자포니카 벼의 담수발아 내성에 대한 QTL 분석

김진희 · 모영준 · 하수경 · 김우재 · 김보경 · 정지웅 · 정종민*

농촌진흥청 국립식량과학원

QTL Analysis for Tolerance to Anaerobic Germination in *Japonica* Rice (*Oryza Sativa* L.)

Jinhee Kim, Youngjun Mo, Su-Kyung Ha, Woo-Jae Kim, Bo-Kyeong Kim, Ji-Ung Jeung, and Jong-Min Jeong*

National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk, 55365, Republic of Korea

Abstract Hypoxia caused by water seeding of rice inhibits germination and often leads to serious problems in seedling establishment and early growth. To solve this problem, it is necessary to develop rice cultivars that can stably germinate and grow under anaerobic environments. In this study, we performed QTL analysis on anaerobic germination (AG) tolerance using 139 recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between Milyang23 and Gihobyeo, and identified two QTLs (*qAG2.1*, *qAG2.2*) on chromosome 2. The LOD scores at *qAG2.1* and *qAG2.2* were 3.30 and 5.31, respectively. The phenotypic variances explained by the QTLs were 9.19% and 14.99%, respectively. The *japonica* cultivar Gihobyeo provided alleles for AG tolerance at both QTLs. While the chromosomal location of *qAG2.2* overlapped with previously identified QTLs for AG tolerance, *qAG2.1* was detected in a locus that has not been reported previously. The RILs carrying favorable type alleles for the AG tolerance at both QTLs (*qAG2.1* + *qAG2.2*) expressed 41.0% survival rate under the AG condition, which was significantly higher than those of the RILs carrying single QTL, *qAG2.1* (22.0%) or *qAG2.2* (26.2%). As the favorable alleles for the two QTLs found in this study derived from the *japonica* cultivar Gihobyeo, it is expected that they would accompany less linkage drag such as shattering and lodging compared to those derived from *indica* or landraces. The result of this study would provide useful information for improving AG tolerance of *japonica* rice cultivars that can be used for water seeding cultivation.

Keywords AG tolerance, Quantitative trait locus, Rice, Direct seeding, Abiotic stress

Received on August 26, 2019. Revised on September 2, 2019. Accepted on September 19, 2019.

* Corresponding Author (E-mail: jjm0820@korea.kr, Tel: +82-63-238-5236, Fax: +82-63-238-5205)

서 언

벼는 전세계적으로 주요 식량 작물 중 하나로 전 세계 인구의 절반 이상이 주식으로 하고 있으며, 특히 전세계 벼 생산량(481백 만톤) 중 90% 이상이 아시아에서 생산될 만큼 아시아에서 중요한 작물이다(FAO 2017). 벼의 재배는 파종 방법에 따라 이앙재배(Transplanting)와 직파재배(Direct Seeding)로 구분된다. 직파재배는 이앙재배와 달리 육묘 과정 없이 종자를 직접 논에 뿌리기 때문에 비용과 노동력 절감효과가 크다. 이러한 장점으로 인해 직파재배는 미국이나 호주 등 대규모 농경지에서 널리 사용되고 있으며, 최근에는 경지 규모가 상대적으로 적은 아시아 국가에서도 벼 재배의 생력화를 위하여 직파재배 면적이 증가하는 추세이다(Pandey & Velasco 2002, Dawe 2005). 직파 재배는 물 관리 방법에 따라 크게 담수직파와 건답직파로 나눌 수 있는데, 담수직파는 담수 상태의 논에서 볍씨를 직접 파종하기 때문에 건답직파

에 비해 파종 과정이 간단하고, 담수로 인한 잡초 방제에 유리한 장점이 있다. 하지만 담수로 인한 저산소 스트레스로 발아가 불균일하고 입모가 불안정해지는 단점이 있으며 특히, 경지정리와 배수 상태가 불량한 경우 이러한 문제는 더욱 악화된다(Ismail et al. 2012, Septiningsih et al. 2013). 따라서 담수직파 안정성 확보를 위해서는 발아 및 초기 입모 개선이 필수적이다. 현재 직파 적응성 품종으로 저온발아성과 도복저항성이 개선된 품종들이 있지만(Shon et al. 2012) 이들 품종은 대부분 이앙재배 조건과 직파점용으로 개발되어 담수직파 적응성은 다소 부족한 실정이다. 우리나라 직파재배법은 1992년부터 보급되기 시작하여, 1995년에 전체 재배면적의 11.1% (117.5/1,056천 ha)로 확대 되었으나, 직파재배 전용 품종의 부족, 재배방법 실용화의 어려움으로 2014년 2.3% (23.0/815천 ha)로 감소하였다(Park 2018). 최근에는 직파재배 적응 품종의 개발, 다양한 재배 방법의 보급 및 확산 등으로 인하여 직파재배 면적이 2018년에 3.2% (23.0/705천 ha)로 소폭

증가하였으나(Choi 2018) 재배면적 확대에는 어려움이 있다. 담수 환경에서도 발아력이 우수하고 초기 입모가 안정적인 품종 개발은 직파 재배의 확대를 위하여 필요하다(Biswas & Yamauchi 1997, Kim & Reinke 2018).

