

## 도열병 저항성 유전자와 연관된 SSR 마커를 이용한 양질미 품종의 유전적 다양성

황홍구\* · 권수진\*\*\*† · 조영찬\* · 안상낙\*\* · 서정필\* · 문헌팔\*

\*작물시험장, \*\* 충남대학교, \*\*\*농업생명공학연구원

### Genetic Diversity of High-Quality Rice Cultivars Based on SSR Markers Linked to Blast Resistance Genes

Hung-Goo Hwang\*, Soo-Jin Kwon\*\*\*†, Young-Chan Cho\*, Sang-Nag Ahn\*\*, Jung-Pil Suh\*, and Huhn-Pal Moon\*

\*National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

\*\*Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

\*\*\*National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT :** The epidemics of rice blast which occurred in south parts of Korea during the period from 1999 to 2001 and damaged several high quality rice cultivars developed using “Milyang 95” and/or “Milyang 96” as a parent. Genetic diversity of 23 rice cultivars including “Milyang 95” and its relatives was assessed using 54 simple sequence repeats (SSR) markers reported to be linked to major blast resistance genes. Fifty-four SSR markers representing fifty-seven loci in the rice genome detected polymorphism among the 23 cultivars and revealed a total of 170 alleles with an average of 3.0 alleles per primer. The number of amplified bands ranged from 1 to 7. Several SSR markers including RM249, RM206 and OSR20 were informative for assessing the genetic diversity of relatively closed japonica rice cultivars. The 23 cultivars were classified into four groups by cluster analysis based on Nei's genetic distances, and the cultivars developed from same parents showed a tendency to cluster together that is consistent with genealogical information. High quality rice cultivars, Daesanbyeo, Donganbyeo, and Milyang 95 belonged to the same cluster. At the loci, RM254 and OSR32, all of the cultivars derived from the crosses using “Milyang 95” shared same alleles, suggesting that these japonica cultivars might carry alleles that are identical by descent. Evaluation of 23 rice cultivars against blast needs to be confirmed regarding the relationship between genotype and blast resistance.

**Keywords:** genetic diversity, high quality, rice, simple sequence repeats (SSRs), blast, genetic background

우리나라의 벼 육종목표는 시대적 요구에 따라 다수성, 양질성 및 재배안정성 등으로 변화하여 왔다. 1960-1970년대는 다수성에 벼 육종 목표를 두었으며 1980년대에는 자포니카 품종의 재배안정성에 중점을 두었고, 1990년대 이후에는 대다수가 자포니카 품종을 재배하게 되었다. 하지만 양질 자포니카 품종 위주의 재배는 품종들간 유전적 단순화를 가져왔으며, 더욱이 품질이 우수한 소수 양질성 우량계통(elite line)들의 교배모본 활용은 육성품종의 유전적 단순화를 더욱 가속화하는 결과를 가져왔다.

품종육성에 있어 작물의 유전적 다양성은 매우 중요하다. 1970-1971년 미국 옥수수 재배 농가의 단일 응성불임계통에서 발생된 깨씨무늬병 T균계(*Helminthosporium maydis*, T race)의 특이적 침해에 의한 대규모 피해는 유전적 다양성의 중요성을 잘 설명해 주고 있다(National Academy of Science, 1972). 또한 유전적 배경이 유사한 벼품종들의 대면적 재배는 소수의 도열병 레이스 집단이 급격한 증가와 새로운 레이스 출현에 의한 저항성 품종의 이병화를 초래하는 것으로 보고되고 있다. 국내에서는 양질미 벼품종이 빠른 속도로 보급된 1990년대 초반 일품벼와 진미벼(Han *et al.*, 1998)의 저항성 붕괴와 1999년 소수 양질미 품종의 대면적 재배로 인한 전남 지역의 이삭도열병 발병도 유전적 취약성에 근거한다고 보고되고 있어(Kwon *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2001), 재래벼와 야생벼 등 다양한 유전자원을 통한 유전변이 확대에 관심이 고조되고 있다(Kwon *et al.*, 2000b; Kim *et al.*, 1994).

