

Hordein 분석을 통한 보리 국가목록등재품종의 품종식별

소은희*† · 고은별* · 최수정** · 이종호** · 송인호*

*국립종자관리소 재배시험과, **국립종자관리소 재배시험과 밀양지소

Hordein Fingerprinting for Cultivar Discrimination in National List of Barley

Eun-Hee So*†, Eun-Byoel Ko*, Soo-Jeoung Choi**, Jong-Ho Lee**, and In-Ho Song*

*Department of Variety Testing, National Seed Management Office, MAF, Suwon 442-400, Korea

**Millyang Branch Office, National Seed Management Office, Milyang 627-911, Korea

ABSTRACT : A major challenge facing those involved in the testing of new plant varieties for distinctness, uniformity and stability (DUS) is the need to compare new varieties against all those of common knowledge (reference varieties). One possible approach would be to group new (candidate) varieties and reference varieties using descriptions stored in databases prior to further official test. This study was carried out to manage a reference variety collection by databasing of hordein profiling. For this purpose, hordein subunits of the 48 National list barley (*Hordeum vulgare* L) cultivars were analysed. Total 22 of clear scorable hordein subunits were identified from D-subunit to B-subunit region and fifteen different hordein polypeptide patterns were obtained. Based on hordein subunit band pattern, UPGMA cluster analysis was conducted. Forty-eight cultivars were separated into three groups and genetic distance of cluster ranging from 0.55 to 1.00. Hordein subunits have a potential of selecting similar varieties compared with candidate varieties by controlling reference variety collection and playing an important complementary role in cultivar distinctness.

Keywords: *Hordeum vulgare* L, DUS test, Hordein subunit, SDS-PAGE

보리를 포함한 농작물(벼, 옥수수, 감자 및 콩)의 신품종이 상업적으로 판매되기 위해서는 국가목록으로 등재되어야만 한다(www.seed.go.kr). 이들 신품종이 국가목록으로 등재되기 위해서는 재배 혹은 이용상 기존품종보다 우수한지의 여부를 판단하는 성능검정을 실시한다. 더불어 신품종에 대한 육종가권리 보호(PBR's; Protection of the New Plant Varieties for Breeder's Right)를 위한 품종보호권을 획득하기 위해서는 구별성, 균일성 및 안정성 여부를 판단하는 DUS 검정을 실시하게

된다(UPOV, 1994). DUS 검정은 주로 재배시험을 통해 형태적 및 농업적 특성을 조사하게 되므로 환경적 변이로 인한 DUS 검정의 문제가 제기되어 왔었다(Cooke, 1995; Choe 등, 2002). 이러한 문제점을 보완하기 위해 유럽의 품종보호기관들을 중심으로 실험실적 기법들이 발전해 왔고(Maruria, 2000) UPOV(International Union for the Protection of New Varieties of Plants)에서는 생화학 및 분자생물학적 기법 실무회의(BMT meeting; Working Group on Biochemical and Molecular Techniques, and DNA-profiling in Particular)를 두어 신품종 심사시 생화학 및 분자생물학적 기법을 DUS에 적용하기 위한 기술 및 심사기준을 검토중이다(UPOV, 2000). 종자 저장단백질은 종자의 단백질 함량뿐만 아니라 품질을 결정하는 요소이며 특히, hordein은 보리의 중요 저장단백질이다(Pedersen, 1995). 전기영동을 통한 hordein polypeptide 밴드 패턴은 보리 육종에 있어 생화학적 유전정보, 품종확인 및 배유 품질 등에 관한 정보를 알 수 있는 유용한 분석방법이다. 보리의 hordein 조성은 UPOV guideline의 additional characteristics에 지정되어 있고(UPOV, 1994) 이 guideline에는 국제적으로 적용되는 보리 hordein 분석법과 hordein 조성에 따른 표준품종 등이 정립되어 있다(Cooke, 1995; Table 2). 실제로 독일에서는 신품종에 대한 육종가권리보호 설정 및 국가목록등재시 생화학적 분석을 통한 품종식별 및 성능검정을 실시하고 있다. 따라서 본 연구에서는 SDS-PAGE를 통해 국가목록으로 등재된 보리 48품종들의 hordein 밴드패턴을 D/B화하여 기존(참고)품종으로 관리, 활용하면서 품종구별 및 출원품종과 비교될 대조품종의 선별 가능성에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

