

SNP 마커를 이용한 벼 흰잎마름병 저항성 선발 효율 증진

신운철^{1*}, 백소현¹, 서춘순¹, 강현중¹, 김정곤¹, 신문식², 이강섭³, 한장호³, 김현순⁴

¹호남농업연구소 벼육종재배과, ²영남농업연구소 벼생태육종과, ³농업생명공학연구원 세포유전과, ⁴농촌진흥청 연구개발국

Improvement of Selection Efficiency for Bacterial Blight Resistance Using SNP Marker in Rice

Woon-Chul Shin¹, So-Hyeon Baek¹, Chun-Sun Seo¹, Hyeon-Jung Kang¹, Chung-Kon Kim¹, Mun-Sik Shin², Gang-Seob Lee³, Jang-Ho Hahn² and Hyun-Soon Kim³

¹Rice Breeding & Cultivation Division, Honam Agricultural Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA, Iksan 570-080, Korea

²Rice Ecology & Breeding Division, Yeongnam Agricultural Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA, Milyang 627-803, Korea

³Cell & Genetics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

⁴Research & Development Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Discovery of single nucleotide polymorphisms (SNPs), including small insertions and deletions, is one of the hot topics in genetic research. The most common type of sequence variant consists of single base differences or small insertions and deletions at specific nucleotide positions. Significance of SNPs in rice is increasing for genetic research, positional cloning and molecular breeding. F₂ 170 lines and F₃ 194 lines derived from Sangjuchalbyeo/HR13721-53-3-1-3-3-2-2 were used for searching SNP markers related to bacterial blight resistance. Sangjuchalbyeo is susceptible to bacterial blight, but HR13721-53-3-1-3-3-2-2 has *Xa1* gene resistant to bacterial blight. Individual lines were inoculated with K₁ race of bacterial blight and resistant or susceptible was evaluated after 3 weeks from inoculation. The genotypes of population were analysed by PCR-RFLP for SNP marker developing. The segregation of F₂ and F₃ population showed almost 3:1, 1:1 ratio, respectively. Analysis of genotype using SNP marker is capable of confirming resistance for K₁ race and genotype through amplifying the gene using 16PFxa1 primer and digested the PCR product with *Eco* RV. There were close relation between resistance test for K₁ race and SNP marker genotype. Especially, DNA analysis using SNP marker is capable of judging homozygote/heterozygote in F₂ population compared with resistant test for K₁ race. So, it seems to improve the selection efficiency in disease resistant breeding.

서 론

특정 DNA의 인지부위를 절단하는 제한효소에 의해 유발되는 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)가 유전자형의 fingerprinting, 육종에서의 선발, 분자유전자 지도

의 작성 등 다방면에 활용되면서부터 DNA-based marker는 급속도로 발전하였다 (Kochert 1994). 그 중에서도 생물체의 유전체 구조가 구명됨에 따라서 염기의 개체변이에 대한 연구가 집중적으로 이루어져 왔는데 특히 단일 염기 변이 (single nucleotide polymorphism, SNP)가 대표적인 변이로 이를 point mutation이라고도 한다. SNP는 single base change에 의한 RFLP 뿐만 아니라, 제한효소에 의하여 감지될 수 없는 point mutation을 포함하기 때문에 생물체의 계통에서 SNP의

*Corresponding author Tel 063-840-2106 Fax 063-840-2112
E-mail: kimck@rda.go.kr

출현율은 매우 방대하다. 최근 분자생물학 기술의 발달로 oligonucleotide microarray hybridization 기법을 이용하여 동시에 대량으로 수많은 SNP 탐색이 가능하여 기존에 개발된 gel based 시스템 마커인 RFLP, RAPD, SSR, AFLP 보다도 효율적으로 유전자 지도를 제작할 수 있게 되었으며, 식물 육종을 위한 QTL 탐색, 유전적 다양성 측정, 유용 유전자 보유 계통의 탐색에 적절하게 이용될 수 있다.