SSR 마커는 진핵생물의 게놈에 골고루 분포하며 벼 게놈상에서 발현 유전자의 빈도가 높은 부분에서 발견되고(Ji *et al.*, 1998; McCouch *et al.*, 2001) 다른 마커들에 비해 높은 재현성과 품종간 높은 다형화 현상이 보고되었다(Kwon *et al.*, 1999; Olufowote *et al.*, 1997; Wu & Tanksley, 1993). 벼

†Corresponding author: (Phone) +82-31-299-1675 (E-mail) sjkwon@rda.go.kr

<Received June 1, 2003>

계놈 염기서열 완성과 함께 전체 계놈을 대표하는 SSR 마커는 수 천종 개발, 상용화되어(Temnykh *et al.*, 2001) 벼의 품종간 유전적 배경과 유전적 다양성연구 및 저항성 유전자 탐색 등에 그 이용이 가속화되고 있다(Ahn *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2000b).

본 연구는 SSR 마커를 이용하여 최근 육성된 양질 벼품종과 이들 모본들의 유전적 다양성 및 계보분석을 통해 재배품종들의 유전적 일양성과 도열병 이병화 구명의 기초 자료로 활용하고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

시험 재료는 1999년에서 2001년까지 전남지역에서 비교적 재배면적이 넓었던 일미벼, 대산벼, 동안벼와 이들의 모본들로 구성된 23품종을 이용하였다. 분석을 위하여 유묘기에 잎을 채취하였으며 genomic DNA의 추출은 Causse *et al.*(1994)의 방법에 준하였다.

SSR 분석을 위해 각 염색체당 임의로 선택된 마커 외에 기존에 보고된 도열병 저항성유전자와 인접한 54개의 마커를 선정하였다(Table 1). 목적 도열병저항성 유전자는 2번 염색체에 위치하는 *Pi-b*, *Pi-12(t)*, 4번 염색체의 *Pi-5(t)*, 5번 염색체의 *Pi-10(t)*, 6번 염색체의 *Pi-2*, *Pi-9*, 8번 염색체의 *Pi-11*, 11번 염색체의 *Pi-1*, *Pi-7(t)*, *Pi-18*, *Pi-44(t)*와 12번 염색체의 *Pi-3(t)*, *Pi-4(t)*, *Pi-6(t)*, *Pi-21(t)* 등을 기준으로 하였다. SSR 분석은 PCR 증폭액 25  $\mu$ l에 10 mM Tris-Cl(pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, dATP, dCTP, dGTP, dTTP(각 0.1 mM), 0.2  $\mu$ M 프라이머, 20 ng의 genomic DNA와 1 unit의 Taq polymerase가 포함되도록 하였다. DNA 단편의 증폭조건은 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 5분 합성과정을 거쳤다. 반응 후 PCR 증폭산물의 확인은 7 M urea를 함유하는 5% polyacrylamide 변성젤 상에서 전기영동하였으며 silver staining 과정은 Panaud *et al.*(1996)의 방법에 준하였다.

프라이머에 의해 증폭된 DNA 밴드의 유무에 의해 밴드가 있는 경우는 1, 밴드가 없는 경우는 0의 값을 주었다. 각 마커에 의해 나타난 밴드 중 같은 크기의 밴드를 allele로 하여 그 개수를 구하였으며 품종간의 유전적 거리는 Nei(1973)의 식에 의해 산출되었다. 품종간 유전적 유연관계는 UPGMA를 이용한 SHAN clustering 방법으로 dendrogram을 작성하였다.

### 결과 및 고찰

#### 품종의 유전적 다양성

54개의 SSR 마커를 이용하여 양질 자포니카 품종과 이들의 모본들로 구성된 23품종의 유전적 다양성을 분석한 결과 57개 유전자좌에서 전체 170개(평균 3.0개)의 alleles이 관찰되었

