

최 종
연구보고서

DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성
계통 선발

Selection of Resistant Lines to Brown Planthopper Using
DNA Markers in Rice

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
영남농업시험장

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

년 월 일

주관연구기관명 : 경 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 손 재 근

연 구 원 : 김 경 민

권 용 삼

하 원 호

이 중 준

협동연구기관명 : 영남농업시험장

협동연구책임자 : 양 세 준

연 구 원 : 여 운 상

연 구 원 : 곽 도 연

요 약 문

I. 제 목 : DNA Marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

벼멸구(*Nilaparvata lugens* Stal.)는 동남 아시아의 벼 재배지역 일대에 분포하면서 지역에 따라 막대한 경제적 손실을 유발하는 해충이다. 우리나라에서도 벼멸구는 중국 남부지역에서 해마다 날아오는 비래해충으로 연평균 벼 재배면적의 25%에 달하는 면적에 발생하여 8%의 수량 감소를 초래하는 문제 해충이다. 현재 벼멸구 방제는 주로 약제에 의해 이루어지고 있는데, 그 주된 이유는 저항성 품종이 없기 때문이다. 그리고 벼멸구는 벼의 줄기 기부에 서식하고 증식률이 높기 때문에 약제 방제 효과도 매우 낮아 벼멸구 발생면적이 증가하게 되면 살충제의 사용량도 크게 증가할 수밖에 없다. 벼멸구 피해를 최소화하고 약제 방제의 문제점을 해결하기 위해서는 저항성 품종의 육성·보급이 무엇보다 중요한 선결과제일 것이다.

그러나 지금까지 밝혀진 벼멸구 저항성 인자는 모두 인디카형 벼에서 유래되었고 이들의 저항성 유전자를 자포니카에 도입할 경우 저항성 반응이 상이할 뿐만 아니라 인디카의 열악한 형질마저 수반되어 양질이면서 벼멸구에 저항성인 품종 육성을 어렵게 하고 있다.

최근 분자생물학이 발전하면서 병·해충 저항성을 포함한 여러 가지 농업형질 개량에 DNA marker를 이용하는 사례가 여러 작물에서 보고되고 있다. 벼의 경우 gall midge나 도열병에 대한 저항성 유전자의 mapping 및 marker와의 관계분석이 보고되었으며, 밀이나 보리 등의 주요 작물을 중심으로 각종 병해충에 대한 저항성 관련 marker의 탐색과 유전자 mapping 연구가 수행되고 있는 실정이다. 벼멸구 저항성 품종 육성분야에서도 분자 marker의 개발과 이용에 관한 연구 결과가 단편적으로 보고되고 있다. DNA marker를 이용한 저항성 품종 육성이 체계화된다면 지금까지 문제점으로 지적되어 왔던 생물검정의 복잡성과 부정확성을 극복할 수 있고 열악형질의 제거뿐만 아니라 생육시기에 구애됨이 없이 저항성 개체를 선발할 수 있어서 저항성 육종효율이 크게 개선될 수 있을 것이다. 이와 같이 DNA marker를

이용해 유용형질을 선발하는 MAS(Marker-assisted selection)의 육종적 이용성과를 높이기 위해서는 우선 개발된 marker가 목표형질에 밀접하게 연관되어 있어야 하고 경제적이면서 높은 재현성을 나타내는 것이 필수적이다. 그리고 양질성 자포니카형 품종들이 확대 재배되고 있는 우리나라의 경우는 인디카형의 벼멸구 저항성 유전자원을 직접 이용하는 것보다는, 인디카형과 자포니카형의 교잡에 의해 육성된 통일형 품종들의 저항성 인자를 양질성 품종에 도입하는 것이 육종 효율면에서 효과적일 것이다.

따라서 본 연구과제에서는 벼멸구 저항성 유전자의 mapping을 위해 벼멸구에 저항성인 통일형 품종에 자포니카형 품종을 교잡시킨 잡종 세대(F_1)의 약을 배양하여 DH(doubled haploid) 집단을 육성하고 벼멸구 저항성과 DNA markers와의 관계 분석을 통해 벼멸구 저항성과 관련된 연관 marker를 개발하였다. 그리고 저항성 인자가 도입된 잡종집단에 자포니카형 교배 모본을 반복친으로 여교잡 시키면서 세대별로 생물검정과 DNA marker 분석을 병행하여 MAS 체제를 구축하고 이를 저항성 개체 선발에 직접 활용하여 벼멸구 저항성 계통선발 효율을 향상시킬 목적으로 본 연구를 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발과 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용의 협동 과제로 구성되어 있으며, 5년 동안 수행된 주요 연구 개발 내용과 범위를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

세부과제 : DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	◇ Doubled haploid(DH) 집단육성 ◇ Parent에 대한 marker screening	o. 청청벼/낙동벼, 삼강벼/낙동벼 조합의 F ₁ 약배양 o. Parent에 대한 marker screening
2차년도 (1999)	◇ Mapping 집단 작성 및 양친에 대한 marker 검정 ◇ Doubled haploid(DH) 집단육성	o. RFLP 및 RAPD marker와 F ₂ 개체별 genomic DNA와의 관계분석 o. 컴퓨터 program을 이용한 연관군 작성 o. 벼멸구 저항성과 관련된 유전자의 mapping. o. 약배양에 의한 DH 집단의 양성과 특성조사
3차년도 (2000)	◇ DH 집단을 이용한 유전자 지도 작성 ◇ 여교잡 세대의 약배양을 통한 DH 집단양성	o. RFLP 및 RAPD marker와 DH 집단의 개체별 genomic DNA와의 관계분석 o. 컴퓨터 program에 의한 연관군 작성 o. 벼멸구 저항성과 관련된 유전자의 mapping o. F ₂ 집단과 DH 집단과의 유전자 지도 비교 분석
4차년도 (2001)	◇ DH 집단육성 ◇ Marker-assisted Selection	o. BC ₅ F ₁ 약배양에 의한 DH계통육성 o. 여교잡 집단의 벼멸구 검정과 우량계통선발
5차년도 (2002)	◇ Marker-assisted Selection	o. STS marker의 개발과 벼멸구 저항성과의 관계 분석 o. DNA marker에 의한 벼멸구 저항성 원의 구명 o. 벼멸구 저항성 계통의 선발

협동과제 : 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	◇ 인공교배 및 잡종집단 육성	o. 벼멸구 저항성 품종과 감수성 품종 간의 인공 교배(‘청청벼/낙동벼’, ‘삼강벼/낙동벼’) o. F ₁ , F ₂ 및 ‘낙동벼’를 반복친으로 이용한 BC ₁ F ₁ 양성
2차년도 (1999)	◇ 여교잡에 의한 중간모본선발	o. 2 조합의 BC ₂ F ₁ 및 BC ₃ F ₁ 양성 o. 벼멸구저항성 검정 및 유전양식 구명 o. 약배양 집단에 대한 벼멸구 저항성 검정
3차년도 (2000)	◇ 여교잡에 의한 중간모본선발	o. 2조합의 BC ₄ F ₁ 및 BC ₅ F ₁ 양성 o. 벼멸구검정에 의한 저항성 계통선발
4차년도 (2001)	◇ 자포니카 저항성 계통선발	o. BC ₅ F ₂ 및 BC ₅ F ₃ 양성 o. 벼멸구검정 및 DNA marker에 의한 저항성 계통선발
5차년도 (2002)	◇ 자포니카 저항성 계통선발	o. BC ₅ F ₄ 및 BC ₆ F ₄ 양성 o. 벼멸구 검정 및 DNA marker에 의한 저항성 계통선발 o. 벼멸구 저항성 ‘밀양198호’선발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

본 연구과제는 DNA maker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발을 위하여 1개의 세부과제와 1개의 협동과제로 수행하였다.

1. 세부과제 : DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발

- 가. 벼멸구 저항성 인자의 mapping을 위하여 두 조합의 잡종집단(F₁)에 대한 약배양을 실시하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서 201계통, ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서는 96계통의 DH 집단을 양성하였다.
- 나. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 집단 88 계통에 대한 벼멸구 저항성 반응을 7회에 걸쳐 검정한 바 40 계통이 저항성 반응을, 48 계통은 감수성 반응을 나타내었다.
- 다. 2002년 하계 포장에 계통 재배된 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 DH 집단 139계통을 대상으로 수장, 수수, 3절 간장 및 출수 일수를 조사한 바, 비교적 넓은 변이폭을 가지면서 정규분포에 가까운 연속적인 변이를 나타냈고, ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 DH 집단에서도 이와 유사한 변이분포 양상을 나타내었다.
- 라. ‘삼강벼’와 ‘낙동벼’의 genomic DNA를 재료로 이용하여 양친에 다형성을 나타내는 marker로 RFLP 128개, SSR 126개 및 RAPD 220개를 선발하였고, RFLP marker 128개 중에서 벼멸구 저항성 유전자(*Bph1*)가 위치한 12번 염색체상에서 codominant를 나타내는 9개의 marker를 확인하였다.
- 마. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 집단의 벼멸구 저항성과 DNA marker와의 연관분석에서 ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성은 RFLP marker인 G258과 가장 밀접하게 연관되어 있었다. 연관분석 결과로 작성된 12번 염색체의 연관지도는 전체 길이가 56.4 cM 이고 marker간 평균 거리는 6.3 cM 이었다. 그리고 ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성 유전자는 G258과 4.1cM 거리로 연관되어 있었다.

- 바. Isozyme marker인 Sdh1에 대한 국내 육성 벼품종들의 allele type을 분석한 바, 자포니카형 저항성 품종인 ‘밀양 65호’의 Sdh 대립유전자형은 type II로 분석되었고, 대다수의 저항성 품종은 type I으로 나타났다. 통일형 및 인디카형 품종의 경우는 ‘향미벼 1호’가 type II이고, ‘청청벼’가 type IV, 그 외 모든 품종은 type I으로 분석되었다. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 집단의 개체별 저항성 정도와 Sdh isozyme marker와의 연관분석을 실시한 바, 9.9%의 조환가를 나타내었다.
- 사. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 집단 35계통의 벼멸구 저항성과 DNA marker와의 연관분석을 실시한 바, 9개의 marker에서 고도로 유의한 결과를 나타내었다. 특히, 벼멸구 저항성과 G258, RG901 및 G402간에 조환가가 6.2%로 가장 낮았고 LOD 값도 가장 높게 나타났다.
- 아. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 계통을 재료로 bulked segregant analysis(BSA)에 의해 11개의 RAPD marker를 찾아 벼멸구 저항성과의 연관분석에서 저항성 유전자와 4.4cM 거리로 밀접하게 연관된 ‘OPE18’을 선발하였다.
- 자. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 BC₅F₁의 약을 배양하여 18계통의 완전 저항성 계통을 육성하고, 이들 중 제반 특성이 양호한 계통을 양질성 품종과 교배하여 4조합의 우량계통을 육성 중에 있다.
- 차. 벼멸구 저항성과 연관된 것으로 밝혀진 OPE18₉₂₃을 STS marker로 전환시켜 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 집단을 대상으로 한 관계 분석에서 STS marker는 벼멸구 저항성 유전자와 3.9cM 거리로 밀접하게 연관되어 있는 것으로 밝혀졌다.
- 카. STS marker와 국내외에서 육성된 벼 19품종의 벼멸구 저항성과의 관계를 분석한 바, marker의 genotype에 따라 벼멸구 저항성 source가 뚜렷이 구분되었는데, 국내에서 육성된 ‘영풍벼’, ‘한강찰벼’, ‘백운찰벼’, ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성 유전자는 ‘TKM6’에서 유래한 것으로 분석되었다.

2. 협동 과제 : 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용

- 가. ‘청청벼’와 ‘삼강벼’를 자방친으로 하고 낙동벼를 화분친으로 인공교배하여 ‘청청벼/낙동벼’ 및 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서 각각 114립과 62립의 교배립을 채종하였다. 두 조합의 F₁에 낙동벼를 반복친으로 2002년 동계에 이르기까지 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 경우 BC₁F₁~BC₅F₁ 세대에 이르는 교배립을 얻을 수 있었으며, ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 경우 BC₁F₁~BC₆F₁ 세대까지 채종하였다.
- 나. ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 BC₃F₃ 세대 286 계통에 대한 벼멸구 저항성 검정에서 저항성 계통으로 선발된 103계통은 2003년 하계 포장에 재배하여 특성 검정중에 있다. ‘삼강벼/낙동벼^{*7}’ 조합의 BC₅F₃세대 276계통과 BC₆F₃ 세대 85 계통에 대한 주요 작물학적 특성과 미질 검정을 실시하여 미립의 외형적 특성이 양호하고 심·복백이 거의 없는 BC₆F₃ 세대 33계통을 선발하였다.
- 다. ‘삼강벼’와 ‘낙동벼’가 교배된 조합의 F₁, BC₁F₁ 및 F₂ 집단에 벼멸구를 접종한 결과, F₁은 모두 저항성, F₂ 298개체와 BC₁F₁ 39개체는 저항성과 감수성이 각각 3 : 1과 1 : 1의 이론적 분리비에 적합한 것으로 조사되었고, ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 F₂ 집단에서도 저항성과 감수성의 분리비가 3 : 1로 분석되었다.
- 라. 자포니카형이면서 벼멸구에 저항성인 ‘밀양64호’에 양질성계통인 ‘밀양165호’가 교배된 F₄ 집단에 대한 벼멸구 저항성과 주요 농업형질과의 관계 분석을 실시한 바 벼멸구 저항성은 출수기와는 유의성이 없었으나 간장, 3절 간장, 모멘트 및 도복지수와는 고도의 유의성이 인정되었다.
- 마. ‘밀양165호/밀양64호’ 조합의 RIL집단에 대한 QTL 분석에서 ‘밀양64호’의 벼멸구 저항성은 도복관련 형질인 간장, 중심고, 3절간장, 모멘트 및 도복지수에 관여하는 QTL과 연관된 것으로 분석되었다.

바. 자포니카형이면서 벼멸구 저항성인 ‘밀양64호’보다 수량성이나 미질이 우수한 벼멸구 저항성 품종을 개발하기 위하여 양질성 계통인 ‘밀양165호’(‘주남벼’)를 반복친으로 ‘밀양64호’와 여교잡을 실시하여 잡종집단을 육성하였다. 이들 여교잡 집단을 대상으로 isozyme marker에 의한 저항성 개체의 선발과 주요 작물학적 특성을 조사하였다. 2000년 하계 포장에 공시된 BC₃F₄ 세대 23계통 중에서 벼멸구에 저항성이면서 양질성인 YR21258-GH2를 선발하고 지난 2년동안의 생산력 검정 시험을 거쳐 ‘밀양198호’란 계통명을 부여하여 2003년 지역적응성 시험을 거친후 2004년에 신품종으로 등록할 예정이다.

제 2 절 활 용 에 대 한 건 의

1. 본 과제에서 개발된 DNA marker는 금후 잡종집단의 벼멸구 저항성 개체 선발에 직접 활용될 수 있고 특히 벼의 생육시기에 구애됨이 없이 저항성 개체 선발이 가능함
2. 본 연구에서 양성된 자포니카형 벼멸구 저항성 계통들은 금 후 양질이면서 벼멸구에 저항성인 신품종 개발에 중간모본으로 직접 활용될 수 있을 것임
3. 벼멸구 저항성 유전자와 밀접하게 연관되어 있는 DNA marker를 선발하여 이를 MAS 체계확립 및 map-based cloning에 활용
4. DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 source의 분류 결과는 다양한 벼멸구 생태형에 복합적인 저항성 품종육종에 활용
5. 벼멸구 저항성 유전자와 주요 농업형질과의 관계 분석에서 작성된 유전자 지도와 선발된 DNA marker들은 벼멸구 저항성 품종육성에서 문제가 되고 있는 열악형질 제거에 직접 활용될 수 있음
6. 벼멸구에 저항성이면서 양질성 계통으로 선발된 ‘밀양198호’를 신품종으로 등록하여 벼멸구 피해 상습지에 우선 보급
7. 본 연구에서 개발된 DNA marker이용 체계는 벼의 다른 병해충에 대한 분자유종기술 확립에 기초 자료로 활용

SUMMARY

I . TITLE

Selection of Resistant Lines to Brown Planthopper Using DNA Markers
in Rice

II. OBJECTIVE AND NECESSITY

Brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* stal, which is widely distributed throughout southeast Asia, is one of the most serious insect pests of rice. The BPH immigrates from southern parts of China to Korea in the early summer every year. In Korea, 25% of rice cultivation areas have been affected annually by the BPH. Annual yield loss due to the insect has been estimated at about 8% of total yield. The BPH pest has been usually controlled by spraying pesticide because all of the japonica rice currently cultivating in Korea are susceptible to the insects. BPH inhabits and propagates rapidly on the basal parts of rice stem. Because it sucks the phloem saps of rice plant and causes a severe damage symptom known as hopper-burn, the efficiency of chemical control is very low compared with other insect pests. Therefore, high infestation of BPH gives to use more chemicals in rice field.

Until now 12 BPH resistance genes have been identified in indica rice, but it was not discovered in japonica rice. It was reported that the reaction of rice cultivars to BPH was different from the varietal groups, japonica and indica, at early stages of rice seedlings (Yeo & Sohn, 1995). Breeding efforts to combine the high grain quality of japonica rice with BPH resistance from indica rice have been generally unsuccessful. It seemed to suggest that deleterious linkages between BPH resistance gene and agronomically important traits such as grain quality, lodging-related traits, and so on (Yeo & Sohn, 2001).

Recently, the improvement of agronomically useful characters including disease and insect resistance using DNA markers have been reported in several crops such as rice, wheat, maize, and etc. In rice, resistant genes to gall midge and blast were mapped, and linkage between DNA markers and their resistant genes was analyzed using DNA markers. Linkage maps of genes associated with resistance of diseases and insect pests have been constructed in wheat, barley, and other economically important crops. Effort have also been made to determine the DNA markers related to BPH resistance and its use to select the resistant plants in breeding programs. If marker-assisted selection is available for the development of resistant cultivars, the bioassay efficiency required for the selection of resistant lines can be remarkably improved with more accuracy. At the same time, selection of the marker genotypes at any growth stage with minimal linkage drag associated with the target gene will be greatly helpful to improve the breeding program for resistance to diseases and insect pests. For the best utilization of DNA markers in breeding program, it is essential that the developed DNA marker should be closely linked with the target gene and highly repeatable. It may be more effective to use Tongil type rice (indica/japonica) as a resistant source than direct introduction of indica sources into japonica rices with good grain quality.

For the tagging of BPH resistance gene, we developed doubled haploid populations through anther culture of F₁ plants derived from the crosses between Tongil type resistant cultivars and susceptible japonica rice. This study aimed at the selection of DNA markers closely linked BPH resistance gene and the facilitating marker-assisted selection in breeding program for BPH resistance.

III. Contents and Scopes of the Study

This project consists of one subject and joint subject. The former is selection of resistant lines to brown planthopper using DNA markers in rice. The latter is development of mid-parent lines with resistance to brown planthopper in rice. The major contents and scopes of this project studied during 5 years from 1998 to 2003 can be summarized as follows ;

1. Selection of resistant lines to brown planthopper using DNA markers in rice

Year	Research objectives	Contents and scopes of study
1st yr. (1998)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Development of doubled haploid(DH) population ◇ Marker survey in parents 	<ul style="list-style-type: none"> o. Anther culture of F₁ plants from the crosses 'Cheongcheongbyeo(C)/Nagdongbyeo(S)' and 'Samgangbyeo(S)/Nagdong byeo(N)' o. Marker screening to parent cultivars of two crosses, 'C/N' and 'S/N'
2nd yr. (1999)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Construction of mapping population and marker analysis ◇ Development of doubled haploid(DH) population 	<ul style="list-style-type: none"> o. Linkage analysis between DNA markers and genomic DNA of F₂ plants from a cross 'S/N' o. Construction of linkage group using computer program o. Mapping of gene associated with BPH resistance using F₂ population from 'S/N' o. Development of DH population through anther culture of F₁ plants from 'S/N' and 'C/N' o. Evaluation of major agronomic characteristics in DH population.

3rd yr. (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Construction of genetic map using DH population ◇ Development of DH population through anther culture of backcrossed lines 	<ul style="list-style-type: none"> o. Linkage analysis between DNA markers and genomic DNA of DH population from a cross 'S/N' o. Construction of linkage group using computer program o. Mapping of gene associated with BPH resistance o. Comparison of genetic maps between DH and F₂ population
4th yr. (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Development of DH population in backcrossed population ◇ Marker-assisted selection 	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of DH population by anther culture of BC₅F₁ from 'S/N'^{*6} o. Screening for BPH resistance of DH lines from 'S/N'^{*6} o. Selection of BPH resistant lines from DH population
5th yr. (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Marker-assisted selection 	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of STS marker related to BPH resistance o. Linkage analysis between BPH resistance and STS marker o. Classification of BPH resistant source using DNA markers o. Selection of promising lines with BPH resistance

2. Development of mid-parent lines with resistance to brown planthopper in rice

Year	Research objective	Contents and scopes of study
1st yr. (1998)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Development of hybrid population 	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of hybrid population by artificial crossing between resistant cultivars 'Samgangbyeo' & 'Cheongcheongbyeo' and a susceptible cultivar, 'Nagdongbyeo' o. Development of F₁, F₂, and BC₁F₁ population using a recurrent parent, 'Nagdongbyeo'

2nd yr. (1999)	◇ Selection of mid-parent by backcross	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of BC₂F₁ and BC₃F₁ population from the crosses o. Genetic analysis of BPH resistance in two crosses, 'S/N' and 'C/N' o. Screening of DH population for BPH resistance
3rd (2000)	◇ Selection of mid-parent by backcross	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of BC₄F₁ and BC₅F₁ population from the crosses o. Selection of resistant lines by screening of BPH resistance in backcrossed population
4th (2001)	◇ Selection of japonica lines with resistance to BPH	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of BC₅F₂ and BC₅F₃ lines o. BPH screening of backcrossed population o. Selection of BPH resistant lines using DNA markers
5th (2002)	◇ Selection of resistant lines to BPH in japonica rices	<ul style="list-style-type: none"> o. Development of BC₅F₄ and BC₆F₄ lines o. Selection of BPH resistant lines using DNA markers o. Development of a elite line 'Milyang198' with BPH resistance and good grain quality

IV. RESULTS AND APPLICATIONS

1. Results of this study

This study was carried out to select the BPH resistant lines using DNA markers in rice. The research projects consists of one subject for "the selection of resistant lines to BPH using DNA markers" and one joint subject for "development of mid-parent lines with resistance to BPH". The results were summarized as follows ;

(1) Result on 「Selection of resistant lines to brown planthopper using DNA markers in rice」

- ① Two doubled haploid (DH) population consisting of 201 and 96 pure-lines were established by anther culture of F₁ hybrids from 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo' and 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo'.
- ② Segregation analysis using 88 DH lines from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo' showed a fit to 1 (40) : 1(48) ratio for resistance and susceptibility.
- ③ Segregation modes for plant height, panicle length, number of panicles / hill, 3rd internode length and days to heading in the 139 DH lines from a cross, 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo', showed nearly normal distributions with comparatively wide range of variation. The modes of frequency distribution for the major agronomic characters of DH population from 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo' were similar to those of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.
- ④ A total of 474 polymorphic markers (including 128 RFLPs, 126 SSRs, and 200 RAPDs) were selected by the parent survey of a cross 'Samgangbyeo/ Nagdongbyeo'. It was confirmed that 9 markers among

32 RFLPs located on chromosome 12 showed co-dominant patterns between parents.

- ⑤ In linkage analysis between BPH resistance gene (*Bph1*) and DNA markers using F₂ population of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo', the resistance gene of 'Samgangbyeo' was closely linked with G 258 at a distance of 4.1cM .
- ⑥ In the analysis of Sdh isozyme for 43 rice cultivars, 4 japonica cultivars with resistance to BPH showed type I allele of Sdh-1, but 'Milyang65' among japonica resistant cultivars showed type II allele. Among 11 Tongil and indica rices, Hyangmibyeo I showed type II allele, 'Cheongcheongbyeo' belonged to type IV, and other cultivars showed type I allele of Sdh-1. The recombination value between Sdh-1 and BPH resistant gene was 9.9% in the linkage analysis between Sdh-1 and BPH resistance of F₂ population from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.
- ⑦ Linkage analysis between 9 DNA markers and *Bph1* using DH population derived from 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo' showed that BPH resistant gene of 'Samgangbyeo' was linked at the recombination value of 6.2% with 3 RFLP markers, G258, RG 901, and G 402, on chromosome 12.
- ⑧ Bulk segregant RAPD analysis was employed for the identification of DNA markers linked to BPH resistance genes in the DH population from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'. Eleven primers of 220 RAPDs revealed polymorphism between resistant bulk and susceptibility one. Of the 11 markers, one primer, OPE 18 was closely linked to BPH resistant gene with a distance of 4.4cM in the linkage analysis between DNA markers and BPH resistance of DH population.
- ⑨ Eighteen homozygous lines with BPH resistance were developed by

anther culture of BC₅F₁ plants derived from 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'^{*6}. Some promising lines with BPH resistance have been selected from the hybrid population made by using the DH lines.

