연구논문

韓資植誌 24(5) : 584~590(2011)
Korean J. Plant Res.

마늘유래 Cytochrome P450 유전자의 변이 분석

권순태*, Juli Kamiya[1]
안동대학교 생명자원과학부, [1]퍼듀대학교 원예학과

Genetic Variation of Cytochrome P450 Genes in Garlic Cultivars

Soon-Tae Kwon* and Juli Kamiya[1]
Department of Biological Resources, Andong Nat'l University, Andong 760-749, Korea
[1]Department of Horticulture, Purdue University, IN 47907-2010, USA (*Corresponding author)

Abstract - Wound inducible P450-Esg cDNA, one of cytochrome P450 gene family, was isolated from shoot of Euiseong garlic cultivar. P450-Esg cDNA possesses highly conserved heme-binding domain in the nucleotide sequence, and 1,419 bp of open reading frame (ORF) coding of 473 amino acids. Based on the nucleotide sequence analysis of P450-Esg homologous from twelve garlic cultivars, two domains, one domain between 472 to 510 bp, and the other between 1,210 to 1,249 bp from start codon (ATG), showed various nucleotide polymorphism among cultivars. Sequence of heme-binding domain in P450-Esg homologous, which is located at the domain between 1,210 to 1,240 bp from start codon, showed various nucleotide polymorphism as well as amino acid sequence polymorphism among twelve garlic cultivars. Anther domain, between 472 to 510 bp from start codon, showed exactly same amino acid sequence in the twelve garlic cultivars, but there were various single nucleotide polymorphism to the cultivars.

Key words - cDNA, Cytochrome P450, Garlic cultivar, Polymorphism, Nucleotide sequence

서 언

우리나라의 재배종 마늘은 휴면성이나 맹아습성 및 재배적 특성에 따라 크게 한지형과 난지형으로 구분되고 있는데, 각 지역에서 재배되고 있는 다양한 종류의 마늘종에 대한 구체적인 전파경로나 유전적 변이에 관하여는 알려진 바가 거의 없다(Hwang, 1993; Bae *et al.*, 2010; Kwon and Oh. 1999). 지금까지 마늘의 종을 분류하기 위한 형태적, 생리·생태적(Hwang, 1993; Lee, 1974), 세포학적(Cheshmedhiev, 1973; Harn *et al.*, 1996) 및 생화학적(Etoh and Ogura, 1981) 방법이 시도되었으며, 전 세계적으로 재배되고 있는 마늘종에는 다양한 변이가 존재한다는 사실은 이미 잘 알려져 있다(Kollmann and Shmida, 1977). 우리나라의 재배마늘은 한지형과 난지형이 뚜렷이 구분되는 생태형이 존재하는 것으로 보아 재배종 간에는 상당한 정도의 유전적 다양성이 존재할 것으로 추정된다.

*교신저자(E-mail) : skwon@andong.ac.kr

Cytochrome P450(P450)은 세포소기관의 microsome 부위에 존재하는 단백질로 세포에서 일어나는 다양한 종류의 산화반응을 촉매하는 효소이다(Hoshino *et al.*, 1995). P450군에 속한 효소들은 생체방어와 관련된 이차대사물질이 생합성에 결정적인 역할을 할뿐 만 아니라 독성물질의 해독작용에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Donaldson and Luster, 1991). 식물에서는 벼, 고추, 완두, 담배, 알팔파, 해바라기 등에서 P450 유전자가 밝혀졌는데, 이에 속하는 유전자는 식물종이나 변종에 대한 염기서열의 특이성이 강하며, 식물이 생물·비생물적 스트레스와 같은 불량한 환경조건에 놓였을 때 선택적으로 발현되는 특성을 가진 것으로 알려져 있다(Donaldson and Luster, 1991; Kwon and Chappell, 1998).

동·식물 게놈이나 유전자의 염기서열에서 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 조사하는 것은 근연종이나 변종을 간편하게 구분하기위한 도구로 많이 사용되어 왔다(Drabovich and Krylov, 2006; Morita *et al.*, 2007). P450 유전자가 특정한 환경 스트레스에 선

