93-11 × 밀양352 약배양 집단을 이용한 벼 출수기 QTL분석

이소명 · 강주원 · 조준현 · 이지윤 · 신동진 · 권영호 · 차진경 · 이섫별 · 고종민 · 이종희*

농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부

QTL Analysis of Heading Date Using 93-11 × Milyang352 Doubled Haploid Lines in Rice

So-Myeong Lee, Ju-Won Kang, Jun-Hyeon Cho, Ji-Yoon Lee, Dongjin Shin, Young-Ho Kwon, Jin-Kyung Cha, Sais-Beul Lee, Jong-Min Ko, and Jong-Hee Lee*

National Institute of Crop Science, RDA, Miryang, 50424, Republic of Korea

Abstract Rice doubled haploid (DH) lines derived from crosses of the *indica* cultivar 93-11 and *japonica* line Milyang352 were used in genetic mapping and QTL analysis studies of days to heading (DTH), an important trait that controls rice yield and biomass. QTL mapping was conducted using the inclusive composite interval mapping method. We used 234 single-nucleotide polymorphic markers in the whole-genome region, including 100 KASP markers and 134 Fluidigm markers, to construct a genetic map. DH populations were raised in Milyang, Korea, over three different periods. Two major DTH QTLs, *qDTH3-1* and *qDTH7*, were detected under natural conditions in Milyang, and explained 14.88%~24.56% and 24.20%~37.39% of the phenotypic variation, respectively, in 93-11 × Milyang352 DH populations. During three different rice cultivation periods, *qDTH3-1* and *qDTH7* were repeatedly detected with significant logarithm of the odds scores and phenotypic variability explained. The findings of this study will make a valuable contribution to breeding high-yielding and early-maturing rice in Korea.

Keywords rice, QTL, days to heading, doubled haploid, genetic analysis

Received on September 7, 2020. Revised on September 19, 2020. Accepted on October 20, 2020.

* Corresponding Author (E-mail: ccrljh@korea.kr, Tel: +82-55-350-1168, Fax: +82-55-352-3059)

서 언

아시아 지역에서 벼는 북위 53°에서 남위 40°까지 광범위하게 재배되고 있다. 벼는 단일식물로서 벼의 출수기는 일장과 온도에 민감하게 반응하며 이런 다양한 감광성 및 감온성 특성에 의해 벼 유전자원들은 인위적으로 선별되어 왔다. 벼 출수기는 유전적 다양성 변화와 다양한 지역에 적응성을 결정하는 중요한 요소이다. 벼 출수기는 전형적인 양적 형질이며 유전 양식이 복잡하고 다수의 유전자가 관련되어있다. 출수기에 대한 유전적 배경은 벼 재배 지역, 재배 시기를 결정하는 중요한 요소이다. 특히, 다양한 작부 체계에 적합한 고품질 품종 개발을 위해서는 출수기와 관련된 유전자 및 양적형질 유전자좌(Quantitative traits loci, QTL)를 이해하는 것이 대단히 중요하다.

벼 염기서열분석 프로젝트를 통해 자포니카인 Nipponbare와 인디카인 93-11의 유전체가 완전히 해독되었다. 이러한 유전체 정보를 바탕으로 벼의 출수기와 관련한 다수의 유전자 및 QTL이

분리 및 동정되었다. *Heading date 3a (Hd3a)* 및 *RICE FLOWERING-LOCUS T 1 (RFT1)*는 식물이 영양생장에서 생식 생장으로 전환시 생물학적 신호 역할을 담당하는 *florigen* 유전자로 밝혀졌다(Komiya et al. 2008). 출수기 유전자 *Heading date 1 (Hd1)*과 *Early heading date 1 (Ehd1)*은 일장의 길이에 대해서로 다른 반응을 보이는 광주기 조절 핵심 유전자이다. 이들의 상류의 유전자로부터 여러 가지 조절 신호를 받아 *florigen* 유전자의 형성을 제어함으로써 출수기를 조절한다(Yano et al. 2000, Wei et al. 2016). Wei et al. (2010)은 Asominori와 IR24 RIL 집단에서 *DTH8* 유전자를 분리 동정하였으며 이 유전자는 장일 조건에서 *Ehd1*을 억제하여 이로 인해 *Hd3a*가 억제되어 출수 및 개화가 지연된다고 보고했다. *Hd1*의 경우 장일조건에서 *Ehd1* 뿐 아니라 *Hd3a*도 직접적으로 억제한다고 밝혀졌다. 반면, Yang et al. (2018)은 *DTH8*이 가장 상위에 위치하여 *EH3*, *OsMADS50*, *Hd1*을 조절하고, *OsMADS50*은 *Hd1* 및 *Ehd1*을 조절하여 최종적으로 *Hd3a* 발현 여부에 따라 개화가 조절된다고 보고했다.

Komiya et al. (2009)은 *OsMADS50* 유전자가 장일환경에서 *Early Heading date1 (Ehd1)*과 *RFT1* 유전자를 조절하여 출수를 촉진한다고 보고하였다. Wei et al. (2010)은 *DTH8*이 장일조건 하에서 세포 신장을 촉진하고 출수를 늦춰 벼의 키를 크게 하고 이삭 길이를 길게 한다고 보고했다.

출수기에 관련된 유전자의 염색체상의 위치, 특히, 유전자의 기능이 해석됨에 따라, 교배 집단의 초기세대에서 DNA 마커를 이용하여 목표 출수기를 가진 계통을 효율적으로 개발할 수 있다. 일본에서는 Koshihikari의 출수기 다양성 확보를 위해 Koshihikari와 Kasalath 교잡 후대를 이용해서 출수기 유전자 mapping을 수행하였고(Yamamoto et al. 2001), 유전 분석 집단에서 얻어진 QTL 중 Kasalath 유래의 출수기 QTL *qDTH6 (Hd1)*을 Koshihikari의 출수기를 당기는 데 이용하였다. 반대로 출수기를 늦추는 데에는 *qDTH7 (Hd4)*, *qDTH8 (Hd5)* 및 *qDTH3 (Hd6)*이 삽입된 계통을 이용하였다(Takeuchi et al. 2001).

