대립벼 1호의 종자중에 관여하는 유전자 분석

심규찬¹ · 강주원² · 이현숙¹ · 안상낙^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 농학과, ²경남 밀양시 점필재로 국립식량과학원

Elucidating the Genetic Basis of Grain Traits in Japonica Rice Cultivar ‘Daeribbyeol 1’

Kyu-Chan Shim¹, Ju-Won Kang², Hyun-Sook Lee¹, and Sang-Nag Ahn^{1*}

¹Department of Agronomy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Department of Southern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Milyang50424, Korea

Abstract : Grain size has a great impact on rice grain yield and is controlled by quantitative trait loci (QTL). Daeribbyeol 1 with big grain is widely used for genetic materials to develop varieties with diverse grain size. This study was conducted to identify genes controlling grain size traits of Daeribbyeol 1. An F_{2:3} population derived from a cross between two *japonica* cultivars, Boseogheugchal and Daeribbyeol1, was used to identify QTL controlling grain shape traits. A total of 284 F₂ plants were measured for grain shape traits, grain length (GL), grain width (GW), grain thickness (GT), 1,000 grain weight (TGW), and two morphological traits, pericarp color and waxy endosperm. Sixty F₃ lines were selected based on the grain shape traits and marker genotypes and evaluated for grain shape traits. For marker analysis, SSR markers tightly linked to five known grain size genes and two QTLs were selected and used for genotyping. A total of 11 QTLs detected on chromosomes 2, 3, 4 and 6 explained phenotypic variation from 3.9% to 59.3%. *qTGW2*, *qGW2* and *qGT2* were detected in the same region between RM12811-RM12837 that are tightly linked with *GW2* gene. *qTGW3* and *qGL3* were detected near *GS3* gene. To know whether Daeribbyeol 1 has the same mutations in *GW2* and *GS3* as the various grain-size genotypes, *GW2* and *GS3* of two parents were sequenced. Daeribbyeol 1 had the same one base (A) deletion at a position 316 as ‘WY3’ in *GW2* which results in the loss of function of *GW2* gene. Boseogheugchal showed a C-to-A nonsense mutation in the second exon of *GS3* gene that increased grain length. Interaction between *GW2* and *GS3* was not significant indicating that two genes controlled grain-size traits in additive pathway. The results from this study indicate that three QTLs *GW2*, *qGT4* and *qGL6* are associated with the grain size variation in Daeribbyeol 1 with *GW2* as the major QTL.

Keywords : Rice, Grain size, *GW2*, *GS3*

서 언

벼는 아시아 지역에서 가장 중요한 식량작물이다. 벼의 종자중은 수당립수와 함께 수량을 구성하는 가장 중요한 요소이며, 양적형질유전자좌 (QTL, quantitative trait locus)에 의해 조절된다. 종자 크기는 종자중과 밀접한 상관관계를 갖고 있으며, 종자 길이 (GL, grain length), 종자 폭 (GW, grain width), 종자 두께 (GT, grain thickness)에 의해 측정된다 (Yoon *et*

al. 2006).

벼 (*Oryza sativa* L.)에서 수 많은 종자형태 변이체들이 발견되었다. 이러한 변이들을 연구하기 위해 다양한 유전자원들을 이용한 교배집단이 육성되었고, 연구결과 종자의 크기와 무게에 관련된 많은 QTL들이 서로 다른 유전적 배경 및 환경에서 탐색되었다. 많은 QTL들이 fine mapping을 통해 염색체내 유전자 위치가 많이 좁혀졌으며, NIL (Nearly Isogenic Line)을 통한 QTL의 특성이 밝혀졌다. 또한 *GS3*, *GW2*, *qSW5/GW5*, *GS5*, *OsSPL16* 등 종자의 형태와 크기를 조절하는 유전자들이 동정되었다 (Fan *et al.* 2006, Song *et al.* 2007, Weng *et al.* 2008, Shomura *et al.* 2008, Li *et al.* 2011, Wang *et al.* 2012).

*Corresponding author (E-mail: ahnsn@cnu.ac.kr, Tel: +82-42-821-5728)

(Received on August 5, 2016. Accepted on August 23, 2016.)

Grain size 3 (GS3) 유전자 (Chr. 3: 16,729,501-16,735,109, <http://www.gramene.org/>)는 ‘Minghui 63’과 ‘Chuan 7’ 교배 집단으로부터 동정되었고, 종자 크기를 감소시키는 역할을 한다. 종자의 길이를 조절하는 QTL 중 처음으로 동정된 유전자이며, 두 번째 exon 지역에는 C→A 염기치환 돌연변이가 nonsense mutation을 일으켜 유전자의 기능을 상실시킨다고 보고되었다. 이 유전자가 기능을 소실됨으로 인해 종자의 길이를 증가시킨다 (Fan *et al.* 2006). 이러한 C→A 염기치환 돌연변이를 확인할 수 있는 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 마커 SF28 (*Pst*I)가 선행연구에서 개발되었다 (Fan *et al.* 2009). 또한 *GS3* 유전자의 5번째 exon 지역에는 TCC 염기반복 다형성을 보이고 있다. TCC 반복을 확인할 수 있는 InDel 마커 (RGS2)가 선행연구에서 개발되었고 (Wang *et al.* 2010), SF28과 TCC 반복에 따라 *GS3* 유전자를 4가지 haplotype으로 구분할 수 있다 (Mao *et al.* 2010).

