

綜 說

식물유전 및 육종학 연구에서의 분자생물학적 마커기술의 이용

이주경, 홍순관, 김남수
강원대학교 농업생명과학대학

Utilization of Molecular Markers in Plant Genetics and Breeding

Ju-Kyong Lee, Soon-Kwan Hong and Nam-Soo Kim
Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture
and Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon, Korea, 200-701

ABSTRACTS

The understanding on the plant genome is accelerated with the fast advance of molecular biological techniques. The molecular dissecting of the plant genome has made possible the precise genotyping the plants, which can be utilized for molecular breeding program. As well, the molecular cloning of genes interested can facilitate the process of gene transfer between intra- and inter-generic taxa. Moreover, the manipulation of the agronomically important QTL genes, which can be rarely performed by the conventional genetic methods, is also possible by the utilization of molecular markers. In addition to these genetical applications, molecular markers are useful in the areas of plant taxonomy and management of germplasm by fingerprinting analysis. This paper describes the theoretical aspects marker technologies and practical applications of each marker technique.

Key words : plant genome, molecular markers, QTL, molecular breeding, molecular cloning

서 언

불과 수년전까지만 해도 식물유전학에서는 조밀한 유전자지도를 작성하고 또 유전적 마커를 이용하여 특정 형질에 대한 육종적 조작은 거의 기대할 수가 없을 정도로 미약하였다. 형태적인 마커를 이용한 유전자지도는 옥수수나 토마토 등의 극히 일부의 작물에서 이용되었으나, 이외의 작물에서는 거의 작성되어 있지 않았다. 특히, 목본류의 식물 등에 있어서는 이들 식물의 생활환이 길고 형태적인 마커의 수적인 제한으로 인하여 유전연구에 많은 제약이 있었다. 생화학적인 방법으로 동위효소를 이용한 표식유

전자의 개발은 분자생물학적인 마커기술이 개발되기 이전에 상당히 많은 가능성을 제시하는 마커기술이었으나, 최근에는 분자유전학적인 기법의 발달로 인하여 동위효소의 이용은 그렇게 활발하지 못한 실정이다. 분자유전학적인 마커기술로서 첫 번째 개발된 방법은 제한효소단편다형화 현상(RFLP; restriction fragment length polymorphism)이다(Bostein 등, 1980). 이 방법은 기존의 표현형적 또는 생화학적 마커들과는 비교가 되지 않을 정도로 많은 대립유전자를 검정할 수 있으므로 많이 이용되고 있다. 또한 DNA 연쇄 증합반응의 발견(Mullis 등, 1986)과 자동연쇄증합반응기의 발명으로 식물 유전자의 마커기술의 진보가 상당히 빠르게 진척되고 있다. 따라서, 본 논문에서는 분

자 유전학 마커기술의 최근의 진보와 함께 마커를 이용한 유전 및 육종학 연구에 대해서 논의하여 보고자 한다.

유전학적 마커의 정의

유전학 연구에서 마커라 함은 특정한 형질과 밀접히 유전적으로 연관이 되어 있어서 마커 출현의 가부에 따라 연관된 형질의 발현을 유추할 수 있는 지표를 지칭한다. 따라서, 마커는 특정형질 발현에 관여하는 그 유전자 자체일 수도 있는데, 이 경우는 완전연관이라 할 수 있다. 그러므로 특정 유전자와 마커간의 유전적 거리가 가까우면 가까울수록 분석하고자 하는 형질의 발현정도를 유추하는데 정확도가 높아진다. 유전학적인 용어에 1 cM이란 100개의 생식모세포(gametocyte)중 1개의 생식모세포에서 유전자간의 교차가 일어나서 비양친형(recombinant type)의 생식모세포가 나올 확률의 거리에 있는 두 유전자간의 거리를 의미하는 것으로, 두 유전자간의 거리가 멀면 멀수록 교차가 일어날 확률이 높으므로 유전적인 거리 또한 멀어지게 되고 50cM 이상의 거리에 위치한 두 유전자는 유전적으로 연관되어 있지 않다고 할 수 있다. 통상의 경우 진핵생물의 세포에는 5만에서 10만개 정도의 단백질이 발현된다고 한다. 진핵생물의 DNA 염기의 수는 수천만에서 수십억개 정도의 DNA 염기로 되어져 있으며, 각각의 염색체도 수백만 bp에서 수천만 bp에 이르므로 대체로 생물의 종이나 유전자들의 염색체내의 위치에 따라 다르지만 1 cM은 대개 20만에서 40만 bp정도로 보고 있다. 이들 유전자들의 염색체 내에서의 위치를 밝히고, 각 유전자들간의 상대적거리를 조환가에 의하여 측정하고, 실제적 거리를 결정하는 일이 바로 유전학의 중심적인 연구로서 근간에는 중요한 작물들을 중심으로 계통의 연구가 매우 활발하여 애기장대(*Arabidopsis*), 벼, 보리, 옥수수, 토마토 등의 경우는 상당히 조밀한 유전자 지도가 완성 되었다.

식물유전 및 육종학 연구에서 마커의 응용

- 유전자 지도의 작성 -

Mendel이 1800년대 후반에 완두의 유전형질의 분리

현상을 보고한 이후 수많은 생물에서 유전자들이 분리·동정되었고, 이들의 유전양상에 따른 유전자들의 연관에 기초한 지도가 작성되어졌으며, 식물에서는 옥수수와 토마토에서 1930년대 초에 이미 이러한 현상에 대해서 연구되었다(Emerson 등, 1935; Mac Thur, 1934). 따라서 많은 식물유전학자들은 유전자지도를 응용하여 식물이나 작물의 개량에 적용시키기 위한 노력을 끊임없이 시도하여 왔다(Tanksley 등, 1989). 하지만, 생화학적인 마커들이 등장하기 이전까지는 유전자지도에 사용된 마커들은 표현형적인 마커들로서 이들의 숫자는 극히 제한적인 것이었다. 그러나, 생화학적 또는 분자생물학적 마커기술의 진보에 의해 근래의 식물의 유전자 지도는 수백개의 마커가 포함된 유전자지도의 작성이 가능하게 되었다(Causse 등, 1994; Helentjaris, 1987; Kurata 등, 1994; Landry 등, 1987).

