

최 종
연구보고서

미소 기관 게놈 및 핵 microsatellite DNA
다형화 현상에 관한 연구

Cultivar identification of garlic and chinese cabbage
by DNA polymorphism and microsatellite DNA

연구기관
서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 「미소 기관 계놈 및 핵 microsatellite DNA 다형화 현상에 관한 연구」 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 최 양 도

세부연구책임자 : 최 양 도

이 종 섭

연 구 원 : 구 연 중

연 구 원 : 정 춘 균

연 구 원 : 김 은 덕

연 구 원 : 이 동 근

연 구 원 : 김 보 경

요 약 문

I. 제 목

미소 기관 계놈 및 핵 microsatellite DNA 다형화 현상에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

마늘은 우리나라 채소류 생산액의 27% (약 1 조원)를 차지하는 작물로 쌀, 돼지, 소, 고추 다음으로 중요한 농업소득 작목이다. 우리나라는 마늘이 재배되는 면적은 1996년 경우 41,973 ha, 총 생산량 455,893 M/T에 달해서 세계적으로 중국에 이어 제 2위의 생산국이며 1인당 생산량과 소비량 (10.13 kg/M)은 세계 제 1위이다. 또한 세계 마늘 재배면적은 1994년 915,000 ha 에서 1997년 1,053,000 ha 로 꾸준한 증가추세에 있으며 이에 따라 소비량과 생산량 (2,662,000 M/T)이 증가하고 있다. 미국의 경우를 보면 지난 10년간 재배면적이 70% 증가하였다.

배추는 고추 마늘 무와 함께 우리나라 4 대 채소 작물의 하나로서 십자화과에 속하며, 원산지는 중국의 북부지방이다. 하지만 배추는 우리나라의 고유작물일 뿐만 아니라 대표적인 전통식품인 김치의 주요 원료로 사용되고 있다. 고품질 배추의 생산 기술의 체계화는 세계 제 1위를 차지하고 있으며 그 규모를 살펴보면 1996년 경우 2,731,000 M/T 이 생산되어, 가격으로 약 4 천억원에 이르며 김치의 해외 수출 및 국내 공장 생산이 시작되면서 부가가치가 매우 높은 농산물로 인식되고 있다.

최근 분자생물학 및 유전공학의 발달 결과 생물의 계통을 분명하게 밝힐 수 있는 핵산 지문법이 개발되어 이미 유전병 진단, 범죄 수사 및 친자 소송 등에 활용되고 있다. 이 방법은 핵산의 다형화 현상 (polymorphism)에 근거한 것으로 지금까지 그 유래를 찾아볼 수 없는 매우 정확하고 특이한 방법이다. 더욱이 이 방법에 사용되는 핵산은 그 양이 ng 수준이므로 머리카락 혹은 혈흔에서 채취한 핵산으로 충분한 양이 되므로 이를 식물에 적용할 경우 종자 및 종묘의 수준에서 확인이 가능해졌다. 또한 동식물 의학 분야에서는 분자생물학적 기술을 이용하여 각 순계 양친종 (원종) 또는 품종에 특이한 marker 유전자

를 인식하고 이를 정확하고 간편한 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기술을 이용하여 확인할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 핵산지문법을 이용하여 우리의 마늘과 배추의 계통 및 품종을 확인하는 방법을 개발하고자 한다. 이 결과는 잘못된 종자에 의한 재배 농가와 종자 회사의 피해를 줄이며 신품종 육성을 권장하고 종자 수출을 촉진하며 수입 종자에 대항하는데 효과적으로 활용이 될 것이다.

특히 마늘 작물에 있어서는 국내에서는 재배 마늘의 기원 식물 및 종 분류에 대한 체계적인 연구가 이루어지지 못하여 농가에서는 종이 불분명한 상태로 재배하고 있고 정확한 품종 분류 체계가 확립되어 있지 않은 상태로 생산지역의 이름으로서 명명하고 있는 실정이다. 따라서 현재 국내에서 재배되고 있는 마늘의 품종 구분을 명확히 하면, 재래의 품종을 보존하고 우수한 형질을 지닌 품종의 발굴 및 육종이 쉬워지게 되어 유용한 물질을 생산할 수 있는 마늘 품종의 개발을 개발할 수 있고 양파, 부추 등 유사 식물에 응용이 가능하다.

또한 배추작물에 있어서는 배추의 품종 선별법의 개발은 배추의 F₁ 잡종의 순도 검정 등에 요구되는 노동력과 경비의 절감을 이룩하며, 신품종 개발을 촉진하여 궁극적으로 종묘산업계의 생산성 증가와 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이기 때문에 이러한 기술의 개발 필요성은 대단히 크다고 할 수 있다. 또한 우량 품종을 개발하여 특허화 하고 이를 보호받기 위해서는 품종을 인지할 수 있는 체제의 개발이 필수적이다. 이러한 미소기관과 핵 계놈의 수준에서 마커기술의 개발은 궁극적으로 국내 종묘 산업 등의 지적 재산권을 보호해 줄 수 있을 뿐만 아니라 국제 경쟁력을 강화시켜 줄 수 있기 때문에 다가오는 21세기의 종자전쟁에서 승리할 수 있는 첩경이 되는 연구라고 할 수 있다.

이와 같이 작물의 품종 감별 기술은 국내 시장의 개방에 대응하고 외국으로 기술 및 제품의 수출이 가능하며 특히 우수한 형질을 지닌 품종 개발 시 품종 체계를 명확히 하여 유사 외국의 모방 품종과 차별화 및 재산권 보호가 가능하다. WTO 체제에 따른 농산물 시장의 개방에 대응하여 국내 작물의 생산성 향상 및 품질의 고급화에 의한 국내 시장 나아가서는 농산물의 보호 육성을 위해서는 작물의 손쉬운 품종 감별법 확립과 이를 이용한 고급 품종 개발이 필요하다. 농산물 수입 개방에 따른 값싼 중국산 마늘 등 수입마늘의 부정유통을 방지하기 위하여서도 손쉬운 판별법이 요구되고 있다. 따라서 마늘의 품종체계 정립과 신품종 개발을 접목할 경우 세계시장을 상대로 한 마늘 및 종구 수출의 길이 열릴 것으로 전망된다. 더 나아가 배추작물에서는 이들을 이용하여 유전자 지도가 만들어지면 배추의 유전체 분석을 위

한 중요한 정보를 제공하여 줄 것이며, 궁극적으로 특수 유용형질을 갖는 배추의 분자육종에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

작물의 미소기관 계놈과 핵의 microsatellite DNA 연구를 통하여 핵산 다형화 현상을 규명하고 다형화 부위를 분리 이용하여 핵산 지문법으로 신속하고 정확한 품종 감별법을 개발하고자 한다. 이는 궁극적으로 DNA chip을 이용하여 다른 작물에도 적용할 수 있는 기본 기술을 개발하고자 한다. 이를 위해 마늘과 배추의 미토콘드리아, 엽록체 및 핵 계놈에서 최소한 각각 1 종류 이상의 핵산 다형화 집중 변이 지역을 선발하여 이 부위의 특성을 규명하고 이를 토대로 품종 판별법을 확립하고자 한다. 이러한 목적을 달성하기 위해 다음의 세부 목표를 설정하였다.

- 가. 미소기관 계놈에서 핵산 다형화 현상이 집중된 변이 지역 탐색 및 마커 개발
- 나. 핵 계놈의 microsatellite DNA의 탐색 및 마커 개발
- 다. 특히 marker를 이용한 마늘과 배추의 품종 및 계통 감별 시스템 구축

2. 연구 개발 범위

가. 영양번식을 하는 마늘의 경우 모계 유전 특성을 지닌 미토콘드리아와 엽록체 계놈을 대상으로 변이 지역을 탐색하여 마커로 활용하는 방법을 우선적으로 시도한다.

나. 종자 번식을 하는 배추의 경우 핵 계놈의 변이에 가장 중요한 역할을 수행하는 것으로 인식된 microsatellite의 특성을 연구하여 F₁ 잡종 배추의 순계 양친종 (순종) 및 그 계통의 선별법을 개발하고자 한다.

다. 이 과제에서 추구하는 최종 목표는 변이 지역을 대상으로 특히 primer를 이용한 PCR을 수행하고 필요한 경우 증폭된 DNA에 대해서 1 차례 정도의 RFLP를 실시하는 간편한 기술의 개발이다. 그러나 궁극적으로는 DNA chip (oligonucleotide microarray) 을 이용하여 간편하게 염기서열의 변이를 추적하는 방법을 개발하기 위한 전 단계의 연구가 될 것이다.

라. 이를 이용하여 외국에서 유입되는 마늘과 배추를 선별 할 수 있는 시스템을 구축하여 국내 농산물을 보호하고 수출 상품의 고유성을 입증할 수 있는 계기로 삼고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 마늘 계놈 다형화 현상 연구

가. 마늘 엽록체 계놈 다형화 현상 연구

마늘 엽록체 계놈 다형성 현상을 연구하기 위하여 한국의 단양, 일본의 아오모리, 중국의 북경마늘 (*Allium sativum*) 등을 표준시료로 하여 엽록체 계놈을 분리하였고, 이 엽록체 계놈은 같은 화본과 작물로 서로 유연관계가 있는 벼와 옥수수 계놈의 염기서열을 서로 분석하였다. 이렇게 분석한 결과 변이가 심한 지역의 프라이머 들을 제조하였다. 엽록체 계놈의 *rbcL*과 *petA*사이의 영역은 화본과에 속하는 식물들 사이에서는 변이가 매우 심한 지역으로 알려져 있으며 유전자들의 삽입과 탈락이 많기 때문에 이 부위에서 마늘 엽록체 계놈의 구조를 알기 위하여 이 부분을 클로닝 하였다. 부분 염기서열을 결정 한 결과 화본과 식물에서는 탈락된 *accD* 유전자가 존재하며, 이 지역의 유전자 지도가 오히려 쌍떡잎식물인 담배의 엽록체 계놈 구조와 유사함을 알 수 있었다. 이 지역 비암호화 부분의 다양성을 조사하기 위하여 *accD*와 *psaI* 사이, *psaI*과 *petA* 사이, 비교적 변이가 심하다고 알려진 *psaA*와 *trnS* 사이 *trnT*와 *trnL* 사이 그리고 *rpl16* intron 영역들을 증폭할 수 있는 프라이머를 제조하여, 7개의 변이지역에서 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과, 북경마늘은 다른 마늘들과 비교했을 때 PCR 절편 크기에서 큰 차이를 보였으나 다른 마늘들의 경우 절편들의 크기에서는 차이를 발견할 수 없었다.

다음으로 이들 PCR 증폭된 절편을 클로닝 하여 절단 확률이 높은 제한효소 *Sau3AI*과 *MseI*로 절단하고, PCR 증폭한 결과를 조사하였다. 그 결과 북경마늘은 모든 PCR 증폭된 절편의 크기에서는 다른 마늘들과 변이를 보였고, 코끼리마늘은 *psaI*-*petA*, *rps16*-*trnQ* 및 *trnT*-*trnL* 지역에서 단양마늘 및 아오모리 마늘과 차이를 보였다. 그러나 아오모리 마늘과 단양 마늘 사이에는 뚜렷한 변이를 확인할 수 없었기 때문에 엽록체 계놈 상에 서로 변이를 보이는 부분이 있는지 확인하기 위하여 AFLP (amplified fragment

length polymorphism) 분석을 실시하였다. AFLP 분석은 프라이머 (E-0/M-G, M-A, M-T, M-C) 4 쌍을 이용하여 엽록체 게놈 DNA상에서 일정부분을 증폭시킨 다음 polyacrylamide 겔에서 이들 절편들의 크기를 분석한 결과 아오모리 마늘과 단양마늘에 서로 차이가 나는 부분을 발견하지 못했다. 따라서 아오모리 마늘과 단양 마늘은 엽록체 유전체 구조가 매우 비슷함을 알 수 있었다.

이와같이 실험에 사용한 표준시료들의 경우 엽록체 게놈의 비암호화 부위에서 북경마늘은 단양 마늘이나 아오모리 마늘과 큰 변이를 보임을 알 수 있다. 이는 마늘 재배종들의 엽록체 게놈에서 비암호화 부위는 큰 차이를 보일 가능성이 있음을 나타낸다. 그러나 단양마늘과 아오모리 마늘 사이에는 엽록체 게놈 구조에 있어서 큰 차이를 발견할 수 없었다. 이것은 엽록체 유전자의 근원관계가 국내 마늘과 일본 마늘이 매우 가까운 반면 북경마늘과는 상당한 거리가 있다는 것을 알 수 있었다.

나. 마늘 미토콘드리아 게놈 다형화 현상연구

마늘 미토콘드리아 게놈 분리는 대량의 시료확보가 용이한 북경, 남해, 의성, 아오모리 (일본) 및 제주 마늘을 표준 시료로 Percoll-gradient 방법을 이용하여 분리하였다. 미토콘드리아 게놈의 변이지역 탐색은 데이터베이스 검색을 통하여 고등식물의 미토콘드리아 게놈의 염기서열들을 비교분석하여 *coxI*, *coxII*, *coxIII* 및 *nad3* 유전자 부위를 PCR 증폭할 수 있도록 프라이머들을 제작하고, PCR 증폭 및 클로닝을 실시하였다. 또한 미토콘드리아 DNA를 제한효소 *HindIII*, *BamHI*, *XhoI* 등으로 절단 후 self-ligation 및 inverse PCR 방법으로 *coxI*, *coxII*, *coxIII*, *nad3* 주변지역을 PCR 증폭하였다. 이들 클론에 대하여 부분 염기서열을 결정한 다음 blast 프로그램을 이용하여 Genebank 데이터베이스에 등록된 자료들을 검색하였다. 그러나 이들 지역에 있어서 각 지역종 사이에서는 변이를 발견할 수 없었다.

그리고 미토콘드리아 전체 게놈 상에 서로 변이를 보이는 부분이 있는지 고흡마늘과 남해마늘을 대상으로 AFLP 분석을 실시하였다. 고흡마늘과 남해마늘의 AFLP 분석 결과, 약 200bp 근처에서 한 부분의 절편에서 다형성 절편이 차이가 나타나고 있었으나, 전체적으로 볼 때 마늘의 미토콘드리아 게놈은 그 구조가 서로 매우 유사함을 알 수 있었다.

다. 마늘 핵 게놈 다형화 현상연구

1) AFLP 분석

마늘 핵 게놈의 다형성을 조사하기 위해서 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 실험방법으로 총 32개의 AFLP 프라이머 쌍 조합을 가지고 PCR 증폭하였고, 그 중 12개의 프라이머 쌍에서 다형성 절편이 존재하였다. AFLP 실험에서 2번의 PCR 증폭 과정을 실시하며, 이것은 pre-amplification 와 selective amplification 과정으로 나뉜다. 마늘 핵 게놈의 다형성 절편들을 살펴보면 다음과 같다.

첫 번째 실험에서는 pre-amplification에서 E+1와 M+1 (E-C/M-C, E-A/M-C) 프라이머를 사용하였고 selective amplification에서 E+3와 M+3 혹은 M+4 (E-GAC/M-CAT, M-CAG, M-CAC, M-CAGA 등)을 PCR 증폭시켰을 때 미국, 태국, 고양, 의성마늘 에서 다형성의 절편들이 존재하지 않았다.

두 번째 실험에서는 pre-amplification을 E+2와 M+1 (E-AC/M-C) 프라이머를 사용하고 selective amplification에서 E+4, M+4 혹은 M+3 (E-ACAT M-CAGA, M-CAA 등)로 PCR 증폭시켰을 때에 미국 재배종과 태국 재배종 마늘은 한국의 재배종 마늘들과는 다른 다형화 밴드가 나타남을 알 수 있었다. 이 결과로 미국 (Colossal) 마늘과 태국 재배종 마늘들 사이에서는 마늘이 유전체가 구조적으로 다름을 알 수 있었다.

따라서 이들 AFLP 프라이머 쌍들을 바탕으로 하여 국내 마늘과 해외 마늘들 사이에 있어서 구조적 유사성을 함께 파악함과 동시에 나아가 국내 마늘은 유전적 유사관계도 살펴볼 수 있는 계기가 되었다. 또한 다른 STEMS 실험에서는 AFLP 실험에서 좀더 심도 있게 다형성 절편을 찾고자 프라이머를 제작하였고, 이를 바탕으로 유전적 유사관계도 파악하였다.

2) SETMS 분석

마늘 핵 게놈에서 SETMS의 (Sequenced Tagged Microsatellite DNA) 다형성을 분석하기 위해서 양파에서 유래한 7쌍의 SETMS DNA 마커를 프라이머로 사용하여 PCR 증폭시킨 후 polyacrylamide gel로 전기영동 후, 다형성 절편들을 75bp에서 400bp까지 scoring 하였다.

미국 (Colossal) 마늘과 태국 (Lasoon) 및 한국 재배종 마늘 5종을 대상으로 PCR 증폭 결과, 다형성 절편의 수가 AMS04 (6개), AMS06 (11개), AMS08 (21개),

AMS12 (27개), AMS22 (52개), AMS23 (43개), AMS25 (26개) 로 관찰되었다. 위의 AMS 프라이머 쌍들에서 나타나는 다형성 절편들의 패턴 양상을 scoring 하여 그 마늘들 사이의 핵 게놈의 유전적 유연관계를 NTSYS-pc program을 통하여 분석하였다. 그 결과 similarity coefficient (F) ≥ 0.61 일 때, 미국 재배종 마늘과 태국 재배종 마늘, 그리고 한국 산 마늘인 고양, 의성, 예천, 함안, 황성 마늘 재배종 등이 3 그룹으로 분류되었다. 전체적으로 볼 때, 국내마늘들의 유전적 유연관계는 외국종 마늘 사이의 관계보다 가깝고, 따라서 국내 재배종 마늘들과 외국 재배종 마늘들과 구별할 수 있었다.

2. 배추 microsatellite DNA 다형화 현상연구

가. 배추 핵 게놈 microsatellite DNA 분리

1) 배추 microsatellite loci의 선별

배추(*Brassica campestris subsp. pekinensis*) 핵 게놈 DNA의 microsatellite DNA 연구를 통하여 핵산 다형화 현상을 규명하고 다형화 부위를 분리 이용하여 핵산 지문법으로 신속하고 정확한 품종 감별법을 개발하기 위해 배추 유전자은행에서 microsatellite loci를 선별하였다. 이를 위해 먼저 애기 장대의 2개의 microsatellite 좌위를 선별하였다. 이 중에서 nga139 microsatellite 좌위는 AG/CT의 반복 모티프를 가지며, nga 172는 GA/TC의 반복 모티프를 가진다. 증폭산물의 예상 크기는 nga139가 182bp로 이중 반복서열은 (AG/CT)₃₃이고, nga172의 경우 166bp로 반복 서열은 (GA/TC)₂₇이다. 이들을 적절한 primer를 design하여 PCR 기법을 이용해 애기 장대의 genomic DNA로부터 증폭해 내었다. 이 증폭된 DNA 절편을 탐침으로 사용하여 λ -DASHII에 제조된 배추 유전자은행에서 plaque hybridization을 통한 선별을 통해 AG/CT 또는 GA/TC motif의 반복서열이 존재할 것이라고 생각되는 13개의 genomic clone을 확보하였다. 그리고 DNA gel blot analysis를 수행하여 cloning 된 phage DNA에 microsatellite region이 포함되어 있는지를 확인하였다.

2) 제한효소지도 작성과 Sub-cloning

클로닝된 microsatellite region을 포함할 것으로 기대되는 총 9개의 제한효소지도를 작성하기 위해 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sph*I 및 *Xba*I으로 절단한 다음 agarose gel 상에서 전기영동 하여 제한효소 자리의 존재를 확인하였다. 그리고 이 결과를 통하여 배추에 존재하는 microsatellite region의 sequence를 결정하기 위해 sequencing 이 가능한 길이로 DNA fragment를 만들고 sub-cloning을 수행하였다. 이렇게 sub-cloning된 DNA fragment들은 각각 1BH, 1BSc, 2HE, 3H, 4Xb, 6Sc, 7Sc, 10ESph, 11Sc, 12HK, 그리고 13EB라 명명하였다.

3) 분리된 microsatellite DNA의 염기서열 결정

유전자의 염기서열 결정은 dideoxynucleotide chain termination sequencing 방법으로 자동염기서열분석기를 사용하여 실시하였다. 각 절편들에 대한 염기서열을 결정한 결과 예상대로 모든 절편에서 (GA/TC)의 모티프를 가지는 microsatellite region(bold letter)이 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 예상되었던 (GA/TC)의 dinucleotide repeat 뿐만 아니라 주변 부위에서 (A/T), (AT/TA), 그리고 (TAAA/TTTA) 등의 motif를 가진 repeat region도 더불어 확인할 수 있었다. microsatellite DNA에 관한 이전 연구들에서 더 많은 수의 nucleotide repeat motif에서 더 polymorphism을 관찰할 수 있다고 밝혀져 있으므로 이들 또한 그 유용 가능성을 생각할 수 있었다.

4) microsatellite region 증폭을 위한 primer 설계

microsatellite는 소수의 염기로 구성된 반복 단위체가 다양한 수로 연속적으로 존재하고 있는 DNA (variable number of tandem repeats)라 하며 microsatellite 좌위의 주변 지역에는 각각의 보존된 고유한 염기서열이 존재하므로 이를 이용하여 microsatellite region 증폭을 위한 primer를 설계하였다.

나. 순종 배추를 대상으로 SSR 분석 수행

1) 배추의 genomic DNA 분리

이 실험의 목적인 배추의 F₁ 잡종의 순도검정 및 감별법 구축과 유사종간의 유연

관계분석에 부합할 수 있게 다양한 종류의 배추의 게놈 DNA를 확보하고, 또한 이들의 부·모계의 게놈 DNA 또한 확보하여야 한다. 이를 위해 홍농종묘와 서울종묘에 의뢰하여 각각 8종과 5종의 부·모계의 잎 조직을 확보하였고, 또한 시중에 유통되는 F1 hybrid 배추 종자를 구입하여 잎 조직에서 게놈 DNA를 분리하였다.

2) 순종 배추를 대상으로 PCR 수행

추출한 배추의 게놈 DNA를 주형으로 삼아 PCR을 수행하였으며, PCR 산물에 대한 분석은 non-isotopic method를 개발하기 위하여 BMA사에서 생산되는 Meta-phore agarose를 사용하였다. PCR 산물의 크기가 모두 300bp 보다 작기 때문에 일반적인 agarose gel을 사용해서는 그 차이를 볼 수가 없어 다형화 현상에 대한 분석이 불가능하다. 이 결과 microsatellite 지역의 다양성은 고유한 주변지역 내의 repeat motif 수에 의한 길이의 다양성과 그리고 핵 내에 존재하는 서로 다른 길이의 microsatellite 지역의 수에서 기인한다. 그 결과 핵 게놈에 존재하는 microsatellite 지역에서의 다형성을 볼 수 있었다. 즉 배추를 대상으로 한 SSR 분석결과 모든 F1에서 둘 이상의 PCR 산물을 얻을 수 있었고 각각의 PCR 산물은 부계와 모계의 차이로부터 기인한다고 가정할 수 있었다. 이에 SSR 분석이 이번 연구주제의 궁극적인 목적인 haploid 감별 및 유연관계 분석에 적합한 실험방법임을 확인할 수 있었다. 그러나 이 연구를 통해 기대되었던 각 배추의 표현형과 SSR band pattern과의 연관 관계는 찾기가 어렵다고 결론을 내릴 수 있었다.

3) 변이지역 구조 규명 및 마커 선별

배추를 포함한 채소작물의 종자를 생산하는 종묘업체는 주로 잡종 강세를 보이는 1 세대 잡종 종자 (F₁ hybrid)를 생산하나, 위임 (pseudo-fertility) 등의 이유로 자가불화합성을 이용하여 F₁ 잡종 종자를 생산한다고 하여도 순도가 100%에 이르지 못하게 된다. 그 순도는 직접 파종하여 재배하여 보기 전에는 알기가 곤란하다. 비록 직접 재배를 한다고 하더라도 미묘한 차이는 표본 재배에 의해 확인하기가 매우 어려운 것이 사실이다. 이전 실험의 결과에서 보는 바와 같이 microsatellite 지역은 매우 큰 다양성을 가지고 있으므로 F1 hybrid가 그 부계와 모계로부터 올바른 형질을 받았는지를 결정하고자 하였다. 이를 위해 먼저 F1 hybrid인 불암3호와 홍농종묘에서 분양받은 불암3호의 부·모계 잎 조직에서

게놈 DNA를 추출하였다. 그리고 이를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 또한 실험과정에서 혹시 있을지도 모를 각 개체간의 변이에 의한 오류를 제거하기 위해 부계, 모계, 그리고 F1 hybrid인 불암3호를 각각 서로 다른 3개체씩 선별하였다. 불암 3호를 대상으로 한 SSR 분석의 경우 2HE, 13EB, 그리고 7Sc의 경우는 부계와 모계에서 microsatellite region 이 차이를 보이지 않았으나, 1BH, 1BSc, 그리고 10E 의 microsatellite region 은 차이를 보이므로 이를 이용하여 F1 hybrid를 검정할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 배추로부터 분리해 낸 microsatellite 지역을 이용하면, 그 지역이 부계와 모계에서 차이를 보일 경우 간단히 PCR을 이용해 F1 hybrid를 검정할 수 있으므로, 홍농종묘와 서울 종묘로부터 분양 받은 13종의 순종배추의 부.모계의 앞에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하고 이 결과를 통해 어느 microsatellite 지역이 가장 큰 다형성을 보이는지 알아보았다. 실험 결과 배추에서 분리한 10 종류의 microsatellite 지역 중 어느 하나만으로 모든 재배종에서 변이를 볼 수는 없었지만 본 실험에 사용된 배추 13종의 F1 hybrid는 현재 선별한 10종류의 primer set을 조합하여 PCR을 수행하면 모든 F1 hybrid의 감별 및 동정이 가능함을 알 수 있었다.

다. 배추 microsatellite 좌위의 염기서열 결정 및 비교

배추의 게놈으로부터 microsatellite 좌위의 증폭을 위한 PCR용 prime들을 이용하여 증폭된 PCR 산물이 실제로 microsatellite 좌위를 포함하는지 알아보기 위하여 첫 번째 불암3호와 그 부계, 모계의 핵 게놈 DNA를 주형으로 10E primer를 사용한 PCR 증폭산물, 두 번째 서울종묘의 26번과 그 부계, 모계의 핵 게놈 DNA를 주형으로 10E primer를 사용한 PCR 증폭산물, 그리고 마지막으로 서울종묘의 16번과 그 부계, 모계의 핵 게놈 DNA를 주형으로 13EB primer를 사용한 PCR 증폭산물들의 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 결정은 PCR에 사용된 primer 들을 이용해 PCR 산물을 plasmid에 클로닝하지 않고 직접 주형(template)으로 이용하는 방법을 사용하였다. 임의로 3종의 PCR 산물을 선정하였는데 불암3호는 122bp와 98bp의 두 가지 염기서열이 결정되었으며 그 중 122bp 의 절편은 그 염기서열이 모계의 PCR 증폭산물의 염기서열과 동일하였고, 98bp 의 절편은 부계의 PCR 증폭산물과 그 염기서열이 동일하였다. 서울종묘의 26의 경우는 F₁ 잡종과 그 부계, 그리고 모계에서 모두 120bp의 동일한 염기서열을 가짐을 알 수 있었다. 그리고 서울 종묘의 16의

경우 133와 107bp의 두 가지 염기서열이 결정되었으며 그 중 133bp의 절편은 그 염기서열이 부계의 PCR product의 염기서열과 동일하였고, 107bp의 절편은 모계의 PCR 증폭산물과 그 염기서열이 동일하였다. 이 결과 실제로 본 연구에서 사용된 PCR primer들은 배추의 핵 게놈에서 microsatellite 좌위를 증폭해내고 있으며, 또한 이 PCR 산물의 길이 차이는 바로 반복서열의 수로부터 기인한 것이라는 것을 알 수 있었다.

라. SSR 분석을 통한 서로 다른 종간의 유연관계 파악

SSR 혹은 STEMS 분석은 아주 짧은 염기서열이 반복적으로 존재하는 지역에서의 다형현상을 PCR을 통하여 분석하는 방법으로 공동우성적으로 유전하며 PCR을 이용하여 용이한 검출이 가능하다. 이러한 특징을 바탕으로 배추(*B. campestris subsp. pekinensis*)와 같은 십자화과(*cruciferae*)에 속하는 순무(*B. rapa*)와 양배추(*B. oleracea*)와의 유연관계를 검정할 수 있는지 알아보기 위해 이들의 핵 게놈 DNA를 추출하여 이전에 제조한 배추의 SSR primer들을 이용하여 PCR을 수행하였다. 양배추의 경우 홍농종묘로부터 예서 대월양배추와 winterhunt 양배추, 그리고 순무의 경우 역시 홍농종묘에서 관동여름 winterhunt, 백봉무, 장형무, 청복무, 청운무의 F1 hybrid와 그 부계 그리고 모계의 종자를 배양받아 재배한 후 잎 조직에서 분리한 게놈 DNA 1 µg을 사용하였고 각각의 primer들은 200 ng을 사용하여 95°C에서 5분간 변성시켰다. 그 후 95°C에서 15초, 59°C에서 15초 그리고 72°C에서 30초씩 40회 순환시킨 후 72°C에서 10분간 두고 4°C로 soaking시켰다. 각각의 primer에 따라 배추의 게놈 DNA를 주형으로 삼았던 때와 동일한 조건의 annealing temperature로 조건을 잡았고, 특히 1BSc의 경우 먼저 67°C의 annealing temperature로 7회 순환시킨 후, 61°C의 annealing temperature로 33회 순환시켰다. 이렇게 얻은 PCR 산물은 BMA사에서 생산되는 Meta-phore agarose를 사용하여 분석하였다. 이 결과 비록 이들이 같은 십자화과에 속하지만 동일한 모티프에 해당하는 microsatellite 지역을 포함하고 있지는 않다는 결론을 내릴 수 있었다. 그러나 양배추로부터 얻은 PCR 산물의 band-pattern이 순무에 비해 배추와 더욱 유사한 점으로 미루어 양배추가 순무에 비해 배추와 근연종 관계에 있음을 유추할 수 있었다. 또한 흥미로운 점은 3H primer set의 경우 그 PCR산물이 배추에서부터 양배추 그리고 순무에 걸쳐 모두 동일한 하나의 band만으로 나타나는 것으로 보아 이에 상응하는 염기서열이 십자화과에서 매우 보존적으로 존재함을 유추할 수 있었다.

마. 활용에 대한 건의

이 연구에서는 미소기관 및 핵 게놈 다형화 현상을 알아보기 위해 엽록체, 미토콘드리아, 그리고 핵 게놈에 대하여 변이지역을 중심으로 연구가 이루어 졌다. 이들 지역의 일부는 클로닝을 통하여 그 염기서열을 밝히고, 데이터 탐색을 통하여 다른 식물 혹은 작물들 사이의 유의성을 조사하였다. 엽록체 게놈의 다형성 현상 연구에서는 엽록체 게놈 상에서 변이를 보이는 지역을 집중 탐색한 결과, 7쌍의 프라이머 쌍을 통하여 변이를 찾아낼 수 있었고, 또한 PCR/RFLP를 통해서도 절편의 차이를 통하여 중국 북경 마늘을 다른 마늘들과 구별할 수 있었다. 마늘 핵 게놈의 다형성 현상 연구에서는 AFLP, SETMS, PCR/RFLP 실험법을 통하여 그 변이지역을 탐색하였고, 이것은 국내 재배종과 외국 재배종 사이에서 다형성 절편이 관찰 되었으며 유연관계를 파악하였다.

배추의 SSR(Simple Sequence Repeat)을 분리 이용하여 주변지역에 대한 6쌍의 PCR 용 primer를 얻었고 이들을 사용해 여러 서로 다른 재배종 배추의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 재배종 사이에 같은 motif를 가지는 microsatellite region에서의 변이를 확인할 수 있었다. 또한 F1 hybrid의 감별을 위해 종묘회사로부터 분양받은 부·모계와 실제 F1 hybrid를 비교해 보았을 때 이 방법이 적절한 감별법임을 확인할 수 있었다. PCR에 주형으로 쓰일 genomic DNA는 매우 소량으로 검사할 대상이 적게 자란 상태에서도 빠르게 검사가 가능할 뿐 아니라, PCR을 기본으로 하기 때문에 기존에 쓰이던 hybridization을 기본으로 하는 방법에 비해 빠르고, 또한 방사성 동위 원소를 사용하지 않고 간단하게 agarose gel을 이용하여 분석할 수 있다.

그러므로 본 연구에서 설계된 primer를 사용한 마늘의 지역종 감별법은 우리 고유 품종을 확인할 수 있는 유력한 수단으로 수입종과 차별화가 가능해 진다. 배추의 품종 감별법은 배추의 F₁ 잡종의 순도검정 등에 요구되는 노동력과 경비의 절감을 이룩하며, 신품종 개발을 촉진하여 궁극적으로 종묘산업계의 생산성 증가와 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이기 때문에 이러한 기술의 개발 필요성은 대단히 크다고 할 수 있다. 또한 염기서열 결정 등을 통해 배추의 재배종마다 고유한 PCR 산물의 길이를 정확하게 파악하고나면 이는 어떤 재배종인지 모르는 배추의 동정에도 이용될 수 있어 궁극적으로 국내 종묘 산업 등의 지적 재산을 보호해 줄 수 있을 것이라 기대된다.

위의 결과와 같이 PCR 방법을 통해 마늘 및 배추의 지역종 혹은 품종을 조기에 소량의 시료를 이용하여 판별 할 수 있는 체제가 구축되었다. 이들 PCR primer 쌍을 효과적으로 활용하는 기술은 논문 발표와 특허 출원에 이어 실용화를 위한 후속 연구를 통해 다듬어지면 정확한 품종 감별로 농민과 종묘회사의 이익을 지켜줄 수 있을 것으로 기대한

다. 그러나 실험에 사용되는 표준 품종 및 지역종들의 순도가 실용성을 결정하는 만큼 후속 연구는 이들 표준 품종을 확보한 산업체와 긴밀한 공동 연구를 통해서 완성되어 질 것이다.

SUMMARY

I. Subject

Cultivar identification of garlic and chinese cabbage by DNA polymorphism and microsatellite DNA.

II. Importance and objectives of the research

Garlic (*Allium sativum* L.) and chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *pekinensis*) is important crops in Korean agriculture. Despite of its economic and social importance as major crops, its genetic background is poorly understood. Garlic is not as yet established as a cultivar but regarded as a regional stock. A variety of cultivars for Chinese cabbage is bred but its genetic information of individual cultivar is not well established.

DNA fingerprinting methods (RFLP, AFLP, SSR and Microsatellite DNAs) have been shown to be quite useful to identify subtle genetic differences among closely related organisms for which typical phenotypic approach could not be applicable. Attempts have been made to distinguish regional cultivars of garlic and cultivars of Chinese cabbages each other on the basis of DNA polymorphism.