벼는 다른 작물과 달리 산소가 낮은 담수 상태에서도 종자의 발아와 생육이 가능한 것으로 알려져 있으나(Perata et al. 1993, Ella & Setter 1999, Perata & Voisenek 2006) 유전자형에 따라 담수발아 내성의 차이가 있으며 대부분의 재배 벼 품종은 담수 상태의 저산소 스트레스에 민감한 것으로 보고되고 있다(Jackson & Ram 2003, Sarkar et al. 2006, Mackill et al. 2012). 담수 발아 내성 자원의 경우, 담수 상태에서 산소의 결핍으로 인해 발아에 필요한 에너지원이 제한되면 생존에 필요한 산소를 얻기 위하여 정산 조건보다 초엽을 급속하게 성장시켜 수면에 빨리 도달하게 하여 산소를 흡수함으로써, 뿌리와 배유로 산소가 전달되어 생존하는 기작을 가지고 있다(Perata et al. 1997, Ella & Setter 1999, Hwang et al. 1999). 이러한 내성 기작은 전분 분해 효소, 알콜발효, 빠른 세포신장 등이 관여하는 것으로 보고되어 있다(Ismail et al. 2009, Narsai et al. 2015, Miro et al. 2017, Zhang et al. 2017). 전분의 분해는 종자 발아 시 배아 발달의 주요 에너지원이며, 특히 아밀라아제는 종자의 전분 분해에 중요한 효소이다(Murata et al. 1968, Loreti et al. 2003). 벼의 담수 조건에서 α -아밀라아제의 활성은, 담수 상태에서 전분 분해에 중요한 역할을 하여 종자 발아에 필요한 에너지를 공급한다고 알려져 있다(Perata et al. 1992, 1993, Hwang et al. 1999, Ismail et al. 2009). 지난 20년간 담수발아 내성과 관련된 연구는 지속적으로 수행되고 있으나, 그 기작이 매우 복잡하고 저항성을 가진 유전자원도 한정되어 있어, 담수직파 재배에 유리한 품종을 개발하는데 어려움이 있다(Yamauchi et al. 1993, Redona & Mackill 1996, Yamauchi & Winn 1996, Biswas & Yamauchi 1997).

담수발아 내성은 환경요인에 큰 영향을 받으므로 주동 유전자의 발견이 어려우며 그 보고는 다소 제한적이다. 현재까지 밝혀진 담수발아 내성 주동 유전자위는 인디카 또는 잡초벼인 Khao Hlan On에서 유래하여 담수 발아 내성 관련 표현형 변이의 33.5%를 설명하는 9번 염색체 상의 *qAG-9-2* (Angaji et al. 2010), 중국의 재래종 Ma-Zhan Red에서 유래하였고 표현형 변이 31.7%를 설명하는 7번 염색체 상의 *qAG7.1* (Septiningsih et al. 2013), aus 재래종 Nanhi로부터 표현형 변이 22.3%를 설명하는 7번 염색체 상의 *qAG7* 등이 보고 되었다(Baltazar et al. 2014). 이에 반해 자포니

카의 담수 발아 내성 연구는 상대적으로 부족하며, 관련 유전자원도 부족한 실정이다. 자포니카 유래 담수 발아 내성 유전자원으로는 일본 품종인 Kinmaze에서 유래하였고 표현형 변이는 12.1%, 15.6%, 10.5%를 설명하는 1번, 2번, 7번 염색체 상의 *qAG1*, *qAG2*, *qAG7*이 확인 되었으며, 자포니카 계통인 USSR5에서 유래하였고 표현형 변이는 15.5%, 10.9%를 설명하는 5번, 11번 염색체 상의 *qAG-5*, *qAG-11* 등이 있다(Jiang et al. 2004, Jiang et al. 2006).

본 연구는 자포니카 벼의 담수 발아 내성 개선 및 새로운 담수 발아 내성 유전자를 도입한 자포니카 품종 육성을 위한 유전자원의 개발을 목표로 진행되었다. 총 327개(168 SSRs 와 159 SNPs) 분자표지와 139개의 RIL 집단을 이용하여 기호벼(자포니카)에서 유래된 2개의 담수 발아 내성 QTL을 2번 염색체 상에서 확인하였다. 이 결과는 담수 발아 내성 자포니카 벼의 육종에 유용한 유전자원으로 활용되어 직파재배 적응 품종 개발에 기여할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

식물 재료

본 연구에서는 자포니카 품종 유래 담수발아 내성 QTL 분석을 위하여 밀양23호(통일)와 기호벼(자포니카)의 교배를 통해 육성된 자식성 재조합 집단(Recombinant Inbred Line; MGRIL)을 실험재료로 사용하였다. 이 집단은 1988년도에 교배되어, F₂를 자식하여 확보한 종자를 일주일계통법(Single Seed Descent method)을 이용하여 F₆ 세대까지 육성하였으며, 이 후 F₇ 세대부터는 일계통 일종자법을 통해 25세대 이상 고정된 집단이다(Ji et al. 2012). MGRIL 162 계통 중 종자의 혼입이나 계통 내에서 분리가 되지 않고 작물학적 특성 발현이 균일한 139 계통을 선별하여 본 연구에 시험 재료로 사용하였다. 실험에서 사용된 종자는, 2017년에 국립식량과학원 시험포장(전라북도 완주군)에서 표준재배법으로 증식한 후 수확하였다. 수확된 종자는 활력 유지를 위해 수분함량을 약 15% 정도로 건조 후 4℃ 저온 저장고에 보관하였으며 매 실험마다 적온(30℃)에서 발아 검정을 통하여 정상 발아 정도를 평가한 후 담수 시험에 사용하였다.