택적으로 발현된다는 점과 각 식물의 변종에 대한 특이적인 염기서열을 보유하고 있다는 점을 이용하면 마늘의 재배종을 구분하는데 유용한 marker로 이용될 수 있을 것이다(Donaldson and Luster, 1991). 따라서 본 연구는 마늘 재배종에 존재하는 P450 유전자의 염기서열을 비교하여 국내·외에서 재배되고 있는 마늘의 유전적 변이를 조사하고, 각 지역종간에 뚜렷한 차이를 나타내는 유전자 marker를 탐색하여, 이들 유전자를 국내·외 재배마늘의 분류지표로 이용하기 위한 시도로 수행되었다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 마늘은 12종이었으며, 국내종으로는 의성종, 삼척종, 서산종, 예천종(2종), 의성노랑, 정선종, 육백종, 단양종, 대서종 및 남도종이며, 국외종으로는 몽골종을 사용하였다. 각 지방종은 의성군농업기술센터, 단양마늘시험장 및 원예연구소에서 수집·유지하고 있는 것을 분양받아 사용하였다.

상처처리 및 P450 cDNA 탐색

휴면이 타파된 마늘 인편을 25℃ ± 1에 생장상에 치상하여, 2주 동안 자란 마늘의 싹에 수술용 칼을 이용하여 5 mm 간격으로 상처를 처리한다. 상처처리를 한 후 일정시간이 경과하면 싹을 채취하여 액체질소에 담구어 total RNA 추출한 후 poly(A)$^+$RNA를 추출하였다(GIBCO, Life Technology). RT-PCR을 위한 forward primer는 P450 유전자 내부에 heme-binding domain(hb-domain)의 상부에 존재하는 아미노산서열(EFLPF)을 바탕으로 디자인하였으며, 5'말단에 *Bam*H1 부위를 포함한 염기서열[5'-GCGGATCCGAGTT(T/C)(T/C)T(G/A/T/C)CC(G/A/T/C)TT(T/C)-3']을 사용하였고, reverse primer는 *Eco*R1 부위가 포함된 oligo(T) primer(5'-CGGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTT-3')를 사용하였다(Fig. 1). 탐색된 P450 유전자 단편은 cDNA libray에서 완전한 염기서열 탐색을 위한 프로브로 사용하였으며, 탐색된 모든 P450 cDNA는 염기서열 분석을 실시하였다.

유전자의 발현분석

유전자의 발현은 Northern blot과 RT-PCR방법으로 분석하였다. Northern분석은 각 식물체로부터 추출한 total

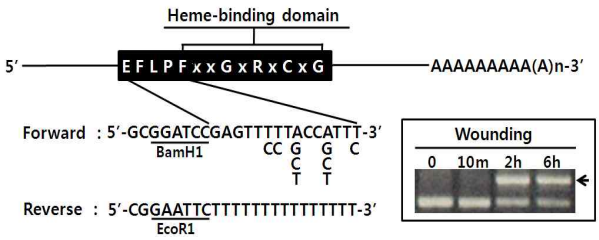

Fig. 1. Primer design for cloning wound-inducible Cyt. P450 cDNA in garlic shoot cell. A forward primer including *Bam*H1 site is based on amino acid sequence of EFLPF and reverse primer is oligo (dT) including *Eco*R1 site. Box is RT-PCR product showing wound-inducible bands (arrow).

RNA를 1.0% agarose에 전기영동하고 이를 필터에 옮긴 후 미리 준비한 P450 cDNA를 프로브로 hybridization을 실시하였다(Kwon *et al.*, 2003). RT-PCR은 식물체로부터 추출한 total RNA로부터 cDNA를 작성하고 Fig. 1에서 제작한 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. 합성된 PCR 산물을 전기영동하여 발현정도를 조사하였다.

염기서열 비교 및 변이분석

P450-Esg를 probe로하여 상처(wound)를 처리한 12개 지방종으로 부터 탐색한 P450 cDNA의 염기서열을 비교하였다. Start codon(ATG)에서 472~510 bp 사이의 염기에서 지방종간에 차이를 보이는 서열을 다수 확인하였고, start codon에서 1,210~1,240 bp 사이의 염기에서 heme-binding 부위를 확인하였다. 변이성 분석은 각 염기 A, G, C, T를 하나의 산물로 간주하고 존재 '1', 부재 '0'으로 data화 하여 유전적 다양성을 분석하고, 재배종간의 유사성계수는 Nie and Li(1979)의 계산법을 기초로 하였으며, 통계적 분석에는 NT-SYS 2.0 program을 사용하였다.

