

## 배추 trehalose 합성 유전자와 연관된 DNA 마커 개발

정예솔 · 임용표<sup>1</sup> · 허윤강<sup>2</sup> · 정상민\*

동국대학교 생명과학과, <sup>1</sup>충남대학교 원예학과, <sup>2</sup>충남대학교 생물학과

Received February 12, 2009 / Accepted March 17, 2009

**Development of DNA Markers for Trehalose Synthesis Genes in *Brassica rapa* L.** Yesol Jeong, Yong Pyo Lim<sup>1</sup>, Yoonkang Hur<sup>2</sup> and Sang-Min Chung\*. Department of Life Science, Dongguk University, Seoul, 100-715, South Korea, <sup>1</sup>Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea, <sup>2</sup>Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea - High temperature stress might affect the yield and quality of Chinese cabbage. In order to develop cultivars resistant to high temperature stress, we developed polymorphic DNA markers for trehalose synthesis genes related to abiotic stress resistance. A total of 28 *Brassica rapa* ESTs homologous to trehalose synthesis genes of *Arabidopsis* were found from the NCBI database. The polymorphic DNA sequences were searched between Chinese cabbages - Chiifu, which is relatively susceptible to high temperature stress, and Kenshin, which is tolerant to high temperature stress. Among the 28 ESTs, we found 10 ESTs that have either insertion/deletion and/or single nucleotide polymorphism between the two cultivars. Those polymorphic sites were then targeted for the development of 10 PCR based markers. These molecular markers related to trehalose genes could be used not only to test their relationship with abiotic stress resistance in Chinese cabbage, but also the development of abiotic stress resistant cultivars using MAS.

**Key words** : Chinese cabbage, abiotic stress, trehalose, molecular marker

### 서 론

김치의 주재료인 배추, *Brassica rapa* L. (n=10)는 국내뿐 아니라 세계 시장에서도 식품영양학적 우수성을 인정받아 그 수요가 증가하고 있다[6]. 배추는 서늘한 기후를 좋아하는 호냉성 채소로 생육적온인 20°C 이상이 되면 생육이 약해지는데 고온 스트레스는 결구에 영향을 주어 생산량 및 품질 저하를 유발할 수 있다[4,5,8]. 또한 재배 적온보다 기온이 낮아지면 동해를 입게 되고 심하면 얼어 죽기 쉽다[4,5]. 따라서 온도는 배추의 수확량에 영향을 미치는 주요 요인 중 하나로, 농업 종사자들은 고온 또는 저온 현상 때문에 경제적 손실을 입을 수 있다[1,13].

병 또는 환경 저항성 품종을 육성하기 위해 품종간의 유전적 차이를 알아보기에 가장 확실한 방법은 전체 DNA 염기서열을 비교하는 것이다. 하지만 이는 많은 시간과 비용이 필요하므로 상대적으로 비용이 적게 들고 쉬운 방법으로 고안된 것이 바로 DNA marker 분석이다. DNA marker에는 DNA 제한효소에 의해 절단된 단편의 다형성을 보는 RFLP (restriction fragment length polymorphism), PCR (polymerase chain reaction)을 통한 증폭 길이의 다형성을 보는 AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeat) 등이 있다

[1,11,12]. 최근에는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커가 많이 사용되고 있다[12].

Trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-[1,1]- $\alpha$ -Dglucopyranose)는 두 개의 포도당의 결합으로 이루어진 이당류이다. 세균, 효모, 곰팡이, 곤충, 식물 등 생물체에 저장탄수화물의 형태로 자연계에 널리 존재한다[2]. 효모와 식물체에서 trehalose는 성장에 영향을 주는 대사 경로를 조절하거나 신호분자로도 존재한다. 또한 저온, 고온, 건조, 산화작용과 같은 다양한 스트레스 환경에 단백질과 세포막이 불활성 및 변성되는 것을 보호한다고 알려져 있다[3]. 최근에는 trehalose 유전자를 이용하여 환경 저항성 품종을 육성하려는 노력이 수행되고 있다[7].