인간의 경우 인체 DNA에서 1 kb 당 1.39 SNP가 발견되었으며, 이러한 SNP의 개발로 인간의 질병에 대한 유전적 진단을 가능하게 하고, 예방조치를 취함으로써 질병을 줄일 수 있게 되었다 (Wang *et al.* 1998). 식물 분야에서 SNP marker의 개발은 아직은 기초 단계에 불과하지만, 애기장대 (Drenkard *et al.* 2000), 보리 (Kanazin *et al.* 2002), 옥수수 (Tenailon *et al.* 2002) 등에서 SNP mapping이 이루어지고 있으며, 그중에서도 콩의 SNP mapping에 대한 연구가 활발히 진행되어 인체 DNA보다 더 높은 1 kb당 3.4 SNP가 발견되어 식물 육종을 위한 마커로서 가능성을 보이고 있다 (Cregan *et al.* 1999).

벼 흰잎마름병은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)에 의해 유발되며, 전세계적으로 벼를 재배하는 대부분의 지역에서 발생하여 많은 피해를 주는 병종의 하나이다. 우리나라에서는 태풍과 침수로 특히 남부평야지를 중심으로 매년 발생하여 수량 감소는 물론 미질을 저하시킨다. 우리나라에 있어서 흰잎마름병균은 1977년과 1978년에는 K1, K2, K3, K5의 4개 레이스가 분포하였고, 1979년부터 1983년까지는 K1, K2, K3, K4 및 K5 등 5개 레이스가 분포하였다 (Yun *et al.* 1984). 그러나 1990년대 초부터 품질 고급화에 따라 통일형 품종의 재배가 줄어들고 자포니카형 품종으로 대체되면서 K4, K5 레이스는 기주와 더불어 사라진 것으로 추정되었으나, 최근 기존의 K3보다는 병원성이 강하지만 K4보다는 병원성이 약하면서 K1, K2, K3 레이스 모두에 저항성이었던 화영벼 등을 침해하는 새로운 K3a 레이스의 출현이 보고되었다 (Noh *et al.* 2003; Shin *et al.* 2005). 본 연구는 벼 흰잎마름병 저항성 유전자인 *Xal* 유전자를 가진 분리집단을 육성하고 분리집단에 대한 개체별 저항성 검정 및 유전정보를 획득한 후 흰잎마름병 저항성 관련 SNP 마커를 탐색하고 육종현장에서 흰잎마름병 저항성 계통을 과학적이고 보다 편리하게 대량검정 할 수 있는 체계를 확립하는데 그 목적을 두고 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 분리집단은 MAS (Marker assisted selec-

tion)를 이용한 흰잎마름병 저항성 품종의 분자유종 실용화를 위하여 2001년에 K1 레이스에 감수성 품종인 상주찰벼와 *Xal* 유전자를 가지고 있는 HR13721-53-3-1-3-3-2-2를 인공교배하여 육성되었다. HR13721은 Asominori에서 유래된 *Xal* 유전자를 가진 대청벼를 K1 레이스에 감수성인 이리390호에 6회 여교잡하여 육성되었다. 본 연구에서는 F₂ 170개체, F₃ 194계통을 흰잎마름병 K1 레이스 저항성 검정 및 SNP 마커를 이용한 유전분석에 사용하였다.

흰잎마름병 접종

접종에 사용된 K1 레이스는 호남농업연구소 식물환경과에서 분양받은 HB01013이었으며 PSA 배지에서 28°C에서 3일간 배양한 후, 최고분얼기에 엽선단 5 cm 부위에 절엽접종하였다. 접종 3주 후에 병반장의 진전 정도에 따라 저항성과 이병성을 판단하였다.

