



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0121590
(43) 공개일자 2009년11월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0047565

(22) 출원일자 2008년05월22일

심사청구일자 2008년05월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

서용원

서울특별시 성북구 안암동5가 1 고려대학교 생명
과학대학

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 7 항

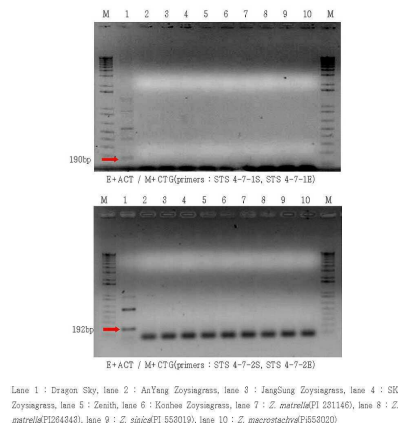
(54) 한국 잔디 신품종 용천(D r a g o n S k y) 특이 분자유전학적 마커

(57) 요약

본 발명은 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)과 그 분자 유전학적 마커에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 기존 한국 잔디에 사용되지 않았던 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 분석을 실시하여, 기존의 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 분석에 비해 훨씬 더 세밀한 genotyping 을 할 수 있다. 또한 본 발명에 따르면 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에 RAPD를 이용한 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker와 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)를 이용한 STS (Sequence Tagged Sites) marker 를 제작하고, 상기 제작한 마커를 이용하여 신품종 용천(Dragon Sky)에 대한 품종선별에 정확성을 기할 수 있다.

대표도 - 도9



특허청구의 범위

청구항 1

잔디 신품종 용천(Dragon Sky) DNA를 OPW-2 프라이머 특이적으로 증폭시켜 획득함을 특징으로 하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별을 위한 서열번호 1의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 RAPD(Random amplified Polymorphic DNA) 표지인자.

청구항 2

잔디 신품종 용천(Dragon Sky) DNA를 OPA-8 프라이머 특이적으로 증폭시켜 획득함을 특징으로 하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별을 위한 서열번호 2의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 RAPD(Random amplified Polymorphic DNA) 표지인자.

청구항 3

잔디 신품종 용천(Dragon Sky) DNA를 OPZ-4 프라이머 특이적으로 증폭시켜 획득함을 특징으로 하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별을 위한 서열번호 3의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 RAPD(Random amplified Polymorphic DNA) 표지인자.

청구항 4

서열번호 4의 프라이머 및 서열번호 5의 프라이머를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 프라이머 세트.

청구항 5

서열번호 6의 프라이머 및 서열번호 7의 프라이머를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 프라이머 세트.

청구항 6

서열번호 8의 프라이머 및 서열번호 9의 프라이머를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 STS(Sequence Tagged sites) 프라이머 세트.

청구항 7

서열번호 11의 프라이머 및 서열번호 12의 프라이머를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 STS(Sequence Tagged sites) 프라이머 세트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 분자 유전학적 마커에 관한 것이다.
- <2> 더욱 구체적으로 본 발명은 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 분자 유전학적 마커인 RAPD, RAPD 를 이용한 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker 및 AFLP 를 이용한 STS (Sequence Tagged Sites) marker 에 관한 것이다.

배경 기술

- <3> 잔디는 자가 불화합성(self-incompatibility)으로 쉽게 클론으로 증식이 가능하다. 따라서 품종으로서 타 증지류와 구별하기 위해서는 유전체 정보를 기초로 한 품종 특이 분자마커의 확보가 가장 요구된다.
- <4> 또한 생육 및 생태학적 특성조사는 식재되어있는 재배환경에 따라 변이가 있기 때문에 유전적으로 고정된 유전체정보를 기초로 한 분자마커의 개발이 필수적이다. 분자마커개발 방법에 있어서도 안정적으로 재현성이 있는 마커 시스템을 이용하여야한다. 따라서 잔디(Zoysia japonica)의 품종 구별을 위하여 생육 생태학적 특성조사

및 안정적 분자마커의 종합적 정보가 함께 제공되어야한다.

