

단메밀과 쓴메밀의 ITS 염기서열 기반 식별마커*

오대주** · 현호봉*** · 임태준*** · 윤선아*** · 함영민*** ·
윤원종*** · 양우삼**** · 정용환****

Discriminability of Molecular Markers Based on Nuclear Ribosomal ITS Sequences of *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*

Oh, Dae-Ju · Hyun, Ho-Bong · Lim, Tae-Joon · Yoon, Seon-A · Ham, Young-Min ·
Yoon, Weon-Jong · Yang, Woo-Sam · Jung, Yong-Hwan

We analyzed the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequence of common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* and tartary buckwheat, *F. tataricum*. The diversity of the nucleotides and haplotypes, Tajima's *D*, and Fu's *F_s* was analyzed and compared among the varieties of common buckwheat and tartary buckwheat. The diversity of nucleotides and haplotypes indicated that the buckwheat populations had undergone rapid population expansion but *D* and *F_s* did not support their expansion statistically. The phylogenetic analysis of ITS sequences did not clearly establish the phylogenetic relationships between the varieties of common buckwheat. The In/Del sequence of ITS-1 region could, therefore, be used as a DNA marker to distinguish raw or manufactured products derived from common buckwheat and tartary buckwheat.

Key words : *common buckwheat*, *In/Del marker*, *Internal Transcribed Spacer (ITS)*, *tartary buckwheat*

* 본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(315027-4).

** Corresponding author, (재)제주테크노파크 생물종다양성연구소(daeju@jejutp.or.kr)

*** (재)제주테크노파크 생물종다양성연구소

**** 제주특별자치도 농업기술원

I. 서 론

마디풀과에 속하는 메밀은 전 세계적으로 재배되고 있는 작물로 우리나라에서는 산간지역에서 주로 재배되고 있으며 통계청에 따르면 제주도는 우리나라 메밀의 최대 생산지로 알려져 있다(농작물생산통계, 2015). 우리나라에서는 단메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)과 쓴메밀(*F. tataricum* (L.) Gaertn.) 두 종이 재배되고 있다. 단메밀 품종으로는 양절, 약선, 대산, 다원, 쓴메밀 품종으로는 대관3-3호, 대관3-6호 등이 있으나, 일반적으로 단메밀에서는 양절메밀과 쓴메밀에서는 대관3-3호가 가장 많이 재배되고 있으며, 양절메밀은 다양한 음식에 활용되고 쓴메밀은 메밀차로 주로 이용되고 있다.

메밀은 예로부터 원기회복에 좋다고 알려져 다양한 음식의 재료로 활용되어 왔으며 현대에는 과학적 연구를 통해 폴리페놀, 미네랄, 비타민 등이 풍부하고 다양한 생리활성 효능이 있음이 보고되어 왔다(Park et al., 2005; Jeong et al., 2011; Yoon et al., 2012). 특히 메밀에 많이 함유되어 있는 루틴은 항산화 효과가 뛰어나며, 항염, 간보호 효과 등 다양한 효능이 있음이 알려져 있다(Afanas' ev et al., 1989; Guardia et al., 2001; Park et al., 2005).

DNA 염기서열 분석 기술이 발달하면서 메밀을 비롯한 다양한 작물 유전학적 정보가 빠르게 축적되고 있다. 특히, 개체 간 또는 집단 간 계통학적 유연관계분석을 통한 분자계통학적 연구는 미생물에서부터 인간에 이르기까지 다양한 분류군에서 이루어져왔다. 이러한 분자계통학적 연구는 개체간 또는 생물집단이 가지고 있는 특정한 DNA 염기서열의 특징을 이용하는 것이며 수많은 연구자들의 다양한 생물집단에 대한 연구를 통해 몇몇 유전자 및 특정 염기서열 구역이 마커로서의 가치가 있음이 입증되어 현재에도 널리 활용되어 오고 있다(Powers et al., 1997; Chu et al., 2001; Viñas and Tudela, 2009).

Internal transcribed spacer (ITS)는 nuclear ribosomal RNA (nrRNA) small-subunit과 large subunit 사이에 위치하고 있고, ITS-1과 ITS-2로 구분되는데, 식물에서는 ITS-1이 18S rRNA와 5.8S rRNA 사이에 위치하며, ITS-2는 5.8S rRNA와 26S rRNA 사이에 위치한다(Lafontaine and Tollervey, 2001). ITS는 세균부터 진핵생물까지 공통적으로 가지고 있으며, 길이가 짧고 염기서열의 변이가 풍부하고 증폭을 통한 분석이 용이하여 생물분류에 있어 매우 유용한 마커로 인정받고 있다. 이러한 유용성으로 인해 매우 다양한 분류군에서 계통유연관계 분석에 이용되었고, 특정 분류군에서는 DNA 바코드 영역으로 지정되기도 하였다(Schoch et al., 2012).