종자폭을 조절하는 *grain width and weight 2 (GW2)* 유전자 (Chr. 2: 8,114,961-8,121,925 bp, <http://www.gramene.org/>)는 ‘FAZ1’과 ‘WY3’ 교배집단으로부터 동정되었다 (Song *et al.* 2007). *GW2* 유전자는 Really Interesting New Gene (RING)-type E3 ubiquitin ligase를 암호화하고 있는 유전자로 번역된 단백질은 종자의 세포분열을 억제하여 종자의 폭을 작게 만든다. ‘FAZ1’과 ‘WY3’의 *GW2* 염기서열 비교 결과 3개의 SNP (Single Nucleotide polymorphism)이 발견되었는데 114, 1116 위치에 있는 SNP들은 아미노산을 변화시키지 않는 동의돌연변이 (synonymous mutation)였다. 반면 316 위치의 1-bp(A) 염기서열 결실은 번역을 조기에 종결시켜 유전자의 기능을 잃게 만든다. 이에 따라 돌연변이형 *GW2* 유전자는 종자의 영 세포분열을 촉진시켜 종자의 폭과 무게를 증가시킨다.

qSW5 (QTL for seed width 5) 유전자는 ‘Nipponbare’와 ‘Kasalath’ 교배집단으로부터 동정되었고, 종자의 폭과 무게를 조절하는데 있어 매우 중요한 역할을 한다 (Shomura *et al.* 2008). *qSW5* 유전자에 있는 1212-bp 결실이 종자의 폭과 무게를 증가시키는데 가장 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었고, ubiquitin-proteasome pathway에 관여하는 유전자로 추측된다고 보고되어있다.

GS5 유전자는 *qSW5* 유전자와 2Mb 거리에 연관되어 있고, 종자 크기를 증가시키는 역할을 하는 유전자로 밝혀졌다 (Li *et al.* 2011). 이 유전자의 발현이 높아지면 종자의 크기가 커지는 동시에 세포주기가 빨라지는 것으로 보고되었다.

최근에는 많은 연구들이 종자 크기를 조절하는 유전자들 사이

의 상호작용에 초점을 맞추고 있다. Yan *et al.* (2011)은 종자의 길이와 폭의 조절에 *GS3*와 *qSW5/GW5* 간에 유의한 상호작용이 있다고 보고하였다. Ying *et al.* (2012)는 *GW2*와 *qSW5/GW5*가 종자 폭을 증가시키는데 유의하게 집적되며, 두 유전자 간에 상호작용 없이 독립적으로 작용한다고 보고하였다. Takano-Kai *et al.* (2009)는 여러 벼 품종들을 이용한 연관성 연구 (association study)에서 *GS3*와 *GW2* 유전자 사이에 유의한 상호작용을 발견할 수 없었다고 보고하였는데, 그 이유는 실험에 사용된 품종들 중에 *GW2* 유전자의 돌연변이형 (1-bp deletion)이 존재하지 않았음에도 불구하고 분석 집단 내에서 종자 크기의 차이가 관찰되었기 때문이었다. Lu *et al.* (2013)은 자포니카 벼 집단 내에서 *GS3-A* 돌연변이가 유전자형을 갖는 *GW2-2*와 *GW2-3* haplotype 간 종자길이에서 유의한 차이가 존재한다고 보고하였다. 이는 *GW2* 유전자와 *GS3* 유전자 사이에 상호작용이 있음을 나타냄을 의미한다.

벼 품종들은 검정색 (보라색), 갈색, 녹색, 적색 등 다양한 종피색을 갖고 있다 (Furukawa *et al.* 2006, Reddy *et al.* 1995, Sweeney *et al.* 2006, Wang & Shu 2007). 그 중 보라색 종피는 안토시아닌을 많이 함유하고 있으며, *Ra (Pb)* 유전자와 *Pp* 유전자의 상보적인 작용에 의해 조절된다고 보고되어 있다. Rahman *et al.* (2013)은 보라색 종피를 갖는 흑남벼 (*PbPbPpPp*)와 백색 종피를 갖는 화영벼 (*pbpbpppp*)를 교배하였을 때 F₂ 세대에서 보라색 (9) : 갈색 (3) : 백색 (4)의 분리비를 보이는 것을 확인하였다. 보라색 종피를 갖는 개체들의 유전자형은 *Pb_Pp_*, 갈색은 *Pb_pppp*, 백색은 *pbpbPp_* 혹은 *pbpbpppp*를 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서는 대립변 1호의 종자크기 및 종자중에 관련된 유전자 탐색을 수행하였다. 일반적으로 QTL분석은 염색체 전체에 대해 연관지도를 작성하여 분석하지만 이에는 많은 시간과 비용, 노력이 수반된다. 본 연구에서는 염색체 전체에 대한 분석 대신에 선행연구에 의해 동정된 종자의 크기를 조절하는 5개의 유전자 (*GW2*, *GS3*, *qSW5*, *GS5*, *TGW6*)와 동정되지 않은 2개의 QTL (*qGL6*, *gw9.1*) 지역 (Ishimaru *et al.* 2013, Ying *et al.* 2012, Xie *et al.* 2008)에 대하여 분석하였다. 7개의 유전자 및 QTL에 밀접하게 연관된 SSR 마커를 이용하여 유전자형 분석을 수행하였고, 이 유전자형과 종자형태 특성과의 분산분석을 통해 해당 유전자 및 QTL의 유의성을 검정하였다. 또한 찰/메성 (*Wx*)과 종피색 (*Ra*) (Shao *et al.* 2011)을 표현형 마커로 사용하여 종자 형태 특성과 이들 간의 연관관계를 분석하였다. 그리고 탐지된 QTL 유전자들간의 상호작용을 분석하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 재배방법