국제적으로 출수에 관한 많은 분자생물학적 연구가 많이 진행되었지만, 국내에서는 관련 연구가 미흡한 실정이다. 특히, 출수기는 일장과 온도에 의해 복합적으로 영향을 받기 때문에 국외에서 연구된 결과를 국내 벼 육종에 직접 활용하는 것은 어려운 실정이다. 특히 이모작 재배 등 다양한 작부 체계 적응 품종 개발은 일반 관행 재배와 재배 시기가 다르기 때문에 출수기 관련 유전자에 대한 새로운 검토가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 우리나라의 다양한 작부 체계에 적응하는 단기성 품종 개발을 위해 인디카인 93-11과 자포니카인 밀양352를 교배하여 만든 약배양 집단(Doubled Haploid, DH)을 이용하여 출수기 관련 양적유전자좌(QTL)를 분석했다.

재료 및 방법

93-11 × 밀양352 약배양 집단 육성

인디카 품종인 93-11을 모본으로 하고, 자포니카 조생종인 밀양352호(교배조합 운광 × C18)를 부본으로 사용하여 2015년 인공교배를 실시했다. 2016년 하계에 F₁을 식물체에서 양성하였고, 교배된 식물체의 꽃가루를 N6Y2배지에 배양하여 캘러스를 유기하고 재분화 식물체를 얻었다. 2016/2017년 동계온실에서 재분화된 A₀ 세대 식물체를 육성하였으며, 2017 하계에 A₁세대 128계통을 선발하여 DH집단을 육성하였다.

재배 방법 및 출수기 조사

출수기 조사를 위해 2018년 국립식량과학원 남부작물부에서

5월 10일 이앙한 조기 재배와 7월 1일 만기 재배로 이앙하였고, 2019년 동일한 장소에서 5월 26일 보통기 재배로 이앙했다. 계통당 2열씩, 주당 1본씩, 재식 거리 30 cm × 15 cm로 포장에 이앙했다. 시비는 질소(N)-인산(P₂O₅)-칼리(K₂O)를 9-4.5-5.7 kg/10a으로 사용하였으며, 인산은 전량 기비, 질소는 기비 50%, 분얼비 30%, 수비 20%, 칼리는 기비 80%, 수비 20%로 분시했다. 기타 물관리 및 병해충 방제는 농촌진흥청 표준재배법을 준하여 수행했다. 출수기는 계통 내 이삭이 40-60% 정도 나왔을 때를 기준으로 조사했다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA는 이앙 전 어린잎을 채취하여, CTAB 방법(Murray & Thompson 1980)으로 다음과 같이 추출했다. 벼 어린잎 2 g과 3 mm 마쇄용 구슬 3개를 2 ml Eppendorf tube에 넣고 액체 질소에 5-10분간 침적시킨 후 1분간 vortex했다. 700 μl의 2X CTAB buffer (2% CTAB, 0.1 M Tris, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% PVP)를 넣고, 65°C 항온 수조에 20분간 넣어 두었다. 600 μl PCI 용액(phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1)을 첨가하여 20분간 교반한 후 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 500 μl 상등액을 1.5 ml Eppendorf tube에 옮겼다. 500 μl의 isopropanol을 첨가하여 2-3회 혼합한 후 -72°C에 10분간 넣은 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물을 70% ethanol로 세정 후 건조했다. 추출된 DNA는 TE buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 2.5 mM EDTA)에 녹인 후 핵산농도측정기(Nanodrop Co., 한국)를 이용하여 50 ng/μl로 농도를 조절했다.

유전자 지도 작성 및 양적형질유전자좌(QTLs) 분석

유전자 지도 작성을 위해 KASP마커와 Fluidigm 마커를 이용하여 유전자형을 분석하였다(Kabange et al. 2020, Lee et al. 2020). KASP마커 분석은 농업기술실용화재단의 종자산업진흥센터에 대용량 분석시스템(LGC Douglas Scientific, Alexandria, 미국)을 활용하여 Cheon et al. (2018)이 보고한 372종을 분석하였다. 384-well array tape에 2X master mix (LGC Genomics, London, 영국) 0.8 μl, KASP assay mix 0.02 μl, 1.6 μl KASP reaction mixture에 DNA 총량이 5 ng이 되도록 희석한 DNA 샘플을 분주한 뒤 Cheon et al. (2018)에 보고된 바에 따라 KASP 증폭반응을 진행했다. 또한 Fluidigm 마커 분석은 서울대학교 NICEM (National Instrumentation Center for Environmental Management, Seoul National University, 한국)에 보유하고 있는

BioMark™ HD system (Fluidigm, San Francisco, 미국)과 96.96 Dynamic Array IFC (96.96.IFC) chip을 이용하였으며, 분자 마커는 자포니카와 인디카 아종 간 특이적으로 다형성을 보이는 마커 192개를 이용하였다. 먼저, 96개 마커에 대해 각각 2 µl의 Specific Target Amplification (STA) 프라이머와 2 µl의 Locus Specific Primer (LSP)를 혼합한 뒤 DNA suspension buffer 16 µl를 첨가한 10X STA primer pool을 만들었다. 96개의 DNA 샘플에 대해서는 2 × multiplex PCR master mix (Qiagen, Hilden, 독일) 2.5 µl, 0.5 µl 10X STA primer pool, 0.75 µl PCR-certified water, 1.25 µl genomic DNA 샘플을 혼합하여 총 용량 5 µl가 되도록 분주한 뒤 STA를 진행했다. STA시 95°C에서 15분 경과 후 두 단계로 이루어진 사이클(95°C 15초, 60°C 2분)을 14회 반복하여 PCR을 진행했다(Seo et al. 2020). 이후 STA 산물 2.5 µl, pre-mix 3.5 µl를 새 PCR 플레이트에 분주하여 만든 sample mix를 만든 뒤 sample mix 5 µl를 96.96

