색이 훨씬 진하게 나타나 쉽게 recombinant인 white colony와 구분되는 장점이 있다.

- 1) pCUGI1을 LB (Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 10g Agarose 15g/L)/ Chloramphenicol (12.5mg/ml)에서 16-18시간 배양하였다.
- 2) DNA midiprep kit (Qiagen)를 이용하여 DNA를 분리하였다.
- 3) 37°C에서 2시간 동안 HindIII로 절단하였다 (7.5ul 10X enzyme reaction buffer, 1.5ul BSA, 5.0ul HindIII (10U/ul), 50-61ul vector (7.5-10ug), ddH₂O/75ul reaction mixture).
- 4) 65°C에서 20분간 heat inactivation한 후 재빨리 spin down하였다.
- 5) 30°C에서 1시간 50분간 dephosphorylation시켰다 (75ul restriction reaction, 5.0ul HK phosphatase (Epicentre), 5.0ul CaCl (0.1M), 2.5ul reaction buffer, 12.5ul ddH₂O).
- 6) 65°C에서 20분간 heat inactivation한 후 재빨리 spin down하였다.
- 7) Phenol/chloroform extraction을 한 후 ethanol precipitation을 거쳐 TE에 녹였다.
- 8) 16°C에서 overnight으로 self ligation을 시켰다 (100ul dephosphorylation reaction, 12.5ul ligase buffer (Promega), 3.0ul T4 ligase (9units, Promega), 9.5ul ddH₂O).
- 9) 65°C에서 20분간 heat inactivation한 후 재빨리 spin down하였다.
- 10) Ligation reaction을 13ul의 loading dye를 가한 후 1X TAE (Tris base 54g, Boric acid 27.5g, 0.5M EDTA 20ml, pH8.0), 0.8% agarose minigel에서 30V로 5시간 동안 전기영동하였다.
- 11) 절단된 7.5kb의 벡터 DNA band를 멸균한 면도날로 잘라낸 후 1.5ml

microcentrifuge tube에 담은 후 -80°C 에서 1시간 동안 두었다.

12) 13,000rpm으로 20분간 centrifuge한 후 pipette으로 벡터 DNA를 회수하였다.

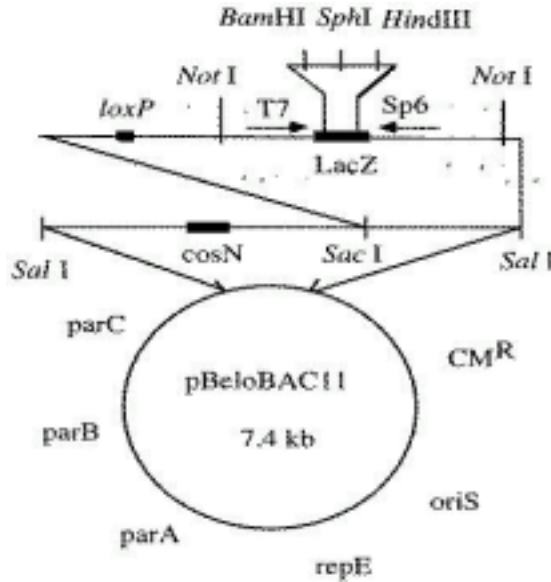


Figure 19. pCUGI1의 backbone인 pBeloBAC11의 map.

라. 거대 DNA 불완전 절단 조건

- 1) DNA plug를 멸균한 glass slide 위에서 면도날로 잘게 썰고 100ul씩 1.5ml microcentrifuge tube에 담았다.
- 2) *Hind*III를 1U/ul이 되도록 희석하였다.
- 3) Tube 당 반응 buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 1mM DTT, 4mM Spermidine, 1mg/mL BSA, 6mM MgCl_2)를 넣고 ice에서 1시간 동안 방치하였다.
- 4) Tube 당 0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 100unit의 *Hind*III를 가하고 다시 ice에서 1시간 동안 방치하였다.
- 5) 37°C 에서 20분간 불완전 절단을 한 후 CHEF gel (BioRad CHEF DRII System)에서 initial switch time 15sec, final switch time 35sec, 6V/cm, 14°C , 18시간 동안 전기영동하였다.

6) 1Mb이상의 거대 DNA가 대부분 절단되고 100-300kb 범위의 절편크기를 만들어 내는 조건을 선택한 결과 1unit/100ul plug가 적정조건임을 알아내었다 (Figure2).

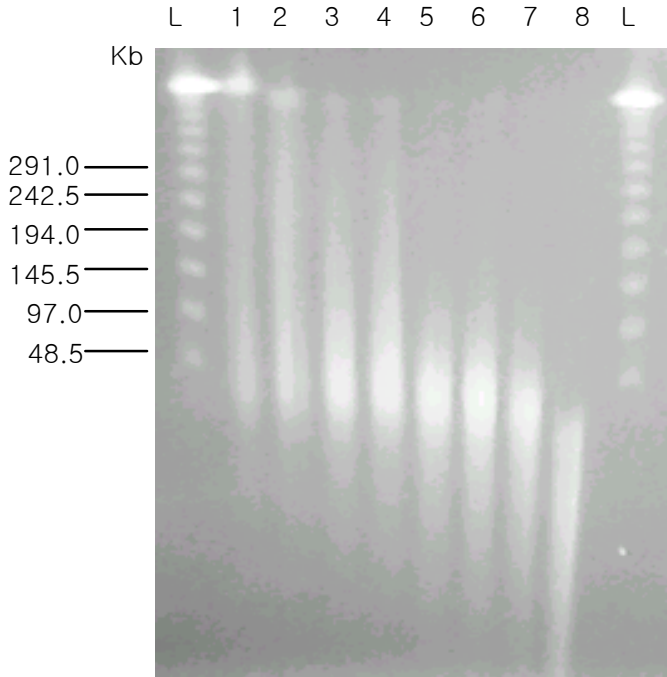


Figure 20. HindIII partial digestion 합천앵미3에서 분리해낸 거대 DNA를 HindIII 0(lane1), 1(lane2), 2(lane3), 3(lane4), 4(lane5), 6(lane6), 10(lane7), 100(lane8) unit으로 처리한 후 lambda ladder marker(L)와 함께 PFGE로 분리하였다.

마. 거대 DNA size selection

- 1) 앞단계에서 검정된 적정 조건(HindIII 1unit/100ul DNA plug)에서 대량으로 HindIII 불완전 절단을 하였다.
- 2) CHEF gel (0.5X TBE, 1% agarose)에서 marker와 함께 initial switch time 1sec, final switch time 40sec, 6V/cm, angle 120°으로 12°C에서 18시간 동안 전기영동하였다.

- 3) Gel을 면도날을 이용하여 세로로 3부분으로 자르고 marker와 접한 양 가장자리 조각만 EtBr로 염색하여 DNA 상태를 UV illuminator 하에서 조사하였다.
- 4) Size marker를 보고 100-300kb 부근에 표시를 하였다.
- 5) 염색하지 않은 가운데 조각과 맞추어 비교하여 거기서 염색되지 않은 gel의 100-300kb 부분을 잘라내었다.
- 6) 잘라낸 gel을 다시 3등분으로 자르고 0.5X TBE (Trisma base 54g, Boric acid 27.5g, 0.5M EDTA 20ml, pH8.3), 1% agarose gel에 loading한 후 size marker와 함께 initial switch time 3sec, final switch time 6sec, 6V/cm, angle 120°으로 12°C에서 18시간 동안 전기영동 하였다.
- 7) 3)-5)와 같은 방법으로 100-300kb 해당 범위의 gel을 잘라내었다 (Figure 3).

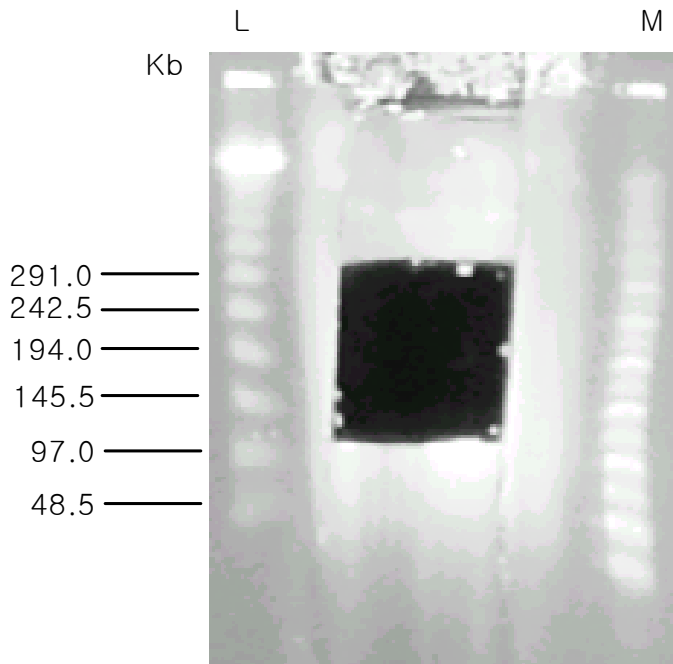


Figure 21. Size selection HindIII로 절단한 합천앵미3의 거대 DNA를 CHEF gel에 loading하고 100-300kb의 부분을 잘라내었다.

L: lambda ladder marker; M: midrange marker.

바. Electroelution

Bio-Rad Model 422 Electroelution System을 사용하여 DNA를 elution하였다.

- 1) Bio-Rad 422 Electroelution System의 모든 component를 70% ethanol로 멸균하였다.
- 2) Parafilm을 bench위에 깔고 assmebly joint와 collection cup을 연결한 후 1X TAE를 가하고 miracloth 한 겹을 얹었다.
- 3) 그 위에 glass tube를 연결시켜 1X TAE (Trisma base 54g, Boric acid 27.5g, 0.5M EDTA 20ml, pH8.0)를 가득 채운후 gel block을 담그었다.
- 4) 이를 cuvette holder에 끼우고 1X TAE를 채운 buffer tank에 넣었다.
- 4) Buffer tank를 stir plate에 얹고 stir bar로 stir시켰다.
- 5) 100mA에서 2.5시간 동안 elution하였다.

사. Ligation, test transformation and NotI digestion

- 1) pCUGI1 50ng, 15ul 10X T4 ligase buffer, 3ul T4 ligase, 300ng insert DNA를 섞고 ddH₂O로 최종 volume 150ul로 맞추는 후 16°C에서 overnight으로 incubation하였다.
- 2) 다음 날 65°C에서 20분간 heat inactivation하였다.
- 3) 5% PEG를 petri dish에 붓고 그 위에 nitrocellulose filter (Milipore)를 띄운 후 ligation mixture를 pipette을 이용하여 조심스럽게 nitrocellulose filter (Milipore)위에 얹고 상온에서 2시간 방치하였다.
- 4) 2시간 뒤 ligation mixture를 microcentrifuge tube에 회수하였다.
- 5) DH10B cell 20ul와 ligation mixture 2ul를 cuvette에 넣고 320-330V에서 electroporator로 transformation 시켰다.
- 6) SOC (Bacto tryptone 20g, Bacto yeast extract 5g, 1M NaCl 10ml, 1M KCl 2.5ml, ddH₂O up to 980 ml, pH 7.0, 2M MgSO₄/ MgCl₂ 10 ml, 2M Glucose 10 ml) 500ul를 가하고 37°C에서 50분간 incubation 한 후 25ul씩 취하여 2-3개의 X-gal/IPTG를 깬 LB (Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 10g, Agarose15g/L)/Chloramphenicol (12.5mg/ml) plate에 spreading하였다.