- <5> RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams JGK et al., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535)는 최초의 PCR-based marker 라고 할 수 있는데, genomic DNA 상에서 약 10-mer 로 구성된 primer 와 일치된 부분을 PCR 에 의해 증폭하고, 증폭된 DNA 분석하는 마커이다. 이는 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 와 달리 증폭된 DNA 량이 충분하여 radioisotope 혹은 chemically-labelled 된 probe 를 필요로 하지 않고, 분리된 gel 상에 ethidium bromide 를 처리하여 hybridization 과정 없이 DNA 변이를 분석할 수 있는 기술이다.
- <6> SCAR 분자마커는 RAPD나 AFLP (amplification fragment length polymorphism) 마커 밴드를 염기서열 분석하여 제작한 것으로 보다 정확하고 세밀한 primer로 사용이 가능하다. 따라서 SCAR 마커는 다른 PCR 마커에 비하여 연구소의 환경에 영향을 받지 않는 공용으로 이용 가능한 마커이다. 제한효소를 이용하여 염기서열의 다형성을 보는 방법을 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)라고 하며, 단일 마커로 많은 다형성을 보는 방법으로 각광받고 있다. 비록 대단히 높은 다형성을 보이는 것은 아니지만, 앞으로 SCAR 마커는 빠르게 발전할 양상이다. SCAR 분자마커는 RAPD 분자마커에 비하여 몇 가지 장점이 있다. 증폭환경에 비교적 둔감하고, 유전정보가 풍부한 공우성(co-dominant) 마커로 전환 가능하고, 제작과정에서 인트론 (intron)에 영향을 받지 않고, 다른 PCR 를 기초로 한 분자 마커보다 SCAR 분자 마커는 채집하기가 수월하다.
- <7> SCAR 분자 마커의 가장 이상적인 사용은 ASAP (allele-specific associated primers) 방식으로 밴드의 있고 없음을 확인하는 방식처럼 증폭정도의 조건을 잡지 않아도 되고, 결과적으로 가격과 속도를 줄일 수 있다. 결과적으로, SCAR 분자 마커가 이러한 조건을 충족 할 경우 현존하는 분자 마커들 중에서 현실적으로 가장 많은 시료를 시간과 노동력을 줄이면서도, 정확하고 쉽고 비용이 적은 방법으로 손꼽히고 있다.
- <8> AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Ridout CJ, Donini P, 1999, Use of AFLP in Cereals research, Trends in Plant Sci, 4(2):76-79)는 PCR-based 기술로서 genome 상의 고도로 선발된 부위(rare cutter 와 frequent cutter 이용)에 대한 DNA 변이를 나타내는 marker 이다. RFLP 및 RAPD marker 개발 이후, 유전학자의 많은 관심을 가져왔다. 실제로 각 작물의 유전자지도를 세밀화 시키는데 중요한 역할을 하고 있다.
- <9> STS marker 는 또 다른 익명의(anonymous) 마커이며, 60~1000 bp 길이를 갖는다. PCR 을 이용하여 탐지 가능하며, PCR 산물의 사이즈를 보고 알 수 있다. AFLP 로부터 얻은 PCR products 로부터 Sequence Tag Sites (STS) 마커로 전환할 수 있다.
- <10> 최근 분자 생물학의 발달로 인하여 상기 마커 시스템들을 이용하여 특정 식물체에 대하여 품종선별을 하는 방법들이 널리 이용되고 있다. 그러나 잔디류에 있어서 분자 유전학 적인 마커 시스템을 이용하는 것은 이제 시작단계에 있다 할 것이다.
- <11> 이에, 본 발명자들은 훨씬 세밀한 genotyping 을 가능하게 하는 상기 분자유전학적인 마커들을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 마커를 개발하고, 이를 토대로 SCAR 분자마커를 개발하였으며, 또한 기존 한국잔디에 사용되지 않았던 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 분석을 실시하고, STS marker 를 개발하는 경우, 신품종 용천(Dragon Sky)에 대하여 기존의 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석에 비해 훨씬 더 세밀한 genotyping 할 수 있고, 품종선별에 정확성을 기할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <12> 따라서 본 발명의 주된 목적은 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에 RAPD 를 이용한 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker 와 AFLP 를 이용한 STS (Sequence Tagged Sites) marker 를 제작하고, 이를 통해 신품종 용천(Dragon Sky)에 대한 분자유전학적 특성을 다른 잔디들과의 비교하는데 있다.
- <13> 본 발명의 다른 목적은 상기 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 분자 유전학적 마커를 이용한 신품종 용천(Dragon Sky)의 genotyping 및 품종선별 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <14> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) DNA 를 OPW-2 프라이머 특이적으로 증폭

시켜 획득함을 특징으로 하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별을 위한 서열번호 1의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) 표지인자를 제공한다. 본 발명의 상기 RAPD 표지인자는 프라이머 특이적으로 증폭된 DNA 로서 분리된 DNA 자체 또는 젤 상에서 다형성 밴드(Polymorphic Band)의 형태로 존재할 수 있다. 또한 상기 RAPD 표지인자는 본 발명의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 DNA 를 PCR 반응할 때 특이적으로 증폭되는 DNA 로서 타 잔디류와 비교하여 품종 선별을 하는데 유용하게 이용된다. 본 발명의 실시예 5 에서는 OPW-2 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행 시 본 발명의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에서만 특이적인 서열번호 1의 RAPD 표지인자(1244bp)를 관찰하였다(도 2).

<15> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) DNA 를 OPA-08 프라이머 특이적으로 증폭시켜 획득함을 특징으로 하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별을 위한 서열번호 2의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) 표지인자를 제공한다. 본 발명의 실시예 8-1에서는 OPA-08 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행 시, 본 발명의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에서만 특이적으로 서열번호 2의 RAPD 표지인자(2354 bp)를 관찰하였다(도 4).

<16> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) DNA 를 OPZ-04 프라이머 특이적으로 증폭시켜 획득함을 특징으로 하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별을 위한 서열번호 3의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 RAPD(Random amplified Polymorphic DNA) 표지인자를 제공한다. 본 발명의 실시예 8-2에서는 상기 OPZ-04 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행 시 본 발명의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에서만 특이적으로 서열번호 3의 RAPD 표지인자(752 bp)를 관찰하였다.

