

# 갓 (*Brassica juncea*) 품종구분을 위한 ITS 영역 및 MITE Family 정보를 이용한 분자표지 개발

양기웅<sup>1</sup> · 이고은<sup>1</sup> · 아리프 하산 칸 로빈<sup>1</sup> · 정남희<sup>1</sup> · 이용혁<sup>2</sup> · 박종인<sup>1</sup> · 김희택<sup>1</sup> · 정미영<sup>3</sup> · 노일섭<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 생명산업과학대학 원예학과, <sup>2</sup>여수시 농업기술센터, <sup>3</sup>순천대학교 사범대학 농업교육과

## Development of molecular markers for varietal identification of *Brassica juncea* on the basis of the polymorphic sequence of ITS regions and MITE families

Kiwoung Yang<sup>1</sup>, Go-eun Yi<sup>1</sup>, Arif Hasan Khan Robin<sup>1</sup>, Namhee Jeong<sup>1</sup>, Yong-Hyuk Lee<sup>2</sup>, Jongin Park<sup>1</sup>, Hoyteak Kim<sup>1</sup>, Mi-Young Chung<sup>3</sup>, and Il-Sup Nou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

<sup>2</sup>Agricultural Technology Center of Yeosu City, Korea

<sup>3</sup>Department of Agricultural Education, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

\*Corresponding author: nis@sunchon.ac.kr

### Abstract

*Brassica juncea* ( $2n = 4x = 36$ , AABB genome, 1,068 Mb) is a U's triangle species and an amphidiploid derivative of *B. rapa* and *B. nigra*. Fifteen varieties were used to study the ITS (internal transcribed spacer) regions of ribosomal DNA and MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) with a view of developing specific molecular markers. ITSs and MITEs are an excellent resource for developing DNA markers for genomics and evolutionary studies because most of them are stably inherited and present in high copy numbers. The ITS (ITS1 and ITS2) sequence was compared with the consensus sequence of *B. rapa* and *B. nigra*. Variation in ITS1 created two separate groups among 15 varieties, with 10 varieties in one group and 5 in the other. Phylogenetic analysis revealed two major clusters for those 10 and 5 varieties. Among the 160 different MITE primers used to evaluate the selected 15 varieties of *B. juncea*, 70 were related to the *Stowaway*, 79 to the *Tourist*, 6 to the *hAT*, and 5 to the *Mutator* super-families of MITEs. Of 160 markers examined, 32 were found to be polymorphic when fifteen different varieties of *B. juncea* were evaluated. The variety 'Blackgat' was different from the other mustard varieties with respect to both phenotype and genotype. The diversity of 47 additional accessions could be verified using eight selected molecular markers derived from MITE family sequences. The polymorphic markers identified in this study can be used for varietal classification, variety protection, and other breeding purposes.

**Additional key words:** *B. juncea*, molecular marker, ITS of rDNA, InDel marker, phylogenetic tree

Korean J. Hortic. Sci. Technol. 34(2):305-313, 2016  
<http://dx.doi.org/10.12972/kjhst.20160031>

pISSN : 1226-8763  
eISSN : 2465-8588

**Received:** November 24, 2015

**Revised:** December 28, 2015

**Accepted:** March 23, 2016

Copyright©2016 Korean Society for Horticultural Science.

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호: 213003-04-4-SB110)에 의해 이루어진 것임.

## 서 언

배추과(*Brassicaceae*) 식물은 338 속(*genera*), 약 3,709 종(*species*)으로 이루어져 있으며, 세계적으로 경제적 가치가 매우 높은 작물에 속한다(Al-Shehbaz et al., 2006; Bailey et al., 2006). 그 중 갯(*Brassica juncea*)은 배추(*Brassica rapa*;  $2n = 2x = 20$ , AA genome, 529Mb)와 흑겨자(*Brassica nigra*;  $2n = 2x = 16$ , BB genome, 632Mb)의 복이배체(amphidiploid)로  $2n = 4x = 36$ , 전체 유전체는 약 1,068Mb를 가지고 있는 식물이다(Johnston et al., 2005). 갯은 유전체 및 유전자에 대한 연구가 세계적으로 미비하기에 많은 연구를 필요로 한다. 갯의 유연관계 및 유전적 다양성에 대한 분석은 거의 이루어지지 않았으며, ribosomal DNA의 ITS(Internal Transcribed Spacer) 영역, RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 및 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphisms)를 이용한 소수의 연구만이 진행되었다(Fu et al., 2006; Qi et al., 2007; Song et al., 1990; Song et al., 1988). 갯의 유연관계 및 유전적 다양성에 대한 분석은 다양한 육종재료 확보 및 품종 판별에 활용될 수 있을 것이다.

분자표지는 목표형질과 가까이 연관되거나 목표형질을 결정하는 유전자의 DNA 염기서열 변이에 기초해서 개발되기 때문에 환경영향을 받지 않으므로 시간과 장소의 구애를 받지 않고 기존의 육종방법보다 빠르고, 정확한 정보를 얻을 수 있다(Kim et al., 2015; Kim et al., 2014). 분자표지는 유전적 다양성 연구, 종 및 품종 판별, 유전자 지도 작성 및 주요 형질 선별 등 넓은 분야에서 이용하고 있다. 최근에는 다양한 분자표지가 개발되고 있는데, SSR(Simple Sequence Repeat), SNP(Single Nucleotide Polymorphism), InDel(Insertion and Deletion) 등의 분자표지가 범용으로 활용되고 있다. 특히, InDel 표지는 아가로스 겔에서 쉽게 구분할 수 있으며 재현성이 매우 높아 많은 연구자들이 선호하는 표지이다.

