

마늘(*Allium sativum* L.) 게놈의 高反復序列의 分離와 特性 調査

嚴 銀 美 · 李 東 熙*

梨花女子大學校 自然科學大學 生物科學科

본 연구는 마늘(*Allium sativum* L.)의 기초적인 유전적 특성을 파악하기 위해, 단양마늘을 대상으로 염색체 DNA의 반복서열의 양상을 확인하고, 고반복서열이 매우 빠르게 reassociation되는 특성을 이용하여 이들에 해당되는 부분을 분리하고, 클로닝하였다. 이들 고반복서열 클론의 게놈 내의 copy수는 대체적으로 $10^2 \sim 10^6$ 이었다. 이 중 일부 클론의 염기서열을 분석한 결과, G/C 함량은 25~40% 정도로 낮았고, 일부서열의 내부에서는 소단위의 염기서열이 반복배열되어 있었다. 단양을 비롯한 문경, 서산, 의성 품종 사이에서 해당 반복서열의 변이정도를 조사하기 위하여, 다섯종류의 고반복서열을 탐침으로 이들 품종 마늘에 대한 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석을 한 결과 이들 서열의 유전적 변이는 거의 나타나지 않았다.

주요어: 고반복서열, 마늘품종, 마늘게놈, 다형화현상

대부분의 고등생물은 전체 게놈의 50% 이상에 해당하는 반복서열을 포함하고 있다. 이처럼 반복서열은 고등생물 전체 게놈의 대부분을 구성하므로 전체 게놈의 구조나 기능을 이해하기 위하여 연구되어 왔으나, 반복수, 구조, 염기서열이나 염색체에서의 위치, 진화적 기원 등 그 특성에 대해서는 아직 자세히 알려지지 않았다. 지금까지 알려진 바에 의하면, 반복서열은 수 개에서 수 천개의 염기쌍을 단위로 주로 telomere나 centromere와 같이 특정 heterochromatic 부위에 긴 중열반복서열(tandem repeat sequence)로 분포하거나, 게놈 전체에 고루 산재해 있다. 또한 대략 $10^2 \sim 10^6$ 정도의 copy수로 존재하며, 이러한 높은 copy수는 반복서열의 대표적인 특성이다.

근래 반복서열에 대한 연구는 동물뿐 아니라 여러 식물종을 대상으로도 진행되어지고 있으며, 밀(Dennis *et al.*, 1980), 벼(Zhao *et al.*, 1989; Grebenstein, 1995), 보리(Molnar *et al.*, 1989), *Arabidopsis thaliana*(Simeons *et al.*, 1988; Depeiges *et al.*, 1995), *Brassica napus*(Xia *et al.*, 1993) 등에서 이에 대한 연구결과가 보고되어 있다. 또한 고등식물의 경우

$10^4 \sim 10^6$ 의 copy수를 갖는 고반복서열(highly repetitive sequences)이 전체 게놈의 10~20% 정도로 존재하는데, 이들은 긴 중열반복서열로 존재하거나 단일서열이나 다른 반복서열 사이에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(Benbrook *et al.*, 1980; Simeons *et al.*, 1988; Xia *et al.*, 1993). 이와같이 다수의 식물에서 반복서열이 보고·연구되고는 있으나, 아직 그 생물학적 기능에 대해서는 뚜렷이 제시된 경우가 드물다. 주로 동물세포나 효모, 곤충을 대상으로 한 기존의 연구를 바탕으로 게놈 크기의 결정이나 염색체 folding, pairing, 유전자 발현조절, 종분화 등에 기여하는 것으로 추측하고 있다(Cooper, 1964; Davidson and Britten, 1979; Butner *et al.*, 1986).

마늘은 식용 및 약용 등 다방면으로 이용되며, 전 세계적으로 널리 재배되는 작물이다. 그러나 교잡이 불가능한 영양번식 식물의 특징때문에 전통적인 유전학에 바탕을 둔 육종이나 계통분류 등에 많은 제약을 받아왔으며(Etoh, 1985), 기초적인 유전적 특성도 잘 파악되어 있지 않다. 본 연구는 유전적 기초조사의 일환으로 매우 빠르게 reassociation되는 고반복서열의 특성을 이용하여 고반복서열을 분리·클로닝하였고, 4개 품종 사이의 고반복서열의 변이정도를 조사하였다.