- 7) 37°C에서 overnight으로 incubation하였다.
- 8) 평균 1340의 white colony 당 26개의 blue colony가 관찰되었고 이는 1.94%의 nonrecombinant율을 나타낸다.
- 9) 각 plate당 임의로 선택한 10-12개의 colony를 따서 LB/CM 액체배양을 한 후 DNA를 분리하여 NotI digestion을 실시하였다.
- 10) Restriction digestion 후 CHEF gel에서 initial switch time 5sec, final switch time 15sec, 6V/cm, angle 120°으로 14°C에서 16시간 동안 전기영동하였다.
- 11) EtBr로 염색한 후 DNA 절편 크기를 계산한 결과 대부분의 클론이 절편 크기 100kb 이상이 됨(평균 150kb)을 확인하였다.

아. Mass transformation

- 1) 2ul의 ligation mixture 당 평균 26,800cfu가 얻어지므로 (13,400cfu/ul) 36,864cfu를 얻기 위해서는 transformation 당 2ul의 ligation mixture를 사용했을 때 1.38 transformation이 필요하다. 그러므로 2회의 transformation으로 10X 이상의 colony를 얻을 수 있었다.
- 2) 충분한 양의 colony를 얻기 위하여 5회를 걸친 형질전환을 하였다. 5개의 1.5ml microcentrifuge tube에 tube 당 2ul 씩 ligation mixture를 분주하고 20ul의 DH10B cell과 함께 electroporation을 실시하였다.
- 3) SOC 500ul를 가하고 37°C에서 50분간 incubation한 후 plate 당 3,000pfu가 되도록 100ul씩 취하여 0.45%X-gal/0.045%IPTG를 간 LB/0/0.25%CM (Chloramphenicol) Q-plate(22.5cmX22.5cm)에 spreading하였다.
- 4) 37°C에서 overnight으로 colony를 키웠으며 평균 1.94%가 non recombinant인 blue colony였다.

자. Picking colony and filter preparation

Genetix사의 Q-bot(Genetix, UK)은 robotic arm을 이용하여 colony picking과 plate replication을 할 수 있는 기기이다. Robot의 arm에는 96 또는 384개의 pin이 달려있어 clone들을 동시에 대량으로 복제할 수 있다.

- 1) 96개의 384-well plate에 freezing buffer (2.5% LB granulated broth; 13mM KH₂PO₄; 36mM K₂HPO₄; 1.7mM sodium citrate; 6.8mM (NH₄)₂SO₄; 4.4% glycerol; 0.4mM MgSO₄; 250ul of 5% CM)를 분주하였다.
- 2) colony가 자란 6개의 Q-plate를 Q-bot board위에 배열하였다.
- 3) Q-bot을 이용하여 36,864개의 colony를 96개의 384-well microtiter plate에 배열하였다.
- 4) 96개의 384-well microtiter plate를 37°C에서 18시간 동안 배양하고 이로부터 copy plate를 Q-bot을 이용하여 duplicate한다.
- 5) Hybrid N+ membranes (Amersham, UK)을 Q-bot위에 배열하고 96개의 384-well plate로부터의 clone을 robot을 이용하여 배열하였다.
- 6) Membrane상의 DNA를 다음과 같이 고정시켰다: Solution 1 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)에서 7분간 denature시키고 Solution 2 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0)에서 7분간 renature 시킨후 Solution 3 (5X SSPE)에서 7분간 washing한 후 상온에서 overnight으로 건조시켰다.
- 7) 총 36,864개의 클론이 Q-bot을 이용하여 96개의 384-well plate에 배열되었고 2장의 filter에 고정되었다.

차. Insert Size Distribution and Genomic Coverage

- 1) BAC library의 DNA 절편 크기의 분포를 살피기 위해 임의로 선택한 108개의 클론을 12.5 mg/ml의 chloramphenicol이 든 LB media에서 37°C에서 overnight으로 배양하고 automatic DNA miniprep system (Autogen 740)을 이용하여 DNA를 분리하였다.
- 2) 분리된 DNA는 NotI으로 digestion하여 (DNA 8ul; NotI 1.5ul; 10X buffer 1.5ul; 100X BSA 0.1ul; ddH₂O up to 15ul) CHEF gel에서 insert 단편들을 분리한 후 (initial switch time 5sec, final switch time 15sec, 6V/cm, angle 120°으로 14°C에서 16시간) size를 계산하였다. NotI site는 pCUGI1 벡터에서 단 2 곳에 존재하며 HindIII site 외곽에 존재한다.

카. Overgo 마커를 이용한 BAC library 검정

합천앵미3 저온발아성 관련 유전자에 근접한 Nipponbare chromosome 5번 long arm에서 5개의 overgo primers(C1350, S2712, G320, C794, R682)와 10번 short arm 상의 RFLP marker에서 2개의 overgo primers (C43, C1991)를 제작하였으며(J.D. McPherson, Washington Univ. Genome Sequencing Center, St. Louis, Missouri, <http://genome.wustl.edu/gsc/overgo/overgo.htm>), 제작된 overgo primers를 이용한 검정한 방법은 다음과 같다.

- 1) Filter를 hybridization solution 20ml에 넣고 60°C에서 overnight으로 prehybridization하였다.
- 2) Overgo primer (C794, C1350, G320, R682, S2712, C43, C1991) 10pmol, BSA (2mg/ml) 0.5ul, dNTP 2.0ul, ³²P-dATP 0.5ul, ³²P-dCTP 0.5ul, Klenow fragment (2U/ul) 1ul를 섞고 상온에서 1시간 동안 두었다.
- 3) 100°C에서 10분간 denature시킨후 ice에 보관했다가 hybridization을 하였다.
- 4) 4X SSC, 0.1% SDS에서 30분 washing한 후 1.5X SSC, 0.1% SDS에서 30분간 washing하였다.
- 5) Screen을 끼우고 6시간 후 phosphostrom 840 으로 image를 확인하였다.

파. HICF(high-information-content fingerprinting)를 이용한 물리적 유전자 지도 작성

1) EarI으로 BAC DNA를 절단하면 3'GAGAAGNNNN5' 끝의 NNN three-base 5'overhang을 만들며 TaqI은 blunt end를 만든다.

1) 5ul의 BAC DNA에 전체 20ul의 Master Mix(NEB Buffer2(10 X) 2.5ul, NEB EarI (10U/ul) 0.4ul, NEB TaqI(20 U/ul) 0.2ul, ABI ddATP, ddGTP, ddTTP, Roche ddCTP(50 uM) 각 0.0625ul, ABI TaqFS (12U/ul) 0.08375, ddH2O 16.57ul)을 섞고 37°C에서 30분간 incubation 시킨 후 Thermocycler로 labeling reaction을 진행시킨다. 전체는 96-well plate를 이용하여 동시에 진행시킨다.

2) 75ul의 100% EtOH을 섞고 3200 rpm에서 30분간 침전시킨 후 pellet을 말린다.

3) ROX500 standard와 Hi-Di formamide를 섞은 후에 fluorescent label된 절편을 ABI3700을 이용하여 분리하였다.

4) GeneScan Fragment Analysis Software를 이용하여 35에서 500 bp 사이의 절편크기를 분석한 후 FPC v.4.7 program을 이용하여 겹쳐지는 BAC 클론들을 consensus band maps(CB map)을 이용하여 각각의 contig로 연결하였다.

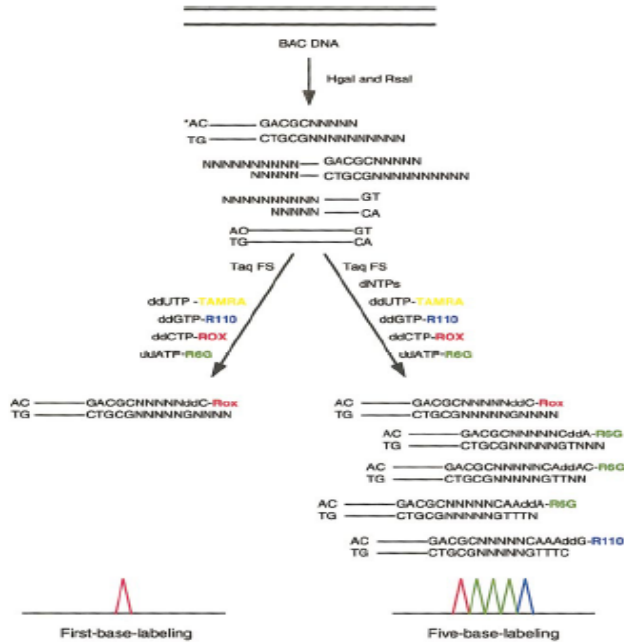


Figure 22. High-information-content fingerprinting reaction. EarI과 TaqI(그림에서는 HgaI and RsaI)으로 절단된 BAC DNA 절편의 한쪽 끝은 EarI에 의하여 three-base 5' overhang (그림에서는 five-base overhang) 갖게 되며, TaqFS와 Big-Dye terminator에 의하여 dNTPs의 첨가여부에 따라 first-base-labeling이 되거나 three-base-labeling ICF가 된다 (Ding 등, 2001).

3. 결과 및 고찰

가. 합천앵미3 거대 DNA 추출 및 BAC library 제작

합천앵미3에서 BAC library 제작을 위하여 종자를 온실에서 4-6주 키운 후 잎을 수확하고, 엽록체 DNA의 오염도를 줄일 수 있도록 세포핵만을 분리하여 LMP(low melting point) agarose와 함께 섞어 plug로 만드는 효율적인 1Mb 이상 되는 거대 DNA 추출 분리법을 개발하였으며, 거대 DNA를 대량으로 확보하여 BAC library 제작에 이용하였다. 고품질의 BAC library를 제작을 위한 선행 조건으로 BAC 벡터를 순수 분리, 완전 절단 및 dephosphorylation하여 self ligation이 되지 않는 Vector DNA를 준비하고, 합천앵미3의 거대 DNA가 HindIII 제한효소에 의하여 대부분 절단되며 동시에 100-300kb 크기의 불완전 절단 DNA 절편들이 최대로 확보 되는 조건을 찾고, 부분 절단된 거대 DNA를 완전 절단/완전 dephosphorylation된 pCUGI1와 접합시키어 *E. coli*에 형질 전환시키는데 성공하였으며, 이와 같은 방법으로 평균 절편의 크기가 100-150 kb 되는 BAC library를 제작할 수 있음을 확인하였다.

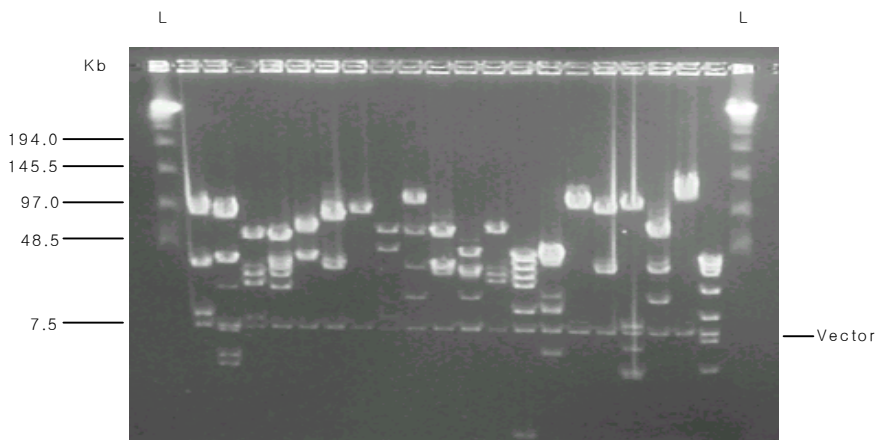


Figure 23. Randomly selected BAC clones with NotI digestion.
무작위로 선택한 합천앵미3의 BAC clone을 NotI으로 절단하여
lambda ladder marker (L: New England Biolabs, USA)와 함께

CHEF gel에서 loading하였다. 7.5kb의 vector를 제외한 절편들을 합산하여 계산하였다.