III. Research contents and scope

1. Regional cultivar identification of garlic by DNA polymorphism

- 1) Search and cloning of variable regions in chloroplast, mitochondrial, and genomic DNAs
- 2) Analysis of variable regions in chloroplast, mitochondrial, and genomic DNAs : PCR/RFLP and DNA sequencing

- 3) Genetic variation analysis
- 4) Investigation of DNA polymorphic marker

2. Characterization of the microsatellite loci of *B. campestris*

- 1) Identification of sequences and structures of the microsatellite loci
- 2) SSR analysis about *B. campestris*
- 3) Identification of DNA polymorphism and selection of markers
- 5) Comparison of sequences between polymorphic PCR products
- 6) Identification of the relationship among chinese cabbage (*B. campestris*), cabbage (*B. oleracea*) and turnip (*B. rapa*) using SSR analysis

IV. Research results

1. Regional cultivar identification of garlic by DNA polymorphism

1) Analysis of chloroplast DNA polymorphism in garlic

To find chloroplast DNA polymorphism in different regional cultivars of garlic, we carried out PCR amplification of variable regions, PCR-RFLP analysis, and AFLP analysis. PCR primers were designed from variable regions in tobacco plant obtained by comparative sequence analysis among chloroplast genomes of plants in Genebank Database

(1) PCR amplification of variable regions

We examined the PCR fragment polymorphism with 7 primer pairs for variable regions such as rps16 intron, rps16-trnQ, psaA-trnS, trnT-trnL, accD-psaI, psaI-petA, and rpl16 intron among Danyang (Korea), Aomori (Japan), Beijing (China), and Elephant garlic (*Allium ampeloprasum*). The results showed that Beijing garlic maintained distinct pattern from that of Danyang, Aomori, and Elephant garlic which showed the same polymorphic pattern each other.

(2) PCR-RFLP analysis

PCR-RFLP analysis was carried out by PCR amplification and digestion with *Sau3AI* or *MseI* restriction enzymes. The result showed that the Beijing garlic showed difference in various PCR fragments such as rps16-trnQ, accD-psaI, trnT-trnL, whereas Elephant garlic showed different fragments in psaI-petA, rps16-trnQ and trnT-trnL in chloroplast DNA.

(3) AFLP analysis

AFLP analysis was performed with Aomori and Danyang garlics used E-0/M-G, M-A, M-T, M-C primer pairs. But the result showed that polymorphic fragments were not detected in the gel.

2) Analysis of mitochondrial DNA polymorphism on garlic plants

To find a mitochondrial DNA polymorphism, PCR amplification of coxI, coxII, coxIII and nad3 coding regions, inverse PCR amplification of non-coding region and cloning, and AFLP analysis were carried out. Those regions were selected by comparative sequence analysis among mitochondrial genomes of plants in Genebank Database

(1) PCR amplification of coxI, coxII, coxIII and nad3 coding regions

Five garlic cultivars (Beijing, Namhae, Uisung, Aomori, and Jeju) were analysed by PCR amplification in coxI, coxII, coxIII and nad3 regions. In coxI region, the same fragments of 1.3kb were amplified from 5 garlics. In coxII region, the 500bp fragments were amplified from 5 garlics as well as from *Arabidopsis* and chinese cabbage. In coxIII and nad3 regions, 0.7kb fragments were detected. Those results show that the polymorphism was not detected at coxI, coxII, coxIII and nad3 coding regions among 5 garlic cultivars.

(2) Inverse PCR of non-coding regions and their molecular cloning

To investigate non-coding regions, mitochondrial DNAs of Gohung, Uisung, and Namhae garlics were digested with *Hind*III, *Bam*HI, and *Xho*I restriction enzymes. The digested DNAs were self-ligated. Inverse PCR was performed to find polymorphic fragments at non-coded *cox*I, *cox*II, *cox*III, and *nad*3 regions.

After inverse PCR, cloned fragments were sequenced and compared their information with others in the Genebank. Even though cloned DNA fragments were matched with *nad*3, *rps*12, and *cox*II regions of onion, their structure and nucleotide sequences of Gohung and Namhae garlics were not different each other.

(3) AFLP analysis

AFLP analysis was performed with Gohung and Namhae garlics. The primers were used E-A · M-0 primer pairs. The result showed a polymorphic fragment of 200 bp in Gohung garlic.

3) Analysis of genomic DNA polymorphism in garlic plants

In this study, we carried out sequence-tagged microsatellite site (SETMS) analysis, AFLP DNA fingerprinting, and inverse PCR amplification of variable regions.

(1) In AFLP experiments

12 AFLP primer pairs yielded polymorphic fragments between garlic cultivars foreign and domestic. It is notable that selective primer pairs determines a key role to yield the polymorphic patterns. These results suggest that Domestic cultivars came from a specific origin and splitted into various regions in Korea.

(2) In SETMS experiments

AMS primers produced significant differences in their polymorphic patterns among 7 garlic cultivars. Genetic similarities between the garlic cultivars were estimated through the tree program of NTSYS-pc in SETMS analysis. The garlic cultivars tested were divided into two major groups; foreign cultivars including Clossal

and Lasoon, and domestic cultivars at the genetic similarity of 0.61. Foreign garlic group gave different patterns of polymorphic fragments all over the denatured polyacryamide gel. This result indicates that Korean garlic cultivars are closer to each other than foreign cultivars in genome structure.

(3) Inverse PCR amplification of variable regions

In order to find polymorphic fragments in the variable regions, inverse PCR/Southern blot analysis was performed. The polymorphic fragment was isolated from PCR product used AMS23 primer pairs (145bp Figure 4-7) in Yecheon garlic plant. DNA sequence was determined and then designed IAMS23 primer pairs. To perform inverse PCR, total genomic DNAs digested with *Hind*III restriction enzyme, self-ligated, and amplified each DNA (Clossal, Lasoon, Danyang, Yecheon, Hongcheon garlic plants) used IAMS23 primers. The Yecheon PCR product (991bp) was isolated and determined nucleotide sequence. The Southern blot analysis inverse PCR products were hybridized with probe of Yecheon PCR partial product(745bp). These results show that Korean garlic and foreign cultivars are similar to genomic structure in variable regions.

2. Characterization of the microsatellite loci of *Brassica campestris*

1) Isolation of the microsatellite loci of *B. campestris*

Microsatellite loci consist of mono-, di-, tri-, tetra- or penta-nucleotide units. Microsatellites are abundant in the genomes of higher eukaryotes and hitherto considered as "junk DNA". Variation at these loci, so called simple sequence repeats (SSRs) or simple sequence length polymorphisms (SSLPs), is co-dominantly inherited. The loci are highly polymorphic. Once the loci are characterized with primer sequences, assay is easy with PCR. The uniqueness and value of microsatellite arises from their multi-allelic nature, co-dominant transmission, ease of detection by PCR, relative abundance, extensive genome coverage and requirement for only a small amount of

starting DNA. These features have made them valuable tools for many purposes, e. g., in population genetics and ecology. The isolation and cloning of microsatellites of plant was first performed with tropical tree species. Poly(A/C) and poly (A/G) dinucleotide repeats were detected at a frequency of 5×10^3 to 3×10^5 per genome with A/G repeat motifs being more frequent than A/C.

(1) Screening the genomic library of *B. campestris*

For this purpose, two AG/CT-motif microsatellite loci from *A. thaliana* were selected and amplified by PCR as a probe for screening. Using this probe, screening the genomic library of *B. campestris* was carried out by plaque hybridization. Thirteen genomic clones containing AG/CT-motif microsatellite DNA were isolated.

(2) Restriction enzyme mapping and sub-cloning

To identify sequences of screened microsatellite DNA clones, selected genomic clones were sub-cloned into small sizes. Using various restriction enzymes, we determine the restriction enzyme maps of screened genomic clones and the smallest size of positive fragment after DNA gel blot analysis. Then the fragments were sub-cloned into pGEM3ZF(+) vector. We called these positive fragments, 1BH, 1BSc, 2HE, 3H, 4Xb, 6Sc, 7Sc, 10ESph, 11Sc, 12HK, and 13EB.

(3) Sequencing of the isolated microsatellite DNA clones

Confirming the positive clones by DNA gel blot analysis, nucleotide sequences were determined. As expected GA/TC repeat sequences were obtained in all positive fragments. Also we could get A/T, AT/TA and TAAA/ATTT-motif repeat in addition.

(4) Designing of the primer sets for amplification of microsatellite loci

Nucleotide sequences of the flanking region of microsatellite are known to be conserved. Therefore, we could design the primer sets to amplify microsatellite loci from the flanking sequences.

2) SSR analysis about *B. campestris*

(1) Isolation of the genomic DNA of *B. campestris*

To test that those primer sets are useful as markers of crossbreeding, we collected 13 F₁ hybrid seeds and their paternal and maternal lines of *B. campestris*. Genomic DNAs were prepared by using the DNeasy Plant Mini Kit produced by Qiagen Co.

(2) PCR amplification from genomic DNA of *B. campestris* as a template

By using primer designed for microsatellite region, locus specific PCR amplification was carried out and its products were analyzed by Meta-phore agarose gel electrophoresis.

(3) Identification of polymorphism and selection of markers

As PCR reaction was carried out from genomic DNAs of paternal, maternal and F₁-hybrid, the polymorphisms identified were applied as a marker for cross-breeding of *B. campestris*. Molecular cloning and identification by nucleotide sequencing were followed for C/T microsatellites in *B. campestris*.

3) Comparison of sequences between polymorphic PCR products

We also performed nucleotide sequencing of polymorphic PCR products and elucidate the polymorphism was caused by the number of AG/CT repeated motif.

4) Genetic relationship among *Cruciferae* by SSR analysis

To determine the genetic relationship among chinese cabbage (*B. campestris*), cabbage (*B. oleracea*) and turnip (*B. rapa*), all belonging to the *Cruciferae*, SSR analysis was carried out with primer sets of *B. campestris*. The result showed that *B. oleracea* is more closely related to *B. campestris* than *B. rapa*.

CONTENTS

Cultivar identification of garlic and chinese cabbage by DNA fingerprinting

Abstract -----	2
Summary -----	15
Chapter 1. Introduction -----	24
1. Background and purpose of the research	
Chapter 2. Current view of the research -----	27
Chapter 3. Results and Discussion -----	31
1. Materials and Methods -----	31
2. Chloroplast DNA polymorphism analysis of garlic plants -----	37
3. Mitochondrial DNA polymorphism of garlic plants -----	49
4. Genomic DNA polymorphism analysis of garlic plants -----	54
5. Analysis of microsatellite DNA of chinese cabbage -----	71
Chapter 4. Accomplishment and contribution of the research field -----	106
Chapter 5. Future application -----	109
Chapter 6. References -----	112

목 차

요약문	2
Summary	15
제 1 장 연구개발과제의 개요	24
1. 연구개발의 목적, 필요성 및 배경	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	31
1. 재료 및 방법	31
2. 마늘 엽록체 게놈의 핵산 다형화 분석	37
3. 마늘 미토콘드리아 게놈의 핵산 다형화 분석	49
4. 마늘 핵 게놈의 핵산 다형화 분석	54
5. 배추 핵 게놈의 핵산 다형화 현상연구	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	106
1. 마늘 미소기관 및 핵 게놈 다형화 현상 연구	106
2. 배추 핵 게놈의 핵산 다형화 현상연구	107
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	109
1. 마늘 미소기관 및 핵 게놈 다형화 현상 연구	109
2. 배추 핵 게놈의 핵산 다형화 현상연구	110
제 6 장 참고문헌	112

제 1 장 연구개발 과제의 개요

1. 연구개발의 목적, 필요성 및 배경

가. 기술적 측면

마늘은 중앙아시아가 원산으로 단군신화에도 나올 정도로 우리 민족에게 있어서는 중요한 작물이다. 그러나 국내에서는 재배 마늘의 기원 식물 및 종 분류에 대한 체계적인 연구가 이루어지지 못하여 농가에서는 종이 불분명한 상태로 재배하고 있고 정확한 품종 분류 체계가 확립되어 있지 않은 상태로 생산지역의 이름으로서 명명하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 재배되고 있는 마늘의 품종 구분을 명확히 하면 재래의 품종을 보존하고 우수한 형질을 지닌 품종의 발굴 및 육종이 쉬워지게 되어, 유용한 물질을 생산할 수 있는 마늘 품종의 개발을 개발할 수 있고, 양파, 부추 등 유사 식물에 응용이 가능하다.

배추는 고추 마늘 무와 함께 우리나라 4 대 채소 작물의 하나로서 십자화과에 속하며, 원산지는 중국의 북부지방이나 고유 전통식품인 김치의 주원료가 되는, 경제적으로 매우 중요한 작물이다. 배추를 포함한 채소작물의 종자를 생산하는 종묘업체는 주로 1 세대 잡종 종자 (F₁ hybrid)를 생산하고 있는 바, F₁ 잡종 종자는 특성이 다른 양친 계통을 번갈아 심어서 자연교잡을 통하여 생산된 종자로서 자가수정이나 무작위 수분을 통해 생산된 종자에 비하여 잡종강세를 나타내기 때문에 고소득 및 고품질 특성을 지니고 있다.

최근 분자생물학 및 유전공학의 발달 결과 생물의 계통을 분명하게 밝힐 수 있는 핵산 지문법이 개발되어 이미 유전병 진단, 범죄 수사 및 친자 소송 등에 활용되고 있다. 이 방법은 핵산의 다형화 현상 (polymorphism)에 근거한 것으로 2개의 탐침 (probe)을 같이 사용할 경우 다른 개체가 같은 개체로 나타날 확률은 사람의 경우 10^{-11} 으로 지금까지 그 유래를 찾아볼 수 없는 매우 정확하고 특이한 방법이다 (Jefferey *et al.*, 1985a, b; 1991; Gill *et al.*, 1985). 더욱이 이 방법에 사용되는 핵산은 그 양이 nanogram 단위이므로 머리카락 혹은 혈흔에서 채취한 핵산으로 충분한 양이 되므로 이를 식물에 적용할 경우 종자 및 종묘의 수준에서 확인이 가능하다.

핵산 다형화 현상 (DNA polymorphism)은 게놈에서 대체로 비암호화 부위 (non-coding region)에 나타나서 표현형에 영향을 미치지 않기 때문에 게놈에 있어서 진화적으로 적응 압력을 적게 받아왔고 다양성을 그대로 유지하고 있는 현상이다. 따라서 이

현상을 이용하면 핵산지문법 (DNA finger printing)으로 품종판별 및 나아가서는 개체수준의 정확한 판별이 가능하다. 작물의 신품종 육성을 고무하고 잘못된 종자에 의해 농민과 종자 회사의 피해를 최소로 하며 나아가서 국산 종자의 수출을 늘리기 위해서는 정확하게 작물의 계통 및 품종을 확인할 수 있는 방법의 개발이 필요하다. 이러한 계통 확인은 종자 상태에서 이루어지거나 가급적 어린 종묘 상태에서 이루어질 수 있으면 더욱 바람직하다.

현재 종자 시장에서 유통되는 종자 및 종묘는 대부분 제 1 세대 잡종 (F1 hybrid)이다. 그러나 이를 직접 파종하여 수확하기 전에는 이를 확인할 수 있는 방법이 현재까지는 없다. 비록 직접 재배를 한다고 하더라도 미묘한 차이는 표본 재배에 의해 확인하기가 매우 어려운 게 사실이다. 최근에는 분자생물학의 발전과 더불어 생물분야에서 기초적인 기술발전이 급진적으로 이루어져 동위효소 (isozyme), RFLP, RAPD, AFLP 등을 이용하여 작물의 품종 및 계통 감별법을 개발함으로써 육종효율을 증진시키는 방법이 재평가 시도되고 있다.

이러한 이유로 짧은 시간 내에 대량으로 품종을 감별하는 방법의 개발은 대단히 중요한 연구 분야이다. 분자생물학적 기술을 이용하여 각 순계 양친종 (원종) 또는 품종에 특이한 marker 유전자를 인식하고 이를 정확하고 간편한 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기술을 이용하여 확인할 수만 있다면 지금까지 문제시 되어 왔던, 계통 혹은 품종을 정확하게 알 수 없어서 입계되는 종묘 회사의 불이익이나 농민의 피해를 최소화할 수 있을 것으로 기대된다. 더 나아가 이들을 이용하여 유전자 지도가 만들어지면 genome 분석을 위한 중요한 정보를 제공하여 줄 것이며, 궁극적으로 특수 유용형질을 갖는 품종의 분자유종에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 핵산지문법을 이용하여 우리의 마늘과 배추의 계통 및 품종을 확인하는 방법을 개발하고자 한다. 이 결과는 잘못된 종자에 의한 재배 농가와 종자 회사의 피해를 줄이며 신품종 육성을 권장하고 종자 수출을 촉진하며 수입 종자에 대항하는데 효과적으로 활용되도록 하는 것이 그 목적이라 할 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

마늘은 우리나라 채소류 생산액의 27% (약 1 조원)를 차지하는 작물로 쌀, 돼지, 소 고추 다음으로 중요한 농업소득 작물이다. 우리나라는 재배면적이 1996년 경우 41,973 ha, 총 생산량 455,893 M/T에 달해서 세계적으로 중국에 이어 제 2위의 생산국이며 1인당 생산량과 소비량 (10.13kg/인/년)은 세계 제 1위이다. 세계 마늘 재배면적은 1994년 915,000 ha 에서

1997년 1,053,000 ha 로 꾸준한 증가추세에 있으며 이에 따라 소비량과 생산량 (2,662,000M/T)이 증가하고 있어 미국의 경우를 보면 지난 10년간 재배면적이 70% 증가하였다. 따라서 마늘의 품종체계 정립과 신품종 개발을 접목할 경우 세계시장을 상대로 한 마늘 및 종구 수출의 길이 열릴 것으로 전망된다.

배추는 1996 년 경우 2,731,000 M/T 이 생산되어 가격으로 약 4천억 원에 이르며 김치의 주원료로 사용되며 김치의 해외 수출 및 국내 공장 생산이 시작되면서 부가가치가 매우 높은 농산물로 인식되고 있다. 특히 배추의 품종 선별법의 개발은 배추의 F₁ 잡종의 순도검정 등에 요구되는 노동력과 경비의 절감을 이룩하며, 신품종 개발을 촉진하여 궁극적으로 종묘산업계의 생산성 증가와 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이기 때문에 이러한 기술의 개발 필요성은 대단히 크다고 할 수 있다. 또한 우량 품종을 개발하여 특허화 하고 이를 보호받기 위해서는 품종을 인지할 수 있는 체제의 개발이 필수적이다. 이러한 marker 기술의 개발은 궁극적으로 국내 종묘 산업 등의 지적 재산을 보호해 줄 수 있을 뿐만 아니라 국제 경쟁력을 강화시켜 줄 수 있기 때문에 다가오는 21세기의 종자전쟁에서 승리할 수 있는 첩경이 되는 연구라고 할 수 있다. 이와 같이 작물의 품종 감별 기술은 국내 시장의 개방에 대응하고 외국으로 기술 및 제품의 수출이 가능하다. 특히 우수한 형질을 지닌 품종의 개발시 품종 체계를 명확히 하여 유사 외국의 모방 품종과 차별화 및 재산권 보호가 가능하며, 마늘에 있어서는 농산물 수입 개방에 따른 값싼 중국산 마늘 등 수입마늘의 부정유통을 방지하기 위하여서도 손쉬운 판별법이 요구되는데 이러한 방법에 부합하는 실험법을 확립하고자 한다.

다. 사회·문화적 측면

마늘은 단군신화에도 나올 정도로 우리 민족에게 있어서는 중요한 작물이다. 한국은 세계 마늘 생산량의 15%, 인구 1 인당 마늘의 생산 및 소비로 볼 때 (10.13 kg/인/년) 세계 제 1의 소비국으로써 마늘에 대한 연구는 우리가 주도해 나가야한다. 배추는 우리나라의 고유작물일 뿐만 아니라 대표적인 전통식품인 김치의 주요 원료로서 고품질 배추의 생산 기술의 체계화는 궁극적으로 국민 건강증진에 크게 기여할 것이다. 또한 농업의 대외경쟁력을 강화시켜 농업도 자생력 있는 산업으로 발전할 수 있을 것이다.

WTO 체제에 따른 농산물 시장의 개방에 대응하여 국내 작물의 생산성 향상 및 품질의 고급화에 의한 국내 시장 나아가서는 농산업의 보호 육성을 위해서는 작물의 손쉬운 품종 감별법 확립과 이를 이용한 고급 품종 개발이 필요하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 외국의 경우

핵산 다형화 현상 (DNA polymorphism)은 계놈에서 대체로 비암호화 부위 (noncoding region)에 나타나서 표현형에 영향을 미치지 않기 때문에 진화적으로 적응 압력을 적게 받아왔고 따라서 다양성을 유지하고 있는 현상이다 따라서 이 현상을 이용하면 핵산지문법 (DNA finger printing)으로 품종 나아가서는 개체수준의 정확한 판별이 가능해진다.

가. 세포내 소기관 계놈을 이용한 유전적 유연관계 연구

미토콘드리아와 엽록체 DNA는 계놈 DNA 보다 크기가 작고 모계유전의 특성을 가지고 있으며 변이 속도가 빨라 유전학적 유연관계를 연구하는데 유용하게 사용되어왔다 (Butler & Levin, 1998). 식물의 경우 *Arabidopsis*에서 품종간의 변이를 확인했고 (Ullrich *et al.*, 1997), *Allium* 속에서도 미토콘드리아 DNA RFLP를 이용하여 양파의 재배종을 분류했다 (Satoh *et al.*, 1996).

식물의 엽록체 DNA는 크기가 대략 120-217kb 정도로 식물의 미토콘드리아 DNA에 비하여 크기가 일정하며, 현재 11종에서 전체 염기서열이 밝혀져 있고, 많은 종에서 부분염기서열이 알려져 있으며 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>, 1999) 엽록체 DNA를 이용하면 손쉬운 품종감별이 가능함을 제시하였다. 따라서 이들 미토콘드리아와 엽록체의 DNA의 특성은 계놈 DNA에 비하여 분석이 훨씬 용의하고 품종간의 유연관계를 밝히는 데 유용한 마커들을 손쉽게 분리할 수 있다.

나. 핵 계놈 마커를 이용한 유전적 유연관계 연구

품종을 인식하기 위한 분자생물학적 기술로서 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)는 가장 먼저 도입된 방법이며 PCR (Polymerase Chain Reaction)의 발달과 더불어 많은 응용 기술이 개발되었는데, 이들에게는 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 및 SSR (Simple

Sequence Repeat) 혹은 STEMS (Sequence-Tagged Microsatellite Site) 분석이 있다 (Ridout and Donini, 1999). SSR 혹은 STEMS 분석은 아주 짧은 염기서열이 반복적으로 존재하는 지역에서의 다형현상을 PCR을 통하여 분석하는 방법이다. Microsatellite 좌위에는 1-5개의 염기가 반복적으로 존재하고 있는데 이는 SSR (simple sequence repeat) 혹은 SLP (simple sequence length polymorphism)라고 부른다(Bell and Ecker, 1994). 이들은 공동 우성적으로 유전하기 때문에 일단 primer sequence로 그 특성이 규명만 되면, PCR을 이용하기 때문에 이 검정 방법은 대단히 용이하다. 따라서 SSR은 집단유전학의 연구 등에 널리 이용되고 있다 (Bruford and Wayne, 1993).

특히 배추와 같은 과에 속하는 애기장대의 경우 전체 게놈의 염기서열이 알려져 있는데 이로부터 다양한 부류의 microsatellite sequence가 보고 되어 있다 (GeneBank accession No. X79418-X79428). 이들을 이용하여 애기장대의 연관지도에서 30개의 microsatellite 좌위가 설정되어 있으며 (Bell and Ecker, 1994), microsatellite의 변이를 분석하는 SSR의 이용은 애기장대 생태형 (ecotype)의 유전변이를 분석하는 중요한 기준이 되고 있다 (Konieczny and Ausubel, 1993; Innan *et al.*, 1997). 더 나아가서 이들을 이용하여 애기장대와 유연관계가 깊은 *Arabis petraea* 및 *Arabis lyrata* 간의 진화관계를 파악하기도 하였다 (van Treuren *et al.*, 1997).

다. 마늘 및 유사종의 유전적 유연관계 연구

1993년에 영국에서 마늘 재배종 사이의 유전적 분석에 이용할 수 있는 20 개의 RAPD marker 개발을 시작으로 (Wilkie *et al.*, 1993), 호주 재배종 마늘 분류 (Bradley *et al.* 1996), 마늘 재배종들과 마늘의 원종으로 추정되는 *A. longicuspis* 간의 유연관계분석 (Al-Zahim *et al.*, 1997) 등에 RAPD를 이용하였다. 그 외에 미토콘드리아 DNA 다형화 현상을 이용한 양파의 재배종 분류 (Satoh *et al.*, 1996) 엽록체 DNA와 게놈 DNA의 RFLP분석을 이용한 *A. fistulosum* 과 *A. cepa*의 잡종인 *A. wakegi*의 부모 식물 동정 (Tashiro *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 1994) 및 잡종 분석 등이 있었다. 또한 1996년에는 서로 밀접한 연관관계가 있는 *Allium* 속 식물들 간의 satellite 서열이 매우 유사함이 알려졌고 (Pich *et al.*, 1996), 양파와 shallot에서 microsatellites를 분리했다 (Fisher and Bachman, 1998).

2. 국내의 경우

가. 유전적 유연관계를 이용한 작물의 계통분류

벼의 RFLP 지도 작성은 1990년 농촌진흥청 농업기술연구소를 중심으로 시작되었으며 사람의 RFLP 지도 작성은 인체 계놈 연구 차원에서 1991년 유전공학센터를 중심으로 시작되었다. 최근 몇 년 사이에 RAPD 방법의 편리함 때문에 국내에서도 벼, 콩 등 많은 종의 작물뿐만 아니라, 산달래, 소나무 등 국내 재래 약 20 종의 식물에서 RAPD를 이용한 계통분류 연구 및 외국종들과의 비교연구가 활발히 이루어지고 있어 최근 2년 동안 최영원 등 (1998)의 논문 외에 약 40 편 정도의 논문이 발표되었으나, RFLP와 동위효소 방법은 벼, 콩 등 일부에서만 시도했다 (이석하 등 1997a, b; Nam *et al.*, 1997; 조용구 등 1998; 양태진 등 1998; 안상낙 1997; 안상낙 등 1998). AFLP를 이용한 지도 작성이나 SSR의 분석에 관한 연구는 벼와 고추에서 보고된 바 있다 (조윤상 등 1998; Nam *et al.*, 1997).

나. 마늘 및 유사종의 계통분류 연구

1996년에 RAPD를 이용하여 국내 재배종들 및 그들의 외래 품종들 간의 유연관계를 분석하였고 (이영경 등, 1996), 마늘 계놈의 고반복서열들을 분리하였으나, 분리된 고반복서열들이 국내 재배종들간의 유연관계를 밝히는데 실패했다 (Eom *et al.*, 1996). 최근에는 RAPD 방법으로 국내 재래종 부추와 수입종 간의 유연관계 분석과 재래종 산달래의 유연관계를 분석하기도 하였다 (권일찬 등 1998; 허경옥 등 1998).

다. 배추 및 무에 대한 계통분류 연구

배추 및 무에 대한 계통분류 연구 사례는 최근 몇 년간 신품종 개발과 더불어 수 편의 논문이 보고 되었다. 1996년 RFLP 방법에 의해 6종 배추 품종의 유연관계도와 RAPD 방법에 의한 8개 품종의 유연관계도를 작성하였으며 (김정선 등 1996) RFLP 분석에 의해 52개의 배추 RFLP 마커가 개발되었다 (김정선 등 1997).

3. 현 기술 상태의 취약점

현재 유통되는 종자 및 종묘는 대부분 제 1세대 잡종 (F₁ hybrid)이나 순도감별을 위해서는 이를 직접 파종하여 재배한 후 검정하지 않으면 안 되므로 해마다 많은 농민들이 농사를 망치고 따라서 종묘 회사의 피해 또한 막심한 것이 현실이다. 또한 우리의 종자를 외국에 수출할 경우 이의 계통을 정확하게 밝혀 보호를 받거나 유사한 외국 종자가 수입된다 하더라도 이에 대항할 방법이 현재로는 없다.

4. 앞으로 전망

이번 연구에서는 마늘작물과 배추작물의 미소기관과 핵 게놈의 연구로 인하여 다음과 같은 응용적인 기여도가 예상된다.

- 작물의 미소기관과 핵 게놈의 핵산 다형화 지역 특성 규명 및 품종감별에 응용
- 국내 작물의 품종 체계 확립 및 유전형질 보존 가능
- 작물의 파종 전에 변이를 확인하여 예기치 못한 재앙 방지
- 외국산 작물의 부정유통 방지
- DNA 칩 기술과 접합하여 다른 작물의 품종 판별에 응용
- 종자의 상표화 및 21세기의 종자전쟁에 대비

5. 기술도입의 타당성

외국에서도 미소기관 이나 핵 microsatellite DNA 의 다양화 현상을 이용해 작물의 유연관계 분석을 시도한 적은 있으나, 이를 이용한 마커 개발 및 품종감별에 응용한 사례는 없다. 따라서 국내에서도 품종 감별법을 개발할 만큼 충분히 기술이 축적된 상태이고, 외국에 기술 개발을 위촉해도 상당한 기간을 요한다. 마지막으로 마늘과 배추는 우리나라가 1인당 생산, 소비량에서 세계에서 제일이기 때문에 우리가 기술개발을 주도해 나가야 한다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 재료 및 방법

가. 실험재료 및 시약

마늘 미소기관 다형성 연구에 사용된 *E. coli* 균주는 MC1061, INVαF', DH5α 등을 사용하였고, 제한효소, DNA ligase, RNase, Agarose 등은 promega 및 Invitrogen 회사의 시약을 사용하였으며, Oligonucleotide 및 PCR에 관련된 *Taq* polymerase, *AccuPower*TM PCR Premix 등은 Bioneer 사 제품을 사용하였다. 그 외 여러 가지 유기용매 및 시약들은 Merk 사의 시약들을 사용하였다. AFLP 실험기법에 사용된 시약은 AFLP Analysis System KitTM (Gibco BRL) 제품을 사용하였고, 방사성 동위 원소 [α -³²P]dATP, [γ -³²P]dATP와 Southern 혼성화 반응을 위한 nitrocellulose 및 nylon 막은 Amersham에서 구입하였으며, 탐침 DNA를 만들기 위한 random primer labelling kit (Prime-a-Gene System)은 Promega의 제품을 사용하였다. Subcloning을 위한 plasmid vector로는 pGEM3Zf(+)를 사용하였다. 그 외의 시약들은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 마늘의 실험재료로 사용된 Colossal (미국 지역 재배종), Lasoon (태국지역 재배종), 남도 (Spain 원산, 중국지역 재배종), 북경, 코끼리마늘 (*Allium ampeloprasum*), 단양, 고흥, 남해, 고양, 의성, 예천, 함안, 횡성 등 마늘들은 동양물산 연구소에서 분양받아 사용하였다. 배추 품종은 한국 신젠타와 흥농 세미니스에서 분양 받아 사용하였다.

나. 마늘 엽록체, 미토콘드리아, 핵 게놈 분리

마늘의 엽록체 게놈과 미토콘드리아 게놈은 Percoll-gradient 방법 (Jose M *et al*, 1998)을 이용하여 분리하였으며 마늘 핵 게놈 DNA는 Ultracentrifuge-CsCl gradient 방법 (Sambrook *et al*, 1989)을 이용하여 분리하였다. 배추(*B. campestris subsp. pekinensis*)의 genomic DNA는 (Shure *et al*. 1983)의 방법으로 분리하였다. 2g 의 잎을 액체 질소와 함께 곱게 갈아낸 후 50 ml cap tube에 옮겨 7 ml의 extraction buffer (50 mM Tris/8.0, 10 mM EDTA/8.0, 100 mM sodium chloride, 1% SDS, 10

mM β -mercaptoethanol)를 첨가한 후 65°C에서 10분간 incubation 시켰다. 2.5 ml의 5M potassium acetate를 첨가하고 얼음에서 최소한 15분 incubation 시킨 후 4°C에서 8000 xg 로 15분간 원심 분리하여 분리시킨 상층액을 동량의 isopropanol과 섞어 nucleic acid를 침전시켰다. 4°C에서 8000 xg 로 10분간 원심분리하여 얻은 DNA pellet을 80% ethanol로 washing 한 후 500 μ l 의 TE (10 mM Tris/8.0, 1 mM EDTA/8.0)에 녹였다. 이를 phenol/chloroform과 chloroform extraction을 거친 후 50 μ l 의 3M sodium acetate 와 500 μ l 의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 다시 침전시켜 원심 분리하여 얻은 후 80% ethanol 세척을 거쳐 200-300 μ l의 TE에 녹였다. 애기장대(*A. thaliana*)의 경우 약간의 수정된 CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) buffer [(2%(w/v) CTAB, 1.4 M sodium chloride, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris/8.0, 0.2%[v/v] β -mercaptoethanol)]을 이용하여 Saghai-Marpoo (1984)의 방법으로 60°C에서 30분간 incubation하는 방법을 사용하였다.

다. *E. coli* 균주와 배양

E. coli DH5a는 일반적인 유전자의 재조합 후 형질전환에 사용하였고, XL1-BLUE MRA(P2)는 plaque hybridization을 위한 phage의 감염 숙주로 사용하였다. 이들은 LB 배지 (10 g peptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl per liter), 37°C 조건에서 배양하였으며 XL1-BLUE는 10 mM MgCl₂와 0.2%(w/v) maltose를 첨가하였다. 고체 배지에서 *E. coli*를 배양할 경우에는 agar를 1.5%(w/v)가 되도록 첨가하여 사용하였다. 형질전환 숙주를 선별해 항생제 ampicillin은 50 μ g/ml, tetracycline은 12.5 μ g/ml이 되도록 배지에 첨가해 주었고 고체 배지의 경우 이 농도의 두 배를 사용하였다. 클로닝 여부를 확인하기 위해서 color test를 시행할 경우 LB 배지에는 0.004% (w/v) X-gal과 0.1 mM IPTG를 첨가하였다.

라. Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA는 수정된 alkaline lysis 방법 (Brush *et al.*, 1985)에 의하여 분리하였으며, 다량의 순수한 DNA를 얻기 위하여 PEG 침전법 (Sambrook *et al.*, 1989)을 사용하였다.

마. AFLP 및 STEMS 분석

마늘의 AFLP 실험은 350 ng 의 핵 게놈을 *EcoRI* 와 *MseI* 제한효소로 8시간 절단하였으며, 이 결과물을 70 °C에서 불활성화 시키고, 이 산물들을 site-derived adapter와 함께 T4 DNA ligase로 16 °C에서 반응시켰다. 이 산물들은 AFLP™ Analysis System Kit의 방법에 따라 pre-amplification primers와 PCR 하였으며, 이 결과물을 [γ -³²P]dATP와 반응시킨 후 selective amplification primers 와 함께 PCR 중합반응을 하였다. 이렇게 얻어진 반응물들은 6% polyacrylamide에 전기영동 후 X-ray film에 자가 방사시켜 다형성 절편들을 분석하였다. 다형성 절편들은 NTSYS-pc (version 1.7 Exeter software; Rohlf 1993) program 와 UPGMA (Sokal and Michener, 1958)을 사용하여 분석하였다.

또한 STEMS의 실험은 30 ng 의 핵 게놈을 주형으로 하여 [α -³²P]dATP 와 dNTP (250 μ M)와 함께 PCR을 실시하였다. 95°C에서 10분간 denature 시킨후 60°C에서 1분, 72°C에서 2분, 94°C에서 1분으로 하여, 40회 순환시켜 6% polyacrylamide겔에 전기영동하였다. 이렇게 전기영동한 결과물들은 X-ray film에 자가 방사시켜 다형성 절편들을 분석하였다.

바. 배추의 microsatellite locus 선별

배추(*B. campestris subsp. pekinensis*)의 genomic DNA를 부분 절단하여 Lambda DASH II replacement vector에 삽입시킨 genomic library로부터 새로운 microsatellite locus를 선별하기 위하여 Benton과 Davis (1977)의 방법에 의해 plaque hybridization을 수행하였다.