2013년 하계에 충남대학교 시험포장에서 검정색 종피와 찰성인 자포니카 품종 보석흑찰을 모본, 종자 크기가 큰 자포니카 벼 품종 대립벼 1호를 부본으로 교배하여 F₁ 식물체를 육성하였다 (Fig. 1). 2013/2014년 겨울 4개의 F₁ 식물체를 자식시켜 종자를 받았고, 2014년 284개의 F₂ 식물체를 얻었다. 2015년 유전분석을 위해 SSR 유전자형과 표현형 성적을 이용하여 F₃ 60계통을 선발하였고, 본 실험에 사용하였다 (Fig. 2). 2014, 2015년 각각 F₂ 284개체와 F₃ 60계통을 재식거리 30 X 15cm로 주당 1본씩 이양하여 기본 농업형질, 이삭 및 수량 관련 형질들을 조사하였다. 시비량은 N-P₂O₅-K₂O = 9-4.5-5.7 kg/10a로 재배하였으며 기타 재배법은 농촌진흥청 표준재배법에 준하였다.

농업형질 조사

2014년 F₂ 식물 모든 개체를 대상으로 간장, 수장, 분얼수를 포장에서 실측하였다. 종자 특성은 찰/메성, 종피색, 정조중

(TGW), 현미중, 종자 길이 (GL), 폭 (GW), 두께 (GT)를 조사하였다. 찰/메성은 종자를 부수어 전분의 색상으로 확인하였다. 종피색은 왕겨를 제거하였을 때 백색의 종자(*rara*)와 유색 종자(*RaRa*, *Rara*) 두 가지로 구분하여 조사하였다. 정조중 및 현미중은 100립중을 2반복으로 조사한 후 천립중으로 환산하였으며, 종자 길이, 폭, 두께는 15개의 잘 등숙된 현미를 임의로 선발하여 150-mm 버니어캘리퍼스 (Mitutoyo Corp., Japan)로 측정하였다. F₃ 세대에서는 각 계통에서 5 개체를 임의로 선발하여 F₂에서 조사한 형질들을 동일한 방법으로 조사하였다.

DNA추출 및 유전자형 검정

284개 F₂ 식물체에서 유묘기 잎을 채취하여 CTAB 방법으로 DNA를 추출하였다 (Causse *et al.* 1994). 종자 크기를 조절한다고 보고된 5개의 유전자들과 반복적으로 발견되는 2개의 QTL을 선정하였고, 이들과 밀접하게 연관되어 있는 SSR 마커를 이용하여 유전자형 검정을 수행하였다. PCR product (15.0 µl)의 조성은 5.0µl (5.0ng/ µl)의 DNA와 0.1µl (5 Unit/µl) *Taq* polymerase, 0.8µl dNTP (2.5 mM each), Forward + Reverse primer 1µl (10pmol each), 1.5µl 10×PCR buffer (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% gelatin), 6.6 µl 3차 증류수로 사용하였다. PCR 반응은 95℃에서 5분간 초기변성 후 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초간 총 30회 반복하고, 72℃에서 5분간 반응하였다. 전기영동은 4% polyacrylamide denaturing gels에서 수행되었으며 silver staining은 Panaud *et al.* (1996)의 방법에 준해 실시하였다. GS3 유전자의 분류에 사용된 SF28 (*Pst*I)과 RGS2 마커도 동일한 PCR 조건을 따랐으며, Loading Star로 발색하여 2% agarose gel에서 전기영동하였다. *Pst*I 제한효소는 37℃에서 30분간 처리하였다.

Fig. 1. Rice grains and brown rice of the parents and the F₃ lines.
B : Boseogheugchal, D : Daeribbye 1

Fig. 2. Pedigree diagram of the plant materials in this study.

표현형 마커 유전자형 검정

찰/메성은 6번 염색체에 위치하는 단일 유전자에 의해 조절되며, 찰성 (*wxwx*)은 보석흑찰의 대립유전자 (1), 메성 (*WxWx*)은 대립변 1호의 대립유전자 (3), 찰성과 메성이 같이 존재하는 것은 헤테로 (2)로 유전자형을 부여하였다. 보석흑찰의 종피색은 보라색 혹은 검정색 (purple or black pericarp)를 띠는데 염색체 4번에 위치한 *Ra* (*Pb*)유전자에 의해서 조절된다 (Shao *et al.* 2011). 보석흑찰은 *RaRa* 유전자형을 갖고 있으며, 대립변 1호는 *rara* 유전자형을 나타내어 흰색 종피를 가진다. *Rara* 유전자형의 경우도 종피가 갈색 (brown pericarp)으로 유색을 나타내므로, F₂ 세대에서 종피색을 dominant marker로 보라색 혹은 갈색을 나타내는 개체는 보석흑찰의 대립유전자 (1), 종피색을 갖지 않는 개체는 대립변 1호의 대립유전자 (3)으로 유전자형을 분류하였다. F₃ 세대에서는 각 계통에서 5개의 식물체 종피색을 조사하였는데, 조사된 5개체의 종피색이 모두 유색이면 보석흑찰의 대립유전자 (1), 종피색이 유색과 백색으로 분리되는 계통은 헤테로 (2), 모두 종피색을 갖지 않는 계통은 대립변 1호의 대립유전자 (3)으로 유전자형을 분류하였다.