2ul의 ligation mixture 당 평균 26,800cfu가 얻어지므로 (13,400cfu/ul) 36,864cfu를 얻기 위해서는 transformation 당 2ul의 ligation mixture를 사용했을 때 1.38 transformation이 필요하다. 그러므로 2회의 transformation으로 10X 이상의 colony를 얻을 수 있었다. 충분한 양의 colony를 얻기 위하여 5회를 걸친 형질전환을 하였다. Mass transformation방법으로 형질 전환시키어, BAC library의 크기가 전체 벡터 계놈의 13.4배인 평균 크기 156.6kb의 36,864개의 clone을 획득하였고, 이 클론들은 Genetix사의 Q-bot robotic arm을 이용하여 colony picking과 plate replication을 수행하였으며, 96개의 384-well microtiter plate에 ordering 하였고, positive clone의 hybridization pattern만으로도 address를 확인할 수 있는 형태의 duplicate로 2장의 membrane filter에 총 36,864개의 클론의 전체 library를 2장의 filter에 고정시켰다.

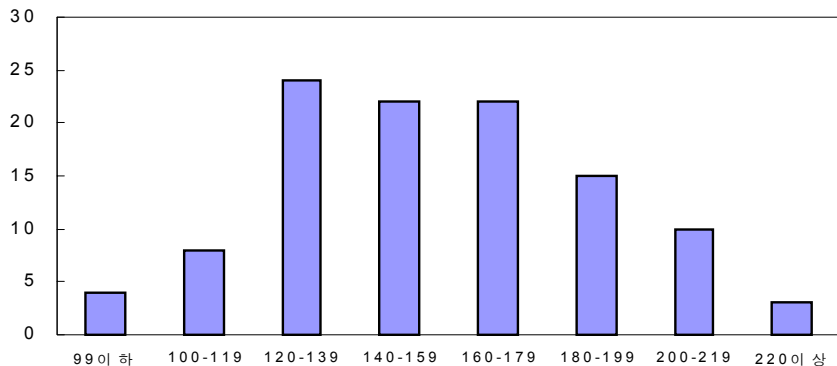


Figure 24. Insert size distribution. 임의로 선발한 108개의 BAC 클론을 NotI 으로 절단하고 insert size를 계산하여 도표화하였음.

나. 합천앵미3 저온발아성 유전자에 근접한 Nipponbare RFLP marker로 부터 overgo primer 제조 및 BAC library 제작 및 검정

제 1 세부과제에서 개발된 저온발아성 등 직파적성 관련 유전자와 연관된 합천앵미3 분자표지의 상대적 위치를 Nipponbare 고밀도 유전자 지도에서 확인하여 벡

염색체 11번 상의 저온 발아성 유전자위에 근접한 5개의 RFLP marker(C1350, S2712, G320, C794, R682)를 선발하였으며, 벼 염색체 5번 상의 저온발아성 관련 유전자에 근접한 2개의 RFLP marker(C43, C1991)를 선발하였다.

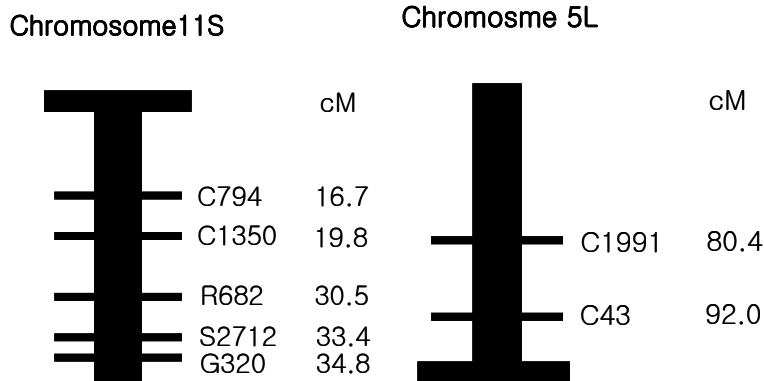


Figure 25. 합천앵미3 직파적성 관련 유전자와 연관된 분자표지의 상대적 위치를 고려하여 선발된 Nipponbare RFLP marker.

목적하는 분자표지를 BAC 클론을 선발하고, 선발된 BAC 클론들로부터 목표 유전자까지의 유전적인 거리를 물리적 거리(bp 단위)로 전환하고, 서로 겹치는 BAC 클론들로 contig를 만들어 단시일 내에 목표유전자의 물리적 유전자지도를 작성하기 위하여서는 Overgo(J.D. McPherson, Washington Univ. Genome Sequencing Center, St. Louis, Missouri)를 BAC library의 검정에 이용하는 것이 효과적이다. 분자표지나 BAC 클론 한쪽 끝의 염기서열 정보와 Overgo Marker (<http://genome.wustl.edu/gsc/overgo/overgo.htm>)를 이용하면 8 bp의 염기서열이 중복되는 1쌍의 Overgo primer를 쉽게 설계할 수 있는데, 한번에 서로 다른 40쌍의 Overgo primer를 고밀도 BAC 필터 검정에 함께 이용할 수 있다. 저온 발아성 유전자위에 근접한 벼 염색체 11번 short arm 상의 RFLP marker에서 제조된 5개의 overgo primers를 이용하여, 2장의 membrane filter에 고정되어 있는 36,864개의 clone을 검정하였으며, 그 결과 모든 overgo primers로부터 3개에서 16개의 BAC 클론을 선발 할 수 있었고, BAC library의 깊이가 전체 벼 게놈의 평균 10X의 genome coverage를 나타내는 계산 결과를 이로부터 얻을 수 있었다. 저온발아성 관련 유전자에 근접한 벼 염색체 5번 long

arm상의 RFLP marker에서 제조된 2개의 overgo primers를 이용하여 검정한 결과 각각 9개와 37개의 클론들을 선발 할 수 있었다.

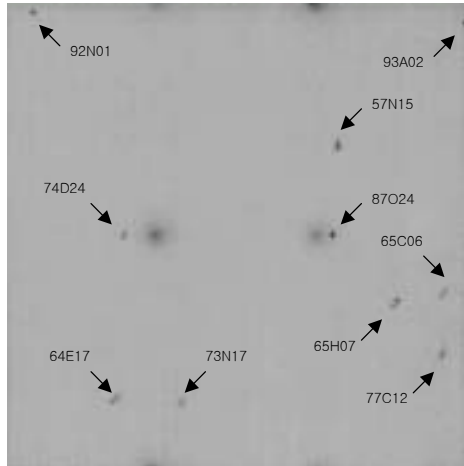


Figure 26. BAC library screen with overgo markers from RFLP marker C794 on chromosome 11.

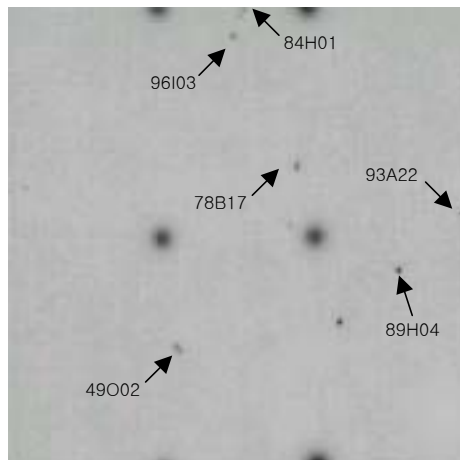


Figure 27. BAC library screen with overgo markers from RFLP marker C43 on chromosome 5.

Table 20. Summary of BAC clones that hybridized to RFLP markers distributed in rice chromosome11 linkage group.

Probes	cM	Number of hits	Hit addresses
C794	16.7	15	16E19, 28H15, 32M02, 34L17, 39K10, 57N15, 64E17, 65C06, 65H07, 73N17, 74D24, 77C12, 87O24, 92N01, 93A02
C1350	19.8	16	02L13, 03C21, 07I01, 08E06, 17I09, 19G17, 26I07, 29K22, 30G19, 34B09, 45E02, 50I18, 79J17, 80E22, 82A19, 93A07
R682	30.5	11	06B10, 06E02, 11K06, 13E17, 31K23, 49E13, 53B11, 76M08, 81H03, 88H10, 96L15
S2712	33.4	3	02E09, 62J03, 89I10
G320	34.8	4	23A12, 28K03, 50L11, 73O06

Table 21. Summary of BAC clones that hybridized to RFLP markers distributed in rice chromosome 5 linkage group.

Probes	cM	Number of hits	Hit addresses
C1991	80.4	37	01F04, 01O16, 09C24, 11G11, 26B20, 26J17, 27M18, 32A17, 35I16, 36O04, 41J10, 43C10, 46F11, 51P19, 56I03, 57J13, 59M09, 57J13, 59M09, 60F07, 60N08, 61I16, 62G06, 68E07, 68O07, 69I05, 70E22, 72P03, 74D23, 75M06, 82A14, 84B06, 84M18, 88G15, 89A21, 91C18, 93N18, 96C15, 96L08
C43	92.0	9	13H06, 14F18, 26F05, 49O12, 78B17, 84H01, 89H04, 93A22, 96I03

다. HICF (high-information-content fingerprinting)를 이용한 물리적 유전자지도 작성

HICF(high-information-content fingerprinting)시스템은 Type IIS 제한효소와 Type II 제한효소를 동시에 이용하여 BAC 클론을 절단하여 평균 500 bp 이하의 절편들을 만들고, Type IIS 제한효소에 의하여 만들어진 절편의 5' overhang을 형광 dideoxy terminator로 염기서열 분석원리를 이용하여 labeling 한 후, 자동 염기서열 분석기와 size standard를 이용하여 절편의 크기와 말단염기서열 정보를 동시에 획득하는 효과적인 fingerprinting 시스템이다 (Ding등, 2001). BAC DNA를 추출하여 EarI로 절단하면 3'GAGAAGNNNN5' 끝의 NNN three-base 5'overhang을 만들며, TaqI은 blunt end를 만든다. 직파적성 관련 유전자와 연관된 7개의 overgo primer를 탐침으로 합천앵미3 BAC library를 검정하여 얻은 95개의 BAC 클론으로부터 95개의 94개의 클론이 HICF 방법에 의하여 성공적으로 fingerprinting 되었으며, ROX500 size standard와 함께 ABI3700에 의하여 크기 35-500 bp 사이의 절편이 분석되었다.