*교신저자 : Fax (02) 360-2385

© 한국식물학회 [서울] 1996

재료 및 방법

실험재료 및 시약

단양, 문경, 서산, 의성의 각 품종 마늘(*Allium sativum* L.)은 시중 또는 현지에서 확보하였다. Double-stranded DNA의 분리에 사용한 hydroxylapatite는 Bio-Rad제품을 사용하였고, DNA 정제에는 BIO101제품의 GeneCleanII kit를 이용하였다. DNA 염기서열분석은 USB의 sequencing kit와 Amersham의 [α - 35 S] dATP를 구입하여 사용하였다. [α - 32 P] UTP와 [α - 32 P] dCTP는 Dupont에서 nucleotide triphosphate는 Pharmacia에서, Southern blot에 사용된 membrane은 Hybond-N⁺로써 Amersham에서 구입하였다. Random primer labelling kit는 Stratagene제품을 사용하였다.

염색체 DNA의 추출

각 품종의 염색체 DNA는 다음과 같은 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 방법(Roger and Bendich, 1988)을 사용하여 잎조직으로부터 추출하였다. 액체질소를 사용하여 시료를 막자사발에서 분쇄한 후, 65°C, 2X CTAB buffer[2%(w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone (MW 40,000), pH 8.0]를 같은 부피만큼 첨가하여 잘 섞었다. 동일한 부피의 chloroform/isoamylalcohol(24:1)로 1회 추출하고, 1/10 부피의 10% CTAB 용액(10% CTAB, 0.7 M NaCl)을 가한 후, chloroform/isoamylalcohol 추출을 반복하였다. 새 tube로 옮겨진 상층액에 동일한 부피의 CTAB precipitation buffer(1% CTAB, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 넣어 혼합하였고, 이때 침전체로 생성된 핵산 중 사상으로 엉긴 핵산을 건져내고 나머지 핵산 침전체는 3000 g로 30분동안 원심분리하여 침전시켰다. 건져진 핵산과 침전된 핵산을 모아 진공건조시킨 후, high-salt TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0)에 녹이고, ethanol 침전과정을 거친 후, TE buffer에 녹여 사용하였다. 고순도의 DNA가 필요한 Southern 분석의 경우에는 RNaseA를 처리하고, 1/5 부피의 20% PEG+2.5 M NaCl 혼합용액을 첨가하여 DNA를 침전시키는 과정을 거친 후 사용하였다.

고반복서열의 C₀t 값 측정

정제된 단양 마늘의 염색체 DNA를 평균길이가 약 300~400 bp 되도록 초음파분쇄기(Ultra sonicator, Sonic & Materials, Inc., Model VCX200)를 사용하여 200 W 출력으로 3분동안 분쇄하고, ethanol 침전과정을 거친 뒤, 0.12 M phosphate buffer(PB, pH 6.8)에 녹여 사용하였다. DNA 용액은 100°C에서 5분동안 유지하여 변성시키고, 60°C에서 일정시간동안 reassociation시킨 다음, 60°C로 유지되고 있는 hydroxylapatite column(water-jacketed)에 통과시켰다. Reassociation되지 않은 single-stranded DNA를 0.12 M PB(pH 6.8)를 흘려서 세척한 후에, 0.4 M PB(pH 6.8)를 흘려 renaturation된 double-stranded DNA를 분리시키고, 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 반복서열 부분을 확인할 수 있도록, 3 µg/mL~3 mg/mL 범위의 DNA 농도에 대해 위와같은 과정으로 얻은 값들은 다음 방정식을 사용하여, C/C₀값에 대한 C₀t 값을 도식화하였다(Allen *et al.*, 1975; Britten and Kohne, 1986).

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + k C_0 t}$$

C₀: 초기의 total single-stranded DNA의 농도(mole/L)

C: 반응 후 reassociation되지 않은 single-stranded DNA의 농도(mole/L)

k: 속도상수

C₀t값이 10⁻²~10⁻³에 해당하는 경우에는 reassociation 속도가 대단히 빠르므로 온도를 조절할 수 있는 spectrophotometer를 이용하여 그 reassociation 상황을 연속적으로 측정하였다. 100°C에서 변성시킨 DNA 용액을 60°C로 유지되어 있는 spectrophotometer(Gilford 2600)로 옮기고 시간에 따른 A₂₆₀ 값의 변화를 추적하여, reassociation된 double-stranded DNA의 양을 추정하여 C 값을 계산하였다.

