

RAPD 마커를 이용한 무의 유전자지도 작성

안춘희 · 최수련¹ · 임용표¹ · 정해준 · 예병우² · 윤화모*
배재대학교 원예학과, 충남대학교 원예학과¹, 원예연구소²

Construction of a Genetic Linkage Map in Radish (*Raphanus sativus* L.) Using RAPD Markers

AHN, Choon-Hee · CHOI, Su-Ryun¹ · LIM, Yong-Pyo¹ · CHUNG, Hae-Joon ·
YAE, Byeong-Woo² · YOON, Wha-Mo*

Department of Horticulture, Paichai University Daejeon 302-735, Korea

¹Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²National Horticultural research Institute, Suwon 440-310, Korea

ABSTRACT Genetic map and molecular marker have a great importance in improving and facilitating crop breeding program as well as in genome analysis and map-based cloning of genes representing desirable characters. This study aimed at developing RAPD markers and constructing a genetic linkage map using 82 BC₁F₁ individuals originated from the cross between '835' and B₂ in radish (*Raphanus sativus* L.). One of the parents for genetic linkage map construction, '835' (P₁) of egg type is susceptible to *Fusarium wilt* and have medium resistance to virus infection and the other parent, B₂ (P₂) of round type, is susceptible to *Fusarium wilt* and virus. Screening of 394 RAPD primers in BC₁F₁ population resulted in selecting 128 polymorphic markers which displayed 1:1 segregation pattern. Two markers failed to display 1:1 segregation and showed the segregation ratio skewed to maternal genotype. Selected markers were categorized into 14 linkage group based on LOD score represented by MAPMAKER/EXP program. Five groups composed of single marker among them were excluded from the linkage map, and consequently, the remaining groups are well matched with the number of radish chromosome (n=9). The linkage map constructed with 128 markers covers 1,688.3 cM and the average distance between markers was 13.8 cM. For developing STS marker, we determined the partial nucleotide sequence of OPE10 marker at both ends and designed a oligonucleotide primer pair based on this sequence. STS PCR using the primer pair displayed a single, clear band of which segregation is perfectly matched with that of OPE10 marker. This implies that RAPD markers could readily convert into clear and reliable STS markers.

Key words : RAPD, DNA marker, linkage map

서 론

무는 십자화과 *Raphanus*속 식물에 속하며 6개 군으로 어

는 것이나 n=9의 동일 계통을 가지고 있다.

무는 고추, 배추, 마늘과 함께 4대 채소의 하나이며 김치의 주재료로서 우리 국민 식생활에 필수적인 중요한 채소이다. 무는 주로 국내에서 소비되고 있고 홍콩과 싱가포르에 일부 수출되고 있으며 가공한 단무지가 독일에 소량 수출되고 있는 실정이다. 그러나 무 종자를 수출하여 획득한 외화는 채소종

*Corresponding author Tel 042-860-4493 Fax 042-860-4599

E-mail hyuns@kribb.re.kr

자 전체 수출액의 약 50~60%를 차지하며 그 중 약 90%가 일본에 수출되고 있다.

무 등과 같은 채소류의 품종육성시 육종 목표의 설정에서부터 시작하여 교배조합의 작성 및 교배, 고정세대의 진전을 거쳐 우량계통을 선발하는 기존 육종법은 여러 단계의 어려운 과정을 거쳐서 이루어지게 되는데 중에서도 특히 선발은 정확성 및 통찰력이 요구되는 중요한 과정으로 육종의 성패가 여기에 좌우된다고 할 수도 있다.

많은 농작물들의 형질은 환경의 영향에 의해 표현형이 변하여 유전형의 식별이 어렵거나 불가능하다. 그러므로, 우량 대립유전자 (allele)가 최대한 집적된 개체를 환경의 영향이나 다른 유전자 작용을 배제하고 선발하는 것은 가장 절실하면서도 어려운 과정이다.

그리고 여러 개의 다른 유전자가 한 가지 형질에 대해 관여할 때, 다른 염색체 부위에 존재하는 유용 allele을 한 계통으로 집적시키는 것 (gene pyramiding)은 극히 가능성이 희박한 것으로 알려져 있다. 또한, 특정형질의 경우 성숙된 후에야 발현되기 때문에 유전형 평가에 장기간이 소요된다 (Melchinger, 1990).

따라서, 작물 육종 과정에서 환경의 영향이나 다른 유전자의 상위효과 (epistasis)를 배제하고 선발의 정확성 및 효율성을 제고하기 위한 방법이 연구되었다. 그 중의 하나는 형태적인 마커와 isozyme 마커를 이용하는 것인데 이러한 마커들은 그 수가 제한되어 있고 대부분이 열악한 표현형을 나타내기 때문에 선발과정에 효율적으로 이용되지 못하였다.

최근에는 분자수준의 마커인 RFLP (Young et al. 1989a, 1989b; Gu et al. 1994)와 RAPD (Kesseli et al. 1994)가 실용화되고 이것이 유용 유전자의 간접선발 지표로 활용될 수 있으면서 그 유용성에 대한 연구가 많이 진행되었다.

분자마커는 환경이나 다른 유전형에 의해 영향받지 않고 특정 유전 형질의 존재 여부를 판정할 수 있을 뿐 아니라 특정 형질이 환경이나 다른 유전자에 의한 상위효과에 의해 영향을 받을 경우에도 마커를 이용하여 특정형질을 가지는 개체를 선발할 수 있으며, 열성유전자에 의해 발현되는 형질의 경우에도 후대분석 없이 분자마커를 이용하여 유묘 상태를 조기선발이 가능하다. 또한, 특정 형질에 연관된 DNA 표지인자를 이용하여 다수의 유전자원에서 특정 형질을 가진 계통을 조사하여 육종에 사용할 재료선발에 이용할 수 있으며 (Haley et al. 1993), 여러 분자마커를 한 번의 반응에서 확인할 수 있기 때문에 선발에 소요되는 시간과 비용을 절감함으로써 효율적인 선발을 할 수 있는 장점이 있고, 선발과정에서 소실될 수 있는 유용 개체의 유전형을 직접 평가하여 선발함으로써 선발의 정확성을 제고시킬 수 있고 다품종 간 차이를 식별할 수 있다 (Thormann et al. 1994; Torres 1993).

