

Creeping bentgrass(*Agrostis palustris* Huds.) 품종별 SCAR markers 개발

장덕환* · 정승호

한국잔디연구소

Development of SCAR markers in Creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) cultivars

Duk-Hwan Jang* and Seung-Ho Jung

Korea Turfgrass Research Institute, Seongnam 463-840, Korea

ABSTRACT

Creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) is cool season turfgrass that is used for putting green in golf course. Creeping bentgrass cultivars are difficult to distinguish with the same species because of similar morphological characters and low level of genetic diversity. The SCAR markers using the specific DNA can be useful for differentiating between creeping bentgrass cultivars. Five RAPD primers were used for specific band detection among creeping bentgrass cultivars, penncross, penn A-4, crenshaw, L-93, CY-2, T-1. The pairs of SCAR primers for six cultivars were designed by the specific sequences of the bands that amplified by RAPD. Three of the six SCAR primers could not make the use as SCAR primers because the specific false bands were detected in all cultivars. The remaining pairs of SCAR primer, CY850F/R, T700F/R, L2900F/R, amplified the specific band at expected size for three cultivars, CY-2, T-1, L-93, respectively. The CY850F/R primer amplified a band of 850bp in CY-2 cultivar, the T700F/R primer amplified a band of 700bp in T-1 cultivar, and the L2900F/R primer amplified a band of 2.9kb in L-93 cultivar. In this study we developed the SCAR markers to identify and distinguish the inseeded creeping bentgrass cultivars in a golf course green.

Key words : RAPD, SCAR marker, PCR, Creeping bentgrass

*Corresponding author. Tel : +82-31-781-6440

E-mail : pbori@hanmail.net

Received : Sep., 1, 2009, Revised : Nov., 15, 2009, Accepted : Nov., 22, 2009

서론

미국에서 이용하고 있는 벤투그래스 종(species)은 5개로 크리핑벤투그래스(*creeping bentgrass*, *A. palustris*), 콜로니얼벤투그래스(*colonial bentgrass*, *A. capillaris*), 벨벳벤투그래스(*velvet bentgrass*, *A. canina*), 레드톱(*redtop*, *A. alba*), 드라이랜드(*dryland*, *A. castellana*)다. 이들 중 크리핑벤투그래스와 콜로니얼벤투그래스가 그린, 티, 페어웨이 등에 가장 많이 이용되고 있다(Elizabeth et al., 2003). 일반적으로 크리핑벤투그래스는 강한 포복경 생장, 낮은 예고에 대한 저항성 등의 특성을 가지고 있어 골프코스의 그린, 티 등에 가장 많이 이용하고 있다. 주로 서늘한 기후에 잘 적응하지만 높은 퍼팅 품질로 인해 전이지대에서의 이용이 증가하고 있다(Cacler와 Duncan, 2003).

전이지대에 위치한 국내 골프장의 골프코스 내 그린은 모두 크리핑벤투그래스로 조성되어 있다. 크리핑벤투그래스 품종들 중에 가장 많은 비율을 차지하는 것은 penncross 품종이며, 다음으로 L-93, penn-A4 순 이었다(한국잔디연구소, <http://www.ktri.or.kr>). 최근 골프장수의 급격한 증가와 골프 플레이어들의 퍼팅그린 스피드 향상 요구 등으로 인해 신품종에 대한 요구가 점차적으로 증가하고 있다. 그린 전체를 신품종으로 전면 교체하는 것은 많은 인력, 시간, 경비 등이 소요되므로 신품종을 인터씨딩(*inter-seeding*)하여 점진적으로 교체하는 방안들이 검토되고 있다(Rossi, 1999). 인터씨딩 후 기존 잔디 품종에 대한 신품종으로의 전환율은 대부분 형태적 특성만으로 조사하기 때문에 전환율에 대한 정확한 검증이 어렵다. 따라서 전환율을 보다 정확히 검증하기 위해서는 DNA 분석 방법의 도입이 필요할 것으로 판단된다. 하지만 크리핑벤투그래스 품종간의 유전적 근연 관계가 매우 가

까워 유전적인 표지인자(*genetic markers*)에 의한 구별이 어렵다(Rossi, 1999).