고반복서열의 클로닝 및 염기서열 분석

고반복서열의 C₀t 곡선에 기초하여 C₀t 값이 9.12×10⁻²에 해당하도록 50 µg/mL의 DNA 용액을 60°C에서 10분동안 renaturation시킨 후 reassociation된 double-stranded DNA를 hydroxylapatite column을 사용하여 0.4 M PB(pH 6.8)분획으로 받아내었다. 분리된 double-stranded DNA는 GeneCleanII kit를 사용하여 정제 한 후, SmaI으로 자른 pTZ18U에 blunt-end ligation시

키고, *E. coli* JM107에 형질전환시켰다. 재조합된 플라스미드는 alkaline 방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 추출하였으며, 삽입된 DNA의 크기는 제한효소를 사용하여 분석하였다.

클로닝된 고반복서열들은 dideoxy chain termination방법으로 염기서열을 분석하였으며, 각 클론들은 AHRS(*Allium* highly repetitive sequence)에 변호를 붙여 AHRS1, AHRS2, AHRS3 등으로 명명하였고, 이를 포함한 플라스미드는 pAHRS1, pAHRS2, pAHRS3 등으로 표시하였다.

클로닝된 고반복서열의 copy 수 측정

클로닝된 고반복서열의 한 세포내의 copy수는 임의의 한 클론의 세포당 절대적 copy수를 측정하고, 이를 기준으로 나머지 클론들의 상대적 copy수를 추정하는 방법으로 결정하였다.

먼저 AHRS12-9의 한 세포내의 copy수를 측정하기 위하여 100 pg~1 µg의 게놈 DNA와 10^7 ~ 10^{10} 의 다양한 copy수의 *Xba*I로 선형화시킨 pAHRS12-9를 Hybond N⁺ membrane에 고정시켰다. 이 blot을 ³²P로 표지된 AHRS12-9 탐침으로 혼성화시키고, 게놈 DNA와 표준 클론인 pAHRS12-9의 혼성화정도를 Instant imager(Packard)로 측정하여 비교하였다. 게놈 DNA의 경우와 동일한 혼성화 정도를 보이는 pAHRS12-9의 copy수를 확인한 뒤, [표준 클론의 copy수/게놈 DNA 양/한 세포의 게놈 DNA 양]의 계산으로 세포당 pAHRS12-9의 절대적 copy수를 추정하였다. 마늘의 경우에는 염색체 수가 $2n=16$, 게놈 DNA의 양이 $2C=35.7$ pg으로 보고(Bennett & Smith, 1991)되어 있어, 이를 copy수 계산에 적용하였다.

나머지 고반복서열 클론들의 상대적 copy 수를 측정하기 위해서는 다음과 같은 방법을 사용하였다. 비교하고자 하는 pAHRS DNA 100 ng씩을 제한효소 *Kpn*I과 *Bam*HI으로 처리하여 삽입된 고반복서열부분과 vector를 분리한 후, 1% agarose gel에서 전기영동하였다. 이로부터 만든 blot을 [α -³²P] dCTP로 random primer labelling된 전체 게놈 DNA의 탐침을 사용하여 혼성화시켰다. 이미 copy수를 알고 있는 AHRS12-9와 나머지 다른 AHRS와의 상대적 혼성화정도를 비교함으로써 각각의 상대적 copy수를 추정하였다.

마늘품종 사이의 고반복 서열의 변이정도 조사

특정 AHRS에 대하여 품종 사이의 변이정도를 조사하기 위해 단양, 문경, 서산, 의성 지역 마늘의 DNA 10 µg을 제한효소 *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RI, *Alu*I, *Tag*I, *Ssp*I으로 처리한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동하고 Hybond-N⁺ membrane에 capillary transfer(Sambrook *et al.*, 1989) 방법으로 blotting하였다. 이 blot을 5가지의 상이한 ³²P-labelled AHRS riboprobe로 stringent condition에서 혼성화시키고, autoradiogram을 분석함으로써 해당 AHRS의 분포를 확인하였다.