결과 및 고찰

P450 유전자의 분리 및 발현분석

마늘 유래의 P450-Esg(cytochrome P450 from Euiseong garlic) 유전자를 분리하기위하여 생장상에서 2주정도 자란 의성종 마늘의 유묘에 상처(wound)를 가하여 경시적으로 RT-PCR 분석을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. 그 결과 상처를 주지 않은 조직에서는 전혀 발현되지 않았으나, 상처를 가한 후 3시간에는 뚜렷한 발현이 보이며, 처리 6시간 이후에도 지속적으로 발현되는 것으로 나타났다. 마늘 유

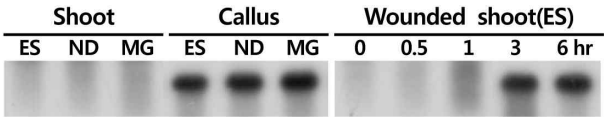

Fig. 2. Expression of garlic P450-Esg gene in shoot, callus and wounded shoot. Cultivars, Euiseong (ES), Namdo (ND) and Mongolia (MG). probe for northern blot was P450 cDNA isolated from Euiseong garlic (P450-Esg) shoot treated with wounding for 6 hours.

래 P450-Esg 유전자의 발현 분석을 위해 Northern blot 분석을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 먼저, 한지형인 의성종(ES), 난지형인 남도종(ND) 및 해외종인 몽골종(MG)을 이용하여 싹 절편체와 callus를 비교한 결과 싹 절편체에서는 전혀 발현되지 않았으나, callus에서는 조사한 품종 모두에서 강한 signal를 보였다. 그러나 싹 절편체에 상처를 준 후, 3시간과 6시간이 경과한 싹에서는 P450-Esg 유전자가 강하게 발현되었다.

동·식물의 microsome 부위에 존재하는 P450 단백질은 세포에서 일어나는 다양한 종류의 산화반응을 촉매하는 효소로서, 대사과정 중에 생체방어와 관련된 이차대사물질의 생합성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hoshino *et al.*, 1995). 지금까지 다양한 스트레스에 노출된 벼, 고추, 완두, 담배, 알팔파, 해바라기 등과 같은 식물에서 P450 유전자가 밝혀졌으나, 마늘 세포로부터는 이 유전자가 탐색된 사례는 보고된바 없다(Donaldson and Luster, 1991). 한편 P450에 속하는 유전자는 식물종이나 변종에 대한 염기서열의 특이성이 강하며, 식물이 불량한 환경조건에 놓였을 때 선택적으로 발현되는 특성을 가진 것으로 알려져 있다(Donaldson and Luster, 1991; Kwon and Chappell, 1998).