이 중에서도 RFLP 방법을 이용시의 probe 확보, 방사성 동위원소 사용 등의 기술적인 제한을 극복하기 위하여 RAPD 마커가 품종에서 새로운 유전자 탐색 방법으로 제시되었다.

PCR은 단 하나의 DNA 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타낼 수 있을 정도로 그 감응도가 높고 (Innis and Gelfand 1990) 소량의 DNA만으로도 수행이 가능하며, 시험 과정이 빠르고 안전하여 대규모 집단의 screening에 효과적인 방법이다 (Tragoonrung et al. 1992).

Williams 등 (1990년)의 임의 단일 (arbitrary single) primer를 이용한 PCR 방법에 의해 개체 간에 변이를 보여주는 분석 결과를 발표함으로써, DNA 염기서열에 대한 아무런 정보가 없이도 개체의 전체 게놈을 대상으로 유전변이 분석이 가능하다는 것이 제시되었다.

RAPD 기법은 유전적 변이 감별, 유전자 지도 작성, 종간의 유전자 흐름의 수준 판정, 모본의 확인 등 이용성이 다양하며 (Roy et al. 1992; Natalia et al. 1992), 옥수수, 콩, 사람, *Neurospora crassa* 및 다수의 박테리아 계통에서 다형성이 확인되었고 (Williams et al. 1990), 양파, 땅콩, 고추, 아스파라거스, 수박, 오이, 멜론, 고구마, 토마토, 앵두, 자두, raspberry, blackberry, 포도 등 다수의 작물에서도 이의 이용성이 증명된 바 있다 (Weeden et al. 1992).

무가 우리나라의 채소작물에서 차지하는 중요성에 비추어 볼 때 이런 생명공학적인 기초 연구가 활발히 진행되어 무의 육종에 유용하게 이용될 수 있는 기반을 제공하여야 할 것이다. 그러므로, 본 연구는 무의 표지인자 개발을 위한 RAPD 분석조건을 최적화하고 이를 이용하여 무의 유전자지도를 작성하여 육종에 활용하기 위한 기술을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 공시된 유전자지도 작성용 식물재료는 노바티스 종묘회사에서 무 위황병 저항성품종 육성을 위하여 시험 중인 '835'와 B₂ 계통 간의 F₁을 '835'에 여교잡하여 얻은 82 개체를 이용하였다.

양친은 재래종 가을무로서 '835'는 위황병에는 약하고 바이러스에는 중강 정도이며 근형은 계란형인 데 반하여, B₂는 위황병에는 강하고 바이러스에 약하며 근형은 원통형인 특성이 있다.

Total DNA 추출 및 PCR

Total DNA를 분리, 정제는 Chen과 Delaporta (1993)의 방법과 예 (1994)의 방법에 준하여 하였다.

PCR 반응은 4800 (Perkin-Elmer, USA)을 사용하여 template DNA 40 ng, Taq polymerase 0.8 unit, primer 20 ng, dNTP 100 μM의 조성으로 5분간 denaturation한 다음 94°C에서 1분, 37°C에서 1분, 72°C에서 2분간을 50 cycle로 반복하였다.

Random primer의 종류에 따른 예비 검증

유전자지도 작성을 위한 마커 개발 및 분리세대 분석을 위한 재현성 있는 마커를 개발하기 위하여 우선 많은 종류의 primer를 이용하여 양친간 다형화 밴드를 찾고자 하였으며, 이렇게 1차적으로 다형성을 보인 primer를 양친과 F₁ 개체에 대해 2차 분석하여 반복성이 있는지 확인하였다.

Ten-mer random primers는 Operon Technologies와 University of British Columbia의 제품을 이용하였다. Operon사의 제품은 OPA, OPB, OPC, OPD, OPE, OPF, OPG, OPH, OPI, OPJ 및 OPK의 11 set에서 각 set마다 20종씩, 총 220종의 primers를 이용하여 시험하였고, University of British Columbia사의 제품은 UBC 301부터 425까지 총 125종의 primers를 이용하였다. 또한, Wako사의 12-mer primer도 이용하여 시험하였는데, WA-1 set 12종, WA-3 set 5종, WA-4 set 12종, WB-4 set 9종 및 WB-5 set 3종 등 총 49종을 이용하였다.

RAPD 분석을 이용한 연관군지도 작성

RAPD 분석을 수행하여 찾아진 밴드가 BC₁F₁ 분리 집단에서 안정적으로 유전되는지, 멘델의 분리비에 적합한지의 여부를 확인하였고, 연관 검정 및 연관군 지도 작성을 위하여 BC₁F₁ 집단 82개체와 양친을 동시에 RAPD 분석한 후 전기영동하여 각 개체의 유전형을 scoring 하였다.

BC₁F₁ (P₁) 집단에서 각 개체의 유전형은 '835' (P₁) homozygous한 개체와 heterozygous한 개체로 분리되리라 예상되었으며, 따라서 B₂ (부계) 특이 밴드를 가지는 개체는 이형 접합체로 판단하여 "2"의 지수를 주었으며, 밴드를 가지지 않는 개체는 '835' (모계)와 동일한 유전형으로 "1"의 지수를 주었다.

RAPD 결과 나타난 다형성 밴드 가운데 우성으로 표현된 마커들을 수치화 (2)하여 컴퓨터 프로그램 MAPMAKER/EXP (ver. 2.0)을 이용하여 (Lander et al, 1987) LOD > 4.0, 조환가(theat)=0.25의 group 명령어로 연관된 일군의 마커들을 분리하였고, 공분리 하는 마커들 중 한 마커만을 기본 유전자지도에 위치시킨 후 프로그램의 order와 compare 명령어, rearrange 기능을 이용하여 정확한 마커의 배열순서를 결정하였으며, 그 배열순서를 확인하기 위하여 ripple 명령어를 이용하였고, ripple시 LOD > 2.0인 경우에만 기본 분자유전자지도 상에 위치시켰고, 새로운 마커를 첨가할 때에는 try 명령어를 이용하여 대략 위치를 결정한 후 계속 마커를 붙여갔다. 연관거리는 Kosambi (1944)의 계산 방법에 의한 cM으로 하였다.