- 특정 유전형질의 염색체 위치 결정과 유전자의 클로닝 -

유전자지도를 바탕으로 유전자를 클로닝 할 수 있다는 가설이 제창되었을 때 까지만 해도 분자 유전자지도를 작성하는데는 많은 시간과 노력이 들었으나 최근에는 여러 가지 분석기법의 발전으로 상황이 상당히 호전되어 유전자 지도가 작성되어 보고된 식물체 만도 30여종에 이르며, 유전자 지도를 기초로 특정형질의 염색체 위치를 밝히는 것은 이미 보편화 되어있다(Martin 등, 1991; Michelmore 등, 1991; Tanksley 등, 1995; Waugh 등, 1992). 특정 유전자의 마커를 개발하는 기법으로는 세가지가 있는데, 첫번째 방법은 근동질계통(NIL, near isogenic lines)을 이용하는 방법으로 이 방법은 분석하고자 하는 형질이 상이한 두 계통을 교잡한 후 그 후대에 계속 한쪽친을 여교잡하는 방식으로 교배 후 선발을 하는 방법으로 계산상으로는 5회정도의 여교잡과 선발에 의해서 약 97% 정도의 유전자형이 동질이며 나머지 3%정도의 유전자형이 서로 다른 두 계통을 육성 할 수 있다.

따라서 분석하고자 하는 농업형질은 서로 다르나 나머지의 유전자형은 거의 동질인 계통을 육성하면 이들간의 근동질계통이라 할 수 있으며, 근동질 계통들간에 서로 다른 분자마커를 찾는다면 이들은 원하는 형질과 상당히 근접하여 연관된 분자마커일 가능성이 높은 것이다.

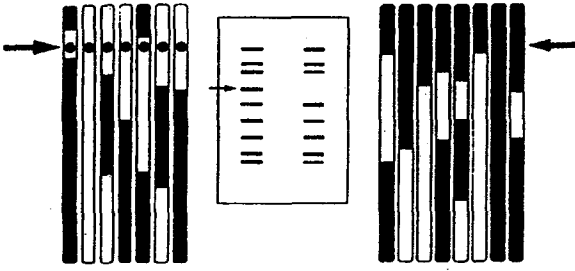


Fig. 1 Schematic representation of Bulk Segregation Analysis (BSA). Chromosomes from several individuals selected for the phenotypic expression of a gene of interest (dark arrows, black dots), and from several individuals selected for the lack of expression of the gene (small arrow). Genomic segments derived from one parent are shown in gray, and from the other parent in white. An agarose gel showing a RAPD polymorphism between the DNA bulk derived from the expressing individuals (left gel lane) and the DNA bulk derived from the nonexpressing bulk (right gel lane) is represented in the center of the figure. The only polymorphism detectable between the two gel lanes (small arrow) is the amplified fragment derived from the genomic region linked to the gene of interest.

Martin 등(1991)은 토마토의 *Pseudomonas*에 저항성과 이병성인 근동질계통인 토마토 계통들을 RAPD 법으로 분석한 결과 7개의 다형화현상을 보이는 분자표식을 찾아서 이들을 다시 F₂의 각 개체와 연결하여 분석한 결과 2개의 마커는 *Pseudomonas*의 저항성 유전자 *pto*와 상당히 밀접하게 연관되어 있음을 밝혔다. 그리고, 또 한가지 방법은 특정 형질에 대해서 표현형을 달리하는 두 식물체를 교배한 후 F₂의 분리 집단을 작성하고 특정형질에 대해서 같은 표현형을 가지는 F₂ 식물체들의 DNA와 이에 대립되는 형질을 가진 F₂ 식물체들의 DNA를 따로 섞어서 이들의 DNA를 분석하는 BSA(bulked segregant analysis)기법으로서 Michelmore 등(1991)은 이와 같은 방법으로 상추의 흰가루병 저항성 유전자들을 쉽게 찾아내었다 (Fig. 1). 그리고, 마지막 방법으로는 고밀도 유전자를 이용하여 특정 유전자지도를 클로닝하는 방법이 있다.

- 양적유전형질의 Mendelian 유전법칙으로의 이해 -
농업적으로 유용한 형질들중 많은 것들은 이들 형질발현에 관련하고 있는 유전자가 여러개이며, 각 유전자들의 형질발현 기여도가 다른 양적인 형질들이

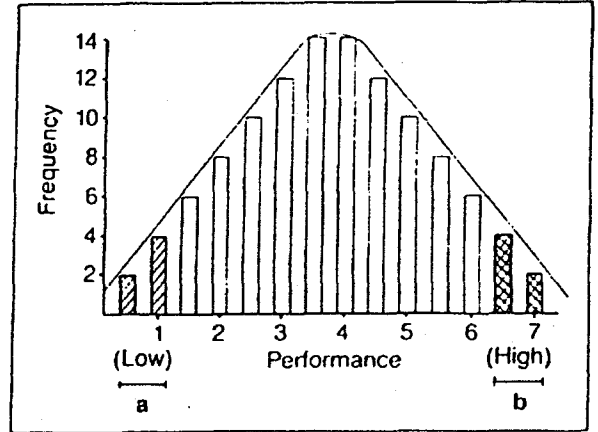


Fig. 2 Schematic representation of a quantitative trait controlled by a polygenic system and exhibiting continuous variation. (Frequency = the number of individual genotypes; Performance = phenotypic score, i.e. the performance of the quantitative trait under study.) In order to identify molecular markers linked to the genetic loci controlling the trait, DNA from the six individual genotypes identified in the 'tails' of the distribution (a and b) are pooled to form a bulk. The bulked samples are screened with molecular markers and putative markers linked to the quantitative trait quickly identified. The segregation of these molecular loci are then monitored in each individual genotype and the intensity of linkage between the marker and the quantitative trait established.