IFC의 샘플 주입구에, 각각의 assay mix 4 µl를 96.96 IFC의 assay 주입구에 분주했다. 이후 SNP 분석은 IFC controller HX (Fluidigm, San Francisco, 미국)과 BioMark™ HD system (Fluidigm, San Francisco, 미국)을 이용하여 생산자 매뉴얼에 따라 진행했다. 95°C 15초, 64°C 45초, 72°C 15초 경과 후 같은 사이클을 64°C 단계에서 1도씩 감소시키며 61°C가 될 때까지 사이클을 반복했다. 이후 95°C 15초, 60°C 45초, 72°C 15초 세 단계로 이루어진 사이클을 34회 반복했다. 이후 유전자형 분석 결과는 Fluidigm SNP Genotyping Analysis 소프트웨어를 이용하여 얻었다. 유전자 연관 지도는 MapChart v.2.32를 이용하여 마커의 물리적 위치를 기반으로 작성했다(Fig. 1). QTL분석은 IciMapping v.4.1 (Meng et al. 2015)을 이용하여 CIM (Composite interval mapping)방법으로 실시했다. 본 연구에서는 탐색된 QTL의 LOD 값이 5.0 이상인 QTL만을 제시했다.

Fig. 1. Genetic map of 93-11 × Milyang352 DH population and QTLs of days to heading (DTH).

결과 및 고찰

93-11 × 밀양352 DH 집단 유전자 지도 작성

93-11 × 밀양352의 DH집단의 유전자 지도 작성을 위해 Fluidigm 마커와 KASP마커를 이용하여 모·부분 간의 다형성 분석을 수행하였다. Fluidigm 마커는 인디카와 자포니카 아종간 특이적으로 다형성이 높은 192개를 이용하여 분석한 결과 134개의 마커에서 모·부분 간 다형성을 보였으며, 다형성 비율은 71.4%이었다. 염색체 별 다형성 비율은 47.4-100.0%이었으며, 1, 7, 9, 및 11번 염색체에서 다형성 비율이 높았다. Chen et al. (2019)이 보고한 자포니카 품종 특이적인 SNP를 중심으로 제작된 KASP마커는 372개중 100개가 모·부분 간의 다형성을 보였으며, 다형성 비율은 약 26.9%이었다. KASP마커에서 염색체 별 다형성 비율은 14.7-52.6%이었으며, 10번 염색체에서 52.6%로 다형성 비율이 높았다(Table 1). 총 234개의 다형성을 보인 Fluidigm 및 KASP 마커를 이용하여 유전자 지도를 작성하였다. 다형성 마커의 염색체 상 위치는 KASP마커 또는 Fluidigm 마커 개발 시 보고된 정보를 활용하였으며, Nipponbare 염기서열 기준으로 작성된 물리지도를 기준으로 분자 마커의 위치를 나타내었다. 12개 염색체에 전체에 골고루 분포하도록 인디카-자포니카 벼 아종 특이적인 마커와 자포니카 특이적인 마커를 사용하였으나, 1, 2, 3, 5 및 11번 염색체에서 마커 간의 거리가 먼 영역도 존재하였다. 위와 같은 구간은 모본인 93-11과 밀양352간의 유전적 배경이 비슷한 영역인 것으로 판단된다(Fig.

1). 모·부분의 다형성 비율은 Fluidigm마커가 KASP마커에 비해 다형성 비율이 높았다. 이는 인디카 품종인 93-11과 자포니카 품종인 밀양352가 교배된 인디카 및 자포니카 품종 간 교배된 집단이기 때문에 인디카-자포니카 벼 아종 특이적으로 개발된 분자 마커에서 다형성이 높게 나타난 것으로 판단된다.

벼 유전자 염기서열 분석 완료와 더불어 벼의 양적 형질에 대한 수많은 연구가 다양한 유전분석 집단을 활용하여 수행되었다. 일본의 Nipponbare × Kasalath 조합이 대표적이며(Lin et al. 1998), 국제미작연구소(International Rice Research Institute, IRRI)의 IR64 × Azucena (Maheswaran et al. 1997), 및 우리나라에서 밀양23 × 기호벼 집단이 육성되었다(Ji et al. 2013). 이들 유전분석 집단의 유전자 지도 작성은 초기에 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 마커와 SSR (simple sequence repeat) 마커 등이 활용되었다. 이들 분자 마커는 아크릴 아마이드 또는 아가로스 겔을 이용하여 전기영동을 수행한 후 유전자형을 분석해야 하기 때문에 많은 시간과 노력이 요구된다. 따라서, 소규모 육종 연구실 수준에서 유전 분석 집단 육성 및 유전자 지도 작성은 현실적으로 쉽지는 않았으며, 분자생물학 전문연구실 수준에서 작성이 가능하였다. 최근에 벼 유전체 분석이 완료되고 유전자형 분석기술이 고도화 되었으며, 특히 SNP 기반의 비 전기영동 방식의 분자마커들이 다양화 되고(Yang et al. 2019) 이들 마커에 대한 분석서비스가 상용화 됨에 따라 유전분석 집단 육성 및 유전자지도 작성이 용이하게 되었다. 본 연구에서는 93-11과 밀양352 DH집단에서 출수기 관련 QTL 탐색을 위하여

Table 1. Marker information of DNA linkage map of 93-11 × Milyang352 DH population.