STS 표지개발 및 RAPD표지와 연관분석

교배모본 사이에 polymorphism을 보이고 유전자지도에 포함된 RAPD 분자표지 중에서 OPE10 primer를 이용하여 나타난 PCR product를 STS 표지로 전환하였다. PCR 증폭 후 특이적으로 나타나는 DNA 단편을 잘라내어, QIAGEN의 gel elution kit를 이용하여 DNA를 순수 분리한 다음 pGEM-Easy Vector (Promega)에 cloning하였다. Accu Prep Plasmid Extraction Kit (Bioneer)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하고, Thermal Cycling Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia Biotech)를 이용하여 분석한 염기서열로 STS분자 표지개발을 위한 primer를 제작하였다.

PCR반응은 총 반응액을 25 μ L로 하여 template DNA 40 ng, primer 50 pmole, dNTP (Promega) 200 μ M, Taq DNA polymerase 0.8 units으로 하였으며, PCR 조건은 처음에는 94°C에서 5분간 denaturation하였고, 연속적으로 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 60초의 조건으로 50회 반복한 후 72°C에서 10분간 안정화하였다. PCR 산물을 전기영동하여 STS표지로 확인된 band 양상과 RAPD 분석에 의해 합성된 band 양상을 서로 비교하여 분리집단에서 cosegregation되는지 확인하였다.

결과 및 고찰

Primer의 종류에 따른 RAPD 분석 효율

무의 RAPD 분석을 하기 전에 무에 적합한 primer를 선발하고자 Operon사의 10-mer random primer 220종류, UBC 10-mer random primer 125, Wako 12-mer random primer 49 종류를 이용하여 일차 PCR을 수행하였다.

그 결과 Operon primer A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 및 K 세트 220 종류의 primer 중에서 47개의 primer가 선발되어 21.4%의 선발효율을 나타내었으며, 70개의 다형화 밴드가 생성되어 선발된 primer 당 1.49개의 밴드가 생성되는 것으로 나타났다. (Figure 1, Table 1).

각 세트 20종류의 primer 중에서 A, B 세트와 같이 효율이 낮은 세트에서는 2종류의 primer가 선발되었고 효율이 높은 세트인 K세트에서는 14종류의 primer가 선발되었다. 최소한 1개의 다형화 표지인자를 개발하기 위해서는 3개의 primer를 조사해야 하는 것으로 분석되었다. I세트에서 18번은 4개의 다형성 밴드를 나타내었다. 앞으로 K세트처럼 선발효율이 높은 세트를 선발할 경우 더 많은 다형화밴드를 찾을 수 있을 것으로 생각되었다.

UBC primer 3번 세트 100종류와 4번 세트 25종류의 primer를 이용하여 26개의 primer가 선발되어 20.8%의 선발 효율을 나타내었다. 선발된 26개의 primer에서 44개의 다형성

밴드가 생성되었으며 선발된 primer 당 1.69개의 다형화 밴드가 생성되는 것으로 나타났다. (Table 1). UBC primer를 이용하여 최소한 1개의 표지인자를 개발하기 위해서는 3개의 primer를 조사해야 하는 것으로 분석되었다.

Wako primer (12mer) 49종류를 이용하여 9개의 primer가 선발되어 18.36%의 선발효율을 나타내었다. 9개의 primer에서 14개의 다형성 밴드가 생성되었으며, 선발된 9개의 primer 당 1.56개의 다형화 밴드가 생성되는 것으로 나타났다. (Table 1). Wako primer을 이용하기 위해서는 3개의 primer를 조사해야 하는 것으로 분석되었다.

Williams 등 (1990)은 RAPD에서 primer 염기의 미세한 차이에 의해서도 PCR 결과 나타나는 밴드의 양상은 다르게 나타나며, 10개의 염기 중 하나만 바뀌어도 RAPD 양상은 다르

게 나타난다고 하였다. Operon, UBC, Wako primer 사용 시 다형성밴드의 형성을 간에 큰 차이를 보이지 않았다.

Primer 간의 GC 함량을 비교해 보면, Operon primer Kit에서 선발된 47개의 primer 중에서 GC 함량이 60%인 것은 28개, 1개의 다형성 밴드를 나타낸 것은 18개, 2개의 다형성 밴드를 나타낸 것은 8개, 3개의 다형성을 나타낸 것은 2개로 나타났다.

70%의 GC 함량을 나타낸 것은 19개의 primer이며 1개의 다형성 밴드를 나타낸 것은 12개, 2개의 다형성 밴드를 나타낸 것은 5개, 4개의 다형성 밴드를 나타낸 것은 2개이었다. 이 시험 결과 Operon primer에서 보인 다형성 밴드 패턴 중에서 1개의 다형화 밴드를 보이는 형태가 61.7%로 가장 많았다.

다형성 밴드를 생성한 UBC primer 중에서 GC 함량이 50%인 primer는 3개로써 1개의 다형화 밴드를 나타낸 것, 2개의 다형성 밴드를 나타낸 것, 3개의 다형성 밴드를 형성한 것이 각각 1개씩이었으며, GC 함량이 60%인 primer는 7개로써 1개의 다형성밴드는 2개의 primer, 2개의 다형성 밴드는 4개의 primer, 3개의 다형성밴드는 1개의 primer로 나타났다. GC 함량이 70%인 primer는 10개로서 1개의 다형화밴드는 6개, 2개의 다형성 밴드는 4개로 나타났다. 80%인 primer는 6개로써 1개의 다형화 밴드를 나타낸 것은 2개, 2개의 다형화 밴드를 나타낸 것은 3개, 3개의 다형화 밴드는 1개로 나타났다.

Wako primer에서 선발된 9개의 primer중에서 GC 함량이 30%인 1개의 primer에서도 1개의 다형화밴드를 생성하였고, 40%인 primer는 3개로써 1개의 다형화밴드를 형성한 것, 2개의 다형화밴드를 형성한 것, 3개의 다형화밴드를 형성한 것이 각각 1개씩 나타났고, 50%인 primer는 2개로써 1개의 다형화 밴드를 형성한 것이 1개, 2개의 밴드를 형성한 것이 2개이었다. 70%인 primer는 3개로써, 1개의 다형성밴드를 형성한 것이 2개, 2개의 다형성 밴드를 형성한 것은 1개로 나타났다.