보리종자는 1997년부터 국가목록으로 등재된 품종으로서 국립종자관리소에서 보관해온 종자를 이용하였다(Table 1). 종자로부터 hordein 추출은 UPOV guideline(1994)과 강(1990)의

†Corresponding author: (Phone) +82-31-273-4147 (E-mail) soeunhee@seed.go.kr <Received April 6, 2004>

방법을 참고로 하였다. 각각의 마쇄된 종자 20 mg에 100 μ l 추출버퍼A(1% SDS, 24% Urea)를 혼합시킨 후 50 μ l의 추출버퍼B(추출버퍼A: β -mercaptoethanol=1:0.03)를 첨가하였다. 상온에서 1시간정도 추출한 후 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취해 샘플로 사용하였다. SDS-PAGE는 18% separating gel과 4% stacking gel을 사용하였고 4 μ l 샘플을 로딩한 후 40mA로 전기영동하였다. 전기영동 후 젤은 fixing sol (50% Metanol, 10% acetic acid)에서 1시간동안 밴드를 고정시킨 후 증류수로 세척하고 staining sol.(15% TCA:2% Coomassie brilliant blue R-250=750:1)에서 염색하였다. Hordein subunits 분류 및 조성은 전기영동적 이동거리(REM-value; Relatively Electrophoresis Mobility Value)방식으로 기록하는 UPOV guidelines(UPOV, 1994; Table 2)을 참고하였고 젤 상에 나타난 hordein 밴드는 다형성 유무에 따라 1(유)과 0(무)으로 수치화하여 기록하였다. 공시된 보리품종에 대한 유전적 유사도는 NTSYSpc V.2.1 프로그램(Rohlf, 1993)을 이용하였고 simple matching(Sneath & Sokal, 1973) 방법에 의해 산출하였다. 이 값을 근거로 하여 비가중산술방식(UPGMA:unweighted pair group method using arithmetic averages)로 집괴분석하였다.

결과 및 고찰

보리 국가목록등재품종 중 겉보리(18품종), 쌀보리(19품종), 맥주보리(11품종) 등 48품종의 저장단백질인 hordein을 추출하여 SDS-PAGE하였다. 전체적으로 hordein subunit는 D, D/C, C, B-hordein의 4 부분으로 구분되었는데 B와 C-hordein 부분은 다양한 밴드패턴을 보인 반면, D와 D/C-hordein 부분은 단순한 밴드패턴을 보였다. SDS-PAGE에 의한 hordein subunit의 조성은 분자량에 의해 구분되기도 하지만(Kang 1990; Shin 등 2001), 현재 UPOV는 REM-value(Relative electrophoretic mobility)에 의해 품종별 hordein subunit 조성을 기록하고 있다(표 2). 48품종의 hordein SDS-PAGE 결과, 총 22개의 hordein peptide 밴드를 읽을 수 있었으며 다양한 15종류의 hordein 밴드 패턴을 볼 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과는 신 등(2001)이 108개의 보리종자에서 총 14개의 hordein polypeptide 밴드와 각기 다른 7종류의 hordein 밴드 패턴으로 구분할 수 있었다는 보고와 차이를 보였다. 국가목록등재 48품종의 hordein 밴드 패턴에 의한 유전적 유사도를 분석한 바 전체 유사도지수는 0.54-1.00 범위로 나타났으며 유전적 유사도값 0.77를 기준으로 하였을 때 총 48품종을 3개 군으로 분류할 수 있었다(Fig. 2). 분류된 군집별로 hordein 밴드 패턴을 보면 제 I군과 제 III군은 B-hordein polypeptide 조성에서 뚜렷한 차이를 보여주었고 제 II군은 다른 군과는 전혀 다른 밴드패턴을 보였다. 제 I군에는 20개의 품종이 속하였는데 이들 품종들은 C-hordein polypeptide 조성에서 약간의

Table 1. Barley cultivars used in this study.