Fagopyrum 속에서의 ITS 염기서열을 이용한 연구는 야생종들 간의 계통유연관계 분석(Yasui and Ohnishi, 1998), 새로운 야생 메밀 종의 발견(Zhou et al., 2014), 식품 내 메밀 함유 여부 검출 방법 개발(Hirao et al., 2005), 그리고 특정 종에 대한 기원 연구(Tian et al., 2011) 등 다양하게 이루어졌으나, ITS 염기서열을 이용한 메밀의 집단유전학적 연구는 매우 부족한 실정이다. 특히 ITS 염기서열은 식물 분자계통학적 마커로 널리 사용되고 있는

만큼 이를 중심으로 한 단메밀과 쓴메밀의 집단유전학적 특성 분석과 재배품종에 대한 유전적 다양성 분석이 메밀에 대한 유전학적 이해를 높이는데 도움이 될 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 제주에서 재배되는 단메밀(3품종)과 쓴메밀(1품종)에 대한 ITS 염기서열 분석을 통해 각 품종간 염기서열 비교분석 및 분자계통학적 분석, 그리고 품종 또는 종을 구분할 수 있는 DNA 마커 개발의 가능성을 탐색하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에서는 제주특별자치도 농업기술원을 통해 제주에서 재배되고 있는 단메밀 3품종과 쓴메밀 1품종을 각각 10개체씩 확보하여 사용하였다. 단메밀 3품종은 가장 많이 재배되고 있는 양절, 대산 및 다원 품종을 선택하였고, 쓴메밀은 단일 품종으로 대관3-3호를 확보하여 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Plant samples used in this study and the accession numbers of the ITS sequences deposited in GenBank

Number	Species Name	Code Name	Locality	ITS
1	<i>F. tataricum</i>	DG-1	Jeju Island	KY945287
2	<i>F. tataricum</i>	DG-2	Jeju Island	KY945288
3	<i>F. tataricum</i>	DG-3	Jeju Island	KY945289
4	<i>F. tataricum</i>	DG-4	Jeju Island	KY945290
5	<i>F. tataricum</i>	DG-5	Jeju Island	KY945291
6	<i>F. tataricum</i>	DG-6	Jeju Island	KY945292
7	<i>F. tataricum</i>	DG-7	Jeju Island	KY945293
8	<i>F. tataricum</i>	DG-8	Jeju Island	KY945294
9	<i>F. tataricum</i>	DG-9	Jeju Island	KY945295
10	<i>F. tataricum</i>	DG-10	Jeju Island	KY945296
11	<i>F. esculentum</i>	DW-1	Jeju Island	KY945277
12	<i>F. esculentum</i>	DW-2	Jeju Island	KY945278
13	<i>F. esculentum</i>	DW-3	Jeju Island	KY945279
14	<i>F. esculentum</i>	DW-4	Jeju Island	KY945280
15	<i>F. esculentum</i>	DW-5	Jeju Island	KY945281

Number	Species Name	Code Name	Locality	ITS
16	<i>F. esculentum</i>	DW-6	Jeju Island	KY945282
17	<i>F. esculentum</i>	DW-7	Jeju Island	KY945283
18	<i>F. esculentum</i>	DW-8	Jeju Island	KY945284
19	<i>F. esculentum</i>	DW-9	Jeju Island	KY945285
20	<i>F. esculentum</i>	DW-10	Jeju Island	KY945286
21	<i>F. esculentum</i>	DS-1	Jeju Island	KY945297
22	<i>F. esculentum</i>	DS-2	Jeju Island	KY945298
23	<i>F. esculentum</i>	DS-3	Jeju Island	KY945299
24	<i>F. esculentum</i>	DS-4	Jeju Island	KY945300
25	<i>F. esculentum</i>	DS-5	Jeju Island	KY945301
26	<i>F. esculentum</i>	DS-6	Jeju Island	KY945302
27	<i>F. esculentum</i>	DS-7	Jeju Island	KY945303
28	<i>F. esculentum</i>	DS-8	Jeju Island	KY945304
29	<i>F. esculentum</i>	DS-9	Jeju Island	KY945305
30	<i>F. esculentum</i>	DS-10	Jeju Island	KY945306
31	<i>F. esculentum</i>	YJ-1	Jeju Island	KY945307
32	<i>F. esculentum</i>	YJ-2	Jeju Island	KY945308
33	<i>F. esculentum</i>	YJ-3	Jeju Island	KY945309
34	<i>F. esculentum</i>	YJ-4	Jeju Island	KY945310
35	<i>F. esculentum</i>	YJ-5	Jeju Island	KY945311
36	<i>F. esculentum</i>	YJ-6	Jeju Island	KY945312
37	<i>F. esculentum</i>	YJ-7	Jeju Island	KY945313
38	<i>F. esculentum</i>	YJ-8	Jeju Island	KY945314
39	<i>F. esculentum</i>	YJ-9	Jeju Island	KY945315
40	<i>F. esculentum</i>	YJ-10	Jeju Island	KY945316