최초 의성종 마늘에서 탐색된 P450-Esg 유전자가 타 재배종에서도 특이적으로 발현된다는 점으로 미루어 이 유전자는 마늘에서는 보편적으로 존재하는 상처유도성(wound-inducible) 유전자인 것으로 판단되었다. 따라서 P450-Esg 유전자를 probe로 하여 국내와 몽골에서 수집한 12종의 마늘 유묘에 상처를 가한 후 각각의 cDNA library로부터 상처에 특이적으로 발현되는 P450유전자를 찾아 염기서열 분석을 실시하였다.

```
   0 atttagcaaaattgcgccacttaaccattattctccagacagcatcgtctaataatccaccacgtatctcccata
  76 atgcagttatgcagcttggtgtccattttcctcttcctagctgtcctattgtggttgaggatatggaagtactcc
     M  Q  F  F  S  L  V  S  I  F  L  F  L  A  F  L  F  L  L  R  K  W  K  N  S
 151 aatagccaaagcaagaaattgccaacaggtccatggaaaataccaatcctaggaagtatccttcatatgattggt
     N  S  Q  S  K  K  L  P  T  G  P  W  K  I  P  I  L  G  S  I  L  H  M  I  G
 226 ggagaaccgcaccatgtcctcagagatttagcaaaaaaatatggaccacttatgcaccttcagttaggtgaaatt
     G  E  P  H  H  V  L  R  D  L  A  K  K  Y  G  P  L  M  H  L  Q  L  G  E  I
 301 tctgcagttgtggttacttctagggacatggcaaaagaagtgctaaaaactcatgacgtcgtttttgcatctagg
     S  A  V  V  V  T  S  R  D  M  A  K  E  V  L  K  T  H  D  V  V  F  A  S  R
 376 cctaaaattgtagccatggacatcatctgtaataaccagtcagatattgcctttagccctatggcgaccactgg
     P  K  I  V  A  M  D  I  I  C  N  N  Q  S  D  I  A  F  S  P  Y  G  D  H  W
 451 agacaaatgcgtaaaatttgtgtcatggaacttctcaatgcaaagaatgttcggtctttcagctccatcagacgt
     R  Q  M  R  K  I  C  V  M  E  L  L  N  A  K  N  V  R  S  F  S  S  I  R  R
 526 gatgaagtcgttcgtctcattgactctatccggtcagattcttcttcaggtgaactagttaatttacgcagagg
     D  E  V  V  R  L  I  D  S  I  R  S  D  S  S  S  G  E  L  V  N  F  T  Q  R
 601 atcatttggtttgctagctccatgacgtgtagatcagcatttgggcaagtactcaaggggcaagacatattgcc
     I  I  W  F  A  S  S  M  T  C  R  S  A  F  G  Q  V  L  K  G  Q  D  I  F  A
 676 aaaaagatcagagaagtaataggattagcagaaggcttggatgtggtagacatcttccctacatacaagtttctt
     K  K  I  R  E  V  I  G  L  A  E  G  L  D  V  V  D  I  F  P  T  Y  K  F  L
 751 catgttctcagtgggatgaagcgtaaacttttgaatgcccacctcaaggtagacgccattgttgaggatgtcatc
     H  V  L  S  G  M  K  R  K  L  L  N  A  H  L  K  V  D  A  I  V  E  D  V  I
 826 aacgagcacaagaaaaatcttgcagctggcaaaagtaatggcgcattagaggacatgtttgctgccggaacagaa
     N  E  H  K  K  N  L  A  A  G  K  S  N  G  A  L  E  D  M  F  A  A  G  T  E
 901 acttcatcaacaacaactgtctgggctatggctgaaatgatgaagaatccaagtgtattcaccaaagctcaagca
     T  S  S  T  T  V  W  A  M  A  E  M  M  K  N  P  S  V  F  T  K  A  Q  A
 976 gaagtgcgagaagccctttagggacaaagtttcttttgatgaaaatgatgtggaggagctgaaatacttaaagtta
     E  V  R  E  A  F  R  D  K  V  S  F  D  E  N  D  V  E  E  L  K  Y  L  K  L
1051 gtcattaaagaaactttgagacttcatccaccgtctccactttttggtcccaagagaatgcagggaagatacggat
     V  I  K  E  T  L  R  L  H  P  P  S  P  L  L  V  P  R  E  C  R  E  D  T  D
1126 ataaacggctacactattcctgcaaagaccaaagttatggttaatgtttgggcattgggaagagatccaaaatat
     I  N  G  Y  T  I  P  A  K  T  K  V  M  V  N  V  W  A  L  G  R  D  P  K  Y
1201 agggatgacgcggaaagctttaagccagagagatttgagcaatgctcggtggatttttttggtaataattttgag