동위원소로 표지된 탐침의 제조

Vector pTZ18U에 클로닝된 AHRS의 삽입 DNA만이 전사될 수 있도록, T₇ RNA polymerase의 종결위치를 제한효소 *Bam*HI, *Xba*I로 처리하여 vector DNA를 선형화시켰다. 선형화된 각 pAHRS DNA 1 µg에 대해 4 µL의 5X reaction buffer(200 mM Tris-HCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM spermidine, 50 mM NaCl, pH 7.9), 2 µL의 0.1 M DTT, 각각 0.4 µL의 10 mM ATP, GTP, TTP와 0.4 µL의 0.25 mM의 UTP, 0.5 µL의 RNasin(20~40 units/µL)를 넣고, 50 µCi의 [α -³²P] UTP, 2 µL의 T₇ RNA Polymerase(15~20 units)를 첨가하여 전체 20 µL의 부피로 37°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 동일 부피의 stop solution(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)을 넣어 반응을 중단시키고, 0.25 µL를 6% polyacrylamide + 6 M urea gel에 전기영동하여 탐침의 상황을 확인 한 후에 혼성화실험에 사용하였다.

염색체 DNA전체를 표지하기 위해서는 random primer labelling방법을 사용하였다. 초음파분쇄기로 평균 300~400 bp 정도의 크기로 자른 단양마늘의 게놈 DNA(~50 ng)에 10 µL의 random oligonucleotide primer와 증류수를 첨가하여 33 µL 부피로 90~100°C에서 5분동안 변성시킨 후, 상온에서 짧게 원심분리하였다. 위 용액에 10 µL의 5X reaction buffer(25 mM Tris-HCl, 50 mM MgSO₄, 0.5 mM DTT, 각각 0.1 M의 dATP, dGTP, TTP포함, pH 7.2), 50 µCi의 [α -³²P] dCTP, 5 unit의 DNA polymerase I(exo(-)Klenow fragment)를 첨가하여 총 50 µL의 부피로 37°C에서 30분 반응시켰다. 동일부피의 stop mix(0.5 M EDTA, pH 8.0)을 첨가하여 반응을 중단시킨 후, 혼성화실험에 사용하였다.

결과 및 고찰

고반복서열의 C₀t값 측정

고반복서열의 C₀t값을 측정하기 위해 마늘 염색체 DNA 전체에 대해 개략적인 renaturation kinetics을 조사하여 작성한 C₀t 곡선은 Fig. 1과 같다. 고반복서열의 부분은 대체로 10⁻³~10⁻²의 C₀t값에 해당하며, 전체 계층의 13% 정도로서 이는 이미 보고된 고등식물의 평균상황과 유사하였다(Bendich *et al.*, 1970; Zimmerman *et al.*, 1977; Gupta *et al.*, 1981). 일반적으로 빠르게 reassociation되는 이 부분은 foldback서열을 포함하므로 이로 인한 영향이 어느 정도 있다고 고려된다. 본 연구에서는 고반복서열을 분리하는 과정에서 완전한 blunt-end를 가진 DNA조각만이 vector에 삽입, 클로닝되므로 foldback서열에 해당하는 DNA는 제외되므로 이를 고려하거나 제거하기 위한 과정은 생략하였다.

분리된 고반복서열의 특성

고반복서열의 특성을 보다 상세히 조사하기 위하여, C₀t 곡선에 기초하여 매우 빠르게 reassociation하는 DNA를 분리 정제하고, vector pTZ18U를 사용하여 클로닝하였다. 30개의 클론을 확보하였고, 이들을 분석함으로써 마늘의 고반복서열의 특성을 조사하였다. Vector에 삽입된 DNA 조각은 Table 1에서 보여주는

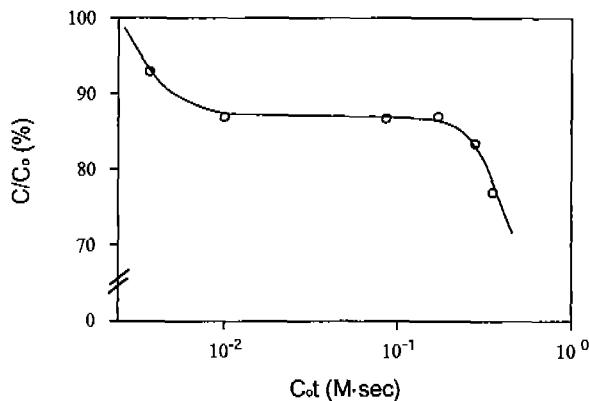


Fig. 1. Partial C₀t curve of garlic genomic DNA. The DNA sheared to an average length of 300-400bp by sonication was resuspended in 0.12 M PB(pH 6.8), denatured by boiling for 5 min, and incubated at 60°C for appropriate time. The reassociated DNA was separated by hydroxyapatite chromatography.

