



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0029482
(43) 공개일자 2008년04월03일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0095687

(22) 출원일자 2006년09월29일

심사청구일자 2006년09월29일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

안상낙

대전 유성구 궁동 220 충남대학교 농업생명과학대학 농학과

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

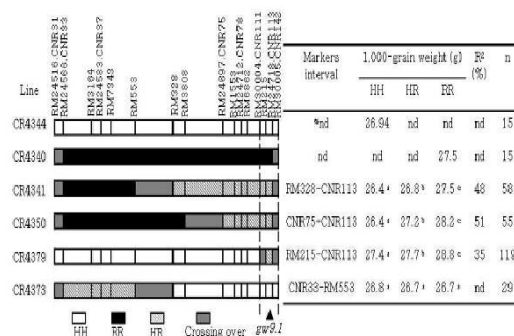
(54) 벼의 수량성 증진에 관여하는 고밀도 양적형질 유전자 지도

(57) 요약

본 발명은 벼 근동질계통과 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용한 벼의 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자의 고밀도지도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 *Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 여 교잡하여 얻어진 근동질계통을 대상으로 양적형질 유전자(QTL) 분석을 실시하여 작성된 벼 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 벼 고밀도 양적형질 유전자지도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 양적형질 유전자지도는 벼 수량성 증진에 관여하는 특정 양적형질 유전자좌를 확인함으로써 수량 관련 형질의 유전적 배경에 대한 직접적인 정보를 제공할 수 있는 고밀도 양적형질 유전자 지도인 것으로 평가되었다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

*Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 여교잡하여 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용하여 작성된 벼의 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 벼의 고밀도 양적형질 유전자 지도.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 양적형질 유전자좌는 9번 염색체 장완상의 4.0 cM 부위에 위치하는 것을 특징으로 하는 벼의 고밀도 양적형질 유전자 지도.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 양적형질 유전자좌는 gw9-1, sn9-1, gn9-1, den9-1, pl9-1 및 yd9-1을 포함하는 것을 특징으로 하는 벼의 고밀도 양적형질 유전자 지도.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 양적형질 유전자좌는 대략 37.4 kb 부위에 위치하는 것을 특징으로 하는 벼의 고밀도 양적형질 유전자 지도.

청구항 5

*Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 여교잡하여 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용하여 작성된 벼의 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 근동질 유전자계통.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 양적형질 유전자좌가 천립중, 이삭당 영화수, 이삭당 립수, 이삭당 영화밀도, 이삭길이 및 종실수량 중에서 선택되는 하나 이상의 형질과 관련되어 있는 것을 특징으로 하는 근동질 유전자계통.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<5> 작물 개량을 위해 분자유전학을 이용하는 목표 중의 하나는 필요한 유용유전자의 탐색, 특성 규명, 분리 및 이용을 통해 우수한 신품종을 육성하는 것이다. 지난 10여 년 동안 작물의 게놈(genome) 연구를 위한 다양한 기술이 개발되었는데, 이 중 DNA 표지인자를 이용한 기술은 전통적인 육종 방법으로 해결하기 힘든 여러 문제들에 대한 해법을 제시해 주고 있으며, 대표적인 것들로 양적형질 유전자좌(QTL: quantitative trait locus)의 분석과 야생종 등의 유전자원에서 유용유전자의 탐색 및 이용 등을 들 수 있다.

<6> 야생벼는 작물의 수량성 뿐만 아니라 병해충저항성, 스트레스 저항성 및 이와 관련된 형질들의 개선을 위한 유용 유전자들의 중요한 공급원이다. 야생 유용유전자를 탐색하여 이들을 재배종에 도입하고 마커를 이용하여 선발하는(marker-assisted selection) 일련의 기술은 수량성, 각종 저항성 등을 개선하는데 있어 효과적인 수단으로 알려져 있다. 현재 전세계적으로 유전자은행에 보관중인 많은 양의 유전자들이 수량 및 기타 유용한 형질들에 관여하는 새로운 유전자들을 탐색하는데 있어 기초 연구 자료로 광범위하게 활용되고 있다.

<7> 식물 게놈 분석 기술의 진보로 양적형질 유전자좌에 관여하는 유전적 변이의 연구가 가능해졌으며, 목표유전자의 이전 및 선발에 MAS(marker-assisted selection)가 효율적으로 이용될 수 있게 되었는데, 특히 양적형질 유전자좌 (QTLs: quantitative trait loci) 분석은 분자표지인자를 이용하고 측정이 가능한 형질에 관여하

는 염색체의 특정 부분을 확인함으로써, 특정 환경에서 수량성, 과실 무게, 출수기 등 주요 형질에 관여하는 유전자의 수 및 염색체 위치, 개개 유전자의 영향력, 상위작용, 양적형질 유전자좌와 환경과의 상호작용, 그리고 양적형질 유전자좌와 유전적인 배경과의 상호작용 등 주요 농업형질의 유전적 배경에 대한 전반적이고 직접적인 정보를 얻을 수 있다.

<8> 벼는 밀 다음으로 세계 제2의 식량작물로서 세계 인구의 과반 이상이 쌀을 주식으로 하고 있으며, 아시아에서 90% 이상이 생산되어 주로 소비되고 있다. 최근의 연구에 따르면, 벼의 생산이 인구증가를 만족시키기 위해서는 2030년까지 40%가 증가해야 한다고 한다(Khush, G.S., Nutr. Rev., 2003, 61:114-116). 그러나 현재까지 벼의 품질은 상당 수준으로 향상되었으나 수량성의 개선에는 이렇다 할 큰 진전이 없었다.