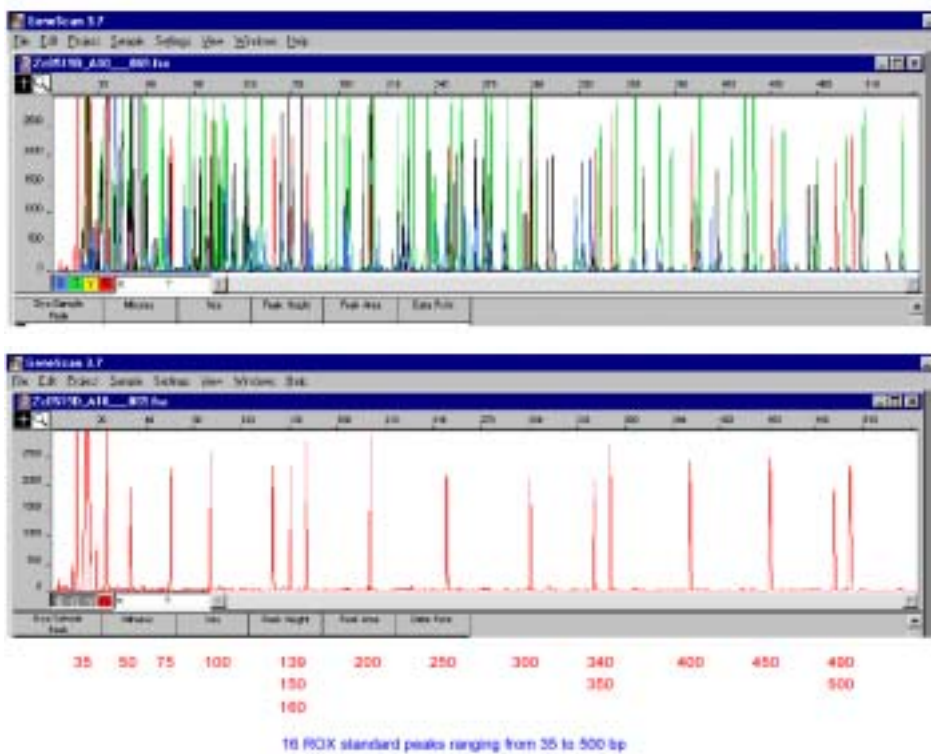


Figure 28. HICF 방법에 의하여 절단되고 형광 labeling된 절편들을 ABI3700에 의하여 분석한 그림. 아래 그림은 크기 30-500 bp의 ROX500 size standard가 ABI3700에 의하여 분리된 결과임.

fingerprint data는 FPC program의 building consensus band maps에 의하여 1×10^{-35} 의 strict probability cutoff setting 조건에서 contig로 연결되었다. HICF 방법에 의하여 fingerprinting된 94개의 클론 중 모두 74개가 FPC에 의하여 10개의 contig로 연결되었다. C1991에 의하여 선발된 BAC 클론들을 제외한 나머지 BAC 클론들은 탐침으로 이용된 분자표지마다 각각 하나의 contig로 모두 연결되었으며 물리적 유전자지도로 작성되었다. C1991에 의하여 선발된 BAC 클론들은 4개의 contig로 연결되었다. BAC library의 크기가 전체 벼 게놈의 13.4 배이고, 깊이가 전체 벼 게놈의 평균 10X의 genome coverage이며, C1991 단일 분자표지로부터 37개의 BAC 클론이 선발되었음을 고려하면, 4개의 contig로 연결된 것은 나타내는 Nipponbare로부터 유래된 C1991이 함천앵미3 genome에서는 duplicate되었거나 이 지역에만 특이적이지는 않다고 결론 할 수 있다.

Table 22. Summary of BAC clones that were assembled into contigs by HICF and FPC

Probes	Number of hits	Number of contigs	Number of clones/contig
C794(ch11)	15	1	14(5 buried)
C1350(ch11)	16	1	15(3 buried)
R682(ch11)	11	1	7(2 buried)
S2712(ch11)	3	1	3(0 buried)
G320(ch11)	4	1	3(0 buried)
C1991(ch5)	37	4	contig1: 10(1 buried), contig2: 9(0 buried), contig3: 2(0 buried), contig4: 2(0 buried)
C43(ch5)	9	1	9(1 buried)