- ⑩ A RAPD marker, OPE 18₉₂₃, linked to BPH resistant gene was converted to the STS marker to facilitate the marker-assisted selection (MAS). Co-segregation of this marker with *Bphl* was verified by using an F₂ population from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'. The STS marker was closely linked to *Bphl* with a distance of 3.9cM
- ⑪ The STS marker proved to be highly significant in the association between marker genotype and phenotypes of rice cultivars. The genotypes of the markers showed completely correspondence with the phenotypes of *Bphl* originated form TKM 6.

(2) Results on 「Development of mid-parent lines with resistance to brown planthopper in rice」

- ① To develop the mid-parent lines with BPH resistance, two hybrid population were produced from the crosses between two BPH resistant Tongil type cultivars, 'Samgangbyeo' and 'Cheongcheongbyeo', and a susceptible japonica rice, 'Nagdongbyeo'. A total of 114 crossed seeds were harvested from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo' and 62 F₁ seeds from 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo' in 1998. The backcross population (BC₁F₁ to BC₅F₁) of two crosses have been developed using 'Nagdongbyeo' as recurrent parent from 1998 to 2002.
- ② A total of 103 resistant lines were selected by screening BPH resistance for 286 BC₃F₃ lines derived from a cross 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo'^{*4}. Thirty-three BC₆F₃ lines with BPH resistance and good grain quality were selected by BPH bioassay and quality test for 85 BC₆F₃ lines from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'^{*7}.

- ③ The F₁ plants of two crosses, 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo' and 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo', was resistant to BPH biotype 1. Segregation analysis using F₂ population of the two crosses revealed a fit to 3:1 ratio for resistance and susceptibility.
- ④ Relationship between BPH resistance and major agronomic trait was analyzed using 318 F₄ lines derived from a cross between a japonica susceptible line, 'Milyang 165', a japonica resistant line, 'Milyang64'. Culm length, 3rd internode length, moment, and lodging index of resistant population were significantly greater than those of susceptible ones.
- ⑤ In QTL analysis for 8 agronomic traits of 170 recombinant inbred lines (RILs) from a cross 'Miyang165/ Milyang64', the QTLs associated with the lodging-related characters such as culm length, height of center gravity, 3rd internode length, moment, and lodging index were linked to BPH resistance of 'Milyang64'.
- ⑥ To develop a japonica type resistant cultivar which is superior to 'Milyang64' in yield and grain quality, an elite japonica cultivar, 'Milyang165', was crossed with a japonica resistant cultivar 'Milyang64' and the progeny was backcrossed with 'Milyang165' as recurrent parent to produce backcross progeny. Plant selection from the population has been continued with screening BPH resistance using DNA marker and evaluating of agronomic characteristics from 1999 to 2002. A promising resistant line, YR21258-GH2, was selected from BC₃F₄ progeny of 'Milyang165^{*4}/Milyang64' and designated as 'Milyang198' in 2002.

2. Applications of this study

- (1) The DNA marker that was developed in this project could be utilized directly in the selection of resistant plant to brown planthopper from the hybrid population introduced resistant gene. Especially, selection system of resistant lines using DNA markers will be available to any growth stages of rice.
- (2) The promising resistant lines selected in this study can be utilized as mid-parent to develop a new cultivar with BPH resistance.
- (3) The DNA markers closely linked with BPH resistant gene may be employed to the MAS system for selection of resistant lines and to the map-based cloning of BPH resistant gene.
- (4) Classification system of BPH resistant sources by DNA markers is available for the development of a resistant cultivar with several BPH resistant genes.
- (5) The results obtained from the linkage analysis between DNA markers and major agronomic characters can be applied to eliminate the deleterious characters related to BPH resistance.
- (6) A promising line, 'Milyang198', which has BPH resistance and good grain quality will be registered and released to farmer's field.
- (7) The marker-assisted selection developed in this study can be applied to establish the molecular breeding system for improvement of resistance to diseases and insect pests of other crops.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of project	27
1-1. Objective and necessity	27
1-2. Contents and scopes	28
Chapter 2. Current status of technical development in foreign countries and Korea	30
1-1. Status of the related techniques	30
1-2. Prospect and propriety of technique introduction	32
Chapter 3. Selection of BPH resistant lines using DNA markers	33
3-1. Introduction	33
3-2. Materials and Methods	34
3-3. Development of DH population and evaluation of their agronomic characteristics	39
1. Development of DH population	
2. Evaluation of major agronomic characteristics in DH population	
3-4. Development of mapping population and DNA marker screening to parent cultivars	43

1. Marker survey in parents	
2. Linkage analysis between BPH resistance and DNA markers	
3-5. Mapping of BPH resistant gene using DH population	50
1. Linkage analysis between BPH resistance and DNA markers	
2. Gene mapping	
3-6. Breeding of DH lines by anther culture of backcrossed population(BC ₅ F ₁) ·	55
3-7. Selection of BPH resistant lines using DNA markers	58
1. Linkage analysis between BPH resistance and STS marker	
2. Classification of BPH resistant sources using STS marker	
Chapter 4. Development of mid-parents lines with resistance to BPH in rice ·	64
4-1. Introduction	64
4-2. Materials and Method	65
4-3. Development of backcross population and evaluation of their major agronomic characteristics	68
4-4. Screening of BPH resistance and genetic analysis	72
4-5. Relationship between BPH resistance and major agronomic characteristics	73
4-6. Breeding of a promising line 'Milyang198' with BPH resistance	76
1. Breeding details of 'Milyang198'	
2. Major agronomic characteristics of Milyang198	
3. Parentages and pedigree diagrams of Milyang198	

Chapter 5. Research goals and contribution in the related field	90
5-1. General plan for the research	90
5-2. Accomplishment of research goal	91
5-3. Contribution of this study to the related field	93
Chapter 6. Application plans of the results studied in this project	94
6-1. Application fields and plans	94
6-2. Additional plans for technical development	95
Chapter 7. Oversea information of science and technology collected during the research	96
Chapter 8. Reference	97

목 차

제 출 문	1
요 약 문	3
SUMMARY	11
CONTENTS	21
목 차	24
제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 1 절 연구 개발의 필요성 및 목적	27
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	28
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	30
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황	30
1. 관련 기술의 현황	
2. 문제점	
제 2 절 앞으로의 전망과 기술도입의 타당성	32
1. 앞으로의 전망	
2. 기술도입의 타당성	
제 3 장 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발	33

제 1 절 서 론	33
제 2 절 재료 및 방법	34
제 3 절 DH 집단 의 육성과 주요 농업형질조사	39
1. DH 집단 육성	
2. DH 계통의 주요 특성 조사	
제 4 절 Mapping 집단 작성 및 양친에 대한 marker 검정	43
1. 양친에 대한 marker 검정	
2. 벼멸구 저항성과의 관계분석 및 유전자 지도 작성	
제 5 절 DH 집단을 이용한 유전자 지도 작성	50
1. DH 집단을 이용한 연관분석	
2. 유전자 지도작성	
제 6 절 여교잡 집단의 DH 계통 육성	55
제 7 절 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발	58
1. 벼멸구 저항성 관련 STS marker의 개발 및 연관분석	
2. 벼멸구 저항성원의 구분	
제 4 장 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용	64
제 1 절 서 론	64
제 2 절 재료 및 방법	65
제 3 절 여교잡 집단의 육성과 주요 특성 조사	68
1. 잡종 집단 육성	
2. 여교잡 집단의 주요 특성조사 및 선발	

제 4 절 벼멸구 저항성 검정 및 유전분석	72
제 5 절 벼멸구 저항성과 주요 농업형질과의 관계	73
제 6 절 벼멸구 저항성 계통 ‘밀양198호’ 선발	76
1. 육성경위	
2. ‘밀양198호’의 주요 특성	
3. 육성 경과	
제 5 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	90
제 1 절 총괄 추진계획표	90
제 2 절 연구개발 목표의 달성도	91
1. 세부과제	
2. 협동과제	
제 3 절 관련분야의 기술발전예 기여도	93
제 6 장 연구개발결과의 활용계획	94
제 1 절 활용분야 및 활용 방안	94
1. 활용분야	
2. 활용방안	
제 2 절 추가 기술개발 방안 및 조치사항	95
제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	96
제 8 장 참고 문헌	97

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

벼멸구(*Nilaparvata lugens* Stal.)는 동남아시아의 모든 벼 재배국가에서 발생하며 우리 나라에서도 큰 피해를 입히고 있다. 벼멸구는 6월 중 하순경 중국 남부 지역으로부터 장마전선을 타고 우리나라로 날아와 포장에서 3~4세대 발생하는 비래해충으로 월동하지는 못하는 것으로 알려져 있다. 벼멸구로 인한 피해는 1960년대 이후 산발적으로 발생되다가 1975년과 1997년에는 전국적으로 크게 발생한 바 있다. 벼멸구는 특히 벼의 엽초부위에서 서식하므로 약제 방제에 어려움이 있을 뿐만 아니라 증식력이 높아 우리나라에서는 연평균 벼 재배면적의 약 25%에 해당하는 면적에 발생하여 무방제시 8%의 수량감소를 가져온다고 한다.

이 해충에 대한 방제는 근년에 들어 병해충에 복합 저항성이었던 통일형 품종들이 장려품종에서 완전히 제외됨으로서 대부분 약제방제에 의존하고 있으며 이러한 살충제의 남용은 인간·동식물에 대한 피해 및 환경생태계에 악영향을 미칠 뿐만 아니라 막대한 경제적 손실을 초래할 가능성마저 배제할 수 없다. 벼멸구로 인한 벼의 피해를 최소화하고 약제방제로 인한 문제점을 해결하기 위해서는 벼멸구에 저항성인 품종을 육성 보급하는 것이 가장 효과적인 방안으로 알려져 있다.

현재 우리나라의 장려 품종들은 대부분이 자포니카형 품종으로서 이들 품종에는 벼멸구에 저항성을 가진 유전자원이 없는 것으로 알려져 있어 이에 대한 저항성 품종육성을 위해서는 인디카로부터 원연교잡에 의한 중간모본 육성이 선행되어야만 한다.

지난 수십년 동안 국내의 벼육종 연구진은 인디카 형의 저항성 유전자원을 자포니카형에 도입하여 벼멸구에 저항성이면서 양질다수성인 자포니카 신품종 개량에 주력해 왔지만 현재까지도 벼멸구에 저항성이면서 제형질이 우수한 자포니카형 품종은 육성되지 못하고 있는 실정이다. 이는 기존의 교배육종법과 검정체계만으로는 이 문제를 해결하기 어렵다는 것을 잘 입증해주고 있다.

근년에 벼멸구 저항성 유전자는 인디카형의 여러 가지 열악형질과 밀접하게 연

관되어 있기 때문에 자포니카형 실용품종 육성에 여러 가지 어려움이 있다는 지적도 있다(Yeo & Sohn, 1995).

분자생물학이 발달하면서 DNA marker를 이용한 농작물의 유전자 지도작성과 이들 표지인자를 유용형질 선발에 이용하는 분자유종법이 개발되고 있는데 이 방법은 기존의 육종효율을 크게 증진시킬 것으로 전망되고 있고, 작물에 따라서는 이미 상당한 성과를 얻고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발을 목적으로 mapping 집단의 육성과 유전자지도 작성, 벼멸구 저항성과 관련된 DNA marker의 개발, 벼멸구 저항성 개체선발을 위한 MAS체제 구축 등에 관한 일련의 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구 개발은 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발이라는 세부과제 하에 약배양에 의한 DH 집단 육성, 벼멸구 저항성과 관련된 DNA marker의 선발과 유전자 지도작성을 수행하였으며, 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용이라는 협동과제로 잡종집단 육성과 벼멸구 저항성의 유전양식 구명 등에 관한 연구를 수행하였다. 수행한 주요 연구내용과 범위를 요약하면 다음과 같다.

세부과제 : DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	◇ Doubled haploid(DH) 집단육성 ◇ Parent에 대한 marker screening	o. 청청벼/낙동벼, 삼강벼/낙동벼 조합의 F ₁ 약배양 o. Parent에 대한 marker screening
2차년도 (1999)	◇ Mapping 집단 작성 및 양친에 대한 marker 검정 ◇ Doubled haploid(DH) 집단육성	o. RFLP 및 RAPD marker와 F ₂ 개체별 genomic DNA와의 관계분석 o. 컴퓨터 program을 이용한 연관군 작성 o. 벼멸구 저항성과 관련된 유전자의 mapping. o. 약배양에 의한 DH 집단의 양성과 특성조사

3차년도 (2000)	◇ DH 집단을 이용한 유전자 지도 작성 ◇ 여교잡 세대의 약배양을 통한 DH 집단양성	o. RFLP 및 RAPD marker와 DH 집단의 개체별 genomic DNA와의 관계분석 o. 컴퓨터 program에 의한 연관군 작성 o. 벼멸구저항성과 관련된 유전자의 mapping o. F ₂ 집단과 DH 집단과의 유전자 지도 비교 분석
4차년도 (2001)	◇ DH 집단육성 ◇ Marker-assisted Selection	o. BC ₅ F ₁ 약배양에 의한 DH계통육성 o. 여교잡 집단의 벼멸구 검정과 우량계통선발
5차년도 (2002)	◇ Marker-assisted Selection	o. STS marker의 개발과 벼멸구 저항성과의 관계 분석 o. DNA marker에 의한 벼멸구 저항성원의 구명 o. 벼멸구 저항성 계통의 선발

협동과제 : 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	◇ 인공교배 및 잡종집단 육성	o. 벼멸구 저항성 품종과 감수성 품종간의 인공 교배('청청벼/낙동벼', '삼강벼/낙동벼') o. F ₁ , F ₂ 및 '낙동벼'를 반복친으로 이용한 BC ₁ F ₁ 양성
2차년도 (1999)	◇ 여교잡에 의한 중간모본선발	o. 2 조합의 BC ₂ F ₁ 및 BC ₃ F ₁ 양성 o. 벼멸구저항성 검정 및 유전양식 구명 o. 약배양 집단에 대한 벼멸구 저항성 검정
3차년도 (2000)	◇ 여교잡에 의한 중간모본선발	o. 2조합의 BC ₄ F ₁ 및 BC ₅ F ₁ 양성 o. 벼멸구검정에 의한 저항성 계통선발
4차년도 (2001)	◇ 자포니카 저항성 계통선발	o. BC ₅ F ₂ 및 BC ₅ F ₃ 양성 o. 벼멸구검정 및 DNA marker에 의한 저항성 계통선발
5차년도 (2002)	◇ 자포니카 저항성 계통선발	o. BC ₅ F ₄ 및 BC ₆ F ₄ 양성 o. 벼멸구 검정 및 DNA marker에 의한 저항성 계통선발 o. 벼멸구 저항성 '밀양198호'선발

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

제 1 절 국내 · 외 관련 기술의 현황

1. 관련 기술의 현황

가. 국 외

1970년대 초에 *Bph 1*과 *bph 2* 유전자가 발견된 이후 지금까지 12개의 벼멸구 저항성 유전자가 밝혀지고 있다(Murata et al. 1997). 국제 미작 연구소에서는 1973년에 최초의 벼멸구 저항성 품종인 'IR26'을 육성한 이후 근년까지 다수의 저항성 품종을 육성하고 있고, 이들에 대한 유전분석도 병행해 오고 있다. 근년에는 이들 벼멸구 저항성 유전자와 DNA marker와의 연관분석에 관한 결과도 보고되고 있다(Kawaguchi et al. 2001, Murai et al 2001). 일본에서는 *Bph 1*, *bph 2*, *Bph 9* 유전자가 12번 염색체상에 위치하며, *bph 2* 유전자에 밀접히 연관된 DNA marker를 이용한 저항성 유전자의 map-based cloning도 시도되고 있다 (Murai et al. 2000). 최근에는 벼멸구 저항성은 주동 유전자에 의해서도 지배되지만 다수의 QTL도 저항성에 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Xu et al. 2002). 그러나 아직까지 일본에서도 벼멸구에 저항성이면서 제 특성이 우수한 실용품종은 없는 실정이다.

나. 국 내

영남농업시험장의 벼육종 연구진과 본 연구실에서는 자포니카 계통인 '밀양64호'의 벼멸구 저항성이 *Sdh-1* 동위효소와 밀접하게 연관되어 있음을 밝히고(Yeo et al. 1998) 농촌진흥청 작물시험장에서는 야생벼(*Oryza minuta*)에서 유래한 벼멸구 저항성 유전자의 mapping과 통일형 품종인 '가야벼'의 벼멸구 저항성과 RAPD marker와의 관계를 밝힌 바 있다(Jeon et al. 1999). 국내에서는 '삼강벼/낙동벼' 조합 F₂ 집단을 이용하여 '삼강벼'의 저항성 유전자 (*Bph 1*)와 DNA marker와의 관계를 분석하고 벼멸구 저항성 품종 육종에 MAS의 도입방안(Ha et al. 2000)과 벼멸구 저항성과 농업형질과의 연관분석에서 저항성 유전자는 열악형질과 밀접히 연

관됨을 보고하였다(Yeo et al. 2001). 지난 5년 동안 본 연구과제가 수행되면서 벼멸구 저항성과 밀접하게 연관된 DNA marker가 선발되고 유전자지도도 작성되고 있는데, 이 유전자 지도는 벼멸구 저항성 유전자의 mapping 뿐만 아니라 주요 농업형질과 벼멸구 저항성과의 연관 분석에도 활용될 수 있어서 도복 등과 같은 열악형질 제거에도 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

2. 문제점

현재까지 벼에서 개발된 대부분의 DNA marker들은 인디카×자포니카 집단에서 다형성을 보이는 marker들이어서, 우리나라에서 벼 품종개량에 주로 사용하는 자포니카형 유전자원에서는 이들 DNA marker들의 이용효율이 그다지 높지 못하며 특히, 벼멸구 저항성과 같은 특정 유전자의 경우는 더욱 그러하다. 따라서 처음부터 원연교잡을 통한 여교잡육종에 의해 원하는 농업형질과 marker만을 제외한 다른 모든 부분이 양질의 자포니카형으로 치환된 자포니카형 중간모본이 개발되어야만 marker-assisted selection에 의한 육종효율이 크게 향상될 것이다.

그리고 벼멸구 저항성 검정면에서도 유묘기에 벼멸구를 접종하는 생물검정만으로는 검정 결과의 재현성면에서 여러 가지 문제점이 야기되고 있는 것도 사실이다. 인디카형의 경우에는 1~2엽기 유묘 검정에서도 저항성과 감수성이 비교적 뚜렷하게 구분되지만 자포니카형의 경우 유묘기에는 감수성 반응을 보이다가 4~5엽기에 도달했을 때 저항성 반응이 명확하게 구분된다는 것도 자포니카형의 저항성 개체 선발을 어렵게 하는 요인중의 하나가 되고 있다(Yeo & Sohn, 1995). 또한 인디카형의 저항성 유전인자를 자포니카에 도입할 경우 인디카의 여러 가지 열악형질이 함께 도입되므로써 대부분의 벼멸구 저항성 계통들이 육종과정에서도 태되는 것도 자포니카형 저항성 품종 개발을 어렵게 하고 있는 요인이 되고 있다.

제 2절 앞으로의 전망과 기술도입의 타당성

1. 앞으로의 전망

벼멸구 저항성과 같은 유용한 농업형질과 밀접하게 연관되어 있는 DNA marker가 선발되고 그 이용체계가 자체적으로 확립되어 진다면 저항성 개체 선발효율이 크게 향상될 뿐만 아니라 선진국의 특허화 등으로 인한 이용상의 장애도 극복할 수 있을 것이다. 특히, DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 품종개발의 경우는 복잡한 검정과정을 거치지 않게 되므로 기존의 육종과정에서 소요되는 인력과 경비를 크게 줄일 수 있을 것이며 앞으로 map-based cloning을 위한 중요한 기초자료가 될 수도 있을 것이다.

2. 기술도입의 타당성

벼멸구는 우리나라에서 월동하지 못하는 비래 해충이지만 그 피해는 매년 발생되고 있고 해에 따라서는 심각한 수량 손실을 초래하기도 한다. 벼멸구는 벼의 출수후에 많이 발생되고 벼의 줄기 기부에 서식하기 때문에 약제 방제효과도 낮아서 피해면적이 넓은 경우에는 약제 사용량이 크게 증가하게 된다. 특히 우리나라에서 재배되고 있는 모든 양질성 품종들은 벼멸구 저항성이 없어서 벼멸구 피해는 더욱 크게 우려되고 있다. 벼멸구 저항성은 멘델식 유전을 하는 주동유전자에 의해 지배되는 것으로 밝혀져 있지만 국내에서 재배되고 있는 자포니카형 품종 중에는 아직도 벼멸구 저항성 품종이 없는 실정인데, 그 주된 이유중의 하나는 벼멸구 저항성 인자와 연관된 여러 가지 열악형질 때문인 것으로 지적되고 있다. 이러한 육종적인 어려움을 해결하기 위한 방안으로 선진국을 중심으로 농작물의 병·해충 저항성 개체 선발에 DNA marker를 이용하는 방안들이 구체적으로 검토되고 있고 분야에 따라서는 상당한 성과도 얻고 있다. 만약 DNA marker의 효율적인 이용체계를 자체적으로 개발하지 않고 외국으로부터 도입하게 된다면 이에 대한 지적재산권 등 상당한 문제점이 야기될 것은 명확하다. 따라서 벼멸구와 같은 해충의 저항성 관련 DNA marker의 선발과 이용은 다소 시간이 소요되더라도 자체적인 기술을 개발하고 그 이용체계를 확립하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.

제 3 장 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발

제 1 절 서 론

우리나라에서 벼멸구 방제는 전적으로 약제 방제에 의존하고 있는데 그 주된 이유는 현재 재배되고 있는 벼품종 중에는 저항성 품종이 없기 때문이다. 과도한 살충제의 남용은 인간·동식물에 대한 피해 및 환경생태계에 악영향을 미칠 뿐만 아니라 막대한 경제적 손실을 초래할 가능성마저 배제할 수 없다. 벼멸구로 인한 벼의 피해를 최소화하고 약제방제로 인한 문제점을 해결하기 위해서는 벼멸구에 저항성인 품종을 육성 보급하는 것이 가장 효과적인 방안으로 알려져 있다 (RDA, 1997, 1998).

국내에서는 1970년대 초반부터 벼멸구 저항성 품종 육성에 대한 연구를 시작하면서, 다양한 유전자원을 활용하여 1980년대 중반까지 벼멸구에 저항성인 통일형 12 품종을 육성·보급하여 그 피해를 줄일 수 있었다. 최근 소비자들의 양질미 선호에 따라 통일형 벼멸구 저항성 품종이 장려품종에서 제외됨에 따라 양질이면서 벼멸구에 저항성인 품종의 육성 보급이 시급히 요구되고 있는 실정이다(Ha et al. 2000). 그러나 오늘날 우리나라에서 재배되고 있는 품종들은 대부분이 자포니카형 품종으로서 이들 품종에는 벼멸구에 저항성을 가진 유전자원이 없는 것으로 알려져 있고, 벼멸구 저항성 인자 또한 농업적으로 열악한 형질과 연관되어 있다는 점이 벼멸구 저항성 품종 육성을 어렵게 하고 있는 이유로 지적되고 있다(Kaneda, 1984). 또한, 자포니카 저항성 계통은 인디카의 저항성에 비해 저항성 정도가 불안정한 중도저항성을 보이는 경우가 많고 이러한 중도 저항성은 집단 유묘 검정조건에서 감수성 품종과의 판별이 쉽지 않다는 점 등도 자포니카형 저항성 품종육성을 어렵게 하는 요인으로 알려져 왔다(Yeo & Sohn, 1995).

최근 분자생물학이 발달하면서 DNA marker를 이용한 농작물의 유전자 지도작성과 이들 표지인자를 유용형질 선발에 이용하는 분자유종법이 개발되고 있는데 이 방법은 기존의 육종효율을 크게 증진시킬 것으로 전망되고 있고, 유용 농업형질과 연관된 열악형질의 제거에도 분자표지인자를 이용하는 방안이 제시되고 있다(Huang et al. 1997, Mohan et al. 1997). 농작물의 병충해 저항성 연구에 DNA 표지인자를 이용하게 되면 복잡한 생물검정 과정이나 재배작물의 생육시기 및 재배환경에 구애됨이 없이 저항성 개체를 선발할 수 있다는 것이 가장 큰 장점이다. 그러

므로 DNA marker를 벼멸구 저항성 품종 육성에 이용한다면 이 분야의 육종성과는 한층 더 높아질 것이다.

본 연구과제에서는 벼멸구 저항성과 관련된 유전자를 mapping하고, 밀접히 연관된 DNA marker를 이용하여 저항성 개체를 선발하는 MAS 체계의 구축과 저항성 계통 육성에 관한 연구를 수행하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Doubled haploid (DH) 집단의 육성과 주요 농업형질 조사

‘삼강벼/낙동벼’와 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 F₁의 이삭을 출수전에 채취하여, 1핵성 소포자기의 약을 2-4-D(1mg/L), zeatin(0.1mg/L), sorbitol (20g/L) 및 gelrite (5g/L)가 첨가된 Chu 배지(Chu et al. 1997)에 배양하여 캘러스를 형성시켰다. 30~40일 동안 형성된 캘러스를 kinetin(20mg/L), IAA(0.2mg/L), sucrose(30g/L) 및 gelrite(5g/L)가 첨가된 Chu 배지에 이식하여 50일 동안 식물체를 재분화시켰다.

