최 종
연구보고서

GOVP 12009265

분자유전학적 표지를 이용한 십자화과작물의 자가불화합성 인자의 분류 및 채종체계확립

Classification of S-alleles in Brassica crops using molecular genetic markers and their application for seed production

연 구 기 관

흥농종묘 (주) 육종연구소

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “분자유전학적 표지를 이용한 십자화과작물의 자가불화합성 인자의 분류 및 채종체계확립에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 24.

주관기관명 : 흥농종묘(주)
총괄연구책임자 : 조영환
연구원 : 남상현
연구원 : 김명원
연구원 : 전세일
연구원 : 조화진
연구원 : 전병문
연구원 : 리왕영
연구원 : 박한용
연구원 : 나종현
연구원 : 안경구

협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 김병동
연구원 : 임선형
연구원 : 권진경
연구원 : 이제민
연구원 : 유은영
연구원 : 한명숙

요 약 문

Ⅰ. 제 목

분자유전학적 표지를 이용한 십자화과 작물의 자가불화합성 인자의 분류 및 채종 체계확립

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라의 주요 채소작물인 무, 배추 등은 이미 오래 전부터 자가불화합성 현상을 이용하여 F1 잡종을 생산하고 있으며, 이러한 기술은 주로 민간 종묘회사에 의해 이루어지고 있는데 그 육종 및 채종 기술은 가히 세계적인 수준이라고 할 수 있다. 그러나 자가불화합성을 이용한 채종 기술이 세계적인 것과는 대조적으로 우리 나라에서 가장 중요한 채소작물인 무나 배추의 자가불화합성 인자를 분류하고 상호작용을 구명하는 체계적인 연구는 거의 없었다. 특히, 현재 종묘회사에서 생산하고 있는 대부분의 십자화과 작물의 품종은 2개의 자식계통만을 이용하는 단교잡종이기 때문에 두 계통의 자가불화합성이 완벽해야 균일한 F1 종자를 생산할 수 있기 때문에 자가불화합 현상에 대한 기초연구가 절대 필요하다.

본 연구에서는 주요 십자화과 작물의 육성에 이용되고 있는 교배 모본의 자가불화합성 인자를 체계적으로 분류하고, 이를 F1 채종에 효율적으로 이용할 수 있는 기틀을 마련하며 나아가 분자유전학적 표지를 이용하여 조기에 신속한 방법으로 자가불화합성 인자를 판별할 수 있는 방법을 개발하고자 한다. 이를 위하여 관행적인 방법에 의한 자가불화합인자 분류 결과와 분자유전학적 표지를 이용한 분류의 결과를 상호비교분석하여, 분자유전학적 방법으로 자가불화합성

인자를 신속, 정확하게 판별하는 기술을 확립하고자 한다

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구를 수행하기 위하여 양배추, 브로콜리, 무를 재료로 사용하였다. 양배추, 브로콜리 그리고 무에 대한 결실율 및 결협율 조사를 통해 자가불화합성이 안정적인 계통들을 확보하고 이를 저온처리 하여 추대를 유도하여 재료로 사용하였다. 일반적인 교배시기에 맞추어 화분관 검경을 통한 인자의 분류를 시도하였고 동일한 재료로부터 genomic DNA를 분리하여 분자유전학적 방법(PCR-RFLP)을 이용하여 연구를 수행하였다.

- 양배추, 브로콜리, 무의 계통내 자가불화합 인자의 homozygosity 분석
- 양배추, 브로콜리, 무의 결협율·결실율 조사와 이를 통한 실험계통 선발
- 양배추/무 계통간 인공교배를 통한 자가불화합 인자의 분류
- 무 계통과 F1 교배를 통한 자가불화합 인자간 주두와 화분에서의 우열분석
- 무 SLG, SRK 유전자 분리를 위한 cDNA library 작성 및 이를 통한 자가불화합 관련 유전자 (SLG, SRK, SLR) cloning
- 무 SLG, SRK 유전자 염기서열 분석을 통한 primer 합성
- SLG, SRK primer를 이용한 PCR 및 PCR product cloning
- 여러 가지 제한효소를 이용한 계통별 PCR-RFLP profile 작성
- 무 Tester plant와 미 분류 계통간의 교배를 통한 자가불화합 인자 결정
- 화분관 검경을 통한 무 F2 분리세대에서의 자가불화합인자 분석
- PCR-RFLP를 이용한 미 분류 계통(무) 자가불화합 인자결정
- PCR-RFLP를 이용한 자가불화합 F2 분리세대의 SI allele 분리 pattern 분석
- PCR-RFLP를 이용한 F1 순도검정

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 무 10계통에 대한 자가불화합인자 결정 실험결과 서로 다른 8개의 인자로 분류되었고 PCR-RFLP를 이용한 실험에서는 1개의 계통을 제외한 7개의 서로 다른 인자로 분류되었다. 또한 화분관 검경을 통한 관행적 조사 방법과 PCR-RFLP를 이용한 조기 인자 조사결과가 일치하는 것으로 나타났다.
2. SI genotype이 확인되지 않은 11개의 무 계통에 대한 계통간 교배 결과 5개의 SI group으로 나눌 수 있었으며 관행적 조사 방법과 PCR-RFLP를 이용한 조기 조사 결과가 일치하는 것으로 나타났다.
3. 무 주두에서의 SI 인자간 우열관계를 알아본 결과 기본적으로 조사된 8개의 allele에 대하여 공동우성으로 나타났고, S1과 S6, 그리고 S3와 S7 간에는 정확한 우열관계를 판단 할 수 없었다.
4. 화분에서의 인자간 우열관계는 주두 와는 다른 양상을 보였으며 S1, S2, S6, S7, S8 간에는 공동우성, 그리고 S3, S4, S5는 이들에 대하여 열성을 나타내었다. S3는 S4, S5 에 대하여 우성으로 나타났으며, S4는 S5에 대하여 열성으로 나타났다.
5. 주두와 화분에서 모두 공동우성인 S1, S2에 대하여 뇌수분으로 얻은 F2 세대에 대한 SI allele의 분리양상 조사에서는 예상과는 달리 S1S1: S1S2: S2S2 = 4:11:24로 나타나 S2S2 한 방향으로 치우치는 결과를 보였다.
6. 양배추와 브로콜리를 재료로한 실험에서는 2년에 걸친 인공교배를 통한 화분관검경 결과가 재현성이 없고 화합과 불화합의 판정이 어려워 인자분류에 실패하였다. 이에 따라 PCR-RFLP system의 개발에도 일단 진전을 보지 못하였다.

이러한 결과들을 바탕으로 하여 PCR-RFLP 방법을 이용한 자가불화합 인자의 조기분류는

1. 기존의 유전자원과 앞으로 도입되는 유전자원의 자가불화합 인자 조기·대량 분류에 이용될 수 있다.
2. 개화기의 불일치로 자가불화합 여부를 교배를 통하여 결정하기 어려웠던 계통들 간에 화합 여부를 검정할 수 있다.
3. 무 외에 배추 나 양배추에 적용하여 이들 작물의 자가불화합 인자 분류에 이용 할 수 있다.
4. 효율적인 F1 채종을 위해 적합한 SI 인자 조합을 선정하게 됨으로써 채종시 자가수정으로 발생할 수 있는 불량 종자를 감소시킬 수 있다.
5. 유묘기에 단시간 내에 SI 인자를 판별할 수 있게 됨으로써 저온처리 및 개화기까지 작물을 재배하는데 필요한 비용절감 효과가 있다.
6. 생산비 및 품질면에서 우수한 종자생산으로 우리 종자의 대외 경쟁력을 제고함으로써 수출 종자에 대한 경쟁력을 갖게 한다.

Summary

This study was carried out for identifying genotypes of self-incompatibility of crucifer crops at their seedling stage by using PCR-RFLP. We selected radish, broccoli and cabbage based on homogeneity in their population. Fifty-five of cabbage, twenty-four of broccoli and thirty-eight of radish lines were tested for seed set and sib-cross. Through sib-cross we finally selected eleven lines of cabbage and ten lines of radish for pollen tube growth observation and PCR-RFLP. In case of cabbage we could not identify true genotype of each lines because pollen tube growth result was not uniform at each experiment. This variation prevent from further investigation, PCR-RFLP, then we failed to identify cabbage SI genotypes of each lines.

On the other hand, pollen tube growth observation in radish gave uniform result at three to six duplication. We obtained eight SI genotypes from ten inbred radish lines. This genotype distribution was consistent with result of PCR-RFLP. We needed specific primer pairs for amplification of SI related genes such as SLG, SRK or SLR for PCR-RFLP. We made cDNA library derived from whole flowers which were pooled from various radish lines. After we screened the library with cabbage SI genes as probe, we designed three primer pairs. One was for SLG class I and the other was for SLG class II. The third primer pair was for SRK. Using these primers we could identify seven SI genotypes from ten radish lines. Based on this result we further identified twelve radish lines which was not previously investigated for their SI genotype. As a result, we could classify twenty two radish lines to ten SI genotypes depend on their PCR-RFLP patterns and pollen tube growth analysis. All of the result

obtained from PCR-RFLP was consistent with pollen tube growth analysis result.

In order to identify a segregation pattern of SI allele thirty nine F2 population were analysed by both PCR-RFLP and pollen tube growth. The F2 plants were segregated to 4:11:24 for S1S1:S1S2:S2S2. This result deviated to normal distribution in F2 population. It should be needed to further analysis for another F2 population. In F1 hybrid analysis, PCR-RFLP band patterns of parents were exhibited with being combined on their progenies. This PCR-RFLP technique will reduce cost for radish breeding and shorten time which will be needed to identify SI genotype of each radish lines during breeding procedure. As a result, breeding efficiency will be improved by using PCR-RFLP technique.

Contents

Chapter 1. Introduction

Ⅰ. Research Purpose ---------- 1
Ⅱ. Literature review ---------- 5
1. Classification and identification of SI
2. Molecular studies of SI genes
3. Classification and identification of SI genotypes by using molecular approaches
4. Trends of SI research in Korea
Ⅲ. Research goals and its content ---------- 7
Ⅳ. Strategic plans ---------- 8
1. Principle investigation
2. Collaboration

Chapter2. Classification of SI genotypes in cabbage

Ⅰ. Classification of SI genotypes by using artificial pollination -- 10
1. Purpose
2. Materials and methods
3. Research procedures
4. Results

Chapter 3. Classification of SI genotypes in radish

Ⅰ. Classification of SI genotypes by using artificial pollination -- 18
1. Purpose
2. Materials and methods
3. Research procedures

4. Results

Chapter 4. Classification of SI genotypes by using PCR-RFLP in radish

Ⅰ. Classification of SI genotypes by using PCR-RFLP ---------- 34
1. Purpose
2. Materials and methods
3. Research procedures
1) PCR condition
2) Southern blot analysis
3) Silver staining
4. Results
1) Genomic DNA extraction
2) PCR amplification of SLG and SRK genes
3) Cloning and sequencing of PCR products
4) Classification of SI genotypes by using PCR-RFLP

Ⅱ. Identification of SI genotypes in unknown radish lines and segregation analysis of SI alleles in F2 population ---------- 60
1. Purpose
2. Materials and methods
3. Research procedures
4. Results
1) PCR of unknown radish lines by using SLG and SRK primer.
2) Classification of SI genotypes in unknown radish lines by using PCR-RFLP
3) Segregation analysis of F2 population by using PCR-RFLP
4) Purity test of F1 hybrid by using PCR-RFLP

목차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위 ---------- 1
1. 기술적 측면
2. 경제적 측면
3. 사회 문화적 측면
제2절 국내외 관련 기술의 현황 및 문제점 ---------- 5
1. 자가불화합성 인자의 분류 및 동정
2. 자가불화합성 유전자의 분자 생물학적 연구
3. 분자생물학적 방법에 의한 자가불화합성 인자의 분류 및 동정
4. 우리 나라의 경우
제3절. 연구개발 목표와 내용 ---------- 7
제4절. 추진전략 및 방법 ---------- 8
1. 주관연구기관
2. 협동연구기관

제 2 장 양배추 SI 인자 분류

제1절 인공교배를 통한 양배추 SI 인자분류 ---------- 10
1. 연 구 목 적
2. 연구에 사용된 재료
3. 연구수행방법
가. 양배추 및 브로콜리 파종, 육묘, 저온처리
나. 화분관 검경을 통한 자가불화합 계통 분류
다. 교배조합 작성 및 인공교배

라. 결협률 및 결실률 조사
4. 연구결과

제 3 장 무 SI 인자 분류

제1절 인공교배를 통한 무 SI 인자분류 ---------- 18
1. 연 구 목 적
2. 연구에 사용된 재료
3. 연구수행방법
가. 무의 파종, 육묘, 저온처리
나. 화분관 검경을 통한 자가불화합 계통 분류
다. 교배조합 작성 및 인공교배
라. 결협률 및 결실률 조사
4. 연구결과
가. 관행적 방법에 의한 무의 자가불화합성 인자의 분류

제 4 장 PCR-RFLP를 이용한 무 SI 인자 분류

제1절 PCR-RFLP를 이용한 무 SI 인자분류 ---------- 34
1. 연 구 목 적 ---------- 34
2. 연구에 사용된 재료 ---------- 34
3. 연구수행방법 ---------- 34
가. PCR 조건의 확립 ---------- 34
1) DNA 추출
2) PCR 반응 및 조건
3) 전기영동
나. Southern blot analysis ---------- 35

1) Transfer

2) Hybridization

다. Silver staining 조건 확립 ---------- 36

1) PCR 산물 extraction 방법 비교

2) Template 농도

3) Silver staining 방법

4. 연구결과 ---------- 38

가. 무 genomic DNA 분리 ---------- 38

나. Universal, SLG, SRK primer를 이용한 PCR ---------- 38

다. SLG, SRK primer를 이용한 PCR products의 cloning 및 sequencing ---- 43

라.PCR-RFLP를 이용한 자가불화합성 인자의 분류 ---------- 43

1) PCR 산물 extraction 방법 ---------- 43

2)Template 농도 ---------- 44

3) ClassI-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류 ----- 45

가) PCR-RFLP with *Taq*I

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

다) PCR-RFLP with *Msp*I

라) PCR-RFLP with *Rsa*I

마) PCR-RFLP with *Hae*III

바) PCR-RFLP with *Alu*I

4) ClassII-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류 ----- 51

가) PCR-RFLP with *Taq*I

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

다) PCR-RFLP with *Rsa*I

라) PCR-RFLP with *Hae*III

마) PCR-RFLP with *Alu*I

5) SRK 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류 --------- 56

가) PCR-RFLP with *Taq*I

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

다) PCR-RFLP with *Rsa*I

라) PCR-RFLP with AluI

6) PCR-RFLP를 이용한 무 계통의 자가불화합성 인자형
제2절 PCR-RFLP를 이용한 미확인 무 SI 인자분류 및 분리세대 검정 ---- 60
1. 연 구 목 적 ---------- 60
2. 연구에 사용된 재료 ---------- 61
3. 연구수행방법 ---------- 61
4. 연구결과 ---------- 61
가. SLG, SRK primer를 이용한 미확인 무 계통 SI인자의 PCR ---------- 61
나. PCR-RFLP를 이용한 미확인 무 계통에 대한 SI인자의 분류 ------- 65
1) ClassI-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류 --- 65
가) PCR-RFLP with *Taq*I
나) PCR-RFLP with *Tru*9I
다) PCR-RFLP with *Msp*I
라) PCR-RFLP with *Rsa*I
마) PCR-RFLP with *Hae*III
바) PCR-RFLP with *Alu*I
2) ClassII-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류 -- 71
가) PCR-RFLP with *Taq*I
나) PCR-RFLP with *Tru*9I
다) PCR-RFLP with *Msp*I
라) PCR-RFLP with *Rsa*I
마) PCR-RFLP with *Hae*III
바) PCR-RFLP with AluI
3) SRK 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류 ---------- 77
가) PCR-RFLP with *Taq*I
나) PCR-RFLP with *Tru*9I
다) PCR-RFLP with *Msp*I
라) PCR-RFLP with *Rsa*I
마) PCR-RFLP with *Hae*III
바) PCR-RFLP with *Alu*I
다. PCR-RFLP를 이용한 SI F2 분리세대에서의 분리 pattern 분석 ------ 83
1) PCR with class I-SLG specific primer
2) PCR/RFLP를 이용한 분리세대에서의 SI 인자의 분류

라. PCR-RFLP를 이용한 F1 순도검정 ---------- 86
1) PCR with class I-SLG specific primer
2) PCR with class II-SLG specific primer
3) PCR with SRK specific primer
4)PCR-RFLP with *Taq*I
5) PCR-RFLP with *Taq*I
6) 일대교잡종 순도검정확인

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 기술적 측면

농업에 있어 가장 기술 집약적이며 부가가치가 높은 분야는 새로운 품종을 육성하고 육성된 품종의 종자를 대량증식하는 육종과 채종기술이다. 우리 나라의 채소 품종은 완전 자가수정 작물인 상추를 제외하고 모두 1대 잡종 (F1)을 채종하고 있으며, 무, 배추, 양배추, 파, 양파, 고추 등 주요한 채소작물의 F1 채종에는 웅성불임 (MS)이나 자가불화합성 (SI)이 도입되어 노동력이나 경제적 측면에서 F1 채종 효율을 높이는 데 기여하고 있다. 본 연구에서는 주요 십자화과 작물의 육성에 이용되고 있는 교배 모본의 자가불화합성 인자를 체계적으로 분류하고, 이를 F1 채종에 효율적으로 이용할 수 있는 기틀을 마련하며 나아가 분자유전학적 표지를 이용하여 조기에 신속한 방법으로 자가불화합성 인자를 판별하는데 그 목적이 있다. 우리 나라의 주요 채소작물인 무, 배추 등은 이미 오래 전부터 자가불화합성 현상을 이용하여 F1 종자를 생산하고 있으며, 이러한 기술은 주로 민간 종묘회사에 의해 이루어지고 있는데 그 육종 및 채종 기술은 세계적인 수준이라고 할 수 있다. 특히 주년 생산을 가능케 한 품종 육종기술이나, 1대 잡종 종자를 경제적으로 생산하기 위한 자가불화합성의 실용화는 세계 정상의 수준이다. 그러나 자가불화합성을 이용한 채종 기술이 세계적인 것과는 대조적으로 우리 나라에서 가장 중요한 채소작물인 무나 배추조차도 자가불화합성 인자를 분류하고 상호작용을 구명하는 체계적인 연구는 거의 없었다. 특히, 현재 종묘회사에서 생산하고 있는 대부분의 십자화과 작물의 품종은 2개의 자식 계통만을 이용하는 단교잡종이기 때문에 두 계통의 자가불화합성이 완

벽해야 균일한 F1 종자를 생산할 수 있기 때문에 자가불화합 현상에 대한 기초 연구가 절대 필요하다. 자가불화합 계통을 효과적으로 이용하기 위해서는 대상 작물의 종내에 몇 종류의 자가불화합성 인자가 존재하며 자가불화합성 인자간에 어떠한 상호작용이 있는지에 대한 정확한 이해와 정보가 필요하다. 자가불화합 인자를 분류하고 상호작용을 밝히기 위해서는 자가불화합성 인자를 구분하는 방법이 확립되어야 한다. 현재 자가불화합성 인자를 구별하는 방법으로 가장 많이 쓰이는 방법은 인공교배 후 화분관 신장을 현미경으로 관찰하는 방법과 종자의 결실률이나 결협률을 분석하는 방법이 있다. 이 방법은 육성모본으로 사용할 계통들 간에 이면교잡을 통해서 자가불화합 인자를 분류·동정하고 인자들 간에 상호 우열관계를 알아내는 방법이다. 이 방법은 개화기까지 상당한 시간이 필요하고, 때로는 저온처리를 통해 개화를 유도해야 할 경우도 있다. 또한 작물을 재배하기 위해 많은 노동력과 포장면적을 필요로 할 뿐만 아니라 자가불화합성 유전자의 발현이 환경적인 요인과 식물체의 생리상태에 의해 영향을 받아 SI가 타파되는 문제점을 가지고 있다.