2. DNA 추출 및 염기서열 확보

Total DNA는 종자시료 분말에 Exgene™ Plant SV (GeneAll, Korea)을 사용하여 제조사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 추출하였다. 추출된 total DNA는 유전자 증폭을 위해 Internal transcribed spacer (ITS) 염기서열 증폭에 사용되는 universal primer (White et al., 1990)를 사용하였고, ITS1 primer와 ITS4 primer를 각 10 pmol 사용하였고, AccuPower® PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여 총 반응액을 20 µl로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응시 발

생할 수 있는 염기서열 오류를 보정하기 위해 각 샘플마다 총 3회 반복하여 PCR을 수행하였고, 각각의 증폭산물은 2% agarose gel 전기영동을 통해 확인한 후 솔젠트(주) (Solgent Co., Ltd. Korea)에 의뢰하였고, BigDye[®] Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 통해 염기서열을 결정하였다.

3. 염기서열 분석

확보된 염기서열은 ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997)로 정렬한 후 DNAsp 6 (Rozas et al., 2017)을 사용하여 nucleotide diversity, haplotype, Tajima's *D*, Fu's *F_s* 분석을 수행하였다. 각 분석은 ITS 전체 서열에서 ITS-1과 ITS-2 구역을 구분지어 분석하였다. ITS-1과 ITS-2 구역의 구분은 GenBank에 보고된 메밀의 ITS 염기서열들을 참고하여 수행하였다.

4. 유연관계 분석 및 In/Del 마커

단메밀과 쓴메밀의 각 품종간 유연관계 분석에 있어 ITS 염기서열의 유용성을 확인하기 위해 MEGA7 프로그램(Kumar et al., 2016)을 이용하여 Neighbor-Joining (NJ) 및 Maximum Likelihood (ML) 방법을 통해 계통수를 작성하였다. 계통수 작성에 이용된 진화모델로는 Maximum Composite Likelihood (MCL) 모델과 Tamura 3-parameter (T92) + G 모델이 각각 선택되었다. 계통수 작성에 있어 outgroup으로는 *Persicaria hydropiper* (DQ346665)를 선정하였고(Ohsako et al., 2001), 계통수에 대한 지지도를 평가하기 위해 bootstrap을 이용하였고 1,000회 반복을 통해 평가하였다.

ITS 염기서열이 단메밀과 쓴메밀을 구별할 수 있는 SCAR 마커로서 활용이 가능한지 여부를 확인하기 위해 각 품종별 ITS 서열을 정렬하여 consensus sequence를 얻어낸 후 품종간 염기서열 정렬을 수행하였다. 그리고 In/Del sequence 구역을 포함하는 primer를 새로 디자인하였고, 그 primer 정보는 다음과 같다. Fago-ITS-F, 5'-GGATCATTGTCTCAAACCTGC-3'; Fago-ITS-R, 5'-CGAGAGCCGAGATATCCGT-3'. 새로 디자인된 primer는 AccuPower[®] PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여 총 반응액을 20 μ l로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다. In/Del 마커 PCR을 위한 샘플은 단메밀 3품종을 무작위로 선별하되 모든 품종이 최소 1개씩을 포함되도록 선별하였고, 쓴메밀은 단일 품종이기 때문에 별도의 선별과정 없이 확보된 DNA를 그대로 활용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. ITS 염기서열 분석

확인된 단메밀과 쓴메밀의 ITS 염기서열은 GenBank에 서열정보를 등록하였고, 부여받은 accession number는 Table 1에 기재하였다.

단메밀의 ITS 서열은 733 bp ~ 744 bp로 확인되었으며, 쓴메밀은 한 개체(682 bp)를 제외하고는 모두 687 bp로 동일하였다. 염기서열 정렬을 통해 단메밀과 쓴메밀간의 ITS 염기서열 길이의 차이가 나는 원인을 확인하였고, 정렬된 서열을 기준으로 쓴메밀에서 58 bp의 deletion이 확인되었다.

