

작물 육종에서 분자유전자 지도의 이용

GENOME MAPPING TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION IN PLANT BREEDING

은 무 영

농업과학기술원 세포유전과

Division of Cytogenetics
National Agricultural Science and Technology Institute
Suwon, 441-707 KOREA

1. 서언

지금까지 작물육종 기술은 멘델의 법칙을 기초로 원하는 특성을 분리, 결합하고 선발하여 새로운 품종을 육성함으로써 작물생산에 크게 기여해 왔으며 앞으로도 그 역할은 더욱 증대될 것으로 예상된다. 그러나 교배나 돌연변이에 의해 발견되는 표현형의 선발에 의존하는 기존 육종법은 우수한 유전자 재조합체를 선발하는데 어려움이 있으며 특히 표현형은 환경의 영향이 크기 때문에 검정 효과가 불확실하고 유용 형질을 원하는 대로 조작하기에도 여러가지 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 통계학을 이용한 육종기술이 발전되었으나 노력과 비용이 많이 들었고, 분리세대에 대한 지속적인 표현형 선발의 반복으로 선발효율은 높일 수 있었으나 육성년한을 10년 이상으로 연장시키게 되었다.

Recombinant DNA Technology와 식물조직배양 기술의 발달로 말미암아 기존 육종에서는 도입이 불가능한 미생물, 동물 또는 다른 종 속의 식물로 부터 우량 유전자를 분리한 후 대상식물에서 발현될 수 있도록 조작하여 형질전환시켜 짧은 시간에 새로운 형질이 획득된 식물을 얻는 것이 가능하게 되었다. 형질 전환에 의한 식물 유전자의 개량은 현재 존재하지 않는 새롭고 광범위한 유전자 조합을 생성할 수 있는 무한한 가능성을 제시하고 있어 작물 육종에 새로운 전기를 마련하고 있다. 그러나 현재까지의 형질전환 기술은 몇가지 단인자 형질

만을 대상으로 하고 있으며, 다수의 유전자에 의해 지배되는 양적형질인 수량, 품질 등 실용성이 보다 높은 유전자를 분리하고 전환하는 유전공학기술은 아직까지 일반화 되고 있지 못한 실정이다. 이러한 원인으로는 유전공학 연구가 아직 시작단계에 불과하여 연구성과의 집적이 적고 기술개발이 미진한 점을 들 수도 있지만 한편으로는 이러한 농업형질들 대부분이 복잡한 유전양식을 갖고 있으므로 유전적 특성이나 유전자 발현과정이 밝혀지지 못한 원인도 들 수 있다.

1923년 Sax가 Morgan의 연관연구와 연계하여 “작물육종에서 가장 중요한 수량 및 품질 등에 관여하는 다수의 미동유전자를 주동유전자와 연관시킨 후 이를 선발함으로써 우수한 유전자 제조합개체를 보다 쉽게 선발할 수 있다”고 발표한 후 많은 작물에서 유전 및 연관연구가 활발히 수행되어 여러 작물의 형태적 유전자 지도를 작성하여 왔다. 그러나 대부분의 형태적인 유전자 marker는 작물의 표현형을 너무 많이 변화시키기 때문에 미동유전자와의 연관 유무를 판단하기가 불가능하였고 또한 육종사업에 이용할 만큼 많은 marker 유전자의 발견도 어려웠다. 다행스럽게도 최근 DNA 마커를 이용한 고밀도 분자유전자지도 작성과 이를 이용한 육종 효율 증진기술은 급진적으로 발전되고 있어 기존 육종과 유전공학적 방법을 연계시킬 수 있게 됨으로써 장래 농업에 새로운 전기를 마련할 필수적이며, 유망한 기술로 대두되고 있다. 따라서 DNA 마커를 이용한 유전자지도 작성과 육종 이용기술의 내용과 연구추진 결과들을 정리 보고하고자 한다.

2. DNA 단편 이용 기술의 개발현황 및 특성

가. RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)

생물종의 각 세포는 생존에 필요한 유전정보를 일정한 수의 기본 염색체인 게놈에 나누어 보유하고 있으며, 생물의 생존과 번식 중에 크고 작은 DNA상의 변화가 생기게 되고 이런 변화가 장기간에 걸쳐 집적됨으로써 유전적 차이를 나타내게 된다. 따라서 유전자형이 다른 개체는 DNA상의 변화의 종류나 정도가 다른 것을 의미한다.

DNA 염기서열의 자연적 변이체는 몇가지 방법으로 찾을 수 있는데 그 한가지 방법은 물론 DNA를 직접 염기서열 분석을 하여 세부적으로 비교하는 것이며 다른 한 방법은 제한효소라 불리는 효소의 특성을 이용하는 방법이다. 특정 미생물이 생산하는 DNA 제한효소(Restriction nuclease)들은 DNA속에 있는

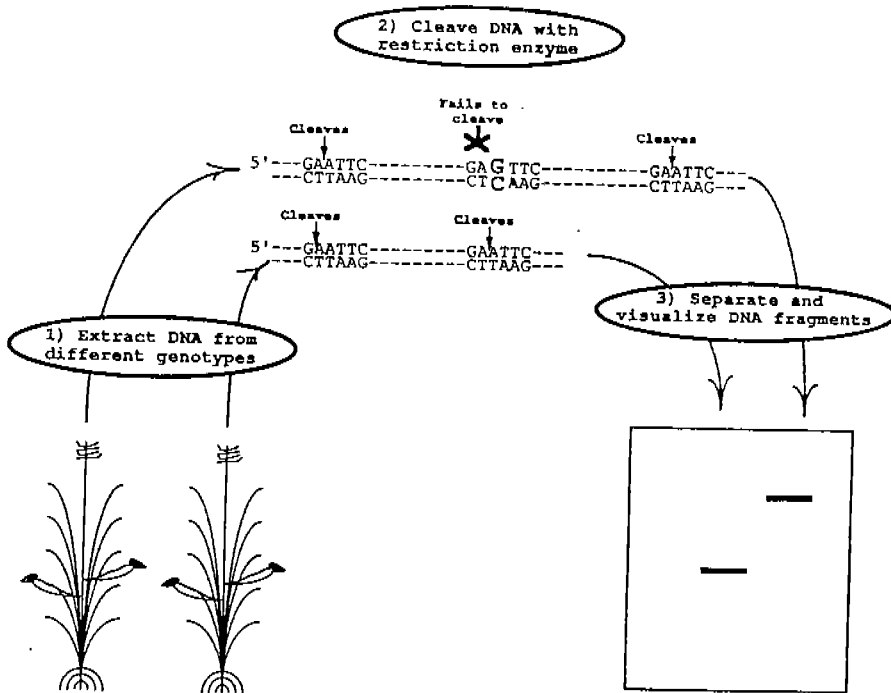


Fig. 1. Detection of DNA markers by the method of restriction fragment length polymorphism. DNA is extracted from two (or more) different individuals, then is digested by a restriction enzyme, which cleaves the DNA in or near a specific recognition sequence (or restriction site). In the example, the recognition sequence of the commonly used restriction enzyme *EcoRI* is presented (5'-GAATTC). The two individuals differ in DNA sequence at one potential recognition sequence. The restriction enzyme cuts in one but not the other (indicated by X), generating restriction fragments of different length. The fragments are separated by gel electrophoresis, and visualized by binding of a specific radioactive DNA probe. In practice, restriction fragment length polymorphisms are found empirically, by randomly testing different DNA probes with different restriction enzymes, until a combination is found which distinguishes between the genotypes of interest.

특정 염기서열에 대한 제한효소 인지부위(restriction sites)라고 하는 특정부위(target site)를 인지하고 절단하는 능력을 가지고 있어 절단된 DNA단편들의 크기를 분류함에 따라서 본래 DNA에 있는 제한효소 인지부위의 분포를 알 수 있다. 생성된 단편들은 제한효소별로 각각의 특정 DNA에 대한 특이성을 가지게 되며 특정 DNA(혹은 그 DNA를 포함하는 생물)에 대한 특이성(fingerprint)으로 이용될 수 있다. RFLP 분석기술은 전체 게놈 DNA를 제한효소로 절단하고, 표지된 마커 DNA와 Southern hybridization하여 마커에 상응하는 유전자 위치 부위의 DNA 염기서열의 변이를 발견할 수 있다. Hybridization에 의해서 나타나는 제한효소 단편 크기의 변동은 사용된 제한효소의 인지부위나 그 주변에 있는 염기서열의 변화 즉, 염색체의 삽입, 결실, 역위 및 제한효소 자리의 유실 또는 생성이 있었음을 의미하고 있다 (그림1).

나. PCR(Polymerase Chain Reaction)

PCR은 짧은 핵산 단편 (30bp 이하)을 primer로 하고 고온에 안정한 DNA 중합효소를 사용하여 게놈 DNA와 같은 DNA 복합체로부터 특정 DNA 부위만을 증폭하는 기술이다. 단세포나 일부 세포조직과 같은 매우 적은 DNA 시료로부터도 DNA 증폭이 가능하며 이러한 과정은 자동적으로 수행된다. 증폭된 단편은 Southern hybridization 과정이 없이 agarose겔에서 전기영동한 후 염색하여 직접 DNA 단편 길이의 다양성을 비교 분석할 수 있다. 만일 서로 다른 유전자형에서 증폭된 PCR 산물간에 다양성 즉 차이가 발견되지 않으면 PCR 산물의 염기서열을 직접 밝혀 그들간의 모든 염기서열의 차이를 비교할 수 있다. 그러나 PCR은 적절한 Primer를 합성하기 위하여 관심 있는 유전자 위치에서 약간의 염기서열 정보를 필요로 하며, 특히 재현성 여부가 관건이므로 세심한 실험실 조건과 반복적인 실험에 의해서 결과를 도출해야 한다.

1) RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD법은 대개 9~11bp의 임의의 염기서열로 된 작은 프라이머를 이용하기 때문에 프라이머에 상응하는 정역 2 방향의 염기서열에 의해 확장된 게놈 부위만을 증폭시키게 된다. 이 방법은 아가로스겔상에 나타나는 절편의 형태를 조사하면 되기때문에 매우 간단하다.

RAPD법에 의한 polymorphism은 한 품종에서 나타나더라도 다른 품종에서는 안 나타날 수도 있으며 특히 게놈이 달라지면 더욱 그렇다. 특히 실험조건에 따라 상이한 결과가 나타나는 재현성의 문제가 종종 있기 때문에 극도의 세

심한 실험실 조건과 반복적인 실험이 필요하다. RAPD법은 gene tagging 응용에는 적합하지 않고 유전적 다양성 혹은 유연관계를 구분하고자 할때 주로 이용하며 SCAR과 같은 고감도 PCR 마커로 전환하여 응용할 수 있다.

2) SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

SCAR는 개개의 RAPD 밴드들이 더욱더 고감도의 마커로 전환된 형태를 말한다. SCAR는 대개 효소로 절단한 DNA 단편을 짧은 RAPD 프라이머로 끝 부분을 sequence하여 만든다. 이렇게하여 프라이머가 18-24bp까지 연장되어 증폭된 최종산물에 의해 원래의 polymorphism을 반영한다고 해석하는 것이며 때때로 우성인 RAPD를 공우성인 SCAR로 전환시키기도 한다.

SCAR법은 실제로 모든 유전자지도의 활용에 유용한 것으로 되어있으나 만약 사용된 프라이머 염기서열이 알맞게 conserve되어 있지 않을 경우에는 계통간에 차이를 보여주지 못할 수도 있는 단점이 있다. RAPD 밴드가 식물체의 무작위 계통 절편에서 만들어진 것이기 때문에 SCAR를 더욱 conserve된 계통상의 목표지점으로 삼을 방법이 없기도 하며 본래 RAPD의 polymorphism을 잃기도 한다.

3) STS(Sequence Tagged Sites)

STS법은 한쪽끝의 sequence를 알고 있는 RFLP probe나 18-24bp 크기의 알고 있는 sequence를 가지고 프라이머를 만들어 어느 특정 계통부위 절편을 증폭시키는데 응용된다. Polymorphism은 품종간 차이로 인해 프라이머가 상보 결합을 하느냐 안하느냐에 따라, PCR 산물의 생성여부가 결정되고 따라서 밴드가 존재하느냐 존재하지 않느냐로 구분이 되는데 이런 polymorphism은 intervening sequence가 일부라도 삽입 되었느냐 아니면 결실 되었느냐에 따른 절편 길이 변이에 의해서도 나타난다.

STS법은 보통 어떤 특수한 필요성이 있어 RFLP probe나 복제된 마커 gene을 개발하려고 할때 응용된다. 역시 이 방법에서도 프라이머 conservation 유무에 따라 품종간 polymorphism 발현에 변이가 일어날 수 있는 단점이 있다. 그러나 이러한 단점들은 cDNA 클론과 같이 분명히 conserve되어 있는 sequence를 사용함으로써 보완 될수 있다.

4) AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP 방법의 기본원리는 genomic DNA를 rare cutting 제한효소로 절

단하고 frequent cutting 제한효소로 이중절단한 후 그 DNA 단편들의 양끝에 adaptor를 부착 다음, adaptor 부위의 DNA 염기서열을 바탕으로 작성한 primer를 PCR의 primer로 사용하여 상기 이중 절단된 DNA 단편을 증폭하여 게놈의 특정부위의 DNA 다형성을 분석하는 기술이다.

AFLP 감도는 primer sequence 중에서 변이부위 sequence bp 수(n)에 따라 좌우된다. 즉 PCR에 의한 증폭효율은 양쪽 primer에 template DNA 와 상보적인 bp가 있을때 가장 높으므로 결국 감도는 $1/4^{2n}$ 이 된다. 그래서 4^{2n} 개의 제한 효소 단편 중에서 하나의 확률로 PCR 증폭이 일어날 수 있다. 보통 3' end의 변이부위 sequence의 bp 수(n)를 1-3으로 하여 증폭되는 DNA 단편 수의 증감을 조절할 수 있는데 SRFA (Selective Restriction Fragment Amplification)에 의하여 50-100개의 DNA 단편이 생성된다. 따라서 AFLP는 RFLP로는 탐지하기 어려운 genome내의 제한효소 인식좌 변이를 보다 더 정확하고 용이하게 탐지할 수 있다. 따라서 이 방법은 map-based cloning에 적합할 수도 있지만 RAPD법에서와 같이 품종에 따라 재현성 여부가 문제점으로 되고 있다.

5) VNTR(Variable Number of Tandem Repeats)

이 방법은 인체 게놈 프로젝트 등 포유류 genome mapping에 널리 이용되어 왔으며 최근에는 식물에서도 시도되어 그 가치를 인정 받고 있는 방법이다. VNTR 마커들에서 보이는 polymorphism은 전체 게놈에 고루 분포되어 있는 tandem repeat와 conserved sequence motif의 수적인 변화에 근거를 두고 있다. 대개 식물 genomic DNA의 80% 이상이 repetitive로 되어 있고 highly repetitive DNA가 전체 DNA 중 대부분을 차지한다. 이러한 sequence family의 repeat unit는 그 크기가 대개 1000bp이며 이러한 부위들의 3'과 5' 측위(flanking)들은 유전자좌 별로 품종마다 conserve되어 있는것으로 밝혀졌다. 따라서 PCR로 inter-regional spacer를 증폭시킴으로 polymorphism을 탐지할 수 있게 된다.

또 다른 repetitive sequence로는 tandem repeated sequence motif가 있다. 이들 sequence는 satellite DNA보다 카피수가 적어 "mini-satellites"라 불려 왔는데 repeat unit의 크기는 10-50bp 정도이다. 이러한 repeat region은 단조롭게 tandem repeat로 채워져 있으며 이런 부위는 매우 conserve되어 있다고 알려져 있다. 이러한 tandem repeat sequence motif가 2-6개의 nucleotide의 simple sequence repeats (SSRs) 들로 구성되어 있는 것을 일컬어 microsatellite라고 부른다. Microsatellite의 길이는 변이가 매우 다양하며, 약 10-500 copies정도

genome 전체에 고르게 분포한다. SSR는 그 주변의 unique DNA sequence로부터 고안된 primer들을 이용하여 PCR에 의하여 증폭할 수 있으며 증폭된 산물들은 보통 높은 다형성을 보이는데 이는 특정 SSR에서 tandem repeat unit 수가 변이를 일으킴으로써 나타난다. 일반적으로 SSR marker들은 개체간에 다형성을 보이면서 공유성을 나타낸다. SSR은 동물에서는 인체, 쥐 등의 유전자 지도작성에 이용되어 왔으며 식물에서는 대두, Brassica, 포도, 아라비도시스, 옥수수, 벼등에서 시도되고 있다. DNA sequence database를 통하여 SSRs을 조사한 결과에 의하면 식물에서 가장 많이 나타나는 repeat는 AT이고 AG와 AC의 순으로 그 빈도가 높다고 한다.

3. 분자 유전자 지도 작성

지금까지 형태적 돌연변이 표지인자를 기초로 한 관행 연관군지도들은 식물 유전학과 세포학 연구에 공헌한 바 적지 않다. 그러나 최근에 연구되고 있는 isozyme과 DNA 단편을 이용한 분자단위의 표지인자들을 기초로 한 분자유전자 지도는 관행 유전자지도 보다 월등한 유전학적 장점들을 가지며 유전학과 육종에 적용할 수 있는 새로운 기회를 제공하고 있다.

Tanksley (1983)에 의하면 RFLP 표지인자는 식물 전체 조직이나 세포단위에서도 동일한 결과를 얻을 수 있으며, 자연적 변이를 재료로 하기 때문에 모든 염색체에 광범위하게 분포하는 많은 marker를 만들 수 있고, codominant로 발현되기 때문에 유전자형과 표현형이 일치하며, 환경의 영향을 거의 받지 않고, epistatic interaction이 없으므로 어떤 집단에서도 형질 분리가 편중되지 않을 뿐 아니라 양적형질의 검정에도 이용 가능하다고 하였다.