**Table 1.** Number of alleles as detected by individual marker.

No.	Locus name	Chr. Location	No. of allele	No.	Locus name	Chr. Location	No. of allele
1	RM24	1	2	30	RM72	8	4
2	RM9	1	2	31	RM44	8	3
3	RM246	1	4	32	RM210	8	1
4	RM465A	2	2	33	RM80	8	3
5	RM207	2	4	34	RM219	9	5
6	RM48	2	3	35	RM242	9	2
7	RM218	3	3	36	OSR28	9	3
8	RM119	4	1	37	OSR29	9	3
9	RM273	4	2	38	RM228	10	3
10	RM252	4	2	39	RM202	11	4
11	RM241	4	3	40	RM20B	11	3
12	RM303	4	1	41	RM287	11	3
13	RM249	5	7	42	RM209	11	4
14	RM465C	5	2	43	RM229	11	3
15	RM430	5	5	44	RM206	11	6
16	RM204	6	2	45	RM254	11	4
17	RM217	6	5	46	RM224	11	2
18	RM276	6	1	47	RM139	11	3
19	RM402	6	1	48	RM144	11	4
20	RM549	6	1	49	RM20A	12	3
21	RM121	6	2	50	RM101	12	5
22	RM136	6	1	51	OSR20	12	6
23	RM465B	6	4	52	OSR32	12	3
24	RM70	7	4	53	RM179	12	1
25	RM234	7	2	54	RM277	12	2
26	RM248	7	1	55	RM511	12	2
27	OSR34	8	4	56	RM260	12	4
28	RM25	8	4	57	RM235	12	3
29	RM547	8	3				

으며 발생한 alleles 수는 1개에서 7개까지 다양하였다. 이중 9개 마커를 제외한 45개 마커에서 하나의 유전자좌당 2개 이상의 alleles이 관찰되었으며(Table 1) 이 중 RM249, RM206, OSR20은 6개 이상의 대립유전자를 가져 같은 모본에 의해 육성된 근연의 품종에서도 높은 다형현상을 보였다. 5번, 11번 그리고 12번 염색체에 각각 위치하는 이 마커들은 수원365호와 추청벼간에 다형성을 보였고 이 조합의 유전자지도를 이용한 QTLs도 탐색되고 있어(Kwon *et al.*, 2000a) 근연관계의 벼품종 판별 및 자포니카 근연조합의 유전자지도 작성과 연관 유전자 mapping에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

#### 품종간 유연관계

54개 SSR 마커들에 의해 증폭된 밴드의 유무를 바탕으로 공시된 23품종의 유전적 거리를 구하여 이를 바탕으로 군집분석을 한 결과는 Fig. 1과 같다. 4개의 군으로 나뉘었으며 이

