

최 종
연구보고서

무(*Raphanus sativus* L.)의 자가불화합성 유전자
좌상의 유전자군 해석

Genomic Molecular Analysis of
Self-incompatibility Genes of the *S*-locus
in Radish(*Raphanus sativus* L.)

연구기관
순천대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “무(*Raphanus sativus* L.)의 자가불화합성 유전자 좌상의 유전자군 해석” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 8일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 노 일 섭

세부연구책임자 : 양 승 열

연 구 원 : 김 현 중

연 구 원 : 조 지 영

요 약 문

I. 제 목

무(*Raphanus sativus* L.)의 자가불화합성 유전자 좌상의 유전자군 해석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

대부분의 현화식물은 진화과정에서 자식(Selfing)을 피하여 내혼약세를 방어하기 위한 수단으로 자가불화합성(Self-incompatibility) 기구를 발달시키고 있다. 자가불화합성이란 자성 및 용성기관이 정상임에도 불구하고 자가수분을 할 때 주두 표면이나 style-transmitting 조직에서 자기의 화분의 발아를 억제하거나 또는 화분관 침입을 거절하여 수정에 이르지 못하게 하는 현상이다. 무는 배추속 채소와 같은 포자체형 자가불화합성을 나타내며, 단일 유전자 좌(S-locus)에 의해 조절되는 S 복대립 유전자(S-allele)에 의해서 유전양식이 설명된다. 자가불화합성에 대한 분자적 연구는 *B. campestris*와 *B. oleracea*에 대하여 집중적으로 이루어졌으며, S 유전자좌는 rich genes 영역으로써 자성측 자가불화합성 유전자인 *SLG* (S-locus glycoprotein) 및 *SRK* (S-locus receptor kinase)의 S allele간 다형성을 나타낸다. 또한, S 유전자좌는 multigene complex로 S allele는 S haplotype으로 불려진다. 지금까지 보고된 S haplotype은 *SLG*의 염기서열 상동성에 기초하여 우성의 class I S haplotype과 열성의 class II S haplotype의 두 그룹으로 분류가 가능하다. 주두측 자가불화합성 유전자는 최근의 gain-of-function 실험에 의해 *SRK* 단독으로 주두에서의 S 특이성을 결정하며, 반면 *SLG*는 자가불화합의 인식 반응을 향상시킨다는 기능이 밝혀졌다. 주두측 자가불화합성 유전자가 결정된 이후 이들 유전자를 포함한 S 유전자 좌의 genomic 연구에 의해 약 특이적 small cysteine-rich 단백질을 생산한 분비형의 signal peptide를 가진 화분측 자가불화합성 유전자인 *SP11/SCR*이 동정되었다. Loss-of-function and gain-of function 실험에 의해 이들 유전자가 화분측 자가불화합성 결정 유전자임이 밝혀졌다.

시판되고 있는 무의 대부분은 자가불화합성 체계를 이용하여 F₁ 잡종 종자를 생산하고 있기 때문에 S haplotype의 동정은 육종과정에 있어서 절실히 요구되어진다. 지금까지 S haplotype의 동정은 양배추류(*B. oleracea*)에서 50개, 배추(*B.*

campestris)에서 30개, 무(*R. sativus*)에서 야생형과 일본 잡종품종에서 18개 이상 (Sakamoto et al. 1998)이 동정되었다. Sakamoto et al.(1998)등은 *SLG*-specific primer를 이용한 PCR-RFLP 분석과 Southern blot 분석에 의해 무의 S haplotype를 동정하였으며, 최근에는 class I *SLG* 5개 및 class II *SLG* 2개 그리고 7개의 *SRK*의 DNA 염기서열이 결정되었다. 무의 자가불화합성 유전자의 염기서열은 Brassica와 유사성이 높았으며, 자기화분에 대한 인식 system 또한 유사 할 것으로 추측된다.

본 연구는 무의 자가불화합성 유전자의 분자적 특성을 분석하기 위하여 자가 불화합성 유전자인 *SLG*, *SRK* 그리고 *SP11*를 포함한 거대단편을 해석하였다. 또한, 국내 무의 F₁ 품종 생산에 이용되고 있는 inbred line을 이용하여 PCR-RFLP에 의한 S haplotype의 동정 기술을 개발하였으며, S haplotype의 출현빈도를 분석하였다. *SLG*-specific primer 및 F₁ 순도 검정용 primer와 class I과 class II를 분류할 수 있는 primer를 *SRK*의 kinase domain에서 합성하여 분석하였다. 육성 계통에 있어서 동정된 S haplotype의 동정된 수와 출현빈도를 분석하였으며, S haplotype과 자가불화합성의 정도를 비교 분석하였다. 이상의 얻어진 무의 자가불화합성 유전자의 genomic 특성과 inbred line에서의 S haplotype 동정 기술은 F₁ 품종 생산을 위한 육종프로그램에 활용이 용이할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	1) BAC vector에 삽입될 거대 DNA 단편의 분리	- 공시 재료로부터 고분자 DNA추출 및 정제 - 자가불화합성 유전자를 포함하는 거대 DNA 단편을 소화하는 제한효소 선발 - genomic DNA에 제한효소 처리 - PFGE 후 거대 단편회수
	2) 주두측 자가불화합성 유전자를 이용한 PCR-RFLP	- Total DNA 및 mRNA 추출 및 정제 - 주두측 자가불화합성 유전자 관련 primer 선발 및 합성 - PCR-RFLP profile 작성 및 RT-PCR - 분획된 DNA 단편 분석에 의한 S-allele 동정

2차년도 (2002)	1) BAC vector를 이용한 거대 genomic DNA 단편(S-locus 포함) 삽입 및 clone 선발 2) 선발된 clone 분석 3) 화분측 발현 유전자의 탐색 및 동정	- BAC vector의 작제 및 구축 - BAC vector에 단편 삽입 - 선발배지에 transformation - Plasmid 추출 - <i>SLG</i> , <i>SRK</i> probe 작제 - Southern blot분석 - 선발된 clone의 plasmid 추출 - 선발된 insert DNA 단편의 subcloning - Sequencing 및 염기서열 검색 - 거대 DNA 단편 분석 - 화분측 자가불화합성관련 primer 선발 및 합성 - PCR 및 RT-PCR 증폭 - Vector에 증폭산물 cloning - Plasmid 추출후 sequencing
3차년도 (2003)	1) 주두측 자가불화합성 유전자의 동정 2) 자가불화합성 유전자의 cloning 및 염기서열 결정에 의한 S-genotype 결정	- 주두측 자가불화합성관련 primer 선발 및 합성 - PCR 증폭 - Vector를 이용하여 증폭된 산물 cloning - Plasmid 추출후 sequencing - 화분측 및 주두측 자가불화합성 관련 primer 선발 및 합성 - PCR 증폭 및 RT-PCR - Vector를 이용하여 증폭된 산물 cloning. - Plasmid 추출후 sequencing - Southern 분석에 의한 자가불화합성 유전자 검정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 무의 *SLG/SRK/SP11* 자가불화합성 유전자를 포함한 거대 DNA 단편의 해석을 통하여, 자가불화합성에 대한 분자적 정보를 확보하는데 있다. 또한, 확보된 정보를 기초로 하여 육성계통에서 S haplotype 동정을 위한 PCR-RFLP 방법을 개발하였다.

1. S⁹¹⁸번의 육성계통으로부터 거대 genomic DNA를 *Mlu*I으로 소화하여 S-locus 상의 자가불화합성 유전자, 즉 *SLG*, *SRK* 및 *SP11/SCR*를 모두 포함한 약 72 kb의 단일 단편을 TrueBlue-BAC2[®] cloning vector에 ligation하여 vector를 구축하였다. Positive clone이 *SLG*와 *SRK* 양자를 포함하고 있는가를 확인하기 위하여 *Brassica rapa* class I S haplotype의 *SLG*⁴⁸과 *SRK*⁴⁸ probe를 이용하여 Southern blot 분석을 행한 결과 S⁹¹⁸ 계통의 게놈 DNA와 완전히 같은 위치에서 *SLG*와 *SRK*의 밴드가 검출되었다. 따라서 *SLG*와 *SRK*의 자가불화합성 유전자, 즉 S-locus를 cloning한 것이 확인되었다. Positive clone은 *Spe*I 및 *Bam*HI으로 소화한 후 pBluescriptII 및 pBIN19에 subcloning하여, 자가불화합성 유전자의 염기서열을 결정하였으며, database searches 및 *B. rapa*의 S⁹의 S-locus와 비교하여 게놈구조를 분석하였다. 72 kb영역 내에는 *SLG*, *SRK* 및 *SP11*를 포함해 12개의 유전자가 존재하고 있었다. S⁹¹⁸ *SLG*의 전 영역을 해석한 결과, *SLG*-33(*B. oleracea*, AB054730)과 *SLG*13-b(*B. oleracea*, AB024418)에 90%이상의 상동성을 보였다. *SP11*-S⁹¹⁸의 DNA 염기서열을 결정된 결과, Brassica의 pollen coat protein(PCP)군의 특성을 보이는 8개의 cysteine잔기를 포함한 84개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 또한, *B. rapa* *SP11*-60(AB067446)과 *B. oleracea* *SP11*-15(AB089511)에 95%이상의 상동성을 보였다.
2. 무의 F₁생산에 이용되고 있는 국내 3개 종묘회사의 192개 육성계통에 있어서 S haplotype의 동정을 위한 PCR-RFLP system를 개발하였다. *SLG* universal primer(USLf+USLr)를 이용한 PCR 증폭 시 모든 육성계통에서 약 1,200 bp의 단일 단편이 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물은 S haplotype의 다형성을 검사하기 위하여 *Sty* I, *Alu* I, *Msp* I, *Hinf* I, *Afa* I 등 여러 가지 제한효소로 소화하였으며, Metaphor agarose gel에서 다형성을 동정하였다. 선발된 제한효소 중 *Hinf* I, *Msp* I과 *Afa* I에서 다형성이 높게 나타났으며, 그중 *Hinf* I에서 가장 높은 다형성을 보였다. *Hinf* I으로 소화하여 밴드패턴을 분석한 결과, 공시한 육성계통은 17개의 S haplotype(S¹~S¹⁷)으로 구성되어있었다. 동정된 S haplotype의 출현빈도는 S¹(53%), S²(6.7%)와 S³(15%)에서 다른 S haplotype에 비해 높게 나타났다. *Brassica* 채소류에 있어서 대부분의 S haplotype은 우성(class I)에 비해 열성(class II)의 출현빈도가 높게 나타나며, 이러한 현상

은 육종과정 중 특정의 농업형질을 선발하는 과정에서 특정 S 유전자형이 집적되었을 것으로 추측된다.

3. 무 육성계통(알타리계 30계통, 국내 가을무계 29계통, 일본 궁중무계 29계통), 합계 88 계통을 공시하여 *SLG* 특이적 primer로 PCR-RFLP 분석을 하여 S-haplotype을 동정하였고, 1 협립당의 자가 결실율을 조사하여 동정된 S 대립유전자와 자가불화합성 정도와의 관련성을 검토하였다. *SLG* universal primer에 의해 증폭된 산물을 *Hinf* I과 *Msp* I 으로 소화한 결과 공시한 88 육성계통은 11종류의 S 대립유전자로 분류되었으며, S^7 (30.6%), S^3 (23.8%), S^{11} (11.3%) 순으로 출현빈도가 높았다. 모든 계통군에 존재하는 공통 S 대립유전자는 S^3 , S^7 이었으며, S^3 는 알타리 계통군에서 53.3%로 높은 출현빈도를 보였으나 국내 가을무계 계통군에서는 10.7%로 다른 대립유전자의 빈도와 유사하였다. 특히 S^7 은 일본의 궁중무계 계통군에서 76.6%로 집중된 출현빈도를 보였다. 자가불화합성 정도의 지표가 되는 각 계통에 대한 자가 결실율을 조사한 결과, 알타리계는 1.17%, 국내 가을무계는 0.50%, 일본 궁중무계 계통군은 0.17%로 최저 0%(32계통)에서부터 4.3%까지 나타났다. 대립유전자별 1 협립당 종자수는 알타리계의 S^1 에서 1.97립으로 자가 결실율이 가장 높았으나 동일 S 대립유전자 내에서도 계통간 자가 결실율은 유의성이 없었다. 이상의 결과로부터 S 대립유전자와 자가불화합성 정도와의 관련성은 인정되지 않음을 알 수 있었으며, 자가불화합성의 강, 약 활력에 관여하는 다른 요인이 존재하는 것이 예상되었다.
4. 국내 3개 종묘회사에서 육성된 F₁ 품종 생산에 이용되고 있는 178개의 육성계통에 대하여 *SRK* 유전자만 증폭시키며, PCR 단계에서 class I과 class II를 구분할 수 있는 primer를 합성하고, S haplotype의 동정에 적합한 제한효소를 선발하였다. *SRK*-specific primer를 이용한 PCR-RFLP 결과 PCR 단계에서 class I과 class II의 분류가 가능하였으며, 국내 육성계통의 S 호모 178계통은 우성 class I(*Hinf* I+*Eco*R II)의 4개 S haplotype($S^a \sim S^d$)과 class II(*Hinf* I)의 6개 S haplotype($S^e \sim S^j$)으로 구성 되어있었다. 178개의 육성계통 중 class I과 class II의 비율은 class II가 93%의 높은 빈도로 나타났으며, class I는 6.7%를 차지하고 있었다. Class I S haplotype중 S^a 가 58%를 차지하고 있으며, class II는 S^e haplotype이 81%의 높은 빈도를 보였다. 또한 class I에 속한 4

개의 S haplotype은 intron 영역을 제외한 5번째에서 7번째 영역에서 매우 높은 상동성을 보였으며, class II는 4번째, 5번째, 6번째 그리고 7번째 exon에서는 매우 상동성이 높았지만 5번째, 6번째 intron에서는 매우 상이함을 보였다. 다른 그룹의 염기서열보다는 같은 그룹의 염기서열에서 더 높은 상동성을 보였다. 즉 class I 그룹에서는 86%에서 93%, class II 그룹에서는 91%에서 99%의 상동성을 보였다. 본 실험에 사용된 primer조합으로 PCR 단계에서 유묘기에 신속하게 class간 분류가 가능하며, 증폭된 산물을 이용한 PCR-RFLP방법은 육종 현장에서 서로 다른 S haplotype을 구분할 수 있었다. 또한 개화기의 불일치로 교배조합 작성이 어려웠던 계통들 간에 불화합 여부를 신속하게 검정할 수 있는 매우 유용한 방법이 될 것으로 예상된다.

5. *SLG*와 *SRK*를 포함한 72 kb의 거대단편(*Mlu* I genomic fragment) 분석에 의해 화분측 자가불화합성 결정 유전자인 *SP11-S*⁹¹⁸을 동정하였다. 다른 S haplotype에서의 *SP11* 유전자를 동정하기 위하여 *SP11-S*⁹¹⁸ DNA 염기서열을 기초로 하여 PCR primer를 합성하였다. SPC2f와 SPC2r의 primer를 사용한 PCR 증폭 결과, 공시한 5개의 육성 계통에서 약 400 bp의 단일 단편이 증폭되었으며, 증폭된 산물의 DNA 염기서열을 결정하였다. *Brassica*에서와 같이 동정된 *SP11* 유전자의 DNA 염기서열은 signal peptide영역이 매우 잘 보존되어 있으며, S haplotype간 77~96%의 높은 상동성을 보였다. 또한 *B. rapa* *SP11-60*(AB067446)과 *B. oleracea* *SP11-15*(AB089511)의 class II S haplotype과는 77~93%의 상동성을 보였으나, *B. rapa* *SP11-S9*(BAA85458) class I S haplotype과는 20%의 낮은 상동성을 보였다. 이상과 같이 *B. rapa*와 *B. oleracea*의 class II S haplotype와의 높은 상동성은 분리된 무의 *SP11* 유전자가 class II S haplotype이며, genera의 분화 이전에 자가불화합성의 유전자가 분화하였으며, 같은 선조의 S haplotype으로부터 진화한 것으로 추측된다. 또한 무의 *SP11* 유전자의 5'-flanking 영역을 분석한 결과, 5'-flanking 영역들은 53~96%의 높은 상동성을 나타내며, *B. rapa*와 *B. oleracea*간의 5'-flanking 영역 염기들의 상동성은 76~96%로 *R. sativus*와의 염기서열 상동성(60~91%)보다 더 높았다. 추가적으로, 추정되는 TATA box의 위치와 염기들은 *B. rapa*, *B. oleracea* *R. sativus* line 모두에서 보존되어 있었다. 두 개의 반복배열 (TTT TAG ATA TAA A)과 추정되는 pollen-specific element

(CTT AAA TTA GA) 염기들은 pollen 특이적 유전자인 PCP-A class 유전자에서 동정되었다. Database 검색에서, 반복 배열들과 추정되는 pollen-specific 염기들은 또한 5'-flanking 영역에서 발견되지 않았다. 또한 다른 일반적 반복 배열 또는 palindromic 염기들 역시 발견되지 않았다. 그러므로 여기에 제시된 data는 *Brassica*와 *Raphanus*에서의 포자체적 발현 양상은 *SP11/SCR* 유전자의 promoter가 tapetum 또는 pollen에서의 발현을 부여하는 일반적인 cis-acting element들과 상호 작용하여 발현되어 진다는 것을 강하게 시사하였다.

6. 육성계통에 있어서 PCR-CAPS에 의한 S haplotype의 동정과 F₁ 품종에 있어서 효율적인 종자 순도 검정용 primer를 개발하였다. SRK3f과 SRK7r의 primer를 이용한 PCR 증폭한 결과 모든 육성계통에 약 1,100 bp의 단일단편의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 증폭된 산물은 제한효소로 소화하여 S haplotype을 동정하였으며, cloning하여 *SRK* kinase domain의 S haplotype간 DNA 염기서열을 결정하였다. PCR 산물을 *Hinf* I과 *EcoR* I으로 이중 소화한 결과 67개의 육성계통은 9개의 서로 다른 밴드패턴으로 분류되었으며, 이는 9개의 S haplotype(R1~R9)의 동정되었다. PCR-CAPS 분석에 의해 S haplotype의 확인 후 F₁ 품종 생산에 사용빈도가 높은 5개 S haplotype에 대한 F₁ 종자 순도 검정용 primer를 합성하였다. F₁ 종자 순도 검정용 primer는 증폭된 단편의 크기와 specific 증폭으로 F₁ 종자의 양친 S haplotype을 구분할 수 있게 합성하였다. R1과 R2, R5와 R8의 S haplotype 가진 육성계통의 교배에 의해 생산되는 F₁ 종자에 대한 순도검정을 실시한 결과, 양친의 호모계통에 있어서는 각각 특이적 단일 단편이 증폭 되었으며, 순수한 F₁ 종자에 있어서는 양친의 특이적 두개의 단편이 증폭되었다. 그러나 F₁ 종자 중 모친의 단일 단편만 증폭된 개체가 발견되었으며, 이러한 종자는 selfing이나 화분친 이외의 S haplotype의 교배에 의한 오염일 것으로 추정할 수 있게 되었다.

SUMMARY

I. Title

Genomic Molecular Analysis of Self-incompatibility Genes of the *S*-locus in Radish(*Raphanus sativus* L.)

II. Goal and necessity of the study

Many flowering plants have self-incompatibility(SI) systems that promote outbreeding and maintain genetic diversity. These systems prevent self-fertilization by inhibiting pollen-tube growth of self-pollen on the stigma surface or in the style-transmitting tissue. Radish has a sporophytic SI which controlled by a single *S* locus with multiple alleles. Two species, *B. campestris*(syn. *rapa*) and *B. oleracea*, have been used extensively in SI system at molecular level. Molecular analyses revealed that the *S* locus comprises a number of genes. On the female side, two genes located at the *S* locus encode *SLG*(*S* locus glycoprotein) and *SRK*(*S* receptor kinase), both of which are highly polymorphic genes. Because the *S*-locus appears to be a multigene complex, "*S* allele" is referred to as "*S* haplotype". From the nucleotide sequence similarity of the *SLG* of different *S*-haplotypes, they can be classified into two types, class I and class II, and it is known that dominant *S* haplotypes belong to class I and that recessive *S* haplotypes belong to class II. Recent gain-of-function experiments has been confirmed that the *SRK* alone determines *S* haplotype specificity of the stigma, while the *SLG* enhances the recognition reaction of SI. Immediately after the identification of *SRK*, sequence analyses of the *S* locus genomic region of *Brassica campestris* containing *SRK* and *SLG* led to the identification of an anther-specific gene, termed *SP11*(*S* locus protein 11) or *SCR*(*S* locus cysteine-rich), and encodes anther-specific small cysteine-rich protein with a signal peptide for secretion. Loss-of-function and gain-of function experiments demonstrate that the *SP11/SCR* gene is necessary and sufficient for

determining the pollen SI phenotype.

Most commercial cultivars of radish are F₁ hybrids varieties, the seeds of which are produced using SI system. Thus, it is very significant that the S haplotypes of breeding materials and commercial cultivars can be identified methods. A total of 50 and 30 S haplotype have been found in *B. oleracea* and *B. rapa*, respectively. Some dozens of S-alleles were also identified in Japanese hybrid varieties and wild radishes. Sakamoto et al. (1998) identified 18 S haplotypes, by Southern blot analysis and PCR-RFLP analysis with *SLG*-specific primers. Recently, nucleotide sequences of five class I *SLG*, two class II *SLG* and seven *SRK* determined. These sequences are similar to those of *SLG* and *SRK* in *Brassica*, suggesting that radish has a SI system similar to that of *Brassica*.

For analysis of molecular characterization of SI genes in *Raphanus sativus*. we was determined nucleotide sequence of an 72 kb fragment(obtained from *Mlu* I digested genomic DNA) that containing *SLG*, *SRK* and *SP11* genes from S⁹¹⁸ inbred line. Also, we were developing the PCR-RFLP system(primer design and restriction enzyme selection) for determination of S haplotype in inbred lines. We synthesized the primer of *SLG*-universal, F₁ purity evaluation, *SRK*-specific of the kinase domain that can discriminate accurately between class I and class II. We determined the number and frequencies of S haplotypes, and estimated level of SI using the rate of self-seed setting resulting from artificial self-pollinations. In addition, the obtained information of genomic characterization of SI genes and developed skill of identification of S haplotype in inbred lines will be able to apply to F₁ hybrid breeding program.

III. Content of research & development and its range

Sub-subject	Content of research & development and its range
Isolation of high molecular weight	- Extraction and purification of the megabase-saize DNA from leaf tissue

nuclear DNA	<ul style="list-style-type: none"> - Test restriction digest of containable self-incompatibility genes - Restriction digest of <i>Mlu</i> I - Size selection containing DNA between 50 and 350 kb
Identification of <i>S</i> haplotype based on PCR-RFLP of <i>SLG</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Total DNA extraction and purification from leaf tissue - Primer selection and synthesis of female <i>S</i> determinant gene - Determination of <i>S</i>-genotype by DNA fraction and RT-PCR - Identification of <i>S</i> haplotype by DNA fraction analysis
Construction and screening of BAC vector including the self-incompatibility genes	<ul style="list-style-type: none"> - BAC vector construct - BAC vector ligation - Transformation - Plasmid miniprep - Construct of the <i>SLG</i>, <i>SRK</i> probe - Southern blot analysis
Screening and sequencing of selected clones	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmid isolate of selected clones - Subcloning of the selected clones - Sequencing and putative genes - Ananalysis of a high-molecular-weight(HMW) clones of the <i>S</i> locus
Identification and molecular characterization of male <i>S</i> determinant	<ul style="list-style-type: none"> - Primer selection and synthesis of male <i>S</i> determinant gene - Amplification of male <i>S</i> determinant gene by PCR and RT-PCR - Cloning of male <i>S</i> determinat genes - Sequencing and isolation of plasmid
Identification of <i>S</i> haplotype based on PCR-RFLP of	<ul style="list-style-type: none"> - Selection and synthesis of <i>SRK</i>-specific primer - Amplification of <i>SRK</i> by PCR - Cloning of kinase domain of the <i>SRK</i>

kinase domain of the <i>SRK</i>	- Sequencing and isolation of plasmid
Identification of <i>S</i> haplotypes based on PCR-RFLPs, and sequencing of the self-incompatibility genes	- Selection and synthesis of primer pairs for determinant <i>S</i> -haplotype - Amplification of <i>SI</i> genes using PCR and RT-PCR - Cloning of the <i>SI</i> genes - Sequencing and isolation of plasmid - Identification of the <i>SI</i> gene by Southern analysis

IV. Results of research & development and suggestions for utilization

Through analysis of genomic organization of the *SLG/SRK/SP11* gene of the *S* locus in radish, we wish to secure molecular information. And, this research performed the PCR-RFLP system(primer design and restriction enzyme selection) development for determination of *S* haplotype in inbred lines.

1. The 72 kb fragment(obtained from *Mlu* I digested genomic DNA) that includes the *SLG*, *SRK* and *SP11* genes of *S*⁹¹⁸ had cloned into Bacterial Artificial Chromosome(BAC) vector, and determined the nucleotide sequence of self-incompatibility genes. To confirm positive clone containing both *SLG* and *SRK*, we performed southern blot analysis using *SLG*⁴⁸ and *SRK*⁴⁸ probe of *B. rapa* class I *S* haplotype. These two probes detected the same bands in the positive clone, suggesting that the positive clone are includes the *S*-locus. One positive clone was digested *Spe* I or *Bam*H I and subcloned into pBluescript II and pBIN19 plasmid vector. We determined the nucleotide sequence, and characterized the genomic organization of fragment by database searches and compares with *S*⁹ previously characterized *S*-locus of class I *S* haplotype in *B. rapa*. In this 72 kb genomic sequence, 12 putative genes, including *SP11*, *SRK* and *SLG* were identified. The nucleotide and amino acid sequence of *SLG*-*S*⁹¹⁸ showed the highest homology to those of the *SLG*³³(*B. oleracea*, AB054730) and *SLG*^{13-b}(*B. oleracea*, AB024418). The predicted mature protein of *SP11*

gene contained 84 amino acids and eight cysteine residues, characteristic of members of the pollen coat protein(PCP) family of *Brassica*. *SP11* was also showed the highest homology to those of the *B. rapa SP11-60*(AB067446) and *B. oleracea SP11-15*(AB089511) more than 95%.

2. This study investigated the PCR-RFLP system for the identification of *S* haplotypes in 192 inbred lines that are used as the parental lines of commercial radish F₁ hybrid cultivars in domestic 3 seed companies. PCR using the *SLG*-universal primer pair (USLf+USLr) amplified DNA fragments of about 1,200 bp from tested whole inbred lines. Digestion of the PCR products with restriction endonucleases (such as *Sty* I, *Alu* I, *Msp* I, *Hinf* I, *Afa* I) and subsequent Metaphor agarose gel electrophoresis revealed polymorphism of the amplified DNA fragment. From several restriction endonucleases tested, the PCR products from the amplified with the *SLG*-universal primer pair showed the polymorphism of the electrophoretic profiles after digestion with *Hinf* I, *Msp* I and *Afa* I. When digested with *Hinf* I, the highest polymorphism as seventeen types based on their band patterns which were designated as S¹~S¹⁷. The numbers of *S* haplotypes detected in the inbred lines were 17 and the highly frequent *S* haplotypes were S¹(53%), S²(6.7%) and S³(15%). In Brassica vegetables, the most common *S* haplotypes belong to class II; they exhibit a weaker self-incompatibility phenotype and are pollen-recessive to class I. This intense selection for uniformity could lead to the loss of *S* haplotypes and the accumulation of recessive *S* haplotypes in breeding.
3. The present investigation was performed with 88 inbred lines of radish belonging to used in F₁ hybrid production. DNA fragments of *SLG* alleles were amplified from all inbred lines by PCR using *SLG* universal primer pair USf and USr. Digestion of the PCR products with restriction endonucleases and subsequent Mataphor agarose gel electrophoresis revealed polymorphism of the amplified DNA fragment. Electrophoretic profiles of the PCR products after digestion with *Hinf* I and *Msp* I were

classified into 11 band patterns($S^1 \sim S^{11}$) in all inbred lines. The numbers of *S* haplotypes detected in the inbred lines were 11 and the highly frequent *S* haplotypes were S^7 (30.6%), S^3 (23.8%), S^{11} (11.3%). Our present investigation shows that the PCR-RFLP analysis using specific primer pairs of *SLG* is useful for identifying the *S* haplotypes in radish. To estimate the level of self-incompatibility of identified the *S* haplotypes by seeds set analysis, we calculated the seeds set ratio, which corresponds to the ratio between number of seeds obtained and number of capsules after self-pollination. The seeds set ratio varied from 0% to 4.3% in all inbred lines. The average of seeds set ratio showed any significant statistical differences among different lines. The level of self-incompatibility for *S*-haplotype appeared to differ according to the genetic background of inbred lines. Consequently, it was expected that existence of other leading reason concerned in the degree of self-incompatibility.

4. One hundred seventy-eight inbred lines in *R. sativus* *S* homozygotes were used as plant materials. DNA fragments of the class I and class II *S* haplotypes were amplified by PCR using specific two primer pairs. Class I and class II primer pairs amplified a single DNA fragment of 900bp in 15 and of 1,050bp in 163 out of 178 inbred lines, respectively. These DNA fragments showed high polymorphism in electrophoresis after digestion with restriction endonucleases: 15 inbred lines amplified with class I primer pair were classified into 5 haplotypes and 163 inbred lines amplified with class II primer pair were classified into the 7 *S* haplotypes by *EcoR* II + *Hinf* I, respectively. The nucleotide sequences of the kinase domain of total 12 different *S* haplotypes were determined. Degrees of similarity of the nucleotide sequences to *SRK12* (GenBank Acc. no: Z18921) of *B. oleracea* ranged from about 58% to 93%. Also, similarity of nucleotide sequences between *SRKs* in class I group was more than 88%, and in class II group was more than 90%. Nucleotide sequencing of the DNA fragments amplified from different types shows that the exons of *SRK* are highly

conserved, and that there are high variations of the introns of *SRK*, which produced polymorphism of the band pattern in PCR-RFLPs. In this study, the results of PCR-RFLP and sequencing were accurately the same. Therefore, the used class I and class II specific primer pairs, and endonucleases in PCR-RFLP analysis can be identify the characteristics of *S*-haplotypes which is used in breeding more precisely and quickly.

5. By analysis of 72 kb *Mlu* I genomic fragment containing both *SLG* and *SRK* genes, identified the *SP11-S*⁹¹⁸ of male determinant SI gene. For isolation of the other *S* haplotypes, We synthesized that could be amplified by PCR using the primer designed based on nucleotide sequence of *SP11-S*⁹¹⁸. PCR using the *SP11*-specific primer pair (SPC2f +SPC2r) amplified DNA fragments of about 400 bp from tested 5 radish inbred lines. We determined the nucleotide sequences of *SP11* of total 5 different *S* haplotypes. The nucleotide sequence revealed a striking similarity in the region encoding the signal peptide such as *Brassica*. The high degree of sequence conservation between *S* haplotypes observed about 77~96%. Also, the sequence similarity with class II *S* haplotype of *B. rapa SP11-60* (AB067446) and *B. oleracea SP11-15* (AB089511) exhibited 77~93%, but with class I *S* haplotype of *B. rapa SP11 S*⁹ (BAA85458) lower degree of sequence conservation with approximately 20% sequence identity. The *SP11* genes that isolated from inbred lines of radish predicted by class II *S* haplotype from the high degree of allelic sequence similarity with class II *S* haplotype of *Brassica*, originated from the same ancestral *S* haplotypes before speciation of these genera. Also, in the analysis of the 5'-flanking regions of *SP11* genes by comparing the genomic sequences of the genera *Brassica* and *Raphanus*, alignment of these sequences are highly conserved (53~96% identity) in the 5'-flanking region of *SP11* genes. Similarities between the nucleotide sequences from the *B. rapa* and *B. oleracea* lines ranged from 76% to 96%, not significantly higher than the similarities of *R. sativus* lines (from 60% to 91%). In addition, the position and sequence

of the putative TATA box were conserved in *B. rapa*, *B. oleracea* and *R. sativus* lines. Two direct repeats (TTTTAGATATAAAA) and a putative pollen-specific element (CTTAAATTAGA) were identified from PCP-A class gene. From database searches in the 5'-flanking region, these repeats and a putative pollen-specific sequences were not also found in the 5'-flanking region of *B. oleracea* and *R. sativus* lines. Moreover other common repeat or palindromic sequence was not found in these sequences. Therefore, these sequences strongly support that the sporophytic expression patterns in *Brassica* and *Raphanus* are controlled by different cis-regulatory elements in this region.

6. We developed methods for identification of *S* haplotypes by PCR-CAPS in inbred lines and primer pairs for evaluation of F₁ seed purity by using PCR in F₁ hybrid varieties. DNA fragments of *SRK* kinase domain were amplified from all inbred lines by PCR using primer pair SRK3f and SRK7r. Digestion of the PCR products with restriction endonucleases and subsequent revealed polymorphism of the amplified DNA fragment and determined the nucleotide sequences. Electrophoretic profiles of the PCR products after digestion with *Hinf* I and *EcoR* I were classified into 9 band patterns (R1~R9) in tested 67 inbred lines. After ascertaining *S* haplotype by PCR-CAPS analysis, we synthesized the primer pairs for F₁ seeds purity evaluation for 5 *S* haplotypes of high frequency used in F₁ seed production. These primer pairs were classifiable the parental *S* haplotype of F₁ seeds with amplified size and specific amplification. We have evaluated F₁ seeds that is produced by crossing of inbred lines with R1/R2 and R5/R8. The parents of homozygous for the *S*-alleles was amplified by specific one fragment. The pure F₁ seeds of heterozygous for the *S*-alleles was amplified by specific two fragments with different size. But, seeds that is amplified one fragment of maternal line were found in commercial F₁ hybrid cultivars, and these seeds could presume to be pollution by crossing of *S* haplotype except maternal line or selfing.