Table 1. Garlic highly repetitive DNA cloned on plasmids

Clone designation	Insert size (kb)	Copy number (per haploid)
12-1	0.6	2.1 × 10 ⁷
12-2	0.37	1.4 × 10 ⁷
12-3	0.55	1.2 × 10 ⁷
12-4	0.28	3.2 × 10 ⁶
12-6	0.19	4.8 × 10 ⁶
12-7	0.6	8 × 10 ⁶
12-8	0.4	7 × 10 ⁶
12-9	0.36	1.9 × 10 ⁶
12-11	0.55	4 × 10 ⁶
12-12	0.5	9.5 × 10 ⁶
13-1	0.85	8 × 10 ⁵
13-2	0.2	1.9 × 10 ⁶
13-3	0.45	8 × 10 ⁵
13-4	0.55	2.6 × 10 ⁶
13-5	0.3	2.5 × 10 ⁶
13-7	0.24	1.1 × 10 ⁶
13-8	0.45	1.2 × 10 ⁶
13-9	0.5	1.1 × 10 ⁶
13-12	0.5	2.1 × 10 ⁶
13-13	0.85	1.9 × 10 ⁶
13-14	0.6	1.7 × 10 ⁷
13-15	1	3.2 × 10 ⁵
13-17	0.5	8 × 10 ⁶
13-18	0.8	1.9 × 10 ⁶
13-21	0.45	1.6 × 10 ⁶
13-22	0.4	9 × 10 ⁶
13-23	0.55	1.6 × 10 ⁶
13-24	0.35	8 × 10 ⁶
13-27	0.6	1.7 × 10 ⁶
13-30	0.65	2.1 × 10 ⁷

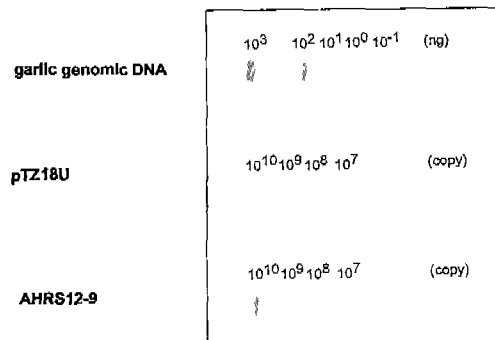


Fig. 2. Estimation of copy number of AHRS 12-9 in Tanyang garlic genomes. Various amount of garlic genomic DNA, vector plasmid DNA, and AHRS12-9 were blotted onto a nylon membrane using slot blot kit and hybridized with ³²P-labelled riboprobe of AHRS12-9. The hybridization signal from the cloned AHRS candidates and genomic DNAs were compared. The copy number of AHRS12-9 was about 1.9 × 10⁶.

바와 같이 대체로 0.2~1 kb에 해당하며, 평균 0.5 kb로써 C_t 곡선에 사용된 DNA 조각의 평균크기인 300~400 bp보다 약간 크다. 고반복서열로 예상되는 클론들의 한 세포 내의 copy수를 측정하기 위해 우선, 임의의 한 클론의 세포 당 절대 copy수를 측정하고, 이를 기준으로 나머지 클론들의 상대적 copy수를 추정하였다. 즉, Fig. 2의 결과로 추정하면 반수체 게놈내의 AHRS12-9의 copy수는 1.9×10⁶에 해당하며, 다른 서열들의 AHRS12-9에 대한 상대적 copy수를 측정하여 조사한 결과, 나머지 29개의 고반복서열은 반수체 게놈내에 10⁵~10⁷의 copy수로 존재(Fig. 3과 Table 1)하여 Simeons(1988), Xia(1993) 등에 의해 이미 알려진 고등식물의 고반복서열의 copy정도와 유사하였다.