Primer의 종류에 따른 증폭 효율은 primer 염기서열의 무게중 내 공통성과 primer 염기 중 차지하는 GC 함량에 좌우되는 것으로 판단되었다.

Primer의 GC 함량에 따라 구분하였을 때 60~70%의 GC 함량을 가진 것이 증폭 효율이 좋은 것으로 나타났다. 33% 함량에서는 1개의 primer로 1.2%, 41% 함량에서는 3개의 primer로 3.6%, 50% 함량에서는 5개 primer로 6.1%, 60% 함량에서는 35개의 primer로 42.7%, 70% 함량에서는 32개 primer로 39%를 각각 나타내었으며, 80% 함량에서는 6개의 primer로 7.3%로 나타났다. GC 함량이 60~70%인 primer들에서 전체의 81.7%를 나타내 가장 효율성이 높은 것으로 나타났다.

그 결과, GC 함량 50%를 가진 primer는 평균 2.8개의 밴드와 0.3개의 다형화 밴드를 생성하였으나, 70%와 80%의 GC 함량을 가진 primer는 평균 7개의 밴드와 0.8개의 다형화 밴드를 생성하였다. Fritsch 등 (1993)은 600종류의 random

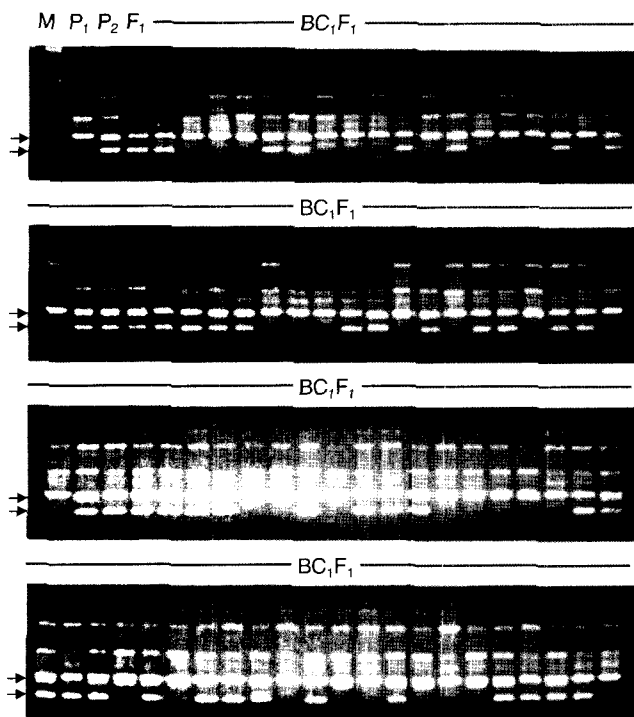


Figure 1. RAPD profile of 82 BC₁F₁ individuals generated by a primer (OPJ-04). Two different polymorphic bands (arrow) show !:1 segregations independent of each other among the BC₁F₁ population.

Table 1. Classification of primers according to numbers of polymorphic bands which were successively scored for mapping.

Classification by	No. of primer generated polymorphic bands					
	Total	One	Two	Three	Four	
Kinds of Primer primers	Operon	47	30	13	2	2
	UBC	26	11	12	3	-
	Wako	9	5	3	1	-
	Total	82	46	28	6	2

decamers를 이용하여 세 가지 종류의 식물 종을 분석했을 때 primer의 증폭 효율은 세 종 간에 대체로 일치하였으며, 증폭 효율은 GC 함량과 대체로 비례한다고 하였다. 본 연구에서도 GC 함량에 따른 분석효율에서 50% 이하로 존재할 경우 분석 효율이 떨어지는 것으로 나타났다 (Table 2).

RAPD를 이용한 무의 유전자지도 작성

유전자지도 작성용으로 재현성 있는 RAPD 표지인자를 개발하기 위하여 375종류의 primer를 이용하여 양친의 RAPD를 조사하였다.

다형화 밴드를 생성한 primer는 전체 조사된 것 중 약

24.3%인 82개였으며, primer당 1개에서 4개까지 다형화 밴드가 생성되었고, 총 128개의 밴드가 생성되었다. 그리고 선발된 primer에서 다형화 현상을 보인 primer에서 평균 1.56개의 다형화 밴드를 생성하였다. 다형화 밴드는 250 bp에서 2050 bp로 크기가 다양하였는데 선명성이 뚜렷하지 않은 밴드들은 분리세대 분석시 안정적으로 분석이 불가능하거나 scoring이 힘들기 때문에 분리세대 분석시 정확한 분리를 확인할 수 없을 것으로 판단하여 사용하지 않았다.

양친 간 다형화 현상을 보인 밴드 중 분리집단에서 안정적으로 분리된 128개를 연관군 지도 작성에 이용하였다. 연관군 지도 작성에 이용된 128개 중 126개는 멘델의 분리비 1:1에 적합하게 분리되었으며 두 개는 동형접합체 (모본형) 쪽으로 편향된 분리비를 보였다. 특이적으로 증폭된 DNA의 종류는 양친 중 한쪽에서만 특이성을 보이는 우성마커와 다른 크기의 밴드가 양쪽친에 동시에 생겨 BC₁F₁ 집단에서 두 밴드가 공통으로 분리되는 공우성 마커로 구분할 수 있었다.

본 연구에서는 BC₁F₁ (P₁) 집단을 유전자지도 작성용 재료로 이용하였기 때문에 B₂ (부계) 특이 표지인자를 선발하였으며, 이런 128개의 표지인자는 분리집단에서 밴드의 생성 유무로 뚜렷이 분리되었다. 반면, 모계 특이 밴드가 부계 특이 밴드와 비슷한 크기로 생성되어 두 밴드가 상호 영향을 받는 10개의 공우성 밴드 쌍이 관찰되었다.