Chr.	Fluidigm marker			KASP marker		
	polymorphic markers	tested markers	% of polymorphic markers	polymorphic markers	tested markers	% of polymorphic markers
1	17	23	73.9	14	58	24.1
2	10	18	55.6	8	32	25.0
3	14	20	70.0	6	24	25.0
4	11	17	64.7	9	32	28.1
5	9	16	56.2	8	30	26.7
6	9	19	47.4	6	29	20.7
7	16	16	100.0	10	27	37.0
8	9	14	64.3	8	29	27.6
9	12	12	100.0	10	33	30.3
10	6	10	60.0	10	19	52.6
11	12	14	85.7	5	34	14.7
12	9	13	69.2	6	25	24.0
Total	134	192	71.4	100	372	26.9

Fluidigm 마커와 KASP 마커를 이용하여 유전자 지도를 작성하였다.

출수기

93-11과 밀양352의 출수 일수는 2018년 조기 재배에서 각각 112일과 93일로 밀양352가 93-11보다 출수기가 21일 정도 빨랐다. DH 집단의 평균 출수 일수는 98일이었으며, 범위는 90일~117일이었다. 또한, 7월 1일 이앙한 만기 재배에서 93-11과 밀양352의 출수 소요 일수는 각각 98일 및 86일이었다. 만기 재배에서도 밀양352가 93-11보다 출수기가 12일 정도 빨랐다. 만기 재배 DH 집단의 평균 출수 일수는 95일이었으며, 범위는 82일~117일이었다. 2019년 5월 26일 이앙한 보통기 재배에서 93-11과 밀양352의 출수 일수는 각각 103일과 92일이었으며 밀양352가 출수기가 11일 정도 빨랐다. 보통기 재배 DH 집단의 평균 출수 일수는 99일이고, 범위는 84일~113일 이었다. 또한 이 DH 집단의 출수기는 정규분포하여 양적형질임을 알 수 있었다. 조기 재배보다 만기 재배에서 전체적인 출수 소요 일수가

줄어드는 경향을 보였고, 출수 일수 변이 폭은 줄어들었다(Fig. 2). 우리나라는 계절에 따라 온도와 일장이 차이가 많이 나기 때문에 봄, 여름, 가을 겨울이 뚜렷하게 구분되는 지역에 위치해 있다(Lee et al. 1979). 특히, 벼 조기 재배는 5월 상순에 이앙해서 7월 중하순에 출수하기 때문에 출수 감응시기인 6월 중하순의 일장이 만기재배보다 길어 출수 소요 일수가 많이 소요된다. 반면, 만기 재배의 DH집단의 출수기는 8월 중하순에 해당하여 출수 감응기 고온과 일장이 짧아져 출수가 촉진되어 조기 재배보다 출수 소요 일수가 짧아진 것으로 판단된다.

출수기 QTL

출수기 QTL은 주동유전자와 연관된 마커 탐색을 위해서 LOD 값이 5.0 이상인 QTL을 선발하였다. 조기 재배에서 3, 7, 9번 염색체에서 3개의 QTL이 탐색되었으며, $qDTH7 > qDTH3-1 > qDTH9$ 순으로 표현형 변이에 대한 설명력이 높았다(Fig. 1, Table 2). 보통기 재배에서는 3, 7, 8, 9번 염색체에서 4개의 QTL이 탐색되었으며, $qDTH7 > qDTH8 > qDTH3-1 > qDTH9$

Fig. 2. Distribution of days to heading (DTH) in DH population derived from a cross 93-11 and Milyang352 depends on transplanting season; A: E1 (Early season), B: E2 (Normal season), C: E3 (Late season).

Table 2. QTLs of days to heading (DTH) in DH population derived from a cross 93-11 and Milyang352 depends on transplanting season².

Season	Chr.	QTL	Physical Position (Mb)	Marker Interval	LOD	PVE (%)	Add
E1	3	<i>qDTH3-1</i>	33.03	id3015453-ah03002520	16.30	24.56	2.99
	7	<i>qDTH7</i>	11.12	KJ07_033-id7001998	22.61	37.39	3.68
	9	<i>qDTH9</i>	20.44	KJ09_073-KJ09_075	7.22	9.06	-1.85
E2	3	<i>qDTH3-2</i>	2.03	KJ03_007-ah03000403	5.35	2.51	-1.39
	3	<i>qDTH3-1</i>	33.03	id3015453-ah03002520	27.26	20.21	4.01
	7	<i>qDTH7</i>	11.12	KJ07_033-id7001998	34.58	29.75	4.81
	8	<i>qDTH8</i>	8.86	wd8001250-KJ08_045	32.25	27.48	-4.84
	9	<i>qDTH9</i>	20.44	KJ09_073-KJ09_075	5.73	2.69	-1.49
E3	3	<i>qDTH3-1</i>	33.03	id3015453-ah03002520	8.16	14.88	2.24
	7	<i>qDTH7</i>	10.12	id7001155-KJ07_033	11.53	24.40	2.83
	12	<i>qDTH12</i>	5.26	id12002113-KJ12_017	6.38	11.53	-2.02

²PVE = Phenotypic variability explained, Add = Additive effect, E1 = Early season, E2 = Normal season, E3 = Late season.

순으로 표현형 변이에 대한 설명력이 높았다. 만기 재배에서는 3, 7, 12번 염색체에서 3개의 QTL이 탐색되었으며, $qDTH7 > qDTH3-1 > qDTH12$ 순으로 표현형 변이에 대한 설명력이 높았다. 7번 염색체 KJ07_033-id7001998 마커 구간에서 탐색된 QTL $qDTH7$ 과 3번 염색체의 id3015453-ah03002520 마커 구간에서 탐색된 QTL $qDTH3-1$ 이 조기 재배, 보통기 재배 및 만기 재배에서 공통적으로 탐색되었다.