     R  D  D  A  E  S  F  K  P  E  R  F  E  Q  C  S  V  D  F  F  G  N  N  F  E
1276 tttcttcccctttggcggtggacggagaatctgtcctggaatgtcatttggtttagctaatctttacttgccattg
     F  L  P  F  G  G  G  R  R  I  C  P  G  M  S  F  G  L  A  N  L  Y  L  P  L
1351 gctcaattactctatcactttgactggaaactcccaaccggaatcatgccaagagacttagacttgaccgaatta
     A  Q  L  L  Y  H  F  D  W  K  L  P  T  G  I  M  P  R  D  L  D  L  T  E  L
1426 tcgggaataactattgctagaaagggtgacctatacttaaatgccactccttatcaaccttctcgagagtaatac
     S  G  I  T  I  A  R  K  G  D  L  Y  L  N  A  T  P  Y  Q  P  S  R  E  *
1501 tatattggcatactcattataaatttccttcatcaacctctatattgttcaataatcaatcttctggtgttatag
1576 gctttatcgatttccaatacatgtcattgaagaatgtatcacattccatatagatggtgaacgcaccaattaatc
1651 gtgccatgattttagcgtatcttgtcccatcataaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Fig. 3. Nucleotide and predicted amino acid sequences of P450-Esg cDNA isolated from Euiseong garlic. ORF, 1,419 bp nucleotide with 473 amino acids, from starting (atg) codon to termination (taa) codons are underlined. First domain, between 472 bp to 510 bp from start cocon (ATG), showing nucleotide polymorphism among cultivars, and second domain, heme binding domain of P450 gene, between 1210 bp to 1,240 bp from start codon, are highlighted.

P450-Esg의 염기서열

유묘의 싹에 상처를 처리한 의성종 마늘로부터 cDNA library를 만들어 RT-PCR에 의해 확보된 P450-Esg 단편을 probe로 하여 완전한 cDNA를 탐색하였다.

탐색한 P450-Esg 유전자는 시작코돈(ATG)으로부터 1,210~1,240 bp 사이에서 cytochrome P450 유전자에 공통적으로 존재하는 것으로 알려진 heme-binding domain (hb-domain)을 코딩하는 염기서열이 확인되었다. Hb-domain은 P450의 전체 polypeptide 중에서 총 10개의 아미노산(FxxGxRxCxG)으로 구성되어 있는데 동식물로부터 P450유전자를 확인하는 가장 결정적인 단서로 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서 탐색된 P450-Esg cDNA는 마늘 유묘가 상처를 받았을 때 특이적으로 발현되는 cytochrome P450 유전자임이 확인되었다.

P450-Esg cDNA의 시작코돈으로부터 polyadenine의 마지막 염기서열까지의 길이는 1,627 bp 였으며, open reading

frame(ORF)의 DNA 염기수는 1,419 bp이고, 이 유전자는 473개의 아미노산을 가진 polypeptide를 코딩하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 한편 본 연구의 의성종 마늘에서 밝혀진 P450-Esg 유전자는 고추에서 밝혀진 P450-Hy01 cDNA (Kwon *et al*, 2003), 담배에서 밝혀진 P450-EAS cDNA (Ralston *et al*., 2001)와 동일한 길이의 ORF을 보유하고 있으며, ORF 염기서열비교에서 95% 이상의 동일성을 보였다.

재배종간의 염기서열 비교

본 연구에서 탐색한 P450-Esg cDNA를 probe로 하여 국내외에서 수집된 12종의 마늘에서 상처에 의해 특이적으로 유도되는 유전자를 모두 탐색하여 염기서열 분석을 실시하였다. 그 결과 12종 마늘에서 각각 탐색된 P450 유전자는 P450-Esg와 동일한 길이(1,419 bp)의 ORF를 갖고 있었으며, 모든 유전자가 P450의 공통된 hb-domain인 FxxGxRxCxG를 코딩하는 염기서열을 포함하고 있었다.

각각의 재배종으로부터 탐색한 P450 cDNA의 ORF영역의 염기서열을 비교분석한 결과 472~510 bp 영역과 1,210~1,240 bp 영역에서 다형성(polymorphism)이 많이 관찰되었다(Fig. 3). 먼저 hb-domain(1,210~1,240 bp)의 경우 의성종, 서산종, 예천종, 정선종, 육백종, 단양종은 hb-domain의 세 번째 아미노산이 glycine(G)인 반면, 삼척종, 의성노랑 및 몽고종은 methionine(M)이었고, 난지형인 남도종과 대서종은 alanine(A)으로 나타났다. 한편 7번째 아미노산이 isoleucine(I)인 종은 삼척종, 서산종, 예천-A, 의성노랑, 정선종, 육백종, 대서종, 남도종, 몽골종인 반면에 예천-B종과 단양종은 serine(S)인 것으로 확인되었다 (Table 1). 한편 동일한 아미노산을 코딩하면서도 DNA의 염기서열에서 차이를 보이는 경우도 볼 수 있는데, 예를 들어 hb-domain의 7번째 아미노산인 isoleucine(I)를 코딩하는 DNA의 염기서열이 의성종은 ATC, 삼척종은 ATT, 예천종-A종은 ATA, 예천-B종은 TCT로 재배종간에 다양한 차이를 보였다. 다섯 번째 아미노산인 arginine(R)을 코딩하는 염기서열에서도 다른 모든 종은 CGG인 반면에 육백종만 유일하게 AGG인 것으로 나타났다(Table 1).