<9> 벼의 경우 전체 유전변이의 약 75%를 보유하고 있는 야생벼 유전자원은 수량성뿐만 아니라 병해충 저항성, 스트레스 저항성 및 다른 특성에 대한 유용 유전자들의 원천(source)이며(Moncada P. et al., Theor. Appl. Genet., 2001, 102: 41-52; Thomson M.J. et al., Theor. Appl. Genet., 2003, 107:479-493), 최근에는 DNA 마커(marker)를 이용하여 야생벼로부터 재배벼의 양적형질을 개선시키는 유전자를 탐색하는 연구가 수행되고 있다(Price A.H. et al., Plant Mol. Biol., 2002, 48:683-695). 또한, 옥수수, 토마토, 벼 등의 작물에서 양적형질 유전자좌를 대상으로 근동질유전자 계통(nearly isogenic line, NIL)을 작성하는 연구가 수행되고 있는데, 이 연구는 주로 유망 계통의 유전적 배경에 수여친(donor)의 염색체 단편을 포함하는 근동질 유전자계통을 작성하는 것으로, 각 근동질 유전자계통마다 수여친의 서로 다른 염색체 단편을 가지고 있는 것이 된다.

<10> 또한, 지금까지 대부분의 양적형질 유전자좌 분석 연구에서 제I형의 오류를 범할 확률을 줄이기 위해 확률 수준을 높인 결과 영향력이 큰 양적형질 유전자좌만 검정되는 경우가 많은데, 이들은 이미 육종 집단에서 이용되고 있는 것이 대부분이다. 그러므로 영향력이 적지만 육종적으로 이용 가치가 높은 양적형질 유전자좌를 탐색하고 이용할 수 있는 방법의 개발도 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<11> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 재배벼의 수량성 등 형질의 개선을 위해 야생벼 *O. rufipogon*의 유용유전자를 탐색하고 탐색된 유용유전자의 고밀도 양적형질 유전자지도를 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 다른 목적은 야생벼 *Oryza rufipogon*의 염색체 단편이 이입되어 벼의 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 우수한 근동질 유전자계통을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<13> 이와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은 근동질계통과 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용한 벼 수량성 증진에 관여하는 고밀도 양적형질 유전자지도에 관한 것이다.

<14> 본 발명은 *Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 하여 계속적인 여교잡 결과 육성된 근동질계통을 대상으로 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용하여 작성된 벼 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 벼의 고밀도 양적형질 유전자지도에 관한 것이다.

<15> 본 발명의 상기 양적형질 유전자좌는 근동질계통의 분석결과 9번 염색체 장완에 위치하는 마이크로새터 라이트 마커 RM215를 포함하는 약 4.0cM 크기의 염색체단편에 위치하는 것을 특징으로 한다.

<16> 보다 구체적으로는 상기 양적형질 유전자좌는 대략 37.4 kb 크기의 염색체부위에 위치하는 것을 특징으로 한다.

<17> 또한, 본 발명의 상기 양적형질 유전자좌는 gw9-1, sn9-1, gn9-1, den9-1, pl9-1 및 yd9-1을 포함하는 것을 특징으로 한다.

<18> 한편으로 본 발명은 *Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 여교잡하여 육성된 근동질계통을 대상으로 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용하여 작성된 벼의 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 근동질 유전자계통에 관한 것이다.

<19> 본 발명의 상기 양적형질 유전자좌는 벼의 수량성 증진과 관련된 천립중, 출수기, 초장, 이삭당 영화수, 이삭당 립수, 이삭당 영화밀도, 이삭길이, 종실수량 등의 주요 형질과 관련되어 있는 것을 특징으로 한다.