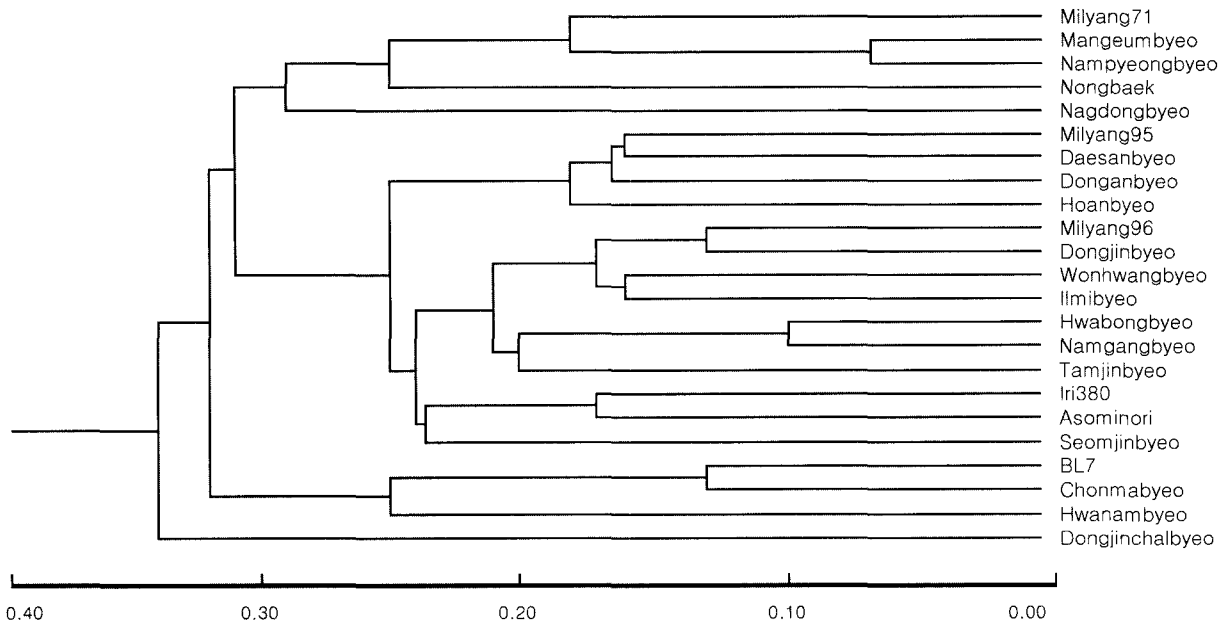


Fig. 1. Classification of 23 rice cultivars based on 170 polymorphic bands.

중 II 군은 유전적 거리 0.24에서 3개의 세군으로 세분할 수 있었다. I 군은 낙동벼 등 5품종, II 군은 밀양 95호 등 14품종, III 군은 BL7 등 3품종, IV 군은 찰벼인 동진찰벼가 따로 구분되었으며 이 결과는 Fig. 2의 품종 계보도와 일치하였다 즉, I 군은 낙동벼를 모본으로 하는 만금벼, 남평벼 및 밀양 71호와 농백이 속하였으며, II 군의 제 1, 2 세군에는 밀양 95호와 밀양 96호(영남벼)를 모본으로 하는 일미벼, 대산벼, 동안벼, 호안벼 등이 속하고 제 3 세군은 그 외의 모본품종들로 이루어졌다. III 군과 IV 군의 화남벼와 동진찰벼는 밀양 95호를 모본으로 하고 있으나 밀양 95호를 모본으로 하는 다른 품종들에 비해 밀양 95호의 유전적 배경이 적음을 알 수 있었다. 반면에 1999년과 2001년에 잎도열병과 이삭도열병이 심하게 발병한 일미벼, 대산벼, 동안벼는 근연의 품종으로 밀양 95호와 같은 군으로 분류되어 유전적으로 유사하다는 것을 확인할 수 있었다. 이같은 경향은 품종 계보도와도 일치하며 단간이면서 도복에 강한 밀양 95호를 교배모본으로 널리 이용한 결과로 추정된다. 이 결과는 Kwon 등(2000c)의 SSR 과 RAPD 마커를 이용한 육성시기별 유전적 다양성에 대한 연구 보고에서 1990년대 육성품종의 교배모본들이 소수 우량계통으로 이루어졌으며 이것이 유전적 단순화를 가져왔다는 보고를 뒷받침하는 결과이다. 이를 종합해 볼때 육종과정에서 유전적 다양성을 고려한 교배모본의 선정이 육종가에게는 고려되어야할 중요성을 강조할 수 있다.

**대면적 재배품종의 모본 추적**

1990년대 이후 우리나라에서는 양질 자포니카 품종 육종이 가속화되었고 양질 중심의 품종이 선별 재배되면서 특정 품종

의 재배면적이 증가하게 되었다. 따라서 재배 품종들간의 유전적 배경이 점차 좁아졌으며 이것은 육성품종들의 유전적 다양성을 단순화시키는 결과를 가져오게 되었다. 특히, 2000년에는 비슷한 유전적 배경을 갖는 품종들의 재배면적이 전남, 전북, 충남 순에서 각각 86%, 64%, 그리고 37%로 늘어난 것으로 조사되었으며(Han *et al.*, 2001), 전남지역에서 많은 면적에 재배되고 있는 일미벼, 대산벼, 동안벼의 잎도열병 및 이삭도열병 발병 또한 이와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 피해 품종과 그들의 모본을 추적하여 계보도를 비교해 본 결과 동진벼, 탐진벼를 제외하고 모두 밀양 95호와 밀양 96호(영남벼)를 모본으로 하고 있으며 아울러 모두 낙동벼의 유전적 배경을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 도열병 저항성유전자와 가까이 위치한 SSR 마커를 이용하여 이들 계보도상의 근연 품종들간 유연관계를 분석한 결과 유전적 유사도가 높음을 볼 때 이들 품종들의 도열병 저항성원도 단순화되었음을 추정할 수 있었다. 이같이 유전적으로 취약한 품종들의 재배면적 확대는 세심한 주의가 필요하다고 하겠으며 육성품종의 병해 저항성 역전현상에 대비하여 유전적 다양성을 고려한 교배모본의 이용이 절실하다고 하겠다.

