

RAPD 표지인자를 이용한 돌콩 DNA 다형현상 분석

이 성 규

상지대학교 생명자원과학대학

Identification of DNA polymorphisms in the field bean (*Glycine soja* S. and Z.) using RAPD markers

Sung Kyu Lee

College of Life Science and Natural Resource, Sangji Univ. Wonju 220-702, Korea

Summary

Six field bean (*Glycine soja* S and Z) plants were examined for their genetic polymorphisms and intraspecific variations using randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) markers. In RAPD analysis of 5 random primers (Rp-1, Rp-2, Rp-3, Rp-4, Rp-5), 30 of total 155 bands obtained from 5 primers were polymorphic and sizes of polymorphic band ranged between 0.5 and 3.0 kb. Number of bands amplified per primer was varied from 2 to 11 and average number was 6.0. Genetic variation of intraspecies in the samples of six region was ranged between 11 to 25 percent, and genetic similarity among intraspecies was ranged from 0.69 to 0.78. In pairwise genetic similarity test of six field bean plants, Mun and Hoj showed highest coefficient of genetic similarity as 0.67, whereas Sin and Hoj was lowest as 0.45. According to the genetic similarity, the level of intraspecific variation is higher than that of regional distance in *Glycine soja*.

I. 서 론

돌콩은 농경지 주변, 야초지 등 광량이 풍부한 양지에서 왕성하게 자라는 일년생 덩굴식물로, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 동북아시아 일대에 널리 분포한다 (Hymowitz 등, 1997). 돌콩의 계통분류학적 위치는 *Glycine* 속에 속하며 *Glycine* 속에는 *Glycine* 아속과 *Soja* 아속이 있다. *Glycine* 아속은 16종의 다년생 야생종으로 분류되고 오세아니아와 서태평양 연안지역에 걸친 넓은 지역에 분포하고 있다 (Singh 등, 1988; Hymowitz 등, 1997). *Soja* 아속에는 재배콩 (*Glycine max*)과 돌콩 (일명 야생대두)이 있으며, 우리나라에 자생하는 돌콩은 *Glycine soja*와 *Glycine gracilis* 2종이 동정되고 있다.

돌콩은 자가수정 또는 부분 자가수정을 하며, 두 종 사이에 자유로운 교배가 가능할 뿐만 아니라, 염색체수가 $2n = 40$ 개로 재배콩과 같고, 형태, 생리, 생육 및 유전적 특성이 재배콩과 비슷하여 재배콩의 원조로 추정하고 있다 (Karasawa, 1936; Hymowitz, 1970; Hadley와 Hymowitz, 1973).

지리적 분포 범위가 광범위한 식물은 다양한 생육 환경의 영향을 받아 형태적 변이를 나타내는 점에 착안하여 이를 식물의 계통분류 근거로 많이 이용하고 있는데, 돌콩의 형태적인 변이를 근거로 하여 중국에는 739 계통 (중국 흑룡강성 농업연구소, 1991), 한국에는 49 계통 (박과 허, 1979)이 분류 수집되어 있다. 지금까지 식물의 유전적 차이에 대한 평가는 주로 식물의 형태학적 분석 및 동위효소 분석 등에

의해 조사되어 왔다 (Oka, 1988; Glaszmann, 1988). 그러나 식물을 농업적으로 이용하기 위해서는 특정한 유전형질을 대상으로 해야 하기 때문에, 환경요인에 의해 일어난 형태적 특징 즉, 개체변이에 의한 계통분류는 분명한 한계가 있다.

최근 분자생물학 및 유전자 분석기술 등의 급속한 발달로 DNA 분자 수준에서 다형성 검출 및 그 이용성이 가능하게 되었다. 특히, DNA 다형현상은 식물의 genome 해석 연구에 획기적인 변화를 가져와 DNA 염기배열에서 변이성을 나타내는 유전적 표지인자 (genetic markers)가 됨으로서, 식물의 유전적 다형분석에 무한정한 공급원이 될 수 있을 뿐만 아니라, DNA 다형성은 식물의 종, 품종 그리고 집단내의 유전적 배경이나 특성을 나타내기 때문에, 생물의 유전정보 해석에 아주 효과적으로 이용될 수 있다 (Beckman과 Soller, 1986; Gebhardt와 Salamini, 1992).