대부분이다. 따라서, 이러한 양적 형질들은 집단내에서 연속적인 변이를 보이며 경우에 따라서는 개체간에 명확한 표현형을 구별하기가 쉽지가 않다. 이러한 양적 형질들의 경우 종래의 유전분석 방식으로는 염색체의 위치를 동정하기가 거의 불가능 하였다. 하지만, 분자유전학적인 마커의 응용으로 이들 양적인 형질들의 유전양상을 Mendelian 유전방식으로 이해를 하며, 나아가서는 이들의 염색체내의 위치를 결정할 수 있다(Lander와 Botstem, 1989; Wu, 1996; Zheng, 1993). 즉 양적인 형질발현이 서로 상당히 상이한 두 계통을 교배하면 F₂분리 집단에서는 연속적인 변이를 나타내며 각 형질들의 출현율은 이항분포의 양상을 보이게 된다(Fig. 2). 따라서, 이때 가장 극단의 형질을 보이는 두 집단의 개체들을 앞에서 기술한 BSA분석법으로 분석하고 이 두 집단간의 차이를 보이는 마커들의 염색체내의 위치를 결정하게 되는 것이다 (Waugh와 Powell, 1992). 이론상은 기술한 바와 같으나 실제적인 분석의 경우는 QTL-Mapping PC Program

들이 개발되어 있어 컴퓨터에 의해 자동적으로 계산 되어 진다(Lander 등, 1987).

- 식물육종시 선발의 지표로서 활용 -

지금까지 식물의 육종에서 특정형질을 가진 식물체를 고정하기 위해서는 표현형 또는 병리학적인 마커들을 이용 선발하여 왔다. 하지만, 이러한 표현형 마커들은 환경의 영향이나 유전자들의 상호작용에 의해 발현이 조절되어 정확한 진단이 어려운 경우가 많았으며, 경우에 따라서는 이들 표현형질이 식물의 후기에 발현되어 발현될때까지 식물을 생육시켜야 하는 번거로운 점들이 있었다. 하지만, 분자마커를 이용하는 경우는 식물체를 진단하는 경우에 환경의 영향을 배제할 수 있어서 분석하고자 하는 식물체의 유전자형을 정확하게 진단할 수 있으며, PCR을 이용한 마커의 경우는 극히 소량의 DNA를 사용하여 분석이 가능하므로 생육의 초기에 약간의 식물조직에서 DNA를 분리하여 분석할 수 있으며, 조기선별이 가능하여 불필요한 식물체들을 초기에 도태시킴으로써 많은 노력의 절감을 가져온다. 실제적으로 1cm²의 leaf disc에서 추출한 DNA로 100회 이상의 RAPD분석을 할 수 있다(Lee 등, 1994). Rafalski와 Tingey(Rafalski와 Tingey, 1993)는 식물의 육종연구에 있어 식물체의 유전자형 진단에서의 분자마커들의 이차 선발의 효율을 향상시키기 위해 컴퓨터를 이용

한 자료의 자동화를 역설하고, 마커를 이용한 식물육종의 일련의 과정을 설명하였다(Fig. 3).

- 작물내 또는 작물간의 유전적 근연관계의 확립 및 식물분류에 응용 -

종래의 식물분류에서는 식물체간의 비교는 주로 식물체들의 여러가지 식물학적 표현형 특성에 따라 분류를 하여왔다. 하지만 이들 표현형질들은 이미 앞에서 기술한 바와 같이 환경의 영향에 의해 표현형질의 발현이 조절되는 경우가 있다. 그리고 어떤 유전형질의 경우는 단일 유전자에 의해 결정되지만, 어떤 유전형질의 경우는 몇 개의 유전자가 상호작용에 의해 결정되는 경우도 있어서 이들 표현형질들을 분류의 지표로 사용하는데 동일한 가중치를 부여하여 분류하는데 있어 정확한 진단을 하기가 어려운 경우가 많이 있다. 하지만, 환경의 영향을 배제할 수 있는 분자마커들을 이용하는 경우는 대부분의 이들 마커들

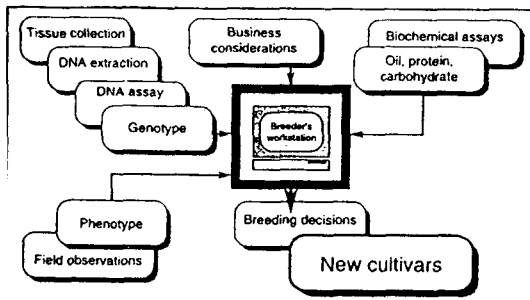
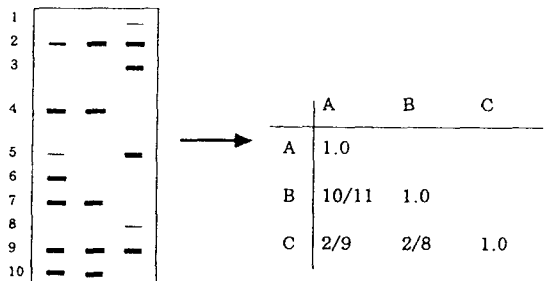


Fig. 3 Information flow in marker-assisted plant breeding. When a breeder considers to develop new cultivars with the aid of molecular markers, he must compile information on the agronomic phenotypes from field observation, genotypes from molecular markers, biochemical traits, as well as business aspects of the cultivars to be developed in his workstation before breeding decision.



	A	B	C
A	1.0		
B	10/11	1.0	
C	2/9	2/8	1.0

Fig. 4 Comparison of two methods of quantifying molecular marker data. For simplicity, only a small number of 'major' fragments are illustrated as heavy bands, and minor fragments (up to an arbitrary limit) are used as the positional basis for comparison (denominator), and minor fragments are counted (in the numerator) if they match a major fragment. In the composite method, major and minor bands are all assigned to the position closest to that of the grid used.