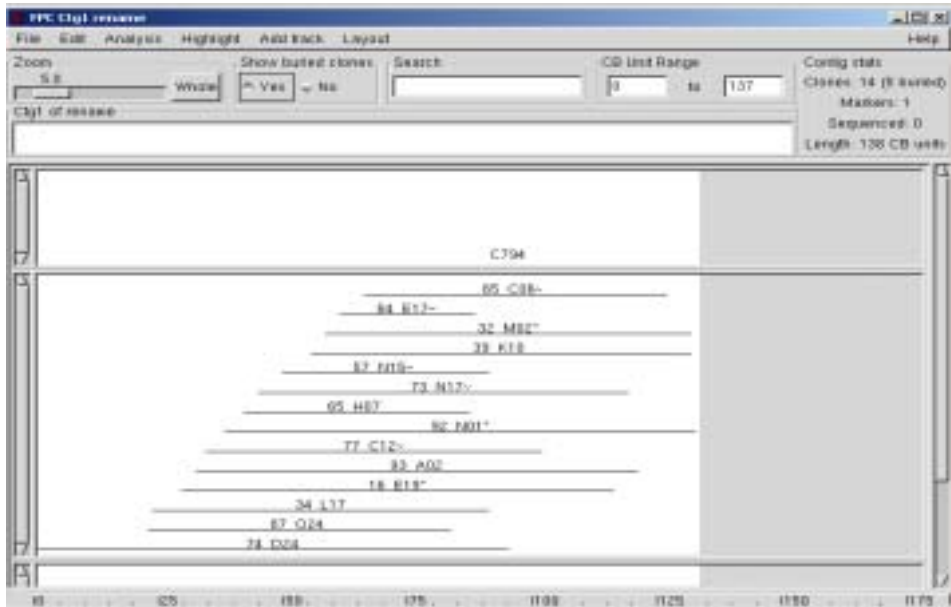


Figure 29. C794(ch11)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

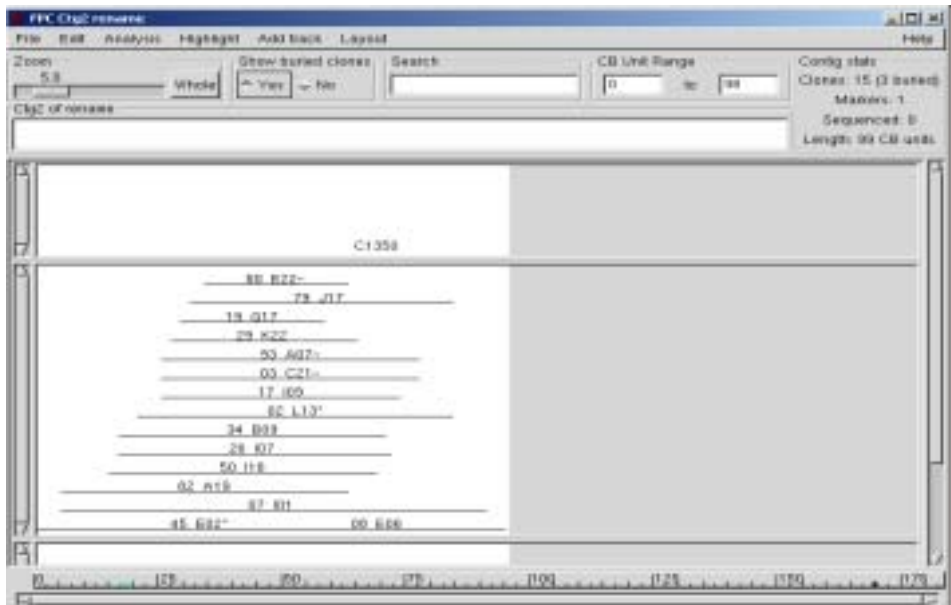


Figure 30. C1350(ch11)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

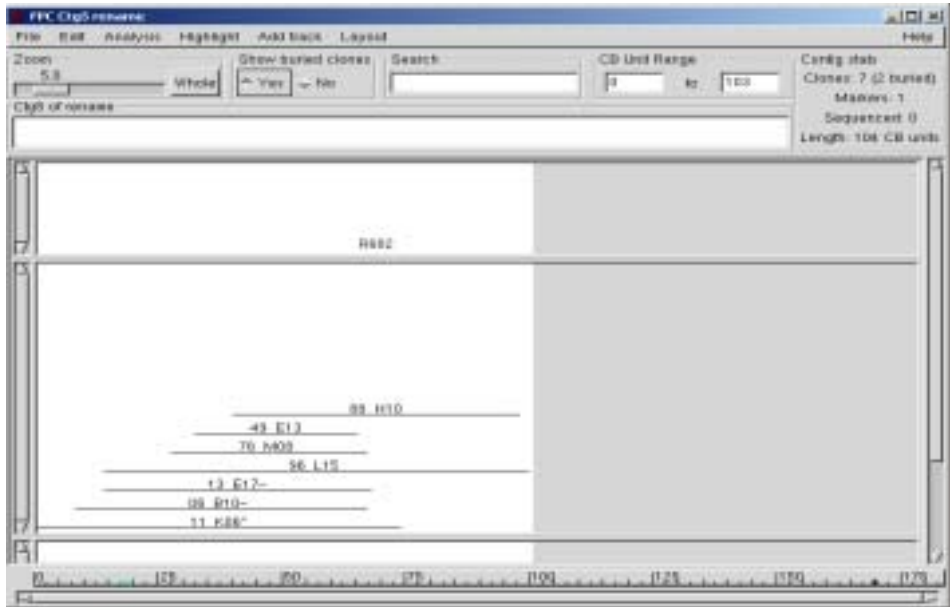


Figure 31. R682(ch11)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

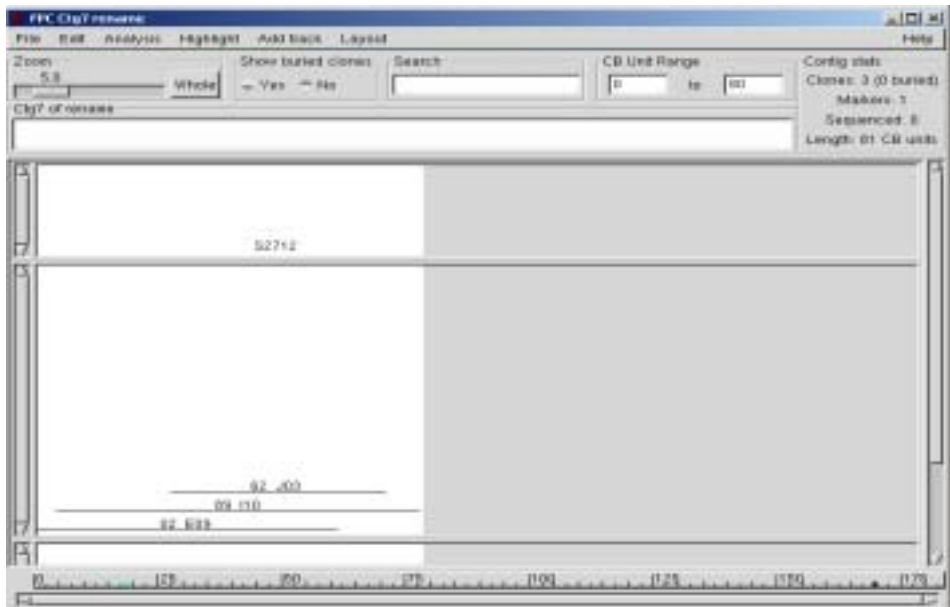


Figure 32. S2712(ch11)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

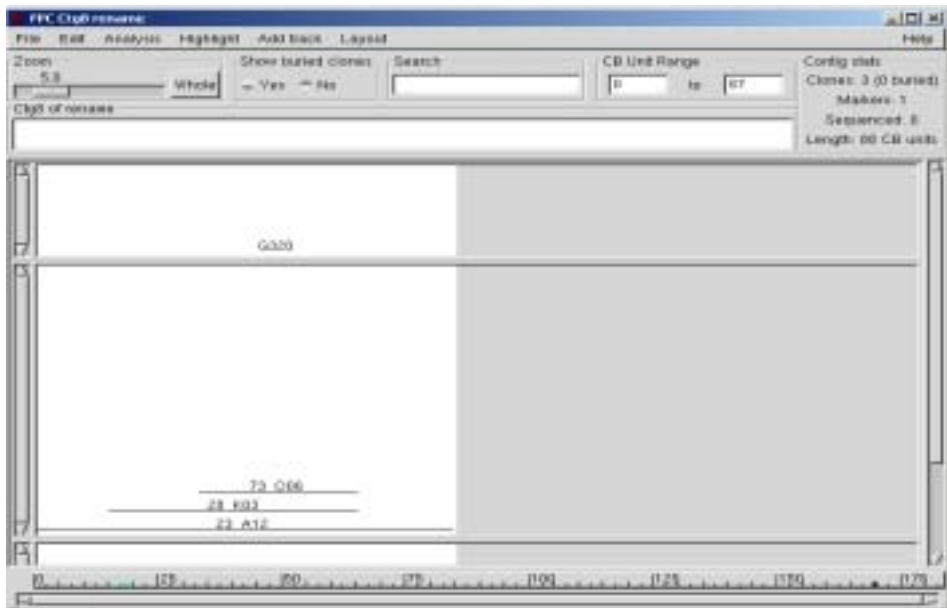


Figure 33. G320(ch11)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

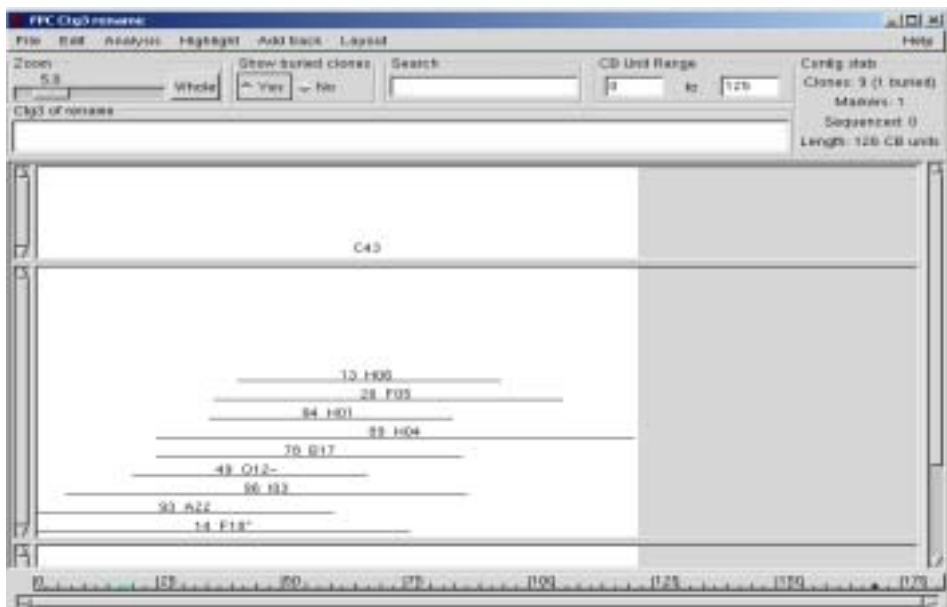


Figure 34. C43(ch5)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

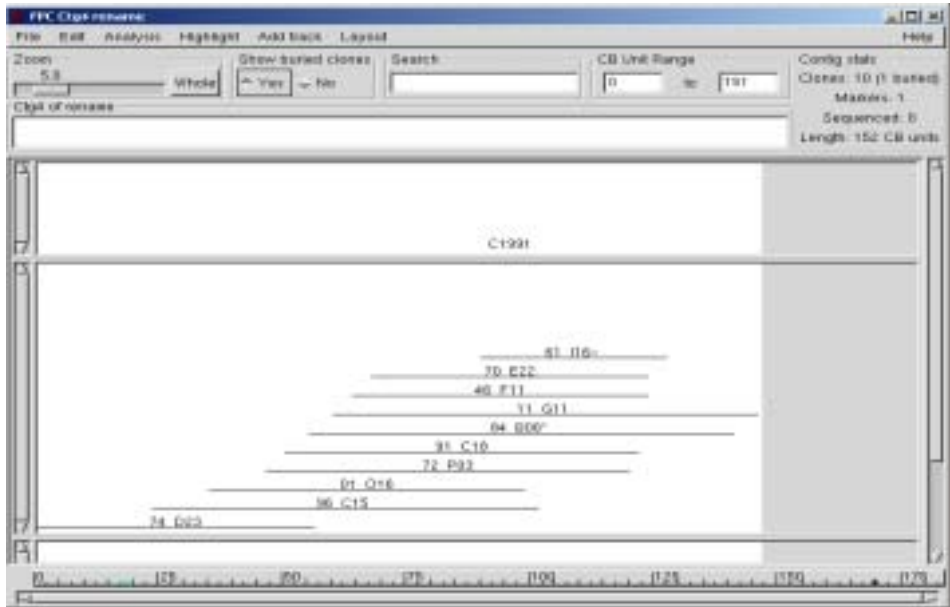


Figure 35. C1991(ch5)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

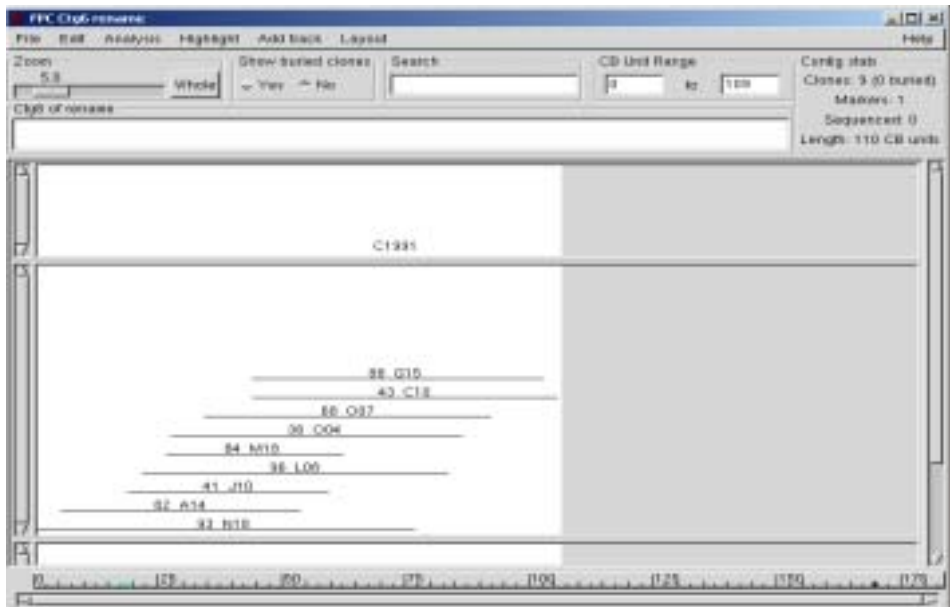


Figure 36. C1991(ch5)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

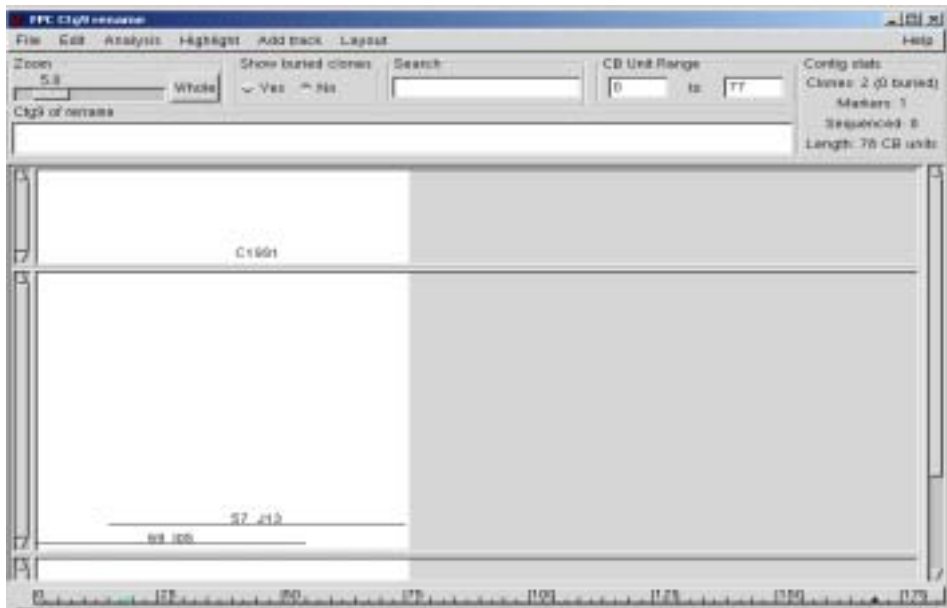


Figure 37. C1991(ch5)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

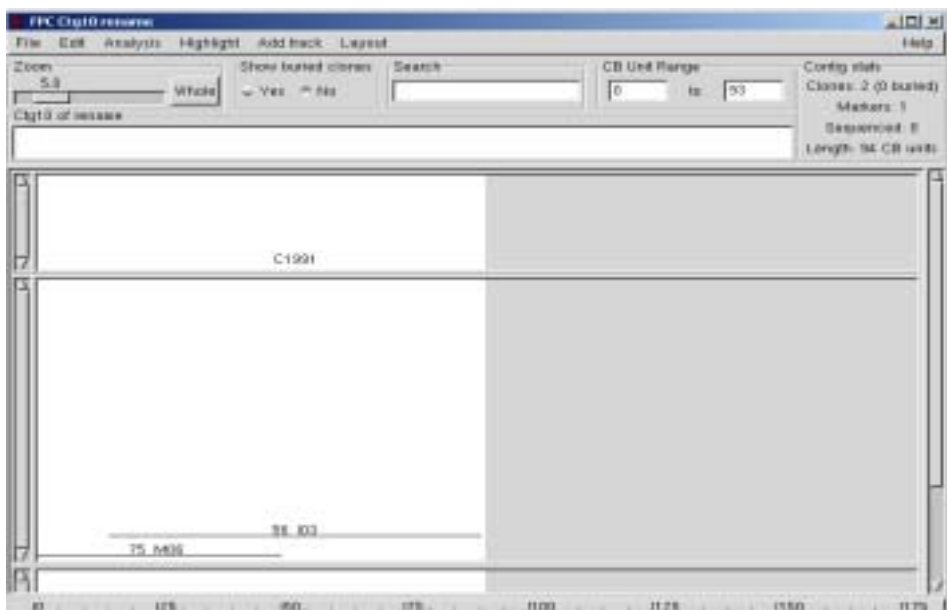


Figure 38. C1991(ch5)로부터 선발된 BAC 클론의 물리적 지도.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구 개발 목표 및 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	
1차 년도 (2000 2001)	주관기관 (충남대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 직파 특성 유전분석 및 연관 DNA marker 개발용 집단 육성 ○ 모부본간 polymorphism 조사 ○ 직파특성 고밀도 유전자지도 작성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ BC1F3 (밀양23**2/합천앵미3)집단 ○ 합천앵미3/밀양23 간 SSR marker에 의한 polymorphism 조사 (100여 개) ○ 직파 특성 유전자 (저온발아성 등) 고밀도 유전자지도 작성
	제1협동 기관 (단국대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 직파특성 관련 유전자 유사체 5종 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Data base에 수록된 저온발아성 등 염기서열 분석 및 primer 작성 ○ PCR-cloning 및 염기서열 결정
	제2협동 기관 (작사)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 주요 직파적성 유전자원 평가 ○ 직파특성 고밀도 유전자 지도 작성용 집단 육성 ○ 직파품종 육성을 위한 교잡교배 및 계통육성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 직파적성 유전자원 (50점이상) 특성평가 (저온발아성 등) ○ 합천앵미3/밀양23 F1 약배양 및 DH 계통 육성 (400개 이상) ○ 직파적성 계통육성을 위한 교잡 및 고세대 여교잡 육종법 실시 (F1, BC1육성)
제3협동 기관 (유니젠)	<ul style="list-style-type: none"> ○ BAC library 제작을 위한 거대 DNA 추출 ○ BAC library 제작 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 합천앵미 3 유묘의 세포핵에서 1Mb 이상 되는 거대 DNA 추출 ○ 잡초성벼(합천앵미3)의 거대 DNA 이용 BAC library 개발 조건 확립 	