지금까지 DNA 다형현상에 관한 검출방법으로는 genomic DNA를 각종 제한효소로 절단하여 분리된 DNA 단편을 검출하는 RFLP (restriction fragment length polymorphism), 고빈도 반복배열 (tandem repeat)로 이루어진 hypervariable DNA의 반복배열에 따른 변이를 검출하는 DNA fingerprinting 및 VNTR (variable number of tandem repeat), 최근의 새로운 분석기술인 PCR 기법을 이용하는 PCR-RFLP, 특정 유전자를 임의로 증폭시켜 다형성을 검출하는 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 및 1~6 bp의 짧은 염기배열 부위의 변이를 검출하는 microsatellite 등이 있다 (Song 등, 1990; Williams 등, 1990; Kazan 등, 1993; Nakamura 등, 1987; Huckenbeck와 Bonte, 1992; Morgante 등, 1997). 특히, RAPD 기법은 genome내 특정 DNA 염기배열 부위를 다수의 random primer를 이용하여 임의로 증폭시켜 genetic marker를 분석하는 방법으로, 특정 유전자의 염기배열에 대한 사전정보 없이도 무한정한 primer의 제작과 이용이 가능하며, 또한 고도의 다형성 검출에 효과적으로 사용할 수 있다 (Williams 등, 1990; Welsh와 McClelland, 1991). 따라서 RAPD 기법은 유전적 변이성 및 다형성 분석, 유전자 지도작성, 유전적 근연관계 분석, 질병저항관련 유전자 구명 그리고 품

종식별 및 분화 등 식물자원의 분자유전학적 연구에 폭넓게 응용되고 있다.

그 동안 Keim 등 (1989)과 Zhu 등 (1995)은 *Glycine* 속의 유연관계를 DNA 분자수준에서 구명하기 위하여 RFLP 및 RAPD 기법을 이용하였고, 국내에서도 *Glycine* 속의 유전적 다형성과 품종간의 근연관계 분석 및 저항성 유전자와의 연관관계 분석 등에 관한 연구가 진행되고 있다 (이 등, 1997; 백 등, 1997). 지금까지 다수의 식물을 대상으로 DNA의 특성 및 형질과 관련된 유용유전자를 발굴하기 위해 DNA 수준에서 많은 연구가 진행되고 있으나, 국내콩에 대한 연구는 아직까지 미흡하며, 더욱이 돌콩에 대한 분자생물학적 연구는 상당히 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 RAPD 기법을 이용하여 돌콩 집단내의 유전적 변이성을 DNA 수준에서 분석하고, 돌콩 지역집단내의 유전적 특성과 RAPD marker를 이용하여, 사료작물로 개발하는데 필요한 분자유전학적 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

강원도 원주시를 중심으로 반경 15~25km에 위치한 6개 돌콩 군락을 선정하고, 이 곳에 자생하고 있는 돌콩의 각 개체에서 잎을 따로 떼어 액화 암모니아 냉장고에 넣어 동결한 후, 분석에 이용하였다.

2. Genomic DNA의 추출

동결된 잎을 CTAB법 (Rogers와 Bendich, 1994)을 이용하여 genomic DNA를 다음과 같은 조건으로 추출하였다. 즉, 20mg의 잎에 2 × CTAB buffer 2ml 와 1 × CTAB 1ml 를 혼합한 다음 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 침전시켰다. 침전된 pellet에 2 × CTAB buffer 20 μ l와 1xCATB 10 μ l를 첨가하여 혼합한 다음, 1.5ml Eppendorp tube에 옮겨 60°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 동일한 양의 chloroform을 넣어

30분간 방치한 후, 15℃에서 4,000rpm으로 7분간 원심분리하였다. 원심분리된 상층액 30 μ l를 Eppendorf tube에 옮겨 10% CTAB-NaCl 3 μ l와 chloroform 35 μ l를 넣고 잘 혼합한 후, 4,500rpm으로 5분간 원심분리하여 분리된 상층액을 1.5ml Eppendorf tube에 옮겼다. 상층액에 CTAB 용액 (1% CTAB, 50mM Tris, pH 8.0, 10mM EDTA) 70 μ l를 첨가한 다음 12시간 이상 상온에 방치하였고, 다시 2,500rpm으로 5분간 원심분리하여 분리된 상층액은 버리고, 1M NaCl-TE 0.7ml와 isopropanol 0.42ml를 첨가후 12,000rpm에서 2분간 원심분리하여 DNA pellet을 회수하였다. DNA pellet은 80% ethanol로 세척하여 건조시키고, TE buffer로 용해하여 보관하였다.