이 세포 내에서의 기능이 알려져 있지 않은 무명의 DNA 단편들이므로 이들간에 동일한 가중치를 부여 하는데 무리가 없다. 품종간의 유연관계를 밝히는 기본적인 논리는 Fig. 4에서 자세히 설명하고 있다. Sharma 등(1995)은 렌틸콩의 야생종과 재배종 27종의 식물을 RAPD 기법으로 분석하여 이들의 유연관계를 구명하였으며, Becerra 등(1994)은 강낭콩들의 재래종과 육성종, 그리고 외래의 수도품종들을 RFLP와 RAPD 기법을 이용 분석하였으며 이들의 유전적 다양성과 근연성을 조사한 결과 표현형질중의 하나인 종실의 모습에 따른 구분과 분자마커들을 이용한 구분이 잘 일치함을 보여 주었다.

- 식물 유전자원의 평가 -

현재 우리가 재배하고 있는 작물들은 오랜기간동안 재배를 거치면서 거듭된 선발에 의해 유전적인 다양성이 상당히 좁아져서 환경적으로 조금만 스트레스를 받아도 그에 대한 대처 능력이 제한적이 되어 있어서 큰 피해를 입게 된다. 하지만, 재배되지 않은 많은 야생의 근연식물체들이나 인간에 의해 비선발되어 그냥 농가에서 보존되어져 오고있는 재래종들에는 아직도 이와 같은 환경의 변화에 적응할 수 있는 유전자를 가진 것들이 많이 있다. 따라서, 이러한 유전자원들의 중요성이 인식되어 현재에는 각 나라마다 유전자원의 수집에 큰 관심을 가지고 유전자 은행이나 종자은행을 설치하여 유전자원을 관리하고 있어서 매년 새로운 유전자원들을 농가나 야생으로부터 수집하고 있다. 하지만, 이러한 방대한 양의 수집종들을 몇가지의 가시적인 형질들로 분류하여 저장하고 재배하여 증식시키고 있으나 이들 중에는 상당한 양의 유전자원의 분류가 잘못되어서 중복되어 있다. 실제로 Virk 등(1995)은 필리핀의 국제미작연구소에서 보유하고 있는 수도품종 또는 계통들을 분자마커들로 분석한 결과 그곳에서 보유하고 있는 상당량의 유전자원이 중복되어 있음을 보고하고 있다. 또한 타식성 식물의 경우는 수집해 올 당시에는 유전적 조성이 고정되어 있지 않은 상태로서 이들의 유전적 순도를 검정하는 것에도 상당히 유용하게 이용되어질 수 있다.

- 핵산지문(DNA fingerprinting)에 의한 식물체의 동정 -

핵산지문에 의한 특정 개체의 감별은 이미 인간 유전학이나 가축의 유전학에서는 보편화되어 사용되고 있으나, 식물에서는 아직 보편화되어 있지는 않다. 하지만 앞에서 기술하였듯이 특정한 유전자원의 중요성이 크게 부각되고 있는 요즘 특정한 유전자 조합을 가진 식물체를 특허권을 획득하여 이들을 보호할 필요가 있으며, 실제로 육종가들은 자기가 특별히 육성한 유전집단에 대해서 보호를 받고자 한다. 이러한 목적에서도 분자마커들은 잘 응용될 수 있다. 가령 예를 들면, 자식성 작물의 경우 RFLP의 각 분자표식마다 2개의 대립유전자가 있다고 가정하고 각각의 출현율이 0.5라 한다면 20개의 자식계통을 구별하기 위해서 20개의 probe를 사용한다면 99%정도의 정확성으로 각 개체를 구별 할 수 있다(Landry와 Michellmore, 1987). 하지만, microsatellite 분석으로는 대립유전자의 수가 RFLP보다 월등히 높으므로 분석하는 횟수를 줄이고도 보다 확실한 분석이 가능하며, Cregan 등(1994)에 의하면 96개의 다양한 대두품종을 구별하기 위해서는 15개의 microsatellite loci의 분석에 의해 가능하였다고 한다.

- 기타 -

앞에서 열거한 응용이외에도 분자마커는 여러 가지 면에서 식물유전학과 육종학 연구에 응용될 수 있다. 현재 재배되고 있는 작물들은 처음에는 아주 먼 공통의 조상으로부터 유래되었는데 분자마커를 이용하여 이들의 비교 유전자지도를 작성 분석함으로써 이들의 진화를 구명하고 계능의 구성을 연구할 수 있다(Ahn와 Tanksley, 1993; Kurata 등, 1994b). 또한, 재배되고 있는 작물의 형질을 개량하고자 야생 근연종의 유전물질들을 도입할 경우 이들 야생의 유전물질을 추적하고 분석할 필요가 있는데, 이때에도 야생 유전물질에 특이한 분자표식을 이용하여 이들을 효과적으로 추적하고 관리할 수가 있다(Kim 등, 1992).

식물유전학에서 마커의 종류

PCR을 응용한 분자생물학적인 기구와 기법의 발전으로 초기에 RFLP 기법에 더하여 수많은 유전자 기법이 개발되어 식물의 계능분석에 이용되고 있다. PCR을 이용한 마커분석법으로는 RAPD(Random

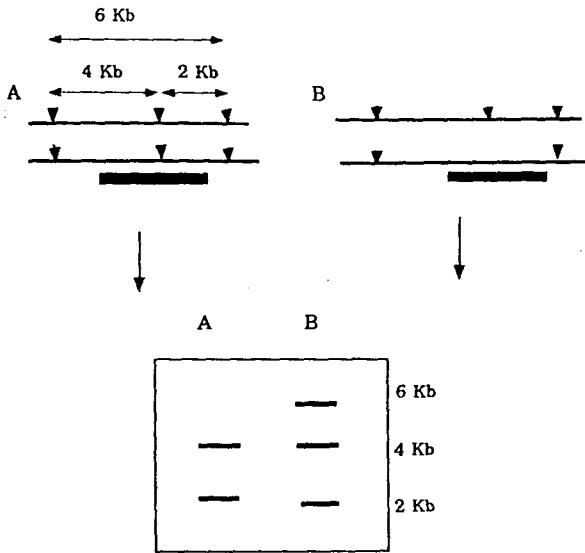


Fig. 5 The schematic illustration of RFLP. The triangles designate recognition sites of a restriction enzyme in homologous chromosomes. The black bar is a molecular probe to hybridize on the corresponding chromosomal site. The individual A is a homozygote of the 4 Kb and 2 Kb fragments. However, the internal restriction site of a homologous chromosome in individual B was mutated so that the restriction enzyme could not recognize this site anymore. Therefore, the Southern hybridization will produce 6 Kb, 4 Kb, and 2 Kb fragments (heterozygote for the internal restriction site).