대부분의 식물의 RFLP 지도작성에는 자식계통을 이용한 역교배, F_2 , 잡종자식계통 (recombinant inbred line, RIL) 등 3가지의 지도작성용 재료가 주로 사용된다. 역교배 집단은 F_1 잡종을 양친의 어느 하나와 교배시켜 만들며 역교배에 의하여 얻은 후대에서 어느 특정 단일 RFLP 표지인자의 유전자형은 동형체와 이형체간의 비율이 1:1이 된다. 다음은 F_1 을 자가수분시켜 만든 F_2 를 사용하는데. 이 경우에는 한 양친의 것과 같은 동형체, 이형체, 또 다른 양친의 것과 같은 동형체간의 비율이 1:2:1로 나타난다. 똑같은 개체수를 갖는 집단이라면 F_2 집단으로부터 더 많은 정보를 얻을 수 있는데 이는 양친 모두에서 교차가 일어나기 때문이다 (Allard, 1956). 대부분의 식물 RFLP 지도는 보통 약 50개

의 F₂ 후대를 이용하여 작성하고 있으며, 연관 컴퓨터프로그램이나 Lander팀 (1987)에 의하여 개발된 Mapmaker/QTL 프로그램을 사용하여 유전자 지도를 작성한다.

RFLP 유전자 지도의 가장 큰 장점중의 하나는 무한정의 표지인자를 지도화할 수 있다는 것이지만 역교배 혹은 F₂집단을 분석할 경우 재료공급의 부족이 한가지 문제점이 된다. 왜냐하면 어디까지나 지도를 작성하고자 하는 원래의 집단(original plants)이 살아있어야 하고 계속 핵산을 추출해 낼 수 있어야 하기 때문이다. 이런 문제를 해결하기 위하여 잡종자식계통 (RIL) 을 만들어 이용하는 방법이 사용되는데 재료 육성에 시간이 많이 걸리는 약점이 있다. 이 방법은 기본적으로 F₂ 지도작성용 집단을 갖고 시작하여 매세대 한 종자로 부터 얻은 식물체를 계속 자가수정시켜 8-10세대까지 계속하여 선발한다. 농업과학기술원에서는 밀양 23호/기호벼 교배 조합을 이용하여 잡종자식계통을 육성하여 현재 F₁₁ 세대까지 진행되어 있는데 그 주요한 특성은 (표 1)과 같으며 이 계통은 벼 국제 표준 유전자지도 제작용 집단으로 추천 이용될 예정이다. 이들 RIL 개체들은 완전 동형체이며 순계로서 종자를 심으면 정확하게 똑같은 순계를 얻을 수 있다. 따라서 RIL 식물체들로 부터 얻은 RFLP 결과는 종자가 보관되고 있는 한 절대로 유실될 수 없으며 RIL 개체로 부터 생산된 종자를 다른 연구자들에게 분양하여 또다른 표지인자들로 부터 얻은 결과와 비교연구하여 종합화할 수 있어 고밀도 염색체 지도작성에 소요되는 시간을 크게 단축시킬 수 있다 (그림 2).

4. 분자유전자지도의 작물 유전연구 및 육종에의 이용

가. Gene Tagging

RFLP marker들의 연관을 이용하여 목적으로 하는 유전자를 tagging 하려면 대상형질의 유전분리를 조사하고 RFLP marker와의 연관을 확인해야 한다.

이와 같은 간접적 선발은 연관된 형태적 marker들을 이용하여 실행하는 방법과 비슷하나 연관된 isozyme 또는 RFLP 표지인자를 이용하면 여러가지 장점들이 있다. 즉 gene tagging 연구들로부터 얻어지는 정보는 (1) 대상으로 하는 특정 표현형질을 조절하는 유전자들의 수, (2) 이들 유전자들의 지도상 위치, (3) 양적형질의 경우 형질발현에 미치는 각 유전자의 상대적 기여도 등의 정보를 얻을 수 있다 (McCouch, et al. 1988). 표현형 선발보다 RFLP marker를 표지로서 한 선발 이용성의 상대적 장점들을 평가하기 위해서는 RFLP를 이용한 실제적

Table 1. Development of Milyang 23/Gihobyeo recombinant in bred lines using single seed descent method for highly saturated molecular mapping of rice

**Milyang 23/Gihobyeo Recombinant Inbred Line
for Highly Saturated Molecular Mapping**

Generation : F11 ('95)

Method : Single Seed Descent

Population size : 164 lines

Characteristics :

- Excellent Population Structure
(Abundant Seed and Easy to Propagate)
- Sufficient Population Size for Fine Mapping of
Target Genes
- High Level of Polymorphism
- Immediate Availability of Pure Lines
- Many Agronomically Valuable Characteristics
Embodied by These Varieties
- Will be Used as a "International Reference
Mapping Population"

Molecular Map of Rice

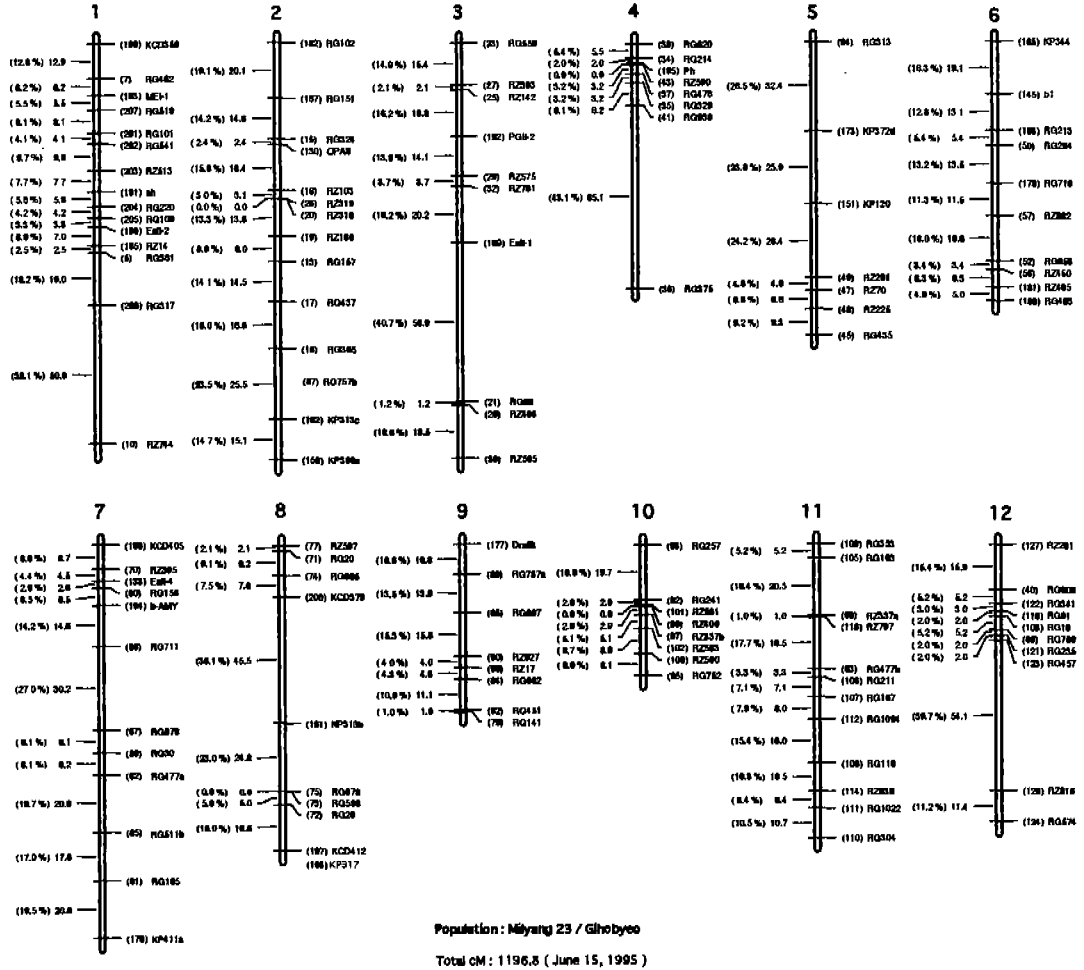


Fig. 2. A molecular map of rice using 164 Milyang 23/Gihobyee recombinant inbred lines in F₁₁ generation (June 15, 1995)

선발과정의 비용뿐만 아니라 gene-tagging에 소요되는 비용까지도 포함해 관행의 표현형 평가 육종법에 대한 전체비용과 비교되어야 하는데 이와 같이 식물육종에 RFLP 표지인자의 이용성 평가에 포함된 사항들이 여러 사람들에 의하여 논의 되었다 (Beckmann and Soller, 1983, Helentjaris et al, 1986).

식물육종 측면에서 marker를 토대로 한 선발은 Southern hybridization 결과에서 특정 RFLP band들의 존재 유무를 근거로 유망한 형질들의 존재 여부를 간접적으로 확인할 수 있다 (Young and Tanksley 1989 a, b). 만약 목적하는 유전자가 RFLP marker와 가깝게 연관되어 있으면 분리세대의 개체를 형질 발현되기 전에 선발할 수 있으므로 취급 개체를 상당히 줄일 수 있으며, 여교잡 후대에서 목적하는 염색체 단편만을 갖는 개체들을 구별 선발할 수 있으므로 목적하는 유전자를 쉽게 도입할 수 있는 것이다. (그림 3)에서는 벼의 반외성 단간(sd-1) 형질이 동위효소 EstI-2와 밀접히 연관되어 있음이 확인 되었으며 1번 염색체의 RFLP 마커와 연관이 확인되어 이들 마커들을 육종에 도입 활용하는 연구가 진행중에 있다.