이러한 관행의 자가불화합성 인자 판별법을 대체할 수 있는 방법으로 현재까지 선진 외국에서 개발되어 있는 방법에는 주두 glycoprotein (S-glycoprotein)을 전기영동방법으로 분석하는 방법과 S-glycoprotein의 cDNA를 이용하여 RFLP 분석을 수행하는 두 가지가 있다. 전기영동방법은 주두에서 자가불화합성과 연관되었을 것으로 생각되는 glycoprotein을 등정점 전기영동법으로 분석하거나 glycoprotein의 antibody를 만들어서 분석하는 방법이다. 이 방법은 화합·불화합을 판별하기 위하여 양친의 개화시기를 맞출 필요도 없으며, antibody를 이용하면 주두 하나만 있어도 분석이 가능하다. 그러나 개화유도를 위한 저온처리 기간이 필요하고, 꽃이 있어야 분석이 가능하므로 긴 재배기간과 포장, 노력을 요구한다. 또한 분석할 수 있는 SI allele type이 몇 가지로 한정되어 있어 그 이용이 제한되어 있다. RFLP 분석방법은 유묘기에 SI 인자를 판별할 수 있고, 신뢰성이 있는 방법이기는 하나, 분석 시간이 많이 소요되고 고도의 기술을 요하기 때문에 실용적으로 이용하기에는 매우 어려움

이 많다.

한편, 분자생물학의 발전과 더불어 1985년 이후 자가불화합성 현상에 대한 심층적인 이해가 한층 가속적으로 진전되어 왔다. 즉 자가불화합성 현상에 관여하는 것으로 주목되는 물질인 S-glycoprotein의 아미노산 구성이 밝혀지고 S-유전자 좌의 여러 대립유전자의 염기 서열이 점차 밝혀짐에 따라, S-유전자 좌간의 염기 배열상의 특이성과 유사성이 매우 많이 밝혀졌다. 이미 선진 외국에서는 이 염기서열을 바탕으로 자가불화합성 인자를 분류하고 종자 순도검정에 이용하는 등의 연구가 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 먼저 관행적인 방법과 분자유전학적 표지를 이용하여 자가불화합성 인자를 분류하고 그 결과를 비교분석하여, 궁극적으로는 분자유전학적 방법으로 자가불화합성 인자를 신속·정확하게 판별하는 기술을 확립하고자 한다.

2. 경제적 측면

우리 나라의 종묘산업은 지금까지 많은 발전을 거듭하여 1970년에 3,000달러에 불과했던 채소종자의 수출이 1990년에는 무려 699만 달러에 달하며 20년 동안 약 2,000배의 신장을 하였다. 그러나 1989년부터 단계적으로 실시된 채소종자의 수입자유화와 함께 1989년에 155만 달러 정도이던 채소 종자의 수입액이 1991년에는 620만 달러에 달하여 수입이 수출을 능가하는 현상이 나타났다. 이와 같은 종자의 수입 증가는 우리의 육종이나 채종 관련 산업이 위협받고 있다는 증거이며 현재의 기술이 선진화되고 개선되지 않는 한 계속될 것이다.

무와 배추는 우리 나라 4대 채소 중의 하나로 농가의 소득원으로서나 국민의 식생활에 있어 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 우리 나라에서 무, 배추가 재배되기 시작한 것은 고려시대 이전으로 추정되며, 과거에는 주로 김장 김치용으로 재배되다가 최근에는 봄재배와 시설재배 면적이 서서히 증가하고 있다. 특히 무는 종자 수출이 가장 많은 채소이다. 같은 십자화과에 속하는 양배추와 브로콜리는 우리 나라에서는 수요가 많지 않은 작물이나 무와 배추의 앞선 기

술을 이용하여 우수한 품종을 육성한다면 앞으로 수출 전망이 매우 밝은 작물이 될 것이다.

앞서 설명한 바와 같이 우리 나라에서는 십자화과 작물의 채종에 자가불화합현상을 이용하고 있는데 자가불화합성에 대한 기초 연구가 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 및 채종을 위해서는 현재 육성모본으로 이용되고 있는 십자화과 작물의 자가불화합성 인자를 체계적으로 분류하고 인자간의 상호작용을 밝히는 등의 연구가 매우 절실하다. 아울러 조기에 정확하고 신속하게 자가불화합성 인자를 검정하는 방법이 개발되어야 육종연한도 단축할 수 있으며 대외 경쟁력을 가진 우수한 품종을 생산해 낼 수 있는 것이다.

3. 사회 문화적 측면

우수한 품종의 종자를 양호한 품질로 공급하는 것은 농업 생산성과 효율성의 첫째 요건이며 나아가 농산물 가격을 안정화시켜 국민의 사회적 불안감을 해소시킨다. 무, 배추는 김치의 주재료로써 우리의 식생활에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있기 때문에 국민 정서에 끼치는 영향이 더 크다고 하겠다. 특히 오늘날에는 김치의 수출이 확대되고 있어 더욱 더 품질을 다양화하고 고급화해야 할 필요가 있으며, 김치 종주국의 위치를 고수하기 위해서도 그 주재료가 되는 십자화과의 작물에 대한 체계적인 연구가 필요하다. 우리 나라를 대표하는 과학 업적의 하나가 우 장춘박사의 십자화과 연구인데 이러한 연구의 연속선상에서 십자화과 연구를 통하여 그 위치를 지켜 가야 한다.

제2절 국내외 관련 기술의 현황 및 문제점

1. 자가불화합성 인자의 분류 및 동정

Bateman(1955)은 십자화과의 자가불화합성이 체세포 유전형질의 지배를 받으며 단일유전자좌의 복대립인자가 관여하며, 각 대립 인자는 화분과 주두에서 우세, 독립, 약화가 있다고 보고하였고, 그 후 많은 사람들이 이를 실험적으로 입증하였다. 자가불화합성을 지배하는 복대립 인자수에 관하여 Sampson (1967)은 무속 식물을 소재로 한 연구에서 45개체 중 9개의 복대립 인자가 있음을 보고하였고, Haruta (1962)는 양배추에서 10개, 배추에서 9개, 순무에서 4개, 무에서 11개의 자가불화합성 인자를 보고하였다. 영국의 식물육종 연구소는 35종 이상의 양배추 자가불화합성 인자를, 영국의 국립채소연구소에는 41종의 양배추 불화합 인자를 각각 보존하고 있다 (Ockendon, 1975). 최근에 Nou (1993)등이 일본과 터키에 자생하는 *B. campestris*를 대상으로 38개의 불화합성 인자를 동정하였고, *B. oleracea*에서 50 종류의 불화합 인자를 동정하였다. Haruta (1962)는 여러 가지 십자화과 채소의 자가불화합성 인자의 우열 관계를 연구하여 이를 4가지 종류로 분류하기도 하였다.

2. 자가불화합성 유전자의 분자 생물학적 연구

자가불화합성 유전자에 대한 분자생물학적 연구는 *Brassica oleracea*와 *B. campestris*를 중심으로 활발하게 이루어져 왔는데 (Nasrallah 등 1989), 자가불화합성 연구가 1985년 이후 비약적인 발전을 가져온 것은 Cornell 대학의 Nasrallah 연구진이 *B. oleracea* S-locus에서 특이하게 발현되는 cDNA clone을 획득한 이후부터 라고 할 수 있다. 그후 S-locus의 glycoprotein을 암호화하는 유전자인 SLG (S-locus glycoprotein gene)가 SI allele type에 따라 클

로닝되고 염기서열이 분석되었다 (Dickinson 등 1992; Hinata 등 1993). 그 결과에 의하면 S locus는 약 200 kb 정도의 길이에 퍼져있으며, 그 안에는 SLG 유전자뿐만 아니라 SLG와 상당히 높은 염기서열상 상동성을 나타내는 SRK (S-locus receptor kinase) 유전자도 암호화되어 있음이 밝혀졌다 (Nasrallah 등 1993; Oldknow 등 1994; Watanabe 등 1995). 이들 유전자는 자가불화합 반응을 일으키는데 결정적인 역할을 한다고 보고되어 있으며 SI allele들 간에 특이성이 높은 염기서열을 가지고 있다. 또한 S-locus와 유전적으로 연관되어 있지는 않지만 염기서열상 SLG와 매우 높은 유사성이 있는 많은 유전자가 밝혀져서, 단일 유전자좌에 여러 대립인자가 관여하여 자가불화합성이 나타난다는 종래의 생각이 12개 이상의 유전자가 관여하는 multigene family에 의해 자가불화합성이 나타난다는 쪽으로 바뀌어 가고 있다 (Trick 등 1992; Mayo 등 1993). SLG 유전자와 염기서열상 유사성을 갖지만 S-locus와는 연관되어 있지 않은 유전자를 S-locus related (SLR) sequence라고 부르며 (Guilluy 등 1991; Charles 등 1992; Oldknow 등 1995) SLR1, SLR2는 SLR 중에서 가장 연구가 많이 된 유전자들이다. SLR1은 SLG와 65% 정도의 유사성을 보이며, SI-type에 따라 유사성이 많은 경우는 90% 이상, 적은 경우는 70% 정도의 염기서열상 유사성이 있다. Nasrallah(1993), Oldknow(1994), Watanabe(1994) 등은 S-locus에 SRK (S-locus receptor kinase) 유전자도 암호화되어 있음을 알아내었고, SLG와 SRK는 매우 가까이 연관되어 있음을 밝혔내었다. 또한 SLG와 SRK 유전자 내에는 S-domain이 공통적으로 존재하며 염기서열도 매우 유사함이 밝혀졌다. 본 연구진은 지금까지 보고된 십자화과 작물의 S-locus 연관 유전자의 염기서열을 분석하여 본 결과 크게 세군데의 conserved region을 발견하였고 이 부위는 *B. oleracea*나 *B. campestris*의 SLG, SRK, SLR 유전자 모두에 공통적으로 존재함을 알게 되었다.

3. 분자생물학적 방법에 의한 자가불화합성 인자의 분류 및 동정

Brace (1993, 1994)등은 SLR2 염기서열의 일부를 primer로 합성하고 PCR한 후 6개의 제한 효소로 절단하여 나타난 profile로 양배추의 50여 가지의 SI 계통을 구분하였다. 이중 두 계통은 똑같은 profile을 나타내어 구분이 안 되었으나 화분관 검경을 통해 같은 S allele을 가지고 있음을 확인하였다. Nishio (1994)등은 S6 SLG 염기서열을 근간으로 primer를 합성하였으며 이를 이용하여 PCR-RFLP를 수행하여 양배추와 배추 20 계통을 판별하였고, 나아가 종자 순도 검정에 이용하기 위한 표지로도 사용하였다.

4. 우리 나라의 경우

1980년 대 초 이 수성박사가 배추의 15개 자가불화합성 계통의 자가불화합 인자를 분류하고, 그 중 9개의 서로 다른 자가불화합 인자간 이면교잡으로 이형접합체를 만들어 인자간의 상호 우열관계와 활력을 검정한 연구가 있었으나, 그 후에는 국내에서 자가불화합성에 대해 체계적인 연구가 진행된 바가 없다. 자가불화합성에 대한 분자생물학적 연구는 외국에서 자가불화합 현상을 연구하고 돌아온 노 일섭, 배 현숙박사 등이 있으며, 국내에서 연구가 진행중이나 아직 뚜렷한 결과를 보이고 있지 않다.

제3절 연구개발 목표와 내용

1. 인공교배를 통한 무, 양배추의 자가불화합성 인자의 분류 및 화분과 주두에서의 인자간 우열관계 분석
2. PCR-RFLP 기술을 이용한 무, 양배추의 자가불화합성 인자 분류
3. 관행적 방법과 PCR-RFLP 기술의 비교를 통한 PCR-RFLP 기술의 유용성 확립
4. 계통 특이 분자유전학적 표지를 F1 종자 순도검정에 이용

제4절. 추진전략 및 방법

1. 주관연구기관

가. 관행적 방법에 의한 자가불화합성 인자의 분류

1) 현재 품종 육종에 사용되는 무, 양배추의 계통간 이면교잡과 화분관 검경을 통하여 자가 불화합 인자의 종류를 밝힌다.
2) 인자형이 밝혀진 자가불화합 계통간 교배를 통하여 자가불화합성 인자의 이형 접합체를 만든다.
3) 이형접합체와 그 모본들 간의 여교잡을 통하여 자가불화합 인자 간의 우열관계를 알아내고, 자가불화합 인자의 강도를 측정한다.
4) 재래적인 방법과 분자유전학적 방법에 의한 분류 결과를 비교하여 조기에 자가불화합 인자를 판별할 수 있는 체계를 확립한다.

2. 협동연구기관

가. 분자유전학적 표지를 이용한 자가불화합성 인자의 분류 및 동정

1) 무 화기로부터 화기특이발현 cDNA library를 작성한 뒤 자가불화합 관련 유전자를 클로닝 한다.
2) 클로닝된 유전자들을 서로비교하여 primer를 합성하고 일부는 외국의 논문과 유전정보 data base 분석을 통해 자가불화합 관련 유전자의 염기서열을 분석하여 conserved region을 탐색하여 primer를 합성한다.
3) 합성된 여러 primer들을 이용하여 PCR 방법으로 자가불화합성 관련 유전자를 증폭해 내고 이를 클로닝하여 염기서열을 결정함으로써 얻어진 DNA 단

편이 자가불화합성 관련 유전자인지를 data base를 분석하여 확인한다.

4) 자가불화합성 유전자만을 증폭하는 primer를 이용하여 주관연구과제에서 자가불화합성이 확인된 무, 양배추의 여러 계통에서 이 유전자를 얻는다. 여러 가지 제한 효소를 이용하여 이 유전자 단편을 절단함으로써 계통별로 PCR-RFLP profile을 얻고 이를 주관연구기관의 결과와 비교한다.

5) 계통 특이 표지를 이용해 F1 잡종 순도 검정법을 확립한다.

제 2 장 양배추 SI 인자 분류

제 1 절 인공교배를 통한 양배추 SI 인자분류

1. 연 구 목 적

본 실험은 인공교배를 통하여 양배추 (브로콜리포함)의 자가불화합 인자를 분류함으로써 이 결과와 Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)를 이용하여 유묘상태에서 양배추의 SI 인자를 분류한 결과와 비교하여 PCR-RFLP를 이용한 SI 인자 조기분류의 유용성을 검증하는데 그 목적이 있다.

2. 연구에 사용된 재료

양배추 20계통과 브로콜리 14계통을 공시재료로 하여 실험을 수행하였다.

3. 연구수행방법

가. 양배추 및 브로콜리 파종, 육묘, 저온처리

현재 품종 육종에 사용되는 양배추 20계통 및 브로콜리 14계통을 96년 8월 15일 파종하였고 10월 23일에 15 ㎝ x 15 ㎝의 재식거리로 이식하여 육묘하였다. 96년 11월 10일 하우스를 피복하였고, 96년 11월말부터 야간에 온풍기로 난방하여 야간온도를 0℃ 이상으로 유지하였으며 주간에는 환기시켜 5-6℃를 유지하였다. 97년 3월 5일 하우스에 계통당 5-20주씩 정식하였다.

나. 화분관 검경을 통한 자가불화합 계통 분류

4월초부터 교배를 시작하였다. 교배할 화지는 화뢰기에 일부의 화지는 제웅을 하고 화분을 이용할 화지는 제웅을 하지 않았다. 이들은 유산지로 된 봉투를 씌워 타화분의 혼입을 방지하였다. 자가수분 및 형매교배 (sib cross)를 하여 교배 1일 후 Kho와 Baer의 방법에 의해 형광현미경으로 주두에서의 화분 발아와 화분관 신장을 관찰하여 자가불화합 여부를 조사하였다.

다. 교배조합 작성 및 인공교배

분류된 자가불화합 계통간의 교배조합을 작성하여 인공교배하고 화분관 검경을 통하여 화합 및 불화합 정도를 조사하였다.

라. 결협률 및 결실률 조사

각 계통에 대하여 개화 전에 유산지 봉투를 씌워 타화분의 혼입을 방지하였다. 일부의 화지는 만개한 꽃에 수분을 하였고 나머지 화지는 개화 2일전 꽃봉우리에 수술을 제거하고 만개한 꽃의 화분을 이용하여 교배를 하였다. 이들은 교배 후 유산지 봉투를 씌워 타화분의 혼입을 방지하였다. 종자가 등숙이 된 후 종자립수를 조사하였다. 일반적인 십자화과 작물의 개화순서는 아래그림 1 과 같다.

4. 연구결과

가. 관행적 방법에 의한 양배추 및 브로콜리 자가불화합성 인자의 분류

양배추 20품종 55계통에 대하여 화분관 검정과 인공교배에 의한 결실율을 조사한 결과는 표2와 같다. 화분관 검정 결과 양배추 20품종 중 YRHW를 제외한 19개 품종은 자가불화합으로 나타났다. 자가불화합 정도는 화령에 따라서 차이가 있어 그림1과 같은 방법으로 실험해 조사한 결과 자가불화합인 19개 품종

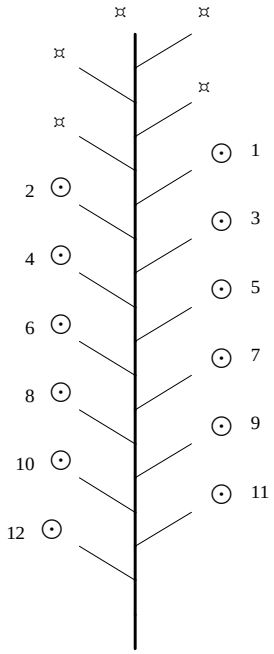

Fig. 1. 일반적 십자화과 작물의 개화순서도

¤: bud. ⊙1: a full-bloomed flower ⊙12: a withered flower.

52계통은 상당히 안정한 것으로 나타났다. 결실율에 의한 자가불화정도를 살펴보면 YRHW와 N658은 자가화합으로 나타났고 (표 2), 그 외 18품종은 자가불화합으로 나타났다. 화분관 검정과 결실율에 의한 자가불화합 정도를 살펴보면 N658를 제외한 19개 품종에서 거의 일치함을 알 수 있었다.

19개 자가불화합인 품종 중 10개의 품종에 대한 각각의 sib에 대해서 교배를 한 결과는 표3과 같다. 자가불화합인 계통에 대해서 자가불화합 인자가 homo또는 hetero인지를 구별하기 위해서는 최소한 8주 이상 19주 정도를 실험을 해야된다. 8세대 이상 자식된 계통으로 유전적으로 고정된 것으로 생각하고 각각의 품종에 대해서 4-5주씩 sib-cross를 수행하였다. 실험대상 주수는 적지만 10품종 내에 각각의 sib-cross 내에서 모두 자가불화합으로 나타났다 (표

3).

표 1. 양배추 20 계통에 대한 화분관 검경과 결실율조사 결과.

계통명	계통고유번호	불화합여부	계통명	계통고유번호	불화합여부
EE2	1	SI	CK	18	unstable SI
EE3	3	"	HW	19	SI
QS	6	"	CD	20	"
QT	7	"	GS	22	"
KR	10	"	CM	24	"
KY	11	unstable SI	760	26	"
S2	12	"	JK8	35	unstable SI
GA	13	SI	WS	39	"
N660	14	"	N658	49	compatible
YRHW	17	compatible	YY	55	SI

어느 정도 자가불화합이 고정되어 강하게 나타나는 11개 품종에 대해서 자가불화합 인자를 분류하기 위해서 11 품종 상호간에 교배를 실시하여 화분관 검경을 통하여 불화합 여부를 확인하였다 (표 4). 일부의 조합에서는 주두에 화분이 부착되지 않거나 다만 몇 개의 화분이 발아하여 정확한 불화합 정도를 파악하기 곤란하였다. 전체적으로 불화합여부를 판단 할 수 있는 계통이 적어 정확한 자가불화합 인자의 판별이 불가능 하였다.

브로콜리 15품종 24계통에 대하여 화분관 검경과 인공교배에 의한 결실율을 조사한 결과는 표5와 같다. 화분관 검경 결과 브로콜리 15 품종 중 SM, GH, MT, CL, HNB-41, H4, UD, NB, NK, MTGS는 자가불화합으로 나타났다. 자가불화합 정도는 화령에 따라서 차이가 있어 그림1과 같은 방법으로 실험해 조사한 결과 SM과 NB는 꽃이 핀지 오래되면 화합으로 되고 그 밖의 것들은 화령에 대해서 안정된 것으로 나타났다. 결실율에 의한 자가불화정도를 살펴보면 SM, GH, MT, H4, UD, NB, NK, MTGS는 자가불화합으로 나타났다. 화분관 검경과 결

실율에 의한 자가불화합 정도를 살펴보면 CL 및 HNB-41에서는 상이한 결과를 나타냈다. 이들의 결과는 화분관 검경과 결실률에 의한 검정이 동일개체에서 실시되지 않았기 때문에 발생된 것으로 생각된다.

