SSR 분자마커를 이용한 튀김옥수수 자식계통 집단의 구조 및 association 분석

장진선¹ · 장은하¹ · 사규진² · 김병완² · 김종화^{3,4} · 이주경^{2*}

¹강원도 농업기술원, ²강원대학교 농업생명과학대학 식물자원응용공학과,

³강원대학교 농업생명과학대학 원예학과, ⁴강원대학교 한방바이오연구소

Analysis of Population Structure and Association Mapping among Popcorn Inbred Lines using SSR markers

Jin-Sun Jang¹, Eun-Ha Chang¹, Kyu Jin Sa², Byeong Wan Kim², Jong-Hwa Kim³, and Ju Kyong Lee^{2*}

¹Gangwon Agricultural Research and Extension Services, Korea

²Department of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Korea

³Department of Horticulture, College of Agriculture and life Sciences, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Korea

⁴Bioherb Research Institute, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea

Abstract : In this study, genetic diversity and population structure among 79 popcorn inbred lines were investigated using 10 morphological traits and 50 simple sequence repeat (SSR) markers. From population structure analysis, the 79 maize inbred lines were divided into five groups: I, II, III, IV, and admixed. Among them, 4 inbred lines were assigned to group I, 17 inbred lines were assigned to group II, and 6 and 22 inbred lines were respectively assigned to groups III and IV. The rest 30 inbred lines were contained in the admixed group. Association mapping analysis for popcorn inbred lines was performed to assess the marker-trait associations between the 50 SSR markers and the 10 morphological traits. At a significance level of 0.01, we found 92 marker-trait associations using the Q GLM model. While, using the Q+K MLM model, we found 6 marker-trait associations at a significance level of 0.01. Finally, this study's assessment of population structure and association mapping of 79 popcorn inbred lines will be helpful useful for popcorn breeding programs such activities as planning crosses for hybrid and line development at Maize Experiment Station, Gangwon Agricultural Research and Extension Services.

Keywords : Maize, Popcorn inbred line, Population structure, Association mapping, Maize breeding program

서 언

옥수수(*Zea mays* L.)는 세계 3대 식량 작물 중 하나로 전 세계에서 식용, 간식용, 사료용, 공업용 등 다양한 용도로 이용되고 있다. 최근에 우리나라에서 국민의 식생활이 다변화되고, 여가시간의 증가로 놀이동산과 영화관의 이용이 증가하면서 튀김옥수수의 수요가 점차 증가하고 있다. 하지만 간식용

으로 많이 이용되는 튀김옥수수의 경우에 대부분은 외국에서 수입되고 있고, 수입되는 대부분의 튀김옥수수는 유전자변형인 GMO (Genetically Modified Organism) 옥수수로 알려져 있으므로, 국내에서 수입산 GMO 옥수수를 대체할 수 있는 새로운 품종 개발이 절실한 상황이다.

작물 육종연구에서 주요 농업형질에 영향을 주는 genetic basis를 확인하는 것이 작물 개량에 매우 중요하다(Pasam et al. 2012). 그러나 대부분의 주요 농업형질의 genetic basis는 매우 복잡하며, 다수의 유전자에 의해 결정되고, 환경의 영향에도 민감하다(Li et al. 2011). 따라서 예전부터 중요한 농업

*Corresponding author (E-mail: jukyonglee@kangwon.ac.kr, Tel: +82-33-250-6415, Fax: +82-33-244-6410)

(Received on September 9, 2013. Revised on December 17, 2013.
Accepted on December 20, 2013.)

형질에 영향을 미치는 genomic regions를 확인하기 위하여 특성이 상반되는 두 계통을 교잡하여 얻은 분리 집단 내의 연관관(linkage)을 이용한 QTL mapping 분석을 주로 이용하였다(Skot et al. 2005). 하지만 최근에는 주요 농업형질과 마커 간 linkage disequilibrium (LD)에 따른 Association mapping 분석을 많이 이용하고 있다(Flint-Garcia et al. 2005, Yu and Buckler 2006). QTL mapping과 비교하였을 때, Association mapping 분석의 경우, 몇 가지 이점을 가지고 있다. 첫째, mapping 집단을 육성하지 않기 때문에 연구에 드는 비용과 시간, 노력을 줄일 수 있으며, 둘째, 보다 많은 allele에 대한 분석이 가능하며, 셋째, mapping resolution을 높일 수 있다는 것이다(Flint-Garcia et al. 2005, Zhu et al. 2008). 따라서 많은 작물연구에서 QTL mapping의 한계를 극복할 수 있는 association mapping이 널리 이용되고 있다(Bobra et al. 2010, Lorenz et al. 2010, Mezouk et al. 2011, Kwon et al. 2012). 하지만 association mapping의 문제점 중의 하나는 false positive associations (Type I error)가 발생한다는 것이다(Zhu et al. 2008, Myles et al. 2009). 따라서 population structure (Q), kinship (K) 값을 이용하여 false positive associations을 최소화하는 것이 association mapping 분석에 필수적인 요소이다(Yu and Buckler 2006).