종 및 품종에서 유연관계를 알아보기 위해 주로 ITS 영역 염기서열의 다형성을 많이 이용한다. 최근에 약용식물의 유연관계를 확인하기 위해 7점의 후보 DNA 바코드에 대해 연구하였다(Chen et al., 2010). Chen et al.(2010)은 7점의 DNA 바코드 (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcl*, *rpoCl*, *ycf5*, ITS1 및 ITS2) 중에 ITS2 영역에서 753속, 4800종, 약 6600개체에서 확인하였고, 92.7%의 성공적인 동정률을 나타냈다. ITS2 영역은 약용식물들과 밀접하게 관련된 종들의 동정을 위한 표준 DNA 바코드로서 이용 할 수 있음을 입증하였다. Qi et al.(2007)은 중국 갯 16 품종에서 ITS 영역을 활용하여 분자 계통도를 분석하였다. ITS1과 ITS2 영역을 분리하여 확인한 결과 ITS1 영역에서는 흑겨자 서열과 유사한 4 품종, 배추 서열과 유사한 12 품종을 확인하였다. ITS2 영역에서는 흑겨자 서열과 유사한 3 품종, 배추 서열과 유사한 13 품종을 확인하였다. ITS 영역으로 확인한 결과 갯은 흑겨자보다 배추에 더 근접한 품종이 많이 나타났다. 이러한 결론은 엽록체 DNA, 미토콘드리아 DNA, RFLP의 결과 갯이 흑겨자보다 배추 염기서열과 유사하다는 것과 일치한다(Palmer and Herbon, 1988; Song et al., 1990; Warwick and Black, 1991; Yang et al., 2002).

MITE (miniature inverted-repeat transposable element)는 동물, 식물, 박테리아 등에 아주 빈번하게 존재하며, 크기는 800bp보다 작다(Casacuberta et al., 2003; Turcotte et al., 2001). 또한, 비 독립형 엘리먼트(non-autonomous elements)의 말단 역 반복(Terminal Inverted Repeats: TIR)으로 sequence 길이의 범위가 10-15bp의 차이를 나타내는 경우도 있다(Zhang et al., 2000). MITE는 유전자 부위(intron, exon, and UTR; untranslated regions, promoters)와 매우 근접하게 조합되어 있기 때문에 유전자의 구조, 발현, 기능을 변형할 수 있다. 배추에서 MITE는 triplicated 유전자의 구조적 변형 또는 발현량의 변화를 가져오기도 한다(Sampath et al., 2013; Yang et al., 2006). MITE는 안정적으로 유전되고, 많은 copy로 존재하기 때문에 유전체학과 진화 연구를 위한 DNA 분자표지로 매우 적합하다(Amundsen et al., 2011). 실제로 MITE는 벼 9.98%, Medicago 8.21%, 수박 5.53%, 배추 4.05%, 토마토 3.44%, 옥수수 1.96%, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 0.71% 이상으로 식물 유전체에 주요 부분을 차지하고 있다(Chen et al., 2014). Chen et al.(2014)은 *in silico* tools를 활용하여 배추에서 174 MITE families를 공개하였다. 총 45,821 MITEs를 확인하였고, 이는 배추 유전체의 11Mb (4.08%)를 차지한다. 또한, Sampath et al.(2014)은 배추, 양배추 그리고 애기장대의 MITE를 비교 분석하여 20 families로 구분하였다. 20 families는 4 *BraSto* (*Stowaway* families as *Brassica Stowaway*), 13 *BraTo* (*Tourist* families as *Brassica Tourist*), 2 *BraHAT* (*hAT* families as *Brassica hAT*), 1 *BraMu* (*Mutator* family as *Brassica Mutator*)로 구분하였다. 총 290점의 분자표지로 163점의 배추관련, 127점의 양배추관련 분자표

지를 개발하였다.

본 연구에서는 갯 15 품종의 ribosomal DNA ITS 영역 염기서열을 확인하여 유연관계를 확인하였으며, 기존에 발표된 MITE 분자표지로 갯의 품종판별 활용가능성을 알아보았다(Sampath et al., 2014; White et al., 1990). MITE 분자표지는 쉽고 유용하게 판별 할 수 있는 InDel 표지 위주로 선발하였으며, 선발한 MITE를 활용하여 다양한 유전자원에서 구분할 수 있는지 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 DNA 추출

갯 재료는 시중에서 판매하는 품종과 국내 갯 생산지역 및 일본에서 수집하였다. 갯 15 품종은 얼청갯(Eolcheonggat), 남도갯(Namdoogat), 청갯(Cunggat), 남양갯(Namyanggat), 동강갯(Dongganggat), 동원적갯(Dongwonredgat), 청송갯(Cheongsonggat), 봉래갯(Bongraegat), 흑갯(Heukgat; Accession number, IT200214), J23, 농우적갯(Nongwooredgat), 팔강갯(Palganggat), J15, J16, J17로 관련 분자표지를 확인하였다(Fig. 1). J23, J15, J16, J17은 일본에서 수집한 품종이다. 또한, 여수시 농업기술센터에서 갯 유전자원 47점을 분양 받아 분자표지의 다형성을 확인하였다. 재배는 순천대학교 생명산업과학대학원예학과비닐하우스에서 재배하였고, DNA 추출은 발아 후 4주 된 유엽을 사용하였다. 각 식물 시료는 TissueLyser(QIAGEN, Netherlands)를 이용하여 분쇄하였으며, DNA는 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, Cat. No. 69104)을 사용하여 추출하였다.