Entry	Cultivar	Entry	Cultivar	Entry	Cultivar
1. Mirac		17. Sangroc		33. Jaegangssal	
2. Daebag		18. Saeneul		34. Daehossal	
3. Keunal		19. Daejin		35. Chunchussal	
4. Nakyoung		20. Songhac		36. Mudeungssal	
5. Saeal		21. Saechalssal		37. Kwanghwalsal	
6. Milyanget		22. Chalssal		38. Samdo	
7. Alchan		23. Dowonchapsal		39. Danwon	
8. Al		24. Jinnichapsal		40. Illjin	
9. Oweol		25. Kanghossal		41. Jeju	
10. Daeyeon		26. Saessal		42. Namhyang	
11. Seodunechal		27. Olssal		43. Doosan 29	
12. Chal		28. Hinchalssal		44. Doosan 8	
13. Topgol		29. Nulssal		45. Sacheon 6	
14. Saekang		30. Naehanssal		46. Jingkwang	
15. Saeol		31. Hinssal		47. Jinyang	
16. Paldo		32. Kinssal		48. Shinho	

차이들을 보였다. 겉보리 중 미락, 낙영, 새알, 오월, 대연, 서둔찰, 탑골, 셋강, 팔도 등 9품종과 새찰쌀, 찰쌀, 울쌀, 내한쌀, 흰쌀, 춘추쌀 등 6품종이 같은 밴드패턴을 보였다. 상록과 대진은 제 I군에 속한 다른 품종들이 C-hordein 에서 2개의 polypeptide를 나타낸것과 달리 4개의 polypeptide를 보였다. 알찬은 D/C-hordein에서 2개의 polypeptide를 나타내었고 C-hordein에서도 다른 품종과는 다른 조성을 나타내어 독특한 밴드패턴을 보였다. 제 I군은 주로 6조 겉보리가 포함되어있지만 6조 쌀보리도 다수 포함되어 있었다. 이에 대해 강(1990)은 교배모본이 같거나 육성계보가 비슷하기 때문에 그 결과로 hordein 밴드패턴에서 구별성이 보이지 않는 것으로 보여진다고 하였으나 48품종에 대한 육성계보를 조사해본 결과 hordein 밴드패턴과 교배모본과는 연관이 없는것으로 나타났다. 제 II군은 맥주보리 품종들로 구성되어있었고 이들 맥주보리들은 각기 다른 4가지 밴드패턴을 보였다. 제 II군에서 단원, 남향, 진양은 같은 밴드패턴을 보였지만 일진은 C와 B-hordein조성에서 단원을 포함한 위의 3품종과 구별되는 독특한 밴드패턴을 보였다. 삼도 두산29호, 두산8호, 사천6호, 진광, 제주 등 2조 겉보리인 맥주보리와 2조 쌀보리인 두원찰쌀도 같은 밴드패턴을 보였는데 이와 같은 결과는 장 등(2001)의 결과와 같았다. 맥주보리 중 신호와 일진은 다른 맥주보리의 hordein 밴드패턴과 비교해볼 때 많은 차이를 보였는데 특히 신호는 겉보리 중 찰보리와 유사도 0.87로서 맥주보리보다는 겉보리의 hordein 구성에 더 가깝게 나타났다. 제 III군은 14개의 품종들로 구성되었는데 공통적으로 D/C-hordein에 해당하는 polypeptide가 없었다. 겉보리 중 알보리와 쌀보리 중 새늘, 송학, 진미찰쌀, 새쌀, 흰찰쌀, 긴쌀, 재강쌀, 대호쌀, 무등쌀, 광활쌀이 같은 밴드패턴을 보였다. 제 III군은 주로 6조

Table 2. Characteristics derived by using SDS-PAGE in UPOV test guideline.