Novy와 Vorse (1996) 그리고 Ayliffe 등 (1994)은 heterozygote의 PCR 반응 후 양친의 밴드와 크기가 다른 밴드가 생성되는 현상을 관찰하고 이것을 heteroduplex RAPD라 하였다. 그들의 관찰에 의하면 PCR 반응횟수가 30회 이상 진행되면서 DNA recombination이 일어나고 이로 인해 양친에 공우성인 표지인자가 생성된다고 하였다.

일반적으로 RAPD는 우성으로 발현되므로 일반적으로 한 개의 마커로 각 개체의 homo와 hetero 상태를 식별할 수 없는데, 본 연구에서는 많은 종류의 '835' (모계특이) 마커가 BC₁F₁ (P₁) 집단에서 분리를 확인할 수 없었다.

Demeke와 Adams (1994)는 밴드의 진한 정도에 의해 0에서 6까지의 등급을 주었으며, 이렇게 밴드의 등급에 의해 근연관계 분류를 할 경우보다 많은 정보를 얻을 수 있다고 하였으나, 본 연구에서는 여교잡 분리 세대를 유전자지도 작성용 재료로 이용하였으므로 모계 (회복친)에서 일어난 조환을 뚜렷이 알 수 없기 때문에 부계친 (B₂)의 계놈에서 일어난 조환만을 가지고 연관거리를 추정하였다. BC₁F₁ (P₁) 82개체에서 scoring된 128개의 RAPD 표지인자를 MAPMAKER/EXP 프로그램을 이용하여 LOD score 2.0 분석을 한 결과 128개의 표지인자가 유전자지도 작성에 이용되었으며, 14개의 연관군으로 그룹이 지어졌다.

MAPMAKER program을 이용하여 LOD 값 <LOD> 3.0, X² <0.05>을 근거로 하여, DNA 마커에 대한 상호간의 연관 관계를 분석한 바 9개의 연관된 군과 5개의 독립적인 군으로 구분되었다.

Table 2. The nucleotide sequences of selected random primers

Primer	GC (%)	Primer	GC (%)
OPA02	70	OPK12	70
OPA20	60	OPK16	60
OPB04	60	OPK17	70
OPB06	70	OPK18	60
OPC04	60	OPK19	70
OPC08	70	OPK20	70
OPC10	60	UBC304	70
OPC15	60	UBC310	60
OPC05	60	UBC315	60
OPD11	60	UBC328	50
OPD20	70	UBC336	70
OPE01	70	UBC347	60
OPE07	60	UBC348	80
OPE10	60	UBC354	70
OPE11	60	UBC359	60
OPE18	60	UBC361	70
OPE20	60	UBC364	80
OPF03	60	UBC367	50
OPF15	60	UBC370	70
OPF16	60	UBC372	70
OPG-03	70	UBC373	60
OPG04	60	UBC375	70
OPG09	60	UBC388	80
OPG13	60	UBC389	80
OPH03	60	UBC392	60
OPH12	60	UBC393	50
OPI06	70	UBC396	60
OPI14	70	UBC402	80
OPI18	70	UBC405	70
OPJ04	70	UBC406	70
OPJ10	70	UBC407	70
OPJ13	60	UBC421	80
OPJ20	70	WKA01	41
OPK01	70	WKA03	67
OPK02	60	WKA06	67
OPK03	60	WKA07	67
OPK04	70	WKA12	41
OPK06	60	WKA63	50
OPK07	60	WKA69	41
OPK08	60	WKB45	33
OPK09	70	WKB82	50

무는 염색체수 (n=9)가 9개인 것으로 보아 5개의 독립적인 군에 속한 마커는 유전자지도작성에서 제외하였다. 유전자 지도 작성에 총 122개의 마커가 이용되었고 유전자지도의 전체 거리는 1,688.3 cM이었고, 마커 간의 평균 거리는 13.8 cM이었다. 제 1연관군에는 14개의 마커와 전체거리 281.3 cM, 제 2연관군에는 19개의 마커들이 그룹을 이루고 전체거리는 253.8 cM이었으며, 제 3연관군은 17개의 마커와 전체거리 243.6 cM, 제 4연관군은 19개의 표지인자와 전체거리 210.1 cM, 제 5연관군에는 11개의 표지인자와 전체거리는 165.8 cM, 제 6연관군은 15개의 표지인자와 전체거리 162.4 cM, 제 7연관군에는 11개의 표지인자와 전체거리는 133.1 cM, 제 8연관군은 6개의 표지인자와 전체거리 120.8 cM, 제 9연관군은 10개의 표지인자와 전체거리 117.6 cM으로 그룹이 이루어졌다 (Figure 2).

무 genome의 물리적 거리가 총 526 Mbp인 것으로 보고되어 있으므로 본 연구에서 제작한 유전자 지도의 유전적 거리 1 cM은 312 kb의 물리적 거리에 해당하는 것을 알 수 있었다. 그러나 무 genome 전체의 유전적 거리는 본 연구 결과와 일치하지는 않을 것이므로 이를 추정하기 위해 Lefebvre 등 (1996)이 발표한 자료를 참고하여 무 genome 전체의 유전적 거리를 계산하였다. Lefebvre 등 (1993)은 고추에서 유전자

지도를 작성하여 고추 genome 전체의 유전적 거리를 추정하기 위해 연관군과 연관되지 않은 마커 사이에 35 cM, 즉 mapping 집단에서 검정할 수 있는 최대의 유전적 거리에 해당하는 염색체 단편이 존재한다는 가설을 세운 후 유전자 거리를 추정하였다.

이와 같은 방법으로 무의 genome 전체의 유전적 거리를 환산하게 되면, 본 연구에서 제작한 유전자 지도는 9개의 연관군과 2개의 독립적인 마커를 포함하고 있기 때문에, 모든 연관군과 독립된 마커가 염색체 단편에 의해 중첩되는 경우에는 2,108.3 cM의 유전적 거리를, 모든 연관군과 독립된 마커가 중첩되지 않는 경우에는 2,458.3 cM의 유전적 거리를 가지게 된다.

이러한 결과로 볼 때 본 연구에서 제작된 무의 유전자 지도는 무 genome 전체의 68.7%~80.1%를 포함하는 것으로 추정할 수 있다.