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction	27
Section 1. Purpose and category of study	27
Section 2. Necessity of study	27
Chapter 2. Trend of Research	31
Section 1. Processing extent of research in the inside and outside of country	31
Section 2. View of future research	32
Chapter 3. Contents and Results of the Study	33
Section 1. Genomic organization of the <i>S</i> locus in <i>Raphanus sativus</i> : Identification and characterization of SI genes of S ⁹¹⁸ haplotype	33
1. Introduction	33
2. Materials and methods	34
3. Results of the study	39
A. Construction of BAC vector and confirmation of S-locus by Southern blot analysis	
B. Identification of female SI genes in S-locus by subcloning	
C. Isolation and characterization of pollen determinant SI genes	
4. Discussion	49
Section 2. Determination of <i>S</i> haplotype in inbred lines using PCR-RFLP of female SI gene(<i>SLG</i>)	53
1. Introduction	53
2. Materials and methods	54
3. Results of the study	55
A. PCR-RFLP analysis of female SI gene(<i>SLG</i>)	
B. Frequency analysis of identified the <i>S</i> haplotype	
4. Discussion	59
Section 3. Identification of <i>S</i> genotypes and its relationship with activity of SI in radish inbred lines	61

1. Introduction	61
2. Materials and methods	62
3. Results of the study	64
A. Identification of SI genotype	
B. Analysis of activity of SI between <i>S</i> alleles	
4. Discussion	70
Section 4. Identification of <i>S</i> haplotypes by PCR-RFLP and DNA sequencing in <i>Raphanus sativus</i> L. inbred lines	71
1. Introduction	71
2. Materials and methods	72
3. Results of the study	74
A. PCR-RFLP analysis of kinase domain in <i>SRK</i> gene	
B. Analysis of <i>S</i> haplotype by cloning and sequencing of <i>SRK</i> gene	
4. Discussion	82
Section 5. The pollen determinant gene(<i>SP11/SCR</i>) and specific promoter(5' flanking region) of analysis	85
1. Introduction	85
2. Materials and methods	86
3. Results of the study	87
A. Isolation and characterization of pollen determinant	
B. Analysis of pollen specific promoter region	
4. Discussion	92
Section 6. Identification of <i>S</i> -alleles using PCR-CAPS in kinase domain of <i>SRK</i> and evaluation of F ₁ seed purity	95
1. Introduction	95
2. Materials and methods	96
3. Results of the study	98
A. Identification of <i>S</i> haplotype by PCR-CAPS in kinase domain of <i>SRK</i>	
B. Synthesis of primer pairs and evaluation of F ₁ seed purity	
4. Discussion	106
Chapter 4. Achievement Degree and Contribution to Related Fields	109

- Section 1. Achievement degree of research and development toward goals
- Section 2. Contribution to related fields

Chapter 5. Utilization Plans from Results of Research and Development ·· 111

Chapter 6. Science & Technology Information of Foreign Countries ··· 113

Chapter 7. References 117

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 1 절 연구의 목적 및 중요성	27
제 2 절 연구개발의 필요성	27
제 2 장 국내·외의 연구동향	31
제 1 절 국내·외의 관련연구의 기술현황	31
제 2 절 연구의 전망	32
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	33
제 1 절 무의 자가불화합성 유전자 좌(S-locus)의 genomic 구조 분석: S ⁹¹⁸ haplotype의 자가불화합성 유전자의 특성 및 동정	33
1. 서론	33
2. 연구재료 및 방법	34
3. 연구결과	39
가. BAC vector 구축 및 Southern blot 분석에 의한 S-locus의 확인	
나. S-locus의 subcloning에 의한 주두측 자가불화합성 유전자 동정	
다. 화분측 자가불화합성 유전자의 단리 및 특성	
4. 고찰	49
제 2 절 주두측 자가불화합성 유전자(SLG)의 PCR-RFLP에 의한 육성계통의 S haplotype 결정	53
1. 서론	53
2. 연구재료 및 방법	54
3. 연구결과	55
가. 주두측 자가불화합성 유전자(SLG)의 PCR-RFLP 분석	
나. 동정된 S haplotype의 출현빈도 분석	
4. 고찰	59
제 3 절 무 육성계통의 자가불화합성 반수형 동정 및 자가불화합성 정도와의 관계	61
1. 서론	61
2. 연구재료 및 방법	62

3. 연구결과	64
가. 자가불화합성의 유전자형 동정	
나. 자가불화합성의 정도 분석	
4. 고찰	70
제 4 절 <i>SRK</i> 의 PCR-RFLP 및 DNA 염기서열 결정에 의한 무 육성계통의	
<i>S</i> haplotype 동정	71
1. 서론	71
2. 연구재료 및 방법	72
3. 연구결과	74
가. <i>SRK</i> kinase domain의 PCR-RFLP 분석	
나. 염기서열 결정에 의한 <i>S</i> haplotype 분석	
4. 고찰	82
제 5 절 화분측 자가불화합성 <i>S</i> 유전자(<i>SP11/SCR</i>) 및 화분 특이적 promoter의	
분석	85
1. 서론	85
2. 연구재료 및 방법	86
3. 연구결과	87
가. 화분측 자가불화합성의 <i>SP11</i> 유전자의 단리 및 특성 분석	
나. 화분 특이적 promoter 영역의 분석	
4. 고찰	92
제 6 절 <i>SRK</i> 의 kinase domain을 이용한 PCR-CAPS에 의한 <i>S</i> -alleles 동정 및	
F ₁ 종자 순도검정	95
1. 서론	95
2. 연구재료 및 방법	96
3. 연구결과	98
가. <i>SRK</i> kinase domain의 PCR-CAPS에 의한 <i>S</i> haplotype 동정	
나. F ₁ 순도 검정용 primer 합성 및 검정	
4. 고찰	106
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	109
제 1 절 연구개발목표의 달성도	109
제 2 절 관련분야의 기여도	110

제 5 장 연구개발결과의 활용계획	111
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	113
제 1 절 배추과 식물의 자가불화합성 연구 현황 및 금후 연구 방향	113
제 7 장 참고문헌	117

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적 및 중요성

세계적으로 자가불화합성 연구는 배추과 식물 중 배추나 양배추류 등에서 많은 연구가 진전이 되고 있지만 같은 배추과 식물인 무의 자가불화합성 유전자에 관한 연구는 상대적으로 저조한 실정이며, Gene bank에 등록된 무의 자가불화합성 유전자 또한 방대한 배추나 양배추 등의 자가불화합성 유전자들에 비해 겨우 몇 개에 불과하고 분자적 기초자료 역시 미비하다.

따라서, 본 연구의 목표는 첫째, 무의 자가불화합성 유전자를 포함하는 거대 DNA단편을 BAC vector에 삽입하여, 거대 DNA단편을 해석하고, 두 번째, 화분측 및 주두측에서 발현하는 자가불화합성 유전자들을 cloning하여 무의 분자적 정보를 확보하는데 있다.

- BAC vector를 이용한 거대 genomic DNA 단편(S-locus 포함) 삽입
- Subcloning에 의한 거대 genomic DNA단편 분석
- Genomic상에서 자가불화합성 유전자들간의 물리적 특성 분석
- 화분측 발현 유전자의 탐색 및 동정
- 주두측 자가불화합성 유전자의 cloning 및 염기서열 결정에 의한 S-genotype 결정

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면의 필요성

유성생식은 고등식물에 있어서 종의 다형성유지나 열성변이의 발현억제의 기구로써 매우 중요하다. 유성생식을 위해서는 상이한 계통(친)간의 융성과 자성 배우자가 수정할 필요가 있다. 동물의 세계에서는 일반적으로 수컷과 암컷간은 다른

개체이고 유성생식에 있어서 다른 유전자의 조우가 보증되고 있다. 그러나 식물은 토양에 뿌리를 내려서 움직일 수 없을 뿐만 아니라 대부분이 자웅양성화이고 물리적으로 동일한 꽃 중에서의 수분 수정의 확률이 높게 된다. 자식의 반복은 유전적으로 호모개체를 만들어 내게 되고 유전적 다양성을 유지하기 어렵다. 그래서 많은 식물에서는 유전적으로 교묘한 기구를 발달시켜 자식약세를 방어하고 있다. 식물에 있어서 수분양식의 대부분은 충매 혹은 풍매이고 암술의 선단에는 자기화분과 타 개체의 화분이 수분된다. 자식을 방어하기 위해서는 같은 종의 화분 중으로부터 자기개체 유래의 화분을 식별해서 수정시키지 않는 시스템을 만들어 내는 것이 필요하게 된다. 자가불화합성은 그러한 유전적 프로그램 중에서 가장 고도의 기구이다. 여기에는 화분과 암술간에 자타 식별 시스템이 존재하고 있다. 또한 다세포계의 생물에서는 세포간의 정보교환이 기초로 되어 여러 가지의 생명현상제어가 행하여지고 있지만 자가불화합성에서 보여지는 암술의 세포와 화분과의 정보교환은 식물에 있어서 세포간 상호작용의 한가지 전형이다. 이와 같이 식물이 갖고있는 교묘한 성질은 옛 부터 알려져 있었지만 학문적으로 취급한 것은 다윈이고 그는 장미과 등 여러 가지 식물에 있어서 이 현상을 기술하였다. 그 후 이 현상은 많은 자연과학자의 흥미를 불러일으켜 유전적 혹은 생리적인 연구가 계속되었다. 그 결과 자가불화합성은 S 유전자 좌의 S 복대립유전자에 의해 지배되고 있다는 것이 분명히 되었다. 그러나 그 기구에 대해서는 긴 세월간 불명인체였고, 1980년대가 되어서 겨우 분자생물학적 혹은 생화학적 연구가 진전되어 그 기구가 현재 분자수준에서의 해명이 계속되고 있는 실정이다.

세계적으로 포자체형 자가불화합성 연구의 재료는 배추과 식물, 특히 배추 (*Brassica campestris*)나 양배추(*Brassica oleracea*)류 등을 재료로 해서 많은 연구가 진전이 되었다. 이러한 까닭에 배추나 양배추의 자가불화합성 유전자는 매우 많이 동정되었고 분석되었다. 또한 최근에는 화분측에서 발현하는 유전자를 역시 배추와 양배추류에서 동정해 냄으로써 자가불화합성 연구는 한층 더 높은 수준으로 올라와 있다. 그러나 무의 자가불화합성 유전자의 연구는 그 실정이 다르다. 무 또한 배추과 식물이나 배추나 양배추와는 속이 다르다. 그래서 같은 자가불화합성 유전자라 할 지라도 배추와 양배추류의 주두측에서 발현하는 유전자인 *SLG* 유전자의 경우에 무의 *SLG* 유전자와 상동성이 약 85% 정도로 같은 종내의 상동성 보다 현저히 낮다. 또한 gene bank에 등록된 무의 자가불화합성 유전자는 주두에

서 발현하는 *SLG*유전자만이 10개 정도 밖에 등록되어 있지 않으며, 최근 주두측의 진정한 자가불화합성 유전자로 밝혀진 *SRK*유전자는 전혀 등록이 되어있지 않다.

본 실험은 무의 주두측 및 화분측에서 발현하는 자가불화합성 유전자를 동정·분석하고, 자가불화합성 유전자를 포함하는 거대 단편을 분석하여 이들의 주변영역 역시 탐색하여 아직 미비한 무의 자가불화합성 연구를 진척시키고자 한다.

2. 경제·산업적 측면의 필요성

현재 재배되고 있는 무, 배추, 양배추, 브로콜리등의 배추과 채소의 대부분은 1대 잡종의 형태로 종자가 시판되고 있고, 그들 일대잡종 종자생산에는 주로 자가불화합성이 이용되고 있다. 우리나라의 종묘산업은 지금까지 많은 발전을 거듭하여 1970년대에 3,000달러에 불과했던 채소종자의 수출이 1990년에는 무려 699만 달러에 달하여 20년 동안 약 2,000배의 성장을 하였다. 그러나 1989년부터 단계적으로 실시된 채소 종자의 수입자유화와 함께 1989년에 155만 달러 정도이던 채소종자의 수입액이 1991년에는 620만 달러에 달하여 수입이 수출을 능가하는 현상이 나타나 채종 관련 산업을 위협하고 있다. 무와 배추는 우리나라 4대 채소 중의 하나로 농가의 소득원으로서나 국민의 식생활에 있어 매우 중요한 위치를 차지하고 있으며 특히, 무는 종자 수출이 가장 많은 채소이다. 무의 채종에는 앞에서 말한 바와 같이 자가불화합성 현상을 이용하고 있는데 자가불화합성에 대한 기초연구가 전무한 실정이기 때문에 종묘회사에서 자가불화합성 현상을 채종에 이용하기 위해서는 매년 많은 노력과 시간을 소모하여 채종 원종의 모본 계통의 자가불화합성 인자를 판별하여야 한다. 그 결과 원종 육성에 많은 시간이 소용될 뿐만 아니라, 어떤 경우에는 자가불화합성 검정 결과가 불완전하여 채종 후에도 종자의 순도를 저하시키는 요인이 되고 있다. 따라서 효율적 원종생산, 순도 높은 채종, 경쟁력있는 종자생산, 종자 수출에 있어서 우위성을 갖기 위해서는 자가불화합성 인자를 체계적으로 분류하는 기초연구가 매우 중요하다.

3. 사회·문화적 측면의 필요성

무가 우리나라에 도입된 시기는 분명하지 않으나 중국과 일본이 도입시기를 각각 2,400년전과 1,250년전으로 추정하고 있으므로 보아 우리나라는 지정학적으로

보아서 기원전에 도입되었을 것으로 추정되어 지고 있다. 또한 무의 영양소는 비타민 A는 없지만 비타민 C는 44 mg이나 들어있으며 칼슘이 62 mg, 인이 29 mg 들어있다. 또한 배추, 무 등은 알칼리성 식품으로 체액을 알칼리성으로 유지시키는 역할을 한다. 특히 무청은 영양가가 매우 높아 단백질의 약 60%는 순 단백질로서 라이신 함유량이 높은 우량 단백질이다. 이러한 영양가를 가지는 무는 배추와 더불어 김치의 주재료로써 우리의 식생활에 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 현재, 김치는 국제규격을 획득하여 수출이 확대되고 있어 더욱 더 품질을 다양화하고 고급화할 필요성이 요구되어지므로 김치 종주국의 위치를 고수하기 위해서도 그 주재료가 되는 배추과 작물에 대한 기초적, 체계적인 연구가 필요하다.

제 2 장 국내·외의 연구동향

제 1 절 국내·외의 관련연구의 기술현황

미국 코넬대학의 Nasrallah 등은 주로 게놈 DNA해석으로부터 *SLG*, *SRK* 유전자 주변에 존재하며 화분에서 발현하는 유전자를 탐색하고 있으며 그 중 *SLA*라고 불리우는 유전자를 단리하였지만 화분측 인자의 본체는 아니었다. 또한 그들은 자가불화합성을 나타내는 배추과 식물과 자가화합종인 애기장대 게놈의 상동영역을 비교하고 애기장대에는 *S* 유전자 좌에 해당되는 부분이 결여되어 있다는 것을 보고하였다. 영국의 Dickinson 등은 화분측인자의 탐색법으로서 *SLG*와의 결합성을 지표로 하는 방법을 고찰해서 화분단백질을 정제하고 PCP(pollen coat proteain)A-1 등의 단백질을 단리하였으나 *S* 유전자 특이성이 없고 화분측 인자의 본체가 아니었다. 일본 이와테대학의 Watanabe 등은 *SLG* 및 *SRK*를 포함하는 약 80kb의 게놈단편을 해석하여 약 및 화분에서 발현하는 유전자를 cloning하였다. 또한 나라선단대학원대학의 Isogai 등은 현재 biacore 시스템을 이용해서 *SLG* 등에 결합성을 갖는 화분 단백질 PCP를 정제하고 있다. 또한 화분에서 발현하고 *S* 유전자형이 다른 mRNA를 탐색하여 화분 인자를 분명히 하려고 하고 있으며, 동북대학의 Nishio 등은 지금까지 배추과 식물에 있어서 많은 *S* test line을 정리하였고, 이들을 이용해서 *SLG*, *SRK*의 염기배열을 결정함과 동시에 이들의 종내에서의 변이를 명확히 하여왔다. 주두에는 *S* 유전자 산물로서 *SLG* 이외에 이것과 구조가 극히 유사하면서 *S* 유전자 좌에 연쇄되어 있지 않은 *SLR1*이 있다. 영국의 Dumas 등은 *SLR1*의 antisense 유전자를 도입한 브로콜리를 작성하였고 화분의 접착력이 감소된다는 것을 발견하였다. Isogai 등은 이 *SLR1*에 특이적으로 결합하는 화분표층단백질도 단리하였고 이러한 것이 종간의 불화합성에 관여하고 있는 가능성을 시사하였다. 최근 Nasrallah팀은 화분에서 특이적으로 발현하는 유전자 (*SCR*; *S* locus cysteine-rich protein)을 보고하였다. 현재, 자가불화합성 연구의 세계적인 토픽은 화분측 자가불화합성 유전자가 동정됨에 따라 이 유전자를 형질 전환 시킴으로써 자가불화합성 기구의 기능을 해석하는데 초점이 모아지고 있다.

본 연구자의 연구실은 Brassica류의 주두측에서 발현하는 자가불화합성 유전자

(*SLG*; S-locus glycoprotein, *SRK*; S-locus receptor kinase)를 계속 동정, 분석하여 왔으며, 최근 미국의 코넬대학의 Nasrallah 등에 의해 밝혀진 화분측 자가불화합성 유전자(*SCR*; S locus cysteine-rich protein)를 수종 동정하여 분석하고 있다.

제 2 절 연구의 전망

무의 주두측 및 화분측에서 발현하는 자가불화합성 유전자를 동정·분석함으로써 몇 개의 gene bank에 등록된 주두측 자가불화합성 유전자인 *SLG* 유전자와 더불어 무의 자가불화합성 기구의 해석이 분명히 될 것이며, 화분측 발현 유전자를 동정함으로써 무 뿐만아니라 배추과 작물의 자가불화합성 기능분석에 대한 자료가 될 것이다. 또한 자가불화합성 유전자를 포함하는 거대 단편내에 있는 주변 영역의 탐색과 화분측에서 발현하는 유전자를 동정함으로써 자가불화합성 기구의 분석이 가능할 것이라 기대된다. 그리고, 이렇게 동정된 자가불화합성 유전자는 형질전환용의 donor gene으로 활용 가능할 것이다.

본 연구실은 Brassica류의 주두측 및 화분측에서 발현하는 자가불화합성 유전자(*SLG*, *SRK*, SP11/*SCR*)를 계속 동정, 분석하여 왔다. 이렇게 축적된 자료, 기술 등을 바탕으로 본 연구를 수행하는데 있어서 문제점은 없을 것이라 생각되며, 충분히 목표 달성을 할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 무의 자가불화합성 유전자 좌(S-locus)의 genomic 구조 분석: S⁹¹⁸ haplotype의 자가불화합성 유전자의 특성 및 동정

1. 서론

배추과 식물의 자가불화합성은 포자체적으로 기능하는 1 유전자좌 S 복대립 유전자계에 의해 지배되어 있으며, 화분과 주두의 S 유전자의 표현형이 일치하면 수분되어도 수정에 이르지 못한다. 지금까지의 유전적 연구에 의해 *Brassica campestris*(syn. *rapa*)는 30개 이상, *B. oleracea*에는 50개 이상의 S 대립유전자 호모계통이 확립되어 있다. 자가불화합성의 특징은 화분과 주두의 표층에 자타식별의 인식반응이 일어나고, 주두에 부착된 화분이 자가 화분으로 인식되면 흡수 및 화분관의 발아, 신장을 억제하는 기구가 발견되었다. 이러한 현상은 S 유전자좌의 주두와 화분의 S 표현형을 결정하는 인자가 존재하며, 이들 인자가 상호작용하는 인식반응으로 이해되었다.

자가불화합성 연구는 배추과 식물 중 배추나 양배추류 등에서 많은 연구가 진전이 되고 있지만 같은 배추과 식물인 무의 자가불화합성 유전자에 관한 연구는 상대적으로 저조한 실정이다. 자가불화합성의 현상을 분자적 수준에서 이해하기 위해서는 S 유전자좌의 실체, 즉 주두의 인자와 화분의 인자를 명확히 하는 것이 가장 중요한 목표가 되었다. 더욱이 정보전달 시스템의 해석이 중요한 연구과제로 되어 있다. 또한 포자체형 자가불화합성에는 화분과 주두의 S 유전자 표현형은 S 대립유전자간의 우열성에 의해 결정된다. 배추과 식물의 S 대립유전자간에는 공우성이 일반적이지만, 화분에서는 주두측에 비해 우열성이 보여지는 경우가 많고, 더욱이 우열성 관계는 주두측과 화분측에 반드시 일치하지 않은 경우가 많다.

*B. campestris*와 *B. oleracea*로부터 S 유전자좌의 실체에 대한 연구는 주두측 인자의 해명으로부터 시작 되었으며, 1977년 S 유전자좌와 연쇄되어 있는 주두 특이적 단백질로써 S 당단백질(S locus glycoprotein; SLG)가 발견되었다. SLG는

분비형 당단백질로써 분자 중에 가변형지역이 존재하며, C 말단쪽의 12개의 cysteine 잔기가 보통 보존되어 있다. 지금까지 동정된 *SLG*는 상동성에 기초하여 정리하면 class I과 class II의 두 그룹으로 분류가 가능하며, 같은 class내의 상동성은 80~90%, class간에는 60%로 낮은 상동성을 보였다. 또한, *SLG*와 함께 주두측에서 특이적으로 발현하며, *SLG*와 높은 상동성을 보이는 영역(S-domain)과 막관통 영역(transmembrane domain) 그리고 serine/threonine형의 단백질 인산화효소(protein kinase)영역을 가진 *SRK*(S receptor kinase)가 발견되었다.

화분측 S 유전자는 S 유전자좌의 해석에 의해 *SLG*와 *SRK* 유전자의 근방에 존재하며, 약과 화분 특이적으로 발현하며, 대립유전자간의 다형성을 보이는 유전자의 검색에 의해 동정되었다. *SP11/SCR* 유전자는 cysteine이 풍부한 신규의 PCP(Pollen Coat Protein)를 코드하고 있으며, 바이오어세이와 형질전환법을 이용하여 화분측 S 유전자임이 증명되었다(Takayama et al. 2000, Shiba et al. 2001).

무는 국내뿐만 아니라 아시아 주요국가에서 중요한 채소로써 잡종강세를 이용한 1대 잡종 품종(hybrid품종)으로 자가불화합성을 이용해서 실용화 되어있다. 무의 자가불화합성 연구는 Sakamoto 등(1998)에 의해 게놈 DNA에 대한 *SLG* probe를 이용한 Southern blot분석과 *SLG*-specific primer를 이용한 PCR-RFLP에 의해 18 S haplotype과 8개의 *SLG*의 DNA 염기서열이 보고 되었다. 무의 *SLG*는 배추와 유사하였으며, 자가불화합성의 기구 또한 유사할 것으로 예상되었다. 최근 Lim 등(2002)에 의해 5개의 class I과 2개의 class II *SLG*가 결정되었으며, *SRK*의 동정이 보고 되었다. 그러나 화분측 자가불화합성 유전자에 대한 보고가 없으며, 아직 무의 자가불화합성에 대한 분자적 기초 자료가 미비한 상태이다.

본 연구는 무의 주두측과 화분측 자가불화합성 유전자를 포함한 거대 DNA단편을 BAC vector에 삽입하여 DNA단편을 해석함으로써 화분측 및 주두측에서 발현하는 자가불화합성 유전자들을 cloning하여 무의 분자적 정보를 확보하고, *SLG*, *SRK*, *SP11/SCR*의 PCR-RFLP 분석에 의해 육성계통의 S-genotype 결정법을 개발하고자 한다.

2. 연구재료 및 방법

가. 고분자 DNA추출 및 정제

우성의 S-allele를 가진 918번 계통을 재료로 사용하여 고분자 DNA를 추출하

였다. 15g의 액체 질소를 이용하여 조직을 미세하게 분쇄 후, mercaptoethanol 과 0.5% Triton X-100이 포함된 차가운 1×HB (10×HB: 0.1 M Trizma base, 0.8 M KCl, 0.1 M EDTA, 10 mM spermidine, 10 mM spermine, pH 9.4-9.5) 200 ml를 담고 있는 500 ml 비이커에 옮겨 얼음 위에서 10분 동안 혼합한 후, 250 ml 원심 튜브로 옮겼다. 20분 동안 4℃에서 1,800g로 원심분리 한 후, 상청액을 버리고 즉시 1 ml의 냉 wash buffer (1×HB, 0.5% Triton X-100; 사용하기 전에 0.15% mercaptoethanol 첨가)를 첨가하여 혼탁 시킨 후, 다시 30 ml의 wash buffer를 첨가하여 50 ml의 원심 튜브로 옮겼다. 조직의 잔여물을 분리하기 위하여 57g, 4℃에서 2분 동안 원심분리하고 상청을 다른 튜브로 옮겨 상청을 다시 15분 동안 4℃에서 1,800g로 원심분리 하였다. 상청을 버리고 wash buffer를 첨가하여 pellet를 세척한 후, 5분 동안 4℃에서 1,800g에서 다시 원심분리 하였으며 mercaptoethanol이 포함되지 않은 1×HB로 녹여 4℃에서 저장하였다.

나. 자가불화합성 유전자를 포함하는 거대 DNA단편을 소화하는 제한효소 선발

자가불화합성 유전자, 즉 *SLG*와 *SRK* 유전자를 모두 포함하는 제한효소를 선발하기 위하여 위에서 추출된 genomic DNA에 *Nde* I, *Mva* I, *Apo* I, *Bam*A I, *Mlu* I등의 여러 가지 제한효소를 처리하였다. 제한효소 처리된 산물은 1% low melting point agarose gel에 투입하여 PFGE (Puls Field Gel Electrophoresis) 영동을 하였다. 전기영동 조건은 14℃에서 switch time를 30-50초로 하였으며, 170에서 24시간 동안 영동하였다. 최적의 제한효소를 선발하기 위하여 *Mlu*I를 units(0~20units) 조건을 테스트하였다(그림 1). *Mlu*I으로 완전 소화(12시간) 후 0.5X TBE buffer의 저융점 아가로스(SeqPlaque GTG; FMC)를 사용하여 BioRad사의 CHEF-DRII에 22시간 전기영동 하였다(volts/cm=6.0, initial switch time=1.0sec, final switch time=50.0sec).

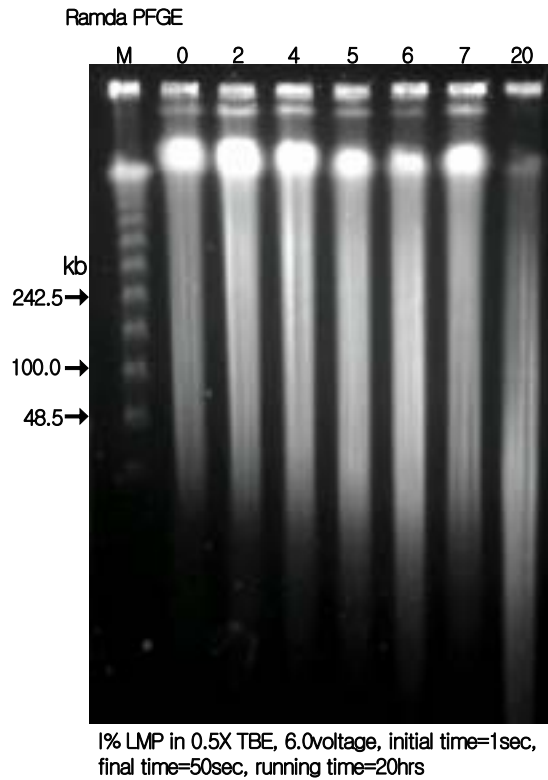


그림 1. 자가불화합성 유전자를 모두 포함한 거대단편을 회수하기 위하여 최적의 제한효소 units 선발을 위한 PFGE 결과.

다. Vector와 거대단편의 ligation

거대 단편 cloning을 위한 vector는 TrueBlue-BAC2[®]를 이용하였으며, QIAGEN[®] Large-Construct Kit를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 *Mlu* I으로 소화하였다(그림 2). 또한 self ligation를 방지하기 위하여 Alkaline phosphatase(*E. coli* A19)로 5' phosphate를 제거하였다.

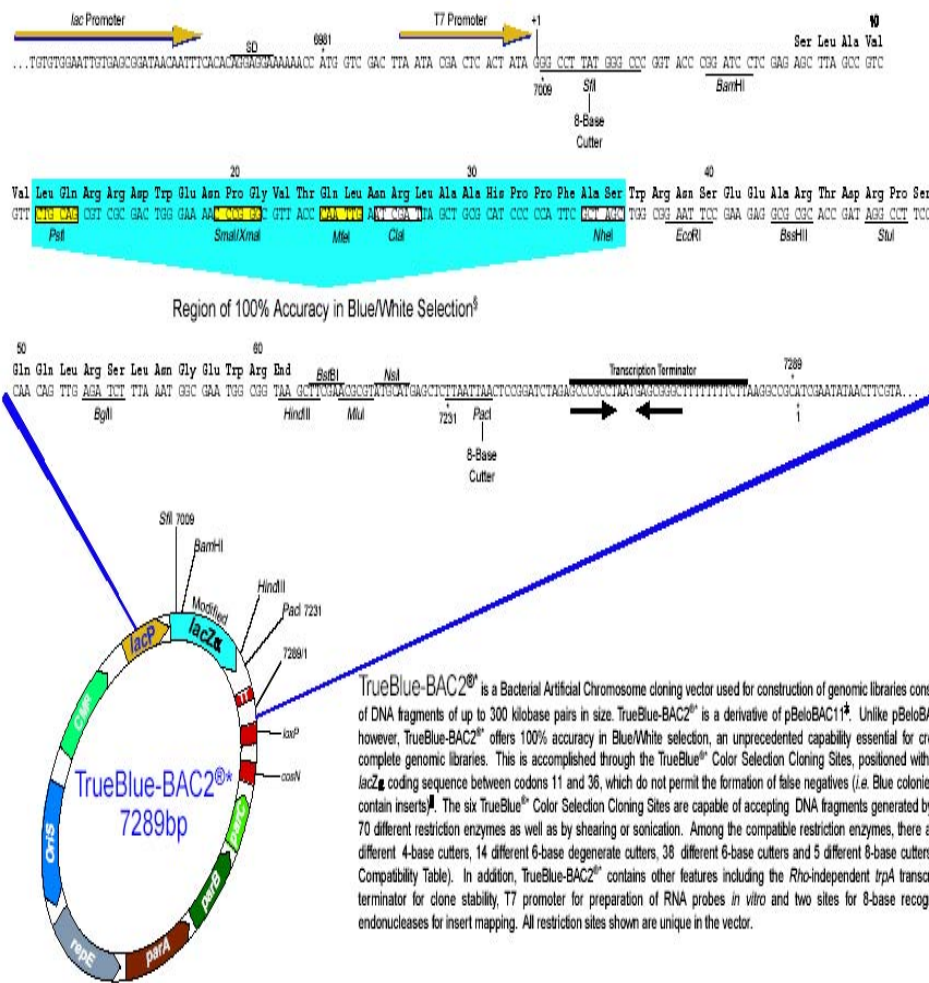


그림 2. 거대 단편 cloning을 위해 사용한 TrueBlue-BAC2[®] vector의 유전자 지도

자가불화합성 유전자좌의 거대단편은 최적의 제한효소로 선발된 *Mlu* I의 20units로 12시간 소화한 후 그림 3과 같이 50~350 kb의 gel을 상, 중, 하로 나누어 회수하였다. 정확한 size의 단편 회수를 위하여 2차 영동후 electro-elution에 의해 회수 하였다(그림 3, 그림 4).

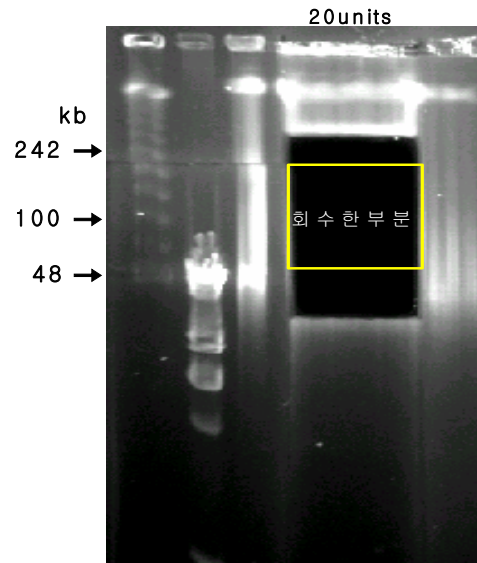


그림 3. 20units의 *Mlu* I으로 완전 소화한 후 CHEF 전기영동하여 gel로부터 50kb이상의 gel를 회수하였음(First size selection PFGE, volts/cm=6.0, run time= 22hours, initial switch time =1.0sec, final switch time=50.0sec).

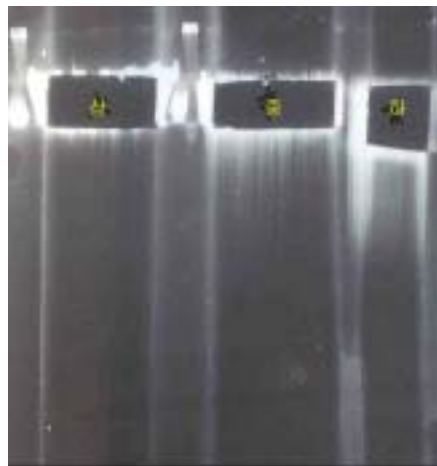


그림 4. 1차 size 선별한 gel를 상, 중, 하로 나누어 2차 size 선별하였음.
(Second size selection PFGE, volts/cm=6.0, run time=22hours, initial switch time=3.0sec, final switch time=5.0sec).

추출 후 *Mlu* I으로 소화한 50ng vector DNA와 gel에서 회수한 300ng의 insert DNA를 T4 ligase(9 units)에 의해 16°C에서 12시간 반응하여 제조합체 vector를 구축하였다.

라. 제조합체 vector 선발

구축된 vector는 대장균 DH10B(Gibco BRL)에 Cell-Porator™(13.0kV/cm, 50 μF, 125 ohms)로 형질전환 하였다. SOC medium에서 1시간 배양후 chloamphenicol 25μg/ml, 0.03mM IPTG와 0.003% X-Gal이 첨가된 LB배지에 plating 하였다. Overnight후 white colonies를 선발하였다. 선발된 white colonies는 QIAprep® Miniprep Kit(QIAGEN)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출후 10μl를 *Xba* I으로 소화한후 0.8% agarose gel에 전기 영동하였다. 6 lane을 제외한 모든 insert DNA가 vector DNA(7.2kb) 이상인 것을 확인할 수 있었다(그림 5). 또한 insert DNA의 정확한 size 확인을 위하여 PFGE 전기 영동하였다 (volts/cm=6.0, run time=16시간, initial switch time=5초, final time=15초).

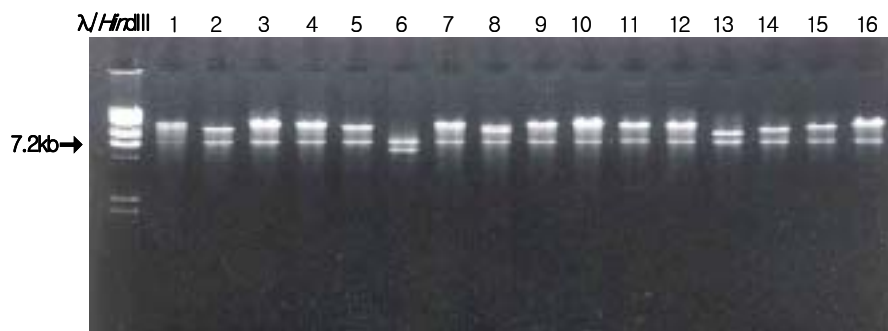


그림 5. 추출한 plasmid DNA을 *Xba* I으로 소화후 0.8% agarose gel에 전기 영동 하였음.

3. 연구결과

가. BAC vector 구축 및 Southern blot 분석에 의한 S-locus의 확인

본 연구실에 보유하고 있는 pGEM-T Easy(Promega) vector에 cloning된 S⁴⁸ SLG, SRK kinase donmain과 S⁶⁰ SP11을 각각 특이적 primer를 이용하여 PCR 증폭시킨 후 probe template로 이용하였다.

S⁹¹⁸계통의 고분자량 게놈 DNA를 단리하고 *Mlu*I으로 소화한 후, PFGE Southern blot분석과 같은 방법으로 영동, blotting한 후, SLG⁴⁸ probe와 SRK⁴⁸-KD probe로 hybridization 시켰다. 세정조건은 0.1x SSC, 0.1% SDS, 65°C에서 20분간 2회 실시하였다.

특이적 단편의 probe labeling은 BM사(Germany)의 Non-radioactive DNA labeling kit를 사용하였다. *E. coli*로 부터 plasmid DNA를 추출한 후 *Eco*R I으로 절단하여 low melting agarose gel에 분획한 후 agarase kit(Promega, USA)를 이용하여 특이적 DNA 단편을 회수하였다. 회수된 DNA 단편을 100°C에서 5분 동안 열변성시켜서 얼음 속에서 냉각시킨 후 digoxigenin이 표식된 dUTP labeling mixture와 hexanucleotide mixture를 첨가하여 이것에 klenow enzyme(2 units)을 넣고 37°C, 2시간 이상 보온 방치하였다. 반응 후 99.9%의 냉각 ethyl alcohol로 침전시키고 70% 냉각 ethyl alcohol로 씻은 후, 진공하여 건조시킨 뒤 50 μ l의 TE buffer에 용해하여 probe로 사용하였다. 특이적 단편의 probe를 사용할 때는 사용 직전에 다시 한번 열처리하여 single strand DNA로 만든 후 사용하였으며, Southern blot 분석을 위하여 각 품종으로부터 추출, 정제된 genomic DNA는 사용전 제한효소의 제조회사(Bethesda Research Laboratories, Inc, Gaithersburg, MD)의 권장 방법에 준하여 각각 소화시켰다. 소화된 DNA 단편들은 TBE buffer(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 0.8% agarose gel에 전기영동하여 변성 및 중화 과정을 거친 후 vacuum blotting apparatus를 사용하여 DIG전용 nylon membrane에 blotting하였다. Blotting nylon membrane을 80°C에서 1시간 30분 동안 진공상태에서 baking시킨 후 1분 동안 UV-crosslink하였다. Baked nylon membrane은 hybridization용액 [5x SSC, 0.5%(w/v) blocking reagent, 0.1%(w/v) sodium N-lauroylsarcocinate, 0.02%(w/v) SDS]을 넣은 hybri-bag에 밀봉하고 hybrid oven에서 65°C, 2시간 동안 prehybridization을 하였다. Prehybridization 용액을 버리고 열처리한 probe 5 μ l를 포함하는 hybridization 용액 2.5ml을 넣어서 65°C에서 12시간 이상 반응시켰다. 50ml의 수세액 A[2x SSC, 0.1%(w/v) SDS]로 5분 동안 2회, 50ml의 수세액 B[0.1x SSC, 0.1%(w/v) SDS]로 65°C에 15분 동안 2회, buffer 1(100 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl)로 실온에서 1분 동안 씻은 후 100ml의 buffer 2(100 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)로 2분간 진탕한 후 DIG-ELISA법 (BM사의 manual)을 이

용하여 X-ray film상에서 검출하였다. 그 결과 *Mlu* I으로 제한효소 처리된 genomic DNA는 *SLG* 유전자를 probe로 이용하여 hybridization하였을 때 약 80kb의 단일 밴드가 검출되었으며, *SRK* 유전자의 kinase domain을 이용하여 hybridization 하였을 때도 역시 약 80kb의 단일 단편이 검출되었다. 이러한 결과는 *Mlu* I으로 제한효소 처리하였을 때 분획된 약 80kb 크기의 단편은 *SLG* 유전자와 *SRK* 유전자 모두를 포함하고 있는 단편임을 보여주는 결과이다(그림 6).