숙주 *E. coli* 균주로는 XL1-BLUE MRA(P2)를 사용하였고, 하나의 plate에 약 10,000 개의 plaque가 생성되도록 genomic library stock을 희석하여 총 600,000개의 plaque를 plating하였다. 하룻밤 동안 배양한 phage의 plate 위에 nitrocellulose membrane을 5분 동안 얹어 놓아 phage 입자가 막으로 이동하도록 하였고, 이 막을 denaturation solution (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에 5분씩 2회 처리하였고, neutralization solution (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.5)에 5분간 처리하였다. 그 다음 6X SSC (0.9M NaCl, 0.09 M sodium citrate)으로 옮겨주어 5분씩 3회 세척하였다. 이 막을 실온에서 건조시킨 후, 80°C에서 2시간 동안 고정시켰다. 막에 고정된

phage DNA를 표지된 탐침 DNA (nga139)와 60°C에서 혼성화 반응을 시켰다. 막을 비닐 백에 넣고 pre-hybridization solution [6X SSC, 8X Denhardt's solution, 0.5%(w/v) SDS]을 50 ml을 넣고 1 시간 동안 pre-hybridization을 시킨 다음 표지된 탐침을 넣어 혼성화 반응을 시켰다. 20 시간이 경과한 다음 washing solution [2X SSC, 0.1%(w/v) SDS]에 막을 3회 세척하여 혼성화 되지 않은 탐침 DNA를 제거하였다. 이를 건조시킨 다음 증폭막을 대고 X-ray 필름에 자가방사 시켰다.

1차선별에서 혼성화 반응을 보인 phage plaque들을 멸균된 pasteur pipette으로 추출한 다음 1 ml SM buffer와 10 µl의 chloroform이 들어있는 Eppendorf tube에 옮겨 주어 방치함으로 phage 입자를 유리시켰다. 1차선별을 통해서 얻은 phage stock들의 titration을 수행하여 plate당 약 500-1,000개의 plaque가 생성되도록 이들을 희석하여 2차 screening을 실시하였다. 2차 screening을 통해 선별된 plaque 중 임의로 약 40개 정도의 plaque들을 골라 멸균된 요지로 XL1-BLUE MRA(P2)가 top agar [0.7%(w/v) agarose in LB media]와 함께 뿌려져 있는 plate에 찍어 master plate를 만들었고 이에 대해 3차선별을 수행하였다.

사. 탐침 DNA의 표지

탐침 DNA는 microsatellite locus 전체를 포함하는 PCR product인 nga139를 사용하였다. 탐침 DNA의 표지는 random primer labelling 방법을 이용하였다. 표지하고자 하는 DNA 25 ng과 20 µM의 dGTP, dCTP, dTTP를 잘 섞고 400 µg/ml의 BSA와 50 mCi의 [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물에 Klenow fragment를 100 unit/ml이 되도록 첨가하여 실온에서 60분간 방치하여 반응시켰다. 반응 후 0.5 M EDTA (pH 8.0) 4 µl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이 반응 혼합물에 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)를 첨가하여 부피가 100 µl가 되도록 한 후 Sephadex G-50 column을 통과시켜 합성되지 않은 방사능을 띤 oligonucleotide를 제거하였다.

아. Phage DNA 분리 및 Southern 혼성화 반응

3차선별에서 최종적으로 선별된 phage를 *E. coli* XL1-BLUE MRA(P2)를 숙

주로 사용하여 액체 배지에서 다량으로 배양한 후 phage DNA를 분리하였다. 숙주 세포의 파편을 침전시킨 상층액을 초고속원심분리기에서 25,000 rpm으로 2시간 동안 다시 침전시켜 phage 입자를 얻었다. 침전된 phage 입자에 SDS와 RNase 및 proteinase K를 처리한 뒤 phenol extraction을 시행하여 phage DNA를 얻었다.

순수 분리된 phage DNA를 left, right arms를 분리시킬 수 있는 제한효소 *SaII*, *XbaI* 그리고 *EcoRI* 으로 각각 절단한 후 0.8% agarose gel 상에서 전기영동 하였다. 전기영동을 통해 얻어진 DNA 절편들의 절단 pattern들을 비교하여 중복된 것들을 제외한 나머지 15개의 phage DNA들을 대상으로 pGEM3Zf(+) vector의 multi-cloning site에 존재하는 여러 가지 제한 효소들을 이용하여 각각 절단한 후 0.8% agarose gel 상에서 전기영동 하였다. 이 gel을 depurination solution (0.25 M HCl)에 15분간 처리하였고 denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 30분간 담근 다음 alkaline transfer buffer (0.25 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 15분간 처리한 후 Southern (1975)의 방법에 따라 nylon 막으로 옮겼다.

표지된 탐침 DNA와 nylon 막과의 혼성화 반응은 65°C에서 수행하였다. DNA가 고정된 막을 비닐 백에 넣은 다음, pre-hybridization solution (1 M NaCl, 2%[w/v] SDS)을 20 ml를 넣고 1시간 동안 pre-hybridization시킨 후 백에서 공기를 제거하고 탐침 DNA를 넣어 주었다. 이를 65°C에서 20시간 동안 반응시켰다. Washing solution [2X SSC, 0.1%(w/v) SDS]으로 결합되지 않은 탐침 DNA를 3회 세척한 후 X-ray film에 1-4일 동안 자가방사 시켰다.

자. 유전자의 sub-cloning을 위한 *E. coli*의 형질 전환

혼성화 반응에서 표지된 phage DNA 절편을 pGEM3Zf(+) vector에 cloning 하기 위하여 이 절편을 순수분리 하였고, 각각 같은 제한 효소로 처리하여 절단시킨 pGEM3Zf(+)와 함께 ligation시켰다. *E. coli*의 형질 전환은 CaCl₂ 처리 방법 (Mandel and Higa, 1970)을 이용하여 만들어진 *E. coli* strain DH5a competent cell과 ligation 된 DNA를 섞어서 얼음 위에서 60분간 방치한 뒤 42°C에서 2분간 heat shock을 가하여 수행하였다. 그리고 cloning 된 절편들이 microsatellite 지역이 포함되어 있는지를 확인하기 위해 nga139 microsatellite locus를 탐침으로 삼아 DNA gel blot analysis를 수행하였다.

차. 제한 효소 지도 작성과 유전자의 sub-cloning

pGEM3Zf(+) vector에 cloning된 절편의 제한효소지도를 작성하기 위해 이 절편을 여러 제한효소로 절단한 다음 0.8% agarose gel 상에서 전기영동 함으로써 제한효소 자리의 존재를 확인하였다. 그리고 microsatellite locus 전체를 포함하는 PCR product인 nga139를 탐침으로 사용하여 DNA gel blot analysis를 실시하였다. 이로부터 제한효소지도를 작성하고, 보다 용이한 유전자 조작을 위해 제한효소로 절단한 후 여기서 나온 절편을 pGEM3Zf(+) vector로 sub-cloning하였다. 이 과정들을 통해 모두 9종류의 서로 다른 절편들을 cloning하는데 성공하였고, 이렇게 sub-cloning으로 sequencing을 할 수 있는 적절한 길이로 수정된 DNA fragment들은 각각 1BH, 1BSc, 2HE, 3H, 4Xb, 6Sc, 7Sc, 10ESph, 11Sc, 12HK, 그리고 13EB라 명명하였다.

카. Microsatellite loci 증폭을 위한 primer 설계

microsatellite의 고유한 특성을 이용하여 이 부위의 증폭을 위한 primer를 설계하였다. microsatellite는 소수의 nucleotide로 구성된 반복 단위체가 다양한 수로 연속적으로 존재하고 있는 DNA (variable number of tandem repeats)를 일컬으며, microsatellite 좌위의 주변에는 각각의 보존된 고유한 염기서열이 존재한다. 이러한 microsatellite 지역의 특성을 이용하기 위하여 주변에 위치한 각각의 보존된 고유한 염기서열을 이용하여 microsatellite 지역 증폭을 위한 10쌍의 primer들을 설계하였다.

타. Polymorphism 검출을 위한 SSR 분석

배추(*B. campestris subsp. pekinensis*)의 genomic DNA를 주형으로 하여 설계한 여섯 쌍의 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 주형으로 사용한 F1 hybrid로는 서울, 불암3호(홍농), 장원, 원우1호(서울), 농우1호(농우), 삼선60일, 여름신관, 신선숨, 새신관3호, 뿌리배추(동원), 명성봄(경신), 고농3호(고농), 팔방(제일)등의 배추종자를 구입하여 배양하였고 또한 서울종묘로부터 5종, 홍농종묘로부터 8종의 F1 hybrid 와 그 분계 그리고 모계의 종자를 분양받아 재배한 후 잎조직으로부터 분리한 genomic DNA 1 µg을 사용하였고 각각의 primer들은 200 ng을 사용하여 95°C에서 5분간 denaturation시켰다. 그 후 95°C에서 15초, 59°C에서 15초 그리고 72°C에서 30초씩 40회 순환시킨 후

72℃에서 10분간 두고 4℃로 soaking 시켰다. 각각의 primer에 따라 약간씩 annealing temperature는 조정을 하였으며 특히 1BSc의 경우 먼저 67℃의 annealing temperature로 7회 순환시킨 후, 61℃의 annealing temperature로 33회 순환시켰다. 이렇게 얻은 PCR 산물은 BMA사에서 생산되는 Meta-phore agarose를 사용하여 분석하였다. 순무와 양배추의 경우 홍농종묘로부터 순무 5종, 그리고 양배추 2종의 F1 hybrid 와 그 분계 그리고 모계의 종자를 분양받아 재배한 후 배추와 동일한 방법으로 SSR 분석을 수행하였다.

2. 마늘 엽록체 게놈 다형화 현상 연구

가. 엽록체 게놈의 변이지역 탐색

1) rps16과 trnQ사이의 영역

Genebank에 등록된 엽록체 게놈 염기서열 중 마늘과 같은 외떡잎식물이며, 같은 화분과로 서로 엽록체 게놈 상에서 유연관계가 가까운 벼와 옥수수의 엽록체 게놈 염기서열을 서로 비교하였다. 비교한 결과 rps16 intron 및 rps16과 trnQ사이의 영역에서 심한 변이를 보였으며 (Figure 2-1a), psaA와 petA 사이의 영역에서 변이가 심하였고 (Figure 2-1b) rpl16 지역이 다음으로 변이가 심하였다 (Figure 2-1c). 나머지 지역에서는 염기서열이 대체로 서로 잘 보존되어 있었다. 그래서 변이가 심한 이들 영역을 대상으로 탐색하기 위해 rps16과 trnQ 사이의 영역에서의 rps16 intron 지역 (Figure 2-1a, Fragment A), rps16과 trnQ 사이(Fragment B)를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍들을 제조하였다.

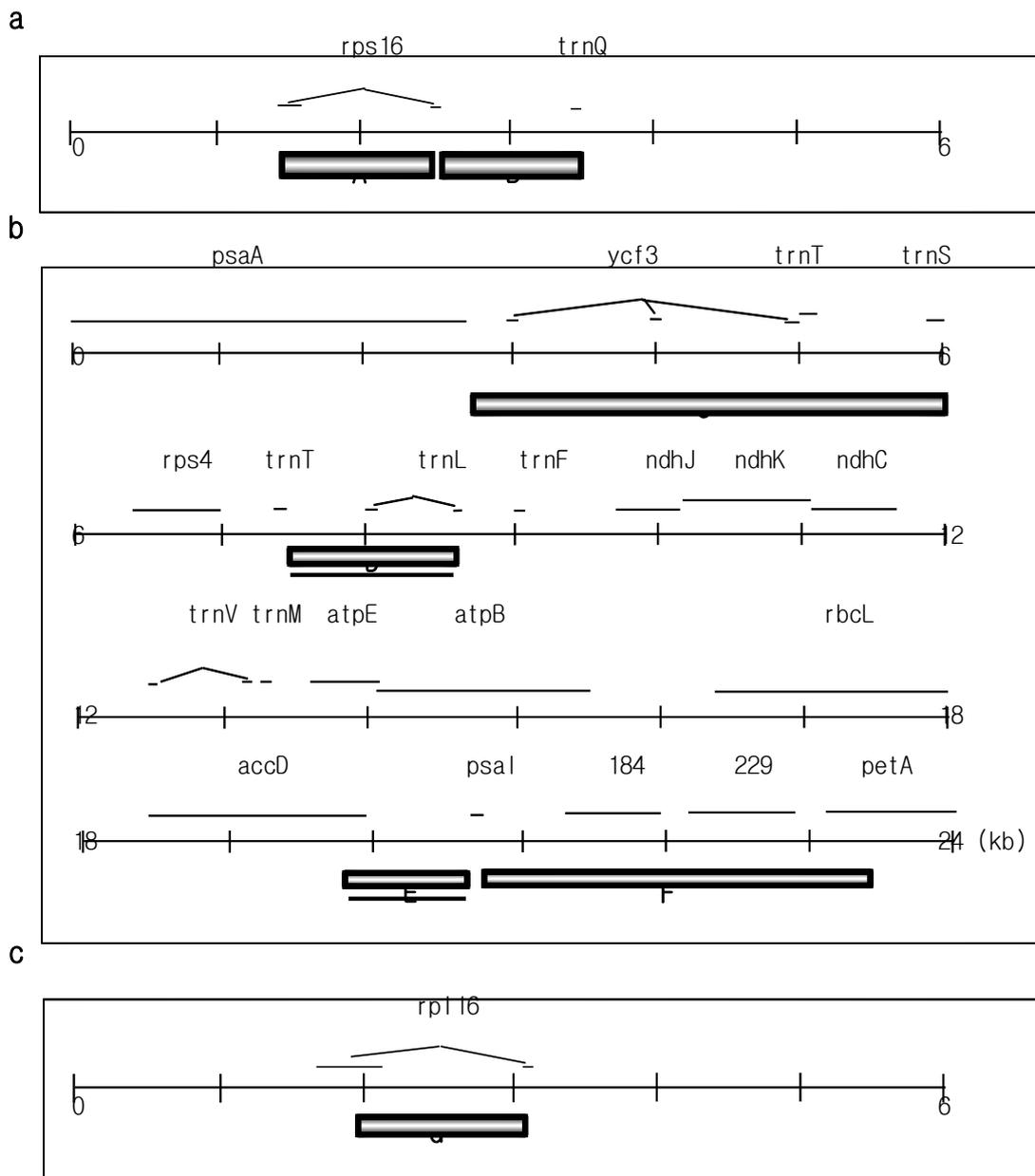


Figure 2-1. Local map of the tobacco chloroplast DNA. **a**, Region between *rps16* and *trnQ*; **b**, region between *psaA* and *petA* (about 24kb); **c**, region of *rpl16*. , PCR amplified region; , nucleotide sequence determined region. Hypervariable regions in the various chloroplast genomes are shown as a reference to the tobacco chloroplast DNA.

2) psaA와 trnL 사이의 영역

여러 가지 다른 문헌검색을 통하여 다른 부분보다 비교적 변이가 심하다고 알려져 있는 psaA와 trnS 영역(Figure 2-1b, Fragment C), trnT와 trnL 영역(Fragment D), accD와 psaI 영역 (Fragment E) 그리고 psaI과 petA 영역(Fragment F)을 증폭할 수 있는 프라이머들을 제조하였다 (Small *et al.*, 1998).

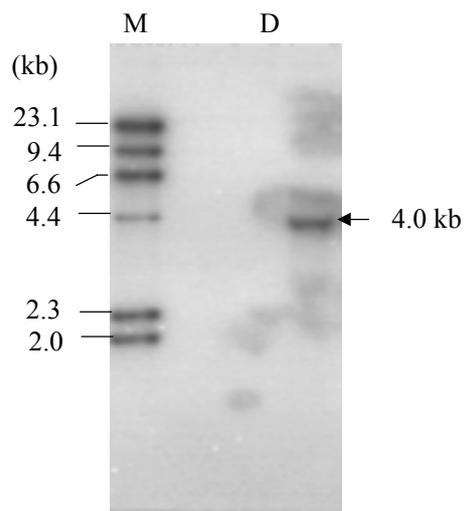
3) rbcL과 petA사이의 영역

rbcL과 petA사이의 영역은 화본과에 속하는 식물들 사이에서는 변이가 매우 심한 지역으로 알려져 있으며 (Ogihara *et al.*, 1991; 1992) 유전자들의 삽입과 결손이 많기 때문에 이 부위에서 마늘 엽록체 게놈의 구조를 알기 위하여 먼저 이 부분을 클로닝 하였다. 먼저 단양마늘에서 제한효소 *HindIII*로 엽록체 게놈을 절단하여 벼의 rbcL 유전자를 탐침으로 Southern blot hybridization을 실시한 결과 4kb 절편을 분리하고 클로닝 하였다 (Figure 2-2).

4) rpl16 intron 영역

또 다른 변이 지역 rpl16 intron 영역 (Figure 2-1c, Fragment G)들을 증폭할 수 있는 프라이머들을 제조하였다 (Small *et al.*, 1998). PCR 증폭을 실시한 부분과 예상되는 PCR 산물의 지도는 Figure 2-1에 표시하였다.

Figure 2-2. Southern blot analysis of the chloroplast DNA from garlic cultivated in Danyang. *HindIII* digested-fragment of 4.0 kb was hybridized with the 3' region of rice rbcL .



5) PCR 분석 및 클로닝

이들 7개 지역을 PCR 증폭한 다음 agarose 겔 전기영동 한 결과는 표 2-1과 Figure 2-3과 같다. 표준시료로 사용한 단양마늘, 북경마늘, 아오모리마늘, 코끼리마늘 중 북경마늘은 다른 마늘들과 PCR 절편 크기에서 큰 변이를 보였고 다른 마늘들 사이에서는 절편들의 크기에서 차이를 발견할 수 없었다. 그 구조를 더욱 자세히 결정하기 위해 PCR 증폭된 절편들을 pCR-II vector (Invitrogen Co. Ltd) 및 pUC18 vector에 클로닝 하였다.

Table 2-1. Comparison of the size of the PCR products among garlic cultivated in Danyang, Beijing, Aomori and elephant garlic.

(unit: kb)

Regions \ Samples	Danyang	Beijing	Aomori	elephant garlic
A. rps16 intron	1.0	1.0	1.0	1.0
B. rps16-trnQ	1.1	0.9	1.1	1.1
C. psaA-trnS	2.0	-	2.0	2.0
D. trnT-trnL	0.9	0.7	0.9	0.9
E. accD-psaI	0.8	0.6, 1.7	0.8	0.8
F. psaI-petA	2.2	2.4	2.2	2.2
G. rpl16 intron	1.2	1.2	1.2	1.2

나. PCR-RFLP 및 염기서열 결정

1) PCR-RFLP

PCR 증폭 및 클로닝된 절편들에 대한 변이를 탐색하기 위해 *Sau3AI*과 *MseI*를 사용한 RFLP 패턴은 다음과 같다 (Figure 2-4). 북경마늘은 모든 지역에서 PCR 증폭된 절편의 크기에서 다른 마늘들과 변이를 보였고, 코끼리마늘은 rps16-trnQ, trnT-trnL 및 psaI-petA 지역에서 단양마늘 및 아오모리 마늘과 차이를 보였다.

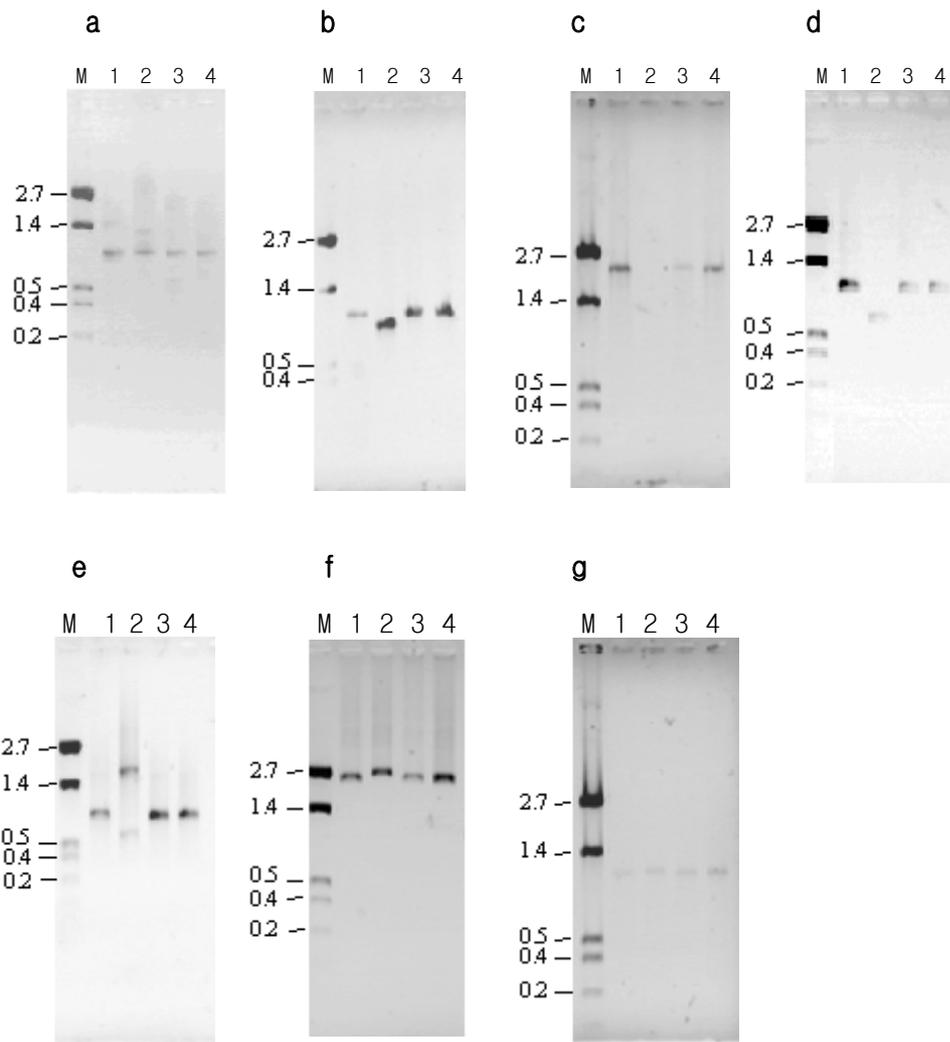


Figure 2-3. PCR amplification of the variable regions of chloroplast DNA of garlic cultivated in (1) Aomori, (2) Beijing, (3) Danyang, and (4) Elephant garlic. M is the pUC18/*HinI* size marker. Panel a, the intron of *rps16*; panel b, the intergenic space between *rps16* and *trnQ*; panel c, the intergenic space between *psaA* and *trnS*; panel d, the intron of *trnT* and intergenic space between *trnT* and *trnL*; panel e, the intergenic space between *accD* and *psal*; panel f, the intergenic space of chloroplast DNA between *psal* and *petA*; panel g, the intron of *rpl16*.

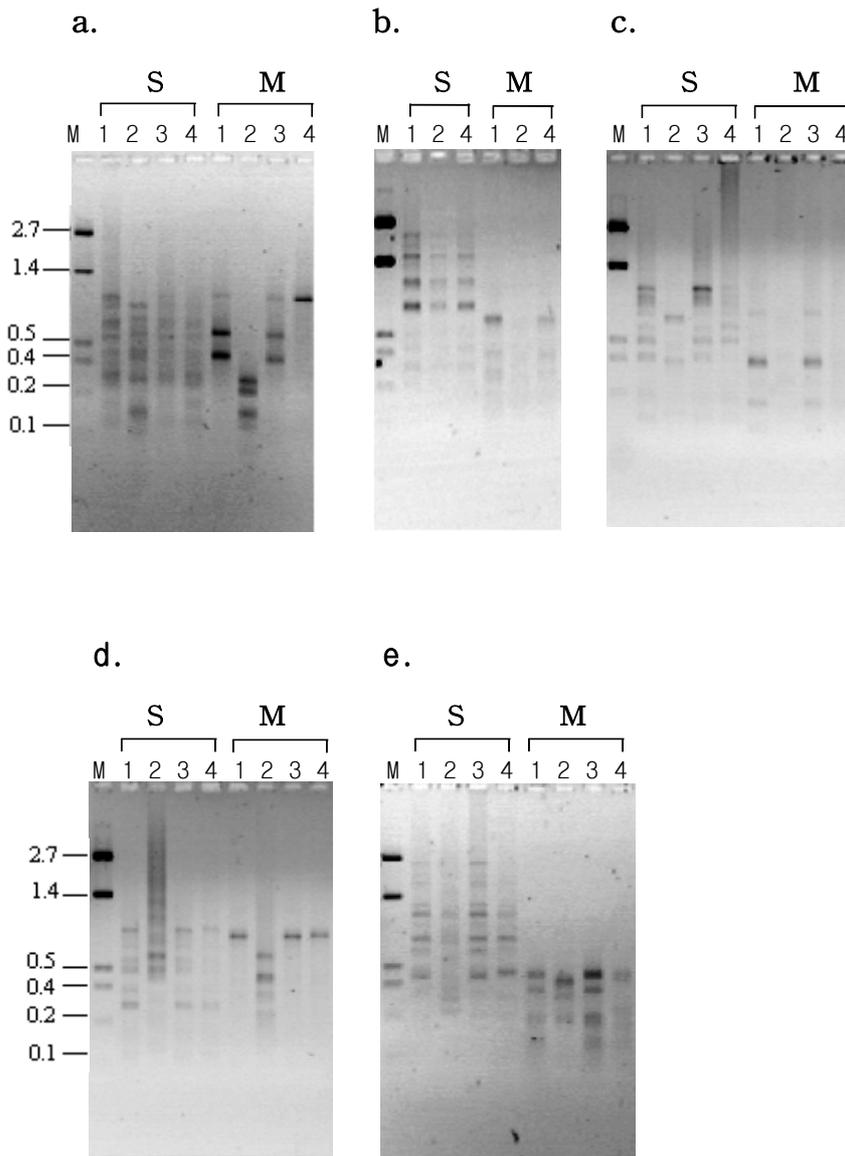


Figure 2-4. PCR-RFLP analysis of the variable regions of chloroplast DNA cultivated in (1) Aomori, (2) Beijing, (3) Danyang, and (4) Elephant garlic with the enzyme *Sau*BI (S) and *Mse*I (M). M is the pUC18/*Hin*I size marker. Panel a, the intergenic space between *rps16* and *trnQ*; panel b, the intergenic space between *psaA* and *trnS*; panel c, the intron of *trnT* and intergenic space between *trnT* and *trnL*; panel d, the intergenic space between *accD* and *psal*; panel e, the intergenic space between *psal* and *petA*.

2) 염기서열 분석

PCR 절편들의 변이를 자세히 탐색하기 위해 염기서열 분석을 실시하였다. 이들 중 *psaA-trnS* 절편을 제외한 절편들의 전체 및 부분 염기서열결정 결과 *trnT-trnL*, *accD-psaI*, *psaI-petA* (Fragment D, E, F)지역의 비암호화 부분에서 코끼리 마늘은 단양 마늘 및 아오모리 마늘과 비교했을 때 짧은 염기들의 insertion 및 deletion을 확인할 수 있었다. (Figure 2-5).

A. *trnT - trnL*

```

Aomor i   GAAATAATGCATATG-AATTCAGGAGACTACCGGATCCCGCTATTAGCTGTAAAGTTCGTATGAACTATATAT-----
Danyang   GAAATAATGCATAGG-AATTCAGGAGACTACCGGATCCCGCTATTAGCTGTAAAGTTCGTATGAACTATATAT-----
Elephant  GAAATAATGCATAGGAATTCAAGAGACTACCGGATCCCGCTATTAGCTGTAAAGTTCGTATGAACTATATATTTAATAT
***** * *****

Aomor i   -----TT-AATATAAACTATATATTATATTCTAGTTCATTAAAATTAATATGCAAATTAATATTAATAATATATTTAA
Danyang   -----TT-AATATAAACTATATATTATATTCTAGTTCATTAAAATTAATATGCAAATTAATATTAATAATATATTTAA
Elephant  AAACATTTTAAATAAACTATATATTATATTCTAGTTCATTAAAATTAATATGCCAATTA-----CTAATATATTTAA
          ** *****

Aomor i   TAAATAAATAGAATAATATGACTAAATAGAAATTTATTCTAATAATGTAAACAGATCTAATAATGTAAACAGAAAAAATAT
Danyang   TAAATAAATAGAATAATATGACTAAATAGAAATTTATTCTAATAATGTAAACAGATCTAATAATGTAAACAGAAAAAATAT
Elephant  TACATATATAGAATAATATGACTAAATAGAAATTTATTCTAATAATGTACCAGATCTAATA-TGTCCCAGAA-TGTAATAT
          ** ** *****

Aomor i   CTGACTAATTTCAATTTTATTATTATACATAATAATTATTGATGATATACATTTACATTACTGTTATTTTTAGCCTATTT
Danyang   CTGACTAATTTCAATTTTATTATTATACATAATAATTATTGATGATATACATTTACATTACTGTTATTTTTAGCCTATTT
Elephant  CTGACTAATTTGCAATTTAATTATTATACCTGAGAATTATCGATGATAT-CATTTACATGACGGTTATTTG-----
          ***** *****

Aomor i   AGAATTTACATTATTTATCTTATTTACATTATTTATCTTAATTTAATATATATATATATTTAATATATATTTTTTACAT
Danyang   AGAATTTACATTATTTATCTTATTTACATTATTTATCTTAATTTAATATATATATATATATTTAATATATATTTTTTACAT
Elephant  AAGATTTAGCTTATT---CGACTGTACTTTTATTTATCTCAATTAATATATATATATAT---TTAATATATATTTT--ACAT
          * *****

Aomor i   TCCAT-TATATAATAAACTATAATAA----ATATAAAATTCCTTTTATATTTAA-TTTATTTAATTTTAAATAAAGATATT
Danyang   TCCAT-TATATATTAAACTATAATAA----ATATAAAATTCCTTTTATATTTAA-TTTATTTAATTTTAAATAAAGATATT
Elephant  CATGTGTAATAATAA-CTTTATTAATTCAAATATAAAAAAGGAATTTTATATTTATAATAATTTATAATAAAGATATT
          ** ** * * * * *

Aomor i   GAAAATACCAAAAAATTGGAATTCCTTTTTAGATTTGAGATAGTTATAAGAAATAAGGATTCATATTATAGCGGATCAGT
Elephant  GGAGATACCAAAAAATTGGAATTCCTTTTTAGATT-GAGATAGTTATAACAAATAAGGATTCATATTATAGCGGATCAGT
          * * *****

Aomor i   CC-----AAAGATACAACAATAAAAATTATAATCAGACATTCTTCTGATTTTCGTTTCGAAAAGG
Elephant  CCTAAGAAAAGTATAAAATAAGGATAAAGATACAACAATAAAAATTATAATCAGACATTCTTCTGATTTTCGTTTCGAAAAGG
          ** *****
    
```


Aomor i AGTGTAAATGCGGTATGATATGTGCCCTTTTTCCCAATACAAATGAAAAACTGTTATGCATGCAAATACATGATATCCCTA
 Danyang AGTGTAAATGCGGTATGATATGTGCCCTTTTTCCCAATACAAATGAAAAACTGTTATGCATGCAAATACATGATTTCCGTA
 Elephant AGTGTAAATGCGGTATGATATGTGCCCTTTTTCCCAATACAAATGAAAAACTGTTATGCATGCAAATACATGATATCCGTA

 Aomor i TAAATCCATGTTTATACGGGCGGTCGGCAAAATATTTTATAATAAAAAAGTCAATGTTTCTAACCAATTACTCCTAAGGGTT
 Danyang TAAATCCATGTTTATACGGGCGGTCGGCAAAATATTTTATAATAAAAAAGTCAATGTTTCTAACCAATTACTCCTAAGGGTT
 Elephant TAAATCCATGTTTATATGGGCGATCGGCAATATTTTATAATAAAAAAGTCAATGTTTCTAACCAATTACTCCTAAGGGTT

 Aomor i CATATCAAATATTTTTAGTTGATGAAAGTACTTTGGCATCAAAAAA-----TTTTTTTTCTGAATCCAATC
 Danyang CATATCAAATATTTTTAGTTGATGAAAGTACTTTGGCATCAAAAAA-----TTCCCTTTCTGAATCCAATC
 Elephant CATATCAAATAGTTTTAGTTGATAAAAGTACTTTAGCATCAAAAAAAGTAAAGTCAATTTTTTCTGAATCCAATC

 Aomor i AAATGCAATCGGATCTAGTATAGTTTGAAGTGGCGATCACAACATATCTGGATAGAAGTATACCGGGTCTCGAAAAGCAA
 Danyang GAATGCAATCGGATCTAGTATAGTTTGAAGTGGCGATCACAACATATCTGGATAGAAGTATACCGGGTCTCGAAAAGCAA
 Elephant AAATGCAATCGGATCTAGTATAGTGTGATCTGGCGATCAAACATTTATGGATAAAAGTATAACGGGTCTCGAAAAGCAA

 Aomor i TAATTTTTCTGGCCT-TATTCTTTTTAAAGTCACTAGGATCTTAATGGTGAATCCTATTACCTGGTAGACTGATACC
 Danyang TAATTTTTCTGGCCT-TATTCTTTTTAAAGTCACTAGGATCTTAATGGTGAATCCTATTACCTGGTAGACTGATACC
 Elephant GTAATTTTTCTGGCCTCTATTCTTTTTTAGTCACTAGGATCTTAATGGTGAATCCTATTCTGGTAGACTGATACC
 * *****
 Aomor i GGATCCCTCTCACAATATTTTTCCCAAGGACCGAGTCTCCATGATCCGGTTTTTCATAATCCATTGTGGGCCAAT-GTGAT
 Danyang GGATCCCTCTCACAATATTTTTCCCAAGGACCGAGTCTCCATGATCCGGTTTTTCATAATCCATTGTGGGCCAAT-GTGAT
 Elephant GGATCCCTCTCACAATATTTTTCCCAAGGACCGAGTCTTAGGATCCGGTTTTTC-TACTCCATT-TGGGCAAATTTGAA

 Aomor i -TTGTTGTAGACACCCAGAAAAGAAATGTTTTCTGGGATCCGAACTTCTCCCTCCCAAGATCCCCACCAAGAGT
 Danyang -TTGTTGTAGACACCCAGAAAAGAAATGTTTTCCGGGATCCCAACTTCTCCCTCCCAAGATCCCCACCAAGAGT
 Elephant GTTGTGGTATACATCAAAAAAG-ATTGTTTTCTGGGACCGGATCTTCTCCCTTAAAAA---CCCCCATAGT

 Aomor i AAAGTCTCCCTCCTTTGAAACAAGCAGACCCCTTACC. . . . (약 600bp). . . . TCTGATGAAAATCCCGGTTTT
 Danyang AAAGTCTCCCTCCTTTGAAACAAGCAGACCCCTTACC. . . . (약 600bp). . . . TCTGATGAAAATCCCGGTTTT
 Elephant AAAGTCTCCCTCATCTTAGAACAGCAGACCCCTTACC. . . . (약 600bp). . . . TCTGTTGAAAATCCCGGTTTT

 Aomor i ATAAGTGACCGGATTAGGAAAGCTCGAATTGGATC-GGAAGTGAATCTGATGGATTTTGGGGAGTAAGAACGGAAAAAAA
 Danyang ATAAGTGACCGG-TTAGGAAAGCTCGAATTGGATC-GGAAGTGAATCTGATGGATTTTGGGGAGTAAGAACGGAAAAAAA
 Elephant ATCAATGGCCGGATT-GGAAAGCACCATTGGATCAGGAAGTGAATCGGAGGGATTTTGGGGAGAAAGACCG-AAAAAAA
 * * * * *
 Aomor i GTGTTGAAACAGAGACATGTCAAAAAGATATCTTCATAAATGTGAAAAATGTCATTTAAGGTATTATTGGGAGAGATGT
 Danyang GTGTTGAAACAGAGACATGTCAAAAAGATATCTTCATTAATGTGAAAAATGTCATTTAAGGTATTATTGGGAGAGATGT
 Elephant GTGTTGAAACAGAGACATGTCAAAAAGATATCTCTGGCATGTGAAAAATGTTATTTAAGT-TTATGGGAGAGATGT

 Aomor i ATTGATTGGATCGGATTTTAAATACGGAACATAAAGTTTTTATTTTAGTACGATTAGGATGGATTCATCAACCAGGGGGG

```

Danyang   ATTGATTGGATCGGATTTTAAATACGGAACATAAAGTTTTTTATTTTTAGTACGATTAGGATGGATTCATCAACCAGGGGGG
Elephant  ATTGATTTGATCGGATTTTAAATA-GGAACATAAAGTTTTTTTTATAGGA---T-AGGA--GGATCATCA-CCCGGGGA
*****
Aomor i   ACTGGGGTGATTGATTACATGATTGGAGGGTCATAAGGCAATATATTGTTTTGTTCCACTTTCAGTATTTAGAACAATCG
Danyang   ACTGTGGTGATTGATTACATGATTGGATGGTCATAAGGCAATATATTGTTTTGTTCCACTTTCAGTATTTAGAACAATCG
Elephant  G--GAGGTGAT-GATTACA-GATTGGAGGGTC-TAAGGCAATA-ATTGTTT-GTTCCA-TTCCAGTATTAAGAACAATGG
      * *****
Aomor i   GAATATGGATTTCCGTTTTTAAATCGGTATCTCCTTCGCTCGTAGTCATTTATCATTCAAGGAATGAATGATAAATTATTT
Danyang   GAATATGGATTTCCGTTTTTAAATCGGTATCTCCTTCGCTCGTAGTCATTTATCATTCAATGAATGAATGATAAATTATTT
Elephant  GAATATGGATTTCCTTTTTAAATCGGTATCTCCTTCGTTGGTAGTCATT-ATCAATCAAGGAA-GAAAGATAAACTATTG
*****
Aomor i   GAT-----ATCATTTTTTATACTTTTCAAGGCCT
Danyang   GAT-----ATCATTCTTTATACTTTTCAAGGCCT
Elephant  GATTTCTGATATCAATCAAAAAGTTTTTTCACGTGTA AAAACTTTTTGATAGATATCATTCTTTAAAAATTTTCAAGGCC
      ***
Aomor i   TCGTCTGTTTTGTCAAATTTTTTTCAGTACAATGGCAGAATTGTGGATAGGGAATACTAGCTACCTATCTAATTTAT
Danyang   TCGTCTGTTTTGTCAAATTTTTTTCAGTACAATGGCAGAATTGTGGATAGGGAATACTAGCTACCTATCTAATTTAT
Elephant  TCGTCTGTTTTGTCCGATTTTTTTCAG-----CAGAATCGTGGATAGGGAATACTAGCTACCTATCTAATTTAT
*****
Aomor i   TGTAGAAATCCGGGATCAATGATTGGATCATGCAAAATAGAAATACTTTTTTTGGGTAAGGGACAGATGACTCAATTT
Danyang   TGTAGAAATCCGGGATCAATGATTGGATCATGCAAAATAGAAATACTTTTTTTGGGTAAGGGACAGATGACTCAATTT
Elephant  TGTAGAAATCCGGGATCAATGAATGGATCATGCAAAATAGAAATACTTTTTTTGGGTAAGGGACAGATGACTCAATTT
*****
Aomor i   ATTTCTGTATCGATCATGATATATGTAATAAATCGAGCATTTATTTCAAATGCGTATCCCATTTTTGCGCAGAAAAGTTAT
Danyang   ATTTCTGTATCGATCATGATATATGTAATAAATCGAGCATTTATTTCAAATGCGTATCCCATTTTTGCGCAGAAAAGTTAT
Elephant  ATTTCTGTATCGATCATGATATATGTAATAACTCGAGCATTTATTTCAAATGCGTATCCCATTTTTGCGCAGAAAAGTTAT
*****
Aomor i   GAAAATCCACGAGAAGCAACCGGGCGAATTGTATGCGCCAATTGCCATTTAGGTAATAAGCCTGTGGATAAAT
Danyang   GAAAATCCACGAGAAGCAACCGGGCGAATTGTATGCGCCAATTGCCATTTAGGTAATAAGCCTGTGGATAAAT
Elephant  GAAAATCCACGAGAAGCAACCGGGCGAATTGTATGCGCCAATTGCCATTTAGCTAATAAGCCTGTGGATAAAT
*****

```

Figure 2-5. Multiple alignment of the nucleotide sequences of the variable regions of chloroplast DNA cultivated in Aomori, Danyang and elephant garlic by Clustal_X program (Thompson *et al.*, 1997). Region A, the intron of trnT and intergenic space between trnT and trnL; region B, the intergenic space between accD and psal; region C, the intergenic space between psal and petA.