DNA 마커 탐색 및 연관 분석

SNP 마커를 이용한 PCR-RFLP를 수행하기 위한 SNP 마커 탐색과 염기서열 분석은 농업생명공학연구원에서 수행하였다. 북경 유전체 연구소 (BGI)와 국제 쌀 게놈 프로젝트 (IRGSP)에 의해 indica (93-11)와 japonica (Nipponbare)의 염기서열이 발표됨에 따라 이 두 염기서열을 비교 분석하여 총 15,303,476개의 mismatch site가 탐색되었으며, DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)와 SBE (Single Base Extension) 방법을 이용하여 벼 12개 염색체를 대상으로 평균 50 kb 간격을 갖는 95,887 primer를 설계하였으며, 이 중 평균 1 Mb 간격을 갖는 363 SNP 마커를 탐색하고 염기서열을 분석하였다. 식물체의 genomic DNA는 CTAB 방법 (Rogers and Bendich 1988)을 이용하여 추출하였다. 벼 잎 2 g을 액체질소에 급속 냉동시켜 유발로 최대한 마쇄한 후 15 ml falcon tube로 옮긴 후 65°C로 데워진 2×CTAB 2 ml을 첨가하고 30분간 배양하였다. 2 ml의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 첨가하고 혼합액이 맑게 될 때까지 교반하여 섞어준 후 11,000×g로 30초간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 넣어 잘 섞은 다음 원심분리하여 상층액을 버리고, 70% 에탄올로 2번 씻어주었다. DNA를 건조한 후 0.1×TE buffer에 DNA를 녹였다. 벼 흰잎마름병 K1 레이스에 대한 저항성과 SNP 마커를 이용한 PCR-RFLP 분석 결과와의 연관성을 탐색하기 위한 16PF_{Xa}I 프라이머(5'-ACG GTT CTG AAG GTC GTC AT-3', 5'-TGC AAG AGC TCC GGT TTA AG-3')는 농업생명공학연구원에서 분양 받아 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고,

증폭반응 (94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분)을 35회 진행하였으며, 최종 신장반응은 72℃에서 7분간 수행하였다. PCR 산물은 *Eco* RV 제한효소로 2시간 처리한 후 전기영동하여 다형성을 조사하였으며 포장에서의 K₁ 레이스 검정 결과와 비교하였다.

결과 및 고찰

흰잎마름병 저항성 분리집단 육성

벼 흰잎마름병균 K₁ 레이스에 감수성인 상주찰벼와 *Xal* 유전자를 가지고 있으며 K₁ 레이스에 저항성을 보이는 HR13721-53-3-1-3-3-2-2를 인공교배하여 F₁ 10개체, F₂ 293개체, F₃ 198계통을 육성하였으며, 이 중 F₂ 170개체, F₃ 194계통을 K₁ 레이스 저항성 및 SNP marker를 이용한 유전 분석에 이용하였다.

흰잎마름병 K₁ 레이스 접종

상주찰벼/HR13721-53-3-1-3-3-2-2 교배조합의 F₂, F₃ 분리집단을 K₁ 레이스인 HB01013에 대한 저항성 검정결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. *Xal* 유전자가 단순우성으로 유전하기 때문에 F₂ 집단에서 3:1, F₃ 집단에서 1:1의 분리비를 보여 이론적인 분리비에 적합하였다. Yang 등 (1998)은 밀양74호/Dasukei 2 조합의 약배양 집단에서 1:1, F₂ 집단에서는 3:1로

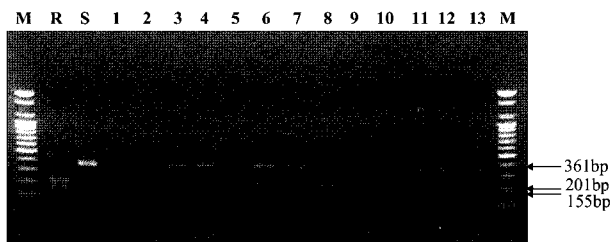


Figure 1. Photo on the PCR analysis in F₂ progenies of Sangjuchalbyeo / HR13721-53-3-1-3-3-2-2. M, 100bp ladder; R, HR13721; S, Sangjuchalbyeo lane 1 to 13, F₂ progeny of Sangjuchalbyeo/HR13721-53-3-1-3-3-2-2. Lane R to 13, PCR products digested with *Eco* RV.