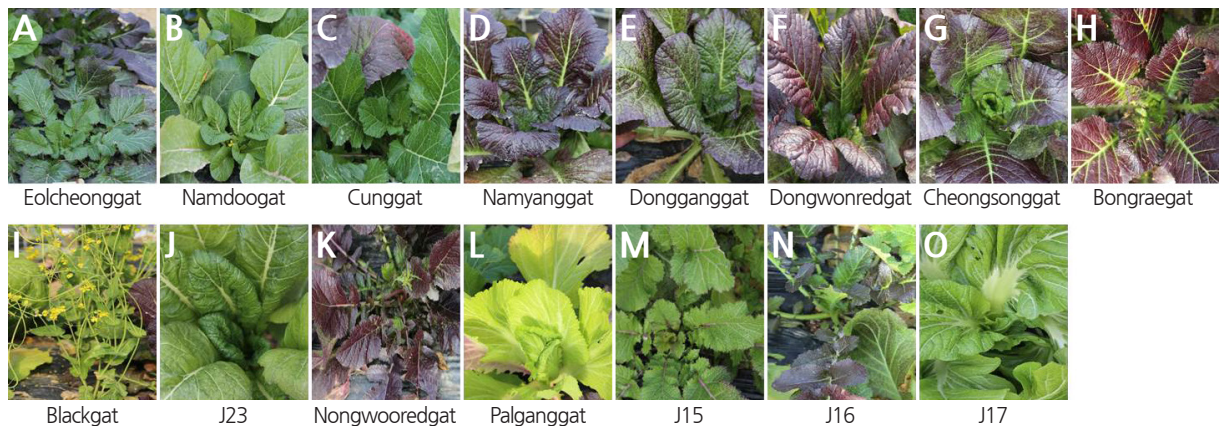


Fig. 1. The phenotypic appearance of the 15 selected *B. juncea* varieties and/or accessions. (A) Eolcheonggat, (B) Namdoogat, (C) Cunggat, (D) Namyanggat, (E) Dongganggat, (F) Dongwonredgat, (G) Cheongsonggat, (H) Bongraegat, (I) Blackgat, (J) J23, (K) Nongwooredgat, (L) Palganggat, (M) J15, (N) J16, (O) J17. J-accessions were collected from Japan. Alphabet A-I, K and L are varieties and J and M-O are accessions.

### ITS 및 MITE 분자표지 선발

갯의 유연관계를 알아보기 위해 이전에 보고된 ribosomal DNA의 ITS 관련 분자표지를 이용하였다. PCR 증폭으로 확인하기 위해 이용한 분자표지는 BJ ITS-F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'와 BJ ITS-R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'이다(Qi et al., 2007; White et al., 1990). 갯의 품종구분을 위한 MITE 분자표지는 Sampath et al.(2014)에 의해 보고된 290점의 분자표지 중 배추와 양배추 각각 다형성을 많이 보이는 80점을 선발하여 총 160점의 분자표지를 이용하였다(Supplementary Table 1).

## PCR 및 전기영동

PCR 반응 방법으로 DNA는 100ng을 사용하였고, primer는 10pmol로 희석하여 사용하였다. Taq 중합효소 및 PCR buffer는 (주)제넷바이오 premix (Cat. No. G2002)를 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR 증폭 조건으로는 94°C에 3분 반응 후, 94°C에서 30초, 55–62°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 반응하여 34번 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR 산물의 확인을 위해 1.2% 아가로스 겔에 blue mango 0.5µg · mL<sup>-1</sup>을 첨가하여 UV상에서 확인하였다.

## Cloning and sequencing

Cloning을 위한 PCR분석 시약은 Takara Ex Taq™ (Takara, Japan)을 사용하였다. 조성은 10 X buffer 2.5µL, dNTP mixture 0.5µL, Takara Ex Taq™ 0.2µL, forward primer(10pmol) 0.3µL, reverse primer(10pmol) 0.3µL, water 15.2µL, gDNA 1µL(100ng)를 넣어 총 20µL로 하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분 처리 후 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 45초 동안 반응하여 34번 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응하였다. 유전자의 증폭산물 정제는 The Wizard® Genomic DNA Purification Kit(Promega, Germany) 프로토콜에 따라 수행하였다. 정제 후, TOPcloner™ Blunt Kit(Enzymomics, Korea)를 사용하여 ligation 하였다. TOPO 벡터에 삽입된 것을 확인한 클론은 carbenicillin이 포함된 액체 LB배지에 14시간 정도 배양한 후, QIAprep® Spin Miniprep Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 염기서열 분석은 forward는 M13F, reverse는 M13-pUC를 사용하여 (주)마크로젠(Korea)에 의뢰하여 확인하였다.

## 유연관계 분석

갯 15 품종의 유연관계를 알아보기 위해 rDNA의 ITS1, ITS2, 5.8S 영역의 염기서열로 phylogenetic tree를 작성하였다. 분석은 ClustalW 및 MEGA 6 프로그램을 이용하여 neighbor-joining(NJ), bootstrap 1,000으로 확인하였다(Tamura et al., 2013). 갯은 배추(JN564039.1)와 흑겨자(AF128102.1)의 복이배체 작물로 ribosomal DNA의 ITS 서열이 두 가지 타입으로 나타나기 때문에 이를 이용하여 갯 15 품종의 전반적인 phylogenetic tree를 작성하여 유연관계를 확인하였다(Qi et al., 2007). 또한, 같은 방법으로 다양한 갯 유전자원을 MITE 분자표지로 확인하여 유연분석을 하였다.