다. AFLP 분석

아오모리 마늘과 단양 마늘 사이에는 뚜렷한 변이를 확인할 수 없었기 때문에 엽록체 게놈 상에 서로 변이를 보이는 부분이 있는지 확인하기 위하여 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 분석을 실시하였다. AFLP 분석결과 프라이머 쌍을 E-0 : M-G, M-A, M-T, M-C로 PCR 증폭시켰을 때, 아오모리 마늘과 단양마늘에서 다형성 절편은 존재하지 않았다. (Figure 2-6). 따라서 아오모리 마늘과 단양 마늘은 엽록체 게놈에서 매우 유사한 구조로 나타나고 있음을 알 수 있었다.

마. 논 의

지금까지 실험한 표준시료들의 엽록체 게놈 DNA의 비암호화 부위에서 중국의 북경마늘 (*Allium sativum*)은 코끼리 마늘(*Allium ampeloprasum*)보다도 단양 마늘이나 아오모리 마늘과 더 큰 변이를 보임을 알 수 있다. 이는 마늘 재배종들의 엽록체 게놈에서 비암호화 부위가 차이를 보일 가능성이 있었으나, PCR 증폭, RFLP 분석, AFLP 분석 등에서 단양마늘과 아오모리 마늘 사이에는 뚜렷한 차이점을 발견할 수 없었다. 이것은 국내 마늘이 일본 마늘에 대해서 유전적 근원관계가 서로 가까운 반면 북경마늘에 대해서는 비교적 멀다는 것을 알 수 있었다.

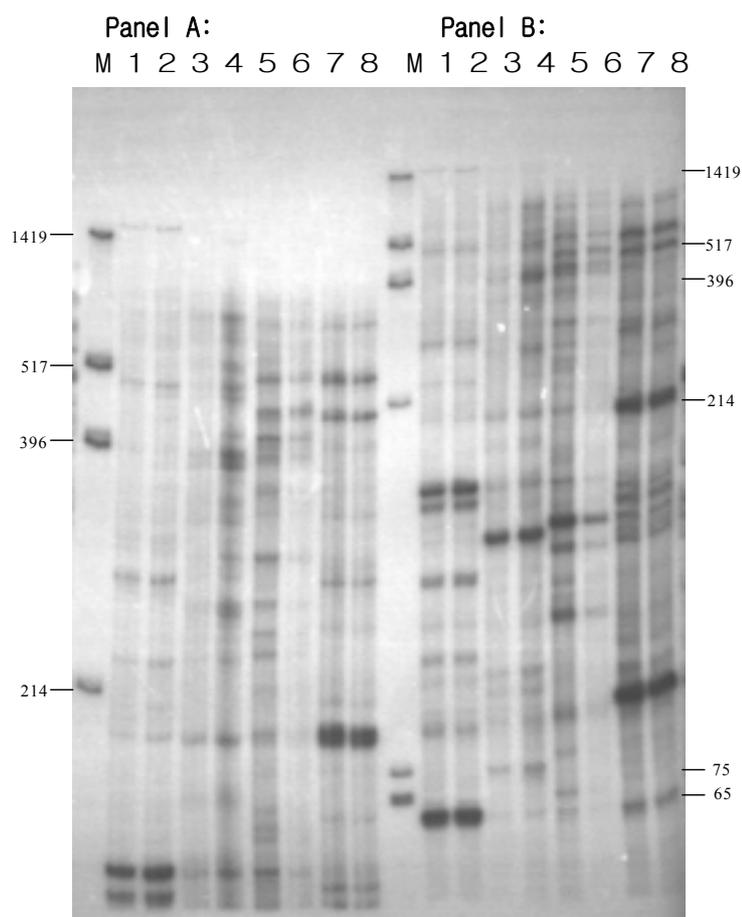


Figure 2-6. AFLP fingerprint of chloroplast DNA from garlic. Panel A is long run analysis of sequencing gel and the panel B short run analysis. Lane M, pUC18/*Hinf*I size marker; lanes 1 and 2 are PCR products by the primer pair E-0/M-G; lanes 3 and 4 are by E-0/M-A; lanes 5 and 6 are by E-0/M-T; lanes 7 and 8 are by E-0/M-C. Chloroplast DNA samples for lanes 1,3,5 and 7 are from Aomori garlic and for lanes 2,4,6 and 8 are from Danyang garlic.

3. 마늘 미토콘드리아 게놈의 핵산 다형성 분석

가. 변이지역 탐색 및 클로닝

마늘 미토콘드리아 게놈의 핵산 다형성을 분석하기 위해 데이터베이스 검색을 통하여 고등식물의 미토콘드리아 게놈의 염기서열들을 비교 분석하여 변이가 심한 *coxI*, *coxII*, *coxIII* 및 *nad3* 유전자 부위 및 이들 유전자 주변들을 증폭할 수 있는 PCR 프라이머 쌍들을 합성하였으며 북경, 남해, 의성, 아오모리 (일본) 및 제주산 마늘을 대상으로 PCR 증폭 결과는 Figure 3-1과 같다.

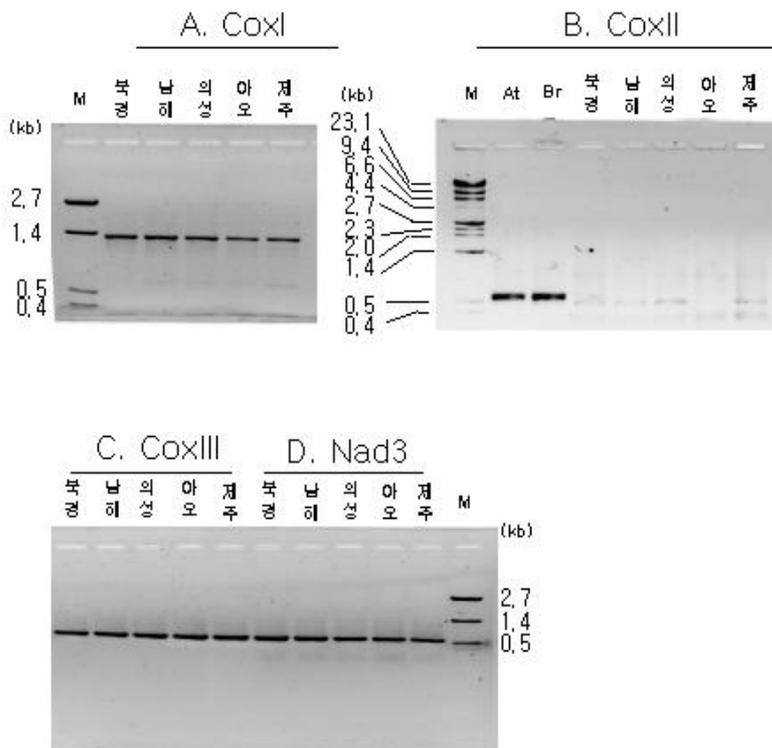


Figure 3-1. PCR amplification analysis of garlic mitochondrial DNA for coding region of *coxI*(A), *coxII*(B), *coxIII*(C), and *nad3*(D). Lane M, pUC18/*HinfI* size marker or λ /*HindIII* size marker; 북경, 북경마늘; 남해, 남해마늘; 의성, 의성마늘; 아오, 아오모리마늘; 제주, 제주마늘; At, 애기장대; Bc, 배추

위의 결과들을 보면 북경, 남해, 의성, 아오모리, 제주 마늘에서 *cox I* 프라이머에서는 약 1.3 Kb의 절편들이 PCR 증폭됨을 알 수 있었다. *cox II* 프라이머로 PCR 증폭하였을 때에는 애기장대와 배추의 PCR 증폭하였을 때와 마찬가지로 약 500bp에서 절편들이 존재하였다. *cox III* 프라이머와 *Nad3* 프라이머로 PCR 증폭하였을 때 약 0.7kb에서 절편이 확인되었다. 각 지역종 마늘 사이에서 *cox I*, *cox II*, *cox III* 및 *nad3* coding region 에서는 증폭된 절편들 사이에서 크기의 변이는 발견할 수 없었다.

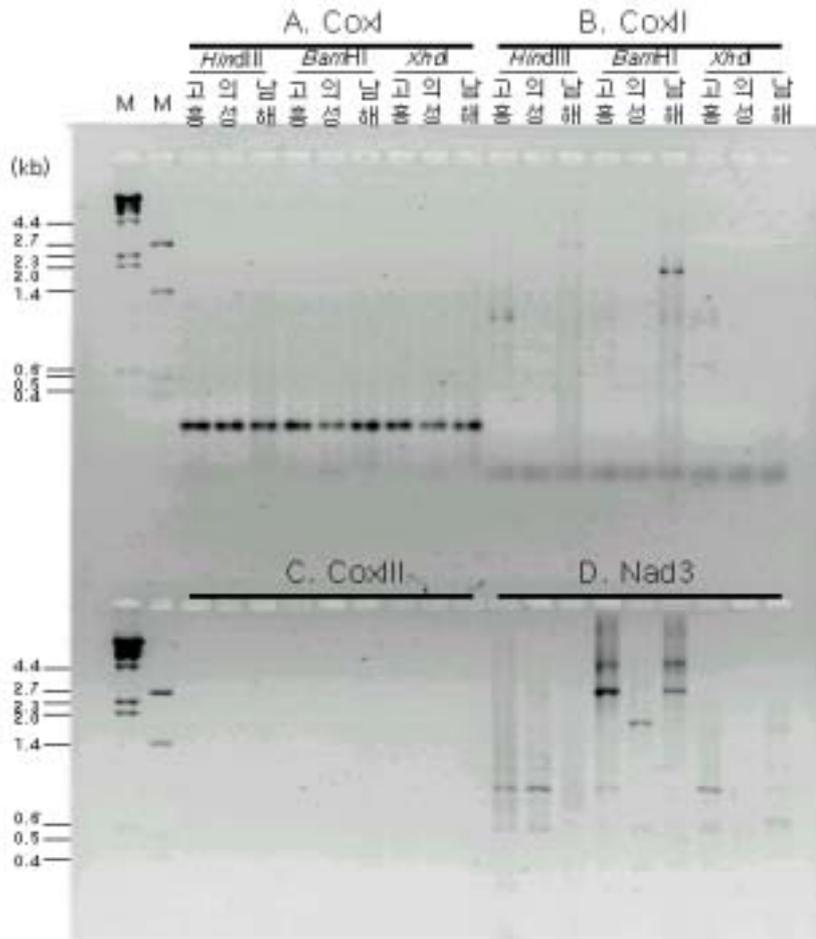


Figure 3-2. Inverse PCR amplification analysis of variable region for *CoxI*(A), *coxII*(B), *coxIII*(C) and *nad3*(D). M, λ /*HindIII* and pUC18/*HinfI* size marker; 고흥, 고흥마늘; 의성, 의성마늘; 남해, 남해마늘.

마늘 미토콘드리아의 *coding region*이 아닌 그 주변 지역을 알아보기 위해서, 고흥, 의성 남해 마늘의 미토콘드리아 DNA를 *HindIII*, *BamHI*, *XhoI*으로 절단한 후 self-ligation한 후, inverse PCR 방법으로 *coxI*, *coxII*, *coxIII*, *nad3* 주변지역을 PCR 증폭하였다. 이것을 1% agarose gel에 전기영동한 한 결과를 Figure 3-2에 나타내었다. Inverse PCR 증폭결과, *coxII* 및 *coxIII* 지역에서는 PCR 증폭이 이루어지지 않았고, 제한 효소 *BamHI*으로 절단하고, self-ligation 시킨 *nad3* PCR 증폭에서 고흥마늘과 남해마늘의 경우 4.3kb, 의성마늘에서는 1.8kb 절편이 존재하였다. 그리고 이 절편을 pBluscriptII 벡터에 클로닝하였다.

나. 변이 지역 구조 분석

클로닝된 고흥마늘, 남해마늘 4.3kb 절편들과 의성마늘 1.8kb 절편에 대한 부분 염기서열을 결정한 다음 blast 프로그램을 이용하여 Genebank 데이터베이스에 등록된 자료들을 검색한 결과 고흥마늘 및 남해마늘 4.3kb 절편들은 양과의 *nad3*와 *rps12* 사이의 지역에서 가장 높은 유사성을 보였고, 의성마늘 1.8kb 절편은 한쪽 부분에서는 양과의 *nad3* 유전자와 유사성을 보인 반면 다른 쪽에서는 *coxII* 유전자와 유사성을 보였다. Figure 3-3은 고흥마늘의 4.3kb 절편의 부분염기서열과 양과 유전자 (EMBL accession number X84204)의 blast 분석결과이다. 그러나 고흥마늘과 남해마늘의 절편들은 서로 일치하였다. 따라서 이들 *nad3* 지역에서는 변이가 없는 것으로 나타났다.

A. Forward 부분

Score = 301 bits (152), Expect = $2e^{-79}$
Identities = 162/164 (98%), Gaps = 1/164 (0%)

```
A: 7  ctggataggtcgaactattggaagcaaatggaaaaggaagaccgagtgggatcaaagaaa 66
   |||
B: 179 ctggataggtcgaactattggaagcaaatggaaaaggaagaccgagtgggatcaaagaaa 120

A: 67  ctagcggactcatcactaaatagatcaaaataggtgaaaattccgacatcaccaaagctc 126
   |||
B: 119 ctagcggactcatcactaaatagataaaaaataggtgaaaattccgacatcaccaaagctc 60

A: 127 act-gcgttctctcgctctgctcgcggcgctccttgcctgcgga 169
   |||
B: 59  acttgcgttctctcgctctgctcgcggcgctccttgcctgcgga 16
```

B. Reverse 부분

Score = 208 bits (105), Expect = 1e⁻⁵¹
Identities = 105/105 (100%)

```

A: 58  gtattcgaggagtcaaggatttgc tgggaattccggatcgaagaagaggcagatctaaat 117
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 762 gtattcgaggagtcaaggatttgc tgggaattccggatcgaagaagaggcagatctaaat 821

A: 118 atggtgcggaaaaacccaaatccaaatgaatggaagatgcctctg 162
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B: 822 atggtgcggaaaaacccaaatccaaatgaatggaagatgcctctg 866

```

Figure 3-3. Comparison of the nucleotide sequences of the variable regions of mitochondrial DNA cultivated in Goheung with Onion mitochondrial DNA by Genebank blast. A , Inverse PCR fragment of Goheung garlic for nad3 variable region of 4.3 kb fragment; B, EMBL accession number X84204.

다. AFLP analysis

고흥마늘과 남해마늘 사이에서 미토콘드리아 전체 게놈 상에 서로 변이를 보이는 부분이 있는지 확인하기 위하여 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 분석을 실시하였다. 고흥마늘과 남해마늘의 AFLP 분석결과 약 200bp 근처의 1곳에서 다형성 절편이 관찰 되었다. 이 결과로 볼 때 마늘의 미토콘드리아 게놈은 그 구조가 매우 비슷하지만(Figure 3-4) 두 마늘의 구조적 차이를 판별할 수 있는 마커로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

라. 논의

마늘 미토콘드리아 게놈의 핵산 다형화 지역의 규명은 미토콘드리아 게놈에서 핵산 다형화 현상이 집중된 변이지역 즉, coxI, coxII, coxIII 및 nad3의 cording 지역을 대상으로 먼저 PCR 증폭을 하였다. 하지만 이들 유전자 부위에서는 북경마늘, 남해마늘, 의성마늘, 아오모리마늘, 제주산 마늘을 대상으로 분석한 결과 변이를 발견할 수 없었다. 따라서 이들 유전자 부위 주변을 탐색하기로 하여 이들 coxI, coxII, coxIII 및 nad3 유전자 주변을 inverse PCR 증폭 방법을 통하여 변이의 차이를 밝히고자 하였다. 그 결과, 남해마늘, 고흥마늘에서는 nad3 유전자 주변에서 약 4.3kb의 절편들이 PCR 증폭되었다. 그리고

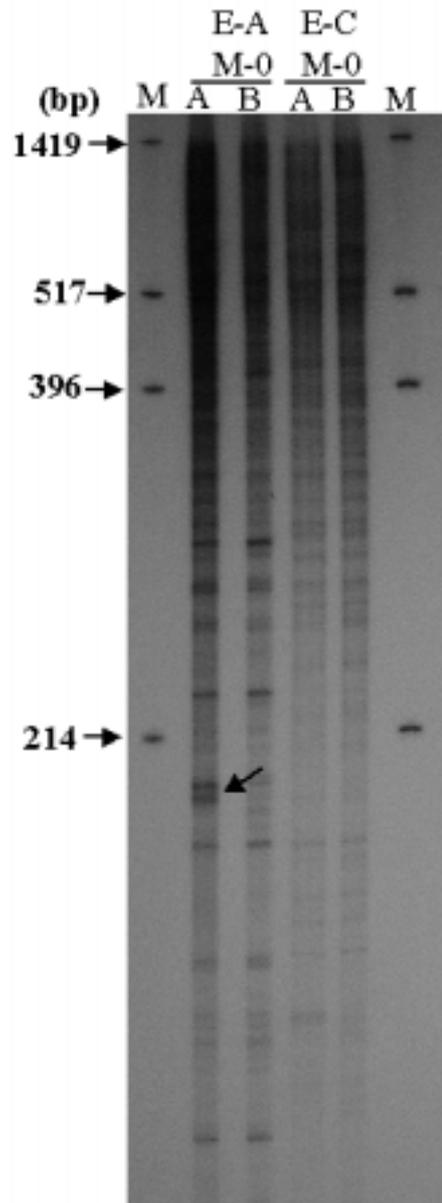


Figure 3-4. AFLP fingerprint generated from mitochondrial DNA of 2 garlic clones with primer pairs E-A · M-0, and E-C · M-0, respectively. M, pUC18/*Hinfl* size marker; A, Goheung; B, Namhae. Arrow indicates polymorphic region between the garlics cultivated in Goheung and Namhae.

의성마늘에서는 역시 *nad3* 유전자 주변에서 1.8kb의 절편이 증폭되었다. 따라서 이 절편들

을 pBluscriptII vector에 클로닝 하고, 이것을 sequencing을 통해서 이 부분들을 염기서열을 결정하였다. 이들의 염기서열을 GeneBank의 database들을 blast program을 이용하여 분석한 결과, 고흥마늘 및 남해마늘의 4.3kb 절편들은 양과의 nad3와 rps12 사이의 지역에서 가장 높은 유사성을 보였고, 의성마늘의 1.8kb 절편은 한쪽 부분에서 양과의 nad3 유전자와 유사성을 보인 반면, 다른 한쪽에서는 coxII 유전자와 유사성을 보였다. 그리고 고흥마늘과 남해마늘의 AFLP를 통하여 그 종간의 변이를 찾으려 하였으나, 2개의 표준시료를 분석한 결과, 유전체 구조에 있어서 고흥 마늘과 남해 마늘에서는 1개의 다형성 절편을 발견할 수 있었고, 이것은 두 종의 마늘을 구별 할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 마늘 핵 게놈의 핵산 다형성 분석

가. AFLP 분석

마늘 핵 게놈의 다형성을 조사하기 위해서 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 실험방법으로 총 32개의 AFLP 프라이머 쌍 조합 (Table 4-1) 을 가지고 PCR 증폭하였고, 그 중 12개의 프라이머 쌍 (Table 4-2)에서 다형성 절편이 존재하였다. AFLP 실험에서 2번의 PCR 증폭 과정을 실시하며, 이것은 pre-amplification 와 selective amplification 과정으로 나뉜다. 마늘 핵 게놈의 다형성 절편들을 살펴보면 다음과 같다.

첫 번째 실험결과 Figure 4-1, 4-2 에서는 pre-amplification에서 E+1와 M+1 (E-C/M-C, E-A/M-C) 프라이머를 사용하였고 selective amplification에서 E+3, M+3을 PCR 증폭시켰을 때 미국, 태국, 고양, 의성마늘 에서는 다형성의 절편들이 존재하지 않았다.

두 번째 실험결과 Figure 4-3 에서는 pre-amplification을 E+2와 M+1 (E-AC/M-C) 프라이머를 사용하고 selective amplification에서 E+4, M+4 혹은 M+3 로 PCR 증폭시켰을 때에 미국 재배종 마늘은 한국의 고양, 의성, 예천 마늘들과는 다른 다형화 밴드가 나타남을 알 수 있었다. 이것으로 보아 미국 (Clossal) 마늘이 한국의 세 지역종 마늘이 구조적으로 다름을 알 수 있었고, 또한 한국의 세 마늘들은 모두 같은 다형화 밴드가 존재함으로 매우 밀접한 유연관계를 나타내고 있다.

세 번째 실험결과 Figure 4-4 에서는 pre-amplification을 E+2와 M+1

(E-AC/M-C) 의 프라이머를 사용하고 selective amplification에서 E+3, M+3로 PCR 증폭시켰을 때 시료의 개수를 더 늘려서 9개의 지역 중 마늘들을 가지고 실험하였다. E-AC A·E-CAA로 증폭된 절편들에서는 미국과 태국 마늘이 구조적으로 가까운 유연관계를 나타내었고 약 100bp 부근에서는 미국마늘과 태국마늘에서 다형성 절편의 유무가 나타나게 되었다. 따라서 이들 관계도 구조적으로 차이가 나타남을 알 수 있었다. 하지만 우리나라 재배종 마늘과 일본의 아오모리 마늘 사이에서의 다형성 절편은 발견되지 않았고, 이로서 유전체 구조가 비슷하다고 판단되었다. Figure 4-5 에서는 pre-amplification을 E+2와 M+1의 프라이머를 사용하였는데 미국마늘의 경우 E-AAG, M-CAGA에서 약 240bp 절편에서, 태국마늘의 경우 650 bp에서 다형성의 존재가 발견되었다.

Table 4-1. Sequences of AFLP primers used in this experiment.

Primers	sequence
EcoRI-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
EcoRI-AC	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'
EcoRI-AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
EcoRI-AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
EcoRI-ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
EcoRI-ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'
EcoRI-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'
EcoRI-GAC	5'-GACTGCGTACCAATTCGAC-3'
EcoRI-TAC	5'-GACTGCGTACCAATTCTAC-3'
EcoRI-GAC	5'-GACTGCGTACCAATTCGAC-3'
EcoRI-ACAT	5'-GACTGCGTACCAATTCACAT-3'
EcoRI-AACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACAT-3'
EcoRI-ACGG	5'-GACTGCGTACCAATTCACGG-3'
MseI-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
MseI-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
MseI-CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
MseI-CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
MseI-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
MseI-CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
MseI-CAGA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAGA-3'

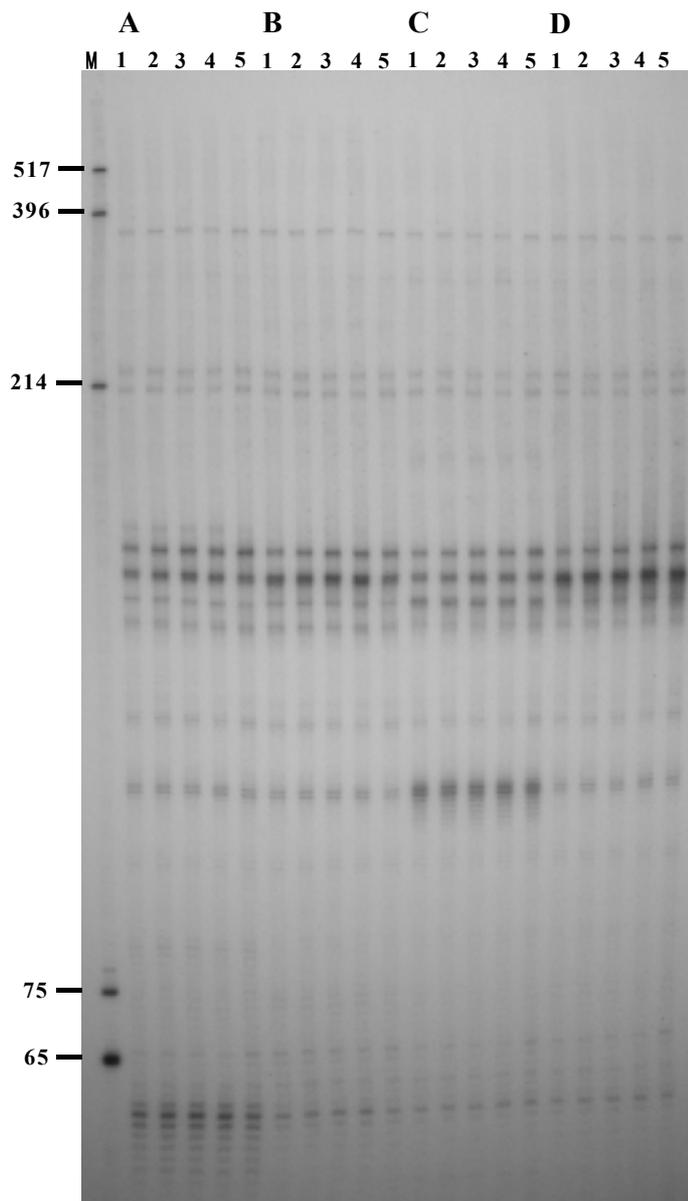


Figure 4-1. AFLP fingerprint generated from genomic DNA of 4 different garlic cultivars by using primer pairs (A) E-GAC · M-CAT, (B) E-GAC · M-CAG, (C) E-GAC · M-CTC, and (D) E-GAC · M-CAGA, respectively. M is the pUC18/*Hinf*I size marker. Each lane represents: 1, Colossal (USA); 2, Lasoon (Thailand); 3, Goyang; 4, Uisung, respectively.

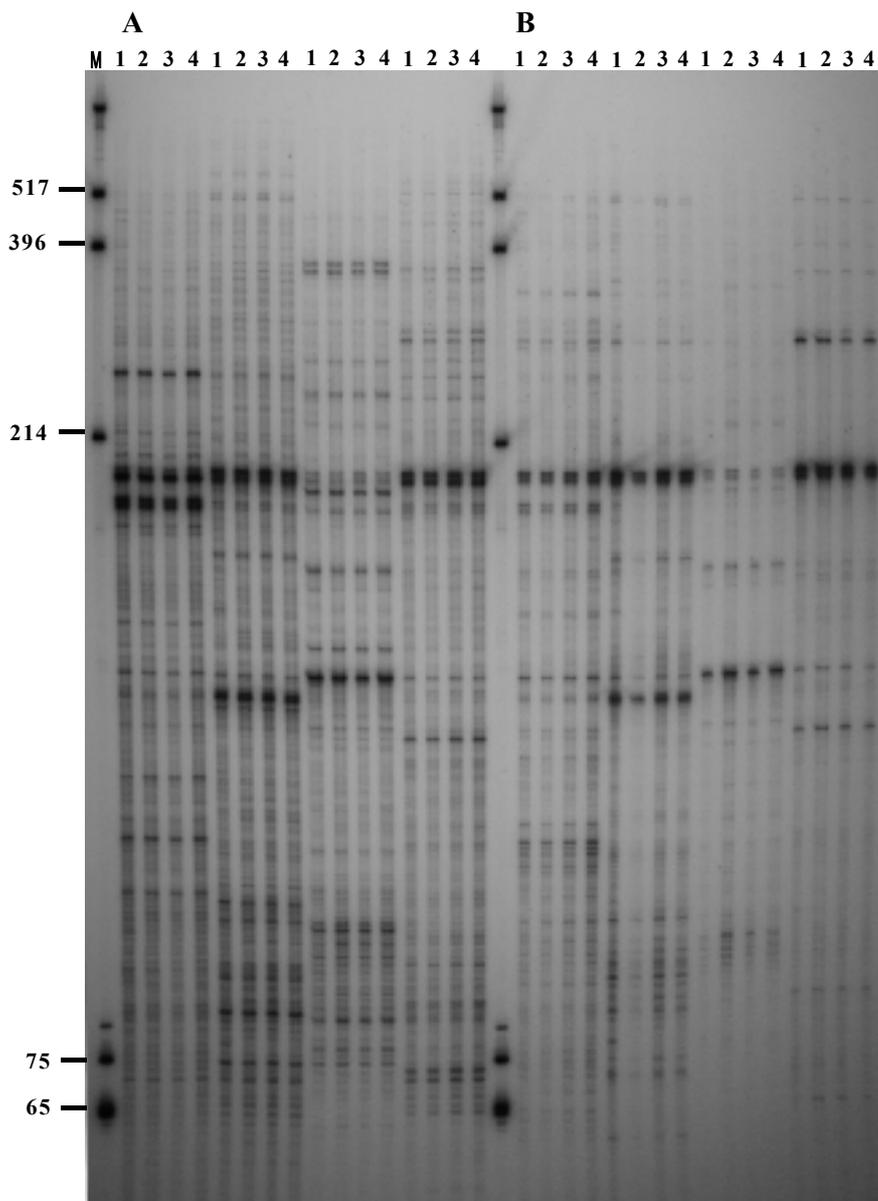


Figure 4-2. AFLP fingerprint generated from genomic DNA of 4 different garlic cultivars by using primer pairs (A) E-ACA · M-CAA, M-CAC, M-CAT, M-CAG and (B) E-ACAT · M-CAA, M-CAC, M-CAT, M-CAG, respectively. M is the pUC18/*Hinf*I size marker. Each lane represents: 1, Colossal (U.S.A); 2, Lasoon (Thailand); 3, Goyang; 4, Uisung, respectively.