많은 연구진들이 작물 생산성을 증가시키고 작물의 재배 가능 지역을 확장 시키고자 스트레스를 유발하는 환경인 저온 또는 고온에서의 작물의 저항성을 개선시킨 새로운 품종 개발에 노력하고 있다. 이러한 경향에 맞춰 본 연구는 육종에 적용이 가능한 스트레스 저항성에 관련 분자마커개발을 위해 배추에서 trehalose 유전자 군의 다형성 마커를 개발하였다. 이를 이용하여 장기적으로 고온 저항성 직접적으로 연관된 DNA 마커를 개발하여 내서성 배추품종 육성에 기초연구자료로 활용될 수 있다고 생각된다.

### 재료 및 방법

#### \*Corresponding author

Tel : +82-2-2260-8915, Fax : +82-2-2260-8915

E-mail : smchung@dongguk.edu

배추의 trehalose 합성 관련 유전자 검색

애기장대의 trehalose 합성관련 유전자는 크게 두 그룹으로

나누어지는데 trehalose phosphate synthase (TPS) 11개 유전자(at1g78580, at1g16980, at1g17000, at4g27550, at4g17770, at1g68020, at1g06410, at1g70290, at1g23870, at1g60140, at2g18700)와 trehalose phosphate phosphatase (TPP) 10개 유전자(at1g22210, at1g35910, at1g78090, at2g22190, at4g12430, at4g22590, at4g39770, at5g10100, at5g51460, at5g65140)이다 [10]. NCBI에서 확보된 총 21개의 예기장대 trehalose 합성관련 유전자의 염기서열을 이용하여 NCBI에서 제공하는 *B. rapa* EST 데이터베이스를 검색하였다. 검색된 EST 중 염기서열이 동일한 EST는 제거하였고 남은 총 28개의 trehalose 유전자 관련 EST 후보군을 확보하였다(Table 1). 확보한 EST에 각각의 고유번호를 부여하였으며, 확보한 염기서열을 이용하여 배추 품종간의 차이를 비교하기 위해 각 EST에 양 끝 염기서열을 대상으로 하여 포워드 프라이머와 리버스 프라이머를 각각 제작하였다(Table 1).

식물 DNA 정제

한국배추계농소재은행으로부터 분양받은 고온 스트레스에 약한 품종 ‘지부’(Chiifu)와 비교적 강한 ‘권심’(Kenshin) 두 종의 배추 종자를 받아서 키운 후 어린잎을 수확하여 -70°C 냉동고에 보관한 후 CTAB method를 이용해 DNA를 추출하였다. 곱게 마쇄된 시료에 CTAB buffer를 750 µl을 가하고 30 초 vortexing하여 추가로 60°C에서 1시간 배양하였다. 750 µl phenol:chloroform:isomyl alcohol (25:24:1)을 넣고 15초 vortexing, 5분 원심분리 하였다. 얻은 상층액을 2 ml tube로 옮긴 후 두 번에 걸쳐 chloroform:isomyl alcohol (24:1) 용액으로 세척한 후 EtOH를 900 µl 넣고 -70°C에서 1시간 보관 후에 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. DNA 펠렛을 확인한 후 상층액을 버리고 자연건조를 시켰다. 추출된 DNA는 증류수 50 µl로 현탁시켰다.

중합효소연쇄반응(PCR)과 gel 전기영동

CTAB method를 이용하여 얻은 지부와 권심 DNA를 각각 디자인한 프라이머를 이용하여 PCR증폭을 하였다. PCR에 사용된 모든 시약은 솔젠트 회사의 e-taq kit를 사용하였다. 지부와 권심의 DNA는 15 ng, total volume은 15 µl로 10 mM dNTP 0.3 µl, 10× buffer는 1.5 µl, taq polymerase는 0.4 unit으로 0.08 µl, 100 µM의 forward primer, reverse primer 각각 1 µl, 지부와 권심의 DNA는 15 ng을 사용하였다. PCR은 93°C에서 3분 후 93°C에서 30초, 50°C에서 1분, 68°C에서 3분 과정을 40회 반복하고, 72°C 7분 후 종료 또는 5°C에서 보관되었다. 증폭된 DNA는 2% 아가로스 gel에서 전기영동을 이용해 DNA 조각의 크기를 확인하였다.