## 결과 및 고찰

### Ribosomal DNA의 ITS 영역 염기서열 확인 및 유연관계 분석

식물의 ribosomal DNA에서 ITS 다형성을 이용하여 유연관계를 알아보는 연구는 빈번하게 수행되고 있다(Downie et al., 1996; Koch et al., 2003; Yang et al., 1996; Yuan et al., 1996). Ribosomal DNA의 ITS는 ITS1과 ITS2로 나누어진다. 기존에 알려져 있는 분자표지를 활용하여 15 품종에서 ITS 영역의 차이를 확인하였다(Qi et al., 2007; White et al., 1990). 분자표지는 BJ ITS-F/R로 PCR 확인 후 cloning과 sequencing을 수행하였다. 확인된 염기서열은 흑겨자의 ITS 서열(AF128102.1)과 배추의 ITS 서열(JN564039.1)를 비교하여 전반적인 유연관계를 알아보았다(Fig. 2A). 갯(AABB genome)은 복이배체이기 때문에 흑겨자(BB genome)와 배추(AA genome) 두 서열을 함께 확인하였다(Qi et al., 2007). 관련 서열의 주석(annotation)은 흑겨자의 NCBI Accession No. AF128102.1을 가지고 작성하였다. 전체 길이는 696bp와 710bp로 두 가지 타입으로 확인되었다(Fig. 2A). 696bp 관련 서열의 주석은 1–31bp(18S), 32–288bp(ITS1), 289–452bp(5.8S), 453–639bp(ITS2), 640–696bp(25S)로 서열이 구분되었다. 710bp 관련 서열의 주석은 1–31bp(18S), 32–302bp(ITS1), 303–466bp(5.8S), 467–653bp(ITS2), 654–710bp(25S)로 서열이 구분되었다. 그 결과 배추의 ITS 서열과 유사한 10 품종과 흑겨자의 ITS 서열과 유사한 5 품종을 구분하였다. 전체 서열 중 ITS1과 ITS2에서 염기서열 차이를 보였으며, 5.8S에서는 모두 같은 염기서열을 가지고 있는 것으로 나



타났다. 이는 흑겨자와 배추의 5.8S의 염기서열이 같기 때문이다. ITS 영역의 염기서열 차이는 ITS2 영역보다는 ITS1 영역에서 많은 차이를 볼 수 있었고, 흑겨자보다 배추 ITS 영역과 유사한 품종이 많았다(Fig. 2A).

Ribosomal DNA에서 ITS 영역의 염기서열 차이를 이용하여 갯 15 품종의 유연관계를 알아보았다. 팔강갯, 청송갯, 동강갯, 동원적갯, 남양갯과 일본 수집 품종인 J15, J16, J23이 배추 ITS와 유사한 그룹으로 나타났고, 얼청갯, 청갯, 봉래갯이 흑겨자와 같은 그룹으로 나타났다(Fig. 2B). 유연관계 분석으로 15 품종 중 배추의 ITS 서열과 유사한 10 품종 중 흑갯은 유연관계가 멀다는 것을 확인하였는데 이는 흑갯이 다른 갯에 비해 잎 면적이 적고, 생육과정에서 줄기부위의 발달이 우월하며, 꽃이 일찍 개화하는 등의 표현형이 매우 다르다는 것과 일치하게 나타났다(Fig. 1). 흑겨자의 ITS 서열에서 유사한 5 품종 중 남도갯과 농우적갯이 얼청갯, 청갯, 봉래갯과 그룹핑되지 않는 것으로 확인되어 다른 유연관계를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

현재 전 세계적으로 갯에 대한 연구가 미비하기 때문에 ITS 영역 관련 분자표지는 배추과 식물의 유전적 진화에 관한 연구, 갯의 유용 유전자 탐색 및 국내 갯 품종 판별에 많은 도움을 줄 것이다. 또한, 갯의 유연관계 및 유전적 다형성에 대한 분석으로 유전적 범위에 대한 정보와 계통 발생, 작물의 기원지 분석, 다양한 육종 재료 확보 측면에서 다각적으로 활용할 수 있을 것이다. 특히, Schoch et al.(2012)의 연구에 의하면 곶판이에서 ribosomal DNA ITS 영역으로 종간 또는 종내에서 변이를 이용한 DNA 바코드 표지를 개발하였다. 이는 신속한 유해 병원균 진단 및 곶판이의 신속한 동정이 가능하다. 이렇듯, 식물에서도 종간 또는 종내의 판별을 위한 식물 DNA 바코드 표지 개발을 기대할 수 있다.