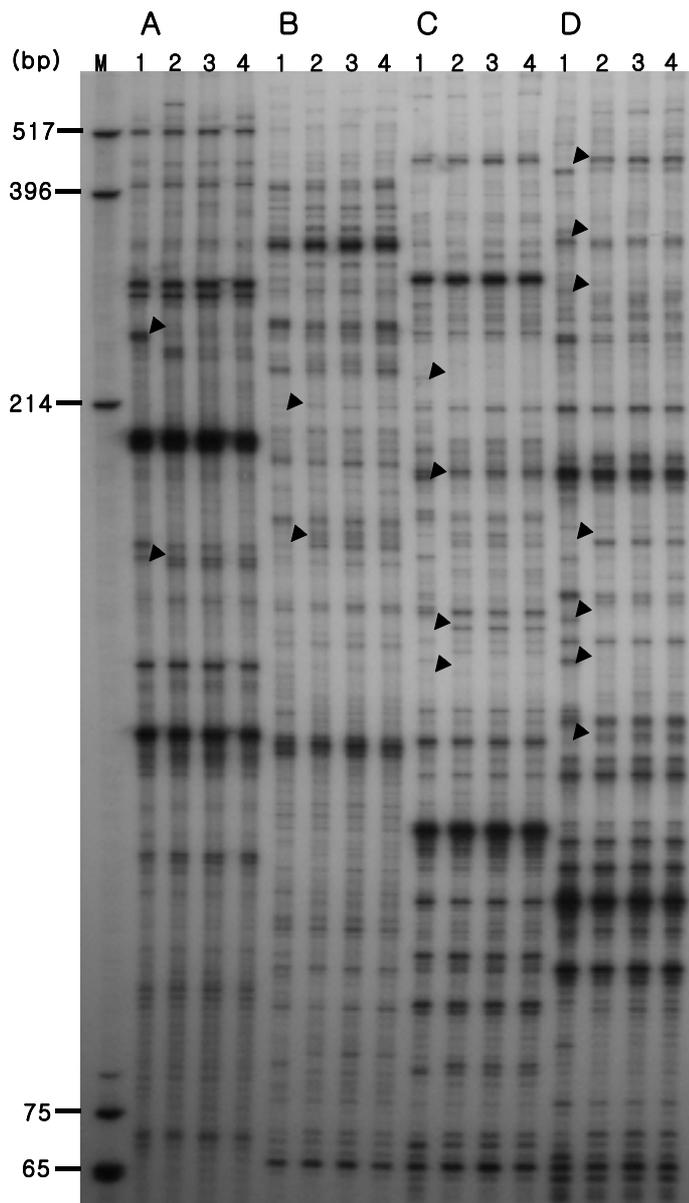


Figure 4-3. AFLP fingerprints generated from genomic DNA of 4 differentt garlic cultivars by using primer pairs (A) E-ACAT · M-CAGA, (B) E-ACAT · M-CAA, (C) E-AACC · M-CAA, and (D) E-AACC · M-CAGA, respectively. M is the pUC18/*Hinf*I size marker. Each lane represents: 1, Colossal (U.S.A); 2, Goyang; 3, Uisung; 4, Yecheon, respectively. Arrows represent polymorphic fragments.

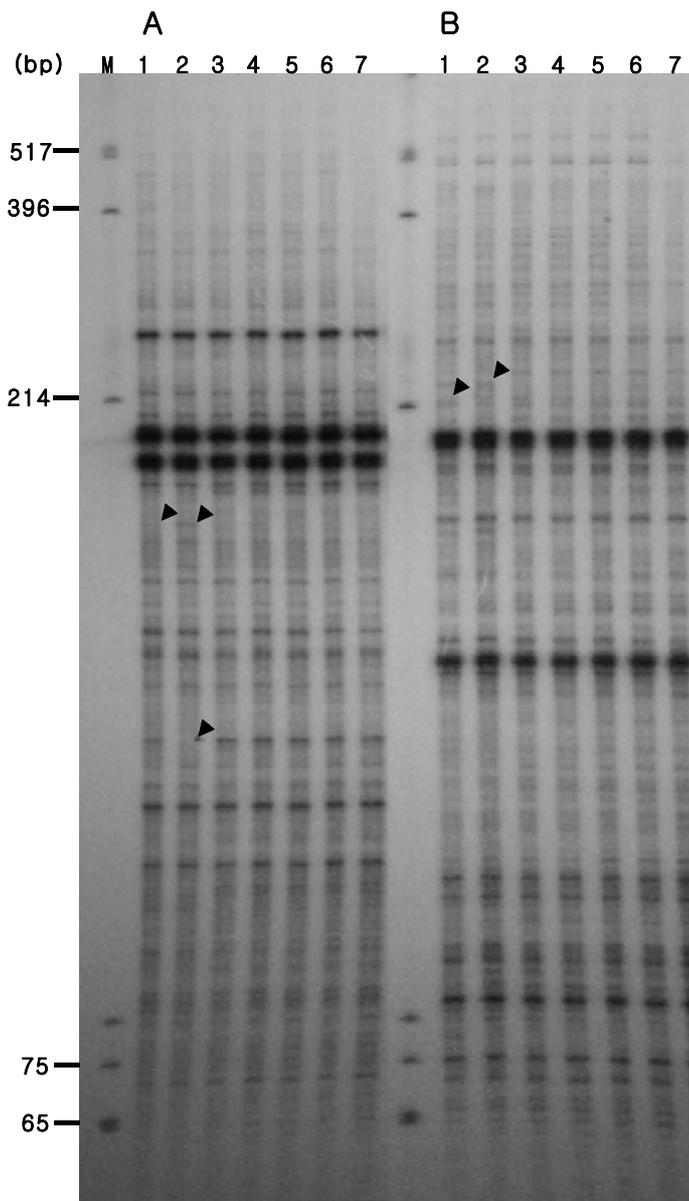


Figure 4-4. AFLP fingerprint generated from genomic DNA of 9 different garlic cultivars by using primer pairs (A) E-ACA · M-CAA, and (B) E-ACA · M-CAC, respectively. M is the pUC18/*Hinf*I size marker. Each lane represents: 1, Colossal (U.S.A); 2, Lasoon (Thailand); 3, Goyang; 4, Uisung; 5, Yecheon; 6, Haman; 7, Hoengsung; 8, Aomori; 9, Yongin, respectively. Arrows represent polymorphic fragments.

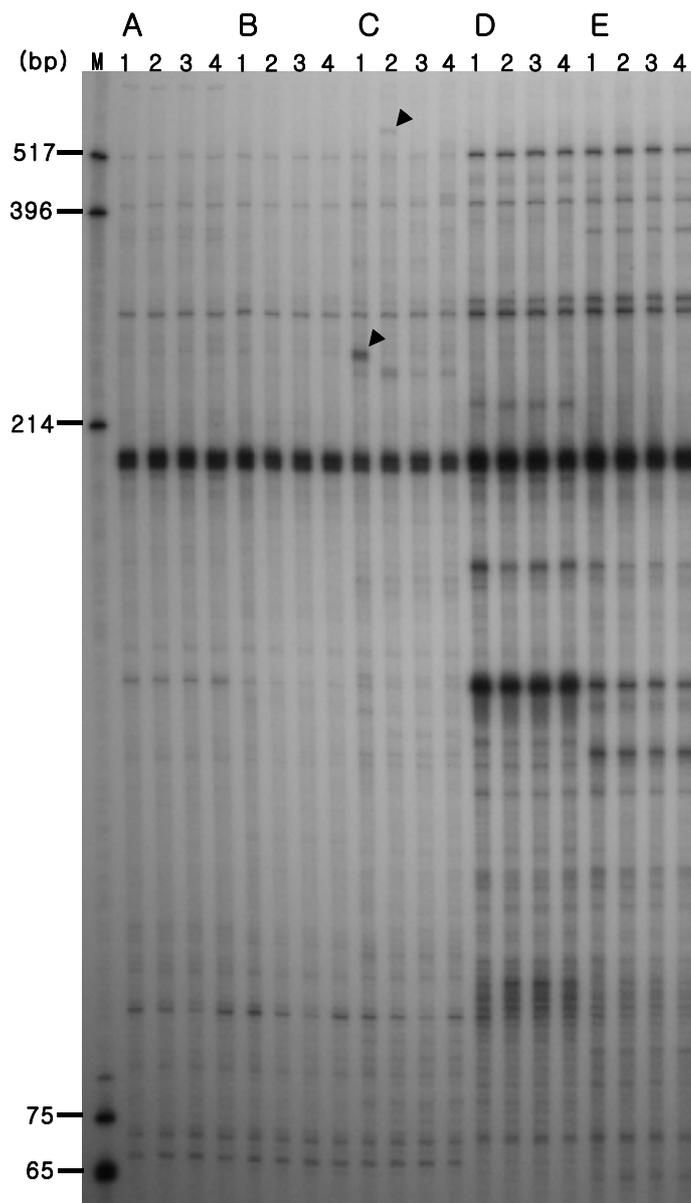


Figure 4-5. AFLP fingerprint generated from genomic DNA of 4 different garlic cultivars by using primer pairs (A) E-AAG · M-CAT, (B) E-AAG · M-CAG, (C) E-AAG · M-CAGA (D) E-ACAT · M-CAT, and (E) E-ACAT · M-CAG, respectively. M is the pUC18/*Hinfl* size marker. Each lane represents: A, Colossal (U.S.A); B, Lasoon (Thailand); C, Goyang; D, Uisung, respectively. Arrow represents polymorphic fragment.

Table 4-2. AFLP primer pairs and polymorphism shown by AFLP analyses

Pre-amplified primers	Selective PCR primers	Remarks
E-G, M-C	E-GAC, M-CAT M-CAG M-CAC M-CAGA	NP** (Figure 4-1)
	M-CACA	NP**(data not show)
E-A, M-C	E-ACA, M-CAA M-CAC M-CAT M-CAG	NP** (Figure 4-2)
	E-ACAT, M-CAA M-CAC M-CAT M-CAG	
E-AC, M-C	E-ACAT, M-CAGA M-CAA	P* (Figure 4-3)
	E-AACC, M-CAA M-CAGA	
	E-ACA, M-CAA M-CAC	P* (Figure 4-4)
	E-AAG, M-CAGA	P* (Figure 4-5)
	E-AAG, M-CAT M-CAG	NP** (Figure 4-5)
	E-ACAT, M-CAT M-CAG	
E-AC, M-G	E-ACA, M-CAC M-CAG	P* (data not show)
E-T, M-C	E-TAC, M-CAG M-CAGA	
E-C, M-C	E-CAC, M-CAG	
	E-CAC, M-CAT M-CAC M-CAA	NP** (data not show)

*P: polymorphic fragments were found

**NP : polymorphic fragment was not found

The bold characters represent 12 primer pairs shown the polymorphic fragments

나. Sequence tagged microsatellite site (SETMS) 분석

마늘에서 microsatellite DNA의 다형성을 분석하기 위해서 사용된 7개의 프라이머 쌍들의 염기서열과 다형성 절편들의 수는 다음과 같다 (Table 4-3). 이 다형성 절편을 조사하기 위해서, PCR 조건은 각각의 AMS 프라이머 쌍들을 가지고 주형 DNA를 30 ng으로 하여 94°C 1분, 60 °C 1분, 72°C 2분으로 40 cycle로 PCR 증폭하였다. Figure 4-6, 4-7에서는 미국(Colossal)과 태국(Lasoon), 그리고 한국 재배종 마늘 5종을 6% polyacrylamide gel에서 전기영동 후 X-ray 필름에 감광시켜 75bp 에서 400 bp 까지 scoring 하였다. AMS04 와 AMS06 프라이머 쌍에서는 대체적으로 적은수의 다형성 절편이 관찰되었고 AMS08, AMS12, AMS22, AMS23, AMS25 프라이머 쌍들에서는 다양하고 많은 수의 다형성 절편이 관찰되었다 (Table 4-3). 대체적으로 미국, 태국 마늘이 한국의 고양, 의성, 예천, 함안, 황성마늘과 구별됨을 알 수 있다.

Table 4-3. Seven primer sequences and number of polymorphic fragments on SETMS experiment

AMS primer pairs	Sequences	Number of polymorphic fragments
AMS04	5'-TATGTTTTTCAGCTGCGATGTGAG-3' 5'-AAATCTAAGCACGGATACCAAGTC-3'	4
AMS06	5'-GGTGCATAGGGTCTCATCTG-3' 5'-ATTGATTGTTTGTGGATGTG-3'	11
AMS08	5'-GCCACGATGTTGAGATTTTCG-3' 5'-CCCGAATATCCCACCAGTTC-3'	21
AMS12	5'-AATGTTGCTTTCTTTAGATGTTG-3' 5'-TGCAAAATTACAAGCAAAGTTC-3'	27
AMS22	5'-CACCGTTTCCATAATCAAGG-3' 5'-ATTTTTTTGGGCATTGTTGG-3'	52
AMS23	5'-GCTGTTCACTGGTCTATCTGG-3' 5'-ATTCGGTGCTGATTTTCG-3'	43
AMS25	5'-GAGGGCAGTGTTAGCATTC-3' 5'-GCAACCTTTCCCGAGAG-3'	26

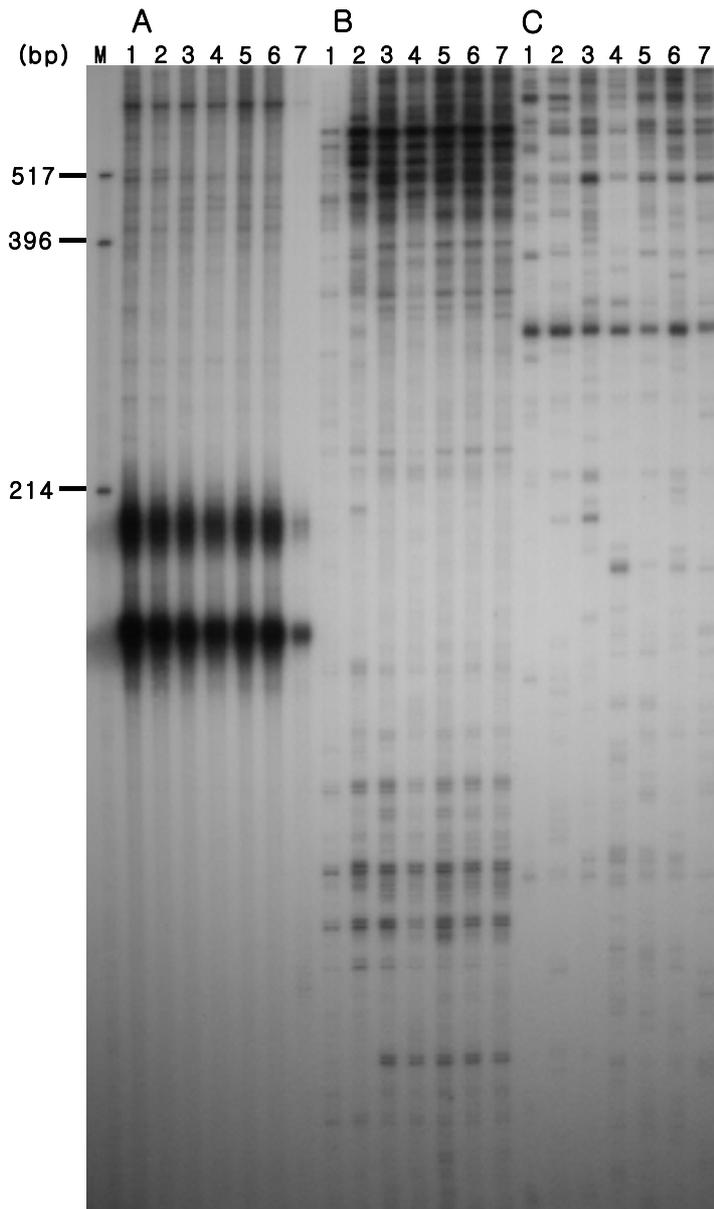


Figure 4-6. DNA fingerprint analysis of genomic DNA used by (A) AMS04, (B) AMS06, and (C) AMS08 primer sets. M is the pUC18/*Hinf*I size marker, Each lane represents: 1, Colossal; 2, Lasoon; 3, Goyang; 4, Uisung; 5, Yecheon; 6, Haman; 7, Hoengsung, respectively.

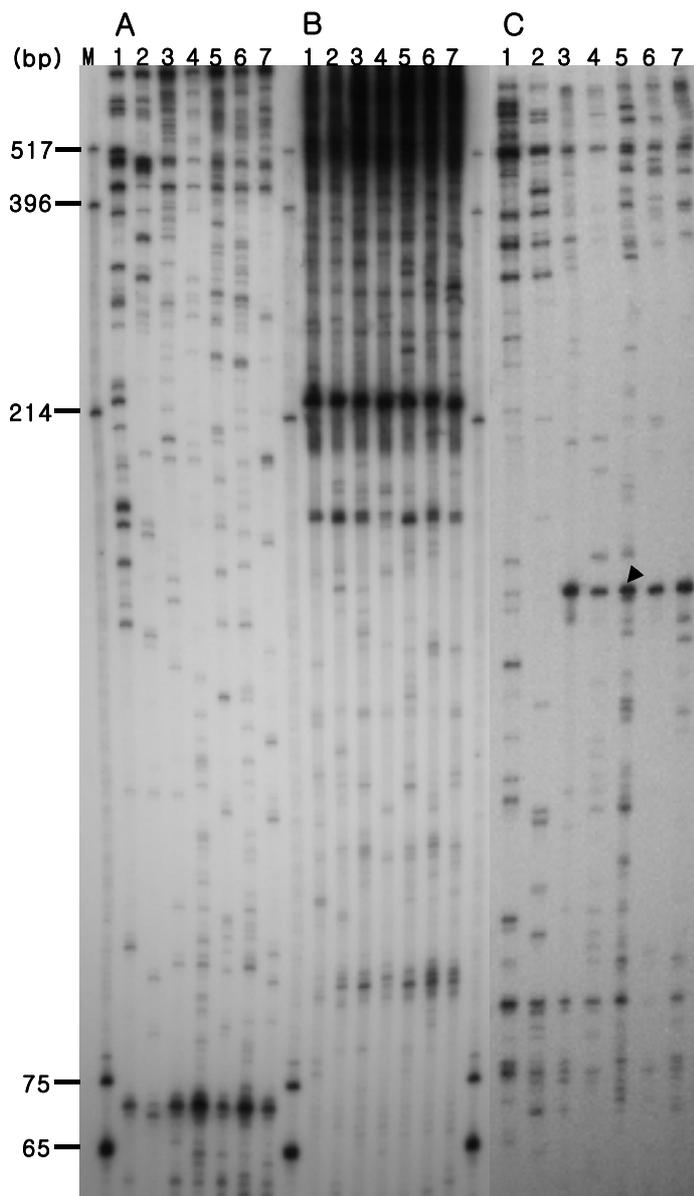


Figure 4-7. DNA fingerprint analysis of genomic DNA used by (A) AMS12, (B) AMS22, and (C) AMS23 primer sets. M is the pUC18/*Hinf*I size marker. Each lane represents: 1, Colossal; 2, Lasoon; 3, Goyang; 4, Uisung; 5, Yecheon; 6, Haman; 7, Hoengsung, respectively.

다. SETMS에 의한 마늘 재배종 간의 유전적 유사도 관계

양과에서 유래한 SETMS(sequenced tagged microsatellit marker site) PCR 실험 방법으로 다양성을 분석한 결과 7쌍의 프라이머에서 다양성이 나타남을 알 수 있었다. 특히, AMS08, AMS12, AMS22, AMS23의 프라이머를 이용한 PCR fragment들은 아주 다양한 패턴을 나타내고 있었다. 그 외 다양성을 나타내는 프라이머는 AMS04, AMS06, AMS25 들이다. 위의 AMS 프라이머들이 나타나는 밴드의 패턴 양상을 scoring 시켜서 그 마늘 사이의 유연관계를 NTSYS-pc program을 통하여 Figure 4-8 ~ Figure 4-13에 나타내었다.

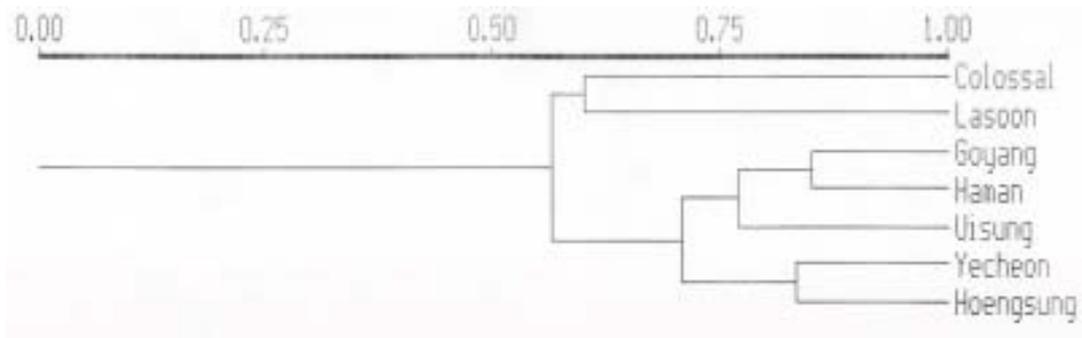


Figure 4-8. UPGMA-based dendrogram generated from AMS08 primer pairs among cultivars, Colossal (U.S.A), Lasoon (Thailand) and local cultivars from Goyang, Uisung, Yecheon, Haman and Hoengsung. The bar indicated similarity coefficient.

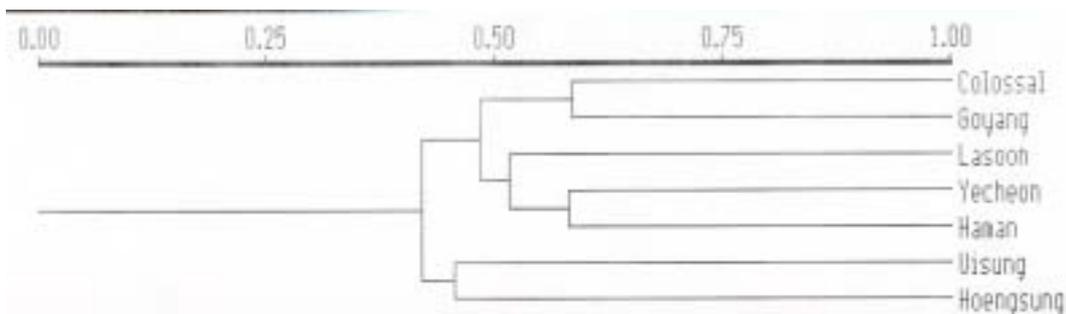


Figure 4-9. UPGMA-based dendrogram generated from AMS12 primer pairs among cultivars, Colossal (U.S.A), Lasoon (Thailand) and local cultivars from Goyang, Uisung, Yecheon, Haman and Hoengsung. The bar indicated similarity coefficient.

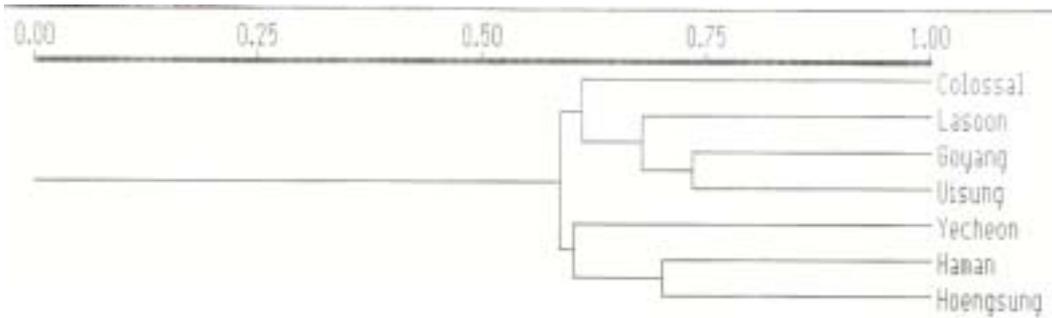


Figure 4-10. UPGMA-based dendrogram generated from AMS22 primer pairs among cultivars, Colossal (U.S.A), Lasoon (Thailand) and local cultivars from Goyang, Uisung, Yecheon, Haman and Hoengsung. The bar indicated similarity coefficient.

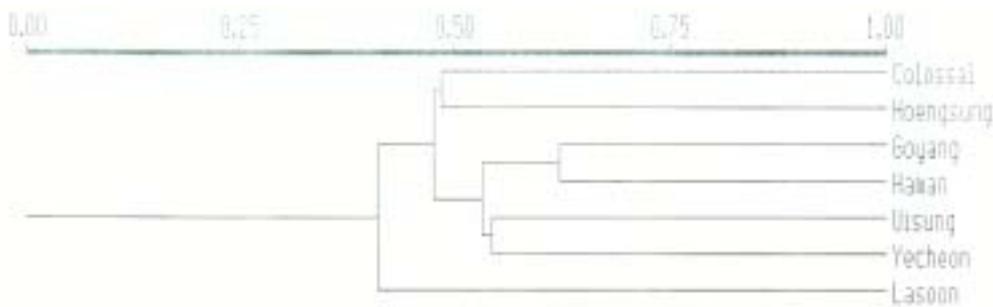


Figure 4-11. UPGMA-based dendrogram generated from AMS23 primer pairs among cultivars, Colossal (U.S.A), Lasoon (Thailand) and local cultivars from Goyang, Uisung, Yecheon, Haman and Hoengsung. The bar indicated similarity coefficient.

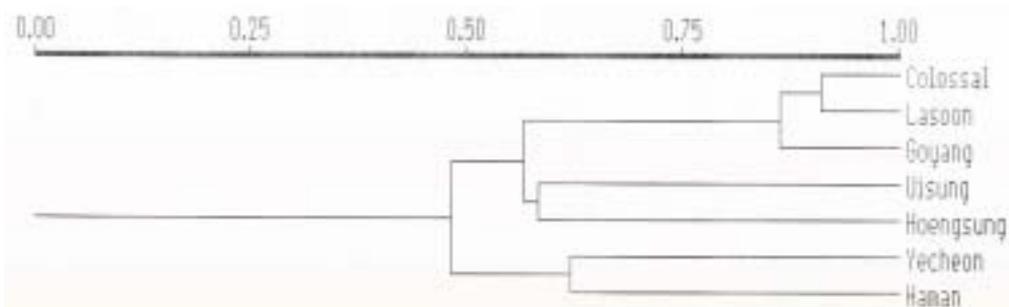


Figure 4-12. UPGMA-based dendrogram generated from AMS25 primer pairs among cultivars, Colossal (U.S.A), Lasoon (Thailand) and local cultivars from Goyang, Uisung, Yecheon, Haman and Hoengsung. The bar indicated similarity coefficient.

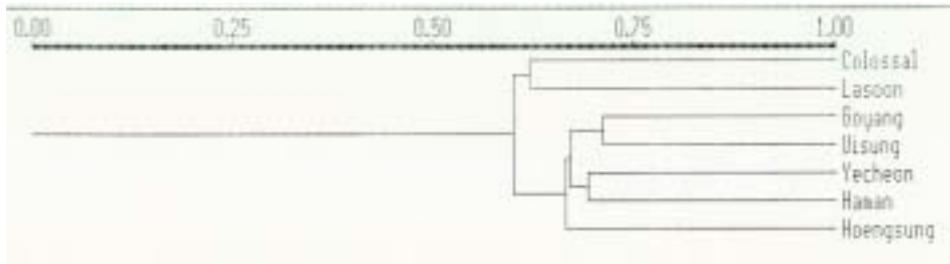


Figure 4-13. UPGMA-based dendrogram generated from total 7 AMS primer pairs among cultivars, Colossal (U.S.A), Lasoon (Thailand) and local cultivars from Goyang, Uisung, Yecheon, Haman and Hoengsung. The bar indicated similarity coefficient.

이 결과를 요약하면 대체적으로 미국(Colossal), 태국(Lasoon) 마늘이 한국의 고양, 의성, 예천, 함안, 횡성마늘과 구별됨을 알 수 있다. 한편 국내 재배종 마늘들의 유전적 유연관계는 미국 및 태국 보다는 서로 가깝지만 여전히 AFLP 형태를 보이고 있어, 구조적으로 구별할 수 있는 가능성을 찾을 수 있었다.

라. 핵 게놈의 변이지역 탐색

마늘 핵 게놈의 변이지역을 탐색하기 위하여 SETMS 프라이머쌍(AMS23 primer pairs, Table 4-3)으로 PCR 증폭된 절편을 분리하였다(Figure 4-7, 예천마늘 145bp-화살표 부분). 이 절편을 염기서열을 결정하였고 (Figure 4-14) 그 염기서열을 바탕으로 IAMS23 프라이머 쌍 (5'-atcttatgtaacgaacta-3', 5'-agtcttcttgagctt-3')으로 하여 inverse PCR을 수행하였으며, 시료는 미국(Clossal), 태국(Lasoon), 단양, 예천 마늘의 핵 게놈을 *HindIII* 제한효소로 절단하였고, PCR 조건은 94°C 1분, 52°C 1분, 72°C 1분, 30번 순환시켰다. 그 결과 예천마늘에서 991bp의 절편을 얻었고, 이 절편들을 분리하여 그 염기서열을 결정하였다 (Figure 4-15).

그 염기서열을 결정한 결과. 그 절편 안에는 1개의 *EcoRI* 제한효소 인식부분이 존재하여 746bp 와 245bp의 2절편으로 나누어짐을 알 수 있었다.

1 ATTCGGTGCT GATTTTCGGA GTCGAAATTC CTAGTTCGTT ACATAAGATT TCTTTTATTT
 61 CAAAAGGTTT TAAAAGTTAA AAAATTA AAAA TTCATTGTGA ATTGAGTCTT CTTGAGCTTG
 121 TTTTCCAGAT AGACCAGTGA ACAGC