수량, 품질, 숙기, 응성불임성 등과 같이 식물의 생육 후반기에 나타나는 형질들에 대한 선발이 만약 생육초기에 molecular marker를 토대로 이루어질 수 있다면 시간, 노력 및 경비를 줄일 수 있을 것이며 또한 여러 형질을 한 품종에 모으고자 할 경우에도 대상 형질들과 연관된 RFLP marker를 이용하면 그 효율은 엄청나게 증가할 것이다(Tanksley et al. 1989). 뿐만 아니라 molecular marker들은 codominant하기 때문에 단 한세대의 단일 식물체로부터도 많은 유전자형을 후대검정 없이 구별할 수 있다.

영속적인 병충해 저항성 계통을 만들기 위하여 pyramiding과 multiline 육성방안이 제안되었는데 (Yoshimura et al, 1985) 실용적인 관점에서 흥미있는 일이었으나 기존 관행육종법으로는 육성이 어렵기 때문에 널리 시도되지 못하였다. 그러나 유용한 농업형질 유전자들이 RFLP marker들과 tagging된다면 여교잡법을 이용한 multiline과 near-isogenic line의 육성이 크게 가속화 될 수 있을 것이다.

나. 유전자원의 평가 및 유연관계 분석

RFLP 기술의 또 다른 이용성은 유전자원의 평가 및 유연관계 분석이다. 야생종이나 외래의 유전자원은 유전적 변이가 많으며 이들 중에는 재배종으로 도입하면 유리한 유전자들이 많이 존재하고 있다. 그러나 대부분의 작물들이 서로간의 교잡이 불가능하기 때문에 각 작물 상호간의 유전성 연구가 어렵고

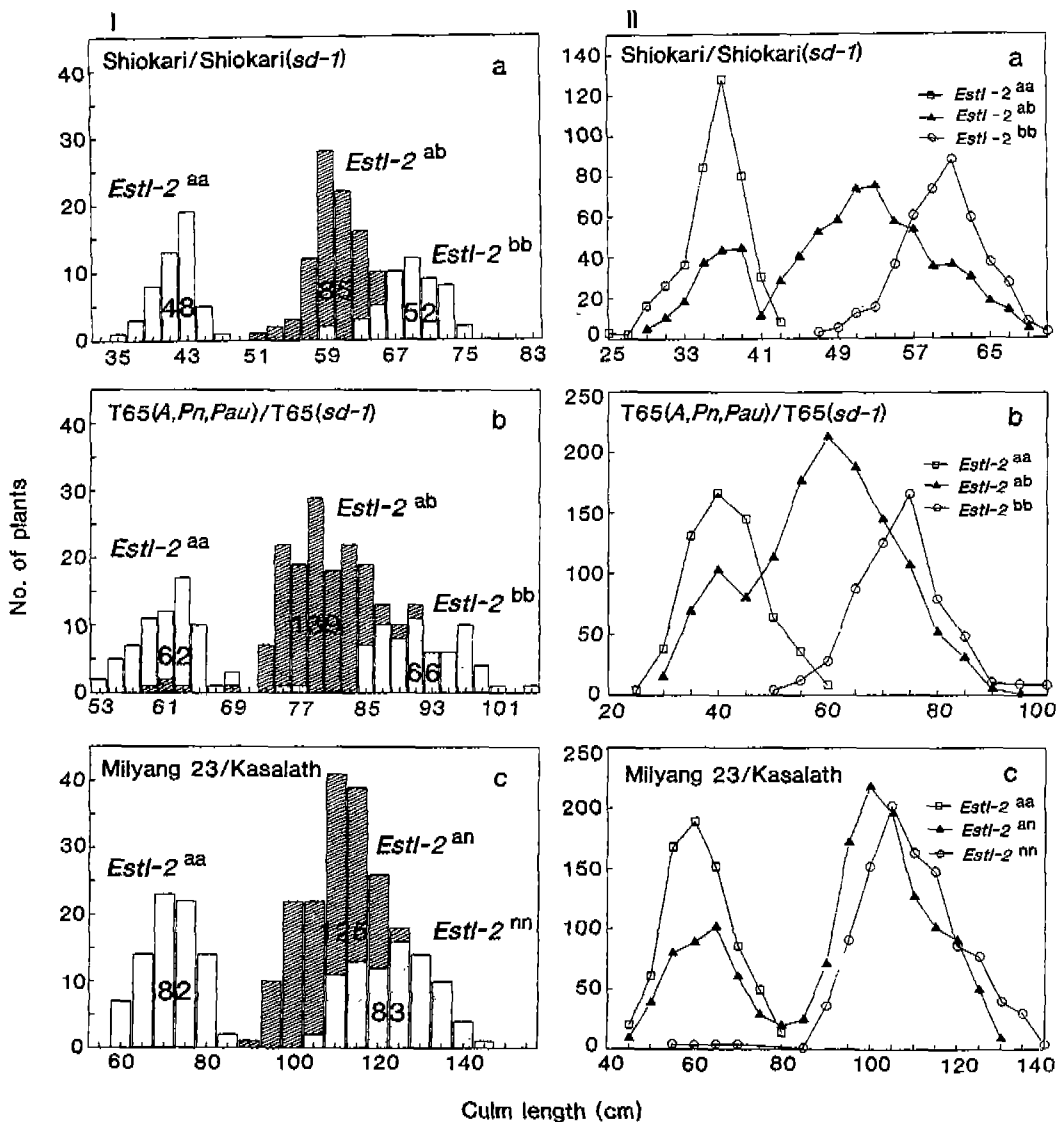


Fig. 3. The distributions of semidwarf and tall culm lengths and *EstI-2* alleles in F_2 and F_3 families of (a) Shiokari/Shiokari (*sd-1*), (b) Taichung 65 (A,*Pn,Pau*)/Taichung 65 (*sd-1*) and (c) Milyang 23/Kasalath. I Segregation of *EstI-2* alleles in relation to culm length in F_2 populations. II Segregation of *EstI-2* alleles and culm lengths in F_3 families (Cho et al., 1994 a, b)

독립적이며 한정되어 있다. 그러나 만약 염색체 내용이나 유전자 순서가 근연 종간에 비슷하다는 것을 파악할 수 있다면 염색체 단편을 바꾸어 넣을 수 있게 될 것이고 따라서 종래의 교배에서 얻은 유전적 변이보다 더 큰 변이를 기대할 수 있을 것이다. 이러한 유전자원들에서 내병충성 유전자와 같은 특성들은 RFLP를 이용하면 효과적으로 평가가 가능하고 여교잡 등을 통하여 유용 유전자만을 쉽게 도입할 수 있다. 최근에는 RFLP 기술을 이용하여 야생종으로부터 밀, 벼, 토마토, 감자 등으로 유용 유전자를 도입하려는 시도가 이루어지고 있다. 대부분의 작물종들은 서로간의 교잡이 불가능하기 때문에 각 작물간 유전연구의 연계가 적고 독립적이며 한정되어 있다. 그러나 RFLP 기술을 이용하면 종간 또는 종내의 유연관계를 보다 정확히 구분할 수 있다. 근래에는 RFLP 분석을 통하여 유연종간의 유전적 다양성을 밝힘으로써 phylogenetic tree를 작성하여 작물 육종에 이용하려는 노력이 이루어지고 있으며(Miller and Tanksley, 1990, Wang and Tanksley, 1989) 유연종간의 genome 분석을 통하여 작물의 진화에 관한 DNA 수준의 검토가 많은 연구자들에 의하여 이루어지고 있다. (그림4)는 우리나라 전역에 분포하고 있는 벼 흰잎마름병균에 대하여 유전자 마커 *aurXa10*과 *xori1M*에 의해 나타나는 RFLP에 의하여 유연적 근연관계를 조사하였던바 기주에 대한 병원력 범위와 밀접히 연관되어 있음이 확인 되었다 (최등미 발표 1995).

다. 유전자 이입(introgression)의 추적

어떤 다른 품종, 지역특이계통 (land race), 혹은 야생종으로부터 우리가 원하는 특정 농업형질을 재배종에 옮겨 넣으려 할때 RFLP분석을 이용함으로써 각 세대별로 원하는 형질의 이입 (introgression)정도를 양적으로 추적이 가능하며 이러한 형질 이입을 주목표로 하고 있는 여교잡(backcross)에서 세대 단축을 하는데 많은 도움을 줄 수가 있다. Young과 Tanksley (1989 a, b)는 이 방법을 이용하여 야생토마토로부터 바이러스 저항성 유전인자를 재배종에 옮겨넣는 방법을 이론적으로 정립하였다. 이런 경우 바이러스 저항성 유전자를 원하는 재배품종에 계속 유지시키기 위하여는 여러 차례의 여교잡을 거치므로써 우리가 바라지 않는 형질과 연관된 염색체 조각들을 서서히 소멸시키는 과정을 거치게 된다. 이렇게 하여 새품종을 개발하는데는 순전히 표현형 분석에만 의존하기 때문에 야생종으로부터 재배종에 혼입을 원치 않는 염색체 부위가 얼마나 될 것인가를 직접적으로 판단하는 것이 불가능하다. 그러나 RFLP를 이용하므로써 육종과정 중에 염색체 단편의 이입정도를 추적할 수 있다(그림 5). 여교잡으로

isoline을 육성할 경우 RFLP marker를 이용한 선발 방법을 적용하면 연관성 영향을 최소화하면서 빠른 세대내에 반복친의 유전자형을 선발할 수 있으며 도입하고자 하는 형질을 정확히 확인 선발할 수 있는 장점이 있다(Young et al 1988, Young and Tanksley, 1989 a, b).