3번 염색체 id3015453-ah03002520 마커 구간에서 탐색된 QTL은 조기 재배에서 $qDTH3-1$ 은 LOD값이 16.30이며 전체 표현형 변이의 24.56%를 설명하였고, 보통기 재배의 $qDTH3-1$ 은 LOD값이 27.26이며 전체 표현형 변이의 20.21%를 설명하였고, 만기 재배 DH 집단에서 발견된 $qDTH3-1$ 은 LOD값이 8.16이며 전체 표현형 변이의 14.88%를 설명했다. $qDTH3-1$ 은 3번 염색체 말단에 위치하고 있으며, 이 QTL 영역에서는 출수기 관련 유전자 *HD6*, *Hd16* 및 *EH3* 유전자가 보고되었다. Takahashi et al. (2015)은 Nipponbare와 Kasalath 여교배 집단에서 탐색된 출수기 유전자 *Hd6*은 Kasalath 대립유전자형에 의해 출수를 지연시킨다고 보고했다. Hori et al. (2013)은 *Heading date16* (*Hd16*)을 분리 동정하였으며, Koshihikari의 유전자형에 의해서 Nipponbare의 출수기가 단일조건에서 2일 지연되고 장일조건에서 19일 지연된다고 하였다. Kwon et al. (2014)은 자포니카 품종 H143에서 장일조건에서 출수기를 빠르게 하는 유전자 *Early heading 3* (*EH3*)를 보고했다. 본 연구의 $qDTH3-1$ 은 인디카 품종인 93-11의 유전자형에 의해 출수기가 지연되고, 자포니카 품종인 밀양352의 유전자형에 의해 출수기가 빨라진다. 이는 자포니카 품종의 유전자형에서 출수기가 빨라지는 *Hd6* 유전자 또는 *EH3* 유전자와 비슷한 기능을 하는 것으로 판단된다.

또한 3번 염색체 KJ03_007-ah03000403 마커 구간에서 탐색된 $qDTH3-2$ 는 Dong et al. (2004)이 보고한 $qDEF-3$ QTL과 구간이 중복된다. 해당 QTL은 출수기 형질 변이의 10.9%를 설명하며, 자포니카형 대립유전자형일 경우 지연 출현 시기가 앞당겨진다고 보고되었다. Hittalmani et al. (2002)도 해당 구간과 중복되는 출수기 관련 QTL인 $qFDN-3$ 을 보고했다. 7번 염색체 KJ07_033-id7001998사이에서 탐색된 $qDTH7$ 은 조기 재배에서 LOD값이 22.61이며 전체 표현형 변이의 37.39%를 설명하였고, 보통기 재배에서는 LOD값이 34.58이며 전체 표현형 변이의 29.75%를 설명하였고, 만기 재배에서 LOD값이 11.53이며 전체 표현형 변이의 24.40%를 설명했다. 또한 $qDTH7$ 은 7번 염색체의 id7001155-KJ07_033사이에 위치하며, 이 QTL 영역에는 *Ghd7* (Xue et al. 2008)이 존재하는 것으로 보고되었다.

Xue et al. (2008)에 의하면 *Ghd7*은 장일조건에서는 출수를 지연시키고 벼의 키와 이삭 길이를 증가시키는 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. Zhang et al. (2015)에 의하면 328개의 벼 품종과 48개의 야생벼에서 *Ghd7*의 haplotype을 분석한 결과, 자포니카와 인디카 아종 간에 유전자형 차이가 나타났으며, 93-11은 functional-*Ghd7* 유전자를 가지고 있어 장일조건에서 출수가 지연되는 것으로 보고되었다. 본 연구의 조기 재배와 만기재배에서 탐색된 QTL $qDTH7$ 은 93-11 유전자형에 의해서 출수기가 지연되고, 밀양352 유전자형에 의해 빨라지는 결과를 얻었다. 따라서 밀양352는 93-11의 대립유전자형으로서 loss of function *ghd7* 유전자형을 가진 것으로 판단된다. 국내 재배환경에서 평야지 조기 재배 또는 소득 작물 후작지 적응형 품종의 출수기 단축을 위해서는 밀양352 유전자형 QTL을 활용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

Mo et al. (2020)은 국내 품종 자포니카 295 품종에 대해 *Ghd7* 유전자형을 분석한 결과, loss-of-function *Ghd7*을 가진 품종은 백일미 뿐이라고 보고하였다. 밀양352는 운광과 중국에서 도입된 유전자원 C18이 교배후대에서 선발된 계통으로 기존의 국내 육성 품종과 유전적 배경이 상이할 수도 있다. 따라서, 본 연구에서 탐색된 ‘밀양352’의 출수기 QTL $qDTH7$ 의 유전자 영역에 포함된 *Ghd7* 유전자가 functional-*Ghd7*인지, 또는 loss-of-function 타입 유전자인지에 대한 추가적인 검토가 필요하다. 8번 염색체 wd8001250-KJ08_045 구간에서 탐색된 $qDTH8$ 은 Lin et al. (1995)가 보고한 *hd8* 및 Xiao et al. (1996)이 보고한 *DTH8* QTL 구간에 포함된다. *DTH8*은 표현형 변이의 51%를 설명하며 인디카형 유전자형일 경우 출수기를 9일 이상 지연시킨다고 보고되었다. 한편, 본 연구에서 $qDTH8$ 은 재배시기별로 반복 관찰되지 않았다. 9번 염색체 KJ09_073-KJ09_075 마커 구간의 $qDTH9$ 부근에는 Murakami et al. (2003)이 보고한 광주기 반응 조절 관련 유전자 *OsPRR95*가 위치해있다. *OsPRR95*가 속한 *OsPRR* 족은 애기장대 광주기 반응 조절 관련 유전자 Arabidopsis Pseudo-Response Regulators (*APRR*)의 ortholog를 포함한다고 보고되었다. *OsPRR*족은 장일 하에서 *OsPRR73* (*OsPRR37*) → *OsPRR95* (*OsPRR59*) → *OsPRR1* 순서로 약 두 시간 간격으로 발현되며, 이 과정에서 벼의 광주기 반응이 조절된다. 자포니카의 경우 *OsPRR* 족의 발현이 인디카보다 늦게 시작되는 것으로 보고되었다. 12번 염색체 id12002113-KJ12_017 마커 구간에서 발견된 $qDTH12$ 구간에는 기존에 보고된 개화, 출수기 관련 QTL은 없으나 $qDTH12$ 는 재배시기 별로 반복적으로 관찰되지 않아 신규 QTL로 보고하기 어렵다고 판단된다.