통계분석 및 QTL분석

통계분석은 Minitab 16.2.4 프로그램으로 수행되었다. QTL 분석은 1원 분산분석 (One-way analysis of variance)을 이용하였고, SSR 마커 및 표현형 마커의 유전자형을 요인으로, 종자 형태 특성 표현형 (종자 길이, 폭, 두께, 천립중)을 반응으로 분석을 수행하였다. 분산분석 결과 표현형과 유전자형 사이에 유의성 ($P < 0.005$)이 있을 때 QTL이 존재하는 것으로 정의하였다. *GW2* 유전자와 *GS3* 유전자의 교호작용을 확인하기 위해 2원 분산분석 (Two-way analysis of variance)이 수행되었다. QTL의 명명은 McCouch (2008)의 방법을 적용하였다.

결과 및 고찰

양친 및 F_{2:3} 집단의 종자 형태 특성

보석흑찰, 대립변 1호, F₂, F₃ 집단의 종자 길이, 폭, 두께 및 천립중을 조사하였다 (Table 1, Fig. 3). 종자 길이는 최소 5.23mm에서 최대 6.96mm의 변이를 보였고, 종자 폭은 2.5mm에서 3.49mm까지의 변이를 보였다. 종자 두께는 1.74mm에서 2.38mm의 분포를 보였고, 천립중은 정조로 최소 22.1g에서 최대 45.8g의 변이를 보였다. 대립변 1호는 보석흑찰에 비해 천립중, 종자 길이, 폭, 두께 모두 높은 것으로 조사되었다. 특히 종자 폭, 두께에서 큰 차이를 보였다. F_{2:3} 집단은 종자 형태 특성 및 천립중 모두 연속변이를 보였다. F₂ 집단에서는 정규분포를 보였고, F₃ 집단은 비교적 약한 정규분포를 나타내었다. 특히 종자 길이와 폭에서는 이정분포 (Bimodal)를 보였는데, 이는 F₂ 세대에서 특정 유전자 조합을 보인 개체를 선발하였기 때문으로 보여진다. 종자 형태 특성에서는 양친의 표현형을 증가하는 초월변이가 관찰되었다. 종자형태 특성이 정규분포를 보이고 초월변이가 관찰되는 것은 이 형질들이 여러 유전자에 의해 조절되는 양적형질이기 때문이다.

유전분석

종자형태 특성과 SSR 마커, 표현형 마커의 유전자형을 이용해 분산분석을 수행한 결과 총 11개의 QTL이 탐지되었다 (Table 2). 천립중에 영향을 주는 4개의 QTL이 2, 3, 4, 6번 염색체에서 발견되었다. 천립중에 관여하는 QTL인 *qTGW2*, *qTGW6*, *qTGW4*는 대립변 1호의 대립유전자가 천립중을 증가시켰다. 반면 *qTGW3*은 보석흑찰의 대립유전자가 천립중을 증가시켰는데, *qTGW3*을 제외한 다른 QTL들은 F₂, F₃ 세대에서 반복적으로 발견되었다. 표현형 변이는 5.7~39.2% 사이의 분포를 보였다. 종자 길이에 영향을 주는 QTL은 총 3개가 발견되었는데, *qGL2*,

Table 1. Comparison of four rice grain traits in the parents and the F_{2:3} populations.

Line	Trait ^x			
	TGW (g)	GL (mm)	GW (mm)	GT (mm)
Boseogheugchal	24.1 ± 1.29 ^y	5.91 ± 0.26	2.62 ± 0.27	1.81 ± 0.11
Daeribbyeol 1	41.9 ± 0.28	6.17 ± 0.16	3.48 ± 0.09	2.24 ± 0.05
F ₂	33.4 ± 4.39	6.09 ± 0.45	3.00 ± 0.22	2.00 ± 0.16
F ₃	33.4 ± 4.10	6.21 ± 0.52	3.03 ± 0.27	2.03 ± 0.19

^x GL: grain length, GW: grain width, GT: grain thickness, TGW: 1,000 grain weight

^y Data are presented as mean ± standard deviation.

Fig. 3. Frequency distributions of four grain traits in the $F_{2:3}$ population. (P_1 : Boseogheugchal, P_2 : Daeribbye 1).

Table 2. QTLs for grain shape traits identified in the Boseogheugchal /Daeribbye 1 $F_{2:3}$ population.