구 분		연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2001 2002)	주 관 기 관 (충남대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 주요 직파적성 유전자원평가 및 DNA 다양성 검정 ○ 직파 특성 유전분석 및 연관 DNA marker ○ 직파특성 고밀도 유전자 지도 작성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 직파 적성 유전자원 특성 평가 및 DNA다양성 검정으로 직파특성 DNA marker와의 연계성 확립 ○ 밀양23/합천앵미3//밀양23 집단을 이용 직파특성 유전자 연관 DNA marker 개발(특성 별 3개 이상) ○ Bulked segregant analysis 방법을 이용하여 목적 형질의 고밀도 유전자 지도 작성(AFLP, SSR marker 이용)
	제1협동 기관 (단국대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 직파특성 관련 유전자 유사체 10종 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Data base에 수록된 저온발아성 등 염기서열 분석 및 primer 작성 ○ PCR-cloning 및 염기서열 결정 ○ PCR 단편의 염색체 위치 확인 (유전자지도 및 BAC library 이용)
	제2협동 기관 (작시)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리세대의 직파 특성 평가 ○ MAS를 이용한 직파 특성별 근동질 유전자 계통육성 ○ 직파 품종 육성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고밀도 유전자 지도 작성을 위해 육성된 집단의 특성평가 ○ DNA marker 를 이용 특성별 근동질 유전자 계통을 육성함 ○ 고세대 여교잡 육종법 실시 (BC1, BC2 전개 및 선발)
	제3협동 기관 (유니젠)	<ul style="list-style-type: none"> ○ BAC library 제작 ○ BAC library 검정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전체 유전체의 5배 이상을 포함하고 평균 크기가 100-150 kb 되는 BAC library 제작 ○ 직파적성 유전자와 밀접 연관된 분자 표지를 이용한 BAC library 검정

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2002 2003)	주관기 관 (충남대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 직파적성 유전자원 특성 평가 및 DNA 다양성 검정으로 직파특성과 DNA marker와의 연계성 확립 ○ Bulked segregant analysis 방법과 PCR marker 이용 목적의 고밀도 유전자 지도 작성 (특성별 3개 이상)
	제1협동 기관 (단국대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 차등발현을 보이는 저온내성 관련 유전자를 probe으로 hybridization하여 상응한 BAC clone을 분리함. ○ 분리된 BAC clone을 대상을 차등발현 저온내성 유전자 연관 SSR marker를 탐색함. ○ SSR marker를 분리세대를 대상으로 저온내성 연관을 확인
	제2협동 기관 (작사)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 직파적성관련 유적분석 집단 특성평가 ○ 직파적성 고세대 여교배 계통육성 ○ 직파적성 꽃가루배양 (DHL) 및 SSD에 의한 계통육성
	제3협동 기관 (유니젠)	<ul style="list-style-type: none"> ○ BAC library 제작 완료 ○ 물리적 유전자 지도 작성 및 목적 유전자 함유 BAC 클론 선발

2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차 년도 (2000)	○ 모부분간 polymorphism조사 (SSR등 100개)	20
	○ 선정 모본(합천앵미3)의 BAC library 제작조건 확립	20
	○ 직파적성 관련 벼 유전자 5종 이상 개발	20
	○ 직파적성 관련 유전자 연관 DNA marker개발	20
	○ 고밀도 유전자지도 작성용 집단 육성 및 평가	10
	○ 직파적성 유전자원(50점 이상)평가 및 교배	10
2차 년도 (2001)	○ 직파적성 유전자원 평가 및 DNA 다양성 분석	20
	○ 직파적성 유전자 고밀도지도 작성	10
	○ 합천앵미3 BAC library 제작 및 검정	20
	○ 직파적성 관련 벼 유전자 5종 개발 여부	20
	○ MAS를 이용한 근동질 유전자 계통 선발	20
	○ 모부분간 polymorphism조사(SSR등 100개)	10
3차 년도 (2002)	○ 직파적성과 DNA 다양성과의 연계분석	10
	○ 고밀도 유전자 지도 작성	10
	○ 합천앵미3 BAC library 제작 완료	10
	○ 직파적성 유전자 연관 물리적 지도 작성 및 BAC 클론 선발	10
	○ MAS를 이용한 형질별 근동질 유전자 계통 육성	20
	○ 직파적성 관련 유전자 유사체의 염색체 위치 결정 및 연관 DNA marker와의 연관 여부	15
○ 직파적성 계통육성	25	
최종 평가	○ 저온담수 직파적성 벼 계통 개발	20
	○ 합천앵미3 BAC library 제작 및 BAC 클론 선발	20
	○ 직파적성 유전자원 평가 및 검정법 개발	20
	○ MAS를 이용한 직파적성 계통 분자 육종 체계 확립	20
	○ 직파적성 관련 분자 표지 개발 여부	20

3. 연구 개발 목표의 달성도

가. 벼 저온담수 직파적성 관련 형질 유전분석 및 분자표지 개발

저온담수 직파적성 벼 품종이 갖추어야 할 저온발아성 등의 유전양식을 구명하고 직파적성 관련 유전자 연관 분자표지를 개발하며, 직파계통 선발 효율을 제고시키는 MAS (marker-assisted selection) 방법을 육종에 활용하는 체계를 개발하기 위해 저온발아성, 담수저항성 등 불량 환경에 적응하는 능력이 높은 합천앵미 3호와 통일형 벼인 밀양23호 (반복친) 간 80개의 BC1F6 계통을 육성하였다. 양친과 80개의 BC1F6 계통을 충남대학교 및 춘천출장소 포장에 공시하여 묘초장, 적고 등 15개의 주요 농업적 특성을 검정하였다. 이들 80개 계통과 SSR 마커를 이용하여 유전자지도를 작성하였고, QTL 분석을 실시하였다. 저온발아성 등에 관여하는 유전자 분석과 연관 DNA marker를 탐색한 결과 염색체 11번에 위치하는 합천앵미3호의 유전자가 밀양23호의 저온발아성을 증진시키는 것으로 분석되었다. 또한 이 유전자는 적고, 이삭목 추출도, 탈립성을 조절하는 유전자들과 같은 지역에서 관찰되었는데 이러한 현상이 한 유전자의 다면발현에 의한 것인지 혹은 여러 유전자의 연관에 의한 것인지는 고밀도 유전자지도를 이용한 검토가 필요하다. **저온발아성 유전자의 유전양식 분석 및 근동질 유전자계통 육성을 위해 저온발아성이 양호한 계통을 선정, 여교잡을 이용, 근동질 유전자계통 (QTL-NILs)을 육성하였다 (BC1F6BC1).** 이들 계통들은 직파적성 외의 다른 농업적 특성에 대해서도 검토를 실시할 예정이다. 또한 이 저온발아성 유전자와 연관된 다수의 SSR 마커를 개발하였기 때문에 이를 이용한 직파적성 계통의 선발이 가능할 것으로 기대된다.

나. 벼 저온담수 직파 적성 후보 유전자 분석 및 마커개발

벼 저온 스트레스 저항성 관련 유전자를 이용한 specific primer를 작성하기 위해 기보고된 10개 저온 유도성 발현 벼 유전자의 sequence 정보를 확보하여 상응하는 primer를 제작하였다. 재배벼 5 품종(일품, 추청, 다산, 화성, 밀양 23호), 합천앵미3호, 그리고 밀양23호와 합천앵미3호 간 여교배후대를 대상으로 10종의 유전자의 발현을 확인하기 위한 DD-RT PCR을 수행하여 저온직파적성과의 관련성을 찾고 이를 이용하여 여교배 후대들의 내냉성 정도를 비교하였다. 이들 primer와 담수직파적성 중 저온저항성과의 연관성을 확인하기 위하여 밀양

23호와 합천앵미3호 간 교잡후대 여교배집단 (BC1) 중 저온발아성, 저온신장성, 유아내냉성, 유묘내냉성 등에서 전체적으로 강, 중, 약을 보이는 계통을 선정하였다. 재배벼 (일품, 추청, 다산, 화성, 밀양23호), 합천앵미 3호를 재배하여 유식물 수준에서 저온처리 시 발현하는 RNA를 추출하였으며 이들 RNA로부터 제작한 cDNA를 주형으로 위의 specific primer를 사용한 DD-RT PCR을 수행하였다.

BC₁F₃ 세대의 DD-RT PCR을 한 결과 저온 처리에 따라 저온 유도성 유전자의 발현이 증가하였다. 저온처리 없는 조건에서는 *O. rufipogon*과 합천앵미3호에서 유전자 발현 정도가 높았고 *O. rufipogon*과 합천앵미3호를 재배벼와 여교배한 후대에서 저온처리 시 재배벼보다 해당 유전자의 발현이 많은 개체를 확인하였다. 밀양23호와 합천앵미3호 여교배 후대집단에서 저온처리 시 여러 유전자의 발현 정도의 증가가 두드러진 개체들은 저온신장성, 저온발아성, 유아내냉성, 유묘내냉성 등이 강한 계통임을 확인할 수 있었다. 이 결과를 기초로 총 10개의 저온 유도성 유전자를 벼 저온담수 직파적성 후보 유전자 분석 및 마커로 선발한 것 중에서 7개인 pBC121, 442, 601과 LIP5, 19 그리고 AOX1a, AOX1b 유전자의 primer는 벼 품종간이나 교잡후대에서 계통의 내냉성 정도를 측정할 수 있는 marker로 확인하였다. 그 중 pBC121은 모본인 합천앵미3호와 밀양23호 간에 PCR 밴드가 다형성을 보였으며, 염색체 1번에 위치하였다. 특히 이 유전자는 이삭목의 길이를 조절하는 QTL과 밀접하게 연관성을 보였는데, 이들 간의 관계를 규명하는 연구가 앞으로 요구된다.

다. 저온담수 직파적성 벼 선발 및 분자생물학적 이용연구

국내의 주요 유전자원의 직파관련 특성 중 저온발아성과 출아성 등을 검정하고, 직파적성 연관 분자표지 개발 및 고밀도 유전자지도 작성을 위한 집단을 육성하며, 여교잡 육종법을 활용 저온발아성과 출아성 관련 유용 대립유전자를 집적함으로써 직파적성 계통을 육성하고자 실시하였다. 선정된 64개의 유전자원을 공시하여 직파 관련 특성중 초기 입모에 영향을 미치는 저온발아성, 출아성 및 담수착근성이 우수한 유전자원으로 합천앵미 3호, Arroz da Terra 등을 선발하였다. 또한 공시된 64 계통의 유전적 다양성을 검토하기 위해 AFLP 분석을 실시였다. 직파적성 유전자 연관 분자표지 개발을 위해 여교배를 통하여 SR27439 등 2집단을 육성하였고, 약배양을 통해 Double Haploid 집단으로 SR27439 (화성벼/합천앵미3) 등을 육성하였다. 약배양을 실시하여 SR27517 등

4조합 526 계통을 육성 공시하여 포장에서 85계통을, 저온발아검정을 실시하여 17계통을 선발하였으며, 실내 미질 검정을 통하여 4계통을 각각 선발하였다.