한편 작물 육종연구에서 육종재료로 이용될 유전자원을 수집 및 보존하는 것이 매우 중요하다. 특히 타식성 작물인 옥수수 품종의 경우, 단교잡종이 주류를 이루고 있으므로, 다양한 지역에서 수집되어 고정된 육종재료들에서 우수한 자식계통을 선정하기 위해서 수집된 재료들의 유전적 다양성(genetic diversity), 계통유연관계(genetic relationship) 및 집단구조(population structure)를 명확히 평가하는 것이 신품종 개량을 위한 자식계통 육성 및 발굴 그리고 교배조합 예측 등에 효율적으로 이용될 수 있고, 또한 이형집단에서 자식계통의 선발과 품종 보호 등에도 유용한 정보를 제공할 수 있다(Hallauer et al. 1988, Pejic et al. 1998). 더욱이 집단구조, familial relatedness (kinship)의 정보는 성공적인 association mapping 연구에서 매우 중요한 요소이다. 특히 본 연구에서 분석에 이용한 SSRs (simple sequence repeats) 분석법은 다양한 대립단형, 재현성, 비용 대비 효율성 등 이점으로 식물집단의 개체들 내에서 대립유전자의 특성을 명확하게 나타낼 수가 있으므로 옥수수와 같은 타식성 작물들에서 유전적 다양성, 계통유연관계 및 집단구조를 분석하는데 이용한 분석법이다(Smith et al. 1997). 따라서 현재 많은 연구에서 SSR 마

커를 이용한 유전적 다양성과 집단구조 및 familial relatedness (kinship) 분석에 이용되고 있다(Yang et al. 2010).

본 연구는 강원도 농업기술원 옥수수 연구소에서 고품질의 튀김옥수수 품종을 개발하기 위해서 육성한 79개 튀김옥수수 자식계통 핵심집단에 대하여 SSR 분자마커를 이용하여 집단 구조 분석을 수행하고, 옥수수 육종연구에서 중요한 형질인 10개의 양적 형질을 이용하여 association mapping 분석을 실시하여 이들 자식계통들에서 특정 형질에 연관된 SSR 마커를 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 DNA 추출

본 연구에 이용된 튀김옥수수 자식계통들은 강원도 농업기술원 옥수수연구소에서 고품질의 튀김옥수수 신품종 육성을 위하여 국내 및 국외 지역에서 수집한 옥수수 재래종 및 품종들을 2004년부터 2009년까지 6년 이상을 육성하였다. 그 중에서 핵심집단으로 육성한 79개 자식계통들에 대하여 형태적 특성 및 SSR 분석을 수행하였다(Table 1). 옥수수 genomic DNA는 유묘기의 어린 잎에서 Dellaporta et al. (1983)의 방법을 약간 변형하여 추출하였다.

형태적 변이 조사

튀김옥수수 자식계통들에 대한 형태적 변이를 측정하기 위해서 강원도 농업기술원 옥수수연구소의 시험포장에서 2010년에 각 계통 별로 일반 관행 재배법으로 재배하였다. 형태적 특성 조사는 각 계통 별로 10개체씩 생육시기별로 형태조사를 실시하였으며, 조사한 형질들은 간장(PH), 착수고(EH), 이삭장(EL), 착립장(KSL), 이삭경(ET), 이삭열수(ER), 이삭중(EW), 종실중(KW), 백립중(100KW), 발아율(GR) 등 10개의 양적 형질에 대하여 각 계통들의 생육시기별로 조사하였다.

SSR 분석 및 PCR 증폭

튀김옥수수 자식계통들의 핵심집단에 대한 유전적 다양성 및 집단구조 분석을 위해서 선발된 SSR primer들은 MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>) 정보를 기초하여, 옥수수 전체 게놈을 포함할 수 있도록 각 염색체 당 5개씩, 총 50개의 SSR primer를 선발하였다(Table 2).

PCR 증폭에서 용액 조성은 총 30 mL로 20 ng의 genomic DNA, 1x PCR buffer, 0.3 mM의 forward와 reverse primers,

0.2 mM dNTPs, 1 unit의 Taq Polymerase (Biotools, B&M Labs, Madrid)로 구성하였다. PCR 반응은 처음 94°C에서 5분간 최초 denaturation을 한 후, 다음 94°C에서 1분간 denaturation, 65°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 하였으며, 2번째 cycle부터 annealing 온도를 1°C씩 낮추어 최종 55°C까지 20 cycle을 반복한 후, final extension을 72°C에서 10분간 실시하였다.

전기영동 및 silver-staining

PCR 증폭이 끝난 product 5μl를 10 μl의 loading-buffer (98% formamide, 0.02% BPH, 0.02% Xylene C, 5 mM NaOH)와 혼합하였다. 그 후 denaturation 처리를 한 후 얼음에 냉각하여, 6% denaturing (7.5 M urea) acrylamide-bisacrylamide gel (19:1)에 1x TBE buffer를 처리 후 2 μl의 sample을 로딩하고, 1,800 V, 60W에서 2시간 동안 전기영동을 실시하였

Table 1. Derivation of 79 popcorn inbred lines used in this study.