**연관마커를 이용한 저항성 유전자 후대 전이탐색**

SSR 마커에 의한 각 allele별 해당품종을 조사한 결과 RM207, RM121, RM70, RM25, RM144, RM139, RM224, RM254, RM101, OSR20 그리고 OSR32의 특정 allele은 밀양 95호와 영남벼를 모본으로 한 품종들 중 1~2개의 품종을 제외하고 모두 같은 allele을 가짐을 확인할 수 있었다. RM207은 도열병 저항성 유전자 *Pib*와 인접한 마커이며, RM121은 *Pi-*

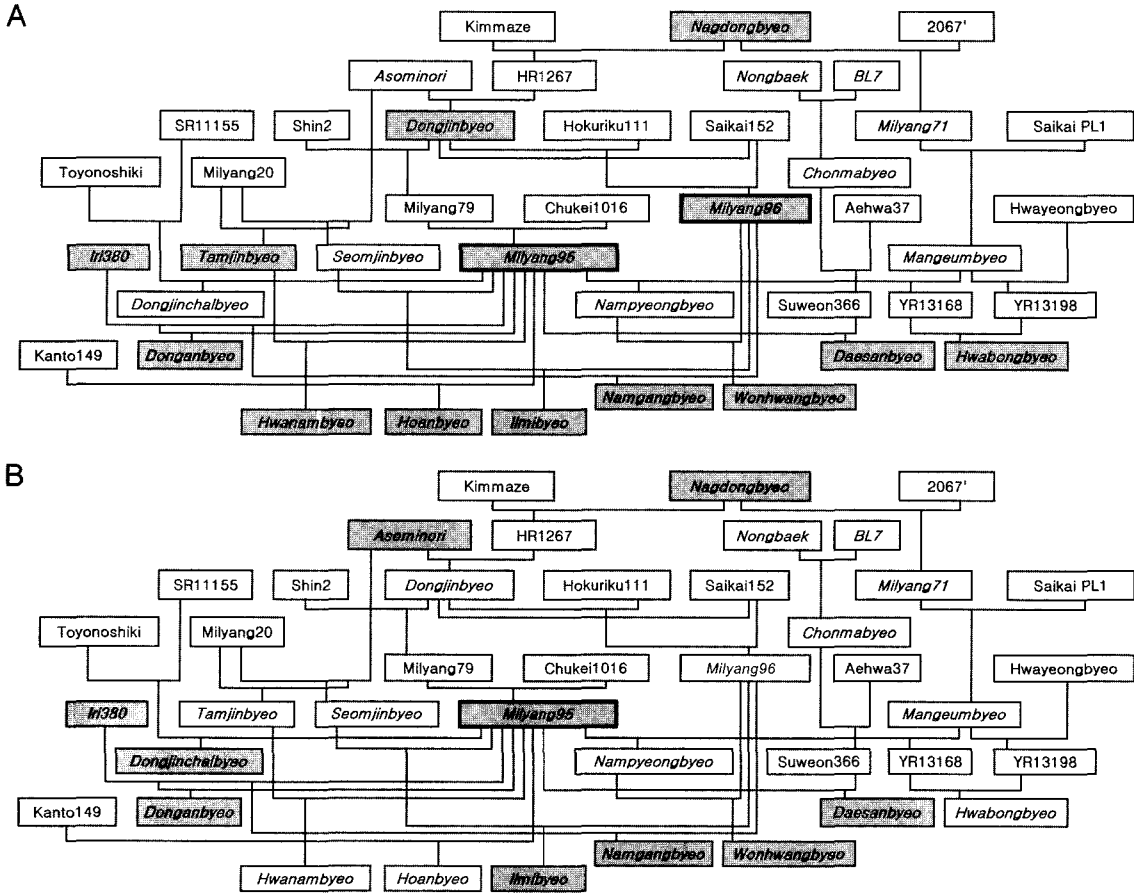


Fig. 2. Inheritance of the OSR32 (shade, A) and RM254 (shade, B) alleles within pedigree. Evaluated cultivars are shown in italics.