조기 및 만기 재배 *qDTH3-1*과 *qDTH7* QTL집적 효과 분석

qDTH3-1, *qDTH7*의 유전자형별 출수기 및 이들 유전자의 집적 효과를 재배시기별로 분석하였다(Fig. 3). 이를 *qDTH3-1* 영역 내의 id3015453마커에 대해 밀양352 유전자형을 가진 계통과 93-11 유전자형을 가진 계통을 분류하였다. 조기 재배에서 *qDTH3-1* 영역 내에서 밀양352 유전자형을 가진 계통은 출수 일수 평균 95.8 ± 4.22 일로 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 103.5 ± 6.07 일보다 7.7일 정도 빨랐다[Fig. 3A (E1)]. 보통기 재배에서는 밀양352 유전자형을 가진 계통은 평균 96.0 ± 5.45 일로 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 100.8 ± 4.85 일보다 4.8일 정도 빨랐다[Fig. 3A (E2)]. 만기 재배에서는 밀양352 유전자형을 가진 계통은 평균 89.3 ± 4.22 일로 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 99.7 ± 7.13 일보다 10.4일 정도 빨랐다[Fig. 3A (E3)]. *qDTH3-1*의 밀양352 유전자형에 의해 조기, 보통기 및 만기 재배에서 모두 출수기가 빨라지는 효과가 있었다. *qDTH7* 영역 내의 KJ07_033 마커로 밀양352 유전자형을 가진 계통과 93-11 유전자형을 가진 계통을 분류할 경우 조기 재배에서 밀양352 유전자형을 가진 계통은 평균 96.5 ± 3.77 일로 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 105.5 ± 5.28 일보다 7.7일 정도 빨랐다[Fig. 3B (E1)]. 보통기 재배에서는 밀양352 유전자형을 가진 계통은

평균 95.5 ± 4.67 일로 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 102.2 ± 4.35 보다 4.8일 정도 빨랐다[Fig. 3B (E2)]. 만기 재배에서는 밀양352 유전자형을 가진 계통은 평균 91.0 ± 4.28 일로 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 101.0 ± 6.6 보다 9.9일 정도 빨랐다[Fig. 3B (E3)]. *qDTH7*의 밀양352 유전자형에 의해 조기, 보통기 및 만기 재배에서 모두 출수기가 빨라지는 효과가 있었다.

또한 두 QTL의 재배 시기별 집적 효과를 분석한 결과, 조기 재배에서 *qDTH3-1*과 *qDTH7* 영역 내에서 밀양352 유전자형을 가진 계통은 출수 일수가 평균 94.1 ± 2.49 일로, 두 영역 내에서 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 107.1 ± 4.83 일보다 13.0일 정도 빨랐다[Fig. 3C (E1)]. 보통기 재배에서 *qDTH3-1*과 *qDTH7* 영역 내에서 밀양352 유전자형을 가진 계통은 출수 일수가 평균 94.5 ± 4.99 일로 두 영역에서 ‘93-11’ 유전자형을 가진 계통의 출수 일수 평균 103.2 ± 4.10 일보다 8.7일 정도 빨랐다[Fig. 3C (E2)]. 만기 재배에서는 *qDTH3-1*과 *qDTH7* 영역 내에서 밀양352 유전자형을 가진 계통은 출수 일수가 평균 87.5 ± 2.16 일로 두 영역에서 93-11 유전자형을 가진 계통의 평균 103.5 ± 6.16 일보다 16.0일 정도 빨랐다[Fig. 3C (E3)]. *qDTH3-1*의 밀양352 유전자형에 의해 조기, 보통기 및 만기 재배에서 모두 출수기가 빨라지는 효과가 있었다. *qDTH3-1*의 밀양352 유전자형에 의해

Fig. 3. Interaction between two major QTLs for days to heading on chromosome 3 and 7 detected in 93-11 × Milyang352 DH population.

조기, 보통기 및 만기 재배에서 모두 출수기가 빨라지는 효과가 있었다. 출수 일수에 대해 *qDTH3-1*과 *qDTH7*의 유전자형의 상호작용 효과를 파악하기 위해 이원분산분석을 진행한 결과, 두 QTL은 만기재배에서 같은 유형의 유전자형 집적시 상가적인 효과를 나타냈다(Fig. 3D, Table 3).

