밀 고분자 글루테닌 조성 분석을 위한 유전자 특이 분자표지 선발

신동진* · 차진경 · 이소명 · 고종민 · 이종희

국립식량과학원 남부작물부

Validation and Selection of Functional Allele-specific Molecular Markers to Analyze High-Molecular-Weight Glutenin Subunit Composition in Wheat

Dongjin Shin*, Jin-Kyung Cha, So-Myeong Lee, Jong-Min Ko, and Jong-Hee Lee

Department of Southern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang, 50424, Republic of Korea

Abstract The high-molecular-weight glutenin subunit (HMW-GS) composition of wheat is the main factor controlling gluten strength related to bread baking quality. Reported molecular markers for HMW-GS were validated and selected for improved breeding efficiency in South Korean wheat breeding programs. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, lab-on-a-chip electrophoresis, sequence-tagged site (STS) markers, and Kompetitive Allele-Specific PCR were performed to re-evaluate the known HMW-GS of 14 wheat cultivars. *Glu-A1b* and *Glu-A1c* alleles were separated by the STS marker, UMN19, and KASP marker, namely *Glu-Ax1/2**_SNP, at *Glu-1* loci. At the *Glu-B1* locus, *Glu1-By8* and *Glu1-By9* could be distinguished from *Glu-B1b* and *Glu-B1c* alleles by two STS markers, namely ZSBY8 and ZSBY9a, respectively. *Glu1-Bx17* and *Glu1-7^{OE}* could respectively be separated from non-*Glu-B1i* and non-*Glu-B1al* alleles by cauBx642 and BX7^{OE}_866_SNP. The *Glu-D1d* allele, used to determine bread baking quality, could easily be distinguished from other alleles by *Glu-D1d*_SNP at *Glu-D1* loci. Validated molecular markers in this study could therefore be used to select wheat lines for good bread baking quality in South Korean wheat breeding programs.

Keywords Wheat, High-molecular-weight glutenin subunit, molecular marker, KASP

Received on March 26, 2020. Revised on May 18, 2020. Accepted on June 5, 2020.

* Corresponding Author (E-mail: jacob1223@korea.kr, Tel: 82-55-350-1185, Fax: 82-55-352-3059)

서 언

밀은 세계적으로 매년 약 7억톤이 생산되는 육배체($2n=6x=42$, AABBDD) 작물로 빵이나 국수를 포함한 다양한 가공 제품으로 인간에게 영양분을 제공한다(Shewry & Hey 2015). 밀의 가공적 성은 종자 저장단백질인 글루테닌과 글리아딘의 이황화결합(disulfide bond)과 비공유성 수소결합으로 이루어진 글루텐의 양과 질에 의해 결정된다(Gilbert et al. 2000). 글루테닌은 단백질 분자량에 따라 고분자 글루테닌(high-molecular-weight glutenin subunits, HMW-GS)과 저분자 글루테닌(low-molecular-weight glutenin subunits, LMW-GS)으로 분류되며 밀가루 반죽의 탄성(elasticity)과 강도(strength)를 결정한다(Ortolan & Steel 2017).

HMW-GS 유전자좌는 A, B, D 각 1번 염색체 장완에 있으며, 분자량이 큰 x-type과 분자량이 작은 y-type의 유전자로 나뉘며, 대부분의 품종에서 *Glu-A1* 유전자좌의 y-type 유전자는 비활성화되어 단백질이 합성되지 않는다(Payne & Lawrence 1983).

Payne 그룹의 초기 보고에서는 *Glu-A1* 유전자좌에는 3개의 대립유전자가 보고되었고, *Glu-B1* 유전자좌에는 11개, *Glu-D1* 유전자좌에 7개의 대립유전자가 알려 졌다. 최근 단백질 동정 기술과 유전체 정보 분석 기술의 발달로 현재까지 Grain Genes 2.2 Database에는 *Glu-A1*과 *Glu-B1*, *Glu-D1* 유전자좌에 각각 22개, 52개, 36개의 대립유전자가 보고되었다(Peng et al. 2015, Roy et al. 2018). 그러나 세계적으로 대부분 육성 품종에는 특정 *Glu-1* 대립유전자의 빈도가 높았는데, *Glu-A1* 유전자좌에서는 *Glu-A1b* 대립유전자가 55%로 가장 높았고, *Glu-B1* 유전자좌에서는 *Glu-B1b*, *Glu-B1c*와 *Glu-B1i*의 대립유전자 빈도가 높았으며, *Glu-D1* 유전자좌에서는 *Glu-D1a*와 *Glu-D1d* 대립유전자의 빈도가 높았다(Table 1, Yasmeen et al. 2015). 또한, 빵에 적합한 글루텐 특성을 지닌 품종은 대부분 *Glu-A1*과 *Glu-D1* 유전자좌에서 각각 *Glu-A1a*나 *Glu-A1b* 대립유전자와 *Glu-D1d* 대립유전자를 지녔으며, *Glu-B1* 유전자좌에서는 *Glu-B1i*과 *Glu-B1al* 대립유전자를 지닌 품종의 제빵 적성이

우수하였다(Anjum et al. 2007, Gao et al. 2020).