라. 양적형질 유전자 분석

육종가들이 관심을 가지는 대부분의 주요 농업형질들은 여러개의 유전자에 의해 지배되며 양적유전을 한다. 이들 각각의 유전자들은 어떤 형질의 발현에 대한 지배가 낮아 정부방향으로 영향을 미치는 다수의 유전자가 집합적으로 작용하여 한개의 표현형에 영향을 주는 경우에만 그 양적 정도의 측정이 가능하다. 이렇듯이 여러개의 유전자가 작용하는 형질을 일컬어 양적형질이라 하며 이들 형질을 조절하는 유전인자를 양적형질 유전자좌(quantitative trait loci : QTL)라고 부르고 있다.

Molecular marker들의 출현 이전의 양적형질들의 유전분석은 멘델 유전양식을 바로 적용하기 힘들기 때문에 단지 적절한 관행 생물통계학을 이용하여 대개 수행되었다. 현재 지도화된 molecular marker들은 Mendelian 유전자좌가 복잡적으로 관여하는 양적형질들을 파악하기 위한 새로운 방법으로 이용될 수 있으며 (Tanksley et al, 1989), 또한 각각의 형질발현에 대한 기여도의 상대적 크기 뿐만 아니라 이들 형질들의 표현에 포함된 유전적 요인들의 수와 염색체 위치에 관한 정보의 획득이 가능하게 되었다 (Knapp and Bridges, 1990).

Paterson 등 (1988)은 토마토에서 과실의 무게, pH, 고형분 등 양적형질들과 RFLP 표지인자와의 연관관계를 조사하여 무게는 6개, 과실의 pH는 5개, 과육질은 4개의 RFLP 표지인자가 이들의 발현에 연관되어 있다고 하였고, Kinzer 등 (1990)은 토마토의 숙기와 관련있는 cDNA clone을 선발하여 양적형질을 탐색한 바 있다. 이 밖에도 양적형질과 관련한 연구로는 양적형질 분석을 위하여 기존의 maximum likelihood analysis 방법 (Allard, 1956)을 수정 보완하여 RFLP 표지인자와의 관계를 분석하려는 시도 (Lander와 Botstein, 1989)가 이루어지고 있으며, 여러 작물에서 수량, 숙기, 품질등 농업적으로 중요한 양적형질의 탐색에 RFLP 기술을 이용한 연구들이 진행되고 있다.

마. 유전자 지도를 활용한 유전자 분리 증식(Map-based Cloning)

유전자 산물이 알려진 유용 유전자들은 대개 유전공학적으로 쓸수 있도록

분리증식하는 방법이 잘 개발되어 있으나 불행히도 식물에서는 유전자 산물이 잘 밝혀져 있지 않아 유용한 유전자를 분리 증식하는 기술이 발전되어 있지 못하다. 병해 저항성과 같은 특수한 유전자는 유전 현상이 잘 밝혀져 있는데도 불구하고 이들 저항성이 근본적 기작이나 저항성 유전자가 생산하고 있는 물질의 종류에 대한 정보는 그리 알려져 있지 않다. 그러므로 유전자 산물을 모르는 내병성 유전자와 같은 농업적으로 중요한 유전자를 분리 증식하는 방법이 무엇보다도 필요한 것이다. 이런 경우 기본적으로 두가지 방법이 유전자 분리 증식에 쓰이고 있다. 그 하나가 transposon tagging을 이용하여 insertional mutagenesis를 유기하거나 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환으로 T-DNA를 도입시키는 방법이며, 또 다른 하나는 역유전 (reverse genetics) 혹은 chromosome walking이라 불리는 방법에서와 같이 연관된 마커를 시작으로 하여 복제하는 방법이 있다.

고도로 포화된 RFLP 지도를 이용한 gene cloning의 가능성은 초파리, 박테리아 및 인체에서 입증 되었는데 현재 동물에서 확립된 물리적 mapping 기술을 응용하여 식물에서 연구가 진행되고 있다. 이런 chromosome walking 방법은 근본적으로 목표 유전자 부근의 염색체 단편 양쪽으로 마커들이 충분히 인접하여 있도록 매우 조밀하게 집단화 되어야 한다. 이것은 chromosome walk 또는 jump에 대한 방향성을 가지게 하는 중대한 정보를 제공하며 또한 조환가로 표현되는 유전적 거리와 base pair로 나타내는 물리적거리 간의 차이를 확인하는 정보를 제공한다. 이는 가깝게 인접해 있는 마커로부터 시작하여 유전자가 존재해 있는 염색체 방향으로 걸치기로 복제해 나감으로서, 혹은 띠엄띠엄 점프식으로 염색체의 먼 부위를 복제하여 원하는 유전자가 포함되어 있는 염색체 절편을 찾아가는 것이다. 이러한 방법은 이론적으로는 쉬운 일 같지만 실제로 수행하는에는 어려움이 많다. 예를 들면 마커사이가 1cM만 떨어져 있다고 할 경우에도 물론 작물의 종류에 따라 다르겠지만 대개 수십만 혹은 수백만 염기쌍이 그 안에 존재하는 것이기 때문에 그 규모가 사실 엄청난 것이다.

최근에 cosmid, yeast artificial chromosome (YAC), bacterial artificial chromosome (BAC) 벡터등이 개발되어 비교적 커다란 크기의 게놈 DNA 절편들을 포함한 유전자 은행을 제작, 선발 연결시켜 나가며, pulsed-field 전기영동법을 응용하여 100Kb 이상의 거대 DNA 절편을 분리하여 우리가 목표로 하는 유전자지도를 작성하여 이용할 수 있다. 이렇게 하여 수백 kb에 이르는 크기의 큰 절편을 분석함으로써 유전자 지도와 물리적 지도(physical map)를 서로 연관시키는 것이 가능할 뿐아니라 gene family나 tandem repeat 같이 복잡한 유전자

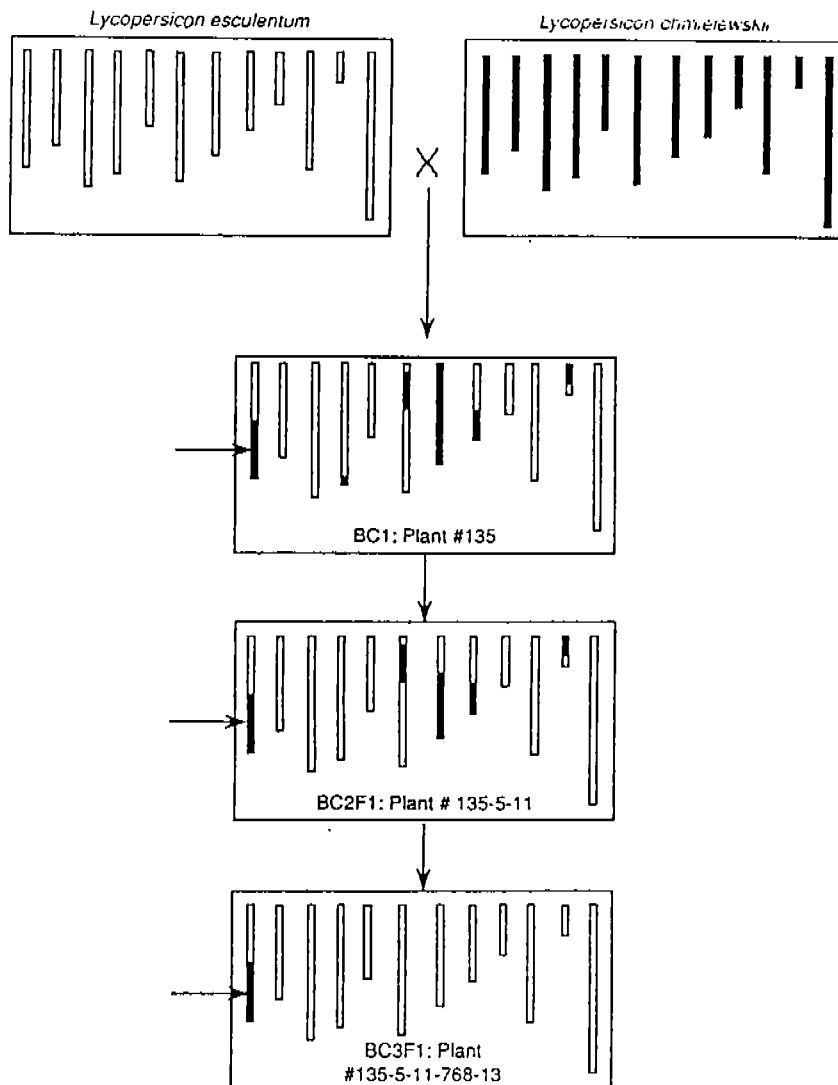


Fig. 5. Use of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) to eliminate undesirable regions of donor genome. Quantitative trait loci (QTL) mapping showed that a segment of chromosome 1 from *Lycopersicon chmielewskii* (indicated by filled chromosomes) was valuable in elevating the soluble solids concentration of *Lycopersicon esculentum* (tomato; indicated by open chromosomes) (Paterson et al., 1990). Using RFLPs to identify chromosome segments from *L. chmielewskii*, one plant in the first backcross generation (#135) was found which carried only five undesirable segments of *L. chmielewskii* genome, in addition to the desired region of chromosome 1. after two additional backcrosses to *L. esculentum*, using RFLPs to select against these undesirable segments, a single plant (#135-5-11-768-13) was found which was carrying only the segment of interest.