Code No.	Pedigree Na.	Source	Code No.	Pedigree Na.	Source
1	HP1	Unknown	41	DS9-006	02Pink-1-1-T1-1-T1-2-2-1
2	HP2	Unknown	42	DS9-009	De0216-1-2-1-1-1-T1-1-1-1
3	HP3	Unknown	43	DS9-016	02Black-1-1-1-T1-2-T1-1-2-1
4	HP4	Unknown	44	DS10-005	De0020-3-1-2-1-1-T1-1-1-1-1
5	HP5	Unknown	45	DS10-007	De0205-1-T6-3-1-1-T1-1-1-1-1
6	HP6	Unknown	46	DS10-015	De0219-1-T1-1-1-1-T1-1-1-2-1
7	HP7	Unknown	47	PS0-001	804294
8	HP8	Unknown	48	PS0-002	American cultivar
9	HP9	Unknown	49	PS0-003	Jecheon landrace
10	DS0-001	147565	50	PS1-001	09PS0001-1
11	DS0-002	147995	51	PS1-002	09PS0002-1
12	DS0-004	Jeongseon landrace 2	52	PS1-003	09PS0003-2
13	DS0-005	Chuncheon landrace 1	53	PS2-001	08PS0001-1-1
14	DS0-006	Chuncheon landrace 2	54	PS2-003	08PS0002-1-1
15	DS0-016	K127054	55	PS2-007	08PS0003-1-1
16	DS0-017	K147055	56	PS2-009	08PS0004-1-1
17	DS0-020	K021731	57	PS7-001	0310-1-1-1-1-1-1-1-1
18	DS0-021	K021732	58	08DS10003-1	Unknown
19	DS0-022	K021737	59	08DS10006-1	Unknown
20	DS0-023	K021739	60	07DS10002	Unknown
21	DS0-024	K021741	61	07DS10005	Unknown
22	DS0-025	K100223	62	07DS10006	Unknown
23	DS0-026	K037275	63	KP1	Unknown
24	DS1-001	09DS0001-1(K100223)	64	KP2	Unknown
25	DS1-002	09DS0003-1(K127047)	65	KP5	Unknown
26	DS1-003	09DS0004-1(K127048)	66	KP6	Unknown
27	DS1-004	09DS0011-1(K037275)	67	KP7	Unknown
28	DS2-001	08DS0001-2-1(807251)	68	KP11	Unknown
29	DS2-003	08DS0002-1-1(900068)	69	KP16	Unknown
30	DS2-006	08DS0008-1-1(K001453)	70	KP19	Unknown
31	DS2-009	08DS0009-1-1(K001534)	71	KP20	Unknown
32	DS2-011	08DS0012-1-1(K002675)	72	KP21	Unknown
33	DS2-013	08DS0016-2-1(K021733)	73	KP22	Unknown
34	DS2-014	08DS0018-1-1(K021735)	74	10PS11001	Unknown
35	DS2-022	08DS0019-1-1(K021736)	75	10PS11003	Unknown
36	DS2-026	08DS0022-1-1(K021740)	76	10PS11004	Unknown
37	DS2-028	08DS0023-1-1(K044730)	77	07PS10003	Unknown
38	DS2-032	08DS0026-1-1	78	08PS10006	Unknown
39	DS3-001	07DS0001-2-1-1	79	08PS10012	Unknown
40	DS9-002	De0208-1-1-1-T1-1-3-1-3-1			

Table 2. Characteristics of the 50 SSR loci including allele size, allele number, MAF, GD, and PIC among 79 popcorn inbred lines.

SSR Loci	Chr.	Allele size	No. of Allele	MAF ^z	GD ^y	PIC ^x
umc2149	1	145 – 160	7	0.494	0.631	0.568
umc2228	1	125 – 165	6	0.62	0.567	0.528
umc1709	1	120 – 145	5	0.747	0.419	0.393
umc1281	1	110 – 120	7	0.557	0.629	0.589
umc1553	1	150 – 175	9	0.291	0.807	0.782
umc2252	2	95 – 130	7	0.367	0.719	0.669
umc2380	2	115 – 130	7	0.329	0.755	0.716
umc1256	2	165 – 185	6	0.405	0.697	0.644
umc1454	2	105 – 120	6	0.848	0.274	0.265
umc2202	2	125 – 135	5	0.608	0.54	0.472
umc1844	3	120 – 140	9	0.43	0.722	0.683
umc1158	3	135 – 145	5	0.443	0.697	0.649
umc1886	3	135 – 155	14	0.595	0.627	0.614
umc1286	3	125 – 130	3	0.722	0.409	0.335
umc1136	3	135 – 155	11	0.468	0.733	0.71
umc2280	4	105 – 120	8	0.443	0.705	0.662
umc1303	4	115 – 125	3	0.696	0.437	0.361
umc1707	4	135 – 145	6	0.519	0.635	0.581
umc1101	4	130 – 155	13	0.228	0.849	0.832
umc2041	4	135 – 165	10	0.329	0.785	0.754
umc1447	5	115 – 125	5	0.367	0.711	0.658
umc2036	5	135 – 155	4	0.646	0.482	0.398
umc1153	5	105 – 120	15	0.43	0.75	0.724
bnlg1237	5	150 – 190	11	0.329	0.786	0.759
umc2161	5	150 – 210	10	0.329	0.802	0.777
umc1857	6	135 – 155	12	0.354	0.784	0.758
umc1388	6	110 – 115	4	0.772	0.378	0.346
umc1187	6	95 – 115	3	0.785	0.354	0.318
umc2316	6	150 – 160	6	0.759	0.394	0.361
umc1006	6	85 – 130	16	0.316	0.825	0.807
umc1241	7	140 – 160	8	0.367	0.729	0.683
umc1159	7	135 – 155	6	0.646	0.527	0.479
umc1450	7	155 – 165	8	0.544	0.655	0.625
umc1788	7	105 – 115	4	0.57	0.546	0.46
umc1275	7	130 – 145	6	0.557	0.631	0.593
umc1627	8	130 – 150	4	0.671	0.492	0.438
umc1457	8	90 – 100	7	0.405	0.664	0.602
umc1913	8	140 – 155	6	0.519	0.609	0.542
umc1663	8	115 – 135	10	0.443	0.714	0.677
umc1673	8	85 – 100	6	0.544	0.638	0.598
umc1588	9	130 – 135	7	0.595	0.596	0.56
umc1357	9	160 – 185	7	0.418	0.651	0.587
bnlg1375	9	100 – 140	19	0.405	0.796	0.782
umc1942	9	120 – 135	6	0.43	0.706	0.66
umc1675	9	150 – 165	6	0.595	0.584	0.539
umc2018	10	145 – 160	7	0.38	0.707	0.654
umc1152	10	155 – 170	6	0.494	0.631	0.568
umc2021	10	115 – 135	8	0.43	0.718	0.677
bnlg1079	10	135 – 180	14	0.241	0.867	0.853
bnlg1518	10	175 – 240	17	0.38	0.81	0.796
Total			395			
Mean			7.9	0.497	0.644	0.602