일부 클론의 염기서열은 Fig. 4와 같다. 이들 6가지 고반복서열의 G/C 함량은 25~40% 정도로서 40.6%인

전체 염색체 DNA의 G/C 함량(미보고실험결과)보다 낮았고, 일부의 경우 서열의 내부에서 소단위의 염기서열이 반복되어 있는 특징이 보였다. AHRS12-4 클론은 100~200번째 염기배열사이에 'TTCAAATA-TTCTAC'의 염기서열이 다소의 변형이 있지만 6차례 이상 반복배열되어 있고, AHRS12-9와 13-7은 20~30 nt 크기의 동일한 염기서열이 사이를 두고 2~3회 반복배열되어 있다. 특히 AHRS12-9의 경우, *MseI*(TTAA)-*MseI*-*TspEI*(ATAATT)-*MaeI*(CTAG)/*MseI*-*MseI*에 해당하는 제한효소의 인식부위가 반복배열되어 있었다. 본 실험에서 사용된 고반복서열의 분리는 혼성화단계를 거치게 되므로 혼성화된 양쪽 염기서열이 100% 상보적이지 아닌 double-stranded DNA가 생길 수 있고, 이것이 확보된 고반복서열의 일부일 수도 있다. 따라서 Fig. 4의 염기서열은 실제 게놈의 해당 부분의 염기서

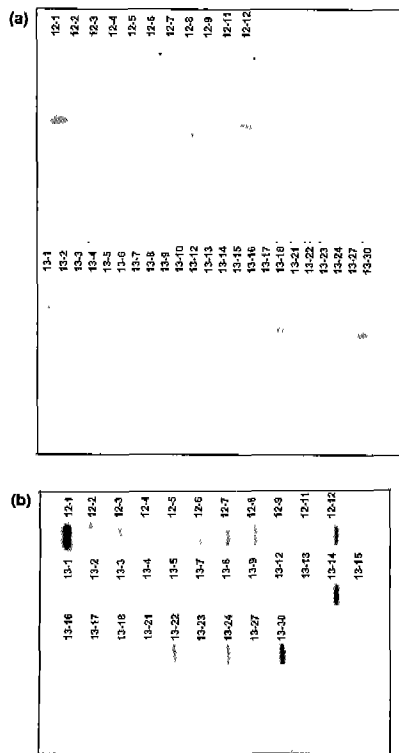


Fig. 3. Copy number determination of 29 AHRS candidates in Tanyang garlic genomes. Plasmids containing AHRS candidates were (a) cut with *KpnI* and *BamHI* to separate insert from vector, electrophoresed on 1% agarose gels, blotted to a nylon membrane, and (b) blotted to a nylon membrane using slot blot kit, and hybridized to ³²P-labelled total genomic DNA probes. The hybridization signal from 29 AHRS candidates and AHRS12-9 was compared to determine approximate copy numbers in the garlic genome.

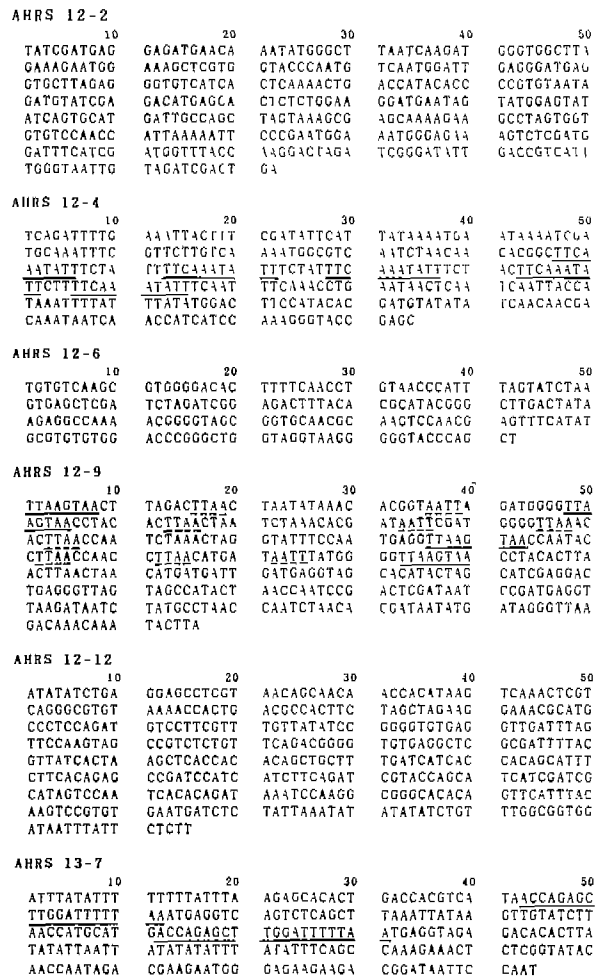


Fig. 4. Nucleotide sequences of six AHRS candidates. Subrepeated units were underlined.