담수 내성 표현형 평가

양친 및 MGRIL의 담수발아 내성 검정은 2017년 국립식량과학원 인공기상동에서 Septiningsih et al. (2013) 방법을 약간 변형하여 수행되었다. 수도용 플라스틱 파종 상자(72공, 12 × 6)에

3.5 cm 정도의 수도용 상토를 채운 후 계통 당 30개의 마른 종자를 3개의 파종 구멍에 각 10개씩 나누어 파종한 후 1 cm 두께로 상토를 복토하였다. 이후 담수를 위하여 파종 상자를 저수용 수조(길이 × 너비 × 깊이; 2.3 × 1.2 × 0.3 m)로 옮긴 후 수심 10 cm 깊이로 담수 처리 후 시험기간 동안 유지 하였다. 담수발아 내성 평가는 평균온도가 21°C로 설정된 온실조건에서 수행하였으며, 파종 후 21일 후 수면위로 초엽이 출현한 개체를 생존의 기준으로 하여 아래와 같이 생존율을 계산하였다.

$$SVR=(N/S) \times 100$$

(SVR: 생존율, N: 생존 종자수, S: 파종 종자수)

SSR와 SNP 마커를 이용한 유전자형 분석

MGRIL 유전자형 분석은 SSR (Simple Sequence Repeat) 마커와 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 칩을 이용하여 분석하였다. SSR 분석은 전체 671개의 SSR마커를 이용하였으며 밀양23호와 기호벼 간의 다형성을 보인 마커를 선별하여 MGRIL 집단에 유전자형 분석을 진행하였다. PCR반응은 10 μM의 primer, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 ng template DNA 그리고 0.5 U의 Taq polymerase를 포함한 총 20 μl의 반응액을 이용하여 진행하였다. PCR 증폭 조건은 처음 denaturation은 95°C에서 8분, 그리고 94°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분 extension을 실행하고 이를 35 cycle 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 10분 extension으로 수행되었다. PCR 산물은 수직 전기영동 장치(Nihon Eido Co. NA-1114)에서 8% natural acrylamide gel을 이용하여 308V에서 2시간 정도 전기영동 하였다. 이후 Silver staining (SILVER SEQUENCETM Staining Reagent Kit, Promega)을 이용하여 다형성을 확인하였다. SNP genotyping은 384개의 SNP marker로 구성된 Illumina BeadXpress 384-plex SNP plate GS0011861을 사용하였으며, Vera Code manual protocol (Illumina, San Diego, CA, USA)의 방법에 의하여 다형성 분석을 실시한 후 Illumina BeadXpress Reader를 사용하여 다형성을 확인하였다. 유전자형은 ALCHEMY software를 이용하여 판정하였다(Wright et al. 2010).

연관 지도(Linkage map) 작성과 QTL 분석

연관 지도는 MAPMAKER/EXP 3.0을 사용하여 작성하였다 (Lincoln et al. 1993). 모부분에 대해 다형성을 나타내는 678개의 마커(424 SSRs and 254 SNPs) 중 결측치가 15% 이상이거나 연관 지도에서 위치가 중복된 마커를 제외한 327개(168 SSRs

and 159 SNPs) 마커를 이용하여 유전자 지도를 작성하였다.

QTL 분석은 IciMapping Version 4.1을 이용하였다. 누락된 표현형 값은 분석에서 제외하였다. QTL 분석은 표현형 데이터와 SSR와 SNP의 유전형 데이터를 이용하여 IM (interval mapping) 방법과 CIM (Composite Interval Mapping) 방법을 이용하여 QTL 분석을 수행하였다(Zhang et al. 2008). 유의한 QTL의 존재를 결정하기 위한 LOD의 임계값은 $p \leq 0.05$ 조건에 1000 반복으로 permutation test에 의해 결정하였다(Churchill & Doerge 1994). QTL 명명은 McCouch (2008) 방법을 따랐다. 후보 유전자 검색은 Rap- db (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp>)와 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu>)를 이용하였다.

결과 및 고찰

유전분석 집단의 표현형 검정 및 연관 지도 작성

상온 조건에서 종자의 발아율을 조사한 결과, 밀양23호와 기호벼의 발아율은 모두 97% 이상으로 정상적으로 발아하였다. 또한 139개 MGRIL 계통의 평균 발아율은 94.2%로 대부분의 계통이 정상적으로 발아하였다. 수심 10 cm의 담수조건에서 21일 후, 생존율은 모본인 밀양23호와 부분인 기호벼가 각각 6.7%, 63.3%로 자포니카인 기호벼의 생존율이 통일형인 밀양23호 보다 높게 나타났다. MGRIL 139계통의 평균 생존율은 분포는 0~86.7%로 밀양23호 방향으로 치우친 연속 분포하였다. 전체 계통에서 18 계통이(13%) 모본인 밀양23호보다 생존율이 낮았으며, 6 계통이(4%) 부분인 기호벼보다 생존율이 높았다. 생존율의 분포도는 좌측으로 치우치는 연속적인 분포를 보여, 1개 이상의 복수 유전자에 의하여 조절되는 양적형질임을 확인하였다 (Fig. 1, Table 1). RIL 집단은 담수 발아 내성과 감수성 모두에서 초월 분리(Transgressive Segregation)를 보였다.