본 연구를 통해 작성된 무의 연관군에서 특정 마커들이 군집하여 위치하며 마커 간 교차가 전혀 일어나지 않고 연관군 내 동일 위치에 완전 연관된 것처럼 보이는 마커들이 존재하였다. 제 4연관군에 UBC348a와 UBC393a가 가까이 연관되어 있고, 제 3연관군에 OPA02와 OPB06이 가까이 연관되어 있고, 제 6연관군에는 세 개의 표지인자 UBC373a/UBC393a/

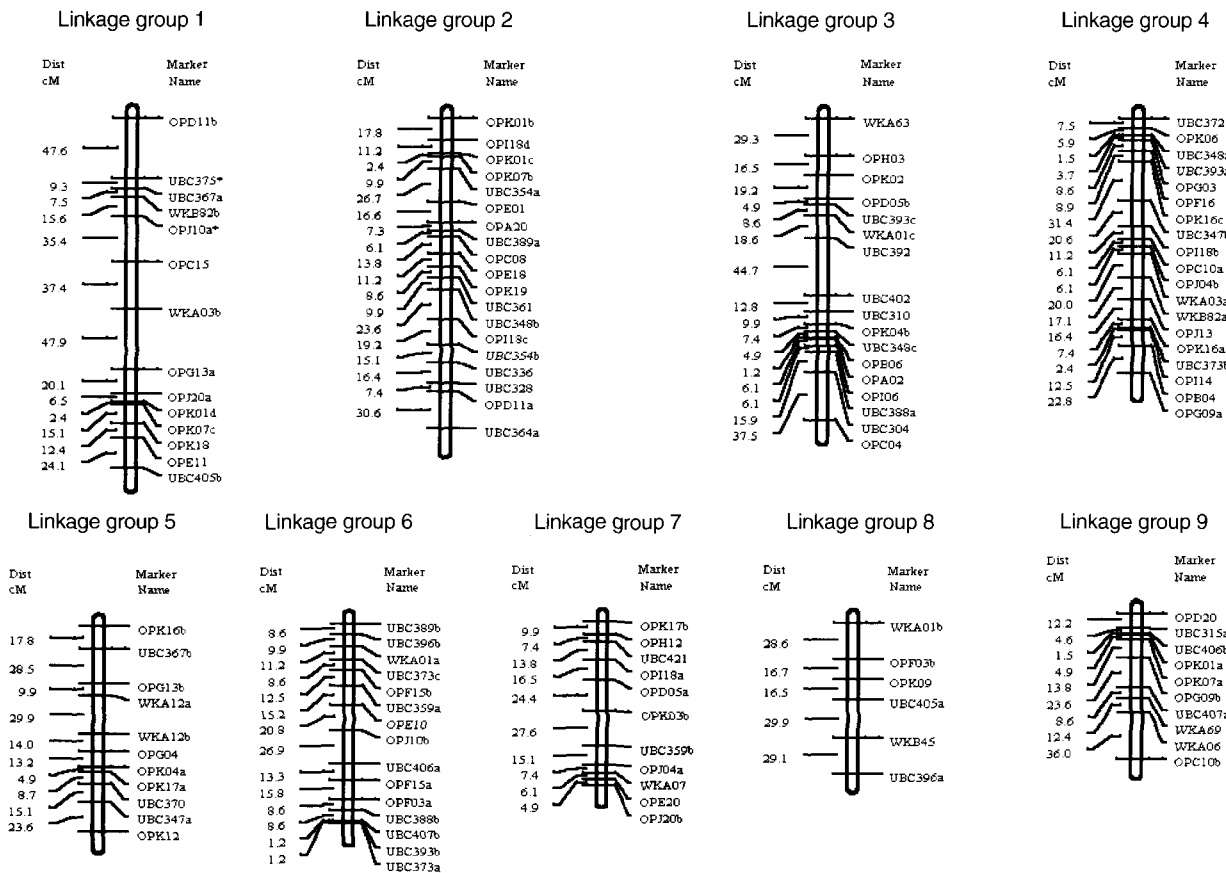


Figure 2. The integrated genetic map of radish based on 14 RAPD markers. Marker identification is given at the right of the bars ; map distances are given (at the left of the bars) in cM (Kosambi function). The skewed markers (P < 0.05) are indicated with a star(*)

UBC407b가 가까운 연관관계를 보여주었고, 제 9연관군에는 OPK-01a와 UBC406b가 연관관계를 보여 주었다. 이들 표지 인자들은 BC₁F₁ (P₁) 82개체에서 각각 1개체씩만 동일하지 않고 81개체들은 유전형이 모두 동일하였다 (Figure 2).

Chaparro 등 (1993)의 복숭아 RAPD에 의해 보여지는 많은 마커들의 군집현상은 이들 마커들이 repetitive sequence를 인지하는 표지인자이기 때문이라고 판단하였다.

Chen 등 (1995)은 기대분리에서 벗어난 marker들의 염색체 상의 위치를 결정하는 데 이용하고 있어서 본 연구에서도 이러한 marker들을 염색체상 위치 결정에 이용하였다.

이와같이 marker와 대상식물의 양친형과의 분리비 검정에서 유의성이 있는 marker가 출현되는 것은 잡종후대 (F₂)의 유전자 재조합 과정에서 상인과 상반의 관여도에 따라 다르며, 또한 DNA marker와 표현형과의 분리비 검정에서 유의성을 나타낸 marker의 수가 적을수록 대상식물의 전체 게놈을 해석할 수 있는 유전자지도의 정확도는 더 높아지게 될 것이라고 하였다 (Chaparro et al, 1993).

Kesseli 등 (1994)은 상추에서 실제 연관군수는 9개인데, RAPD marker에 의한 연관군수는 17개로 구분되었다고 하였고, 이러한 연관군 수의 차는 충분한 수의 marker가 지도상에서 탐색되지 않는 경우, 재조합의 혼란으로 인한 유전자지도 상의 gap 또는 분석에 이용되는 marker가 해석할 수 없는 영

역이 존재하고 있는 것 등에 의해서 비롯된 결과라고 보고한 바 있다.