분리하여 흰잎마름병 K₁ 레이스에 대한 저항성 관련 유전자가 단순우성인자에 의하여 지배된다고 하였으며, Kang 등 (2003)은 밀양121호/HR11650-1-4-2 조합 등 2조합의 약배양에서 유래된 258계통을 이용하여 K₁ 레이스에 대한 분리비를 조사한 결과 저항성과 감수성이 3:1로 조사되어 본 연구 결과와 같이 단순우성으로 유전한다고 하였다.

DNA 마커 탐색 및 연관 분석

SNP 마커를 이용한 PCR-RFLP를 수행하기 위한 SNP 마커 탐색과 염기서열 분석은 농업생명공학연구원에서 수행하였다. 이미 발표된 indica와 japonica의 염기서열 분석 DB를 토대로 대칭벼, 탐진벼 등 6개의 흰잎마름병 저항성인 품종과 신선찰벼, 동진벼, 만금벼 등 10개의 흰잎마름병 감수성 품종을 대상으로 4번 염색체에 존재하는 *Xal* 유전자 주변의 염기서열을 분석한 결과 10PFXa, 16PFXa, 17PFXa 등 3개의 SNP 마커를 발견하였으며, 이 중 16PFXa1은 *Eco* RV 제한효소 자리를 포함하고 있어 PCR-RFLP 분석에 적합한 마커로 판단되었다. F₂ 개체의 genomic DNA를 추출하여 PCR 반응 후 PCR 산물 1 μl를 전기영동한 결과 361 bp size의 band가 증폭됨을 확인할 수 있었다 (Figure 1). PCR 산물을 2시간 동안 *Eco* RV 제한효소를 처리하여 전기영동한 결과 저항성인 개체는 lane 1, 5, 8, 10에서 보는 바와 같이 제한효소에 의해 201 bp와 155 bp의 두 band로 분리되는 것을 확인할 수 있었으며, 감수성인 개체는 lane 2, 3, 12, 13에서 보는 바와 같이 *Eco* RV 제한효소 처리에 의한 절단되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 lane 4, 6, 7, 9, 11에서와 같이 *Eco* RV 제한효소 처리에 PCR 산물의 일부분만이 반응하여 3개의 band가 나타나는 경우가 있어 24시간 제한효소 처리한 결과 동일한 결과를 얻었다. 따라서 이러한 결과로 3개의 band가 나타나는 개체는 실험 오류가 아닌 유전자형이 이형접합체임을 확인할 수 있었다.

이러한 K₁ 레이스에 대한 저항성 검정과 SNP 마커를 이용한 PCR-RFLP 분석 결과는 Table 2와 같다. 분리집단의 F₂, F₃ 세대에서 K₁ 레이스에 대한 저항성 검정과 PCR-RFLP 분석 결과 모두 각각 3:1, 1:1의 분리비를 나타냈으며, 이는 이론상 분리비에 적합하였다. 특히 PCR-RFLP 분석을 통하여 K₁ 레

Table 1. Resistance test to bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K₁ race in F₂ and F₃ populations derived from the cross combination of Sangjuchalbyeo/ HR13721-53-3-1-3-3-2-2.

Cross combination	F ₂				F ₃			
	Total	R	S	χ^2 (3:1)	Total	Homo	Hetero	χ^2 (1:1)
Sangjuchalbyeo/ HR13721-53-3-1-3-3-2-2	170	129	41	0.07	194	106	88	1.81

* R : resistant, S : susceptible

Table 2. Comparison of resistance test and PCR-RFLP analysis in F₂ and F₃ populations derived from the cross combination of Sangjuchalbyeo/HR13721-53-3-1-3-3-2-2.