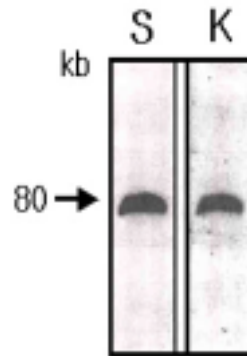


그림 6. *SLG* probe (S) 와 *SRK*의 kinase domain probe (K)를 사용한 genomic Southern blot 분석. 고분자 genomic DNA는 *Mlu* I으로 소화하였음.

나. S-locus의 subcloning에 의한 주두측 자가불화합성 유전자 동정

Positive clone을 *Spe* I 및 *Bam*H I으로 소화한 후 pBluescriptII 및 pBIN19에 subcloning하였고, 제한효소 지도를 작제 하였다. 그 결과, *SLG*는 clone의 중간부분에 존재하였고 *SLG*의 13 kb 상류에 동일한 전사방향으로 *SRK*가 존재하고 있었다. 또한 clone의 전 염기배열을 결정한 결과 72,536 bp로 되어 있었다. 평균 GC함량은 36%이었고, 유전자(exon)가 존재하고 있는 영역은 GC함량이 40% 이상의 곳에 많이 분포하고 있었다.

QIAprep[®] Miniprep Kit(QIAGEN)에 의해 추출된 plasmid DNA의 염기배열의 결정은 dideoxynucleotide chain termination법에 의하고 자동 sequencer (Applied Biosystems)로 판독하여 Lasergene sequence 분석 software를 이용하여 결정하였다. 염기배열의 해석은 DNASIS software(HITACHI Software Engineering) 및 GENETIX-WIN Ver 4.0 software(Software Development Co., LTD.)을 이용하였

다. 주두축 자가불화합성 유전자인 S^{918} SLG의 전 영역을 해석한 결과, SLG-33(*B. oleracea*, AB054730)과 SLG13-b(*B. oleracea*, AB024418)에 90%이상의 상동성을 보였으며, *Brassica*속 SLG와 같은 특징을 보였다(그림 7). S^{918} 의 SLG와 SRK의 아미노산 배열을 SLG13과 비교결과, *Brassica*의 SLG에서 보고된 12개의 cysteine잔기와 3개의 hypervariable 영역이 관찰되었다(그림 8).

```

1 - ATGAAAGGTGTACGAAACATCTACCATAAATCTTACATCTTATCCITTTTGCTTGTCTTT - 60
  - M K G V R N I Y H N S Y I L S F L L V F
61 - TTCGTCGTGATTCTATTTTCGTCCTGCCTTTTCGATCAACATTTTGTGCGCTACAGAATCT - 120
  - F V V I L F R P A F S I N I L S P T E S
121 - CTTACAATCTCAACCAACAGAACACTTGTATCTCCCGTAATGTCTTCGAGCTCGGCTTC - 180
  - L T I S T N R T L V S P G N V F E L G F
181 - TTCAGAACCAACTCAAGTTCTCGTTGGTATCTCGGGATATGGTACAGAAAATCTCGGAA - 240
  - F R T N S S S R W Y L G I W Y K K I S E
241 - AGAACCTATGTATGGGTTGCCAACAGAGATAGGCCTCTCTCCAGTGCCGTTGGAACCCCTT - 300
  - R T Y V W V A N R D R P L S S A V G T L
301 - AAAATCTCTGGCTATAAATCTTGTCCCTCCGAGGCCACTCCAATAAATCAGTTTGGTTCGACG - 360
  - K I S G Y N L V L R G H S N K S V W S T
361 - AATCTTACAGAGGAAATGAGAGATCACCAGTGGTGGCAGAGCTTCTCGCTAATGGAAC - 420
  - N L T R G N E R S P V V A E L L A N G N
421 - TTCGTGATGCGAGACTCCAATAACAACAACGCAAGTCAATTCTTGTGGCAAGTTTCGAT - 480
  - F V M R D S N N N N A S Q F L W Q S F D
481 - TACCCTACAGATACTTTGCTTCCAGAGATGAAACTGGGTTACGACCTCAAAACAGGGTTG - 540
  - Y P T D T L L P E M K L G Y D L K T G L
541 - AACAGGTTCCCTTACATCATGGAGAACTTCAGATGATCCGTCAGCGGGGATTACTGTAC - 600
  - N R F L T S W R T S D D P S S G D Y L Y
601 - AAGCTCGAACCCCGAAACTTCCGAGTTTTATCTATGGAATGAGGACTTCCAATGCAT - 660
  - K L E P R K L P E F Y L W N E D F P M H
661 - CGGAGCGGTCCATGGAATGAAGTCAGATTTAGTGGTATACCAGAGGACCAAAAGTTGAGC - 720
  - R S G P W N E V R F S G I P E D Q K L S
721 - TACTTGGTGTATAATTTACAAAGAATAGTGAAGAGGTGGCTTACACATTCGGAATGACC - 780
  - Y L V Y N F T K N S E E V A Y T F R M T
781 - AACAAACAGCTTTTACTCGAGATTGACAGTAAGTTCCCTCAGGGTATTTTGAGCGACTGACG - 840
  - N N S F Y S R L T V S S S G Y F E R L T
841 - TGGAAATCCGACATTAGGGATATGGAACGTGTTCTGGTCTTCTCCAGCGAACCTCCAGTGC - 900
  - W N P T L G I W N V F W S S P A N L Q C
901 - GATATGTACAAGAGTTGTGGGCCTTACTCTTACTGTGACGTGAACACATCACCTGTGTGT - 960
  - D M Y K S C G P Y S Y C D V N T S P V C
961 - AACTGTATCCAAGGGTTCAGACCCAAGAACCAGGAGTGGAAATCTGAGAGTACCGGCA - 1020
  - N C I Q G F R P K N R Q E W N L R V P A
1021 - GGTGGGTGTATAAGGAGGACCAAGCTTAGCTGCAGTGGAGATGGTTTTACCAGGATGAAG - 1080

```

```

- G G C I R R T K L S C S G D G F T R M K
1081 - AATATGAAGTTGCCAGAACTACGATGGCTATTGTCGACCGCAGTATTGGTGTGAAAGAA - 1140
- N M K L P E T T M A I V D R S I G V K E
1141 - TGTGAGAAGAAGTGCCTTAGCGATTGTAATTGTACCGCGTTTGCAAMTGCAGATATCCGG - 1200
- C E K K C L S D C N C T A F A N A D I R
1201 - AATCGTGGGAAGGGTTGTGTCATTGGACCGGAGAGCTTGAAGATATCCGGACGTACTTT - 1260
- N R G K G C V I W T G E L E D I R T Y F
1261 - GCTGACAGTCAAGATCTTTATGTCAGATTGGCTGCTGCGGACCTTGTTTAGCTCTTTATC - 1320
- A D S Q D L Y V R L A A A D L V * L F I
1321 - TTAAATAAAGCACGGAT - 1338
- L K * S T D

```

그림 7. S⁹¹⁸ haplotype의 SLG 전 영역의 염기서열.

```

S918 SLG      MKGVRNIVHNSYILSFLLVFFVWILFRPAFSINILSPTESLTI*STNRTL*VSPGNV*FELGF
S918 SRK      MKGVRNIVHNSYILSFLLVFFVWILFRPAFSINILSSTESLTI*STNRTL*VSPGNV*FELGF
SLG13      MKGVVKTYDI*SYTILSFLLVFFVLI*LRPAFSINILSSTESLTI*SSNRTL*VSPGNV*FELGF
SRK13      MKGVRNIVHNSYILSFLLVFFVWILFRPAFSINILSSTESLTI*SSNRTL*VSPGNV*FELGF
*::*: * , ** ***** ***** ** , *****:*****

```

```

S918 SLG      FRTNSSSRWYLG*IWYK*ISERTYVWVANRDRPLSSAVGTLKI*SGYNL*VLRGHSNK*SVWST
S918 SRK      FRTNSSSRWYLG*IWYK*ISERTYVWVANRDRPLSSAVGTLKI*SGYNL*VLRGHSNK*SVWST
SLG13      FKTTSSSRWYLG*IWYK*FPYRTYVWVANRDNPLSNDIGTLKI*SGNNL*VLLDHSNK*SVWST
SRK13      FKTTSSSRWYLG*IWYK*FPYRTYVWVANRDNPLSNDIGTLKI*SGNNL*VLLDHSNK*SVWST
*:* , *****: , ***** , *** , :***** **** , *****

```

```

S918 SLG      NLTRGNERSPVVAELLANGNFVMRDSNNNNASQFLWQSPDYPTDILLPEMKLGYDLKTGL
S918 SRK      NLTRGNERSPVVAELLANGNFVMRDSNNNNASQFLWQSPDYPTDILLSEM*KLGYDLKTGL
SLG13      NVTRGNERSPVVAELLDNGNFVMRDSNSNNASQFLWQSPDYPTDILLPEMKLGYDLKTGL
SRK13      NVTRGNERSPVVAELLDNGNFVMRDSNSNNASQFLWQSPDYPTDILLPEMKLGYDLKTGL
*::***** ***** ***** *****

```

Hypervariable region I

```

S918 SLG      NRFLTSWKTSDDPSSGDYLYKLE-PRKLPEFYLNEDFPMHRSGPWNEVRFPSGIPEDQKL
S918 SRK      NRFLTSWRTSDDPSSGDYLVQARTPKTFRSFI*LNEEDFPMHRSGPWNEVRQIVVYQRTKS
SLG13      NRFLTSWRSSDDPSSGDVSYKLE-LRRLPEFYLSGGIFRLHRSGPWNGFRI*SGIPEDQKL
SRK13      NRFLTSWRSSDDPSSGDVSYKLE-PGR*LPEFYLWGNIRTHRSGPW*SGIQPSGIPEDQRL
*****:***** : , : * * , : ***** , : : :

```


CATAGTTCCTTGAAATTTGTTACTGGAAAGAGGAACAGAGGATTCIACAACITGAACIACAAAAACAATTTTCTAAG
 CIAT[6th-Intron]GCATGGAGTAAITGGAAAGAAGGAAGAGCCCTAGAAATCGIAGATCCAGTAAITCGAAGA
 TTCACITTCATCACIGCCATCAACATTTCAACCACAAGAAGTCCIAAAATGCATCCAAATTTGGTCTCTTGGTGT
 TCAAGAACITTCAGAGCACAGACCAACGATGTCGTCGTGGTGGTGGATGCTTGGAAAGTGAAGCAACAGAGATTC
 TCAGCCIAAACCGCCAGGTIATTTTGTGGAGGAAGTCCTGATGACCTTGATCCTTCAITCAAGTACGCAGTGC
 CGACGATGAATCCITGGACGGTGAACCAGTACACCTGCTCAGTCAITCGATGCCCGGTAA

그림 8. S⁹¹⁸ haplotype의 *SLG* 및 *SRK* S-domain과 S¹³ *SLG*(AB024417) 및 S¹³ *SRK*(AB024420)의 염기배열 비교. 밑줄은 보존된 signal peptide를 나타냄.

다. 화분측 자가불화합성 유전자의 단리 및 특성

72 kb 영역내에는 12개의 유전자가 존재하고 있었고 유전자 밀도는 평균 6 kb 에 1 유전자가 존재하였다. ClpP 나 J domain protein 등의 분자 샤페론이나 Yeast anti-silencing protein homologue 등은 기지의 단백질과 상동성이 있었다. Pollen coat protein(PCP)과 같은 작은 cysteine이 풍부한 단백질을 코딩하고 있는 SP11은 SRK의 하류에 존재하고 있었다(그림 9).

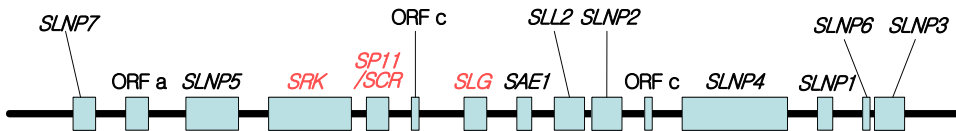


그림 9. S⁹¹⁸ haplotype의 72.5kb 거대단편에 포함된 유전자 지도

동정된 SP11-S⁹¹⁸의 DNA 염기서열을 결정 한 결과, 2개의 exon과 1개의 intron 으로 이루어져 있으며, 84개의 아미노산으로 구성되어 있었다(그림 10). 또한, *B. rapa* SP11-60(AB067446)과 *B. oleracea* SP11-15(AB089511)에 95%이상의 상동 성을 보였다.

```

gcgaaaatcttatataactcataagtcATGAGATATGGTACTTATATATACAAATTTGGAAAAAGATACACTACT
      N R Y G T Y I Y K F G K K I H Y L

TGTGTTTCATAGTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGgtaaatatatacaatagctttccccctttattgacgatt
      C F I V L I L T Y V Q A

taggatttttcttaccagatgcacttcattatTTTTCTATTTAAAGCACAGATGTGGGAGCTCCGATATGCC
      Q D V G A P I C P

TGAAGGCATCGCCAGAAAGTATGGTATACTAGGAAGATGCTTTAATTCACACACCCAGACTGTAAGGTTAATAA
      E G I A R K Y G I L G R C F N S T H P D C K V N N

TTGCCATTGTGGTGTTCMAACGATGGGTCATCTTGGAGTAAATTTTTGCTACTGTTGCAAAAGTTAAATCATAAtt
      C H C G V S N D G S S W S N F C Y C C K V K S

gatcaacgaa
  
```

그림 10. S⁹¹⁸ haplotype의 주두측 자가불화합성 유전자 SP11의 염기배열. 대문자 는 exon, 소문자는 intron, boldface letters는 start codon, stop codon를 나타냄.

그 밖의 것은 이미 보고된 유전자와 상동성이 없었고 기능에 관해서도 추정이 불가능하였다. SLNP7(S-locus near protein)의 상류에 긴 ORF가 있었고 그 ORF는 *En/Spm*의 DNA transposon과 상동성이 있었다. 이 transposon과 같은 배열은 페튜니아의 *PsI PttA* 유전자와 상동성이 높았고 아미노산수준에서 약 74%의 유사성을 나타내었다. 또한 이 ORF를 끼고 transposon 경계역에 존재하는 역위 반복배열이 있었고, DNA transposon과 같은 배열이 약 7.5 kb 존재하였다. 그러나 본 clone에서는 retro-transposon과 같은 배열은 보이지 않았다. GC함량이 높은 곳에서 비교적 긴 ORF가 두 개 발견되었다. 이 두 개의 ORF는 데이터 베이스 검색 결과 어느 것도 등록되어 있지 않은 유전자로 아미노산 수준에서 상동성이 없었다. 또한 GC함량은 그다지 높지 않지만 SP11/SCR하류에 비교적 긴 ORF가 존재하였고, 이 ORF는 *Arabidopsis*의 F21 J9.24 protein(accession no. AC000103-24)와 아미노산 수준에서 상동성이 있었다.

Promoter element로서 *SLG*, *SRK*, *SLR1*에 보존되어 있다고 알려져 있는 *SLG/SRK* promoter 배열이 *SRK*로부터 상당히 떨어져 있는 상류에 존재하고 있었다. 이 promoter 배열 하류에는 ORF와 같은 배열이 발견되지 않았다(표 1).

표 1. 72 kb 영역내에 존재하는 12 유전자의 특성

Gene	cDNA Length	Coding protein feature
SLNP1	866 (Not full-length)	None
SLNP2	1125	Clp protease
SLNP3	924	None
SLNP4	1398 (Not full-length)	None
SLNP5	1435 (Not full-length)	J-domain protein
SLNP6	355	Anti-silencing protein(ASF1)-like
SLNP7	Not determinant	None
SP11/SCR	487	Pollen coat protein-like cysteine-rich protein
SLG	1405	Secreted glycoprotein
SRK	2692 (Not full-length)	Receptor kinase
SAE1	1015	None
SLL2	2075	None

S⁹¹⁸ haplotype에 있어서 *SLG*와 *SRK*간의 거리는 약 11.5 kb이었지만 이것은 *B. campestris*의 S⁸계통 및 *B. napus*의 S⁹¹⁰에서의 추측거리보다 짧았다. *SLG*와 *SRK*의 양 유전자의 방향에 관해서는 *B. campestris* S⁸계통에서 보고 되어 있는 것과 달랐다. 따라서 다양한 haplotype에 있어서 *SLG*와 *SRK*는 긴밀히 연쇄되어 있지만 방향은 각각이라고 말할 수 있었다. 이와 같이 유전자의 방향이 서로 다른 상동성 조환이 일어나기 어렵다고 생각되었다. 일반적으로 S 유전자좌에서는 조환이 억제되어 있지만 그 이유는 이와 같이 *SLG*와 *SRK*방향의 다양성에 기인하였는지도 모른다(그림 11). Positive clone의 유전자 밀도는 1유전자/6 kb이었다. *Arabidopsis*에서의 유전자 밀도는 제 4염색체 1.9 Mb 배열에서 1유전자/4.8 kb이었고, 제 5염색체 1.6 Mb에서 1유전자/4.7 kb 이었다. *B. campestris*의 게놈 크기가 *Arabidopsis*의 약 3배인 것을 생각하고, 양 종의 총 유전자 수가 거의 같다고 가정하면 *Brassica*의 게놈 전체의 평균 유전자 밀도는 1유전자/ 14 kb 정도라고 하는 계산이 된다. 따라서 1유전자/6 kb인 영역은 유전자 밀도가 높은 영역이라고 말할 수 있다. 이와 같은 gene space(gene island=gene rich region)는 종종 식물의 genome 중에 흔히 발견된다. Cluster중의 유전자 간에는 transposon배열이 흔히 보인다. 72 kb의 영역에는 retro-transposon과 같은 배열은 보이지 않았지만 DNA형 transposon 배열이 존재하였고, 전 insert의 10%에 해당하는 영역을 점하고 있었다. 이 transposon이 전사기능을 갖고 있는지를 분명히 하기 위해서는 ORF의 발현을 조사하거나 이 transposon이 삽입되어 있지 않은 S⁹¹⁸ haplotype을 찾을 필요가 있다. 지금까지 다수의 S 호모 개체로 PFGE Southern blot분석을 행하였지만 *Mlu* I소화로 약 72 kb의 밴드가 안정하게 검출되었다. 이것은 아마도 현재 전이능을 갖고 있지 않은 것으로 추정된다. GC 함량이 높은 유전자가 존재하고 있는 것은 stop codon(TAA, TAG, TGA)이 AT가 많기 때문이라고 생각되고, 일반적인 지견과 일치한다. 단지 식물에 따라서는 벼와 같이 전반적으로 GC 함량이 높은 특징을 갖는 종도 있기 때문에 유전자 존재 부위에서의 GC 함량의 정도에는 식물종간의 차가 있다고 생각된다. 또한 동물에 있어서는 여러 장소에서 발견되는 housekeeping 유전자는 GC 함량이 높지만 조직 특이적으로 발현하는 유전자는 GC 함량이 낮다고 하는 보고도 있기 때문에 일괄적으로 GC 함량이 낮다고 하여 그 영역에는 유전자가 존재하지 않는다고는 말할 수 없을 것이다. 이들 유전자중 *SLG*와 결합하는 것으로 알려져 있는 pollen coat protein(PCP-A1)과 유

사하고 cysteine이 풍부한 작은 단백질을 code하는 *SP11/SCR*이 화분측 ligand의 receptor로서 자가불화합성의 인식반응이 중심적 역할을 하는 유전자이다. 또한 이것은 1핵기 후반의 약에서부터 성숙 약까지 특이적으로 발현하는 것으로 알려져 있고 화분측 자가불화합성 유전자 임이 확인되었다. 본 연구에서는 이 화분측 자가불화합성 유전자 *SP11/SCR*을 cloning하여 F₁ 순도 검정용 primer를 개발하는 연구목표를 병행하고 있다.

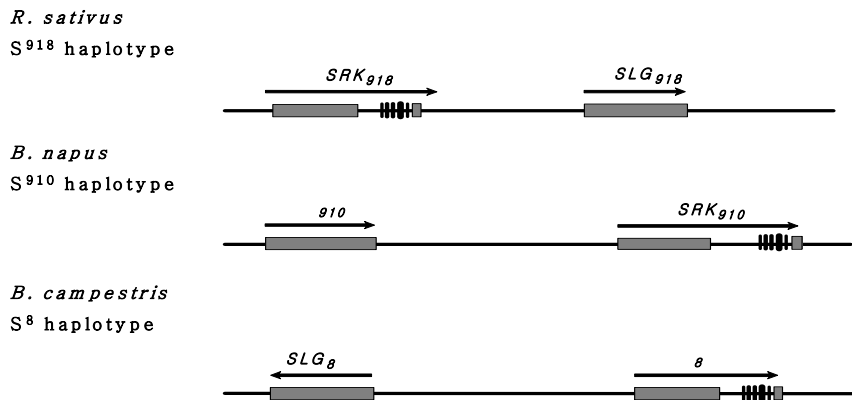


그림 11. *Raphanus* S⁹¹⁸ haplotype과 *Brassica* S⁹¹⁰ 및 S⁸ haplotype간의 *SLG*와 *SRK*의 전사방향 비교

3. 고찰

1차년도에 달성된 S⁹¹⁸번의 육성계통으로부터 거대 genomic DNA를 *Mlu* I으로 소화하여 S-locus상의 자가불화합성 유전자, 즉 *SLG*, *SRK* 및 *SP11/SCR*를 모두 포함한 약 72 kb의 단일 단편을 TrueBlue-BAC2[®] cloning vector에 ligation하여 vector를 구축하였다. *Mlu* I으로 소화한 50ng vector DNA와 gel에서 회수한 300ng의 70 kb이상의 insert DNA를 T4 ligase(9 units)에 의해 16°C에서 12시간 반응하여 ligation 하였으며, Ligated DNA는 대장균 DH10B(Gibco BRL)에 Cell-PoratorTM(13.0kV/cm, 50μF, 125 ohms)로 형질전환 하였다. SOC medium에서 1시간 배양후 chloamphenicol 25μg/ml, 0.03mM IPTG와 0.003% X-Gal이 첨가된 LB배지에 plating 하였다. 선발된 white colonies는 insert DNA의 크기를 확인하기 위하여 QIAprep[®] Miniprep Kit(QIAGEN)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여

PFGE 전기영동 하였다(volts/cm= 6.0, run time=16시간, initial switch time=5초, final time=15초). 얻어진 clone을 *SLG*⁴⁸ probe로 colony hybridization과, *SLG*⁴⁸과 *SRK*⁴⁸에 특이적인 primer를 이용한 PCR에 의해 positive clone 1개를 얻었다. Positive clone이 확실히 *SLG*⁴⁸과 *SRK*⁴⁸ 양자를 포함하고 있는가를 확인하기 위하여 plasmid를 추출하여 *Xba* I으로 소화한 후 Southern blot 분석을 행한 결과 S⁹¹⁸ 계통의 게놈 DNA와 완전히 같은 위치에서 *SLG*⁴⁸과 *SRK*⁴⁸의 밴드가 검출되었다. 따라서 *SLG*⁴⁸과 *SRK*⁴⁸의 목적의 영역을 cloning한 것이 확인되었다.

선발된 white colonies는 QIAprep[®] Miniprep Kit(QIAGEN)를 이용하여 plasmid DNA를 CHEF 전기영동하였다(volts/cm=6.0, run time=16시간, initial switch time=5초, final time=15초). Positive clone을 *Spe* I 및 *Bam*H I으로 소화한 후 pBluescriptII 및 pBIN19에 subcloning하였고, 제한효소 지도를 작제하였다. 그 결과, *SLG*는 clone의 중간부분에 존재하였고 *SLG*의 11.5 kb 상류에 동일한 전사방향으로 *SRK*가 존재하고 있었다. 72 kb 영역내에는 12개의 유전자가 존재하고 있었고 유전자 밀도는 평균 6 kb에 1 유전자가 존재하였다. Pollen coat protein(PCP)과 같은 작은 cysteine이 풍부한 단백질을 코드하고 있는 *SP11*은 *SRK*의 하류에 존재하고 있었다. 그 밖의 것은 기지의 유전자와 상동성이 없었고 기능에 관해서도 추정이 불가능하였다. GC 함량이 높은 곳에서 비교적 긴 ORF가 두 개 발견되었다. 이 두 개의 ORF는 데이터 베이스 검색 결과 등록되어 있지 않은 유전자로 아미노산 수준에서 상동성이 없었다. 또한 GC 함량은 그다지 높지 않지만 *SP11/SCR*하류에 비교적 긴 ORF가 존재하였고, 이 ORF는 *Arabidopsis*의 F21 J9.24 protein(accession no. AC000103-24)와 아미노산 수준에서 상동성이 있었다. Promoter element로서 *SLG*, *SRK*, *SLR1*에 보존되어 있다고 알려져 있는 *SLG/SRK* promoter 배열이 *SRK*로부터 상당히 떨어져 있는 상류에 존재하고 있었다. 이 promoter 배열 하류에는 ORF와 같은 배열이 발견되지 않았다.

S⁹¹⁸ haplotype에 있어서 *SLG*와 *SRK*간의 거리는 약 11.5 kb이었지만 이것은 *B. campestris*의 S⁸계통 및 *B. napus*의 S⁹¹⁰에서의 추측거리보다 짧았다. *SLG*와 *SRK*의 양 유전자의 방향에 관해서는 *B. campestris* S⁸계통에서 보고되어 있는 것과 달랐다. 따라서 다양한 haplotype에 있어서 *SLG*와 *SRK*는 긴밀히 연쇄되어 있지만 방향은 각각 다른 것으로 동정되었다.

이들 유전자중 *SLG*와 결합하는 것으로 알려져 있는 pollen coat protein

(PCP-A1)과 유사하고 cysteine이 풍부한 작은 단백질을 code하는 *SP11/SCR*이 화분측 ligand의 receptor로서 자가불화합성의 인식반응에 중심적 역할을 하는 유전자로 1핵기 후반의 약에서부터 성숙 약까지 특이적으로 발현하는 것으로 알려져 있는 화분측 자가불화합성 유전자가 동정되었다.

제 2 절 주두측 자가불화합성 유전자(*SLG*)의 PCR-RFLP에 의한 육성계통의 *S* haplotype 결정

1. 서론

자가불화합성은 자웅의 생식기관이 정상임에도 불구하고 자가 화분을 자가의 주두에 수분한 경우에 수정에 이르지 못한 현상으로 주두 표면이나 style-transmitting 조직에서 자가화분의 화분관 신장을 억제하여 자가수정을 방해하는 system이다. 많은 개화 식물들은 자가 수정을 타가 수정으로 전환하기 위하여 다양한 방법으로 진화되었으며 자가불화합성 현상은 그 중 한 예이다.

십자화과에 속하는 *Brassica*류 및 무는 분자적 연구가 집중적으로 이루어진 포자체형 자가불화합성 체계를 가지고 있으며 이 체계는 단일 *S* 유전자 좌에 의해서 조절되는 *S* 복대립 유전자에 의하여 설명되어진다(Bateman, 1955). 자가불화합성의 분자 유전학적 분석에 있어서 *S*-locus에는 적어도 2개의 유전자, 즉 *S*-locus glycoprotein(*SLG*)와 *S*-locus receptor kinase(*SRK*) 유전자를 포함하고 있다. *SLG* 유전자는 높은 다형성을 보이는 분비 당 단백질로써 주두 papillar cell의 세포벽에 위치하고(Kandasamy et al. 1989), *SRK* 유전자는 *SLG*와 염기 유사성 정도가 매우 높은 extracellular domain, transmembrane domain, serine/threonine protein kinase로 이루어진 transmembrane receptor protein kinase를 부호화한다(Stein et al., 1991). *S* haplotype은 *SLG* 핵산 서열의 상동성으로부터, class I과 class II의 두 가지 그룹으로 나누어지며, 이것은 class I에 속하는 우성 *S* haplotype과 class II에 속하는 열성 *S* haplotype이라는 것이 알려져 있다(Nasrallah and Nasrallah 1993). *Brassica rapa*, *Raphanus sativus* 대다수는 Class I에 속하며(Hatakeyama et al., 1998b, Sakamoto et al., 1998), Class II haplotype들은 기본적으로 자가불화합성 정도가 약하고, S^2 , S^5 , S^{15} 가 여기에 속한다(Nasrallah et al., 1991).

현재 시판된 무의 대부분은 자가불화합성 체계를 이용하여 F_1 잡종 종자를 생산하기 때문에, *S* haplotype의 동정은 육종에 절실히 요구되어진다. *S* haplotype을 동정하기 위하여 사용되는 방법으로 모든 실험 계통들을 교배하여 화분관 신장을 관찰하는 화분관 검경법(Zuberi MI and Lewis D 1981)과 결실율을 조사하는 방

법이 있다. 이러한 방법들은 개화기까지 작물재배에 시간과 노력이 많이 소모되는 단점과 환경요인과 식물 생리상태에 따라 자가불화합성 현상이 불안정하며, 또한 양친의 개화기를 맞추어야 하는 문제점들이 있다. 현재까지 *S* haplotype의 동정은 *Brassica oleracea*에서 50 개체(Ockendon 1974), *Brassica campestris*에서 30 개체 이상이 동정되었다(Nou et al 1993). 양배추류의 *S* haplotype을 동정하기 위하여 *SLG*, *SRK* 유전자를 이용한 PCR-RFLP방법이 사용되었다. 이 방법은 *SLG*, *SRK*-specific primer 조합을 이용하여 *SLG*, *SRK* allele를 PCR에 의해 증폭하고, 증폭된 PCR 산물을 한 개 또는 그 이상의 restriction endonucleases로 소화한 후 전기영동 하여 분석하는 방법이다(Brace et al 1993, Nishio et al 1994, 1996, 1997).

본 연구에서는 국내 시판의 F₁ 채종에 이용되고 있는 무의 육성계통에 있어서 *S* haplotype의 동정을 수행하였다. 주두측 자가 불화합성 유전자인 *SLG* 유전자를 PCR 증폭하여 제한효소로 소화하여 *S* 인자형의 상이성을 결정하는 분자적인 방법으로 육종현장에서 활용되고 있는 *S* haplotype을 신속하게 동정할 수 있고, 개화기의 불일치로 *S* 유전자형을 결정하기 어려웠던 계통들간의 화합 여부를 검정할 수 있는 방법을 개발하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험재료 수집 및 Total DNA 추출 및 정제

국내 3개 종묘회사로부터 179개의 육성계통을 수집하여 엽을 채취 후 CTAB법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. DNA 추출방법은 신평 1g을 액체질소에 넣고 막자사발에서 마쇄하여, 추출 buffer 15ml과 2-mercaptoethanol 750 μ l, 20% SDS 1ml 를 첨가한 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키고 5M potassium acetate 5ml를 첨가한 후 얼음에 20분간 방치하였다. 원심 후 상등액을 다른 튜브에 옮긴 후 isoprophanol을 10ml 첨가하고 -20 $^{\circ}$ C에 20분간 방치하였다.(O/N 가능) 튜브를 꺼내 다시 원심시킨 다음 상등액을 버리고 건조시킨 후 1 \times TE Buffer 500 μ l로 녹였다. 동량의 phenol과 chloroform첨가하여 정제하고 isoprophanol 500 μ l와 3M Na-acetate 75 μ l를 넣고 원심시켜 상등액을 버리고, 다시 70% EtOH 500 μ l 넣은 후 원심시켰다. pellet은 건조 후 1 \times TE Buffer 녹여 spectrophotometer를 이용하여서 DNA를 25 ng/ μ l로 정량하여 자가불화합성 유전자의 PCR 증폭을 위한

template DNA로 이용하였다.

나. *SLG* 증폭을 위한 primer 합성 및 선발

모든 공시재료의 *SLG*를 증폭하기 위한 특이적 primer는 현재까지 보고된 무의 *SLG* 염기서열을 비교, 분석 후 보존된 영역에서 USLl(5'-TWT GTC GTC TTC RGA GTC TC-3')와 USLr(5'-YTG ACR TAA AGA TCT TGM CC-3')을 합성하였다. PCR 증폭은 Perkin-elmer사의 PE-9700을 이용하였고, 2분간 94°C에서 pre-denaturation 시킨 후, denaturation을 94°C에서 1분, annealing은 63°C에서 2분, extension은 72°C에서 3분간 30회 반응시켰다. Post-extension은 72°C에서 5분간 수행하였다. PCR 증폭 반응용액은 10 x reaction buffer(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, PH 8.3, 15mM MgCl₂) 2.5 μ l, 2.5mM dNTP 2 μ l, Genomic DNA 50ng, 100pM Primer 0.1 μ l, 0.5unit *Taq* polymerase 0.25 μ l (TaKaRa, Japan) 및 멸균수를 이용하여 Total Vol. 25 μ l로 조성되었다.

다. 증폭 DNA 단편의 RFLP 분석

증폭된 PCR산물을 다형성 분석에 적합한 *Sty* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Afa* I으로 소화하였다. 그 반응조건으로 1.5 μ l의 10 \times buffer (750mM KCl, 150mM tris-HCl, pH 7.5, 92.5mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol)를 첨가하고 PCR산물 7 μ l, restriction endonuclease 2.5units를 첨가한 후 최종 volume을 15 μ l로 하였다. 반응액은 37°C에서 10시간 incubation시킨 후 1X TBE buffer를 함유하고 있는 2.5% Metaphor agarose(BMA, USA) gel에서 100V에서 2시간동안 전기영동으로 분획한 후 UV trans-illuminator상에서 촬영하였다.

3. 연구결과

가. 주두측 자가불화합성 유전자(*SLG*)의 PCR-RFLP 분석

국내에서 시판되고 있는 무의 F₁생산에 이용되고 있는 육성계통을 3개 종묘회사로부터 179개의 S 동형접합체 계통을 분양받아 공시재료로 이용하였다. 공시한 모든 육성계통으로부터 주두측 자가불화합성 유전자인 *SLG*만을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 합성하기 위하여 genbank에 등록된 무와 배추의 *SLG* 염기 배열을 비교 분석하여 S haplotype간에 보존된 영역에서 *SLG* universal primer를

합성하였다. 192개 육성계통은 합성된 *SLG* universal primer(USLf+USLr)로 증폭 시 모두 약 1,200 bp의 단일 단편이 증폭되었다(그림 1).

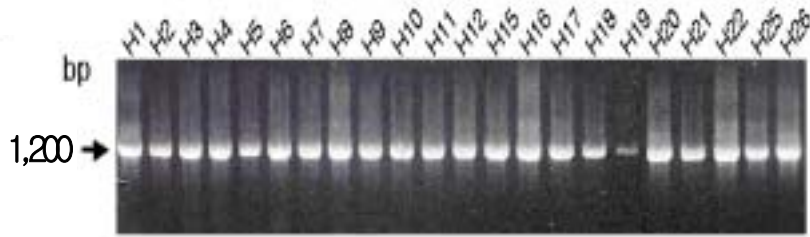


그림 1. *SLG* universal primer primer에 의해 증폭된 단일 단편의 PCR 산물.

증폭된 PCR product은 *S* haplotype의 다형성을 검사하기 위하여 *Sty* I, *Alu* I, *Msp* I, *Hinf* I, *Afa* I 등 여러 가지 제한효소로 소화하였다. 선발된 제한효소중 *Hinf* I, *Msp* I과 *Afa* I에서 다형성이 높게 나타났으며, 그중 *Hinf* I에서 가장 높은 다형성을 보였다(그림 2).