본 연구에서 마늘 재배종으로부터 탐색된 P450유전자의 hb-domain은 30 bp의 비교적 짧은 염기서열 임에도 불구하고 종간에 다양한 염기서열의 변이를 보여주고 있는데, 특히 hb-domain의 3, 5 및 7번째 아미노산에서만 종간에 차이를 보여 각 지역의 재배종을 간편히 구분하는 중요한 단서로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Fig. 4는 P450 cDNA의 hb-domain에 존재하는 DNA의 염기서열을 바탕으로 각 지역의 재배종간의 유연관계를 표시한 결과이다. 12개의 마늘 지방종은 유전적 거리(Genetic distance, GD값)가 0.07인 값에서 크게 두 개의 그룹으로 나누어지는데, 제1그룹은 예천-B종과 단양종이 속해 있으며, 의성종을 포함한 나머지 10개 지방종은 제

Table 1. Nucleotide and amino acid sequence of heme binding domain in Cyt P450 genes identified from twelve garlic cultivars

Cultivars	DNA and amino acid sequence of heme-binding domain	
	Amino acid	DNA (5' to 3')
Euiseong	FGGGRRICPG	TTT/GGC/GGT/GGA/CGG/AGA/ATC/TGT/CCT/GGA
Samchuk	--M-------	---/---/ATG/---/---/---/--T/---/---/---
Seosan	----------	---/---/--C/---/---/---/--T/---/---/---
Yechun-A	----------	---/---/---/---/---/---/--A/---/---/---
Yechun-B	------S---	---/---/---/---/---/---/TCT/---/---/---
Euiseong-norang	--M-------	---/---/ATG/---/---/---/--T/---/---/---
Jeongsun	----------	---/---/---/---/---/---/--T/---/---/---
Yookback	----------	---/---/--G/---/A--/---/--T/---/---/---
Danyang	------S---	---/---/---/---/---/---/TCA/---/---/---
Daeseo	--A-------	---/---/--C/---/---/---/--T/---/---/---
Namdo	--A-------	---/---/-CA/---/---/---/--T/---/---/---
Mongolia	--M-------	---/---/ATG/---/---/---/--T/---/---/---

2그룹으로 분류되었다. 제2그룹에 속한 10개의 지방종도 GD 값에 따라 종간의 유연관계가 다시 몇 개의 소그룹(sub-group)으로 분류되는데, 의성종, 예천-A종, 정선종이 포함된 소그룹, 서산종과 대서종이 포함된 소그룹, 삼척종, 의성노랑종, 몽골종이 포함된 소그룹으로 재분류되었다. 육백종과 남도종은 제2그룹에 포함된 종들의 어느 소그룹에도 속하지 않는 것으로 분류되었다.

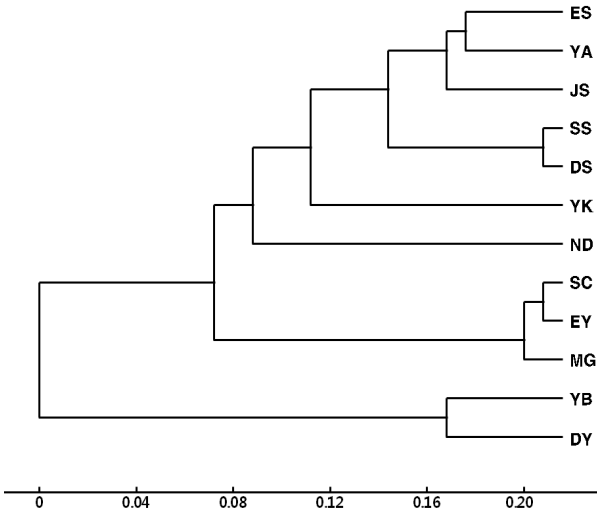

Fig. 4. Polygenetic tree of garlic cultivars based on the nucleotide sequence of heme-binding domain in Cyt. P450 cDNA isolated from garlic shoots treated with wounding. Cultivars, Euiseong (ES), Samchuk (SC), Seosan (SS), Yechun-A (YA), Yechun-B (YB), Euiseong-norang (EY), Jeongsun (JS), Yookback (YK), Danyang (DY), Daeseo (DS), Namdo (ND) and Mongolia (MG).

P450에 속하는 유전자는 식물종이나 변종에 대한 염기서열의 특이성이 강하며, 식물이 스트레스조건에 놓였을 때 선택적으로 발현되는 특성을 가진 것으로 알려져 있다(Donaldson and Luster, 1991). 본 연구에서도 상처를 처리한 마늘 싹으로부터 유도되는 P450유전자에 존재하는 hb-domain의 염기서열에서 지방종에 따라 특이적으로 차이를 보이는 부분을 찾을 수 있었다. 그러나 hb-domain의 염기서열 차이로는 한지형과 난지형 또는 국내종과 몽고종간의 뚜렷한 차이는 찾아 볼 수 없었다. 또한 472-510 bp 영역에서 재배종간의 다형성을 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)분석을 실시한 결과는 Table 2와 같다.

첫 번째 아미노산인 aspartic acid(D)를 DNA 염기 GAC로 코딩하는 종이 의성종, 서산종, 의성노랑, 육백종, 대서종, 남도종, 몽골종이었고, GAT로 코딩하는 종이 삼척종, 예천-A종, 예천-B종, 정성종, 단양종으로 재배종간에 차이를 보였다(Table 2). 두 번째 아미노산인 serine(S)의 경우 남도종은 염기 TCC로 코딩하는 반면, 다른 11개의 재배종은 모두 TCT로 코딩하는 것으로 나타나났다. 네 번째 아미노