여러 가지 방법들이 벤투그래스 종(*species*)간, 품종간 구별을 위해 이용되어져 왔다. Wilkinson과 Beard(1972)는 Acrylamide gel disk 전기영동방법을 이용하여 크리핑벤투그래스 품종들에 대한 구별을 실시하였다. 또한 Isozyme 전기영동방법에 의해서 크리핑벤투그래스 품종간에 유전적인 다양성 등을 조사하였다(Warnke 등, 1997). 그러나 Jones(1983)은 저장 후 isozyme의 안정성에 문제 제기를 통한 분석의 한계성을 제시하였다. Huff와 Palazzo(1998)은 Laser flow cytometry을 이용하여 파인헤스큐(*fine fescue*) 초종을 염색체별로 분류하였으며, Bonos 등(2002)은 벤투그래스의 종(*species*)간 배수체(*ploidy*)의 상이성을 이용하여 검정하였다.

하지만 최근에는 DNA를 이용하여 유전자 지도(*genetic mapping*)를 작성하고, 품종간 구분 등을 실시하고 있다. Caceres 등(2000)은 RFLP(*restriction fragment length polymorphic*) marker를 이용하여 크리핑벤투그래스 품종들을 구분하였고, Yaneshita(1997)은 한국잔디의 유전적 다양성과 중간 잡종성을 구분하였다. 이런 분석 방법은 방사선 동위원소를 이용하여야 하며, 결과를 얻기 위해서는 많은 시간과 노력이 필요하다.

따라서 유전자 분석을 위해 시간과 노력을 절감할 수 있는 방법으로 PCR를 근거로 한 분류 방법들이 개발되었는데, Casler 등(2003)과 Hollman 등(2005)은 벤투그래스 영양체(*clones*)들간 RAPD(*random amplified Length polymorphic DNA*) marker를 이용하여 유전적인 다양성과 종(*species*)들을 분류하였다. 하지만 PCR를 근거로 한 RAPD방법은 신속하고, 적은 비용이 소요되는 장점이 있지만

PCR반응 온도조건에 너무 민감하게 반응하여 재현성이 떨어지는 문제가 있다(Skroch와 Nienhuis, 1993). 또한 Vergara와 Bughrara(2004)은 벤프그래스의 유전적인 다양성을 분석하기 위해 AFLP(amplified fragment length polymorphism)를 이용하였으며, Cai 등(2004)은 AFLP를 근거로 한국잔디의 연관 지도를 작성하였다. 또한 재현성이 매우 높으며, 특정 유전자를 분석할 수 있는 SCAR(sequence characterized amplified region) marker를 개발하였다(Paran와 Michelmore, 1993). SCAR marker는 RAPD primer에서 증폭된 특이적 band들을 이용하여 만들며, 대략 20개의 특이적 염기서열로 구성된다(Elizabeth 등, 2003). 특이적 염기서열수가 증가할수록 재현성이 더욱 높아진다(Hernandez 등, 1999).

따라서 본 연구에서는 유전적인 다양성이 매우 낮은 크리핑벤프그래스 품종들에 대한 유전 분석을 위해 품종별 SCAR marker를 개발하고, 이를 이용하여 인터씨딩(inter-seeding)을 이나 품종간 유연관계 등을 분석하는데 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

DNA 추출

크리핑벤프그래스 품종별 SCAR markers 을 개발하기 위해서 총 6개의 공시품종을 이

용하였다(표 1). 이들 품종의 DNA를 추출하기 위해서는 모래로 조성된 포트(15cm×15cm×20cm)에 품종당 20립 정도를 파종하여 잔디 잎이 4~5엽기에 식물체를 채취하였다.

공시품종별 Genomic DNA 추출은 CTAB 방법 (Murray와 Thompson,1980)을 변형하여 사용하였다. 채취한 잔디 식물체 1~2g 정도를 2.0 ml tube에 넣고, CTAB extraction buffer (Buffer content : 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% b- mercaptoethanol) 700 ul 를 넣어준 후 Retsch Mixer Mill MM301를 이용하여 식물체를 마쇄하였다.