밀양23호**2/합천앵미3호 유래 BC1F6 80 계통을 대상으로 저온발아성 및 출아성을 검정하였으며 QTL 분석 결과 저온발아성을 증진시키는 합천앵미3호의 대립유전자가 11번 염색체에서 탐색되었다. 저온발아성과 연관된 이 염색체 지역에서 합천앵미3호의 염색체 단편을 가지고 있는 BC1F6 계통을 선정하여 밀양23호로 2회 여교배를 실시하여 식물체를 확보하였다. 이 계통은 밀양23호와 근동질 유전자계통으로 반복친인 밀양23호와 주요 농업적 주요 형질 및 저온발아성 등의 특성을 비교실험할 계획이다.

라. 벼 저온 답수 직파적성 유전자의 분리

박테리아 인공염색체 (bacterial artificial chromosome, BAC)는 특히 식량 작물에서 복잡한 게놈의 분석 연구와 농업적으로 중요한 유전자의 클로닝에 획기적이고도 중요한 도구로 이용되고 있다. 재배종이나 현재 이용되는 육종 재료에는 부재하는 직파적성 관련 유용유전형질들을 가진 잡초성벼(합천앵미3)에서 고품질의 BAC library를 제작하면, 정밀 유전자 연관 지도상의 직파적성 형질과 밀접하게 연관된 분자표지와 후보 유전자를 이용 BAC 클론들을 선발하여 물리적 유전자 지도를 작성하고, 향후 저온발아성을 결정하는 단일 또는 QTL 유전자들을 포함하는 BAC을 선발하여 유전자 분리를 가능케 하는데 기초 자료를 제공하며, 선발된 BAC의 염기서열정보를 활용하여 목표유전자에 초밀접하며 이용이 편리한 다양한 분자표지를 개발하는데 활용 할 수 있다. 본 연구에서는 합천앵미3에서 전체 게놈을 고루 포함할 수 있도록 벼의 전체 유전체를 5배 이상 포함하고 평균 절편크기가 100-150 kb 정도 되는 고품질의 BAC library 제작을 목표로 하였으나, 연구 결과 평균 156.6 kb의 절편이 얻어졌으며, BAC library의 크기가 전체 벼 게놈의 13.4배인 36,864개의 clone을 획득하였다. 이 클론들은 Q-bot을 이용하여 96개의 384-well microtiter plate에 ordering 되었으며 2장의 membrane filter에 고정되었다. 이와 같은 BAC library를 검정하면 99% 이상의 확률로 원하는 유전자나 염기서열을 가진 BAC 클론을 획득할 수 있다.

제 1 세부과제에서 개발된 저온발아성 등 직파적성 관련 유전자와 연관된 분자표지의 상대적 위치를 Nipponbare 고밀도 유전자지도에서 확인하여 벼 염색체 11번의 저온발아성 유전자위에 근접한 RFLP marker에서 제조된 5개의 overgo primers (C1350, S2712, G320, C794, R682)를 이용하여, 2장의 membrane filter에 고정되어 있는 36,864개의 clone을 검정하였다. 그 결과, 모든 overgo primers로부터 3개에서 16개의 BAC 클론을 선발 할 수 있었고, 제작된 BAC

library의 깊이가 전체 벼 게놈의 평균 10X의 genome coverage를 나타내는 계산 결과를 이로부터 얻을 수 있었으며, 추가로 벼 염색체 5번의 저온발아성 관련 유전자에 근접한 RFLP marker에서 제조된 2개의 overgo primers (C43, C1991)를 이용하여 검정한 결과 각각 9개와 37개의 클론들을 선발 할 수 있었다. 직파적성 관련 유전자와 연관된 overgo primers를 탐침으로 합천앵미3 BAC library를 검정하여 얻은 BAC 클론을 HICF 방법과 ABI3700을 이용하여 fingerprinting 하였으며, 획득된 절편들은 FPC program을 이용하여 10개의 contig로 연결시키고 물리적 유전자 지도를 작성하였다.

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

1. 연구결과의 활용화 방안

가. 실용적 측면

- 양적형질 관여 유전자의 유전 분석은 유전자간의 상호작용, 환경의 영향 등으로 인해 어려운데 본 연구에서 개발되는 근동질 유전자 계통을 이용하여 직과 적성을 정확하게 검정할 수 있으며 이를 토대로 직과 계통시 효과적인 육종 방법을 제시할 수 있다.
- 국내외 주요 직과적성 유전자원의 특성 검정과 DNA 다양성 분석으로 직과 특성과 DNA marker와의 연관성 분석이 가능하며 이를 토대로 주요 교배모본 선정 자료 제공이 가능하다.
- 우리나라 유전자원인 잡초성벼를 이용하여 작성된 BAC library는 직과적성 관련 유전자 이외의 유용유전자 탐색 및 분리에 이용될 수 있고 우리의 고유 자산이 될 수 있다.
- 내재해성 관련 유전자 연관 분자표지 (QTL) 개발, 유전자 분리 및 이용 기술을 확보할 수 있다.

나. 산업화 측면

- 초다수 직과 적응성 계통이 육성되고 직접 생산에 투입되어 재배될 경우 (10% 면적) 기존 일반형 품종에 비해 20% 증수효과가 있으므로 그에 따른 경제적 효과는 연간 1,800억원 (9조원 (1997 쌀 생산액)×10%(벼재배면적)×20%증수효과 = 1,800억원)에 이르게 된다.
- 유전자원은 농업 분야에서 가장 가치가 높은 지적재산권이다. 우리나라 유전자원인 잡초성벼를 이용하여 작성된 BAC library는 직과적성 관련 유전자 이외의 유용유전자 탐색 및 분리에 이용될 수 있고 산업화가 가능하며 개발된 분자육종 기술을 활용하여 육종 효율의 증진을 기할 수 있다.

2. 추가 연구의 필요성

잡초성벼는 아직 본격적인 연구가 진행되고 있지 않으나, 재배벼의 유전적 다양성이 협소해지는 점을 고려할 때 다양한 종류의 대립유전자를 확보하기 위해 잡초성벼 등 유전자원의 이용이 활발해질 것이다. 본 연구에서 밝혀진 합천앵미3호의 저온발아성, 적고 등의 유용유전자에 대한 유전 분석, 연관 분자표지, 근동질 유전자계통 육성, 고밀도 유전자지도 등의 정보는 앞으로 직파적성 품종 육성에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 저온 처리시 특이적으로 발현되는 유전자는 저온 스트레스에 강한 계통의 육성에 중요한 자료로 이용될 수 있으며, 특성 규명이 미흡한 다른 유전자에 대한 보다 자세한 연구가 요구된다. 개발된 벼 유전자원의 직파적성 검정 방법은 앞으로 직파적성 계통 선발을 위한 중요한 지표로 이용 가능하며 작성된 합천앵미3호의 BAC library와 저온발아성 유전자가 위치하는 염색체지역을 포함하는 BAC 클론 contig는 이 유전자의 분리에 귀중한 재료가 될 수 있을 것이다. 본 연구에 이용된 잡초성벼인 합천앵미3호는 저온발아성 외에도 재배벼의 유전적 다양성을 증진시킬 수 있는 다양한 대립유전자를 가지고 있기 때문에 육성 중인 고세대 여교배 계통을 활용하는 연구, 저온발아성 관여 유전자의 고밀도 유전자지도 작성 및 특성 규명, 그리고 substitution mapping과 BAC 크론을 이용한 저온발아성 유전자의 분리를 통한 저온발아성의 분자 수준에서의 기작 연구 등이 앞으로 요구된다.

현재 확보한 기술과 연구 성과물을 발전적으로 이용하기 위해 추가 실험은 필수적, 소요될 연구 예산 역시 증가되어야 할 것으로 사료된다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 1절 자연변이의 탐색 및 육종적 이용

작물 개량을 위해 분자유전학을 이용하는 목표 중의 하나는 필요한 유용 유전자의 탐색, 특성 규명, 분리 및 이용을 통해 우수한 신품종을 육성하는 것이다. 지난 10 여년 동안 작물의 genome 연구를 위한 다양한 기술이 개발되었는데, 대표적인 것들은 DNA 표지인자를 이용한 유전자지도 작성, 작물종간 상동성 비교를 위한 비교유전자지도 작성, 전체 genome 물리적지도 작성, 질적 및 양적 유전자의 mapping 그리고 전체 염기서열 해독을 위한 국제 컨소시엄 구성 등이다. 이 중 DNA 표지인자를 이용한 기술은 전통적인 육종 방법으로 해결하기 힘든 여러 문제들에 대해 해법을 제시해 주고 있는데 대표적인 것들로 i) 양적형질 (QTLs)의 분석 ii) 야생종 등의 유전자원에서 유용유전자의 탐색 및 이용 그리고 iii) 유전자와 환경간의 상호작용에 대한 이해 등을 들 수 있다. 식물 genome 분석 기술의 진보로 양적형질 (QTL)에 관여하는 유전적 변이의 연구가 가능해졌으며, 분자 수준에서 QTL을 정확하게 분석하고 분리하고 있다. 또한 목표유전자의 이전 및 선발에 MAS가 효율적으로 이용될 수 있음을 보고하고 있다.

최근의 분자유전학 연구는 유전자의 탐색 및 분리 그리고 그 기능을 연구하는 기능체 유전학 (functional genomics)으로 그 중심이 옮겨가고 있다. 모델 식물인 애기장대 (*Arabidopsis*)를 선두로 돌연변이원 및 삽입돌연변이주 유기 등을 통한 대규모 돌연변이체 육성, 전체 게놈 발현유전자 프로파일링 및 전염기서열 정보 분석 등을 통해 식물 유전자에 대한 방대한 정보가 축적되어 있다. 애기장대의 경우 2010년까지 전체 유전자의 기능을 밝히기 위한 협의체가 구성되었으며, 벼, 옥수수 등 다른 주요 작물에서도 대규모 돌연변이체 육성, 전체 염기서열 분석, EST와 microarray 연구를 통한 기능체 연구협의체가 구성되고 있다. 이렇게 축적된 방대한 양의 식물체 유전 정보의 홍수 속에서 두 과제가 현안으로 대두되는데 첫째는 식물 간에 유용한 유전 정보를 효과적으로 이용함에 있어 비교유전체학 (comparative genomics)이 얼마나 많은 기여를 하느냐하는 점이고, 둘째는 다양한 식물 유전자와 생합성 경로에 관한 자료로부터 농업적으로 중요한 유전

적 정보를 어떻게 효율적으로 발굴하느냐 하는 것이다. 결국 이 문제에 대한 해답의 제시 여부가 신품종 육성이라는 관점에서 막대한 예산을 투자하여 수행하는 기능체 유전학의 성공 여부를 판가름할 것이다.

비교유전체학은 여러 수준에서 식물 종간 유전 정보를 연계시키는데 큰 기여를 해오고 있다. 먼저 종간에 염기서열이 잘 보존된 DNA 표지인자를 이용 작성된 유전자지도를 비교하여 작물 종간에 상동성이 잘 보존된 염색체 지역을 밝혔는데, 특히 화분과와 가지과 작물에서 많은 연구를 통해 유전자지도 간 synteny 관계를 정립할 수 있었다. 더 나아가 종간 상동성이 높은 염색체 지역의 염기서열 분석을 통해 유전자 수준에서 비교가 가능해 졌는데, 몇몇 결과는 종간 염기서열의 상동성이 유전자가 존재하는 지역에 국한되어 있고 유전자의 배열 순서도 일치하지 않음을 보고하고 있다. 전체 계통 수준에서의 상동성 비교연구도 수행되었는데, 애기장대와 토마토 간 그리고 벼와 애기장대 간의 염기서열 수준에서 상동성이 복잡하게 연결되어 있음을 보고하고 있다. 현재 밝혀진 벼와 애기장대의 전체 염기서열 정보 그리고 수년 내에 밝혀질 주요 작물의 염기서열 간 상동성 비교 분석을 통해 유전자 해석 (gene annotation) 및 유전자 기능 분석 등의 연구가 한층 탄력을 받을 것으로 기대된다.