Characteristic	State of Expression		Characteristic	State of Expression	
30	Band	34*	32.	Bands	79+86+88+100
D-Hordein	Band	33	B-Hordein		
Composition	Band	35	composition	Bands	79+88+91+95+97+101
	Bands	62+65+68		Bands	79+91+92+95+97+101
	Bands	62+65+66+68		Bands	75+82+87+91+97
	Bands	65+68		Bands	79+86+88+97+101
	Bands	66.5+71		Bands	78+84+95+101
	Bands	61.5+66.5+71		Bands	79+90+91+94+100
	Band	65		Bands	78+86+91+95+100
31.				Bands	79+82+88+91+92+101
C-Hordein	Bands	60+67.5+68.5		Bands	76+79+86+88+100
Composition				Bands	79+86+89+92+95+101
	Bands	61+65+68+73		Bands	79+95+101
	Bands	60+69+72		Bands	78+89+92+101
	Bands	64+66.5		Bands	75+78+79+81+89+101
				Bands	75+78+79+81+83+86+88+95+100
	Bands	67+71		Bands	81+84+88+90+101
				Bands	75+78+79+81+83+86
	Bands	65+68+69+70		Bands	82+88+100
	Bands	61.5+68+71		Bands	81+100
	Bands	65+67.5		Bands	75+79+83+89+91
				Bands	79+84+92
	Bands	65.5+70.5		Bands	79+91+92
				Bands	75+79+91+92+95+97+101
	Bands	66+70.5		Bands	75+79+90+94+99
	Bands	63+66.5+70		Band	79+(83bis85)+(89bis91)+ (94bis96)+102
	Bands	63+67.5+70		Bands	78+86+91+95+101
	Bands	65+68+72		Bands	79+82+88+91+92+101
				Bands	88+92+100
	Band	49		Bands	72+74+79+88+91+101
	Bands	49+52		Bands	79+88+98+101
34.	Band	50		Bands	79+82+89+90+101
D/C-Hordein	Bands	50+52			
Composition	Band	51.5or51.5+52or52			
	Band	53			
		No Bands			
	Bands	50+53			
	Bands	49+53			

*Relatively Electrophoresis Mobility Value(REM-value)

쌀보리가 포함되어 있었다. 본 분석에서 나타난 바와 같이 hordein 밴드패턴을 바탕으로 분류되는 집단에 대하여 품종별 형태적 특성을 일부 설명할 수 있었으나 이들의 유전적 척도가 형태적 특성으로 반영되는 일관적인 연관성을 정의할 수 없었다. 같은 hordein 밴드패턴을 보였던 품종들도 있었던 반면에 상록, 대진, 알찬, 일진, 큰알, 밀양걸, 늘쌀, 찰, 신희 및 새울 품종들은 다른 품종의 hordein 밴드패턴과 다른 독특한

밴드패턴을 보여 hordein 구성에 있어 구별성을 보였다. 식물 품종에 대한 생화학적분석 기술은 식물육종기술이 진보함에 따라 발전해왔고 유사품종의 식별문제가 중요 쟁점이 되면서 품종의 유전적 정보를 결정하려는 기술들이 빈번하게 사용되고 있다. 유전형은 분자생물학적, 생화학적 마커들을 사용하여 입증되어질 수 있는데 hordein polypeptide 패턴은 보리종자를 확인함에 있어 일상적으로 사용되어져 온 기술로서(shewry