이후 65℃에서 90분간 incubation한 후 CTAB extraction buffer와 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 넣었다. 10분 동안 다시 incubation 시킨 후 4℃에서 14,000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415R)으로 20분간 원심분리 한 후 1.5 ml tube에 상등액을 취하였다. Chloroform : isopropanol (24 : 1)을 이용하여 2회 정제후 상등액을 취하였다. 상등액과 동량으로 100% ethanol을 넣고 10%(v/v)의 3M sodium acetate를 첨가 한 후 1분간 incubation시켰다. 4℃, 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 DNA를 침전시킨 다음 70% ethanol 800 ul을 넣고 다시 4℃에서 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 응집된 DNA를 세척하였다. DNA을 건조시켜

Table 1. Cultivars, year released, and source of creeping bentgrass

Cultivar	Year of release	Source
Penncross	1955	Standard entry
CY-2	1993	Snow Brand Seed Co. & Chiba-Prefecture Agr. Exp. Station
Crenshaw	1993	Loft's Seed, Inc.
L-93	1995	Loft's Seed, Inc.
Penn A-4	1995	Tee-2-Green Corp.
T-1	1999	Jacklin Seed by Simplot

ethanol을 제거하고 20 μ l의 TE buffer를 넣어 응집된 DNA를 녹인 후 RNase처리를 하였다. DNA농도를 정량하기 위해 20, 50, 100, 250, 500 ng의 λ DNA를 이용하였고, 공시품종별로 DNA농도를 10 ng/ μ l로 희석하여 SCAR marker 제작에 이용하였다.

RAPD 분석

크리핑벤틀그래스 품종별 특이적인 SCAR marker를 개발하기 위하여 Random Primer (Qiagen)을 이용하였다(Table 2). 공시품종별 PCR 반응 농도는 DNA 20ng, 2.5mM dNTP, 10pMol Primer, 0.75unit ExTaq polymerase (TAKARA)이고, 멸균수를 이용하여 총량 25 μ l로 맞추었다. PCR 조건은 Johns 등(1997)의 방법을 변형하여 사용하였다. DNA 증폭은 PCR기기(ASTEC PC802)를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 37 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension의 과정을 총 30회 반복하여 수행하였다.

SCAR Marker 제작을 위한 cloning

SCAR marker 제작을 위해서는 크리핑벤틀그래스 품종별 특이적 band를 선발하여 cloning하였다. PCR 반응에 의해 생성된 PCR product들은 1.0% agarose gel에서 전기영동을 하여 특이적 band를 확인하였다. PCR product 중에 품종별로 특이적 DNA band를 선택하여 오려내어 target DNA band를 pGEM-T-easy vector(Promega)에 넣었다. 이 Vector를 이용해서 *E. coli* DH5 α 를 형질전환하였으며, LB-amp 배지에서 배양 후 Target DNA를 추출하였다.

SCAR primer 제작 및 분석

추출한 DNA의 염기서열 분석은 Microgen (<http://www.microgen.co.kr>)사에 의뢰하여 실

시하였다. 염기서열 분석에 필요한 primer는 pGEM T-Easy vector(Promega)에 있는 T7, SP6 primer를 사용하였다. 또한 크리핑벤틀그래스 공시품종별 특이적인 SCAR primer 제작은 Microgen사의 DNA 염기서열 분석 결과를 근거로 하였다. Target DNA의 염기서열에서 GC함량을 고려하여 공시품종별 특이적 염기서열을 작성하였고, 공시품종별 Forward(F)와 Reverse(R)를 한 쌍으로 SCAR primer를 제작하기 위해 bioneer (<http://www.bioneer.co.kr>)사에 의뢰하였다(표 2). 6개 공시품종별로 제작한 SCAR primer에 대해 특이적 band의 발현 여부를 검정하였다.