HMW-GS 조성 분석을 위하여 SDS-PAGE 분석 방법이 최근 까지 활용되고 있지만, 분석 시간이 길고 대량 검정에 한계가 있어 DNA 분자 표지를 활용한 방법이 많이 이용되고 있다(Ravel et al. 2020). 최근에는 형광물질 이용하여 전기영동없이 유전형 분석을 쉽고 빠르게 할 수 있는 TaqMan과 Kompetitive allele-specific PCR (KASP) 등을 활용한 분자표지가 개발되어 육종 프로그램에서 대량 유전형 검정이 이루어지고 있다(Tan et al. 2017, Kang et al. 2020). 밀에서도 목표 형질을 도입하고 유전체 배경을 분석할 수 있는 방법으로 신뢰도가 높고 가격이 저렴한 rhAMP 방법이 제안되었으며, 국내에서도 밀 종실 경도에 연관된 *Pinb-D1* 유전형 분석에 활용되었다(Ayalew et al. 2019, Choi et al. 2020). HMW-GS 조성 분석을 위한 STS, SNP, KASP 등의 분자표지가 다양하게 개발되었지만, 국내 밀 육종 프로그램에서 빵용 품종 개발을 위한 HMW-GS의 분자 표지 활용은 미흡한 실정이다(Yuan et al. 2014, Rasheed et al. 2016, Ravel et al. 2020). 본 연구에서는 기존에 보고된 HMW-GS 분자표지를 검토하여 국내 육종 프로그램에 활용하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 수행 하였다.

재료 및 방법

SDS-PAGE와 Lab-on-a-chip을 이용한 고분자 글루테닌 단백질 조성 분석

고분자 글루테닌의 조성이 알려져 있는 조경과 조품 등 국내 육성 품종 5종과 Petrel, Brimstone 등 국외 육성 품종 11종을 사용하였다. 종자 1립에서 배를 제거하고 배유를 막자사발로 분쇄하고 Singh et al. (1991)의 방법을 변형하여 밀 고분자 글루테닌의 단백질을 추출하였다. 분쇄된 종자에 1,000 ml의 extraction buffer (50% 1-propanol, 80 mM TrisHCl pH 8.0)을 첨가하고, 원심분리(12,000rpm, 5분) 후 글리아딘과 알부민 등이 포함되어 있는 상등액을 제거하였다. 침전물에 500 ml의 denaturation buffer (50% 1-propanol, 1% (w/v) dithiothreitol, 80 mM TrisHCl pH 8.0)을 첨가하고 60°C에서 30분간 방치하고 원심분리(12,000 rpm, 10분)하여 고분자 글루테닌이 포함된 상등액을 새 튜브에 옮겨 사용 전까지 초저온냉동고에 보관하였다. 고분자 글루테닌의 단백질 조성 분석을 위하여 3-8% Criterion XT Tris-acetate protein gel (Bio-Rad, 미국)을 사용하여 Criterion vertical electrophoresis cell (BioRad, 미국)에서 SDS-PAGE 전기영동을 매뉴얼에 따라 수행하였다(Geisslitz et al. 2020).

Table 1. Allelic information of HMW-GS at *Glu-1* loci.

Locus name	Locus allele	Gene allele (x-type + y-type)	SDS-PAGE allele
<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-A1a</i>	<i>Glu1-Ax1</i>	1
	<i>Glu-A1b</i>	<i>Glu1-Ax2*</i>	2*
	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu1-AxNull</i>	Null
<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-B1a</i>	<i>Glu1-Bx7</i>	7
	<i>Glu-B1b</i>	<i>Glu1-Bx7</i> + <i>Glu1-By8</i>	7+8
	<i>Glu-B1c</i>	<i>Glu1-Bx7</i> + <i>Glu1-By9</i>	7+9
	<i>Glu-B1d</i>	<i>Glu1-Bx6</i> + <i>Glu1-By8</i>	6+8
	<i>Glu-B1f</i>	<i>Glu1-Bx13</i> + <i>Glu1-By16</i>	13+16
	<i>Glu-B1i</i>	<i>Glu1-Bx17</i> + <i>Glu1-By18</i>	17+18
	<i>Glu-B1al</i>	<i>Glu1-Bx7^{OE}</i> + <i>Glu1-By8</i>	7 ^{OE} +8
<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-D1a</i>	<i>Glu1-Dx2</i> + <i>Glu1-Dy12</i>	2+12
	<i>Glu-D1c</i>	<i>Glu1-Dx4</i> + <i>Glu1-Dy12</i>	4+12
	<i>Glu-D1d</i>	<i>Glu1-Dx5</i> + <i>Glu1-Dy10</i>	5+10
	<i>Glu-D1f</i>	<i>Glu1-Dx2.2</i> + <i>Glu1-Dy12</i>	2.2+12

추출한 10 ml 고분자 글루테닌 단백질에 동량의 Laemmli sample buffer를 넣고 150V에서 4시간 동안 전기영동 하였다. Coomassie brilliant blue staining solution으로 염색 후 젤 사진을 확보하였다.

Lab-on-a-chip을 이용한 고분자 글루테닌의 조성 분석은 추출한 1 ml 고분자 글루테닌 단백질을 제조사 매뉴얼에 따라 Protein 230(Agilent Technologies, 미국) 칩에 넣고 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, 미국) 기기를 이용하여 전기영동 하였다. 고분자 글루테닌의 조성은 Mondal et al. (2008)의 방법에 따라 판독하였다. 고분자 글루테닌의 단백질 정량은 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, 미국) 프로그램을 이용하였다.