<17> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 4의 프라이머(5' -ACC CCG CCA AAT TGA CAC-3') 및 서열번호 5의 프라이머(5' -ACC CCG CCA ACG TCC AGT C-3')를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 프라이머 세트(표 11)를 제공한다. 본 발명의 실시예 8-2에서는 상기 SCAR 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행하는 경우 타 중지류에서는 관찰되지 않는 1244 bp 크기의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이적인 서열번호 1의 DNA 절편을 합성할 수 있었다(도 6). 상기 DNA 절편의 생성 유무에 따라 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)임을 확인할 수 있다.

<18> 따라서 상기 프라이머 세트를 이용하여 잔디 품종 선별을 하는 경우 다른 RAPD 표지인자에 비하여 연구소의 환경에 영향을 받지 않고 반복 재현 가능하며, 밴드의 있고 없음을 확인하는 방식처럼 증폭정도의 조건을 잡지 않아도 되고, 결과적으로 가격과 속도를 줄일 수 있다. 현실적으로 가장 많은 시료를 시간과 노동력을 줄이면서도, 정확하고, 쉽게 품종선별이 가능하며, 또한 적은 비용으로 신품종 용천(Dragon Sky)의 genotyping 및 품종선별을 할 수 있다.

<19> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 6의 프라이머(5' -AGG CTG TGC TCA CCG CTT G-3') 및 서열번호 7의 프라이머(5' -AGG CTG TGC TGC ATG CGG-3')를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) 프라이머 세트(표 11)를 제공한다. 본 발명의 실시예 8-2에서는 상기 SCAR 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행하는 경우 타 중지류에서는 관찰되지 않는 752 bp 크기의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이적인 서열번호 3의 DNA 절편을 합성할 수 있었다(도 7). 상기 DNA 절편의 생성 유무에 따라 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)임을 확인할 수 있다.

<20> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 8의 프라이머(5' -GAA TGA TAA CAT GCT CCG AC-3') 및 서열번호 9의 프라이머(5' -CAT CCT GTA GTC CCT TTT AG-3')를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 STS(Sequence Tagged sites) 프라이머 세트를 제공한다. 상기 STS 프라이머 세트를 이용하여 잔디 품종 선별을 하는 경우 다른 RAPD 표지인자에 비하여 연구소의 환경에 영향을 받지 않고 반복 재현 가능하며, 밴드의 있고 없음을 확인하는 방식처럼 증폭정도의 조건을 잡지 않아도 되고, 결과적으로 가격과 속도를 줄일 수 있다. 본 발명의 실시예 9-2에서는 상기 STS 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행하는 경우 타 중지류에서는 관찰되지 않는 190 bp 크기의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이적인 서열번호 10의 DNA 절편을 합성할 수 있었다(표 14, 도 9). 상기 DNA 절편의 생성 유무에 따라 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)임을 확인할 수 있다.

<21> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 11의 프라이머(5' -CAA GAA TGA TAA CAT GCT CCG-3') 및 서열번호 12의 프라이머(5' -CAT CAT GTA GTC CCT TTT AG-3')를 포함하는 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 판별용 STS (Sequence Tagged sites) 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 실시예 9-2에서는 상기 STS 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행하는 경우 타 중지류에서는 관찰되지 않는 192 bp 크기의 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이적인 서열번호 13의 DNA 절편을 합성할 수 있었다(표 14, 도 9). 상기 DNA 절편의 생성 유무에 따라 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)임을 확인할 수 있다.

<22> 이하, 본 발명의 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)의 선별과 용천 특이적인 분자 마커의 개발을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.

<23> 본 발명의 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)은 국내수집 중지계통 간 인공교배[충청북도 연기군 금남면 봉기리 하천변 수집종(모본) / 충청북도 영동군 심천면 초강리 하천변 수집종 (부분)]하여 선발된 클론을 증식하여 선택된 클론의 우수계통들을 방임수분하여 선발된 종자[농업생명공학연구원 (<http://www.niab.go.kr>)에 기탁, 수탁번호 : KACC 98001P]를 (주)삼덕 포장에서 파종하여 얻었다.

<24> 신품종 잔디 용천(Dragon Sky) 34클론에 대한 RAPD 분석결과 동일 포장 내에서 재배가 되고 있지만 다소 유전적으로 변이를 보였다. 이러한 경향은 국내 외 잔디 품종에서 똑같이 보인다. 따라서 본 발명에서는 용천품종 내 다수를 대표하고 그들 간에 유전적 근연관계가 가장 높은 집단을 선발하였고, 그 대표종은 용천 9-1, 11-2, 12-2 이다.

<25> 본 발명에 의한 한국잔디 신품종 용천(Dragon Sky)은 표 1의 생태학적 특성을 갖는다.