결과 및 고찰

SCAR marker 변환을 위한 RAPD band 선발

크리핑벤틀그래스 6개 품종별 특이적인 SCAR marker 개발을 위해서 표 2의 Random Primer(Qiagen)를 이용하였다. RAPD band를 선발하여 SCAR marker로 변환하고자 RAPD PCR의 annealing 온도를 37 $^{\circ}$ C로 PCR 반응을 실시하였다. 5개 primer 모두에서 band수가 평균 18~25개 정도 비교적 많은 다형현상을 보였다. 하지만 공시품종 모두에서 특이적 band가 보이지 않았는데, 이는 크리핑벤틀그래스 종내 유전적인 다양성이 낮아 보다 많은 RAPD primer를 이용해야 품종별 특이적 band를 선발할 수 있을 것으로 판단된다. Warnke 등(1994)의 연구결과에서도 크리핑벤틀그래스 품종간 유전적인 다양성이 낮음을 보고하였는데, 이들은 isozyme polymorphism 방법에 의해 크리핑벤틀그래스 19개 품종간 유연관계를 조사하여 유전적인 다양성을 보고하였다. 특히, 본 연구의 공시품종인 penncross와 crenshaw의 유전적인

유연관계가 0.043으로 매우 가까웠다고 하였다. 또한 AFLP를 이용하여 크리핑벤트그래스 품종간 유전적인 다양성을 조사한 Vergara와 Bughrara(2004)의 연구에서도 유사한 결과를 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 RAPD PCR에 의해서 품종별 특이적 band가 보이지 않은 원인은 크리핑벤트그래스 품종간 유전적인 다양성이 낮기 때문인 것으로 판단된다.

Table 2. OPB primer list used to SCAR marker selection

OPB primer No. ^a	5' to 3' Sequence
7	GGTGACGCAG
8	GTCCACACGG
9	TGGGGGACTC
10	CTGCTGGGAC
11	GTAGACCCGT

^a RAPD primers purchased by Operon Inc.

37°C의 annealing 온도에서는 공시품종별로 특이적 band가 나타나지 않아 negative band를 점차적으로 줄이면서 특이적 band를 선별하기 위해 annealing 온도를 1°C씩 올려가며 특이적 band를 선별하였다. OPB-7 primer에서 annealing 온도에 따라 총 3개의 공시품종에 대한 특이적 band를 선별하였는데, T-1품종은 annealing 38°C에서 0.7kb 크기의 band, crenshaw, L-93 품종은 43°C에서 각각 0.5kb, 2.9kb 크기의 band를 선별하였다. OPB-8 primer는 annealing 39°C에서 만 2개 품종에 대한 특이적 band를 선별하였는데, CY-2 품종은 0.9kb 크기의 band, penncross 품종은 1.2kb 크기의 특이적 band를 선별하였다. Penn A-4 품종은 OPB-10 primer의 annealing 38°C에서 3.0kb 크기의 특이적 band를 선별하였다(표 1).

SCAR primer 제작 및 검증

크리핑벤트그래스 공시품종별로 SCAR

primer를 제작하기 위해 표 2의 primer들을 이용하여 PCR을 실시하였고, PCR product들을 1.0% agarose gel에서 전기영동을 하였다. 공시품종별로 선별된 특이적 band를 agarose gel에서 올려내어 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석하여 제작한 SCAR primer들은 표 3과 같았다. SCAR primer의 CY850F/R에서 앞 영문 대문자 CY는 CY-2 품종, 850은 850bp 크기의 특이적 band를 뜻하였다. 또한 L2900F/F2900R에서 앞 영문 대문자 L은 L-93품종, 2900은 2.9kb크기의 특이적 band를 뜻하였다. F와 R은 SCAR primer 한 쌍으로 F는 Forward, R은 Reverse를 의미하였다.