좌의 지도를 만드는데도 유용하게 이용될 수 있다.

예를 들면 벼의 반왜성 유전자(sd-1)의 위치가 RG220등의 RFLP 표지인자와 Est I-2(esterase) 유전자 간의 연관관계를 near isogenic line(NIL)을 육성하고 여러 세대간의 교배에 의한 조합들을 분석함으로써 특정 RFLP 표지인자와 sd-1 유전자간의 거리가 1cM이하임을 밝힌 바 있다. 특정 RFLP 표지인자를 이용하여 YAC 클론을 선발한 후 이를 근거로하여 목표 유전자 sd-1을 포함하면서 겹치기로 연속된 YAC 클론을 차례로 찾은 다음, 이 부분에서 coding하는 cDNA 유전자를 선발하여 분석하거나 아예 YAC 삽입단편 전부를 유전자총 등으로 식물에 형질전환 함으로써 단간 유전자를 확인 분리하는 연구가 이루어지고 있다 (그림 6, 7).

바. 비교염색체 지도의 작성 및 이용

작물에서 작성되고 있는 RFLP 유전자지도는 유전자들의 클론된 단편을 대부분 프로브로 이용하기 때문에, 염색체 상의 유전자의 순서와 방향을 알 수 있다. 초기의 유전자지도 작성자들은 각각 별개의 작물과 프로브들을 이용하여 독립적으로 유전자지도를 작성하였기 때문에, 동일한 작물에 대해 작성된 유전자지도라 할지라도 실험실간에 비교하기가 힘들었으나 지금은 원연간의 작물 간에도 genome 구조를 비교할 수 있다는 것이 밝혀지고 있다.

첫번째의 예는 토마토에서 유래한 프로브를 이용하여 토마토와 감자의 12개 염색체 상에서의 유전자 순서가 몇몇의 역위(inversion)를 제외하고는 동일하다는 보고였다 (Tanksley et al, 1992). 따라서 토마토의 genome보다 3배 큰 genome을 가지고 있지만, 동일한 기본 염색체 수를 가지고 있고 근연 관계에 있는 고추가 유전자의 순서에 있어서 토마토와 많은 변이를 보인 것은 실망스러운 일이었다(Tanksley et al, 1988).

화본과에서는 상황이 나은 편이었다. 세포유전학적으로 유사한 염색체 구조를 가지고 있고 비슷한 DNA 함량을 보유하고 있는 밀, 보리 및 귀리가 광범위한 유전자들의 *synteny*를 보였으며(Devos et al, 1992), genome 크기에서 3.5배 이상의 차를 보이지만, 같은 족(tribe)에 속하고 동일한 기본염색체수 ($n=10$)를 가진 수수와 옥수수가 다수의 역위, 전좌, 염색체 소실등에도 불구하고 전반적으로 유전자의 순서가 일치하였다 (Hulbert et al, 1990). 더욱 놀라운 사실은 형태적으로 화본과의 양 극단에 위치하고 있고 (다른 족에 속하고, genome 크기에서 6배의 차이가 남) 기본 염색체 수가 다른 벼($n=12$)와 옥수수($n=10$)가 염색체의 광범위한 부분에서 유전자의 순서가 잘 보존되어 있었으며, 어떤 경우에는

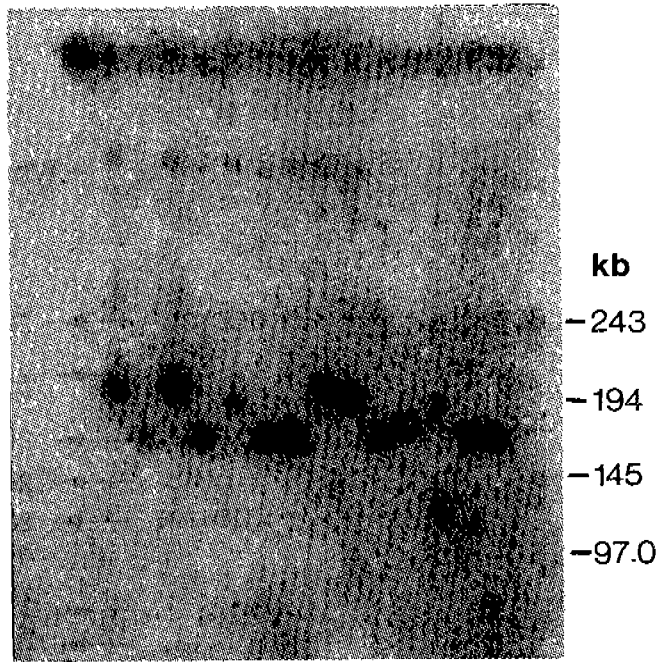


Fig. 6 Pulsed field gel separation of YACs and its identification by Southern blot. The 1% agarose gel was run at 200V using ramped pulse times from 12.6 to 44.7 sec. for 24 hours in 0.5X TBE. The gel DNA was transferred onto nylon membrane. As probe, pBR322 labeled with [³²P] dCTP was used.

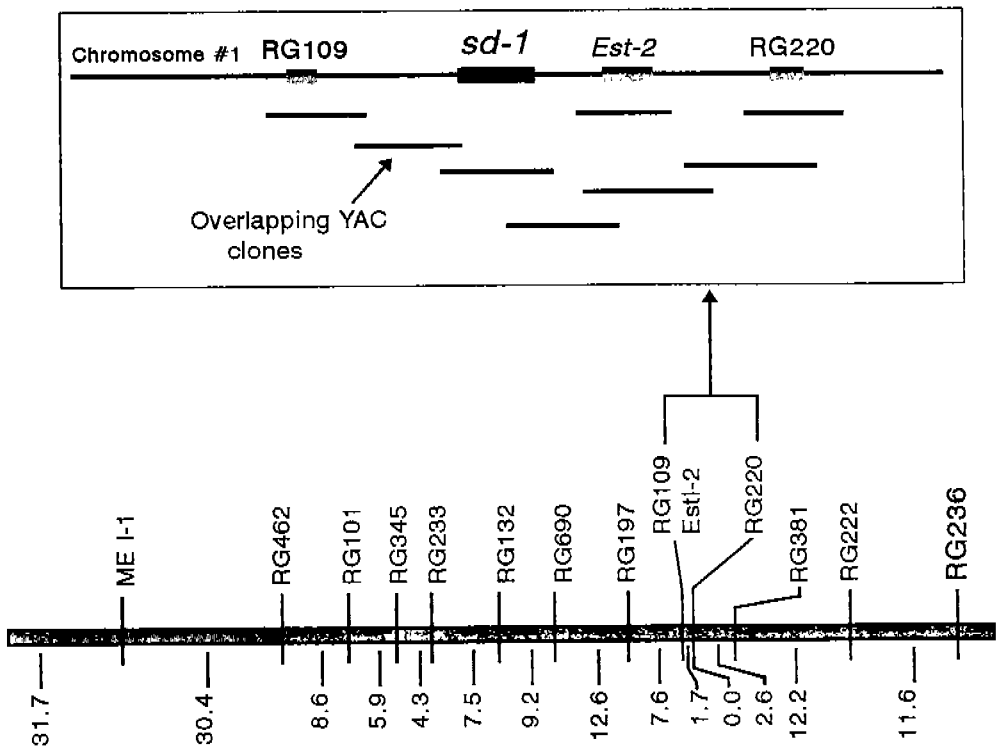


Fig. 7. Steps involved in RFLP map-based cloning of semidwarf (*sd-1*) gene of rice.

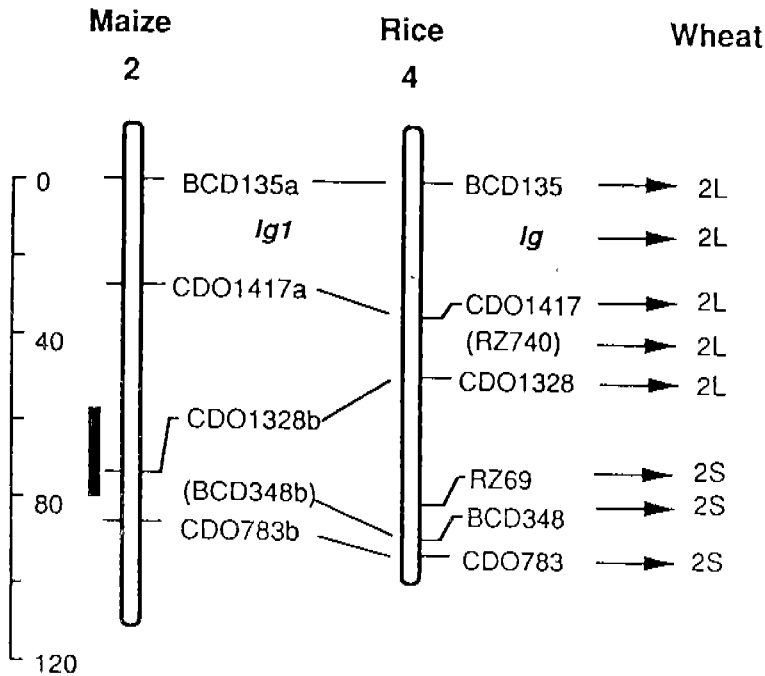


Fig. 8. Conserved linkage between maize chromosome 2 and rice chromosome 4 with corresponding loci on wheat chromosome 2. Scale in Haldane cM is shown at the left side. Markers indicated by *tick marks* have been ordered with LOD > 2 using Mapmaker software (Lander et al. 1987). Markers in *parentheses* have been located to intervals with LOD < 2. Maize/rice comparison based on Ahn and Tanksley (1993). The *thick bar* along the left side of maize chromosome 2 indicates the approximate position of the centromeres. B-A translocation stocks were used to locate the position of centromere in the maize map (Beckett 1978; Burr et al. 1988). Loci connected by a line are detected by the same clone. The gene for loss of ligule (*lg* locus in rice and wheat and *lg1* in maize) appears to be conserved among the three species.