단메밀과 쓴메밀의 ITS 염기서열은 ITS-1과 ITS-2 구역을 구분지어 각 구역별로 nucleotide diversity, haplotype, Tajima's D , Fu's F_s 를 분석하였다(Table 2). 단메밀의 ITS-1 구역의 nucleotide diversity는 다윈이 0.018, 대산이 0.024, 양질이 0.019로 나타났으며, ITS-2 구역의 경우 다윈이 0.029, 대산이 0.023, 양질이 0.028로 확인되어 단메밀의 집단의 nucleotide diversity가 매우 낮음을 확인 할 수 있었다. 쓴메밀의 경우는 ITS-1 구역이 0.005, ITS-2 구역의 경우 0.007로 쓴메밀이 단메밀에 비해 현저히 낮은 다양성을 나타내며 쓴메밀 개체간 염기서열의 차이가 거의 없음을 보여주었다. 단메밀의 ITS-1과 ITS-2 구역의 variable site가 품종을 통틀어 각각 28개와 25개 site인 반면 쓴메밀의 경우 각각 3개와 4개의 variable site

Table 2. Population analysis of common buckwheat and tartary buckwheat

Name	Region	Race	N	π	S	Nh	h	D	F_s
Common Buckwheat	ITS-1	DW	10	0.018	14	7	0.911	0.130	-0.695
		DS	10	0.024	18	10	1	-0.174	-4.909
		YJ	10	0.024	17	10	1	0.354	-4.909
		total	30	0.021	26	21	0.959	-0.505	-9.712
	ITS-2	DW	10	0.029	17	8	0.956	-0.181	-1.346
		DS	10	0.023	16	8	0.933	-0.221	-2.037
		YJ	10	0.020	14	9	0.978	-0.446	-3.978
		total	30	0.024	22	19	0.938	-0.537	-7.875
Tatary Buckwheat	ITS-1	DG	10	0.005	3	4	0.644	-0.130	-0.831
	ITS-2	DG	10	0.007	4	3	0.644	0.204	1.293

N, Sample size; π , Nucleotide Diversity; S, variable sites; Nh, Number of haplotype; h , Haplotype diversity; D , Tajima's D ; F_s , Fu's F_s

만이 집단내 존재하는 것으로도 단메밀과 쓴메밀의 ITS 염기서열은 개체별로 잘 보존되어 있음이 확인되었다.

Haplotype 수는 단메밀의 경우 ITS-1에서 다원 7개, 대산 10개, 양절 10개로 나타났고, ITS-2에서는 다원 8개, 대산 8개, 양절 9개로 나타났다(Table 2). 반면 쓴메밀의 경우는 ITS-1에서 4개, ITS-2에서 3개로 확인되었다. Haplotype diversity는 단메밀에서는 ITS-1과 ITS-2 구역에서 0.911~1로 매우 높게 나타났고, 쓴메밀에서는 ITS-1과 ITS-2 모두 0.644로 상대적으로 낮은 수치를 보였다. 이처럼 Haplotype diversity가 높은 반면에 낮은 nucleotide diversity를 보이는 것은 그 집단이 낮은 유효집단 크기를 가지는 시기를 지나 빠르게 확장 되었음을 의미한다(Grant and Bowen, 1998). 그러나, Tajima's D와 Fu's Fs 분석의 결과 단메밀과 쓴메밀 모두 집단의 크기의 확장에 대한 통계적 유의성은 확인되지 않았다. 이러한 결과는 본 연구에서 분석된 메밀 샘플이 재배종이기 때문에 나타나는 것으로, Ohnishi (1998)에 따르면 메밀의 재배가 시작된 시기는 기원전 약 6000년경부터로 생물의 진화 역사를 놓고 볼 때 매우 최근에 발생한 일이기 때문에 아직은 집단의 변화가 통계적으로 유의성을 갖기에 시간적으로 부족하다고 사료된다.

2. 메밀 품종간 계통유연관계

단메밀 3품종과 쓴메밀 품종간의 유연관계분석에 ITS 서열의 유용성을 확인하기 위해 ML 및 NJ 방법을 이용하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1).

NJ tree와 ML tree에서 모두 단메밀과 쓴메밀은 명확한 별개의 집단으로 나뉘지만 단메밀 3품종은 서로 별개의 집단을 형성하지 못하였고, 개체들이 서로 섞여 하나의 집단으로 분지되었다. 이는 단메밀의 품종간 염기서열의 변이가 고정되어 있지 않고 개체 수준에서의 변이만이 존재하는 것임을 보여준다. 품종간 염기서열의 변이가 고정되어 있지 않은 이유는 품종별로 재배를 하더라도 인근의 다른 품종과 서로 수분이 이루어지기 때문이며, 품종간 유전자 교환을 방지하기 위해서는 하우스 등 시설을 통한 재배가 이루어져야 하나 메밀은 시설 재배를 할 경제적 타당성이 없기 때문에 앞으로도 메밀 재배지에서의 품종 유지는 어려울 것으로 보인다.