<26> [표 1]. 신품종 용천(Dragon Sky)와 다른 잔디류 간의 형태적 특징 비교

조사항목 품종	초장(cm)	엽길이(cm)	엽폭(cm)	포복경의 수 (개/6000cm ²)	포복경의 절간수(개)	포복경의 길이(cm)	이삭 출현시기
용천중지1	30.39	21.98	0.42	84	8.03	11.02	5월 중순~ 6월초순까지
용천중지2	25.51	25.51	0.52	85	8.57	16.92	
용천중지3	34.02	27.42	0.47	82	7.67	16.76	
들잔디1	32.79	26.62	0.50	32	5.37	11.12	5월초~ 6월초순까지
들잔디2	36.20	27.61	0.53	42	5.03	9.31	
들잔디3	34.28	27.55	0.51	54	6.03	15.31	
안양중지1	29.22	19.20	0.45	54	8.53	23.97	5월 중순~ 6월초순까지
안양중지2	31.14	21.34	0.44	61	7.17	19.06	
안양중지3	30.14	22.21	0.45	74	7.47	23.62	
SK중지1	26.99	21.72	0.47	4	4.75	7.33	5월초~ 5월중순까지
SK중지2	26.19	19.55	0.46	5	3.40	5.64	
SK중지3	25.33	29.31	0.47	6	4.33	9.33	
장성중지1	34.59	20.06	0.42	114	7.57	37.81	5월초~ 5월말까지
장성중지2	28.59	21.60	0.42	108	7.00	33.54	
장성중지3	30.19	29.31	0.43	136	6.43	52.06	
제니스1	36.81	21.73	0.37	43	6.50	20.11	5월초~ 6월초순까지
제니스2	35.80	25.70	0.44	85	5.90	15.35	
제니스3	27.46	21.76	0.48	58	5.27	15.70	

<27>

조사항목 품종	이삭/꽃대의 수 (개/6000cm ²)	꽃대(이삭포함) 길이(cm)	이삭길이 (cm)	이삭당 종자수(개)	종자길이 (mm)	종자너비 (mm)	종자무게 (mg/20개)
용천중지1	17	9.72	2.73	24.12	2.78	1.02	10.1
용천중지2	8	6.95	2.53	29.25			
용천중지3	21	7.79	2.70	25.48			
들잔디1	218	10.79	3.24	33.07	3.74	1.00	19.9
들잔디2	61	9.06	3.23	34.13			
들잔디3	119	9.84	3.06	35.67			
안양중지1	0	0.00	0.00	0.00	3.84	1.06	13.1
안양중지2	1	5.40	2.00	19.00			
안양중지3	5	3.34	1.62	16.80			
SK중지1	513	7.28	2.46	33.24	3.00	0.98	15.0
SK중지2	644	7.29	2.78	33.87			
SK중지3	832	7.67	2.98	33.23			
장성중지1	112	6.79	2.81	24.87	2.37	1.01	13.5
장성중지2	48	6.92	2.96	23.23			
장성중지3	136	6.58	3.08	25.30			
제니스1	890	7.78	2.69	25.30	2.54	1.06	18.0
제니스2	1110	8.36	2.52	26.60			
제니스3	1480	6.55	2.73	23.40			

<28>

<29> 신품종 용천(Dragon Sky) 발명에 있어서 생리학적 특징 이외에 유전학적 분석을 통하여 신품종 용천(Dragon

Sky)과 한국잔디간의 유전학적 차이를 확인하기 위해 아래의 분석을 사용하였다.