Hori et al. (2013)은 *Hd16* 및 4개의 개화 관련 유전자(*Ghd7*, *Hd1*, *DTH8*, *Hd2*)가 삽입된 근동질계통을 이용하여 유전자간의 상호작용을 관찰했다. 그 결과, 광주기 반응성이 낮은 *Hd16* 대립유전자를 갖고 있는 근동질계통에서 장일조건시 *Ehd1*, *RFT1* 및 *Hd3a*의 전사 수준이 증가했고 단일조건시 *RFT1* 및 *Hd3a*의 전사 수준이 감소했다. Hori et al. (2013)은 3번 염색체 말단에 존재하는 출수기 유전자 *Hd16*은 7번 염색체에 존재하는 *Ghd7* 유전자가 감광성 반응을 강화하여 벼의 출수개화경로를 억제하는 역할을 한다고 하였다. 이는 본 연구에서 3번 염색체의 93-11 유전자형 QTL이 출수기를 지연시키는 것과 유사한 결과인 것으로 판단된다(Fig. 3D). 반면, 출수기를 빠르게 하는 작부 체계용 단기성 품종 육성을 위해서는 밀양352 유전자형 간에 *qDTH3-1*과 *qDTH7*이 서로 상가적인 작용을 하는 유전자 조합이 바람직한 것으로 판단된다. Xue et al. (2008)은 장일조건에서 출수기를 지연시킴과 동시에 수당립수 및 간장이 커지는 효과가 있는 유전자를 보고하였으며 *Grain number plant height and heading date 7 (Ghd7)*로 명명하였다. 국내의 다양한 작부 체계에 적응하는 품종을 개발 시 *Ghd7* 유전자 기능이 상실된 계통을 선발하면 출수기는 빨라질 수 있지만, 수량구성요소인 수당 립수가 줄어들어 수량성 측면에서는 불리하게 작용할 수 있을 것으로

판단된다.

Yang et al. (2018)은 인디카인 HJX74를 배경으로 하여 8개의 공여친 품종을 이용해 만든 SSSL (Single Segment Substitution Lines) 중 서로 다른 8개의 출수기 관련 QTL 및 유전자가 삽입된 계통을 선발하였고 이들 계통 간 교배를 통해 출수기 관련 QTL 및 유전자가 집적된 계통을 만들었다. 이와 같은 재료들을 이용하여 각 출수기 관련 유전자 및 QTL 간 상호작용이 존재함을 밝혔다. Fujino & Ikegaya (2020)는 일본 육성 자포니카 벼 교배 집단을 이용하여 출수기 관련 유전자를 집적하여 수수가 증가된 계통을 만들었다. 또한 Wang et al. (2012)은 인디카인 93-11에 자포니카인 Zhenshan97을 여교배한 Backcross Recombinant Inbred Lines (BRIL)를 이용해 *qHD8*과 *GS3*를 집적하여 출수기를 당기면서도 수량성을 증진시킨 계통을 만들었다. 이와 같이 출수기 및 수량 관련 유전자, QTL 간에는 다양한 상호작용이 존재하며, 이러한 유전자 및 QTL을 집적함으로써 수량성을 향상시킬 수 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서도 유사하게 3번 염색체 *qDTH3-1*와 7번 염색체 *qDTH7*은 인디카 품종인 93-11의 유전자형에 의해 출수가 지연되고, 자포니카 품종인 밀양352의 유전자형에 의해 출수가 빨라지는 것이 확인되었다. 현재까지 보고된 바에 따르면 출수기를 늦춤으로써 벼 수량을 증진시킨 결과는 보고되어 있으나(Gao et al. 2014.), 출수기를 앞당기면서 수량도 동시에 증가시킨 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 밀양352호 유래 출수기 관련 QTL *qDTH7*과 *qDTH3-1*과 다면발현효과가 낮은 수량 관련 유전자 탐색도 병행하여야 할 것으로 판단된다. 또한 이는 조기

Table 3. 2 × 2 ANOVA test result between days to heading (DTH) and QTLs.

	Season	Df	Sum of Squares	Mean Squares	F value	Pr (>F)	Significance
<i>qDTH3-1</i>	E1	1	1609.0	1609.0	108.3	0.00	*** ^z
	E2	1	672.6	672.6	36.1	0.00	***
	E3	1	2671.0	2671.1	128.6	0.00	***
<i>qDTH7</i>	E1	1	1450.4	1450.4	97.6	0.00	***
	E2	1	689.5	689.5	37.0	0.00	***
	E3	1	1934.0	1934.0	93.1	0.00	***
<i>qDTH3-1</i> × <i>qDTH7</i>	E1	1	29.9	29.9	2.0	0.16	
	E2	1	4.2	4.2	0.2	0.64	
	E3	1	107.0	107.0	5.2	0.03	*
Residuals	E1	115	1709.1	14.9			
	E2	115	2144.6	18.6			
	E3	115	2388.0	20.8			

^zLevel of significance: <0.001 (***), <0.05 (*).

및 만기 재배의 다양한 작부 체계 적응 단기성 벼 품종 육성의 실마리가 될 수 있을 것이다.