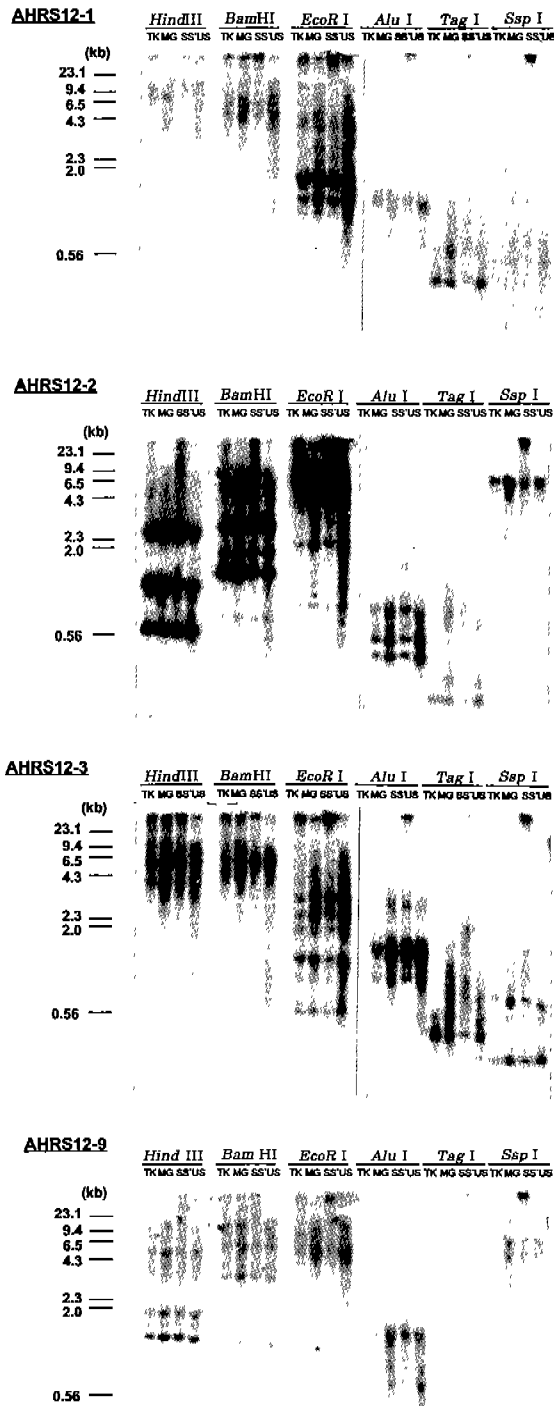


Fig. 5. Hybridization patterns of DNA in four local garlic clones by five different AHRS probes. Garlic DNA was digested with specified restriction enzymes, fractionated on a 1% agarose gel, blotted onto a nylon membrane, and probed with ^{32}P -labelled riboprobe of specified AHRS (TK: Tanyang, MG: Mungyong, SS: Sosan, US: Uisong).

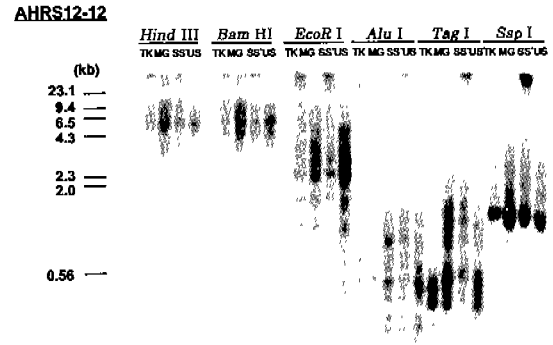


Fig. 5. Continued.

열에 비해 일부분이 변형이 되어있을 가능성이 있다.

마늘 품종 사이의 고반복서열 변이정도 조사

단양마늘을 비롯한 4가지 지역종 DNA 10 μg 을 제한효소 *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *AluI*, *TagI*, *SspI*으로 자른 후, Southern blot하여 5가지 고반복서열을 탐침으로 혼성화시킨 결과는 Fig. 5와 같다. 4개 품종 사이의 혼성화 절편은 대부분이 그 크기나 혼성화 정도 면에서 큰 차이가 없다. 즉 이들 4개 품종 사이에서 본 서열의 유전적 변이가 거의 나타나지 않은 것이므로 비교적 안정하게 유지되고 있는 반복서열들로 추정된다.