- <30> 본 발명은 신품종 용천(Dragon Sky)을 타 잔디류인 국내 Zoysiagrass 품종(안양중지, 건희), 국내 Zoysiagrass 계통(장성중지, SK 중지), 국외 Zoysiagrass 품종(제니스) 및 USDA/ARS (National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland 20705, U. S. A.)에서 분양받은 Zoysia 계통[*Z. matrella*(PI 231146, PI 264343), *Z. sinica*(PI 553019), *Z. macrostachya*(PI 553020), *Z. japonica*(PI 338566)]들과 비교하여 신품종 용천(Dragon Sky) 고유의 특이성[유전체(genome), 생육, 생태]를 확인하고, 용천중지의 대표 종을 선발하며, 이들에 대한 분자마커를 개발하기 위하여 수행되었다. 본 발명에서는 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 분자마커 개발을 위하여, Operon 10-mer Primer의 대량검정으로 신품종 용천(Dragon Sky) 개체 특이 RAPD 표지인자를 확보하였고, RAPD 를 통한 용천중지 집단 내 변이를 분석하고, 용천중지 특유의 SCAR marker 개발과 이를 이용한 검정이 수행되었다. 또한 본 발명에서는 기존 한국잔디 특허출원에 사용되지 않았던 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 분석을 실시하여 기존의 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 분석에 비해 훨씬 더 세밀한 genotyping 을 수행하였고, 이러한 시도를 통해 한국잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에 대한 분자유전학 마커를 좀 더 다양하게 찾을 수 있었고, AFLP 를 통한 용천중지의 STS marker 를 개발하였고, 이를 통하여 신품종 용천(Dragon Sky)의 새로운 분자마커를 개발하였다.
- <31> 신품종 잔디 용천(Dragon Sky) 34클론에 대한 RAPD 분석결과 동일 포장 내에서 재배가 되고 있지만, 다소 유전적으로 변이를 보였다. 이러한 경향은 국내 외 잔디 품종에서 똑같이 보인다. 따라서 본 발명에서는 용천 품종 내 다수를 대표하고, 그들 간에 유전적 근연관계가 가장 높은 집단을 찾았고, 대표 종으로 용천 9-1, 11-2, 및 12-2를 선발하였다. 또한, 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종을 타 잔디류[안양중지, 장성중지, SK중지, 제니스, 건희), 고려잔디(*Z. matrella*, PI231146, PI264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020), 금잔디(*Z. japonica*, PI 338566)]와 RAPD 분석하여 다른 잔디류와의 유전적 변이를 조사하였다. 그 결과 신품종 용천(Dragon Sky)은 primer OPA-8, OPW-2, OPZ-4에서 용천 고유의 다형성 밴드(polymorphic bands)를 확인할 수가 있었다. 2개 primer(OPW-2, OPZ-4)에서 보인 신품종 용천(Dragon Sky) 고유의 polymorphic bands는 염기서열 분석 후 SCAR marker 로 전환되었고, 본 SCAR marker 는 신품종 잔디 용천(Dragon Sky)의 특이 분자마커로서 사용될 수 있다.
- <32> 본 발명에서는 AFLP 분석을 통하여 STS 마커를 개발하였다. AFLP 는 digestion, adaptor ligation, pre-amplification, selective amplification 을 순서대로 시행하였다. AFLP product 를 전기영동하여 용천중지 특이적인 밴드를 확인하였고, 신품종 용천 polymorphism fragments 가 확인된 프라이머 조합에서 polymorphism fragments 를 분리한 후, 다시 polymorphism DNA fragments 와 해당 polymorphism DNA fragments 가 나온 primer 조합을 이용하여 PCR 을 수행하였다. PCR 후 polymorphism fragments 의 서열을 분석하여 새로운 프라이머를 디자인하였고, 이를 이용하여 AFLP 분석을 시행하였다. 분석 시 총 31개의 primer 조합 중 11개의 primer 조합에서 28개의 polymorphism fragments 가 타나났다. 추가로 1-6, 1-7, 2-3은 AFLP 를 1번 더 반복해서 실험하였고, 1-6은 1개, 1-7은 1개, 2-3은 5개의 polymorphism fragments 를 추가로 얻을 수 있었다. AFLP 분석으로부터 얻은 Polymorphic products 중 primer 조합(E+ACT / M+CTG)으로부터 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 PCR products 에 대한 염기서열분석을 통하여 STS primers 를 제작하였다(표 13). 제작된 STS primers(STS 4-7-1S/STS 4-7-1E, STS 4-7-2S/STS 4-7-2E)로부터 각각 191 bp, 192 bp의 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 band 를 확인할 수 있었다. 상기 STS primer 세트들은 타 잔디와 품종 비교 시 용천중지 고유의 polymorphism fragments 의 지표가 될 수 있다.
- <33> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <34> 실시예 1. 잔디 신품종 “용천(Dragon Sky)”의 육성과정
- <35> 국내에서 수집(표 2)한 총 34 종의 잔디들을 각 수집집단에서 런너(runner)를 선별하여 포장(대전광역시 유성구 금탄리 시험포)에 줄 때 식재하였다.

<36> [표 2]. 잔디 수집지역

주 소	주 소
강원도 홍천군 남면 제곡리 하천변(홍천강지류)	충청남도 보령시 남포면 삼현리 하천변
강원도 홍천군 남면 남노일리 하천변(홍천강지류)	충청남도 보령시 주교면 주교리 하천변
경기도 화성시 팔탄면 지월리 하천변	충청남도 예산군 예산읍 발연리 하천변
충청북도 청원군 현도면 중척리 하천변(금강지류)	충청남도 예산군 신암면 계촌리 하천변
충청북도 청원군 옥산면 환희리 하천변	경상북도 안동시 임하면 임하리 하천변
충청북도 청원군 강내면 황탄리 하천변	경상북도 안동시 풍산읍 마애리 하천변
충청북도 연기군 금남면 봉기리 하천변(금강지류)	경상북도 의성군 안사면 쌍호리 하천변
충청북도 연기군 금남면 도암리 하천변(금강지류)	전라북도 진안군 동향면 능금리 하천변
충청북도 영동군 심천면 초강리 하천변	전라북도 진안군 동향면 학선리 하천변
충청북도 영동군 양강면 구강리 하천변	전라북도 무주군 안성면 진도리 하천변
충청남도 천안시 풍세면 남관리 하천변	전라북도 익산시 용안면 용두리 하천변
충청남도 아산시 배방면 갈매리 하천변	전라북도 완주군 봉동읍 신선리 하천변
충청남도 금산군 복수면 지량리 하천변(금강지류)	전라남도 구례군 구례읍 신월리 하천변
충청남도 부여군 장암면 합곡리 하천변	전라남도 화순군 이서면 창량리 하천변
충청남도 공주시 우성면 옥성리 하천변	전라남도 화순군 남면 용리 하천변
충청남도 공주시 사곡면 호계리 하천변	전라남도 무안군 몽탄면 당초리 하천변
충청남도 공주시 유구읍 만천리 하천변	전라남도 함평군 나산면 계동마을 하천변