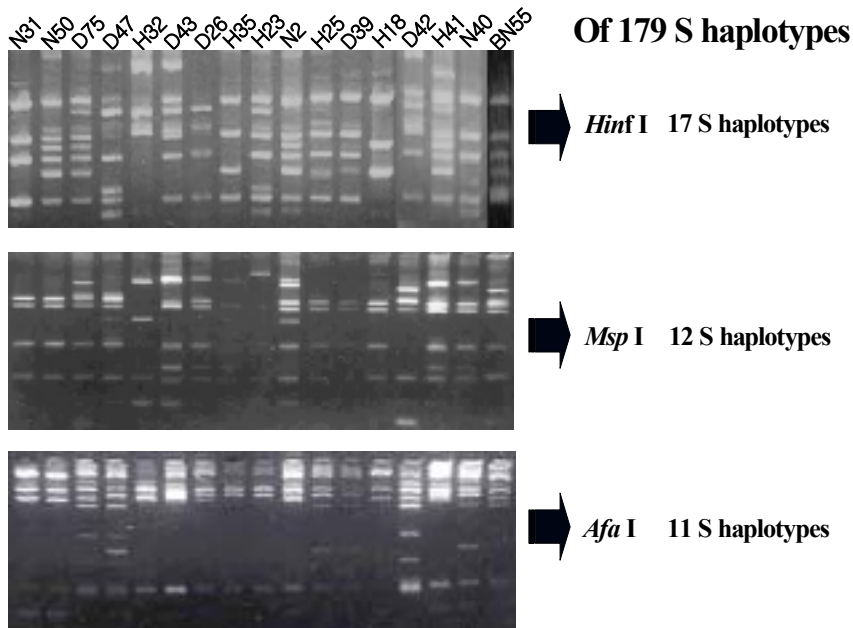


그림 2. *SLG*의 PCR-RFLP에 의한 제한효소별 동정된 *S* haplotype의 종류.

국내 3개의 종묘회사로부터 분양받은 179개 육성계통에 대한 *SLG* universal primer의 PCR-RFLP 결과, *Hinf* I의 경우 17개의 서로 다른 밴드타입이 검출되었다(그림 3).

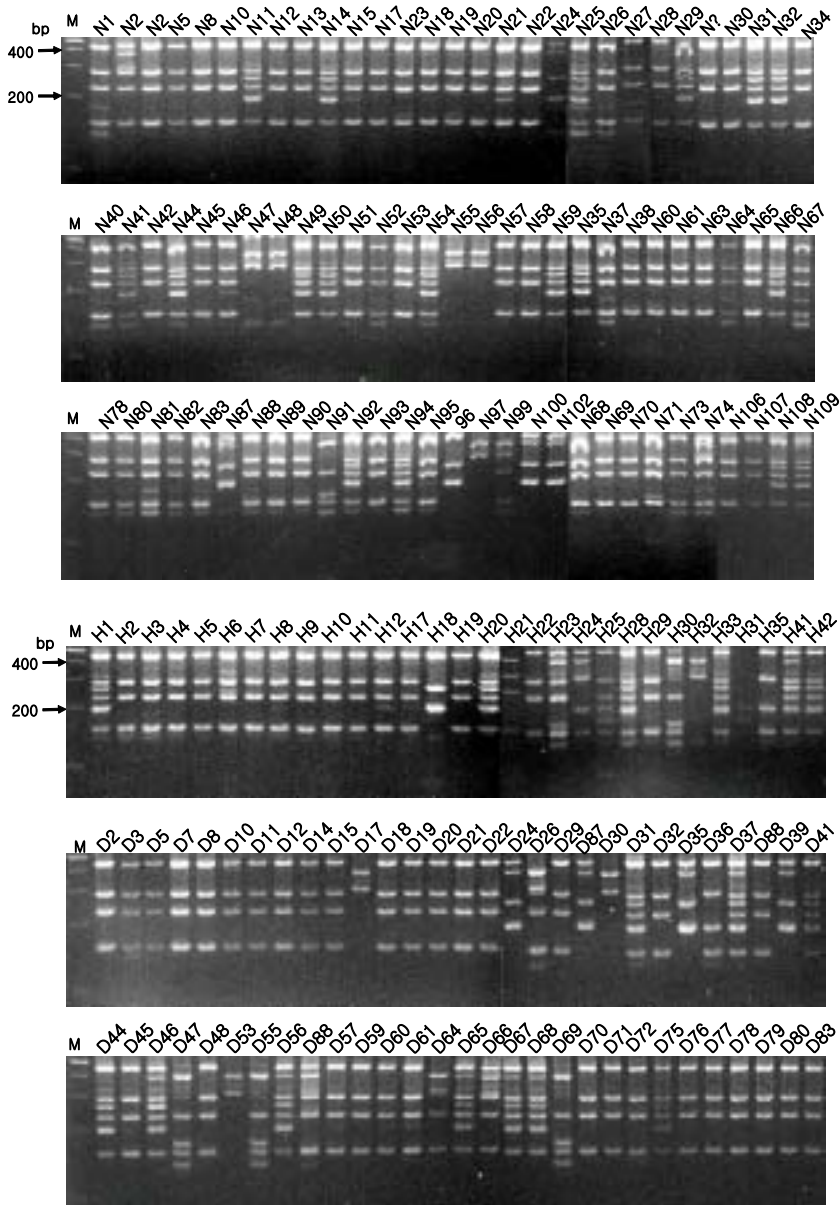


그림 3. *SLG* universal primer의 PCR 산물을 *Hinf* I 으로 소화한후 3% Metaphor agarose gel에 전기영동 한 결과 192개의 육성계통은 14개의 *S* haplotype으로 구성되어 있음.

나. 동정된 S haplotype의 출현빈도 분석

PCR-RFLP 결과, 동정된 17개의 밴드타입은 S1~S17로 명명하였으며, A회사는 12, B회사는 11 그리고 C회사는 9개의 S haplotype이 동정되었으며, S1의 출현 빈도가 높았다(표 1).

표 1. SLG universal primer를 이용한 PCR-RFLP 결과. 179 inbred line의 S haplotype 분류와 빈도

S-haplotype	A company	B company	C company
S1	N3, N8, N10, N15, N21, N22, N27, N28, N29, N31, N38, N42, N44, N45, N46, N48, N51, N52, N53, N54, N55, N56, N58, N60, N63, N64, N67, N68, N69, N70, N71, N73, N88, N89, N90, N93, N106, N107, N112, N113, N114, N115, N116, N117	D2, D3, D5, D7, D8, D10, D11, D12, D14, D15, D17, D18, D19, D20, D21, D22, D29, D32, D45, D48, D58, D59, D60, D70, D71, D72, D76, D77, D78, D79, D80, D82, D83	H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H17, H19, H22, H29, H44, H45
S2	N1, N17, N26, N30, N34, N37, N40, N98, N100, N101, N104, N119		
S3	N5, N13, N14, N18, N24, N25, N32, N35, N47, N50, N61, N65, N66, N92, N94, N108, N118	D31, D41, D44, D85,	H1, H20, H28, H33, H42, H46
S4	N110	D37, D56, D65, D67, D68, D75	
S5	N91	D47, D55, D69	H30
S6	N11, N12, N19, N20, N97	D30, D53	H32
S7	N41, N59, N74	D42, D43, D66, D89	H24
S8	N99	D26, D64	
S9		D88	H35
S10			H23
S11	N2		
S12			H25
S13	N87, N102	D35, D87	
S14	N96		H18
S15		D84	
S16		D41	
S17	BN55		

3. 고찰

무의 대부분은 자가불화합성 체계를 이용하여 F₁ 잡종 종자를 생산하기 때문에, 육성계통의 S haplotype의 동정은 육종에 절실히 요구되고 있음에도 불구하고, 기존에 사용되고 있는 방법은 개화기까지 작물재배에 시간과 노력이 많이 소모되는 단점과 환경요인과 식물 생리상태에 따라 자가불화합성 현상이 불안정하며, 또한 양친의 개화기를 맞추어야 하는 문제점들이 있다. 최근 SLG, SRK-specific primer 조합을 이용하여 SLG, SRK allele를 PCR에 의해 증폭하고, 증폭된 PCR 산물을 한 개 또는 그 이상의 restriction endonucleases로 소화한 후 전기영동 하여 분석하는 방법들이 연구되고 있다. 현재 S haplotype의 동정은 양배추류(*B. oleracea*)에서 50개(Ockendon 1974), 배추(*B. campestris*)에서 30개(Nou et al. 1993), 무(*R. sativus*)에서 18개 이상(Sakamoto et al. 1998)이 동정되었다.

국내 3개 종묘회사에서 시판의 F₁ 채종에 이용되고 있는 무의 179개 육성계통에 있어서 유묘기에 신속, 정확하게 S haplotype를 동정하여 육종연한과 노동력을 절약할 수 있는 분자적 방법을 개발하였다. 먼저, 주두측 자가불화합성 유전자인 SLG를 이용하였으며, 증폭을 위한 primer 합성은 SLG와 높은 상동성을 보이고 있는 SRK의 S-domain, SLR1과 SLR2는 증폭되지 않고, 순수한 SLG만을 증폭할 수 있는 primer를 합성하였다. 합성된 SLG universal primer(LUF+LUR)는 공시한 모든 육성계통에서 PCR 증폭결과, 1,200bp의 단일단편이 증폭되었다.

SLG universal primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물은 *Hinf* I으로 소화하여 밴드패턴을 분석한 결과, 가장 많은 다양성이 검출되었으며 공시한 육성계통은 17개의 S haplotype으로 구성되어있었다. A회사는 12, B회사는 11 그리고 C회사는 9개의 S haplotype이 동정되었으며, S1(53%), S2(6.7%)와 S3(15%)에서 출현빈도가 높게 나타났다. 양배추, 브로콜리, 꽃양배추 등의 *Brassica oleracea*에서는 약 60여개의 S-allele가 존재한 것으로 보고 되어있으나 재배종의 케일(var. *acephala*)을 구성하는 S-allele는 대부분이 class II에 속하는 세 개의 열성유전자(S², S⁵ 및 S⁷)가 약 70%이상 차지하고 있었다. 이러한 한정된 S haplotyp의 높은 출현빈도는 육종과정에서 특정의 농업형질을 주로 선발하는 과정에서 S 유전자형이 집적되었을 가능성이 있다고 생각된다(표 2).

표 2. *SLG* universal primer에 의한 PCR-RFLP 결과 동정된 S haplotype별 출현 빈도

S- haplotype	A Co. ea(percentage)	B Co. ea(percentage)	C Co. ea(percentage)	Total ea(percentage)
S1	44(24.58)	34(18.99)	17(9.50)	95(53.07)
S2	12(6.70)	-	-	12(6.70)
S3	17(9.50)	4(2.23)	6(3.35)	27(15.08)
S4	1(0.56)	6(3.35)	-	7(3.91)
S5	1(0.56)	3(1.68)	1(0.56)	5(2.79)
S6	5(2.79)	2(1.12)	1(0.56)	8(4.47)
S7	3(1.68)	4(2.23)	1(0.56)	8(4.47)
S8	1(0.56)	2(1.12)		3(1.67)
S9	-	1(0.56)	1(0.56)	2(1.12)
S10	-	-	1(0.56)	1(0.56)
S11	1(0.56)	-	-	1(0.56)
S12	-	-	1(0.56)	1(0.56)
S13	2(1.12)	2(1.12)	-	4(2.24)
S14	1(0.56)	-	1(0.56)	2(1.12)
S15	-	1(0.56)	-	1(0.56)
S16	-	1(0.56)	-	1(0.56)
S17	1(0.56)	-	-	1(0.56)
Total (S-haplotype)	89 (12)	60 (11)	30 (9)	179 (17)

제 3 절 무 육성계통의 자가불화합성 반수형 동정 및 자가불화합성 정도와의 관계

1. 서론

고등식물에 있어서 자가불화합성(Self-incompatibility)이란 자성 및 음성기관이 정상임에도 불구하고 자가수분을 할 때 자기의 화분은 발아를 억제하거나 또는 화분관 침입을 거절하여 수정에 이르지 못하게 하는 현상이다. 피자식물의 반수이상은 진화과정에서 자식(Selfing)을 피하여 내혼약세를 방어하기 위한 수단으로 자가불화합성 기구를 발달시키고 있다.

무는 배추속 채소와 같은 포자체형 자가불화합성을 나타내며, 단일 유전자 좌(S-locus)에 의해 조절되는 S 복대립 유전자(S-allele)에 의해서 유전양식이 설명된다(Bateman 1955). 자가불화합성 유전자 좌상에서 자성측 유전자 *SLG*(S-locus glycoprotein) 및 *SRK*(S-locus receptor kinase)와 음성측 유전자 *SP11*(S-locus protein 11)/*SCR*(S-locus cysteine rich protein) 유전자가 동정되었다.

*SLG*는 분비형 당단백질로 주두표면의 유두세포에 다량으로 존재하며, 그 아미노산 상동성으로부터 우성그룹 class I과 열성그룹 class II로 분류된다(Boyes et al. 1993, Hatakeyama et al. 1998). *SLG* 대립유전자간의 상동성은 동일 class내에서 80~90%이며, class간에는 약 70%를 나타낸다. 또한 class II의 *SLG*를 갖는 S-호모접합체는 화분측의 S-allele가 열성의 표현형을 보이는 것으로 알려졌다(Nasrallah & Nasrallah 1993). *SRK*는 세포막 관통형 단백질로 *SLG*와 염기 유사성 정도가 매우 높은 세포외부로 돌출된 S domain, 막관통 부위(transmembrane domain) 및 세포내부의 serine/threonine kinase 측매부위로 이루어져 있다. S domain은 *SLG*와 90%이상의 상동성을 갖고 있다(Stein et al. 1991, Watanabe et al. 1994). *SLG* 및 *SRK*에 대한 자가불화합성과의 직접적 관계를 증명하기 위한 형질전환실험에서 *SRK*는 인식반응의 주두측 결정 유전자이며, *SLG*는 *SRK*와 화분측 결정 인자간의 인식반응을 조장하는 기능을 갖고 있다는 것이 제시되었다(Takasaki et al. 2000).

한편 *SP11/SCR*은 S 유전자좌의 *SLG* 및 *SRK*와 밀접하게 위치하고 있으며, 화분 및 약 tapetum조직에서만 발현하고 cysteine 잔기가 풍부한 저분자 단백질의

특징을 가진 것으로 나타났다. 형질전환계를 이용한 gain of function 실험 및 발현된 *SP11* 단백질을 이용한 수분실험 결과, Brassica류의 자가불화합성 인식기구에 있어서 *SP11/SCR*은 화분측 결정인자로 확인되었다(Schopfer et al. 1999, Takayama et al. 2000).

무 및 배추류 등의 대부분의 주요작물은 자가불화합성 체계를 이용하여 F_1 잡종 종자를 생산하기 때문에 S haplotype의 동정은 육종과정에 있어서 절실히 요구되어진다. S haplotype을 동정하기 위하여 사용되는 방법은 육성계통을 교배하여 화분관 신장을 관찰하는 화분관 검경법(Zuberi & Lewis 1981)과 결실율을 조사하는 방법 등이 있다. 이러한 방법들은 개화기까지 작물재배에 시간과 노력이 많이 소모되는 단점과 환경요인과 식물 생리상태에 따라 자가불화합성 현상이 불안정하며, 또한 양친의 개화기를 맞추어야 하는 문제점들이 있다. 지금까지 S-haplotype의 동정은 양배추류(*B. oleracea*)에서 50개(Ockendon 1974), 배추(*B. campestris*)에서 30개(Nou et al. 1993), 무(*R. sativus*)에서 18개 이상(Sakamoto et al. 1998)이 동정되었다.

최근에는 S haplotype을 동정하기 위한 유용한 기술들이 개발되었으며, 이 방법은 주두측 자가불화합성 유전자인 *SLG* 및 *SRK* 유전자를 PCR 증폭하고, 증폭된 산물을 하나 또는 그 이상의 제한효소로 소화하여 다형성을 분석하는 방법이다(Brace et al. 1993, Nishio et al. 1994, 1996, 1997, Sakamoto et al. 1998, Sakamoto & Nishio 2001, Lim et al. 2002).

본 연구에서는 시판의 F_1 채종에 이용되는 무의 육성계통을 이용하여 S-haplotype을 동정하고, 개개의 계통에 대한 1 헵립의 자가결실율을 조사하여 동정된 S 대립유전자와 자가불화합성 정도의 관련성을 조사하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 공시재료

국내 민간 종묘회사의 F_1 생산에 이용되고 있는 3 계통군(알타리계, 국내 가을무계, 일본 궁중무계)의 88 육성계통을 이용하였다. 각 계통으로부터 CTAB법에 의해 Genomic DNA를 추출하였으며(Doyle & Doyle, 1990), 본엽 2~3매 전개시에 13°C, 4주간의 저온처리를 행한 후 온실내에서 육성, 개화시켰다.

나. SLG 특이적 primer 합성 및 증폭

모든 공시재료의 SLG를 증폭하기 위한 특이적 primer는 현재까지 보고된 무의 SLG 염기서열을 비교, 분석 후 보존된 영역에서 USf(5' -TWTGTCGTCTTC RGAGTCTC-3')와 USr(5' -YTGACRTAAAGATCTTGMCC-3')을 합성하였다. PCR 증폭은 Perkin-elmer사의 PE-9700을 이용하였고, 2분간 94°C에서 pre-denaturation 시킨 후, denaturation을 94°C에서 1분, annealing은 63°C에서 2분, extension은 72°C에서 3분간 30회 반응시켰다. Post-extension은 72°C에서 5분간 수행하였다. PCR 증폭 반응용액은 10 x reaction buffer(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, PH 8.3, 15mM MgCl₂) 2.5 μ l, 2.5mM dNTP 2 μ l, Genomic DNA 50ng, 100pM Primer 0.1 μ l, 0.5unit *Taq* polymerase 0.25 μ l(TaKaRa, Japan) 및 멸균수를 이용하여 Total Vol. 25 μ l로 조성되었다.

다. 증폭 DNA 단편의 RFLP 분석

증폭된 PCR산물을 다형성 분석에 적합한 *Hinf* I과 *Msp* I으로 소화하였다(인용). 그 반응조건으로 1.5 μ l의 10 \times buffer (750mM KCl, 150mM tris-HCl, pH 7.5, 92.5mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol)를 첨가하고 PCR산물 7 μ l, restriction endonuclease 2.5units를 첨가한 후 최종 volume을 15 μ l로 하였다. 반응액은 37°C에서 10시간 incubation시킨 후 1X TBE buffer를 함유하고 있는 2.5% Metaphor agarose(BMA, USA) gel에서 100V에서 2시간동안 전기영동으로 분획한 후 UV trans-illuminator상에서 촬영하였다.

라. 수분방법 및 결실 협립수 조사

무의 꽃은 개화 후 2일까지는 화방이 이탈하지 않고 방화곤충을 유인하여, 수분되는 가능성이 있기 때문에 자가불화합성 정도는 인공교배에 의해 개화 당일, 개화 익일, 그리고 개화 후 2일째의 노화한 꽃을 자가 수분시켜 약 1개월 후에 결실 협립수를 조사하였고, 교배화수 당의 결실 협립수를 조사하였다. 또한, 1 협립당 종자수는 너수분에 의해 얻어진 결실협립수당의 결실 종자립수의 수치로 계산되었다.

3. 연구결과

가. 자가불화합성의 유전자형 동정

무 S-호모접합체의 알타리계 30계통, 국내 가을무계 29계통, 일본 궁중무계 29계통, 합계 88 육성계통의 게놈 DNA를 이용하여 *SLG* 특이적 primer(USf + USr)로 PCR 증폭한 결과 모든 공시계통에서 약 1,300 bp의 단일단편이 증폭되었다. 증폭된 산물을 *Hinf* I과 *Msp* I 으로 소화한 결과 모두 11종류($S^1 \sim S^{11}$)의 다형성을 보였다(그림 1, 2). 즉, 3개의 계통군내에는 11 S-haplotype이 존재하였으며, 알타리계는 7개, 국내 가을무계는 8개 및 일본 궁중무계는 5개의 S 대립유전자로 구성되어 있었다. 무의 S 대립유전자는 Nikura & Matsuura (2001)에 의한 인공교배 및 PCR-RFLP 분석을 통해 일본의 18 품종군과 국외 5 품종군으로부터 37 종류가 동정되었으나, 공시한 육성계통 중 약 30%가 *SLG* 특이적 primer에 의해 PCR산물이 증폭되지 않았다. Lim et al.(2002)은 국내 무 24 육성계통을 소재로 *SLG* 및 *SRK* 특이적 primer를 이용하여 PCR-RFLP 분석한 결과 9종류의 S-haplotype을 동정하였다. 본 연구에 사용한 universal primer(USf +USr)는 class I 혹은 classII에 관계없이 공시한 모든 계통에서 *SLG* 단편이 증폭되었다. 육종현장에서 S-haplotype을 동정함에 있어서 universal primer는 기존의 class I, II primer보다 더 효율적으로 활용될 수 있다.

각 계통군별 동정된 S 대립유전자와 출현빈도를 표 1에 나타냈다. S 대립유전자 중 특히 출현빈도가 높았던 것은 S^7 (30.6%), S^3 (23.8%) 및 S^{11} (11.3%) 이었으며, 알타리계 계통군에 있어서 S^3 은 53.3%로 높은 출현빈도를 보였으나, 국내 가을무계 계통군에서는 10.7%로 비교적 대립유전자간 고른 분포를 보였다. 또한 국내 가을무계는 알타리계나 일본 궁중무계에서 동정되지 않았던 S^8 , S^9 , S^{10} 이 동정되었으며, 대립유전자의 변이 폭이 가장 넓었다. 특히 일본의 궁중무계 계통군은 S^7 (76.6%) 대립유전자에 출현빈도가 집중되었다. 3개의 계통군에 있어서 공통된 S 대립유전자는 S^3 , S^7 이었으며, 이들은 동일 계통군내에서 출현빈도도 높게 나타났다. 양배추, 브로콜리, 꽃양배추 등의 *Brassica oleracea*에서는 약 60여개의 S-allele가 존재한다고 알려져 있다. 그러나 재배종의 케일(var. acephala)을 구성하는 S-allele는 대부분이 class II에 속하는 세 개의 열성유전자(S^2 , S^5 및 S^7)가 약 70%이상 차지하고 있었다(Thompson & Taylor 1966).

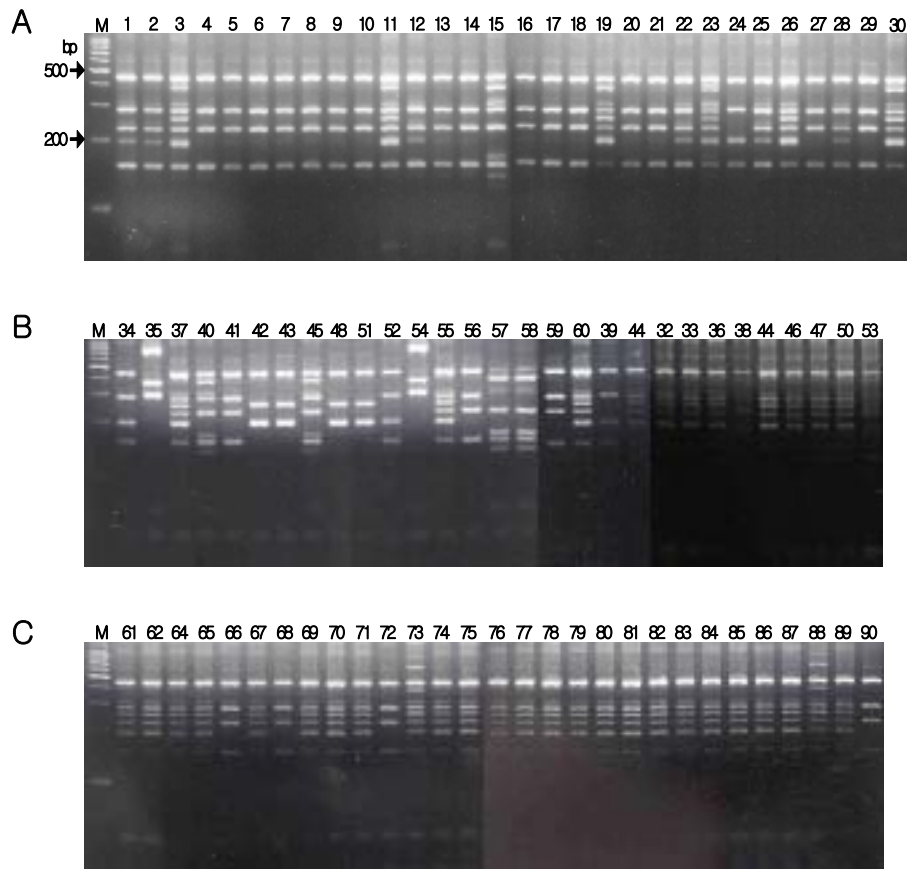


그림 1. *SLG* universal primer의 PCR 산물을 *Hinf* I 으로 소화한후 3% Metaphor agarose gel에 전기영동 한 결과. A: Altari lines, B: Domestic autumn lines, C: Japanese varietal(miyashige) lines.

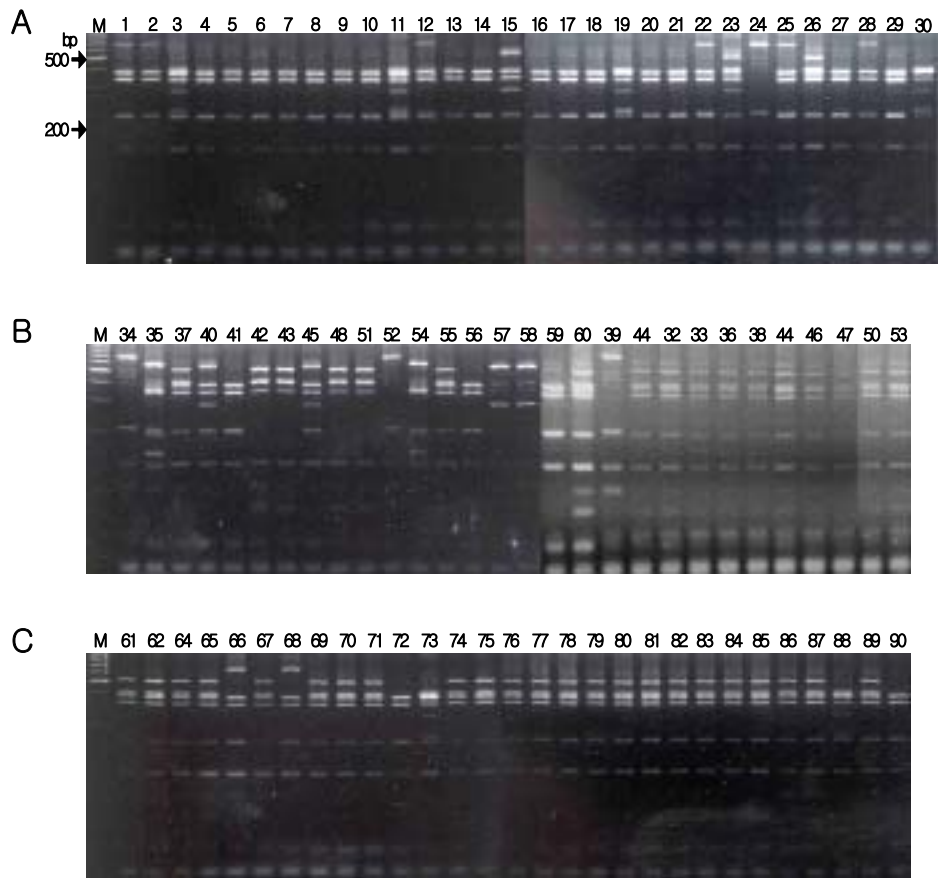


그림 2. *SLG* universal primer의 PCR 산물을 *Msp* I 으로 소화한후 3% Metaphor agarose gel에 전기영동 한 결과. A: Altari lines, B: Domestic autumn lines, C: Japanese varietal(miyashige) lines.

이러한 결과는 육종과정에서 특정의 농업형질을 주로 선발하는 과정에서 S 유전자형이 집적되었을 가능성이 있다고 생각된다.

표 1. SLG universal primer를 이용한 PCR-RFLP 결과. 88 inbred line의 S haplotype 분류와 빈도

S 유전자형	알타리계	국내 가을무계	일본 궁중무계	출현빈도 (%)
S1	1, 2, 12, 22, 25, 28		66, 68	8(9.0)
S2	3, 11, 19, 30		73, 88	6(6.8)
S3	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 27, 29	41, 56, 59	72, 90	21(23.8)
S4	15	40, 45		3(3.4)
S5	23			1(1.1)
S6	24	34, 52, 39		4(4.5)
S7	26	37, 55, 60	61, 62, 64, 65, 67, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89	27(30.6)
S8		35, 54		2(2.2)
S9		42, 43, 48, 51		4(4.5)
S10		57, 58		2(2.2)
S11		31, 32, 33, 36, 38, 44, 46, 50, 53	63	10(11.3)
공시계통 수	30	28	30	88(100)

나. 자가불화합성의 정도 분석

자가불화합성 정도는 뇌수분한 교배화수 당의 결실 험립수(이하 자가 결실율이라 함)로 평가하였다. 개개의 공시계통에 있어서의 자가 결실율을 그림 3에 나타냈다. 자가 결실율은 최저 0%(32계통)로부터 최고 국내 가을무계 계통군의 4.3%까지 분포하였다. 각 계통군내에서 자가 결실율의 변이가 비교적 크게 나타났으나, 평균 자가 결실율은 알타리 계통군은 1.17%, 국내 가을무 계통군은 0.50%, 일본 궁중무 계통군은 0.17%로 국내 가을무와 일본 궁중무 계통군은 비교적 낮은 수치

를 보였다. Duncan 다중검정결과 알타리 계통군과 국내 가을무 계통군간에는 유의차가 인정되었으나, 가을무 계통군과 일본 궁중무 계통군간에는 유의차가 인정되지 않았다. 즉, 각 계통군에 있어서 자가불화합성 정도는 일본 궁중무계가 가장 높게 나타났다. 일본 궁중무계의 자가 결실율이 낮은 원인은 자가불화합성이 높은 일본 지방 품종인 '宮重'(Miyashige)를 중심으로 육성되었기 때문이라고 생각되었다. 또한 상기의 PCR-RFLP결과 일본 궁중무계는 S 대립유전자수도 다른 계보다 작게 나타났고, 29계통중 76.6%가 S⁷에 집중되었던 점도 결실율이 낮은 원인을 뒷받침한다고 생각된다.

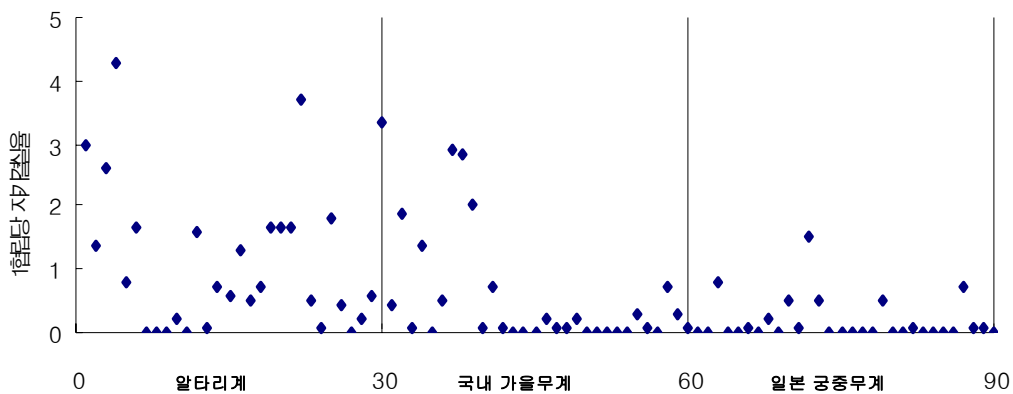


그림 3. 공시 계통군별 1협립당 자가결실율 분포.

동정된 S 대립유전자와 1 협립당 종자수의 관계를 조사하였다. 협립당 종자수는 알타리 계통군의 S¹을 가진 6계통에서 평균 1.97립으로 가장 높았으나, 동일 S¹ 대립유전자의 일본 궁중무 계통군은 0.15립으로 계통군간 1협립당 종자수는 상당한 차이가 있었다. 3 계통군에 있어서 공통된 S 대립유전자인 S³와 S⁷은 출현빈도도 높고 1 협립당 종자수도 각각 0.80립 및 0.26립으로 비교적 작게 나타났다. 즉 계통군간 자가 결실율은 대체로 5% 이내에서 유의성이 있었으나, S 대립유전자와 1 협립당 종자수에 의해 평가된 자가불화합성 정도와의 관련성은 발견할 수 없었다(표 2).

표 2. S 대립유전자별 자식결실율 비교

S 대립유전자	공시계통수	자식결실율(%)		
		최소	최대	평균
S1	8	0.1	3.7	1.50
S2	6	0	3.3	1.36
S3	21	0	4.3	0.80
S4	3	0.1	0.7	0.46
S5	1	0.5	0.5	0.50
S6	3	0	1.4	0.50
S7	29	0	2.9	0.26
S8	2	0	0	0
S9	4	0	0.1	0.05
S10	2	0	0.7	0.35
S11	10	0	2.8	0.67

자가불화합성 정도의 유전적 변이를 S 대립유전자와의 관계로 해석하는 연구는 Ruffio et al. (1997)이 *B. oleracea*를 이용하여 보고한 예가 있으며, 본 실험의 결과와 같이 유의성이 없다고 하였다. 배추속 식물에 있어서 자가불화합성 정도를 약하게 하는 예로서는 S 유전자가 직접 관여하는 경우(Goring et al. 1993, Tantikanjana et al. 1993)와 S 유전자 이외의 요인에 의한 경우(Ikeda et al. 1997)가 이미 보고 되어있다. 본 연구에서 동정된 S 대립유전자는 비교적 자가불화합성 정도가 강한 것들이어서 후자의 예에 해당하는 가능성이 있다. 즉 자가불화합성 정도를 강하게 하는 유전자가 S 대립유전자와는 독립적으로 존재할 가능성이 있다. 그러나 현재의 결과는 S 대립유전자의 종류에 의하지 않고, 계통군 육성에 있어서 자가불화합성 정도를 강하게 하는 선발이 진행되었음을 시사한다.

또한, 자가불화합성 정도가 약한 몇 개의 알타리 계통군의 S 대립유전자는 채종 종자의 F₁ 순도 저하에 연결되기 때문에 기본적으로 F₁ 품종의 양친에 해당하는 원종 계통에 이용될 가능성이 낮다는 것을 알 수 있었다. 한편 대부분의 S 대립유전자의 자가 결실율은 3% 이하로 자가불화합성 정도가 강한 계통이므로 시판 F₁ 품종의 채종에 이용 가능성이 높은 계통이라고도 말할 수 있다.

4. 고찰

본 연구에서는 무 육성계통(알타리계 30계통, 국내 가을무계 29계통, 일본 궁중무계 29계통), 합계 88 계통을 공시하여 *SLG* 특이적 primer로 PCR-RFLP 분석을 하여 *S*-haplotype을 동정하였고, 1 헥립당의 자가 결실율을 조사하여 동정된 *S* 대립유전자와 자가불화합성 정도와의 관련성을 검토하였다.

1. *SLG* universal primer에 의해 증폭된 산물을 *Hinf* I과 *Msp* I 으로 소화한 결과 공시한 88 육성계통은 11종류의 *S* 대립유전자로 분류되었으며, S^7 (30.6%), S^3 (23.8%), S^{11} (11.3%) 순으로 출현빈도가 높았다.
2. 모든 계통군에 존재하는 공통 *S* 대립유전자는 S^3 , S^7 이었으며, S^3 는 알타리계통군에서 53.3%로 높은 출현빈도를 보였으나 국내 가을무계 계통군에서는 10.7%로 다른 대립유전자의 빈도와 유사하였다. 특히 S^7 은 일본의 궁중무계 계통군에서 76.6%로 집중된 출현빈도를 보였다.
3. 자가불화합성 정도의 지표가 되는 각 계통에 대한 자가 결실율을 조사한 결과, 알타리계는 1.17%, 국내 가을무계는 0.50%, 일본 궁중무계 계통군은 0.17%로 최저 0%(32계통)에서부터 4.3%까지 나타났다.
4. *S* 대립유전자별 1 헥립당 종자수는 알타리계의 S^1 에서 1.97립으로 자가 결실율이 가장 높았으나 동일 *S* 대립유전자 내에서도 계통간 자가 결실율은 유의성이 없었다.

이상의 결과로부터 *S* 대립유전자와 자가불화합성 정도와의 관련성은 인정되지 않음을 알 수 있었으며, 자가불화합성의 강, 약 활력에 관여하는 다른 요인이 존재하는 것이 예상되었다.