사 사

본 연구는 1993년도 대학부설연구소 연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Allen, Thomas M.R., Alfrad R.L. and C.K., Lynn. 1975. Characterization of the DNA from the Dinoflagellate *Cyrodinium cohnii* and implications for Nuclear Organization. *Cell*, 6: 161.
- Bennett, M.D. and J.B. Smith. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond, Ser. B; Biological science* 334: 309-345
- Benbrook, J.R., J. Jones, M. O'dill, R.D. Thomson and R.B. Flavell. 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 19: 545-560.
- Bendich, A.J. and B.J. McCarthy. 1970. DNA comparisons among barley, oats, rye, and wheat. *J. Mol.*

- Biol.* **65**: 545-565.
- Britten, R.J. and D.E. Kohne.** 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* **161**: 529-540.
- Butner, K.A. and C.W. Lo.** 1986. High frequency DNA rearrangements associated with mouse centromeric satellite DNA. *J. Mol. Biol.* **187**: 546-556.
- Cooper, K.W.** 1964. Meiotic conjunctive elements not involving chiasmata. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **52**: 1248-1255.
- Davidson, E.H. and R.J. Britten.** 1979. Regulation of gene expression: possible role of repetitive DNA. *Science* **204**: 1052-1059.
- Dennis, E.S., W.L. Gerlach and W.J. Peacock.** 1980. Identical polyp yrimidine-polypurine satellite DNAs in wheat and barley. *Heredity* **44**: 349-366.
- Depeiges, A., C. Gaubely, A. Lenoir, S. Cocherel, G. Picard, M. Raynal, F. Grellet and M. Delseny.** 1995. Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 160-168.
- Etoh, T.** 1985. Studies on Sterility in Garlic, *Allium sativum* L. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* **21**: 77-132.
- Grebenstein, B., Grebenstein, O., Sauer, W. and V. Hemleben.** 1995. Characterization of a highly repeated DNA component of parannial Oats (*Helictotrichon, Poaceae*) with sequence similarity to a A-genome-specific satellite DNA of rice(*Oryza*). *Theor. Appl. Genet.* **90**: 1101-1105.
- Gupta, V.S., S.R. Gadre and P.K. Ranjekar.** 1981. Novel DNA sequence organization in rice genome. *Biochem. Biophysic. Acta* **656**: 147-154.
- Molnar, S.J., P.K. Gupta, G. Fedak and R. Wheatcroft.** 1989. Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in 25 *Hordeum* species. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 387-392.
- Rogers, S.O. and A.J. Benich.** 1988. Plant Molecular Biology Manual, vol A6, pp1-11. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.
- Sambrook, J., E.F. Fitch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, A laboratory Manual, 2nd edition, Cold Harbor Laboratory Press 9.34
- Simeons, C.R., I. Gielen, M. Van Montagu and D. Inze.** 1988. Characterization of highly repetitive sequence of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acid Research* **16**: 6753-6766.
- Xia, X., G. Selvaraj and H. Bertrand.** 1993. Structure and evolution of a highly repetitive DNA sequence from *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **21**: 213-224.
- Zhao, X., T. Wu, Y. Xie and R. Wu.** 1989. Genome-specific repetitive sequence in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genetic.* **78**: 201-209.
- Zimmermon, J.L. and R.B. Goldberg.** 1977. DNA sequence organization in the genomic of *Nicotiana tabacum*. *Chromosoma*(Berl.) **59**: 227-252.

(1996. 3. 4 接受)

Cloning and Characterizations of Highly Repetitive Sequences in the Genome of *Allium sativum* L.

Eom, Eun-Mi and Dong-Hee Lee*

Dept of Biological Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, KOREA

ABSTRACT

We have studied the DNA of *Allium sativum* L. with respect to highly repetitive sequences. Fast reassociated DNA fragments expected to be highly repetitive sequences based on C_0t curve were isolated and characterized. Their copy numbers were approximately 10^5 - 10^7 per haploid genome. Nucleotide sequences analysis of six candidates reveals that their G/C content were low, 25-40% and typical patterns of repeating sequences exist. Repeat sequences were used as probes to access restriction fragment length polymorphism (RFLP) of genomic DNAs of four local clones, Tanyang, Mungyong, Sosan, and Uisong. The hybridization pattern were very similar among these four local clones.

Keywords : highly repetitive sequence, garlic, local clone, polymorphism

*Corresponding author: Fax +82-2-360-2385