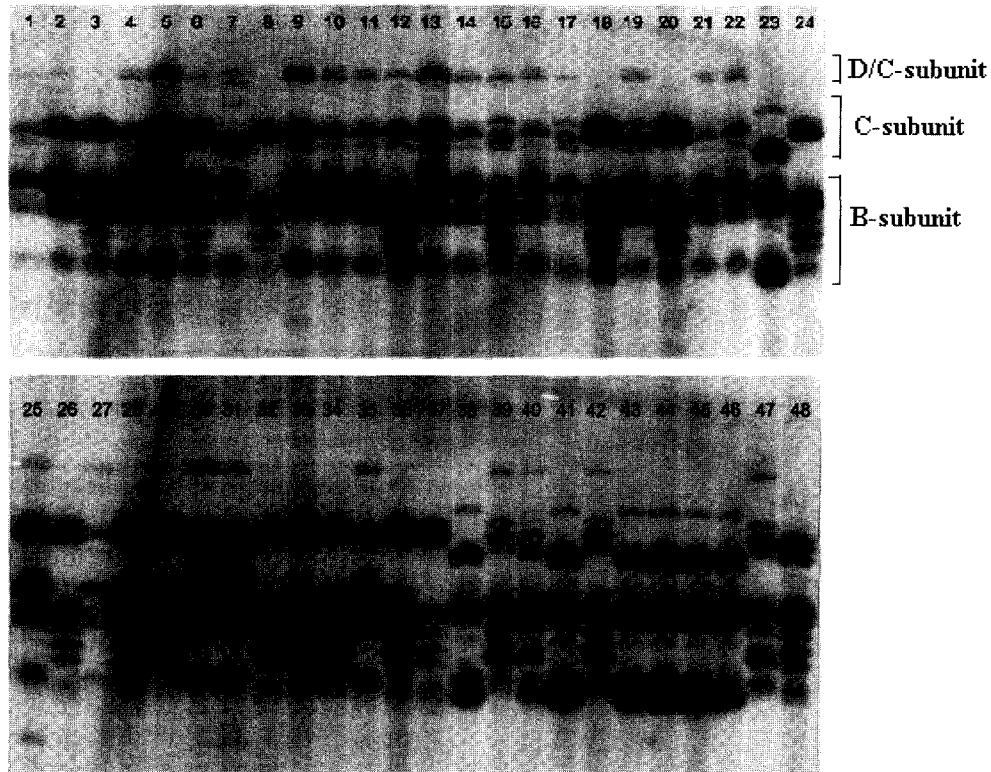


Fig. 1. Genetic variation of hordein subunits in 48 cultivars. Refer to the Table 1 for cultivar identification.