표 2. 화분관 검경과 결실율 분석을 통한 양배추의 자가불화합성 정도 검정

계통명	계통번호	화분관 검경결과				결실율 (종자수/협)		계통명	계통번호	화분관 검경결과				결실율 (종자수/협)	
		1a)	3	6	9	FS	BS			1	3	6	9	FS	BS
EE2	1-1	-	-	-	-	0.4	19.1	HW	19-1	-	-	-	-	0.0	8.3
	1-2	-	-	-	-				19-4	-	-	-	-		
EE3	3-1	-	-	-	-	0.0	12.6		19-5	-	-	-	-		
QS	6-1	-	-	-	-	0.0	6.5	CD	20-1	-	-	-	-	0.6	11.5
	6-2	-	-	-	-				20-2	-	-	-	-		
	6-3	-	-	-	-			GS	22-1	-	-	-	-	0.0	3.7
	6-4	-	-	-	-			CM	24-1	-	-	-	-	0.5	14.3
	6-5	-	-	-	-				24-2	-	-	-	-		
QT	7-1	-	-	-	-	0.4	5.8		24-3	-	-	-	-		
KR	10-1	-	-	-	-	0.2	13.4		24-4	-	-	-	-		
	10-3	-	-	-	-				24-5	-	-	-	-		
	10-5	-	-	-	-			760	26-3	-	-	-	-	0.0	2.1
KY	11-1	-	-	-	-	1.5	13.8		26-8	-	-	-	-		
	11-2	-	-	-	-			JK8	35-1	-	-	-	-	1.0	5.2
	11-3	-	-	-	-				35-2	-	-	-	-		
	11-4	-	-	-	-				35-3	-	-	-	-		
S2	12-1	-	-	-	-	3.8	17.9		35-4	-	-	-	-		
	12-2	-	-	-	-				35-5	-	-	-	-		
	12-3	-	-	-	-			WS	39-1	-	-	-	-	0.7	16.4
	12-4	-	-	-	-				39-2	-	-	-	-		
N660	14-1	-	-	-	-	0.0	7.3		39-3	-	-	-	-		
	14-2	-	-	-	-				39-4	-	-	-	-		
YRHW	17-1	=	=	=	=	6.5	10.0	N658	49-1	-	-	-	-	5.3	11.7
	17-2	=	=	=	=			YY	55-1	-	-	-	-	0.0	10.6
	17-3	=	=	=	=				55-2	-	-	-	-		
CK	18-1	-	-	-	-	2.7	12.5		55-3	-	-	-	-		
	18-2	-	-	-	-				55-4	-	-	-	-		
									55-5	-	-	-	-		

1a): Full-bloomed flower. 3: the third flower below flower 1. 6: the sixth flower below flower 1. 9: the ninth flower below right flower 1. FS: open flower pollination (selfing). BS: bud pollination (selfing).
-: self-incompatible. = : unstable self-incompatible.

표 3. 양배추 계통내 개체간 교배를 통한 자가불화합인자 분석

a) **계통번호** #1

♀ \ ♂	6 -1	-2	-3	-4	-5
6-1	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-
-3	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-

b) **계통번호** #3

♀ \ ♂	1 -3	-4	-5	-6	
10-3	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-
-6	-	-	-	-	-

c) **계통번호** #6

♀ \ ♂	11 -1	-2	-3	-4
11-1	-	-	-	-
-2	-	-	-	-
-3	-	-	-	-
-4	-	-	-	-

d) **계통번호** #7

♀ \ ♂	1 2 -1	-2	-3	-4
12-1	-	-	-	-
-2	-	-	-	-
-3	-	-	-	-
-4	-	-	-	-

e) **계통번호** #10

♀ \ ♂	19 -1	-2	-3	-4	-5
19-1	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-
-6	-	-	-	-	-

f) **계통번호** #13

♀ \ ♂	24 -1	-2	-3	-4	-5
24-1	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-
-3	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-

g) **계통번호** #14

♀ \ ♂	26 -2	-5	-6	-9
26-2	-	-	-	-
-5	-	-	-	-
-6	-	-	-	-
-9	-	-	-	-

h) **계통번호** #19

♀ \ ♂	3 -1	-2	-3	-4	-5
35-1	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-
-3	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-

I) **계통번호** #22

♀ \ ♂	3 -1	-2	-3	-4
39-1	-	-	-	-
-2	-	-	-	-
-3	-	-	-	-
-4	-	-	-	-

j) **계통번호** #26

♀ \ ♂	46 -1	-2	-3	-4	-5
46-1	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-
-6	-	-	-	-	-

k) **계통번호** #55

♀ \ ♂	55 -2	-3	-4	-5
55-2	-	-	-	-
-3	-	-	-	-
-4	-	-	-	-
-5	-	-	-	-

표 4. 양배추 계통간 교배를 통한 자가불화합 인자의 분류

♀ \ ♂	70 (1)	71 (3)	74 (6)	37 (7)	4 (10)	36 (13)	1 (14)	20 (19)	72 (22)	11 (26)	32 (55)
70 (1)	−	+	+	−	+	+	+	+	+	*	+
71 (3)	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−
74 (6)	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+
37 (7)	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
4 (10)	+	+	+	+	−	−	*	+	+	+	+
36 (13)	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	*
1 (14)	+	+	+	+	*	+	−	*	+	+	*
20 (19)	+	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+
72 (22)	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
11 (26)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	*
32 (55)	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	−

+ : compatible. - : incompatible.

* : further investigation is needed.

양배추와 브로콜리는 본 실험에서 선발된 계통의 계통내 SI 인자 순도 및 강도에 있어 실험에 사용될 수 있을 정도로 높지 않은 것으로 생각되어 더 이상의 실험 진행이 불가능하였다. 이에 따라 PCR-RFLP에 의한 조기 검정 system을 개발하는데도 인공교배에 의한 SI 인자의 분류가 선행되지 않았기 때문에

실험의 진행이 무의미하게 되었다. 반면 무의 경우 인공교배에 의한 실험결과가 계통간 인자 분석을 수행하기에 충분하였기 때문에 PCR-RFLP에 의한 SI 인자 조기판별 체계를 위해 무로 재료를 바꾸어 계속적으로 실험을 진행하였다.

표 5. 화분관 검경과 결실율 분석을 통한 브로콜리의 자가불화합성 정도 검정

계통명	계통번호	화분관 검경결과				결실율 (종자수/협)		계통명	계통번호	화분관 검경결과				결실율 (종자수/협)	
		1[1]	3	6	9	FS	BS			1	3	6	9	FS	BS
SM	105-2	-	-	-	=	0.1	12.5	H4	126-2	=	-	-	=	0	9.4
GH	107-1	-	-	-	-	0	6.8	H10	129-2	=	=	+	+	4.7	10.1
	107-2	-	-	-	-			MS	132-1	=	+	=	=	1.8	12.5
MT	110-1	-	-	-	-	0.1	10.6		132-2	=	-	=	=		
	110-3	-	-	-	-			UD	139-1	-	-	-	-	0	5.7
CL	111-1	-	-	-	-	2.3	8.3		139-2	-	-	-	-		
	111-3	-	-	-	-			NB	141-5	-	-	-	=	0.3	5.9
	111-5	-	-	-	-			SS	142-1	+	+	+	+	2.5	10.3
	111-7	-	-	-	-				142-2	+	+	+	+		
	111-9	-	-	-	-			NK	146-2	-	-	-	-	0.1	4.6
HNB-41	113-2	-	-	-	-	3.6	11.7	KW	154-2	+	+	+	+	2.1	7.9
H4	126-1	-	-	-	-	0	9.4	MTGS	161-1	-	-	-	-	0.2	14.3

1): Full-bloomed flower. 3:the third flower below the flower 1. 6:the sixth flower below the flower 1. 9: the ninth flower below the flower 1. FS: open flower pollination(selfing). BS: bud pollination(selfing).
-: self-incompatible. =: unstable self-incompatible. +: compatible.

제 3 장 무 SI 인자 분류

제 1 절 인공교배를 통한 무 SI 인자분류

1. 연 구 목 적

본 실험은 인공교배를 통하여 무 자가불화합 인자를 분류함으로써 이 결과와 PCR-RFLP를 이용하여 유묘상태에서 무의 SI 인자를 분류한 결과와 비교하여 PCR-RFLP를 이용한 SI 인자 조기분류의 유용성을 검증하는데 그 목적이 있다.

2. 연구에 사용된 재료

무 13계통을 공시재료로 하여 실험을 수행하였다.

3. 연구수행방법

가. 무의 파종, 육묘, 저온처리

현재 품종 육종에 사용되는 무 13계통을 96년 10월 15일 파종하였고 10월 30일에 15 ㎝ x 15 ㎝의 재식거리로 이식하여 육묘하였다. 96년 11월 10일 하우스를 피복하였고, 96년 11월말부터 야간에 온풍기로 난방하여 야간온도를 0℃ 이상으로 유지하였으며 주간에는 환기시켜 5-6℃를 유지하였다. 97년 3월 5일 하우스에 계통당 10-20주씩 정식하였다. 각각의 품종에 대하여 형매교배를 하여 화분관 신장으로 불화합을 조사한 결과는 표 7과 같다.

나. 화분관 검경을 통한 자가불화합 계통 분류

4월초부터 교배를 시작하였다. 교배할 화지는 화뢰기에 일부의 화지는 제웅을 하고 화분을 이용할 화지는 제웅을 하지 않았다. 이들은 유산지로 된 봉투를 씌워 타 화분의 혼입을 방지하였다. 자가수분 및 형매교배 (sib cross)를 하여 교배 1일 후 Kho와 Baer의 방법에 의해 형광현미경으로 주두에서의 화분 발아와 화분관 신장을 검경을 하여 자가불화합 정도를 조사하였다.

다. 교배조합 작성 및 인공교배

분류된 자가불화합 계통간의 교배조합을 작성하여 인공교배하고 화분관 검경을 통하여 화합 및 불화합 정도를 조사하였다.

라. 결협률 및 결실율 조사

각 계통에 대하여 개화 전에 유산지 봉투를 씌워 타 화분의 혼입을 방지하였다. 일부의 화지는 만개한 꽃에 수분을 하였고 나머지 화지는 개화 2일전 꽃봉오리에 수술을 제거하고 만개한 꽃의 화분을 이용하여 교배를 하였다. 이들은 교배 후 유산지 봉투를 씌워 타 화분의 혼입을 방지하였다. 종자가 등숙이 된 후 종자 립수를 조사하였다.

4. 연구결과

가. 관행적 방법에 의한 무의 자가불화합성 인자의 분류

표 6. 무 계통내 개체간 인공교배를 통한 자가불화합 인자 순도분석

a) **계통** #28

♀ \ ♂	28-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	10-	11-	12-
28-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6	-	-	-	-	-	=	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	=	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	=	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

b) **계통** #31

♀ \ ♂	31-3	-4	-5	-7	-8	-9	10-	11-	12-
31-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	-	=	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	-	-	=	=	=	=	=	=	=
-12	=	-	-	-	-	-	-	-	-

c) **계통** #38

♀ \ ♂	38-4	-5	-7	-8	-9	10-	11-	12-
38-4	=	=	-	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	=	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	-	-	=	-	-	-

d) **계통** #120

♀ \ ♂	120-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	10-	11-
120-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6	=	=	-	-	-	-	=	-	-
-7	=	-	-	-	-	-	-	=	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	=	-	-	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

e) breeding line 127

♀ \ ♂	127-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
127-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-3	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
-4	-	-	-	-	-	-	-	=	+	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
-6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
-7	=	-	-	-	-	-	-	-	+	-
-8	-	-	-	-	=	-	-	-	-	-
-9	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
-10	=	=	-	+	+	-	=	=	-	-

f) breeding line 132

♀ \ ♂	132-5	-6	-7	-8	-9	-10	-13	-14
132-5	=	=	=	-	=	-	=	-
-6	=	=	=	-	=	=	-	=
-7	=	=	=	-	=	=	-	=
-8	-	=	-	=	-	=	-	-
-9	-	=	=	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	=	-	-	-	=
-11	-	-	-	-	-	-	-	-
-13	=	-	=	-	=	=	-	-
-14	=	=	=	-	=	=	-	=

g) **계통** #137

♀ \ ♂	137-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15
137-6	-	-	-	-	-	-	-	-	=	-
-7	=	-	-	-	=	=	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	-	=	-	-	-	-	-	=	-	-
-12	-	-	-	-	=	-	-	-	-	-
-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-15	-	-	=	-	-	-	-	-	=	-

h) breeding line 176

♀ \ ♂	176-6	-7	-8	-9	-10
176-6	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-

i) **계통** #180

♀ \ ♂	180 -6	-7	-8	-9	10	11	12	13	14	15
180-6	=	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-10	=	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-11	=	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

j) **계통** # 183

♀ \ ♂	183 -6	-7	-8	-9	10	11	12	14	15
183-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	=	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-	=	-	-	=
-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	=	-	-	-	-	-	-
-14	-	-	-	-	=	-	-	-	-
-15	-	-	=	=	-	-	-	-	-

k) **계통** #186

♀ \ ♂	186 -3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	10	11	12
186-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-4	-	-	=	-	-	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-10	=	-	-	-	-	-	-	-	=	-
-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

l) **계통** #222

♀ \ ♂	222 -3	-4	-5	-6	-7	-9	10	11	12
222-3	-	-	=	-	-	-	-	-	-
-4	-	-	-	=	-	-	-	=	-
-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6	=	-	-	-	=	-	-	-	=
-7	=	-	=	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	=	-
-10	-	-	-	-	=	-	-	-	-
-11	-	-	-	-	-	-	-	=	-
-12	-	+	-	-	-	-	-	-	-

ㅠ) 계통 # 241

♂ / ♀	241-3	-5	-8	-9	-10
241-3	-	-	-	-	-
-5	-	-	-	=	-
-8	-	-	-	-	-
-9	-	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	-

n) breeding line 253

♂ / ♀	253-1	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
253-1	=	-	=	-	=	=	-	-	-
-3	=	=	=	-	-	-	-	=	-
-4	=	=	-	=	=	=	=	-	=
-5	=	=	=	-	-	=	=	=	=
-6	-	-	=	=	-	=	=	=	=
-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	=	=	=	=	-	-	-	=	=
-9	-	-	=	=	-	=	-	-	=
-10	=	-	-	=	-	-	-	=	-

127은 개체간의 교배조합에 따라서 화합인 것들이 있어 자가불화합 인자가 hetero인 것 같다. 168, 132 및 253은 개체간의 교배조합에 따라서 1-2개의 화분이 발아된 것들이 있었다. 특히 132는 거의 모든 조합에 이러한 현상이 나타나 자가불화합 정도가 약한 것으로 생각된다. 무 품종들에 대해서 품종당 2-5개의 개체에 대해서 인공교배에 의한 결실율을 조사한 결과 28, 31, 38, 120, 137, 176, 180, 183, 186, 241은 불화합으로 판정되었다. 127, 168, 222, 132은 각 품종간 개체간에 불화합인 것과 아닌 것으로 구분됨을 알 수 있다. 자가불화합에 대하여 화분관 검정과 결실율에 판정을 비교해 보면 거의 일치됨을 알 수 있었다 (표 6, 7, 8).

1차년도 연구수행결과 자가불화합 여부를 명확히 확인할 수 없었던 9조합에 대하여 2차년도에 재실험을 수행한 결과 모두 화합으로 나타났다. 이로써 실험에 사용된 무 계통들에 대한 자가불화합 인자를 구분할 수 있었으며, 본 실험의 결과를 바탕으로 하여 아래와 같이 8개의 자가불화합 인자를 구분하였다. 37번 과 43번 무 계통은 서로 자가불화합 반응을 보여 같은 인자를 보유하고 있는 것으로 생각되며 262와 5324도 동일한 자가불화합인자를 갖고 있는 것으로 사료된다 (표 9). 이러한 결과는 협동연구기관의 PCR-RFLP 결과와 일치되는

것으로 무에 대한 자가불화합 인자의 분자유전학적 방법을 통한 분류가 가능한 것으로 생각된다.

표 7. 실험에 사용된 무 계통

계통번호	계통	개화수분	뇌수분
28	CH-51-G2-2	0.04 0.03	2.68 2.06
31	CH-51-G2-4	0.00 0.00	2.27 1.87
38	CH-54-G3-	0.00 0.00	0.70 0.37
120	CH-231-55-3-	0.19 0.08	2.26 2.10
127	E-345-G2-	0.29 0.08	2.11 0.33
132	(17xBd)-1-G3-2-1-62-1	0.97 0.48	0.82 0.72
137	(26xBd)-2-62	0.10 0.26 0.16 0.43 0.24	1.24 1.38 1.25 1.25 1.38
176	(KxK)-G2-54	0.00 0.00 0.00 0.00 0.00	1.04 0.52 1.02 0.36 1.03
180	(KxK)-G2-62	0.00 0.00 0.00 0.00 0.09	1.04 0.52 1.02 0.36 1.03
183	C3-3-61	0.93 0.93 0.00 0.00 0.09	1.78 1.96 1.90 2.13 3.52
186	92-62-2	0.00 0.00	0.62 0.94
222	JY-12-52-G4-51	0.30 0.04	0.70 0.80
241	Y-51-51-61	0.00 0.00	0.52 1.48

표 8. 실험에 사용된 무 계통들의 자가불화합 정도 검정

계통명	계통번호	자가불화합여부
CH1	28	SI
CH2	31	"
CH3	38	"
CH	120	unstable SI
Samge	127	unstable SI
younghyun-bancheong	132	SI
Ulsan-bancheong	137	SI
KK1	176	SI
KK2	180	"
C3	183	"
92	186	"
JY1	222	"
JY2	241	"

표 9. 무 10개 계통간 화분관 검정을 통한 자가불화합 인자 분류

♀ \ ♂	37 (28)	43 (31)	50 (38)	267 (120)	107 (137)	262 (176)	5324-263 (180)	250 (183)	204 (186)	5335 (241)
37 (28)	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
43 (31)	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
50 (38)	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
267 (120)	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+
107 (137)	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
262 (176)	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
263 (180)	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
250 (183)	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
204 (186)	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
5335 (241)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−

무 10 계통에 대한 화분관 검경과 그 결과에 따라 자가불화합인자를 분류한 결과 8개의 서로 다른 인자가 존재하는 것으로 나타났다. 실험에 사용된 계통 #37과 #43은 동인한 인자형을 갖는 것으로 생각되며 #262와 #5324도 동일한 인자형을 갖고 있는 것으로 생각된다. 각 계통별 자가불화합인자형을 다음과 같이 결정하고 일련번호를 부여하였다 (표 10).

표 10. 무 10 계통 자가불화합 인자형

계통번호	37	43	50	267	107	262	5324	250	204	5335
인자형	S1S1	S1S1	S2S2	S3S3	S4S4	S5S5	S5S5	S6S6	S7S7	S8S8

십자화과의 자가불화합은 조포체성 자가불화합으로 주두와 화분에서의 인자간 우열관계에 따라 화합과 불화합이 결정된다. 따라서 본 실험에 사용된 계통들을 재료로 하여 무의 자가불화합 인자간 우열관계를 구명하였다. 1차년 도에 확보된 이형접합체 22 계통을 재료로 하여 그들의 양친을 화분친으로한 교배조합을 설정하고 화분관 검경을 통하여 불화합 여부를 결정한 결과 표 11에서 나타난 것과 같이 하나의 조합을 제외하고 모두 주두에서 공동우성관계를 보였다. 이형접합체 #5325는 계통 43과 250의 이형접합체로서 250 화분을 수분시켰을 때 화합반응을 보였다. 이것은 자가불화합 인자 S1이 S6에 대해 우성이라는 결과를 나타내는 것으로 생각될 수 있다. 그러나 이형접합체 #2303의 경우 37과 250을 양친으로 하며 #5325와 동일한 genotype (S1S6)을 가지고 있어 이들에 대한 실험결과는 공동우성으로 나타났다. 이러한 불일치는 3차년 도 실험에서도 반복적으로 나타나 이들간의 우열 판별은 정확히 이루어지지 못하였다. 무 주두에서의 자가불화합 인자가 공동우성관계는 일반적으로 보고된 십자화과 작물에서의 결과와 일치하는 것이다 (표 11, 13).

무 화분에서의 자가불화합인자간 우열관계를 구명하기 위하여 22개 이형접합체를 화분친으로하고 그들 각각의 양친을 종자친으로하여 교배를 수행하였다. 화분관 검경을 통하여 불화합여부를 조사한 결과 8개의 인자간 조합 (S1=S2, S1=S6, S1=S7, S1=S8, S2=S7, S2=S8, S6=S7, S7=S8)에서 공동우성관계를 나타내었으며, 8개의 이형접합체 (S1>S3, S1>S5, S2>S3, S2>S5, S3<S6, S5<S6, S5<S7, S5<S8)에서 우열관계를 보였다 (표 12, 14).