Trait ^w	QTL	Chr.	Marker	R ² (%) ^x		A ^y	
				F ₂	F ₃	F ₂	F ₃
TGW	<i>qTGW2</i>	2	RM12811 - RM12837	39.2	32.0	0.40	0.26
	<i>qTGW3</i>	3	RM15203 - RM15204	5.7	ns ^z	-0.18	-
	<i>qTGW4</i>	4	<i>Ra</i>	13.5	36.9	0.19	0.32
	<i>qTGW6</i>	6	<i>Wx</i> - RM19501	14.0	26.5	0.24	0.27
GL	<i>qGL2</i>	2	RM12811 - RM12837	3.7	5.5	0.10	0.10
	<i>qGL3</i>	3	RM15203 - RM15204	59.3	38.0	-0.34	-0.35
	<i>qGL6</i>	6	<i>Wx</i> - RM19501	13.0	40.2	0.19	0.30
GW	<i>qGW2</i>	2	RM12811 - RM12837	55.9	46.1	0.18	0.15
	<i>qGW6</i>	6	<i>Wx</i> - RM19501	10.2	14.4	0.07	0.10
GT	<i>qGT2</i>	2	RM12811 - RM12837	30.8	24.0	0.10	0.07
	<i>qGT4</i>	4	<i>Ra</i>	19.3	41.8	0.06	0.11

w GL: grain length, GW: grain width, GT: grain thickness, TGW: 1,000 grain weight

x R² : Coefficient of determination, y A : Addictive effect, z ns : Not significant

Fig. 4. Comparative sequencing analysis of Boseogheugchal and Daeribbyeol 1 in *GW2* gene. * This CDS number is based on the Gramene (<http://www.gramene.org/>) database of *GW2* gene (LOC_Os02g14720). The 8 exons are indicated as black boxes, and black line means intron.

*qGL6*는 대립변 1호의 대립유전자 영향으로 종자 길이가 길어졌고, *qGL3*는 보석흑찰의 대립유전자에 의해 종자 길이가 증가하는 것으로 나타났다. 이 QTL들은 최소 3.7%에서 최대 59.3%까지의 표현형 변이를 보였고, F₂, F₃ 세대 모두에서 발견되었다. *qGW2*, *qGW6*는 종자 폭에 관여하는 QTL로 모두 대립변 1호의 대립유전자가 증가시켰다. 표현형 변이는 10.2~55.9%의 분포를 보였고, 그 중 *qGW2*는 F₂, F₃ 세대에서 모두 45%가 넘는 높은 표현형 변이를 보였다. 종자 두께는 *qGT2*와 *qGT4* 2개의 QTL이 발견되었다. 두 QTL 모두 대립변 1호의 염색체단편에 의해 종자가 두꺼워졌다. 종자 두께에 관련된 QTL들은 19.3~41.8%의 표현형 변이를 보였으며, F₂, F₃ 세대 모두에서 발견되었다. 선행 연구에서 동정된 유전자인 *GW2*, *GS3* 유전자에 인접한 SSR 마커 RM12811-RM12837과 RM15203-RM15204에서 각각 4개, 2개의 QTL이 확인되었고, *qSW5/GW5*, *GS5*, *TGW6*, *gw9.1* 인접 SSR 마커에서는 유전자형간에 유의한 차이가 없었다. 찰/메성 (*Wx*), 종피색 (*Ra*)에서는 각각 3개, 2개의 QTL이 발견되었다. 유전분석 결과 단일 QTL 유전자좌에서 종자 폭, 두께, 천립중에 관여하는 QTL이 동시에 발견되었는데 이는 단일 유전자에 의한 다면발현 (Pleiotropic effect)에 의한 것으로 보여진다.

염기서열 분석 및 유전자형 검정

RM12811-RM12837 범위에서 발견된 QTL (*qTGW2*, *qGL2*, *qGW2*, *qGT2*)이 기존에 보고되었던 유전자원과 동일한 *GW2* 유전자 돌연변이를 갖고 있는지 확인하기 위해 보석흑찰과 대립변 1호의 *GW2* 유전자 염기서열 분석을 수행하였다 (Fig. 4). 그 결과 두 계통간에는 1개의 SNP가 존재하였다. 대립변 1호의 *GW2* 유전자 4번째 exon에서 1-bp (A) 결실이 발견되었으며, 이는 기존에 보고된 'WY3'의 1-bp (A) 결실과 같은 위치로 확인되었다. 선행 연구와 마찬가지로 exon지역에서의 1-bp결실은 이후의 아미노산 번역을 조기에 종결시키고, 결과적으로 *GW2* 유전자의 기능을 잃게 되어 대립변 1호의 종자의 폭과 두께를

Fig. 5. Comparison of PCR products amplified using (a) SF28 (*PstI*) CAPS marker and (b) RGS2 InDel marker. L : 100bp Ladder maker, B: Boseogheugchal, D: Daeribbyeol 1, N: Nipponbare, M: Milyang23.

증가시키는 것으로 보여진다.

RM15203-RM15204지역에 의해 발견된 *qTGW3*, *qGL3*가 *GS3* 유전자의 변이에 의한 것인지 확인하기 위해 선행연구에서 개발된 CAPS마커 SF28 (*PstI*)와 InDel마커 RGS2를 이용한 유전자형 검정이 실시되었다. *GS3* 유전자 2번째 exon에 위치하는 SNP에서 A type은 SF28의 PCR산물이 *PstI* 제한효소에 의해 절단되지 않고, C type은 절단된다. 보석흑찰의 SF28 primer PCR산물은 *PstI* 제한효소에 의해 절단되지 않아 A type으로 나타났고, 대립변 1호의 PCR산물은 *PstI* 제한효소에 의해 절단되어 C type으로 분류되었다 (Fig. 5). 이 변이를 염기서열 분석을 통해 확인한 결과 보석흑찰은 A type, 대립변 1호는 C type으로 관찰되었다. InDel마커 (RGS2)를 이용하여 보석흑찰과 대립변 1호의 (TCC)염기의 반복을 확인하였다. (TCC)반복을 확인한 결과 보석흑찰과 대립변 1호 모두 (TCC)가 6회

Table 3. Genotypes and haplotypes of the parents and the check lines in *GS3*.