^zMajor allele frequency.^yGenetic diversity^xPolymorphism information content

다. 전기영동이 끝난 gel은 silver-staining kit (Promega, USA)를 이용하여 DNA band를 확인하였다.

Data 통계 분석

튀김옥수수 자식계통들의 핵심집단에 대한 집단구조 분석은 model-based program인 STRUCTURE 2.3를 이용하여 Pritchard et al. (2003)가 제안한 방법에 의해 계산하였다. STRUCTURE program을 이용한 분석에서 admixture model은 100,000의 burn-in, 100,000의 run length로 1~10의 범위에서 각 K 값 당 5반복을 실시하여 평균 likelihood value인 LnP(D) 값을 계산하였으며, STRUCTURE program에서 측정된 데이터의 log probability[LnP(D)]는 정확한 subgroup 수를 평가할 수 없어서, Evanno et al. (2005)가 제안한 *ad hoc* criterion (ΔK)를 이용하여 K 값을 결정하였다. 또한 79개 튀김옥수수 자식계통들은 subgroup이 명확히 구분되지 않았기 때문에, membership probabilities (Q value) ≥ 0.80 에 근거하여 각 subgroup의 계통들을 분류하였으며, membership probabilities < 0.80 의 자식계통들은 별도로 admixture group으로 분류하였다(Wang et al. 2008).

Association mapping 분석은 TASSEL 3.0 program을 이용하여 50개의 SSR loci 조합에 대한 linkage disequilibrium (LD)을 조사한 r^2 , D' 과 P value ($p < 0.01$) 값과 형태 변이 및 SSR genotype 자료를 이용하여 marker-trait association을 확인하였다(Bradbury et al. 2007). 본 연구에서 marker-trait

association 분석을 위하여 2가지 모델[Q-matrix를 이용한 Q GLM (general linear model)과 Q-matrix와 K-matrix를 이용한 Q+K MLM (mixed linear model)]을 이용하였다. TASSEL 3.0 program을 이용한 분석에서 유의수준 0.05와 0.01로 10,000의 permutation run의 조건으로 분석을 실시하였다. 각 분석에 이용된 Q-matrix는 STRUCTURE program을 통하여 분석하였고, K-matrix는 SPAGeDi software (Hardy and Vekemans, 2002)를 이용하여 Loiselle et al. (1995)의 방법에 의해 kinship coefficients를 계산하였다.

결 과

튀김옥수수 핵심집단 자식계통들의 계통유연관계와 집단구조

본 연구는 강원도농업기술원 옥수수연구소에서 고품질의 튀김옥수수 품종개발을 위하여 육성 중인 79개의 자식계통들의 핵심집단에 대하여 50개의 SSR primer를 이용하여 집단구조를 분석하였다. 전체 79개의 튀김옥수수 자식계통들에 대한 집단구조를 확인하기 위해서 STRUCTURE program을 이용하여 LnP(D) 를 계산하였다. LnP(D) 분석에서 K 값이 명확하지 않아서 Evanno et al. (2005)가 제안한 *ad hoc* measure ΔK 를 이용하였다. 그 결과 79개의 자식계통들에서 가장 높은 ΔK 값은 $K=4$ 인 것으로 확인되었으나(Fig. 1), 튀김옥수수 핵심집단의 subgroup들이 명확히 구분되지 않았다. 따라서 Wang et al. (2008)이 제시한 membership probability threshold 0.8에

Fig. 1. Rate of change in the log probability of data between true K values(ΔK) described by Evanno et al. (2005).

근거하여 분석한 결과, 79개의 튀김옥수수 자식계통들은 groups I, II, III, IV, admixed group으로 구분되었다(Fig. 2). 4개의 옥수수 자식계통은 group I에 포함되었고, Group II는 17개의 자식계통들이 포함되었다. 그리고 6개의 자식계통들은 Group III에 포함되었으며, 22개의 자식계통들은 Group IV에 포함되었다. 그리고 나머지 30개 자식계통들은 admixed group으로 구성되어 있었다(Fig. 2).