약으로부터 재분화된 식물체를 충분히 성장시킨 다음 순화처리 후 활착이 양호한 개체를 플라스틱 포트에 재배하여 개체별로 채종하고 반수체의 경우는 콜히친 처리로 염색체를 배가시켰다. 온실에서 채종된 종자를 포장에 계통 재배하고 이들 계통에 대한 주요 농업적 특성과 벼멸구 저항성 정도를 검정하였다. 연구 1차년도인 1998년부터 2002년까지 양성된 두 조합(‘삼강벼/낙동벼’, ‘청청벼/낙동벼’)의 DH 집단을 2002년 및 2003년 하계 포장에 재배하여 각 계통별로 벼멸구 저항성 정도를 조사한 다음 주당 1본씩, 30×15cm의 재식 밀도로 이앙하고 계통별로 출수기, 간장, 수장을 포함한 주요 농업적 형질, 미질 관련 특성 등을 조사·분석하였다. 벼멸구 저항성 판정기준과 검정은 Yeo & Sohn(1995)의 방법에 준하여 수행하였다.

2. Mapping 집단 작성 및 양친에 대한 marker 검정

가. DNA 분리

PCR 반응과 Southern hybridization을 위하여, 양친과 잡종세대 및 DH집단의 식물재료를 25℃에서 3주간 재배한후 CTAB법에 따라 다음과 같이 DNA를 추출

하였다. 각 식물체의 건전한 잎 3g을 막자사발에 넣고 액체질소로 급냉동시킨 상태에서 미세한 분말로 마쇄하고, 2×CTAB buffer 1ml 과 1×CTAB 6ml를 넣어 혼합한 다음, 50ml cap tube에 옮겨서 55℃에 30분 동안 반응시키면서 2~3회 가볍게 혼합한다. 여기에 동일한 양의 chloroform을 넣어 30분간 둔 다음 원심분리(4,000 rpm, 7분, 15℃)한 후 상층액을 15ml의 폴리프로필렌 튜브로 옮겨서, 10% CTAB-NaCl 325 μ l와 chloroform 3.5ml을 넣고 잘 혼합하고 원심분리(4,500 rpm, 10분, 15℃)하여 상층액을 15ml의 새로운 폴리프로필렌 튜브에 옮긴다. ppt(precipitation) CTAB 용액 (1% CTAB, 50mM Tris pH8.0, 10mM EDTA) 3.5 ml을 넣어 12시간 이상 상온에 방치한 후 원심분리(2,500 rpm, 5분, 20℃)하여 상층액을 버리고 1M NaCl-TE 0.7ml와 isopropanol 0.42ml를 넣어 DNA를 엉키게 한 다음 회수한다. 이렇게 회수된 DNA를 80% 에탄올로 세척하여 건조시키고 TE buffer로 100배 희석한 다음 0.8% agarose gel에 전기영동하고 260nm UV하에서 Ethidium Bromide(EtBr)에 의해 나타난 염색정도로서 DNA 농도를 조절하여 PCR과 Southern hybridization에 이용하였다.

나. 양친에 대한 marker 검정

DH 집단의 genomic DNA 2 μ g를 제한효소에 12시간 처리하고 0.8%의 agarose gel 상에서 전기영동한 후 nylon membrane filters(Nytran, S&S)에 전이시킨다. Sambrook 등(1989)의 방법에 의하여 벼멸구에 밀접히 연관된 RFLP marker를 이용하여 probe를 제작한 다음 α -dCTP P³²로 표지하고 hybridization하여 각 개체별 벼멸구 저항성과 band의 분리양상을 조사·분석하였다.

벼멸구 저항성 유전자에 밀접하게 연관된 DNA marker가 PCR-based marker(RAPD, SSR)일 경우 PCR 작업을 위해 Gene Amp PCR system 9600을 사용하였으며, 증폭을 위한 시약의 조성은 genomic DNA가 15~20ng/ μ l이고, dNTP 및 taq-polymerase는 각각 200 μ M과 0.1unit 농도였으며 각각의 primer는 영남 농업시험장으로부터 분양 받은 Operon Technologies Kits A-Z (Operon Technologies, Alameda, Calif.)와 Research Genetics(2130 South Memorial Parkway, AL, USA)의 primer를 이용하였다. PCR 증폭은 96℃에 5분간, 그 후의 변성은 96℃에서 15초, annealing은 RAPD 수행시 40℃와 SSR 수행시 55℃에서 각각 30초와 15초, 그리고 DNA 합성은 72℃에서 1분간으로 총 40cycle과 35

cycle을 실행하여, 최종 DNA 합성은 72°C에서 7분으로 한다. 합성된 DNA는 각각 1.2%와 3%의 agarose gel로 전기영동 후 band의 분리여부와 저항성 정도를 비교·분석하였다. ‘삼강벼’와 ‘낙동벼’에 다형성을 보이는 marker 선발을 위하여 총 1302개의 DNA marker(RFLP 184, SSR 598, RAPD 520)와 양친의 genomic DNA 간의 관계를 분석하였다.

다. 벼멸구 저항성과의 관계분석 및 유전자 지도 작성

‘삼강벼’와 ‘낙동벼’에 codominant marker로 선발된 9개의 RFLP 및 1개의 isozyme marker를 이용하여 DNA marker와 F₂ 집단(51개체) genomic DNA 간의 분리 양상에 대한 적합도 검정을 실시하였다. 그리고 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₁ 및 F₂ 집단(51개체)을 재료로 선발된 DNA marker와 벼멸구 저항성과의 연관 관계를 분석하고, MAPL program에 의해 유전자 지도를 작성하였다.

‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 집단에 대한 isozyme 분석은 Yeo 등(1998)의 방법에 따라 실시하였고, starch gel을 이용한 전기 영동을 통하여 Sdh1 유전자에 대한 밴드형태를 조사하였다. 한편, isozyme marker인 Sdh1에 대한 벼품종들의 allele type을 조사하기 위하여 벼 43품종에 대한 isozyme 분석을 실시하였고, ‘삼강벼/낙동벼’ F₂ 조합집단의 벼멸구 저항성과 Sdh1과의 연관분석을 실시하였다.

3. DH 집단을 이용한 유전자 지도 작성

‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 집단의 벼멸구 저항성과 DNA marker 간의 관계를 알기 위하여 DH 집단 35계통의 벼멸구 저항성과 12번 염색체상에 위치한 10개의 DNA marker(RFLP 7개, RAPD 2개, isozyme marker 1개)간의 관계를 분석하였다.

벼멸구 저항성과 밀접하게 연관된 marker의 개발을 위하여 520개의 RAPD primer를 영남 농업시험장으로부터 분양받아 Bulked-segregant analysis (BSA)을 통해 선발작업을 수행하였다. DNA sample은 resistant parent (RP ; 삼강벼), susceptible parent (SP ; 낙동벼), resistant bulk (RB ; 저항성 계통), susceptible bulk (SB ; 감수성 계통) 등 4가지로 구분하여 사용하였으며, RP와 RB를 저항성 그룹으로 SP와 SB를 감수성 그룹으로 분류하여 두 그룹간에 보여지는 다형성을 확인하였다. 사용된 DNA sample중 RB와 SB는 공시한 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 DH

계통에서 생물검정을 통해 확인된 저항성과 감수성 계통을 각각 10계통씩 같은 비율로 섞어 마쇄하는 방법으로 준비되었다. Marker의 선발은 RP와 RB 그리고 SP와 SB로 나누어 두 그룹간에 나타나는 다형성을 조사하는 방식으로 수행되었다.

BSA를 통해 선발된 11개의 RAPD marker를 이용하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 46계통의 벼멸구 저항성과 이들 marker와의 관계를 분석하였으며, 이로부터 선발된 1개의 RAPD marker와 벼멸구 저항성과 연관된 것으로 알려진 3개의 RFLP marker간의 관계를 분석하였다. 그리고 벼멸구 저항성 유전자의 mapping을 위해 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 158개체와 6개의 marker(RFLP : 5개, RAPD : 1개)간의 연관 관계를 분석하였다.

4. 여교잡 집단 DH 계통 육성

여교잡 세대의 DH 집단을 육성하기 위하여, 2001/2002 동계온실에 삼강벼/낙동벼의 BC₅F₁ 교배립을 파종하여 1헥타 소포자의 약을 배양하였다. 화분발달단계로 보아 배양에 알맞은 이삭을 채취하여 12°C에서 15일간 저온처리후 1 mg/L의 NAA, 2 mg/L의 kinetin, 30g/L의 sucrose, 5 g/L의 gelrite가 첨가된 N₆-Y₁배지에 배양한 다음 암상태로 30일 동안 유지하고 그 이후는 1일 12시간 2,500 Lux 명상태로 45일간 배양하는 1단계 배양법과 2 mg/L의 NAA, 0.2 mg/L의 kinetin, 30g/L의 sucrose, 5 g/L의 gelrite가 첨가된 N₆-Y₁배지에 암상태로 30일 동안 배양하여 캘러스를 유지시킨 다음, 이들 캘러스를 0.2 mg/L의 IAA, 2 mg/L의 kinetin, 30g/L의 sucrose, 5 g/L의 gelrite가 첨가된 N₆-Y₁배지에 배양하여 1일 12시간 2,500 Lux 상태로 45일간 배양하는 2단계 배양법을 이용하였다. 배양실의 온도는 26±1°C 항온으로 유지하였다. 약으로부터 재분화된 식물체를 시험관에서 충분히 성장시킨 다음 수경액에 20일간 순화처리 후 온실에 이식하고 온실에 활착이 양호한 개체를 플라스틱 포트(20×17cm)에 재배하여 개체별로 채종하였다.

자포니카형이면서 벼멸구에 저항성인 중간모본을 육성하기 위하여 ‘낙동벼’가 반복친으로 여교배된 BC₅F₁의 약을 배양하여 양성된 개체들에 대해 벼멸구 검정을 실시하였다. 벼멸구 검정에서 저항성으로 확인된 개통을 재배하여 이들의 주요 작물학적 특성을 조사하고 특성이 양호한 계통을 화분친으로 하여 양질성 품종인 ‘주남벼’ 및 ‘영안벼’와 인공교배하여 잡종집단을 양성중에 있다.

5. DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통 선발

가. Sequence-tagged-site(STS) marker의 개발

BSA method를 통해 선발된 11개의 RAPD marker중에서 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 벼멸구 저항성과 가장 밀접하게 연관된 1개의 marker를 선별하여 STS marker로 합성하였다. 먼저 전기영동에 의해 분리된 band들 중 STS marker로 전환할 band 뒷부분에 칼집을 내어 DE 81 paper를 끼워 역전류를 5분(100V)간 흘렸다. DE 81 paper를 회수하여 UV lamp에서 DNA가 전이된 것을 확인한 후 extraction buffer를 이용하여 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA는 pGEM-T easy vector system I (Promega)을 이용하여 ligation한 후 CaCl₂ (50mM)를 처리한 *E. coli*에 형질 전환하여 LB (X-gal + IPTG + agar)배지로 옮긴 후 37°C에서 8시간 동안 배양하였다. 형성된 clone 중에서 white colony를 액체 LB 배지에서 배양한 후 QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리한 plasmid DNA는 (주) 바이오닉스에 염기서열 분석을 의뢰하였다.

나. Primers design

염기 서열이 밝혀진 DNA fragment (923bp)를 이용하여 20mer primer를 3 sets(OPE18-A, B, C) 제작하여 그 중 다형성을 가장 잘 나타내는 1set를 STS marker로 사용하였다.

다. STS marker와 벼멸구 저항성과의 관계

STS marker와 벼멸구 저항성과의 관계를 분석하기 위하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 158개체를 대상으로 marker와 벼멸구 저항성과의 관계를 분석하였다.

라. 벼멸구 저항성원의 분류

국내에서 육성된 벼멸구 저항성 품종들에 대한 벼멸구 저항성원의 유래를 구명하기 위하여 벼 19개 품종(인디카저항성 품종; 4개, 통일형 저항성 품종; 13개, 자포니카형 저항성 품종; 1개, 감수성 품종; 1)의 벼멸구 저항성과 STS marker와의 관계를 분석하였다.

제 3 절 DH 집단의 육성과 주요 농업형질 조사

1. DH 집단 육성

벼멸구 저항성 유전자의 mapping을 위한 DH 집단을 육성하고자 저항성 품종인 ‘삼강벼’와 ‘청청벼’를 자방친으로 감수성 품종인 ‘낙동벼’를 화분친으로 인공교배하여 양성된 두 조합 F₁의 1핵성 소포자기의 약을 배양하였다. ‘98/99 동계에서부터 2002년 하계까지 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서 54,000 약, ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서 36,000 약 이상을 배양하였으나 두 조합 모두 원연교잡된 관계로 식물체 분화율은 저조한 경향이있다. 약배양 후 30일 동안 조사된 두 조합의 교배친과 F₁의 캘러스 형성률은 모두 양친의 평균치보다 다소 높게 나타났으나, 캘러스를 명상태로 옮긴 후 50일 동안 조사된 녹색체 분화율은 양친의 평균치보다 다소 낮은 경향을 나타내었다(표 1-1).

Table 1-1. Frequency of callus formation and plant regeneration in anther culture of F₁ plants from ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’ and ‘Cheongcheonbyeo/ Nagdongbyeo’

Cultivar and cross	No. of anthers inoculated	% of callus formation	% of green plant regeneration	% of albino regeneration
Nagdongbyeo	1,500	28.5	7.6	1.3
Samgangbyeo	1,000	5.9	0.4	0.0
Cheongcheonbyeo	1,100	9.5	1.5	0.1
Samgangbyeo/ Nagdongbyeo(F ₁)	54,120	21.7	0.9	0.3
Cheongcheonbyeo/ Nagdongbyeo(F ₁)	36,150	22.8	2.4	0.8

약으로부터 재분화된 식물체를 시험관에서 충분히 성장시킨 다음 수경액에 20일 동안 재배한 후 활착이 양호한 개체를 온실에 재배하면서 각 조합별로 배수성을 조사한 바(표 1-2), ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서는 전체의 70%가 염색체가 자연 배가된 2배체이었고, ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 경우는 전체의 약 74%가 2배체로 조사되었다. 연구 1차 년도인 1998년부터 2003년 하계까지 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서는

채종 가능한 DH 계통을 201 계통 확보하였고, ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서는 재분화 식물체를 800개체이상 얻었다. 원연간의 심한 불임 현상으로 인하여 채종가능한 계통이 96 계통밖에 확보되지 않아서 2003 하계에도 약배양에 의한 DH 집단 육성을 계속하고 있다(표 1- 3).

Table 1-2. Ploidy level of plants regenerated from anther culture

Cross	Polyploid level of regenerated plants (%)	
	Doubled haploid	Haploid & Polyploid
Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo	70.5	29.5
Samgangbyeo/Nagdongbyeo	73.5	26.5

Table 1-3. Number of doubled haploid(DH) lines produced by anther culture of F₁ plants from ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’ and ‘Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo’

Cross	No. of DH lines			
	Total	‘98~’99	‘00~’01	‘02~’03
Samgangbyeo/ Nagdongbyeo	201	50	89	62
Cheongcheongbyeo/ Nagdongbyeo	96	-	79	17

‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₁의 약을 배양하여 양성된 201 계통중에서 채종량이 많았던 88 계통에 대한 벼멸구 저항성 반응을 7회에 걸쳐 검정한 바(표 1-4), 40 계통이 저항성 반응을, 48 계통은 감수성 반응을 나타내었다.

Table 1-4. Segregation for BPH resistance in the DH population from a cross between resistant and susceptible parents

Cross	No. of lines		
	Total	Resistance	Susceptibility
Samgangbyeo/ Nagdongbyeo	88	40	48

2. DH 계통의 주요 특성 조사

연구 1차년도인 1998년부터 2002년까지 양성된 두 조합('삼강벼/낙동벼', '청청벼/낙동벼')의 DH 집단을 2002년 하계 포장에 재배하여 각 계통별로 벼멸구 저항성 정도를 조사한 다음 주당 1본씩, 30×15cm 재식밀도로 이앙하였다. 각 계통별로 출수기, 간장, 수장을 포함한 주요 특성을 조사하였다. 2002년 하계 포장에 재배된 DH 집단 139계통의 간장은 37.1~107.5 cm, 수장은 15.2~26.7 cm, 수수는 7~41 개/주, 삼절간장은 5.3~19.4cm 그리고 출수일수는 83~143일 범위로 각각 비교적 넓은 변이 폭을 가지면서 정규분포에 가까운 연속적인 변이 분포양상을 보였다(그림 1-1).

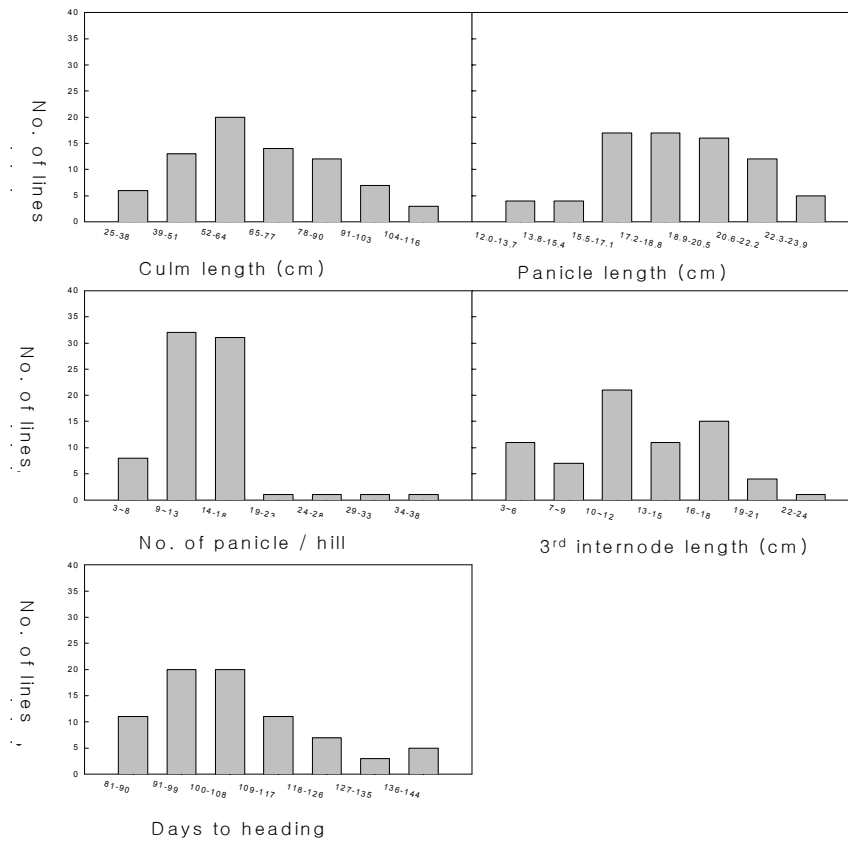


Fig. 1-1. Frequency distribution of five agronomic characters of DH lines produced from a cross, 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.

‘청청벼/낙동벼’ 조합의 DH 79계통에 대한 특성 조사에서도 간장은 28.0~114.9 cm, 수장은 12.5~23.5 cm, 수수는 4.8~38.0 개/주, 삼절간장은 4.4~21.8cm, 출수일수는 78~133일 범위에 분포하였고, 변이 분포는 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합과 유사한 연속적인 변이양상을 나타내었다 (그림 1-2).

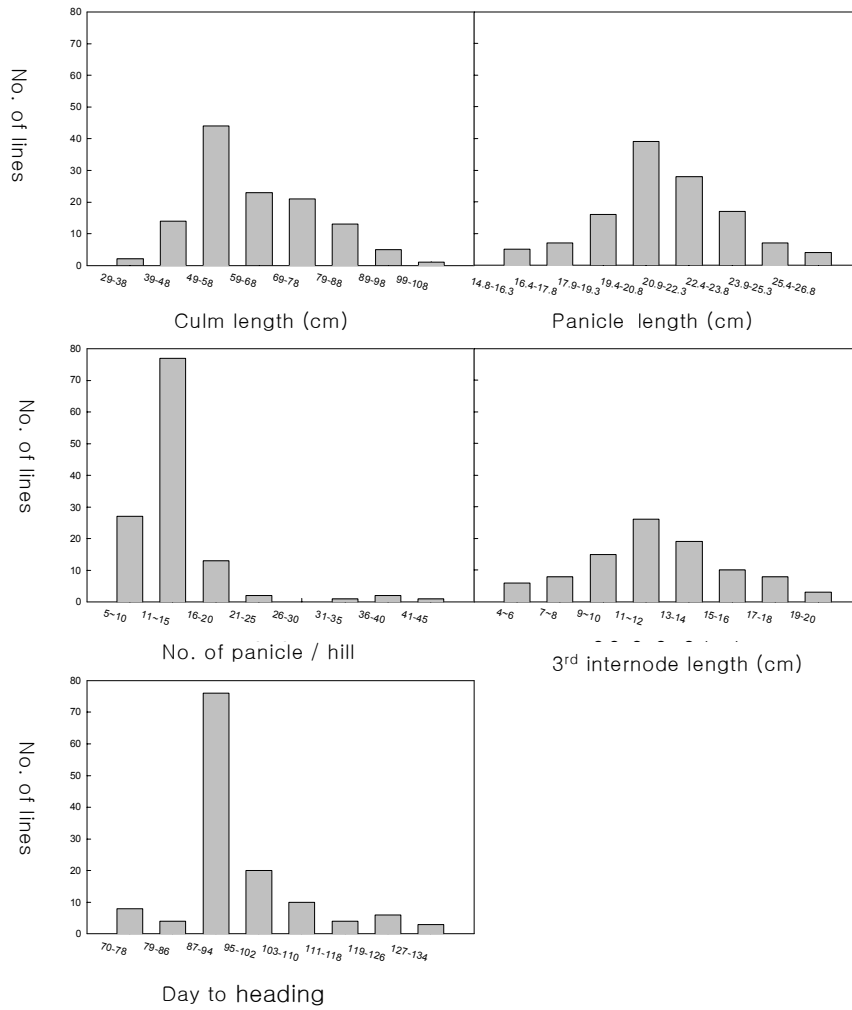


Fig. 1-2. Frequency distribution of five agronomic characters of DH lines produced from a cross, 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo'.

제 4 절 Mapping 집단작성 및 양친에 대한 marker 검정

1. 양친에 대한 marker 검정

‘삼강벼’와 ‘낙동벼’의 어린잎(30일묘)을 CTAB 방법(Murray et al. 1994)에 준하여 genomic DNA를 추출하고 제한효소로 12시간 처리하여, nylon membrane (Hybond+)에 전이시켜, Southern 분석한 바, 공시된 184 개의 RFLP marker중에서 양친에 다형성을 나타내는 128개의 marker를 선발하였다(표 1-5). 동일 조합에 대한 PCR-based marker 검정에서는 총 598개의 SSR marker(RM : 522, OSR : 3, MRG : 73)와 520개의 RAPD marker가 사용되었다. 이들 marker를 이용한 parent screening에서 126개의 SSR marker와 220개 RAPD marker의 다형성 band가 3%와 1.2%와 agarose gel 상에서 선발되었다.

Table 1-5. DNA markers shown polymorphism between BPH resistant cultivar ‘Samgangbyeo’ and susceptible cultivar ‘Nagdongbyeo’

Markers	No. of markers tested	No. of markers shown polymorphism
RFLP	1 8 4	1 2 8
S S R	5 9 8	1 2 6
RAPD	5 2 0	2 2 0

‘삼강벼’와 ‘낙동벼’에 대한 marker 검정을 통하여 벼멸구저항성인자 (*BphI*)가 위치한 12번 염색체 상에서 양친에 대해 codominant를 나타내는 9개의 RFLP marker를 선발할 수 있었다(표 1-6).

Table 1-6. RFLP markers shown polymorphism between 'Samgangbyeo' and 'Nagdongbyeo' on Chromosome 12

Markers	Enzyme	Fragment size of marker (bp)	Length of hybridized band (kb)	
			Samgangbyeo	Nagdongbyeo
G261	BglII	1700	6.0	4.5
G258	Pst I	1500	2.7, 2.0	0.7
G304	HindIII	2000	13.0	4.5, 4.0
G148	EcoRV	850	6.0	4.5
G336	HindIII	1900	3.0	2.6
G402	HindIII	600	17.0	9.8
G193	HindIII	2000	2.5	2.0
RG413	EcoRV	1650	20.0	9.0
RG901	EcoRV	1800	6.0	18.0

2. 벼멸구 저항성과의 관계분석 및 유전자 지도 작성

가. F₂를 이용한 연관분석

'삼강벼'와 '낙동벼'에 codominant marker로 선발된 9개의 RFLP marker 및 1개의 isozyme marker와 F₂ 집단의 genomic DNA 간의 분리비에 대한 적합도 검정을 실시한 결과, G 261을 제외한 모든 marker에서 이론적 분리비에 적합한 것으로 분석되었다(표 1-7).