2(t)와 *Pi-9*와, RM25는 *Pi-11(t)*와, RM144, RM139 및 RM224는 *Pi-18*과, 그리고 RM101, OSR20 및 OSR32는 *Pi-21*, *Pi-ta*와 *Pi-25(t)* 외 다수의 저항성 유전자와 인접한 마커들이며 RM70 마커가 위치한 7번 염색체상에는 도열병 저항성 유전자도 보고되지 않았다. 특히, 12번 염색체에 위치하는 OSR32에 의해 발생된 3개의 alleles 중 2번째 allele은 한 등(2001)이 보고한 KJ105와 KI117a에 대한 도열병 저항성 반응과 일치하는 경향을 보였다(Fig. 2). 밀양95호와 밀양96호를 모본으로 하며 유전적 배경이 유사한 남강벼, 화봉벼, 원황벼, 호안벼, 일미벼, 대산벼 및 동안벼는 모두 낙동벼와 밀양95호가 갖는 allele과 같은 allele을 가지면서 KI117a에 이병성을 보였고, KI117a에 저항성을 보인 농백은 이들과 다른 allele을 보였다. 다른 품종들에 비해 밀양95호와 유전적으로 비교적 다른 품종으로 구분된 동진찰벼와 남평벼는 KI117a에 이병성 반응을 보이나 같은 allele을 보이지는 않았다. 또한, 11번 염색체에 위치한 RM254는 KI113에 대한 저항성 반응과 일치하는 경향을 보였는데 RM254에 의해 발생된 4개의 alleles 중 3번째 allele은 낙동벼와 밀양95호를 모본으로 하는 품종들이 같은 allele을 가졌으며 반면에 KI113에 저항성인

품종이면서 밀양95호를 모본으로 하는 호안벼는 이들과 다른 allele을 가졌다(Fig. 2). 이처럼 KJ105, KI117 및 KI113에 대한 저항성 반응은 같은 모본으로부터 유래한 품종들의 유전자형과 일치하는 양상을 보였으나 이 결과는 좀 더 많은 품종을 대상으로 도열병 저항성 반응과 비교한 후 연관성 여부에 대한 정밀한 검토가 이루어져야 할 것이다.

적 요

최근 비교적 재배면적이 넓은 일미벼, 대산벼, 동안벼와 이들의 모본들로 구성된 23품종의 유전적 다양성을 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 1999년에서 2001년에 잎도열병과 이삭도열병이 심하게 발병한 일미벼, 대산벼, 동안벼는 밀양95호를 모본으로 육성되었다.
2. 밀양95호를 모본으로 하는 품종들에 대해 SSR 마커를 이용하여 유전적 다양성을 조사한 결과 57개 유전자좌위에서 170개(평균 3.0개)의 alleles이 관찰되었으며 대립유전자수는 2개에서 7개까지 다양하였다. 특히, RM249, RM206, OSR20

은 6개 이상의 대립유전자를 가져 근연의 자포니카 벼품종간의 유전적 다양성 평가에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

3. 증폭된 밴드의 유무를 바탕으로 품종간 유전적 거리를 산출하여 군집분석을 실시한 결과 크게 4개의 군으로 나뉘었으며 일미벼, 대산벼, 동안벼는 모본인 밀양95호와 유전적 배경이 매우 유사하였다.

4. 같은 계보상의 품종들에 대해 도열병 저항성 유전자 인권의 마커를 이용한 유전적 다양성 분석결과가 계보도와 일치하여 이들 품종들의 저항성 유전자형 또한 유사할 것으로 추정할 수 있었다.

5. 조사품종의 계보상의 allele 전이를 분석한 결과 11번 염색체의 RM254의 3번째 allele과 12번 염색체의 OSR32의 2번째 allele이 밀양95호로부터 계속 전이되었음을 알 수 있으며 이들 alleles의 도열병 이병화와의 연관성 여부는 추후에 검토가 이루어져야할 것이다.