	SF28 (PstI)	RGS2	Haplotype
Zhenshan 97	C	(TCC) ₅	GS3-1
Nipponbare	C	(TCC) ₆	GS3-2
Minghui 63	A	(TCC) ₆	GS3-3
Chuan 7	C	nd ^x	GS3-4
Boseogheugchal	A	(TCC) ₆	GS3-3
Daeribbyeol 1	C	(TCC) ₆	GS3-2

^x : not determined**Table 4.** Two-way ANOVA of the *GW2* and *GS3* genes in the *F*_{2,3} population.

SV	Trait ^Z							
	GL		GW		GT		TGW	
	F ₂	F ₃	F ₂	F ₃	F ₂	F ₃	F ₂	F ₃
<i>GW2</i>	0.134	0.023*	0.000***	0.000***	0.000***	0.001**	0.006**	0.000***
<i>GS3</i>	0.000***	0.000***	0.061	0.529	0.615	0.521	0.022*	0.007**
<i>GW2/GS3</i>	0.982	0.223	0.986	0.342	0.593	0.453	0.906	0.241

^Z : GL: grain length, GW: grain width, GT: grain thickness, TGW: 1,000 grain weight* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001, Number of plants and lines are 20 and 16 for F₂ and F₃, respectively)

반복되는 것으로 나타났고, 대조품종으로 사용한 Nipponbare는 6반복, 밀양23호는 TCC가 5반복인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 종자 길이가 중정도인 두 품종 Zhenshan 97과 Nipponbare는 Haplotype 각각 ‘GS3-1’과 ‘GS3-2’으로 분류되었다. 이 두 그룹은 SF28에서 모두 C type으로 관찰되었고, ‘GS3-1’은 RGS2마커에서 (TCC)₅를 나타내고 ‘GS3-2’는 (TCC)₆을 보였다. ‘GS3-3’은 종자가 길고, Minghui 63이 이 군에 속하는데 SF28에서 A type을 나타내며 (TCC)₆의 유전자형을 나타낸다. 위와 같은 기준으로 분류했을 때 보석흑찰은 Minghui63과 같은 GS3-3로, 대립변 1호는 Nipponbare와 같은 GS3-2로 구분되었다 (Table 3).

*GW2*와 *GS3*의 상호작용

*GW2*와 *GS3*의 교호작용을 살펴보기 위해 2원 분산분석을 실시하였다. F₂와 F₃세대에서 4종류의 유전자형 *gw2gs3* (A), *gw2GS3* (B), *GW2gs3* (C), *GW2GS3* (D)을 가지며 다른 QTL 지역에서는 보석흑찰의 유전자형을 가진 계통을 선정하여 분석하였다 (F₂ N=20, F₃ N=16). 4가지 유전자형 조합을 요인으로 천립중과 종자 형태 특성 (종자 길이, 폭, 두께)에 대한 분산분석을 수행한 결과 *GW2*와 *GS3* 간에 유의한 상호작용이 나타나지

않았다 (Table 4). 4가지 유전자형 조합 간 종자 길이, 폭, 두께, 천립중을 비교해 본 결과 A그룹의 종자길이가 다른 그룹에 비해 유의적으로 높기 때문에 두 유전자는 상가적으로 작용하는 것으로 보인다. 하지만 대립변 1호(*gw2*) 대립유전자를 가진 B 그룹의 종자길이가 D 그룹의 종자길기와 유의적인 차이를 보이지 않은 것은 주목할 필요가 있다. 종자폭과 두께에서는 A와 B 그룹이 C와 D 그룹보다 유의적으로 높은 값을 보였는데 이는 *GW2*가 종자폭과 두께에 크게 관여한다는 기존의 보고와 일치하고 있다 (Song *et al.* 2007). 천립중에서는 돌연변이 유전자 (*gw2*, *gs3*)가 집적된 A 그룹의 종자중이 다른 그룹보다 무거웠지만 B 군과는 통계적인 유의차가 관찰되지 않았다. 두 유전자간의 상호작용이 통계적인 유의성이 없어 두 유전자는 서로 독립적으로 작용하는 것으로 판단된다 (Fig. 6). 하지만 F_{2,3}세대에서 조사된 개체들의 유전적 배경이 다르고 개체수가 작기 때문에 정확한 분석을 위해서는 근동질 계통 (NIL, Near-isogenic line) 육성을 통한 비교가 필요할 것으로 보인다. Kang *et al.* (2016)은 근동질 계통을 이용한 연구에서 *GS3*의 발현이 대조 품종인 화성벼와 *gw2-NIL*에서는 영향이 없었지만, *gw9.1-NIL*에서는 발현이 줄어들었다고 보고하였다. 이는 *GS3*와 *GW2*의 유전자 발현이 서로 유의한 상호작용이 없다는 것을 의미한다. 반면, Yan *et*