Cross combination	Test	F ₂					F ₃			
		Total	RR	Rr	rr	χ^2 (3:1)	Total	Homo	Hetero	χ^2 (1:1)
Sangjuchalbyeo/ HR13721-53-3-1-3-3-2-2	PCR RFLP	170	40	87	43	0.008	194	97	97	0
	K ₁ race	170	129		41	0.07	194	106	88	1.81

이스에 대한 저항성 검정에서는 알 수 없었던 저항성 유전자의 유전자형을 알 수 있다는 장점이 있었다. 이는 Figure 2에서 보는 바와 같이 F₃ 세대에 대한 K₁ 레이스 검정 결과 감수성 개체가 없을 경우 이형접합체임에도 불구하고 이를 동형접합체로 잘못 판단할 가능성이 있다. 이러한 이유로 PCR-RFLP 분석과 K₁ 레이스에 대한 저항성 검정 결과간에 동형접합체와 이형접합체의 차이가 발생한 것으로 생각되며, 이러한 SNP 마커를 이용하여 저항성 품종 육성을 위한 선발 효율을 높일 수 있을 것이다.

흰잎마름병균에 대한 저항성 유전자는 전세계적으로 30여 개가 밝혀져 있지만 (Lee *et al.* 2003), 우리나라에서 벼품종의 저항성 유전자 동정은 극히 제한적으로 이루어졌다 (Park *et al.* 1998, Shin *et al.* 1995; 2003). 이러한 유전자중에서 *Xal* 유전자는 K₁ 레이스에, *Xa3* 유전자는 K₁, K₂, K₃ 레이스에 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (Lin *et al.* 1996), 이 유전자들은 단순 우성 유전을 한다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다. 최근에는 K₁, K₂, K₃ 및 K_{3a} 레이스에 모두 저항성을 보이는 *Xa7* 유전자를 가진 익산478호가 개발되어 앞으로 저항성 유전자 다양화에 크게 기여 할 것으로 생각된다. 한편 최근 벼 흰잎마름병 저항성 유전자와 연관된 DNA 표지 인자들이 밝혀졌는데, Yoshimura 등 (1998)은 *Xal* 유전자는 4번 염색체에 위치하고 있으며 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있으며 5.9 kb 크기로 보고하였고, Kang 등 (2003)은 *Xa3* 유전자는 RFLP 마커인 RZ536, RG303과 11번 염색체

상에 각각 7.6 cM, 16.0 cM으로 연관된 것으로, *Xal*은 RZ590과 4번 염색체상에서 약 3.1 cM 거리로 연관된 것으로 보고하였는데, SNP 마커를 이용한 본 연구 결과는 보다 간편하고 저항성과 연관성이 높아서 흰잎마름병 저항성 품종 육종을 위한 시간 및 노력을 절감할 수 있고 흰잎마름병 저항성 육종 효율을 개선하는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 흰잎마름병 K₁ 레이스에 감수성인 상주찰벼와 저항성인 HR13721-53-3-1-3-3-2-2를 인공교배하여 육성된 F₂, F₃를 재료로 하여 K₁ 레이스에 대한 저항성 검정과 SNP 마커를 이용한 유전자형 분석 및 저항성과의 연관성을 분석하였다. K₁ 레이스에 대한 저항성 검정 결과 F₂, F₃에서 각각 이론적 분리비인 3:1, 1:1의 분리비를 나타냈으며 SNP 마커를 이용한 유전자형 분석은 16PFXa1 primer를 이용하여 유전자를 증폭한 후 *Eco* RV 제한효소 처리하여 다형성을 분석하여 저항성 및 유전자형을 확인할 수 있었다. K₁ 레이스에 대한 저항성 검정과 SNP 마커를 이용한 유전자형의 연관 분석 결과 저항성과 마커간에 연관성이 일치하였으며, 특히 SNP 마커를 이용한 유전자형 분석에서는 K₁ 레이스에 대한 저항성 검정에서 알 수 없었던 F₂ 개체가 동형접합체인지 이형접합체인지를 판별할 수 있어 저항성 품종 육종을 위한 선발 효율을 높일 수 있었다.