- <20> 이하, 본 발명의 구성을 바람직한 실시 예를 통하여 보다 상세히 설명할 것이나, 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것으로서 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 범위는 오직 특허 청구 범위에 기재된 바에 의해 한정되어야 할 것이다.
- <21> <실시예 1> 유전자 집단 전개
- <22> 야생벼인 오리자 루피포곤(*Oryza rufipogon*, IRGC105491)을 화분친(pollen parent)으로 하여 국내 우량품종인 화성벼와 교잡한 다음, 화성벼를 반복친(recurrent parent, RP)으로 하여 여교잡을 2회 실시하였다(Cho Y. et al., Treatises of Crop Res., 2003, 4:19-29). 상기에서 얻은 820개의 BC₂F₁ 식물들 중 172개의 개체들이 표현형에 기초하여 선발되었고, 이들을 자가수정하여 QTL 분석을 위한 172개의 BC₂F₂ 집단을 얻었다.
- <23> 상기에서 얻은 BC₂F₂ 집단 중 한 계통인 F132를 목표형질인 천립중 관여 유전자의 확인을 위한 기본 계통으로 선발되었다. 이는 F132가 야생벼의 유전자가 이입된 목표부위(target region)를 가지며(9번 염색체에서 마이크로새터라이트 마커 RM242와 RM215로 확인), 증가된 천립중(thousand grain weight, TGW)을 보였기 때문이다. 또한 이 염색체 부위에 위치하는 *O. rufipogon* 유전자는 이삭(panicle)당 영화수(spikelets) 및 이삭길이를 증가시키는 효과를 보였으며, 목표부위를 제외하고는 비교적 적은 8개의 비목표(non-target) 야생벼 유전자 단편을 genome의 다른 곳에 가지기 때문이다. 상기 F132를 화성벼와 여교잡한 다음, 이 교배개체를 자식시켜 9번 염색체의 목표부위에서 분리하는 BC₃F₂ 세대를 육성하였다. 그리고 천립중을 선발형질로 하여 상기 F132에서와 같은 동일한 기준으로 BC₃F₂ 집단 중에서 1개의 F10 계통을 선발하였다.
- <24> 2개의 BC₃F₃ 계통인 F10-6과 F10-70은 천립중 양적형질 유전자와 지도를 작성하기 위해 후대검정 계통으로 이용되었다. 이 두 계통은 모두 9번 염색체 장완의 목표 부위에서 화성벼/*O. rufipogon* 이형접합체이며, 부분적으로 화성벼/*O. rufipogon* 이형접합체 그리고 *O. rufipogon* 동형접합체인 단편을 12번 염색체 단완에 추가적으로 포함한다(도 2). 이 두 계통을 각각 239와 241 개체를 이루는 두 개의 BC₃F₃ 자매세대인 CR1416과 CR1417을 육성하기 위하여 자가 수정되었다(도 1). gw9-1 유전자로 나타난 천립중에 대한 양적형질 유전자좌는 두 계통 모두에서 확인되었다.
- <25> 그리고 일련의 BC₃F₄의 치환 근동질 유전자계통(sub-NILs)과 대조계통들은 MAS에 의해 CR1416과 CR1417로부터 선발되었다(도 1). CR4340, CR4341, CR4344는 CR1416으로부터, CR4350, CR4373, CR4379는 CR1417로부터 선발되었다. gw9-1 유전자를 포함하는 전부위에 걸쳐 *O. rufipogon* 동형접합체인 CR4340과 화성벼 동형접합체인 CR4344는 수량성 검정을 위한 대조구로 사용되었다.
- <26> <실시예 2> 유전자좌 평가
- <27> 모든 식물재료들은 충남대학교 시험포장에서 재배되었다. 4월 20일에 파종되어 5월31일에 재식밀도 15 cm × 30cm로 이앙되었다. 수량성 검정은 완전임의배치법 3반복으로 수행되었다. 기타 재배관리는 농촌진흥청 수도 표준재배법에 준하였다.
- <28> 곡물은 수확한 다음 자연적으로 건조하고 24시간 동안 30℃의 오븐에서 다시 건조시켰다. 천립중(TGW)은 임의로 선택한 곡물 100개의 무게를 측정하여 3회 반복한 실험을 평균하여 조사하였다. 곡물의 수분 함량은 디지털 곡물 수분 측정기(GMK-303)를 사용하여 측정하고 3회 반복한 실험을 평균하여 조사하였다. 출수기(heading date, HD)은 파종부터 출수까지의 날을 조사하였고, 초장(Plant height, PH)은 지표면에서부터 까락을 제외한 가장 높은 이삭 말단까지의 길이를 조사하였다.
- <29> 이삭 길이(PL)는 까락을 제외한 이삭목으로부터 말단까지를 측정하였다. 개체당 이삭수(PN)는 개체당 이삭수를 조사하였고, 이삭당 영화수(SN), 이삭당 립수(GN) 그리고 이삭당 영화 밀도(DEN)는 개체당 세 개의 주 이삭(major panicle)을 평균하여 조사하였다. 이삭당 영화수는 이삭당 임실립수를 조사하였고, 밀도는 이삭의 센티미터 당 영화의 갯수를 조사하였다. 개체당 종실수량(YD)은 수분함량을 10%로 건조하여 각 시험구의 중앙에서부터 임의로 선택된 15개 개체의 종실 수량을 평균하여 조사하였다.
- <30> gw9-1의 근동질유전자계통 확인 (NIL-based confirmation of gw9-1)
- <31> 본 발명의 양적형질 유전자좌 gw9-1은 BC₂F₂로부터 전개된 2개의 BC₃F₂ 자매 근동질계통 F10-67과 F10-70을 이용하여 9번 염색체 장완에 위치한 RM215 부위에서 동정되었다. 이 계통들은 목표부위인 9번 염색체지역에서 크기가 4.0 센티모르간(cen t i Morgans, cM)인 *O. rufipogon* 단편을 보유하고 있었는데, 이 단편은 마커

RM242-RM215의 유전자형 평가결과 화성벼/0. rufipogon 이형접합체이다. 또한 이들 계통들은 12번 염색체의 단원에서 한 개의 이입염색체 단편을 포함하는데, 이 이입단편은 이형접합체 부위 및 0. rufipogon 동형접합체로 구성된 약 7.6cM 크기의 부위를 포함한다(도 2).

<32> F10-67과 F10-70 계통에서 얻은 BC₃F₃ 집단을 이용한 양적형질 유전자좌(QTL) 분석을 통해 천립중과 9번 염색체 목표부위의 마커들 사이의 관계를 확인하였다($P \leq 0.0001$). 도 2에 나타난 18개의 마커들을 사용한 interval 분석은 gw9-1 유전자가 RM215(LOD=29.67 (CR1417), 31.9 (CR1416))와 강하게 연관되어 있다는 것을 나타낸다. 그러나 천립중과 12번 염색체에 이입된 단편에 위치하는 마커들과의 연관은 탐지되지 않았다.

<33> gw9-1 유전자의 표현형적인 특성 (Phenotypic characterization of gw9-1)

<34> RM215와 연관된 0. rufipogon 대립유전자는 화성벼의 유전적 배경에서 종실 무게를 증가시켰다. gw9-1은 CR1416과 CR1417의 두 자매 계통에서 천립중 전체 표현형 변이의 41.6~42.5%를 설명하였고, 0. rufipogon 대립유전자의 상가적인 효과는 0.75~0.98g 임을 나타낸다(표 1).

<35> [표 1]

계통	양적형질 유전자좌	P	flanking markers	Mean $\pm$ s.d.(g)			상가적 효과	R ² (%)
				HH	HR	RR		
CR1416	gw9-1	≤ 0.0001	RM24566.CNR33-RM215	25.0 $\pm$ 0.81	25.4 $\pm$ 0.71	26.5 $\pm$ 0.60	0.75	41.6
CR1417	gw9-1	≤ 0.0001	RM5661-RM215	25.7 $\pm$ 0.64	26.5 $\pm$ 0.79	27.7 $\pm$ 0.96	0.98	42.5

<37> CR1416과 CR1417 집단을 마커의 유전자형에 의해 세 개의 군으로 분류하고 각 군의 천립중 분포를 비교하였으며, 그 중에서 CR1417 집단에 대하여 도 3에서와 같이 표시하였다. 화성벼 동형접합체인 HH, 이형접합체 HR, 0. rufipogon 이형접합체인 RR에 대한 천립중 평균값은 각각 25.7 $\pm$ 0.64, 26.5 $\pm$ 0.79, 27.7 $\pm$ 0.96 이었다(표1). CR1416에서 천립중의 평균값과 분포는 CR1417과 거의 동일하였고, 세 개의 분포가 각각 겹쳐졌으나, 평균값(means)은 유의하게 차이가 있었다($P < 0.01$).