1,055개 마커(671 SSRs, 384 SNPs)를 이용하여 밀양23호와 기호벼에 대한 마커 다형성 검정을 실시하였다. 671개의 SSR 마커 중 424개(65.5%)가 다형성을 보였으며, 384개 SNP 마커 중 254개(65.8%)가 다형성을 보였다. SSR, SNP 각 마커의 염색체당 다형성 범위는 각각 38.9%~90.0%, 46.4%~86.7%였다. 5번 염색체에서 SNP와 SSR 마커 다형성은 각각 38.9, 46.4%로 가장 낮은 다형성을 보였다. 총 678개(424 SSRs, 254 SNPs) 마커 중 염색체 상 위치가 중복 되거나 혹은 불분명한 것을 제외한 327개의(168 SSRs, 159 SNPs) 마커를 이용하여 연관지도를 작성하였다. 연관지도의 총 길이는 1564.0 cM이었으며, 마커

Table 1. Variation in survival rate (%) in the RIL population and its parents under anaerobic conditions.

Treatment	Parent		RIL					
	Milyang23	Gihobyeyo						
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	CV	Min	Max	Skewness	Kurtosis
Normal ^z	97.3±2.5	97.7±1.5	94.2±10.5	11.1	20.6	100.0	-3.74	18.91
AG ^y	6.7±11.6	63.3±15.3	27.4±19.8	72.2	0.0	86.7	0.50	-0.51

^zThe clean seeds were germinated at 30°C in a petri dish covered with moist filter paper.

^yAfter sowing, the seedling boxed were submerged in the depth 10 cm water. The evaluation was performed 21 days after sowing.

Table 2. Summary of the molecular markers used for linkage map construction.

Chr.	Total no. of DNA markers		No. of polymorphic markers		Polymorphism (%)		No. of markers used for linkage map construction ^z		Length ^y (cM)	Avg. distance ^x (cM)
	SSR	SNP	SSR	SNP	SSR	SNP	SSR	SNP		
1	83	44	63	34	75.9	77.3	16	20	190.0	5.3
2	80	37	32	32	40.0	86.5	19	15	159.0	4.7
3	68	41	43	23	63.2	56.1	21	19	182.5	4.6
4	50	35	28	20	56.0	57.1	12	10	138.4	6.3
5	72	28	28	13	38.9	46.4	11	8	137.3	7.2
6	36	35	27	20	75.0	57.1	10	16	110.3	4.2
7	44	30	37	26	84.1	86.7	12	18	120.9	4.0
8	54	29	41	21	75.9	72.4	15	11	137.8	5.3
9	40	23	36	18	90.0	78.3	14	12	85.4	3.3
10	38	24	26	14	68.4	58.3	9	11	75.1	3.8
11	53	30	34	18	64.2	60.0	16	11	108.3	4.0
12	53	28	29	15	54.7	53.6	13	8	119.0	5.7
Total (average)	671	384	424	254	(65.5)	(65.8)	168	159	1,564.0	(4.8)

^zMarkers selected for linkage map construction.

^yChromosome length.

^xAverage distance between two adjacent markers.

Fig. 1. Frequency distribution of survival rate for AG tolerance in the Milyang23/Gihobyeyo RIL population. Vertical arrows indicate the average survival rates of Milyang23 and Gihobyeyo.

간 평균 거리는 4.8 cM 이었다(Fig. 2, Table 2). 염색체당 마커의 수는 19-40개 였으며, 각각의 염색체당 마커가 균등하게 분포되어 있었다. 유전자 지도에서 각 염색체당 마커 분포가 균일하고 밀도도 비교적 높았기 때문에 주요 QTL이 유실되지 않았을 것으로 추측할 수 있다(Fig. 2, Table 2).

담수발아 내성 QTL 분석

MGRIL 집단의 담수 생존율 표현형 데이터와 유전자형 정보를 이용하여 IciMapping ver. 4.1 소프트웨어(CAAS, China)의 Interval Mapping (IM)과 Composite Interval Mapping (CIM) 방법으로 QTL을 분석하였다. 담수 발아 내성 QTL 분석결과 2번 염색체 상에서 헝기발아 내성과 연관된 2개 유의한 QTL이 탐색 되었으며, 2개의 QTL은 모두 기호벼 대립인자가 담수

Table 3. QTL for AG tolerance identified from the Milyang23/Gihobyeyo RIL population.

QTL	Chr.	Flanking markers		IM				CIM			
		Left marker	Right marker	LOD ^z	PVE ^y (%)	Add ^x	Position ^w	LOD	PVE (%)	Add	Position
<i>qAG2.1</i>	2	RM6230	id2003067	3.30	9.19	-5.96 ^v	39.6	3.06	8.67	-6.42	40.6
<i>qAG2.2</i>	2	id2010818	id2011139	5.31	14.99	-7.61	104.6	5.01	12.81	-7.81	104.6

IM: Interval Mapping.