3. PCR-RAPD 분석

(1) RAPD primers

본 연구에 사용한 random primer는 Operon사 (Alameda, CA, USA)로부터 G + C 함량이 약 60~70% 수준인 10-mer random primer를 구입하여 이용했다 (Table 1).

Table 1. List of oligonucleotide primers used for RAPD analysis

Primer code	Sequence (5' to 3')	G + C content (%)
RP-1	GITTCGCTCC	60
RP-2	GTCCACACGG	70
RP-3	TGGGGGACTC	70
RP-4	CCACAGCAGT	60
RP-5	GGACCCTTAC	60

(2) PCR 기법에 의한 DNA의 증폭

random primer를 이용하여 genome내 임의의 유전자 증폭을 위한 PCR 반응은 Willams 등 (1990)이 제시한 방법을 이용하여, DNA Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus, USA)로 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. PCR tube에 1 \times reaction buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3, 1.5mM MgCl₂, 0.01%

gelatin), template DNA 20ng, dNTP 200 μ M, primer 각 0.3 μ M과 Taq DNA polymerase 0.25 unit를 첨가하여, PCR 반응액을 20 μ l로 조절하여 94℃에서 4분간 pre-denaturation 후, 94℃ 1분, 36℃에서 1분, 72℃에서 1분의 cycle을 45회 수행하고, 마지막으로 72℃에서 5분간 final extension 시킨 다음 종료하였다.

(3) 전기영동에 의한 RAPD 검출

PCR 증폭산물을 1.3% agarose gel에서 40V 정전압으로 약 6시간 전기영동을 실시하여, gel을 ethidium bromide용액 (0.2 μ g/ml)으로 염색 후, UV상에서 DNA band를 검출하였다.

(4) 통계 분석

돌콩내 유전적 변이성 및 다양성 정도를 추정하기 위하여 genetic similarity (F)는 전기영동 사진에 나타난 band의 유(+), 무(-)로 표시한 후, 다음의 공식에 의해 계산하였다 (Nei와 Li, 1979).

$$F = 2nXY / (nX + nY)$$

여기서, nXY는 집단 X와 Y가 공유하고 있는 band의 수, nX는 집단 X가 가지고 있는 총 band의 수, nY는 집단 Y가 가지고 있는 총 band의 수를 의미한다.

III. 결과 및 고찰

1. RAPD band pattern 분석

RAPD marker를 이용하여 돌콩종내 유전적 변이성과 지역간의 유사도를 DNA 분자수준에서 분석하였다. 돌콩의 RAPD 분석에 이용된 primer는 일차적으로 20개의 primer를 선정하여, 종내에서 다양한 변이성을 나타내는 총 5개의 primer (Table 1)를 선정하여 RAPD 분석에 이용하였다.

각각의 선정된 primer를 6개 지역에서 채취한 돌콩의 종내 RAPD band 양상을 비교한 결과, Fig. 1의

A, B, C, D와 E에 나타난 바와 같이 종내 또는 지역 간에 따라 다양한 수준의 변이를 검출할 수 있었다. RP-1의 primer를 이용하여 지역별 돌콩 집단의 RAPD band 양상을 검출한 결과 2.02 kb와 0.94 kb에서 공통 DNA band가 관찰되었으며, 약 0.93 kb와 0.80 kb에서 특이한 형태의 DNA band가 검출되었다 (Fig. 1-A). 또한 Fig. 1-C (RP-3)에서는 2.0 kb와 0.50 kb 사이에 각 지역간에 따라 다양한 형태의

DNA marker가 검출되어 종내에 상당히 심한 변이를 나타내었다. 그러나 Fig. 1-B (RP-2)와 1-D (RP-4)에서는 다른 primer에 비하여 매우 유사한 형태의 DNA band가 검출되었으며, Fig. 1-E (RP-5)의 경우 1.58 kb와 1.50 kb에서 두 개의 band가 검출되었고, 0.8 kb의 DNA band 검출 유무에 따라 polymorphic DNA가 관찰되었다. 또한 전지역의 돌콩에서 출현한 공통 band의 비율은 사용된 primer에 따라 다르게