제 4 절 *SRK*의 PCR-RFLP 및 DNA 염기서열 결정에 의한 무 육성계통의 *S* haplotype 동정

1. 서론

많은 개화 식물들은 자가 수정을 타가 수정으로 전환하기 위하여 다양한 방법으로 진화되었으며 자가불화합성 현상은 그 중 한 예이다. 자가불화합성이란 어떤 식물체의 암술에 자신의 화분 혹은 유전적으로 매우 가까운 식물체의 화분이 수분되었을 때 암술이 화분의 발아 또는 침입을 거부하여 수정을 이룰 수 없는 현상이다. 이 현상은 유전적으로 조절되는데 대부분의 작물에 있어서 *S* 좌위라고 하는 한 개의 유전적 좌위에 의해서 결정된다(Hinata K and Nishio T, 1978; Isogai et al., 1987). 자가불화합성 현상에 관한 유전학적, 생리학적 연구는 금세기 초부터 시작되었으며 현재 가장 많이 연구되는 종류는 배추체형 자가불화합성과 포자체형 자가불화합성으로 대별되어 연구가 진행중이다. 대부분의 배추과 작물은 포자체형 자가불화합성 체계를 가지고 있으며 이 체계는 단일 *S* 좌위에 의해 조절되는 *S* 복대립 유전자에 의하여 설명되어진다. 주두측 자가불화합성 인식반응에 관여하는 *S*-locus glycoprotein(*SLG*) 유전자와 *S*-locus receptor kinase(*SRK*) 유전자가 알려져 있으며 이들에 관한 연구가 다수 보고되었다(Chen CH et al., 1983; Dwyer KG et al., 1991; Watanabe M et al., 1994). 배추과 작물의 F_1 잡종은 자가불화합성을 이용하여 생산하기 때문에 교배조합의 *S* haplotype 동정이 요구된다. 현재까지 *Brassica oleracea*에서 60 개체 이상의 *S* haplotype이 동정되었으며(Ockendon DJ, 1974), *Brassica campestris*에서 30 개체 이상의 *S* haplotype이 동정되었다(Nou IS et al., 1993). *S* haplotype은 *SLG* 핵산 서열의 상동성 으로부터 class I과 class II의 두 가지 그룹으로 나뉘어지며, 이중 class I은 화분에 있어서 우성 *S* haplotype이고, class II는 화분에 있어서 열성 *S*-haplotype이다(Nasrallah JB and Nasrallah ME, 1984). 반면에 *S* 유전자 좌에 연쇄되어 있지 않지만 주두의 유두세포에 발현하고 있으며, *SLG*의 발현기관과 특이성이 같은 유전자인 *S*-locus related gene(*SLR1*과 *SLR2*)가 cloning되어 *SLG*와 높은 상동성을 보이고 있다(Nasrallah ME, 1989; Watanabe M et al., 1992). *SRK*는 *S* haplotype에 따라 다양한 물리적 구조를 가지며, 이 유전자는 *S* domain과 transmembrane domain

그리고 kinase domain으로 구성되어 있다(Stein JC et al., 1991).

현재 자가불화합성 인자 구별에 사용되는 방법에는 교배 후 화분관 신장을 관찰하는 화분관 검경법과 교배 후 결실율을 조사하는 방법이 있다. 이러한 방법들은 개화기까지 작물재배에 시간과 노력이 많이 소모되는 단점과 환경요인과 식물 생리상태에 따라 자가불화합성 현상이 불안정하며, 또한 양친의 개화기를 맞추어야 하는 문제점들이 있다. 최근 PCR-RFLP에 의하여 *SLG S* haplotype을 동정하는 방법이 개발되었으며(Brace J et al., 1994; Niikura and Matsuura, 2001; Nishio T et al., 1994), 이것은 *SLG*의 특이적 primer를 이용하여 PCR-RFLP 분석을 하는 방법이다.

본 연구에서는 시판의 F_1 채종에 이용되는 무의 육성계통에 대하여 class I과 class II를 정확히 분류할 수 있는 primer를 합성하고, PCR-RFLP를 통해 *S* haplotype의 동정에 알맞은 제한효소를 선발를 통하여 유묘기에 신속, 정확히 동정할 수 있는 방법을 개발하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 공시재료 및 DNA추출

시판의 무의 F_1 채종에 사용되고 있는 178개 육성계통 공시재료로 사용하였다. Geomic DNA 추출은 유묘기의 어린 엽으로부터 Rogers and Bendich(1985)에 의한 방법을 변형하여 사용하였다. 실험재료의 어린 엽(1 g)은 막자사발과 액체질소를 이용하여 분쇄 후 추출용액[100mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 20% SDS, 14 mM 2-mercaptoethanol]을 넣고 균질화하여 65°C에서 20분간 방치하였다. 추출 용액은 phenol, chloroform, PrepMate™정제 Kit(Bioneer, USA)에 의해 정제하였다. 정제한 후 isopropanol 1 ml와 3M Na-acetate 0.1 ml를 넣어 혼합하여 원심분리기로 침전하였으며, 상등액을 버리고 건조시킨 다음 TE용액[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA] 0.5 ml를 넣고 잘 녹였다. 0.01% RNase 용액 10 ul 넣고 37°C에서 2 hr 처리하였다. 추출된 DNA 농도는 겔 전기영동법과 분광 광도계를 사용하여 정량하였으며, 정제 DNA는 -20°C에 보관하였다.

나. SRK sepecific primer 합성

SRK 유전자만을 증폭시키며, Class I 과 Class II를 구별할 수 있는 *SRK*

specific primer를 Kinase domain영역에서 합성하였다. KSII와 KAII 조합은 class II 자가불화합성 유전자군에 속하는 S^{2-b} , S^5 , S^{15} SRK(GenBank Acc. no. AB024416, Y18259, Y18260; *Brassica oleracea*)의 DNA 염기에 기초하여 합성되었다. Forward primer인 KSII의 염기는 SRK의 4번째 exon영역에서 합성되었으며, Reverse primer인 KAII의 염기는 7번째 exon의 stop 코돈이 포함되게 합성되었다. 반면에, KSI와 KAII 조합은 class I 자가불화합성 유전자군에 속하는 S^3 , S^6 , S^{13-b} , S^{18} , S^{22} , S^{23} , S^{46} SRK(GenBank Acc. no. X79432, M76647, AB024422, AB032473, AB054061, AB013720, AB013718; *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*)의 여러 DNA 염기에 기초하여 합성되었다. Forward primer인 KSI의 염기는 SRK의 5번째 exon영역에서 합성되었으며, Reverse primer인 KAII의 염기는 7번째 exon의 stop 코돈이 포함되게 합성되었다(그림 1).

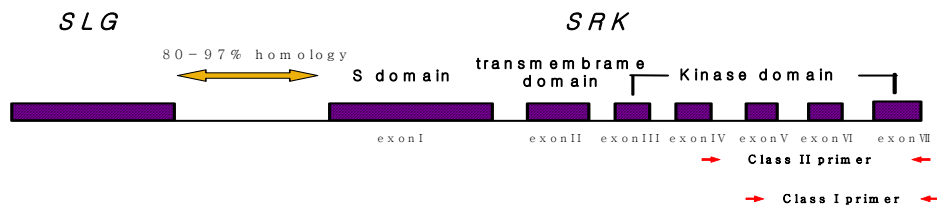


그림 1. Class I과 II를 구분할 수 있는 SRK specific primer 합성 위치.

다. SRK 유전자의 PCR-RFLP 분석

PCR 증폭은 Perkin-elmer사의 PE-9700(Perkin-Elmer, CA, USA)을 이용하였고, 2분간 94°C에서 pre-denaturation 시킨후 denaturation을 93°C에서 1분, annealing은 60°C에서 2분, extension은 72°C에서 3분간 30회 반응시켰다. PCR 증폭반응은 25 μ l 반응액으로 2.5 μ l의 10 \times buffer(조성: 500mM KCl, 100mM TRis-HCl pH 8.3, 15mM MgCl₂, 0.01% gelatin)를 첨가하고 genomic DNA 2.5 μ l(약 50ng), primer 100pM, dNTP 2.5mM 그리고 Taq polymerase 1 unit를 첨가하였다. 반응액은 1.0% agarose gel 전기영동으로 분리 후 UV transilluminator상에서 확인하였다. 증폭된 PCR산물을 제한효소인 *Hinf* I, *EcoR* I, *Alu* I, *Afa* I *Sty* I. *Hae* III 등의 제한 효소로 소화하였다. 그 반응조건으로 1.5 μ l의 10 \times buffer(750mM KCl, 150mM tris-HCl, pH 7.5, 92.5mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol)를 첨가하고 PCR 산물 7 μ l, restriction endonuclease 2.5units, 을 더한 다음 최종 volume을 15 μ l로 하였다. 반응액은 37°C에서 10시간 incubation시킨 후 1X TBE buffer를 함유하고

있는 2% Metaphor agarose gel(BMA, USA)에서 100V에서 1시간동안 전기영동으로 분리한 후 UV transilluminator상에서 확인하였다.

라. PCR 산물의 Cloning 및 염기서열 분석

Taq DNA polymerase로 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T Easy Vector(Promega USA)에 cloning하였고, cloning된 nucleotide sequence는 Auto sequencer(Applied Biosystems)에 의해 결정되었다. PCR 수행중에 발생하는 오류를 피하기 위하여 서로 다른 3개의 clone들을 sequencing하였다.

3. 연구결과

가. *SRK* kinase domain의 PCR-RFLP 분석

국내 3개 종묘회사에서 육성된 F₁ 품종 생산에 이용되고 있는 178개의 육성계통에 대하여 *SRK* 유전자만 증폭시키며, PCR 단계에서 class I과 class II를 구분할 수 있는 primer를 합성하고, S haplotype의 동정에 적합한 제한효소를 선발하였다. 공시 계통에 대한 PCR 결과, class I S haplotype의 증폭을 위해 합성한 KSI과 KAI에서 12개의 육성계통에서 약 900 bp의 단일단편 증폭 산물을 얻을 수 있었다. 또한 class II S haplotype의 증폭을 위한 primer인 KSII와 KAII에서는 class I에서 증폭되지 않은 나머지 166개의 육성계통에서 약 1,050 bp의 단일단편이 증폭되었다(그림 2). 이상의 PCR 결과로부터 공시한 육성계통은 두 조합의 primer에 의해서 class I과 class II의 두 그룹으로 분류가 가능하였으며, F₁ 품종 생산에 이용되고 있는 국내 육성계통은 대부분 열성 자가불화합성인 class II에 속한 것을 알 수 있었다.

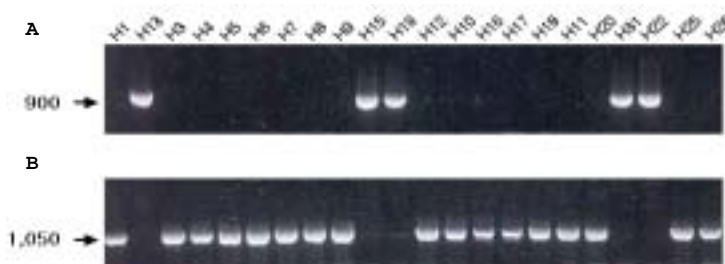


그림 2. *SRK* 우성(class I, A) 및 열성(class II, B) 특이적인 primer에 의해 증폭된 PCR 산물.

SRK 특이적인 class I과 class II primer에 의해 증폭된 PCR 산물은 *Hinf* I, *Alu* I, *Hinf* I+*EcoR* II 그리고 *Afa* I과 같은 제한효소를 사용하여 분석하였다. Class I *SRK* specific primer에 의해 증폭된 산물은 *Hinf* I+*EcoR* II로 이중소화하였을 때 가장 높은 다형성을 보였으며, 12개 육성계통의 4개의 서로 다른 밴드 패턴을 나타냈다(그림 3). 이는 육성계통 중 class I *S* haplotype의 12개 육성계통은 4개의 서로 다른 haplotype으로 구성되어있음을 알게 되었다($S^a \sim S^d$).

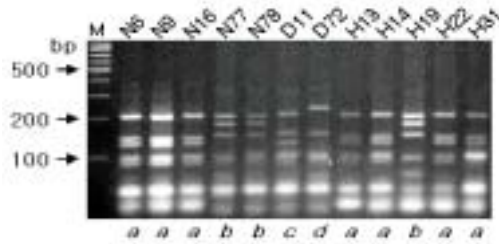


그림 3. Class I *SRK* specific primer에 의해 증폭된 PCR 산물의 RFLP 결과. 12개의 육성계통에서 증폭된 산물을 *Hinf* I+*EcoR* II 이중소화시켜 2% Metaphor agarose gel에 전기영동한 결과 4개의 *S* haplotype으로 분류됨을 알 수 있음($a \sim d$).

Class I *SRK* specific primer에 의해 증폭되지 않은 나머지 계통들은 Class II *SRK* specific primer에 의해서 증폭되었으며 *Hinf* I으로 소화한 결과, 6개의 밴드 패턴이 동정되었다(그림 4). 즉, class II의 육성계통은 6개의 *S* haplotype으로 구성되어 있음을 알게 되었다($S^e \sim S^j$).

이상의 *SRK*-specific primer를 이용한 PCR-RFLP 결과 PCR 단계에서 class I과 class II의 분류가 가능하였으며, 국내 육성계통의 *S* 호모 178계통은 우성 class I의 4개 *S* haplotype과 class II의 6개 *S* haplotype으로 구성 되어있었다.

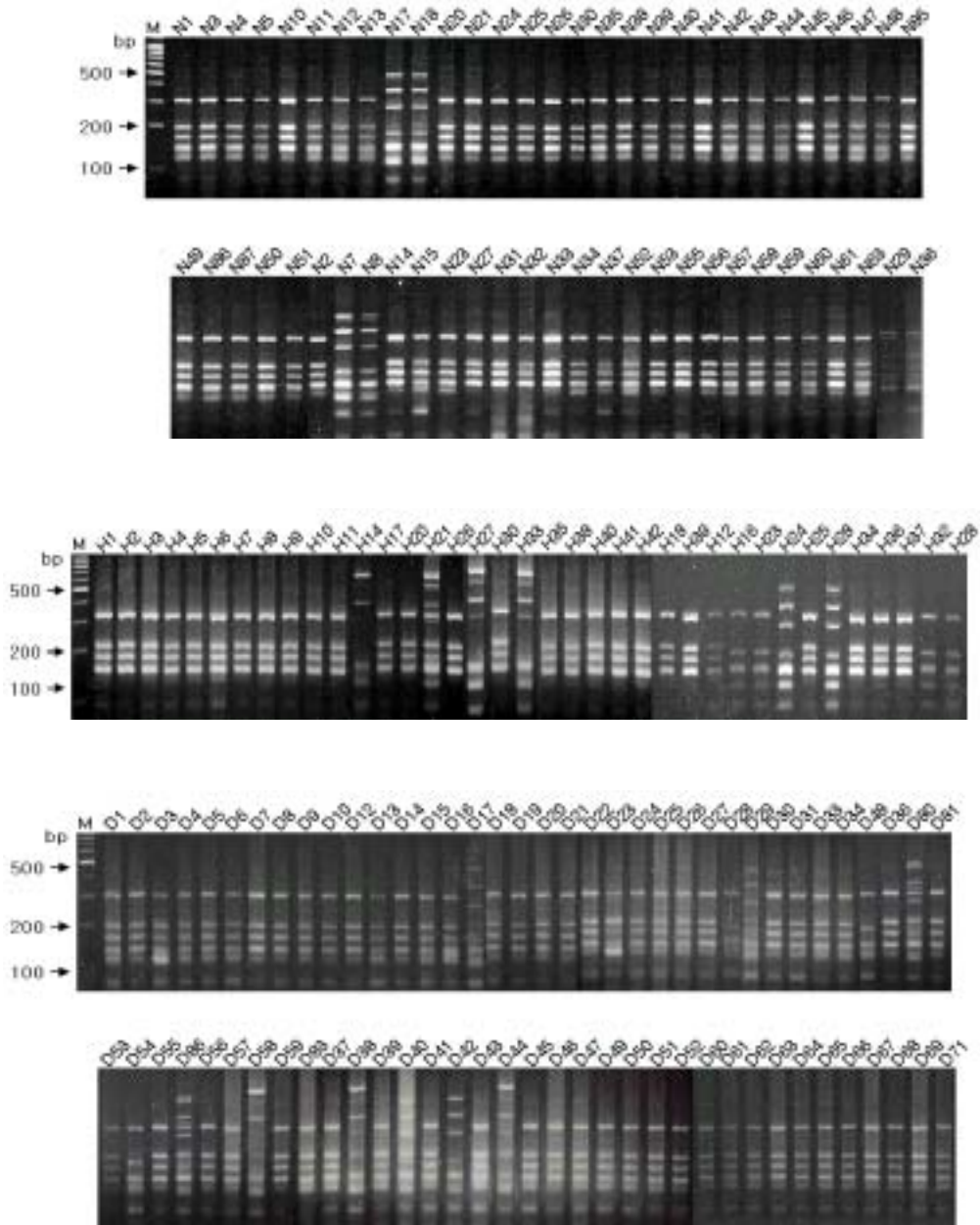


그림 4. Class II *SRK* specific primer에 의해 증폭된 PCR 산물의 RFLP 결과. 166개 육성계통에서 증폭된 산물을 *Hinf* I으로 소화시켜 2% Metaphor agarose gel에 전기 영동한 결과 6개의 *S* haplotype으로 분류됨을 알 수 있음.

178개의 육성계통 중 class I과 class II의 비율은 class II가 93%의 높은 빈도로 나타났으며, class I은 6.7%를 차지하고 있었다. Class I S haplotype중 S^a가 58%를 차지하고 있으며, class II는 S^e haplotype이 81%의 높은 빈도를 보였다(표 1).

표 1. *SRK* specific primer를 이용한 PCR-RFLP 결과. 178 inbred line의 S haplotype 분류와 빈도

Class	S 유전자형	출현빈도(%)	육성계통
class I	S ^a	7(3.9)	N6, N9, N16, H13, H14, H22, H31
	S ^b	3(1.6)	N77, N78, H19
	S ^c	1(0.6)	D11
	S ^d	1(0.6)	D72
class II	S ^e	145(81.5)	N1, N3, N4, N5, N10, N11, N12, N13, N20, N21, N24, N25, N26, N30, N35, N38, N39, N40, N41, N42, N43, N44, N45, N46, N47, N48, N85, N49, N86, N87, N50, N51, N2, N14, N15, N23, N27, N31, N32, N33, N34, N37, N52, N53, N55, N56, N57, N58, N59, N60, N61, N63, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H17, H20, H26, H30, H35, H38, H40, H41, H42, H18, H39, H12, H16, H23, H25, H34, H36, H37, H32, H28, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D12, D13, D14, D15, D16, D18, D19, D20, D21, D22, D23, D24, D25, D26, D27, D28, D30, D31, D33, D34, D48, D36, D81, D53, D54, D55, D56, D57, D59, D83, D37, D39, D41, D43, D45, D46, D47, D49, D50, D51, D52, D60, D61, D62, D63, D64, D65, D66, D67, D68, D69, D71
	S ^f	10(5.6)	N7, N8, N17, N18, H24, H28, D17, D29, D40, D42
	S ^g	2(1.2)	N29, N36
	S ^h	4(2.2)	H14, D58, D38, D44
	S ⁱ	3(1.6)	H21, H27, H33
	S ^j	2(1.2)	D80, D86
Total	10 S haplotypes	178(100)	

나. 염기서열 결정에 의한 S haplotype 분석

Class I에 속한 4개의 S haplotype은 intron 영역을 제외한 5번째에서 7번째 영역에서 매우 높은 상동성을 보였으며, class II는 4번째, 5번째, 6번째 그리고 7번째 exon에서는 매우 상동성이 높았지만 5번째, 6번째 intron에서는 매우 상이함을 보였다. 또한 다른 그룹의 염기서열보다는 서로 같은 그룹의 염기서열에서 더 높은 상동성을 보였다. 즉 class I 그룹에서는 86 %에서 93 %, class II 그룹에서는 91 %에서 99 %의 상동성을 보였다.

Sf(II)	GAGGGCGAGAAGATCTTAAATTTACGAGTACTTGGAGAANTCTTAGCCCTCGACTCTTATCTC
Si(II)	GAGGGCGAGAAGATCTTAAATTTACGAGTACTTGGAGAANTCTTAGCCCTCGATTCTCATCTC
Si(II)	GAGGGCGAGAAGATCTTAAATTTACGAGTACTTGGAGAANTCTAAGCCCTCGATTCTCATCTC
Se(II)	GAGGGCGAGAAGATCTTAAATTTACGAGTACTTGGAGAANTCTAAGCCCTCGATTCTCATCTC
Sh(II)	GAGGGCGAGAAGATCTTAAATTTACGAGTACTTGGAGAANTCTAAGCCCTCGATTCTCATCTC
Sa(II)	GAGGGCGAGAAGATCTTAAATTTACGAGTACTTGGAGAANTCTAAGCCCTCGATTCTCATCTC
Sd(I)	-----
Sb(I)	-----
Sc(I)	-----
Sa(I)	-----

Sf(II)	TTTGGTTAGTGCCCTCAGCACATCCGACACATTTGTTTTACAGTTGAATGTCCTTTGGAAA
Si(II)	TTTGGTTAGTGCCCTCAGCACATCCGACACATTTGTTTTACAGTTGAACGTATTTGGAAA
Si(II)	TTTGGTTAGTGCCCTCAACGCATCAGACAGATTTATTTTTATAGTTAAATGTCCTTTGGAAA
Se(II)	TTTGGTTAGTTCCCTCAACACATCAGACAGATTTATTTTTACAGTTAAATGTCCTTTGTAAA
Sh(II)	TTTGGTTAGTTCCCTCAACACCTCAGATAGATTTATTTTTACAGTTAAATGTCCTTTGTAAA
Sa(II)	TTTGGTTAGTTCCCTCAACACATCAGACAGATTTATTTTTACAGTTAAATGTCCTTTGTAAA
Sd(I)	-----
Sb(I)	-----
Sc(I)	-----
Sa(I)	-----

Sf(II)	TATGTTAATGTGATTCGTGTGTGAACAAAATGCAGATGAAACCAGAAGCCGTATGTTAAA
Si(II)	TATGTTAATGTGATTCGTGTGTGAACAAAATGCAGATGAAACCAGAAGCTGTATGTTAAA
Si(II)	TATGTTAATGTGATTCGTGTGTGAACGAAAGTGCAGATGAAACCAGAAGCTGTATGTTAAA
Se(II)	TATGTTAATGTGATTTATTTGTGAACGAGTGCAGATGAAACCAGAAGCTGTATGTTAAA
Sh(II)	TATGTTAATGTGATTTATTTGTGAACGAGTGCAGATGAAACCAGAAGCTGTATGTTAAA
Sa(II)	TATGTTAATGTGATTCATTTGTGAACGAGTGCAGATGAAACCAGAAGCTGTATGTTAAA
Sd(I)	-----
Sb(I)	-----
Sc(I)	-----
Sa(I)	-----

Sf(II)	TTGGCAAATGAGATTTGATATTATCAATGATATTGCCCGAGGACTTCTGTATCTTCACCA
Si(II)	TTGGCAAATGAGATTTGATATTATCAATGATATTGCCCGAGGACTTCTGTATCTTCACCA
Si(II)	TTGGCAAATGAGATTTGATATTATCAATGATATTGCCCGAGGGCTTCTGTATCTTCACCA
Se(II)	TTGGCAAATGAGATTTGATATTATCAACGATATTGCCCGAGGGCTTCTGTATCTTCACCA
Sh(II)	TTGGCAAATGAGATTTGATATTATCAACGATATTGCCCGAGGGCTTCTGTATCTTCACCA
Sa(II)	TTGGCAAATGAGATTTGATATTATCAACGATATTGCCCGAGGCTTCTGTATCTTCACCA
Sd(I)	-TGGAAGGAGAGATTCGACATTACCAATGATGTTGCTCGAGGGCTTTTATATCTTCATCA
Sb(I)	-TGGAAGGAGAGATTCGACATTACCAATGATGTTGCTCGAGGGCTTTTATATCTTCATCA
Sc(I)	-GGGAAGGAGAGATTCGACATTACCAATGATGTTGCTCGAGGGCTTTTATATCTTCATCA
Sa(I)	-TGGAAGGAGAGATTCGACATTACAAATGATGTTGCTCGAGGGCTTGTATATCTTCATCA

Sf(II) AGATTCACGGTTTAGAATCATTCATAGGGATTGAAAGCAAGCAATGTCTTGCTCGATAA
Si(II) AGATTCACGGTTTAGAATCATCCATAGGGATTGAAAGCAAGCAATGTCTTGCTTGATAA
Si(II) AGATTCACGGTTTAGAATCATCCATAGGGATCTGAAAGCAAGCAATGTCTTGCTTGANAA
Se(II) AGATTCACGGTTTAGAATCATCTATAGGGATTGAAAGCAAGCAATGTCTTACTTGATAA
Sh(II) AGATTCACGGTTTAGAATCATCCATAGGGATTGAAAGCAAGCAATGTCTTACTTGATAA
Ss(II) AGATTCACGGTTTAGAATCATCCATAGGGTTTAAAGCAAGCAATGTCTTACTTGATAA
Sd(I) AGACTCACGGTTTCAAGATAATCCACAGAGATTGAAAGTAAGTAACATTTTGCTTGATAA
Sb(I) AGACTCACGGTTTAGGATAATCCACAGAGACTTAAAGTAAGTAACATTTTGCTTGATAA
Sc(I) AGACTCACGGTTTAGGATAATCCACAGAGATATGAAAGTAAGTAATATTTTGCTTGATAA
Sa(I) AGACTCCCGTTTAGGATAATCCACAGGGATATGAAAGCAGGTAAACATTTTGCTAGATAA
* * * * *

Sf(II) AGATATGACTCCAAAANTTTCAGACTTTGGAATGGCTAGGATCTTTGGACGGAAATGAGAC
Si(II) AGATATGACTCCAAAANTTTCAGACTTTGGAATGGCTAGGATCTTTGGACAGGATGAGAA
Si(II) AGACATGACTCCAAAANTTTCAGACTTCGGAATGGCTAGGATCTTTGGACGGGATGAGAC
Se(II) AAATATGACACCAAAGATCTCGGATTTCCGGATGGCAAGGATCTTTGGAGGGGATGAGAC
Sh(II) AAATATGACTCCAAAAGATCTCGGATTTCCGGATGGCAAGGATATTTGGAGGGGATGAGAC
Ss(II) AAATATGACTCCAAAAGATCTCGGATTTCCGGATGGCAAGGATCTTTGGAGGGGATGAGAC
Sd(I) AAATATGACCCCAAAGATCTCGGATTTTGGGATGGCCAGGATATTTGCAAGGGAGGAGAC
Sb(I) AAATATGATCCCAAAGATCTCGGATTTTGGGATGGCCAGGATATTTGCAAGGGACGAGAC
Sc(I) AAATATGATCCCAAAGATCTCGGATTTTGGGATGGCCAGAAATCTTTGGAGGGACGAGAG
Sa(I) AAATATGATCCCAAAGATCTCGGATTTTGGGATGGCCAGAAATCTTTGCAAGGGACCAAAAC
* * * * *

Sf(II) GGAAGCTAACACGAGGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATTAAGCATC-----
Si(II) GGAAGCTGACACGAGGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATTAAGCATC-----
Si(II) GGAAGCTGACACGAGGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATTAAGCATCT-----TC
Se(II) GGAAGCTAACACGAGGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATTAATCATCA-----TC
Sh(II) GGAAGCTAACACGAGGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATTAATCATCA-----TC
Ss(II) GGAAGCTAACACGAGGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATTAATCATCA-----TC
Sd(I) CGAAGCTAACACAANTGAAGGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAATCAAAAATATCAACATC
Sb(I) CCAAGCTAGCACAAATGAAGGTGGTTGGAACCTTAGTAAGCAATCAAAAATACCAACATC
Sc(I) TGAAGCTAGCACAGGAANTGTGGTCGGAACCTTAGTAAGCAA-----
Sa(I) TGAAGCTAGCACAGATAATCCGATCGGAACCTTAGTAAGCAA-----
* * * * *

Sf(II) ATCATATTTTGAANTCAAAGAGC-----TACCTGAGTACAGAATT---AAA-CCTGATAGT
Si(II) ATCATATTTTGAACAAGAGA-----TACCTGGTACAGAATT---AAA-CCTGATAGT
Si(II) ATCATATTTTGAACAAGAGC-----TACCTGAGTACACAATT---AAA-CCTGATAGC
Se(II) ATCATATTTTGAACAATGAGC-----TGTCTGACTACGTAATT---AAAACCTGGTAGC
Sh(II) ATCATATTTTGAACAATGAGC-----TGTCTGACTACGTAATT---AAAACCTGGTAGC
Ss(II) ATCATATTTTGAACAATGAGC-----TGTCTGACTACGTAATT---AAAACCTGGTAGC
Sd(I) AGTATCTTTGAAGATACAAAGCGATATTGTCTTAACCCATAACTCTACAAAATTCATAAT
Sb(I) AGTATCTTTGAANAATACAAAGAGATATTTCTTAACCCATAACTCTACAAAATTCATAAT
Sc(I) ---GTCTTTGAAGATA-----TTTTCTAACCCATAACTCTAAGAACTCATGAGC
Sa(I) ---ATCTTTAAGATA-----TTTTCTAACCCATAACTCTATAGAACTCATGAGC
* * * * *

Sf(II) TTTTCTATTTAA--TATTTGTTATGCACTGGCTACATGTCTCCAGAANTATGCGATGAAACG
Si(II) TTTTCTATTTAA--TATTTGCTATGCACTGGCTACATGTCTCCAGAANTATGCGATGAAACG
Si(II) TTTTCTATTTAA--TATTTGTTATGCACTGGCTACATGTCTCCAGAANTATGCGATGAAACG
Se(II) TTTTCTATTTAA--TATTTGTTATGCACTGGCTACATGTCTCCAGAANTATGCGATGAAACG
Sh(II) TTTTCTATTTAA--TATTTGTTATGCACTGGCTACATGTCTCCAGAANTATGCGATGAAACG
Ss(II) TTTTCTATTTAA--TATTTGTTATGCACTGGCTACATGTCTCCAGAANTATGCGATGAAACG
Sd(I) CTTT-----TAA-TTCT---CTACTCAGCGGCTACATGTCTCCGAGTACGCAATGATG
Sb(I) CTTTAACTTTAG-TTTTTCGCTACGCACTGGCTACCTGTCCCGGAGTACGCAATGATG
Sc(I) CTCTAAGTTCAAATTTTTATTACTCAGCGGCTACATGTCTCCGAGTACGCAATGATG
Sa(I) CTCTAAGTTCAA-TTTTTGCTACTCAGCGGCTACATGTCTCCGAGTACGCAATGATG
* * * * *

Sf(II) GGACATTCTCGATGAAGTCAGATGTGTTTCAGTTTTGGGGTATTGCTTCTTGA AATTATAA
Si(II) GGACATTCTCGATGAAGTCAGATGTGTTTCAGTTTTGGGGTCTTACTTCTTGA AATTATAA
Si(II) GGACATTCTCGATGAAGTCAGATGTGTTTCAGTTTTGGGGTCTTGCTTCTTGA AATTATAA
Se(II) GGACATTCTCAATGAAGTCAGATGTGTTTCAGTTTTGGGGTCTTGCTTCTTGA AATTATAA
Sh(II) GGACATTTTCAATGAAGTCAGATGTGTTTCAGTTTTGGGGTCTTGCTTCTTGA AATTATAA
Sr(II) GGACATTCTCAATGAAGTCAGATGTGTTTCAGTTTTGGGGTCTTGCTTCTTGA AATTATAA
Sd(I) GGATATTCTCGGAAAAATCAGATGTTTTTCAGTTTTGGAGTCATAGTTCTTGA AATTATTA
Sb(I) GGATATTCTCGGAAAAATCAGATGTTTTTCAGTTTTGGAGTCATAGTTCTTGA AATTATTA
Sc(I) GGGTATTCTCGGAAAAATCAGATGTTTTTCAGTTTTGGAGTCATAGTTCTTGA AATTATTA
Sa(I) GGATACTCTCCGAAAAACAGATGTTTTTCAGTTTTGGAGTCATAGTTCTTGA AATTATTA

*** **

Sf(II) GTGGCAAGAGGAACAAAAGCTTCTGCGACACGGATAGTAATCTTAATCTTCTCGGATGTG
Si(II) GTGGCAAGAGGAAT AATGGCTTCTGCGACTCGGATAGTAATCTTAATCTTCTCGGATGTG
Si(II) GTGGCAAGAGGAACAAAGGCTTCTGCGACTCGAATAGTAATCTTAATCTTCTCGGATGTG
Se(II) GTGGCAAGAGGAAT AAAGGCTTCTGCGACTCCGATAGTAACCTTAATCTTCTCGGATGTG
Sh(II) GTGGCAAGAGGAAT AAAGGCTTCTGCGACTCGGATAGTAACCTTAATCTTCTCGGATGTG
Sr(II) GTGGCAAGAGGAAT AAAGGCTTCTGCGACTCGGATAGTAACCTTAATCTTCTCGGATGTG
Sd(I) CGGGAAAGAGAAACAGAGGATTCATAACTTGAACACGAAAAACGATCTTCTAAGCTATG
Sb(I) CTGGAAAGAGGAACAGAGTATTCTACAACCTGAGCTACGAAAGACCATCTTTAAACTATG
Sc(I) GTGGAAAAGGAGCAGAGGATTCACCAATTGAACAAACGATAACCAATCTTCTAAGCTATG
Sa(I) CTGGAAAAGGAACAGAGGATTCACCAAGTCAACCCCGGAAGCAATCTTGTATGCTATG

*** **

Sf(II) TAAGCTTGA AACCTCTTAAT--TTGATTGTGTTTGACACTCAAAACCTGACGATATCAC-
Si(II) TAAGCTTGA AACCTCTTAAT--TCGATTGTGTTTCAGGCTCAAAATCTGACGATATCAC-
Si(II) TAAGCTAAAAACCTCTTAAT--TCGATTGCGTTTCTGGCTCAAAATCTGACGATATCAC-
Se(II) TAAGCTTGA AACCTAATT--TCGATTGTGTTTCT-----ATGATATCAC-
Sh(II) TAAGCTTGA AACCTAATT--TCGATTGTGTTTCT-----ATGATATCAC-
Sr(II) TAAGCTTGA AACCTAATT--TCGATTGTGTTTCT-----ATGATATCAC-
Sd(I) TAAGTATAAGAACCAACAGT--TCGATCTTCTTTTT-----GAGATTGCTCAAAACAC-
Sb(I) TAAGTATAAGAACTAATAAT--TCGATCTGCGTTC-----GAGATTCTCAGACACA
Sc(I) TAAGTTTAAGAACCAATAATATTCGATCTGCTTTC-----GAGATTGCTAAAAACAC-
Sa(I) TAAGTTTAAGAACCAATAATATCTATCTACTCTC-----GAGATTGCCAAAAACAC-

*** **

Sf(II) TCATAAAAAA ACTGAACTTTATGCACAGGTGTGGAGGAATTGSAAGSAAAGGTCAAGGTCT
Si(II) TAAGAAAAGATCCCTACCATTATGCACAGGTGTGGAGAAATTGSAAGSAAAGGTCAAGGTCT
Si(II) TAAGAAAAGATCCGACATTTATACACAGGTGTGGAGGAATTGSAAGSAAAGGTCAAGGTCT
Se(II) TAAGAAAATATCCGAACTTTATGCACAGGTGTGGAGGAATTGSAAGSAAAGGTCAAGGTCT
Sh(II) TAAGAAAATATCCGAACTTTATGCACAGGTGTGGAGGAATTGSAAGSAAAGGTCAAGGTCT
Sr(II) TAAGAAAATATCCGAACTTTATGCACAGGTGTGGAGGAATTGSAAGSAAAGGTCAAGGTCT
Sd(I) ---TGAAT---CAT---AGATTCAGGCATGGAGTAAATTGSAAGSAAAGSAAAGAGCGCT
Sb(I) CTGTAATGSCCTTCATCCTAATAAACAGGCATGGGATAGTTGSAAGSAAAGSAAAGAGCGCT
Sc(I) -TTTAAATGATTT-ATCTTTATAAACAGGCATGGAGTCATTGSAAGSAAAGSAAAGAGCGCT
Sa(I) -TTTGAATGCTTTTATATTTATAAACAGGCATGGACTCATTGGGCCAGGSAAGAGCGCT