CIM: Composite Interval Mapping.

^zLOD experiment-wise $p=0.05$ was equivalent to the critical LOD score threshold of 2.5.^yPercent phenotypic variation explained by the QTL.^xAdditive effect. = (mean of the lines carrying the Milyang23 allele - mean of the lines carrying the Gihobyeyo allele)/2.^wMarker position in cM on chromosome.^vNegative value indicate additive effects from Gihobyeyo. **Fig. 2.** Linkage map composed of 327 markers (168 SSRs and 159 SNPs) in the Milyang23/Gihobyeyo RIL population. The linkage map was generated using QTL IciMapping program ver. 4.1.

시 생존율을 증가시키는 쪽으로 작용하였다. 이들 QTL은 각각 *qAG2.1*, *qAG2.2*로 명명하였다. 두개의 QTL은 각각 IM, CIM 방법에서 동일한 위치에서 탐색되었다(Fig. 3, Table 3). *qAG2.1*는 IM, CIM 방법에서 LOD 값은 각각 3.30, 3.06이었으며, 표현형 변이는 각각 9.19%, 8.67%를 설명하였다. *qAG2.2*는 IM, CIM 방법에서 LOD 값은 각각 5.31, 5.01이었으며, 표현형 변이는 각각 14.99%, 12.81%를 설명하였다.

*qAG2.1*는 RM6230과 id2003067 (5.202-5.836 Mb)의 사이에

서 탐색 되었으며, 이는 기존에 보고되지 않은 영역으로 담수 발아 내성 관련 새로운 유전인자를 가지고 있는 것으로 예상된다. *qAG2.2*는 id2010818과 id2011139 (2.497-2.558 Mb)의 사이에 위치하였다. *qAG2.2*는 Jiang et al. (2004)이 보고한 Kinmaze (자포니카) 유래 담수발아 내성 QTL인 *qAG2*의 R418과 C560 (2.366-2.895 Mb) 영역과 IR72 (인디카) 유래 침수 내성 QTL인 *qSUB2.1*의 RM6318과 RM2578 (2.442-3.225 Mb)영역에 중첩 되었다(Septiningsih et al. 2012). 담수발아 내성 QTL은 저온내

Table 4. Putative candidates annotated within the QTL regions associated with AG tolerance on chromosome 2.

QTL name	Locus	Chr.	Description	Transcript evidence
<i>qAG2.1</i>	Os02g0202400 ^z (LOC_Os02g10800) ^y	2	ADP-glucose transporter, Plastidic translocator, Starch synthesis during seed development (Os02t0202400-01)(mitochondrial carrier protein, putative, expressed)	AK107368
	Os02g0195600 (LOC_Os02g10200)	2	A20/AN1-type zinc finger protein, Regulation of plant growth and abiotic stress response, Modulation of gibberellins (GA) and abscisic acid (ABA) biosynthesis (zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein, putative, expressed)	AK067403
<i>qAG2.2</i>	Os02g0146600 (LOC_Os02g05330.1)	2	Similar to Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) (eIF-4A). (DEAD-box ATP-dependent RNA helicase, putative, expressed)	AK073620

^zOs ID: Rice Annotation Project Database (RAB DB) based on rice genome sequence IRGSP-1.0.^yLOC_Os ID: MSU Rice Genome Annotation Project Release 7. **Fig. 3.** Two AG tolerance QTLs detected on chromosome 2 from the Milyang23/Gihobyoe RIL population. Dotted line indicates the threshold LOD value of 3.0.

성, 종자휴면 QTL과 관련 있다고 알려져 있다. *qAG2.2*는 저온내성 QTL인 *qCSH2* (2.080-2.580 Mb)와 중첩되었으며(Han et al. 2007), *qCTS2* (1.934-2.442 Mb) 및 *qCTS-2* (1.877-1.934 Mb)와도 비슷한 위치에 존재하였다(Lou et al. 2007, Liu et al. 2013). 또한 종자 휴면 QTL인 *qSst-2* (2.827-3.15 Mb)와도 유사한 위치에 존재하였다(Xie et al. 2011). 한편 본 연구에서 탐색한 *qAG2.2*는 약 60 kb 영역으로 기존에 유사 부위에서 보고된 QTL들에 비하여 염색체 상의 위치가 보다 정밀하였다.

본 연구의 QTL 유전자좌의 후보 유전자 분석을 통하여 *qAG2.1*의 유전자좌에서 2개(Os02g0202400, Os02g0195600)의 후보 유전자를 선발하였다. *qAG2.1*에서 선발한 Os02g0202400 (ADP-glucose transporter)은 종자의 전분 합성 및 전분 알갱이 형성에 관여 하는 것으로 보고되었으며(Li et al. 2017), Os02g0195600 (A20/AN1-type zinc finger protein)은 식물 생장 및 비생물적 스트레스 반응을 조절 하는 것으로 보고되었다(Zhang et al. 2015). *qAG2.2*의 유전자좌에서 선발 된 Os02g0146600 (Eukaryotic initiation factor 4A)은 비 생물학적 스트레스인 염해 및 건조 스트레스 조건에서 내성 기능을 하는 것으로 보고되었다(Santosh Rama Bhadra Rao et al. 2017)(Table 4). 본 연구에서 탐색된 유전자좌에 담수발아 내성 및 저온내성, 종자 휴면에 동시에 영향하는 단일 유전자가 존재하는지, 또는 유사한 위치에 있는 두 개 이상의 유전자들이 서로 다른 형질에 영향하는지 밝히기 위해서, 확인 된 3개의 후보 유전자와 이외의 QTL 영역내의 후보 유전자의 추가적인 정밀 유전자 지도작성(Fine Mapping) 및 유전자 동정연구가 필요하다.