<38> <실시예 3> 마커 개발과 분석

<39> 새로운 SSR(Simple Sequence Repeats) 마커들은 (Li et al., 2004, Genetics, 168:2187-2195)를 참고하여 exon-anchored/intron-spanning을 사용하여 개발되었다.

<40> 간단히 살펴보면, 벼 microsatellite (RM) 유전자좌는 sliver.plbr.cornell.edu/SSR 및 Gramene database(www.gramene.org) 상에서 이용가능한 SSR 유전자좌 주석(locus annotation)에 기초하여 확인되었고, 본 발명의 한 부분으로 고안된 SSR 유전자좌(marker reagents)를 검출하기 위해 사용된 특정 프라이머 쌍들은 특수한 식별기에 의해 유전자좌 이름과 접미사 “.CNR” 나타내었다(예, RM24718.CNR113). 프라이머들은 바이오니어(Bioneer Co., 대한민국)에 의해 합성된 것을 사용하였다.

<41> SSR 마커들은 근동질유전자 계통에서 야생벼 염색체 단편의 이입 유무와 분리 세대들의 유전자형을 조사하기 위해 사용되었다. DNA는 McCouch 등의 방법(McCouch, S.R. et al., 1988, Theor. Appl. Genet. 76, p815-829)을 약간 변형하여 마이크로 량(micro-quantities)으로 추출하였다. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 마커 증폭과 폴리아크릴 아마이드겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 위한 실험방법을 사용하여 크기에 따라 분리하고 실버 염색법으로 마커를 선별하였다.

<42> 기존에 공개된 SSR 지도들(Yano 등, 2000, The Plant Cell 12, p2473-2483; Temnykh 등, 2000, Theor. Appl. Genet. 100, p697-712)을 마커 순서를 정하기 위한 참고자료로 이용하였다. 이입 단편들에 있어서 SSR 마커들 간의 재조합 거리는 MAPMAKER Macintosh V2.0 소프트웨어를 이용하여 BC₃F₃ 세대에서 분리 분석(segregation analysis)에 기초하여 결정되었다. 한편, 마커간의 유전적거리는 cM(Kosambi centiMorgans) 단위로 계산되었다.

<43> 새로운 SSR 마커들의 개발 (Development of New SSR Markers)

<44> 화성벼와 0. rufipogon 간 다형성이 확인된 여덟 개의 새로운 SSR 마커들은 재배벼 니폰바레(cv. Nipponbare: <http://rgp.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/statusdb/stattable.pl?chr=9>)의 염기서열 데이터를 사용하

여 9번 염색체의 염색체단편 이입 부위에서 개발되었다. 이 마커들의 이름과 프라이머(primer) 염기서열은 표 2와 같다.

[표 2]

마커 번호	프라이머 서열		BAC/PAC 클론	(Motif) n	예상 크기
RM24516.CNR31	5'ttgttgatcatggaggtgga3'	5'gaccacatgaggacgaagt3'	P0676H02	(agc)9	156
RM24566.CNR33	5'gcttgaattcttgccattg3'	5'cggaagaggtgtcattttc3'	OJ1011_C06	(at)19	177
RM24583.CNR37	5'ctccattcctcgctcattc3'	5'ggccagtggtaggtgaaagt3'	OSJNBa005C18	(gag)8	162
RM24697.CNR75	5'ttgtctctctcctccatgagc3'	5'tggatcctagatatcgcatcgt3'	OJ1254_E07	(tc)13	151
RM24712.CNR78	5'tccggtaacgtgatcttgaa3'	5'aagatcgttgagggaacgag3'	P0569E11	(cag)10	156
RM30004.CNR111	5'gctgtggccatttatgtatgc3'	5'gatcatcgacgtgaatgaccta3'	P0229B10	(tg)5	158
RM24718.CNR113	5'gaccaacgtgcatgtgactt3'	5'gcttgactagggtcctt3'	P0229B10	(tcc)7	150
RM30005.CNR142	5'cgactcccactctcagatcc3'	5'agattttcaccatcggttgc3'	P0229B10	(tc)5	154

9번 염색체에서 마커들의 순서와 RM242-RM215 사이에서 이전에 발표된 SSR 마커들의 위치에 대한 관계는 도 2와 도 4에서 보여주고 있다. RM215는 gw9-1 유전자와 가장 가깝게 연관된 마커, PAC clone P0229B10에서 RM24718.CNR113-RM3005.CNR142 interval과 가까이 위치하고 있다 (표 2).

BC₃F₄의 근동질유전자계통을 사용한 gw9-1의 유전자지도 (Substitution Mapping of gw9.1 using BC₃F₄ NILs)

9번 염색체 목표부위에서 무작위적으로 재조합이 발생하는데, gw9.1의 위치 확인에 필요한 정보를 주는 6개의 재조합 근동질계통(BC₃F₄ sub-NILs)이 동정되었고, gw9-1의 유전자지도 작성을 위해 사용되었다.

sub-NIL 계통들은 CR4340, CR4341, CR4344, CR4350, CR4373 및 CR4379로 명명되었다(도 4). 모든 계통들은 12번 염색체의 동원체(centromere) 가까이에 0. rufipogon의 작은 단편을 보유한다.

도 4에서 보여지는 바와 같이, CR4344와 CR4340는 천립중에서 유의한 차이가 있었고($P \leq 0.0001$, ANOVA), 이들은 각각 화성벼 대조계통 및 0. rufipogon 대조계통으로 기능하였다.

CR4373을 자식시켜 획득한 개체들을 마커의 유전자형에 의해 세 개의 군으로 분류하고 이들 군간의 평균 천립중을 비교한 결과, 3개의 군간에 유의한 차이가 없었는데, 이 결과는 CR4373이 포함하는 이형접합체 상태의 0. rufipogon 단편에 종실 무게에 영향을 주는 대립유전자가 포함되지 않는 것을 나타내었다.

근동질 유전자계통 자식 후대들을 유전자형에 의해 세 개 군으로 분류하고평균천립중을 비교한 결과, CR4373에서는 뚜렷한 차이점이 없는 반면, CR4341, CR4350 그리고 CR4379 유래 집단내 개체군 간에는 통계적으로 유의한 천립중 차이를 보여주었다($P \leq 0.0001$, ANOVA).