F2 분리 집단에서 SI 인자의 분리 양상을 파악하기 위하여 인공교배와 PCR-

표 11. 무 주두에서의 자가불화합 인자간 우열관계분석

♂ / ♀ (F1)	37 (S1S1)	43 (S1S1)	50 (S2S2)	267 (S3S3)	107 (S4S4)	262 (S5S5)	5324 (S5S5)	250 (S6S6)	204 (S7S7)	5335 (S8S8)	결과
5301	—		—								S1=S2
5319	—					—					S1=S5
5303	—							—			S1=S6
5332	—								—		S1=S7
5304	—									—	S1=S8
5305		—	—								S1=S2
5306		—		—							S1=S3
5308		—				—					S1=S5
5325		—						+			S1>S6
5333		—							—		S1=S7
5336		—								—	S1=S8
5309			—	—							S2=S3
5320			—			—					S2=S5
5311			—						—		S2=S7
5337			—							—	S2=S8
5321				—		—					S3=S5
5326				—				—			S3=S6
5328						—		—			S5=S6
5330						—			—		S5=S7
5340						—				—	S5=S8
5329								—		—	S6=S7
5331									—	—	S7=S8
9315	—				—						S1=S4
9316	—			—							S1=S3
9317	+									—	S1<S8
9322			—		—						S2=S4
9323			—					—			S2=S6
9325					—				—		S4=S7
9326					—	—					S4=S5
9327					—			—			S4=S6
9329					—					—	S4=S8
9330								—	—		S6=S7
9339				—	—						S3=S4
9340				—					*		S3≥S7
9341				—		—					S3=S5
9343				—						—	S3=S8
9319	*							—			S1≤S6
9321	—									—	S1=S8

표 12. 무 화분에서의 자가불화합 인자간 우열관계분석

♀ / ♂ (F1)	37 (S1S1)	43 (S1S1)	50 (S2S2)	267 (S3S3)	107 (S4S4)	262 (S5S5)	5324 (S5S5)	250 (S6S6)	204 (S7S7)	5335 (S8S8)	결과
5301	−		−								S1=S2
5319	−					+					S1>S5
5303	−							−			S1=S6
5332	−								−		S1=S7
5304	−									−	S1=S8
5305		−	−								S1=S2
5306		−		+							S1>S3
5308		−				+					S1>S5
5325		−						*			S1≥S6
5333		−							−		S1=S7
5336		−								*	S1≥S8
5309			−	+							S2>S3
5320			−			+					S2>S5
5311			−						−		S2=S7
5337			−							−	S2=S8
5321				+		+					S3 S5
5326				+				−			S3<S6
5328						+		−			S5<S6
5330						+			−		S5<S7
5340						+				−	S5<S8
5329								−		−	S6=S7
5331									−	−	S7=S8
9315	−				+						S1>S4
9316	−			+							S1>S3
9317	+									−	S1<S8
9322			−		+						S2>S4
9323			−					−			S2=S6
9325					+				−		S4<S7
9326					+	−					S4<S5
9327					+			−			S4<S6
9329					+					−	S4<S8
9330								−	−		S6=S7
9339				−	+						S3>S4
9340				+					−		S3<S7
9341				−		+					S3>S5
9343				+						−	S3<S8
9319	−							*			S1≥S6
9321	−									−	S1=S8

표 13.무 주두의 자가불화합 인자간 우열관계 정리

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
S1		S1＝S2	S1＝S3	S1＝S4	S1＝S5	S1＝S6 S1＞S6 S1≤S6	S1＝S7	S1＝S8
S2			S2＝S3	S2＝S4	S2＝S5	S2＝S6	S2＝S7	S2＝S8
S3				S3＝S4	S3＝S5	S3＝S6	S3≥S7	S3＝S8
S4					S4＝S5	S4＝S6	S4＝S7	S4＝S8
S5						S5＝S6	S5＝S7	S5＝S8
S6							S6＝S7	
S7								S7＝S8
S8								

표 14.무 화분의 자가불화합인자간 우열관계 정리

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
S1		S1＝S2	S1＞S3	S1＞S4	S1＞S5	S1＝S6 S1≥S6	S1＝S7	S1＝S8
S2			S2＞S3	S2＞S4	S2＞S5	S2＝S6	S2＝S7	S2＝S8
S3				S3＞S4	S3＞S5	S3＜S6	S3＜S7	S3＜S8
S4					S4＜S5	S4＜S6	S4＜S7	S4＜S8
S5						S5＜S6	S5＜S7	S5＜S8
S6							S6＝S7	
S7								S7＝S8
S8								

RFLP를 수행한 결과 예상했던 1|2|1의 분리비와는 다른 양상을 나타내었다. 실험 결과 얻어진 4:11:24 (S1S1:S1S2:S2S2)의 분리비는 F1 자가수분시에 뇌수분 과정에서 미성숙 주두의 자가불화합 인자에 대한 기존의 우열관계가 완전히 성숙되어 있지 않다는 것을 의미 할 수 있다 (표 15). 좀 더 정확한 추론은 다른 인자간의 분리비를 추가로 파악해 봄으로써 가능할 것으로 생각된다.

표 15. F2 분리집단에서의 자가불화합성 인자 분리양상조사

♂ / ♀ (F2)	9302 (♀)	9301 (F1)	9304 (♂)		♂ / ♀ (F1)	9302 (♀)	9301 (F1)	9304 (♂)	
9313-1	−	−	−	S1S2	9313-21	+	−	−	S2S2
9313-2	+	−	−	S2S2	9313-22	−	−	−	S1S2
9313-3	−	−	−	S1S2	9313-23	−	−	+	S1S1
9313-4	−	−	−	S1S2	9313-24	+	−	−	S2S2
9313-5	+	−	−	S2S2	9313-25	+	−	−	S2S2
9313-6	−	−	+	S1S1	9313-26	+	−	−	S2S2
9313-7	+	−	−	S2S2	9313-27	−	−	+	S1S1
9313-8	−	−	−	S1S2	9313-28	+	−	−	S2S2
9313-9	+	−	−	S2S2	9313-29	−	−	−	S1S2
9313-10	−	−	−	S1S2	9313-30	−	−	+	S1S1
9313-11	+	−	−	S2S2	9313-31	−	−	−	S1S2
9313-12					9313-32	+	−	−	S2S2
9313-13	+	−	−	S2S2	9313-33	+	−	−	S2S2
9313-14	−	−	−	S1S2	9313-34	+	−	−	S2S2
9313-15	+	−	−	S2S2	9313-35	+	−	−	S2S2
9313-16	+	−	−	S2S2	9313-36	−	−	−	S1S2
9313-17	−	−	−	S1S2	9313-37	+	−	−	S2S2
9313-18	+	−	−	S2S2	9313-38	+	−	−	S2S2
9313-19	+	−	−	S2S2	9313-39	+	−	−	S2S2
9313-20	+	−	−	S2S2	9313-40	+	−	−	S2S2

표16. 무 미 확인 11 계통에 대한 계통간 교배결과

♀ \ ♂	3	12	18	28	32	39	80	85	143	154	160
3	※	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+
12	+	※	+	+	+	+	+	−	+	+	+
18	+	+	※	−	−	+	+	+	+	−	+
28	+	+	−	※	−	+	+	+	+	−	+
32	+	+	−	−	※	+	+	+	+	−	+
39	+	+	+	+	+	※	+	+	+	+	+
80	−	+	+	+	+	+	※	+	−	+	+
85	+	−	+	+	+	+	+	※	+	+	+
143	−	+	+	+	+	+	−	+	※	+	+
154	+	+	−	−	−	+	+	+	+	※	+
160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	※

협동연구기관에 개발한 PCR-RFLP 분석체계를 검증하기 위하여 11개의 무 계통을 추가로 선정하여 인공수분 결과와 PCR-RFLP의 결과를 비교하여 보았다. 인공수분결과 11개의 계통은 5개의 SI 인자로 분류 할 수 있었으며 앞선 실험에서 동정되지 않은 새로운 인자가 포함되어 있는 것으로 나타났다. 이것을 S^{s}S^{s}로 정하였고 따라서 본 실험에서 실제 사용된 무 21 계통은 9개의 서로 다른 SI인자를 가지고 있는 것으로 판명되었다. 이 결과는 4장에 서술된 협동연구과제의 PCR-RFLP 결과와 일치하는 것으로 나타났다 (표 16, 17, 18).

표 17. Tester plant와 무 미 확인 11 계통간의 교배결과

♀ \ ♂	3	12	18	28	32	39	80	85	143	154	160
37 (S1S1)	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+
50 (S2S2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5312 (S3S3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107 (S4S4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
262 (S5S5)	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	+
250 (S6S6)	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
204 (S7S7)	*	*	*	+	+	*	+	+	*	+	*
9312 (S8S8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−

표 18. 무 미 확인 11 계통의 자가불화합 인자형

계통번호	3	12	18	28	32	39	80	85	143	154	160
인자형	S1S1	S9S9	S5S5	S5S5	S5S5	S6S6	S1S1	S9S9	S1S1	S5S5	S8S8

제 4 장 PCR-RFLP를 이용한 무 SI 인자 분류

제 1 절 PCR-RFLP를 이용한 무 SI 인자분류

1. 연 구 목 적

PCR-RFLP 기술을 이용하여 유묘상태의 무 계통을 분석하여 자가불화합성 인자를 검색할 수 있는 체계를 확립하는데 일차적인 목적이 있다. 이를 위하여 관행적 방법과 PCR-RFLP 기술의 비교를 통한 PCR-RFLP 기술의 유용성을 검증하고 F2 분리세대에서의 SI 인자 분리양상을 파악함으로써 계통의 선발과 고정과정에서 인공수분에 의한 자가불화합 여부 판독에 의한 비용과 인력을 절감하며 F1 종자 순도검정에의 이용가능성도 알아보았다..

2. 연구에 사용된 재료

현재 육종에 사용되고 있는 13개의 계통과 정확한 SI 인자가 파악되지 않은 11개의 무 계통을 실험에 사용하였으며 F2 분리세대 분석에는 실험과정에서 획득된 F2 집단을 재료로 사용하였다.

3. 연구수행방법

가. PCR 조건의 확립

1) DNA 추출

흥농종묘 육종연구소에서 자가불화합성을 이용하여 종자를 생산하는 식물개체의 잎 3 g을 액체 질소를 이용하여 분쇄한 후, 여기에 60℃로 데운 extraction buffer (50 mM Tris-Cl, 1.4M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.5 % SDS)를

15 ml 넣고 잘 섞어준 후 β-mercaptoethanol 150 μl, insoluble PVP 1 g을 넣어서 잘 섞어준 뒤, 50 ml conical tube로 옮겼다. 60℃에서 30분에서 1시간동안 가열한 후 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 15 ml 넣고 20-30 분간 잘 섞어주었다. 이를 7,000 rpm 으로 15 분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 동량의 isopropyl alcohol을 넣고 침전시켰다. 침전된 DNA를 유리봉으로 건져 microtube로 옮긴 다음 70% ethanol로 2회 세척한 후 filter paper에 blotting 하여 남아있는 ethanol을 날려버리고 DNA pellet에 TE buffer를 넣어 DNA를 녹여냈다. DNA의 최종 농도는 fluorometer를 이용하여 측정하였다.

2) PCR 반응 및 조건

PCR은 MJ-Research PTC 100을 이용하여 수행하였다. PCR 반응의 적정 template, primer 농도를 결정하기 위하여 template 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ng, primer 5, 10, 25, 50, 100 pmole로 하여서 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 5 분간 denature후 94℃ 1 분, 55℃ 2분, 72℃ 3분으로 35회 반응하고 마지막 회에서 72℃로 10분간 반응하였다.

3) 전기영동

PCR 반응 후 TBE buffer를 넣은 1.2% agarose gel에서 120 V로 1 시간 30분 동안 전기영동하고 EtBr로 염색하여 UV 하에서 관찰하고 사진 촬영하여 data를 보관하였다.

나. Southern blot analysis

1) Transfer

PCR 반응 후 TBE buffer를 넣은 1.2% agarose gel에서 120 V로 1 시간 30분 동안 전기영동한 후에 0.4 N NaOH 용액에 30분간 담가서 denaturation 하였다. Wrap을 깔고, 그 위에 gel을 놓은 뒤에 미리 hydration 시킨 Hybond-N+

membrane을 올려놓고, 2장의 3MM paper와 kitchen towel을 올려서 transfer 하였다.

2) hybridization

Class I-SLG specific Primer와 Class II-SLG specific primer, SRK specific primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 pBluescript SK(+)를 *Sma*I으로 잘라서 dephosporylation을 한 vector에 ligation을 하여 *E. Coli* strain JM109에 형질전환 하였다. X-Gal과 IPTG가 들어있는 LB ampicillin 배지에서 12시간 동안 키워서, 하얀색으로 ligation이 제대로 된 colony 만을 뽑아 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 결정한 뒤에 이를 BLAST search를 통하여 자가불화합성과 관련된 유전자임을 확인하였고, cloning된 각각의 DNA를 *Pvu*II로 절단하여 gel에 전기영동하고, gel로부터 elution하여 probe로 사용하였다. Hybridization solution (6X SSC, C.5% SDS, 5X Denhardt reagent, forand 100 μg/ml Salmon sperm DNA)에 membrane이 젖도록 넣어서 2시간 정도 65℃에서 shaking 하면서 반응한 뒤에 [α-^{32}P]dCTP labelling probe를 0.3N NaCH를 처리하여 denaturation 하였다. 이렇게 처리된 membrane을 hybridization solution에 넣어서 20시간 이을 반응하였다. 반응이 끝난 membrane은 2×SSC, 0.2% SDS 용액에 넣어 65℃에서 30분간 씻어주고, 다시 membrane 1×SSC, 0.2% SDS 용액에 넣어 65℃에서 30분간 씻어주었다. 마지막으로 0.1×SSC, 0.2% SDS 용액에서 65℃로 30분간 2회 씻어주고, X-ray film에 넣어 -60℃에서 3시간 정도 노출시켰다.

다. Silver staining 조건 확립

1) PCR 산물 extraction 방법 비교

PCR 반응이 끝난 산물을 2가지 방법을 이용하여 분리하였다. PCR 반응이 끝난 산물은 1.5 ml microtube로 옮겨 T.D.W.를 넣은 뒤 volume이 500 μl가 되게

한 후에 chloroform/isoamylalcohol (24:1) 500 μℓ를 첨가하여 잘 섞어주었다. 이를 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후에 상등액을 취하여 3 M sodium acetate 40 μℓ와 100% EtOH를 넣어 잘 섞어주고, -20℃에서 2시간 동안 두었다. 이를 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 pellet을 취한 후 70% ethanol로 2회 세척하고 vacuum dryer를 이용하여 ethanol을 날려버렸다. 마지막으로 DNA pellet에 TE buffer를 넣어 DNA를 녹였다.

두 번째 방법은 PCR 산물을 1.2%의 agarose gel에 걸어서 증폭된 산물을 확인한 후, gel로부터 오려내어 DNA를 추출하여 사용하였다. 도려낸 gel을 액체질소에서 얼린 후, 유리봉을 이용하여 마쇄하였다. 마쇄된 gel 조각을 1.5 ml microtube내의 filter paper위에 올린 뒤에 10,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. tube의 아래에 있는 용액에 chloroform/isoamylalcohol (24:1) 500 μℓ를 첨가하여 잘 섞어주었다. 이를 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후에 상등액을 취하여 3 M sodium acetate 40 μℓ와 100% EtOH를 넣어 잘 섞고, -20℃에서 2시간 동안 두었다. 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 pellet을 취한 후 70% ethanol로 2회 세척하고 vacuum dryer를 이용하여 ethanol을 날려버리고 DNA pellet에 TE buffer를 넣어 DNA를 녹였다. 이렇게 얻은 산물을 이용하여 제한효소 *Taq*Ⅰ으로 반응시키고, 이를 5% acrylamide gel에 걸어 확인하였다.

2) Template 농도

Silver staining을 수행하기 위해서 PCR로 증폭된 산물을 gel로부터 extraction한 후에 DNA의 최종 농도는 fluorometer를 이용하여 측정하였다. DNA 농도를 0, 10, 25, 50, 100, 200 ng로 달리하여 제한효소로 절단하였으며 silver staining에 적당한 농도를 결정하였다.

3) Silver staining 방법

가) acrylamide gel 준비

5% acrylamide, 1×TBE를 넣고, 여기에 10% ammonium persulfate 500 ㎕, TEMED 40 ㎕를 넣어 잘 섞어준 뒤에 vertical gel에 부었다. 2시간 정도 굳힌 후에 TBE buffer를 이용하여 well에 남아 있는 acrylamide의 작은 조각들을 제거하고, 여기에 제한효소로 반응시킨 DNA를 loading하여 150 V로 2시간 정도 전기영동 하였다. Gel에 loading하기 위한 DNA 농도는 50-100 ng 정도를 사용하였으며, 절단된 산물을 vacuum dryer를 이용하여 건조시킨 후, 3×DNA dye를 넣어 잘 섞어준 뒤 5% acrylamide gel에 loading하였다.

나) Silver staining

전기영동이 끝난 gel에서 유리판을 떼어낸 뒤에 10% 고정액 (10% acetic acid)에 넣어 30분간 흔들어 주었다. 고정액을 버리고, 3차 증류수를 이용하여 2분씩, 3회에 걸쳐 gel에 있는 고정액이 씻기도록 씻어주었다. 이렇게 처리한 gel을 염색용액 (silver nitrate 500 mg/500㎖, 37% formaldehyde 750 ㎕/500 ㎖)에 넣어서 30분간 흔들어 주었다. 염색이 끝난 gel을 3차 증류수로 5-10초 동안 씻어주고, 미리 4℃에서 cooling한 현상용액 (sodium carbonate 15g/500 ㎖, 37% formaldehyde 750 ㎕/500㎖, sodiumthiosulfate 100㎕/500㎖)에 넣어 밴드가 보일 때까지 rocker 위에서 흔들어 주었다. 밴드가 나타나면 gel을 5분간 고정용액 (10% acetic acid)에 넣어 흔들어 준 뒤 3차 증류수로 3분씩 2회에 걸쳐서 씻어주었다. Gel을 3MM paper위에 잘 펴서 놓은 뒤에 gel dryer에서 80℃로 50분간 건조하였다.

4. 연구결과

가. 무 13계통으로부터 genomic DNA 분리

Genomic DNA를 분리하여 agarose gel에 전기영동한 후, fluorometer를 이용하여 DNA를 25 ng/㎕로 정량하였다.

나. Universal, SLG, SRK primer를 이용한 PCR

1) 적정한 PCR 조건 수립

식물체 계통 번호 107의 DNA를 이용하여 DNA와 primer의 농도를 달리하여 PCR를 수행하였다 (그림 2). 그 결과 DNA 농도는 25-100 ng, primer 농도는 25-50 pmole의 경우가 PCR 증폭이 이루어졌다. 이 결과를 기준으로 하여 이 후에 수행한 모든 PCR 실험에서는 DNA 50 ng, primer 25 pmole를 이용하였다.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

Lanes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Templates(ng)	5	10	25	50	100	200	500	50				
Primer(pmole)	50							5	10	25	50	100

2) PCR with universal primers

Universal primer를 이용하여 무 12 계통에 대해서 PCR를 수행한 뒤 1.2% agarose gel에 전기 영동한 결과 그림 3과 같이 12계통 모두에서 PCR 증폭이 이루어졌다.

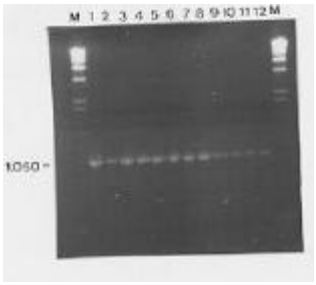

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products with universal primers.Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4, #267; 5, #107; 6, #262; 7, #5324; 8. #250; 9, #204; 10, #5335; 11, #5314; and 12, #5334.

3) PCR with class I-SLG specific primer

Class I-SLG specific primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 무 식물체 계통번호 37, 43, 50, 250, 204, 102에서 증폭된 밴드가 확인되었다 (그림 4). 이들 증폭된 밴드가 SLG 인지 알아보기 위해서 southern analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SLG임을 확인 할 수 있었다.

(A) (B)

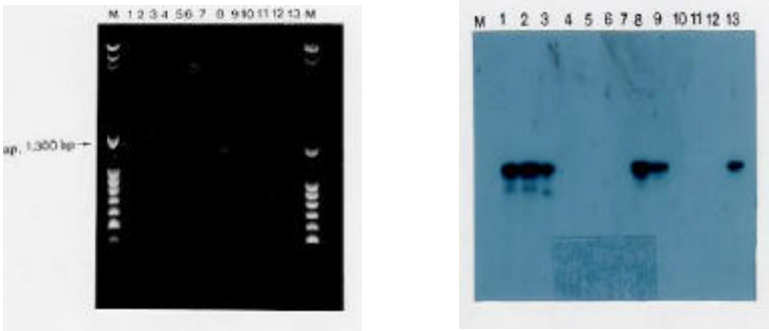

Figure 4. Agarose gel electrophoresis and southern analysis of PCR products with classI-SLG specific primers.(A) PCR products with classI-SLG specific primers. (B) Southern blot analysis of PCR products. Lane 1 radish line #37; 2,#43; 3, #50; 4, #267; 5, #107; 6, #262; 7, #5324; 8, #250; 9, #204; 10, #5335; 11, #5314; 12, #5334; and 13, #102.