QTL 조합에 따른 담수 생존율 변화

두 개의 QTL과 생존율 사이의 관계에 기초하여 생존율에 관여하는 QTL의 조합에 따른 집적 효과를 확인하였다. *qAG2.1*과 *qAG2.2*의 QTL 영역에서 LOD 값이 가장 높은 곳에 위치한 분자마커 RM6230과 id2010818을 선발하였다. 이들 분자 마커를 이용하여 QTL의 집적 여부에 따라 MGRIL 집단을 총 4개의 그룹으로 나누었다(Fig 4). 담수발아 내성에 대해 기호변 대립인자 QTL (*qAG2.1* + *qAG2.2*)을 모두 보유한 계통은 42 계통이었다. 이들의 계통들의 평균 담수 생존율은 41.0% 이었다. *qAG2.1* 및 *qAG2.2* 중 어느 하나의 QTL을 보유한 계통은 각각 31 계통이었으며, 이들 계통들의 평균 생존율은 각각 22.0%와 26.2%로

Fig. 4. Survival rate of the Milyang23/Gihobyeyo RILs carrying different allele combinations of *qAG2.1* and *qAG2.2*. Letters from a to c indicate significantly different values according to the Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$). Errors bars indicate the standard errors of each category.

2개의 QTL이 집적된 계통 보다는 생존율이 낮았다. 담수발아 내성 QTL이 확인되지 않은 30계통의 평균 생존율은 14.6%로 확인되었다. 2개 QTL (*qAG2.1*, *qAG2.2*)의 집적에 따라 담수 상태에서 생존율이 향상 됨을 확인하였다. 그러나 두 QTL이 집적된 계통의 생존율은 부분인 기호벼의 생존율 63.3%보다 낮았으며, 담수 발아 내성 QTL을 보유하지 않은 계통의 평균 생존율은 14.6%로 밀양23호의 생존율인 6.7%에 비하여 높았다. 이를 통해 *qAG2.1*과 *qAG2.2* 이외에도 담수 발아 내성에 관여하는 미동 유전자가 추가적으로 존재함을 예상할 수 있었다. Duncan 검정 결과, 담수 발아 내성 QTL을 보유하지 않은 계통(No QTLs)에 비하여 *qAG2.2*를 보유한 계통들은 담수 발아율이 유의하게 높았지만 *qAG2.1*을 보유한 계통은 발아율 개선이 다소 적은 경향이었다. 2-way ANOVA로 두 QTL 간의 상호작용 여부를 검정한 결과, 유의한 상호작용이 없는 것으로 확인되었다($p=0.215$).

Kim & Reinke (2018)는 QTL의 집적(*qAG1a,b+qAG8*)에 따라 무산소 상태에서 발아율이 향상됨을 보고하였으며 Kim et al. (2019)는 담수 발아 내성 유전자를 가진 KHO(인디카)를 이용하여 동안벼(자포니카)에 분자표지활용 여교배(Marker Assisted Backcrossing)를 통한 담수 발아 내성이 개선된 계통을 선발하였으나, 자포니카 유전적 배경에서는 담수 발아 내성 QTL의 효과가 감소하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 탐색한 담수 발아 내성 QTL은 자포니카 품종인 기호벼에서 유래된 것으로, 자포니카 담수 발아 내성 품종 개발을 위해 교배 시 linkage drag로 인한 열악형질 동반이 낮을 것이며, QTL 효과도 비교적 잘 유지될 것으로 기대된다. 따라서 열악형질 동반을 제거하기 위한 NIL

육성에 필요한 시간과 노동이 감소될 것이며, 자포니카 담수 발아 내성 품종 육성에 직접적으로 이용이 가능할 것이다. 현재 *qAG2.1*과 *qAG2.2*를 모두 보유하여 담수 발아 내성이 높은 것으로 확인 된 RIL 계통들은 담수 발아 내성 증진을 위한 교배모본으로 이용 될 것이며 담수 발아 내성 자포니카 벼 품종 개발에 유용할 활용될 것으로 기대된다.

적 요

자포니카 벼의 담수발아 내성 증진을 위하여, 밀양23호와 기호벼 교배를 통해 육성된 MGRIL 을 이용하여 담수 내성 QTL을 탐색하였다. QTL 분석을 통하여 기호벼(자포니카)에서 유래한 2개의 담수발아 내성 QTL인 *qAG2.1*과 *qAG2.2*를 2번 염색체에서 탐색하였다. *qAG2.1*는 기존에 보고 된 적이 없던 새로운 험기발아 내성 QTL인 것으로 확인 되었으며 *qAG2.2*은 이전 연구를 통해 보고된 자포니카 품종인 Kinmaze 유래 험기 내성 QTL과 인디카 품종 IR72 유래의 담수내성 QTL과 위치가 중첩되었다. 본 연구에서는 *qAG2.2* 위치를 60 kb로 영역으로 한정하여 기존 연구보다 QTL 영역을 정밀화하였다. QTL 효과 분석을 통하여 *qAG2.1*과 *qAG2.2* 두 개의 QTL이 집적되었을 때, 담수 생존율이 향상됨을 확인하였다. 본 논문에서 탐색된 QTL은 자포니카 품종인 기호벼에서 유래하여 국내 자포니카 벼의 담수 발아 개선에 유용하게 활용될것이다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01102001)의 지원으로 수행된 결과입니다.