튀김옥수수 핵심집단에서 linkage disequilibrium과 association mapping

분석에 이용된 50개의 SSR loci에 대하여 LD를 측정하였다. 그 결과, 모든 조합의 SSR loci 중에서 73개의 조합이 동일한 염색체 내에서 D' 값이 0.1 이상의 값을 나타내었으며, 12개의 조합에서 유의성을 나타내었다($P < 0.01$). r^2 값을 근거로 동일한 염색체에서 66개와 7개 조합에서 각각 $r^2 > 0.01$ 과

Fig. 2. UPGMA dendrogram and population structure based on the 50 SSR markers.

Table 3. Summary of LD for each pairs of SSR loci located on the same chromosome and all 50 SSR loci on the inter chromosome in 79 popcorn inbred lines

	Chr.	Number of detected LD			
		$r^2 > 0.01$	$r^2 > 0.1$	$D' > 0.1$	$P < 0.01$
Intra Chromosome	Chr. 1	5	0	6	0
	Chr. 2	8	0	9	0
	Chr. 3	7	3	7	3
	Chr. 4	6	1	9	2
	Chr. 5	7	0	7	0
	Chr. 6	4	0	5	1
	Chr. 7	7	0	7	2
	Chr. 8	4	0	5	0
	Chr. 9	9	0	9	1
	Chr. 10	9	3	9	3
	Total	66	7	73	12
Inter Chromosome	Total	721	122	826	129

Table 4. List of significant markers detected with the Q GLM model

Locus	Chr.	Trait	P value*	R^2	Locus	Chr.	Trait	P value	R^2
umc2149	1	GR	5.88E-06	35.34	umc1187	6	KSL	1.74E-04	20.37
		EL	0.009	18.96			EW	4.97E-04	18.14
umc1281	1	GR	0.006	21.59	umc1006	6	KW	3.82E-04	18.71
		PH	0.008	20.83			ER	0.003	39.52
		EL	0.001	25.69	umc1241	7	GR	0.002	26.94
umc1553	1	KW	0.009	20.72			ER	0.007	23.25
		ER	0.004	25.96	umc1159	7	GR	0.005	18.04
umc2252	2	GR	0.002	22.85			PH	0.002	20.65
		EH	0.004	21.03			PH	0.001	25.87
		EL	8.80E-06	34.56	umc1450	7	EH	0.001	25.52
umc2380	2	KSL	4.57E-04	26.2			EL	0.002	24.82
		PH	0.002	27.08			KSL	2.19E-04	30.02
		EH	4.58E-04	31.73	umc1275	7	EW	0.008	21.04
		EL	6.97E-04	30.6			EL	0.004	20.88
		KSL	0.002	27.6			ER	0.001	23.79
umc1844	3	GR	3.66E-04	32.5	umc1457	8	EW	0.004	20.85
		EW	0.001	29.41			PH	0.008	19.1
		KW	0.002	29.05			EH	0.008	19.12
umc2280	4	GR	4.68E-08	47.6	umc1673	8	KW	0.003	21.38
		PH	0.001	27.43			PH	8.67E-06	34.21
		EH	0.004	24.78			EH	5.62E-06	35.05
		EL	1.27E-06	42.02	umc1588	9	ET	0.008	19.05
		KSL	1.17E-06	42.16			GR	2.52E-04	27.55
umc1707	4	EW	4.07E-05	35.34			EL	0.01	18.61
		KW	0.006	23.68			KSL	4.81E-04	26.08
		GR	8.40E-04	24.49	bnlg1375	9	EW	0.005	20.63
		EL	0.002	21.99			KW	0.005	20.35
		EW	0.007	19.14			GR	8.23E-05	51.3
umc1101	4	GR	0.006	30.95	umc1942	9	GR	0.003	19.65
		PH	0.001	35.46			PH	0.006	17.82

Table 4. Continued

Locus	Chr.	Trait	<i>P</i> value*	<i>R</i> ²	Locus	Chr.	Trait	<i>P</i> value	<i>R</i> ²
umc2041	4	EH	0.002	34.83	umc2018	10	EH	4.27E-04	24.33
		GR	0.005	27.56			EL	2.64E-04	29.27
umc1447	5	EL	0.006	17.4			KSL	0.009	20.68
		KSL	8.20E-05	27.34			ER	0.006	21.62
		EW	2.50E-04	24.95			EW	0.007	21.23
		KW	0.002	19.93	umc1152	10	GR	2.34E-05	31.67
bnlg1237	5	EL	0.002	32.68			EL	5.67E-04	24.56
		KSL	0.003	31.33			KSL	5.75E-04	24.53
		EW	0.002	31.78			EW	2.57E-04	26.41
umc2161	5	GR	0.007	26.98	umc2021	10	GR	5.37E-05	33.08
		EL	0.002	30.3			EH	0.009	20.77
		EW	0.002	30.72	bnlg1079	10	GR	0.001	38.34
		PH	0.001	34.54			EL	5.78E-05	45.1
umc1857	6	EH	0.005	30.96			KSL	0.003	36.06
		KSL	0.007	12.54			EL	0.001	43.04
umc1388	6	KW	0.009	11.84	bnlg1518	10	ER	0.006	38.93