<37>

<38> 줄 때 식재 후 증식된 잔디들의 포장평가를 하였고, 포장평가는 주로 생장력, 줄기밀도, 잎의 조밀도, 직립성, 계절별 색채, 내병성, 내한성에 관하여 검정을 하여 종합적으로 평가하였다. 평가를 통하여 선별된 우수한 수집 계통은 교배를 위하여 이식하였고, 이식된 계통들 중 최종 평가를 수행한 후 선별된 계통들 간에 인공교배(표 3)를 하였다.

<39> [표 3]. 우수 수집종 간 교배 조합

모 본	부 본
경기 화성시 팔탄면 지월리 하천변	충북 청원군 현도면 중척리 하천변
충남 아산시 배방면 갈매리 하천변	강원 홍천군 남면 제곡리 하천변 (홍천강지류)
충남 예산군 신암면 계촌리 하천변	경북 안동시 임하면 임하리 하천변
충남 부여군 장암면 합곡리 하천변	충남 공주시 유구읍 만천리 하천변
충남 보령시 주교면 주교리 하천변	경북 의성군 안사면 쌍호리 하천변
충북 연기군 금남면 봉기리 하천변	충북 영동군 심천면 초강리 하천변
충북 연기군 금남면 도암리 하천변	충남 천안시 풍세면 남관리 하천변
전남 구례군 구례읍 신월리 하천변	전남 화순군 이서면 창량리 하천변
전남 무안군 몽탄면 당초리 하천변	전남 함평군 나산면 계동리 하천변
전북 진안군 동향면 능금리 하천변	전북 무주군 안성면 진도리 하천변
전북 익산시 용안면 용두리 하천변	전북 완주군 봉동읍 신선리 하천변

<40>

<41> 인공교배하여 나온 각 교배 조합 별 F1 종자는 대전시 유성구 금탄리 시험포에 파종 되어 F1 식물체 평가 후, 생장력, 줄기밀도, 잎의 조밀도, 직립성, 계절별 색채(질은적색)의 특성을 갖는 우수 교배조합 계통(충청북도 연기군 금남면 봉기리 하천변 수집계통 / 충청북도 영동군 심천면 초강리 하천변 수집계통)을 최종 선발하여 안정[(주)삼덕 포장]에 식재 증식하였다.

<42> 실시예 2. 유전자원의 수집 및 육성

<43> 신품종 용천(Dragon Sky)의 특성 조사 및 DNA Marker 개발을 위하여 실시예 1에 서 선택된 우수계통들의 방임수

분으로 얻어진 종자를 안성 [(주)삼덕 포장]에 파종하였다. 이들 종자들을 종자 500 닢 이상 건조상태에서 발아시험을 수행한 후, 농업생명공학연구원(<http://www.niab.go.kr>)에 기탁하여 수탁번호 KACC 980001P를 받았다. 이들 신품종 용천(Dragon Sky)의 증식 및 평가를 수행하였다.

- <44> 안양중지, 장성중지, 일동레이크의 SK중지(가칭), 제니스(Zenith), 들잔디를 분양 받아 고려대학교 포장에서 재배를 하였고, 일부는 유리온실에서 재배 및 유지하였다.
- <45> 신품종 용천(Dragon Sky)의 생육 생태적 특성은 고려대학교 실험포장에서 이루어 졌으며, 신품종 용천(Dragon Sky)을 비롯한 다른 Zoysiagrass 품종들이 식재되었다. 포장은 식재면적에 따라 모두 3부분(포장 I, II, III)으로 나누었으며, 포장 I과 II에는 각각 3 반복을 두었다. 시험포장 I는 각 잔디별로 30× 200 cm의 크기로 3반복을 했으며 조사 항목별로 30개체씩 조사를 하였다. 초장, 엽길이, 엽폭, 포복경의 수, 포복경의 절간수, 포복경의 길이, 이삭 출현시기, 이삭/꽃대의 수, 이삭길이, 이삭당 종자수를 조사하였다.
- <46> 시험포장 II에서는 봄철녹화속도, 색상, 피복률, 화사출아시기, 이삭/꽃대의 수, 꽃대(이삭포함)의 길이, 휴면시기, Genetic Color, Leaf Texture를 조사하였다.
- <47> 시험포장 III(반지름 10 cm 원모양)은 2003년 10월 9일 대전의 삼덕조경(주)의 농장에서 임의로 선정한 17곳의 신품종 용천(Dragon Sky)을 sampling 해서 온 것을 식재했다.
- <48> 안양중지, 장성중지, 일동레이크의 SK중지(가칭), 제니스(Zenith), 들잔디를 수집하였다. 수집된 유전자원을 고려대학교 연구농장에서 재배를 하였고, 일부는 유리온실에서 재배하였다.