6개 품종별로 target DNA를 cloning하여 SCAR primer를 제작한 후 검정한 결과, penncross, penn A-4, crenshaw품종을 대상으로 제작한 3개 SCAR primer들은 6개 공시품종에서 모두 band가 나타나 SCAR primer로 활용이 불가능하였다. 이는 target DNA의 높은 GC함량과 크리핑벤트그래스 품종간 유전적인 다양성이 낮은 것에 기인하는 것으로 판단된다. Dieffenbach 등(1993)은 최적의 결과를 얻기 위해서는 PCR primer의 GC함량을 이상적으로 유지하여야 한다고 보고 하였다. PCR 과정에서 충분한 annealing이 이루어지기 위해서는 melting point(T_m)가 56~62°C 정도이며, 이를 위해서는 G+C 함량이 50%인 20개의 oligonucleotides가 적합하다고 하였다. T_m 의 온도가 너무 낮은 경우에는 특이성이 결여되며, 너무 높을 경우에는 특이적 지역 외에서 상보성 결합이 높아져 비특이적 결과물들이 증가한다고 하였다. 따라서 본 연구의 공시품종 대부분은 target DNA의 염기서열내 GC함량이 높았고, SCAR primer 제작시 GC함량이 상대적으로 높았다. 이로 인해 Forward와 Reverse간의 T_m 의 온도 차이

Table 3. Creeping bentgrass specific SCAR primer pair sequence derived from cloned RAPD fragments.

RAPD primer	SCAR primer ^a	5'to3' Sequence of SCAR primers	Annealing temperature ^b
OPB-8	CY850F	GGTGACGCAGAGCACGTGTTGATC	70°C
	CY850R	GGTGACGCAGGAGCTTCAAAG	
OPB-7	L2900F	CAATTCCACACAACATACGAGCCGG	66°C
	L2900R	CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG	
OPB-7	T700F	CACTAGTGAATTCGCGGCCGC	60°C
	T700R	CTGGCGTAATAGCGAAGAGGC	

^a The numbers preceding the R(Reverse) and F(Forward) refer to the approximate size of the SCAR band in bp. "CY", "L", and "T" indicates marker for CY-2, L-93, and T-1.

^b is optimal annealing temperatures for each set of SCAR primers.

가 커져, 최적의 annealing 온도 조건에서 PCR 반응이 일어나지 않았다. 또한 target DNA와 SCAR primer 사이에 비특이적 결합이 증가하여 원하지 않은 지역에서 증폭이 일어나 SCAR primer로써의 이용이 불가능하였던 것으로 판단된다.

또한 6개 공시품종 모두에서 target DNA의 염기서열내 GC함량이 높은 것은 크리핑벤트그래스 품종간 유전적인 다양성이 낮은 것이 원인인 것으로 판단된다. Vergara와

Bughrara(2004)는 AFLP방법에 의해 크리핑벤트그래스 품종과 레드톱(red top)에 대한 유전적인 다양성을 분석하였다. 이들은 크리핑벤트그래스의 신·구 품종에 대한 유전적인 차이는 있었지만 penncross, crenshaw, penn A-4, L-93 품종 등은 다른 유럽에서 유래된 품종들에 비해 유전적으로 근연관계가 가까웠다고 보고하였다. 이는 미국내에서 육성된 품종들간에는 육성 모본들이 유사한 결과라고 보고하고 있으며 이로 인해 국내에 도입된 대