Table 2. Single nucleotide polymorphism between 472 bp to 510 bp domain from start codon (ATG) in cytochrome P450 genes from various garlic cultivars

Cultivars	DNA and amino acid sequence of heme-binding domain	
	Amino acid	DNA sequence (5' to 3')
Euiseong	DSIRSDSSSGELV	GAC/TCT/ATC/CGG/TCA/GAT/TCT/TCT/TCA/GGT/GAA/CTA/GTT
Samchuk	----------	--T/---/---/--A/---/---/---/---/---/---/---/---/---
Seosan	----------	---/---/---/---/---/---/---/---/---/---/--C/---/---
Yechun-A	----------	--T/---/---/---/---/---/--A/---/---/---/---/---/---
Yechun-B	----------	--T/---/---/--A/---/---/---/---/---/---/---/---/---
Euiseong-norang	----------	---/---/---/--A/---/---/--A/---/---/---/---/---/---
Jeongsun	----------	--T/---/---/--A/---/---/---/---/---/---/--C/---/---
Yookback	----------	---/---/--A/---/---/---/---/---/---/---/--C/---/---
Danyang	----------	--T/---/---/--A/---/---/--A/---/---/---/---/---/---
Daeseo	----------	---/---/---/--A/---/---/---/---/---/---/---/---/---
Namdo	----------	---/--C/---/---/---/---/---/---/---/---/--C/---/--G
Mongolia	----------	---/---/--A/---/---/---/--A/---/---/---/---/---/--G

산인 glycine(G)을 코딩하는 염기서열도 CGG와 CCA로 지방종간에 명확히 분류되며, 일곱 번째 아미노산인 serine(S)도 TCT와 TCA로 나누어지며, 11번째 아미노산인 glutamic acid(E)는 GAA와 GAC로 나누어진다. 마지막 아미노산인 valine(V)은 남도종과 몽고종만 GTG로 코딩하고 나머지 10개종은 GTT로 코딩하는 것으로 나타났다.

어떤 유전자에 포함되어있는 염기서열 중 특정한 영역에서 동일한 아미노산을 코딩하면서도 각각 다른 염기서열을 나타내는 경우가 있는데, 이 현상은 단염기염다형성(SNP)으로 간주되어 종이나 변종을 구분하는데 많이 사용되어져 왔다(Drabovich and Krylov, 2006; Morita *et al.*, 2007). 이 방법은 어떤 식물의 변이종을 동정하는데 거대한 genome 전체를 분석하지 않고 극히 제한된 부분의 염기서열만으로도 종의 구분이 가능하다는 점에서 앞으로도 많이 이용될 것이며, SNP를 종을 구분하는 marker로 이용하려는 많은 시도가 이루어지고 있다.

마늘은 영양체로 번식하는 식물체 이면서도 우리나라에는 상당히 다양한 유전적 변이종이 존재하는 것으로 알려져 있다(Hwang, 1993; Kollmann and Shmida, 1977). 최근 농산물 개방에 따른 외국산 마늘의 수입량이 급속하게 증가되고 있는 실정에서, 국내산 마늘과 외국산 마늘을 간단하면서도 신속하게 구분할 수 있는 marker의 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다. 국내산 마늘을 구분할 수 있는 유전적 marker를 개발하는 것은 수입산에 비하여 우수한 우리나라 마늘에 대한 우선권을 확보하는 차원에서도 중요한 의미를 가질 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 얻어진 P450 유전자의 SNP마커는 국내 지방종간 및 해외종을 구분할 수 있는 중요한 마커로써, 우리나라 마늘의 유전적 우선권을 확보하는데 이용될 수 있을 것이다.

적 요

의성종 마늘의 유묘로부터 상처(wound)에 특이적으로 발현되는 cytochrome P450 유전자군의 하나인 P450-Esg cDNA를 탐색하였다. P450-Esg는 1,419 bp의 open reading frame(ORF)을 가지고 473개의 아미노산을 가진 polypeptide를 코딩하는 것으로 나타났다. 국내와 몽골로부터 수집한 12개의 재배종으로 부터 P450-Esg 유사 유전자의 염기서열을 비교한 결과 시작코돈(ATG)에서 472~510 bp 및 1,210~1,240 bp 부위의 염기에서 재배종간에 차이를 보이는 염기서열을 다수 확인하였다. cDNA 1,210~1,240 bp의 부위는 P450 유전자에서 공통적으로 알려진 heme binding domain으로, 각 지역에서 수집된 재배종은 염기서열뿐만 아니라 아미노산 서열에 있어서도 특이적인 변이를 보였다. cDNA 472~510 bp 부위에서 코딩하는 13개 아미노산의 서열은 12개 재배종에서 모두 동일하였으나, 13개 아미노산 중 7개에서 재배종 마다 각각 다른 DNA 염기로 코딩하는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism)을 보이는 서열을 확인하였다. 이 결과는 다양하게 존재하는 국내외 마늘 재배종을 구분하는 marker로 사용될 것이며, 외국산 마늘에 대한 유전적 우선권을 확보하는 수단으로 사용될 것이다.