*** **

Sf(II) AGAGATAGTAGACAGGATCATCATAGATTCTTCATC-----ACCAACGTTCAAGGCC
Si(II) AGAGATAGTAGACAGGTCATCATAGATTCTTCATC-----ACCAACGTTCAAGGCC
Si(II) AGAGATAGTAGATAGGATCATCATAGATTCTTCATC-----ACCAACGTTCAAGGCC
Se(II) AGAGATAGTAGACAGGTCATAATAGATTCTTCATC-----ACCAACGTTCAAGGCC
Sh(II) AGAGATAGTAGACAGGTCATAATAGATTCTTCATC-----ACCAACGTTCAAGGCC
Sr(II) AGAGATAGTAGACAGGTCATAATAGATTCTTCATC-----ACCAACGTTCAAGGCC
Sd(I) AGAAATCGTAGATCCAGTAATCATAGATTCTTTTCACCCTGTCATCAACATATCAACC
Sb(I) AGAAATCGTAGATCCAAATATCGTAGATTCTTTTCACCCTGTCATCAACATATCAACC
Sc(I) AGAAATCGTAGATCCAGTATCGTAGATTCTTTTCACCCTGTCATCAACATATCAACC
Sa(I) AGAAATCGTAGATCCCGTATCGTAGATTCTTTTCACCCTGTCATCAACATATCAACC

*** **

```

Sf(II)  ACGTGAAAATCTTAAGATGCTTACAAATTGGCCTCTTGTGTGTTCAAGAACGTGTAGAGGA
Si(II)  ATGTGAAATCTTAAGATGCTTACAAATTGGTCTCTTGTGTGTTCAAGAACGTGTAGAGGA
Si(II)  ATGTGAAATCTTAAGATGCTTACAAATTGGCCTGTGTGTGTTCAAGAACGTGTAGAGGA
Se(II)  ACGTGAAAATCTTAAGATACATGCAAATTGGCCTCGTGTGTGTTCAAGAACGTGTAGAGGA
Sh(II)  ACGTGAAAATCTTAAGATGTCATGCAAGATTGGCCTCGTGTGTGTTCAAGAACGTGTAGAGGA
Sr(II)  ACGTGAAAATCTTAAGATGTCATGCAAAATTGGCCTCATGTGTGTTCAAAAACGTGTAGAGGA
Sd(I)   ACAAGAAGTCCATAAAATGCATACAAATTGGTCTCTTGTGTGTTCAAGATCTTGCAGAGAA
Sb(I)   ACTAGAAGTCCATAAAATGCATACAAATTGGTCTCTTGTGTGTTCAAGAACTTGCAGAGCA
Sc(I)   AAAAGAAGTCCATAAAATGCATACAAATTGGTCTCTTGTGTGTTCAAGAGCGTGCAGAGCA
Sa(I)   AAAAGAAGTCCATAAAATGCATACAAATTGGTCTCTTGTGTATTCAAGAACGTGCGGTGCA
      0   000 00 000 00 0 0 00 0000 00 00000 00000 0 0 00 0 0

Sf(II)  TAGACCAATGATGTGTCAGTAGTTTTGATGCTCGGAAGTGAAGCTGCATTGATTCCCTCA
Si(II)  TAGACCAATTATGTGTCAGTAGTATTGATGCTCGGTAGTGAAGCTGCATTGATTCCCTCA
Si(II)  TAGACCAATGATGTGTCAGTAGTTTTGATGCTTGGAAAGTGAAGCTGCATTGATTCCCTCA
Se(II)  TAGACCAATGATGTGTCATCACTAATTTTTGATGCTTGGTAGTGAAGCTGCATTGATTCCCTCA
Sh(II)  TAGACCAATGATGTGTCATCACTAATTTTTGATGCTTGGTAGTGAAGCTGCATTGATTCCCTCA
Sr(II)  TAGACCAATGATGTGTCATCACTAATTTTTGATGCTTGGTAGTGAAGCTGCATTGATTCCCTCA
Sd(I)   CAGACCAACCATGTGCTATTTGTGGTTTGGATGCTTGGAAATGAAGCAACAGAGATTCCCTCA
Sb(I)   CAGACCAACAATGTGCTGTCGTGTTGGATGCTTGGAAAGTGAAGTAAACAGAGATTCCCTCA
Sc(I)   CAGACCAACGATGTGTCGTGAGTTTGGATGCTTGGAAAGTGAAGCAACAGAGATTCCCTCA
Sa(I)   CAGACCAACGATGTGTCGTGAGTTTGGATGCTTGGAAAGTGAAGCAACAGAGATTCCCTCA
      0000000 00000 0 0 0 000000 0 0 0000 00 000000000

Sf(II)  ACCTAAACAGCCAGGTTATGCGTCAGCGGAAGTTCTCTTGAACCTTATTCTACTTGGAG
Si(II)  GCCTAAACAGCCAGGTTATGCGTCAGCGGAAGTTCTCTTAAAACCTTATTCTACTTGG--
Si(II)  ACCTAATCAGCCAGGTTATGCGTCAGCGGAAGTTCTCTTGAACCTTATTCTACTTGGAG
Se(II)  ACCTAAACATCCAGGTTATGCGTCAGCGGAAGTTCT-----TATTCTACTTGGAG
Sh(II)  ACCTAAACATCCAGGTTATGCGTCAGCGGAAGTTCT-----TATTCTAGTTGGAG
Sr(II)  ACCTAAACATCCAGGTTATGCGTCAGCGGAAGTTCT-----TATTCTACTTGGAG
Sd(I)   GCCTAAATGGCCAGGTTATGCGTCAGGAAGAAGTCTTACGAACCTTGATCCTTCATCAAG
Sb(I)   GCCTAAACCCAGGTTAATGCGTCCGACGAAGTTCTCATGAACCTTGATCCTTCATCAAG
Sc(I)   GCCTAAACCCAGGTTAATGCGTCCGCAAAAAGTTTTTATGCAAAATAATCCTTCCCTCAAG
Sa(I)   GCCTAAACCCAGGTTAATGCGTCCATACCAAGTTTTTATGCAAAATAATCCTTCCCTGAG
      00000 0000 0 0000 00 0000 0 0000 00 00 00

Sf(II)  TAAACGGCGTGA---CGATGAAAATTGCACAGTGAACCAAATCACCATGTGATCATTGA
Si(II)  -----CGTGA---TGATGAATTTTGCACAGTGAACCAAATCACCATGTGATCATTGA
Si(II)  TAAATGCGTGA---CGATGAAAATTGCACAGTGAACCAAATCACCATGTGATCATTGA
Se(II)  CAAACGGCCTGA---CGATGAATTTTGCACAGTGAACCAAATCACCATGTGATCATTGA
Sh(II)  CAAACGGCCTGA---CGATGAATTTTGCACAGTGAACCAAATCACCATGTGATCATTGA
Sr(II)  CAAACGGCCTGA---CGATGAATTTTGCACAGTGAACCAAATCACCATGTGATCATTGA
Sd(I)   TAGGCAGTGGACGACGATGAATCCTGGACGTTGAACCAAGTACACCTGCTCAGTCAATGSA
Sb(I)   TAGACAGTGGACGACGATCAATCCTGGACGTTGAACCAAGTACACCTGCTCAGTCAATGSA
Sc(I)   TAGGCATTGCGAAGACAATGAATCCTGGACGTTGAACCAAGTACACCTGCTCAGTCAATGSA
Sa(I)   TAGGCCATCCGACAACGATGAATCCTGGACGTTGAACCAAGTACACCTGCTCAGTCAATGSA
      00 00 00 00 0000 0 0000 00 0000 00

Sf(II)  CGCTCGGTAAATATGATAGTCTT
Si(II)  CGCTCGGTAAATATGATCGTCTT
Si(II)  CGCTCGGTAAATATGATCGTCTT
Se(II)  CGCTCGGTAAATATGATAGTCTT
Sh(II)  CGCTCGGTAAATATGATAGTCTT
Sr(II)  CGCTCGGTAAATATGATCGTCTT
Sd(I)   TGCCCGGTAAATATGATCCA----
Sb(I)   TGCCCGGTAAATATGAAAATC---
Sc(I)   TGCCCGGTAAATATGAAAATC---
Sa(I)   TGCCCGGTAAATATGAAATCC----
      00 0000000000

```

그림 5. PCR-RFLP 분석에 의해 서로 다른 10개의 S haplotype에 대한 SRK의 5 번째에서 7번째 exon까지 sequencing 결과. Class I은 900 bp, class II는 1,050 bp이며, box된 영역은 exon을 나타냄.

4. 고찰

무는 국내뿐만 아니라 아시아에서 경제적으로 중요한 채소이며, 시판되고 있는 무의 대부분은 잡종강세를 이용한 1대 잡종 품종(hybrid 품종)으로 자가불화합성을 이용해서 실용화 되어있기 때문에 S haplotype의 동정은 육종과정에 있어서 절실히 요구되어진다. S haplotype을 동정하기 위하여 사용되는 방법은 육성계통을 교배하여 화분관 신장을 관찰하거나 결실율을 조사하는 방법 등이 있으나, 이러한 방법들은 개화기까지 작물재배에 시간과 노력이 많이 소모되는 단점과 환경요인과 식물 생리상태에 따라 자가불화합성 현상이 불안정하며, 또한 양친의 개화기를 맞추어야 하는 문제점들이 있다. 최근에는 S haplotype을 동정하기 위한 유용한 기술들이 개발되었으며, 이 방법은 주두측 자가불화합성 유전자인 *SLG* 및 *SRK* 유전자를 PCR 증폭하고, 증폭된 산물을 하나 또는 그 이상의 제한효소로 소화하여 다형성을 분석하는 방법들이 개발되었다(Brace et al. 1993, Nishio et al. 1994, 1996, 1997, Sakamoto et al. 1998, Sakamoto & Nishio 2001, Lim et al. 2002). 지금까지 S-haplotype의 동정은 양배추류(*B. oleracea*)에서 50개(Ockendon 1974), 배추(*B. campestris*)에서 30개(Nou et al. 1993), 무(*R. sativus*)에서 18개 이상(Sakamoto et al. 1998)이 동정되었다.

본 연구에서는 시판의 F₁ 채종에 이용되는 무의 178 육성계통을 이용하여 S haplotype을 동정하였다. 먼저, 각 S haplotype간 가장 다형성이 높은 주두측 자가불화합성 결정 유전자인 *SRK*의 kinase domain에서 class I과 class II를 구분할 수 있는 primer를 합성하였다. *SRK*-specific class I primer를 이용한 PCR에서 12개의 육성계통에서 약 900 bp의 단일단편이 얻을 수 있었으며, 나머지 166개의 육성계통은 class II primer에서 1,050 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 이상의 PCR 단계에서 공시된 육성계통은 두 그룹으로 분류가 가능하였다. 지금까지 동정된 자가불화합성 유전자는 염기서열 상동성에 따라 크게 두 그룹(class I, classII)으로 분류된다. Class I의 *SLG*는 인트론이 없으나, class II의 *SLG*는 3'말단쪽에 인트론을 가지고 있으며, class내에는 80~90%정도의 상동성을 보이나, class간에는 70%정도를 보인다.

증폭된 PCR 산물은 제한효소로 소화한 결과 다형성을 나타내며, class I primer에 의해 증폭된 12계통은 *Hinf* I과 *EcoR* I으로 이중 소화 하였을 때 4개의 서로 다른 밴드패턴을 보였으며, class II 계통은 *Hinf* I 소화로 6개의 밴드 패턴

의 다형성을 보였다. 즉, class I은 4개의 S haplotype($S^a \sim S^d$)과 class II는 6개의 S haplotype($S^e \sim S^j$)으로 분류가 가능하였다. 자연계에 있어서 *Brassica*류 대부분의 S haplotype들은 class I에 속하며, 오직 4개의 유전자만이 class II S haplotype에 속하며(Okazaki et al., 1999), *Brassica rapa*, *Raphanus sativus* 역시 대다수는 class I에 속한다(Hatakeyama et al., 1998b, Sakamoto et al., 1998). 또한, class II haplotype들은 기본적으로 자가불화합성 정도가 약하며(Nasrallah et al., 1991), *Brassica oleracea*(Thompson and Taylor, 1966)와 *Brassica rapa*(Hatakeyama et al., 1998a)에 있어서 모든 class II haplotype들은 class I haplotype들의 화분에 열성을 보인다. 그러나, 대부분의 육성계통은 class II haplotype으로 구성되어 있으며, 육종 과정에서 특종 형질에 대한 선발과정에서 열성 haplotype이 축적될 것으로 생각된다(Thompson and Taylor, 1966; Okhendon, 1974; Nasrallah and Nasrallah 1993). 국내 육성계통에 대한 S haplotype의 동정결과, class II의 출현빈도가 높게 나타났으며, 종자의 순도를 낮추며, 자식율을 높이는 결과가 될 것으로 전망된다.

동정된 S haplotype의 DNA 염기서열을 분석한 결과, PCR 결과와 같이 두 그룹으로 분류가 가능하였으며, 배추와 마찬가지로 class I 내에서는 80~91%, class II내에서는 90~98%, class간에는 70~75%의 상동성을 보였다. 또한 exon영역에서는 높은 상동성을 보이는 반면, intron영역에서는 사이즈 차이와 다형성을 보였다.

따라서 본 실험에 사용된 primer조합으로 PCR 단계에서 육묘기에 신속하게 class간 분류가 가능하며, 증폭된 산물을 이용한 PCR-RFLP 방법은 육종 현장에서 서로 다른 S haplotype을 구분할 수 있었다. 또한 개화기의 불일치로 교배조합 작성이 어려웠던 계통들 간에 불화합 여부를 신속하게 검정할 수 있는 매우 유용한 방법이 될 것으로 예상된다.

제 5 절 화분측 자가불화합성 S 유전자(*SP11/SCR*) 및 화분 특이적 promoter의 분석

1. 서론

고등식물의 자가불화합성 system은 동일 genotype 화분을 거절함으로써 자가 수정을 방해하는 기작이다. Brassica류에 있어서, 자가불화합성 인식반응은 단일 S-locus에 의해 포자체적으로 조절되어지며, 자가불화합성 유전자인 S-locus glycoprotein (*SLG*) · S-locus receptor kinase protein (*SRK*) · S-locus protein 11 (*SP11*)/S-locus cystein rich (*SCR*) protein가 S-locus상에 위치하고 있다. 이들 유전자들은 주두 표면의 papillar 세포와 pollen 세포간 cell-cell 상호작용에 의하여 self, non-self를 인식한다.

화분측 S 유전자는 1 유전자 좌로 설명 가능 하는 것으로부터 S 유전자 좌상측, *SLG/SRK*의 근방에 존재해야 하며, 특이적으로 발현해야 한다. 또한 S 대립유전자간에 변이가 있어야 한다. 마지막으로, 주두측의 *SLG* 혹은 *SRK*의 receptor domain과 물리적으로 상호작용 해야 한다. 이러한 조건 중 첫째의 조건에 주목해서 *SLG* 혹은 *SRK*를 기점으로 한 염색체 탐색을 통해 화분측 S 유전자를 검색하는 것이 세계적으로 행하여졌었다. 최근의 보고들에 있어서, Takasaki et al. (2000)등은 자가불화합성 유전자인 *SRK*가 주두측의 자가불화합성 결정인자라는 것이 보고 되었고, Brassica에서 처음으로 동정된 *SP11/SCR* 자가불화합성 유전자(Schopfer et al. 1999; Suzuki et al. 1999; Takayama et al. 2000b; Watanabe et al. 2000)가 화분측의 자가불화합성 결정인자라는 것이 보고 되었다(Schopfer et al. 1999; Takayama et al. 2000b; Shiba et al. 2001). 화분측 S 유전자 *SP11*의 특징으로써 signal peptide영역이 매우 보존되어 있기 때문에 대립유전자의 염기배열로부터 primer를 설계하여 RT-PCR에 의해 *B. compestris*의 호모계통으로부터 *SP11* 유전자의 증폭이 시도되었으며, 많은 수의 *SP11*이 동정되었다. 그러나 화분측에서 열성을 보이는 class II S haplotype은 RT-PCR에 의해 좀처럼 *SP11* 유전자가 동정되지 않았다. Class II의 S⁶⁰ 계통의 *SRK* flanking영역으로부터 *SP11*이 동정되었으며 이를 기초로 3'-RACE의 primer합성하여 RT-PCR에 의해 4개의 class II S haplotype에서 500bp 부근의 특이적인 증폭산물을 얻을 수 있었으며,

class II의 *SP11*이 동정되게 되었다

그리고, Shiba et al. (2001)등은 S^9 -*SP11* promoter-GUS fusion의 promoter deletion 분석에 의하여 tapetum에서 GUS 발현에 요구되어지는 S^9 -*SP11* promoter element들은 -192 bp 주위에 위치하며, pollen에서의 GUS 발현에 요구되어지는 최소한의 promoter 영역은 -124 에서-143 bp다는 것을 나타내었다.

본 연구는 거대단편 분석에 의해 동정된 *SP11* 유전자를 기초로 하여 육성계통에 있어서 화분측 결정 유전자를 cloning 하였으며, 화분 특이적 발현 promoter를 분석하여 S haplotype을 동정하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 공시재료

국내의 시판 F₁ 품종 채종에 사용되고 있는 무의 육성계통 공시재료로 사용하였다. Genomic DNA 추출은 Rogers and Bendich(1985)에 의한 방법으로 엽 조직에서 추출하였다.

나. *SP11* 특이적 primer 합성 및 증폭

거대단편 분석에 의해 동정된 *SP11*-S⁹¹⁸의 DNA 염기서열을 기초로 하여 개시코돈(SPC2f; ATG AGA TAT GCT ACT TCT ATA)과 종지코돈(SPC2r; TTA TGA TTG AAC TTT GCA ACA)을 포함하여 합성하였다. Promoter 분석을 위한 *SP11/SCR* 유전자의 5'-flanking 영역들을 증폭하기 위하여 S^9 -*SP11* (Shiba et al. 2001)의 5'-flanking 영역의 염기에 기초하여 *SP11*-PF(5'-AR(A/G) TTR(A/G) GAC CCG TTA W(A/T)TC TM(A/C)G-3') Forward primer를 합성하였고, *SP11*-PR2과 *SP11*-PR3(5'-GAT GAA TAT GAA ACA TAA TAA TGC-3' 과 5'-GCA TAA ACA GCA GAT TTC AT-3')은 S^8 , S^9 , S^9 , S^{52} -*SP11* (Suzuki et al. 1999; Takayama et al. 2000) 염기들에 기초하여 Reverse primer를 합성하였다. PCR 증폭은 Perkin- elmer사의 PE-9700을 이용하였고, 2분간 94℃에서 pre-denaturation 시킨 후, denaturation을 94℃에서 15초, annealing은 55℃에서 30초, extension은 72℃에서 60초간 30회 반응시켰다. Post-extension은 72℃에서 2분간 수행하였다.

다. PCR 산물의 클로닝과 염기서열 분석

각 PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)를 사용하여 클로닝하였으며, 염기서열 결정은 PRISM™ 377(Perkin-Elmer, USA)을 사용하여 수행하였다. PCR 산물의 염기서열은 MacDNAsis (Hitachi software, Calif, USA)와 BLASTN 프로그램(NCBI)을 이용하여 결정 및 분석하였다.

3. 연구결과

가. 화분측 자가불화합성의 SP11 유전자의 단리 및 특성 분석

거대단편 분석에 의해 동정된 SP11-S⁹¹⁸ 유전자의 DNA 염기서열을 기초로 하여 합성한 SPC2f와 SPC2r의 primer를 사용하여 육성계통에 있어서 SP11 유전자를 PCR 증폭하였다. 공시한 5개의 육성 계통 에서 약 400 bp의 단일 단편이 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터를 사용하여 클로닝 하였으며, DNA 염기서열 결정하였다(그림 1). 무의 SP11 유전자는 S haplotype간 77~96%의 상동성을 보였으며, 두개의 exon과 한개의 intron으로 이루어져 있으며, intron에 비해 exon의 상동성이 높았다(그림 2). *B. rapa* SP11-60(AB067446)과 *B. oleracea* SP11-15(AB089511)의 class II S haplotype과는 77%이상의 상동성을 보였으나, *B. rapa* SP11 S⁹(BAA85458) class I S haplotype과는 20%미만의 낮은 상동성을 보였다.

```

SP11-1           ATGAGATATGCTACTTATATATACAAATTTGTAACAAGATACACTACTT 50
SP11-S918       ATGAGATATGCTACTTATATATACAAATTTGGAAAAAAGATACACTACTT 50
SP11-15(B. ole)  ---GATATGCTACTTCTATATATACATTTTTAACAAATATACACTACTT 46
SP11-60(B. r)   ATGAGATATGCTACTTCTATATATACATTTTTAACAAATATACACTACTT 50
SP11-4          ATGAGATCTGCTACTTCTATATATTTTTTTTTAACAAAGATACACTGCTT 50
SP11-5          ATGAGATCTGCTACTTCTATATATATTTTTTTTTAACAAAGATACACTACTT 50
SP11-2          ATGAGATATGCTACTTCTATATATATATTTTTAACACAGATACACTACTT 50
SP11-S9(B. r)   ATGAAATCTGCTATTTATGCTTTATTATGTTTCATA---TTCATCGTTT 46
                * * * * *
                * * * * *

SP11-1           GTGTTTCATATTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTG---A 97
SP11-S918       GTGTTTCATAGTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGCACAAGATGTG---G 97
SP11-15(B. ole)  GTGTTTCATATTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTG---G 93
SP11-60(B. r)   ATGTTTCATATTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTG---G 97
SP11-4          GTGTTTCATATTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTG---G 97
SP11-5          GTGTTTCATATTTTTGATTTTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTG---G 97
SP11-2          GTGTTTCATATTTTTGACTCTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTG---G 97
    
```

```

SP11-S9(B. r)      -CAAGTCATGTTCAAGAAGTGGAAAGCTAATCTGAGGAAAACATGCGTTCA 95
                   **** * ** ** * ** * * ** *

SP11-1            GAGCTCGGAAANTGCCCTGGACGCATCGACCAAGAGTATGGTATAAACGGA 147
SP11-S23B        GAGCTCCGATATGCCCTGAAGGCATCGCCAGAAAGTATGGTATACTAGGA 147
SP11-15(B. ole)  GAGCTTGGAAANTGCCCTGAAGGCATCGCCTATCCGAGTCTATCTCAGGA 143
SP11-60(B. r)   GAGCTTGGAAANTGCCCTGAAGGCATCGTCTATCCGAGTCTATCTCAGGA 147
SP11-4           GAGCTTGGAACTGCCCTGAAGGCATCACCATATCGAANTCCTATCTTAGGA 147
SP11-5           GAGCTTGGAACTGCCCTGAAGGCATCACCATATCGAANTCCTATCTTAGGA 147
SP11-2           GAGCTTGGAAANTGCCCTGGAGACGTCGCGAAATCGGATCATATCACAGGA 147
SP11-S9(B. r)   TAGATTAAATTGCGGTGGAAAGTTGTGGCAAATCAGGACAGCATGACTGCG 145
                   ** * * * * ** * * * *

SP11-1            AGATGCATTTCGTTCCAAACACCCAGACTGTAANTGAT----- 183
SP11-S23B        AGATGCTTTAANTCCACACACCCAGACTGTAAGGTT----- 183
SP11-15(B. ole)  AGATGCTTTAANTCCAGGAGCACAGAGTGTAAAAAACACTATGAAGTTGA 193
SP11-60(B. r)   AGGTGCATTAANTCCAGGAGCACAGAGTGTAAAAAACACTATGAAGTTGA 197
SP11-4           AGATGCTTTAANTCCAGGAGCACAGAGTGTGGTGAA----- 183
SP11-5           AGATGCTTTAANTCCAGGAGCACAGAGTGTGGTGAA----- 183
SP11-2           ACATGCATAAANTCCAGGAGCACAGACTGTCAACAATACTTC----- 189
SP11-S9(B. r)   AAGC-CTTCTATACGAATAAAACGAATCAAAGGCTT----- 181
                   * * * * * *

SP11-1            -----AGTAATTGCTATTGTG---AACTTCAAAAAATCAGA 217
SP11-S23B        -----AATAATTGCCATTGTG---GTGTTTCAAACBATTGGGT 217
SP11-15(B. ole)  GGGACATAATGTTACTAATTGCCGTTGTG---ATACTTATAGCATGCAAA 240
SP11-60(B. r)   GGGACAGAANTGTTACTAATTGCCGTTGTG---ATACTTATAGCATGCAAA 244
SP11-4           -----AATTGCCGTTGTT---GTGATTATAGCAAGCATA 214
SP11-5           -----AATTGCCGTTGTT---GTGATTATAGCAAGCATA 214
SP11-2           -GGACAGAANTGTTACTAATTGCCGTTTGTG---ATACTTTTAGCAAGAATA 235
SP11-S9(B. r)   -----TTTATTGCAACTGTACAAAGTCCTTTTCGAACTCGAT 217
                   ***** ** **

SP11-1            CATCTTGGAGGAATACTTGCTACTGT-TGCAAAGTTAAATCATAA 261
SP11-S23B        CATCTTGGAGTAATTTTGTACTACTGT-TGCAAAGTTAAATCATAA 261
SP11-15(B. ole)  ATCCTGCGAGGATTACTTGCTACTGT-TGCAAAGTTAAATCATAA 284
SP11-60(B. r)   ATCCTGCGAGGATTACTTGCTACTGT-TGCAAAGTTAAATCATAA 288
SP11-4           ATCGT---AGGATTACTTGCTACTGT-TGCAAAGTTCAATCATAA 255
SP11-5           ATCGC---AGGATTACTTGCTACTGT-TGCAAAGTTAAATCATAA 255
SP11-2           GTCGTGGGAGGATTAGTTGCTACTGT-TGCAAAGTTAAATCATAA 279
SP11-S9(B. r)   ATTGT---GATTG--TGCAATTAAATGCAAAGTTAGATAGTAG 252
                   * * ** * * ***** **

```

그림 1. 육성계통에서 cloning된 5개와 *B. rapa*, *B. oleracea*의 *SP11* 유전자의 exon 염기서열 비교. Underline은 개시코돈과 종지코돈을 나타냄.

GenBank acc. no.는 SP11-1 (AY422009), SP11-2 (AY422010), SP11-S⁹¹⁸ (S3, AY422011), SP11-4 (AY422012), SP11-5 (AY422013), SP11-15 (AB176545), SP11-60 (AB067446), SP11-S9 (AB022078).

```

SP11-2   GTAAACTATATCAATAAATTAAGAAAATCTTCAAAAAAAAAAACTATATCAATAACTTT 60
SP11-S918 GTAAA-----TTATATCAANTAGCTTT 21
SP11-1   GTAAA-----TTATATCAANTAATTTT 21
SP11-4   GTAAACTATATCAATAA-----CTCAGTTCAAAAAAAAAAACTATATCAANTAATTTT 50
SP11-5   GTAAACTATATCAATAA-----CTTT 21
        *****

SP11-2   TCCTCTCTTGTGACGA---TTTACGATTTTT-CTTA-----CCCAATTGCAAT----- 105
SP11-S918 CCCCTT-TTATTGACGA---TTTAGGATTTTT-CTTA-----CCCAGATGCACT----- 65
SP11-1   TCCCCT-TTATTGACGA---TTTGGGATTTTTTCTTATATATTCATAAGTGCAATC----- 73
SP11-4   CCCCCC-TTATTGACGA---TTTACGATTTTT-GTTACGATTACGATAAGTCGTGGATA 105
SP11-5   CCCCCC-TTATTGACGACGATTTACGATTTTT-GTTAC-----CGAACTGCA---A 67
        * * * * *

SP11-2   -TCATA-ATATTTTTTAAATTTGAAG 128
SP11-S918 -TCAT---TATTTTTCTATTTAAAG 86
SP11-1   -TTATA-TTATTTTT--ATTTAAAG 94
SP11-4   TTCATATATTTTTATTTTTTTAAAG 130
SP11-5   TTCATATTTTTTATTTTTTTAAAG 92
        * * * * *

```

그림 2. 육성계통에서 cloning된 5개 SP11 유전자의 intron 염기서열 비교.

나. 화분 특이적 promoter 영역의 분석

최근에 동정된 SP11/SCR 유전자의 5'-flanking 영역들의 물리적 구조를 분석하기 위하여 *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* (Cabbage, Broccoli), *Raphanus sativus*의 SP11/SCR 유전자의 5'-flanking 영역들을 동정하여 sequencing하였다. 22개의 inbred line들(*B. rapa*, 3 line; *B. oleracea*, 7 line; *R. sativus*, 12 line)들을 재료로 이용하였다. 증폭된 PCR 산물들을 sequencing하였으며, 이들 염기들의 비교 분석에 의하여 SP11/SCR 유전자들의 5'-flanking 영역들은 53~96%의 높은 상동성을 나타내었다. *B. rapa*와 *B. oleracea*간의 5'-flanking 영역 염기들의 상동성은 76~96%로 *R. sativus*와의 염기 상동성(60~91%)보다 더 높았다. 추가적으로, 추정되는 TATA box의 위치와 염기들은 *B. rapa*, *B. oleracea* *R. sativus* line 모두에서 보존되어 있었다(그림 3).

B. r. -23^a -182 AATTGGACCCGTTATTCTCGTTAAGT---ATCCAGT-----
 B. r. -44 -190 AGTTGGACCCGTTAATCTCGTTGACTCGCCCTCAAA-----
 R. r. -47 -186 AATTGGACCCGTTAATCTCGTTAAGTGCACCAAT-----
 B. o. (C)-2 -184 AGTTAGACCCGTTATTCTCGTTAAGT---ATCCAGT-----
 B. o. (C)-8 -199 AGTTAGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCCCTCAAA-----
 R. o. (C)-18 -202 AGTTAGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 B. o. (B)-6 -201 AATTGGACCCGTTAATCTCGTTGACCCCGCACGCAAA-----
 B. o. (B)-10 -217 AGTTAGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCACCCAAACTTTTTTTGGTAAAATGCACCCA
 B. o. (B)-19 -199 AATTGGACCCGTTAATCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 R. o. (B)-55 -185 AGTTAGACCCGTTAATCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 R. s. -8 -195 AGTTGGACCCGTTATTCTCGTTGACTGGCCCCBAAA-----
 R. s. -17 -186 AGTTGGACCCGTTATTCTCGTTAGTCA-GCCCAAT-----
 R. s. -30 -191 AGTTAGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 R. s. -38 -196 AGTTAGACCCGTTAATCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 R. s. -74 -215 AATTAGACCCGTTATTCTCGTTGACTGGCCCTCAAATCTGTATTTTTTTAGTT-----
 R. s. -322 -193 AGTTGGACCCGTTATTCTAGTTGACTCGCCCTCAAA-----
 R. s. -365 -189 AGTTGGACCCGTTAATCTCGTTGACTCGCCCT-AAA-----
 R. s. -516 -183 AGTTGGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCACCCAAAT-----
 R. s. -713 -183 AGTTGGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 R. s. -828 -166 AATTGGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCCCTCAGA-----
 R. s. -912 -154 AGTTGGACCCGTTATTCTCGTTGACTCGCCCTCAAA-----
 R. s. -918 -210 AGTTAGACCCGTTATTCTCGTTGAAT-GAACCCAAA-----
 S9-SP11 -197 AATTAGACCCGTTAATCTCGTTGACTCGCACCCAAA-----
 * * * * *

B. r. -23 -149 ---T-TT-GTAGTCTTAACCTAATTT-----TATCTATTTTTAGG---TTAT
 B. r. -44 -154 ---TCTTGTAGTCTTACCTAAATTA-----AATATATTTTTACC---TTCT
 B. r. -47 -150 ---T-TTTGTAGTCTTGACCTAAATTT-----TATCTATTTTTACG---TTCT
 B. o. (C)-2 -151 ---T-TT-GTAGTCTTAACCTAATTT-----TATCTATTTTTAGG---CTAT
 B. o. (C)-8 -163 ---TTTTAAGTTTTTATCTAACTTTTTTAAA---AAATCTATTTTTACC---TTTT
 B. o. (C)-18 -166 ---T-TTTGTAGTCTTACCTAATTTAGCTCGAA---AATCTTTTTTACGTACCTTCA
 B. o. (B)-6 -165 ---T-TTTGTAGTCTTACCTAATTTAGTTCAAA---AATCTTATTTACGTACCTTCC
 B. o. (B)-10 -157 CATTTTTTTGTCTTTATCTAATTT-----AATCTATTTTTACC---TTCT
 B. o. (B)-19 -163 ---T-TTTGTAGTCTGTACCTAATTTAATTGAAAA---AAATCTATTTTTACC---TTCT
 B. o. (B)-55 -149 ---ATTTTCTAGTGTTACCTAATTT-----AATCTATTTTTACC---TTCT
 R. s. -8 -159 ---TTTTGTAGTTTT-ACTTAATTTAACTGAAA---AATCTACTTTTACC---TTCT
 R. s. -17 -151 ---T-TTTGTAGTCTTACCTGATTT-----TATCTATTTTTACG---TTCT
 R. s. -30 -155 ---T-TTTGT---CTTATCCTAATTC AATTGAAA---AATCTATTTTTACC---TTCT
 R. s. -38 -160 ---T-TTTGTAGTCTTACCTAATTTGATTTGA-----AATCTATTTTTAGC---TTCT
 R. s. -74 -161 ---TAATTGAGATCTATTTGTCGTCGCAAAAAAATTGAGATCTATTTTTACC---TTCT
 R. s. -322 -157 ---TCTTGAAGCTTTTACCTAATTTTTTGGAAACG-AAAATCTATATTTACC---TTCT
 R. s. -365 -154 ---TCTTAAAGTTTTTACCTAACTTTTTT-GAA---AAATCTATTTTTACC---TTCC
 R. s. -516 -147 ---C-TTTGTAATCTC-ACCTAATTT-----AATCTATTTTTAC---CTTCT
 R. s. -713 -147 ---TTTTGTAGTATTTACCTAAGTTTTAACTCAA---ACGTCTATTTTTAGC---TAGG
 R. s. -828 -130 ---TCTTGGAGTCTTACCGAAATTA-----AATATATTTTTACC---TTCT
 R. s. -912 -118 ---TTTCTCCAGTCTTACCTAATTT-----AATCTATTTTTACC---TTCT
 R. s. -918 -175 ---A-TT-GTAGTCTTACCTAATTTAGTTT-CA---AATCTATTTTTACATACCTTCT
 S9-SP11 -161 ---T-TTTGTAGTCTTATCCTAATTCAGTTGAAA---AATCTATTTTTACC---TTCT
 * * * * *

B. r. -23 -110 GTTGGATATA-----TTTATAATGATT--TTAATAA-GGAAACATCATTGTATAT
 B. r. -44 -112 GTGTGATATA-----TTTATAATGATTT-TGAACAG-TGACATAACAGTATGTA-
 B. r. -47 -110 GTTGGATA-----TTTATAATGATTGGTTAACAA-GGAAACAGCAGTATGTAT
 B. o. (C)-2 -112 GTTGGATATA-----TTTATAATGATT--TTAATAA-GGAAACATCATTATATAT
 B. o. (C)-8 -114 GTTGGATATA-----TTTATAATGATTG-TTAACAA-AGACATAACAATCTGTAT
 B. o. (C)-18 -114 GTTGGATACA-----TTTATAATGATTG-TTAACAA-GGAAACAACAAAATGTAT
 B. o. (B)-6 -113 GTTGGATATA-----TTTATAATGATTG-TCAACAA-GGAAA-AACAAAATGTAT
 B. o. (B)-10 -114 GTTGGATATA-----TTTATAATGATTG-TTATTAA-GAAAACAATAATATGTAT
 B. o. (B)-19 -113 GTTGGATACA-----TTTATAATGATTG-TTAGCAA-GGAGACAACAATGTGTAT
 B. o. (B)-55 -108 GTTGGATATA-----TTTATAATGATTG-TTATGAA-GAAAACAACAATACTTAT
 R. s. -8 -112 GTTGGGTATA-----TTTATAATGACTG-TTAACAA-GGAAACAACAA---CAT
 R. s. -17 -111 GTTAGATATA-----TTTATAATTATTG-CTAACAA-GGAAACAACAT---GTAT
 R. s. -30 -110 GTTGGATA-----TTTATAATGATTG-TTAACAA-GGAAACAACAATGTGTAT
 R. s. -38 -114 GTTGGATATA-----TTTATAATGATTG-TTAACAA-GBACACAATAATATGTAT
 R. s. -74 -107 TTGTGAAACT-----TTTTAAGTGATTT-TTAATAG-TGACATAA---ATGTAT
 R. s. -322 -105 GTTGGATATA-----TTTATAATGATTG-TTAACAA-ACACATA-----AC

```

R s -365 -106 GTTGGACATA-----TTTATAATGATTG-TTAACTA-AGACATA-----CTTAT
R s -516 -109 GTTGGATATG-----ATATATAATGATTG-TTAGAAG-GAA-ACAAC-AAATGTTT
R s -713 -97 GTTGGATATA-----TATTTATAGTGATTG-TTAAACA-GAAAACAAC-----
R s -828 -88 GTGTGATATA-----TTTATAATGGTTT-TTAAACAG-AGACATAA-----
R s -912 -77 GTTGG-----TATATT-----ACA-AG-----CATA-----
R s -918 -125 GTTGGATATATATATATATATATAATGATTG-TTAAACAC-GTATACAGCCAAATGTGT
S9-SP11 -113 GTTGGATA-----TTTATAATGATTG-TTAAACAAGGAAATAACAATATGTAT
      * * * * *

B r -44 -63 TACAAGAATAAGATAAACAAGAAGCTTCTGCAAGTAAAAGAGA--AATTTTA-TCACTTT
B r -23 -65 TACAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCGAGTAAAATAGA--ATCTTTTATCACTT-
B r -47 -63 TATSAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTCTAAGTAAAAGATT--ATCTTTTACCACTTT
B o (C)-2 -65 TACAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAATAGA--ATCTTTTATCACCT-
B o (B)-8 -66 TACAGGAGTAAGATAAACCAGAACTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--GATTTTATCACTTT
B o (C)-18 -66 TACAAGCGTAAGATAAACAAGAATTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTTT
B o (B)-6 -66 TACAAGAGTAAGATAAAGCAAGAATTTGCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTTT
B o (B)-10 -65 TACGAGAGT-AAATAAACAATAACTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTCT
B o (B)-19 -66 TACAAGGGTAAGATAAAAAACGAAGCTCTCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTCATCACTTT
B o (B)-55 -60 TACAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCT--GAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTTT
R s -8 -68 TATAAAAGTAAGATAAAAAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGAATCTCTTTTATCACTTT
R s -17 -66 TACAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTTC
R s -30 -64 TACAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTCCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTTT
R s -38 -66 TACAAGGGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTCATCACTTT
R s -74 -63 TACAAGAGTTAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--AAAATTTATCACTTT
R s -322 -66 AGTAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTACAAGTAAAAGAGA--AACTTTTATCACTTT
R s -365 -64 TACAANTAGTAAGCTAAACAAGAAGCTTTCTCCAAGCAAAAAGAGA--AATTTT--ACACTTT
R s -516 -62 TACTAGAGTAAGATAAAA--GAAGCTTTCTGCA--GTAAAAGCTA--AT-TTTTGTCACTTT
R s -713 -56 -----ATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTATATANGAGATAAACCTTTTCCCTTT
R s -828 -50 -----ACAAGAAGCTTCTGCAAGTAAAAGAGA--TATTTGAATCACTTC
R s -912 -56 -----AGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--CTTTTCTATCACTCT
R s -918 -67 TAAAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGA--ATCTTTTATCACTTT
S9-SP11 -66 TACAAGAGTAAGATAAACAAGAAGCTTTCTGCAAGTAAAAGAGAG--AATCTTTTATCACTTT
      * * * * *

```

```

+1
B r -23 -6 T-TCTGA--ATGAAAGCTGCTACTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B r -44 -8 T-CTGAATGATGAAATCTGCGATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B r -47 -5 T-TTGA--ATGAAAGCTGCTATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (C)-2 -8 T-CTGAATGATGAAAGCTGCTACGTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (C)-8 -8 T-CTAAATTAAGTAAAGCTGGAAGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (C)-18 -8 T-CTGAATCATGAAAGCTGTTGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (B)-6 -8 T-CTGAATCATGAAATCGGCTGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (B)-10 -8 G-CTGAATGATGAAATCTGCTATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (B)-19 -8 T-CTAAATCATGAAATCCGCTGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
B o (B)-55 -5 G-CTGA--ATGAAATCTGCTGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -8 -8 T-GTGAATCATGAAATCTGCTATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -17 -8 T-CTGAATGATGAAATCTGCTACATATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -30 -7 --CCGTATCATGAAATCTGCTGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -38 -8 T-CTAAATCATGAAATCAGCTGCTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -74 -5 T-CCGA--ATGAAATCTCAATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -322 -8 T-CTAAATCATGAGATCTGCAATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -365 -8 T-CTACGTCATGAAATCTGCTGTTTATGC-----+20
R s -516 -8 T-CTCAATGATGAAACTGCTATTTACGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -713 -8 T-TCGAATCATGAAATCTTCTGTTTTGCAATATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -828 -8 T-CTGAATGATGAAACTGTGATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -912 -8 G-CTGAATGATGAAATCTGCTATTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
R s -918 -9 TTCTGAATCATGAAATCTGCTGTTTATGCATTATTATGTTTCATATTCATC +42
S9-SP11 -7 --CTTAATAATGAAATCTGCTATTTATGCTTTTATTATGTTTCATATTCATC +42
      * * * * *

```

그림 3. *Brassica* 및 *Raphanus*속에 있어서 *SP11/SCR* 5'-flanking의 염기서열 비교. Open box: TATA box. 동일 염기서열은 별표로 나타내었음. +1: 번역 개시위치. Underline은 5'-flanking영역 증폭에 사용한 primer 위치.