F₂ 집단을 대상으로 분석된 분리비 검정에서 이론적 분리비에 적합한 것으로 밝혀진 RFLP marker 8개와 1개의 Sdh marker를 이용하여 F₂ 집단의 벼멸구 저항성과 9개 marker와의 연관분석을 실시한 바, 공시된 marker 중에서 G 258이 벼멸구 저항성과 가장 밀접하게 연관(조환가:4.1cM)되어 있는 것으로 나타났고, LOD 치도 8.6으로 가장 높게 조사되었다(표 1-8, 그림 1-3).

Table 1-7. Segregation mode and Chi-square goodness-of-fit tests for Sdh and 9 RFLP markers in the F₂ population of 'Samgangbyeo' and 'Nagdongbyeo'

Markers	Segregation mode ^{a)}			Total lines tested	x ²	P	Type
	A	H	B				
G261	5	30	16	51	6.33*	-	Codominant F ₂ (1:2:1)
G304	13	23	15	51	0.65	0.5-0.9	Codominant F ₂ (1:2:1)
G336	10	26	15	51	1.00	0.5-0.9	Codominant F ₂ (1:2:1)
Sdh	14	25	12	51	0.18	0.9<	Codominant F ₂ (1:2:1)
G402	14	25	12	51	0.18	0.9<	Codominant F ₂ (1:2:1)
RG413	14	25	12	51	0.18	0.9<	Codominant F ₂ (1:2:1)
G258	14	25	12	51	0.06	0.5-0.9	Codominant F ₂ (1:2:1)
RG901	15	26	10	51	1.00	0.5-0.9	Codominant F ₂ (1:2:1)
G148	15	25	11	51	0.65	0.5-0.9	Codominant F ₂ (1:2:1)
G193	11	25	14	50	0.36	0.5-0.9	Codominant F ₂ (1:2:1)

^{a)}A : 'Samgangbyeo' type. H : Hetero type B : 'Nagdongbyeo' type

* Significant at 5% level.

Table 1-8. Linkage analysis between BPH resistance and 9 DNA markers in the F₂ population of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'

Gene pair		Segregation mode						x ²	Recombination value (%)	LOD
A	B	A-BB	A-Bb	A-bb	aaBB	aaBb	aabb			
<i>Bph</i>	- Sdh	13	23	2	1	1	10	28.88**	10.6±4.6	5.57
<i>Bph</i>	- G304	12	20	6	1	2	9	16.51**	20.9±6.3	2.85
<i>Bph</i>	- G261	4	27	7	1	2	9	16.55**	22.1±6.8	2.04
<i>Bph</i>	- G402	13	23	2	0	2	10	29.24**	8.3±4.1	6.56
<i>Bph</i>	- G336	9	23	6	1	2	9	16.55**	20.6±6.4	2.68
<i>Bph</i>	- RG901	14	22	2	0	4	8	19.44**	13.0±5.2	4.74
<i>Bph</i>	- RG413	13	23	2	0	2	10	29.24**	8.3±4.1	6.56
<i>Bph</i>	- G148	14	21	3	0	4	8	18.04**	15.1±5.5	4.21
<i>Bph</i>	- G258	13	24	1	0	1	11	37.67**	4.1±2.9	8.64

** : Significant at 1% level.



20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
 R R R R R R R R R R S S S S R R R R R R R R R R R R R R R R R R S M S S



Fig. 1-3. Relationship between BPH resistance and RFLP pattern in 51 individuals from F₂ of 'Samgangbyeo(P₁)/Nagdongbyeo(P₂)' with a labelled probe G258. Total DNA was digested with *Pst* I. Arrows(↓) designates recombinants produced by crossing over in the DNA region. 1~51 : F₂ individuals. R : Resistance, S : Susceptibility, M : Moderate resistance.

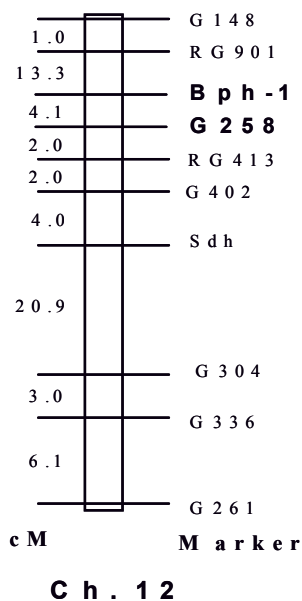


Fig. 1-4. Linkage map of *Bph 1* genomic region of Chromosome 12. The map was constructed using F₂ population of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'.

표 1-8의 연관 분석 결과를 근거로 하여 MAPL program에 의해 작성된 ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성 유전자에 대한 연관 지도는 그림 1-4에서와 같다. 벼멸구 저항성과 관련된 9개의 marker로 작성된 12번 염색체의 연관지도는 전체 길이가 56.4 cM 이고 marker간 평균 거리는 6.3 cM 이었다. 그리고 ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성 유전자는 G258과 4.1cM 거리로 가장 밀접하게 연관되어 있었다.

나. 벼멸구 저항성과 isozyme marker(Sdh1)와의 관계 분석

‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 F₂ 집단 121개체의 벼멸구 저항성과 그들의 Sdh type 과의 관계를 분석한 바, Sdh 1은 벼멸구 저항성과 9.9%의 조환가로 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다(표 1-9).

Table 1-9. Linkage between BPH resistance and shikimic dehydrogenase isozyme in F₂ population of ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’

Cross	Segregation mode in F ₂ population				Expected ratio	x ²	P	Recombination value (%)
	AB	Ab	aB	ab				
	85	5	7	24	9:3:3:1	68.975	0.000	9.9%
Samgangbyeo/ Nagdongbyeo	90A			31a	3 : 1	0.025	0.50~0.90	-
	92B			29b	3 : 1	0.069	0.50~0.90	-

AB: number of plants showed resistant reaction to BPH and sdh-1 allele type of ‘Samgangbyeo’, Ab : number of plants showed resistant reaction to BPH and sdh-2 allele type of ‘Nagdongbyeo’, aB : number of plants showed susceptible reaction to BPH and sdh-1 allele type of ‘Samgangbyeo’, ab: number of plants showed susceptible reaction to BPH and sdh-2 allele type of ‘Nagdongbyeo’.

벼멸구저항성 유전자와 연관된 것으로 밝혀진 isozyme marker인 Sdh에 대한 국내 육성품종들의 allele type을 분석하고자 공시된 43품종들의 4-5엽기 묘의 연한 줄기 부위를 채취하여 Glaszmann’ protocol (Glazmann, 1988)에 따라 분석한 결과(표 1-9), 자포니카형 저항성 품종인 ‘밀양 65호’는 Sdh 대립유전자형이 type

II로 분석되었고 대다수의 저항성 품종은 type I으로 나타났다. 통일형 및 인디카형 품종의 경우는 ‘항미벼 1호’가 type II이고, ‘청청벼’가 type IV, 그 외 모든 품종은 type I으로 분석되었다(표 1-10).

Table 1-10. Shikimic dehydrogenase(Sdh) allele types of 43 rice cultivars using starch gel electrophoresis and their reactions to brown planthopper

Varietal Group	Reaction ^{a)} to BPH	Allele type of <i>Sdh1</i>					
		I		II	III	IV	
Japonica	S	Hwayeongbyeo, Iksan435, Hwasambyeo, Iksan436, Milyang173, Iksan444, Milyang101, Iksan431, Yeongdeog29	Hwayeongbyeo Acp61, Hwayeongbyeo Lys2, Hwayeongbyeo Ocp194	Nagdongbyeo, Donghaebyeo, Hwamyeongbyeo, Sinseonchalbyeo, Yeongdeog26, Milyang95, Milyang165, Milyang166	Milyang171, Milyang172, Iksan436, Iksan443, Iksan445, Tohoku144, Tohoku149	-	-
		R	Hwacheongbyeo, Milyang64, Sangju 13, Suweon 397	Milyang65	-	-	
Tongil & Indica	S	Milyang23	Namcheonbyeo	Hyangmibyeo1	-	-	
	R	IR36, IR50, Hangangchalbyeo	Gayabyeo, Samgangbyeo,	Milyang63, Jangseongbyeo,	-	Cheongcheongbyeo	
Total	43	25		17	-	1	

^{a)} S : Susceptibility, R : Resistance.

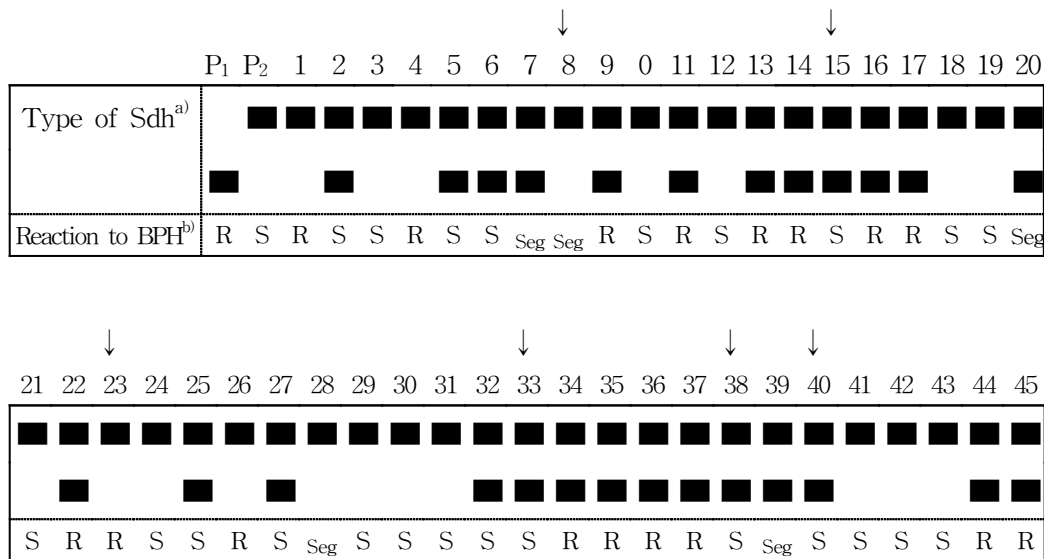


Fig. 1-5. Relationship between BPH resistance and Sdh isozyme in BC₃F₁ and BC₃F₂ of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'. Arrows(↓) designate recombinant by crossing over. ^{a)} Sdh isozyme types in 45 BC₁F₁ individuals of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'. ^{b)} Reaction to BPH in BC₃F₂ derived from 45 BC₃F₁ of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'. R: Resistance, S: Susceptibility, Seg.: Segregation.

한편, '삼강벼/낙동벼' 조합의 여교잡 세대를 대상으로 Sdh marker를 이용한 저항성 계통의 선발 가능성을 BC₁F₁, BC₂F₁, BC₃F₁ 및 BC₃F₂ 집단을 대상으로 한 분석에서도 '삼강벼'의 저항성은 Sdh1과 밀접하게 연관되어 있었다(그림 1-5). 이 결과로부터 통일형 저항성 품종과 자포니카형 감수성 품종이 교배된 조합에서 양친의 Sdh type을 알고 있다면 여교잡된 F₁ 개체의 Sdh 분석만으로도 중간모본 양성이 가능하고, F₂ 세대의 전개없이 감수성 품종인 반복친의 Sdh type 제거도 가능함을 알 수 있었다. 따라서 다양한 교배 모본을 대상으로 한 Sdh type과 벼멸구 저항성과의 관계분석이 이루어지고 그 결과를 잡종집단의 저항성 개체 선발에 이용한다면 벼멸구 검정이나 재배환경에 크게 구애됨이 없이 저항성 계통의 선발도 가능할 것으로 보여진다.

제 5 절 DH 집단을 이용한 유전자지도 작성

1. DH 집단을 이용한 연관분석

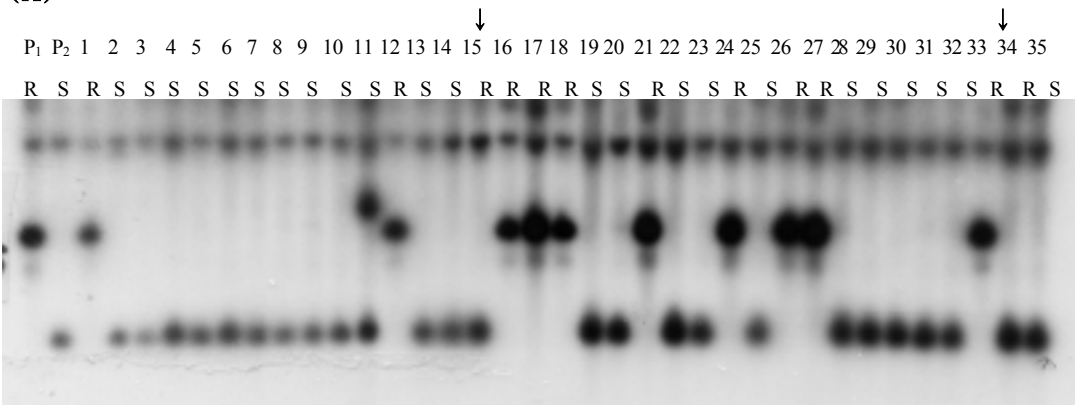
‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 집단 35계통의 벼멸구 저항성 검정결과와 7개의 RFLP marker, 2개의 RAPD marker 및 1개의 Sdh marker를 이용하여 연관분석을 실시한 바, 9개의 marker에서 고도로 유의한 결과를 나타내었다(표 1-11). 특히, 벼멸구 저항성과 G258, RG901 및 G402는 조환가가 6.2%로 가장 낮았을 뿐만 아니라 LOD의 값이 가장 높게 조사되어, 이들 marker와 벼멸구 저항성 유전자는 비교적 밀접하게 연관되어 있는 것으로 분석되었다(그림 1-6). 특히 G258은 2차 년도에 실시한 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 집단의 벼멸구 저항성과의 연관분석에서도 *Bph 1* 유전자와 4.1 cM 거리로 밀접하게 연관되어 있는 것으로 밝혀진 바 있다.

Table 1-11. Linkage analysis between BPH resistance and 9 DNA markers in DH population of ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’

Gene pair		Segregation mode				x ²	Recombination value (%)	LOD
A	B	A-BB	A-bb	aaBB	aabb			
<i>Bph</i>	G258	10	2	-	23	24.50**	6.2±4.3	6.38
<i>Bph</i>	G124	7	5	3	20	8.00**	25.0±7.7	1.82
<i>Bph</i>	RG901	11	1	1	22	24.50**	6.2±4.3	6.38
<i>Bph</i>	G336	5	7	1	22	8.00**	25.0±7.7	1.82
<i>Bph</i>	G402	10	2	0	23	24.50**	6.2±4.3	6.38
<i>Bph</i>	G307	6	6	1	22	10.13**	21.9±7.3	2.33
<i>Bph</i>	OPA19	8	3	1	20	15.21**	13.8±6.4	3.68
<i>Bph</i>	OPH7	7	4	3	19	8.53**	23.3±7.7	1.95
<i>Bph</i>	Sdh	9	3	-	23	21.13**	10.6±4.6	5.31

** : Significant at 1% level.

(A)



(B)

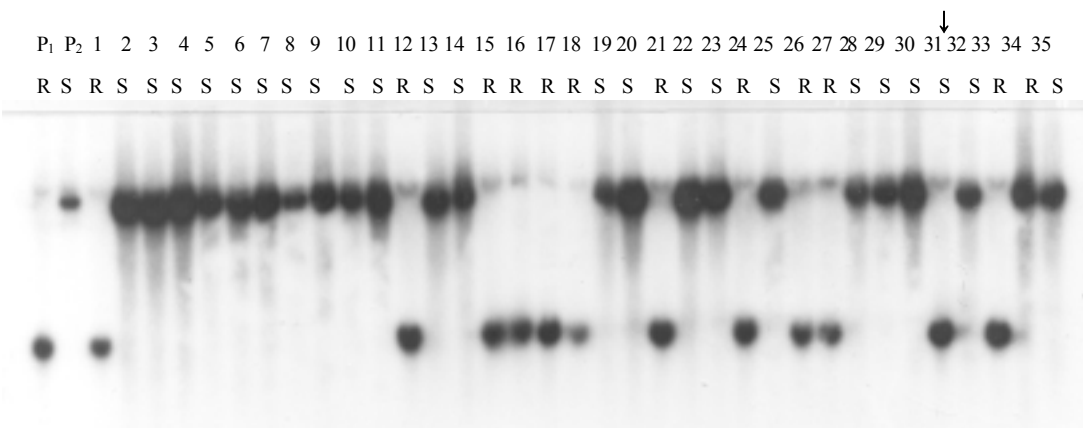


Fig. 1-6. Relationship between BPH resistance and DNA markers, G258(A) and RG901(B) in DH population of 'Samgangbyeo /Nagdongbyeo'. Arrows(↓) designates recombinants produced by crossing over in the DNA region. 1~35 : DH individuals. R : Resistance, S : Susceptibility.

2. 유전자 지도 작성

‘삼강벼’와 ‘낙동벼’에 다형성을 나타내는 것으로 선발된 220개의 RAPD marker 를 이용하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 DH 계통에 대한 벼멸구 저항성과 marker간의 관계분석 결과(그림 1-7), 목표 유전자를 가진 저항성 그룹(RP, RB)에 band가 형성되는 marker type R과 감수성 그룹에 형성되는 marker type S의 형태로 구분

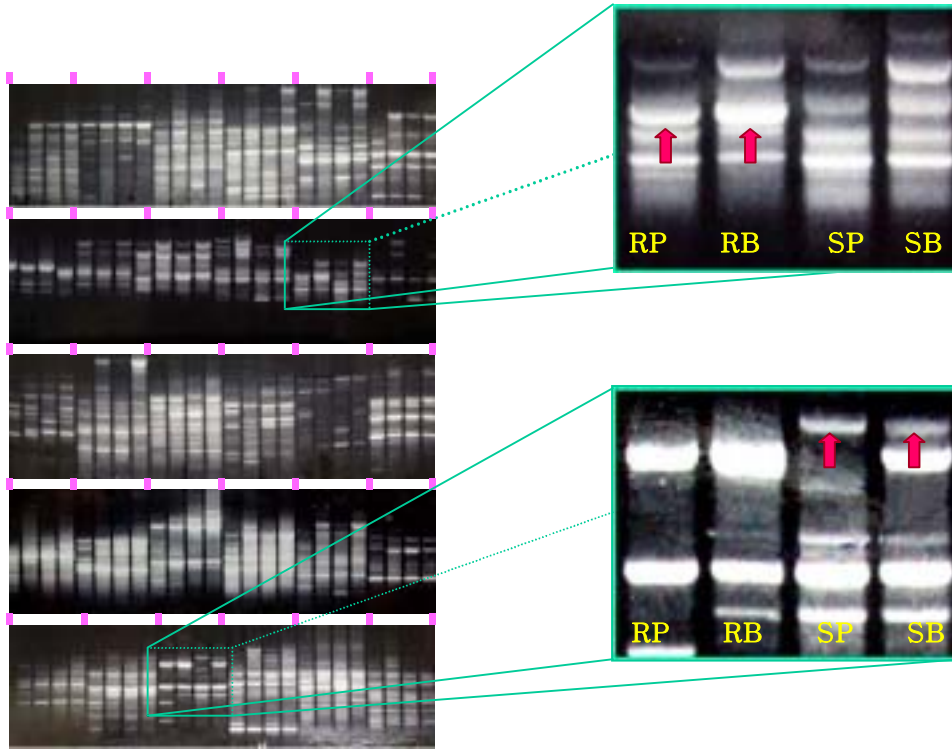


Fig. 1- 7. Bulked segregant analysis using RAPD primers. RAPD markers show the polymorphism between resistant groups (RP,RB) and susceptible groups(SP,SB). RP : Resistant parent 'Samgangbyeo', RB : Resistant bulk, SP : Susceptible parent 'Nagdongbyeo', SB : Susceptible bulk.

되었으며 공시된 RAPD marker 중에서 11개의 marker에서 다형성을 나타내었다(표 1-12). 이들 선발된 RAPD marker 가운데 7개의 markers (OPE 18, OPV8, OPU8, OPW12, OPW19, OPX2, OPX11)는 저항성의 marker type을, 나머지 4개의 marker (OPD16, OPV4, OPV10, OPW16)는 감수성의 marker type을 나타냈다.

Table 1-12. A list of RAPD marker showed polymorphic bands between resistant lines and susceptible lines by BSA method using 520 RAPD primers

Marker	Marker type ^{a)}	Marker sequence	
OPD 16	S	5' - AGGGC	GTAAG - 3'
OPE 18	R	5' - GGACT	GCAGA - 3'
OPV 4	S	5' - CCCCT	CACGA - 3'
OPV 8	R	5' - GGACG	GCGTT - 3'
OPV 10	S	5' - GGACC	TGCTG - 3'
OPU 8	R	5' - GGCGA	AGGTT - 3'
OPW 12	R	5' - TGGGC	AGAAG - 3'
OPW 16	S	5' - CAGCC	TACCA - 3'
OPW 19	R	5' - CAAAG	CGCTC - 3'
OPX 2	R	5' - TTCCG	CCACC - 3'
OPX 11	R	5' - GGAGC	CTCAG - 3'

^{a)} S: Negative band associated with susceptibility, R: Positive band associated with resistance.

‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F₂ 집단의 벼멸구 저항성과 DNA marker와의 관계분석에서 *Bph 1*과 밀접하게 연관된 것으로 밝혀진 RFLP maker(그림 1-4) 및 BSA 분석에서 연관 marker로 선발된 RAPD marker(표 1-12)를 이용하여 DH집단의 벼멸구 저항성과 이들 marker와의 관계를 분석한 바, ‘OPE18’은 벼멸구 저항성 유전자와 4.4 cM 거리로 밀접하게 연관된 것으로 나타났다 (표 1-13, 그림 1-8).

Table 1-13. Linkage analysis between BPH resistance and DNA markers in the DH population of ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’

Gene pare		Segregation mode				x ²	Recombination value (%)	LOD
A	B	A-BB	A-bb	aaBB	aabb			
<i>Bph</i> - OPE18		21	2	0	23	38.35**	4.4±3.1	10.27
<i>Bph</i> - G258		19	3	0	23	33.80**	6.7±3.7	1.82
<i>Bph</i> - RG413		18	4	0	22	30.42**	8.9±4.3	6.38
<i>Bph</i> - RG901		17	6	1	22	22.25**	15.0±5.3	5.33

** : Significant at 1% level.

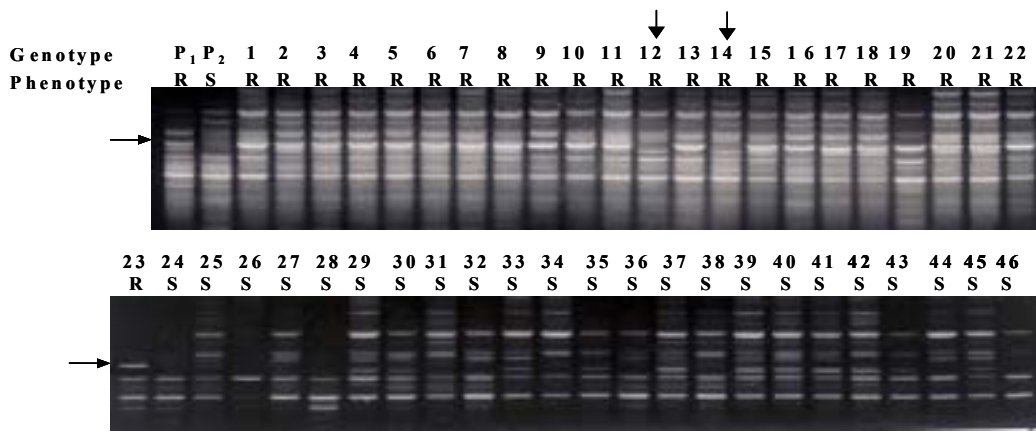


Fig. 1-8. Relationship between BPH resistance and DNA marker, OPE 18, pattern(→) in DH lines derived from 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'. Arrows(↓) designated recombinant produced by crossing over in the DNA region. 1-46 : 46 DH lines. R : Resistance, S : Susceptibility.

2002년 하계에 '삼강벼/낙동벼' 조합 F₂ 집단 158개체의 벼멸구 저항성과 12번 염색체상에 위치한 것으로 밝혀진 RFLP marker 및 OPE 18과의 관계를 조사한 바, OPE 18이 벼멸구 저항성과 3.9 cM의 조환가로 가장 밀접하게 연관되어 있는 것으로 분석되었다(표 1-14). F₂ 집단에서 분석된 조환가(3.9cM)가 DH집단(4.4 cM)에서 보다 낮은 것은 두 집단의 크기 즉, 분석에 이용된 F₂ 집단이 DH집단보다 큰데서 비롯된 결과라고 사료된다.