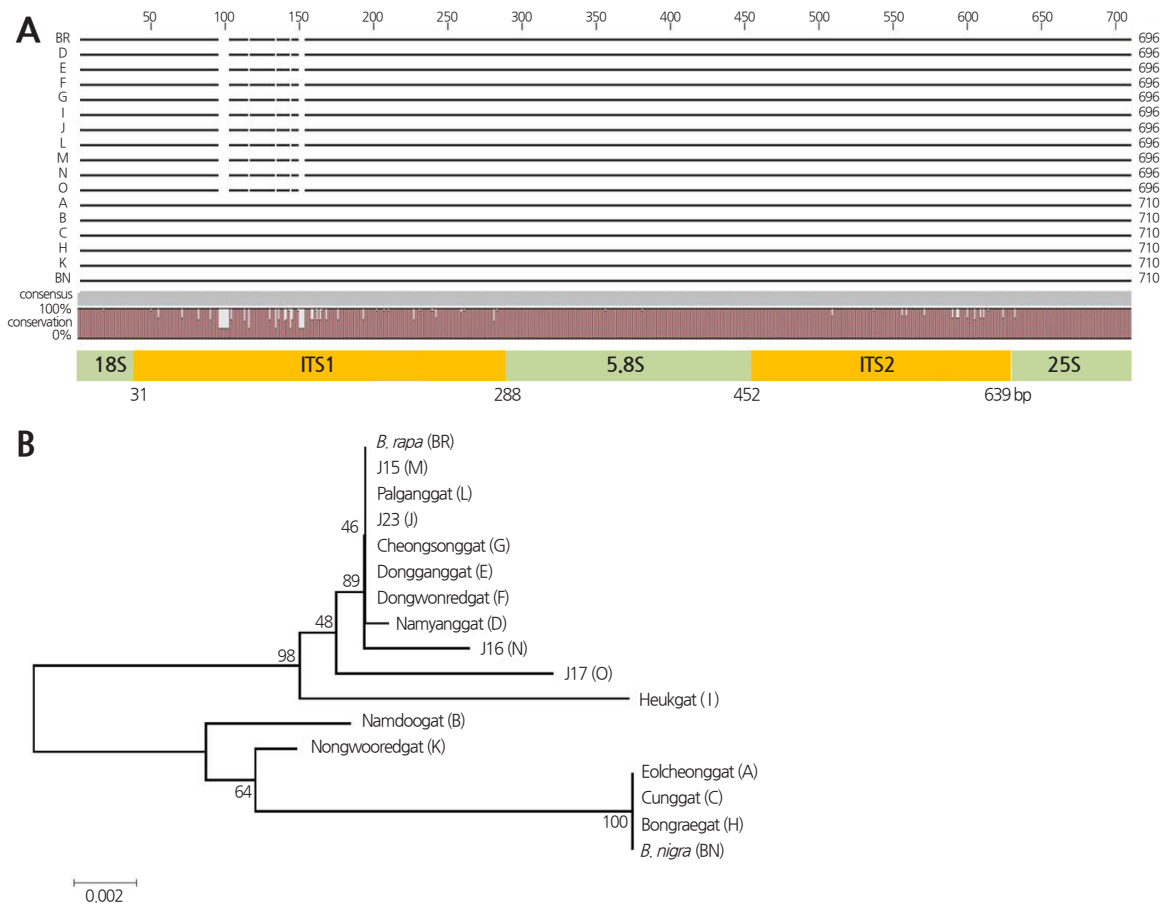


Fig. 2. Classification based on variation in the ITS regions of 15 selected varieties and accessions of *B. juncea* and reference sequences of *B. rapa* and *B. nigra*. (A) The ITS sequence was compared to the *B. rapa* (JN564039.1) and *B. nigra* (AF128102.1) consensus sequence (chronology of 15 varieties and accessions, A-O, are given in Fig. 1). (B) Phylogenetic tree based on ITS sequence of 15 varieties and accessions.

### MITE 분자표지를 활용한 갯 품종 다형성 확인

갯의 유연관계와 더불어 갯의 품종구분을 위해 MITE 분자표지를 선발하였다. 분자표지는 Sampath et al.(2014)에서 다형성이 높은 배추와 양배추 관련 각각 80점의 분자표지를 확인하였다(Supplementary Table 1). 구체적으로 *BraSto* 분자표지는 총 70점으로 배추에서 27점, 양배추에서 43점, *BraTo* 분자표지는 총 79점으로 배추에서 49점, 양배추에서 30점, *BraHAT* 분자표지는 총 6점으로 배추에서 3점, 양배추에서 3점, *BraMu* 분자표지는 총 5점으로 배추에서 1점, 양배추에서 4점을 확인하였다. 총 160점의 MITE 분자표지 중 확실히 다형성을 보이는 분자표지만 선발하였다(Fig. 3).

160점의 MITE 분자표지에서 32점이 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 3). 배추 관련 24점과 양배추 관련 8점이 품종구분에 활용될 수 있을 것이다(Table 1). 배추 MITE 관련 다형성을 보이는 분자표지는 80점 중 24점으로 34%로 나타났으며, 양배추 MITE 관련 다형성을 보이는 분자표지는 80점 중 8점으로 10%로 나타났다. 갯은 흑겨자와 배추의 복이배체 작물이기 때문에 양배추의 MITE 보다는 배추의 MITE에서 많은 표지를 선발할 수 있었다. 아가로스 겔에서 다형성을 보이는 MITE 표지는 전반적으로 흑갯(Fig. 11)이 많은 차이를 보였으며, 이는 ITS 영역의 서열을 이용한 유연관계와 유사한 결과를 도출할 수 있었다. 선발한 32점의 MITE 다형성 분자표지는 갯 품종 구분 및 신품종을 확인할 수 있는 분자수준의 과학적 방법에 유용하게 사용될 것이다.