Figure 4-14. Nucleotide sequence of an amplified PCR fragment used by AMS23 primer pairs. The gray boxes represent AMS23 primer pairs and underlines indicate IAMS23 primer pairs.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
5' AGTCTTCTTGAGCTTGTTGCTGCAGATCTATGGGGTCTGCTTCAACAAATTCTGACTATGGATTCAACTACTACATTTT
      90     100     110     120     130     140     150     160
TTTTGTTGATTCTATTCTAGATATACATGGATATGTTTTTAAAGTCAAATCAGAACTAGCAAAGTTGTTATTCATT
      170     180     190     200     210     220     230     240
TCATTAATCAATCTGAAAAACAGACAGGTGAGAACTTAAAGATTTTGCAGACTGATGGAGGTACAGAATTTAAACCGTTA
      250     260     270     280     290     300     310     320
AATGAAATTCTTTCAAAGAAAGGTATAATTCATAGATTAAGTTGCCATACACTTCTGAGCAAATGGTTTAGTTGAAAG
      330     340     350     360     370     380     390     400
AAAACACAGACATATTGTGGAGTGTGGTCTCACTTTATTAGCTCAAAGTAATTTAACTATGAAGTTCTGGCCTGATGCTT
      410     420     430     440     450     460     470     480
TTAATACTTCTGTATATTTAATAAATACTGCCTACTAAAACCTCTGAATAACAAATCTCCTCTAGAACTTTGTATAAT
      490     500     510     520     530     540     550     560
ATCAAACCTGATTATGATAGACTCAGAGTTTTTGGCTGTTTATGCTATCCATATCTAAGGCCATATAATACTCATAAGTT
      570     580     590     600     610     620     630     640
AAATTTTAGATCCTCAGCGTGTACCTTTATAGGGTATACCAAGTATCAGAAAGGGTATAAATGTCTTGATGACAAAGGTA
      650     660     670     680     690     700     710     720
AGGTCTACATTAGCAGACATGCTGTATTTAATGAAAAGGTATTTCTTTCAACAGTAAAGATATCGCTACTACACAAAAA
      730     740     750     760     770     78     790     800
ATATACAATCCAATGAAACCAATACCAGGAATACCTTTATACTCTGACAGTTTTATCAAAGATACAGTTGATGGTAGCTC
      810     820     830     840     850     860     870     880
AGGATCATCTCAACAGCCTGCATCACCATCAAGCAGTGAGTCACCTGAGCCTTCCAATCAGCCAAGTATCAGTCAACAAC
      890     900     910     920     930     940     950     960
ATGAACATCTGCAGCATGACTCAAGTTCATAAGTTAGAAGTAACCAATCAAACACTAGAAATGATAATATTGAAATTCAT
      970     980     990
GAACAGCAGAGTGAACAAGCTCAAGAAGACT 3'

```

Figure 4-15. DNA sequencing analysis of PCR amplification of *EcoRI* digested genomic DNA. The under line represents *EcoRI* restriction enzyme site.

따라서 예천 마늘의 746 bp의 절편을 가지고 탐침으로 하여 inverse PCR 증폭된 절편을 아가로스 젤에 전기영동 후 Southern Blot을 실시하였다. 그 결과 미국(Clossal), 태국(Lasoon), 단양, 예천, 홍천 마늘에서 모두 991bp에서 혼성화 반응이 일어남을 알 수 있었다. 이로써 이들 마늘 사이에서 변이지역의 변이는 차이가 없음을 알 수 있었다.

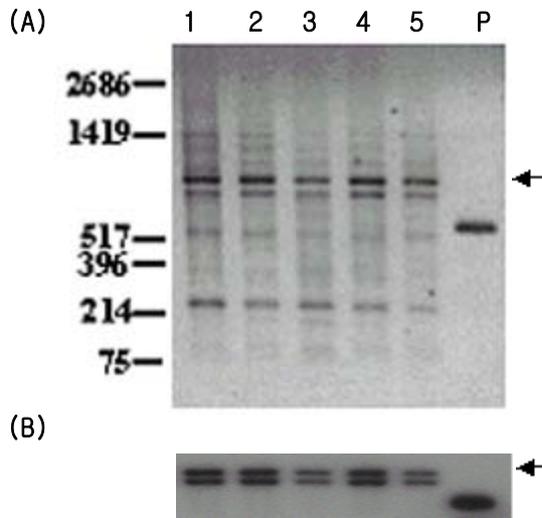


Figure 4-16. PCR amplification of *Hind*III digested garlic genomic DNA with AMS23 primer pairs. Panel (A) and panel (B) indicate inverse PCR product in agarose gel and Southern blot analysis, respectively. Each lane represents (1) Clossal, (2) Lasoon, (3) Danyang, (4) Yecheon, (5) Hongcheon, and (P) probe control (771bp). Arrows represent 991bp.

마. 논의

마늘 핵 계놈의 변이지역 구조분석을 통해 지역중간의 변이를 나타내는 마커를 찾으려고 AFLP와 SETMS PCR 실험을 시도하였다. 이들 AFLP와 SETMS PCR 방법을 위해 은 Ultracentrifuge-CsCl gradient 방법을 통하여 핵 계놈을 분리, 정제하여 순도 높은 DNA를 분리하였다. AFLP 실험에서는 미국, 태국, 고양, 의성, 예천, 함안, 횡성 마늘을 가지고 총 32개의 프라이머 조합을 통하여 그 다형성이 나타나는 변이를 조사하였다.

그중 12개의 프라이머 조합에서는 미국과 태국 그리고 한국의 마늘에서 다형성 절편을 가지는 절편들을 확인하였다. 또한 SETMS PCR 실험에서도 양과의 유연관계 분석에 사용된 microsatellite DNA를 고안된 프라이머 쌍들을 이용하여 PCR 증폭하였다. 그 중에서 8개의 프라이머(AMS primer set) 쌍에서 아주 다양한 밴드 패턴을 보이고 있었다. 따라서 이들 SETMS PCR 프라이머에 증폭된 절편들을 분석하여 NTSYS-pc program을 통하여 그 유연관계를 조사하였다. 그 유연관계를 프라이머 쌍별로 분석하고 그를 종합하여 scoring된 data를 분석해 보면 similarity coefficient(F)≥0.61일때 미국산 마늘과 태국산 그리고 한국산(고양, 의성, 예천, 함안, 황성 마늘)으로서 크게 3가지로 분류 되었다. 따라서 이들 프라이머 쌍으로 마늘 지역종 간의 차이를 나타내는 마커로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

다음으로 마늘 핵계놈의 변이지역을 inverse PCR과 Souther blot을 실시한 결과, 미국(Clossal), 태국(Lasoon), 단양, 예천, 홍천마늘에서 변이지역에서의 다형성 절편을 발견할 수 없었다.

5. 배추 핵 계놈의 핵산 다형화 현상연구

가. 배추 핵 계놈 microsatellite DNA 분리

1) microsatellite loci의 선별

배추(*B. campestris subsp. pekinensis*) genomic DNA의 microsatellite DNA 연구를 통하여 핵산 다형화 현상을 규명하고 다형화 부위를 분리 이용하여 핵산 지문법으로 신속하고 정확한 품종 감별법을 개발하고자 하였다. 이는 궁극적으로 DNA chip을 이용하여 다른 작물에도 적용할 수 있는 기본 기술을 개발하고자 한다. 애기 장대에서 보고된 microsatellite sequence들 중에서 다양성과 보존성, 그리고 탐침으로서의 가능성을 기초로 하여 가장 적절하다고 사료되는 2개의 microsatellite 좌위를 선별하였다. 이 중에서 nga139 microsatellite 좌위는 AG/CT의 반복 모티프를 가지며, nga 172는 GA/TC의 반복 모티프를 가진다. 증폭산물의 예상 크기는 nga139가 182bp로 이중 반복서열은 (AG/CT)₃₃이고, nga172의 경우 166bp로 반복 서열은 (GA/TC)₂₇이다.

이들을 적절한 primer로 design하여 PCR 기법을 이용해 애기 장대의 genomic DNA로부터 증폭해 내었다. 이 증폭된 DNA 절편을 pGEM3Zf(+) vector에 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5a에 형질전환 시켰다. 형질전환된 *E. coli*로부터 추출한 DNA 절편을 탐침으로 사용하여 Lamda-DASHII를 이용하여 제조된 배추의 유전자은행으로부터 plaque hybridization을 통한 선별을 통해 AG/CT 또는 GA/TC motif 의 반복서열이 존재할 것이라고 생각되는 13개의 genomic clone을 확보하였다. 그리고 cloning 된 phage DNA에 microsatellite 지역이 포함되어 있는지를 확인하기 위해 nga139 microsatellite locus를 탐침으로 삼아 DNA gel blot analysis를 수행하였다(Figure 5-1).

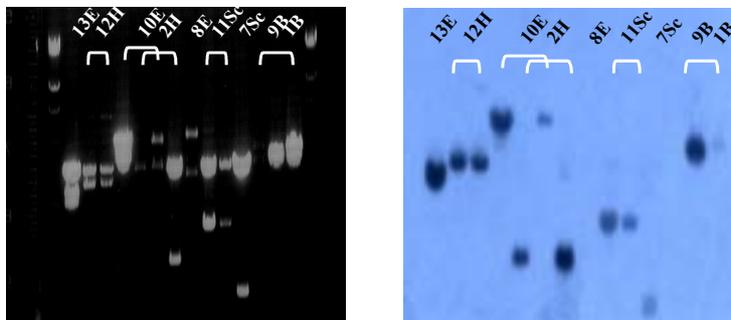


Figure 5-1. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was expected to be cloned microsatellite region of (AG/CT) or (GA/TC) motif in the genome of *B. campestris*.

2) 제한효소지도 작성과 sub-cloning

클로닝된 microsatellite 지역을 포함할 것으로 기대되는 총 9개의 제한효소지도를 작성하기 위해 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sph*I 및 *Xba*I으로 절단한 다음 0.8% agarose gel 상에서 전기영동 함으로써 제한효소 자리의 존재를 확인하였다. 그리고 삽입 절편 내에 절단 자리가 확인된 효소들만을 이용하여 DNA gel blot analysis 반응을 수행하였다 (Figure 5-2).

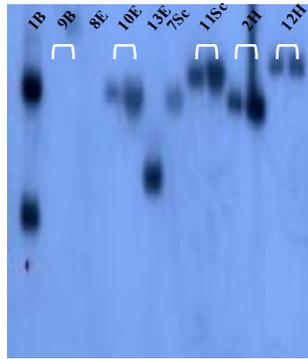
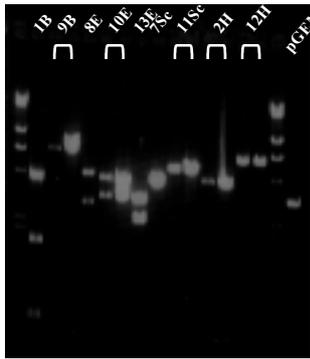


Figure 5-2. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *EcoRI* with nga139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

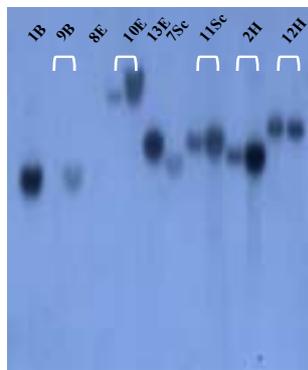
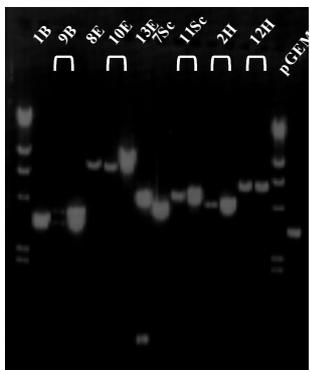


Figure 5-3. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *BamHI* with nga139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

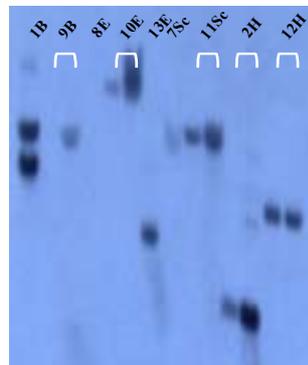
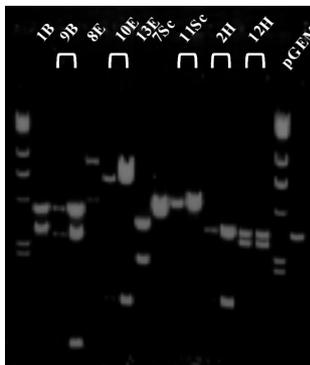


Figure 5-4. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *HindIII* with nga139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

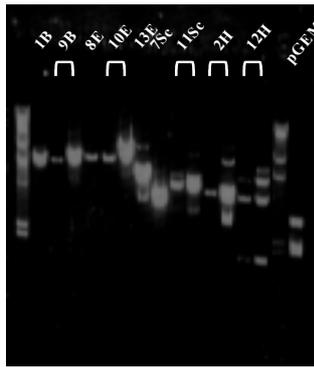


Figure 5-5. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *KpnI* with nga139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

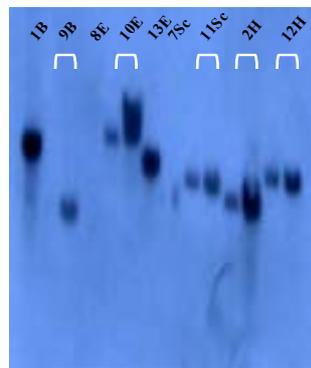
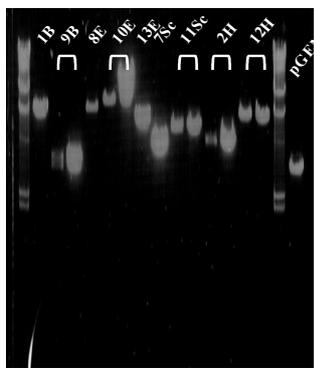


Figure 5-6. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *PstI* with nga139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

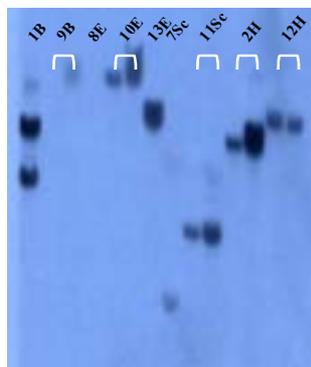
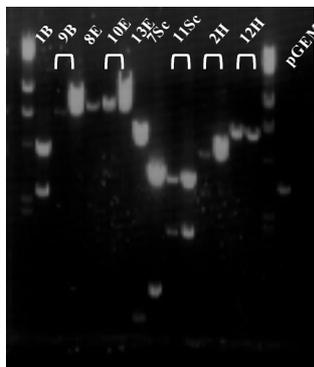


Figure 5-7. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *SacI* with nga139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

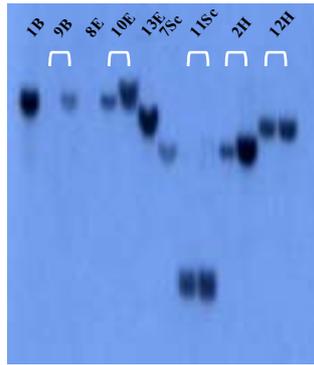
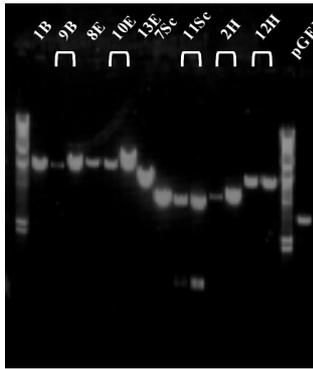


Figure 5-8. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *Sa*I with *nga*139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

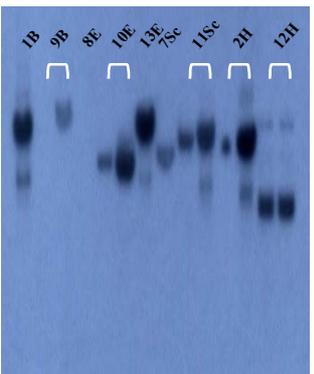
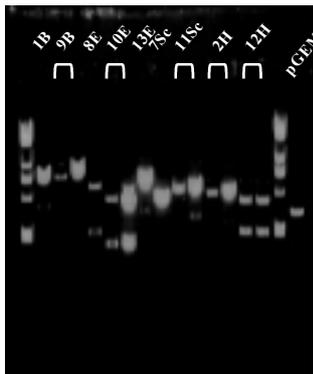


Figure 5-9. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *Sph*I with *nga*139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

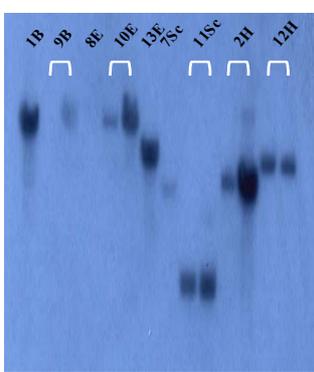
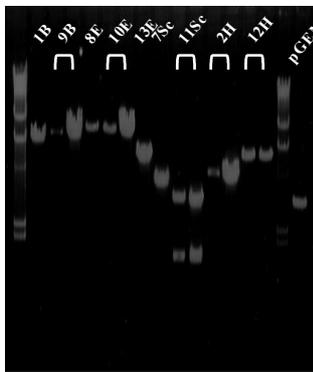


Figure 5-10. DNA gel blot analysis of plasmid DNA that was digested with *Xba*I with *nga*139 probe. pGEM 3Zf(+) vector was used as a negative control.

이를 종합하면 1B 클론의 경우는 하나씩의 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, 및 *Sac*I, 2H의 경우 하나씩의 *Eco*RI, *Hind*III, 7Sc의 경우 하나씩의 *Sac*I, 9B의 경우 하나씩의

*Bam*HI, *Pst*I, 과 두 개의 *Hind*III, 10E 의 경우 하나씩의 *Eco*RI, *Hind*III, *Sph*I, 11Sc의 경우 하나씩의 *Sac*I, *Sal*I 및 *Xba*I, 12H의 경우 하나씩의 *Eco*RI, *Hind*III, 그리고 13E의 경우 하나씩의 *Bam*HI, *Eco*RI, *Sac*I 과 두 개의 *Hind*III가 존재함을 알 수 있었다. 이 과정에서 8E와 9B에서는 매우 약한 signal 또는 signal이 나오지 않아 이 클론에는 microsatellite region이 존재하지 않음을 알 수 있었다.

또한 각 클론에서 제한 효소에 의해 나누어진 절편사이에서 DNA gel blot analysis를 수행하여 얻은 결과를 종합하여 어느 절편에 microsatellite 지역을 포함하는 지 알 수 있었다. Hybridization 결과 1B는 *Bam*HI 과 *Eco*RI 사이의 1.8kb 절편과 *Eco*RI

Table 5-1. The size of fragments cut with various restriction enzymes. Bold italic figures mean the sizes of DNA fragments which show positive signals by DNA gel blot analysis with nga139 microsatellite probe. (unit : kbp)

	1Bam	9Bam	10Eco	13Eco	7Sac	11Sac	2Hind	12Hind
SphI	no cut	no cut	5.9 1.9	no cut	no cut	no cut	no cut	4.0 2.0
KpnI	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut	4.2 1.8
SalI	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut	4.0 1.1	no cut	no cut
XbaI	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut	3.3 1.8	no cut	no cut
PstI	no cut	3.7 3.4	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut	no cut
HindIII	3.9 2.8	4.1 3.0	6.6 1.2	3.4 2.0 0.3	no cut	no cut	3.2 1.2	3.2 2.8
SacI	4.0 2.7	no cut	no cut	5.0 0.7	3.2 1.0	3.2 1.9	no cut	no cut
BamHI	3.5 3.2	3.9 3.2	no cut	4.7 1.0	no cut	no cut	no cut	no cut
EcoRI	4.3 1.8 0.6	no cut	4.6 3.2	3.2 2.5	no cut	no cut	4.0 0.4	no cut

과 *Hind*III의 1.1kb절편에서, 2H는 *Eco*RI과 *Hind*III의 0.8kb절편에서, 7Sc는 *Sac*I들 사이의 1.0kb절편에서, 9B는 *Pst*I 과 *Hind*III의 0.7kb절편에서, 10E는 *Eco*RI과 *Sph*I의 2.7kb

절편에서, 11Sc는 *SaI* 과 *SacI*의 1.1kb 절편에서, 12H는 *HindIII* 와 *KpnI*의 1.8kb 절편에서, 그리고 13E는 *HindIII* 와 *BamHI*의 1.1kb 절편에서 positive signal을 확인할 수 있었다. 이를 통해 microsatellite 지역은 이 부분에 존재할 것으로 예상할 수 있었다. 이를 통해 각각의 절편들에서 제한 효소에 의해 잘려진 길이와 DNA gel blot analysis의 결과는 다음과 같다 (Table 5-1).

그리고 이 결과를 통하여 배추에 존재하는 microsatellite 지역의 sequence를 직접 확인하기 위해 pGEM3Zf(+)의 multi-cloning site에 존재하는 여러 가지 제한효소와 microsatellite 지역 내에 존재하는 여러 제한효소들을 이용하여 sub-cloning을 수행하였다 (Figure 5-11~17). 클로닝 여부는 plasmid DNA에 nga139를 probe로 삼아 DNA gel blot 분석으로 판단하였다. 이렇게 sub-cloning으로 염기서열 분석을 할 수 있는 적절한 길이로 수정된 DNA fragment들은 각각 1BH, 1BSc, 2HE, 3H, 4Xb, 6Sc, 7Sc, 10ESph, 11Sc, 12HK, 그리고 13EB라 명명하였다.(Figure 5-11~17).

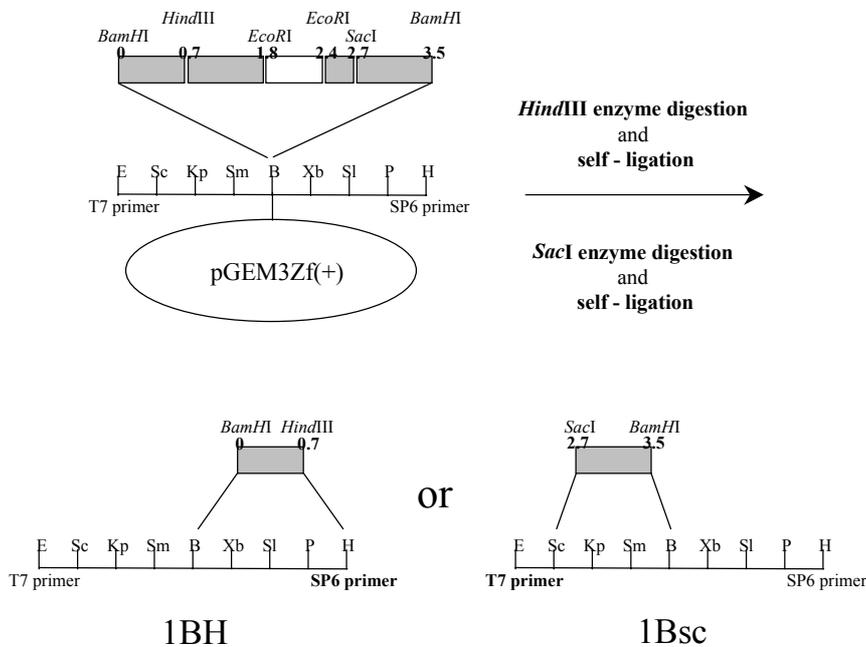


Figure 5-11. The restriction map of 1Bam-DNA fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exist and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is in kbp.

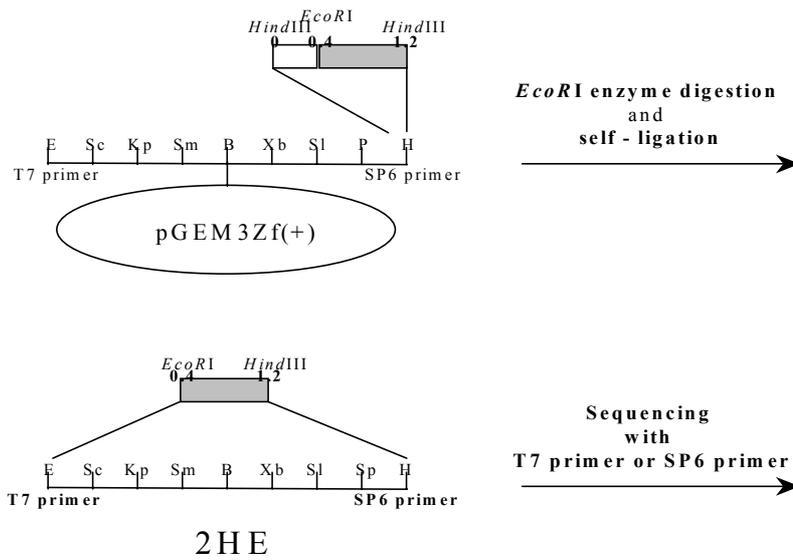


Figure 5-12. The restriction map of 2 HindIII fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exist and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is in kbp.

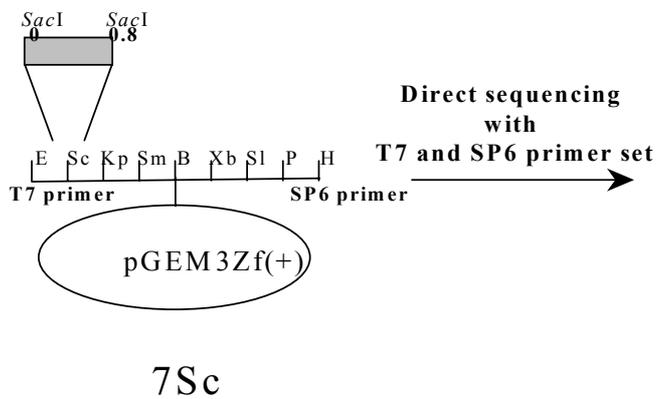


Figure 5-13. The restriction map of 7Sac-DNA fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exist and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is kbp.

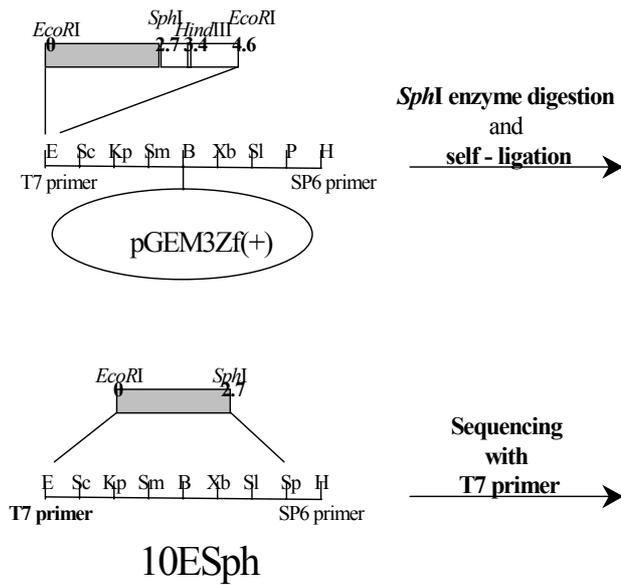


Figure 5-14. The restriction map of 10Eco-DNA fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exist and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is in kbp.

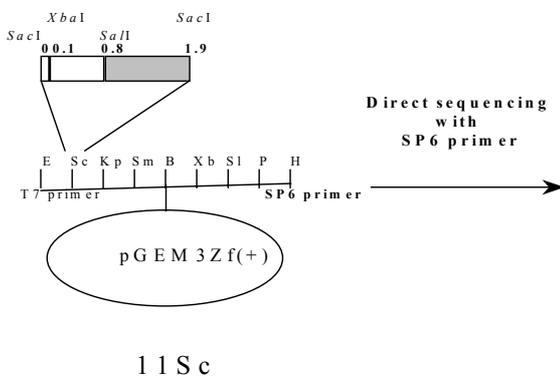


Figure 5-15. The restriction map of 11Sac-DNA fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exist and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is in kbp.

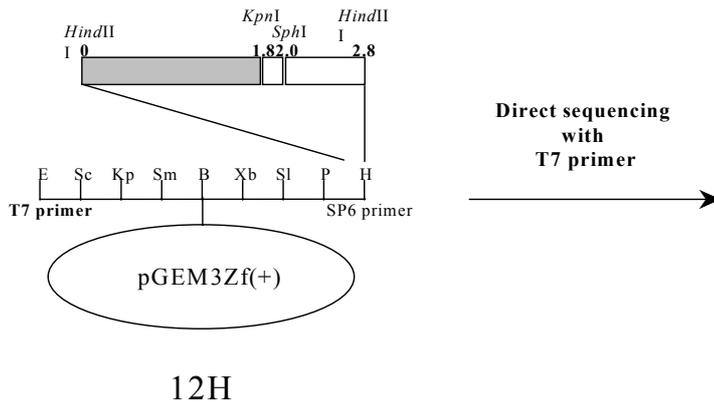


Figure 5-16. The restriction map of 12Hind-DNA fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exist and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is in kbp.

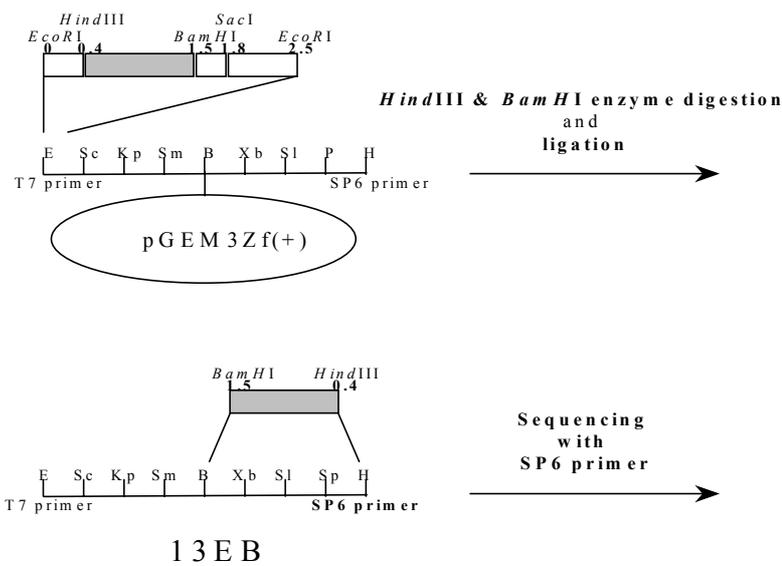


Figure 5-17. The restriction map of 13Eco-DNA fragment and strategy for sequencing. The gray box means expected region in which microsatellite exists and bold letter of primer is used for sequencing. The scale of DNA size is in kbp.

SSR은 집단유전학의 연구 등에 널리 이용되고 있다 (Bruford and Wayne, 1993). 이러한 microsatellite 지역의 특적인 주변지역의 보존된 고유한 염기서열을 이용하여 microsatellite 지역 증폭을 위한 primer를 설계하였다(Table 5-2). 이 primer 들의 위치는 밑줄을 그어 그 위치를 표시하였다(Figure 5-18).

Table 5-2. The primer sequences for amplifying microsatellite regions of *B. campestris* subsp. *pekinensis*.

I.D. (repeat #)	sequences	Tm (. C)	GC %	Product size(bp)
1BH (28)	<u>CGAGTCTCAGGCAGGGTAAC</u>	59.87	60	128
	<u>TTCACTGGACTGCTGTTTGC</u>	60.03	50	
1BSc (47)	<u>GGAAGCAGCGTCCAAGTAAG</u>	60.02	55	178
	<u>GAGCCATCCCTAGCAAACAA</u>	60.21	50	
3H (?)	<u>CACGAAGGTCAACAGTTCCA</u>	59.72	50	?
	<u>GTGCCGACTCTCTTCACACA</u>	60.03	55	
4Xb (?)	<u>AAGGAAACAAGAGAGCTGCG</u>	59.76	50	?
	<u>TAGGAAACCCTAGCCGTCAA</u>	59.70	50	
2HE (41)	<u>TCGTTACCAGATTGGCTATGC</u>	60.0	47.6	128
	<u>CAGTGGATTTTTGTGTTTGGC</u>	60.39	42.8	
7Sc (13)	<u>GCGGTACGAGCTCTTCATCT</u>	59.6	55	120
	<u>CTCCACCCACCTGCTCATA</u>	59.64	57.8	
10E (20)	<u>TCAGATCCGAGACTCAGAACAA</u>	59.99	45	124
	<u>ACGGCCATAAACGGAATACA</u>	60.21	45	
11Sc (8)	<u>GTTTGTCTTGGGGCTTGGTA</u>	59.97	50	181
	<u>AGCCATTAAGTCGTGTTCCA</u>	59.61	52.38	
12HK (23)	<u>TCCTCCAGCTTCCTTTACCA</u>	59.81	50	166
	<u>TAACAACAACCGTCACGCTC</u>	59.76	50	
13EB (24)	<u>CATAAGCTTCATTGCCACAAA</u>	58.83	38.10	135
	<u>AGTAGCAGCAGCAACAACCC</u>	60.46	55	

이와 같이 배추의 게놈으로부터 microsatellite 지역 증폭을 위한 PCR 용 prime들을 설계하였으며, 이는 Sigma Gynosis 와 GENESET에 의뢰하여 합성하였다.

나. 순종 배추를 대상으로 PCR 수행

1) 배추의 genomic DNA 분리

이 실험의 목적인 배추의 F₁ 잡종의 순도검정 및 감별법 구축과 유사종간의 유연관계분석에 부합할 수 있게 다양한 종류의 배추의 게놈 DNA를 확보하고, 또한 이들의 부.모계의 게놈DNA 또한 확보하여야 한다. 이를 위해 홍농종묘와 서울종묘에 의뢰하여 각각 8종과 5종의 부.모계의 잎조직을 확보하였고, 또한 서울, 불암3호(홍농), 장원, 원우1호(서울)농우1호(농우), 삼선60일, 여름신관, 신선숙음, 새신관3호, 뿌리배추(동원), 명성봄(경신), 고농3호(고농), 팔방(제일)등의 시중에 유통되는 F1 hybrid 배추종자를 구입하여 잎 조직으로부터 게놈 DNA를 분리하였다.

2) 순종 배추를 대상으로 SSR 분석 수행

배추의 게놈DNA를 주형으로 삼아 PCR을 수행하였으며, PCR 산물에 대한 분석은 non-isotopic method를 개발하기 위하여 BMA사에서 생산되는 Meta-phore agarose를 사용하였다. 하지만 이 제품의 경우 비용이 많이 들기 때문에 가능하면 일반적으로 사용되는 agarose를 4%로 만들어 분석하였다. 먼저 설계된 primer 들을 사용해 13종의 시중에서 구입한 배추의 게놈DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다(Figure 5-19~5-24).

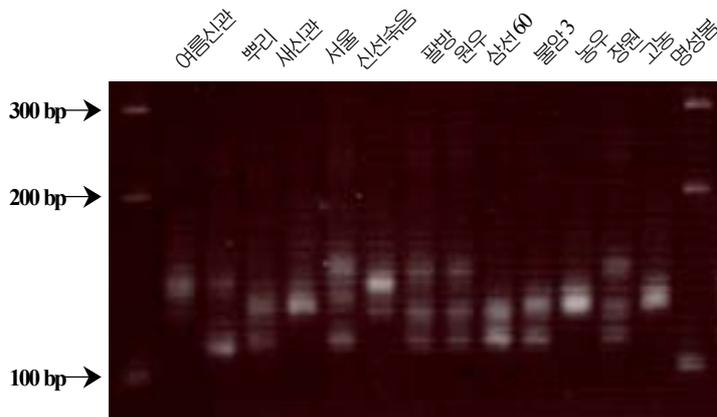


Figure 5-19. The PCR product using 1BH primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

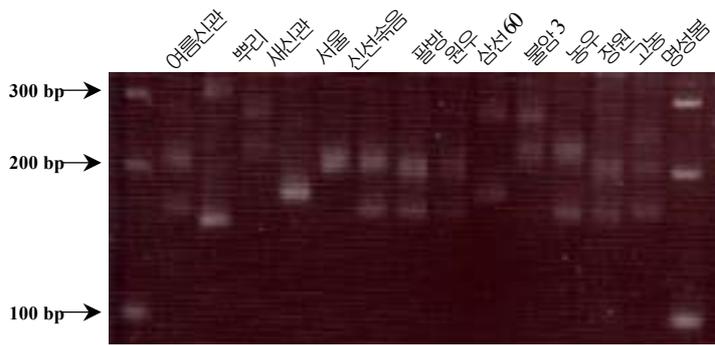


Figure 5-20. The PCR product using 1BSc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

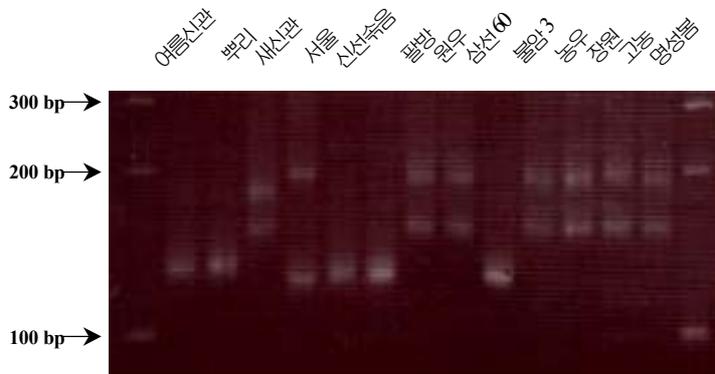


Figure 5-21. The PCR product using 2HE primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

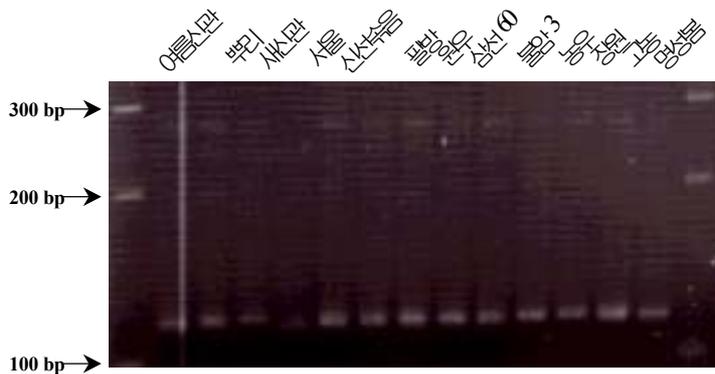