*Significant level : *P* < 0.01

Table 5. List of common significant markers detected with the Q+K MLM models

No.	Locus	Chr.	Trait	<i>P</i> value*	<i>R</i> ²
1	umc2252	2	EL	0.005	24.09
			KSL	0.010	21.71
2	umc2280	4	EL	0.009	26.28
			KSL	0.005	28.56
3	umc1187	6	KW	0.007	13.49
4	umc1673	8	PH	0.004	24.20

*Significant level : *P* < 0.01

$r^2 > 0.1$ 값을 나타내었다(Table 3). 또한 다른 염색체 간 SSR loci 조합에서는 $D > 0.1$ 의 값을 나타내는 조합이 826개가 확인되었다. 129개의 SSR loci 조합에서는 $P < 0.01$ 수준에서 유의성을 나타내었다. $r^2 > 0.01$ 의 값을 나타내는 조합은 총 721개가 확인되었으며, $r^2 > 0.1$ 값을 보이는 조합은 122개가 확인되었다(Table 3).

본 연구에서는 튀김옥수수 자식계통들에서 분석에 이용된 50개 SSR 마커와 10개의 양적 형질과의 연관성을 분석하기 위해서 Q GLM과 Q+K MLM을 이용하여 association mapping 분석을 실시하였다. 0.01의 유의수준에서 Q GLM 분석결과, 31개의 SSR 마커들은 9개의 형질과 association이 확인하였다(Table 4). 그 중에서 SSR 마커인 umc2280의 경우 총 7개의 형질(간장, 착수고, 이삭장, 착립장, 이삭중, 종실중, 발아율)들과 association을 보였다. 반면에 4개의 SSR 마커(bnlg1375, umc1256, umc1553, umc1006)들은 단지 한 개의 형질(발아

율, 이삭열수)에서만 association을 보였다. Q GLM 분석에서 확인된 총 92개의 marker-trait association 중에서, SSR 마커인 umc1388과 종실중은 가장 낮은 association R^2 값($R^2 = 11.84$)을 나타내었으며, 반면에 bnlg1375와 발아율은 가장 높은 association R^2 값($R^2 = 51.30$)을 나타내었다(Table 4).

한편 0.01의 유의수준에서 Q+K MLM 분석결과, 4개의 SSR 마커들은 4개의 형질과 association이 확인되었다. 그 중에서 umc2252와 umc2280은 2개 형질(이삭장, 착립장)과 association을 나타내었고, 나머지 2개의 SSR 마커들은 각각 한 개의 형질(간장, 종실중)과 association을 보였다(Table 5). 또한 Q+K MLM 방법에 의해 확인된 6개의 marker-trait association 중에서, SSR 마커인 umc1187과 종실중 간 association에서 가장 낮은 R^2 값이 확인되었다($R^2 = 13.49$). 반면에 가장 높은 association R^2 값은 umc2280과 착립장에서 확인되었다($R^2 = 28.56$).

고 찰

타식성 작물인 옥수수 자식계통들은 육성내력에 따라 복잡한 genetic background를 갖고 있기 때문에 고정된 자식계통들에 대한 계통유연관계 및 집단구조를 이해하는 것은 옥수수 육종 연구에서 자식계통 육성 및 보존을 위해서 매우 중요하다(Wang et al. 2008). 본 연구에서 집단구조에 대한 분석 결과에서 79개의 튀김옥수수 자식계통들은 groups I, II, III, IV, admixed group으로 구분되었는데, 4개의 자식계통들은 group I에 포함되었고, Group II는 17개의 자식계통들이 포함되었다. 그리고 6개의 자식계통들은 Group III에, 22개의 자식계통들은 Group IV에 각각 포함되었다. 그리고 admixed group에는 30개 자식계통들로 구성되었다.

품종 육성을 목적으로 다양한 지역에서 수집된 자식계통들에 대하여 유전적 특성을 구분하는 것이 매우 중요하다. 또한 집단구조와 계통유연관계 분석의 결과는 수집된 자원들의 유전적 부동(gene flow) 및 기원을 확인하는데 매우 중요하다(Kwon et al. 2012). 옥수수 육종 연구에서 고정된 자식계통들에 대한 계통유연관계 및 집단구조에 대한 정보는 1대잡종 종자를 생산하기 위한 교배조합 구성에 유용하게 이용될 수 있다. 특히 옥수수와 같은 타식성 작물에서 분자마커 기술은 교배조합 예측, 이형잡종 계통들에서 자식계통 육성 및 분류 등에 폭넓게 이용되고 있다(Sa et al. 2010, Xia et al. 2005).

본 연구에서는 79개의 튀김용 옥수수 자식계통과 50개의 SSR marker를 이용하여 집단에서 확인되는 LD를 확인하였다(Table 3). Remington et al. (2001)의 연구 결과와 비교하면 비교적 높은 수준의 LD를 나타내었으나, Wang et al. (2008)과 Zhang et al. (2012) 등의 연구와 비교하면 매우 낮은 수준의 LD를 나타내었다. 일반적으로 LD는 분석에 이용된 연구 재료, selection, genetic drift, 분석용 마커 수 등 많은 요인에 의해서 영향을 많이 받을 수가 있다. 따라서 본 연구에서 확인된 낮은 수준의 LD 결과는 아마도 분석에 이용된 연구재료 및 분자마커 수가 상대적으로 적었기 때문인 것으로 생각되었다.