사 사

본 연구는 2008~2011년 한국연구재단의 일반연구비지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

인용문헌

Bae, S.K., E.A. Jung and S.T. Kwon. 2010. Genetic variation and identification of RAPD markers from some garlic cultivars in Korea and Mongolia. Korean J. Plant Res. 23:458-464 (in Korean).

Cheshmedhiev, I. 1973. A cytotaxonomic investigation of the cultivated A*llium* species in Bulgaria. Genetikai Selektsiya 6:283-294.

Donaldson, R.P. and D.G. Luster. 1991. Multiple forms of plant cytochrome P450. Plant Physiol. 96:669-674.

Drabovich, A. P and S. Krylov. 2006. Identification of base pairs in single-nucleotide polymorphisms by MutS protein-mediated capillary electrophoresis. Anal. Chem. 78:2035-2038.

Etoh, T. and H. Ogura. 1981. Peroxidase isozymes in the leaves of various clones of garlic, *Allium sativum* L. Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ. 17:71-77.

Harn, C., D. Choung and B. Kim. 1996. Studies on the karyotypes of *Allium sativum*. J. Korean Soc. Hort. Sci. 2:58-67.

Hoshino, T., T. Yamaura, H. Imaishi, M. Chida, Y. Yoshizawa, K. Higashi, H. Ohkawa and J. Mizutani. 1995. 5-*epi*-Aristolochene 3-hydroxylase from green pepper. Phytochemistry 38:609-613.

Hwang, J.M. 1993. Genetic divergence and classification of

garlic cultivars by multivariate analysis. J. Korean Soc. Hort. Sci. 33:257-264 (in Korean).

Kollmann, F. and A. Shmida. 1977. *Allium* species of Mt. Hermon. I. Taxonomy. Israel J. Botany 26:128-148.

Kwon S.T., J. Chappell. 1998. Elicitor-inducible 5-epi-aristolochene hydroxylase in suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Korean J. Plant Tiss. Cult. 25: 141-146.

Kwon, S. T., I. J. Lee and J. Chappell. 1998. Cloning of elicitor-inducible 5-*epi*-aristolochene hydroxylase in tobacco cell suspension cultures. Korean J. Life Sci. 8:604-613.

Kwon, S.T. J.S. Kim, D.C. Jung and J.H. Jeong. 2003. Cloning of cytochrome P450 gene involved in the pathway of capsidiol biosynthesis in red pepper cells. Korean J. Life Sci. 13:879-888.

Kwon, S.T. and S.M. Oh. 1999. Genetic relationship among garlic cultivars based on RAPD analysis. Korean J. Life Sci. 9:671-676 (in Korean).

Lee, W.S. 1974. Studies on dormancy of Korean local garlics. J. Korean Soc. Hort. Sci. 15:257-264 (in Korean).

Morita, A., T. Nakayama, N. Doba, S. Hinohara, T. Mizutani, M. Soma. 2007. Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan PCR. Molecular and Cellular Probes 21:171-176.

Nie, M. and W.H. Li. 1979. Methematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Soc. USA. 76:5269-5273.

Ralston, L., S.T. Kwon, M. Schoenbeck, J. Ralston, D.J. Schnek, R.M. Coates and J. Chappell. 2001. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). Arch. Biochem. Biophys. 393:222-235.

(접수일 2011.8.29; 수정일 2011.9.8; 채택일 2011.9.16)