두 번째로, 방대한 양의 식물 유전자 및 생합성 경로에 대한 정보로부터 농업적으로 중요하고 이용 가능한 유전정보를 효율적으로 탐색하는 것은 매우 어려운 과제인데, 지금의 기능유전체 연구로도 기초적인 분자유전학 현상에 대한 이해를 작물 육종에서의 실질적이고 실용적인 결과로 결부시키는데 커다란 격차가 있다. 이러한 문제에 대한 여러 이유 중의 하나는 작물 육종가가 관심을 가지고 있는 대부분의 형질은 복잡하고 따라서 분자유전학적인 해석이 쉽지 않다는 것이다. 수량성과 수량구성 요소가 좋은 예인데, 이들은 개개의 형질에는 다수의 유전자가 관여하고 환경의 영향을 받기 때문에 표현형 값이 연속적인 분포를 보인다. 돌연변이체 검정 등의 전통적인 유전분석 방법이나 전체 계통 염기서열 분석을 포함하는 포괄적인 기능체 유전학도 작물의 양적형질에 관여되어 있는 분자 수준의 기작을 해석하는데 큰 도움이 되지 못한다. 이에 비해, 양적형질 유전자좌 (QTLs: quantitative trait loci) 분석은 분자표지인자를 이용, 측정이 가능한 형질에 관여하는 염색체의 특정 부분을 확인함으로써 주요 농업형질의 유전적 배경에 대한 직접적인 정보를 제공하여 준다.

특정 환경에서 수량성, 과실 무게, 출수기, 수량구성요소, 진화 관련 특성 등의 주요 형질의 유전분석에 QTL 분석을 이용함으로써 관여하는 유전자의 수 및 염색체 위치, 개개 유전자의 영향력, 상위작용, QTL과 환경과의 상호작용, 그리고 QTL과 유전적인 배경과의 상호작용 등에 대한 전반적인 정보를 얻을 수 있다.

식물에서 QTL 연구를 통해 자연 유전변이 (naturally occurring variation)를 분자유전학적으로 분석하는 연구는 기능유전체학에서의 연구 결과를 실제적인 농업문제의 해결로 연결시킬 수 있는 가교 역할을 할 수 있다. QTL 분석이 돌연변이체 분석 연구보다 유리한 점은 표현형의 차이가 자연 유전변이에 의해 조절되고 특정한 농업 환경에서 관찰되기 때문에 돌연변이 분석보다는 표현형의 차이를 실제로 파악할 수 있다는 것이다. 또한 QTL 분석은 돌연변이 분석 결과를 확인해 줄 수 있는데 이는 분리된 QTL 관련 유전자좌가 돌연변이 유전자좌에 대립관계에 있는지를 밝힘으로써 알 수 있다.

돌연변이를 통한 연구 결과와 농업환경에서의 자연 유전변이 정보를 서로 결합함으로써, QTL 분석은 식물 육종과 분자유전학을 연결해주는 가교 역할을 할 수 있다. 이러한 가교 역할의 출발점은 QTL을 조절하는 유전자의 기능을 밝히는 것인데, 이는 QTLs 관여 유전자의 고밀도 유전자지도 작성과 이 정보를 이용한 QTL 유전자의 positional cloning 및 기능 분석을 통해 가능하다.

이와 같이 분자유전학 분야에서 DNA 표지인자는 고밀도 유전자지도 작성, 주요 질적유전자의 연관표지 개발 및 유전 분석, 양적형질 (QTLs)의 분석, 다양한 유전자원에서 유용 유전자의 탐색 및 이용 등 식물의 유전, 육종 연구 분야에서 널리 이용되고 있다. 앞으로 식물 육종의 방향은 수량의 정체성을 타파하고 다양한 생물적, 환경적 재해를 극복하여 안정생산을 할 수 있는 품종의 유전적 강화가 지속적으로 추진되어야 할 것이다. 이를 위해서는 무엇보다도 다양한 유전자원의 창출 및 개발이 우선되어야 하며 이들을 효과적으로 활용하기 위해서 기존의 육종 기술과 새로운 첨단 기술의 합리적인 접목이 이루어져야 할 것이다. 21세기의 식물 육종은 현재보다 생명공학기술에의 의존도가 높을 것이다.

최근 Genomics 분야에서 개발되는 신기술의 이용으로 양적형질에 관여하는 유전적 요인들을 분자 수준에서 탐색할 수 있게 되었다. 자연변이 연구는 인위적 돌연변이체를 이용하여 식물 유전자의 기능을 밝히는 지금까지의 연구가 가지고

있는 단점을 보완해줄 뿐 아니라 수량, 내재해성, 품질 등 농업적으로 중요한 형질에 대한 보다 효율적, 체계적인 분석 수단을 제공할 것이다. 실험실 분석 기법의 자동화와 이에 따른 비용 및 시간의 절감은 양적형질에 관련된 자연변이를 이용하는데 기여를 할 것이다. 결론적으로 교배와 선발 등의 전통적인 기술과 DNA 표지와 염기서열 분석 등 신기술의 결합은 작물의 양적형질에 관련된 자연변이에 대한 우리의 이해를 크게 증진시킬 것으로 기대한다. 이러한 연구는 작물을 연구하는 전문가들 즉 육종가, 분자유전학자 등 여러 분야의 전문가들의 공동연구가 절실히 요구되는 분야이며 각 전문분야의 강점을 최대한 살리는 방향으로 추진되어야만 단독으로는 불가능했던 연구 과제도 개발할 수 있고, 우수한 연구 결과의 확보와 작물 신품종의 육성도 가속화될 것이다.

제 7 장 참고 문헌

- Bernardo R 2001. What if we knew all the genes for a quantitative trait in hybrid crops? *Crop Sci* 41: 1-4.
- Briggs FN, Knowles PF 1969. Introduction to plant breeding. pp 164. Reinhold books in the biological science.
- Byers et al. 2000. Subtractive hybridization genetic ways and the search for meaning. *J Exp Path* 81: 391-404
- Carson et al. 2002. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Plant Sci*. 162: 289-300
- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu k, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE et al (1994). Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138:1251-1274.
- Ding Y, Johnson MD, Chen WQ, Wong D, Chen YJ, Benson SC, Lam JY, Kim YM, Shizuya H 2001. Five-Color-Based High-Information-Content Fingerprinting of Bacterial Artificial Chromosome Clones Using Type IIS Restriction Endonucleases. *Genomics* 74:142-154.
- Doebley J, Stec A, Hubbard L 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386: 485-488.
- El-Din El-Assal S, Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Raz V, Koornneef M 2001. A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of *CRY2*. *Nat Genet* 29: 435-440.
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD 2000. *fw2.2*: quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85-88.
- Fridman E, Pleban T, Zamir D 2000. A recombinant hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4718-4723.
- Fu H, Dooner HK 2002. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9573-9578.

- Fulton TM et al. 2000. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* X *L. parviflorum* cross. *Theor Appl Genet* 100: 1025-1042.
- Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ 2002. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 298: 2345-2349.
- Goff SA et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* spp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Guy CL 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 41:187-223.
- Hon W C, Griffith M, Chong P, Yang DCS 1994. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye leaves. *Plant Physiol.* 104: 971-980.
- Kim CY et al 1998. A new class II rice chitinase, Rch2, whose induction by fungal elicitor is abolished by protein phosphatase 1 and 2A inhibitor. *Plant Mol. Biol.* 37(3):523-534.
- Kobayashi-Uehara, A, Shimosaka E, Handa H 2001. Cloning and expression analyses of cDNA encoding an ADP-ribosylation factor from wheat: tissue-specific expression of wheat ARF. *Plant Science* 160:535-542.
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M 2002. Hd3: a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* 43: 1096-1105.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee SJ, Suh JP, Oh CS, McCouch SR, Ahn SN 2003. Development of introgression lines of *Oryza rufipogon* in the background of *japonica* rice. *Rice Genet Newsl* 20 (in press).
- Liang P et al. 1993. Distribution and cloning of eucaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21:3269-3275
- Liang P, Pardee AB 2000. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971
- Lions JM 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues

- sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45:386-389.
- Liu J, Van Eck J, Cong B, Tanksley SD 2002. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 13302-13306.
- Mackill DJ 1995. Quantitative trait locus analysis of rice seedling vigor in japonica and indica genetic backgrounds. Third international rice genetic sym. IRRI. Poster 64.
- Morgante M, Salamini F 2003. From plant genomics to breeding practice. *Curr Opin in Biotechnology* 14: 214-219.
- Nie Z, Hirsch DS, Randazzo PA 2003. Arf and its many interactors. *Cur. Op. in Cell Biol.* 15:396-404.
- Osborn TC, Kole C, Parkin IAP, Sharpe AG, Kuiper M 1997. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146: 1123-1129.
- Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahe A, Barthes L, Leonardi A, Prioul JL 1999. *lvr2*, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol Biol* 39: 373-380.
- Pflieger S, Lefebvre V, Caranta C, Blattes A, Goffinet B, Palloix A 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42: 1100-1110.
- Rafalski A 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5: 94-100.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic association in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11479-11484.
- Rhode et al., 1997
- Richmond T, Sommerville S 2000. Chasing the dream: plant EST microarrays. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 108-116.
- Saito K 1995. Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at

- the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breeding Science* 45:337-340.
- Sasaki T 1974. Estimation of the number of genes in the germination ability at low temperature in rice. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 57:301-312.
- Shibata S et al. 1998. Evaluation of seedling establishment of Korean weedy rice under the low temperature. *Proceedings of Int'l Workshop (Japan)* pp. 160-161.
- Shizuya H et al. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8794-8797.
- Soderlund C, Humphray S, Dunham A, French L 2000. Contigs Built with Fingerprints, Markers, and FPC V4.7. *Genome Research* 10:1772-1787.
- Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T, Yano M 2001. *Hd8*: a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity encodes the subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 7922-7927.
- Tanksley SD, Nelson JC 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* 92: 191-203.
- Tanksley SD, McCouch. SR 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063-1066.
- Woo SS et al. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.* 22: 4922-4931
- Yano M 2001. Genetic and molecular dissection of naturally occurring variation. *Curr Opin in Plant Biology.* 4: 130-135.
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T 2000. *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2484.
- Yu J et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. spp. *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Zamir D 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* 2:983-989.

- 농림수산부 1994. 농림수산주요통계. 농림수산부.
- 농촌진흥청 1997. 벼 직파재배 신기술. p. 272
- 농촌진흥청 2002. 쌀 개방화 대응기술. p. 317.
- 농촌진흥청 1999. 실용 벼 직파재배 기술. p. 330.
- 서정필, 안상낙, 문헌팔, 서학수. 1999. 한국 잡초성벼의 유묘기 냉해저항성 양적형질 유전자좌(QTL)분석. 한국육종학회지 31(4):434-439.
- 박현우 2000. 보리 (*Hordeum vulgare* L.)와 왕포아풀 (*Poa pratensis* L.)로부터 내동성관련 유전자의 분리 및 형질전환 담배에서의 발현. 단국대 석사학위 논문.
- 작물시험장 2000. 시험연구보고서 (수도편). pp.547-554.
- 최선희 등. 1986. 벼 약배양에 있어서 Auxin에 대한 품종 반응. 한국육종학회지 18(2) : 174-180.
- 황철호 1999. 식물의 저온반응 및 내성 획득 기작. Current Reviews from BRIC, ver. 2nd. (URL <http://bric.postech.ac.kr/webzine>).

주 의

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