ITS 염기서열을 이용한 메밀의 계통학적 연구결과는 Yasui와 Ohnishi(1998), Zhou 등(2014), 그리고 Hu 등(2016)에 의해 보고되었다. Yasui와 Ohnishi(1998)는 *Fagopyrum* 속의 12종 20분 류군에 대해 연구하였고, 형태학적 연구, allozyme variability, 그리고 엽록체의 *rbcL-accD* 서열에 기초한 분류체계와 거의 일치함을 확인하였다. 또 다른 연구로 Zhou 등(2014)은 최근에 확인된 4종의 야생종(*F. crispifolium*, *F. pugense*, *F. qiangcai*, 그리고 *F. wenchuanense*)을 대상으로 계통유연관계, ITS 부위 및 *matK* 유전자 염기서열 다양성을 조사하여 서부 쓰촨성 지방에서 재배된 메밀과 야생 메밀의 진화 과정과 유전학적 관계에 대해 연구한바가 있

다. 최근 Hu 등(2016)은 쓰촨성 지역을 중심으로 10종 71개체의 메밀 표본을 이용하여 ITS와 *ndhF-rpl32* 염기서열을 분석하여 계통학적 유연관계를 조사한 바가 있다. 이와 같이 ITS 염기서열은 종간 유연관계분석에서 그 유용성이 확인되었으나 종내 유연관계, 특히 품종 수준에서의 유연관계를 분석하기에는 Fig. 1에서와 같이 적절치 않다는 것을 확인하였다. 따라서 아종 또는 품종 수준에서의 유연관계 분석은 AFLP 분석 또는 microsatellite 분석을 이용하는 것이 보다 더 적절할 것으로 사료된다(Tsuji and Ohnishi, 2001; Konishi et al., 2006; Li et al., 2007).

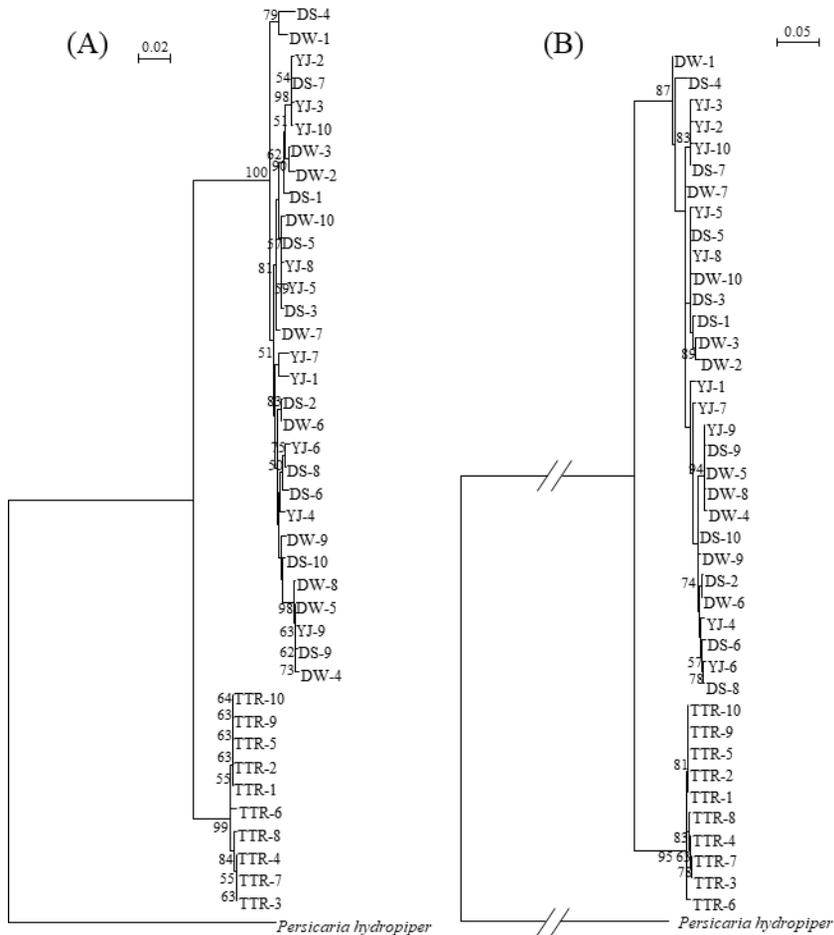


Fig. 1. Phylogenetic analysis among cultivars of *F. esculentum* and *F. tataricum* using ITS sequences. (A) the NJ tree and (B) The ML tree (lnL = -2493.40) was reconstructed using MCL model and T92+G model, respectively. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches (<50% is not shown). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