STS marker 개발

RAPD 마커에 있어 기존에 문제시된 재현성 문제를 검정하기 위해 RAPD 마커를 STS 마커로 변환하였다. 이를 위해 OPE10 primer에 의해 증폭된 DNA 단편 중 교배모본 P2에 특이적으로 존재하는 band를 cloning하여 염기서열 분석한 후 primer를 제작하였다. 5°C 부위의 sequence는 OPE10 primer sequence (5'-CACCAGGTGA-3')를 포함하는 20 bp 크기 (5'-CACCAGGTGAGGAGACGGTC-3')로 제작하였고 3°C 부위의 primer sequence는 OPE10 primer 주변에 AT sequence가 많아 5°C 방향으로 17 bp 앞쪽에서 존재하는 21 bp (5'-CGGCTAGATACTACACTTACT-3')를 primer로 제작하였다. 이를 이용하여 교배모본과 82개체의 BC₁F₁ 집단을 이용하여 분리양상을 확인 한 결과 교배 모본에서는 RAPD에서 차이난 형태로 차이가 나는 band 양상을 보였고, 분리집단 BC₁F₁에서도 RAPD를 이용하였을 경우와 똑같은 band 양상을 보이는 것으로 보아 RAPD에 의해 나타난 band 양상은 정확한 primer의 annealing에 의해 합성된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3).

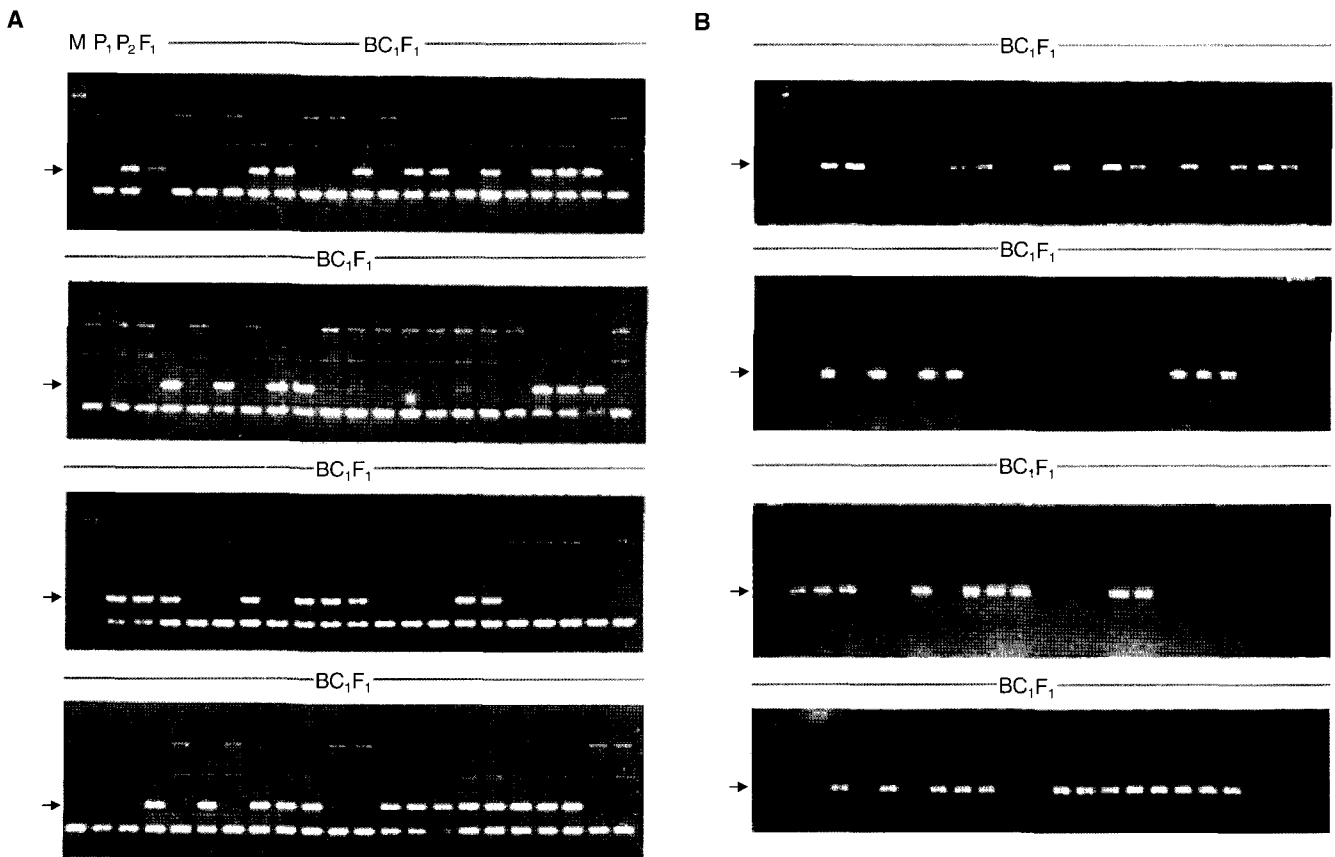


Figure 3. Comparison of segregation scores of the RAPD marker OPE10 according to primers OPE10 (A) and its STS marker (B) in the BC₁F₁ population of the cross between 835 and B₂. M: DNA size marker (λ EcoRI + HindIII), lane P₁, P₂ are 835 and B₂, respectively.

RAPD 마커는 RFLP와 STS 분자표지의 단점을 극복하기 위하여 고안된 기술이지만 연구결과의 재현성이나 정확도면에서 문제가 있다는 지적을 받아 왔었다. 그러나 본 연구에서 선발한 RAPD 표지를 STS 표지로 전환하여 두 마커가 분리되는 양상을 비교해 본 결과 분리집단에서 같은 유전자형을 가지는 것으로 보아 RAPD 마커에 의해 제작된 연관군지도 작성의 정확성이 있는 것으로 판단되었다 (Figure 3).