염기서열분석과 유전자 다형성분석

PCR 증폭을 해 얻은 DNA를 솔젠트(주)에 염기서열분석을

의뢰하였다. 얻어진 염기서열분석 결과는 staden package 프로그램(<http://staden.sourceforge.net/>)을 이용하여 지부와 권심 간 염기서열을 비교하였다.

결과 및 고찰

PCR 증폭 때 사용한 최초의 프라이머 목록은 table 1과 같다. 아가로스 gel 상에서 DNA size 차이(예: TH16)와 지부 DNA는 증폭이 되고 권심 DNA는 증폭하지 못하는 dominant 마커 타입인 TH9가 확인되었다(Fig. 1). 따라서 TH9와 TH16 프라이머의 경우는 지부와 권심의 다형성을 확인시켜주는 마커로 바로 사용이 가능하다.

아가로스 gel 상에서 DNA 크기 차이를 확인할 수 없었던 나머지 trehalose 관련 유전자 증폭 DNA는 염기서열분석을 통해 SNP or insertion or deletion (in/del) 다형성 유무를 확인하였다. 염기서열 분석은 솔젠트(주)에 의뢰를 하였으며 얻어진 염기서열을 이용하여 SNP와 in/del 분석은 staden package program을 이용하여 수행했다. 발견된 SNPs와 in/del을 대상으로 아가로스 gel 상에서 다형성을 보여줄 수 있도록 새

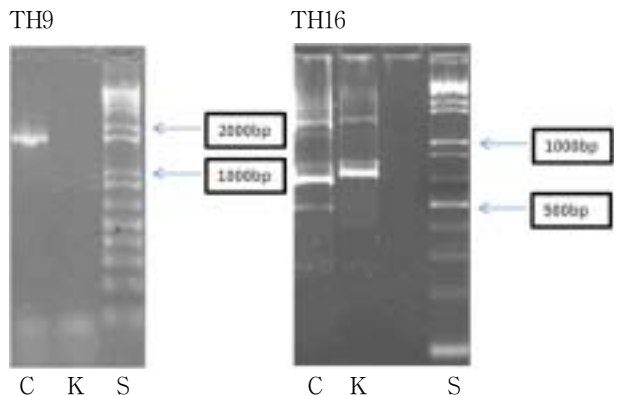


Fig. 1. Agarose gel analysis of dominant TH9 and codominant TH16 markers. C: Chiifu, K: Kenshin, S: size-marker.

TH2	Kenshin	CTACTCATCT <b>TAA</b> ACCTTTTCG
	Chiifu	CTACTCATCT <b>CAA</b> ACCTTTTCG
TH4	Chiifu	CATTACGACA*****TATATATACA
	Kenshin	CATTACGACA <b>ACAA</b> TATATATATA
TH5	Kenshin	ATTAAATATT <b>C</b> TATTCTGTAT
	Chiifu	ATTAAATATT <b>A</b> TATTCTGTAT
TH6	Chiifu	GCTATGTGT <b>AC</b> AGAGTAAGAC
	Kenshin	GCTATGTGT <b>A</b> AGAGTAAGAC

Fig. 2. Nucleotide sequence alignment of TH2, TH4, TH5, and TH6 showed single nucleotide polymorphism or insertion or deletion. Bold letters indicates polymorphic sites. Underline indicates nucleotide sequences recognized by restriction enzyme, RsaI.