근동질 유전자계통 각각에 대하여 interval analysis를 수행하였을 때, gw9-1에 가장 근접한 마커는 RM215였으며 이 마커는 천립중 전체 표현형변이의 35~51%를 설명하였다. 이는 상기의 CR4373에 대한 분리 데이터(segregation data)와 일치하며, gw9-1이 RM24566.CNR33과 RM328 사이에는 위치하지 않는다는 것을 의미한다.

근동질유전자계통 CR4379로 부터 얻은 119 개체를 동일한 방법으로 분석한 결과, 세 개 군 간에는 통계적으로 유의한 천립중 차이를 보여주었다($P \leq 0.0001$, ANOVA). 또한 12번 염색체에 이입된 염색체 단편에 위치하는 어느 마커와도 천립중은 연관이 없었다. 이 결과에 기초하여 천립중에 관여하는 gw9.1 유전자는 RM24718.CNR113과 RM30005.CNR142 사이에 위치한다고 판단된다.

CR4379 계통의 9번 염색체 이입단편의 크기에 기초하여, gw9-1 유전자가 대략 37.4 kb부위의 RM24718.CNR113과 RM30005.CNR142 사이에 위치한다고 판단되었다(도 4) (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/statusdb/stattable.pl?chr=9>). Substitution mapping에 의한 결과는 BC₃F₃ 세대에서의 interval analysis 결과와도 일치하였다(도 2). 또한 RM30004.CNR111과 RM30005.CNR142 마커는 CR4379에서 염색체 단편 이입의 바깥 경계를 나타내며(도 4), gw9-1의 위치는 실질적으로 37.4kb 보다 작은 부위에 위치하고 있다고 판단되었다.

<57> <실시예 4> 정밀 양적형질 유전자지도 (QTL fine mapping)

<58> 9번 염색체의 목표 부위 내의 마커간에 재조합이 발생하였으며 그 결과 *O. rufipogon*의 서로 다른 염색체단편을 가진 여러 재조합계통을 획득하였다. 이들 계통들을 이용하여 양적형질 유전자좌(QTLs)의 위치를 좁힐 수 있었으며, ANOVA 분석을 위해 Data Desk 4.0을 이용하였다. 또한 QGENE를 사용하여 목표부위 내 마커들을 이용하여 interval analysis($P = 0.01$ 및/또는 $LOD = 3.0$)을 실시하여 목표유전자들의 최적 위치를 추정하였다.

<59> HD와 PH를 위한 양적형질 유전자좌의 유전자 지도 (Mapping of QTLs for HD and PH)

<60> BC₃F₄ 세대를 분석한 결과 이들은 천립중 뿐만 아니라 출수기와 초장에 대해서도 분리하는 것으로 나타났다.

<61> 이전 연구들에 의하면, 각각 출수기와 초장을 조절하는 두 개의 양적형질 유전자좌인 hd9-1과 ph9-1은 9번 염색체의 목표 부위에서 조사된 양적형질 유전자좌의 클러스터에서 보고되었다.

<62> 천립중, 출수기 및 초장은 CR4341, CR4350 그리고 CR4379에서 평가되었으며, 이들 모두 SSR 마커 RM215와 함께 분리하는 것으로 나타났다($P \leq 0.0001$). 도 4에서와 같은 CR4379에서 관찰된 분리양상에 기초하여, hd9-1과 ph9-1이 RM24718.CNR113과 RM30005.CNR142 사이에 gw9-1과 함께 위치하고 있다고 판단되었다(표 3).

<63> [표 3]

양적형질 유전자좌	계통	집단 크기	P	연관 마커	평균값±S.D.			상가적 효과	R ² (%)
					HH	HR	RR		
hd9-1	CR4341	56	≤ 0.0001	RM215	100.3 ± 1.1	101.7 ± 1.5	104.0 ± 1.5	1.9	51.8
	CR4250	113	≤ 0.0001	RM215	99.4 ± 1.0	100.5 ± 1.1	103.2 ± 1.4	1.9	58.6
	CR4379	238	≤ 0.0001	RM215	84.2 ± 1.0	85.0 ± 1.4	88.4 ± 1.4	2.1	46.8
ph9-1	CR4350	113	≤ 0.0001	RM215	106.4 ± 4.3	109.0 ± 4.5	111.0 ± 3.4	2.3	15.8
	CR4379	238	≤ 0.0001	RM215	102.3 ± 3.0	103.1 ± 3.0	105.7 ± 3.1	1.7	13.2

<65> 모든 경우에서, *O. rufipogon* 대립유전자들은 약 4일의 출수지연과 약 4cm의 초장 증가라는 상가적인 효과를 나타내었으며, CR4379 근동질 유전자계통에서 12번 염색체에 위치하는 어떠한 마커도 출수기와 초장과의 연관성은 없었다.

<66> 기타 수량구성 요소와 연관된 양적형질 유전자좌의 지도화 (Mapping of QTLs associated with other yield components)

<67> CR4379 집단에서 다섯 개의 다른 표현형인 이삭당 영화수, 이삭당 립수, 이삭당 영화 밀도, 이삭 길이 및 종실수량은 RM215와 함께 분리(co-segregation)하는 것으로 나타났으며($P \leq 0.0001$ for SN, GN, DEN and PL, $P \leq 0.05$ for YD), 이전 연구에서도 이들의 양적형질 유전자좌는 함께 존재한다고 보고되어 있다.

<68> 수량 및 수량구성요소와 관련된 도입 야생벼(*O. rufipogon*)의 모든 대립유전자들은 화성벼의 수량관련 형질을 향상시키는데 초월적으로 작용하고 효과적이었다(표 4).