ITS 염기서열을 이용한 메밀의 계통학적 연구결과는 Yasui와 Ohnishi (1998), Zhou 등 (2014), 그리고 Hu 등(2016)에 의해 보고되었다. Yasui와 Ohnishi (1998)는 *Fagopyrum* 속의 12종 20분류군에 대해 연구하였고, 형태학적 연구, allozyme variability, 그리고 엽록체의 *rbcL-accD* 서열에 기초한 분류체계와 거의 일치함을 확인하였다. 또 다른 연구로 Zhou 등 (2014)은 최근에 확인된 4종의 야생종(*F. crispatifolium*, *F. pugense*, *F. qiangcai*, 그리고 *F. wenchuanense*)을 대상으로 계통유연관계, ITS 부위 및 *matK* 유전자 염기서열 다양성을 조사하여 서부 쓰촨성 지방에서 재배된 메밀과 야생 메밀의 진화 과정과 유전학적 관계에 대해 연구한바가 있다. 최근 Hu 등(2016)은 쓰촨성 지역을 중심으로 10종 71개체의 메밀 표본을 이용하여 ITS와 *ndhF-rpl32* 염기서열을 분석하여 계통학적 유연관계를 조사한 바가 있다. 이와 같이 ITS 염기서열은 종간 유연관계분석에서 그 유용성이 확인되었으나 종내 유연관계, 특히 품종 수준에서의 유연관계를 분석하기에는 Fig. 1에서와 같이 적절치 않다는 것을 확인하였다. 따라서 아종 또는 품종 수준에서의 유연관계 분석은 AFLP 분석 또는 microsatellite 분석을 이용하는 것이 보다 더 적절할 것으로 사료된다(Tsuji and Ohnishi, 2001; Konishi et al., 2006; Li et al., 2007).

3. Insertion-deletion (In/Del) 마커

유연관계분석에서 확인한 바와 같이 단메밀과 쓴메밀은 두 집단이 명확히 구분되며 두 종간의 염기서열 정렬 결과, 마커 개발 가능성이 높은 Insertion-deletion (In/Del) sequence가 확인되어 해당 구간을 포함하는 PCR primer를 디자인하였다(Fig. 2. A). 새로 디자인된 primer는 단메밀의 경우 309 bp, 쓴메밀의 경우 254 bp의 크기로 증폭이 됨으로써 전기영동으로 그 차이를 구분할 수 있도록 하였다.

새로 디자인된 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 예상대로 단메밀은 100 bp DNA ladder의 300 bp 밴드 위치에 밴드가 확인되었고, 쓴메밀은 200 bp와 300 bp 밴드의 중간에 증폭밴드가 위치함을 확인할 수 있었다(Fig. 2. B).

메밀을 대상으로 한 유전자 마커는 sh 유전자를 이용한 SCAR 마커와 microsatellite 마커, RFLP 마커, In/Del 마커 등이 개발되어 있다(Adachi, 1999; Funk et al., 2004; Konishi et al., 2006; Li et al., 2007; Cho et al., 2015). 이중 최근에 개발된 마커(Cho et al., 2015)는 쓴메밀의 엽록체 genome을 단메밀의 엽록체 genome과 비교하여 IGS 구역, *ycf1* 유전자 염기서열에서 7개의 In/Del 서열을 확인한 후 region specific primer를 디자인하여 개발한 것으로 본 연구에서 개발된 마커와 동일한 방식의 마커이다.

본 연구에서 개발된 In/Del 마커는 핵 DNA에 존재하며 식물의 분자계통학적 마커로 널리 활용되고 있는 ITS 서열을 활용한 것으로 엽록체 DNA를 통해 개발된 In/Del 마커와 함께 유용하게 활용이 될 수 있을 것으로 보인다.