Table 1. Twenty eight ESTs homologous to trehalose synthesis genes in *Brassica rapa* L. and primers used for PCR amplification of the ESTs

EST Genbank Number	PRIMER	Nucleotide sequence (5' to 3')	Tm (°C)
EX067175	TH1-F	GTCTCTACTCTCCCCTG	49
	TH1-R	TCTTAACCACCTTCTCGATC	50
EX103397	TH2-F	ATCTTCTCTGTTTCAATCTTATTTTC	49
	TH2-R	TCAGAACTGATCGAACTAGAT	49
EX111722	TH3-F	ACACAAGTCCTCATCTTCATC	50
	TH3-R	TTTTGCTGGACCTTTAATGTC	49
EX132205	TH4-F	GAAACAAATCGTAATGTTTCTTGAT	49
	TH4-R	GCCATATACATATTGGTTGGC	50
EX131767	TH5-F	GCAAAACAACCAAATCACTTATTC	51
	TH5-R	TTTCAGTGTCAAATAGTCTTTA	46
EX074742	TH6-F	AAAATCGATTAGATTTTCGAATATATTG	49
	TH6-R	CGAAAATAAATGGAGTGAAGTTC	49
EX133558	TH7-F	AACAAGTTCTGTCTTTCTGTACA	50
	TH7-R	GATGATACCGGAAAAATAACATTT	49
EX041807	TH8-F	TGGATAATATGGAAAAAATGATCA	49
	TH8-R	CGTCCTGTGATCGAATGG	50
EX126298	TH9-F	GTAATAGTCAATAATTTTATTTTGGTTA	49
	TH9-R	ATGTTTTAAGCCTTCATGTGATC	50
EX125957	TH10-F	AGACAACATAAGCAGCAGTG	50
	TH10-R	TCACCAATGCTTTCAGAAACT	49
EX120603	TH11-F	CATCAAACATATATATATATACTAC	49
	TH11-R	TACAGGTTCCGGTCGGTATTA	50
EX042495	TH12-F	TTTCAACACTTGTGAGAAAATATGA	49
	TH12-R	CATCCTTTACAACCTCTCG	49
EX066738	TH13-F	TATTAATACATTTTCTCCCTTTTCTG	50
	TH13-R	AAGAAAAGACAAAATGTATCCCTG	51
EX121390	TH14-F	TTATTAGATTAGAATCAAACCCTA	49
	TH14-R	TCCCAGCCATCTCACG	49
EX018639	TH15-F	GAGAGTTCCAAGAGTAGCAA	50
	TH15-R	CAAGAGAGGAAGTGTCTAG	49
EX056466	TH16-F	GCAGCCGGGGTCCAT	50
	TH16-R	CCCTGTGGTTTAACTTCAAC	50
CO750595	TH17-F	AACTGCGTTCCCACGTTTC	51
	TH17-R	TCTCATATGCCAATACGTCTC	50
EX027487	TH18-F	GCGGGATTTTGTAGTNATAAAGC	50
	TH18-R	CAAGCTAAAGAGCTTCTAGAT	49
EX061429	TH19-F	AGTGACCTTATTGGCTTCCA	50
	TH19-R	ACACACTCAGCAATATGGTAA	49
EX136003	TH20-F	TTTGGATTAGGGTTTAGGGTTTT	50
	TH20-R	AAGAAGTACTTAGCCTTGCTT	49
EX136883	TH21-F	ACATCTTCAAAGGCATTAGCTTA	50
	TH21-R	AATAAACACTGTGTTCTTATCATCTT	50
EX065344	TH22-F	CTGTCTATCGACCACATTGT	50
	TH22-R	CTCTCTTGACAACAACGGG	51
EX128047	TH23-F	GCACGAGGCTCCTAATTTTC	51
	TH23-R	CCTAGGCTTTGGGCTAGA	50
EX095575	TH24-F	ATTTTCTTTCTTTTCTTCTCTCTCT	49
	TH24-R	GTCGGAGAAGATCTTGTTG	49
CO750596	TH25-F	GTAAGTGGCAAACGAGCCC	50
	TH25-R	AGAGAGACTTCAAAGATATTCTATA	50
DN962862	TH26-F	ACTACCCACCGATTTAGGC	51
	TH26-R	TTAGCCTTGCTCGGTTTCT	49
EE522666	TH27-F	GAGAATATCCCATCCCTCC	51
	TH27-R	AAAGTGGGAACGCAACTGAA	50
EX041632	TH28-F	ACAAATCAAACCTCTGGTTCTTTT	49
	TH28-R	CCCTCCCGCTAACAGTAA	50