Fig. 6. Comparison of GL, GW, GT and TGW among combinations with *GW2* and *GS3* genotype in the $F_{2.3}$ population. Letters above the bars are ranked by Tukey's test at $P < 0.05$; different letters indicate significant difference. The *gw2* and *GW2* represent plants homozygous for 'Daeribbyeol 1' allele and 'Boseogheugchal' allele at *GW2* gene, respectively. The *gs3* and *GS3* represent plants homozygous for 'Boseogheugchal' allele and homozygous for 'Daeribbyeol 1' allele at *GS3* gene, respectively.

al. (2011)은 RNAi 계통을 이용한 연구에서 *qSW5*와 *GW2*가 *GS3*의 발현을 증가시킨다고 보고하였다. Lu *et al.* (2013)은 자포니가 집단 내에서 *GS3-A* 돌연변이 유전자형을 갖는 *GW2-2*와 *GW2-3* haplotype 간 종자길이에서 유의한 차이가 존재한다고 보고하였다. 이처럼 *GW2*와 *GS3*의 상호작용에 대한 여러 연구 결과가 서로 일치하지 않고, 서로 다른 유전적 배경에서 수행되었기 때문에 더 많은 연구가 필요 할 것으로 보인다.

대립변 1호 종자 크기를 조절하는 유전자

유전분석 결과 대립변 1호의 종자 형태에 관여하는 QTL은 총 9개로 나타났다. 이 중 *qTGW2*, *qGL2*, *qGW2*, *qGT2*는 대립변 1호의 *GW2* 유전자 1-bp (A) 결실로 인한 것으로 확인되었다. *qTGW6*, *qGL6*, *qGW6*는 6번 염색체 찰/메성유전자의 부위에서 발견되었는데, 이 QTL들은 종자중에 관여하는 다른 유전자에 의한 작용으로 생각된다. 다른 연구들에서 반복적으로 발견되는

QTL인 *qGL6*는 찰/메성유전자와 2.6Mb의 거리로 연관되어 있다. *qGL6* 연관 마커인 RM19501를 이용한 결과가 찰/메성의 분산분석 결과와 유사한 것으로 봤을 때, 찰/메성 (*Wx*) 유전자 부위에 존재하는 유전자가 천립중, 종자의 길이, 폭에 관여하는 것으로 생각된다. *qTGW4*와 *qGT4*는 4번 염색체에 존재하는 종피색 조절유전자 (*Ra*)를 표현형 마커로 사용한 분산분석 결과 발견되었다. Redona *et al.* (1998)의 연구에서도 검정 종피색을 dominant marker로 이용하여 종자형태 특성들과 QTL분석을 수행한 결과 종자 무게에 관여하는 유의한 QTL을 발견하였다. 이 결과들은 *Ra* 부위에 종자 무게를 조절하는 유전자가 존재한다는 것을 보여주는 결과로, *qGT4*와 *qTGW4*의 대립변 1호 대립유전자가 천립중과 종자 무게를 증가시키는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 기존에 보고된 유전자와 QTL들과 연관된 SSR 마커들만을 이용하여 유전분석을 수행하였기 때문에 검정되지 않은 다른 염색체 부분에 존재할 수 있는 유전자들의 영향은 분석하지

못하였다. 하지만 *GW2*, *GS3*와 같이 종자형태 특성을 조절하는 주요 유전자 및 QTL이 대립변 1호의 종자형태 변이에 관여함을 밝혔으며, 이 유전자형 분석 결과를 이용하여 F_3 세대에서 양친보다 종자 크기와 무게에서 초월변이를 보이는 계통들을 육성할 수 있었다 (Fig. 1).

적 요

보석흑찰/대립변 1호 교배 $F_{2:3}$ 세대를 이용하여 종자형태 특성에 관여하는 11개의 QTL을 발견하였고, 그 중 9개는 대립변 1호의 종자중을 증가시킨다는 것을 확인하였다. *qTGW2*, *qGW2*, *qGT2*는 기존에 보고된 유전자인 *GW2*의 위치에서 발견 되었으며, *qTGW3*, *qGL3*는 *GS3*에 근접하게 위치해 있었다. 탐지된 QTL들이 보고된 *GW2*와 *GS3*와 동일한지 알기위해 양친의 *GW2* 유전자를 염기서열 분석하였으며, 대립변 1호에서 1-bp 결실이 발견되었는데 이는 기존에 보고된 ‘WY3’과 동일한 돌연변이였다. 기능성 분자표지 (Functional marker)인 SF28을 이용한 유전자형 검정에서 보석흑찰 *GS3*가 C-to-A nonsense mutation을 갖고 있음을 발견하였다. 이 돌연변이는 종자의 길이와 무게를 증가시킨다고 보고되었으며, 보석흑찰에서도 C-to-A 돌연변이에 의한 유전자 기능 상실은 종자의 길이를 증가시킨 것으로 판단된다. $F_{2:3}$ 집단 내의 유전자형 검정 결과를 이용하여 *GW2*와 *GS3*의 상호작용을 살펴본 결과, 두 유전자 사이에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았다. 결과적으로 *GW2*, *qGT4*, *qGL6*가 대립변 1호의 종자중을 증가시키는 것으로 확인되었다.