Figure 5-22. The PCR product using 7Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

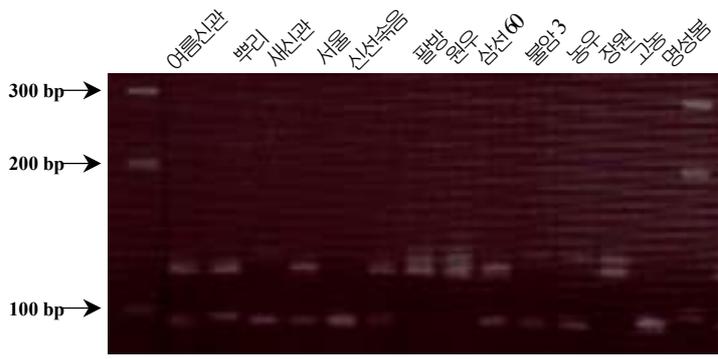


Figure 5-23. The PCR product using 10E primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.



Figure 5-24. The PCR product using 13EB primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

PCR 산물의 크기가 모두 300bp 보다 작기 때문에 일반적인 agarose gel을 사용해서는 그 차이를 볼 수가 없어 다형화 현상에 대한 분석이 불가능하다. 이를 극복하기 위해 보통 이전에 수행되었던 연구들에서는 polyacrylamide gel을 사용하였다. 그러나 이 방법은 방사성 동위 원소를 사용하여 PCR primer의 끝에 표지를 하여야 하는 단점이 있다. 그래서 이번 연구에서는 polyacrylamide gel을 대체할 만큼 작은 size의 DNA절편도 분석할 수 있는 high resolution gel 인 BMA사에서 생산되는 Meta-phore agarose를 사용하였다. microsatellite 지역의 다양성은 고유한 주변지역 내의 repeat motif 수에 의한 길이의 다양성과 그리고 핵 내에서 존재하는 서로 다른 길이의 microsatellite 지역의 수로부터 기인한다. 그 결과 핵 계통에 존재하는 microsatellite 지역에서의 다양한 다형성을 볼 수 있었다. 또한 primer가 장원으로 만든 genomic library에서 설계되었으므로 장원을 주형으로

한 PCR 산물은 염기서열 결정 결과 예상되는 길이를 기대하였다. PCR 산물의 길이는 정확히 일치하였으며, PCR 산물이 microsatellite 지역을 포함하고 있다고 사료되었다. 또한 7Sc의 경우는 증폭된 PCR 산물의 길이가 모두 같은 것으로 미루어보아 이와 같은 형태의 microsatellite 지역은 오직 한 종류만이 존재함을 알 수 있었고, 또한 매우 보존적인 부분에 속해 있음을 알 수 있었다. 즉, 배추를 대상으로 한 SSR 분석 결과 모든 F1에서 둘 이상의 PCR산물을 얻을 수 있었고 각각의 PCR산물은 부계와 모계의 차이로부터 기인한다고 가정할 수 있었다. 이에 SSR분석이 이번 연구주체의 궁극적인 목적인 haploid감별 및 유연관계분석에 의미 있는 실험방법임을 확인할 수 있었다. 그러나 이 연구를 통해 기대되었던 각 배추의 표현형과 그리고 SSR band pattern과의 연관 관계는 찾기가 어렵다고 결론을 내릴 수 있었다.

3) 변이지역 구조 규명 및 마커 선발

배추를 포함한 채소작물의 종자를 생산하는 종묘업체는 주로 1 세대 잡종 종자(F₁ hybrid)를 생산하며, F₁ 잡종 종자는 특성이 다른 양친 계통을 번갈아 심어서 자연교잡을 통하여 생산된 종자로서 자가수정이나 무작위 수분을 통해 생산된 종자에 비하여 잡종강세를 나타내기 때문에 고소득 및 고품질 특성을 지니고 있다. 그러나 위임(pseudo-fertility)등의 이유로 자가불화합성을 이용하여 F₁ 잡종 종자를 생산한다고 하여도 순도가 100%에 이르지 못하게 된다. 그 순도는 직접 파종하여 재배하여 보기 전에는 알기가 곤란하다. 비록 직접 재배를 한다고 하더라도 미묘한 차이는 표본 재배에 의해 확인하기가 매우 어려운 것이 사실이다. Microsatellite 지역은 매우 큰 다양성을 가지고 있으므로 F₁ hybrid가 그 부계와 모계로부터 올바른 형질을 받았는지를 결정하고자 하였다. 이를 위해 먼저 F₁ hybrid인 불암3호와 홍농 종묘로부터 분양받은 불암3호의 부, 모계 잎 조직에서 genomic DNA를 추출하였다. 그리고 이를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다(Figure 5-25~5-30). 실험과정에서 혹시 있을지도 모를 각 개체간의 변이에 의한 오류를 제거하기 위해 부계, 모계, 그리고 F₁ hybrid인 불암3호를 각각 서로 다른 3개체씩 선별하였다.

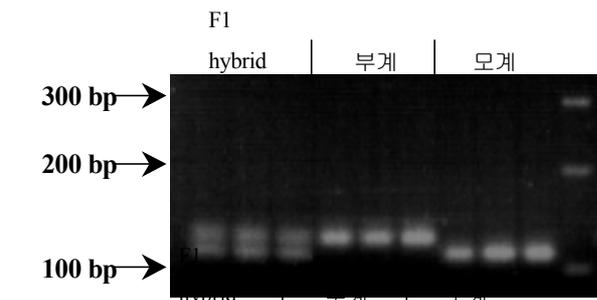


Figure 5-25. The PCR product using 1BH primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

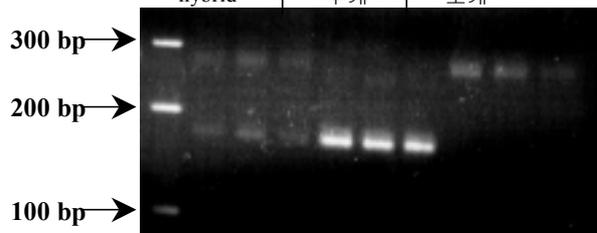


Figure 5-26. The PCR product using 1BSc primer set is analyzed in 3.5% Metaphore agarose of gel.

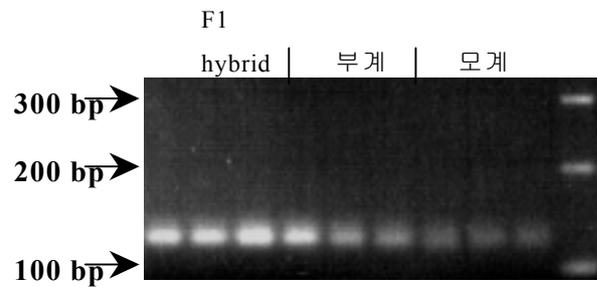


Figure 5-27. The PCR product using 2HE primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

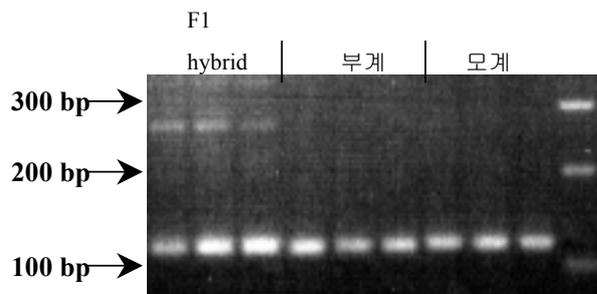


Figure 5-28. The PCR product using 7Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

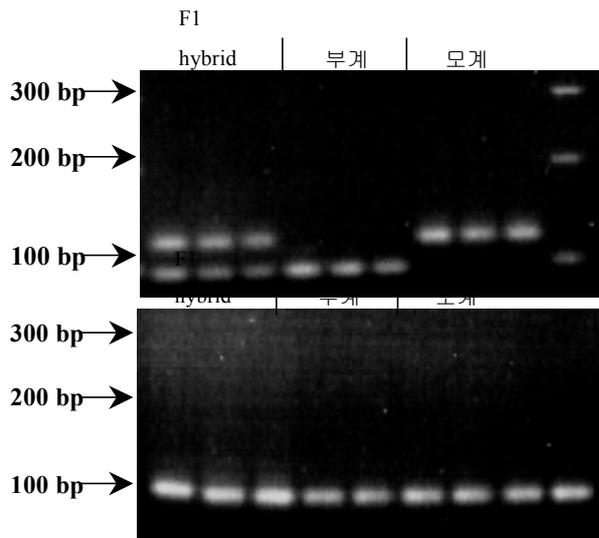


Figure 5-29. The PCR product using 10E primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

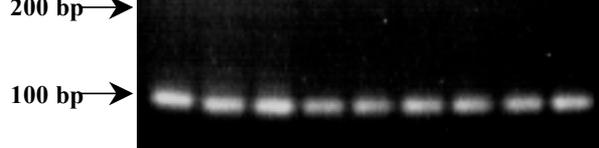


Figure 5-30. The PCR product using 13EB primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

위 결과로 보아 각 개체간의 변이는 보이지 않았다. 2HE, 13EB, 그리고 7Sc의 경우는 부계와 모계에서 microsatellite 지역이 차이를 보이지 않았으나, 1BH, 1BSc, 그리고 10E의 microsatellite 지역은 차이를 보이므로 이를 이용하여 F1 hybrid를 검정할 수 있었다. 배추로부터 분리해 낸 microsatellite 지역을 이용하면, 그 지역이 부계와 모계에서 차이를 보일 경우 간단히 PCR을 이용해 F1 hybrid를 검정할 수 있으므로, 흥농종묘와 서울종묘로부터 분양받은 다른 부.모계의 앞에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하고 이 결과를 통해 어느 microsatellite 지역이 가장 큰 다형성을 보이는지 알아보았다(Figure 5-31~5-50).

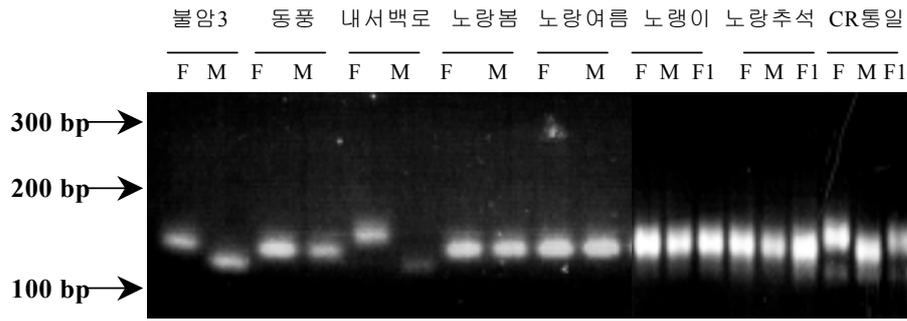


Figure 5-31. The PCR product using 1BH

primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

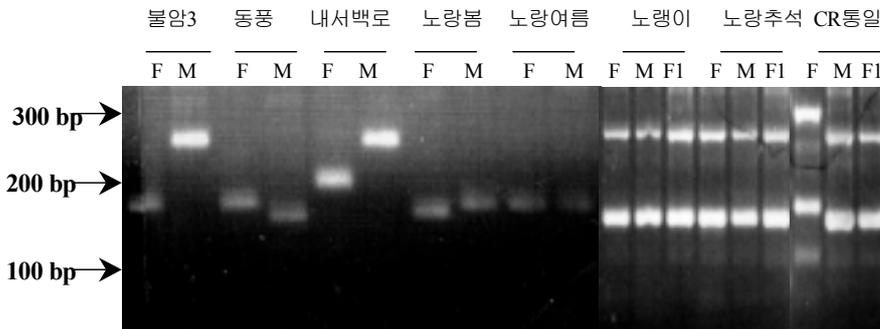


Figure 5-32. The PCR product using 1BSc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

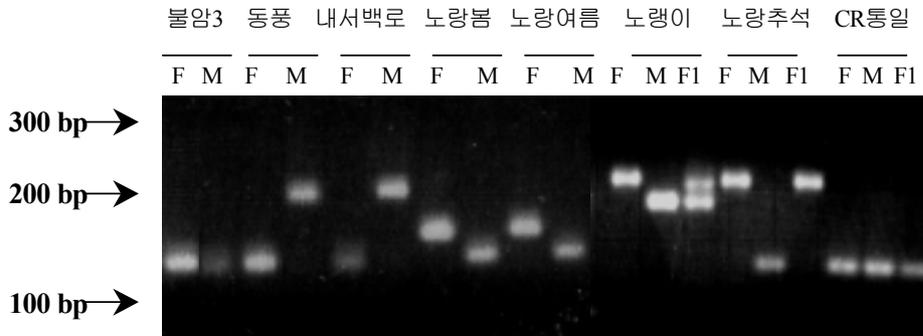


Figure 5-33. The PCR product using 2HE primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

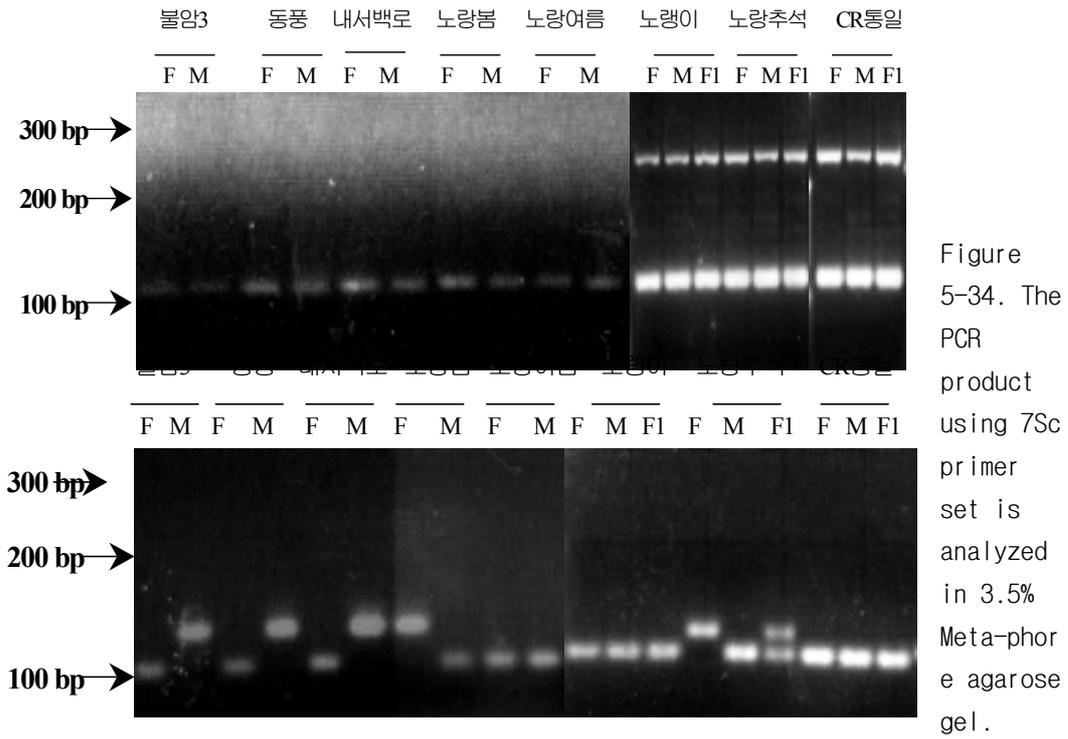


Figure 5-35. The PCR product using 10E primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

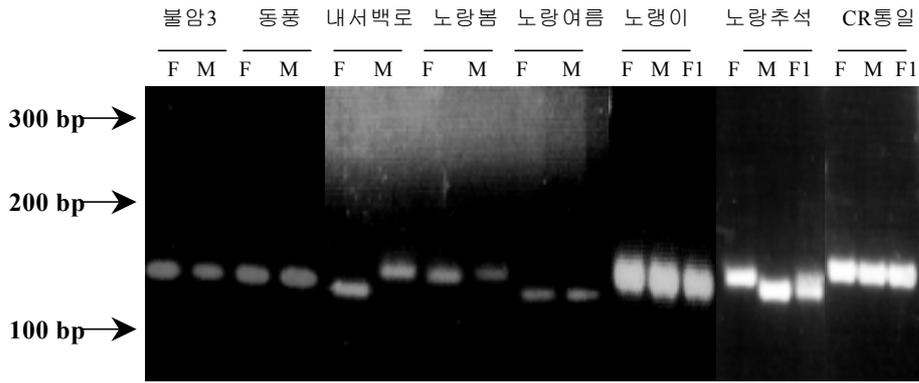


Figure 5-36. The PCR product using 13EB primer set is analyzed

in 3.5% Meta-phore agarose of gel.

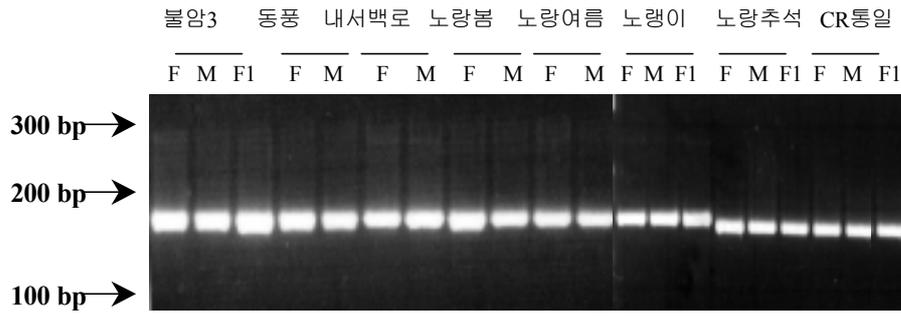


Figure 5-37. The PCR product using 3H primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

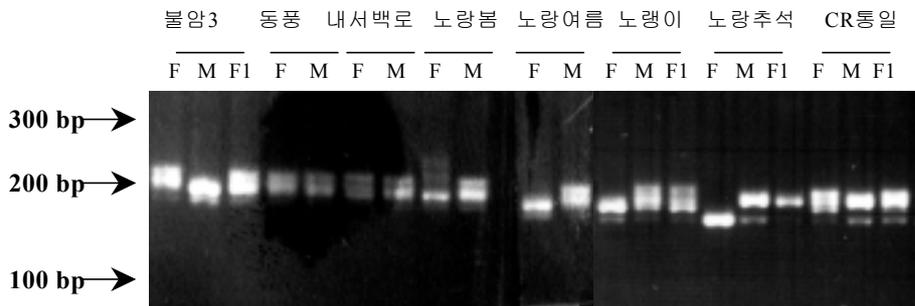


Figure 5-38. The PCR product using 4Xb primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

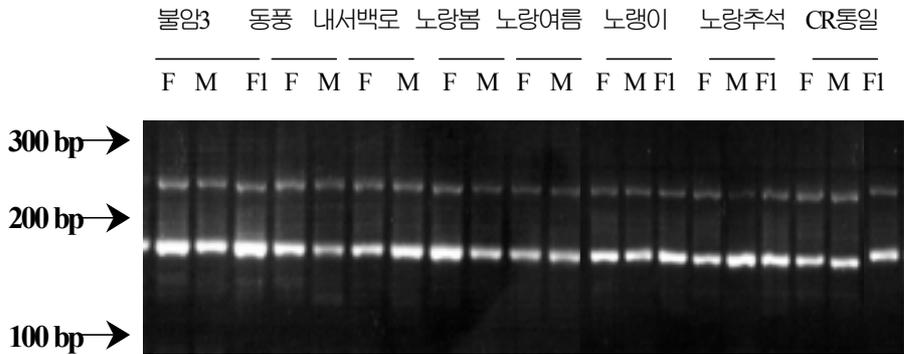


Figure 5-39. The PCR product using 11Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

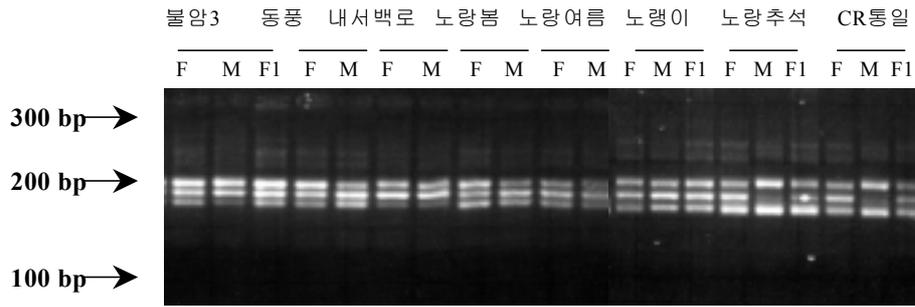


Figure 5-40. The PCR product using 12HK primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

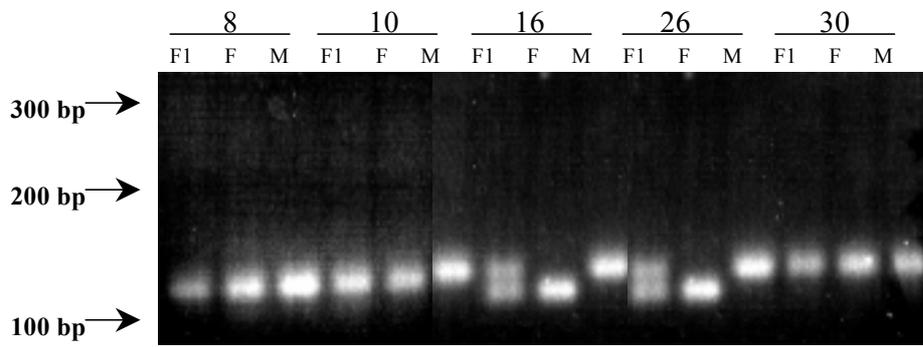


Figure 5-41. The PCR product using 1BH primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

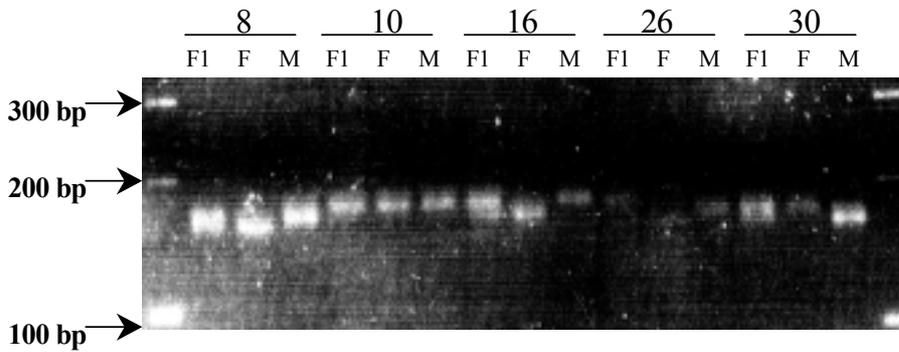


Figure 5-42. The PCR product using 1BSc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

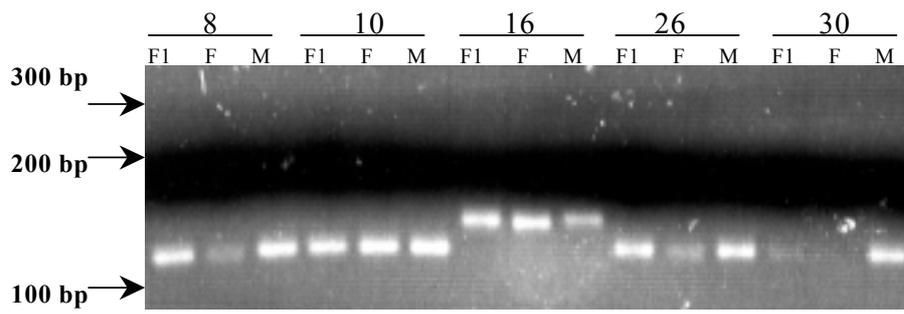


Figure 5-43. The PCR product using 2HE primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

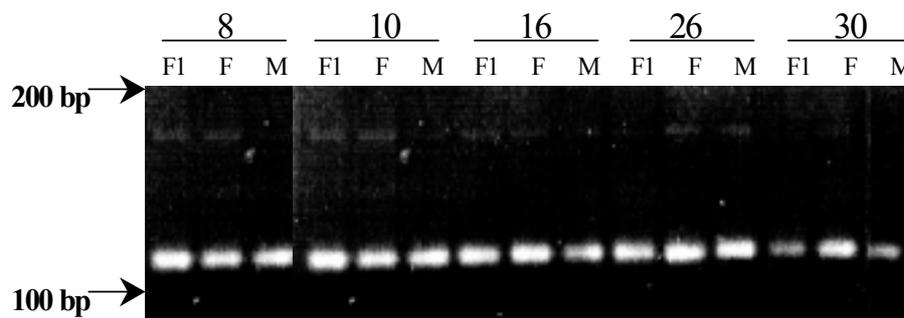


Figure 5-44. The PCR product using 7Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

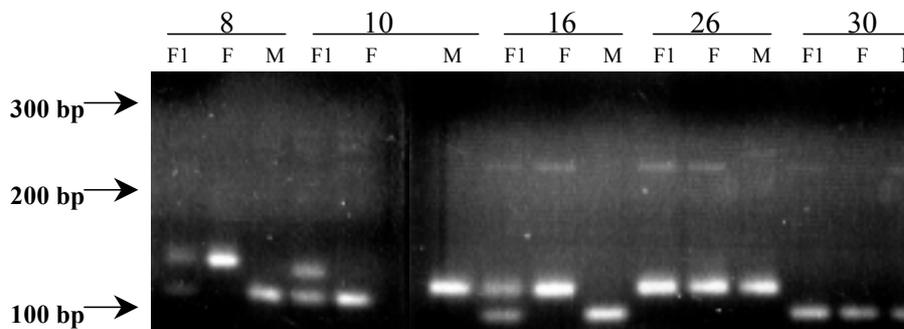


Figure 5-45. The PCR product using 10E primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

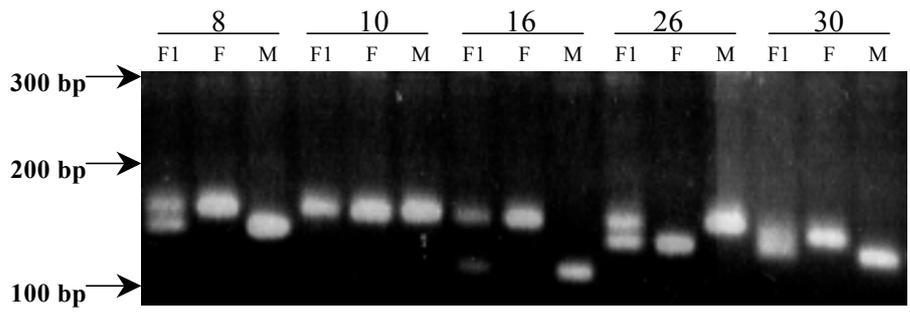


Figure 5-46. The PCR product using 13EB primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

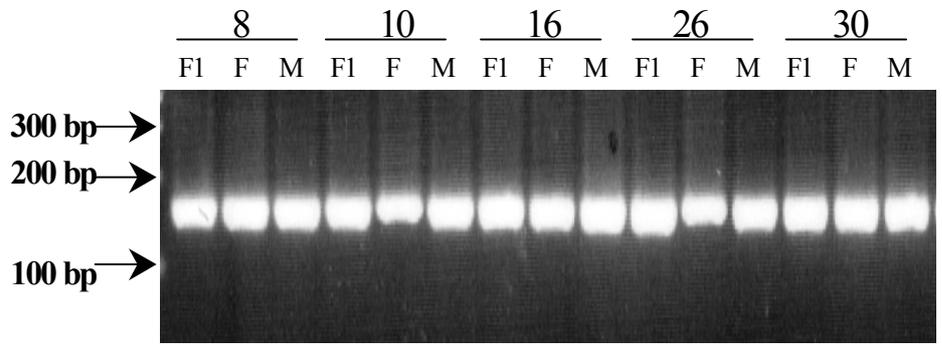


Figure 5-47. The PCR product using 3H primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

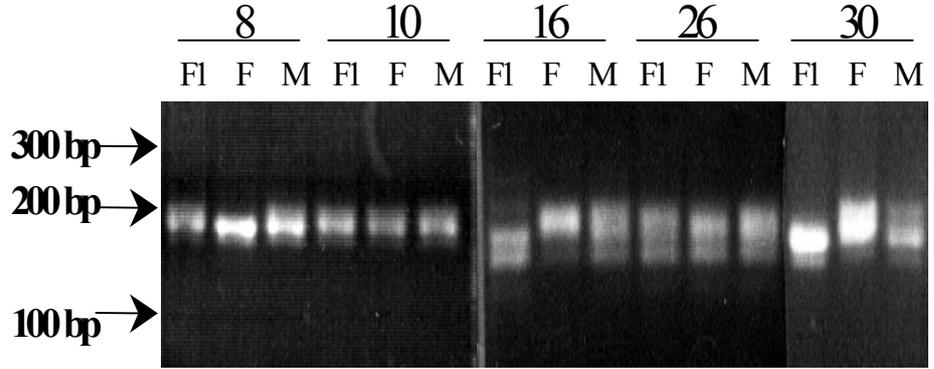


Figure 5-48. The PCR product using 4Xb primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

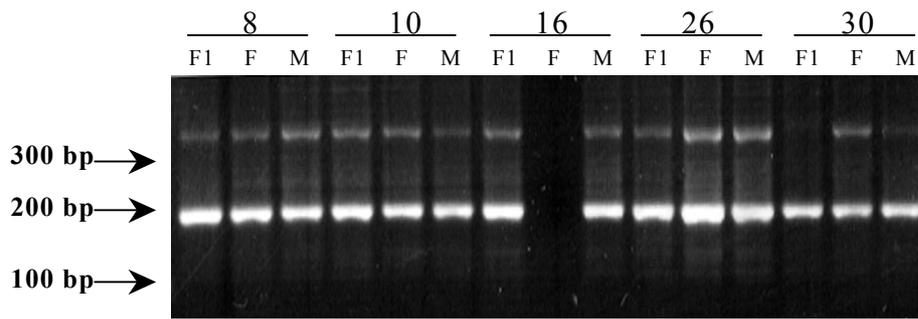


Figure 9-49. The PCR product using 11Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

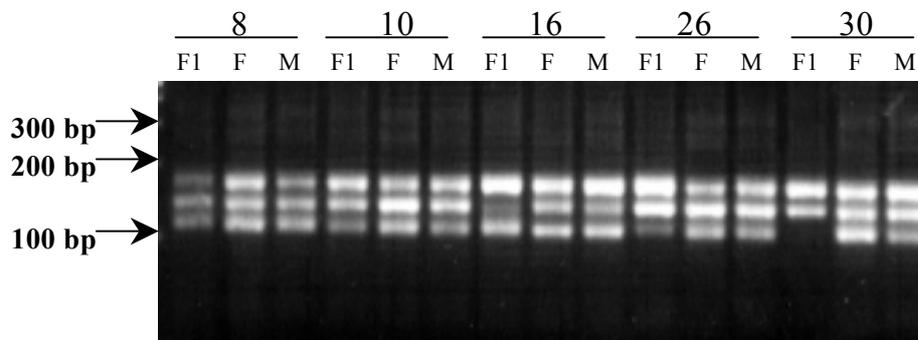


Figure 5-50. The PCR product using 12HK primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

위의 결과로 보아 불암3호는 1BH, 1BSc, 10E에서, 동풍은 1BSc, 2HE, 10E에서 내서백로는 1BH, 1BSc, 2HE, 10E, 13EB에서 노랑봄은 1BSc, 2HE, 10E에서 그리고 노랑여름은 2HE에서 노랑이는 2HE에서 노랑추석은 2HE, 10E, 13EB에서 CR통일은 1BH에서 PCR 산물의 변이를 관찰할 수 있으므로 F1 hybrid 검정이 가능할 것으로 판단되었다. 각각의 primer set을 기준으로 비교해볼 때, 흥농종묘로부터 분양받은 배추들의 경우 7Sc를 이용하여서는 다형성을 관찰할 수 없었고, 1BH의 경우 3종류, 1BSc의 경우 4종류, 2HE의 경우 6종류, 10E의 경우 5종류, 그리고 13EB의 경우 2종류의 F1 hybrid에 대한 부·모계에 서 그 차이를 볼 수 있었다. 서울 종묘로부터도 역시 8, 10, 16, 26, 30 이라는 다섯 종의 F₁ 잡종 재배종과 그 부계와 모계의 잎조직을 분양받아 잎조직에서 핵 게놈을 추출한 후 PCR을 수행하였다. 그 결과 1BH primer로는 16, 26이 1BSc primer로는 8, 16, 26, 30이

10E primer로는 8, 10, 16이 그리고 13EB primer로는 8, 16, 26, 30이 순도 검정과 감별이 가능하다고 판별되었다. 비록 배추에서 분리한 10 종류의 microsatellite 지역중 어느 하나만으로 모든 재배종에서 변이를 볼 수는 없었지만, 본 실험에 사용된 배추 13종의 F1 hybrid는 현재 선별한 10 종류의 primer set을 조합하여 PCR을 수행하면 모든 F1 hybrid의 감별 및 동정이 가능함을 알 수 있었다.

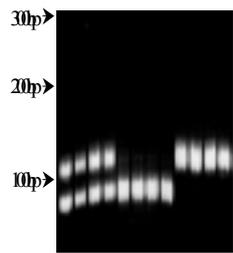
지금까지의 결과들을 종합하여 흥농 종묘와 서울 종묘로부터 분양받은 부계와 모계, 그리고 그 F1 hybrid들의 핵계놈 DNA를 주형으로 개발된 primer들을 사용하여 PCR을 수행하고 이 결과를 haploid 확립 및 유연관계 분석에 적용한 결과를 표로 나타내면 다음과 같다(Table 5-3).

Table 5-3. Summary of the possibility of crossbreed using SSR primer set in F1 hybrid of *B. campestris*

		1BH	1BSc	2HE	7Sc	10E	13EB
흥 농 종 묘	불암3호	가능	가능			가능	
	동풍		가능	가능		가능	
	내서백로	가능	가능	가능		가능	가능
	노랑봄		가능	가능		가능	
	노랑여름			가능			
	노랑이			가능			
	노랑추석			가능		가능	가능
서 울 종 묘	CR통일	가능					
	8		가능			가능	가능
	10					가능	
	16	가능	가능			가능	가능
	26	가능	가능				가능
	30		가능				가능

다. 배추 microsatellite 좌위의 염기서열 결정 및 비교

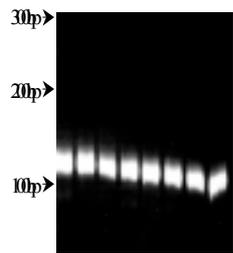
배추의 계놈으로부터 microsatellite 좌위의 증폭을 위한 PCR 용 primer들을 이용하여 실제로 F₁ 잡종 배추의 순도검정 및 품종 감별에 응용한 결과 본 연구를 통해 개발된 1BH, 1BSc, 3H, 4Xb, 2HE, 10E, 11Sc, 12HK 그리고 13EB 의 primer들을 이용하면 모두 가능함을 알 수 있었다. 이 결과들은 사용된 primer들이 바로 microsatellite 좌위를 증폭한다고 생각할 수 있었다. 실제로 증폭된 PCR 산물이 microsatellite 좌위를 포함하는지 알아보기 위하여 첫 번째 불암3호와 그 부계, 모계의 핵 계놈 DNA를 주형으로 10E primer를 사용한 PCR 증폭산물, 두 번째 서울종묘의 26번과 그 부계, 모계의 핵 계놈 DNA를 주형으로 10E primer를 사용한 PCR 증폭산물, 그리고 마지막으로 서울종묘의 16번과 그 부계, 모계의 핵 계놈 DNA를 주형으로 13EB primer를 사용한 PCR 증폭산물들의 염기서열을 결정하였다(Figure 5-51). 염기서열의 결정은 PCR에 사용된 primer 들을 이용해 PCR 산물을 plasmid에 cloning 하지 않고 직접 주형(template)으로 이용하는 방법을 사용하였다. 임의로 3종의 PCR 산물을 선정하였는데 불암3호는 122bp와 98bp의 두 가지 염기서열이 결정되었으며 그 중 122bp 의 절편은 그 염기서열이 모계의 PCR 증폭산물의 염기서열과 동일하였고, 98bp 의 절편은 부계의 PCR 증폭산물과 그 염기서열이 동일하였다. 서울종묘의 26의 경우는 F₁ 잡종과 그 부계, 그리고 모계에서 모두 120bp의 동일한 염기서열을 가짐을 알 수 있었다. 그리고 서울 종묘의 16의 경우 133와 107bp의 두 가지 염기서열이 결정되었으며 그 중 133bp 의 절편은 그 염기서열이 부계의 PCR product 의 염기서열과 동일하였고, 107bp 의 절편은 모계의 PCR 증폭 산물과 그 염기서열이 동일하였다.



1E

1 ACGGCCATAAACGGAATACAAGCCGAAATTTTGAACAAAGCTCTCTCTCTCTCTCT 60
 61 CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAATCGCTTAGGGTTNCTTTTGTCTGAGTCTCGGATCT 120
 121 GA 122

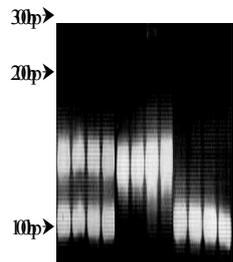
1 ACGGCCATAAACGGAATACAAGCCGAAATTTTGAACAAAGCTCTCTCTCTCTCTCAAT 60
 61 CGCTTAGGGTTNCTTTTGTCTGAGTCTCGGATCTGA 98



1E

1 ACGGCCATAAACGGAATACAAGCCGAAATTTTGAACAAAGCTCTCTCTCTCTCTCT 60
 61 CTCTCTCTCTCTCTCTCTCAATCGCTTAGGGTTNCTTTTGTCTGAGTCTCGGATCTGA 120

1 ACGGCCATAAACGGAATACAAGCCGAAATTTTGAACAAAGCTCTCTCTCTCTCTCT 60
 61 CTCTCTCTCTCTCTCTCTCAATCGCTTAGGGTTNCTTTTGTCTGAGTCTCGGATCTGA 120



1B

1 CATAAGCTTCATTGCCACAACTACTTTAGTACTTACACATTACTCTCTCTCTCTCTCT 60
 61 TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGATACCTAAAACCTACNGCCGAGGGTTGT 120
 121 TGCTGCTGCTACT 133

1 CATAAGCTTCATTGCCACAACTACTTTAGTACTTACACATTACTCTCTCTCTCTCTCT 60
 61 TCTGATACCTAAAACCTACNGCCGAGGGTTGTGCTGCTGCTACT 107

Figure 5-51. PCR products and their nucleotide sequences of microsatellite locus.

위의 결과 실제로 본 연구에서 사용된 PCR primer들은 배추의 핵 게놈에서 microsatellite 좌위를 증폭해내고 있으며, 또한 이 PCR 산물의 길이 차이는 바로 반복서열의 수로부터 기인한 것이라는 것을 알 수 있었다.

라. SSR 분석을 통한 서로 다른 종간의 유연관계 파악

SSR 혹은 STEMS 분석은 아주 짧은 염기서열이 반복적으로 존재하는 지역에서의 다형현상을 PCR을 통하여 분석하는 방법이다. Microsatellite 좌위에는 1-5개의 염기가 반복적으로 존재하고 있는데 이는 SSR (simple sequence repeat) 혹은 SSLP (simple sequence length polymorphism)라고 부른다 (Bell and Ecker, 1994). 이들은 공동우성적으로 유전하며 PCR을 이용하여 용이한 검출이 가능하므로 집단유전학의 연구 등에 널리 이용되고 있다 (Bruford and Wayne, 1993). 이러한 예로써 배추와 같은 과에 속하는 애기장대의 경우 계통 연구가 활발히 진행되어 현재 전체 계통 염기서열이 알려져 있는데 이로부터 다양한 부류의 microsatellite sequence가 보고 되어 있다. 애기 장대의 경우 microsatellite의 변이를 분석하는 SSR의 이용은 애기장대의 생태형 (ecotype)의 유전변이를 분석하는 중요한 기준이 되고 있다 (Koniczny and Ausubel, 1993; Innan *et al.*, 1997). 더 나아가서 이들을 이용하여 애기장대와 유연관계가 깊은 *Arabis petraea* 및 *Arabis lyrata* 간의 진화관계를 파악하였다 (van Treuren *et al.*, 1997). 그러므로 이번 실험에서는 배추(*B. campestris* subsp. *pekinensis*) 와 같은 십자화과(cruciferae)에 속하는 순무(*B. rapa*) 와 양배추(*B. oleracea*) 와의 유연관계를 검정할 수 있는지 알아보기 위해 이들의 핵 계통 DNA를 추출하여 이전에 제조한 배추의 SSR primer들을 이용하여 PCR을 수행하였다(Figure 5-52~5-61). 양배추의 경우 홍농 종묘로부터 대월양배추와 winterhunt양배추, 그리고 순무의 경우 관동여름무, 백봉무, 장형무, 청복무, 청운무의 F1 hybrid와 그 부계 그리고 모계의 종자를 배양받아 재배한 후 잎조직에서 genomic DNA 1 µg을 사용하였고 각각의 primer들은 200 ng을 사용하여 95°C에서 5분간 denaturation시켰다. 그 후 95°C에서 15초, 59°C에서 15초 그리고 72°C에서 30초씩 40회 순환시킨 후 72°C에서 10분간 두고 4°C로 soaking시켰다. 각각의 primer에 따라 배추의 genomic DNA를 주형으로 삼았던 때와 동일한 조건의 annealing temperature로 조건을 잡았고, 특히 1BSc의 경우 먼저 67°C의 annealing temperature로 7회 순환시킨후, 61°C의 annealing temperature로 33회 순환시켰다. 이렇게 얻은 PCR 산물은 BMA사에서 생산되는 Meta-phore agarose를 사용하여 분석하였다.



Figure 5-52. The PCR product using 1BH primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.



Figure 5-53. The PCR product using 2HE primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

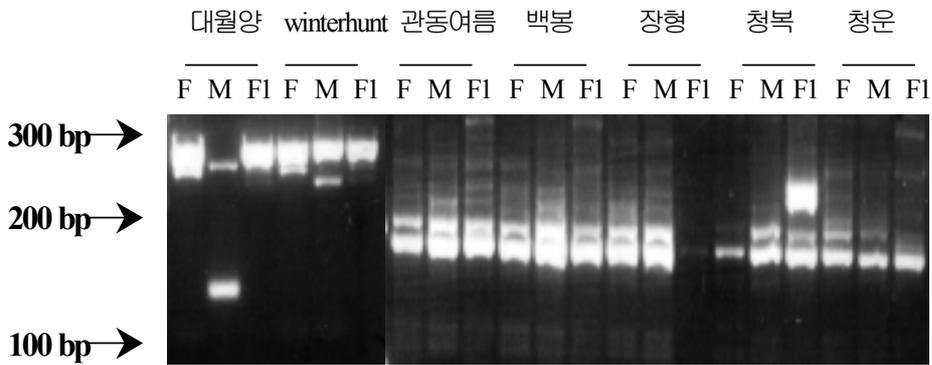


Figure 5-54. The PCR product using 7Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

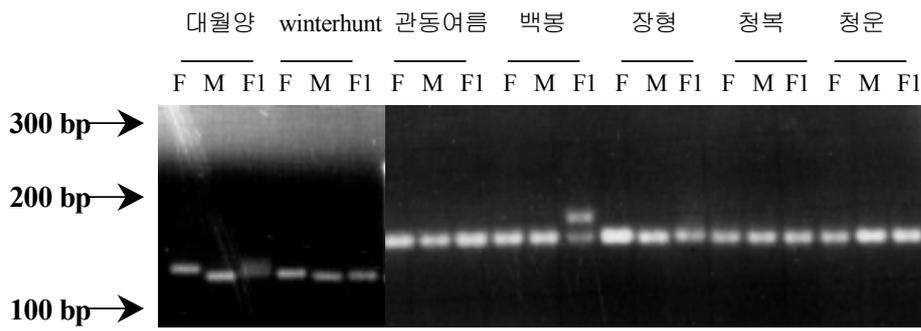


Figure 5-55. The PCR product using 10E primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

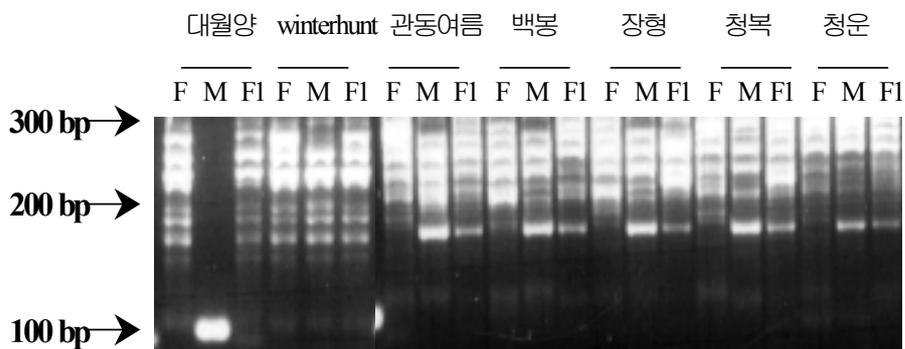


Figure 5-56. The PCR product using 13EB primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

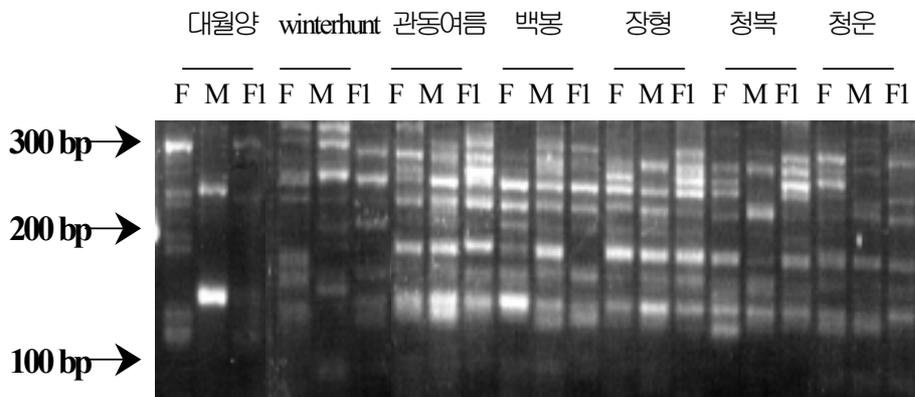


Figure 5-57. The PCR product using 1BSc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

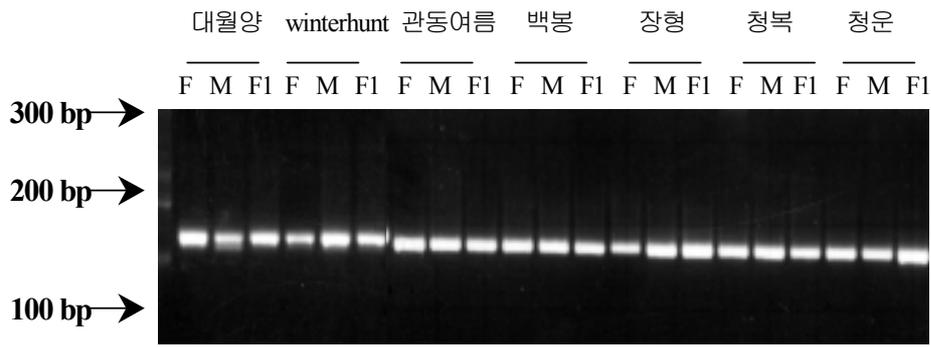


Figure 5-58. The PCR product using 3H primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

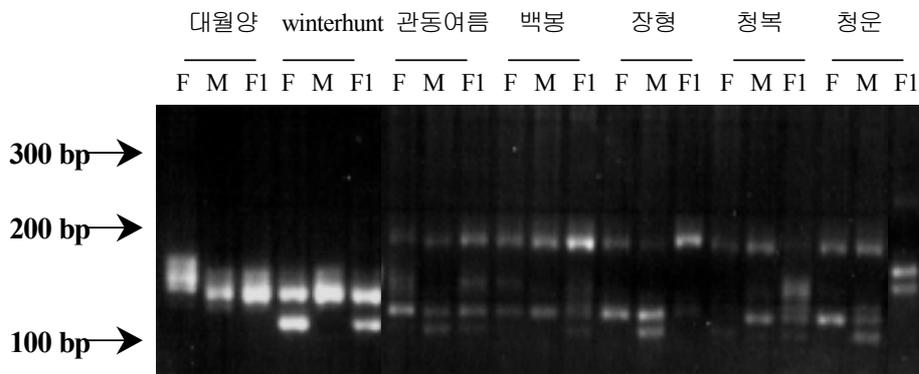


Figure 5-59. The PCR product using 4Xb primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

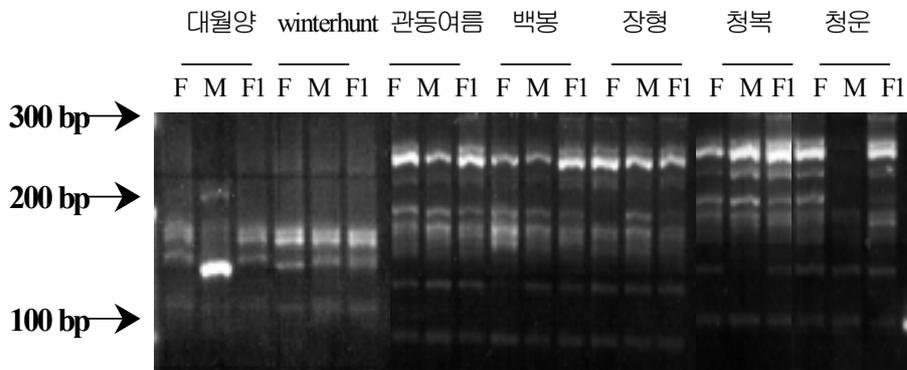


Figure 5-60. The PCR product using 11Sc primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

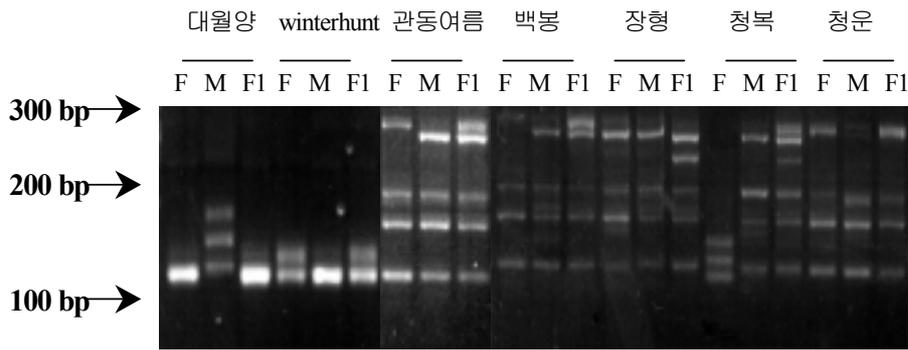


Figure 5-61. The PCR product using 12HK primer set is analyzed in 3.5% Meta-phore agarose gel.

마. 논의

홍농종묘로부터 분양받은 순무 5종, 그리고 양배추 2종의 F1 hybrid 와 그 분계 그리고 모계의 종자를 분양받아 재배한 후 배추와 동일한 방법으로 SSR 분석을 수행한 결과 비록 이들이 같은 십자화과에 속하지만 동일한 모티프에 해당하는 microsatellite 지역을 포함하고 있지는 않다는 결론을 내릴 수 있었다. 그러나 양배추로부터 얻은 PCR 산물의 band-pattern 이 순무에 비해 배추와 더욱 유사한 점으로 미루어 양배추가 순무에 비해 배추와 근연종 관계에 있음을 유추할 수 있었다. 또한 흥미로운 점은 3H primer set 의 경우 그 PCR산물이 배추에서부터 양배추 그리고 순무에 걸쳐 모두 동일한 하나의 band만 으로 나타나는 것으로 보아 이에 상응하는 염기서열이 십자화과에서 매우 보존적으로 존재함을 유추할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 마늘 미소기관 및 핵 게놈 다형화 현상 연구

본 연구의 최종 목표인 작물의 미소기관 게놈과 핵의 microsatellite DNA 연구를 통하여 핵산 다형화 현상을 규명하고 다형화 부위를 분리 이용하여 핵산 지문법으로 신속하고 정확한 품종을 감별하고자 하였다. 그 세부과정의 연구는 다음과 같다.

가. 마늘 엽록체 게놈의 변이지역 탐색, 분리 및 구조 결정

마늘 엽록체 게놈의 변이지역 탐색을 위한 rps16 intron, rps16-trnQ, psaA-trnS, trnT-trnL, accD-psaI, pasI-petA, 및 rpl16 intron 부분을 PCR 증폭을 통하여 조사하였고, PCR/RFLP을 통하여 그 변이 지역의 절편을 클로닝 하여 염기서열을 결정하였다. 또한 AFLP 방법을 통하여 엽록체 게놈의 변이지역을 탐색하였다. 이러한 실험법을 통하여 국내 마늘과 국외 재배종 마늘들 사이에서의 변이를 조사한 결과 중국의 북경마늘에서 많은 구조적 차이를 나타남을 알 수 있었다. 하지만 국내 마늘들 사이에서 구조적인 차이는 크게 나타나지 않았다.

나. 마늘 미토콘드리아 게놈의 변이지역 탐색, 분리 및 구조 결정

마늘 미토콘드리아 게놈의 변이지역 탐색은 coxI, coxII, coxIII 및 nad3 지역에 대한 PCR 증폭을 통하여 그 구조적인 변이를 탐색하였다. 변이지역은 이들 지역에서의 inverse PCR 증폭을 통하여 그 절편을 pBluscriptII vector에 클로닝 하였고, 그 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열의 결과 이들 마늘 미토콘드리아 게놈은 양파의 미토콘드리아 게놈의 절편들과 매우 유사한 구조를 가지고 있었으며, 마늘 게놈 상에는 변이의 차이점이 없었다. 또한 AFLP 실험법에서는 1쌍의 primer쌍에서 변이지역을 발견할 수 있었다. 그러나 전체적으로 국내 마늘과 국외 마늘들 사이에서 구조적인 차이는 나타나지 않았다.