로운 프라이머를 제작하였다. 프라이머 제작 방법은 다음과 같은 방법으로 시도하였다.

In/del이 있는 경우(예: TH4)는 아가로스 gel 상에서 크기 차이가 관찰이 가능하므로 in/del을 대상으로 가까운 주변 염기서열에서 프라이머를 제작하였다. 이는 상대적으로 작은 DNA 크기에서 in/del에서 오는 염기서열 크기 차이를 아가로스 2% gel 상에서 좀 더 자세히 관찰 가능하게 해주므로 염기서열 분석처럼 높은 비용과 고가의 장비 없이 다형성을 분석할 수 있다(Fig. 2).

SNP를 대상으로 다형성을 보이는 마커 개발을 위하여 지부와 권심의 염기서열 데이터를 비교 분석하여 두 염기서열 간에 SNP 차이가 있음을 발견하였고(Fig. 2) 우선적으로 TH2와 TH5의 SNPs를 대상으로 프라이머의 3' 말단 마지막 염기서열 위치에 SNP가 위치하도록 프라이머를 제작하였다. 하지만 TH2의 경우는 대상 DNA와 프라이머의 마지막 서열이 불일치함에도 불구하고 지부와 권심 모두에서 PCR 증폭이 일어나 다형성을 보이는데 실패하였고 TH5의 경우는 권심 DNA만 증폭되어 우성(dominant) 마커로 사용이 가능함을 확인하였다(Table 2). TH2의 경우는 제한효소를 이용하여 SNP를 보이는 마커로 개발하였다.

이용된 방법은 SNP 위치에 특정 제한효소의 인식서열이 있는지 확인하고 이를 이용하여 지부와 권심 사이에 제한효소 인식서열 유무로 다형성 마커를 개발하였다. 예를 들어 TH6의

SNP 염기서열에 있어서 제한효소 *RsaI*는 지부의 GTAC 염기서열을 인식한다. 하지만 권심의 GTAT는 인식하지 못한다. 프라이머는 처음 EST 시작부위와 끝 부위에서 제작한 프라이머를 이용하여 지부와 권심 DNA를 각각 PCR 증폭하고 제한효소를 처리하여 다형성을 확인하였다(Fig. 2 and Table 2).

하지만 모든 SNP 위치에 특정 제한효소의 인식서열이 반드시 존재하는 것은 아니므로 위와 같은 방법으로 모든 종류의 SNP의 다형성 마커를 개발하기 어렵다. 따라서 dCAP method [9]를 이용해 TH2와 TH26에 있어서 새로이 제작되는 프라이머에 각각 인위적인 *PstI*과 *HindIII* 제한효소 인식 염기서열을 가진 프라이머를 제작하였다. 예를 들어 *HindIII* 제한효소의 인식 염기서열은 AAGCTT 인데 TH26의 SNP 포함 염기서열은 권심의 경우 AAGCGT이다. 따라서 프라이머에 인위적인 불일치 염기서열을 포함시켜 최종 증폭 DNA는 AAGCTT를 가지게 만들어 준다. 하지만 지부의 경우는 해당 염기서열이 GAGCGT이므로 최종적으로 제한효소 인식서열을 가지지 못한다(Fig. 3). 이러한 인위적인 프라이머는 특정 DNA만 제한효소 인식 염기서열을 가지게 하여 제작한 프라이머로 다시 PCR을 수행하고 제한효소 처리 후 아가로스 gel 상에서 각각 DNA 크기차이로 지부와 권심 간의 다형성을 확인할 수 있었다(Table 2 and Fig. 3).