<69> [표 4]

양적형질 유전자좌	집단 크기	P	연관 마커	Mean ± S.D.			상가적 효과	R ² (%)
				HH	HR	RR		
sn9-1	119	≤ 0.0001	RM215	115.8 ± 11.1a	120.7 ± 12.8b	138.7 ± 11.7c	11.5	27.2
gn9-1	119	≤ 0.0001	RM215	109.6 ± 9.8a	114. ± 12.6b	130.4 ± 10.7c	10.4	25.7
p19-1	119	≤ 0.0001	RM215	20.9 ± 1.1a	21.8 ± 0.9b	22.4 ± 0.8c	0.75	25.6
den9-1	119	≤ 0.0001	RM215	5.5 ± 0.4a	5.5 ± 0.5a	6.2 ± 0.5b	0.35	14.1
yd9-1	115	≤ 0.05	RM215	25.7 ± 3.1a	27.0 ± 4.3a	28.5 ± 3.7c	1.4	9.2

<71> sn9-1, gn9-1, den9-1 p19-1 및 yd9.1는 9번 염색체에 마커 RM24718.CNR113-RM30005.CNR142 사이의 37.4 kb에 gw9-1, hd9-1 및 ph9-1과 함께 위치하고 있다는 사실을 확인하였다.

<72> 표현형 평가 결과, 본 발명의 모든 양적형질 유전자좌는 부가적 효과를 나타내고, 그 결과 이 부위에서의 *O. rufipogon* 염색체 단편 이입은 이삭당 영화수를 11.5개, 이삭당 립수를 10.4개, 이삭의 센티미터당 영화수를 0.35개, 초장을 0.75cm, 개체당 종실수량을 1.4gr/plant 수준으로 각각 향상시켰다.

<73> 한편 이들 표현형들과 12번 염색체 단편 이입된 어떠한 마커와도 연관이 없는 것으로 나타났다.

<74> 개체당 종실수량에 대한 양적형질 유전자좌 클러스터의 영향 (Impact of the QTL Cluster on Grain Yield per Plant)

<75> 목표 부위에 *O. rufipogon* 동형접합체 염색체 이입단편을 포함하는 BC₃F₄ 근동질유전자 계통 CR4340과 RM242-RM215 구간에 화성벼 동형접합체 유전자를 갖는 근동질유전자 계통 CR4344를 대조품종인 화성벼와 함께 수량성 평가를 실시하였고, 근동질유전자 계통 4340과 4379에 대하여 화성벼를 대조구로 하여 수량성 평가를 실시하였다.

<76> 수량성 평가 결과, 평균 개체당 종실수량이 CR4340에서는 14.2~17.7%, CR 4344에서는 16.2~23.7% 수준으로 화성벼에 비하여 각각 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 개체당 종실수량에 있어, CR4340과 CR4344 간에 또한 CR4340과 화성벼 간에는 유의한 차이가 있었으나($P \leq 0.05$), CR4344와 화성벼 간에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 5).

<77> [표 5]

계통	출수일 (HD)	초장 (PH)	수장 (PL)	수당립수 (SN)	화서밀도 (DEN)	개체당 종실중 (YD)	종실중 비교지수 (YD Index)
화성벼	(112a+)	(107a)	(19a)	(118a)	(5.2a)	27.4a(27.7a)	100(100)
CR4344	(112a)	(108a)	(19a)	(119a)	(5.4a)	28.8a(28.2a)	105.1(101.8)
CR4340 (CR4379)	(115b)	(117b)	(21b)	(129b)	(5.8b)	33.9b(32.8b)	123.7(118.4)

<79> 표의 각 열에서 동일한 문자로 표시된 값들은 $P=0.0001$ 수준에서 유의한 차이가 없다는 것을 나타낸다. ()의 자료는 2005년 수집자료임

<80> 37.4 kb 부위의 후보 유전자 (Candidate Genes in the 37.4-kb Region)

<81> 이용 가능한 염기서열 주식(<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>)에 기초하여, 37.4kb 목표 부위에 일곱 개의 유전자들이 예상되었다. 이들 유전자들 중에는, 알려지지 않은 기능을 가지는 2개와 기능적인 주석을 가지는 5개의 유전자들(cnu1.AutoPredgene01(gene ID), cnu1.AutoPredgene03, cnu1.AutoPredgene04, cnu1.AutoPredgene06, cnu1.AutoPredgene07)이 포함되어 있었다.

발명의 효과

<82> 이상에서 상술한 바와 같이 *Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 여교잡하여 육성된 일련의 근동질계통을 대상으로 양적형질 유전자(QTL) 분석을 실시하여 작성된 본 발명에 따른 양적형질 유전자지도는 벼의 수량성 증진에 관여하는 특정 양적형질 유전자좌를 확인함으로써 수량 관련형질의 유전적 배경에 대한 직접적인 정보를 제공할 수 있는 고밀도 양적형질 유전자 지도인 것으로 평가되었다.

<83> 또한 *Oryza rufipogon*을 화분친으로, 화성벼를 자방친으로 여교잡하여 양적형질 유전자(QTL) 분석을 이용하여 작성된 벼의 수량성 증진에 관여하는 양적형질 유전자좌를 포함하는 본 발명에 따른 근동질 유전자 계통은 수량성 관련 QTL의 확인하고 관련 유전자지도를 작성하는데 뿐만 아니라 수량성 향상을 위한 육종재료로서도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대되었다.