<49>

<50> 실시예 3. Genomic DNA 추출

- <51> 충남 유성근교의 삼덕조경(주)의 농장에서 sampling 한 신품종 용천(Dragon Sky)의 17 계통으로부터 각각 bulk로 2 반복한 식물체들과 안양중지, 장성중지, SK중지(가칭), Zenith, 조이시아 코리아나(*Z. koreana*), 건희(Konhee), 고려잔디(*Z. matrella*, PI231146, PI264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020), 및 들잔디(*Z. japonica*, PI 338566)의 잎 0.1 g 에 1.5 ml 의 추출용액(extraction buffer : 100 mM Tris pH 7.6~8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM beta-mecarptoethanol)을 이용하여 마쇄하였다. 생성된 mixture를 1.5 ml tube 로 옮긴 다음 65℃ 에서 10분간 incubation 하였다. Incubation 후 0.5 ml 의 5 M potassium acetate를 넣고, 얼음에서 20분간 incubation 시켰다. 그 후 4℃ 14000 rpm 에서 20분간 원심분리를 하였다. 상등액을 filter paper 를 이용하여 한번 걸러준 다음 1 ml isopropanol 과 5 M ammonium acetate 0.1 ml 를 첨가한 후 -20℃ 에서 20분간 incubation 하였다. 다시 4℃ 14,000 rpm 에서 20분간 원심분리를 한 후 DNA 침전물이 보이면 상등액을 제거했다. 상온에서 5~10분간 air dry 를 한 후, 0.3 ml 의 증류수로 녹였다. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (v:v:v 25:24:1)을 300 ml 넣은 후, 5분간 원심분리하고, 상등액을 새로운 tube 로 옮겨 Chloroform : Isoamyl alcohol (v:v 24:1)을 0.3 ml를 넣었다. 다시 원심분리 후 새로운 튜브에 상등액을 옮기고, 3 M sodium acetate(pH 7.0) 32 μ l와 cold isopropanol을 214 μ l 넣었다. 2분간 원심분리 후 상등액은 버리고, pellet은 air dry 한 후, 0.1 ml의 증류수로 녹였다. 얻어진 genomic DNA 는 UV spectrophotometer를 이용하여 순도측정과 정량을 하였다.

<52> 실시예 4. 첫 번째 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)를 통한 신품종 잔디 용천(Dragon Sky) 변이분석

- <53> 충남 유성근교의 삼덕조경(주)의 농장에서 sampling 한 용천중지의 17 계통으로부터 각각 bulk로 2 반복한 식물체들의 각각의 변이성을 확인하기 위하여 RAPD를 시행하였다. 시행함에 있어 안양중지, 장성중지, SK중지(가칭)와 비교하였다.
- <54> PCR 반응액 (18.5 μ l, Takara, Japan) 은 실시예 3에서 추출한 genomic DNA(20 ng/ μ l) 1 μ l, Operon random primer (2 μ l/ μ l, Operon Biotechnologies, Germany) 2 μ l, Taq polymerase(5 U/ μ l, Takara, Japan) 0.12 μ l, dNTP(2.5 mM) 1.28 μ l, 10X PCR buffer 2 μ l (Takara, Japan), 및 distilled water 12.1 μ l 로 반응시켰다. PCR 반응은 94℃ 에서 5분간 denature 시킨 후 94℃ 에서 1분, 37℃ 에서 1분간 annealing, 72℃ 에서 2분간 extension 과정을 39회 반복 후 72℃ 에서 4분, 4℃ 로 PCR 반응을 종료하였다. PCR 이 끝난 후 0.1% agarose gel 과 EtBr 을 이용해서 전기영동(electrophoresis)을 시행하였다. 전기영동이 끝난 다음 UV illuminator 를 이용하여 PCR 반응으로 나타난 band 를 관찰하였고, 사진촬영을 하여 데이터로 사용하였다. PCR products 의 유무에 따라서 1과 0으로 coding 하였고, 이것을 이용하여 binomial data matrix code 를 작성하여 유연관계를 살펴보았으며, NTSYSpc2 (<http://www.exetersoftware.com>)를 이용하여 근연관계를 살펴보았다.

<55> 신품종 용천(Dragon Sky) 17개 sample 중 각 sample 군별로 식물체를 bulk로 2 반복씩 선발해서 각각 genomic DNA extraction 을 했으며, RAPD 를 통한 신품종 용천(Dragon Sky)의 변이분석 결과 총 33개의 primer 를 사용하여 그 중 63.6% 인 21개에서 RAPD band 를 확인하였다. OPAA 1개, OPAD 2개, OPAJ 1개, OPC 4개, OPU 2개, OPV 3개, OPW 1개, OPX 1개, OPY 1개, OPZ 17개를 primer로 사용하였고, 각각의 sequence는 표 4에 나타내었다.