다. 마늘의 미소 기관 및 핵 게놈 다형화 현상 규명

마늘 핵 게놈의 다형성 연구를 위한 실험법으로는 AFLP, SETMS, PCR/RFLP 방

법을 통하여 핵 계놈의 변이를 탐색하였다. AFLP 에서는 총 32쌍의 프라이머 쌍에서 12 쌍의 프라이머 쌍에서 국내 마늘과 해외 마늘 재배종 사이에서 다형성 절편이 관찰되었으나 국내 마늘 재배종 사이에서는 그 차이가 크게 나타나지 않았다. 그래서 SETMS 실험법으로 국내 재배종 마늘과 해외 재배종 마늘들 사이에서 유전적 유사도를 통하여 그 변이를 탐색한 결과, 유전적 유사도가 0.61 일 때 크게 3부분으로 나뉘는 것을 알 수 있었고, 고양과 의성마늘이 유전적으로 매우 가까움을 알 수 있었다. 마늘 핵계놈의 변이적 탐색을 위하여 inverse PCR 시험에서는 국내외 마늘에서는 그 변이가 나타나지 않았다. 하지만 AFLP와 SETMS 실험법으로 핵 계놈에서 국내외 마늘 재배종 사이에서 다형성 찾을 수 있으며 품종을 감별할 수 있는 마커로 제시될 수 있을 것으로 기대된다.

2. 배추 microsatellite DNA 다형화 현상연구

본 연구에서는 SSR(simple sequence repeat)을 이용하였다. 배추의 genomic library를 선별한 결과 AG/CT 또는 GA/TC motif 의 반복서열이 존재하는 13개의 genomic clone을 확보하였다. 이중 반복된 것을 제외한 총 9개의 제한효소 지도를 작성하기 위해 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sph*I 및 *Xba*I으로 절단한 다음 0.8% agarose gel 상에서 전기영동하여 제한효소 자리의 존재를 확인하고 제한효소 지도를 완성하였다. 이후 sub-cloning을 통해 염기서열을 결정하고, microsatellite 지역의 특성인 주변 지역의 보존된 고유한 염기서열을 이용하여 microsatellite 지역 증폭을 위한 primer를 설계하였다. 이러한 일련의 과정을 통해 1BH, 1BSc, 2HE, 7Sc, 10E, 그리고 13EB로 명명한 6쌍의 PCR 용 primer를 얻을 수 있었다.

이 primer 들을 사용해 여러 서로 다른 재배종 배추의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 재배종 사이에 같은 motif를 가지는 microsatellite 지역에서의 변이를 확인할 수 있었다. 또한 F1 hybrid 의 감별을 위해 종묘회사로부터 분양받은 부·모계와 실제 F1 hybrid를 비교해 보았을 때 이 방법이 적절한 감별법임을 확인할 수 있었다. PCR에 주형으로 쓰일 genomic DNA는 매우 소량으로 검사할 대상이 적게 자란 상태에서도 빠르게 검사가 가능할 뿐 아니라, PCR을 기본으로 하기 때문에 기존에 쓰이던 hybridization을 기본으로 하는 방법에 비해 빠르고, 또한 방사성 동위 원소를 사용하지 않고 간단하게 agarose gel을 이용하여 분석할 수 있다.

그러므로 본 연구에서 설계된 primer를 사용한 배추의 품종 선별법은 배추의 F₁ 잡종의 순도검정 등에 요구되는 노동력과 경비의 절감을 이룩하며, 신품종 개발을 촉진하여 궁극적으로 종묘산업계의 생산성 증가와 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이기 때문에 이러한 기술의 개발 필요성은 대단히 크다고 할 수 있다. 또한 염기서열 결정 등을 통해 배추의 재배종마다 고유한 PCR 산물의 길이를 정확하게 파악하고나면 이는 어떤 재배종인지 모르는 배추의 동정에도 이용될 수 있어 궁극적으로 국내 종묘 산업 등의 지적 재산권을 보호해 줄 수 있을 것이라 기대된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 마늘 미소기관 및 핵 게놈 다형화 현상 연구

본 연구에서는 마늘 미소기관 및 핵 게놈 다형화 현상을 알아보기 위해 엽록체, 미토콘드리아, 그리고 핵 게놈에 대하여 변이지역을 중심으로 연구가 이루어졌다. 이들 지역의 일부는 클로닝을 통하여 그 염기서열을 밝히고, 데이터 탐색을 통하여 다른 식물 혹은 작물들 사이의 유의성을 조사하였다. 엽록체 게놈의 다형성 현상 연구에서는 엽록체 게놈 상에서 변이를 보이는 지역을 집중 탐색한 결과, 4 품종의 마늘사이에서 7쌍의 프라이머 쌍을 통하여 변이를 찾아낼 수 있었고, 또한 PCR/RFLP를 통해서도 절편의 차이를 통하여 중국 북경 마늘의 경우 엽록체 게놈의 다형성을 통해 다른 마늘들과 구별할 수 있을 것으로 판단된다. 하지만 국내 마늘들 사이에서는 AFLP 방법을 통하여 그 변이의 차이는 크게 나타나지 않았다.

미토콘드리아 게놈의 다형성 연구에서는 5 종류의 국, 내외 마늘 시료로 변이 가능성이 제시되어 왔던 4 개의 지역 (coding and non-coding regions)을 탐색한 결과, coding region 에서는 마늘들 사이에 다형성 절편은 존재하지 않았고, non-coding region 에서 inverse PCR을 통하여 일부 다형성 절편을 확인하였다. 또한 국내 마늘 재배종 2품종을 시료로 그 변이를 찾기 위한 AFLP 실험에서는 1곳에서 다형성 절편을 조사하였다. 이 결과로 볼 때 마늘의 미토콘드리아 게놈은 그 구조가 서로 매우 비슷함을 알 수 있었다.

마늘 핵 게놈의 다형성 현상 연구에서는 AFLP, SETMS, Inverse PCR/Southern blot 실험법을 통하여 그 변이지역을 탐색하였고, 이것은 국내 재배종과 외국 재배종 사이에서 다형성 절편이 관찰 되었다. AFLP와 inverse PCR/Southern blot 실험법을 통한 일부 국내 재배종 마늘 사이에서는 핵 게놈에서 변이지역에 대한 차이점을 찾을 수 없었지만 SETMS 방법으로 유전적 유사도를 관찰한 결과, 국내 재배종 사이에서도 유전적으로 유연 관계를 제시함으로써 새로운 지표 가능성을 제시하였다.

2. 배추 핵 게놈의 핵산 다형화 현상연구

배추는 고추 마늘 무와 함께 우리나라 4 대 채소 작물의 하나로서 십자화과에 속하며, 원산지는 중국의 북부지방이나 고유 전통식품인 김치의 주원료가 되는, 경제적으로 매우 중요한 작물이다. 배추를 포함한 채소작물의 종자를 생산하는 종묘업체는 주로 1 세대 잡종 종자 (F₁ hybrid)를 생산하고 있는 바, F₁ 잡종 종자는 특성이 다른 양친 계통을 번갈아 심어서 자연교잡을 통하여 생산된 종자로서 자가수정이나 무작위 수분을 통해 생산된 종자에 비하여 잡종강세를 나타내기 때문에 고소득 및 고품질 특성을 지니고 있다. 자가불화합성 식물이라도 자가수정에 의하여 전혀 결실되지 않는 것이 아니라, 때로는 일부 결실되는 것이 있는데, 이 현상을 위임(pseudo-fertility)이라고 한다. 위임에는 꽃망울이 아직 충분히 발육하지 못하여 억제물질의 생성이 이루어지지 못할 때 일어나는 뇌위임 (bud pseudo-fertility)과 꽃이 질 무렵, 즉 억제작용의 약화에 의하여 일어나는 말기위임 (end-season pseudo-fertility) 이 있다. 따라서 이러한 이유로 자가불화합성을 이용하여 F₁ 잡종 종자를 생산한다고 하여도 순도가 100%에 이르지 못하게 된다. 그 순도는 직접 파종하여 재배하여 보기 전에는 알기가 곤란하다. 비록 직접 재배를 한다고 하더라도 미묘한 차이는 표본 재배에 의해 확인하기가 매우 어려운 것이 사실이다. 이러한 이유로 짧은 시간 내에 대량으로 품종을 검별하는 방법의 개발은 대단히 중요한 연구 분야이다.

최근에 분자생물학의 발전과 더불어 생물분야에서 기초적인 기술의 발전이 급진 전되어 순도 검정에 응용 되어지고 있다. 분자생물학적 기술을 이용하여 각 순계 양친종 (원종) 또는 품종에 특이한 marker 유전자를 인식하고 이를 정확하고 간편한 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기술을 이용하여 확인할 수만 있다면 지금까지 문제시 되어 왔던, 계통 혹은 품종을 정확하게 알 수 없는 관계로 나타나는 종묘 회사의 불이익이나 농민의 피해를 최소화할 수 있을 것으로 기대된다. 이 PCR을 이용하는 방법 중 본 연구에서는 SSR (simple sequence repeat)을 이용하였다. 배추의 genomic library를 선별한 결과 AG/CT 또는 GA/TC motif 의 반복서열이 존재할 것이라고 생각되는 13개의 genomic clone을 확보하였다. 이중 반복된 것을 제외한 총 9개의 제한효소지도를 작성하기 위해 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sph*I 및 *Xba*I으로 절단한 다음 0.8% agarose gel 상에서 전기영동 하여 제한효소 자리의 존재를 확인하고 제한효소 지도를 완성하였다. 이후 sub-cloning을 통해 염기서열을 결정하고 microsatellite 지역 의 특성인 주변 지역의 보존된 고유한 염기서열을 이용하여 microsatellite 지역 증폭을 위한

primer를 설계하였다. 이러한 일련의 과정을 통해 1BH, 1BSc, 2HE, 7Sc, 10E, 그리고 13EB라고 명명한 6쌍의 PCR 용 primer를 얻을 수 있었다.

이 primer 들을 사용해 여러 서로 다른 재배종 배추의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 재배종 사이에 같은 motif를 가지는 microsatellite 지역에서의 변이를 확인할 수 있었다. 또한 F1 hybrid 의 감별을 위해 종묘회사로부터 분양받은 부·모계와 실제 F1 hybrid를 비교해 보았을 때 이 방법이 적절한 감별법임을 확인할 수 있었다. PCR에 주형으로 쓰일 genomic DNA는 매우 소량으로 검사할 대상이 적게 자란 상태에서도 빠르게 검사가 가능할 뿐 아니라, PCR을 기본으로 하기 때문에 기존에 쓰이던 hybridization을 기본으로 하는 방법에 비해 빠르고, 또한 방사성 동위 원소를 사용하지 않고 간단하게 agarose gel을 이용하여 분석할 수 있다.

그러므로 본 연구에서 설계된 primer를 사용한 배추의 품종 선별법은 배추의 F₁ 잡종의 순도검정 등에 요구되는 노동력과 경비의 절감을 이룩하며, 신품종 개발을 촉진하여 궁극적으로 종묘산업계의 생산성 증가와 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이기 때문에 이러한 기술의 개발 필요성은 대단히 크다고 할 수 있다. 또한 염기서열 결정 등을 통해 배추의 재배종마다 고유한 PCR 산물의 길이를 정확하게 파악하고나면 이는 어떤 재배종인지 모르는 배추의 동정에도 이용될 수 있어 궁극적으로 국내 종묘 산업 등의 지적 재산권을 보호해 줄 수 있을 것이라 기대된다.

제 7 장 참고문헌

- 권일찬, 한원영, 김병주, 정찬식, 박용호. 1998. 한국 부추 수집종 및 도입종들간의 RAPD 유연분석. 한국육종학회지. 30: 298-304.
- 김정선, 정태영, 진용문, 김현욱, 박범석, 이장용, 이수성. 1996. 작물 DNA표지인자 개발 및 연관분석 : 핵산지문법을 이용한 배추속 작물의 유전연구. 시험연구보고서 1995 생물자원부편/농업과학기술원. 27-34.
- 김정선, 조용구, 이수성, 정태영. 1997. 작물 DNA 표지인자 개발 및 연관 분석: 핵산지문법을 이용한 배추속 작물의 유전연구. 시험연구사업보고서. 생물자원부 1996/농업과학기술원: 24-31.
- 김준, 김기인, 이수성, 1998. 배추 X 한국 순무 조합에 있어서 전분 gel 전기영동에 의한 및 가지 동위효소의 유전분석. 한국원예학회지 39: 14-17.
- 리왕영, 조영환, 백기엽, 1997. 동위효소 및 RAPD에 의한 배추속과 무속의 종내 및 종속간 잡종 식물체 다형성 분석. 한국원예학회지 38: 675-678.
- 신정섭, 이승재, 박권우. 1995. RAPD법을 이용한 수박의 유전변이 탐색. 한국육종학회지 27(1): 94-107.
- 안상낙. 1997. 주요 도열병 레이스별 저항성 유전자에 대한 RAPD 및 RFLP 분석. 시험연구보고서. 1996 (수도편): 37-38.
- 안상낙, 김연규, 홍하철, 최해춘. 1998. 주요 도열병 레이스별 저항성 유전자에 대한 RAPD 및 RFLP 분석. 시험연구보고서. 1997 (수도편): 30-31.
- 양태진, 김두환, G. C. Kuo, 박효근. 1998. 녹두 바구미 저항성 도입을 위한 여교잡육종과정에서 RFLP 표지를 이용한 간접선택. 한국육종학회지 30: 8-15.
- 양태진, 박효근. 1998. 고추의 RAPD 분석 조건 최적화 연구. 한국육종학회지 30: 204-211.
- 오미정, 홍병희. 1995. 한국 자생 차나무의 RAPD-Marker에 의한 유연관계. 한국육종학회지 27(2): 140-147.
- 이석하, 박금룡, 유용환, 김석동. 1997a. 상이한 잡종집단을 이용한 콩 RFLP 유전자 지도 작성과 병합. 한국육종학회지 29: 282-288.
- 이석하, 유용환, 김석동. 1997b. 콩의 RFLP 다양성. 한국육종학회지 29: 210-215.
- 정승성, 김주창, 정성조, 조경규, 김수정, 김중환. 1997. 마늘, 양파의 원산지 식별방법 연구. 시험사업보고서. 1996/국립농산물검사소시험소: 62-65.
- 조용구, 강미란, 김영우, 이영태, 은무영, 정태영. 1998. 벼의 밀양23/기호벼 재조합 자식 유전집단을 이용한 RFLP 기본분자유전자지도 작성. 한국육종학회지 30: 289-297.
- 조운상, 홍순관, 송문태, 문현팔, 이점호, 김남수. 1998. RAPD, AFLP, SSRP를 이용한 벼

- 품종간 변이 분석 및 이들 마커기법들간의 효율성 비교. 한국유전학회지 20: 117-127.
- 최영원, 박대영, 서기호. 1998. 품종식별 및 종자의 순도분석을 위한 분자생물학적 기술응용 II. RAPD 기법을 이용한 고추 F 품종의 교배 모/부분 확인. 농업과학논문집 40: 177-181.
- 허경옥, 정일경, 한상정. 1998. RAPD를 이용한 한국산 지방 채래종 산달래의 유연관계 분석. 한국원예학회지 39: 273-277.
- Al-Zahim, M. A., B. V. Ford-Lloyd and H. J. Newbury. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18: 473-477.
- Al-zahim, M., H. J. Newbury and B. V. Ford-Lloyd. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *HortScience* 32(6): 1102-1104.
- Bark, O. H., M. J. Havey and J. N. Corgan. 1994. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of progeny from an *Allium fistulosum* X *A. cepa* hybrid. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(5): 1046-1049.
- Bell, C.J. and J.R. Ecker. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137-144.
- Bradley, K. F., M. A. Rieger and G. G. Collins. 1996. Classification of australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 36: 613-618.
- Bruford, M. W. and R. K. Wayne. 1993. Microsatellites and their application to population genetics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 939-943.
- Butler, J. M. and B. C. Levin. 1998. Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends Biotechnol.* 16: 158-62.
- D'ennequin, M. T., O. Panaud, T. Robert and A. Ricroch. 1997. Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity* 78: 403-409.
- Dubouzet, J. G., T. Etoh, K. Arisumi and T. Yoshitake. 1996. A diagnostic test to confirm interspecific *Allium* hybrids using random amplified polymorphic DNA from crude leaf DNA extracts. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65(2): 321-326.
- Eom, E. M. and D. H. Lee. 1996. Cloning and characterizations of highly repetitive sequences in the genome of *Allium sativum* L. *J. Plant Biol.* 39(1): 49-55.
- Fisher, D. and K. Bachmann. 1998. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques* 24: 796-802.

- Gill, P., A. J. Jeffreys and D. J. Werrett. 1985. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 318: 577-579
- Havey M. J. 1991. Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of the chloroplast genome. *Theor. Appl. Genet.* 81: 752-757.
- Hong, C. J., T. Etoh, B. Landry and N. Matsuzoe. 1997. RAPD markers related to pollen fertility in garlic (*Allium sativum* L.). *Breeding Science* 47: 359-362.
- Innan, H., R. Terauch and N. T. Miyashita. 1997. Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146: 1441-1452.
- Iwabuchi, M., K. Itoh and K. Shimamoto. 1991. Molecular and cytological characterization of repetitive DNA sequences in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 312-316.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73
- Jeffreys, A. J., A. MacLeod, K. Tamaki, D. L. Neil and D. G. Monckton. 1991. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354: 204-209.
- Jeffreys, A. J., J. F. Brookfield and R. Semeonoff. 1985. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818-819
- Jose, M. M. Z and S. Julio. 1998. *Arabidopsis* Protocol; Methods in molecular biology. Human Press. 71-84.
- Kao, T. H., E. Moon and R. Wu. 1984. Cytochromic oxidast subunit II gene of rice has an insertion sequence within the intron. *Nucl. Acids Res.* 12: 7305-7315.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78: 143-149.
- Konieczny, A. and F. A. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Lagercrantz, U. (1998) Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 150: 1217-1228.
- Lee, Y. K., Y. H. Yoon, I. S. Chung, J. S. Lee, S. J. Lim, I. G. Song and D. U. Kim. 1996. Analysis of genetic relationship by RAPD technique in *Allium sativum* L. *Korean J. Breed.* 28(3): 332-341.

- Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Mackill, D. J. et al. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- Money, T. et al. 1996. AFLP-based mRNA finger printing. *Nucl. Acids Res.* 24: 2616-2617.
- Moon, E. and R. Wu. 1988. Organization and nucleotide sequence of genes at both junctions between the two inverted repeats and the large single-copy region in the rice chloroplast genome. *Gene* 70: 1-12.
- Moon, E., T. H. Kao and R. Wu. 1988. Rice mitochondrial genome contains a rearranged chloroplast gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 213: 247-253.
- Nam, S. H., J. W. Yu, B. C. Kang and B. D. Kim. 1997. Selection of parental lines for hot pepper mapping population using RFLP and AFLP analysis. *한국원예학회지.* 38: 693-697.
- Ohri, D., R. M. Fritsch and P. Hanelt. 1998. Evolution of genome size in *Allium* (*Alliaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 210: 57-86.
- Pich, U., R. Fritsch and I. Schubert. 1996. Slosely related *Allium* species (*Alliaceae*) chare a very similar satelliter sequence. *Pl. Syst. Evol.* 202: 255-264.
- Pooler, M. R. and P. W. Simon. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. *Euphytica* 68: 121-130.
- Qi, X. and P. Lindhout. 1997. Development of AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* 254: 330-6.
- Ridout, C. J. and P. Donini. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends Plant Sci.* 4: 76-79.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Rohlf, F. J. (1993) NTSYS-pc numerical taxanomy and multivariate analysis system. version 1.70. Exeter Pub., Setauket, NY.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.

- Satoh, Y., M. Nagai, T. Mikami and T. Kinoshita. 1994. Use of mitochondria DNA polymorphism in the classification of individual onion plants by cytoplasmic genotypes. *JARQ* 28(4): 225-229.
- Sokal, R. R. and Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systemic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409-1438
- Tashiro, Y., T. Oyama, Y. Iwamoto, R. Noda and S. Miyazaki. 1995. Identification of maternal and paternal plants of *Allium wakegi* araki by RFLP analysis of chloroplast DNA. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63(4): 819-824.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25: 4876-82.
- Ullrich, H., K. Lattig, A. Brennicke and V. Knoop. 1997. Mitochondrial DNA variations and nuclear RFLPs reflect different genetic similarities among 23 *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant Mol. Biol.* 33: 37-45.
- Vos, P. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wilkie, S. E., P. G. Isaac and R. J. Slater. 1992. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497-504.
- Wu, J., K. V. Krutovskii and S. H. Strauss. 1998. Abundant mitochondrial genome diversity, population differentiation and convergent evolution in pines. *Genetics* 150: 1605-1614.
- Yang, Y. W., K. N. Lai, P. Y. Tai and W. H. Li. 1999. Rates of nucleotide substitution in Angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other Angiosperm lineages. *J. Mol. Evol.* 48: 597-604.
- van Treuren, R., H. Kuittinen, K. Karkkainen, E. Baena-Gonzales and O. Savolainen. 1997. Evolution of microsatellites in *Arabis petraea* and *Arabis lyrata*, outcrossing relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* 14: 220-229.