Amplified Polymorphic DNA), SSR(Simple Sequence Repeat 또는 Microsatellite), CAPs(Cleavable Amplified Polymorphic Sequences), AFLP(Amplified Fragments Length Polymorphism), ISA(Inter-SSR Amplification) 등의 기법이 있으며, 이들은 분석하는 연구자에 따라 이외에도 조금씩 다른 이름으로 불리기도 한다.

- RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) -

분자유전학적인 마커기법중에서 가장 먼저 개발된 방법으로서 이 방법은 Southern blot hybridization 기법을 응용한 방법이다. 즉, 먼저 분석하고자 하는 식물체들의 게놈 DNA를 추출하고 이들을 몇가지 (통상 5-6가지 정도)의 제한효소로 절단 후 agarose 겔로 전기영동하여 분리된 DNA 단편들을 nitrocellulose membrane 또는 nylon membrane에 이전 시킨 후 이미 클로닝된 단편을 동위원소나 biotin 등의 비동위원소로 표식하여 probe를 제작하고 이를 위의 nitrocellulose

membrane 또는 nylon membrane에 붙여져 있는 제한효소 단편들과 분자교잡을 시킨다. 이때 어느 두 식물체간에 제한효소가 인지하는 부위등이 돌연변이로 이동되었거나 소멸되었을 경우 두 식물체는 제한효소 단편의 다형화 현상이 나타난다(Bostem 등, 1980; Wyman와 White, 1980)(Fig. 5). 이 방법은 식물 계통의 연구에서 지금까지 가장 많이 사용되어진 방법으로서 가장 뛰어난 장점은 재현성이 월등하다는 점이다(Landry와 Michelmore, 1987; Law, 1995; Stuber 등, 1992).

하지만, 이 방법은 실험을 진행하는 절차가 복잡하고 다량의 DNA가 필요하며 분석을 하기 위해서는 꼭 클로닝된 DNA단편들이 필요하다는 단점이 있다 (Waugh와 Powell, 1992).

- RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) -

RAPD분석은 William 등(1990)과 Welsh & McClelland (1990)에 의해 개발된 방법으로서 염기의 수가 9-10 개 정도되는 oligonucleotide를 primer로 사용하여 식물체의 게놈 DNA를 무작위로 PCR증폭후 증폭된 산물을 전기영동하여 분석하는 방법으로 분석절차가 아주 간편하여 최근 수년간 많은 실험실에서 사용하고 있는 방법이다(Rafalski 등, 1991; Waugh와 Powell, 1992; Williams 등, 1993). 이때 나타나는 다형화 현상은 게놈 DNA에서 primer의 접합부위가 돌연변이로 소멸되었거나 primer의 접합 부위간의 길이가 돌연변이에 의해 변했을 경우 등이다(Fig. 6). 게놈 DNA가 PCR반응시 성공적으로 증폭되려면 증폭이 가능한 거리(대개 2Kb 이하)에서 primer가 주형의 DNA가닥에 서로 안쪽 방향으로 접합이 되어야 한다. 따라서 10개의 염기로 구성된 10mer primer는 이론상 410bp 정도 마다 한 번씩 접합부위가 나타날 수 있으므로 진행생물의 염색체들은 보통 수백내지 수천만개의 염기로 이루어져 있어서 수백개 정도의 접합부위가 나타나게 된다. 이때 이들 접합부위가 증폭가능한 거리에서 접합방향이 맞으면 증폭이 되는데 통상 고등 식물들의 경우 약 2-15개 정도의 증폭되는 단편들이 나타나고 이들은 각 개체간에 변이가 높고, 주형의 DNA가 아주 소량이 요구되므로 간편하다. 하지만, 이방법은 재현성이 떨어지고 나타나는 마커는 우성으로서 F2 등의 분리 집단에서는 사용을 할 수가 없다는 단점이 있다. 따라서, 재현성을 높이기 위해서

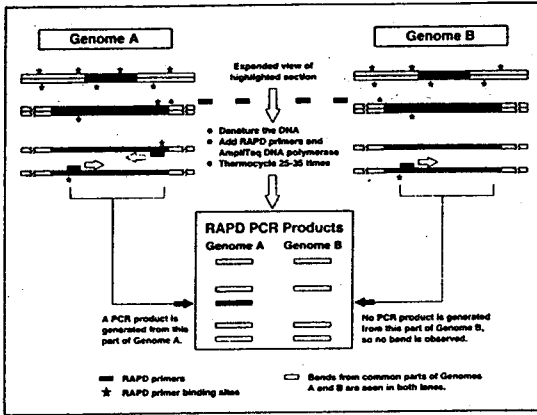


Fig. 6 RAPD PCR Analysis. The above figure illustrates how RAPD PCR analysis can be used to generate DNA fingerprints that allow to distinguish between very similar genomes on the basis of sequence polymorphisms. Genome A has one more RAPD primer binding site (indicated by the stars) than Genome B. The expanded view shows the genomic region containing the two RAPD primer binding sites for Genome A and the single RAPD primer binding site for Genome B. In PCR, RAPD primers will bind to the two sites in Genome A, extension will take place, and a PCR product will be produced. No PCR product will be produced from genome B in the same region because Genome B has only one RAPD binding site there. Identical PCR products will be produced for the two genomes from the other regions where they have identical RAPD binding sites (see top, unexpanded view). After PCR and gel electrophoresis, one additional PCR product will be seen from Genome A as compared with genome B and this allows the two genomes to be distinguished from each other. This approach can effectively differentiate genome that have very minor sequence differences and has the advantage of requiring no prior knowledge of the sequences of the genomes being compared.