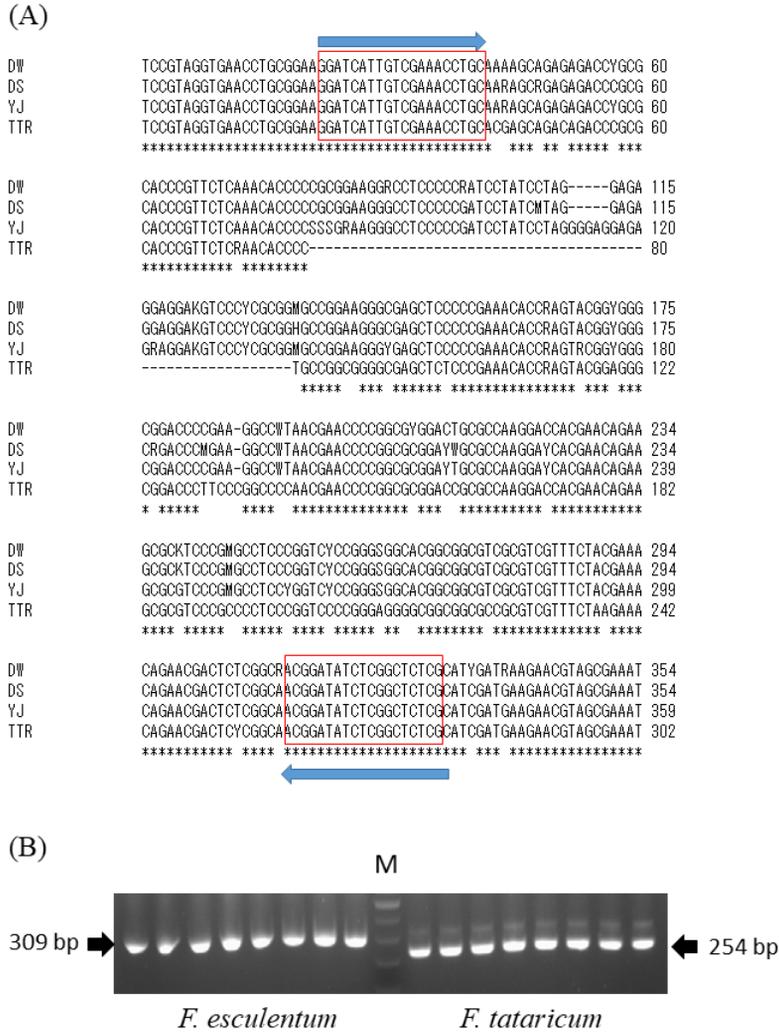


Fig. 2. Alignment of ITS sequences and profiles of PCR products from the ITS-1 region.

(A). ITS-1 sequence of each cultivar containing consensus regions shared among cultivars. (B). PCR products amplified with the primer pairs indicated in A. Forward and reverse primers are indicated as blue arrows.

In/Del 마커는 증폭산물의 크기로 쉽게 판단이 가능하다는 장점이 있고, 강력한 분류학적 진단도구이며 농작물에 대한 맵핑 및 유전학적 연구를 위한 마커로서 선호되고 있다(Liu et al. 2012; Yamaki et al. 2013; Moghaddam et al. 2014; Wu et al. 2014). 이러한 In/Del 마커는 단메밀과 쓴메밀의 종자 혼합물 또는 혼합 분말 등 두 종의 혼합 여부를 판별 할 수 있으며 (Yamaki et al., 2013), 따라서 실질적으로 단메밀과 쓴메밀에서 파생된 가공되지 않은 메밀 제품을 구분하는 유용한 바이오 마커로서 활용이 가능할 것이다.

[Submitted, October. 12, 2018 ; Revised, November. 13, 2018 ; Accepted, November. 15, 2018]

References

1. Adachi, T. 1999. Development of the SCAR markers linked to the Sh gene in buck-wheat. *Fagopyrum*. 16: 19-22.
2. Afanas' ev, I. B., A. I. Dcrozhko, A. V. Brodskii, V. A. Kostyuk, and A. I. Potapovitch. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769.
3. Cho, K. S., B. K. Yun, Y. H. Yoon, S. Y. Hong, M. Mekapogu, K. H. Kim, and T. J. Yang. 2015. Complete chloroplast genome sequence of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and comparative analysis with common buckwheat (*F. esculentum*). *PLoS One*. 10.5: e0125332.
4. Chu, K. H., C. P. Li and H. Y. Ho. 2001. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in Crustacea. *Marine Biotechnol.* 3: 355-361.
5. Funk, T., S. L. Hsam, F. J. Zeller, and V. Mohler. 2004. Development and Characterization of RFLP Markers from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Advances in Buckwheat Res.* 346-349.
6. Grant S. W. and B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insight from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89: 415-426.
7. Guardia, T., A. E. Rotelli, A. O. Juarez, and L. E. Pelzer. 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*, 56: 683-687.
8. Hirao, T., S. Imai, H. Sawada, N. Shiomi, S. Hachimura, and H. Kato. 2005. PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food. *Biosci. Biotech. Bioch.* 69: 724-731.
9. Hu, Y., Z. Zhang, B. Wu, J. Gao, and Y. Li. 2016. Genetic relationships of buckwheat species based on the sequence analysis of ITS and ndhF-rpl3. *Biodivers Sci.* 24: 52-59.
10. Jeong C. H., H. R. Jeong, S. G. Choi, K. H. Shim, and H. J. Heo. 2011. Neuronal cell protection and antioxidant activities of hot water extract from commercial buckwheat tea. *Korean J. Food Preserv.* 18: 358-365.