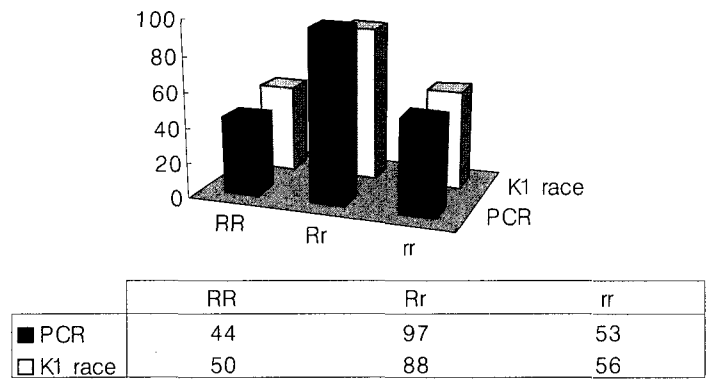


Figure 2. Comparison of PCR-RFLP analysis and reaction to bacterial blight K₁ race in F₃ progeny of Sangjuchalbyeo/HR13721-53-3-1-3-3-2-2.

사 사

본 연구는 정보통신부 IMT-2000 (선도기반기술개발사업) 사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci* 39: 1464-1490
- Drenkard SL, Richter BG, Rozen S, Ausubel FM (2000) A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 1483-1492
- Kanazin V, Talbert H, See D, Blake T (2002) Discovery and assay of single nucleotide polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol Bio* 48: 529-537
- Kang HJ, Kim HS, Nam JK, Lee YT, Lee SY, Kim SD (2003) Mapping of RFLP markers linked to bacterial blight resistant genes (*Xa-1*, *Xa-3*) in rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J Crop Sci* 48(6): 419-423
- Kochert G (1994) RFLP technology. in "DNA-Based Markers in Plants", R. L. Phillips & I. K. Vasil (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 8-38
- Lee KS, Rasabandith S, Angeles ER, Khush GS (2003) Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. *Phytopathology* 93: 147-152
- Lin XH, Zhang DP, Xie YF, Gao HP, Zhang Q (1996) Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. *Phytopathology* 86: 1156-1159
- Noh TH, Lee DK, Kang MH, Shin MS, Shim HK, Na SY (2003) Identification of new race of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) in Korea. *Phytopathology* 93: s66
- Park NB, Lim SJ, Kim HY, Hwang HG, Jun BT, Ko MS (1998) Genetic analysis of resistance to bacterial blight in Korea Japonica rices. *Korean J Breed* 30(4): 369-377
- Rogers SO, Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissue. In: Gelven SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds), *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-10
- Shin MS, Shin HT, Lee SY (1995) A new dominant gene closely linked with *Xa-1* for resistance to bacterial blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, in rice. *Korean J Breed* 27(4): 367-371
- Shin MS, Oh MK, Kim KY, Kim BK, Ko JK, Kim YG, Lee JK, Cho YC (2003) Inheritance of resistance to bacterial blight in Korean landrace and weedy rice. *Korean J Breed* 35(2): 92-95
- Shin MS, Noh TH, Kim KY, Shin SH, Ko JK, Lee JK (2005) Reaction of Korean rice varieties to new bacterial blight race, K3a. *Korean J Crop Sci* 50(3): 151-155
- Tenailon MI, Sawkins MC, Anderson LK, Stack SM, Doebley J, Gaut BS (2002) Patterns of diversity and recombination along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Genetics* 162: 1401-1413
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphism in the human genome. *Science* 208: 1077-1082
- Yang SJ, Oh BG, Chung GS, Sohn JK (1998) Variability of anther-derived plants in rice (*Oryza sativa* L.) III. Variability of qualitative characters in anther-derived plants. *Korean J Breed* 20: 18-21
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T (1998) Expression of *Xa 1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *PNAS* 95: 1663-1668
- Yun MS, Cho YS, Han MS, Lee EJ, Cho YS (1984) Distribution of pathogenic groups of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, bacterial leaf blight of rice, in Korea. *Korean J. Plant Prot* 23(3): 147-152

(접수일자 2006년 9월 8일, 수리일자 2006년 10월 30일)