는 PCR primer를 선발시 3회 이상 재현이 되는 밴드들만을 골라서 마커로 선발하고 선발된 RAPD마커들은 클로닝 후 sequencing을하여 양끝 말단 염기서열을 가지고 primer의 길이가 약 20mer 정도가 되도록 primer를 제작하여 STS(sequence tagged sites)로 전환하여 PCR증폭을 하면 클로닝된 probe와 같이 재현성이 뛰어나서 다른 실험실에 분주도 할 수 있고, 또한 이 STS마커는 공유성으로서 이형접합의 식물체도 분석이 가능하므로 F₂ 집단의 분석도 가능하다. Paran 와 Michelmore(1993)는 상추에서 8개의 흰가루병 저항성 RAPD마커들을 클로닝 후 sequencing하여

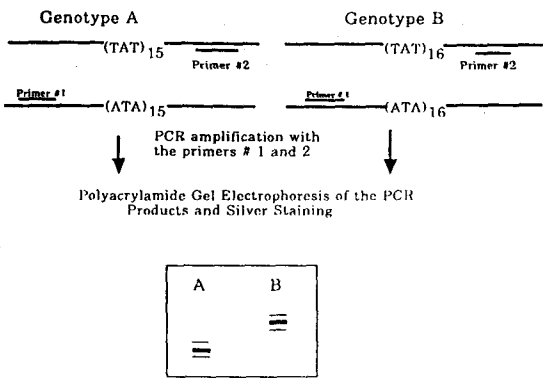
STS마커로 전환하여 보다 재현성있는 마커로 전환하였는데 그들은 이러한 STS마커를 SCAR(sequence chracterized amplified region)마커라고 하였다.

- CAPs(Cleavable Amplified Polymorphic sequences) -

이 방법은 PCR-RFLP라고도 하며, Konieczny와 Ausubel(1993)이 처음으로 제창한 방법으로 특별한 유전자좌의 DNA를 PCR증폭 후 증폭된 단편을 다시 여러 가지의 제한효소로 절단하여 전기영동후 각 개체간의 차이를 보는 방법이다. 따라서 본 방법은 첫째로 증폭된 단편들의 길이에 의한 차이와 단편내의 제한효소 인지 부위의 염기 차이 등에 의한 다형화 현상등도 관찰할 수 있으므로 현상의 관찰을 증진시킬 수 있다. 하지만, 이 방법에 의한 분석법은 PCR에 의해 증폭되는 amplicon단편의 길이가 2Kb이하로서 제한효소의 수를 많이 사용하여야만 다형화현상을 증진시킬 수 있다. 이때 사용되는 특별한 유전자를 증폭시키기 위한 primer의 고안은 이미 sequence가 발표된 database를 사용하거나 반복수가 적은 cDNA클론등을 sequencing하여 그 primer sequence를 기초로 고안할 수 있다. 또한 RAPD단편들이 다형화 현상을 보이지 않을 경우 이들 단편을 다시 제한효소로 절단하여 분석할 수도 있다. 그리고 PCR증폭 전에 주형의 DNA를 제한효소로 절단하여 PCR증폭을 할 수도 있다.

- Microsatellite 마커(Simple Sequence Repeats, SSR) -

진핵세포 염색체의 도처에 존재하는 아주 간단한 mono-, di-, tri-, tetramer의 motif들이 반복된 microsatellite repeat unit의 차이를 분석하는 방법이다. 식물체의 게놈에는 약 50Kb마다 적어도 한 가지의 이와 같은 microsatellite들이 존재한다(Akkaya 등, 1992; Morgante 와 Olievieri, 1993; Morgante 등, 1994). 이러한 DNA들은 unequal crossing-over 등의 기작에 의해 반복단위의 변이가 아주 심해서 polymorphism에 의한 마커의 개발로는 아주 좋은 소재가 되고 있다(Powell 등, 1996; Wu 등, 1994). 이 방법은 기존에 사용되고 있는 여러 가지 마커기법들 중에서 분석이 가능한 대립유전자의 숫자가 가장 많으므로 특정한 식물체의 fingerprinting을 위해서 상당히 좋은 기법이다. 분석 방법으로는 우선 이들 반복되는 microsatellite의 5'



g. 7 The generation of SSR length polymorphism. Individual A and B are different in the illustrated microsatellite locus by the TAT repeating unit. Therefore, if the DNA sequence is amplified using the flanking primer 1 and 2, in PCR, the two plants will show different sizes of amplified fragments.

3' flanking sequences를 바탕으로 primer를 제작하여 PCR로 이들 flanking primers의 중간에 있는 microsatellite sequence를 증폭한 후 3% metaphore agarose 젤이나 sequencing 젤로 분리하여 각 증폭된 amplicon들의 길이의 차이에 의해 반복단위를 분석한다(Fig. 7). 따라서, 이 방법은 일단 분석을 하기 위해서는 각 microsatellite loci들의 특이한 primer sets를 갖추어야 하는데 이기 위해서는 microsatellite sequence가 풍부한 library 구축하고 이들 각 클론들을 sequencing을 하고 microsatellite sequence들의 flanking sequence를 바탕으로 primer를 제작하여야 하는등 적지않은 자금과 노력 필요하다. 이외에도 microsatellite sequences를 가진 DNA sequences를 이미 발표된 것을 DNA database에서 탐색하여 primers를 고안할 수도 있다. 이 방법은 이와 같이 준비상의 어려움에도 불구하고 일정한 primer sets만 갖추어지면 분석방법이 간단하고 재현성이 아주 높으므로 벼, 옥수수, 콩, 밀 등의 주요 작물에서는 microsatellite를 이용한 유전자 지도작업과 마커 개발에 많은 진전을 보이고 있다(Powell 1996; Rafalski 등, 1996). Microsatellite sequences를 분석하는 방법으로는 이외에도 PCR primer 자체를 microsatellite sequence를 사용하는 ISA(Inter-SSR amplification)기법이 있다(Rafalski 등, 1996). 이 방법 분석 자체는 RAPD와 흡사하나 증폭된 단편들을 분석할 때에는 sequencing 젤을 사용하는데 한꺼번에