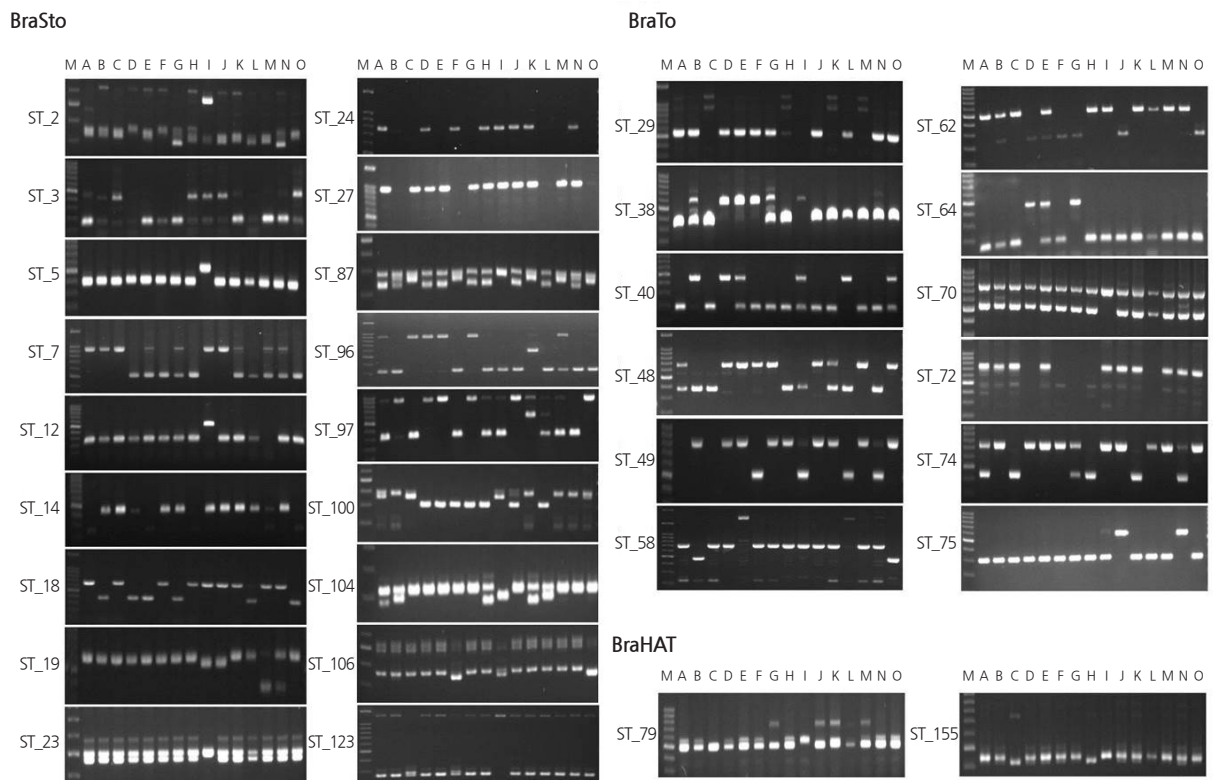


Fig. 3. Polymorphism observed in the MITE region of 15 *B. juncea* varieties and accessions using MITE markers. Among 160 markers, 32 produced polymorphic bands. Chronology of 15 varieties and accessions, A-O, are given in Fig. 1.

Table 1. Classification of MITE markers based on their families.

MITE families	Sub-families	Total number of markers	Marker origin	
			<i>B. rapa</i>	<i>B. oleracea</i>
BraSto	BraSto-2	58	22(8)	36(6)
	BraSto-3	2	1(1)	1(0)
	BraSto-4	10	4(2)	6(1)

MITE families	Sub-families	Total number of markers	Marker origin	
			<i>B. rapa</i>	<i>B. oleracea</i>
BraTo	BraTo-1	15	7(1)	8(0)
	BraTo-2	8	5(1)	3(0)
	BraTo-3	5	3(1)	2(0)
	BraTo-4	7	5(0)	2(0)
	BraTo-5	6	6(2)	
	BraTo-6	6	5(1)	1(0)
	BraTo-7	6	3(0)	3(0)
BraTo	BraTo-8	2		2(0)
	BraTo-9	10	9(3)	1(0)
	BraTo-10	5	3(1)	2(0)
	BraTo-11	1	1(1)	
	BraTo-12	3	1(1)	2(0)
	BraTo-13	5	1(0)	4(0)
BraHAT	BraHAT-1	4	2(0)	2(1)
	BraHAT-2	2	1(1)	1(0)
BraMu	BraMu-1	5	1(0)	4(0)
Total		160	80(24)	80(8)

Parentheses indicate number of clearly polymorphic markers.

### ITS 영역 서열과 MITE 분자표지의 활용

갯에서 ITS 영역을 활용한 품종 특이적 분자표지의 개발은 어려웠으며, 향후 전반적인 rDNA 영역에 대한 연구를 진행해야 할 것이다. 각 품종에서 ITS 영역의 SNP는 확인할 수 있었으나 배추 관련 10 품종 및 흑겨자 관련 5 품종에서 쉽게 구분할 수 있는 InDel 표지는 확인할 수 없었다. 복이배체 작물인 갯의 ITS 연구는 분자적 측면에서의 진화와 품종 구분으로 활용할 수는 있지만 품종 판별용으로는 쉽게 활용할 수 없을 것이다. 복이배체 작물의 rDNA 염기서열 차이에 대한 정보는 새로운 분석 시스템의 개발이 이루어질 것이라 예상된다.