분자표지를 이용한 고분자 글루테닌 대립유전자 유전형 분석

DNA 추출은 파종 후 21일된 유묘의 잎을 채취하여 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 방법으로 추출하였다(Murray & Thompson 1980). 문헌조사를 통하여 기존 개발된 젤 기반 HMW-GS 분자표지 중 다수의 문헌에서 검토된 분자표지 12종과 KASP 분자표지 5종 선발하였다(Tables 2, 3). 젤 기반 분자표지의 PCR은 분리된 gDNA 50 ng와 유전자 특이 프라이머 0.5 nmole, 0.3 ml Taq polymerase, 200 mM dNTP, 1 × PCR buffer를 첨가하여 수행하였다. PCR 기기는 Veriti Thermal Cycler (Applied biosystem, Carlsbad, 미국)를 사용하였다. KASP 분자표지는 기존 보고된 염기서열을 사용하였으며, PCR 반응은 50 ng의

Table 2. Primer information of high-molecular-weight glutenin subunits used in the study.

Locus	Gene type	Primer name	Marker type	Target Allele	PCR size (bp)	Forward primer sequence (5'-3')	References ^z
						Reverse primer sequence (5'-3')	
<i>Glu-A1</i>	x-type	UMN19	Co-dominant	2*	344	CGAGACAATATGAGCAGCAAG	Liu et al. (2008)
				non-2*	362	CTGCCATGGAGAAGTTGGA	
		Glu-Ax2*	Dominant	2*	1200	ATGACTAAGCGGTTGGTTCTT	Ma et al. (2003)
				non-2*	No band	ACCTTGCTCCCCCTGTCTTT	
<i>Glu-B1</i>	x-type	Bx-17	Co-dominant	Bx17	669	CGCAACAGCCAGGACAATT	Ma et al. (2003)
				nonBx17	630,766	AGAGTTCTATCACTGCCTGGT	
		cauBx642	Co-dominant	Bx17	534	GGGCAATCGGGTACTTCC	Xu et al. (2008)
				nonBx17	642	CCCTTGCTCTGGCTGTTGTC	
		Bx-7 ^{OE} left	Dominant	Bx7 ^{oe}	447	ACGTGTCCAAGCTTTGGTTC	Ragupathy et al. (2008)
				non-Bx7 ^{oe}	(x)	GATTGGTGGGTGGATACAGG	
		Bx-7 ^{OE} right	Dominant	Bx7 ^{oe}	844	CCACTTCCAAGGTGGGACTA	Ragupathy et al. (2008)
				non-Bx7 ^{oe}	No band	TGCCAACACAAAAGAAGCTG	
	y-type	ZSBy8	Dominant	By8	527	TTAGCGCTAAGTGCCGTCT	Liu et al. (2008)
				nonBy8	(x)	TTGTCCTATTGCTGCCCTT	
		ZSBy9a	Co-dominant	By9	662	TTCTCTGCATCAGTCAGGA	Liu et al. (2008)
				nonBy9	707	AGAGAAGCTGTGTAATGCC	
<i>Glu-D1</i>	x-type	UMN25	Co-dominant	Dx2	299	GGGACAATACGAGCAGCAAA	Liu et al. (2008)
				Dx5	281	CTTGTTCCGGTTGTTGCCA	
		Dx-5-1	Dominant	Dx5	478	CGTCCCTATAAAAGCCTAGC	Liu et al. (2008)
				non-Dx5	No band	AGTATGAAACCTGCTGCGGAC	
		Dx-5-2	Dominant	Dx5	450	GCCTAGCAACCTTCACAATC	Liu et al. (2008)
				non-Dx5	No band	GAAACCTGCTGCGGACAAG	
	y-type	UMN26	Co-dominant	Dy10	397	CGCAAGACAATATGAGCAAAC	Liu et al. (2008)
				Dy12	415	TTGCCCTTTGCTCTGTGTGC	
		Dy-10	Co-dominant	Dy10	576	GTTGGCCGGTCGGCTGCCATG	Ahmad (2000)
				Dy12	612	TGGAGAAGTTGGATAGTACC	

^zEach primer information was obtained from published articles.

gDNA와 1 × KASP Master mixture, 0.056 ml의 프라이머를 첨가하여 수행하였다. 젤 기반 분자표지와 KASP 분자표지의 PCR은 Touch down 방법으로 65°C에서 시작하여 각 횟수 마다 0.6°C씩 온도를 낮추어서 PCR을 10회 수행한 후 56°C에서 30초, 72°C에서 45초 총 30회 반복하고 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 종료하였다. 젤 기반 분자표지의 PCR 산물은 3% agarose gel에서 전기영동하고 Gel documentary system을 통하여 사진을 확보하였다. KASP 분자표지는 7500 fast Real-Time PCR system (Applied biosystems, 미국)을 통하여 FAM과 HEX 필터를 이용하여 유전형을 분석하였다(Allen et al. 2013).

결과 및 고찰

분자표지 선발을 위한 표준 품종의 고분자 글루테닌 단백질 조성 검정

밀 육성 품종과 재래종에서 다양한 HMW-GS가 보고되어 있으나 육성 품종에는 품질에 영향력이 큰 몇몇 HMW-GS가 이용되고 있다(Yasmeen et al. 2015). 품종 육성에 활용되고 있는 HMW-GS의 주요 대립유전자를 판독할 수 있는 분자표지를 검정하기 위하여 본 연구에서는 Table 1과 같이 주요 대립유전자를 대표할 수 있는 고분자 글루테닌 조성이 보고된 국내외 품종 14종을 표준품종으로 수집하고 활용하였다(Jang et al. 2017). 본 연구에 이용된 품종의 *Glu-A1* 대립유전자는 *Glu-A1a*,

Table 3. Kompetitive allele-specific PCR (KASP) assay information used in the study^z.