다량의 밴드들을 생성하나 이들도 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

- AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) -

본 방법은 RFLP의 재현성과 RAPD의 간편성이 합해진 방법으로서 아주 최근에야 개발된 방법으로서 분석방법자체가 European Patent에 걸려있다(Sharma 등, 1995; Wu, 1996). 분석방법은 우선 분석하고자 하는 주형의 게놈 DNA를 두 개의 상이한 제한효소로(staggering cutters)로 절단 후 절단된 staggered sites에 특이한 adaptors를 ligation시킨 후 adaptor에 특이한 primers들을 가지고 PCR증폭후 sequencing 젤로 분리하고 분석한다(Fig. 8).

이때 사용되는 primers들은 adaptor sequences에 완전히 상보적인 5' 부위의 constant sequences와 3' 부위의 selectable sequence부위로 구성되어 있는데 이때 selectable sequence부위의 염기의 종류는 4가지 종류 중의 어느것이나 가능하여 가능한 primer sets는 무수히 많으므로 각 selectable sequence의 염기구성에 따

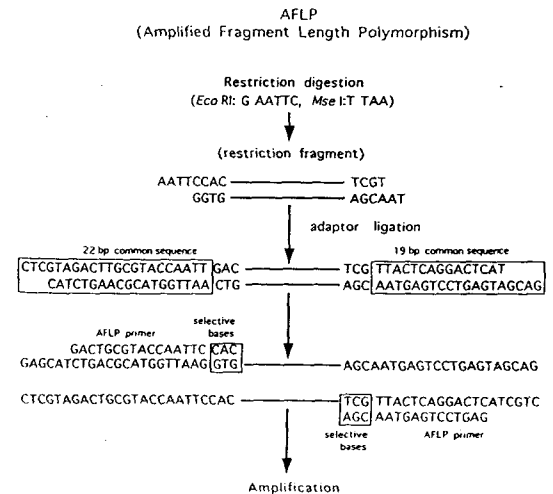


Fig. 8 The generation of AFLP fragments. The genomic DNAs are restricted with a pair of restriction enzymes (this case is *Eco* RI and *Mse* I) and adaptor sequences are ligated on the corresponding staggered ends. Then, the AFLP primers for the adaptor sequences are utilized to amplify the restriction fragments. The AFLP primer consists of the common sequences to the adaptor sequences and selective bases for selective amplification. Depending on the selective bases, different kinds of amplified fragments can be generated.

라 생성되는 DNA밴드들이 달라서 분석 범위가 상당히 넓다. 각 반응마다 생성되는 단편들의 수는 약 50-100개 정도로서 이들은 각 개체간 변이가 아주 심하여 마커개발에 아주 유용하다.

실제로 Lin 등(1996)은 RFLP, RAPD, AFLP 등을 대두의 유전 분리집단에 적용결과 AFLP방법이 가장 유용한 것으로 나타났다.

결 론

식물 유전·육종학 연구는 현재 분자생물학적인 기술의 발전으로 과거에는 상상도 못했던 많은 정보를 분석하고 이를 이용하여 식물의 개성을 보다 폭 넓게 이해할 수 있게 되었다. 즉, 이용하고자 하는 특정 식물체의 유전자형을 정확히 분석하고 이를 이용하여 육종계획을 수립하여 품종의 육성을 할 수 있게 되었다. 또한 분자 유전학적인 마커기술의 개발로 특정한 농업적 형질의 마커를 개발하고 이를 바탕으로 그러한 유전자들을 클로닝하고 더 나아가서는 이들 DNA를 재조합하여 다시 원하는 식물체에 주입하므로써 특정한 유전자형만 바꾸어 형질전환을 시키는 분자유종도 가능하게 되었다. 하지만 이러한 기술적인 진보에도 불구하고 우리가 필요로 하는 많은 농업적 형질들은 유전양상이 복잡한 양적유전의 양상을 띄고 있으므로 이들의 유전자 조작이 필요시 되고 있다. 하지만, 양적 유전자의 유전양식의 이해에는 이제 분자마커들을 이용하여 유전적인 이해가 초기 단계에 있으므로 마커들을 이용한 조기선발 등의 육종적 잇점 등을 생각할 수 있다. 이외에도 분자 마커들은 유전자원의 관리나 분류, 작물이나 식물간의 근연관계 구명, 핵산 지문에 의한 특정 식물체의 동정등 여러분야에서 유용하게 사용되고 있다. 따라서 이미 기술된 여러 가지 마커들중 연구목적에 맞는 마커들을 선택하여 응용하여야 할 것이다. 그렇다면 "위의 여러 가지 방법들 중에서 어느 방법이 각각의 연구자에게 유용한가?" 이것은 답하기가 어렵지만 각 연구과제와 실험을 수행하는 연구자의 실험실의 연구능력에 따라 결정될 수 있을 것이다.

가령 microsatellite분석등은 가장 informative한 방법이긴 하나 개발하는데 상당한 기술과 비용이 든다. 또한 RFLP기법도 상당히 재현성이 있고 많은 연구

결과들이 축적되어 이들을 이용할 수 있지만 이를 위해서는 probe DNA들과 다양한 연구기자재가 필요하며 기술적으로도 상당한 훈련이 필요하다. 이에 비해 RAPD, CAPs, ISA기법들은 분자생물학적인 많은 지식과 기술을 요하지도 않으며 쉽게 수행할 수 있으며 인력이나 장비의 면에서도 많은 것을 요구하지 않으므로 처음 마커기술을 이용한 과제를 수행하는 실험실등에서는 알맞다. 그리고 AFLP법은 처음 수행할 때에는 약간 복잡하나 일단 확립이 되고 나면 상당히 많은 정보를 분석할 수 있다.