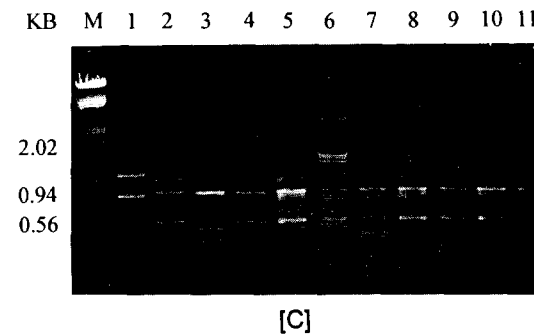
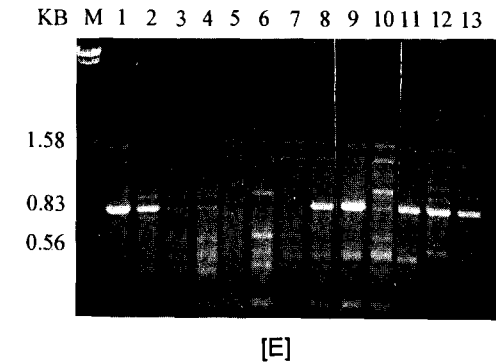
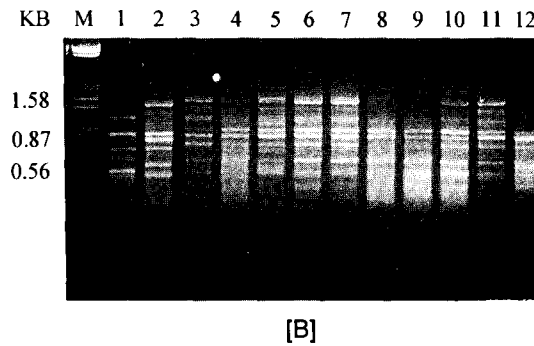
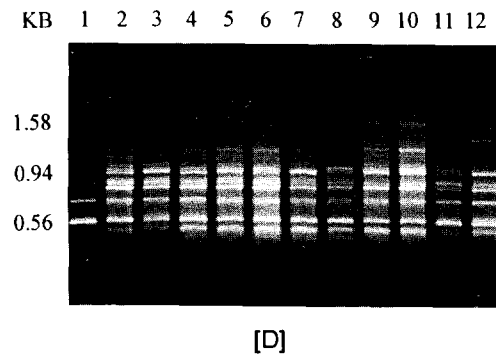
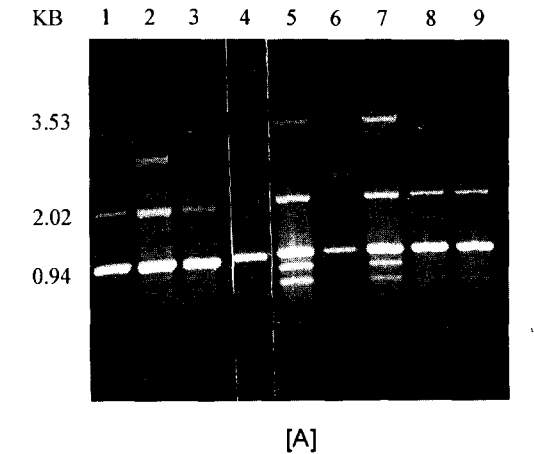


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic pattern of RAPD products obtained with Field bean using primer RP-1[A], RP-2[B], RP-3[C], RP-4[D], and RP-5[E]. M; The sizes of the marker bands given for comparison. Numbers at the top of each lane refer to the sampling region. KB; Kilo base.