Locus	Primer Name	Target Allele	SNP		Primer sequence (5'-3')
<i>Glu-A1</i>	Glu-Ax1/2*_SNP	Ax1, Ax2*	G	FAM	AAGTGTAACCTCTCCGCAACG
		Ax-null	A	HEX	ACCTAAGTGTAACCTCTCCGCAACA
				Common	CGAAGAAGCTTGGCCTGGATAGTAT
	Glu-Ax2*_IND	Ax1, Ax-null	Indel	FAM	ATTCTTGTGTCTTGTCTCTGGCT
		Ax2*		HEX	CTTGTTGTCCTTGTCTCTGGCC
				Common	GGTTTCATACTATCCAGGCCAAGCTT
<i>Glu-B1</i>	BX7 ^{OE} _866_SNP	Bx7 ^{OE}	C	FAM	GTGGAATATTAGTGATGGCGTGAC
		non-Bx7 ^{OE}	G	HEX	GTGGAATATTAGTGATGGCGTGAG
				Common	TTCTTCTCTCGTTGGCCTTATCGC
	Bx13_SNP	non-Bx13	-	FAM	CAACGACCGGGACAAGGGCAAC
		Bx13	-	HEX	CAACGACCGGGACAAGGGCAAT
				Common	CTGTGGAGAGGTTGGGTAGTACCC
<i>Glu-D1</i>	Glu-D1d_SNP	non-Dx5	C	FAM	ATAGTATGAAACCTGCTGCGGAG
		Dx5	G	HEX	ATAGTATGAAACCTGCTGCGGAC
				Common	TACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACCT

^zAll primer information was obtained from Rasheed et al. (2016).

*Glu-A1b*와 *Glu-A1c* 3종류였고, *Glu-B1* 유전자좌에는 *Glu-B1c*와 *Glu-B1i* 등 6 종류였으며, *Glu-D1* 유전자좌에는 *Glu-D1a*와 *Glu-D1d* 등 4 종류를 포함하고 있었다.

SDS-PAGE 방법과 Lab-on-a-chip 전기영동 방법을 이용하여 HMW-GS 조성을 확인하였다(Fig. 1). SDS-PAGE 방법은 주로 15 × 15 cm 이상의 사이즈가 큰 젤이 많이 이용되는데, 크기가 크면 HMW-GS 조성을 명확하게 판독할 수 있는 장점이 있지만, 전기영동 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이를 극복하고자 젤 크기를 13 × 8.7 cm로 줄이고 농도 구배(3~8%)를 포함하여 젤 농도를 다양하게 처리하여 분석하였다(7.5%, 10%, 12%, 15%). 7.5%, 10%와 12%는 전기영동의 시간이 3~5시간으로 줄어들었지만, *Glu-D1* 유전자좌의 *Glu-D1y10*과 *Glu-D1y12*의 구별이 불가능하였다. 15% 농도는 전기영동 시간이 8 시간 이상으로 길었다. 농도구배 젤의 경우 전기영동 시간은 4시간 이내였으며, *Glu-D1y10*과 *Glu-D1y12*의 구별이 가능하였다(Fig. 1). 농도구배 SDS-PAGE를 이용한 결과, 본 연구에 이용된 14개 품종의 HMW-GS 조성은 기본에 보고된 결과와 일치하였다(Fig. 1, Table 4).

SDS-PAGE에서는 HMW-GS 분자량이 약 70ka 이상이지만, Lab-on-a-chip을 이용하였을 때는 95 kDa 이상으로 나타나며, SDS-PAGE 결과와 달리 *Glu-D1x5*이 *Glu-A1a*나 *Glu-A1b*보다 분자량이 크게 나타나는 역전현상이 Lab-on-a-chip에는 발생한

Fig. 1. Analysis of high-molecular-weight glutenin subunit composition of standard varieties used in this study. A. HMW-GS was analyzed by SDS-PAGE with 3~8% Criterion XT tris-acetate protein gel. Each 10m of extracted protein from one seed loaded on the gel. Photograph was taken after coomassie brilliant blue staining and destaining. B. Analysis of HMW-GS by Lab-on-a-chip electrophoresis with Protein 230 kit using 2100 bioanalyzer. HMW-GS composition was analyzed according to its relative molecular weight.

Table 4. High-molecular-weight glutenin subunit of varieties used in the study.