4) PCR with classII-SLG specific primers

ClassII- SLG specific primer를 이용하여서 PCR를 수행한 결과 무 식물체 계통번호 107, 262, 5324, 5334에서 증폭된 밴드가 확인되었다 (그림 5).이들 증폭된 밴드가 SLG 인지를 알아보기 위해서 Southern analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SLG임을 확인하였다.

(A) (B)

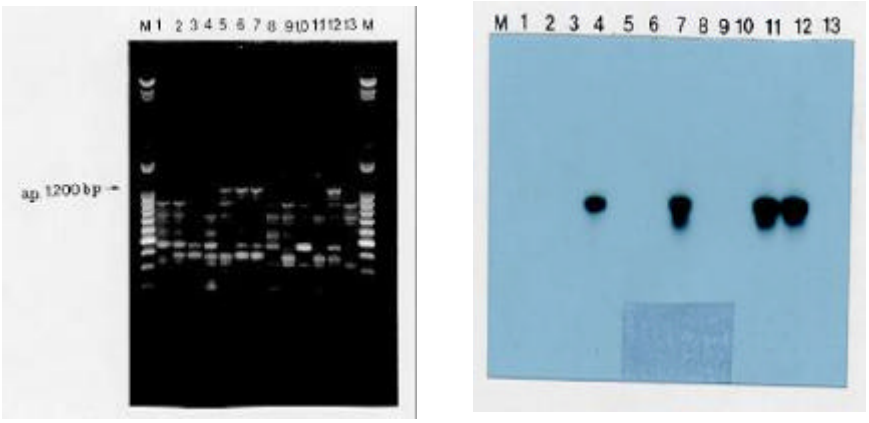

Figure 5. Agarose gel electrophoresis and Southern analysis of PCR products with classII-SLG specific primers. (A) PCR products with classII-SLG specific primers. (B) Southern blot analysis of PCR products. Lane 1, radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4, #267; 5, #107; 6, #262; 7, #5324; 8, #250; 9, #204; 10, #5335; 11, #5314; 12, #5334; and 13, #102.

5) PCR with SRK specific primers

SRK specific primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 무 식물체 계통번호 37, 43, 50, 250, 204, 5335, 102에서 증폭된 밴드가 확인되었다 (그림 6). 이것이 SRK 유전자 인지를 알아보기 위하여 southern analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SRK임을 확인하였다

(A) (B)

Figure 6. Agarose gel electrophoresis and southern analysis of PCR products with SRK specific primers. (A) PCR products with SRK specific primers,(B) Southern blot analysis of PCR products. Lane 1. radish line #37; 2. #43; 3. #50; 4. #267; 5, #107; 6. #262; 7. #5324; 8, #250; 9, #204; 10, #5335; 11, #5314; 12, #5334; and 13, #102.

6) PCR 증폭의 결과

본 실험에 사용된 PCR primer를 이용하여 증폭된 DNA fragments 결과를 표로 나타내었다 (표 19).

Table 19. Amplification of DNA fragments from S tester lines in *R.sativus*.

Radish lines	Universal	class I-SLG	class II-SLG	SRK
37	+	+		+
43	+	+		+
50	+	+		+
267	+			
107	+		+	
262	+		+	
5324	+		+	
250	+	+		+
204	+	+		+
5335	+			+
5314	+			+
5334	+		+	
102	+	+		+

+: DNA fragment amplified

다. SLG, SRK primer를 이용한 PCR products의 cloning 및 sequencing

ClassI-SLG specific primer, class II-SLG specific primer, SRK specific primer를 이용하여 증폭된 각각의 PCR 산물을 cloning하여 sequencing을 수행하였다. 그 결과 이들 증폭된 산물이 기존의 보고된 자가불화합성 유전자와 높은 homology를 지니고 있음을 알 수 있었다.

라.PCR-RFLP를 이용한 자가불화합성 인자의 분류

1) PCR 산물 extraction 방법

식물체 번호 107번의 genomic DNA를 universal primer를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 chloroform/isoamylalcohol (24:1)로 extraction 하였을 때와, gel에 전기영동을 한 후, elution을 한 방법으로 비교하였다 (그림 7). 그 결과, 두 방법 모두 동일한 PCR-RFLP 밴드 pattern을 나타내어 두 가지 방법 모두 PCR 산물의 extraction 방법에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Figure 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Rsa*I. Lane 1; chloroform extraction, and 2; elution of PCR products. L: 100 bp ladder, M: M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII.

2) Template 농도

Silver staining을 수행하였을 때 적정한 template의 농도를 알아보기 위하여, 식물체 번호 107번을 universal primer를 이용하여 PCR한 뒤 elution하여 농도별로 PCR-RFLP를 수행하였다 (그림 8). 그 결과 적은 양의 template 농도에서도 silver staining을 통하여 band를 확인할 수 있었으나, 약 50-100 ng의 농도가 PCR-RFLP를 이용한 전기영동에서 가장 적합하였다.

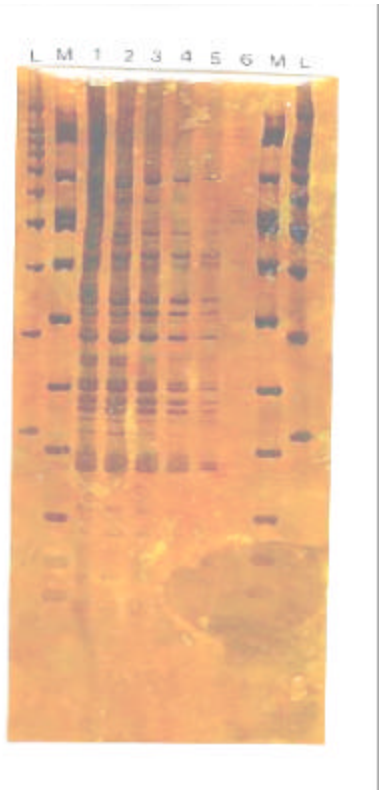

Figure 8. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Rsa*I. DNA concentration of lane1: 200, 2; 100, 3; 50, 4; 25, 5; 10, and 6;0 ng. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

3) ClassI-SLG 특이 primer를 이용하여서 증폭된 계통들의 분류

가) PCR-RFLP with *Taq*I

ClassI-SLG specific primer를 이용하여, 총 13 개체의 무 식물체 가운데 6 개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37, 43, 50, 250, 204, 102)에서 PCR product를 얻었다. 이 밴드들을 elution 하여 *Taq*I으로 반응시킨 뒤 silver staining을 수행하였다. 그 결과 식물체 번호 37번과 43번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고 나머지 4개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 9). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것으로 생각되었다. 이것은 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

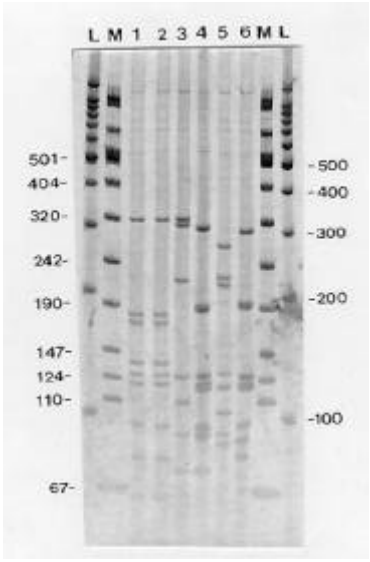

Figure 9. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Taq*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class I-SLG specific primers. Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4. #250; 5, #204; and 6, #102. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII.

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

ClassI-SLG specific primer로 증폭된 6개체의 PCR product를 elution 하여 *Tru*9I 으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 4개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 10). 이것은 앞선 실험결과 (*Taq*I)와 일치하는 것으로 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것으로 생각되며 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

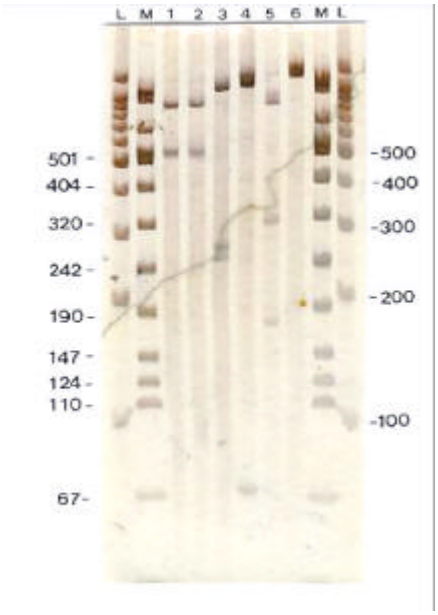

Figure 10. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Tru*9I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class I-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4. #250; 5, #204; and 6, #102.
L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

다) PCR-RFLP with *Msp*I

Class I-SLG specific primer로 증폭된 6개체의 밴드를 elution 하여 *Msp*I 으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고 나머지 4개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 11). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것으로 생각되며 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

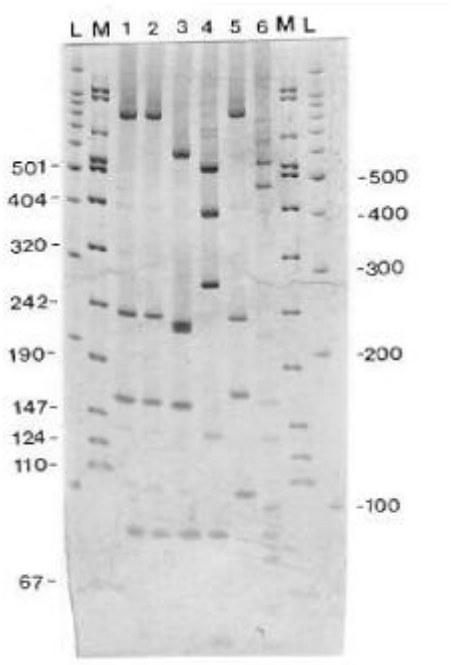

Figure 11. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Msp*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class I-SLG specific primers. Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4. #250; 5, #204; and 6, #102. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII.

라) PCR-RFLP with *Rsa*I

Class I-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 6개체의 밴드를 elution 하여 *Rsa*I 으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 앞선 결과들과 마찬가지로 식물체 번호 37번과 43번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고 나머지 4개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 12). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것으로 생각되었으며 역시 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

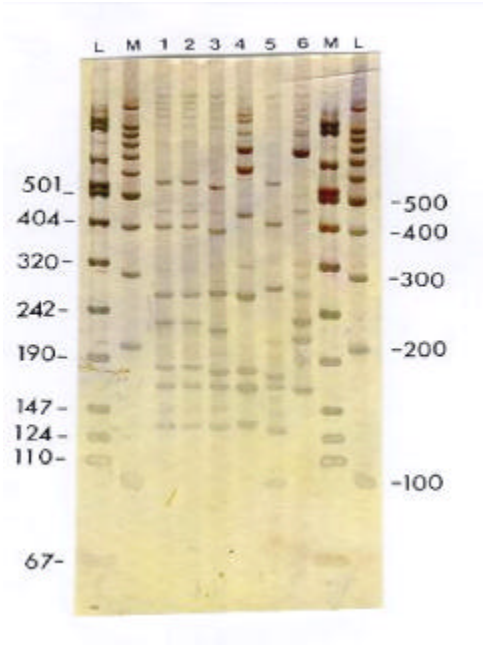

Figure 12. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Rsa*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class I-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4. #250; 5, #204; and 6, #102.
L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

마) PCR-RFLP with *Hae*III

Class I-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 6개체의 밴드를 elution 하여 *Hae*III 로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 50번과 250번의 밴드 pattern이 같게 나타났다 (그림 13). 이 결과는 classI-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 PCR-RFLP 방법으로 분류하는데 있어 *Hae*III enzyme의 경우에는 정확한 자가불화합성 인자를 분류할 수 없다는 것을 보여주는 것이다.

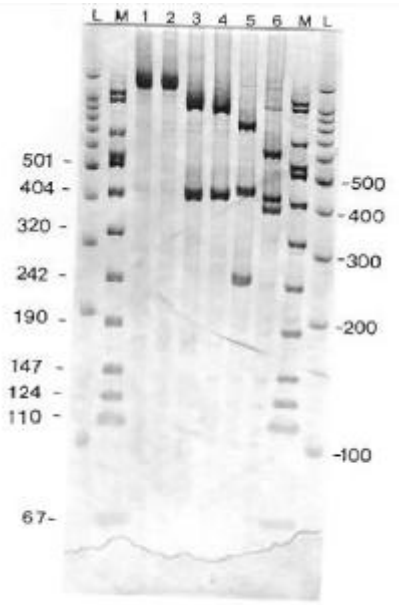

Figure 13. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Hae*III. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class I-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4. #250; 5, #204; and 6, #102.
L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

바) PCR-RFLP with *Alu*I

Class I-SLG specific primer로 증폭된 6개체의 밴드를 elution 하여 *Alu*I 으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 4개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 14). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

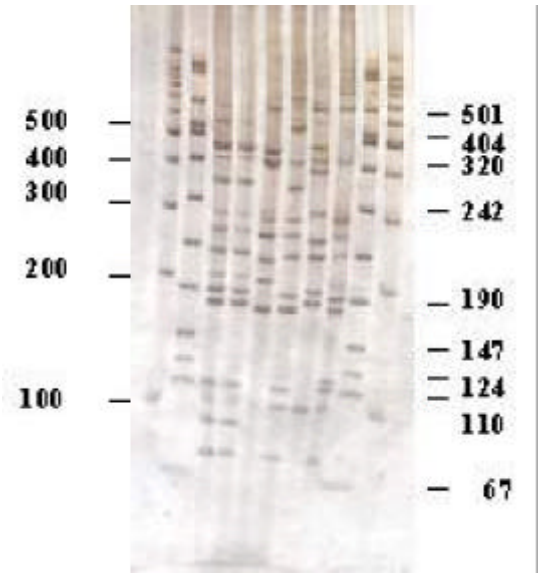

Figure 14. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Alu*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class I-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4. #250; 5, #204; and 6, #102.
L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

4) ClassII-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류

가) PCR-RFLP with *Taq*I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 총 13개체의 무 식물체 가운데 4개체의 식물체 (식물체 일련번호: 107, 262, 5324, 5334)에서 PCR 산물을 얻었다. 이것을 elution 하여 *Taq*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 262, 5324번과 5334번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 107번 식물체에서 증폭된 band pattern만이 다르게 나타났다 (그림 15). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

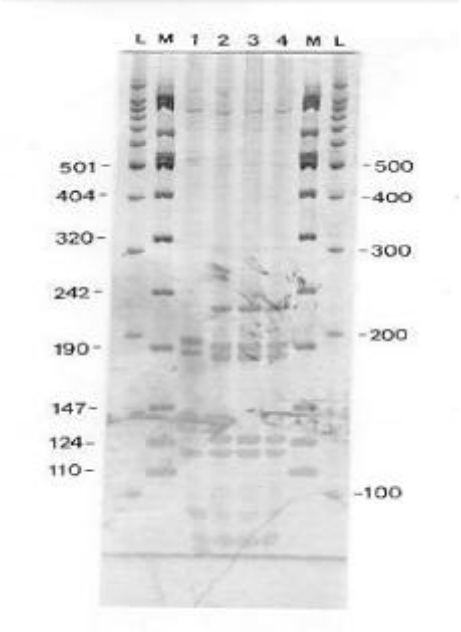

Figure 15. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Taq*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class II-SLG specific primers. Lane 1: radish line #107; 2, #262; 3, #5324; 4, #5334. L:100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII.

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여서 증폭된 4개체 (107, 262, 5324, 5334)의 밴드를 elution 하여 *Tru*9I 으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 4개체에서 서로 비슷한 band pattern을 나타내었다 (그림 16). 이 결과로 classII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 *Tru*9I enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다.

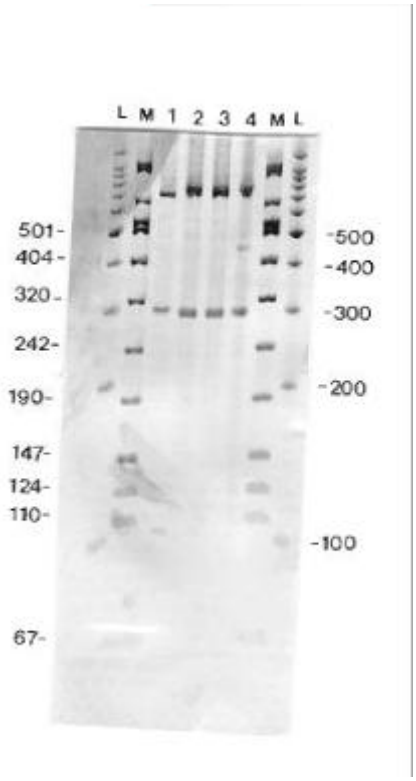

Figure 16. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Tru*9I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class II-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #107; 2, #262; 3, #5324; 4, #5334. L:100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cla*I, and *Hin*dIII.

다) PCR-RFLP with *Rsa*I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 4개체의 (107, 262, 5324, 5334) 밴드를 elution 하여 *Rsa*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 262, 5324번과 5334번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 107번 식물체에서 증폭된 band pattern만이 다르게 나타났다 (그림 17). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인할 수 있었으며 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

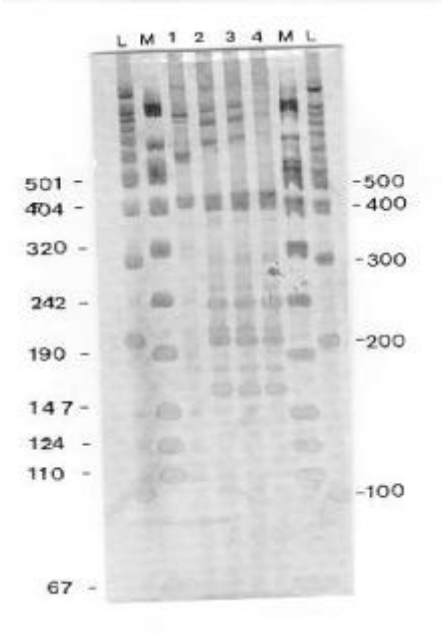

Figure 17. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Rsa*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class II-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #107; 2, #262; 3, #5324; 4, #5334.
L:100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

라) PCR-RFLP with *Hae*III

ClassII-SLG specific primer로 증폭된 4개체 (107, 262, 5324, 5334)의 밴드를 elution 하여 *Hae*III로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 4개체에서 서로 비슷한 band pattern을 나타내었다 (그림 18). 이 결과로 classII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 *Hae*III enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다.

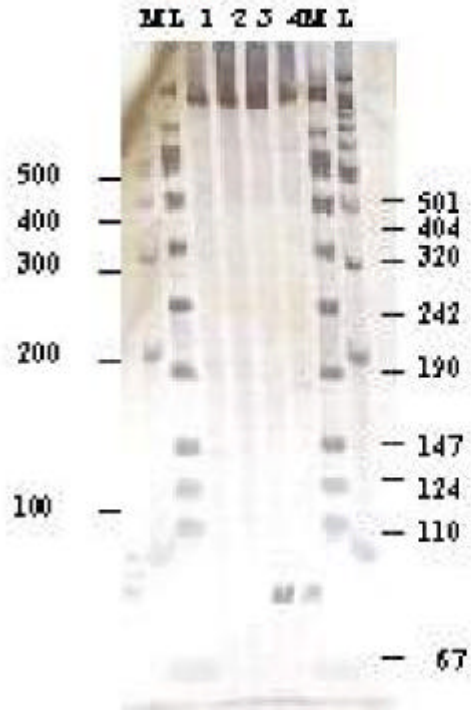

Figure 18. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Hae*III. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class II-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #107; 2, #262; 3, #5324; 4, #5334.
L:100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

마) PCR-RFLP with *Alu*I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여서 증폭된 4개체 (107, 262, 5324, 5334)의 밴드를 elution 하여 *Alu*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 4개체에서 서로 비슷한 band pattern을 나타내었다 (그림 19). 이 결과로 classII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 *Alu*I enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다.