적 요

본 연구는 93-11 × 밀양352 DH 집단을 이용하여 재배 시기별 출수기를 조사하고 KASP 및 Fluidigm SNP마커 유전자형을 분석했으며, 이를 바탕으로 출수기 관련 QTL을 분석했다. 유전자 분석결과 전체 372개 중 41.5%인 234개의 SNP마커가 93-11과 밀양352 사이에 다형성을 보였다. 출수기 관련 QTL 분석결과 3년 연속 LOD 5.0 이상인 QTL은 총 2개였다. *qDTH3-1*은 밀양352형 대립유전자에 의해 출수 일수를 2.24-4.01일 감소시키는 작용을 하였으며, 표현형 변이의 설명력은 14.88-24.56%이었다. *qDTH7*은 밀양352형 대립유전자에 의해 출수 일수를 2.83-3.68일 단축시키는 작용을 하였으며, 이 QTL은 표현형 변이의 24.40-37.39%를 설명했다. *qDTH3-1*, *qDTH7*이 동시에 집적될 경우 만기 재배시 두 QTL이 상가적인 작용을 하는 것으로 나타났다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01428201 논이용 다양화를 위한 단기성 벼 품종 개발)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Cheon KS, Baek J, Cho YI, Jeong YM, Lee YY, Oh J, Won YJ, Kang DY, Oh H, Kim SL. 2018. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and kompetitive allele-specific PCR (KASP) marker development with Korean japonica rice varieties. *Plant Breed Biotechnol* 6: 391-403.
- Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A. 2004. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev* 18: 926-936.
- Dong Y, Kamiuntun H, Ogawa T, Tsuzuki E, Terao H, Lin D, Matsuo M. 2004. Mapping of QTLs for leaf developmental behavior in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 138: 169-175.
- Fujino K, Ikegaya T. 2020. A novel genotype DATTO5 developed using the five genes exhibits the fastest heading date designed in rice. *Korean J Breed Sci* 70: 193-199.
- Gao H, Jin M, Zhang XM, Chen J, Yuan D, Xin Y, Wang M, Huang D, Zhang Z, Zhou K, Sheng P, Ma J, Ma W, Deng H, Jiang Ling, Liu S, Wang H, Wu C, Yuan L, Wan J. 2014. Days to heading 7, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 16337-16342.
- Hittalmani S, Shashidhar HE, Bagali PG, Huang N, Sidhu JS, Singh VP, Khush GS. 2002. Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. *Euphytica* 125: 207-214.
- Hori K, Ogiso-Tanaka E, Matsubara K, Yamanouchi U, Ebana K, Yano M. 2013. Hd16, a gene for casein kinase I, is involved in the control of rice flowering time by modulating the day-length response. *Plant J* 76: 36-46.
- Ji H, Kim H, 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/Gihobyee Cross. *Korean J Breed Sci* 44: 273-281.
- Kabange NR, Park SY, Shin D, Lee SM, Jo SM, Kwon YH, Cha JK, Song YC, Ko JM, Lee JH. 2020. Identification of a novel QTL for chlorate resistance rice (*Oryza sativa* L.) *Agriculture* 10: 1-16.
- Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, Yokoi S, Shimamoto K. 2008. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. *Development* 135: 767-774.
- Kwon CT, Yoo SC, Koo BH, Cho SH, Park JW, Zhang Z, Li J, Li Z, Paek NC. 2014. Natural variation in Early flowering1 contributes to early flowering in japonica rice under long days. *Plant Cell Environ* 37: 101-112.
- Lee BS. 1979. A Study of Natural Seasons in Korea. *J Geol Soc* 14: 1-11.
- Lee SM, Kang JW, Lee JY, Seo J, Shin D, Cho JH, Jo SM, Song YC, Park DS, Ko JM, Koh HJ, Lee JH. 2020. QTL Analysis for Fe and Zn concentrations in rice grains using a doubled haploid population derived from a cross between rice (*Oryza sativa*) cultivar 93-11 and Milyang 352. *Plant Breed Biotechnol* 8: 69-76.
- Lin HX, Qian HR, Zhuang JY, Xiong JLZM, Min SK, Huang N, Zheng KL. 1995. RFLP mapping of major genes and minor genes for heading date in rice. *Rice Genet Newsl* 12: 253-255.

15. Lin S, Sasaki T, Yano M. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theor Appl Genet* 96: 997-1003.
16. Maheswaran M, Subudhi PK, Nandi S, Xu JC, Parco A, Yang DC, Huang N. 1997. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor Appl Genet* 94: 39-45.
17. Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. 2015. QTL IciMapping: integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *Crop J* 3: 269-283.
18. Mo Y, Jeong JM, Ha SK, Kim J, Lee C, Lee GP, Jeung JU. 2020. Characterization of QTLs and candidate genes for days to heading in rice recombinant inbred lines. *Genes* 11: 562.
19. Murakami M, Ashikari M, Miura K, Yamashino T, Mizuno T. 2003. The evolutionarily conserved *OsPRR* quintet: rice pseudo-response regulators implicated in circadian rhythm. *Plant Cell Physiol* 44: 1229-1236.
20. Murray M, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res Spec Publ* 8: 4321-4326.
21. Seo J, Lee SM, Han JH, Shin NH, Lee YK, Kim B, Chin JH, Koh HJ. 2020. Characterization of the common Japonica-originated genomic regions in the high-yielding varieties developed from inter-subspecific crosses in temperate rice (*Oryza sativa* L.). *Genes* 11: 562.
22. Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T, Yano M. 2001. *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the α subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7922-7927.
23. Takeuchi Y. 2011. Developing isogenic lines of Japanese rice cultivar 'Koshihikari' with early and late heading. *Jpn Agric Res Q* 45: 15-22.
24. Wang P, Xing Y, Li Z, Yu S. 2012. Improving rice yield and quality by QTL pyramiding. *Mol Breed* 29: 903-913.
25. Wei X, Xu J, Guo H, Jiang L, Chen S, Yu C, Zhou Z, Hu P, Zhai H, Wan J. 2010. DTH8 suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant Physiol* 153: 1747-1758.
26. Xiao J, Li J, Yuan L, Tanksley SD. 1996. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor Appl Genet* 92: 230-244.
27. Xue W, Xing Y, Weng X, Zhao Y, Tang W, Wang L, Zhou H, Yu S, Xu C, Li X. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat Genet* 40: 761-767.
28. Yamamoto T, Kuboki Y, Lin S, Sasaki T, Yano M. 1998. Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theor Appl Genet* 97: 37-44.
29. Yang G, Chen S, Chen L, Sun K, Huang C, Zhou D, Huang Y, Wang J, Liu Y, Wang H. 2019. Development of a core SNP arrays based on the KASP method for molecular breeding of rice. *Rice* 12: 21.
30. Yang Z, Jin L, Zhu H, Wang S, Zhang G, Liu G. 2018. Analysis of epistasis among QTLs on heading date based on single segment substitution lines in rice. *Sci Rep* 8: 1-8.
31. Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y. 2000. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2483.