본 실험에서는 RAPD 마커를 이용한 유전자연관군지도 작성으로 실험과정이 간편하고 마커의 탐색이 용이하였지만, primer 당 충분한 다형성 밴드를 보이지 않아 어려움이 있었기에 앞으로 많은 다형성밴드를 생성할 수 있는 AFLP를 이용하여 밀도 높은 유전자지도 작성으로 복잡한 유전자형을 보이는 무의 위황병 저항성 연관 마커의 개발로서 품종육성의 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

작물의 신품종 육성 과정에 있어서 선발은 육종의 성패를 좌우하는 중요한 과정이다. 하지만 개체가 나타내는 표현형은 유전적 요인과 환경적 요인이 동시에 작용하여 나타나기 때문에 유전적인 효과만 구분하여 선발하는 것은 매우 어렵다. 최근에 분자생물학 분야의 연구가 급속도로 발전함에 따라 분자 수준의 표지 인자를 유용 유전자의 간접선발 지표로 활용하여 선발 효율을 높일 수 있게 되었다.

작물의 유전자 지도 및 분자 표지인자는 작물 육종에 매우 유용하게 활용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 무에서 양친인 '835'와 'B₂'에서 유래한 여교잡 집단 82개체를 이용하여 RAPD 유전자군 지도를 작성하고 관련 마커를 탐색하여 육종에 이용하고자 연구를 수행하였다.

Primer 375종류를 이용하여 양친, 835와 B₂ 사이의 다형화 밴드 128개를 찾았다. BC₁F₁ 집단 조사를 통해 MAPMAKER/EXP를 이용하여 연관군 지도를 작성하였다. 분리 분석된 RAPD 표지인자 128개 중 126개는 멘델의 이론 분리비 1:1에 적합하였으며, 2개는 동형접합체 (모본형) 쪽으로 편중되어 분리되었다.

LOD 3.0 수준에서 128개의 표지인자가 9개의 연관군으로 나뉘어졌고 전체거리는 1,688.3 cM이었으며, 표지인자 간 평균거리리는 13.8 cM으로 Lefebvre 등 (1996)이 발표한 자료를 참고하여 무 genome 전체의 유전적 거리를 계산한 결과 무의 유전자지도는 무 genome 전체의 68.7%~80.1%를 포함하는 것으로 추정할 수 있었다.

RAPD 마커에서 문제시되는 재현성 문제를 검정하기 위해 이를 STS 마커로 변환하고자 OPE10 primer에 의해 증폭된 특정 밴드를 클로닝하고 염기서열을 분석한 다음 얻어진 염기서열을 기본으로 하여 primer를 제작하여 PCR 하였다. 그 결과 10mer인 OPE10을 이용하여 분석했을 때와 동일하였으

며 목적 밴드 외 다른 밴드는 생성되지 않아 앞으로 분자 마커로서 충분히 이용될 수 있음을 보여주었다.

사사 - 이 논문의 일부는 배재대학교 2000년도 교내연구비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

인용문헌

- Ayliffe MA, Lawrence GJ, Pryor AJ (1994) Heteroduplex molecules formed between allelic sequence cause nonparental RAPD bands. *Nucl Acids Res* 22:1632-1636
- Chaparro JX, Werner DJ, Malley KO, Sederoff RR (1993) Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theor Appl Genet* 87:805-815
- Chen H, Zhn L, Xu J, Chen M (1995) Construction of rice RAPD molecular linkage map. *Acta Botanica Sinica* 37 (9):677-684
- Chen J, Delaporta S (1993) Urea-based plant miniprep. In: *The Maize Handbook* (Freeling, M. and V. Walbot). Springer-Verlag Labrotary. pp. 526-527
- Demeke T, Adams RP (1994) The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution In: Griffin, H.G. and A.M. Griffin (eds). *PCR technology current innovations*. CRC Press. pp.179-192
- Frisch P, Hanson MA, Spore CD, Pack PE, Rieseberg LH (1993) Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol Biol Reporter* 11:10-20
- Gu WK, Weeden NF, Yu J, Wallace DH (1994) Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor Appl Genet* 91:465-470
- Haley SD, Miklas PN, Stavely JR, Byrum J, Kelly JD (1993) Identification of RAPD markers linked to major rust resistance gene block in common bean. *Theor Appl Genet* 86:505-512
- Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCR In: *PCR protocols a guide to methods and application*. Academic Press. pp.3-20
- Kesseli RV, Paran I, Michelmore RW (1994) Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD marker. *Genetics* 136:1435-1446
- Kosambi D (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175
- Lander EC, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Lefebvre V, Palloix A (1996) Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theor Appl Genet* 93:503-511
- Lefebvre V, Palloix A, River M (1993) Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* 71:189-100

- Melchinger AE** (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* **104**:1-19
- Natalis A, Nickolai OB, westblom TU, Kresovich S, Douglas EB** (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD finger printing. *Nucl Acids Res* **20**:5137-5142
- Novy RG, Vorsa N** (1996) Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry implication for pedigree and genetic relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers. *Theor Appl Genet* **92**:840-849
- Penner GA, Chong J, Levesque-Lemay M, Molnar SJ, Fedak G** (1993) Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene Pg3. *Theor Appl Genet* **85**:702-705
- Roy A, Frascaria N, Mackay J, Bousquet J** (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet* **85**:173-180
- Thormann CE, Ferreira ME, Camarge LEA, Tivang JG, Osborn TC** (1994) Comparison of RAPD markers to estimating genetic relationships within and among Cruciferous species. *Theor Appl Genet* **88**:973-980
- Torres AM** (1993) Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* **28**:333-334
- Tragoonrung S, Kanazin V, Hayes PM, Blake TK** (1992) Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor Appl Genet* **84**:1002-1008
- Weeden NF, Timmerman GM, Hemmat M, Kneen DE, Lodhi MA** (1992) Identification and reliability of RAPD marker. In: Application of RAPD technology to plant breeding. pp.12-17. Joint Plant Breeding symposia Series. Minnesota
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* **18**:6531-6535
- YAE BW** (1994) Classification of *Malus domestica* Cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA and Selection of Markers for Cultivar Identification. PhD thesis, Seoul National University, Suwon. pp.13-14
- Young ND, Tanksley SD** (1989a) RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theor Appl Genet* **77**:95-101
- Young ND, Tanksley SD** (1989b) Restriction Fragment Length Polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor Appl Genet* **77**:353-359

(접수일자 2002년 6월 14일)