Table 1-14. Linkage analysis between BPH resistance and DNA markers in the F₂ population of 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'

Markers	Recombination value (%)	χ^2	LOD	P
G 402	22.2	2.36 ^{ns*}	10.7	0.01-0.05
RG 4				
G 261	7.6	1.50 ^{ns}	28.1	0.01-0.05
RG 336				
OPE18	31.1	2.64 ^{ns}	4.7	0.01-0.05
<i>Bph 1</i>				
RG 901	47.1	2.84 ^{ns}	0.1	0.01-0.05
	3.9	1.10 ^{ns}	35.6	0.01-0.05
	32.3	2.70 ^{ns}	4.0	0.01-0.05

* ns : Not significant.

표 1-14.의 연관 분석 결과를 근거로 하여 MAPL program에 의해 작성된 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 F₂ 집단에 대한 벼멸구 저항성 유전자와 연관지도는 그림 1-9 에서와 같다.

Marker

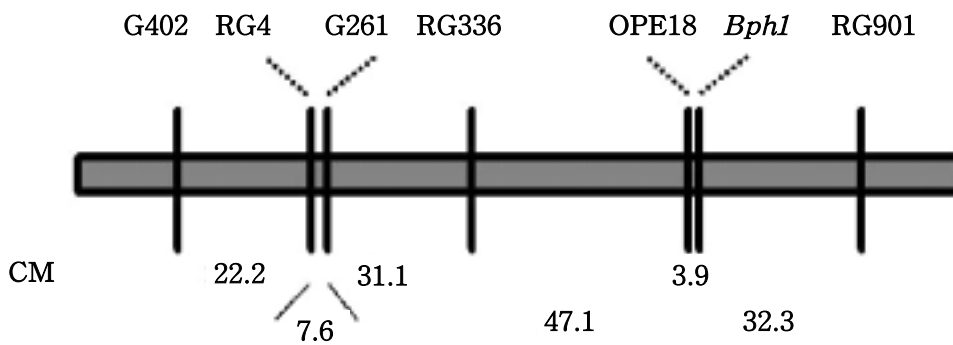


Fig. 1- 9. Linkage map of Bph1 genomic region on Chromsome 12. The map was constructed using F₂ population of ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’.

제 6 절 여교잡 집단의 DH 계통 육성

2000/2001 동계에 ‘삼강벼’에 ‘낙동벼’가 6회 교잡된 BC₅F₁ 개체에 대해 벼멸구 저항성 검정을 실시하여 저항성으로 나타난 개체의 약을 배양하여 174개체를 양성하였다. 재분화된 식물체중에 염색체가 자연적으로 배가된 90개체를 2001 하계 포장에 재배하여 종자량이 충분하게 채종된 39계통에 대한 벼멸구 저항성 정도를 반복 조사하여 안정적으로 저항성 반응을 보인 18 계통을 선발하였다 (표 1-15).

Table 1-15. BPH reaction of DH lines produced by anther culture of BC₅F₁ plants

from a cross 'Samgangbyeo /Nagdongbyeo'^{*6},

Cross	No. of plants regenerated			BPH reaction		
	Total	DH	Haploid	Total	Resistance	Susceptibility
Samgangbyeo/ Nagdongbyeo ^{*6} F ₁	174	90	84	39	18	21

Table 1-16. Major Agronomic characteristics of DH lines produced by anther culture of BC₅F₁ plants from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'

DH lines	Heading date	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	No. of panicles / hill	BPH reaction	WC WB
YR22216 Acp1	Aug.22	80	21	10	R	1/3
YR22216 Acp2	Aug.23	81	20	9	R	1/3
YR22216 Acp3	Aug.22	79	20	9	R	0/2
YR22216 Acp4	Aug.22	77	21	10	R	0/2
YR22216 Acp5	Aug.23	84	18	10	R	1/3
YR22216 Acp6	Aug.23	81	19	11	R	0/1
YR22216 Acp7	Aug.22	84	21	10	R	2/3
YR22216 Acp8	Aug.23	79	19	10	R	1/2
YR22216 Acp9	Aug.22	83	19	11	R	2/3
YR22216 Acp10	Aug.22	81	20	11	R	0/2
YR22216 Acp11	Aug.23	75	21	11	R	0/1
YR22216 Acp12	Aug.22	74	20	12	R	1/3
YR22216 Acp13	Aug.22	81	19	11	R	2/3
YR22216 Acp14	Aug.23	79	20	11	R	1/3
YR22216 Acp15	Aug.23	82	19	10	R	1/2
YR22216 Acp16	Aug.22	78	20	10	R	2/3
YR22216 Acp17	Aug.22	79	21	11	R	0/2
YR22216 Acp18	Aug.23	79	20	12	R	0/2

* WC : White center, WB : White belly.

이들 계통을 2002년 하계포장에 계통 재배하고 벼멸구 저항성을 포함한 주요 특성을 조사한 결과는 표 1-16과 같으며, 이중 벼멸구에 저항성이면서 특성이 양호한 YR22216 Acp17과 YR22216 Acp18을 선발하여 실용적인 특성이 우수한 중간모본을 육성하고자 ‘주남벼’ 등과 교배하여 2003년 현재 F₁을 육성중에 있다(표 1-17).

Table 1-17. Major agronomic characteristics of F₁ plants from two crosses between BPH resistant lines (DH) and newly developed rice cultivars, ‘Junambyeo’ and Yeonganbyeo’

YR No.	Cross combination	No. of crossed seeds	No. of plants transplanted	Heading date	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	NPH
YR24355	Junambyeo/YR22216 Acp17	43	39	Aug.21	76	21	11
YR24356	Junambyeo/YR22216 Acp18	40	34	Aug.21	80	20	10
YR24357	Yeonganbyeo/YR22216 Acp17	59	42	Aug.21	69	20	10
YR24358	Yeonganbyeo/YR22216 Acp18	74	48	Aug.21	71	21	9

* NPH : No. of panicles / hill.

한편, 2002년 하계 포장에 재배된 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 BC₆F₃세대 75계통 중 벼멸구에 저항성이고 미질 및 초형이 양호한 BC₆F₃-190을 화분친으로 하여 ‘주남벼’와 인공교잡시킨 F₁의 약을 배양하였다. 약배양에서 재분화된 식물체 140개체 중에서 염색체가 자연적으로 배가된 30개체를 2002/2003 동계 온실에서 재배하여 채종하였다(표 1-18). 이들 계통을 2003년 하계 경북대학교 실습포장에 계통재배하고 출수기를 포함한 주요 작물학적 특성을 조사중에 있다.

Table 1-18. Production of DH lines by anther culture of BC₆F₃ lines from a cross ‘Junambyeo//Samgangbyeo/Nagdongbyeo’^{a)}

Cross ^{a)}	No. of anthers cultured	No. of green plants regeneration	No. of doubled haploids
J//S/N ^{*7} F ₃	14,164	140	30

^{a)} J : ‘Junambyeo’ S : ‘Samgangbyeo’, N : ‘Nagdongbyeo’.

제 7 절 DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발

1. 벼멸구 저항성 관련 STS marker의 개발 및 연관분석

가. STS marker의 개발

벼멸구 저항성 개체를 DNA marker에 의해 간접 선발하는 marker-assisted selection의 효율을 향상시키기 위하여, ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 집단의 벼멸구 저항성 유전자와 밀접하게 연관된 것으로 밝혀진 OPE18의 PCR 산물을 sequencing 하여 STS marker (20-mer primer)로 전환시켰다.

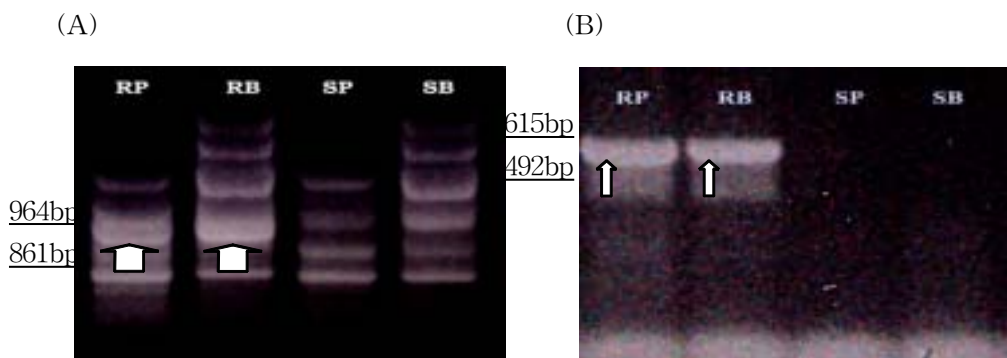


Fig. 1-10. Conversion of OPE 18 (☐) into a PCR-based STS marker(↑).
 RP : Resistant parent, ‘Samgangbyeo’. RB : Resistant bulk. SP : Susceptible parent, ‘Nagdongbyeo’. SB : Susceptible bulk.

그림 1-10에서 964bp와 861bp 사이에 위치한 band를 회수 후 cloning 하여 분석하였는데, 그 염기서열을 조사한 바, 총 923개의 염기로 구성된 DNA 단편임을 확인할 수 있었다(그림 1-11의 A). 이들 염기서열의 양 말단에 위치한 염기서열 10개가 OPE18 primer의 염기서열과 동일한 것으로 확인되었다. 염기서열을 바탕으로 STS marker (523bp)의 primer set (그림 1-11의 B)를 제작한 바, PCR을 통해 증폭된 DNA fragment가 615bp와 492bp를 표시하는 size marker 사이에 위치함으로써 OPE18 (923bp)이 STS marker (523bp)로 전환되었음을 확인하였다.

(A)

1	GGACT	GCAGA	GGGTA	AGACC	AACCC	CTATA	TAAGG	GGGTA	AGGCC	45
46	GGTTC	ATTGT	AAAAA	ACAAT	CTACA	ATCAA	TCGAA	TCGTT	TTTCA	90
91	TATTG	CTTTT	AGTTT	TCTCT	TAGTT	TGTCC	ATCTT	TGTCG	ATTTG	135
136	TGCCG	TAAAT	CGTCC	GCCGC	<u>CGCTG</u>	<u>CGAGA</u>	<u>GTGTG</u>	<u>ACACT</u>	TCTTT	180
181	GTAGG	TTTAT	CGTGA	AAACC	TTCCG	TTTTG	CCTAC	GAGAT	GGGTA	225
226	GTTAT	CTAGA	ATCGG	CTCCG	CTAGC	CGGTT	TAGTT	ATCAA	AACCC	270
271	ATCTT	GGTTT	AGCTT	TTGCC	AGATT	GAGGT	GGTTG	GCGAC	TCTAA	315
316	GATCA	CCATA	AGACG	TTTAG	GTGTT	GCGAT	CATGC	TTGTC	AACTT	360
361	GTACAC	AAAAA	GTTAT	CAACA	CCTTC	GCCGG	AGACT	AACTA	GCGGC	405
406	GTGCT	GGCGC	TCGAC	GGCGG	ACAAG	CTCTC	GCGGG	CTGCA	GCTTC	450
451	ATGTA	TTGTC	GACTT	GGTGT	GGCTT	CCCAA	GGCCA	TGTCC	CTGCG	495
496	CTCGA	CGAAG	CGGCA	TTCCG	CAGTT	CCAGT	CTCCA	GATGG	CATCA	540
541	AAGTG	GCGTC	ACGCG	ATTCT	TATGC	ATTGC	CAATT	TGCCA	TGGGT	585
585	GTGTC	TGCAT	TTTTG	GTTCT	TCTAT	GCAGA	AGTGG	AAAAC	CACTG	630
631	GCACG	GGCGG	GCCAC	CCCGG	TTCAA	<u>CCCGT</u>	<u>CAAAC</u>	<u>CCGTG</u>	<u>TAACC</u>	675
676	<u>CAAAC</u>	CGGTT	AAACC	GGTTA	TTTCT	GGGTT	TGACT	GGGTT	GATGT	720
721	ACTAA	CCCGT	TTAAA	CCGTG	GATGA	TGAAC	AGGCC	TAGCT	AATCC	765
766	TATAG	AAATT	ACTCA	TCATT	GGGTA	TGGTG	CCCAT	CCTGT	ATCAA	810
811	AGAAT	CCATT	GTTTT	ACAGA	GAAAT	TAAGA	AGGTA	GAGGA	GCAGG	855
856	AACTG	CTGTT	ACCAT	TTTAT	TTACC	TACGC	TCTGT	CCCTG	CCGTT	900
901	GTTGA	TCTCA	TGATC	TGCAG	TCC					923

(B)

Forward primer : 5'- CGCTGCGAGAGTGTGACACT -3'

Reverse primer : 5'- TTGGGTTACACGGGTTTGAC -3'

Fig. 1-11. Development of the STS marker. (A) The sequence derived from the cloned fragment, OPE18₉₂₃, with RAPD marker. (B) Site specific oligonucleotide primer set. Italics underlined is the site for designing STS marker.

나. STS marker와 벼멸구 저항성과의 관계 분석

'삼강벼/낙동벼' 조합의 F₂ 158개체에 대한 생물검정과 STS marker에 의한 분석결과, 생물검정에서는 총 158개체 중 128개체가 저항성을, 30개체가 감수성 반응을 보인데 비해 STS marker의 pattern은 저항성을 나타낸 개체중 124개체와 감수성을 나타낸 개체중 28개체에서 생물검정과 일치하는 경향을 보였다(표 1-19). '삼강벼/낙동벼' 조합 F₂ 집단이 벼멸구 저항성과 STS marker와의 관계는 그림 1-12에서와 같다.

Table 1-19. Relationship between STS marker and BPH resistance in 158 F₂ plants derived from a cross 'Samgangbyeo/Nagdongbyeo'

		Phenotype of F ₂ plants		
		Total	R	S
Polymorphism pattern of STS marker	Resistance	126	124	2
	Susceptibility	32	4	28
	Total	158	128	30

본 연구에서 개발된 STS marker는 벼멸구 저항성과의 연관분석 결과 *Bph 1*과 3.9cM 거리에 위치한 것으로 나타났는데(표 1-14, 그림 1-9), 이는 동일한 집단에서 선발된 표 1- 8의 RFLP marker (G258, 4.1cM)에서보다 *Bph 1*에 더 가깝게 위치했을 뿐만 아니라 STS marker이기 때문에 분석 과정이 간편하고 비용도 절감되어 이 marker를 저항성 개체 선발에 이용하게 되면 MAS의 효율이 한층 높아질 것으로 사료된다.

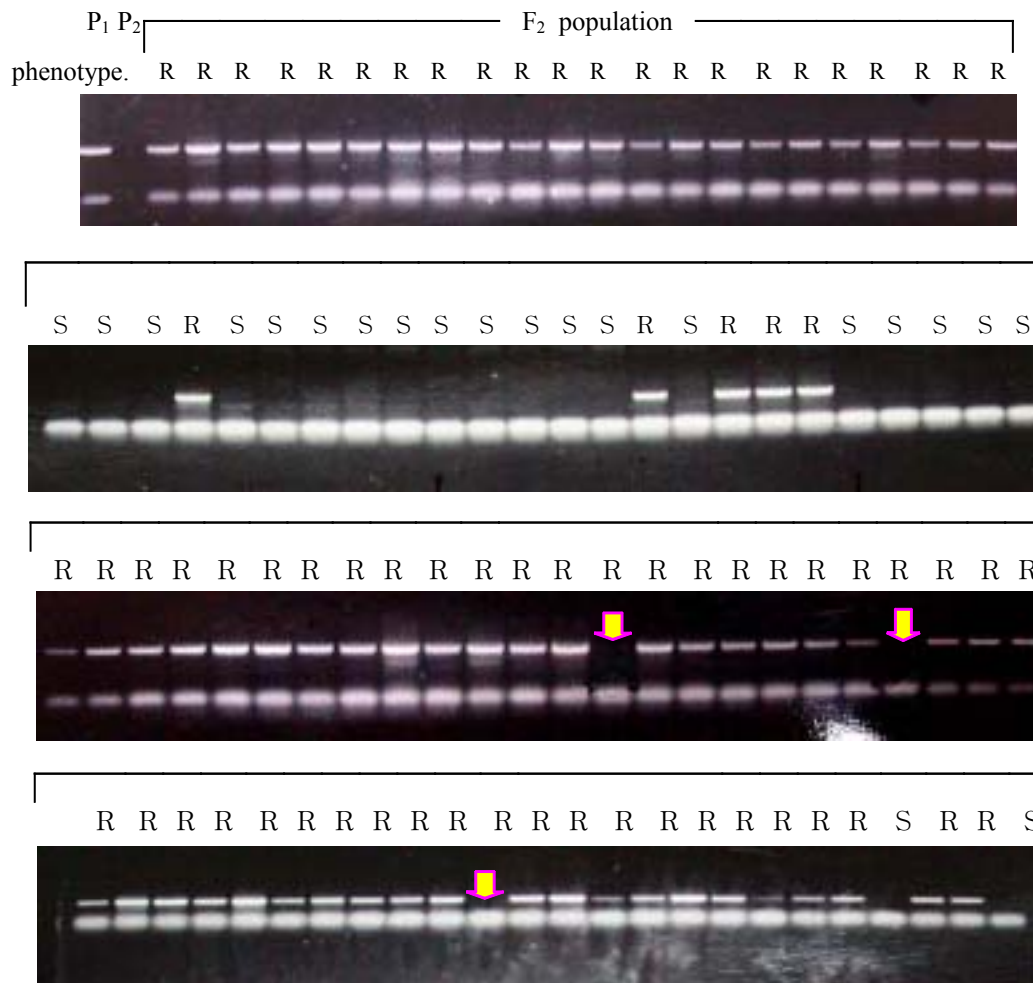


Fig. 1-12. Linkage analyses using STS marker. F₂ individuals with S are SS (homozygous susceptibility), and all others are RR (homozygous resistance) or RS (heterozygous resistance). Arrows() designate recombinants produced by crossing over in the DNA region. P₁ : 'Samgangbyeo', P₂ : 'Nagdongbyeo', R : Resistance, S : Susceptibility.

2. 벼멸구 저항성원의 구분

국내에서 육성된 통일형 품종과 외국에서 도입된 인디카형 저항성 벼 및 자포니카형 감수성 품종 등 총 19개 품종을 이용한 벼멸구(생태형I) 생물검정결과, 낙동벼'를 제외한 나머지 품종 모두가 저항성 반응을 나타내었다(표 1-20).

Table 1-20. Relationship between the origin of BPH resistance and the reaction of STS marker in 19 rice cultivars

Cultivar	BPH ^{a)} reaction	STS marker	Source
1.TKM6	R	+ ^{b)}	TKM 6 (<i>Bph 1</i>)
2.Mudgo	R	- ^{c)}	Mudgo (<i>Bph 1</i>)
3.ASD7	R	-	ASD 7 (<i>bph 2</i>)
4.Samgangbyeo	R	+	TKM 6, Mudgo
5.Nagdongbyeo	S	-	-
6.Baegunchalbyeo	R	+	TKM 6
7.Jangseongbyeo	R	-	Mudgo
8.Chilseongbyeo	R	-	Mudgo
9.Andabyeo	R	-	TKM 6, Mudgo
10.Hangangchalbyeo	R	+	TKM 6
11.Gayabyeo	R	-	Mudgo
12.Nampungbyeo	R	-	Mudgo
13.Milyang30	R	-	Mudgo
14.Yeongpungbyeo	R	+	TKM 6
15.Cheongcheongbyeo	R	-	Mudgo
16.Hwacheongbyeo	R	-	IR1154-243
17.IR36	R	+	TKM 6
18.Milyang63	R	-	IR1154-243
19.Namyeongbyeo	R	-	TKM 6, Mudgo

^{a)} R : Resistance, S : Susceptibility, ^{b)} +indicates amplification of the STS marker.

^{c)}-indicates the absence of STS amplification.

저항성 품종 각각의 계보도를 통해 벼멸구 저항성원을 살펴본 바, '백운찰벼', '한강찰벼', '영풍벼' 및 'IR36'은 저항성원으로 'TKM6'만을 포함하고 있었으며, 이들 품종은 선발된 STS marker에 대해서도 특이적 band를 증폭하였다. 저항성원으로 'Mudgo'만을 가진 '장성벼', '칠성벼', '가야벼', '남풍벼', '밀양30호' 및 '청청벼'는 벼멸구 감수성 품종인 '낙동벼'처럼 band를 증폭하지 않았으며, 'TKM6'와 'Mudgo'를 모두 포함한 '삼강벼', '안다벼', '남풍벼' 중에서는 '삼강벼'에서만 band를 확인할 수 있었다(그림 1-13). 'TKM6'와 'Mudgo'는 벼멸구 저항성 품종 육종에서 가장 광범위하게 이용되고 있는 유전자원이고 다 같이 모두 *Bph 1*을 가진 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서 개발한 STS marker에 대해서는 다형성을 나타냈다 (표 1-20, 그림 1-13). 이는 'TKM6'와 'Mudgo'는 벼멸구에 대해 서로 다른 유전자를 가지고 있을 가능성이 크다는 것을 시사해 주고 있다.

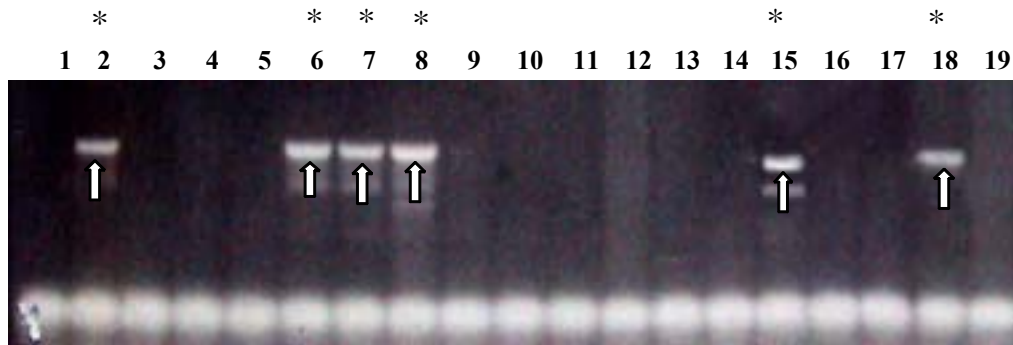


Fig. 1-13. An arrow(↑) indicates DNA marker pattern obtained by PCR amplification using the STS marker in rice cultivars. * Rice cultivars with *Bph 1* originated from 'TKM6'.

- | | | | |
|-------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| 1: Mudgo, | 2: TKM6, | 3: ASD7, | 4: Hwacheongbyeo, |
| 5: Chilseongbyeo, | 6: Baegunchalbyeo, | 7: Hangangchalbyeo, | 8: Yeongpungbyeo, |
| 9: Andabyeo, | 10: Jangseongbyeo, | 11: Gayabyeo, | 12: Nampungbyeo, |
| 13: Milyang30, | 14: Cheongcheongbyeo, | 15: Samgangbyeo, | 16: Nagdongbyeo, |
| 17: Milyang63, | 18: IR36, | 19: Namyongbyeo. | |

제 4 장 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용

제 1 절 서 론

자포니카 벼 품종육성에 있어서 도입되어야 할 중요한 형질 중에 하나인 벼멸구 저항성은 하나의 주동유전자에 의해 유전된다고 알려져 있음에도 불구하고(Shin, 1990, Murada et. al, 1997) 생물검정이 힘들고 정확한 검정에는 많은 시간이 요구되는 등의 문제점이 제기되고 있다(Cho et. al, 1988). 벼멸구에 저항성인 자포니카형 벼 '밀양64호'는 isozyme marker인 Sdh-1과 밀접히 연관되어 있고(Yeo et. al, 1998), 1980년대부터 이를 모본으로 이용하여 수 백조합의 인공교배를 실시하였으나 아직 우수한 저항성 품종은 개발하지 못하고 있는 실정이다. 그 원인으로는 '밀양64호'의 저항성 반응은 인디카형 품종과는 달리 묘의 생육초기 보다는 4~5엽기에 뚜렷하게 나타나고 '밀양64호'와 교배된 잡종집단에서 선발된 저항성 개체들은 대부분 농업적으로 열악한 형질들을 가지고 있기 때문인 것으로 추정하고 있다(Yeo & Sohn, 2001).

최근 분자 생물학의 발전과 더불어 잡종집단의 유용형질 선발에 DNA marker를 이용하는 MAS (Marker assisted selection)체제가 개발되면서 기존의 육종효율을 크게 증진시키고 있다. 특히 벼멸구 저항성과 같이 단순하게 유전되는 유용 농업형질에 있어서 저항성 검정이 매우 어려울때 이러한 marker를 이용한 여교잡 육종법은 보다 효과적인 방법으로 사료된다.

본 연구에서는 자포니카형이면서 벼멸구에 저항성인 중간모본을 육성하기 위해 통일형 저항성 품종인 '삼강벼'와 '청청벼'에 자포니카형 품종인 '낙동벼'를 반복친으로 여교배하면서 세대별로 벼멸구 검정과 주요 농업적 특성을 조사하였다. 그리고 벼멸구 저항성 개체의 선발효율을 향상시키기 위하여 벼멸구 저항성과 주요 농업적 특성과의 관계 분석을 실시하는 한편, 한편, 잡종집단을 대상으로한 저항성 개체 선발에 DNA marker를 이용하였다.