최근 주요 농업형질에 영향을 주는 유전적 마커를 확인하기 위하여 association mapping 분석 연구가 활발히 이루어지고 있지만, false positive (Type I error)에 의해서 의심스러운 association의 발생 가능성이 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다(Zhang et al. 2010). 따라서 본 연구에서는 이러한 문제를 최소화하기 위해서 Q-matrix를 활용한 Q GLM 모

델과 Q와 K-matrix를 활용한 Q+K MLM 모델을 이용하였다(Tables 4, 5). Yu et al. (2005)의 연구 결과에 따르면 Q+K MLM 모델이 Q GLM 모델에 비하여 통계적 검증력이 우수하다는 보고를 하였다. 집단구조를 활용한 Q GLM 모델을 이용하였을 때, 총 92개의 marker-trait association이 확인되었으나, 집단구조와 kinship을 활용한 Q+K MLM의 경우에는 총 6개의 marker-trait association이 확인되었다. Q+K MLM 모델을 이용하였을 때, 유의한 association의 감소는 이전의 연구에서도 확인되었다(Yu et al. 2005, Kwon et al. 2012).

본 연구에서 Q GLM과 Q+K MLM을 이용하여 분석 결과에 의하면, 일부 SSR 마커들과 형질들 사이에서의 association은 이전의 다른 QTL mapping 또는 association mapping 연구에서도 보고되었다. 예를 들면 본 연구에서 SSR 마커 umc1447는 이삭장, 착립장, 이삭중, 종실중 등의 수량 관련 형질들(Q GLM, $P<0.01$)과 연관성이 있는 것으로 나타났는데, Shiri (2011)의 연구에서도 평균수량(mean productivity)과 스트레스 저항성 지수(stress tolerance index) 형질과 연관성이 확인되었다. 따라서 SSR 마커 umc1447는 옥수수의 수량성에 관여하는 마커인 것으로 생각되었다. 한편 본 연구에서 확인된 SSR 마커인 umc1457은 8번 염색체에서 3개의 형질(간장, 착수고, 종실중; Q GLM, $P<0.01$)들과 연관성을 나타내었으나, Zhang et al. (2012)의 연구에서는 2개의 형질(출용기, 개화기)에 관여하는 것으로 확인되었다. 또한 2개의 SSR 마커인 umc1844(발아율, 이삭중, 종실중; Q GLM, $P<0.01$)와 umc1101(발아율, 간장, 착수고; Q GLM, $P<0.01$)의 경우, Lu et al. (2011)의 QTL mapping 결과에 의하면 umc1844와 umc1101은 이삭열수에 관여하는 QTL marker인 것으로 확인되었다. Li et al. (2011)의 보고에 의하면, 양적 형질 분석의 경우 분석에 이용된 재료(분석집단 크기 및 구성), 마커, 환경조건 등 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있으므로 직접적인 비교가 어렵다고 하였다. 이와 같은 이유에 의해서 본 연구에서 marker-trait association 결과가 이전의 연구 결과와 다소 차이를 나타내는 것으로 생각되었다.

최근 들어, 튀김옥수수는 국민의 식생활 변화와 여가시간 증가에 따른 수요 증가 등의 이유로 중요성이 점차 확대되고 있다. 그러므로 새로운 튀김옥수수 품종을 개발하는 것이 매우 중요하다. 그러나 현재 찰옥수수와 비교하여 튀김옥수수의 연구가 매우 부족한 상황이다. 따라서 본 연구에서 확인된 튀김옥수수 핵심집단 자식계통들의 유전적 다양성, 집단구조 분