지금까지 다양한 DNA 마커종류가 개발되어 유전적 다양성 및 유전자 지도 작성 등에 활용되고 있다. 특히 특정한 기능

Table 2. Polymorphic DNA markers of ESTs homologous to trehalose synthesis genes in *Brassica rapa* L.

Trehalose marker (EST Genbank number)	Primer names	Nucleotide sequence (5' to 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Polymorphic pattern
TH2 (EX103397)	TH2-F TH2-R-PstI	ATCTTCTCTGTTTCAATCTTATTTTC CTCCGTCGTCTCCTGC	49 51	PstI digestion, length polymorphism
TH3 (EX111722)	TH3-R TH3-R	ACACAAGTCCTCATCTTTCATC TTTTGCTGGACCTTTAATGTC	50 49	TaqI digestion, length polymorphism
TH4 (EX132205)	TH4-F' TH4-R'	TGTCATCTAARCTTTATTTAAGTCC CGACACTGAAGCGACAG	50 49	length polymorphism
TH5 (EX131767)	TH5-F TH5-R'	GCAAAAACAACCAAATCACTTATTC CATCTGTGAAACATACAGAATAG	51 50	dominant
TH6 (EX074742)	TH6-F TH6-R	AAAATCGATTAGATTTTCGAATATATTG CGAAAATAAATGGAGTGACTTG	49 49	RsaI digestion, length polymorphism
TH7 (EX133558)	TH7-F' TH7-R'	ATGTAAGGGGAATTTATTTTTGGA AGAAATATATATATATTAGAAAGGGC	49 49	length polymorphism
TH9 (EX126298)	TH9-F TH9-R	GTAATAGTCAATAATTTTATTTTTGGTGA ATGTTTTAAGCCTTCATGTGATC	49 50	dominant
TH15 (EX018639)	TH15-F TH15-R	GAGAGTTCCAAGAGTAGCAA CAAGAGAGGAAGTGTCTAG	50 49	PstI digestion, length polymorphism
TH16 (EX056466)	TH16-F TH16-R	GCAGCCGGGGTCCAT CCCTGTGGTTTAACTTCAAC	50 50	length polymorphism
TH26 (CO750596)	TH26-F TH26-R-HindIII	ACTACCCACCGATTTAGGC CTCGTTGGTGAGMAAGCT	51 49	HindIII digestion, length polymorphism

TH26 Kenshin ATCATCTAGAAAGCGTGCTCACCAACGAGCCT  
 Chiifu ATCATCTAGAGAGCGTTCTCACCAACGAGCCT  
 TH26-R-HindIII primer 3'-TCGAAMGAGTGGTGTGTC-5'

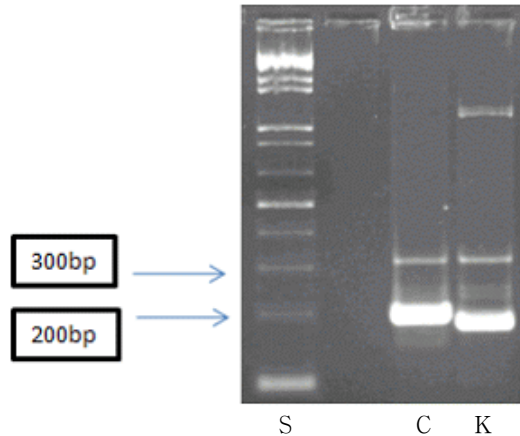


Fig. 3. Nucleotide sequence alignment of TH26 and agarose gel analysis of developed TH26 marker using dCAP method. Bold letter indicates polymorphic sites. Underline indicates the nucleotide sequence for the *Hind*III restriction enzyme. Italic letter indicates mismatch nucleotide between template DNA and primer. C: Chiifu, K: Kenshin, S: size-marker.