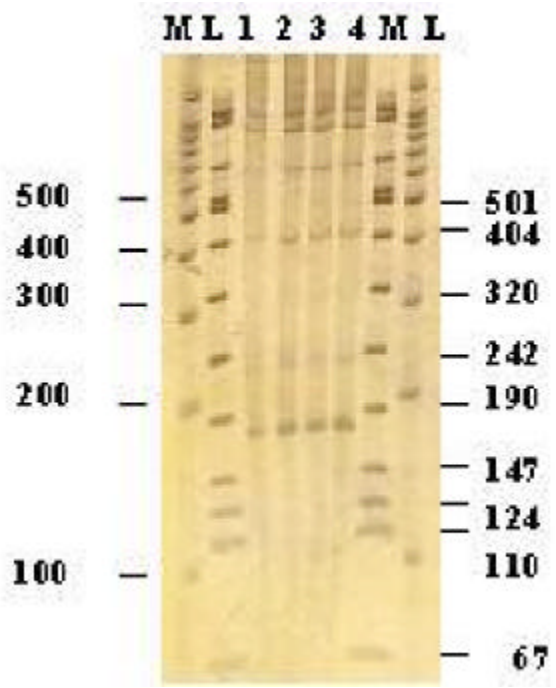

Figure 19. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Alu*I. SLG DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA of S homozygotes in *R. sativus* with class II-SLG specific primers.
Lane 1: radish line #107; 2, #262; 3, #5324; 4, #5334.
L:100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII.

5) SRK 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류

가) PCR-RFLP with *Taq*I

SRK specific primer를 이용하여 총 13개체의 무 식물체 가운데에서 8개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37,43, 50, 250, 204, 5335, 5314, 102)에서 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 이것을 elution하여 *Taq*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 5335번과 5314번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다 (그림 20). 이로써 증폭된 총 8개체의 band pattern은 서로 다른 5가지의 자가불화합성으로 나눌 수 있었다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

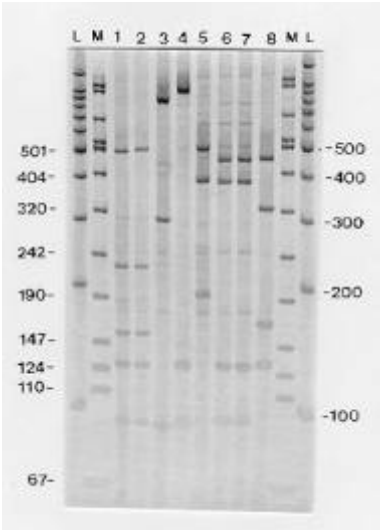

Figure 20. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Taq*I. SRK DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA S homozygotes in *R. sativus* with SRK specific primers . Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4, #250; 5, #204; 6, #5335; 7, #5314; and 8, #102. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII.

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution하여 *Tru*9I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 5335번과 5314번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 개체에서 증폭된 산물의 경우는 PCR-RFLP pattern이 서로 다르게 나타났다 (그림 21). 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

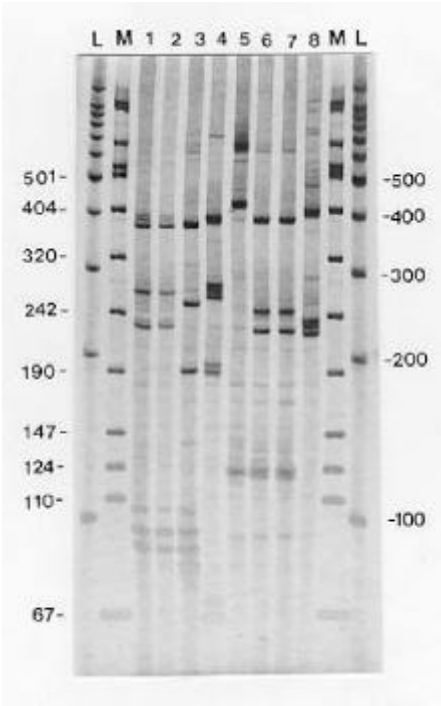

Figure 21. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Tru*9I. SRK DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA S homozygotes in *R. sativus* with SRK specific primers . Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4, #250; 5, #204; 6, #5335; 7, #5314; and 8, #102. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII.

다) PCR-RFLP with *Rsa*I

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution하여 *Rsa*I으로 잘라서 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 증폭된 8개체의 산물을 잘라서 나타난 band pattern은 서로 비슷하게 나타났다 (그림 22). 따라서 SRK specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 *Rsa*I enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려운 것으로 생각된다.

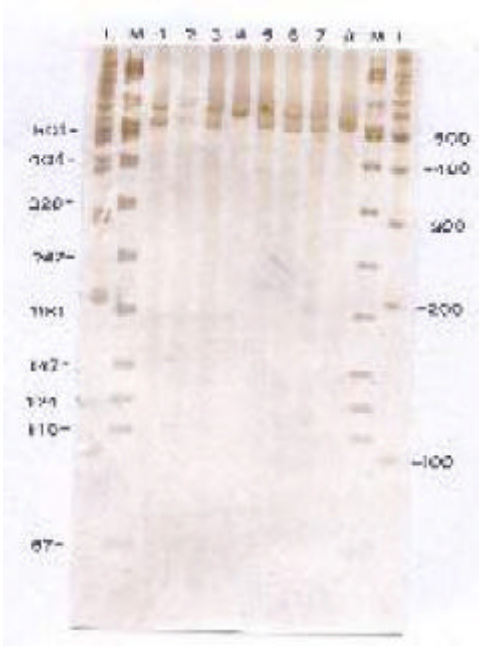

Figure 22. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Rsa*I. SRK DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA S homozygotes in *R. sativus* with SRK specific primers . Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4, #250; 5, #204; 6, #5335; 7, #5314; and 8, #102. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII.

라) PCR-RFLP with AluI

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution하여 *Alu*I 으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번과 43번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 5335번과 5314번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다 (그림 23). 나머지 개체에서 증폭된 산물의 경우는 PCR-RFLP pattern이 서로 다르게 나타났다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

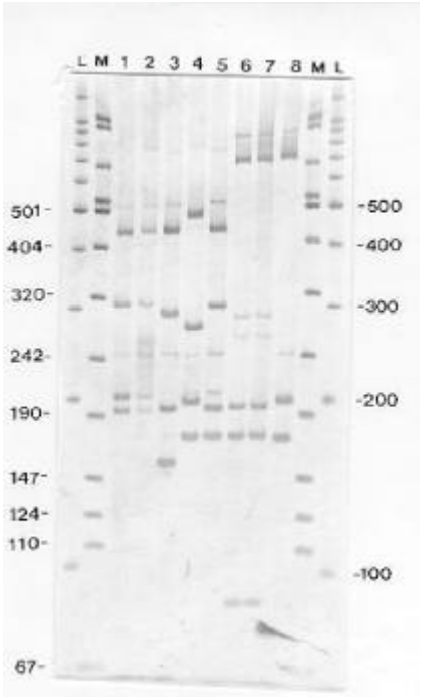

Figure 23. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after cleavage with *Alu*I. SRK DNA was specifically amplified by PCR from the genomic DNA S homozygotes in *R. sativus* with SRK specific primers . Lane 1: radish line #37; 2, #43; 3, #50; 4, #250; 5, #204; 6, #5335; 7, #5314; and 8, #102. L: 100 bp ladder, M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII.

6) PCR-RFLP를 이용한 무 계통의 자가불화합성 인자형

자가불화합성 유전자인 SLG 와 SRK를 선택적으로 증폭하여, 증폭된 산물을 제한 효소로 절단하여 나온 단편들의 polymorphism을 이용하여 자가불화합성 인자형을 구분하였다. 그 결과는 흥농종묘 육종연구소의 교배검정 결과와 일치하였고 #102의 경우는 교배검정을 하지 않아 비교할 수 없었다. PCR-RFLP에서는 #267번의 자가불화합성을 band pattern으로 구분하지는 못하였다 (표20).

Table 20. *R. sativus* S haplotypes used plant materials

S haplotype	Lines
S1S1	#37, #43
S2S2	#50
S4S4	#107
S5S5	#262, #5324
S6S6	#250
S7S7	#204
S8S8	#5335, # 5314
S10S10	#102

제 2 절 PCR-RFLP를 이용한 미확인 무 SI 인자분류 및 분리세대 검정

1. 연 구 목 적

앞선 실험에서 SI 인자가 확인된 무 계통 10개를 tester plant로 하여 인자가 정확히 분류되어 있지 않은 무 11 계통에 대하여 인자 확인을 수행하였다. 인공수분에 의한 자가불화합 여부와 PCR-RFLP를 이용한 결과를 비교하여 PCR-RFLP 만으로 SI 인자의 분류가 가능한지 알아보았다.

2. 연구에 사용된 재료

가. PCR-RFLP를 이용한 미분류 자가불화합성 인자의 동정 및 분류

PCR-RFLP는 2차년도에 연구 수행한 13계통과 3차년 미확정 자가불화합성 11계통을 사용하였다.

나. PCR-RFLP를 이용한 자가불화합 F2 분리세대에서의 SI 분리 pattern 분석

2차년도 무 계통 가운데 식물체 번호 37번과 50번을 교배하여 F1을 얻고 이 F1을 자가수정 하여 F2 집단을 얻은 뒤 분리세대에서 자가불화합성인자의 분리 pattern을 조사하였다.

다.PCR-RFLP를 이용한 F1 순도검정

2차년도 무 계통들은 교배하여 그들로부터 F1을 얻어, 순도검정을 실시하였다.

3. 연구수행방법

가. PCR 조건, Southern blot analysis, PCR-RFLP 방법들은 4장 1절의 연구과정에 사용된 것과 동일한 방법으로 수행하였다.

4. 연구결과

가. SLG, SRK primer를 이용한 미확인 무 계통 SI 인자의 PCR

1) PCR with classI-SLG specific primer

2차년도에 사용되었던 무 13 계통과 3차년도 무 11계통을 classI-SLG specific primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 무 식물체 계통번호 37, 43, 50, 250, 204, 102, 3, 39, 80, 143에서 증폭된 밴드가 확인되었다 (그림 24).

이들 증폭된 밴드가 SLG 인지 알아보기 위해서 Southern blot analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SLG임을 확인하였다.

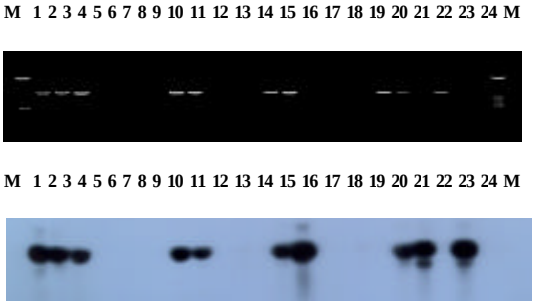

Figure 24. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis of PCR products using class I-SLG specific primers. Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4:#267, 5: #107, 6: #262, 7: #5324, 8: #250, 9: #204, 10:#5335, 11: #5314, 12: #5334, 13: #102, 14: #3, 15: #12, 16: #18, 17: #28, 18: #32, 19: #39, 20: #80, 21: #85, 22: #143, 23: #154, 24: #160.

2) PCR with classII-SLG specific primer

ClassII-SLG specific primer를 이용하여서 PCR를 수행한 결과 무 식물체 계통번호 107, 262, 5324, 5334, 18, 28, 32, 154에서 증폭된 밴드가 확인되었다 (그림 25). 이들 증폭된 밴드가 SLG 인지 알아보기 위해서 Southern blot analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SLG임을 확인하였다.

3) PCR with SRK primer

SRK primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 무 식물체 계통번호 37, 43, 50, 250, 204, 5335, 5314, 102, 3, 12, 39, 80, 85, 143, 160에서 증폭된 밴드가 확인되었다 (그림 26). 이들 증폭된 밴드가 SRK 인지 알아보기 위해서 Southern blot analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SRK임을 확인하였다.

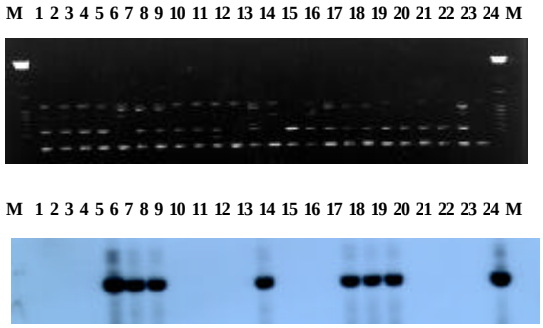

Figure 25. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis of PCR products using class II-SLG specific primers. Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4:#267, 5: #107, 6: #262, 7: #5324, 8: #250, 9: #204, 10:#5335, 11: #5314, 12: #5334, 13: #102, 14: #3, 15: #12, 16: #18, 17: #28, 18: #32, 19: #39, 20: #80, 21: #85, 22: #143, 23: #154, 24: #160.

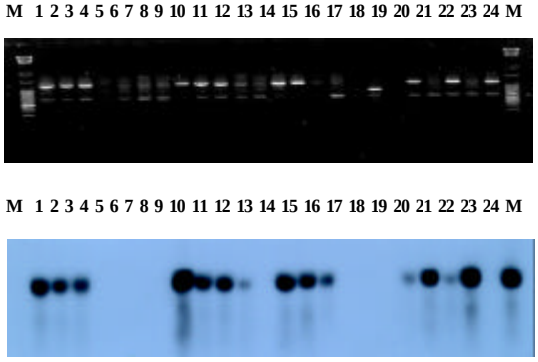

Figure 26. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis of PCR products using SRK specific primers. Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4:#267, 5: #107, 6: #262, 7: #5324, 8: #250, 9: #204, 10:#5335, 11: #5314, 12: #5334, 13: #102, 14: #3, 15: #12, 16: #18, 17: #28, 18: #32, 19: #39, 20: #80, 21: #85, 22: #143, 23: #154, 24: #160.

4) PCR 증폭결과

본 실험에 사용된 PCR primer를 이용하여서 증폭된 DNA fragments 결과를 표로 나타내었다 (표 21).

Table 21. Amplification of DNA fragments from S tester lines in *R. sativus*.

Radish lines	class I SLG	class II-SLG	SRK
37	+		+
43	+		+
50	+		+
267			
107		+	
262		+	
5324		+	
250	+		+
204	+		+
5335			+
5314			+
5334		+	
102	+		+
3	+		+
12			+
18		+	
28		+	
32		+	
39	+		+
80	+		+
85			+
143	+		+
154		+	
160			+

+: DNA fragment amplified

나. PCR-RFLP를 이용한 미확인 무 계통에 대한 SI 인자의 분류

1) ClassI-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류

가) PCR-RFLP with *Taq*I

ClassI-SLG specific primer를 이용하여 총 24개체의 무 식물체 가운데 10개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37, 43, 50, 250, 204, 102, 3, 39, 80, 143)에서 PCR 산물을 얻었다. 이것을 elution 하여 *Taq*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번, 43번, 3번, 80번, 143번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다 (그림 27). 나머지 3개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다. 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

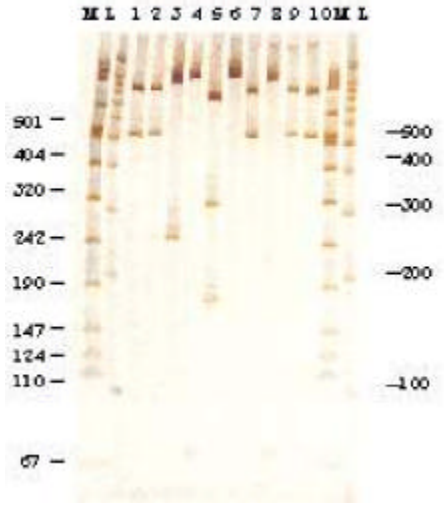

Figure 27. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I specific primers. Ten out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #102, 7: #3, 8: #39, 9: #80, 10: #143. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

ClassI-SLG specific primer를 이용하여 총 24개체의 무 식물체 가운데에서 10개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37, 43, 50, 250, 204, 102, 3, 39, 80, 143)에서 PCR 산물을 얻었다. 이것들을 elution하여 *Tru*9I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번, 43번, 3번, 80번, 143번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 3개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 28). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

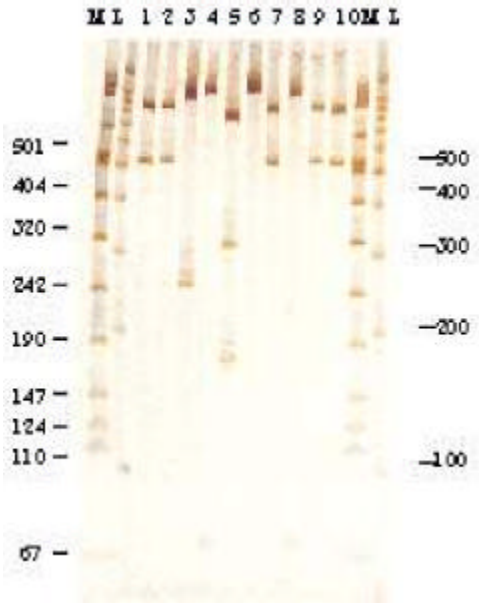

Figure 28. PAGE of the *Tru*9I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I specific primers. Ten out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #102, 7: #3, 8: #39, 9: #80, 10: #143. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

다) PCR-RFLP with *Msp*I

ClassI-SLG specific primer를 이용하여 총 24개체의 무 식물체 가운데 10개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37, 43, 50, 250, 204, 102, 3, 39, 80, 143)에서 PCR 산물이 증폭되었다. 증폭된 밴드를 elution 하여 *Msp*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번, 43번, 3번, 80번, 143번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 3개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 29). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

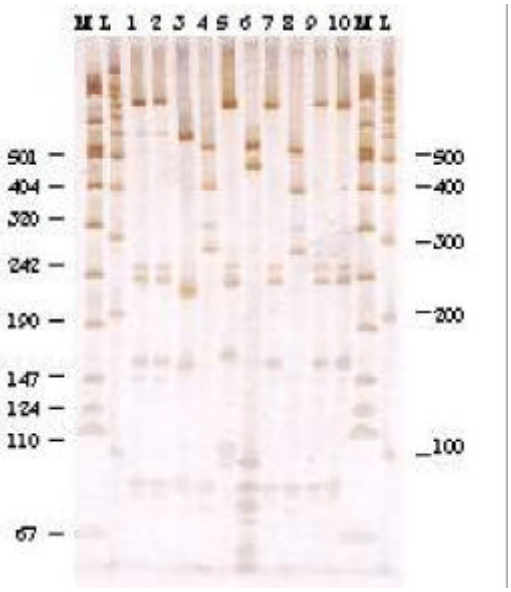

Figure 29. PAGE of the *Msp*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I-specific primers. Ten out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #102, 7: #3, 8: #39, 9: #80, 10: #143. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

라) PCR-RFLP with *Rsa*I

ClassI-SLG specific primer를 이용하여 총 24개체의 무 식물체 가운데에서 10개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37, 43, 50, 250, 204, 102, 3, 39, 80, 143)에서 증폭되었다. 증폭된 밴드를 elution 하여 *Rsa*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번, 43번, 3번, 80번, 143번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 2개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다 (그림 30). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다.

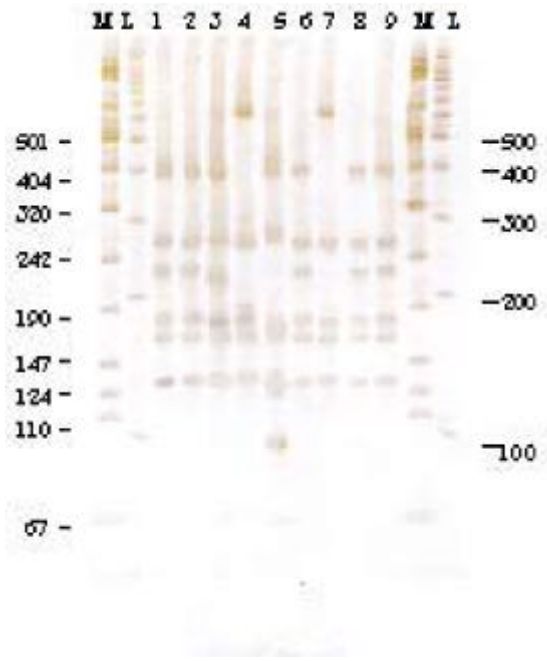

Figure 30. PAGE of the *Rsa*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I-specific primers. Ten out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #3, 7: #39, 8: #80, 9: #143. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

마) PCR-RFLP with *Hae*III

Class I-SLG specific primer를 증폭된 10개체의 밴드를 elution 하여서 *Hae*III 로 잘라서 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번, 43번, 3번, 80번과 143번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 50번과 250번과 39번의 밴드 pattern이 같게 나타났다 (그림 31). 이 결과로 classI-SLG specific primer를 이용하여서 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류하기에는 *Hae*III enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다.