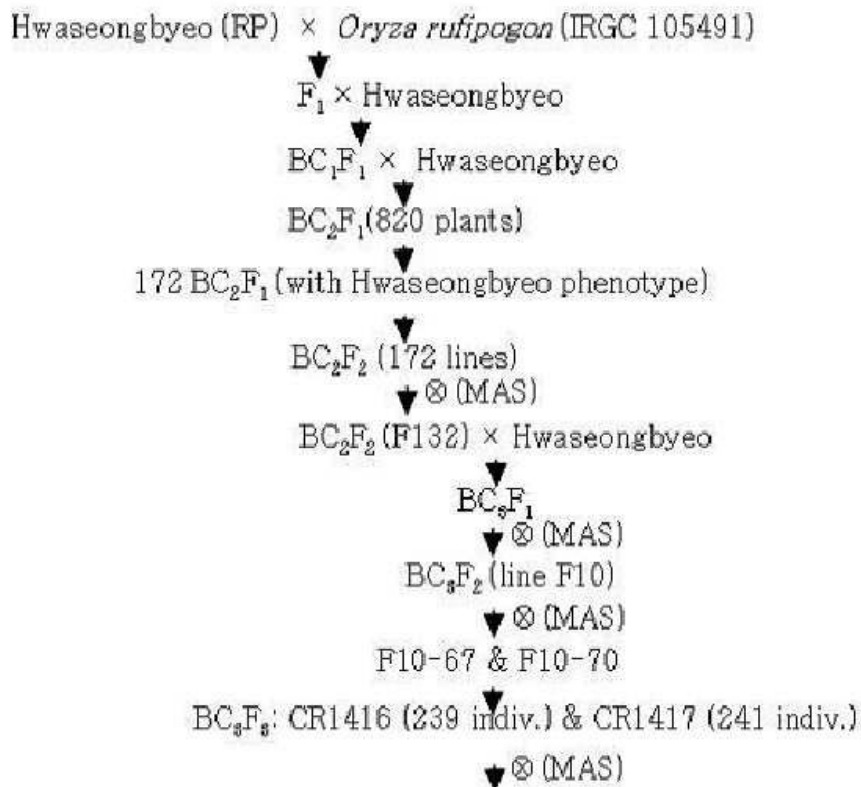
도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명에 이용된 유전분석 집단 육성의 전개 순서를 보여주는 흐름도.

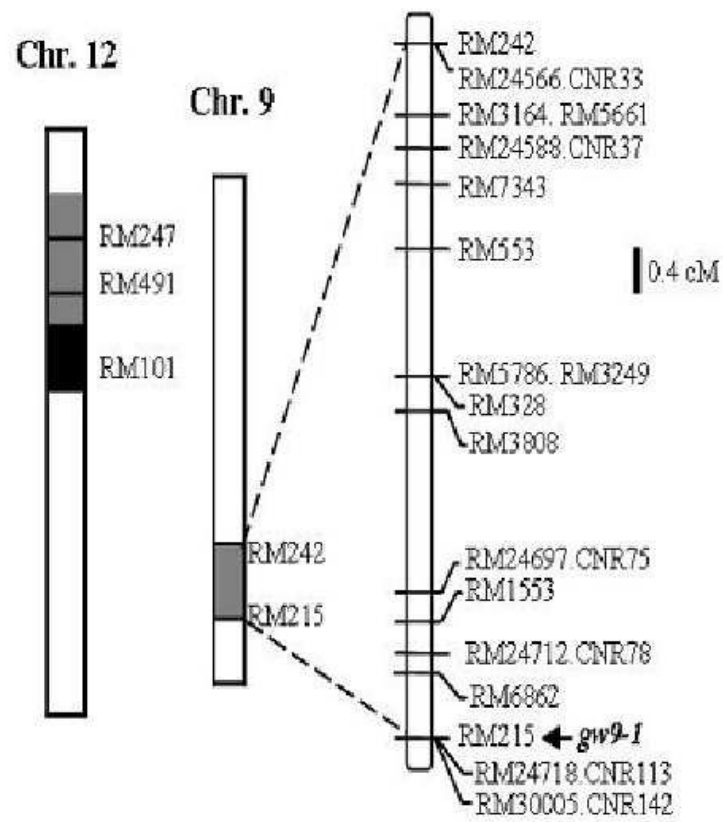
- <2> 도 2는 육성된 근동질계통 (BC₃F₃ 세대) CR1417이 화성벼의 유전적배경에 가지고 있는 야생벼 *O. rufipogon* 염색체단편의 위치를 보여주는 염색체 지도 (9번 염색체와 12번 염색체에서 야생벼 *O. rufipogon* 염색체단편이 도입됨). 점각 네모=동원체, 흰부분=화성벼 호모접합체, 회색부분=이형접합체, 검은 부분= *O. rufipogon* 동형접합체, 화살표는 CR1417로부터 얻은 241개체의 평가에 기초한 본 발명의 gw9-1 유전자의 존재를 확인해주는 최고의 LOD score peak의 위치를 가리킨다.
- <3> 도 3은 9번 염색체 목표 부위의 마커들에서 이형접합체인 근동질계통 CR1417을 자식시켜 육성된 세가지 유전자형 BC₃F₃ 자손들의 천립중(TGW) 분포도. 흰색은 화성벼 호모접합체(HH), 회색은 이형접합체(HR), 검은색은 *rufipogon* 동형접합체(RR)을 나타내며, 화살표는 각 그룹의 천립중을 의미한다.
- <4> 도 4는 gw9-1 유전자를 포함하는 9번 염색체의 부위를 요약한 BC₃F₄ 치환 근동질계통(NILs)의 그래픽 설명도. 흰 부분= 화성벼 동형접합체, 검은 부분=*O. rufipogon* 동형접합체, 회색 부분=이형접합체, 사선=염색체 교차가 일어난 부위. gw9-1 유전자를 포함하는 37.4 kb 후보 부위의 경계는 점으로 표시된다. P=분산분석(ANOVA)의 확률값. 염색체 지도의 오른쪽 표는 근동질계통인 CR4341, CR4350, CR4379 및 CR4373을 자식시켜 육성된 세 가지 유전자형(HH=화성 동형접합체, HR=이형접합체, RR=*O. rufipogon* 동형접합체)에 대한 천립중(TGW)의 평균값을 나타낸다. 지도상의 점선은 gw9-1 유전자좌를 포함하는 interval을 나타낸다. n=각 계통(line)에서 조사된 개체의 수, %nd는 결측치를 나타낸다. 표의 각 열에서 동일한 문자로 표시된 값들은 P=0.0001 수준에서 유의한 차이가 없다는 것을 나타낸다.