MITE에 관한 연구는 현재 다양한 작물에서 이루어지고 있다(Han et al., 2010; Mo et al., 2012; Shirasawa et al., 2012). MITE 표지는 아가로스 겔에서 쉽게 구분이 가능하기 때문에 일반 연구자가 쉽게 정보를 얻을 수 있다. 특히, MITE는 유전자와 매우 근접하게 조합되어 있기 때문에 유전형질의 차이도 확인할 수 있다. 32점의 MITE 중 8점의 분자표지(ST\_18, ST\_40, ST\_48, ST\_49, ST\_62, ST\_74, ST\_97, ST\_100)로 여수시 농업기술센터에서 분양 받은 47점의 유전자원에서 다형성을 확인하였다(Fig. 4). 유연관계를 확인한 결과 JA1, JA2, JD9, JD11, JD12, JD15, JD17, JD19와 JD4, JD7, JD14, JD18는 매우 근접하게 그룹되었다. JB의 3점의 유전자원은 모두 유사한 근연관계에 있을 것이라 예상할 수 있었다(Fig. 4B). 선발한 32점의 MITE 다형성 분자표지는 갯의 품종구분, 품종보호 및 신품종 개발에 유용하게 활용할 수 있을 것이며, 유전체 및 유전자 연구에 많은 도움을 줄 것이라 기대한다.

### 초 록

갯(*Brassica juncea*; 2n = 4x = 36, AABB genome, 1,068Mb)은 U's triangle의 배추와 흑겨자 사이의 복이배체 작물로 구분한다. 본 연구는 갯 15 품종의 ribosomal DNA ITS 영역과 MITE를 이용하여 갯의 유연관계 및 품종구분 분자표지를 확인하였다. Ribosomal DNA ITS 영역은 종 및 품종의 유연관계를 알아보는 연구로 많이 사용되고 있어서, 이를 이용하여 갯 15 품종의 유연관계를 알아보았다. 또한, MITE는 매우 많은 copy 수를 가지고 있고, 유전적으로 안정적이기 때문에 유전체 및 진화

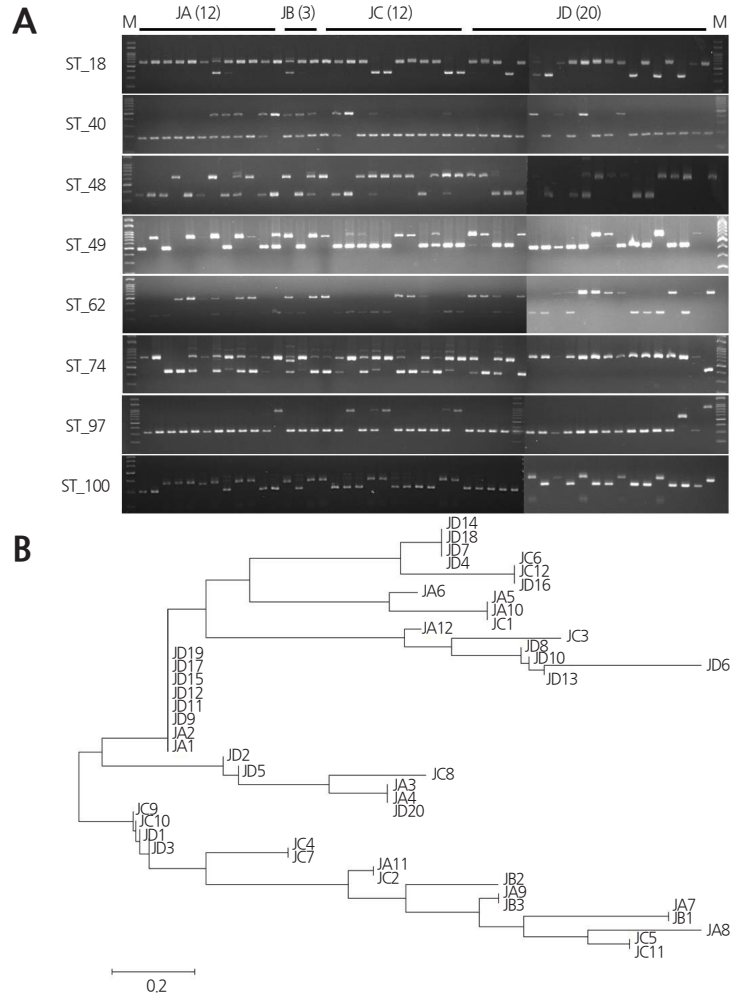


Fig. 4. Polymorphism investigation and phylogenetic analysis based on MITE markers. (A) The 8 selected MITE markers show polymorphism in 47 accessions. (B) Phylogenetic tree based on 8 MITE markers.

연구에 매우 적합한 재료이다. MITE를 이용한 갯의 품종구분 분자표지를 확인하기 위해 MITE super-families 중 *Stowaway*(*BraSto*) 관련 70점, *Tourist*(*BraTo*) 관련 79점, *hAT*(*BrahAT*) 관련 6점, *Mutator*(*BraMu*) 관련 5점으로 품종구분 표지를 알아보았다. 총 160점의 분자표지 중 32점이 갯 15 품종에서 뚜렷한 다형성을 보였다. 특히, 흑갯은 표현형뿐만 아니라 유전자형도 매우 다르게 나타났다. 또한 8점의 MITE 분자표지를 활용하여 47점의 유전자원에서 다형성 및 품종구분 표지로서의 활용 가능성을 확인하였다. 이러한 다형성 표지들은 갯의 품종구분 및 품종 보호에 매우 유용하게 사용할 수 있을 것이라 기대한다.