그리고 벼멸구에 저항성이면서 자포니카형인 '밀양64호' 보다 수량이나 미질면에서 우수한 벼멸구저항성 품종을 개발하기 위하여 벼멸구에는 약하지만 수량이나 밥맛이 뛰어난 '밀양165호'('주남벼')를 반복친으로 이용하여 여교잡 집단을 양성하였다. 여교잡 세대에서 저항성개체의 선발은 isozyme marker인 Sdh1을 이용하였으며 후대

계통들에 대한 여러 가지 농업적 형질들을 조사하여 최종적으로 벼멸구에 저항성이면서 미질이 우수한 ‘밀양198호’를 선발하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 인공교배 및 여교잡 집단 육성

1998년 하계에 영남농업시험장 온실에서 벼멸구에 저항성 품종인 ‘칭청벼’와 ‘삼강벼’를 자방친으로 하고 감수성 품종인 ‘낙동벼’를 화분친으로 인공교배하여 얻어진 교배립을 ‘98/99 동계 온실에서 재배하여 F₁ 집단을 양성하였다. ‘98/99 동계에서 두 조합의 F₁ 개체에 ‘낙동벼’를 반복친으로 여교잡을 실시하고 F₂ 종자를 채종하였다. 그 이후 2003 하계에 이르기까지 여교잡과 포장 특성조사를 병행하면서 잡종집단을 육성하였다.

2. 여교잡 집단의 주요 특성 조사 및 선발

‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 여교잡 집단(BC₅F₃, BC₅F₄, BC₆F₃)을 2002년 하계 포장에 재배하여 각 계통별로 포장특성과 벼멸구 저항성 정도를 조사하였다. 포장재배 조건은 주당 1본씩 30×15cm의 재식밀도로 이앙하였으며 그 외의 재배법과 시비법 및 포장관리는 영남농업시험장 벼 표준재배법에 준하였다. 포장 특성으로 출수기, 간장, 수장, 도열병 저항성 등을 조사하고 실내에서 계통별 벼멸구 저항성 및 미질 검사를 실시하여 선발된 계통을 2003년 하계 포장에 재배하였다.

3. 벼멸구 저항성 검정 및 유전분석

벼멸구 저항성 검정방법은 다음과 같다. 포장에서 채집된 벼멸구 및 영남농업시험장에서 사육된 벼멸구에 대해 식이 품종을 달리하여 그 생태형을 확인하였다. 벼멸구 접종은 상토를 채운 플라스틱 상자(40×25×10cm)에 싹을 틔운 종자를 2×0.5cm 간격으로 품종당 15-20립씩 파종하여 4-5엽기에 개체당 7-10마리씩 되게 벼멸구 밀도를 조절하여 접종하고, 25일 후에 개체별로 저항성 정도를 조사

하였다. 개체별 저항성 판정기준은 0 : 무피해(no damage), 1 : 제 1엽의 부분적 황화 및 위조(partial yellowing/wilting of first leaf), 3 : 제 1, 2엽의 부분적 황화(1st & 2nd leaves partially yellow), 5 : 심한 황화와 약한 위축(pronounced yellowing & some stunting), 7 : 위조 및 심한 위축(wilting and severe stunting), 9 : 고사(plant dead)로 하고, 0-3은 저항성(R), 4-6은 중도저항성(M), 7-9는 감수성(S)으로 구분하였다. 벼멸구 저항성 유전분석을 위하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 F₁, BC₁F₁, F₂ 집단 및 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 F₂ 집단을 대상으로 4~5엽기에 벼멸구 검정을 실시하여 개체별로 저항성 정도를 조사하였다. 각 조합별 저항성과 감수성의 분리비는 χ^2 -test에 의해 그 적합성을 검정하였다. 그리고 ‘삼강벼/낙동벼’ 및 ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서 감수성 친인 ‘낙동벼’가 반복친으로 교배된 여교잡세대에 대해서도 세대별로 벼멸구 검정을 실시하였다.

4. 벼멸구 저항성과 주요 농업형질과의 관계

벼멸구 저항성과 주요 농업적 특성과의 관계를 분석하기 위하여 벼멸구에 저항성이면서 자포니카형인 ‘밀양64호’를 화분친으로 하여 양질성 자포니카형 계통인 ‘밀양165호(“주남벼”)’와 인공교배하였다. ‘밀양165호/밀양64호’ 조합의 F₁세대에서 F₃ 세대까지는 영남농업시험장 온실에서 경과시키고, F₄세대 318계통을 영남농업시험장 포장에 계통재배하였다. 계통별로 30×15cm의 재식밀도로 주당 1본씩 이앙하고 영남농업시험장 표준재배법에 준하여 재배하면서 출수기, 간장, 도복관련형질 등을 계통별로 조사하였다. 주요 형질별로 조사된 318계통(F₁)의 특성들을 저항성 계통군과 감수성 계통군으로 구분하여 t검정에 의해 각 군별로 조사된 평균치를 양친의 값과 비교하였다. 그리고 ‘밀양64호’에 ‘밀양165호’가 3회 여교잡된 BC₃F₄ 세대 98계통에 대한 벼멸구 저항성과 출수기 및 간장과의 관계를 분석하였다.

한편, 벼멸구 저항성과 도복관련형질과의 관계를 분석하기 위하여 ‘밀양165호/밀양64호’ 조합의 RIL 170계통(F₇)을 SSD 법에 의해 양성하였다. RIL 집단을 영남농업시험장 계통 포장에 전개하고 간장, 중심고 등과 같은 도복관련 특성들을 계통별로 조사하여 벼멸구 저항성과의 관계를 분석하였다. RIL 집단의 도복관련형질과 벼멸구 저항성과의 연관분석에 의해 유전자 지도를 작성하고 QGENE

program에 의해 양적형질 유전자좌(QTL)를 분석하였다. 각 형질들의 특성 조사에서 ‘간장’과 ‘수장’은 계통별로 10개체의 평균치를, ‘중심고(中心高)’는 이삭이 달린 줄기에서 무게 평형을 이루는 부위로부터 지표면까지의 길이로, ‘3절 간장’은 이삭으로부터 3번째 마디의 길이로, ‘모멘트’는 지상부상체중×지상부 길이(간장+수장)로, ‘도복지수’는(모멘트/3절간 좌절중)×100의 공식으로, 좌절중은 간격이 6cm로 설치된 지지대에서 제 3절간의 가운데 부위가 좌절될때의 디지털 저울에 나타난 중량으로 조사하였다.

5. 벼멸구 저항성 계통 ‘밀양198호’ 선발

‘밀양165호/밀양64호’ 조합에 양질성 계통인 ‘밀양165호’를 반복친으로 3회 여교잡하여 양성된 BC₃F₃세대에서 벼멸구에 저항성이고 양질다수성인 계통을 선발하였다. 2년간(‘01~’02)의 생산력 검정시험을 거쳐 최종 선발된 YR 21258-GH2에 ‘밀양198호’의 계통명을 부여하고 2003년 지역적응성시험에 공시하였다. 여교잡 집단 및 그 후대에 대한 저항성 계통(개체) 선발에는 생물검정과 Sdh marker 검정을 병행하였고, 기타 품종 육성에 관한 시험과 특성조사는 영남농업시험장 시험기준에 준하여 수행하였다. Isozyme 특성과 벼멸구 저항성은 Yeo 등(1998)의 방법에 따라 분석하였다.

제 3 절 여교잡 집단 육성과 주요 특성조사

1. 잡종 집단 육성

1998년 5월에 ‘청청벼’와 ‘삼강벼’ 및 ‘낙동벼’의 종자를 영남농업시험장 포장에 파종 육묘한 후 6월에 주당 1본씩 이앙하고, 저항성 품종과 감수성 품종을 인공 교배한 ‘청청벼/낙동벼’ 및 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서 각각 114립과 62립의 교배립을 채종하였으며, '98/'99 동계온실에서 각 조합의 F₁ 집단을 양성하였다(표 2-1).

Table 2-1. Number of F₁ plants developed from two crosses ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’ and ‘Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo’

Cross	No. of crossed seeds	No. of F ₁ plants transplanted
Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo	114	26
Samgangbyeo/Nagdongbyeo	62	24
Total	176	50

‘삼강벼/낙동벼’ 및 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 여교잡 세대 육성 과정은 그림 2-1과 2-2에서와 같다. 두 조합의 F₁을 '98/'99년 동계온실에 재배하면서 감수성 품종인 낙동벼를 반복친으로 2회에 걸친 여교잡을 실시하여 BC₁F₁과 BC₂F₁의 교배립을 얻었고, ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 경우는 '99년 상반기에 3회째 여교배를 실시하여 얻어진 교배립을 '99년 7월에 파종 육묘하여 BC₃F₁을 양성하였다.

‘청청벼/낙동벼’ 조합의 경우에는 '98/'99 동계에 재배된 BC₁F₁에서 심한 불임현상이 나타나 교배립을 얻지 못하여 '99 하계에 다시 후보존하고 ‘낙동벼’를 여교잡 하여 BC₂F₁ 36립을 얻었다. '99 하계에 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 BC₃F₁에 ‘낙동벼’를 여교배하여 BC₄F₁ 188립을 얻었다. '99 하계에 얻어진 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 BC₂F₁ 36립과 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 BC₄F₁교배립 188립을 파종하여 벼멸구 저항성 검정을 거친후 저항성 반응을 보인 개체(청청벼/낙동벼 : 5개체, 삼강벼/낙동벼 : 13개체)를 본답에 이앙하고 여교잡에 이용하였다. ‘청청벼/낙동벼’ 조합은 2000년 하계에 ‘낙동벼’를 반복친으로 3회 여교잡하여 BC₃F₁을, 2000/2001년 동계

에 BC₄F₁을 양성하였다. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 여교잡 세대는 2000년 하계에 ‘삼강벼’에 ‘낙동벼’가 5회 여교잡된 BC₅F₁을, 2000/2001년 동계에는 ‘낙동벼’를 반복친으로 6회 교배한 BC₆F₁ 교배립을 얻었다.

그리고 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 경우는 2001년 하계에 BC₄F₁을, ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서는 같은 해에 BC₆F₂를 포장에 전개하고 주요 생육특성을 조사하였다. 2000년 하계에 채종한 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 BC₃F₁ 68립과 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 BC₅F₁ 96립을 파종하여 벼멸구 저항성 검정을 거친 후 저항성 반응을 보인 개체 (‘청청벼/낙동벼’ : 26개체, ‘삼강벼/낙동벼’ : 14개체)를 본답에 이양하고 여교잡에 이용하였다.

2001년 하계에 영남농업시험장에서 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 BC₅F₃ 세대 755 계통, BC₆F₃ 세대 277 계통을 육성하였고, ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서도 BC₃F₃ 286계통과 BC₄F₁에 ‘낙동벼’를 여교배한 BC₅F₁을 양성하였다. 한편, 이들 여교잡 세대에 대한 벼멸구 저항성 검정을 실시하여 저항성으로 나타난 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합의 BC₅F₃ 세대 276 계통과 BC₆F₃ 85계통을 2002년 하계 포장에 계통 재배한 후 외관상 미질이 우수한 계통을 선발하였다. ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서도 BC₃F₃ 세대 286 계통에 대한 벼멸구 검정을 실시하여 후 저항성 계통을 2003년 하계포장에 재배하였다(표 2-2, 2-3).

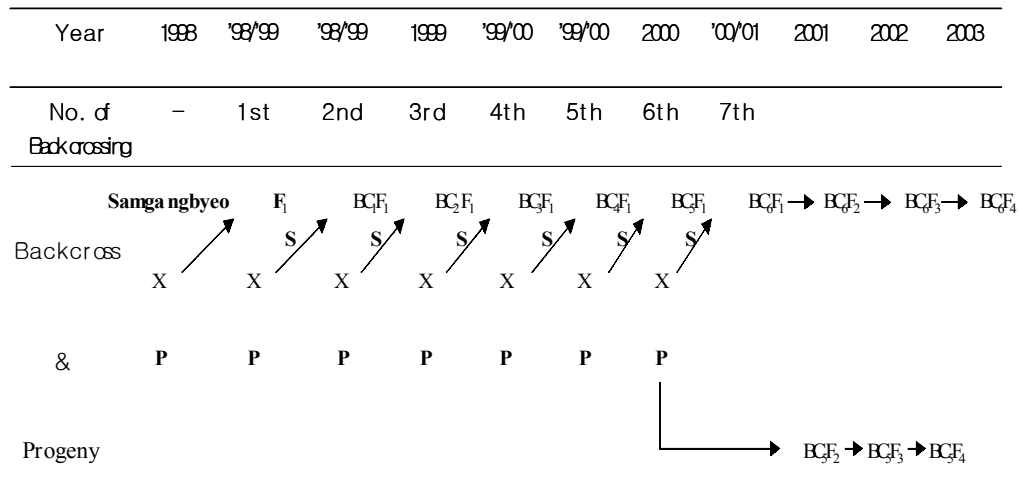


Fig. 2-1. Development of backcrossed generation from a cross ‘Samgangbyeo /Nagdongbyeo’.

P : Recurrent parent (Nagdongbyeo), S : Screening of BPH resistance.

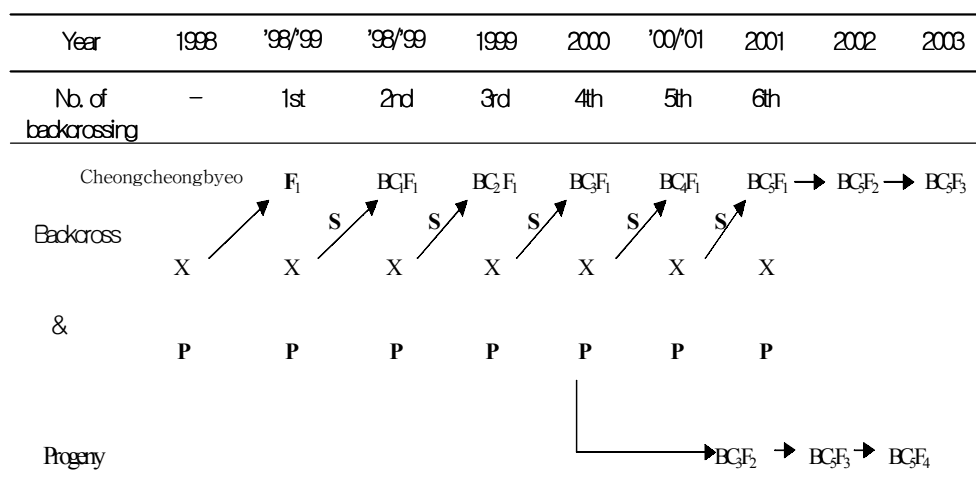


Fig. 2-2. Development of backcrossed generation from a cross 'Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo'.

P : Recurrent parent (Nagdongbyeo), S : Screening of BPH resistance.

Table 2-2. BPH reaction of backcrossed F₁ and progenies from a cross between resistant parent 'Samgangbyeo' and recurrent parent 'Nagdongbyeo'

Group	Generation	No. of crossed seeds	BPH resistance ^{a)}			No. of plants transplanted	Remarks
			R	MR	S		
Back-cross F ₁	BC ₁ F ₁	51	19		20	26	39 lines tested
	BC ₂ F ₁	78	-	-	-	40	Sdh-1
	BC ₃ F ₁	60	-	-	-	57	Sdh-1
	BC ₄ F ₁	188	62	-	126	13	-
	BC ₅ F ₁	96	38	-	58	14	-
	BC ₆ F ₁	68	25	-	43	20	Development of F ₂
Progeny	BC ₅ F ₃	(755)	276	76	403	276	'02
	BC ₆ F ₃	(277)	85	30	162	85	'02

^{a)} R : Resistance, MR : Moderate resistance, S : Susceptibility.

Table 2-3. BPH reaction of backcrossed F₁ and progenies from a cross between resistant parent 'Cheongcheongbyeo' and recurrent parent 'Nagdongbyeo'

Group	Generation	No. of crossed seeds	BPH resistance			No. of plants transplanted
			R	MR	S	
	BC ₁ F ₁	150				26
	BC ₂ F ₁	36	12	-	24	5
Backcross F ₁	BC ₃ F ₁	68	28	-	40	26
	BC ₄ F ₁	5	-	-	-	5
	BC ₅ F ₁	96				
Progeny	BC ₃ F ₃	(286)	103	11	172	276

* R : Resistance, MR : Moderate resistance, S : Susceptibility.

2. 여교잡 집단 의 주요 특성 조사 및 선발

삼강벼/낙동벼의 여교잡 집단(BC₅F₃~BC₆F₄)을 2002년 하계 포장에 재배하여 각 계통별로 벼멸구 저항성 정도를 조사한 다음 출수기, 간장, 수장을 포함한 주요 농업 형질에 대한 특성을 계통별로 조사·분석하였다. 그 중에서 미질 등 제 특성이 우수한 계통을 선발하고 2003년 하계 포장에 재배하여 출수기, 간장, 수장 등을 포함한 주요 특성을 조사중에 있다(표 2-4).

Table 2-4. Major agronomic characteristics of BC₅F₃, BC₅F₄ and BC₆F₃ lines derived from a cross between 'Samgangbyeo' and 'Nagdongbyeo'

Generation	No. of lines tested	Days to heading	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Blast (0~9)	No. of lines selected
BC ₅ F ₃	276	109±0.66 ^{a)}	81±5.96	20±1.06	8.4±0.65	185
BC ₅ F ₄	95	109±0.47	87±3.79	20±1.41	8.5±0.57	35
BC ₆ F ₃	85	109±0.45	79±4.26	19±0.95	8.7±0.44	33

^{a)} Mean±SD.

제 4 절 벼멸구 저항성 검정 및 유전 분석

‘삼강벼’와 ‘낙동벼’가 교배된 조합의 F₁, BC₁F₁과 F₂를 대상으로 벼멸구를 접종한 결과(표 2-5), 모본, 부분 및 F₁은 모든 개체가 저항성을, F₂ 집단은 저항성과 감수성이 3 : 1, BC₁F₁에서는 1 : 1의 이론적 분리비에 적합하게 나타났다. 또한 청청벼/낙동벼 조합의 F₂ 129개체에 대한 벼멸구 반응을 검정하여 본바(표 2-6), 저항성 반응을 보인 개체가 98개체, 감수성반응을 보인 개체가 31개체로 3 : 1의 이론적 분리비에 적합한 유전양식을 보였다. 자포니카형 저항성 계통과 감수성 계통이 교배된 ‘밀양165호/밀양64호’ 조합 F₂ 집단의 저항성 검정 결과도 저항성이 단순우성으로 분석되었다.

Table 2-5. Segregation mode of BPH resistance in F₂ population from a cross ‘Samgangbyeo/Nagdongbyeo’

Parents & Progeny	No. of plants			Segregation ratio	x ²	P
	Total	Resistance	Susceptibility			
P ₁ (Samgangbyeo)	13	13	0	-	-	-
P ₂ (Nagdongbyeo)	13	0	13	-	-	-
F ₁	10	10	0	-	-	-
BC ₁ F ₁	39	19	20	1 : 1	0.026	0.50 ~ 0.90
F ₂	298	218	81	3 : 1	0.756	0.20 ~ 0.50

Table 2-6. Segregation mode of BPH resistance in F₂ population from two crosses ‘Cheongcheongbyeo/Nagdongbyeo’ and ‘Milyang165/Milyang64’

Crosses	Total	Resistance	Susceptibility	Segregation ratio	x ² value (P : 0.1-0.05)
Cheongcheongbyeo /Nagdongbyeo	129	98	31	3 : 1	0.064
Milyang165 /Milyang64	83	58	25	3 : 1	0.345

제 5 절. 벼멸구 저항성과 주요 농업형질과의 관계

‘밀양165호/밀양64호’ 조합의 F₄ 318계통을 영남 농업시험장 표준재배법에 준하여 계통 재배하면서 각 계통별 주요 특성을 조사하였다. 이 조합의 F₄ 계통을 벼멸구 저항성과 감수성의 두 집단으로 구분하여 조사된 각 형질별 평균값은 저항성 집단이 감수성 집단에 비해 간장, 3절 간장, 모멘트 및 도복 지수에서 유의하게 큰 것으로 나타나 벼멸구에 저항성인 집단이 감수성인 집단에 비해 도복에 약할 것으로 추정되었다. 그러나 도복에 관련된 형질중에서도 3절에서의 좌절중과는 통계적인 유의성이 없었으며, 출수일수는 저항성과 감수성 집단간에 유의적인 차이가 없었다(표 2-7).

Table 2-7. Comparison of agronomic traits of Bph-resistant and Bph-susceptible groups in F₄ lines of ‘Milyang165/Milyang64’

Group	Heading date	Culm length (cm)	3rd internode length (cm)	Moment	Lodging index	No. of lines
Milyang64	Aug.13	82	15	1,494	179	-
Milyang165	Aug.21	68	11	1,176	112	-
Bph-resistance	Aug.15	76	14	1,139	161	167
Bph-susceptibility	Aug.14	70	11	1,046	143	151
t-value	1.356 ^{ns}	6.023 ^{ns}	9.122 ^{**}	2.697 ^{**}	4.371 ^{**}	-

^{a)} ns : Not significant at 5%, ^{b)} **: Significant at 1% level.

한편, ‘밀양165호/밀양64호’ 조합에서 감수성인 ‘밀양165호’가 3회 여교잡되어 양성된 BC₃F₄ 집단으로부터 벼멸구에 저항성인 52계통과 감수성인 46계통의 출수일수 및 간장에 대하여 t-검정을 실시한 결과, 벼멸구에 저항성인 집단의 평균 간장이 ‘밀양64호’에 비해서 작아졌음에도 불구하고 저항성 집단의 간장이 감수성 집단에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다(표 2-8).

Table 2-8. Comparison of days to heading and culm length between the Bph-resistant and Bph-susceptible groups in BC₃F₄ (98 lines) derived from 'Milyang165'^{*4}/Milyang64'

Group	Day to heading	Culm length (cm)
Bph-resistance	114±1.28 ^{a)}	76±6.23
Bph-susceptibility	114±1.20	72±3.39
t-value	-0.424 ^{ns b)}	4.778** ^{c)}

a) Mean±SD, b) ns : Not significant at 5% level, c) ** : Significant at 1% level.

'밀양165호'와 '밀양 64호' 사이에 다형성을 보이는 DNA 표지인자를 이용하여 벼멸구 저항성 유전자와의 연관관계를 분석한 바, '밀양 64호'의 저항성 인자는 RFLP 표지인자인 RG413과 가장 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다(그림 2-3).

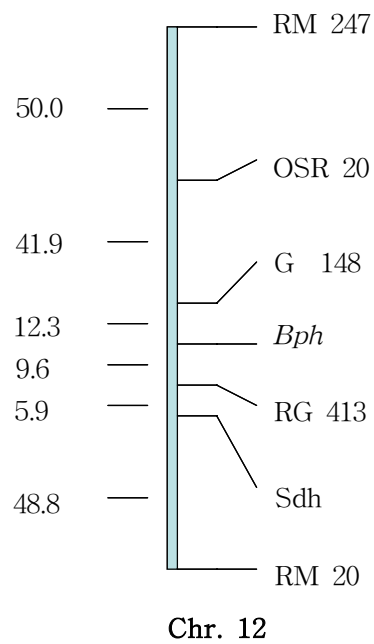


Fig. 2-3. Linkage map of Chromosome 12 of RILs derived from 'Milyang 165 /Milyang64'.

Table 2-9. Characteristics of QTLs associated with lodging traits in RILs of 'Milyang165/Milyang64'

Traits	QTLs	Bordering marker	LOD	Variation (%)	Additive effect
Culm length	qCL-12	RG413-G148	4.67	11.8	-3.83
Height of central gravity	qHCG-12	RG413-G148	4.31	11.0	-1.97
3rd int. length	q3rdIL-12	RG413-G148	6.52	16.2	-0.97
Moment	qMo-12	RG413-G148	2.38	6.2	-9.55
Lodging index	qLI-12	RG413-G148	3.68	9.5	-8.83

그림 2-3의 유전자 지도를 이용하여 QGENE program에 의해 주요 농업형질에 대한 양적형질 유전자좌(QTL)를 분석한 바 (표 2-9), 간장, 중심고, 3절 간장, 모멘트 및 도복지수에 관여하는 QTL이 벼멸구 저항성 유전자와 밀접히 연관된 RFLP 표지인자 RG413~G148사이에 위치하였으며, 각 형질의 LOD 값은 2.38~6.52 범위였고, 3절간장의 경우 설명할 수 있는 표현형 변이가 16.2%로 높게 나타났다.