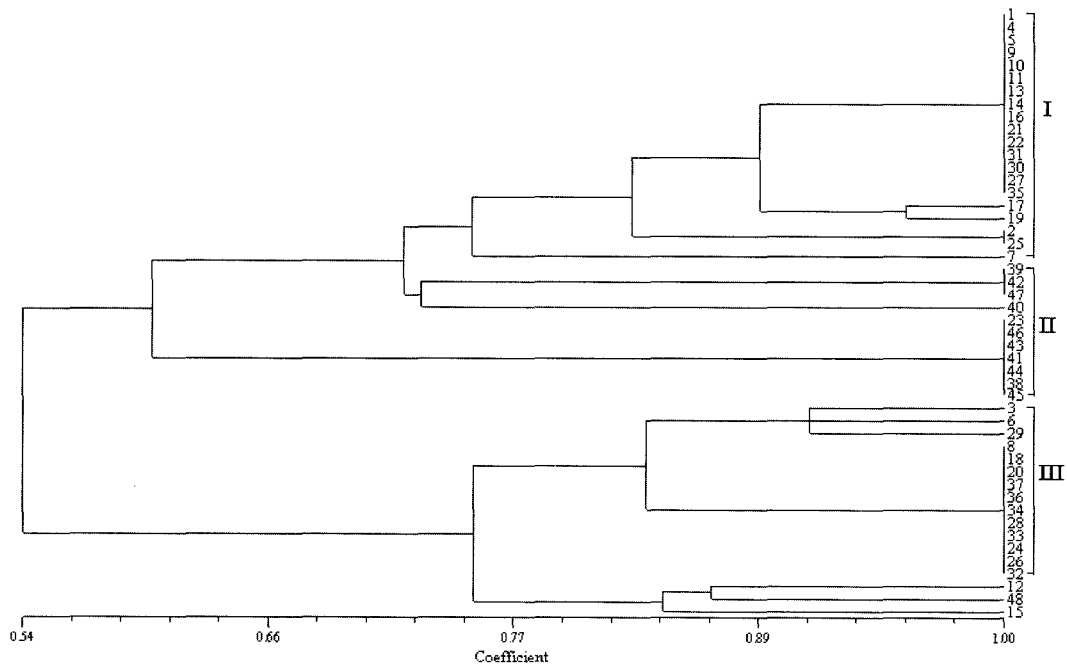


Fig. 2. Dendrogram of 48 cultivars classified by cluster analysis of hordein subunits using UPGMA method.

등. 1978) Weiss 등은(1991) 55개의 유럽형 춘과 및 추과형 보리품종들을 식별함에 있어서 SDS-PAGE를 통한 hordein 분석이 유용하다고 했다. 정(1996)등은 품종식별에 있어서 SDS-

PAGE가 보리품종에는 hordein 밴드가 다형성을 보여 유용한 반면 벼에서는 밴드형태가 단순하여 적당치 않으므로 작물에 따라 제한적이라고 보고하였다. 현재, UPOV는 hordein의 생

화학적 특성이 구별성의 지표로서 유용하지만 그것자체가 DUS에 있어서 충분한 조사형질은 되지 않는다는 입장이다(2002). 하지만, 유럽공동체(EU)에서는 자국의 주요작물에 대하여 분석기법을 개발, 체계화하여 국제적인 표준화를 시도하고 있다. Huw 등은(2002) 밀의 저장단백질의 전기영동을 통해 유도된 특성을 이용하여 포장실험 전에 출원과 유사한 대조품종을 선발하여 출원과 대조의 집구화시 유용하다고 하였으며 또한 이미 기존품종의 형태적인 특성으로 집구화된 data와 비교할 수 있는 잇점이 있다고 하였다. 장 등은(2001)은 STS-PCR과 DNA marker가 보리품종의 분류에 있어서 보리품종들이 지니는 형태적 특성의 차이를 어느 정도 반영한다고 보고하였는데 이는 본 실험의 결과와도 비슷하였다. 본 실험을 통해서 hordein polypeptide 밴드 패턴 자체가 보리품종의 형태적 특성을 나타내는 유전적거리와 반드시 비례하는 것은 아니므로 현재의 UPOV 관점과 마찬가지로 품종보호권 설정에 직접적인 근거를 제공할 순 없다고 판단되었다. 하지만 hordein polypeptide 밴드패턴 그 자체를 신품종의 구별성 특성에 대한 보완적 자료로 활용하고 앞으로 세밀한 형태적 특성조사와 더불어 hordein profiling 및 isozyme 밴드패턴 자료를 D/B화 하면 기존(참고)품종의 관리, 순도검정, 다양한 육종참고자료로서 또한 DUS 검정시 공시할 대조품종선정에 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