나타났으나, 일반적으로 11~25%의 낮은 비율을 보임으로서, 상대적으로 돌콩의 유전적 변이성이 매우 높다는 것을 나타내고 있다. Tingey 등 (1992)의 보고에 의하면 재배콩을 대상으로 RAPD 다형성을 분석한 결과, primer당 평균빈도가 0.5로 나타났으며, 또한 Echt 등 (1992)은 alfalfa를 19개의 primer로 분석한 결과, 13개의 primer에서 총 37개의 다형성을 나타내어, RAPD 방법을 이용할 경우, 특정 종에 대한 유전 정보를 빠르고 신속하게 검출해낼 수 있음을 시사해 주었다. 따라서 본 연구에 사용된 primer는 상당히 높은 수준의 다형성이 검출된 것을 알 수 있으며, 이와 같이 다양하게 검출된 RAPD band 양상은 돌콩종내의 변이이거나 또는 지역집단간의 생태적인 환경 조건에 따른 변이에 기인한 결과로 보여진다. 각 전

기영동에 의해 분리된 DNA 단편의 평균 크기 약 3.0 kb~0.5 kb의 범위에서 다양한 형태의 RAPD marker를 검출할 수 있었다. 사용된 5종류의 primer에 따른 평균 band의 수는 6개였으며, 관측된 총 band의 수는 155개로 그 중에서도 RP-4 primer가 46개로 가장 높게 나타났다 (Table 2). 그러나 최근 백 등 (1997)이 보고한 콩속의 종간에 primer당 평균 8.2개의 다형성을 보인 것과 비교하여 약간 낮은 수준이었다. 이와같이 돌콩의 유전적 다형성은 종에 다양한 변이가 있음을 시사해 주며, 또한 분리된 DNA 단편의 크기 및 형태는 사용된 primer의 염기 배열과 GC 함량 및 genomic DNA내 결합부위의 상동성 비율에 따라 다양한 형태의 DNA로 검출됨을 나타내는 것이라고 볼 수 있다 (Williams 등, 1990).

Table 2. The number of amplified fragments scored from RAPD patterns for five primer.

Primer code	No. of bands per sample	Total No. of observed bands	Average No. of bands
RP-1	2-5	25	4.2
RP-2	3-9	38	6.3
RP-3	4-11	41	6.8
RP-4	5-9	46	7.7
RP-5	3-7	30	5.0
Total	2-11	155	6.0

2. 지역간 유전적 다형성 및 유사성 분석

RAPD band pattern을 근거로 하여 각 지역간 유전적 다형성과 유사성을 분석하기 위해, Nei와 Li

(1979)가 제시한 F값 (genetic similarity) 계산방법을 근거로 하여, 각 RAPD 분석에 사용된 5개의 primer에 따른 지역별 유전적 변이성을 비교 검토한 결과, Table 3과 같이 각 지역에 따라 일정한 범위 (0.69~

Table 3. Genetic similarity(F) values in field bean among sampling regions.

Primer code	Kuk	Soc	Hoj	Mum	Sin	Usa
RP-1	0.57	0.5	0.67	0.67	0.67	0.67
RP-2	0.92	0.67	0.67	0.67	0.46	0.50
RP-3	0.50	0.89	0.75	0.89	0.86	0.63
RP-4	0.93	0.94	0.94	0.93	0.91	0.94
RP-5	0.82	0.67	0.69	0.57	0.57	0.80
Total	3.74	3.67	3.72	3.91	3.47	3.54
Aver ± S.E	0.75 ± 0.18	0.73 ± 0.16	0.74 ± 0.10	0.78 ± 0.11	0.69 ± 0.17	0.71 ± 0.15

S.E; Standard error.

0.78)내에서 유전적 변이성을 나타내었다. 특히, 돌콩의 유전적 변이의 정도는 지역에 따라 다소 차이가 있으나, Mun (0.78)과 Kuk (0.75)지역에서 동질성이 높은 수치를 나타내었고, Sin (0.69)이 가장 다양한 변이성을 나타냈으나, 일반적으로 조사된 지역의 범위가 한정되어 있고 분석된 sample의 수도 제한되어 있어, 돌콩의 유전자 조성에는 크게 차이가 인정되지 않았다 (Fig. 2).

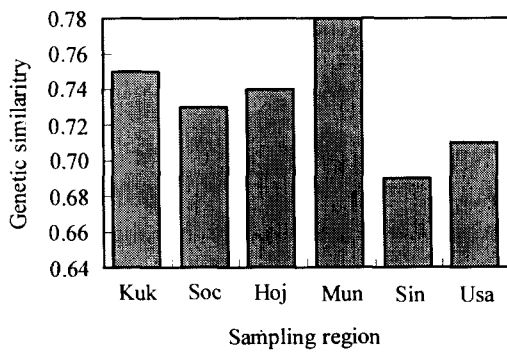


Fig. 2. Diagram of genetic variation in field bean from the similarity values among sampling regions.