염색체의 전체 arm이 유전자의 순서와 내용에서 두 작물이 동일하였다 (Ahn and Tanksley, 1993b). 벼와 밀 간에도 비슷하게 광범위한 synteny가 관찰되었는데 이는 화분과 작물이 조상식물로 부터 유래한 서로 연계된 genome을 가지고 있으며 상대적인 유전자의 순서가 genome 크기의 방대한 증가에도 불구하고 때때로 잘 보존되어 있다는 것을 시사해 준다 (그림 8) (Ahn and Tanksley 1993a). 원근연 작물간의 유연관계와 이에 기초한 비교 염색체지도를 이용하여 한 작물에서만 지도화된 표지인자들의 타 작물에서의 염색체상 위치를 예측할 수 있어서 (그 역도 가능) 비교되는 여러 작물의 염색체지도 작성에 효율을 기대할 수 있다. 작물의 염색체지도의 결합은 단지 marker수의 증가 뿐 아니라 genome 중 특별히 관심 있는 지역이 marker의 유용한 공급원이 될수가 있는데 이는 한 작물의 genome중 어떤 부분에 marker들이 분포하지 않아서 새로운 marker들이 필요한 경우나 흥미있는 유전자를 map-based cloning하기 위해 그 유전자가 위치하는 genome의 한 부분을 여러개의 밀접한 marker들로 포화시키는 경우이다. 또한 비교염색체 지도는 농업적으로 중요한 질적형질(병해충 저항성 등) 및 양적형질에 관여하는 유전자들이 비교되는 작물간에 동일한가의 여부를 밝히는 중요한 정보를 제공할 수 있는데 만일 유전자가 잘 보존된 염색체 지역에 있으면 그 형질은 같은 유전자의 다른 allele에 의해 지배되는 것을 시사해 주며 이런 유전자를 map-based cloning할 경우 genome 크기가 큰 작물보다 작은 작물을 선택해서 하는것이 훨씬 효과적일 수가 있다.

사. Random cDNA 단편 염기서열 분석에 의한 유용유전자 탐색

최근 한식물을 구성하는 식물전체의 유전자지도를 작성하고, 이를 바탕으로 전체 염색체의 유전자 기능과 구조를 밝히려 하는 식물 게놈 연구가 진행되고 있다. 이는 고유유전자의 확보와 유전자 구조에 대한 다량의 정보를 제공하고 있어 조직적인 생명공학 분야 연구수행에 필수적인 발판이 되고 있다. 한편 고밀도 유전자지도를 이용한 chromosome walking이나 gene tagging등의 방법은 유전자 산물이 밝혀지지 않은 대부분의 농업 형질 유전자의 분리에 필수적인 방법이지만, 이와 같은 목표지향적 방법은 연구결과의 획득에 비용이 많이 들고 장시간이 소요되어 실제로 충분한 양의 식물 유전자 자원을 제공하지 못하고 있다.

반면 특정한 유전자 선발을 목표로 하지 않으나 대량의 유전자 확보를 위한 접근방법으로 random cDNA 단편 염기서열 분석 방법이 있다. 최근 시도되고 있는 cDNA 염기분석을 이용한 대량 cDNA 카탈로그 작성은 발현 유전자 단편

(expressed sequenced tags, EST)을 이용한다. 이 EST는 일반적으로 poly (A+) RNA로 부터 얻어진 cDNA 단편 염기서열을 일컫는다. 이러한 EST는 발현된 유전자의 단백질 정보 부위만을 포함하기 때문에 조직특이성이나 성장단계의 유전자의 선별에 효과적으로 이용될 수 있다. 분석된 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열은 국제적으로 유전자가 등록된 GenBank나 EMBL에서 유사성 (homology)을 컴퓨터를 이용하여 검색한다. 1995년 5월 현재 이들 컴퓨터 Database에 등록된 유전자들은 28만종이 넘고 있으며 매일 엄청난 숫자로 증가되고 있다. 현재 벼 genome 연구에서도 미숙종자로 부터 만든 cDNA clone의 염기서열을 분석하고 있는데 1년차 2,000여개의 clone의 부분염기서열을 분석 유사성을 비교하여 database화 하고 있다 (그림 9). 대체로 식물체에서 무작위로 cDNA를 선별하여 염기서열을 분석, 유사성을 비교하였을때 20% 수준의 클론만이 동정이 가능하다. 이런 대량 cDNA 염기서열 분석 방법으로 식물 유전공학에 필요한 유전자 자원을 확보할 수 있을 뿐만 아니라 더욱 포화된 RFLP map의 probe로 이용하고 농업 유용 형질과의 연관관계의 규명, physical map 작성시 tag site로 이용하며 조직이나 특정 성장 단계의 유전자 발현양상 등의 구명에도 이용되고 있다.

5. 결 언

분자유전자 지도를 이용하여 작물의 육종적 효율을 높이려는 연구는 1980년 Bostein 등에 의해 인체 RFLP 연관지도가 작성된 이래 꾸준히 발전되어 현재 옥수수, 토마토, 가지과 작물, 유채속, 밀, 보리, 상치, 대두, 벼 등에서 고밀도 연관지도가 작성됨은 물론 육종적 이용을 위한 데이터 입력, 처리, 결과분석 방법 등에 있어서 급속한 진전이 이루어지고 있다.

RFLP와 RAPD등을 이용하는 분자유전자 지도의 작물육종적 효율성은 높은 다양성을 나타내는 DNA 마커의 개발과 이들 마커와 유용형질간의 연관정도 그리고 이러한 기법을 이용하는데 필요한 노력과 비용에 의해 크게 좌우된다고 할수 있다. 그러나 분자유전자 지도의 유용성에도 불구하고 DNA 마커의 작물 육종적 이용에는 두가지 커다란 걸림돌(문제점)이 있는데 그 하나는 많은량의 시료를 분석하는데는 한계가 있으며 둘째 주요농업 형질을 지배하는 양적형질 유전자에 대한 개별적 “클론화”에 아직도 어려움이 따르고 있다는 점이다.

DNA마커를 이용하는다는 우선 DNA의 순수분리, 제한효소 처리, 전기영동, 멤브레인으로의 전이, DNA 표식 및 잡종화 등 일련의 과정은 노력과 숙련된

기술이 요구되는 실제로 DNA 마커의 이용에 필요한 과정은 DNA 분리와 염기서열 변이의 탐지 두가지뿐이므로 어떻게 여러과정을 최대한 단축시켜 시간과 비용을 절약하는 방법을 개발하는 것이 육종적 효율을 높이는 중요한 관건이 된다.

RFLP 마커를 이용한 단순유전자의 탐지는 이제 일상적인 기술로 인식이 되어 있지만 아직도 양적형질 유전자(QTL)의 본질은 규명하려는 연구는 아직 초보적 단계에 지나지 않으며 이러한 복합 유전형질은 단순 유전자의 형태로 분리하여 개별적으로 클론화 하려는데 유전자 혹은 유전자 발현 조절 수준에서의 분자생물학적, 생화학적 기술 축적이 무엇보다 중요하다. 특히 유전자의 연관지도를 토대로 유용유전자는 분리하는 전략은 유전자의 발현 산물의 특성에 대한 정보가 없는 경우에 이용할 수 있지만 고밀도 유전자 연관지도 및 RFLP 지도의 개발, DNA 삽입 단편 크기가 큰 YAC 유전자 은행의 제작등이 선결되어야 한다. 또한 게놈의 크기가 작고 반복적으로 존재하는 염기서열의 빈도가 낮으며 형질전환 및 재분화 체계가 갖추어져 있는 식물종에서 효과적으로 사용할 수 있다.

분자유전자 지도의 육종적 이용에 있어서 우리모두 염두에 두어야 할 사실은 이러한 분자유전자적 접근기술은 어디까지나 보조적 기술로 인식되어야 한다는 점이다. 즉 기존의 육종체계와 조화는 이룰때 분자유전학적 기술이 그진가를 발휘하게 되므로 첨단기술 연구 종사자와 기존 육종가와의 긴밀한 연구 협조 체계가 그 어느때보다 절실히 요구된다 하겠다.