인 용 문 헌

- Ahn S. and S.D. Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7980-7984.
- Akkaya M.S., A.A. Bhagwat and P.B. Cregan. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139.
- Becerra Velasquez V.L. and P. Gepts. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* 37:256-263.
- Bostein D., R.L. White, M.H. Skonick and R.W. Davis. 1980. Construction of genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Causse M.A., T.M. Fulton, Y.G. Cho, S.N. Ahn, J. Chunwongse, K. Wu, J. Xiao, P.C. Yu, S.E. Ronald, S.E. Harington, G. Second, S.R. McCouch and S.D. Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on interspecific backcross population. *Genetics* 138:1251-1274.
- Cregan P.B., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat, U. Lavi and J. Rongwen. 1994. Length polymorphism of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. In "Plant Genome Analysis", Gresshoff PM (ed), CRC Press, London.
- Emerson R.A., G.W. Beadle and A.C. Fraser. 1935. A summary of linkage studies in maize. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir.* 180.
- Helentjaris T. 1987. A genetic linkage map for maize based

- on RFLPs. *TIG*. 3:217-221.
- Kim N.S., E.D.P. Whelan, G. Fedak and K. Armstrong. 1992. Identification of a Triticum-Lophopyrum noncompensating translocation line and detection of Lophopyrum DNA using a wheatgrass specific molecular probe. *Genome* 35:541-544.
- Konieczny A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR based markers. *PLant J.* 4:403-410.
- Kurata N.Y., Y. Nagamura, K. Yamamoto, Y. Harrushima, N. Sue, J. Wu, B.A. Antonio, B.A. Shomurax, T. Shimizu, S.Y. Lin, T. Inoue, A. Fukuda, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yoyama, Y. Miyamoto, T. Kirihara, K. Hayasaka, A. Miyao, L. Monna, H.S. Zhong, Y. Tamura, Z.X. Wang, T. Momma, Y. Uemura, M. Yano, T. Sasaki and Y. Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 8:365-372.
- Kurata N., G. Moore, Y. Nagamura, T. Foote, M. Yano, Y. Minobe and M. Gale. 1994b. Conservation of genome structure between rice and wheat. *BioTechnology* 12:276-278.
- ander E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factor underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 124:185-199.
- ander E.S., P. Green, J. Arabhamson, A. Barlow, M. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- andry B.S. and R.W. Michelmore. 1987. Methods and applications of restriction fragment length polymorphism analysis to plants. In "Tailoring genes for crop improvements", Breuning G, Harada J, Kosuge T, Hollarder A (eds). Plenum Press, New York.
- andry B.S., R.V. Kesseli, B. Farrara and R.W. Michemore. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116:31-337.
- aw C.N. 1995. Genetic manipulation in plant breeding-prospects and limitations. *Euphytica* 85:1-12.
- Lee Y.S., C.H. Park, K.Y. Kang and N.S. Kim. 1994. RAPD analyses using rapidly extracted genomic DNAs in plant species. *Kor. J. Breed.* 26:187-293.
- Lin J.J., J.K. Kuo, J.A. Saunders, H.S. Beard, M.H. MacDonald, W. Kenworthy, G.N. Ude and B.F. Matthews. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14:156-169.
- MacThur J.W. 1934. Linkage group in tomato. *J. Genet.* 29:123-133.
- Martin G.B., J.G.K. Williams and S.D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:2336-2340.
- Michelmore R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9828-9832.
- Morgante M. and A.M. Olieveri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-182.
- Morgante M., J.A. Rafalski, P. Biddle and S. Tingey. Olieveri A.M. 1994 Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* 37: 763-769.
- Mullis K., S. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.
- Paran I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downey mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Powell W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *TIPS.* 1: 215-221.
28. Rafalski J.A., S.V. Tingey and J.G.K. Williams. 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgroBiotech News Inf.* 3:645-648.

- Rafalski J.A. and S.V. Tingey. 1993. Genetic diagnosis in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *TIG*. 9:275-279.
- Rafalski J.A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre and S. Tingey. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In "Nonmammalian Genomic Analysis" (eds, Biren B & Lai E), Academic Press. pp75-134.
- Sharma S.K., I.K. Dawson and Waugh R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91:647-654.
- Stuber C.W., S.E. Lincoln, D.W. Wolff, T. Helentjaris and E.S. Lander. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred line using molecular markers. *Genetics* 132:823-839.
- Tanksley S.D., M.W. Ganai and G.B. Martin. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *TIG*. 11:63-68.
- Virk P.S., H.J. Newbury, M.T. Kackson and B.V. Fords-Lloyd. 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 90:1049-1055.
- Voss P., R. Hogers, M. Bleejer, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hotnes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Waugh R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH*. 10:186-191.
- Welsh J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Williams J.G.K., A.R. Kubelick, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Williams J.G.K., J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using RAPD markers. In *Methods in Enzymology: (R Wu ed)*. Vol 218, pp704-740. Academic Press, San Diego.
- Wu R.L. 1996. Quantitative genetic dissection of complex traits in a QTL-mapping pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 93:447-457.
- Wu K.S., R. Jones and L.S. Danneberger. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.* 15:3257-3258.
- Wyman A.R. and R. White. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:6754-6758.
- Tanksley S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Nonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/Tech.* 7:257-264.
- Zabeau M. and P. Voss. 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. *Eur. Pat. App.* 92402629.7 (Publ. Number 0 534 858 A1).
- Zheng Z.B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene affects in mapping quantitative traits loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10972-10976.

(접수일 : 1997년 3월 3일)