적 요

보리 국가목록등재 48품종의 hordein 밴드패턴의 다양성을 보고 이러한 hordein 밴드패턴을 D/B화하여 기존(참고)품종으로 관리, 활용하면서 품종구별 및 출원품종과 비교될 대조품종의 선별 가능성에 대하여 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다. 보리 48품종의 hordein SDS-PAGE 결과, 총 22개의 hordein polypeptide 밴드를 읽을 수 있었으며 다양한 15종류의 hordein 밴드패턴을 볼 수 있었다. Hordein 밴드패턴에 따라 48품종을 집괴분석한 결과, 전체 유사도지수 0.54~1.00 범위에서 3개군으로 분류되었고 주로 보리의 조성에 따라 분류되었다. Hordein polypeptide 밴드 패턴 자체가 보리품종의 형태적 특성을 나타내는 유전적거리와 반드시 비례하는 것은 아니므로 현재의 UPOV 관점과 마찬가지로 품종보호권 설정에 직접적인 근거를 제공할 순 없다고 판단되었지만 hordein polypeptide 밴드패턴 그 자체를 신품종의 구별성에 대한 보완적 자료로 이용할 수 있으리라 사료되었다.

인용문헌

- Choe, Y. W., D.Y. Park, H. K. Shin, Y. S. Kwon, H. M. Yoon, J. Y. Moon, and H. Y. Park. 2002. Studies for similarity evaluation of radish and chinese cabbage cultivars. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20(2) : 167-167.
- Cooke, R. J. 1995. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. *J. Chrom A.* 698 : 281-299.
- Huw, J., J. J. Robert, A. Lydia, W. Jon, and J. C. Robert. 2003. The management of variety reference collections in distinctness, uniformity and stability testing of wheat. *EUPHYTICA* 00 : 1-10
- Jang, D. H., S. J. Suh, S. B. Baek, J. G. Kim, and J. H. Nam. 2001. Efficiency of morphological traits and DNA markers in classification of Korean barley cultivars. *Korean J. Breed.* 33(4) : 300-305.
- Jeong, M. H., S. G. Lee, I. K. Hwang, and K. W. Jung. 1996. Discrimination of seed variety by SDS-PAGE. *Annual Report of NAQS.* pp. 24-27.
- Kang, H. J. 1990. Classification of Barley(*Hordeum vulgare* L.) by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of seed protein. Seoul Nat'l Univ. MS. Thesis.
- Mauria, S. 2000. DUS testing of crop varieties-a synthesis on the subject for new PVP-opting countries. *Plant Varieties and Seeds* 13 : 69-90.
- Pedersen, C. 1995. The relationship between physical and genetic distances at the hor1 and hor2 loci of barley estimated by two-colour fluorescent in situ hybridization. *Theor. & Appl. Genet.* 91(6-7) : 941-946.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, Inc., New York, USA.
- Shin, L. S., J. B. Kim, D. S. Kim, J. H. Nam, J. C. Kim, C. K. Kim, B. H. Hong, and Y. W. Seo. 2001. Biochemical and genetic variation of hordein subunits in Korean barley. *Korean J. Crop. Sci.* 46(2) : 100-105.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. The principles and practice of numerical classification. *Numerical taxonomy.* pp.1-15. WH Freeman and Company. San Francisco.
- Shewry, P. R., H. M. Draff, R. A. Finch, and B. S. Mifflin. 1978. Genetic analysis of protein polypeptides from single seeds of barley. *Heredity* 44 : 383-389.
- UPOV. 1994a. Guidelines for the conduct of tests for the distinctness, homogeneity and stability. UPOV Geneva, Swiss. TG76/7
- UPOV. 1994b. Guidelines for the conduct of tests for the distinctness, homogeneity and stability : Barley, Document TG/19/10. Additional useful explanations.
- UPOV. 2000. Revised Working document for a new general introduction to the assessment of distinctness, uniformity and stability in new varieties of plant. UPOV TC/36/9. pp. 53.
- Vapa, L. 1998. Genetics and molecular biology of barley hordeins. *Cereal Research Communications* 26(1) : 31-38.
- Weiss, W., W. Postel, and A. Gorg. 1991. Barley cultivar discrimination: II. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing with immobilized pH gradients.
- Yin, Y. Q., D. Q. Ma, and Y. Ding. 2003. Analysis of genetic diversity of hordein in wild close relatives of barley from Tibet. *Theor. Appl. Genet.* 107(5) : 837-842.