제 6 절 벼멸구 저항성 계통 ‘밀양198호’ 육성

1. 육성경위

1997/1998년 동계에 단간이며 수량성과 미질이 뛰어난 ‘밀양165호’와 자포니카이면서 벼멸구저항성인 ‘밀양64호’를 교배하여 1998년 하계에 F_1 을 양성 BC_1F_1 을 위한 여교잡에 이용하였다. 1998/1999년 동계에 BC_1F_1 , BC_2F_1 을 양성 각각 YR20419, YR20656의 교배 번호를 부여하였으며 1999년 하계에 BC_3F_1 을 양성하였다. 각각의 여교잡세대($BC_{1-3}F_1$)의 벼멸구저항성 검정은 분얼기 잎을 이용 isozyme marker인 Sdh-1 allele type 분석으로 조사하였으며 Sdh-1 allele에 heterozygous 한 개체를 다음세대의 모본으로 이용하였다. Sdh-1에 heterozygous 한 19개의 BC_2F_1 개체 중 4개체를 무작위로 선발하여 BC_3F_1 세대를 위한 모본으로 이용하여 여교잡된 각각의 BC_3F_1 세대에 YR21256~YR21259의 교배번호를 부여하여 1999년 하계에 공시하였다. 모두 110개체의 BC_3F_1 개체를 양성하여 Sdh-1 검정결과 이중 46개체는 ‘밀양165호’와 같은 homozygous 한 allele를 보였으며 64개체는 hetero로 나타났다(표 2-10).

1999/2000년 동계온실에서 BC_3F_2 집단을 양성하여 벼멸구에 저항성이면서 제 특성이 우수한 23개체를 선발하고 같은 해 동계온실재배에서 BC_3F_3 세대를 양성하여 2000년 하계에 생산력검정 예비시험에서 주요 특성들을 조사하였다. 공시된 BC_3F_4 23계통 중 YR21256-GH1, YR21256-GH2, YR21256-GH3 및 YR21256-GH4를 제외한 나머지 계통들은 출수기와 간장이 반복친인 ‘밀양165호’와 거의 비슷하였으며, 벼멸구에 대한 저항성 검정 결과 15계통이 저항성으로 나타났고 8계통이 분리하였으나 약한 계통은 없었으며, 흰잎마름병에 대한 저항성은 4계통을 제외한 나머지 계통들이 ‘밀양165호’와 같은 경향을 보였다(표 2-11).

벼멸구에 저항성인 ‘밀양64호’에 ‘밀양165호’가 여교잡되어 선발된 23계통에 대한 출수기, 간장을 포함한 도복관련 형질, 식미, 수량성 등을 양친과 비교 분석한 결과는 그림 2-4에서와 같다. ‘밀양 198호’의 간장은 ‘밀양 64호’ 보다는 크게 단축되었으나 ‘밀양165호’보다는 약간 컸다. 그리고 도복관련 형질과 식미 등도 ‘밀양 64호’보다는 우수한 것으로 조사되었고, 특히 수량성은 반복친인 ‘밀양165호’와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

공시 계통중에서 YR21258-GH2는 비록 벼멸구 저항성은 분리하였으나 밥맛 등 주요 특성이 우수하여 벼멸구에 강한 계통만을 선발하여 2001~2002년 생산력검정시험에 공시하였다. 2년간의 생산력검정 시험결과 벼멸구에 저항성이면서 수량성, 미질 및 주요 재배특성이 우수한 YR21258-GH2를 선발 '밀양198호'의 계통명을 부여하고 2003년 지역적응시험에 공시하였다.

Table 2-10. Development of promising lines with BHP resistance using marker-assisted selection system(MAS) in the backcrossed population from a cross 'Milyang165/Milyang64'

(NYAES:1998~2000)

Year & season	Cross No.	Cross combination	Generation	No. of plants screened for Sdh	
				Total ^{a)}	Heterozygous plants
'98 Summer	-	Milyang165/Milyang64	F ₁	3	3
'98/'99 Winter	YR20419	Milyang165//Milyang165 /Milyang64	BC ₁ F ₁	9	2
	YR20656	YR20419/Milynag165	BC ₂ F ₁	41	19
'99 Summer	YR21256	YR20656-1/Milyang 165	BC ₃ F ₁	30	18
"	YR21257	YR20656-2/Milyang165	BC ₃ F ₁	11	7
"	YR21258	YR20656-3/Milyang165	BC ₃ F ₁	39	18
"	YR21259	YR20656-4/Milyang165	BC ₃ F ₁	30	21
'99/'00 Winter	YR21256	-	BC ₃ F ₂	23 ^{a)}	-
	YR21259				
	YR21256 YR21259				

^{a)} : No. of BC₃F₂ plants selected from 64 BC₃F₁ plants.

Table 2-11. Major agronomic characteristics of 23 BC₃F₄ lines derived from a cross 'Milyang165*4/Milyan65'

Entry No.	Pedigree	Heading date	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Reaction ^{a)} to BPH	Lodging (0-9)	BLB(1-9) ^{b)} K ₁ , K ₂ , K ₃	Remarks ^{c)}
1	YR21256-GH1	Aug.10	77	19.8	R	3.0	3, 3, 3	Seg. for HD, CL
2	YR21256-GH2	Aug.21	84	21.1	R	1.3	3, 3, 3	-
3	YR21256-GH3	Aug.16	82	20.2	R	2.0	3, 3, 3	Seg. for HD, CL
4	YR21256-GH4	Aug.7	81	20.3	R	1.3	3, 3, 3	Seg. for HD, CL
5	Milyang 64	Aug.12	92	20.2	-	9.0	1, 7, 7	Control
6	YR21256-GH5	Aug. 6	79	20.3	Seg.	1.7	3, 3, 3	Seg. for HD, CL
7	YR21256-GH6	Aug.20	83	20.7	R	1.7	3, 3, 3	-
8	YR21258-GH1	Aug.20	81	21.3	Seg.	1.7	3, 3, 3	Seg. for Bph ²⁾
9	YR21258-GH2	Aug.19	81	21.1	Seg.	2.7	3, 3, 3	Seg. for Bph
10	YR21258-GH3	Aug.20	86	21.5	R	1.0	3, 3, 3	-
11	YR21258-GH4	Aug.20	84	21.8	R	2.3	3, 3, 3	-
12	Milyang 165	Aug.20	74	21.4	-	1.3	3, 3, 3	Control
13	YR21258-GH5	Aug.20	84	22.5	R	1.3	3, 3, 3	-
14	YR21258-GH6	Aug.21	75	21.4	Seg.	1.3	3, 3, 3	Seg. for Bph
15	YR21258-GH7	Aug.19	84	21.0	R	1.0	3, 3, 3	-
16	YR21258-GH8	Aug.20	78	20.9	R	1.0	3, 3, 3	-
17	YR21258-GH9	Aug.20	84	20.5	R	1.3	3, 3, 3	-
18	YR21259-GH1	Aug.19	84	21.3	Seg.	2.7	7, 7, 7	Seg. for Bph
19	Hwacheongbyeon	Aug.20	104	19.7	-	9.0	1, 7, 7	Control
20	YR21259-GH2	Aug.20	82	21.7	Seg.	1.3	7, 7, 7	Seg. for Bph
21	YR21258-GH10	Aug.19	81	20.6	Seg.	2.0	7, 7, 7	Seg. for Bph
22	YR21258-GH11	Aug.20	83	22.3	R	2.0	3, 3, 3	-
23	YR21258-GH12	Aug.19	83	21.3	R	2.5	3, 3, 3	-
24	YR21258-GH13	Aug.19	79	21.8	Seg.	2.0	3, 3, 3	Seg. for Bph
25	YR21258-GH14	Aug.17	84	21.8	R	2.0	7, 7, 7	-
26	YR21258-GH15	Aug.21	84	21.6	R	1.0	3, 3, 3	-

^{a)} R : Resistance, S : Susceptibility, ^{b)} K₁, K₂, K₃ : Race of Korean bacterial leaf blight(BLB) ^{c)} Seg : Segregation, HD : Heading date, CL : Culm length.

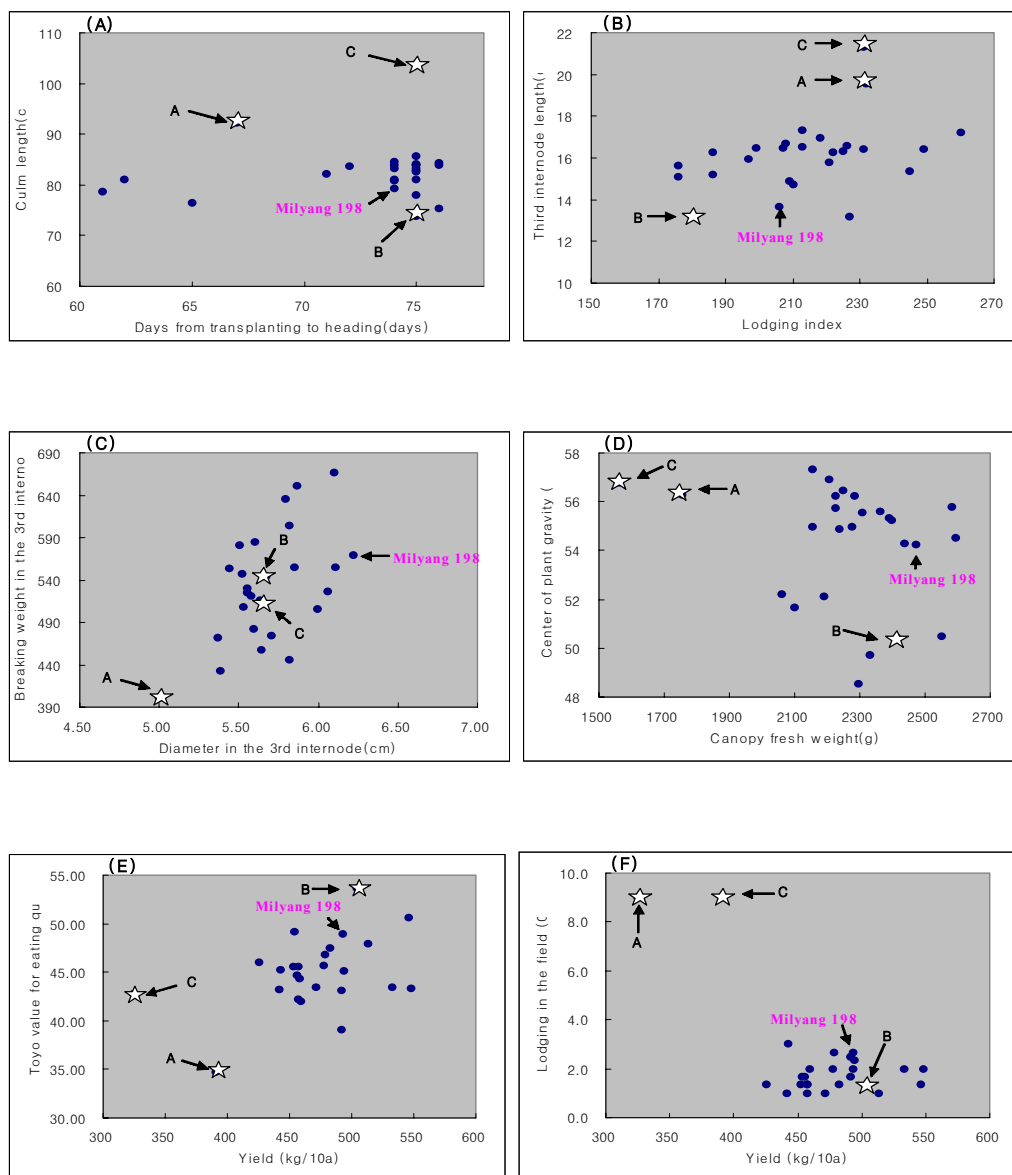


Fig. 2-4. Comparison of major agronomic characteristics including some traits related to lodging between 23 BC₃F₄ lines and their parents.

A : 'Milyang64' (donor parent), B : 'Milyang165' (recurrent parent), C : 'Hwacheongbyeon' (BPH resistant cultivar)

2. 밀양 198호의 주요특성

가. 고유특성

잎은 녹색이며 ‘주남벼’와 마찬가지로 길이와 너비가 중정도이고 직립성 초형으로 줄기도 ‘주남벼’와 비슷한 굵기이며 강도는 강하고 분얼개도는 보통이다. 이삭의 밀도는 ‘주남벼’ 보다는 덜 조밀하며 까락이 거의 없고 탈립이 잘 되지않으며 부선색과 영색은 황백색이고 속색은 양호하다(표 2-12).

Table 2-12. Comparison of leaf, stem, panicle, and grain characters between ‘Milyang198’ and check cultivars.

(NYAES : '01~'02)

Cultivars	Leaf				Culm		SSD ^{b)}	Shattering	PE ^{c)}	Awn	Grain ^{d)} color
	Color	Length	Width	Erect-ness	Diameter	Stiffness					
Milyang198	Green	M ^{a)}	M	Erect	M	Stiff	M	Hard	M	Rare	YW
Junambyeo	Green	M	M	Erect	M	Stiff	MH	Hard	M	Rare	YW
Nampyung- byeo	Green	M	M	Erect	M	Stiff	MH	Hard	M	Rare	YW

^{a)} M : Medium size ^{b)} SSD : Seed setting density, M : Medium, MH : Medium high ^{c)} PE : Panicle exertion ^{d)} YW : Yellowish white.

나. 가변특성

1) 출수기

‘밀양198호’의 출수기는 남부평야지의 보통기 보비재배에서 8월16일로 ‘주남벼’와 같으며 ‘남평벼’ 보다는 3일 정도 빠르고 만식재배에서는 ‘주남벼’와 같으나 ‘남평벼’ 보다는 하루 빠른 중만생종이다(표 13).

Table 2-13. Heading date of 'Milyang198'

(NYAES : '01~'02)

Culture season	Region	Heading date			Seeding date ~ transplanting date
		Milyang198	Junambyeo	Nampyungbyeo	
Ordinary season	Southern plain	Aug. 16	Aug. 16	Aug. 19	May 5 ~ Jun. 5
Late season	Southern plain	Aug. 29	Aug. 29	Aug. 30	Jun. 5 ~ Jul. 1

2) 생육특성

저온발아성은 '남평벼' 보다 높았으며, 묘초장 및 초기신장성은 양호하고 적고 현상은 나타나지 않았다(표 2-14).

Table 2-14. Seedling characteristics of 'Milyang198'

(NYAES : '03)

Cultivar	Germinability at low temp. ^{a)} (%)	Seedling length (cm)	Cold tolerance at seedling stage	Seedling viability	Discoloration
Milyang198	96	14.8	Tolerate	Good	None
Junambyeo	49	-	Tolerate	Good	None
Nampyungbyeo	80	18.5	Tolerate	Good	None

^{a)} : Germination ratio for 15 days at 13°C.

'밀양198호'의 수전일수는 '주남벼' 및 '남평벼'와 마찬가지로 6일 정도이고 본답생육일수는 '남평벼' 보다 3일 빨랐으며, 간장은 77cm로 남평벼 보다는 작았으나 '주남벼' 보다는 다소 크고 수장은 21cm로 '주남벼'와 비슷하였다(표 2-15).

Table 2-15. Major agronomic traits of 'Milyang198' in paddy field

(NYAES : '01~'02)

Cultivar	Heading period (days)	Maturing period (days)	DTR ^{a)} (days)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)
Milyang198	6	47	127	77	21
Junambyeo	6	47	127	70	22
Nampyungbyeo	6	50	130	80	19

^{a)} DTR : Days from transplanting to ripening stage.

3) 수량구성요소

'밀양198호'의 주당수수는 '주남벼'와 비슷하고, 수당립수는 '주남벼'나 '남평벼' 보다 적으나 등숙비율은 '주남벼' 보다 높으며 '남평벼'와는 비슷하였다. 정현비율은 '주남벼' 및 '남평벼'와 비슷하였고 현미천립중은 '주남벼' 보다는 다소 가벼우나 '남평벼' 보다는 약간 무거웠다(표 2-16).

Table 2-16. Yield components of 'Milyang198'

(NYAES : '01~'02)

Cultivar	No. of panicles/hill	No. of grains/panicle	Ratio of ripened grain (%)	Brown/rough rice ratio (%)	1,000-grain weight (g)
Milyang198	14	106	88.8	82.1	21.9
Junambyeo	14	122	81.0	82.1	22.7
Nampyungbyeo	15	113	88.0	82.8	20.3

4) 생리장애 저항성

'밀양 198호'는 위조에는 강한 편이고 성숙기의 엽노화가 느린 편이며, 내냉성 검정 결과 유묘냉해는 '화성벼'보다 다소 강하였고 출수지연일수는 12일로 '화성벼'와 비슷하였으며 간장단축율은 '화성벼' 보다 약간 단축되었다(표 2-17).

Table 2-17. Tolerance to physiological stresses of 'Milyang198'
(NYAES, NCES:'99~'01)

Cultivar	Appearance of wilting	Adult leaf senescence	Cold tolerance ^{a)}			
			Seedling discoloration (0-9)	Heading delay (days)	Grain fertility (%)	Shortening ratio of culm length (%)
Milyang198	Strong	Slow	4	12	72	31
Hwaseongbyeo	Strong	Slow	6	11	69	28

^{a)} : Cold tolerance was evaluated at Chuncheon and Sangju cold-water irrigated nursery ('02).

5) 도복저항성

'밀양198호'의 3절간의 길이는 '주남벼'와 비슷하나 '밀양64호' 보다는 훨씬 짧으며 중심고가 '주남벼' 보다는 높으나 '밀양 64호' 보다는 낮고, 3절간 좌절 중이 '밀양 64호' 보다 높아 도복지수가 '밀양 64호' 보다는 낮으나 '주남벼' 보다는 다소 높았고, 포장 도복에서도 '주남벼' 보다는 다소 약한 것으로 나타났다(표 2-18, 그림 2-5).

Table 2-18. Lodging tolerance and its related characteristics of 'Milyang198'
(NYAES : '01)

Cultivar	3rd internode length (cm)	Height of central gravity (cm)	Fresh weight (g)	3rd internode breaking weight (g)	Lodging index	Field lodging (0-9)
Milyang198	14	54	11.2	569	206	3
Junambyeo	13	50	10.1	547	181	1
Milyang64	20	56	8.06	401	232	9



Fig 2-5 Comparison of lodging tolerance between 'Milyang198' and check cultivars, 'Milyang64' and 'Hwacheongbyeo'.

다. 병해충 저항성

'밀양198호'는 주요 잎도열병 발못자리 검정에서 평균 저항성 정도가 5.6으로 남평벼 보다는 다소 약한 것으로 나타났고(표 2-19), 흰잎마름병 접종 결과 '주남벼'와 마찬가지로 K1, K2, K3군군에 저항성이었고, 줄무늬잎마름병에는 저항성을 보였으나 오갈병과 검은줄 오갈병에는 약하고 벼멸구에는 강한 반응을 나타냈다(표 2-20).

Table 2-19. Reaction to leaf blast disease of 'Milyang198' (NYAES, NHAES : '01~'02)

Cultivar	Reaction to leaf blast (0~9)					Average
	Milyang Youngdeog	Sangju	NHAES ^{a)}	Keihwa		
Milyang198	5	4	5	8	6	5.6
Junambyeo	7	7	5	8	4	6.2
Nampyungbyeo	4	4	4	6	-	4.5

a) : National Honam Agricultural Experiment Station.

Table 2-20. Reaction to bacterial leaf blight, virus disease, and brown planthopper (BPH) of 'Milyang198'

(NYAES:'01~'02)

Cultivar	Bacterial leaf blight			Virus diseases			BPH
	K ₁	K ₂	K ₃	Stripe	Dwarf	Black-streaked dwarf	
Milyang198	3	3	3	R	S	S	R
Junambyeo	3	3	3	R	S	S	S
Nampyungbyeo	9	9	9	R	S	S	S

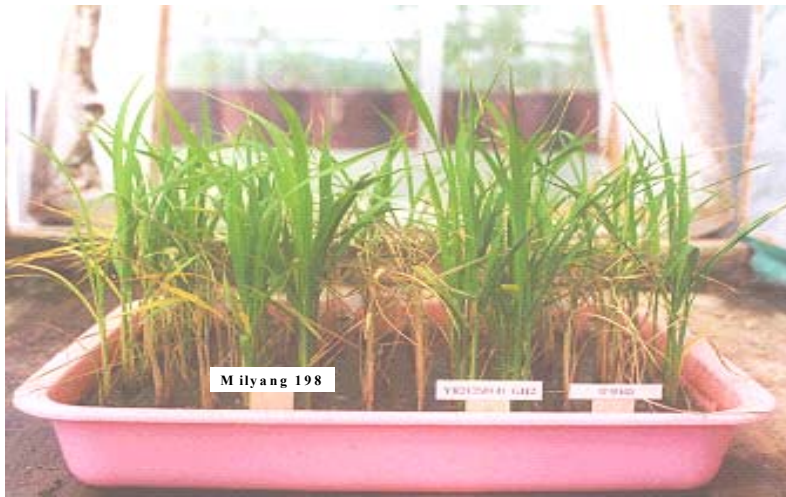


Fig 2-6 Comparison of BPH resistance between 'Milyang198' and check cultivars.

라. 수량성

'밀양198호'는 보통기 보비재배에서 쌀수량이 624kg/10a로 '남평벼' 보다 16% 증수 하였으며 만식재배에서의 쌀수량도 479kg/10a로 '남평벼'와 비슷하였다(표 2-21).

Table 2-21. Yield performance of 'Milyang198'

(NYAES : '01~'02)

Cultivar	Rice yield (kg/10a)					
	Standard fertilizer level at ordinary season				Late season	
	'01	'02	Average	Index	'02	Index
Milyang198	668	580	624	116	479	100
Junambyeo	655	619	637	118	497	103
Nampyungbyeo	-	540	540	100	481	100

마. 미질관련특성

'밀양198호'는 현미 장폭비가 1.71로서 등글며 '추청벼'에 비해 다소 심복백이 많으나 백미 완전립율은 '주남벼' 보다 높은 것으로 나타났다(표 2-22). 아밀로스 함량은 18.6%로 '남평벼' 보다 낮으며 알카리 붕괴도나 단백질 함량은 비슷하였다(표 2-23). 또한 '밀양198호'의 밥맛은 도요 식미치가 64.5로서 '추청벼'나 '주남벼' 보다 낮았으며, 식미 관능검정에서도 '추청벼' 보다는 밥맛이 떨어지는 것으로 나타났다(표 2-24).

Table 2-22. Characteristics of brown and milled rice of 'Milyang198'

(NYAES : '01)

Cultivar	Brown rice				WC/WB ^{a)} (0-9)	Ratio of wc & wb occurrence (%)	Head rice grain ratio (%)
	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	Ratio L/W			
Milyang198	4.95	2.90	2.02	1.71	0/1	16.5	83.9
Junambyeo	4.94	2.87	1.96	1.72	0/1	-	78.7
Nampyungbyeo	4.91	2.73	1.97	1.76	0/1	(8.7)	86.5

() 'Chucheobyeo'. ^{a)} WC : White center, WB : White belly.

Tabel 2-23. Physicochemical properties of 'Milyang198' (NYAES : '01)

Cultivar	Amylose content (%)	Alkali digestion value (1-7)	Mg/K	Protein content (%)
Milyang198	18.6	6.3	0.75	6.9
Junambyeo	18.9	6.3	0.77	7.0
Nampyungbyeo	19.6	6.3	0.89	6.9

Table 2-24. Properties related to eating quality of 'Milyang198' (NYAES : '02)

Cultivar	Pannel test ^{a)}				Toyo taste value
	Brightness	Stickiness	Texture	Palatability	
Milyang198	0.17	0.42	0.33	0.33	64.5
Junambyeo	0.35	0.48	0.45	0.42	70.3
Nampyungbyeo	0.45	0.55	0.50	0.45	75.5

^{a)} Evaluation standard : -3~+3

3. 육성경과

‘밀양198호’는 ‘97/98 동계에 ‘밀양165호’를 자방친으로 하고 ‘밀양64호’를 화분친으로 인공교배하여(그림 2-7) 1999년 하계까지 ‘밀양165호’를 반복친으로 3회 여교잡된 BC₃F₁을 양성하였다. 2000년 하계까지 Sdh marker 검정과 벼멸구 생물검정을 실시하면서 주요 작물학적 특성 조사를 병행하여 YR21258-GH2를 선발하고 2001과 ‘02년에 생산력 검정을 실시한 후, ‘밀양198호’의 계통명을 부여하였다(그림 2-8). ‘밀양198호’의 포장생육 특성은 그림 2-9에서와 같이 성숙기까지 양호한 생육을 보였으며, 금후 지역 적응성 시험결과에 따라 신품종으로 등록할 예정이다.