## 인용문헌

- Ahn, S. N., Y. K. Kim, H. C. Hong, S. S. Han, S. J. Kwon, H. C. Choi, H. P. Moon, and S. R. McCouch. 2000. Molecular Mapping of a New Gene for Resistance to Rice Blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Euphytica* 116: 17-22.
- Causse, M. A., T. M. Fulton, Y. G. Cho, S. N. Ahn, J. Chunwongse, K. S. Wu, J. H. Xiao, Z. H. Yu, P. C. Ronald, S. E. Harrington, G. Second, S. R. McCouch, and S. D. Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Han, S. S., S. H. Choi, D. S. Ra, and M. Y. Eun. 1988. Analysis of rapid increase of rice blast fungus race KI-409 in Korea. *Korean J. Plant Pathology* 14: 705-709.
- Han, S. S., J. D. Ryu, H. S. Shim, S. W. Lee, Y. K. Hong, and K. H. Cha. 2001. Breakdown of resistance of rice cultivars by new race KI117a and race distribution of rice blast fungus during 1999-2000 in Korea. *Korean Research in Plant Disease* 7(2): 86-92.
- Ji, H. S., H. J. Koh, S. U. Park, and S. R. McCouch. 1998. Varietal identification in *japonica* rice using microsatellite DNA markers. *Korean J. Breeding* 30(4): 350-360.
- Kim K. H., S. Y. Cho, H. P. Moon, and H. C. Choi. 1994. Breeding strategy for improvement and diversification of grain quality in rice (in Korean). *Korean J. Breeding* 26 (Supp. 2): 3-19.
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, H. C. Hong, Y. C. Cho, J. P. Suh, Y. K. Kim, K. H. Kang, S. S. Han, H. C. Choi, H. P. Moon, and H. G. Hwang. 2002. Identification of DNA markers linked to resistance genes to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) *Korean J. Breeding* 34(2): 105-110.
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, H. C. Choi, and H. P. Moon. 1999. Evaluation of genetic relationship and fingerprinting of rice varieties using microsatellite and RAPD markers. *Korean J. Crop Science* 44(2): 112-116.
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, J. P. Suh, Y. C. Cho, H. C. Hong, Y. K. Kim, H. G. Hwang, H. P. Moon, and H. C. Choi. 2000a. Genetic mapping and identification of QTLs related to agronomic traits in a *japonica* cross of rice. Proc. 1st Plant Mol. Genet. Breeding, Poster 12. Seoul Nat'l Univ., Suwon, Korea(Sept. 1, 2000)
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, J. P. Suh, H. C. Hong, Y. K. Kim, H. G. Hwang, H. P. Moon, and H. C. Choi. 2000b. Genetic diversity of Korean native rice varieties. *Korean J. Breeding* 32(2):186-193
- Kwon, S. J., S. N. Ahn, C. I. Yang, H. C. Hong, Y. K. Kim, J. P. Suh, H. G. Hwang, H. P. Moon, and H. C. Choi. 2000c. Genetic diversity of Korean rice cultivars. In:Abstract. International Rice Genetics Symposium, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, Oct. 2000. p41.
- McCouch, S. R., S. Temnykh, A. Lukashova, J. Coburn, G. DeClerck, S. Cartinhour, S. Harrington, M. Thomson, E. Septiningsih, M. Semon, P. Moncada, and Li Jiming. 2001. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications. In: *Rice Genetics IV* p 117-135.
- National Academy of Sciences. 1972. Genetic vulnerability of major crops. National Academy of Science, Washington, DC.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70(12): 3321-3323
- Olufowote, J. O., Y. Xu, X. Chen, W. D. Park, H. M. Beachell, R. H. Dilday, M. Goto, and S. R. McCouch. 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 40: 370-378
- Panaud O., X. Chen, and S. R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 252: 597-607.
- Sebastian, L. S., L. R. Hipolito, and J. S. Garcia. 1998. Molecular marker analysis of the contribution made by landraces to modern Philippine rice cultivars. *SABRAO J. Breed. and Genet.* 30(2): 73-82.
- Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, and S. R. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11:1441-1452
- Wu, K. S. and S. D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235