4. 고찰

지금까지 *S* haplotype은 *B. rapa*에서 30개, *B. oleracea*에서 50개정도 보고 되어 있다(Nou et al. 1993; Ockendon 2000). 주두측 자가불화합성 유전자인 *SLG*와 *SRK*의 염기서열의 상동성에 기초하여 *S* haplotype은 class I과 class II의 두개 그룹으로 분류 가능하며, *SLG*, *SRK*와 *SP11*의 염기서열 분석결과, *S* haplotype에 있어서 *B. rapa*와 *B. oleracea*의 상동성이 높은 것으로 보고 되어있다(Nasrallah et al. 1991; Kusaba et al. 1997; Sato et al. 2000). 이러한 *S* haplotype간 높은 상동성은 같은 선조의 *S* haplotype으로부터 진화한 것으로 고려된다.

5개의 육성 계통으로부터 동정된 무의 *SP11* 유전자는 *S* haplotype간 77~96%의 상동성을 보였으며, 두개의 exon과 intron으로 이루어져 있으며, intron에 비해 exon의 상동성이 높았다. 동정된 *SP11* 유전자의 추정된 아미노산 배열은 Brassica에서와 같이 signal peptide영역, 1개의 glycine 잔기와 8개의 cysteine 잔기가 잘 보존되어 있으며, 84~92개의 아미노산으로 구성되어 있다(그림 4).

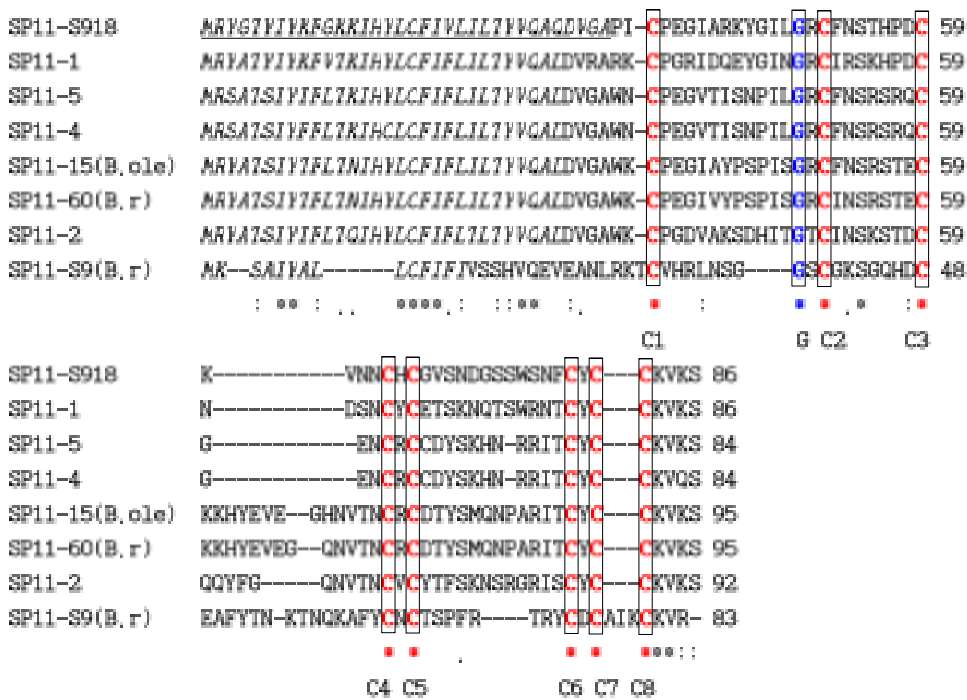


그림 4. 추정된 아미노산 배열의 비교. C1~C8; 보존된 cysteine residues, G; glycine residue. Underline은 alternative signal peptide 영역.

B. rapa SP11-60과 *B. oleracea* SP11-15의 class II S haplotype과는 77%이상의 상동성을 보였으나, *B. rapa* SP11 S⁹ class I S haplotype과는 20%미만의 낮은 상동성을 보였다(그림 5). 이상과 같이 *B. rapa*와 *B. oleracea*와의 SP11 유전자의 높은 상동성은 genera의 분화 이전에 자가불화합성의 유전자가 분화하였으며, 같은 선조의 S haplotype으로부터 진화한 것으로 추측된다.

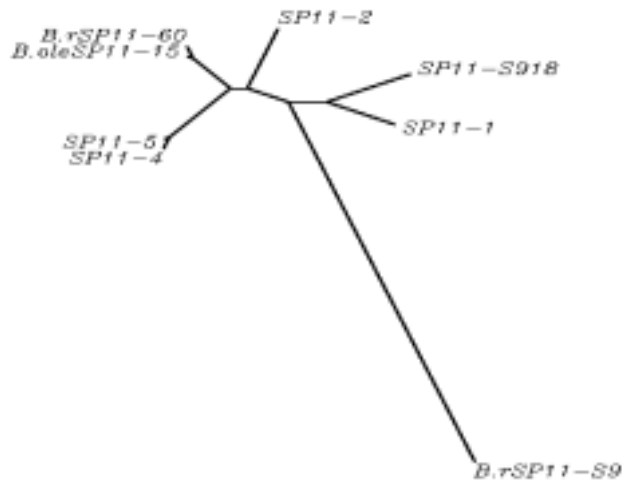


그림 5. *Raphanus sativus*, *B. rapa* 그리고 *B. oleracea*의 SP11 유전자의 DNA 염기서열에 기초한 Unrooted N-T Tree 분석.

SP11/SCR 유전자의 5'-flanking 영역을 분석한 결과, 두 개의 반복배열 (TTT TAG ATA TAA A)과 추정되는 pollen-specific element (CTT AAA TTA GA) 염기들은 pollen 특이적 유전자인 PCP-A class 유전자에서 동정되었다. 반면에, tapetum과 pollen에서 발현되는 Bcp1 유전자는 tapetum 또는 pollen에서의 발현을 부여하는 일반적인 cis-acting element들에 접속하므로써 발현이 조절되어 진다(Xu et al. 1993). *B. rapa*(S⁸, S⁹, S¹²)와 oilseed rape(S⁹¹⁰, S^{A14})에 있어서도, 이 반복 배열과 pollen-specific 염기들은 SP11/SCR 유전자들의 5'-flanking 영역에서 발견되지 않았다(Shiba et al. 2001).

본 연구에서 동정한 *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* (Cabbage, Broccoli), *Raphanus sativus*의 5'-flanking 영역에 대한 database 검색에서, 이들 반복 배열

들과 추정되는 pollen-specific 염기들은 또한 5'-flanking 영역에서 발견되지 않았다. 또한 다른 일반적 반복 배열 또는 palindromic 염기들 역시 발견되지 않았다. 그러므로 여기에 제시된 data는 *Brassica*와 *Raphanus*에서의 포자체적 발현 양상은 *SP11/SCR* 유전자의 promoter가 tapetum 또는 pollen에서의 발현을 부여하는 일반적인 cis-acting element들과 상호 작용하여 발현되어 진다는 것을 강하게 시사하였다.

제 6 절 *SRK*의 kinase domain을 이용한 PCR-CAPS에 의한 *S*-alleles 동정 및 F₁ 종자 순도검정

1. 서론

자가불화합성은 종내 다양성 유지 및 내혼 약세를 방지하기 위해 진화된 식물 시스템으로 정상적인 생식기관을 가지고 있음에도 불구하고 자기화분이 수분 되었을 때 수정에 이르지 못하는 현상을 말한다.

Brassicaceae[*Brassica rapa*(syn. *campestris*), *B. oleracea*, *Raphanus sativus* 등]는 국내에서 경제적으로 중요한 채소이며, 또한 아시아와 유럽에서도 많이 이용되어 왔다. 국내에서 시판중인 무의 대부분은 F₁ 품종으로 자가불화합성 시스템을 이용하여 생산되어지고 있다. *R. sativus*는 포자체적인 자가불화합성 체계를 가지고 있으며, 최소 2개의 유전자 *S*-locus glycoprotein(*SLG*) gene와 *S*-locus receptor kinase(*SRK*) gene(Nasrallah and Nasrallah 1993)를 포함한 복대립 유전자를 가진 단일의 *S*-locus에 의해서 설명할 수 있다. *SLG*와 *SRK*가 자가불화합성의 인식반응에 관여 하며(Shiba et al., 1995; Conner et al., 1997), 성숙한 유두세포에 존재하는 *SLG*와 *SRK*(Watanabe and Hinata., 1999)는 서로 밀접하게 연결된다는 것이 발견되어졌다. 반면에 *S* 유전자 좌에 연쇄되어 있지 않지만 주두의 유두세포에 발현하고 있으며, *SLG*의 발현기관과 특이성이 같은 유전자인 *S*-locus related gene(*SLR1*과 *SLR2*)가 cloning되어 *SLG*와 높은 상동성을 보이고 있다(Nasrallah ME, 1989; Watanabe M et al., 1992). *SRK*는 *S* haplotype에 따라 다양한 물리적 구조를 가지며, 이 유전자는 *S* domain과 transmembrane domain 그리고 kinase domain으로 구성되어 있다(Stein JC et al., 1991, 그림 1).

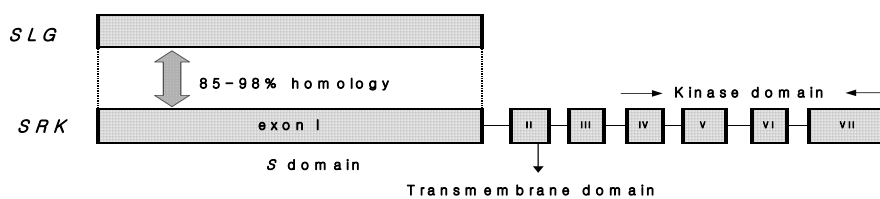


그림 1. *SLG*와 *SRK*의 계놈 구조.

S haplotype은 *SLG* 핵산 서열의 상동성으로부터 class I과 class II의 두 가지 그룹으로 나뉘어지며, 이중 class I은 화분에 있어서 우성 S haplotype이고, class II는 화분에 있어서 열성 S haplotype이다(Nasrallah JB and Nasrallah ME, 1984).

무의 자가불화합성 연구는 Sakamoto 등(1998)에 의해 계놈 DNA에 대한 *SLG* probe를 이용한 Southern blot분석과 *SLG*-specific primer를 이용한 PCR-RFLP에 의해 18 S haplotype과 8개의 *SLG*의 DNA 염기서열이 보고되었다. 무의 *SLG*는 배추와 유사하였으며, 자가불화합성의 기구 또한 유사할 것으로 예상되었다. 최근 Lim 등(2002)에 의해 5개의 class I과 2개의 class II *SLG*가 결정되었으며, *SRK*의 동정이 보고 되었다.

본 연구는 F₁ 품종 생산에 이용되고 있는 육성계통에 대하여 주두측 자가불화합성 결정 유전자인 *SRK*중 가장 높은 다형성을 보이는 kinase domain 영역을 PCR-CAPS(Polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence)로 분석하고, 그 영역의 DNA 염기서열을 기초로 하여 F₁ 종자 순도 검정용 primer를 작성하였다. S haplotype의 빠르고 정확한 동정기술 개발과 간단한 F₁ 종자 순도 검정법을 확립하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 공시재료 및 DNA추출

시판의 무의 F₁ 채종에 사용 빈도가 높은 67개 육성계통을 공시재료로 사용하였다. Geonmic DNA 추출은 유묘기의 어린 엽으로부터 Rogers and Bendich(1985)에 의한 방법을 변형하여 사용하였다. 실험재료의 어린 엽(1 g)은 막자사발과 액체질소를 이용하여 분쇄 후 추출용액[100mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 20% SDS, 14 mM 2-mercaptoethanol]을 넣고 균질화하여 65°C에서 20분간 방치하였다. 추출 용액은 phenol, chloroform, PrepMate™ 정제 Kit(Bioneer, USA)에 의해 정제하였다. 정제한 후 isopropanol 1 ml와 3M Na-acetate 0.1 ml를 넣어 혼합하여 원심분리기로 침전하였으며, 상등액을 버리고 건조시킨 다음 TE용액[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA] 0.5 ml를 넣고 잘 녹였다. 0.01% RNase 용액 10 ul 넣고 37°C에서 2 hr 처리하였다. 추출된 DNA 농도는 겔 전기영동법과 분광 광도계를 사용하여 정량하였으며, 정제 DNA

는 -20°C에 보관하였다.

나. *SRK*의 kinase domain의 PCR 증폭 및 PCR-RFLP 분석

주두측 자가불화합성 유전자인 *SRK*의 kinase domain의 증폭위해 사용한 primer는 *B. oleracea* S³(Delorme et al. 1995), S²⁹(Kumar and Trick 1994) 그리고 *B. campestris* S¹²(Yamakawa et al. 1995)의 DNA 염기서열에 기초하여 *SRK* 중 가장 상동성이 낮은 영역의 4번째(SRK4 ; TGA TGA GTT TAT GAA TGA GGT GA)와 7번째 exon(SRK7 ; GCT TTC ATA TTA CCG GGC ATC GAT GA)에서 S-haplotype간 보존된 부분에서 합성되었다.

다. *SRK* 유전자의 PCR-CAPS 분석

PCR 증폭은 Perkin-elmer사의 PE-9700(Perkin-Elmer, CA, USA)을 이용하였고, 1분간 94°C에서 pre-denaturation 시킨 후 denaturation을 94°C에서 15초, annealing은 57°C에서 30초, extension은 72°C에서 90초간 30회 반응시켰다. PCR 증폭반응은 25 μ l 반응액으로 2.5 μ l의 10 \times buffer(조성: 500mM KCl, 100mM TRis-HCl pH 8.3, 15mM MgCl₂, 0.01% gelatin)를 첨가하고 genomic DNA 2.5 μ l (약 50ng), primer 100pM, dNTP 2.5mM 그리고 Taq polymerase 1 unit를 첨가하였다. 반응액은 1.0% agarose gel 전기영동으로 분리 후 UV transilluminator상에서 확인하였다. 증폭된 PCR산물을 제한효소인 *Hinf* I로 소화하였다. 그 반응조건으로 1.5 μ l의 10 \times buffer(750mM KCl, 150mM tris-HCl, pH 7.5, 92.5mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol)를 첨가하고 PCR산물 7 μ l, restriction endonuclease 2.5units, 을 더한 다음 최종 volume을 15 μ l로 하였다. 반응액은 37°C에서 10시간 incubation시킨 후 1X TBE buffer를 함유하고 있는 2% Metaphor agarose gel(BMA, USA)에서 100V에서 1시간동안 전기영동으로 분리한 후 UV transilluminator상에서 확인하였다.

라. PCR 산물의 cloning 및 염기서열 분석

Taq DNA polymerase로 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T Easy Vector(Promega USA)에 cloning하였고, cloning된 nucleotide sequence는 Auto sequencer(Applied Biosystems)에 의해 결정되었다.

3. 연구 결과

가. *SRK* kinase domain의 PCR-CAPS에 의한 *S* haplotype 동정

효율적인 F₁ 종자 순도 검정용 primer를 개발하기 위하여 시판의 무의 F₁ 종자 생산에 사용 빈도가 높은 67개 육성계통을 공시재료로 사용하였다. SRK3f과 SRK7r의 primer를 이용한 PCR 증폭한 결과 모든 육성계통에 약 1,100 bp의 단일 단편의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 증폭된 산물은 제한효소(*Hinf* I + *Eco*R I)으로 소화하여 *S* haplotype을 동정하였으며, cloning하여 *SRK*의 kinase domain의 *S* haplotype간 DNA 염기서열의 다형성을 검증하였다.

주두측 자가불화합성 결정유전자인 *SRK*의 kinase domain영역의 PCR 산물을 *Hinf* I과 *Eco*R I으로 이중 소화한 결과 67개의 육성계통은 9개의 서로 다른 밴드 패턴이 검출되었으며, 이는 9개의 *S* haplotype(R1~R9)의 동정을 확인할 수 있었다(그림 2).

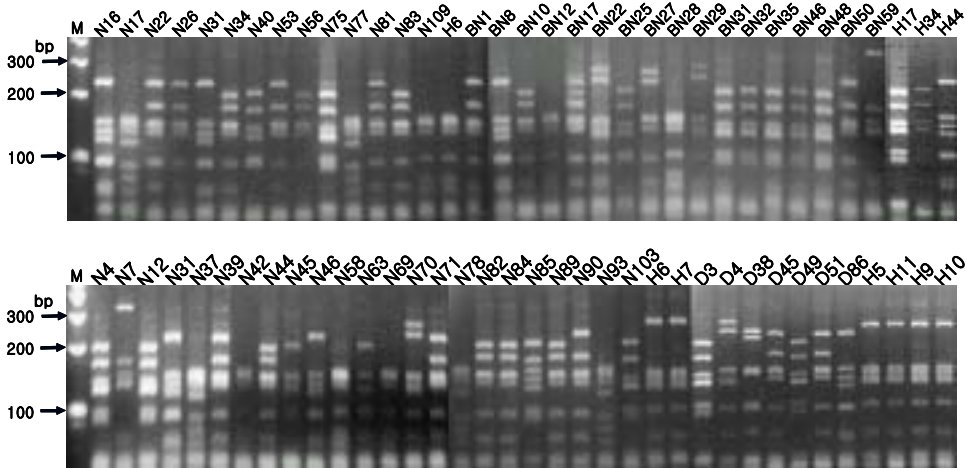


그림 2. 67개의 육성계통의 *SRK*의 kinase domain을 *Hinf* I + *Eco*R I으로 소화한 결과. 9개의 band pattern이 검출되었음.

동정된 9개의 *S* haplotype 출현빈도는 R4(34%), R2(18%), R3(15%)의 순으로 출현빈도가 높게 나타났으며(표 1), PCR-RFLP분석에 의해 grouping된 9그룹에 대하여 *S*-allele가 정확히 분류되었는지를 확인하기 위하여 각각의 그룹에서 임의

적으로 한 개의 계통을 선발하여 nucleotide sequence를 결정하였다(그림 3).

표 1. *SRK* specific primer를 이용한 PCR-RFLP 결과. 67 inbred line의 *S* haplotype 분류와 빈도

<i>S</i> -haplotype	공시 계통	출현 빈도
R1	N16, N31, N46, N45, N63, D86, H44	7(10)
R2	N17, N37, N42, N58, N69, N77, N78, N93, N109, BN12, BN28, H6	12(18)
R3	N22, N26, N39, N53, N71, N81, BN1, BN50, D45, D51	10(15)
R4	N4, N12, N34, N40, N44, N56, N75, N82, N83, N84, N89, N103, BN10, BN25, BN31, BN32, BN35, BN46, BN48, D3, D4, H17, H34	23(34)
R5	N70, BN27, BN29, BN22, D4	5(7)
R6	BN17	1(1)
R7	N7, BN59	2(3)
R8	H5, H6, H7, H9, H10, H11	6(9)
R9	N85	1(1)
9 <i>S</i> -haplotype		67

9개의 *S* haplotype대한 *SRK*의 kinase domain은 R1, R6 그리고 R9는 97%의 상동성을 R4와 R7은 95%의 상동성을 보였다. Intron 영역을 제외한 4번째에서 7번째의 exon 영역에서 높은 상동성을 보였다. 그러나 *SLG*에 비해 *S* haplotype간 다형성을 보이는 intron 영역에서 F₁ 순도검정용 primer를 작성하기 적합하였다.

```

R1    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGACTGATTGCAAGGCTTCAGCACATAAACCTTGTTCCG 60
R9    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGACTGATTGCAAGGCTTCAGCACATAAACCTTGTTCCG 60
R6    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGACTGATTGCAAGGCTTCAGCACATAAACCTTGTTCCG 60
R4    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGACTAATTGCCAGGCTTCAGCACCTAAACCTTGTTCCG 60
R7    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGACTAATTGCCAGGCTTCAGCACGTAAACCTTGTTCCG 60
R3    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGACTAATTGCTAGGCTTCAGCACATAAACCTTGTTCCG 60
R2    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGACATTAATCGCGAGGCTTCAGCATATAAACCTTGTTCCA 60
R8    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGACATTAGTCGCGAGGCTTCAGCATAAAAATCTTGTTCCA 60
R5    TGATGAGTTTATGAATGAGGTGAGATTGATCGCAAGGCTTCAGCATATAAACCTTGTTCCG 60
***** * * * *

```


R1 GGGGTCTTACTTCTTGAGATTATAAGTGGCAAGAGGAACAATGCATTCTACGATTCCGAAC 678
R9 GGGGTCTTACTTCTTGAGATTATAAGTGGCAAGAGGAACAATGCATTCTACGATCCGAAC 678
R6 GGGGTCTTACTTCTTGAGATTATAAGTGGCAAGAGGAACAATGCATTCTACGATCCGAAC 680
R4 GGGGTCTTGGCTTCTTGAGATTATAAGTGGCAAGAGGAACAATGCATTCTACAACTCAAAT 699
R7 GGGGTCTTGGCTTCTTGAGATTATAAGTGGCAAGAGGAACAATGCATTCTACAACTCAAAT 709
R3 GGGGTCTTGGCTTCTTGAAATTATAACTGGCAAGAGGAGTAAAGGGTCTACAACTCTAAC 696
R2 GGAGTTATAGTCTTCTGAAATTGTTAGTGGAAAGAAGAACAGAGGATTCTACAAATATGAGC 693
R8 GGAGTCATAGTCTTCTGAAATTGTTACTGGAAAAGAGGAACAGAGGATTCAACAACCTTGAAC 677
R5 GGAGTCATAGTCTTCTGAAATTGTTACTGGAAAAGAGGAACAGAGGATTCTACCAGTCAACC 680
* * * * *

R1 CGTGATCTTAGTCTTCTCAGTTATgtaagaataaaaactttccctaaggtgatattgcttt 738
R9 CGTGATCTTAGTCTTCTCAGTTATgtaagaataaaaactttccctaaggtgatattgcttt 738
R6 CGTGATCTTAGTCTCCTCAGTTATgtaagaataaaaactttccctaaggtgatattgcttt 740
R4 CGTGACCTTAATCTCCTTGGTTTCgtaagc-taaagaacctcttgatttgg-attatattt 757
R7 CGTGACCTTAACCTCTTGGTTTCgtaagc-taaataacctcttgatttgg-attatattt 767
R3 CGTGACCTTAACCTCCTTGGATTTTgtaagc-tgag-aacaactaaatttga-tattgttt 753
R2 AATGAAAACAATCTCCTAAGCTATgtaagtatgagagccaataacattoga-tcttcttt 752
R8 TACGAACACAACCTTCTAAACTATgtaagtataacaactaata-gttcga-tctgcttt 734
R5 CCGGAAGACAATCTTGTATGCTATgtaagtttaagaaccaataatattcta-tctactct 739
* * * * *

R1 cactct-caacatctgatgataacactaagaaa-----aaaaaattgatcatagGTC 789
R9 cactct-caacatctgatgataacactaagaaa-----aaaaaattgatcatagGTC 789
R6 cactct-caacatctgatgataacactaagaaa-----aaaaaattgatcatagGTC 791
R4 cgcag---ttatagtta---aacactaaaaaa---ttccctctcttt-tgtaagGTG 805
R7 cgcag---ttatagtta---a-cactaaataa---ttccatctcttt-tgcaagGTG 814
R3 cactgcatcttatatctccataacactaaatgaaagattctatattttacggacagGTG 813
R2 cg-----agagtgctcaaacattttaaatgc-----ttttatcttaataaacagGTG 799
R8 ct-----agattgctcaaacactttaaatgc-----atztatcttattacacagGCA 781
R5 cg-----agattgcccacaacactttaaatgc-----ttttatattataaacagGCA 786
* * * * *

R1 TGGAGATTTTGGAAAGGAAGGAAAAGGCCCTAGAGATCGTAGATCCGGTCATTGTAGATTGG 849
R9 TGGAGATTTTGGAAAGGAAGGAAAAGGCCCTAGAGATCGTAGATCCGGTCATTGTAGATTGG 849
R6 TGGAGATTTTGGAAAGGAAGGAAAAGGCCCTAGAGATCGTAGATCCGATCATTGTAGATTGG 851
R4 TGGAGGAATTTGGAATGAAGGACAAAGGCAAGAGATTATAGATCCCATCATCAAGAATCT 865
R7 TGGAGGAATTTGGAATGAAGGACAAAGGCAAGAGATTATAGATCCCATCATCAAGAATCT 874
R3 TGGAGGTACTGGAAAGAAGGAAAAGGGATAGAGACCGTAGACCCAATCATCATAGATTCT 873
R2 TGGAGTCATTGGAAAGGAAGGAAAGCGCTAGAAATCGTAGATCCAGTCATCCTAGATTCA 859
R8 TGGAGTAANTTGGAAAGGAAGGAAAGAGCGSATAGAAATCGTAGATCCAGATATCCTAGATTCA 841
R5 TGGACTCATTGGGCGCAGGGAAGAGCGCTAGAAATCGTAGATCCCGTCATCCTAGATTCA 846
* * * * *

R1 -----TCAGCATCAACATTTCCGCCG---CATGAGATCTTAAGATGCATACAAATT 897
R9 -----TCAGCATCAACATTTCCGCCG---CATGAGATCTTAAGATGCATACAAATT 897
R6 -----TCACCATCAACGTTTCCGCCG---CATGAGATCTTAAGATGCATACAAATT 899
R4 -----TCATCATCAACGTCGCCGACA---CATGAAATCTTAAGATGCATACAAATT 913
R7 -----TCATCACCACGTCGCCGACA---CATGAAATCTTAAGATGCATACAAATT 922
R3 -----TCATCATCAGCACTCCGGACAGTACGTGAAATCTTGAGATGTATACAAATT 924
R2 CTGTTATCACTGCCATCAACATATCAACCG---CAAGAAGTCTTACACTGCATCCAATT 916
R8 CTGTCAACATTTGTCATCAACATTTCAACCA---CAA---GTCATTAAATGCATACAAATT 895
R5 -----TTGTCATCAACATTTCAACCA---AAGAAGTCTTAAATGCATACAAATT 894
* * * * *

```

R1  GGTCTCTTGTGTGTTCAAGAACGTGCGGACGACAGACCAATGATGTCTTCGGTAATTTTG 957
R9  GGTCTCTTGTGTGTTCAAGAACGTGCGGACGACAGACCAATGATGTCTTCGGTAATTTTG 957
R6  GGTCTTTTGTGTGTTCAAGAACGTGCGGACGACAGACCAATGATGTCTTCGGTAATTTTG 959
R4  GGTCTATTGTGTGTTCAAGAACGTGCCGAAGACAGACCAAGTAATGTCTTCGGTAATGGTG 973
R7  GGTCTATTGTGTGTTCAAGAACGTGCCGAAGACAGACCAAGTAATGTCTTCGGTAATGGTG 982
R3  GGTCTCTTGTGTGTTCAAGAACGTGCTGAAGACAGACCAAGTATGTCTGACTGTTATGGTG 984
R2  GGTCTCTTGTGTGTTCAAGAACATGACAGAGAACAGACCAATGATGTCTGCTGTGGTTTGG 976
R8  GGTCTTTTGTGCGTTCAAGAACGTGACAGACGACAGACCAACGATGTCTGCTGTGGTTTGG 955
R5  GGTCTCTTGTGTATTCAAGAACGTGCGGTGCACAGACCAACGATGTCTGCTGGTGGTTTGG 954
    *****

R1  ATGTTAGGAAGCGAAMCAACGGCTATTCTCAGCCTAAAACGCCCGGTTTTTGCBCGTGGG 1017
R9  ATGTTAGGAAGCGAAMCAACGGCTATTCTCAGCCTAAAACGCCCGGTTTTTGCBCGTGGG 1017
R6  ATGTTAGGAAGCGAAMCAACGGCTATTCTCAGCCTAAAACGCCCGGTTTTTGCBCGTGGG 1019
R4  ATGCTCGGAAGCGAAMACTACGGCTATTCTCAGCCTAAAACGTCCTGGTTATTGTGTGGG 1033
R7  ATGCTCGGAAGCGAAMACTACGGCTATTCTCAGCCTAAAACGTCCTGGTTATTGTGTGGG 1042
R3  ATGCTTGGGAGCGAAMACTACGGCTATTCTCAGCCTAAAACGCCCGGTTTTTGCBCGTGGG 1044
R2  ATGCTTGGGAAGTGAAGCAACAGAGATTCTCAGCCTAAACGCCCGGTTATTGCGTCATA 1036
R8  ATGCTTGGGAAGTGAAGTAAACAGAGATTCTCAGCCTAAACGCCCGGTTATTGCGTCA— 1013
R5  ATGCTTGGGAAGTGAAGCAACAGCGATTCTCAGCCTAAACGCCCGGTTATTGCGCTATA 1014
    *** * * * * *

R1  AAAAGTCTTTTGATA-----GTAAACAGCGTGAA--GATAGATCATGG 1059
R9  AAAAGTCTTTTGATA-----GTAAACAGCGTGAA--GATAGATCATGG 1059
R6  AAGAGTCTTTTGATA-----GTAAACAGCGTGAA--GATAGATCATGG 1061
R4  AGAAATCTCCTTGAGACTGAATCGTCAAGTACACAGCGAGAA--GATGAGT---GG 1087
R7  AGAAATCTCCTTGAGACTGAATCGTCAAGTACACAGCGAGAA--GATGAGT---GG 1096
R3  AGAAGTCTTCTTGAGACCGAATTGTCTGCGGGTACACAGCGCGAT--GATGAAT---TG 1098
R2  AGAAGTCTTATGAACCTTGATCCTTCATCAAGTAAGAAGTGTGATGACAATGAATCCTGG 1096
R8  -GAAGTCTTATGAACCTTGATCCTTCATCAAGTAGACAGTGTGACGACGATCAATCCTGG 1072
R5  CC.AAGTTTTTATGCAAAATATCCTTCTCGAGTAGGCCATCCGACAACGATGAATCCTGG 1074
    * * * * *

R1  ACTGTGAACCAAATCACTTTCTCGATCATCGATGCCCGGTAA 1101
R9  ACTGTGAACCA----- 1070
R6  ACTGTGAACCAAATCACTTTCTCGATCATCGATGCCCGGTAA 1103
R4  ACGGCGAACCAGATCACTCAGTCAGTCATCGATGCCCGGTAA 1129
R7  ACAGCGAACCAGATCACTCAGTCAGTCATCGATGCCCGGTAA 1138
R3  TCAGTGAACCAAATCACCTCTCAGTCATCGATGCCCGGTAA 1140
R2  ACCGTGAACCAAGTACACCTGCTCAGTCATCGATGCCCGGTAA 1138
R8  ACGGTGAACCAAGTACACCTGTTCAAGTCATCGATGCCCGGTAA 1114
R5  ACGATGAACGAGTACGCCTGCTCAGTCATCGATGCCCGGTAA 1116
    * * * * *

```

그림 5. *SRK*의 kinase domain의 PCR-RFLP 분석에 의해 서로 다른 9개의 S haplotype에 대한 4번째에서 7번째 exon까지 sequencing 결과. Boldface letters의 TAA는 종지코돈을 나타냄. Uppercase letters는 exon, Lowercase letters는 intron 영역임. Asterisk은 보존된 DNA 염기서열을 나타냄.

나. F₁ 순도 검정용 primer 합성 및 검정

시판되고 있는 F₁ 종자에 있어서 PCR을 이용한 순도를 검정하기 위하여 PCR-CAPS에 의해 동정된 육성계통의 *SRK*의 kinase domain 영역에서 각 S haplotype별 특이적 primer를 합성하였다(표 2).