Cultivar	<i>Glu-A1</i> Locus			<i>Glu-B1</i> Locus			<i>Glu-D1</i> Locus		
	Reported	SDS-PAGE	DNA Marker	Reported	SDS-PAGE	DNA Marker	Reported	SDS-PAGE	DNA Marker
Petrel	null	null	null	7	7	-	5+10	5+10	5+10
Brimstone	null	null	null	6+8	6+8	6+8	2+12	2+12	-
Junggye5336	null	null	null	7+8	7+8	7+8	2.2+12	2.2+12	-
Chukoku122	null	null	null	7+9	7+9	7+9	2.2+12	2.2+12	-
Jopoom	null	null	null	13+16	13+16	-	2.2+12	2.2+12	-
Joongmo2008	null	null	null	17+18	17+18	17+18	5+10	5+10	5+10
Jokyoung	1	1	1	7+8	7+8	7+8	5+10	5+10	5+10
Cajeme	1	1	1	17+18	17+18	17+18	5+10	5+10	5+10
Kenya-5	1	1	1	13+16	13+16	-	5+10	5+10	5+10
Joongmo2012	2*	2*	2*	7+8	7+8	7+8	5+10	5+10	5+10
Norin 61	2*	2*	2*	7+8	7+8	7+8	2.2+12	2.2+12	-
Sukwang	2*	2*	2*	13+16	13+16	-	2.2+12	2.2+12	-
Younbaek	2*	2*	2*	13+16	13+16	-	2.2+12	2.2+12	-
BI1102	2*	2*	2*	17+18	17+18	17+18	5+10	5+10	5+10

다(Mondal et al. 2008). 그러나 Lab-on-a-chip은 분석 시간이 짧고, 단백질 정량을 쉽게 할 수 있는 장점이 있다. Lab-on-a-chip으로 14 품종의 HMW-GS를 분석한 결과 SDS-PAGE 분석과 동일하였다.

Glu-A1 유전자좌 유전형 판별 분자표지 검정

Glu-A1 유전자좌의 y-type 유전자는 유전자 침묵(gene silencing)으로 발현이 되지않고 x-type 대립유전자인 *Glu1-A1a*, *Glu1-A1b*와 *Glu1-A1c*만이 발현된다(De Bustos et al. 2000). 3개의 *Glu-A1* 대립유전자 분자표지 탐색을 위하여 아가로스 젤 기반의 STS 분자표지 2종(UMN19, Ax2*)과 형광 기반의 KASP 분자표지 2종(*Glu-Ax1/Ax2*_SNP*와 *GLu-Ax2*_IND*)을 검정하였다(Ma et al. 2003, Liu et al. 2008, Rasheed et al. 2016). 공우성(co-dominant) STS 분자표지인 UMN19는 *Glu1-A1b* (344 bp)를 *Glu1-A1a*와 *Glu1-A1c* (362 bp)로부터 구별할 수 있으며, 우성(dominant) STS 분자표지인 Ax2*도 *Glu1-A1b*를 특이적으로 구별할 수 있다(Ma et al. 2003, Liu et al. 2008). 이들 분자표지는 UMN19는 국내 품종 중에서 *Glu1-A1b*를 지닌 금강과 *Glu1-A1a*를 지닌 조경과 *Glu1-A1c*인 중모2008의 구분은 가능하였지만, 조경과 중모2008을 구분할 수는 없었다(Fig. 2A). 이러한 문제를 해결하기 위해 KASP 분자표지인 *Glu-Ax1/x2*_SNP*와 *Glu-Ax2*_IND*를 적용한 결과, *Glu1-A1c*를 지닌 품종은 SNP “A” allele로 나타났으며, *Glu1-A1a*와

Fig. 2. Evaluation of molecular markers for genotype analysis of *Glu-A1* locus. A. Evaluation of molecular marker UMN19 for *Glu1-Ax2**. PCR with UMN19 was performed by touch-down method from 65°C for 10 cycles and then followed more 30 PCR cycles at 55 °C for annealing. Gel photograph was taken after electrophoresis on 3% agarose gel for 1 hour. B and C. Scatter plots for *Glu-Ax1/2*_SNP* and *Glu-Ax2*_IND* assay showing clustering of varieties on the X-(FAM) and Y-(HEX) axes. B. Red color indicates *Glu1-Ax1* and *Glu1-Ax2** allele and blue color shows *Glu1-AxNull* allele of each varieties. C. Red color indicates *Glu1-Ax2** allele and blue color shows *Glu1-Ax1* and *Glu1-AxNull* allele of each varieties. All experiments were repeated three times independently.

*Glu1-A1b*를 지닌 품종은 SNP “G” allele로 나타났다(Table 3). *Glu1-A1b*를 구분하는 것으로 알려진 *Glu-Ax2**_IND 분자표지는 본 연구에서 사용한 실험 방법에서 FAM과 HEX의 형광 반응이 X축과 Y축으로 명확히 구분되지 않았다. 위의 연구 결과를 종합하면, 국내 밀 육종에서 *Glu1-A1* 유전자형을 구분하기 위해서는 STS 분자표지인 UMN19와 KASP 분자표지인 *Glu-Ax1/x2*_SNP*를 병행 사용이 효율적인 것으로 보인다.

Glu-B1 유전자와 유전형 판별 분자표지 검정

Glu-B1 유전자좌에는 50종류 이상 대립유전자가 보고되었지만, 빵용에 적합한 재배 품종은 대부분 *Glu-B1b*, *Glu-B1i*와 *Glu-B1a* 등을 지닌 것으로 알려져 있다(Lei et al. 2006). 국내 품종에서는 조경과 금강은 *Glu-B1b*를, 중모2008이 *Glu-B1i* 대립유전자를 지니고 있으며, 연백과 조품은 *Glu-B1f*를 가지고 있다. 조경의 *Glu-B1b* 대립유전자 판별하기 위하여 STS 분자표지인 ZSBy8과 ZSBy9a를 적용하였으며, 기존의 *Glu1-Bx7* 대립유전자 판별 분자표지는 2,000 bp 이상으로 육종 프로그램에 활용 가능성이 낮아 배제하였다(Anderson & Greene 1989, Rai et al. 2018). 우성 분자표지인 ZSBy8을 이용하여 *Glu-B1b*를 보유한 Junggye5336, Kenya-5와 Norin 61 품종에서만 특이적으로 DNA가 증폭된 것을 확인하였으며, 공우성인 ZSBy9a 분자표지를 이용하여 *Glu-B1c* 대립유전자를 보유한 Chukoku122에서 662 bp 밴드를 확인하였고, 다른 대립유전자를 보유한 품종에서는 707 bp의 밴드를 확인하였다(Figs. 3A, 3B).