REFERENCES

1. Angaji SA, Septiningsih EM, Mackill DJ, Ismail AM. 2010. QTLs associated with tolerance of flooding during germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 172: 159-168.
2. Baltazar MD, Ignacio JCI, Thomson MJ, Ismail AM, Mendioro MS, Septiningsih EM. 2014. QTL mapping for tolerance of anaerobic germination from IR64 and the aus landrace Nanhi using SNP genotyping. *Euphytica* 197: 251-260.
3. Biswas JK, Yamauchi M. 1997. Mechanism of seedling establishment of direct-seeded rice (*Oryza sativa* L.) under

- lowland conditions. Bot Bull Acad Sin 38: 29-32.
4. Choi KJ. 2018. Status of rice direct seeding and stabligration of rice establishment in direct seeding. In Oh MK, Choi KJ, Lee CK, Hwang UH, Jeong JH, Choi IB, Lee HS, Yang SY, Yoon JT (Eds.). Education of rice direct seeding and labor saving culture. NICS, RDA, Wanju. pp. 13-44.
5. Dawe D. 2005. Increasing water productivity in rice-based systems in Asia-past trends, current problems, and future prospects. Plant Prod Sci 8: 221-230.
6. Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138: 963-971.
7. Ella ES, Setter TL. 1999. Importance of seed carbohydrates in rice seedling establishment under anoxia. In VI Symposium on Stand Establishment and ISHS Seed Symposium. Acta Horti 504: 209-218.
8. FAO. 2017. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
9. Han L, Qiao Y, Zhang S, Zhang Y, Cao G, Kim J, Lee K, Koh H. 2007. Identification of quantitative trait loci for cold response of seedling vigor traits in rice. J Genet Genomics 34: 239-246.
10. Hwang YS, Thomas BR, Rodriguez RL. 1999. Differential expression of rice α -amylase genes during seedling development under anoxia. Plant Mol Biol 40: 911-920.
11. Ismail AM, Ella ES, Vergara GV, Mackill DJ. 2009. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). Ann Bot 103: 197-209.
12. Ismail AM, Johnson DE, Ella ES, Vergara GV, Baltazar AM. 2012. Adaptation to flooding during emergence and seedling growth in rice and weeds, and implications for crop establishment. AoB Plants 2012.
13. Jackson MB, Ram PC. 2003. Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. Ann Bot 91: 227-241.
14. Ji HS, Kim HB, Lee GS, Yoon UH, Kim TH, Seol YJ, Yun DW, Koh HJ, Eun MY. 2012. Development of rice molecular genetic and physical map using pcr-based dna markers with the recombinant inbred population derived from Milyang23/Gihobyeyo cross. Korean J Breed Sci 44: 273-281.
15. Jiang L, Liu S, Hou M, Tang J, Chen L, Zhai H, Wan J. 2006. Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). F Crop Res 98: 68-75.
16. Jiang L, MingYu H, ChunMing W, JianMin W. 2004. Quantitative trait loci and epistatic analysis of seed anoxia germinability in rice (*Oryza sativa*). Rice Sci 11: 238-244.
17. Kim SM, Kim CS, Jeong JU, Reinke RF, Jeong JM. 2019. Marker-assisted breeding for improvement of anaerobic germination in japonica rice (*Oryza sativa*). Plant Breed 138: 810-819.
18. Kim SM, Reinke RF. 2018. Identification of QTLs for tolerance to hypoxia during germination in rice. Euphytica 214: 160.
19. Li S, Wei X, Ren Y, Qiu J, Jiao G, Guo X, Tang S, Wan J, Hu P. 2017. OsBT1 encodes an ADP-glucose transporter involved in starch synthesis and compound granule formation in rice endosperm. Sci Rep 7: 40124.
20. Lincoln SE, Daly MJ, Lander ES. 1993. Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0: A Tutorial and Reference Manual.
21. Liu F, Xu W, Song Q, Tan L, Liu J, Zhu Z, Fu Y, Su Z, Sun C. 2013. Microarray-assisted fine-mapping of quantitative trait loci for cold tolerance in rice. Mol Plant 6: 757-767.
22. Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A, Perata P. 2003. Sugar modulation of α -amylase genes under anoxia. Ann Bot 91: 143-148.
23. Lou Q, Chen L, Sun Z, Xing Y, Li J, Xu X, Mei H, Luo L. 2007. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 158: 87-94.
24. Mackill DJ, Ismail AM, Singh US, Labios RV, Paris TR. 2012. Development and rapid adoption of submergence-tolerant (*Sub1*) rice varieties. Adv Agron 115: 303-356.
25. McCouch SR. 2008. Gene nomenclature system for rice. Rice 1: 72-84.
26. Miro B, Longkumer T, Entila FD, Kohili A, Ismail AM. 2017. Rice seed germination underwater: Morpho-physiological responses and the bases of differential expression of alcoholic fermentation enzymes. Front Plant Sci 8: 1857.
27. Murata T, Akazawa T, Fukuchi S. 1968. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. I. An analytical study. Plant Physiol 43: 1899-1905.
28. Narsai R, Edwards JM, Roberts TH, Whelan J, Joss GH, Atwell BJ. 2015. Mechanisms of growth and patterns of gene expression in oxygen-deprived rice coleoptiles. Plant J 82: 25-40.
29. Pandey S, Velasco L. 2002. Economics of direct seeding in