한편, 지역집단간의 유전적 유사성을 추정하기 위하여 조사된 유전적 변이성을 중심으로 F 값에 기초하여 유전거리를 추정하였다 (Table 4). 그 결과 Mun과 Hoj가 0.67로 가장 가까웠고, Sin과 Hoj가 0.45로 가장 먼 관계를 나타내었다. 이와 같이 유전

적 유사성이 가깝다는 것은, 돌콩의 분포지역이 다르더라도 지역간 거리가 멀지 않을 때는 생육환경의 차이가 심하지 않기 때문에, 유전자 조성이 비교적 낮은 변이를 일으킨다는 의미로 볼 수 있다. 그러므로 본 실험결과에서 보는 바와 같이, 돌콩의 유전적 변이성은 생육환경과 지역에 따라 큰 차이가 없는 한, 동일지역내에서 자생하는 돌콩의 형태학적 분류로는 유전적 특성을 선별하는데 상당한 무리가 있을 것으로 생각된다.

그 동안 콩속의 종간에 대한 분류방법은 주로 형태적 분류방법이 많이 이용되어 왔다. 그러나 이러한 분류방법은 지리적 분포와 생리·생태적인 환경 조건에 따라 상당한 차이를 나타내므로 (백 등, 1997), 최근에는 DNA 분자수준에서 종간을 군집화하고 있다. 지금까지 콩속에 대한 연구결과를 종합해 보면, Soja 아속에 속하는 재배종 *G. max*의 기원종은 *G. soja*이며, *G. soja*의 원산지에는 다양한 변이종이 다수 분포하고 있는 중국과 한반도 일대가 기원지일 것이라고 추정된다 (Keim 등, 1989; Yu와 Kiang, 1993; Zhu 등, 1995). 그러나 이와 같은 DNA 분석의 결과, 종간의 유전적 유연관계가 매우 가깝더라도 종내에 다수의 변이가 존재하고, 게다가 여러 가지 환경적 영향으로 분화된 다양한 특성을 가지고 있기 때문에, 하나의 완전한 지표로 해석하는 것은 무리이다. 따라서 종 및 아속간에 유전자 조성에 따른 독특한 변이성을 지표로 하여 유연관계를 분석하고, 동시에 유전정보로 활용할 수 있는 DNA marker를 구명하는 것이 효율적인 방법이라 생각된

Table 4. Genetic similarity frequency between regions from the amplified patterns of each random primers.

	Kuk	Soc	Hoj	Mun	Sin	Usa
Kuk	0					
Soc	0.61	0				
Hoj	0.47	0.62	0			
Mun	0.58	0.64	0.67	0		
Sin	0.56	0.60	0.45	0.49	0	
Usa	0.60	0.63	0.54	0.63	0.62	0

다. 앞으로 국내에 자생하고 있는 돌콩을 대상으로 특정 유전자의 유전적 조성 구명과 경제적으로 중요한 형질을 탐색하고, 각 종간에 유연관계 분석 및 환경과 관련된 고유 유용 유전자원을 확보할 수 있는 기초적인 기틀을 마련하는 보다 많은 연구가 수행되어야 하겠다.

IV. 적 요

RAPD 방법에 의한 돌콩의 종내 유전적 변이성과 지역간 유사성을 구명하기 위하여, 20개의 random primer를 시험하여 band의 다형현상과 재현성이 우수한 5개의 primer를 선발하였고, 이들에 의해 분석된 총 band 수는 155개로, primer당 평균 band 수는 6.0 개였다. 조사한 전지역에서 primer에 따라 출현한 공통 band의 비율은 11~25%로 낮게 나타났으며, 분리된 DNA 단편의 평균 크기는 약 3.0~0.5 kb였다. 또한 지역간 유전적 다형성과 유사성은 0.69~0.78 수준에서 유전적 변이성을 보였다. 이와 같이 공통 band의 출현비율이 낮고 지역간 다형현상의 유사성이 높게 나타난 것은, 돌콩의 종내 유전적 변이성은 다양하지만 지역에 따른 유전적 변이성은 큰 차이가 없다는 것을 나타낸다.