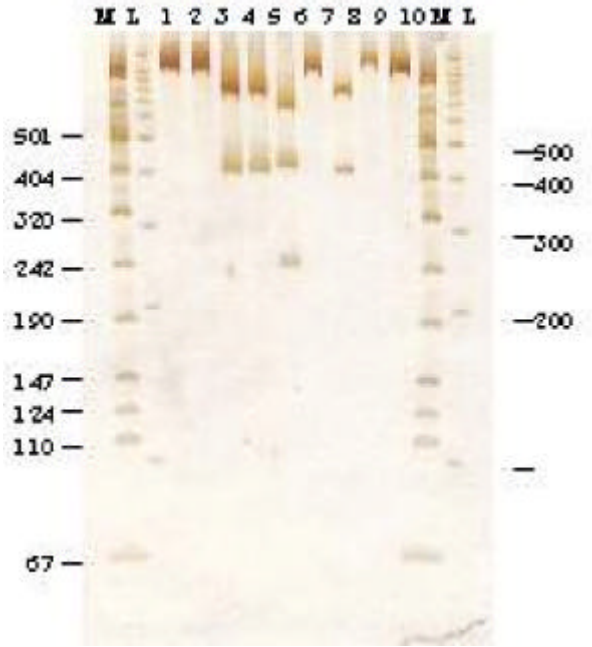

Figure 31. PAGE of the *Hae*III cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I-specific primers. Ten out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #102, 7: #3, 8: #39, 9: #80, 10: #143. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

바) PCR-RFLP with *Alu*I

Class I-SLG specific primer로 증폭된 10개체의 밴드를 elution 하여 *Alu*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37번, 43번, 3번, 80번, 143번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다 (그림 32). 나머지 2개체는 서로 다른 band pattern을 나타내었다. 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것으로 판단되었다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

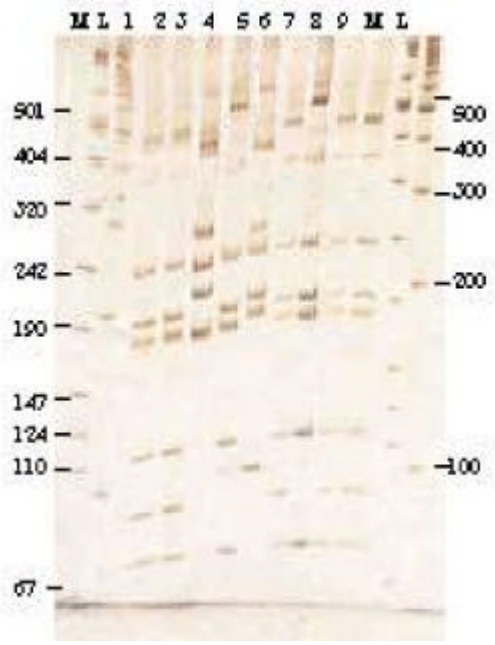

Figure 32. PAGE of the *Alu*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I- SLG specific primers. Ten out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #3, 7: #39, 8: #80, 9: #143. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

2) ClassII-SLG 특이 primer를 이용하여 증폭된 계통들의 분류

가) PCR-RFLP with *Taq*I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 총 24개체의 식물체 가운데 8개체 식물체 (식물체 일련번호: 107, 262, 5324, 5334, 18, 28, 32, 154)에서 PCR 산물이 증폭되었다. 증폭된 밴드를 elution 하여 *Taq*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 262, 5324, 5334, 18, 28, 32번과 154번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 107 식물체에서 증폭된 band pattern만이 다르게 나타났다 (그림 33). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

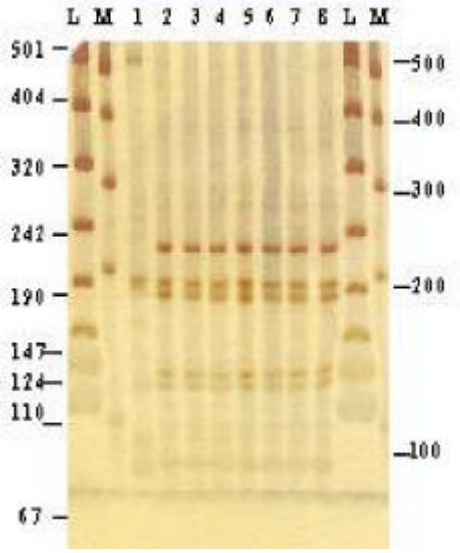

Figure 33. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with classII-SLG specific primers. Eight out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #107, 2: #262, 3: #5324, 4: #5335, 5: #18, 6: #28, 7: #32, 8:#154. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. M:. L: 100bp ladder.

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution 하여 *Tru*9I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 8개체에서 서로 비슷한 band pattern을 나타냈다. 이 결과로 classII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에는 *Tru*9I enzyme이 적합하지 않은 것으로 판명되었다 (그림 34).

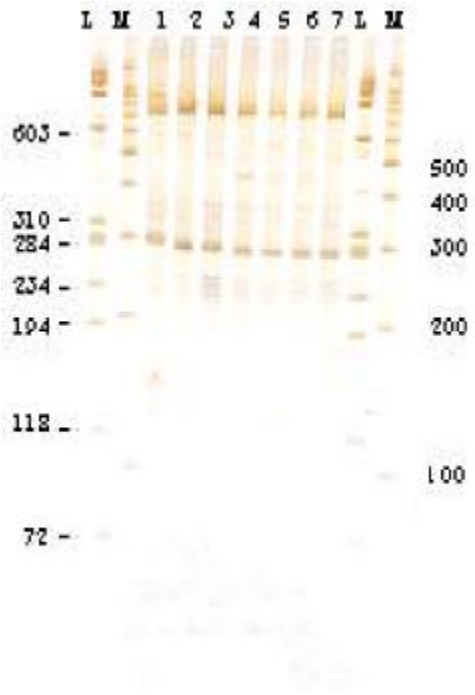

Figure 34. PAGE of the *Tru*9I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with classII-SLG specific primers. Eight out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #107, 2: #262, 3: #5324, 4: #5335, 5: #18, 6: #28, 7: #32, 8:#154. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cla*I, and *Hin*dIII. M:. L: 100bp ladder.

다) PCR-RFLP with *Msp*I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution 하여 *Msp*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 262, 5324, 5334, 18, 28, 32번과 154번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 107번 식물체에서 증폭된 band pattern만이 다르게 나타났다 (그림 35). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

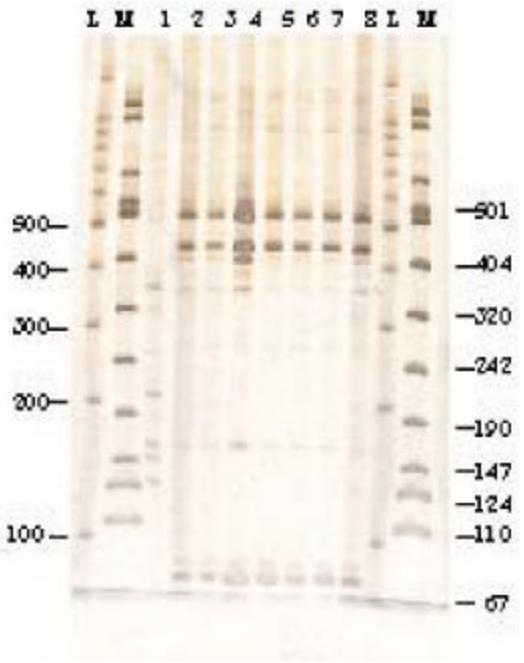

Figure 35. PAGE of the *Msp*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with classII-SLG specific primers. Eight out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #107, 2: #262, 3: #5324, 4: #5335, 5: #18, 6: #28, 7: #32, 8:#154. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. M:. L: 100bp ladder.

라) PCR-RFLP with *Rsa*I

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution 하여 *Rsa*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 262, 5324, 18, 28, 32번과 154번에서 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 나머지 107번 식물체에서 증폭된 band pattern만이 다르게 나타났다. 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다 (그림 36). 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

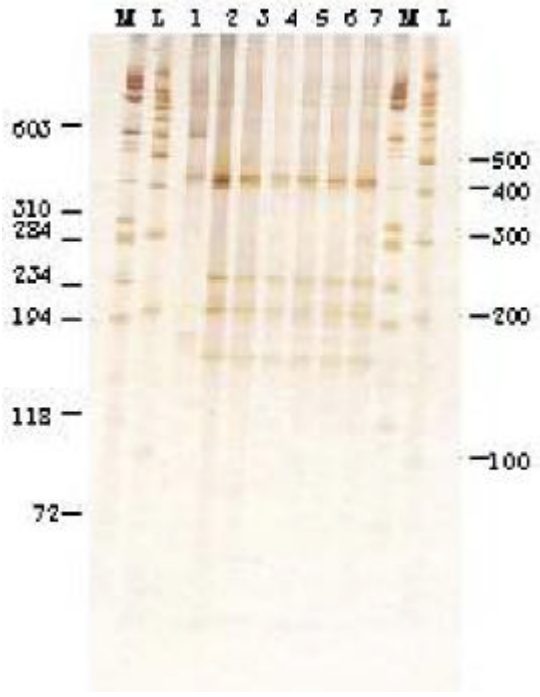

Figure 36. PAGE of the *Rsa*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with classII-SLG specific primers. Eight out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #107, 2: #262, 3: #5324, 4: #5335, 5: #18, 6: #28, 7: #32, 8:#154. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. M:. L: 100bp ladder.

마) PCR-RFLP with *Hae*III

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution 하여 *Hae*III로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 7개 식물체에서 증폭된 band pattern은 같게 나타났고, 나머지 107번 식물체에서 증폭된 band pattern만이 다르게 나타났다 (그림 37). 이로써 이들은 서로 다른 자가불화합성 인자를 지니고 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

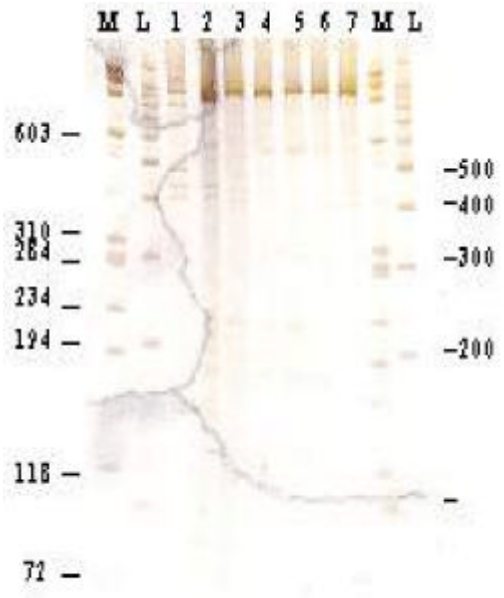

Figure 37. PAGE of the *Hae*III cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with classII-SLG specific primers. Eight out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #107, 2: #262, 3: #5324, 4: #5335, 5: #18, 6: #28, 7: #32, 8:#154. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII. M:. L: 100bp ladder.

바) PCR-RFLP with AluI

ClassII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 8개체의 밴드를 elution 하여 *Alu*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 8개체에서의 서로 비슷한 band pattern을 나타났다 (그림 38). 이 결과로 classII-SLG specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때 *Alu*I enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성 인자를 분류하기가 어려웠다.

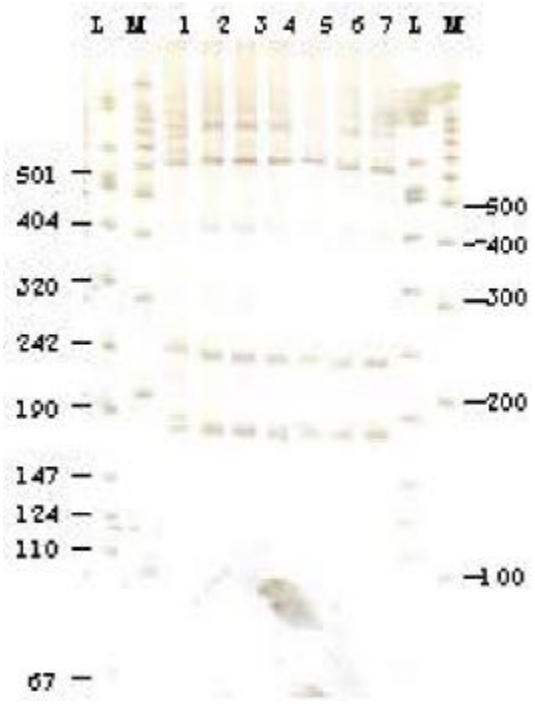

Figure 38. PAGE of the *Alu*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with classII-SLG specific primers. Eight out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SLG fragments. Lanes 1: #107, 2: #262, 3: #5324, 4: #5335, 5: #18, 6: #28, 7: #32, 8:#154. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. M:. L: 100bp ladder.

3)SRK specific primer를 이용하여서 증폭된 계통들의 분류

가) PCR-RFLP with *Taq*I

SRK specific primer를 이용하여 24개체의 무 식물체 가운데에서 15개체의 식물체 (식물체 일련번호: 37, 43, 50, 250, 204, 5335, 5314, 102, 3, 12, 39, 80, 85, 143, 160)에서 PCR 산물을 얻었다. 증폭된 밴드를 elution 하여 *Taq*I으로 잘라 silver staining을 수행한 결과 식물체 번호 37, 43, 3, 80, 143번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 5335번, 5314번, 160번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 또 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 12번과 85번의 증폭산물의 PCR-RFLP band pattern 이 같게 나타났다 (그림 39). 이로써 증폭된 총 15개체의 band pattern은 서로 다른 7가지의 자가불화합성으로 나눌 수 있었다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

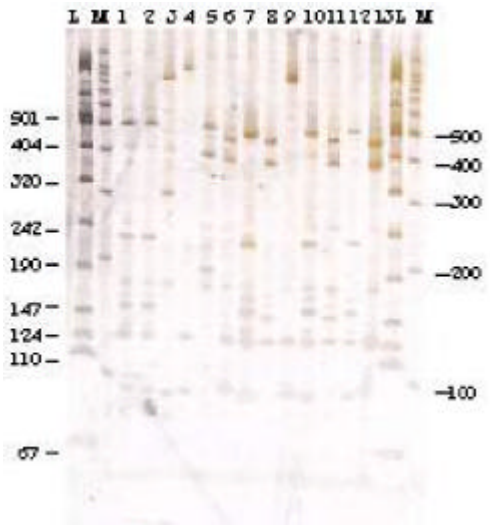

Figure 39. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Thirteen out of twenty-four *R. sativus* lines generated the S가 fragments. Lanes 1: #37, 2: #43. 3: #50. 4: #250. 5: #204, 6: #5335. 7: #3. 8: #12. 9: #39. 10: #80. 11: #85. 12: #143, 13: #160. M: pUBCM21digeated *Hpa*II, *Cra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

나) PCR-RFLP with *Tru*9I

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 15개체의 밴드를 elution하여 *Tru*9I로 잘라 silver staining을 수행한 결과 식물체 번호 37, 43, 3, 80, 143번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 5335번과 5314번, 160번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 또한 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 12번과 85번의 증폭산물의 PCR-RFLP band pattern이 같게 나타났다 (그림 40). 나머지 개체에서 증폭된 산물의 경우는 PCR-RFLP pattern이 서로 다르게 나타났다. 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

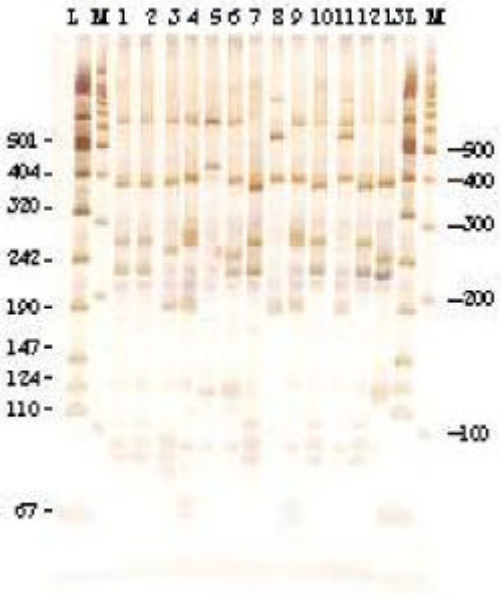

Figure 40. PAGE of the *Tru*9I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Thirteen out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SRK fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #5335, 7: #3, 8: #12, 9: #39, 10: #80, 11: #85, 12: #143, 13: #160. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

다) PCR-RFLP with *Msp*I

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 15개체의 밴드를 elution하여 *Msp*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 증폭된 개체의 산물을 잘라서 나타난 band pattern은 서로 비슷하게 나타났다 (그림 41). 따라서 SRK specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 *Msp*I enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다.

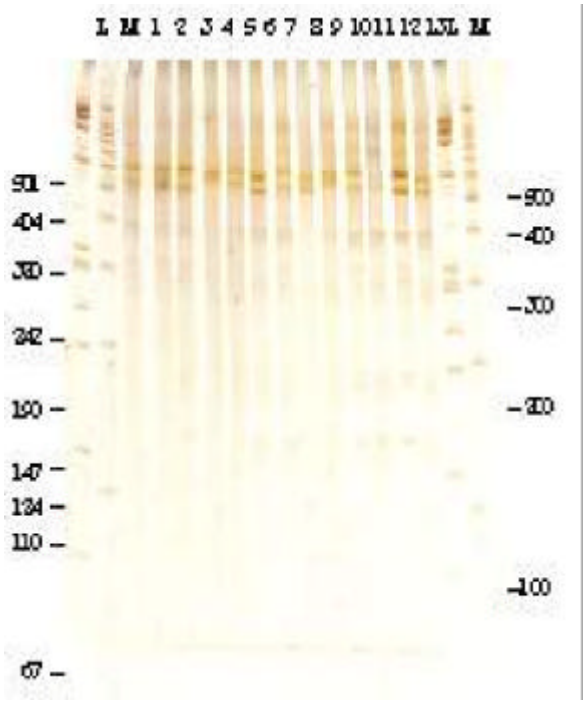

Figure 41. PAGE of the *Msp*I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Thirteen out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SRK fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #5335, 7: #3, 8: #12, 9: #39, 10: #80, 11: #85, 12: #143, 13: #160. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Cla*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

라) PCR-RFLP with *Rsa*I

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 15개체의 밴드를 elution하여 *Rsa*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 증폭된 15개체의 산물을 잘라서 나타난 band pattern은 서로 비슷하게 나타났다 (그림 42). 따라서 SRK specific primer를 이용하여서 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 RsaI enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다.

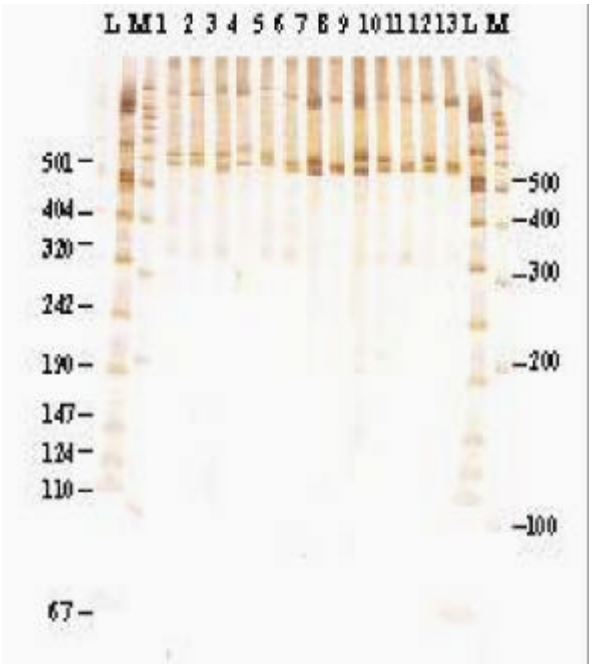

Figure 42. PAGE of the *Rsa*I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Thirteen out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SRK fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #5335, 7: #3, 8: #12, 9: #39, 10: #80, 11: #85, 12: #143, 13: #160. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

마) PCR-RFLP with *Hae*III

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 15개체의 밴드를 elution하여 *Hae* III으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 증폭된 15개체의 산물을 잘라서 나타난 band pattern을 살펴보면, 13개체의 증폭된 산물의 band pattern은 서로 비슷하게 나타났고, 5335번과 160번의 PCR-RFLP pattern이 같게 나오고, 204번의 증폭된 band pattern은 다르게 나타났다. 이 결과는 흥농종묘에서의 교배실험의 결과는 일치하지 않는다. 따라서 SRK specific primer를 이용하여 증폭된 산물의 자가불화합성인자를 분류할 때에 *Hae*III enzyme으로 잘랐을 경우에는 자가불화합성인자를 분류하기가 어려웠다 (그림 43).