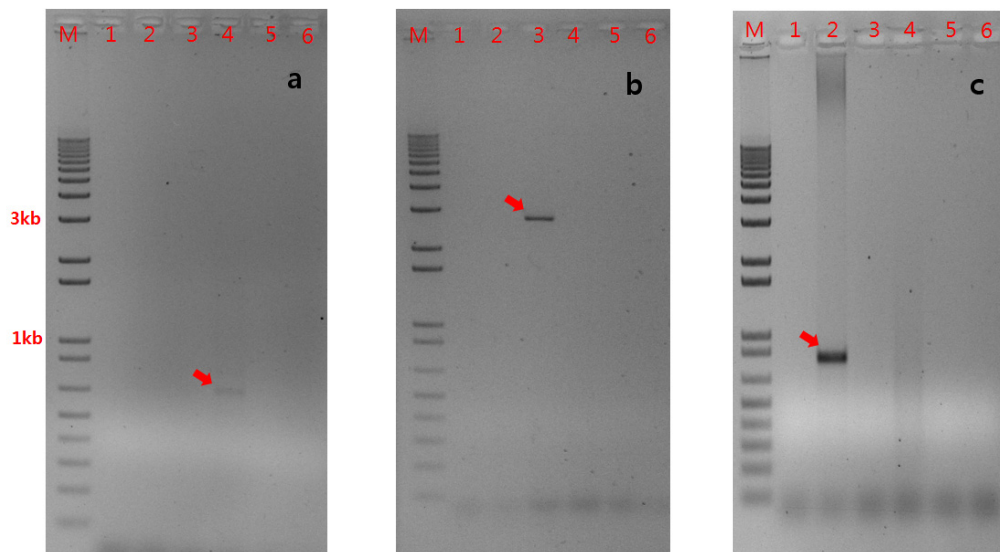


Fig 2. Bending pattern of SCAR markers for three creeping bentgrass cultivars, a T700F/R (SCAR primer pairs) for T-1, b L2900F/R for L-93, c CY850F/R CY-2. Creeping bentgrass cultivars indicated are penncross(Lane 1), CY-2(Lane 2), L-93(Lane 3), T-1(Lane 4), pennA-4(Lane 5), crenshaw(Lane 6). M indicates 100bp marker.

부분 품종들은 유사한 육성 모본으로 인해 유전적인 다양성이 떨어지는 것으로 판단된다.

OPB-7 primer에서 선발하여 제작한 SCAR primer인 L2900F/R은 2.9kb에서 L-93품종의 특이적 band가 나타났으며, T700F/R은 700bp에서 T-1의 특이적 band가 나타났다. 또한 OPB-10 primer에서 선발하여 제작한 SCAR primer인 CY850F/R은 850bp에서 CY-2품종의 특이적 band가 나타났다.

L-93, CY-2, T-1 품종들은 1993년 이후에 육성(표 1)되어 보급되고 있는 품종들로 최근 새롭게 조성되고 있는 국내 골프장에 보급되고 있다. 골프 인구의 증가보다는 새롭게 조성되고 있는 골프장의 수가 더 많이 증가함에 따라 상대적으로 골프장 운영을 위한 영업 경쟁이 더욱 증가하고 있다. 신설 골프장의 경우에는 기존 골프장과 차별화된 골프장 설계 및 최근 골프 플레이어들의 요구에 부합하는 그린 스피드 향상 관리를 실시하고 있다. 기존 골프장에서는 이런 문제를 해결하기 위해 그린 전체를 개보수하기 보다는 골프장 운영에 미치는 영향을 최소화하기 위해 인터씨딩(inter-seeding)을 선택하고 있다. 하지만 인터씨딩을 실시한 후 신품종과 기존 품종간에 우점율을 조사하기 위해 형태적인 특성만으로는 크리핑벤트그래스 품종간 구분이 어려우며, 유전적인 marker를 이용할지라도 품종간 유전적인 근연관계가 가까워 구분하기 어렵다.(Rossi, 1999).

따라서 pennncross로 조성된 그린에 L-93, CY-2, T-1 품종들을 인터씨딩 한 후 이들 신품종으로의 전환율을 품종간 형태적인 특성으로 조사가 불가능하므로 본 연구에서 개발한 SCAR marker를 이용하게 되면 보다 빠르고, 정확한 조사가 가능할 것으로 기대되었다.

국문요약

크리핑벤트그래스는 골프코스의 퍼팅그린에서 주로 사용하고 있는 한지형잔디 초종이다. 크리핑벤트그래스 품종들은 형태적인 특성이나 유전적인 다양성이 협소하여 품종간 구분이 매우 어렵다. 따라서 이들 품종간 유전적인 다양성이나 골프코스 그린의 인터씨딩에 대한 조사를 위해 SCAR marker를 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

pennncross, penn A-4, crenshaw, L-93, CY-2, T-1 공시품종들에 대한 SCAR marker 개발을 위해 5개 RAPD primer에 대한 품종간 구분이 가능한 특이적 band를 선발하였다. 선발한 특이적 band의 염기서열을 분석하여 품종별 SCAR primer를 제작하였다. 각 품종의 SCAR primer별로 특이적 band가 나타나는지에 대한 여부를 검정한 결과, pennncross, penn A-4, crenshaw 품종의 SCAR primer는 6개 공시품종에서 동일한 크기의 band가 나타나 SCAR marker로써 활용이 어려웠다. 하지만 CY-2의 CY850F/R primer는 850bp, T-1의 T700F/R primer는 700bp, L-93의 L2900F/R은 2.9kb에서 특이적 band가 나타나 3개 품종별 SCAR marker로서 활용이 가능하였다.