Glu-B1i 대립유전자의 확인은 2개의 STS 분자표지를 이용하였는데, cauBx642로 유전형을 분석한 결과 *Glu-B1i*를 지닌 중모2008과 Cajeme, B11102는 534 bp의 밴드가 나타났고, *Glu1-Bx6*을 지닌 Brimstone는 660 bp를, 다른 품종은 642 bp 밴드를 나타내었다(Fig. 3C). 제빵력이 우수한 품종이 *Glu-B1a*를 지닌 것으로 알려지면서 *Glu-B1a* 대립유전자에 대한 관심이 높아지고 있는데, 분자표지 검정을 위하여 본 연구에서 평가한 품종과

국내 육성 품종에는 *Glu-B1a* 대립유전자를 보유한 자원이 없었다. *Glu-B1a* 자원 선발을 위하여 Lab-on-a-chip 방법 통하여 국립식량과학원 남부작물부에서 보유하고 있는 유전자원의 HMW-GS 조성을 분석하였다. Lab-on-a-chip 분석 결과 *Glu-B1b*의 조정보다 단백질 발현이 2배 높은 Vesna와 Yecora f-70를 이용하여(Fig. 4), *Glu-B1a* 대립유전자의 x-type 유전자인

Fig. 3. Evaluation of molecular markers for genotype analysis of *Glu-B1* locus. A-C. Molecular markers, cauBx642 (A), ZSBy8 (B), and ZSBy9a (C), were examined after agarose gel electrophoresis. All of markers were applied with touch-down method from 65°C for 10 cycles and then followed more 30 PCR cycles at 55 °C for annealing. Gel photograph was taken after electrophoresis on 3% agarose gel for 1 hour. D and E. Scatter plots for Bx7^{OE}_866_SNP and Bx13_SNP assay, respectively, showing clustering of varieties on the X-(FAM) and Y-(HEX) axes. D. Red color indicates *Glu1-nonBx17*^{OE} allele and blue color shows *Glu1-Bx17*^{OE} allele of each varieties. E. Red color indicates *Glu1-Bx13* allele and blue color shows *Glu1-nonBx13* allele of each varieties. All experiments were repeated three times independently.

Fig. 4. Quantity of each HMW-GS composition. HMW-GS protein was separated on Protein 230 chip with 2100 bioanalyzer and quantity of HMW-GS was calculate with 2100 expert program (Agilent Technologies, CA, USA). Each content was measured as relative content.

Glu1-Bx7^{OE} 대립유전자를 판별할 수 있는 STS 분자표지 2종(*Bx-7^{OE}* left, *Bx-7^{OE}* right)과 KASP 분자표지 1종(*BX7^{OE}_866_SNP*)을 검정하였다(Ragupathy et al. 2008). STS 분자표지인 *Bx-7^{OE}* left와 *Bx-7^{OE}* right는 우성 분자표지로서 *Vesna*와 *Yecora f-70* 품종에서 각각 특이적으로 DNA가 증폭되었다(Data not shown). KASP 분자표지인 *BX7^{OE}_866_SNP*을 이용한 결과, *Vesna*와 *Yecora f-70*은 *BX7^{OE}_866_SNP* 분자표지의 “C”의 SNP를 가지고 있었으며, 다른 대립유전자를 보유한 품종에서는 “G”의 SNP를 가지고 있었다(Fig. 3D). 이러한 결과를 통하여 *BX7^{OE}_866_SNP* 분자표지와 STS 분자표지를 활용하여 *Glu1-B1a* 대립유전자의 국내 품종으로 도입을 적극적으로 검토해야 할 것이다.

Glu1-D1 유전자좌 유전형 판별 분자표지 검정

국내 품종의 *Glu1-D1* 유전자좌에는 *Glu1-D1a*, *Glu1-D1d*와 *Glu1-D1f* 대립유전자가 존재하는데, *Glu1-D1d*는 *Glu1-D1x5*와 *Glu1-D1y10*을 지니고 제빵 적성에 적합한 품종이 반드시 지니고 있어야 하는 대립유전자로 알려져 있다(Zhang et al. 2014). 국내 품종 중에는 금강, 백강, 조경, 탑동, 황금과 중모2008이 *Glu1-D1d* 대립유전자를 지니고 있으며, 대부분의 품종은 *Glu1-D1f* 대립유전자를 가지고 있고 일부 품종이 *Glu1-D1a* 대립유전자를 지니고 있다(Jang et al. 2017). *Glu1-D1d* 대립유전자의 *Glu1-Dx5*와 *Glu1-Dy10*을 판별할 수 있는 4종과 2종을 각각 검정하였다. *Glu1-Dx5* 구별을 위해 STS 분자표지 3종(UMN25, Dx5-1과 Dx5-2)과 KASP 분자표지 1종(*Glu1-D1d_SNP*)을 이용하였다. 아가로스 젤 기반 분자분자표지인 공우성 분자표지인 UMN25로 *Glu1-Dx5*를 지닌 중모2008과 Petrel 등은 281 bp가 증폭되었으