참 고 문 헌

- Andrzej Konieczny and Frederick M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4(2), 403-410.
- Ahn S., J.A. Anderson, M.E. Sorrells and S.D. Tanksley. 1993a. Homoeologous relationships of rice and wheat chromosomes. *Mol. Gen. Genetics* 241:483-490
- Ahn S., and S.D. Tanksley. 1993b. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7980-7984
- Allard, R.W. 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24 : 235-278.
- Beckmann, J.S. and M. Soller. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement : methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67 :35-43.
- Bernatzky, R. and S.D. Tanksley. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112 : 887-898.
- Bonierbale, M.W., R.L. Plaisted, and S.D. Tanksley. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120 : 1095-1103.
- Bostein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32 :314-331.
- Burke D.T., G. F. Carle, and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vector. *Science* 236 : 806-812.
- Burr, B., F.A. Burr, K.H. Thomsopson, M.C. Albertson, and C.W. Suster, 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118 : 519-0526.
- Cheung W.Y. and M.D. Gale. 1990. The isolation of high molecular weight DNA from wheat, barley and rye for analysis by pulse-field gel

electrophoresis. *Plant Mol. Bio.* 14 : 881-888.

Choi, S. H. and J. E. Leach, 1994. Identification of the XorII methyl-transferase gene and a vsr homolog from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Gen. Genet* 244 : 383-390.

Choi, S. H. 1993. Restriction-modification systems and genetic variability of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Ph. D. thesis. Kansas State University. 162 pp.

Cho Y. G., M. Y. Eun, Y.K. Kim, T.Y. Chung, and Y.A. Chae, 1994. The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). I. Linkage with the esterase locus, EstI-2. *Theor. Appl. Genet.* 89:49-53

Cho Y.G., M.Y. Eun, S.R. McCouch, and Y.A. Chae. 1994. The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 89 : 54-59.

Devos K.M., M.D. Atkinson, C.N. Chinoy, C.J. Liu, and M.D. Gale, 1992. RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 83:931-939.

Friar E., G. Kochert. 1994. A study of genetic variation and evolution of *Phyllostachys* (Bambusoideae : Poaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 89:265-270

Friar E. and G. Kochert. 1991. Bamboo germplasm screening with nuclear restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 82:697-703

Huang H. and G. Kochert. 1994. Comparative RFLP mapping of an allotertaploid wild rice species (*Oryza latifolia*) and cultivated rice (*O. sativa*). *Plant Molecular Biology* 25:633-648.

Halward, T., T. Stalker, and G. Kochert. 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. *Theor. Appl. Genet.* 87:379-384.

은무영, 조용구, 정태영, 1988 등전점 전기영동법에 의한 벼 종자내 Esterase 동위효소 품종특성 구분. *농시논문집* 30, B(1) : 21-26.

은무영, 김용권, 조용구, 정태영. 1990. 등전점 전기영동법에 의한 벼 종자내 esterase 동위효소 유전분석. *한국육종학회지* 22(3) : 252-259.

은무영, 김용권, 조용구, 김영우, 정태영, 최해준, 1990. 한국벼 재래종의 동위효소 형태특성에 의한 품종구분. *한국육종학회지* 21(4) : 293-299.

- Ganal, M.W., N.D. Young, and S.D. Tanksley. 1989. Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the *Tm-2a* region of chromosome 9 in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 215 : 395-4000.
- Goodman. R.M., Hauptli. H., Crossway. A., and Knaut, V.C. 1987. Gene transfer in crop improvement. *Science* 236 : 48-54.
- Halward T., T. Stalker, E.LaRue and G.Kochert. 1992. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Molecular Biology.* 18:315-325.
- Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer, and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Gen.* 72 : 761-769.
- Hopkins, C., White, F., Choi, S., Guo, A., Leach, J. 1992. Identification of family of a avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-microbe Interact.* 5:451-459.
- Hulbert S.H., T.E. Richter, J.D. Axtell, and J.L. Bennetzen, 1990. Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4251-4255
- Iwata, N., H. Satoh and T. Omura. 1979. Linkage studies in rice. On some genes described newly which belonging to the third linkage group. *Jpn. J. Breed.* 29(Suppl. 1) : 234-235.
- Jena K.K., G.S.Khush, and G.Kochert. 1992. RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. *Theor. Appl. Genet.* 84:608-616.
- Kinzer, S.M., S.J. Schwager, and m.A. Mutschler. 1990. Mapping of ripening-related or ripening-specific cDNA clones of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theor. Appl. Genet.* 79 : 489-496.
- Knapp, S.J. and W.C. Bridges. 1990. Using molecular markers to estimate quantitative trait locus parameters-Power and genetic variances for unreplicated and replicated progeny. *Genetics* 126 : 769-777.
- Kochert G., T. Halward, W.D. Branch and C.E. Simpson. 1991. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theor. Appl. Genet.* 81:565-570.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, J. J. 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.

Lander, E. S. and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121 : 185-199.

Leach, J., Adhikari, T., Choi, S., Vera cruz, C., Zhang, Q., Skinner, D., Nelson, R. and Mew, T. 1994. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Phytopathology* 84:1069 (abstract).

Martin, B., J. Nienhuis, G. King, and A. Schaefer. 1989. Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science* 243 : 1725-1728.

Miller, J. C. and S. D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80:437-448.

Nienhuis, J., T. Helentjaris, M. Slocum, B. Ruggero, and A. Schaefer. 1987. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. *Crop Sci.* 27:797-803.

Paterson, A. H., E. S. Lander, I. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln, and S. D. Tanksley, 1988. Resolution of quantitative trait into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335(6192) :721-726.

Paterson, A.H., J. W. Deverna, B. Laninin, and S. D., Tanksley. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124 : 735-742.

Sax, K. 1923. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8 : 332-360.

Song K., T.C. Osborn, and P.H. Williams. 1990. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa*(*Syn campestris*). *Theor. Appl. Genet.* 79 : 497-506.

Woo S.S., Jiming Jiang, Bikram S.Gill, Andrew H.Paterson and Rod A.Wing. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of Sorghum bicolor. *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No. 22.

서학수, 허문희, 1978. 수도품종간 교잡에 있어서 간장의 유전분리. VI. 수도 품종 통일 semidwarf 유전자 분석. *한국육종학회지* 10(1) : 1-6.

Tanksley S.D., M.W. Ganal, J.P. Prince, M.C. Dvicente, and M.W. Bonierbale, et al, 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-60.

Tanksley S.D., R. Bernatzky, N.L. Lapitan, and J.P. Prince, 1988. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6419-23.

Tanksley, S.D. and J. Hewitt. 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato-A re-examination. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 811-823.

Tanksley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson, and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding : New tools for an old science. *Biotechnology* 7 : 264-263.

Wang, Z. Y. and S. D. Tanksley. 1989. Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L : *Genome* 32 : 1113-118.

Zhao, X., and G. Kochert. 1993. Clusters of interspersed repeated DNA sequences in the rice genome (*Oryza*). *Genome* Vol. 36.

Yoshimura A, Omura T, Mew TW, and Khush GS. 1985. Genetic behavior of resistance to bacterial blight in differential rice cultivars in the Philippines. *Bull. Inst. Trop. Agr. Kyushu Univ.* 8 : 1-54.

Young, N. D., D. Zamir, M. W. Ganal, and S. D. Tanksley. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics* 120 : 579-585.

Young, N. D. and S. D. Tanksley. 1989a. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 353-359.

Young, N. D. and S. D. Tanksley. 1989b. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 95-101.

GENOME MAPPING TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION IN PLANT BREEDING

Moo Young Eun

Division of Cytogenetics

National Agricultural Science and Technology Institute

Suwon 441-707, KOREA

ABSTRACT

Molecular mapping of plant genomes has progressed rapidly since Bostein et al.(1980) introduced the idea of constructing linkage maps of human genome based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. In recent years, the development of protein and DNA markers has stimulated interest for the new approaches to plant improvement. While classical maps based on morphological mutant markers have provided important insights into the plant genetics and cytology, the molecular maps based on molecular markers have a number of inherent advantages over classical genetic maps for the applications in genetic studies and/or breeding schemes. Isozymes and DNA markers are numerous, discrete, non-deleterious, codominant, and almost entirely free of environmental and epistatic interactions. For these reasons, they are widely used in constructing detailed linkage maps in a number of plant species.

Plant breeders improve crops by selecting plants with desirable phenotypes. However a plant's phenotype is often under complex genetic control, positioning at different "quantitative trait loci" (QTLs) together with environmental effects. Molecular maps provide a possible way to determine the effect of the individual gene that combines to produce a quantitative trait because the segregation of a large number of markers can be followed in a single genetic cross. Using marker-assisted selection, plants that contain several favorable genes for the trait and do not contain unfavourable segments can be obtained during early breeding processes. Providing molecular maps are available, valuable data relevant to the taxonomic relationships and chromosome evolution can be accumulated by comparative mapping and also the structural relationships between linkage map and physical map can be identified by cDNA sequencing. After constructing high density maps, it will be possible to clone genes, whose products are unknown, such as semidwarf and disease resistance genes.

However, much attention has to be paid to level-up the basic knowledge of genetics, physiology, biochemistry, plant pathology, entomology, microbiology, and so on. It must also be kept in mind that scientists in various fields will have to make another take off by intensive cooperation together for early integration and utilization of these newly emerging high-techs in practical breeding.

Keywords: genome, RFLP, molecular map, linkage analysis, plant breeding