11. Konishi, T., H. Iwata, K. Yashiro, Y. Tsumura, R. Ohsawa, Y. Yasui, and O. Ohnishi. 2006. Development and characterization of microsatellite markers for common buckwheat. *Breed. Sci.* 56: 277-285.
12. Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
13. Lafontaine, D. L. J. and D. Tollervey. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2: 514-520.
14. Li, Y. Q., T. L. Shi, and Z. W. Zhang. 2007. Development of microsatellite markers from tartary buckwheat. *Biotechnol. Letters.* 29: 823-827.
15. Liu B., Y. Wang, W. Zhai, J. Deng, H. Wang, Y. Cui, F. Cheng, X. Wang, and J. Wu. 2012. Development of INDEL markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 126: 231-239.
16. Moghaddam S. M., Q. Song, S. Mamidi, J. Schmutz, R. Lee, P. Cregan, J. M. Osorno, and P. E. McClean. 2014. Developing market class specific InDel markers from next generation sequence data in *Phaseolus vulgaris* L. *Front. Plant Sci.* 5: 185.
17. Ohnishi, O. 1998. Search for the wild ancestor of buckwheat III. The wild ancestor of cultivated common buckwheat, and of tartary buckwheat. *Economic Botany.* 52: 123-133.
18. Ohsako, T., S. Fukuoka, H. P. Bimb, B. K. Baniya, Y. Yasui, and O. Ohnishi. 2001. Phylogenetic analysis of the genus *Fagopyrum* (Polygonaceae), including the Nepali species *F. megacarpum*, based on nucleotide sequence of the rbcL-accD region in chloroplast DNA. *Fagopyrum*, 18, 9-14.
19. Park B. J., S. M. Kwon, J. I. Park, K. J. Chang, and C. H. Park. 2005. Phenolic compounds in common and tartary buckwheat. *J. Crop Sci.* 50: 175-180.
20. Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M. Murray, P. C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B. A., and T. S. Harris 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J. Nematol.* 29: 441.
21. Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, and A. Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302.
22. Schoch C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, and W. Chen. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 6241-6246.
23. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by

- quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
24. Tian, X., J. Luo, A. Wang, K. Mao, and J. Liu. 2011. On the origin of the woody buckwheat *Fagopyrum tibeticum* (= *Parapteropyrum tibeticum*) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Mol. phylogenet. evol.* 61: 515-520.
 25. Tsuji, K., and O. Ohnishi. 2001. Phylogenetic relationships among wild and cultivated tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert.) populations revealed by AFLP analyses. *Genes Genet. Syst.* 76: 47-52.
 26. Viñas, J. and S. Tudela. 2009. A validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PLOS one*, 4: e7606.
 27. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. L. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* 18: 315-322.
 28. Wu, K., M. Yang, H. Liu, Y. Tao, J. Mei, and Y. Zhao. 2014. Genetic analysis and molecular characterization of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars using insertion-deletion (InDel) and simple sequence repeat (SSR) markers. *BMC Genet.* 15: 35.
 29. Yamaki, S., H. Ohyangi, M. Yamasaki, M. Eiguchi, T. Miyabayashi, T. Kubo, N. Kurata, and K. Nonomura. 2013. Development of INDEL markers to discriminate all genome types rapidly in the genus *Oryza*. *Breed. Sci.* 63: 246-254.
 30. Yasui, Y. and O. Ohnishi. 1998. Phylogenetic relationships among *Fagopyrum* species revealed by the nucleotide sequences of the ITS region of the nuclear rRNA gene. *Genes Genet. Syst.* 73: 201-210.
 31. Yoon B. R., B. J. Cho, H. K. Lee, D. J. Kim, S. K. Rhee, H. D. Hong, K. T. Kim, C. W. Cho, H. S. Choi, B. Y. Lee, and O. H. Lee. 2012. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from tartary and common buckweats. *Korean J. Food Preserv.* 19: 123-130.
 32. Zhou, M. L., C. L. Wang, D. Z. Wang, Y. D. Zheng, F. L. Li, X. M. Zhu, Y. X. Tang, J. R. Shao, Y. Tang, and Y. M. Wu. 2014. Phylogenetic relationship of four new species related to southwestern Sichuan *Fagopyrum* based on morphological and molecular characterization. *Biochem. Syst. Ecol.* 57: 403-409.