며, 다른 유전형에서는 299 bp가 증폭되어 *Glu1-Dx5*를 판별 할 수 있었다(Fig. 5A). 우성 분자표지인 Dx5-1과 Dx5-2는 *Glu1-Dx5*를 지닌 품종은 각각 478 bp와 450 bp의 단편이 증폭되어 판별이 가능하였지만 공우성 분자표지에 비해서 적용의 한계가 있었다(Fig. 5B). *Glu1-Dx5* 판별을 위한 KASP 분자표지 *Glu1-D1d_SNP* 검정 결과, *Glu1-Dx5*를 지닌 품종은 “G” (HEX) SNP를 나타내었고, *Glu1-Da*와 *Glu1-D1f* 대립유전자를 지닌 품종은 “C” (FAM) SNP를 나타내었다(Fig. 5C).

Glu1-D1 대립유전자의 y-type 인 *Glu1-Dy10*와 *Glu1-Dy12*를 판별하기 위해, STS 분자표지 2종(UMN26, Dy-10)을 검정하였다. 공우성 분자표지 UMN26의 경우, *Glu1-Dy10*을 지닌 품종은 397 bp의 DNA 단편이 증폭되었으며, *Glu1-Dy12*를 지닌 품종은 415 bp의 DNA 단편을 보였다(Fig. 5D). Ahmad M (2000)이 보고한 *Glu1-Dy10* 판별 분자표지는 본 연구에서는 멀티 밴드 패턴으로 나타나 판별에 이용하기 어려웠다. UMN25와 UMN26을 이용하여 *Glu1-D1d* 대립유전자를 판별이 가능하지만 증폭된 DNA 단편의 차이가 작아 육종 프로그램에서 대량 검정에 활용하였을 때 어려움이 예상되어 KASP 기반의 분자표지 *Glu1-D1d_SNP*를 함께 이용하는 것을 제안한다. 국내 품종이 많이 보유하고 있는 *Glu1-D1f*의 판별을 위한 추가적인 분석도 필요하다.

적 요

HMW-GS 조성은 밀의 품질을 결정하는 주요 요인으로 종자 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 이용한 분석이 주로 이루어졌

Fig. 5. Evaluation of molecular markers for genotype analysis of *Glu1-D1* locus. A-C. Molecular markers, UMN25 (A), Dx5-1 (B) and UMN26 (C), were examined after agarose gel electrophoresis. All of markers were applied with touch-down method from 65°C for 10 cycles and then followed more 30 PCR cycles at 55 °C for annealing. Gel photograph was taken after electrophoresis on 3% agarose gel for 1 hour. D. Scatter plots for *Glu1-D1d_SNP*. D. Red color indicates *Glu1-Dx5* allele and blue color shows *Glu1-nonDx5* allele of each varieties. All experiments were repeated three times independently.

으나, 분석 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 육종프로그램에서 대량 검정을 위하여 본 연구에서는 STS와 KASP 표지인자 적용을 검토하였다. *Glu-A1* 유전자좌의 *Glu-A1b* 대립유전자를 판독에는 STS 분자표지인 UMN19와 *Glu-A1c* 대립유전자를 판독할 수 있는 KASP 분자표지 *Glu-Ax1/2*_SNP*이 적합하였다. *Glu-B1* 유전자좌의 *Glu-B1b*, *Glu-B1c*와 *Glu-B1i* 대립유전자 판별을 위한 STS 분자표지로는 ZSBy8, ZSBy9a과 cauBx642가 각각 적합하였다. *Glu-B1a1* 대립유전자 판별을 위해서는 KASP 분자표지 BX7^{OE}_866_SNP가 가능하였다. *Glu-D1* 유전자좌의 *Glu-D1d* 대립유전자를 판별할 수 있는 KASP 분자표지로 *Glu-D1d_SNP*이 가능하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 밀 고분자 클루테닌의 유전적 조성 및 품질 연관성 구명, PJ013564022020)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Ahmad M. 2002. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theor Appl Genet* 101: 892-896.
- Allen AM, Barker GL, Wilkinson P, BurrIDGE A, Winfield M, Coghil J, Uauy C, Griffiths S, Jack P, Berry S. 2013. Discovery and development of exome-based, co-dominant single nucleotide polymorphism markers in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol J* 11: 279-295.
- Anderson O, Greene F. 1989. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet* 77: 689-700.
- Anjum FM, Khan MR, Din A, Saeed M, Pasha I, Arshad MU. 2007. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits--structure, genetics, and relation to dough elasticity. *J Food Sci* 72: R56-63.
- Ayalew H, Tsang PW, Chu C, Wang J, Liu S, Chen C, Ma XF. 2019. Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat. *PloS one* 14: e0217222.
- Choi CH, Park JH, Mo Y, Kim KM, Kim KH, Kang CS, Park TI, Cho SW, Park CS. 2020. Effect of heterozygous genotypes at the Pinb-D1 loci on physicochemical properties of flour and end-use quality. *Korean J Breed Sci* 52: 131-139.
- De Bustos A, Rubio P, Jouve N. 2000. Molecular characterisation of the inactive allele of the gene Glu-A1 and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat. *Theor Appl Genet* 100: 1085-1094.
- Gao S, Sun G, Liu W, Sun D, Peng Y, Ren X. 2020. High-molecular-weight glutenin subunit compositions in current Chinese commercial wheat cultivars and the implication on Chinese wheat breeding for quality. *Cereal Chem* 97: 762-771.
- Geisslitz S, America AH, Scherf KA. 2020. Mass spectrometry of in-gel digests reveals differences in amino acid sequences of high-molecular-weight glutenin subunits in spelt and emmer compared to common wheat. *Anal Bioanal Chem* 412: 1277-1289.
- Gilbert SM, Wellner N, Belton PS, Greenfield JA, Siligardi G, Shewry PR, Tatham AS. 2000. Expression and characterisation of a highly repetitive peptide derived from a wheat seed storage protein. *Biochim Biophys Acta* 1479: 135-146.
- Jang YR, Beom HR, Altenbach SB, Lee MK, Lim SH, Lee JY. 2017. Improved method for reliable HMW-GS identification by RP-HPLC and SDS-PAGE in common wheat cultivars. *Molecules* 22: 1055.
- Kang J, Lee S, Lee J, Kwon Y, Lee S, Kabange N, Shin D, Cha J, Park D, Ko J. 2020. Development and validation of KASP markers for Stv-bi, a rice stripe virus resistance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed Biotech* 8: 196-201.
- Lei Z, Gale K, He Z, Gianibelli C, Larroque O, Xia X, Butow B, Ma W. 2006. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat. *J Cereal Sci* 43: 94-101.
- Liu S, Chao S, Anderson JA. 2008. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. *Theor Appl Genet* 118: 177-183.
- Ma W, Zhang W, Gale K. 2003. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica* 134: 51-60.
- Mondal S, Tilley M, Alviola JN, Waniska RD, Bean SR, Glover KD, Hays DB. 2008. Use of near-isogenic wheat lines to determine the glutenin composition and functionality requirements for flour tortillas. *J Agr Food Chem* 56: 179-184.
- Murray M, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high

- molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4326.
18. Ortolan F, Steel CJ. 2017. Protein characteristics that affect the quality of vital wheat gluten to be used in baking: A review. *Compr Rev Food Sci F* 16: 369-81.
19. Payne PI, Lawrence GJ. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res Commun* 11: 29-35.
20. Peng Y, Yu K, Zhang Y, Islam S, Sun D, Ma W. 2015. Two novel y-type high molecular weight glutenin genes in Chinese wheat landraces of the yangtze-river region. *PloS One* 10: e0142348.
21. Ragupathy R, Naem HA, Reimer E, Lukow OM, Sapirstein HD, Cloutier S. 2008. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat GLU-B1 locus encoding the overexpressed Bx7 (Bx7^{OE}) high molecular weight glutenin subunit. *Theor Appl Genet* 116: 283-296.
22. Rai R, Singh S, Das BK, Bhagwat SG. 2018. Application of allele-specific (AS-PCR) marker for identification of high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS) at the GluB-1 locus in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Adv Crop Sci Tech* 6: 387.
23. Rasheed A, Wen W, Gao F, Zhai S, Jin H, Liu J, Guo Q, Zhang Y, Dreisigacker S, Xia X, He Z. 2016. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor Appl Genet* 129: 1843-1860.
24. Ravel C, Faye A, Ben-Sadoun S, Ranoux M, Dardevet M, Dupuits C, Exbrayat F, Poncet C, Sourdille P, Branlard G. 2020. SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat. *Theor Appl Genet* 133: 751-770.
25. Roy N, Islam S, Ma J, Lu M, Torok K, Tomoskozi S, Bekes F, Lafiandra D, Appels R, Ma W. 2018. Expressed Ay HMW glutenin subunit in Australian wheat cultivars indicates a positive effect on wheat quality. *J Cereal Sci* 79: 494-500.
26. Shewry PR, Hey SJ. 2015. The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur* 4: 178-202.
27. Singh NK, Shepherd KW, Cornish GB. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J Cereal Sci* 14: 203-208.
28. Tan CT, Yu H, Yang Y, Xu X, Chen M, Rudd JC, Xue Q, Ibrahim AM, Garza L, Wang S. 2017. Development and validation of KASP markers for the greenbug resistance gene Gb7 and the Hessian fly resistance gene H32 in wheat. *Theor Appl Genet* 130: 1867-1884.
29. Xu Q, Xu J, Liu CL, Chang C, Wang CP, You MS, Li BY, Liu GT. 2008. PCR-based markers for identification of HMW-GS at *Glu-B1x* loci in common wheat. *J Cereal Sci* 47: 394-398.
30. Yasmeen F, Khurshid H, Ghafoor A. 2015. Genetic divergence for high-molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) in indigenous landraces and commercial cultivars of bread wheat of Pakistan. *Genet Mol Res* 14: 4829-4839.
31. Yuan Z, Liu M, Ouyang Y, Zeng X, Hao M, Zhang L, Ning S, Yan Z, Liu D. 2014. The detection of a de novo allele of the *Glu-1Dx* gene in wheat-rye hybrid offspring. *Theor Appl Genet* 127: 2173-2182.
32. Zhang P, Jondiko TO, Tilley M, Awika JM. 2014. Effect of high molecular weight glutenin subunit composition in common wheat on dough properties and steamed bread quality. *J Sci Food Agr* 94: 2801-2806.