성 유전자를 대상으로 염기서열의 다형성을 확인하고 발견된 SNP를 대상으로 쉽게 검증할 수 있는 기술개발이 시도되고 있는데 본 연구에서는 dCAP 방법을 이용하여 배추작물 지부와 권심 사이에서 trehalose 합성 관련 유전자의 다형성 확인할 수 있는 10개의 분자 마커를 개발하였다. 개발된 마커는 육종가 또는 육종회사에서 PCR로 쉽게 이용이 가능한 마커이고 이는 앞으로 배추작물의 trehalose 합성 관련 유전자가 고온, 저온, 또는 건조 등의 환경 스트레스 저항성 형질과 어떤 연관관계를 가지는지 조사하는데 중요한 자료로 활용될 수 있으며 나아가 환경 스트레스 저항성 배추 품종을 개발하는데 있어서 중요한 육종 도구로써 사용될 수 있다고 생각된다.

## 요 약

배추는 재배 온도에 따라 수확량과 품질에 많은 영향을 받을 수 있다. 고온 스트레스 저항성 배추품종 육성을 위해 본 연구는 스트레스 저항성에 관련이 있다고 알려진 trehalose 유전자 관련 다형성 마커를 개발하였다. 아라비도시스 trehalose 합성 유전자와 유사한 총 28개의 배추 EST를 NCBI database에서 찾고 고온에 상대적으로 약한 지부품종과 고온에 잘 견디는 품종인 권심을 대상으로 다형성을 조사하였다. 이 중 10개의 EST에서 insertion/deletion 또는 single nucleotide polymorphism을 발견하여 이를 바탕으로 쉽게 이용이 가능한 10개의 다형성 PCR 마커를 개발하였다. 본 연구에서 개발된 trehalose 분자마커는 앞으로 배추 작물에서 환경 스트레스

저항성과 유전적 연관성을 확인하는데 이용될 수 있고 MAS를 이용한 품종육성에 이용될 수 있다고 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술관리센터(ARPC) 배추분자마커사업단 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* **27**, 617-631.
2. Chen, Q. and G. G. Haddad. 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalase during hypoxia: from flies to mammals. *J. Exp. Biol.* **207**, 3125-3129.
3. Gancedo, C. and C. L. Flores. 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* **4**, 351-359.
4. Kim, M. J. and J. S. Chun. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 91-96.
5. Kim, Y. S., Z. B. Zheng, and D. H. Shin. 2008. Growth inhibitory effects of kimchi (Korean traditional fermented vegetable product) against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **71**, 325-332.
6. Lagercrantz, U. and D. Lydiate. 1996. Comparative genome mapping in brassica. *Genetics* **144**, 1903-1910.
7. Lee, S. B., H. B. Kwon, S. J. Kwon, S. C. Park, M. J. Jeong, S. E. Han, M. O. Byun, and H. Daniell. 2003. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Molecular Breeding.* **11**, 1-13.
8. Mahmud, T. M. M., J. G. Atherton, C. J. Wright, M. F. Ramlan, and S. H. Ahmad. 1999. Pak Choi (*Brassica rapa* ssp *Chinensis* L) quality response to pre-harvest salinity and temperature. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1698-1702.
9. Neff, M., J. Neff, J. Chory, and A. Pepper. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* **14**, 387-392.
10. Paul, M. J., L. F. Primavesi, D. Jhurrea, and Y. Zhang. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 417-441.
11. Rauwolf, U., H. Golczyk, J. Meurer, R. G. Herrmann, and S. Greiner. 2008. Molecular Marker Systems for *Oenothera* Genetics. *Genetics* **180**, 1289-1306.
12. Slate, J., J. Gratten, D. Beraldi, J. Stapley, M. Hale, and J. M. Pemberton. 2008. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica*. DOI 10.1007/s10709-008-9317-z.
13. Thomashow, M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* **118**, 1-8.