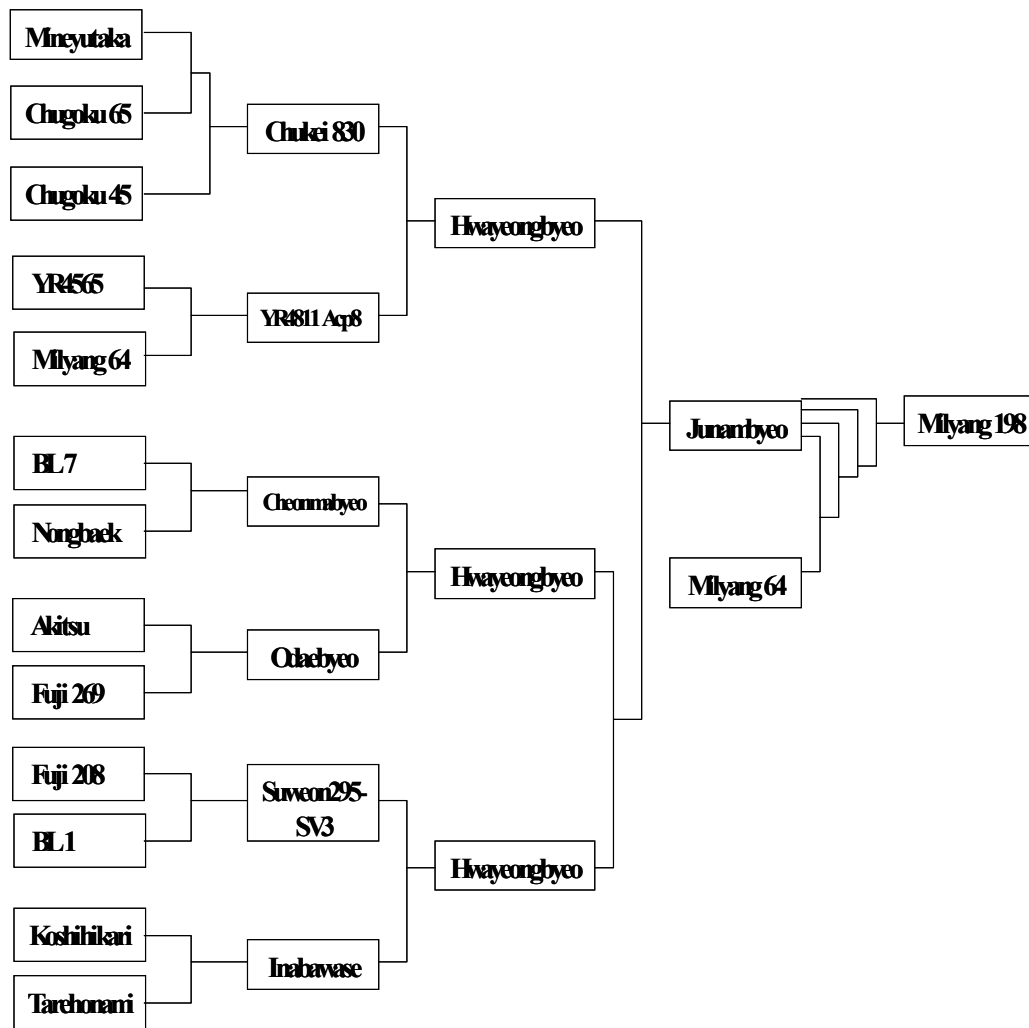


Fig 2-7. Parentages of 'Milyang198'.

나.육성계통도

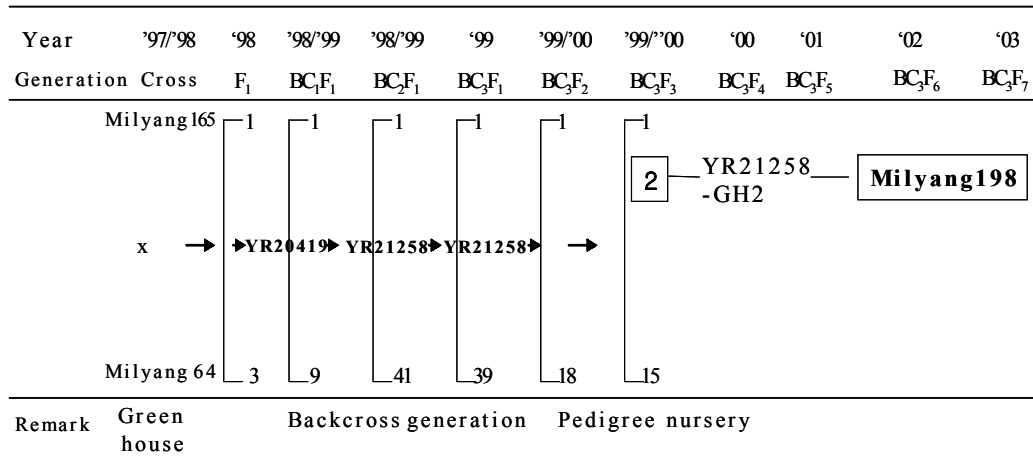


Fig 2-8. Pedigree diagram of 'Milyang198'.



Fig 2-9. Maturing stage of 'Milyang198'.

제 5 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 총괄 추진계획표

세부과제 및 주요내용	연 도					가중치	진도 (%)
	1998 1차년도	1999 2차년도	2000 3차년도	2001 4차년도	2002 5차년도		
(1)세부과제 : DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 계통선발							
○. F ₁ 약배양에 의한 DH 집단육성	—————					20	100
○. 벼멸구 저항성과 관련된 유전자 지도작성 - F ₂ 및 DH 집단을 이용한 유전자 지도작성 - Marker 개발	—————					15	100
○. DNA marker를 이용한 벼멸구저항성 계통선발 체계확립	—————					20	100
- 잡종집단 및 DH 집단에 대한 벼멸구 저항성 검정과 DNA marker와의 관계분석	—————					15	100
(2)협동과제 : 벼멸구 저항성 중간모본 육성 및 육종적 이용							
○. 인공교배 및 잡종집단 육성 - 중간모본 선발을 위한 벼멸구 검정 (F ₁ ~ BC ₃ F ₅)	—————					10	100
○. 저항성 유전양식 구명 - F ₁ , BC ₁ F ₁ , F ₂ 집단	—————					5	100
○. DNA marker에 의한 벼멸구저항성 계통선발 체계확립 - 잡종집단 및 DH 집단에 대한 벼멸구 저항성 검정과 DNA marker와의 관계분석	—————					15	100
사업진도(%)	20	40	60	80	100	100	100
소요인원(명)	11	11	9	9	9	49	
소요예산(천원)	30,000	30,000	30,000	30,000	30,000	150,000	
주요연구결과	o. 3,4장 참고	o.3,4장 참고	o. 3,4장 참고	o. 3,4장 참고	o.3,4장 참고		

제 2 절 연구개발 목표의 달성도

1. 세부과제

- 가. ‘삼강벼/낙동벼’와 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 잡종집단(F_1)에 대한 약배양을 실시하여 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합에서 201계통, ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서는 98계통의 DH 집단을 양성하였다.
- 나. ‘삼강벼’와 ‘낙동벼’의 genomic DNA를 재료로 이용하여 양친에 다형성을 나타내는 marker로 RFLP 128개, SSR 126개 및 RAPD 220개를 선발하였다.
- 다. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F_2 집단의 벼멸구 저항성과 DNA marker와의 연관분석에 의해 벼멸구 저항성 유전자(*Bph1*)가 위치한 12번 염색체의 연관지도를 작성하고 ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성과 밀접하게 연관된 DNA marker (G258)를 선발하였다.
- 라. Isozyme marker인 Sdh 1이 벼멸구 저항성과 밀접하게 연관(RV=9.9%)되어 있음을 밝히는 한편, 벼멸구 저항성 품종과의 관계 분석을 통하여 Sdh1 분석에 의해 자포니카형 저항성 품종개발 가능성을 제시하였다.
- 마. ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 DH 집단을 대상으로 한 연관 분석에서 벼멸구 저항성 유전자와 4.4cM 거리로 밀접하게 연관된 RAPD marker인 OPE18을 선발하였다.
- 바. 벼멸구 저항성과 연관된 것으로 밝혀진 OPE18₉₂₃을 STS marker로 전환시켜 ‘삼강벼/낙동벼’ 조합 F_2 집단을 대상으로 한 벼멸구 저항성과의 연관 분석에 의해 STS marker는 벼멸구 저항성 유전자와 3.9cM 거리로 밀접하게 연관되어 있음을 밝혔다.
- 사. STS marker에 의해 국내에서 육성된 벼멸구 저항성 품종들의 저항성

source 구분이 가능하였고, ‘영풍벼’, ‘한강찰벼’, ‘백운찰벼’, ‘삼강벼’의 벼멸구 저항성 유전자는 ‘TKM6’에서 유래된 것으로 분석되었다.

아. ‘삼강벼’에 ‘낙동벼’가 여교잡된 집단(BC_5F_1)의 약을 배양하여 DH 계통을 육성하므로써 저항성 중간 모본을 조기에 선발할 수 있었다.

자. 여교잡 집단(BC_5F_1)의 약 배양에서 육성된 DH 계통을 양질성 품종과 교배하여 잡종집단을 양성하므로써 벼멸구에 저항성이고 품질이 우수한 신품종 육종 체계를 수립할 수 있었다.

2. 협동과제

가. 벼멸구에 저항성인 ‘삼강벼’와 ‘청청벼’에 감수성 품종인 ‘낙동벼’를 화분친으로 ‘98 하계부터 2002년 동계에 이르기까지 ‘청청벼/낙동벼’ 조합에서는 $BC_1F_1 \sim BC_5F_4$ 세대, ‘삼강벼/낙동벼’ 조합은 $BC_1F_1 \sim BC_6F_3$ 세대까지 채종하였다.

나. ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 BC_3F_3 세대 286 계통에 대한 벼멸구 저항성 검정에서 저항성 계통으로 103계통을 선발하여 2003 하계에 포장 특성 조사중에 있고, ‘삼강벼/낙동벼^{*7)}’ 조합의 BC_5F_3 세대 276계통과 BC_6F_3 세대 85 계통에 대한 주요 작물학적 특성과 미질 검정을 실시하여 미립의 외형적 특성이 양호하고 심·복백이 거의 없는 BC_6F_3 세대 33계통을 선발하였다.

다. ‘삼강벼/낙동벼’ 및 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 F_1 , BC_1F_1 및 F_2 집단을 대상으로 벼멸구 저항성 유전 분석을 실시한 바, ‘삼강벼’와 ‘청청벼’의 저항성은 단일 우성 유전자에 의해 지배되었다.

라. 자포니카형 벼멸구 저항성 계통인 ‘밀양 64호’에 양질 계통인 ‘밀양 165호’가 교배된 F_4 집단에 대한 벼멸구 저항성과 주요 농업형질과의 관계분석에서 벼멸구 저항성은 도복관련 형질과 통계적으로 유의적인 관계에 있는 것으로 밝혀졌다.

마. 벼멸구 저항성 인자가 도입된 자포니카 잡종 집단('밀양165호/밀양64호')을 대상으로 Sdh marker에 의한 저항성 개체 선발로 숙기, 미질, 수량성 등 주요 특성이 우수한 벼멸구 저항성 계통 '밀양 198호'를 선발하였다.

제 3 절 관련 분야의 기술발전에 기여도

1. 벼멸구 저항성과 관련된 유전자 지도와 DNA marker가 선발되고 이의 이용체계가 확립되므로써 분자육종의 실용화에 크게 기여할 것이고, 본 연구에서 작성된 mapping 집단은 벼멸구 이외의 다른 유용한 농업형질에 대한 유전분석이나 유전자 지도 작성에 광범위하게 이용될 수 있을 것이다.
2. BPH 저항성과 밀접하게 연관된 marker를 선발하고 이를 PCR marker로 전환시켜 저항성 개체 선발에 이용한 예는 벼를 포함한 다른 작물의 병충해 저항성 계통 육성을 위한 MAS 체계 구축 및 이용효율 향상에 기여하게 될 것이다.
3. 저항성 인자가 도입된 여교잡 집단의 F₁을 약배양하여 조기에 고정된 계통을 선발한 것은 병·충해 저항성 육종에서 중간 모본의 육성 연한 단축 방안으로 이용 가치가 클 것이다.
4. 벼멸구 저항성 인자가 도입된 잡종집단을 대상으로 여교잡을 실시하면서 주요 특성 검정과 DNA marker에 의한 저항성 개체 선발을 실시하여 벼멸구에 저항성이면서 미질이 우수한 우량 계통을 선발한 예는 MAS의 실용화에 크게 기여하게 될 것이다.
5. 벼멸구 저항성 품종의 육성 보급은 벼멸구 방제에 소요되는 노동력과 경비 절감 및 과도한 농약 사용으로 인한 환경오염을 줄일 수 있어서 친환경 농업의 실현과 생산성 향상에 기여하게 될 것임

제 6 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용분야 및 활용 방안

1. 활용분야

- 가. DNA marker에 의한 벼멸구 저항성 계통 선발에 활용
- 나. 벼멸구 저항성과 주요 농업형질과의 연관 분석을 실시하여 BPH 저항성과 밀접하게 연관된 열악 형질 제거에 활용
- 다. 병·해충 저항성 개체 선발을 위한 MAS 체계 확립에 활용
- 라. 본 연구에서 육성된 저항성 계통들은 벼멸구 저항성 품종 육성을 위한 중간 모본으로 활용

2. 활용방안

- 가. 본 연구에서 개발된 DNA marker는 벼의 생육시기에 구애됨이 없이 벼멸구 저항성 개체 선발에 직접 이용될 수 있을 것임
- 나. 본 연구에서 양성된 자포니카형 저항성 계통들은 양질이면서 벼멸구에 저항성을 가진 신품종 개발에 중간모본으로 직접 활용
- 다. 벼멸구 저항성 품종육성을 위한 MAS 체계 확립 및 벼멸구 저항성 유전자의 map-based cloning에 활용
- 라. DNA marker를 이용한 벼멸구 저항성 source의 분류 결과는 다양한 벼멸구 생태형에 복합적인 저항성 품종육종에 활용
- 마. 벼멸구 저항성 유전자와 주요 농업형질과의 연관 분석결과는 벼멸구 저항성과 밀접하게 연관된 열악형질 제거에 직접 활용될 수 있음

바. 벼멸구에 저항성이면서 양질성 계통으로 선발된 ‘밀양198호’를 신품종으로 등록하여 벼멸구 피해 상습지에 우선 보급

사. 본 연구에서 개발된 DNA marker이용 체계는 벼의 다른 병해충에 대한 분자유종기술 확립에 기초 자료로 활용

제 2 절 추가 기술개발 방안 및 조치사항

1. 본 연구과제에서 두 조합(‘삼강벼/낙동벼’, ‘청청벼/낙동벼’) 여교배 집단의 약배양에서 양성된 계통 중 벼멸구에 저항성이면서 미질 등을 포함한 제반 특성이 양호한 계통들은 벼멸구 저항성 품종육성을 위한 중간 모본으로 활용할 것이다. 그리고 연구개발과정 중에 유망계통으로 선발되어 생산력 검정 중에 있는 계통은 수량성과 지역적응성 등의 시험과정을 거친 후에 제반특성이 우수할 경우 신품종으로 등록 추천할 예정이다.
2. ‘삼강벼/낙동벼’ 및 ‘청청벼/낙동벼’ 조합의 DH 및 잡종 집단을 재료로 유전자 지도를 작성하고, 두 조합 후대의 주요 작물학적 특성과 벼멸구 저항성과의 연관 분석을 실시하여 벼멸구 저항성과 밀접하게 연관된 농업 형질의 구명 및 관련 marker의 선발이 이루어져야만 벼멸구 저항성과 관련된 열악 형질의 제거 효율을 향상시킬 수 있을 것이다.
3. 본 연구에서 벼멸구 저항성 인자와 가장 가까이에 위치한 것으로 분석된 STS marker는 벼멸구 저항성 유전자와 3.9cM의 조환가로 연관되어 있어서 앞으로 더욱 가까이에 위치한 marker의 개발이 요구되고 나아가서 map-based cloning에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.
4. 최근에 알려지고 있는 벼멸구 저항성과 관련된 QTL 분석 결과는 벼멸구 생태형에 대해 수평 저항성을 갖는 계통의 육성이라는 측면에서 매우 중요한 의미를 가지므로 본 연구에서 양성된 mapping 집단을 대상으로 BPH 저항성 관련 QTL 분석이 이루어진다면 그 결과는 지금보다 안정적인 저항성 품종개발에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 최근 일본에서 벼멸구 저항성 품종인 'Norin-PL4'와 감수성 자포니카형 품종인 'Tsukushibare' 조합으로부터 12번 염색체 상의 *bph 2*를 tagging하고 저항성 유전자와 co-segregation하는 AFLP marker(KAM4)를 STS marker로의 전환시켜 map based cloning을 시도 중에 있는 한편, *Bph1*이나 *Bph3*와는 다르게 열성유전을 하는 것으로 알려진 *bph2* 역시 교배 조합의 유전적 특성에 따라 우성유전을 한다는 사실을 실험적으로 증명하였다(Murai et al. 2001).
2. 단순우성 혹은 열성 유전인자에 의해 지배되는 것으로 알려진 벼멸구 저항성에 대해 양적형질 유전자좌 분석을 실시하여 벼멸구 저항성과 관련된 2개의 QTL을 보고한 예도 있다(Huang et al. 2001). 즉 저항성 품종인 'B5'와 감수성 품종인 'Minghui63' 조합으로부터 유래한 집단을 대상으로 한 QTL 분석에서 3번 염색체와 4번 염색체에 위치한 *Qbp1*과 *Qbp2*가 벼멸구 저항성과 밀접하게 연관되어 있음을 밝혔다. 벼멸구 저항성의 QTL 관련 연구는 2002년 Xu 등에 의해서도 4개의 QTL이 보고된 바 있다.
3. Jena 등(2002)은 저항성 계통인 IR54741-3-21-22과 감수성 계통인 IR31917-45-3-2의 조합을 이용하여 벼멸구 저항성과 관련된 유전자의 molecular tagging을 수행한 결과를 보고하였다. 이 조합의 벼멸구 저항성원은 야생벼(*O. officinalis*)에서 유래한 것으로 biotype 4에 저항성이며, Indian BPH biotype에 대해 새로운 저항성원으로 육종적 가치를 가진다고 하였다. 이 연구에서는 275개의 RAPD marker를 이용한 BSA를 통해 OPA16₉₃₈을 선발하였으며 선발된 marker는 RFLP map의 11번 염색체 상에 mapping 되었다고 하고, *O. officinalis*의 11번 염색체와 *O. sativa*의 12번 염색체가 유사하다는 보고로부터 벼멸구 저항성 유전자가 12번이 아닌 11번에 위치한 이유를 설명하였다.

제 8 장 참고문헌

1. Alam, S. N. and M. B. Cohen : 1998, Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice populations, *Theor. Appl. Genet.* 98(8) : 1370-1379.
2. Cha, Y. S., Y. G. Cho, K. O. Shin, U. S. Yeo, J. E. Choi and M. Y. Eun : 1999, Molecular mapping of resistant genes to brown planthopper, *Bph 1* and *Bph2*, in rice, *Korean J Crop Sci* 44(4) : 345-349.
3. Cho, C. I., D. H. Kim and J. H. Yuh. 1988. Resistance Aspects of Tongil and Japonica Varieties to Brown Planthopper, (*Nilaparvata lugens* Stal.). *Res. Rept. RDA(R)* 30(2) : 1-6.
4. Chu, Q.R., Cao, H.X., and S.D. Linscombe : 1977, A novel Medium for induction of embryogenic callus in rice anther culture of southern us crosses. *Rice Biotechnology Quarterly* 33:18-20.
5. Glazmann, J. C., B. G. de los Reyes and G. S. Khush 1988. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice(*Oryza sativa* L.) - A key to the identification of 76 alleles at 24 loci. *IRPS.* 134 : 2-15.
6. Jena, K. K., I. C. Pasalu, Y. Varalaxmi, Y. Kondala Rao, K. Krishnaiah, G. Kochert, and G. S. Khush : 2000, Molecular mapping and marker-aided selection (MAS) of a gene conferring resistance to Indian biotype of brown planthopper in rice, 4th International Rice Genetics Symposium, pp 77.
7. Ha, W. H., K. M. Kim and J. K. Sohn : 2000, Detection of resistance gene to brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) using RFLP and isozyme markers in rice, *Korean J. Breed.* 32(4) : 319-322.
8. Hirabayashi, H. and T. Ogawa : 1995, RFLP mapping of Bph-1(brown planthopper resistance gene) in rice, *Breeding science*, 45 : 369-371.

9. Huang, N., A. Parco, T. Mew, G. Magpantay, S. McCouch, E. Guiderdoni, J. Xu, P. Subudhi, E. R. Angels and G. S. Khush : 1997, RFLP mapping of isozymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in a doubled haploid rice population, *Mol. Breed.* 3 : 105-113.
10. Huang, Z., G. He, L. Shu, X. Li and Q. Zhang : 2001, Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice, *Theor. Appl. Genet.*, 102 : 929-934.
11. Ishii, T., D. S. Brar, D. S. Multani and G. S. Khush : 1994, Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice *O. sativa*. *Genome*, 37 : 212-221.
12. Jena, K.K., I.C. Pasalu, Y.K. Rao, Y.Varalaxmi, K.Krishnaiah, G.S.Khush and G. Kochert : 2002, Molecular tagging of a gene for resistance to brown planthopper in rice(*Oryza sativa* L.), *Eupytica*, 129 : 81-88, 2002.
13. Jeon, Y. H., S. N. Ahn, H. C. Choi, T. R. Hahn and H. P. Moon : 1999, Identification of a RAPD marker linked to a brown planthopper resistance gene in rice, *Euphytica*, 107 : 23-28.
14. Kaneda, C. :1984, Studies on breeding japonica rice resistant to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. *Bul. of the National Agr. Res. cen.* No.2 :1-74.
15. Mohan, M., S. Nari, A. Bhagwat, T.G. Krishna, and M. Yano : 1997, Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants, *Molecular Breeding* 3 : 87-102.
16. Murai H., P. N. Sharma, K. Murata, Z. Hashimoto, Y. Ketipearachchi, T. Shimizu, S. Takumi, N. Mori, S. Kawasaki and C. Nakamura : 2000, Construction of linkage maps of brown planthopper resistance genes *Bph 1*, *bph 2*, and *Bph 9*, on rice chromosome 12, 4th International Rice Genetics Symposium, pp 78.

17. Murray M. G., and W. F. Thompson :1980, Rapid isolation of high molecular weight plants DNA, *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321-4325.
18. Murata, K., C. Nakamura, M. Fujiwara, N. Mori and C. Kaneda : 1997, RFLP mapping of brown planthopper resistance genes in rice, In : *Harmonizing Agricultural Productivity and Conservation of Biodiversity : Breeding and Ecology*, In Proc. of the 8th SABRAO General Congress and the Annual Meeting of the Korean Breeding Society, Seoul, Korea, pp. 193-194.
19. Renganayaki, K., S. Pammi, J. Connell, S. Sadasivam, S. Mohan Kumar and A. S. Reddy : 1997, Molecular tagging of brown plant hopper(BPH) biotype4 resistant genes, *General Meeting of The international Program on Rice Biotechnology* September 15-19, 1997, Malacca, MALAYSIA, pp. 270.
20. Rural Development Administration (RDA) : 1997, '97 General Report for brown planthopper. pp. 98-125.
21. Rural Development Administration (RDA) : 1998, Occurrence and Control of Brown planthopper & Whited backed planthopper. pp. 164-177.
22. Shin M. S. 1990. Genetic Analysis for Resistance to Bacterial Blight and Brown planthopper in Japonica Rice Cultivars Bred in Korea. *Dep. of Agr. Bio., Gradu. Sch. Chonnam. Nat. Uni.* pp. 1-53.
23. Xu, X.F., H. W. Mei, Luo X.N. cheng, and z.k. Li : 2002, RFLP-facilitated investigation of the quantitative resistance derived from the wheat cultivar Moro, *Theor appl. Tenet* 104 : 1278-1282.
24. Yasaratna, K., C. Nakamura and C. Kaneda : 1997, Characterization of brown planthopper (BPH) biotypes with virulence against BPH resistance genes in rice, In : *Harmonizing Agricultural Productivity and Conservation of Biodiversity : Breeding and Ecology*, In Proc. of the 8th SABRAO General Congress and the Annual Meeting of the Korean Breeding Society, Seoul, Korea, pp. 191-192.

25. Yeo, U. S. and J. K. Sohn : 1995, Effective screening methods and inheritance of resistance to brown planthopper(*Nilaparvata lugens* Stal.) in rice, Korean J. Breed., 27(4) : 372-379.
26. Yeo, U. S., Y. D. Jin, H. Y. Kim, N. B. Park, S. J. Lim, H. G. Hwang, S. C. Kim and J. K. Sohn : 1998, Linkage between shikimic dehydrogenase isozyme and a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) resistance gene in a japonica rice, Milyang 64, Korean J. Breed., 30(2) : 162-167.
27. Yeo, U. S. and J. K. Sohn 2001. Linkage Analysis between Some Agronomic Traits and Resistnace Gene to Brown Planthopper in Rice. Korean J. Breed. 33(4) : 287-293.
28. Yeo, U. S., D. Y. Kwak, S. J. Lim, W. G. Ha, J. H. Cho and J. K. Sohn 2002. Relationship between Agronomic Traits and Resistance to Brown Planthopper in Japonica RIL Population. Korean J. Breed. 34(3) : 148-152.
29. 영남농업시험장 2001. 시험연구 보고서 767-779.
30. 영남농업시험장 2002. 시험연구 보고서 302-312.

주 의

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