표 2. S haplotype에 대한 F₁ 순도 검정용 primer의 염기서열과 예상 단편 크기

primer 명		염기서열	적용 S haplotype	예상 크기(bp)
PC1	R1f	GAGACTGATTGCAAGGCTTC	R1	1,100
	R1r	ATCGATGATCGAGAAAGTGA		
PC2	SRK4f	TGATGAGTTTATGAATGAGGTGA	R2	500
	R2r	AGTTTGSTTAAAACGATGATACT		
PC4	SRK4f	TGATGAGTTTATGAATGAGGTGA	R4	200
	R4r	AACATGTTAAATAATCCCCG		
PC5	R5f	ACTCTCGAGATTGCCAAAAC	R5	500
	SRK7r	GCTTTCATATTACCGGCATCGATGA		
PC8	R8f	CCTTTTAATTGCTACTCAGC	R8	700
	SRK7r	GCTTTCATATTACCGGCATCGATGA		

F₁ 품종 생산에 사용빈도가 높은 5개 S haplotype에 대한 F₁ 종자 순도 검정용 primer를 합성하였다. F₁ 종자 순도 검정용 primer는 S haplotype별 specific하게 증폭되고, 증폭된 단편은 크기로 구분할 수 있게 합성하였다. PCR 결과, S haplotype에 대해 specific하고, 단편의 크기로부터 구분이 가능하였다(그림 6).

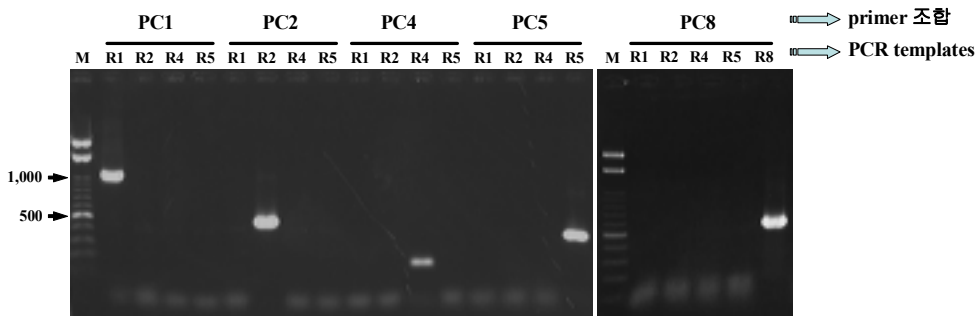


그림 6. F₁ 순도 검정용 primer의 각 S haplotype별 PCR 증폭 양상.

R1 S haplotype를 가진 모주에 R2 S haplotype를 가진 화분의 교배에 의해 생산되는 F₁ 종자에 대한 순도검정을 실시하였다. 모주는 primer 조합 PC1에서 R1 S haplotype의 특이적 단편인 1,100bp의 단일 단편이 증폭되었으며, 화분친은 PC2의 primer 조합에서 500 bp의 특이적 단편이 증폭되었다. 순수한 F₁ 종자에서는 양친의 S haplotype에 대한 특이적 두개의 단편이 증폭되어야 되지만, 4번에서는 모친의 R1 specific 단편만 증폭되었다(그림 7).

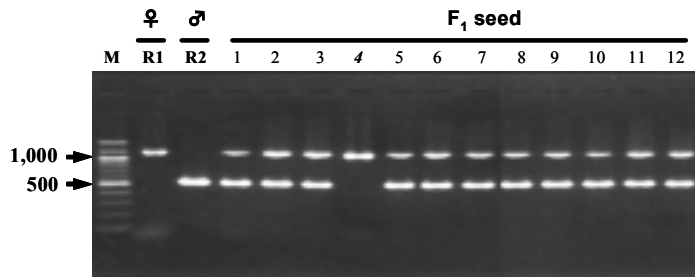


그림 7. R1과 R2의 S haplotype간 교배의해 생산된 F₁ 종자의 순도 검정 결과.

또한, R5과 R8의 S haplotype를 가진 육성계통의 양친의 교배에 의해 얻어진 F₁ 종자의 순도 검정은 PC5와 PC8의 primer 조합에 의해 검정결과, R5의 S haplotype을 가진 모친은 500 bp의 단일 단편, R8의 S haplotype을 가진 화분친은 PC8의 primer 조합에서 700 bp의 PCR 단일 단편이 증폭 되었다. 정상적인 F₁ 종자는 양쪽 primer 조합에서 700과 500 bp의 두 단편이 증폭 되었으나 단일 단편의 증폭산물을 보이는 8과 9번의 F₁ 종자는 selfing이나 R8 S haplotype 이외의 다른 화분의 교배에 의한 오염일 것으로 추정할 수 있었다(그림 8).

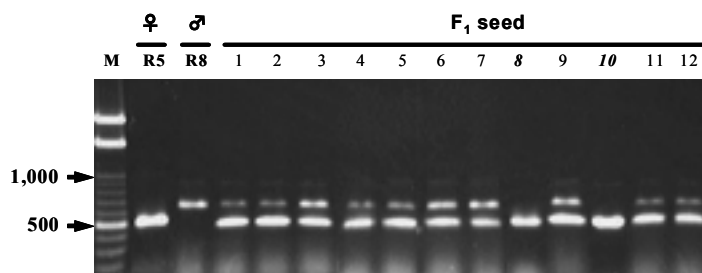


그림 8. R5와 R8의 S haplotype간 교배의해 생산된 F₁ 종자의 순도 검정 결과.

4. 고찰

시판되고 있는 무의 대부분은 자가불화합성 체계를 이용하여 F₁ 잡종 종자를 생산하고 있기 때문에 S haplotype의 동정은 육종과정에 있어서 절실히 요구되어지며, 자가불화합성은 실질적으로 순수한 F₁ 종자 생산이 불가능하다. 즉, selfing 종자의 혼입 방지와 순수한 F₁ 종자 생산이 오랜 기간동안 육종가들 에게 중요한 관건이었다. S haplotype을 동정하기 위하여 사용되는 방법은 육성계통을 교배하여 화분관 신장을 관찰하는 화분관 검경법(Zuberi & Lewis 1981)과 결실율을 조사하는 방법 등이 있다. 이러한 방법들은 개화기까지 작물재배에 시간과 노력이 많이 소모되는 단점과 환경요인과 식물 생리상태에 따라 자가불화합성 현상이 불안정하며, 또한 양친의 개화기를 맞추어야 하는 문제점들이 있다. 최근 자가불화합성 유전자를 이용한 PCR-RFLP에 의한 S haplotype의 동정 기술들이 보고 되어 있다. S-haplotype의 동정은 양배추류(*B. oleracea*)에서 50개(Ockendon 1974), 배추(*B. campestris*)에서 30개(Nou et al. 1993), 무(*R. sativus*)에서 18개 이상(Sakamoto et al. 1998)이 동정되었다.

본 연구는 육성계통에 있어서 PCR-CAPS에 의한 S haplotype의 동정과 F₁ 품종에 있어서 효율적인 종자 순도 검정용 primer를 개발하였다. SRK3f과 SRK7r의 primer를 이용한 PCR 증폭한 결과 모든 육성계통에 약 1,100 bp의 단일단편의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 증폭된 산물은 제한효소로 소화하여 S haplotype을 동정하였으며, cloning하여 SRK kinase domain의 S haplotype간 DNA 염기서열을 결정하였다. PCR 산물을 *Hinf* I과 *EcoR* I으로 이중 소화한 결과 67개의 육성계통은 9개의 서로 다른 밴드패턴으로 분류되었으며, 이는 9개의 S haplotype(R1~R9)의 동정되었다.

또한, 육성계통의 교배에 의해 생산된 시판 F₁ 종자에 있어서 PCR을 이용한 순도를 검정하기 위하여 SRK의 kinase domain 영역에서 각 S haplotype 특이적 primer를 합성하였다. 또한, S haplotype간 증폭산물의 단편 사이즈에 차이를 두어 PCR로 F₁ 순도검정 방법을 개발하였다.

F₁품종 생산에 사용빈도가 높은 5개 S haplotype에 대한 F₁ 종자 순도 검정용 primer를 합성하였다. F₁ 종자 순도 검정용 primer는 S haplotype별 specific하게 증폭되고, 증폭된 단편은 크기로 구분할 수 있게 합성하였으며, PCR 결과, S haplotype에 대해 specific하고, 단편의 크기로부터 구분이 가능하였다.

R1과 R2, R5와 R8의 S haplotype 가진 화분의 교배에 의해 생산되는 F₁ 종자에 대한 순도검정을 실시하였다. 양친의 호모 계통에 있어서는 각각 특이적 단일 단편이 증폭 되었으며, 순수한 F₁ 종자에 있어서는 양친의 특이적 두개의 단편이 증폭되었다. 그러나 F₁ 종자 중 모친의 단일 단편만 증폭된 개체가 발견되었으며, 이러한 종자는 selfing이나 화분친 이외의 S haplotype의 교배에 의한 오염일 것으로 추정할 수 있게 되었다.

이러한 F₁ 순도 검정용 primer는 양친의 S haplotype을 PCR-CAPS에 의해 동정 후 각 양친의 S haplotype을 특이적으로 PCR 증폭하며, 증폭된 산물의 크기로 구분할 수 있는 primer는 간단히 F₁ 종자의 순도를 검정할 수 있었으며, 육종 현장에서 활용이 가능할 것으로 예상된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구 분	연구목표 및 평가의 착안점		
	착 안 사 항	달성도 (%)	기여도
1차년도 (2001)	○ 공시 재료로부터 고분자 DNA 회수	100	대
	○ genomic DNA에 제한효소 처리	100	대
	○ PFGE 영동 후 거대 단편회수	100	대
	○ 자가불화합성 유전자 관련 primer 선발 및 합성	100	대
	○ PCR 증폭	100	대
	○ PCR-RFLP분석	100	대
	○ 자가불화합성 유전자형 결정법 개발	100	대
2차년도 (2002)	○ 화분측 자가불화합성 유전자 관련 primer 선발 및 합성	100	대
	○ PCR 증폭 및 RT-PCR	100	대
	○ cloning 및 sequencing	100	대
	○ data분석 및 정확한 S-genotype 결정	100	대
	○ BAC vector구축 및 삽입	100	대
	○ BAC vector 형질전환	100	대
	○ SLG, SRK probe를 이용한 Southern 분석	100	대
○ Subcloning에 의한 거대 DNA단편의 분석	95	중~대	
○ BLAST 분석 및 염기배열 분석	95	중~대	
3차년도 (2003)	○ 화분측 및 주두측 자가불화합성 유전자 관련 primer 선발 및 합성	100	대
	○ PCR 증폭 및 RT-PCR	95	중~대
	○ cloning 및 sequencing	95	중~대
	○ data분석 및 정확한 S-genotype 결정	100	대
	○ PCR-RFLP profile 작성 및 RT-PCR	95	대
	○ 분획된 DNA 단편 분석에 의한 S-genotype 동정	100	대
	○ BAC vector구축 및 삽입	100	대
	○ BAC vector 형질전환	100	대
○ Subcloning에 의한 거대 DNA단편의 분석	95	중~대	

최종 평가	○ BAC vector를 이용한 거대 genomic DNA 단편 (S-locus 포함) cloning 및 분석	98	대
	○ 주두측 자가불화합성 유전자의 cloning 및 염기서 열 결정에 의한 S-genotype 결정	100	대
	○ 화분측 발현 유전자의 탐색 및 동정	95	대

제 2 절 관련 분야의 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 자가불화합성 유전자를 포함한 거대한 유전자를 cloning함으로써 자가불화합성 유전자의 물리적 구조와 특성을 분석하였음
- 나. 자가불화합성 유전자의 주변 유전자들의 특이성 분석은 무의 자가불화합성 기구해석의 중요한 기초정보를 제공하였음
- 다. 화분측에서 발현하는 유전자의 동정은 지금까지 알지 못했던 화분측 자가불화합성 유전의 특성을 분석할 수 있었음
- 라. 기존의 유전자원과 앞으로 도입되는 유전자원의 자가불화합성 유전자를 조기 및 대량 분류에 이용되었음
- 마. 개화기의 불일치로 자가불화합 여부를 교배를 통하여 결정하기 어려웠던 계통들 간에 화합 및 불화합 여부를 쉽게 검정할 수 있었음
- 바. 자가불화합성 유전자의 분석으로 일대 잡종 육성 기술의 향상에 기여함
- 사. 동정된 자가불화합성 유전자는 형질전환용 donor gene로 이용

2. 경제 · 산업적 측면

- 가. 우성, 열성 자가불화합성 유전자를 쉽게 판단할 수 있는 특이적 primer를 선발함으로써 1차적으로 좋은 교배조합을 작성할 수 있었음
- 나. 유묘기에 단시간 내에 자가불화합성 인자를 판별할 수 있게 됨으로써 저온 처리 및 개화기까지 작물을 재배하는데 필요한 비용을 절감할 수 있었음
- 다. 생산비 및 품질면에서 우수한 종자생산으로 우리 종자의 대외 경쟁력을 제고함으로써 수출 종자에 대한 경쟁력을 갖출 수 있게 함

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 가. 자가불화합성 유전자와 계통, 품종 및 종간의 유연관계를 파악 하므로 새로운 형질의 육성계통 생산에 활용 연구가 필요함
- 나. 고품질의 F₁ 생산을 위한 자가불화합성 유전자의 S-genotype간의 우열관계 규명과 우열관계에 관여하는 유전자의 동정이 요구됨
- 다. *Brassica*와 *Raphanus*의 S 유전자의 비교에 의한 자가불화합성의 유전양상과 배추과의 진화에 대한 연구가 요구됨
- 라. 식물세포의 신호전달계의 규명 및 자기 화분의 인식 후 자가불화합성의 신호전달 체계의 규명을 위한 연구가 요구됨

2. 타 연구에의 응용

- 가. S 유전자좌의 분석은 무에 있어서 주두측과 화분측의 자가불화합성 유전자의 기능해석에 응용됨
- 나. 자가불화합성 유전자를 이용한 PCR-RFLP 및 PCR-CAPS법은 배추속 식물의 포자체 자가불화합성 유전자원 동정, 평가 및 활용에 응용됨
- 다. 동정된 자가불화합성 유전자는 F₁ 순도 검정용 primer의 작성에 응용됨

3. 기업화 추진방향 및 금후의 활용

- 가. 화분측 및 주두측에서 발현하는 자가불화합성 유전자의 동정은 gene bank에 등록하여 무의 자가불화합성 연구의 자료로 활용
- 나. 동정된 자가불화합성 유전자는 gene silencing 및 강활력 자가불화합성 계통 육성을 위한 형질전환용 donor gene로 활용
- 다. 자가불화합성 유전자의 분석으로 개화기 불일치에 의한 계통간의 조합 작성 및 일대 잡종 육성 기술 향상에 활용
- 라. 자가불화합성 유전자의 S-genotype과 자가불화합성의 정도 분석에 의한 강약 조절 유전자의 해명에 활용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 배추과 식물의 자가불화합성 연구 현황 및 향후 연구 방향

1. 자가불화합성에 있어서 자타인식을 제어하는 S 유전자 좌

십자화과(Brassicaceae) 채소품종의 대부분은 잡종강세를 이용한 1대잡종 품종(hybrid)으로 자가불화합성을 이용해서 실용화 되어있다. 자가불화합성은 자웅의 양생식기관이 정상임에도 불구하고 자가의 화분을 자가의 주두에 수분할 경우 수정에 이르지 못한 현상으로 종내의 다양성을 유지하기 위한 시스템의 하나로써, 화분과 주두의 상호인식 시스템이다(그림 1).

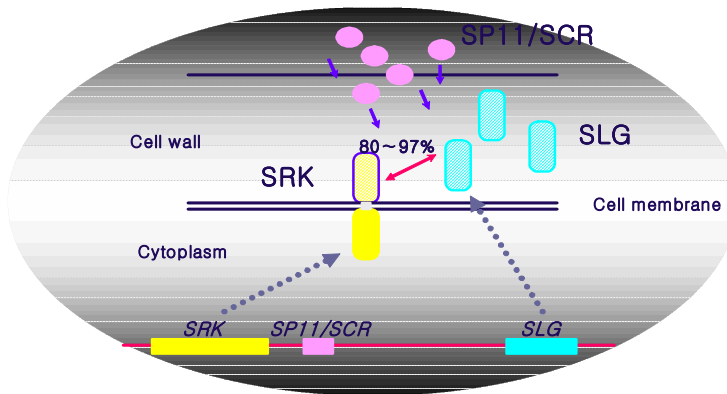


그림 1. 자기화분 인식 모델. 자기화분이 수분되면, 화분의 표층에 있는 SP11이 유두세포 표면에 존재하는 SLG와 SRK의 S-domain 의해 인식된다. 그 시그널은 SRK의 kinase domain에 전달되고 자기 인산화에 의해 인식된다.

배추과 식물의 자가불화합성은 1 유전자좌 S 복대립 유전자계에 의해 제어된다. 현재까지는 S 유전자좌상에 있는 S 대립유전자간의 서로 다른 아미노산 배열을 가지고, 주두에서 특이적으로 발현하는 유전자로서 유리형 당단백질을 코딩하는 SLG(S locus glycoprotein)과 그의 SLG와 높은 상동성의 영역을 receptor로 갖는 serine/threonine protein kinase를 코딩하는 SRK(S receptor kinase)유전자가

동정되어 있다. 발현양식으로부터 그의 양자 혹은 몇 개의 유전자 산물이 주두측의 인식물질 즉, 자기의 화분에 대한 signal를 받는 주두측의 receptor로써 생각되어진다.

2. 주두측 S 유전자의 구조와 기능해석

S 유전자좌의 실체를 명확히 하는 연구는 먼저, *B. campestris*와 *B. oleracea*로부터 주두측 인자의 분리로부터 시작 되었으며, 1977년 S 유전자좌와 연쇄되어 있는 주두 특이적 단백질로써 S 당단백질(S locus glycoprotein; *SLG*)가 발견되었다. *SLG*는 분비형 당단백질로써 분자 중에 가변형지역이 존재하며, C 말단쪽의 12개의 cysteine 잔기가 보통 보존되어 있다. 지금까지 동정된 *SLG*는 상동성에 기초하여 정리하면 class I과 class II의 두 그룹으로 분류가 가능하며, 같은 class 내의 상동성은 80~90%, class간에는 60%로 낮은 상동성을 보였다. 또한, *SLG*와 함께 주두측에서 특이적으로 발현하며, *SLG*와 높은 상동성을 보이는 영역(S-domain)과 막관통영역(transmembrane domain) 그리고 serine/threonine형의 단백질 인산화 효소(protein kinase)영역을 가진 *SRK*(S receptor kinase)가 발견되었다(그림 2). 이러한 발견은 자가불화합성 외부의 신호를 세포내부에 전달하는 기본 분자는 receptor kinase이며, 화분인자와의 결합은 S domain이 수행하며, 세포내부에서의 시그널 전달은 serine/threonine의 인산 cascade로 예상되었다.

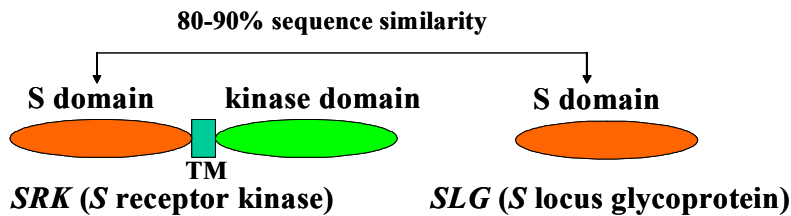


그림 2. 주두측 자가불화합성 유전자인 *SLG*와 *SRK*의 구조.

동정된 *SLG*와 *SRK*가 자가불화합성의 인식반응에 직접적인 관여 여부에 관한 연구는 형질전환체와 이들 유전자 변이체의 해석으로부터 증명되었으며, *SLG*와 *SRK*가 모두 관여하고 있는 가능성과 어느 개체에서는 *SLG*의 중복이 보여 짐에

따라 *SLG*는 자가불화합성에 필요하지 않은 가능성도 시사되었다. *SLG* 및 *SRK*의 형질전환에 의한 분석결과, *SLG*는 자가불화합성의 인식반응에는 직접 관여하지 않지만, 자가불화합성을 안정시키며, *SRK*의 자가불화합성 반응을 강화하기 위해서는 주두에 존재하는 것으로 예상되었다.

3. 화분측 S 유전자의 구조와 기능해석

화분측 S 유전자로써 기대되는 조건은 4가지가 있다. 첫째, 1 유전자 좌로 설명 가능하는 것으로부터 S 유전자 좌상 즉, *SLG/SRK*의 근방에 존재해야 한다. 둘째, 화분측에 특이적으로 발현해야 한다. 셋째, S 대립유전자간에 변이가 있어야 한다. 마지막으로, 주두측의 *SLG* 혹은 *SRK*의 receptor domain과 물리적으로 상호작용 해야 한다. 이러한 조건중 첫째의 조건에 주목해서 *SLG* 혹은 *SRK*를 기점으로 한 염색체 탐색을 통해 화분측 S 유전자를 동정하는 것이 세계적으로 행하여졌었다. 그 결과 *SLG*⁹/*SRK*⁹의 근접해 있는 영역으로 2개의 약 특이적 발현 유전자(*SAEI*, *SP11/SCR*)가 동정되었다(Suzuki et al. 1999, Watanabe et al. 1999). *SAEI*에 관해서는 Southern해석으로 다른 S 유전자 계통간에 다형성이 관찰되지 않는 것으로부터 화분측 S 유전자가 아닌 것으로 추측 되었다. 한편, *SP11/SCR*에 관해서는 대립유전자로써 가능성이 있는 clone이 S⁵²계통으로부터 단리 되었다(Takayama et al. 2000). 또한 동일한 구조를 가진 유전자가 일본 나라선단과학기술대학(NAIST)의 그룹에서 S⁸, S¹²계통으로부터 단리 되었다. 이들 유전자는 cysteine이 풍부한 신규의 PCP(Pollen Coat Protein)를 코드하고 있으며, 바이오어세이와 형질전환법을 이용하여 *SP11/SCR*이 화분측 S 유전자임이 증명되었다(Takayama et al. 2000, Shiba et al. 2001). 화분측 S 유전자 *SP11*의 특징으로써 signal peptide영역이 매우 보존되어 있기 때문에 대립유전자의 염기배열로부터 primer를 설계하여 RT-PCR에 의해 *B. compestris*의 호모계통으로부터 *SP11* 유전자의 증폭이 시도 되었으며, 많은 수의 *SP11*이 동정되었다. 또한 *SP11*이 S 유전자좌와 연쇄되어 있는가를 확인하기 위하여 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) gel blot분석을 통해 어느 계통이든 *SP11*과 *SLG*의 probe에서 같은 사이즈의 밴드가 검출되었으며, 밴드크기는 60-104 kb의 범위였다. 그 결과로부터 *SP11*과 *SLG/SRK*는 매우 연쇄되어 있음이 해명되었다.

그러나 화분측에서 열성을 보이는 class II S haplotype은 RT-PCR에 의해 좀

제 7 장 참고문헌

- Bateman, A. J. (1995) Self-incompatibility systems in angiosperms. III. *Cruciferae. Heredity* **9**, 52-68
- Boyes, D. C., Chen, C.-H., Tantikanjana, T., Esch, J. J. and Nasrallah, J. B. (1991) Isolation of a second *S*-locus related cDNA from *Brassica oleracea*: genetic relationships between the *S* locus and two related loci. *Genetics* **127**, 221-228.
- Boyes, D.C. and Nasrallah, J.B (1995) An anther-specific gene encoded by an *S* locus haplotype of *Brassica* produces complementary and differentially regulated transcripts. *Plant cell* **7**, 1283-1294
- Cock, J M., Stanchv, B., Delorme, V., Croy, R. R > C. and Dumas, C. (1995) *SLR3*: a modified receptor kinase gene that has been adapted to encode a putative secreted glycoprotein similar to the *S* locus glycoprotein. *Mol Gen Genet* **248**, 151-161.
- Delorme, V., Giraanton, J.-L., Hatzfeld, Y., Friry, A., Heizmann, p., Ariza, M. J., Dumas, D., Gaude, t. and Cock, J. M. (1995) Characterization of the *S* locus genes, *SLG* and *SRK*, of the *Brassica S*³ haplotype: identification of a membrane-localized protein encoded by the *S* locus receptor kinase. *Plant J.* **7**, 429-440.
- Dickinson HG. (1995) Dry stigmas, water and self-incompatibility. *Sex Plant Reprod* **8**, 1-10
- Doughty, J., Dixson, S., Hiscock, S.J., Willis, A.C., Parkin, I.A.P and Dickinson, H.G. (1998) PCR-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the *S* locus glycoproteins, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell* **10**, 1333-1347
- Dwyer, K. G., Chao, A., Cheng, B., Chen, C.-H. and Nasrallah, J. B. (1989) The *Brassica* self-incompatibility multigene family. *Genome* **1**: 969-972.
- Dwyer, K. G., Balent, M. A., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1991) DNA sequences of self-incompatibility genes from *Brassica campestris* and

- Brassica oleracea*: polymorphism predating speciation. *Plant Mol Biol* **16**: 481 -486
- Dwyer, K. G., Kandasamy, M. K., Mahosky, D. I., Acciai, J., Kudish, B. I., Miller, J. E., Nastallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (1994) A superfamily of S locus-related sequences in *Arabidopsis*: diverse structures and expression pattern. *Plant Cell* **6**: 1829 -1843.
- Franklin, T. M., Oldknow, J. and Trick, M. (1996) *SLR1* function is dispensable for pollen tube growth and pollen tube attraction processes in *Brassica*. *Sex Plant Reprod* **9**: 203-208.
- Fukai, E., Fujimoto, R. and Nishio, T. (2003) Genomic organization of the S core region and the S flanking regions of a class-II S haplotype in *Brassica rapa*. *Molecular Genetics and Genomics* **10**: 1007-1022.
- Glavin, T. L., Goring, D. R., Schafer, U. and Rothstein, S. J. (1994) Features of the extracellular domain of the S-locus receptor kinase from *Brassica*. *Mol Gen Genet* **244**: 630 -637
- Goring, D. R. and Rothstein, S. J. (1992) The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* **4**: 1273-1281.
- Hatakeyama, K., Watanabe, M., Takasaki, T., Ojima, K. and Hinata, K. (1998a) Dominance relationships between S-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity* **79**: 421 - 427.
- Hatakeyama, K., Takasaki, T., Watanabe, M. and Hinata, K. (1998b) Molecular characterization of S locus genes, *SLG* and *SRK*, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica rapa* L. *Genetics* **149**: 1587 - 1597.
- Hatakeyama, K., Takasaki, T., Watanabe, M. and Hinata, K. (1998c) High sequence similarity between *SLG* and the receptor domain of *SRK* is not necessarily involved in higher dominance relationships in stigma in self-incompatible *Brassica rapa* L. *Sex Plant Reprod* **11**: 292 - 294.
- Heslop-Harrison J. (1975) Incompatibility and the pollen stigma interaction. *Annu Rev Plant Phys* **26**, 403-425
- Hinata, K. and Nishio, T. (1978) S-allele specificity of stigma proteins in

- Brassica oleracea* and *Brassica campestris*. *Heredity* **41**: 93 -100
- Hinata, K. and Nishio, T. (1980) Self-incompatibility in Crucifers. In: Tsunoda S, Hinata K, Gomez-Campo C (eds) *Brassica crops and wild allies*. *Hapan Sci Soc Press Tokyo pp* 223-234.
- Hinata, K. and Nishio, T. (1981) Con A-Peroxidase method: an improved procedure for staining S-glycoproteins in celluloseacetate electrofocusing in crucifers. *Theor Appl Genet* **60**: 281-283.
- Hinata, K., Watanabe, M., Yamakawa, S., Satta, Y., and Isogai, A. (1995) Evolutionary aspects of the S-related genes of the *Brassica* self-incompatibility system: synonymous and nonsynonymous base substitutions. *Genetics* **140**: 1099 -1104.
- Horisaki, A., Tanaka, N. and Niikura, S. (2003) The effectiveness of insect-pollination test to evaluate the level of self-incompatibility and their genetic analysis in radish(*Raphanus sativus* L.) *Theor Appl Genet* **107**: 1009-1013
- Isogai, A., Tkayama, S., Shioawa, H., Tsukamoto, C., Kanbara, T., Hinata, K., Okazaki, K. and Suzuki, A. (1988) Existence of a common glycoprotein homologous to S- glycoproteins in two self-incompatible homozygotes of *Brassica campestris*. *Plant Cell Physiol* **29** : 1331-1336.
- Isogai, A., Yamakawa, S., Shiozawa, H., Takayama, S., Tanaka, H., Kono, T., Watanabe, M., Hinata, K. and Suzuki, A. (1991) The cDNA sequence of NS¹ glycoprotein of *Brassica campestris* and its homology to S-locus-related glycoproteins of *B. oleracea*. *Plant Mol Biol* **16**: 269-271.
- Kandasamy, M.K. et al. (1989) The S-locus glycoprotein of Brassica accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev Biol* **134**, 462-472.
- Kishi-Nishizawa, N., Isogai, A., Watanabe, M., Hinata, K., Yamakawa, S., Shojima, S. and Suzuki, A. (1990) Ultrastructure of papilla cells in *Brassica campestris* revealed by liquid helium rapid-freezing and substitution-fixation method. *Plant Cell Physiol* **31**: 1207-1219.
- Kumar, V. and Trick, M. (1993) Sequence complexity of the S receptor kinase gene family in *Brassica*. *Mol Gen Genet* **241**: 440 -446.

- Lalonde, B. A., Nasrallah, M. E., Dwyer, K. G., Chen, C.-H., Barlow, B. and Nasrallah, J. B. (1989) A highly conserved *Brassica* gene with homology to the *S*-locus-specific glycoprotein structural gene. *Plant Cell* **1**: 249-258.
- Lim, S.-H., Cho, H.-J., Lee, S.-J., Cho, Y.-H. and Kim, B.-D. (2002) Identification and classification of *S* haplotype in *Raphanus sativus* by PCR-RFLP of the *S* locus glycoprotein(*SLG*) gene and the *S* locus receptor kinase(*SRK*) gene. *Theor Appl Genet* **104**: 1253-1262.
- Luu, D.-T., Heizmann, P., Dumas, C., Trich, M. and Cappadocia, M. (1997) Involvement of *SLR1* genes in pollen adhesion to the stigmatic surface in Brassicaceae. *Sex Plant Reprod* **10**: 227-235.
- McCubbin A. G. and Kao T.-H. (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 333-364.
- Nasrallah M. E., Wallace D. H. (1967) Immunogenetics of self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. *Heredity* **38**: 391-396.
- Nasrallah, J. B., Kao, T.-H., Goldberg, M. L. and Nasrallah, M. E. (1985) A cDNA clone encoding an *S*-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* **318**: 263-267.
- Nasrallah, J. B., Kao, T.-H., Chen, C.-H., Goldberg, M. L. and Nasrallah, M. E. (1987) Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the *S*-locus of *Brassica oleracea*. *Nature* **326**: 617-619.
- Nasrallah, J. B., Yu, S.-M. and Nasrallah, M. E. (1988) Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea* : expression, isolation and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5551-5555.
- Nasrallah, J. B. (1997) Evolution of the *Brassica* self-incompatibility locus - a look into *S*-locus gene polymorphisms. *Proc. Natl Acad Sci USA* **94**: 9516-9519.
- Nettancourt, de, D. (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod* **10**: 185-199.
- Nikura, S. and Matsuura, S. (2001) Genetic variation of the self-incompatibility alleles (*S*-alleles) in the cultivated Radish(*Raphanus sativus* L.) by the PCR-RFLP. *Acta Hort* **546**: 359-365.

- Nishio, T. and Hinata, K. (1977) Analysis of S-specific proteins in stigmas of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. *Heredity* **38**: 391-396.
- Nishio, T. and Hinata, K. (1980) Rapid detection of S-glycoproteins of self-incompatible crucifers using Con-A-reaction. *Euphytica* **29**: 217-221.
- Nou, I. S., Watanabe, M., Isogai, A., Shiozawa, H., Suzuki, A. and Hinata, K. (1991) Variation of S-alleles and S-glycoproteins in a naturalized population of self-incompatible *Brassica campestris* L. *Japan J Genet* **66**: 227-239.
- Nou, I. S., Watanabe, M., Isuzugawa, K., Isogai, A. and Hinata, K. (1993a) Isolation of S-alleles from a wild population of *Brassica campestris* L. at Balccsme, Turkey and their characterization by S-glycoproteins. *Sex Plant Reprod* **6**: 71-78.
- Nou, I. S., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K. (1993b) Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex Plant Reprod* **6**: 79-86.
- Okamoto, S., Sato, Y., Sakamoto, K. and Nishio, T. (2003) Distribution of similar self-incompatibility (S) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. *Sex Plant Reprod* **17**: 33-39.
- Okazaki, K. and Hinata, K. (1984) Analysis of S-alleles and S-glycoproteins in F₁-hybrid varieties of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.). *Japan J Breed* **34**: 237-245.
- Roberts IN, Stead AD, Dckendon DJ, Dickinson HG. (1979) A glycoprotein associated with the acquisition of the self-incompatibility system by maturing stigmas of *Brassica oleracea* L. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8816-8820.
- Sakamoto, K., Kusaba, M. and Nishio, T. (1998) Polymorphism of the S-locus glycoprotein gene (SLG) and the S-locus related gene (SLR) in *Raphanus sativus* L. and self-incompatible ornamental plants in the Brassicaceae. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 397-403.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E. and Nasrallah, H.B. (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**, 1697-1700
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B.

- (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8816-8820.
- Stein, J. C., Nasrallah, J. B. (1993) A Plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase of *Brassica oleracea* L., encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Physiol* **101**: 1103-1106.
- Stein, J. C., Dixit, R., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (1996) *SRK*, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *Plant Cell* **8**: 429-445
- Stephenson, A.G., Doughty, J., Dixon, S., Elleman, C., Hiscock, S and Dickinson, H.G. (1997) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea* is located in the pollen coating. *Plant J* **12**, 1351-1359
- Suzuki, G., Watanabe, M., Toriyama, K., Isogai, A. and Hinata, K. (1995) Molecular cloning of members of the S-multigene family in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol* **36**: 1273-1280.
- Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M. and Hinata, K. (1999) Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in *SLG. SRK* region of the S⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* **153**, 391-400
- Suzuki, G., Watanabe, M., Kai, N., Matsuda, N., Takayama, S., Isogai, A. and Hinata, K. (1997b) Three repeated members of the S-multigene family are linked to the S-locus in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Mol Gen Genet* **26**: 257-265
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.-S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K. and Isogai, A. (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1290-1295.
- Takayama, S., Isogai, A., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K. and Suzuki, A. (1987) Sequences of S-glycoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* **326**: 102-104.
- Tantikanjana, T., Nasrallah, M. E., Stein, J. C., Chen, C.-H. and Nasrallah, J.

- B. (1993) An alternative transcript of the *S*-locus glycoprotein gene in a class II pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica oleracea* encodes a membrane-anchored protein. *Plant Cell* **5**: 657-666.
- Tantikanjana, T., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (1996) The *Brassica S* gene family molecular characterization of the *SLR2* gene. *Sex Plant Reprod* **9**: 107-116.
- Thompson, K. F. and Taylor, J. P. (1996) Non-linear dominance relationship between *S* alleles. *Heredity* **21**: 345-362.
- Trich, M. and Flavell, R. B. (1989) A homologous *S* genotype of *Brassica oleracea* expresses two *S*-like genes. *Mol Gen Genet* **218**: 112-117.
- Uyenoyama, M. K. (1995) A general least-squares estimate for the origin of sporophytic self-incompatibility. *Genetics* **139**: 975-992.
- Walker, J. C. and Zhang, R. (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the *S*-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* **345**: 743-746
- Watanabe, M., Nou, I. S., Takayama, S., Yamakawa, S., Isogai, A., Suzuki, A., Takeuchi, T. and Hinata, K. (1992) Variations in and inheritance of NS-glycoprotein in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol* **33**: 343-351.
- Watanabe, M., Takasaki, T., Toriyama, K., Yamakawa, S., Isogai, A., Suzuki, A. and Hinata, K. (1994) A high degree of homology exists between the protein encoded by *SLG* and the *S* receptor domain encoded by *SRK* in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol* **35**: 1221-1229.
- Watanabe, M., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A. and Hinata, K. (1998) Sequence comparison of four *SLR1* alleles in *Brassica campestris*(syn. *B. rapa*). *Sex Plant Reprod* **11**: 295-296.
- Yamakawa, S., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S., Satoh, S., Hinata, K. and Suzuki, A. (1993) The cDNA sequence of NS³-glycoprotein from *Brassica campestris* and its homology to related proteins. *Cell Physiol* **34**: 173-175.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.