도면

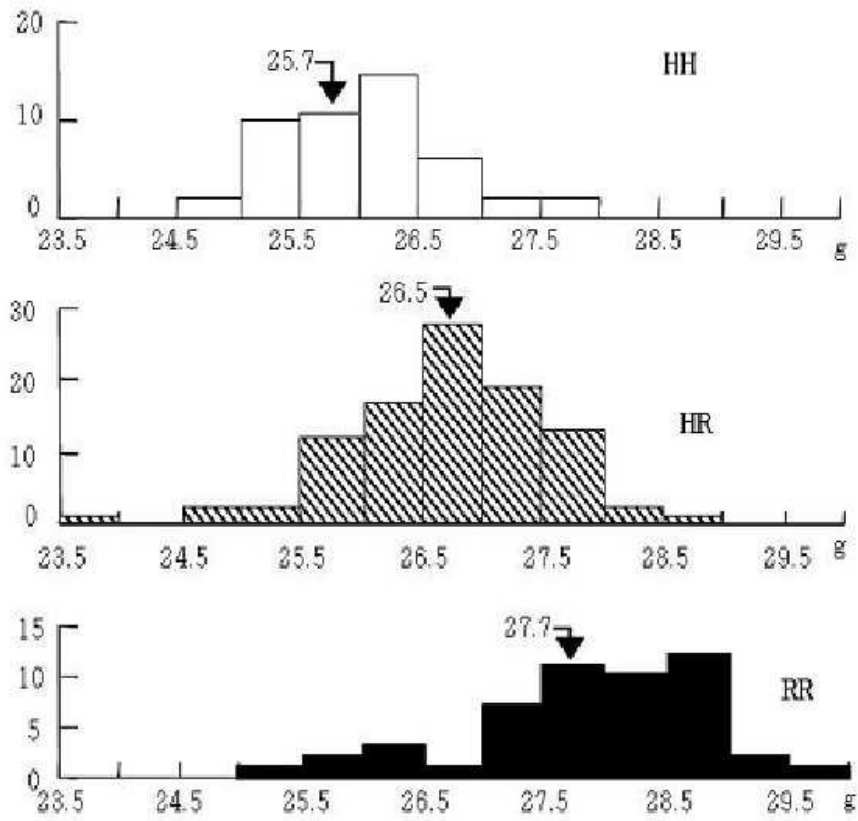
도면1



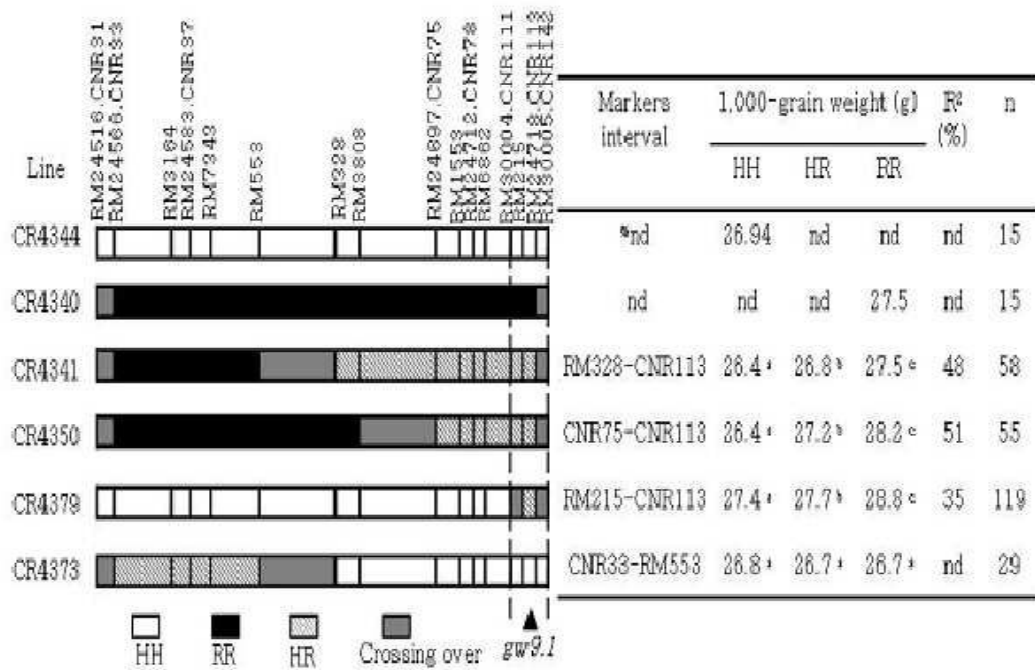
도면2



도면3



도면4



서열목록

<110> Chungnam National University University-Industry Collaboration Foundation
 <120> Fine Mapping of a Yield-enhancing QTL Cluster Associated with Transgressive Variation in an *Oryza sativa* x *O. rufipogon* Cross

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer of RM24516.CNR31 marker

<400> 1

ttgttgatca tggaggtgga 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM24516.CNR31 marker

<400> 2
gaccaccatg aggacgaagt 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM24566.CNR33 marker

<400> 3
gcttgaattc ttgccattg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM24566.CNR33 marker

<400> 4
cggaagagg tgcatttc 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM24583.CNR37

<400> 5
ctccattcc tcgtcattc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM24583.CNR37 marker

<400> 6
ggccagtggg aggtgaaagt 20

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM24697.CNR75 marker

<400> 7
ttgtctctct ctcccatgag c 21

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM24697.CNR75 marker

<400> 8

tggatcctag atatgcacg gt 22

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM24712.CNR78 marker

<400> 9
tccggtaacg tgatcttgaa 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM24712.CNR78 marker

<400> 10
aagatcggtg gaggaacgag 20

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM30004.CNR111 marker

<400> 11
gctgtggcca tttatgtatg c 21

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM30004.CNR111 marker

<400> 12
gatcatcgac gtgaatgacc ta 22

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM24718.CNR113 marker

<400> 13
gaccaacgtg catgtgactt 20

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of RM24718.CNR113 marker

<400> 14
gcttgacta gggctcctt 19

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of RM30005.CNR142 marker

<400> 15

cgactccac tctcagatcc

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer of RM30005.CNR142 marker

<400> 16

agattttcac catcggttgc

20