**추가주요어:** ITS 영역, 갯, 계통도, 분자표지, 삽입/제거 표지

### Literature Cited

- Al-Shehbaz I, Beilstein M, Kellogg E (2006) Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (Cruciferae): an overview. *Plant Syst Evol* 259:89-120. doi:10.1007/s00606-006-0415-z
- Amundsen K, Rotter D, Li HM, Messing J, Jung G, Belanger F, Warnke S (2011) Miniature inverted-repeat transposable element identification and genetic marker development in. *Crop Science* 51:854-861. doi:10.2135/cropsci2010.04.0215



- Casa AM, Nagel A, Wessler SR (2004) MITE display. *Methods Mol Biol* 260:175-188. doi:10.1385/1-59259-755-6:175
- Casacuberta JM, Santiago N (2003) Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene* 311:1-11. doi:10.1016/S0378-1119(03)00557-2
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, et al (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5:e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613
- Chen J, Hu Q, Zhang Y, Lu C, Kuang H (2014) P-MITE: a database for plant miniature inverted-repeat transposable elements. *Nucleic Acids Res* 42: D1176-D1181. doi:10.1093/nar/gkt1000
- Downie SR, Katz-Downie DS (1996) A molecular phylogeny of *Apiaceae* subfamily *Apiaceae*: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Am J Bot* 83:234-251. doi:10.2307/2445943
- Fu J, Zhang MF, Qi XH (2006) Genetic diversity of traditional Chinese mustard crops as revealed by phenotypic differences and RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* 53:1513-1519. doi:10.1007/s10722-005-7763-3
- Han Y, Wessler SR (2010) MITE-Hunter: a program for discovering miniature inverted-repeat transposable elements from genomic sequences. *Nucleic Acids Res* 38:e199. doi:10.1093/nar/gkq862
- Johnston JS, Pepper AE, Hall AE, Chen ZJ, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price HJ (2005) Evolution of genome size in Brassicaceae. *Ann Bot* 95:229-235. doi.org/10.1093/aob/mci016
- Kim H, Yeo SS, Han DY, Park YH (2015) Interspecific transferability of watermelon EST-SSRs assessed by genetic relationship analysis of cucurbitaceous crops. *Korean J Hort Sci Technol* 33:93-105. doi:10.7235/hort.2015.14120
- Kim HI, Hong CP, Im S, Choi SR, Lim YP (2014) Development of molecular markers and application for breeding in Chinese cabbage. *Korean J Hort Sci Technol* 32:745-752. doi:10.7235/hort.2014.12203
- Koch MA, Dobe C, Olds TM (2003) Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in Northern American *Arabis divaricarpa* (*Brassicaceae*). *Mol Biol Evol* 20:338-350. doi:10.1093/molbev/msg046
- Mo YJ, Kim KY, Shin WC, Lee GM, Ko JC, Nam JK, Kim BK, Ko JK, Yu Y, Yang TJ (2012) Characterization of imcrop, a mutator-like MITE family in the rice genome. *Genes & Genomics* 34:189-198. doi:10.1007/s13258-011-0193-z
- Qi XH, Zhang MF, Yang JH (2007) Molecular phylogeny of Chinese vegetable mustard (*Brassica juncea*) based on the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:709-716. doi:10.1007/s10722-006-9179-0
- Sampath P, Murukarthick J, Izzah NK, Lee J, Choi HI, Shirasawa K, Choi BS, Liu S, Nou IS, Yang TJ (2014) Genome-wide comparative analysis of 20 miniature inverted-repeat transposable element families in *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *PLoS One* 9:e94499. doi:10.1371/journal.pone.0094499
- Smapath P, Lee SC, Lee J, Izzah NK, Choi BS, Jin M, Park BS, Yang TJ (2013) Characterization of a new high copy Stowaway family MITE, BRAMI-1 in *Brassica* genome. *BMC plant biol* 13:56. doi:10.1186/1471-2229-13-56
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6241-6246. doi.org/10.1073/pnas.1117018109
- Shirasawa K, Hirakawa H, Tabata S, Hasegawa M, Kiyoshima H, Suzuki S, Sasamoto S, Watanabe A, Fujishiro T, Isoe S (2012) Characterization of active miniature inverted-repeat transposable elements in the peanut genome. *Theor Appl Genet* 124: 1429-1438. doi:10.1007/s00122-012-1798-6
- Song KM, Osborn TC, Williams PH (1988) *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 1. genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor Appl Genet* 75:784-794. doi:10.1007/bf00265606
- Song KM, Osborn TC, Williams PH (1990) *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 3. genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. campestris). *Theor Appl Genet* 76:497-506. doi:10.1007/bf00226159
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Turcotte K, Srinivasan S, Bureau T (2001) Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *Plant J* 25:169-179. doi:10.1111/j.1365-3113X.2001.00945.x
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds, PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif, pp 315-322. doi:10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- Yang TJ, Kim JS, Kwon SJ, Lim KB, Choi BS, Kim JA, Jin M, Park JY, Lim MH, Kim HI, et al (2006) Sequence-level analysis of the diploidization process in the triplicated FLOWERING LOCUS C region of *Brassica rapa*. *Plant Cell* 18:1339-1347. doi:10.1105/tpc.105.040535
- Yang YW, Lai PY, Tai PY, Ma DP, Li WH (1999) Molecular phylogenetic studies of *Brassica*, *Rorippa* *Arabidopsis*, and allied genera based on the internal transcribed spacer region of 18S-25S rDNA. *Mol Phylogenet Evol* 13:455-462. doi:10.1006/mpev.1999.0648
- Yuan YM, Kupfer P, Doyle JJ (1996) Infrageneric phylogeny of the genus gentiana inferred from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *Am J Bot* 83:641-652. doi:10.2307/2445924
- Zhang Q, Arbuckle J, Wessler SR (2000) Recent, extensive, and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family heartbreaker into genic regions of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1160-1165. doi:10.1073/