V. 인용 문헌

1. Beckmann, J.S., and M. Soller. 1986. Restriction fragment length polymorphisms in plant improvement, Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol. 3:198.
2. Echt, C.S., L.A. Erdahl, and T.J. McCoy. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. Genome. 35:84-87.
3. Gebhardt, C., and F. Salamini. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in plant genome and its application to plant breeding. Int. Rev. Cytol. 135:201.
4. Glaszmann, J.C. 1988. Geographic pattern of variation among Asian native rice cultivars(*Oryza sativa* L) based on fifteen isozyme loci. Genome. 30:782-792.
5. Hadley, H.M., and T. Hymowitz. 1973. Speciation and cytogenetics, In B.E. Coldwell(ed). Soybeans: Improvement, production and uses. Agronomy. 16:97-116.
6. Huckenbeck, W., and W. Bonte. 1992. DNA fingerprinting of freeze-dried tissues. Int. J. Legal Med. 105:39.
7. Hymowitz, T. 1970. On the domestication of the soybean, Econ. Bot. 24:428--421.
8. Hymowitz, T., R.J. Sing, and K.P. Kollipara. 1997. Biosystematics of the genus *Glycine*, Soybean Genet. Newsl. 24:119-120.
9. Karasawa, K. 1936. Crossing experiments with *G. max* and *G. ussiansis*. Jap. J. Bot. 8:113-118.
10. Kazan, K., J.M. Manners, and D.F. Cameron. 1993. Genetic variation in agronomical important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA marker. Theor. Appl. Genet. 85:882
11. Keim, P., W. Beavis, J. Schupp, R. Freestone. 1989. Evolution of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. Theor. Appl. Genet. 85:205-212.
12. Morgante, M., I. Jurman, L. Shi, T. Zhu, P. Keim, and J.A. Rafalski. 1997. The STR120 satellite DNA of soybean: organization, evolution and chromosomal specificity. Chromosome Res. 5:363-373
13. Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, and R. White. 1987. Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping. Science. 235:1616-1622.
14. Nei, M., and M. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Sci. USA. 76:5269-5273.
15. Oka, H.I. 1988. Variations of various characters

- and character combinations among rice varieties. Japan J. Breed. 3:33-43.
16. Rogers, S.O., and A.J. Bendich. 1994. Extraction of DNA from plant tissues, in Plant Molecular Biology Manual. 6:1-10.
 17. Singh, R.J., K.P. Kollipara, and T. Hymowitz. 1988. Further data on the genomic relationships among wild perennial species(2n = 40) of the genus *Glycine* wild. Genome 30:166-176.
 18. Song, K., T.C. Osborn, and P.H. Williams. 1990. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms(RFLP). III. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). Theor. Appl. Genet. 79:497.
 19. Tingey, S.V., J.A. Rafalski, and J.G.K. Williams. 1992. Genetic analysis with RAPD markers, In Applications of RAPD technology to plant breeding. CSSA. ASHS. AGA. 99:3-8.
 20. Welsh, J., and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Research. 19:5275-5279.
 21. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
 22. Yu, H., and Y.T. Kiang. 1993. Genetic variation in south Korean natural populations of wild soybean (*Glycine soja*). Euphytica. 68:213-221.
 23. Zhu, T., L. Shi, J.J. Doyle, and P. Keim. 1995. A single nuclear locus phylogeny of soybean based on DNA sequence. Theor. Appl. Genet. 90:991-999.
 24. 박 훈, 허삼남. 1979. 각종 야생대두의 생육속성과 단백질 함량. 한국식물학회지. 22(1):1-4.
 25. 백인열, 윤용휘, 신두철, 박규환, 황영현, 김달용. 1997. RAPD 방법에 의한 콩속의 중간 유연관계 분석. 한국육종학회지. 29:308-317.
 26. 이석하, 유용환, 김석동. 1997. 콩의 RFLP 다양성. 한국육종학회지. 29:210-215.
 27. 중국 흑룡강성 농업연구소. 1991. 중국 흑룡강성의 야생콩 연구. 아시아 태평양지역 IBPGR News letter. 91(3):6.