따라서 본 연구에서 개발한 3개 품종별 SCAR marker를 활용하여 크리핑벤트그래스의 품종별 유전적 다양 및 골프코스 그린의 인터씨딩을 조사에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

주요어 : 인터씨딩, 크리핑벤트그래스, RAPD, SCAR marker

참고문헌

1. 한국잔디연구소. <http://www.ktri.or.kr>.
2. Bonos, S.A., K.A. Plumley, and W.A. Meyer. 2002. Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. *Crop Sci.* 42:192-196
3. Caceres, M.E., Pupilli F., Piano E., and S. Arcioni. 2000. RFLP markers are an effective tool for the identification of creeping bentgrass(*Agrostis stolonifera* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47:455-459.
4. Cai, H., M. Inoue, N. Yuyama, and S. Nakayama. 2004. An AFLP-based linkage map of Zoysiagrass(*Zoysia japonica*). *Plant Breeding* 123:543-548.
5. Casler, M.D., and R.R. Duncan. 2003. Turfgrass biology, genetics, and breeding. p 175. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
6. Casler, M.D., Y. Rangel, and J.C., Stier, and G., Jung. 2003. PAPP marker diversity among creeping bentgrass clones. *Crop Sci.* 43:688-693.
7. Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe, and G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 3:S30-S37.
8. Elizabeth, A.S., M.D., Casler, and G., Jung. 2003. Development of species-specific SCAR markers in bentgrass. *Crop Sci.* 43:345-349
9. Hernandez, P., A. Martin, and G. Dorado. 1999. Development of SCARs by direct sequencing fo RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol. Breed.* 5:245-253.
10. Hollman, A.B., J.C. Stier, M.D. Casler, G. Jung, and L.A. Brilman. 2005. Identification of putative velvet bentgrass clones using RAPD markers. *Crop Sci.* 45:923-930
11. Huff, D.R., and A.J. Palazzo. 1998. Fine fescue species determination by laser flow cytometry. *Crop Sci.* 38:445-450
12. Johnes, M.A., P.W. Skroch, J. Nienhuis, P.Hinrichsen, G. Bascur, and C. Munoz-Schick. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Sci.* 37:605-613
13. Jones, T.W.A. 1983. Instability during storage of phosphogluco-isomerase isoenzymes from ryegrass(*Lolium* spp.). *Physiol. Plant* 58:136-140.
14. Murray, M G; Thompson, W F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* ,v.8 no.19 pp.4321-4325.
15. Paran, I, and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable RCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Gen.* 85:985-993.
16. Rossi, F.S. 1999. Interseeding bentgrasses into established turf. *Golf*

- Course Management August p:53-56.
17. Skroch, P., and J. Nienhuis. 1993. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Gen.* 91:1086-1091.
 18. Vergara, G.V., and S.S. Bughrara. 2004. Genetic differentiation of tetraploid creeping bentgrass and hexaploid redtop bentgrass genotypes by AFLP and their use in turfgrass breeding. *Crop Sci.* 44:884-890.
 19. Warnke, S.E., D.S. Douches, and B.E. Branham. 1997. Relationships among creeping bentgrass cultivars based on isozyme polymorphism. *Crop Sci.* 37:203-207.
 20. Wilkinson, J.F., and J.B. Beard. 1972. Electrophoretic identification of *Agrostis palustris* and *Poa pratensis* cultivars. *Crop Sci.* 12:833-834
 21. Yamamoto, I., and J.M. Duich. 1994. Electrophoretic identification of cross-pollinated bentgrass species and cultivars. *Crop Sci.* 34:792-798.
 22. Yaneshita, M., Nagasawa R., Engelke M.C., and Sasakuma T. 1997. Genetic variation and interspecific hybridization among natural populations of zoysiagrasses detected by RFLP analyses of chloroplast and nuclear DNA. *Genes Gener. Syst.* 72:173-179.