사 사

이 과제는 차세대바이오그린 21사업 (Project No. PJ011048012016 to S.N.A) 연구비로 수행되었음.

REFERENCES

1. Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
2. Fan C, Xing Y, Mao H, Lu T, Han B, Xu C, Li X, Zhang Q. 2006. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1164-1171.
3. Fan C, Yu S, Wang C, Xing Y. 2009. A causal C-A mutation in the second exon of *GS3* highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 465-472.
4. Furukawa T, Maekawa M, Oki T, Suda I, Iida S, Shimada H, Takamura I, Kadowaki, K. I. 2006. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *The Plant Journal*, 49: 91-102.
5. Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, Murakami N, Hara N, Onodera H, Kashiwagi T, Ujiie K, Shimizu B, Onishi A, Miyagawa H, Katoh E. 2013. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nat. Genet.* 45: 707-711.
6. Kang YJ, Jeon YA, Kang JW, Lee HS, Ahn SN. 2016. Interaction of Rice Quantitative Trait Locus *gw9. 1* with Three Grain Shape Genes. *Plant Breeding and Biotechnology* 4: 51-60.
7. Li Y, Fan C, Xing Y, Jiang Y, Luo L, Sun L, Shao D, Xu C, Li X, Xiao J, He Y, Zhang Q. 2011. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat. Genet.* 43: 1266-1269.
8. Lu L, Shao D, Qiu X, Sun L, Yan W, Zhou X, Yang L, He Y, Yu S, Xing Y. 2013. Natural variation and artificial selection in four genes determine grain shape in rice. *New Phytol.* 200: 1269-1280.
9. Mao H, Sun S, Yao J, Wang C, Yu S, Xu C, Li X, Zhang Q. 2010. Linking differential domain functions of the *GS3* protein to natural variation of grain size in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 19579-19584.
10. McCouch SR, CGSNL (Committee on Gene Symbolization, Nomenclature and Linkage, Rice Genetics Cooperative). 2008. Gene nomenclature system for rice. *Rice* 1: 72-84.
11. Panaud O, Chen X, McCouch SR. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 252: 597-607.
12. Rahman MM, Lee KE, Lee ES, Matin MN, Lee DS, Yun JS, Kim JB, Kang SG. 2013. The genetic constitutions of complementary genes *Pp* and *Pb* determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-O-glucoside depositions in black rice. *Journal of Plant Biology* 56:

- 24-31.
13. Reddy VS, Dash S, Reddy AR. 1995. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L): identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 301-312.
14. Redona ED, Mackill DJ. 1998. Quantitative trait locus analysis for rice panicle and grain characteristics. *Theor. Appl. Genet.* 96: 957-963.
15. Shao Y, Jin L, Zhang G, Lu Y, Shen Y, Bao J. 2011. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1005-1016.
16. Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. 2008. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat. Genet.* 40: 1023-1028.
17. Song XJ, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX. 2007. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat. Genet.* 39: 623-630.
18. Sweeney MT, Thomson MJ, Pfeil BE, McCouch S. 2006. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *The Plant Cell*, 18: 283-294.
19. Takano-Kai N, Jiang H, Kubo T, Sweeney M, Matsumoto T, Kanamori H, Padhukasahasram B, Bustanmante C, Yoshimura A, Doi K, McCouch S. 2009. Evolutionary history of *GS3*, a gene conferring grain length in rice. *Genetics* 182: 1323-1334.
20. Wang C, Shu Q. 2007. Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene *Pb* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese science bulletin* 52: 3097-3104.
21. Wang C, Chen S, Yu S. 2010. Functional markers developed from multiple loci in *GS3* for fine marker-assisted selection of grain length in rice. *Theor. Appl. Genet.* 122: 905-913.
22. Wang S, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, Zeng R, Zhu H, Dong G, Qian Q, Zhang G, Fu X. 2012. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nat. Genet.* 44: 950-954.
23. Weng J, Gu S, Wan X, Gao H, Guo T, Su N, Lei C, Zhan X, Cheng Z, Guo X, Wang J, Jiang L, Zhai H, Wan J. 2008. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell research* 18: 1199-1209.
24. Xie X, Jin F, Song MH, Suh JP, Hwang HG, Kim YG, McCouch SR, Ahn SN. 2008. Fine mapping of a yield-enhancing QTL cluster associated with transgressive variation in an *Oryza sativa* x *O. rufipogon* cross. *Theor. Appl. Genet.* 116: 613-622.
25. Yan S, Zou G, Li S, Wang H, Liu H, Zhai G, Guo P, Song H, Yan C, Tao Y. 2011. Seed size is determined by the combinations of the genes controlling different seed characteristics in rice. *Theor. Appl. Genet.* 123: 1173-1181.
26. Ying JZ, Gao JP, Shan JX, Zhu MZ, Shi M, Lin HX. 2012. Dissecting the genetic basis of extremely large grain shape in rice cultivar 'JZ1560'. *J. Genet. Genom.* 39: 325-333.
27. Yoon DB, Kang KH, Kim HJ, Ju HG, Kwon SJ, Suh JP, Jeong OY, Ahn SN. 2006. Mapping quantitative trait loci for yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza grandiglumis* and the *O. sativa* japonica cultivar Hwaseongbyeon. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1052-1062.