석 결과는 앞으로 튀김옥수수 육종연구에서 교배조합 예측 및 유전자원 보존 등에 매우 유용한 정보를 제공할 것으로 생각되며, 또한 association mapping 분석 결과는 농업적으로 유용한 형질에 관여하는 유전적 마커를 선발하는 데 유용하게 이용될 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 강원도 농업기술원 옥수수연구소에서 튀김옥수수 품종개발을 위하여 육성한 79개의 자식계통들에 대하여 대표적인 분자마커인 SSR마커를 이용하여 집단구조 및 association mapping 분석을 실시하였다. 집단구조에 대한 분석 결과에서 79개의 튀김옥수수 자식계통들은 groups I, II, III, IV, admixed group으로 구분되었다. 4개의 옥수수 자식계통은 group I에 포함되었고, Group II는 총 17개의 자식계통들이 포함되었다. 그리고 6개의 자식계통들은 Group III에 포함되었으며, 22개의 자식계통들은 Group IV에 포함되었다. 그리고 admixed group에는 30개 옥수수 자식계통들이 포함되었다. 튀김옥수수 자식계통들에 대하여 50개 SSR 마커와 10개의 양적 형질 사이에서 association mapping 분석을 하였다. Q GLM 분석에서는 0.01의 유의수준에서 92개의 marker-trait association을 확인하였으며, 반면에 Q+K MLM 분석에서는 0.01의 유의수준에서 6개의 marker-trait association을 확인되었다. 본 연구에서 79개의 튀김옥수수 자식계통들에 대한 집단구조 및 association mapping 분석의 결과는 앞으로 강원도농업기술원 옥수수연구소에서 튀김옥수수 품종개발을 위한 계통 육성 및 교배조합 구성 등에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대한다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(식물분자육종사업단, PJ0080182013)과 지역전략작목산학연협력사업(PJ0097462013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Borba TCO, Brondani RPV, Breseghello F, Coelho ASG, Mendonça JA, Rangel PHN, Brondani C. 2010. Association mapping for yield and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Genet. Mol. Biol. 33: 515-524.
2. Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23: 2633-2635.
3. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A simple and rapid method for plant DNA preparation. Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.
4. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14: 2611-2620.
5. Flint-Garcia SA, Thuillet AC, Yu JM, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES. 2005. Maize association population: a high resolution platform for quantitative trait locus dissection. Plant J. 44: 1054-1064.
6. Hallauer AR, Russell WA, Lamkey KR. 1988. Corn breeding. pp 463-564. In G.F. Sprague and JW Dudley (ed). Corn and Corn Improvement. 3rd ed. Agron. Monogr. 18. Madison, WI, USA.
7. Hardy OJ, Vekemans X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol. Ecol. Notes 2: 618-620.
8. Kwon SJ, Brown AF, Hu J, McGee R, Watt C, Kisha T, Timmerman-Vaughan G, Grusak M, McPhee KE, Coyne CJ. 2012. Genetic diversity, population structure and genome-wide marker-trait association analysis emphasizing seed nutrients of the USDA pea (*Pisum sativum* L.) core collection. Genes Genom. 34: 305-320.
9. Li JZ, Zhang ZW, Li YL, Wang QL, Zhou YG. 2011. QTL consistency and meta-analysis for grain yield components in three generations in maize. Theor. Appl. Genet. 122: 771-782.
10. Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). Am. J. Bot. 82: 1420-1425.
11. Lorenz AJ, Coors JG, Hansey CN, Kaeppler SM, De Leon N. 2010. Genetic analysis of cell wall traits relevant to cellulosic ethanol production in maize (*Zea mays* L.). Crop Sci. 50: 842-852.
12. Lu M, Xie CX, Li XH, Hao ZF, Li MS, Weng JF, Zhang DG, Bai L, Zhang SH. 2011. Mapping of quantitative trait loci for kernel row number in maize across seven

1. Borba TCO, Brondani RPV, Breseghello F, Coelho ASG, Mendonça JA, Rangel PHN, Brondani C. 2010. Association mapping for yield and grain quality traits in rice (*Oryza*

- environments. *Mol. Breeding* 28: 143-152.
13. Mezouk S, Dubreuil P, Bosio M, Décousset L, Charcosset A, Praud S, Mangin B. 2011. Effect of population structure corrections on the results of association mapping tests in complex maize diversity panels. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1149-1160.
 14. Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz ES, Zhang Z, Costich DE, Buckler ES. 2009. Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *Plant Cell* 21: 2194-2202.
 15. Pasam RK, Sharma R, Malosetti M, Van Eeuwijk FA, Haseneyer G, Kilian B, Graner A. 2012. Genome-wide association studies for agronomical traits in a worldwide spring barley collection. *BMC Plant Biol.* 27: 12-16.
 16. Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
 17. Pritchard JK, Wen W. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2.
 18. Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11479-11484.
 19. Sa KJ, Park JY, Park KJ, Lee JK. 2010. Analysis of genetic diversity and relationships among waxy maize inbred lines in Korea using SSR markers. *Genes Genom.* 32: 375-384.
 20. Shiri M. 2011. Identification of informative simple sequence repeat (SSR) markers for drought tolerance in maize. *African J. Biotechnol.* 10: 16414-16420.
 21. Skot L, Humphreys MO, Armstead I. 2005. An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* (L.). *Mol. Breed.* 15: 233-245.
 22. Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegler J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular marker in maize (*Zea mays* L.): comparison with RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163-173.
 23. Wang R, Yu Y, Zhao J, Shi Y, Song Y, Wang T, Li Y. 2008. Population structure and linkage disequilibrium of a mini core set of maize inbred lines in China. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1141-1153.
 24. Xia XC, Reif JC, Melchinger AE, Frisch M, Hoisington DA, Beck K, Pixley K, Warburton ML. 2005. Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: II. Subtropical, tropical midaltitude, and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and European maize. *Crop Sci.* 45: 2573-2582.
 25. Yang X, Yan J, Shah T, Warburton ML, Li Q, Li L, Gao Y, Chai Y, Fu Z, Zhou Y, Xu S, Bai G, Meng Y, Zheng Y, Li J. 2010. Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. *Theor. Appl. Genet.* 121: 417-31.
 26. Yu J, Buckler ES. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 155-160.
 27. Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB. 2005. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 38: 203-208.
 28. Zhang Q, Wu C, Ren F, Li Y, Zhang C. 2012. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. *AJCS* 6: 1131-1138.
 29. Zhang Z, Ersoz E, Lai CQ, Todhunter RJ, Tiwari HK, Gore MA, Bradbury PJ, Yu J, Arnett DK, Ordovas JM, Buckler ES. 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics* 42: 355-360.
 30. Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Genome* 1: 5-20.