- Asia: patterns of adoption and research priorities. In: Pandey S, Mortimer M, Wade L, Lopez K, Hardy B (Eds.). Direct Seeding: Research Strategies and Opportunities. Proceedings of the International Workshop on Direct Seeding in Asian Rice Systems: strategic search Issues and Opportunities, 25-28 Jan 2000, Bangkok, Thailand. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. ISBN: 978-1-891127-63-2. pp. 3-14.
30. Park HJ. 2018. Supply status and problems on rice direct seeding technology. In Oh MK, Choi KJ, Lee CK, Hwang UH, Jeong JH, Choi IB, Lee HS, Yang SY, Yoon JT (Eds.). Education of rice direct seeding and labor saving culture. NICS, RDA Manila, Philippines. pp 137-162.
 31. Perata P, Geshi N, Yamaguchi J, Akazawa T. 1993. Effect of anoxia on the induction of α -amylase in cereal seeds. *Planta* 191: 402-408.
 32. Perata P, Guglielminetti L, Alpi A. 1997. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Ann Bot* 79: 49-56.
 33. Perata P, Pozueta-Romero J, Akazawa T, Yamaguchi J. 1992. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta* 188: 611-618.
 34. Perata P, Voesenek LACJ. 2006. Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci* 12: 43-46.
 35. Redoña ED, Mackill DJ. 1996. Genetic variation for seedling vigor traits in rice. *Crop Sci* 36: 285-290.
 36. Santosh Rama Bhadra Rao T, Vijaya Naresh J, Sudhakar Reddy P, Reddy MK, Mallikarjuna G. 2017. Expression of *Pennisetum glaucum* eukaryotic translational initiation factor 4A (PgeIF4A) confers improved drought, salinity, and oxidative stress tolerance in groundnut. *Front Plant Sci* 8: 453.
 37. Sarkar RK, Reddy JN, Sharma SG, Ismail AM. 2006. Physiological basis of submergence tolerance in rice and implications for crop improvement. *Curr Sci* 91: 899-906.
 38. Septiningsih EM, Ignacio JCI, Sendon PMD, Sanchez DL, Ismail AM, Mackill DJ. 2013. QTL mapping and confirmation for tolerance of anaerobic conditions during germination derived from the rice landrace Ma-Zhan Red. *Theor Appl Genet* 126: 1357-1366.
 39. Septiningsih EM, Sanchez DL, Singh N, Sendon PMD, Pamplona AM, Heuer S, Mackill DJ. 2012. Identifying novel QTLs for submergence tolerance in rice cultivars IR72 and Madabar. *Theor Appl Genet* 124: 867-874.
 40. Shon JY, Lee CK, Kim JH, Yoon YH, Yang WH, Choi KJ, Choi MG, Park HK, Ko JC, Kim YG, Kim CK, Yang WH. 2012. Comparisons of growth, heading and grain filling characteristics between wet-hill-seeding and transplanting in rice. *Korean J Crop Sci* 57: 151-159.
 41. Wright MH, Tung CW, Zhao K, Reynolds A, McCouch SR, Bustamante CD. 2010. ALCHEMY: A reliable method for automated SNP genotype calling for small batch sizes and highly homozygous populations. *Bioinformatics*. 26: 2952-2960.
 42. Xie K, Jiang L, Lu BY, Yang CY, Li LF, Lru X, Zhang L, Zhao ZG, Wan JM. 2011. Identification of QTLs for seed dormancy in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed* 130: 328-332.
 43. Yamauchi M, Aguilar AM, Vaughan DA, Seshu DV. 1993. Rice (*Oryza sativa* L.) germplasm suitable for direct sowing under flooded soil surface. *Euphytica* 67: 177-184.
 44. Yamauchi M, Winn T. 1996. Rice seed vigor and seedling establishment in anaerobic soil. *Crop Sci* 36: 680-686.
 45. Zhang L, Li H, Li Z, Wang J. 2008. Interactions between markers can be caused by the dominance effect of quantitative trait loci. *Genetics* 180: 1177-1190.
 46. Zhang M, Lu Q, Wu W, Niu X, Wang C, Feng Y, Xu Q, Wang S, Yuan X, Yu H, Wang Y, Wei X. 2017. Association mapping reveals novel genetic loci contributing to flooding tolerance during germination in indica rice. *Front Plant Sci* 8: 678.
 47. Zhang Y, Lan H, Shao Q, Wang R, Chen H, Tang H, Zhang H, Huang J. 2015. An A20/AN1-type zinc finger protein modulates gibberellins and abscisic acid contents and increases sensitivity to abiotic stress in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* 67: 315-326.