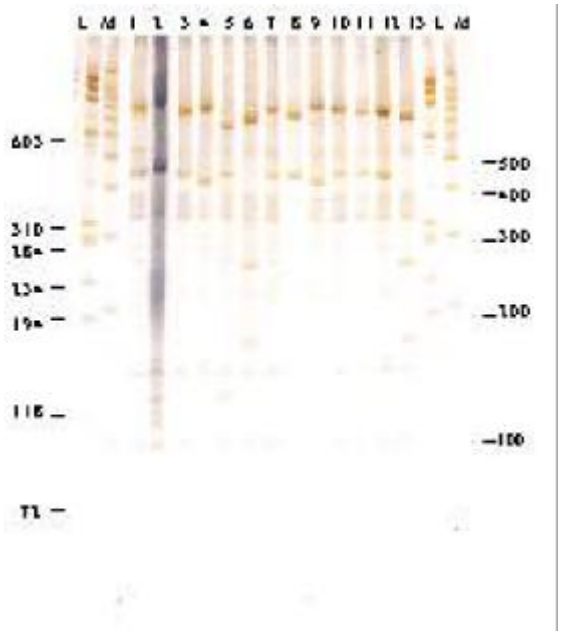

Figure 43. PAGE of the *Msp*I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Thirteen out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SRK fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #5335, 7: #3, 8: #12, 9: #39, 10: #80, 11: #85, 12: #143, 13: #160. M: pUBCM21 digeated *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

바) PCR-RFLP with *Alu*I

SRK specific primer를 이용하여 증폭된 15개체의 밴드를 elution하여 *Alu*I으로 잘라 silver staining을 수행하였다. 그 결과, 식물체 번호 37, 43, 3, 80, 143번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 식물체 번호 5335번과 5314번, 160번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났다. 또, 250번과 39번에서 증폭된 PCR 산물의 잘린 pattern이 같게 나타났고, 12번과 85번의 증폭산물의 PCR-RFLP band pattern이 같게 나타났다. 나머지 개체에서 증폭된 산물의 경우는 PCR-RFLP pattern이 서로 다르게 나타났다 (그림 44). 이 결과는 주관연구기관인 흥농종묘 육종연구소의 교배 결과와도 일치하였다.

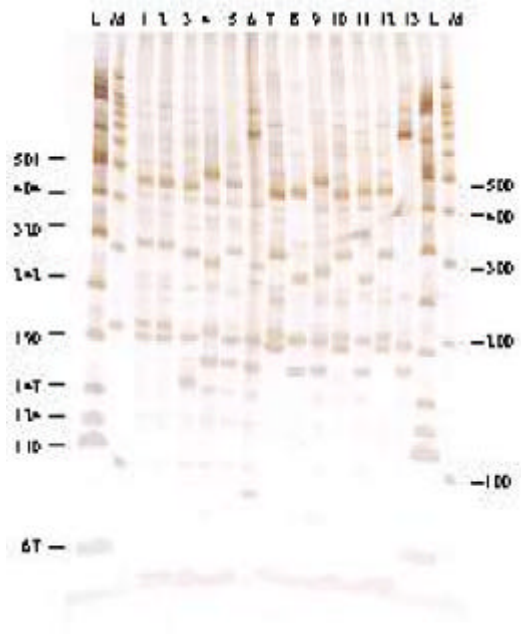

Figure 44. PAGE of the *Alu*I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Thirteen out of twenty-four *R. sativus* lines generated the SRK fragments.
Lanes 1: #37, 2: #43, 3: #50, 4: #250, 5: #204, 6: #5335, 7: #3, 8: #12, 9: #39, 10: #80, 11: #85, 12: #143, 13: #160. M: pUBCM21 digested *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

다. PCR-RFLP를 이용한 자가불화합 F2 분리세대에서의 SI 분리 pattern 분석

1) PCR with class I-SLG specific primer

2차년도 식물체 번호 37 (S_1S_1)번과 50 (S_2S_2)번의 F1를 (S_1S_2) 자가수정 하여 총 38개의 F2 식물체에서 genomic DNA를 분리하여 PCR를 수행하였고, 증폭된 PCR 산물을 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 확인한 뒤 앞선 실험과 동일한 방법으로 elution하여 *Taq*I (그림 45), *Tru*9I (그림 46) 제한효소로 절단하였다. 이렇게 얻어진 band pattern으로 분리비를 조사하였다. 이 결과는 흥농종묘 육종연구소에서 교배실험의 결과와도 일치하였으며 예상과 달리 S_2S_2 인자가 많이 나타나는 것을 알 수 있었다. 정확한 추론은 다른 F2 진단에 대한 조사가 진행되어야 가능할 것으로 생각된다.

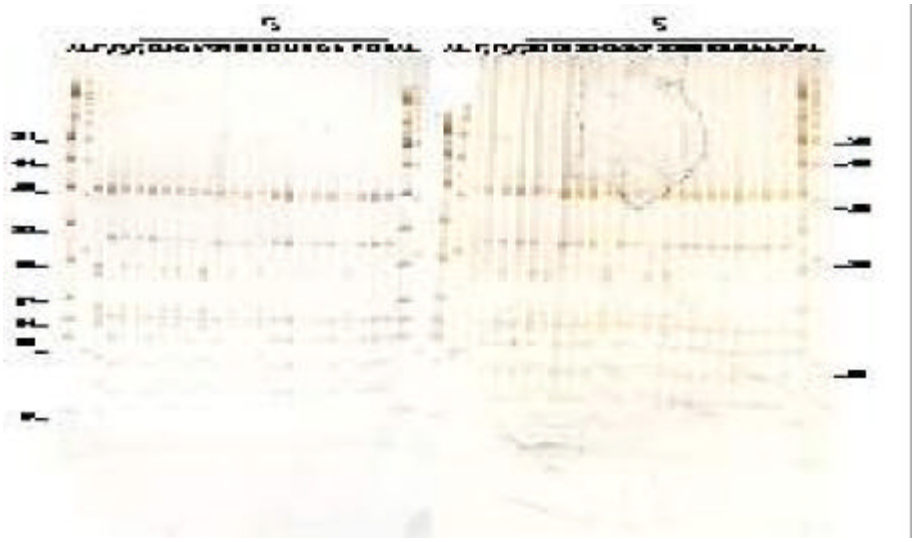

Figure 45. Analysis of F2 population segregating for S1 (P_1) and S2 (P_2) alleles. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified from genomic DNA by PCR with class I SLG-specific primers. M: pUBCM21 digested with *Hpa*II, *Era*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

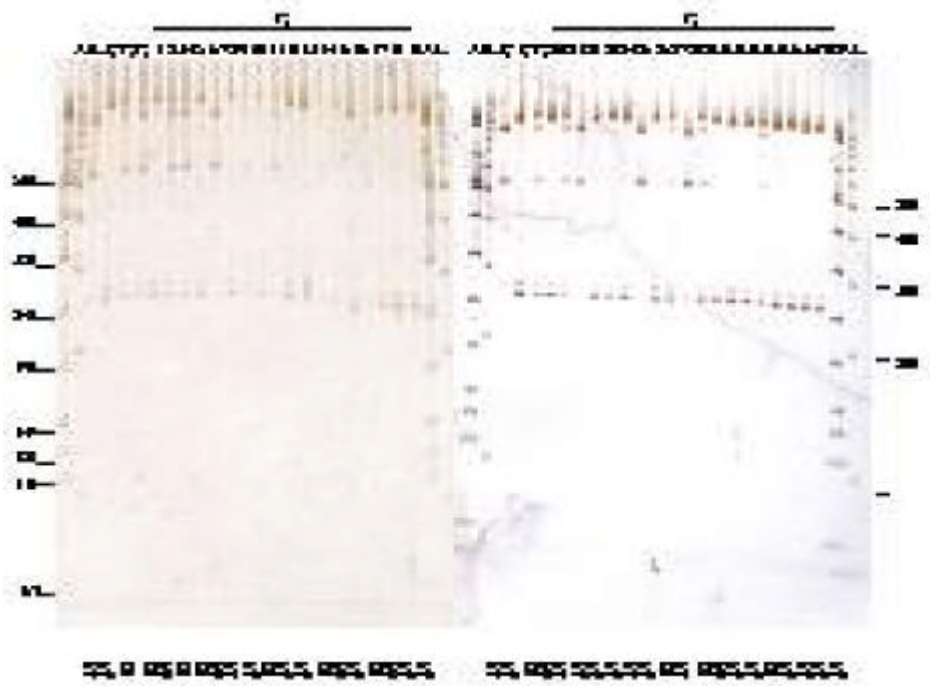

Figure 46. Analysis of F2 population segregating for S1 (P1) and S2 (P2) alleles. PAGE of the *Tru*9I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified from genomic DNA by PCR with class I SLG-specific primers. M: pUBCM21 digested with *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

2) PCR /RFLP를 이용한 분리세대에서의 자가불화합성 인자의 분류

자가불화합성 인자를 PCR/RFLP 방법을 이용하여 분석한 결과 다음과 같이 나타났고, 이는 흥농종묘 육종연구소의 결과와도 일치하였다. 분석결과를 표로 나타내었다 (표 22).

Table 22. SI haplotype determined by PCR-RFLP

Plant#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SI haplotype	S1S2	S2S2	S1S2	S1S2	S2S2	S1S1	S2S2	S1S2	S2S2	S1S2
Plant#	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
SI haplotype	S2S2	missing	S2S2	S1S2	S2S2	S2S2	S1S2	S2S2	S2S2	S2S2
Plant#	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
SI haplotype	S1S2	S1S2	S1S1	S2S2	S2S2	S2S2	S1S1	S2S2	S1S2	S1S1
Plant#	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
SI haplotype	S1S2	missing	S2S2	S2S2	S2S2	S1S2	S2S2	S2S2	S2S2	S2S2

라.PCR-RFLP를 이용한 F1 순도검정

1) PCR with class I-SLG specific primer

2차년도 자가불화합성 검정에 사용하였던 식물체들을 교배하여 F1를 만들어 일대교잡종이 교배되었는지를 PCR-RFLP 방법을 통하여 검정하였다. 교배된 식물체와 그들의 양친으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR를 수행하였고, 증폭된 PCR 산물을 1.2% agarose gel에 전기영동 하였다. 총 8개의 조합, 24개체에서 모두 증폭이 이루어졌다. 이들 증폭된 밴드가 SLG인지 알아보기 위해서 Southern blot analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SLG임을 확인하였다 (그림 47).

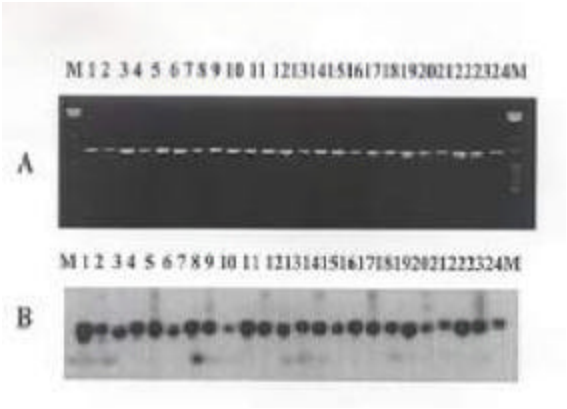

Figure 47. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis of PCR products. DNA fragment was amplified from genomic DNA inbred lines and their F1 hybrids amplified using class I-SLG specific primers.

2) PCR with class II-SLG specific primer

class II-SLG specific primer를 이용하여 앞선 실험과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 총 5개의 조합, 15개체에서 PCR를 수행한 결과 10개체에서 증폭이 이루어졌다 (그림 48). 이들 증폭된 밴드가 SLG 인지 알아보기 위해서 Southern blot analysis를 수행한 결과, 이들 밴드가 SLG임을 확인하였다.

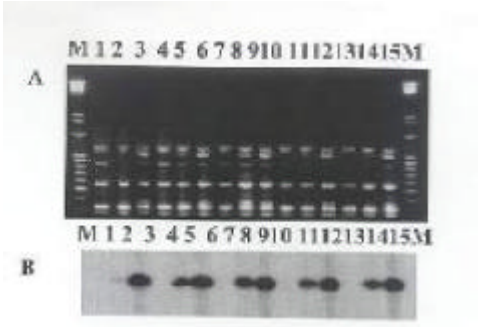

Figure 48. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis of PCR products. DNA fragment which was amplified from genomic DNA inbred lines and their F1 hybrids amplified using class II-SLG specific primers.

3) PCR with SRK specific primer

SRK specific primer를 이용하여 앞선 실험과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 총 12개의 조합, 36개체에서 PCR를 수행한 결과 36개체에서 증폭이 이루어졌다. 이들 증폭된 밴드가 SRK 인지 알아보기 위해서 Southern blot analysis를 수행한 결과 (그림 49), 이들 밴드가 SRK임을 확인하였다.

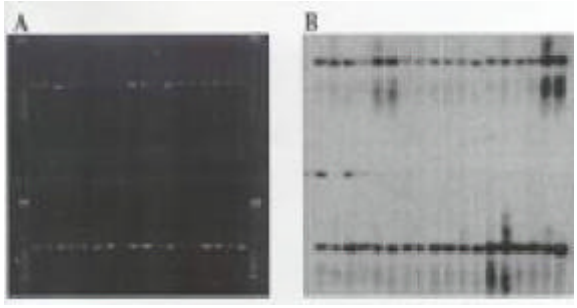

Figure 49. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis of PCR products. DNA fragment which was amplified from genomic DNA inbred lines and their F1 hybrids amplified using SRK specific primers.

4) PCR-RFLP with *Taq*I

Class I-SLG specific primer를 이용하여서 증폭된 PCR산물을 전기영동하여 gel로부터 elution을 한 뒤 *Taq*I 제한효소로 절단하여 silver staining을 수행하였다. 그 결과 일대교잡종의 band pattern은 양친의 band를 모두 가지고 있었으며 이것으로 보아 이들이 교배된 F1 임을 확인할 수 있었다. 다른 F1 조합에서도 동일한 결과가 나타나, PFR-RFLP가 일대교잡종과 그 양친을 검정하는데 이용될 수 있을 것으로 생각되었다 (그림 50).

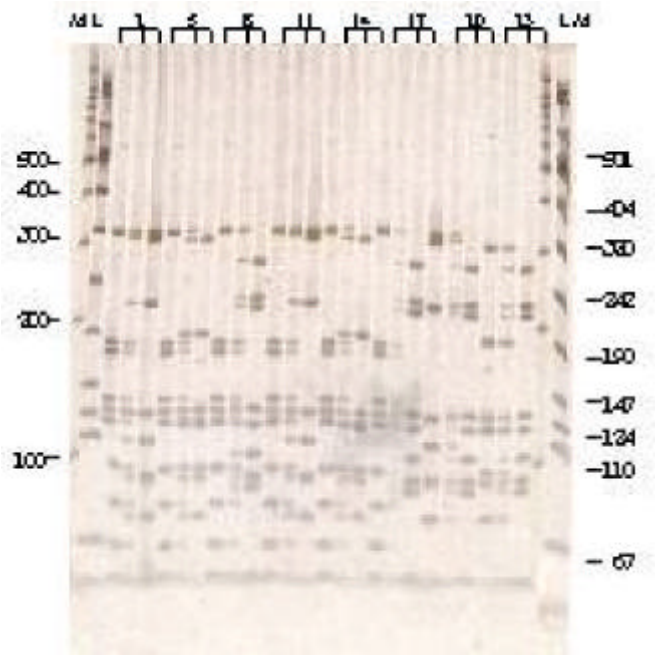

Figure 50. PCR-RFLP analysis of inbred lines and their F1 hybrids. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified from genomic DNA by PCR with class I SLG-specific primers. Each set of triple lanes represents heterozygotic F1 in the middle flanked by two parental lines. The number of each lines represents serial number of plants tested. M: pUBCM21 digested with *Hpa*II, *Cla*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

5) PCR-RFLP with *Taq*I

SRK specific primer를 이용하여서 증폭된 PCR산물을 전기영동하여 gel로부터 elution한 뒤 *Taq*I 제한효소로 절단하여 silver staining을 수행하였다. 그 결과 일대교잡종의 band pattern이 양친의 band 모두 가지고 있어서 이들이 교배된 것을 확인할 수 있었다. 12개의 조합에서 모두 양친의 밴드를 지닌 것으로 나타나, 이러한 결과들을 볼 때, PFR-RFLP가 일대교잡종과 그 양친을 검정하는데 이용될 수 있을 것으로 생각되었다 (그림 51).

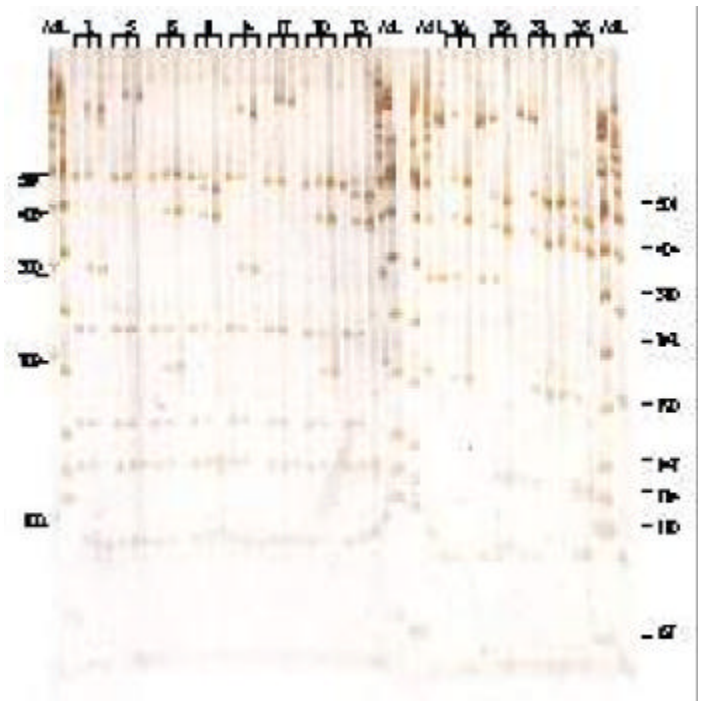

Figure 51. PCR-RFLP analysis of inbred lines and their F1 hybrids. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SRK DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with SRK specific primers. Each set of triple lanes represents heterozygotic F1 in the middle flanked by two parental lines. The number of each lines represents serial number of plants tested. M: pUBCM21 digested with *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder.

6) 일대교잡종 40개체에서의 순도검정확인

2차년도 식물체 번호 250번과 204번을 교배하여 다수의 F_1 종자를 확보하고 그들을 파종하여 유묘상태에서 genomic DNA를 분리하여 SLG-specific primer를 이용 PCR를 수행하였다. 그 결과 양친과 일대교잡종 모두에서 증폭이 이루어졌고, 이들을 *Taq*I으로 잘라 silver staining을 수행한 결과 총 40개의 일대교잡종 모두 양친의 band pattern을 지니고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 52). 따라서, 이러한 PCR/RFLP 방법을 이용하여 교배검정과 순도검정을 수행할 수 있으리라 생각되었다.

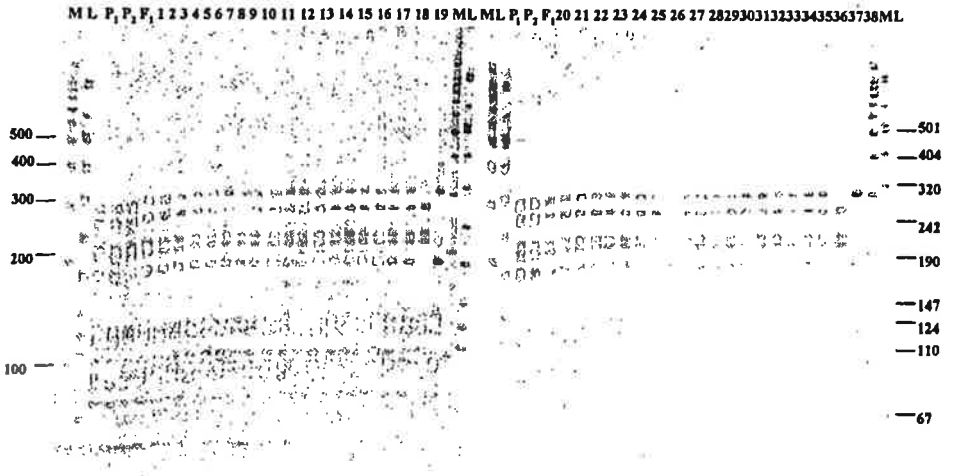

Figure 52. F_1 purity test by PCR-RFLP analysis. PAGE of the *Taq*I cleavage products of SLG DNA fragment which was amplified genomic DNA by PCR with class I-SLG specific primers. M: pUBCM21 digested with *Hpa*II, *Dra*I, and *Hin*dIII. L: 100bp ladder