<56> [표 4]. 첫번째 RAPD 분석에 사용한 Operon Primers

Operon primer No.		Sequence	Operon primer No.		Sequence
OPAA	7	5'-CTACGCTCAC-3'	OPZ	1	5'-TCTGTGCCAC-3'
OPAD	2	5'-CTGAACCGCT-3'		2	5'-CCTACGGGGA-3'
	7	5'-CCCTACTGGT-3'		3	5'-CAGCACC GCA-3'
OPAJ	12	5'-CAGTTCCCGT-3'		4	5'-AGGCTGTGCT-3'
OPC	15	5'-GACGGATCAG-3'		5	5'-TCCCATGCTG-3'
	18	5'-TGAGTGGGTG-3'		6	5'-GTGCCGTTCA-3'
	19	5'-GTTGCCAGCC-3'		7	5'-CCAGGAGGAC-3'
	20	5'-ACTTCGCCAC-3'		9	5'-CACCCAGTC-3'
OPU	1	5'-ACGGACGTCA-3'		11	5'-CTCAGTCGCA-3'
	4	5'-ACCTTCGGAC-3'		13	5'-GACTAAGCCC-3'
OPV	2	5'-AGTCACTCCC-3'		14	5'-TCGGAGGTTC-3'
	9	5'-TGTACCCGTC-3'		15	5'-CAGGGCTTTC-3'
	11	5'-CTCGACAGAG-3'		16	5'-TCCCCATCAC-3'
OPW	2	5'-ACCCCGCCAA-3'		17	5'-CCTTCCCACT-3'
OPX	5	5'-CCTTTCCCTC-3'		18	5'-AGGGTCTGTG-3'
OPY	18	5'-GTGGAGTCAG-3'		19	5'-GTGCGAGCAA-3'
				20	5'-ACTTTGGCGG-3'

<57>

<58> 신품종 용천(Dragon Sky) 34 클론에 관한 RAPD 에 관한 결과는 PCR product 의 생성유무에 따라서 존재하면 “1” , 존재하지 않으면 “0” 로 하여 분석하였으며 그것을 정리한 원 데이터(row data)는 표 5에 나타내었다.

<59> [표 5]. 신품종 용천(Dragon Sky) 34 클론의 RAPD분석에 의한 binomial data matrix code

Primer sample	OPC-15	OPC-18	OPC-19	OPC-20	OPZ-3	OPZ-4	OPZ-5	OPZ-6
DS1-1	00010101	101101010	00101101	011011	110100	000110	110000	111010
DS1-2	00010101	101101010	00101101	011011	110100	000110	000000	111010
DS2-1	00000000	000000000	01101101	011111	111100	000000	110000	110110
DS2-2	01100101	000000000	01111110	001111	011100	000000	100110	111011
DS3-1	10010101	101101010	01101101	010011	110010	001110	100100	110110
DS3-2	11010101	001101010	00000000	010011	110100	000011	100010	111010
DS4-1	11010101	101101010	00111101	011111	110100	001110	100100	110010
DS4-2	10010101	101101010	10101101	000011	110010	000011	100100	111010
DS5-1	10010101	001100010	01101101	011011	110100	000011	100100	111010
DS5-2	10010101	101101010	00000000	011011	110100	001111	110100	111010
DS6-1	10010101	101101010	00101101	010101	110010	001111	100101	110110
DS6-2	10010101	101101010	00101101	010011	110010	001111	100100	110110
DS7-1	11010101	001101010	01101101	010011	110101	001011	100110	111010
DS7-2	11010101	001101010	01101101	000000	110101	001011	100110	111010
DS8-1	00010001	000000010	00001101	000011	000000	000000	000000	001010
DS8-2	10010101	001101010	01101101	010011	110100	001111	100100	111010
DS9-1	10010101	101101010	00101101	010011	110010	001110	100100	110010
DS9-2	10010101	101101010	00101101	010011	110010	001110	100100	111010
DS10-1	10010101	001101010	01101101	000000	110101	001011	100100	111010
DS10-2	10110101	101001010	01101101	011011	110010	001010	100100	101010
DS11-1	10010101	001101010	01101101	011011	110101	001011	100110	111010
DS11-2	10010101	101101010	00101101	010011	110010	001010	100100	110010

<60>

DS12-1	1 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1 1 0 1	0 1 1 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1 1	1 0 0 1 0 0	1 1 1 0 1 0
DS12-2	1 0 0 1 0 1 0 1	1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 0 1 0	0 0 1 1 1 1	1 0 0 1 0 0	1 1 0 0 1 0
DS13-1	0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 0 1 0	0 0 1 1 1 1	1 0 0 1 0 0	1 1 0 0 1 0
DS13-2	1 0 0 1 1 0 0 1	0 0 1 1 0 0 0 1 0	0 1 1 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 1 1 1 1	1 0 0 1 0 0	1 1 1 0 1 0
DS14-1	0 1 1 0 0 1 0 1	1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 1 0 1	0 0 1 0 0 1	0 1 0 0 1 0	0 0 1 1 1 1	1 0 0 1 1 0	1 1 1 0 1 1
DS14-2	1 0 0 1 0 1 0 1	1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 1 0 1	0 0 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 1 1 1 1	1 0 0 1 0 0	1 0 0 0 1 0
DS15-1	1 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 1 0 1	0 0 0 0 0 0	1 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1 0	1 0 0 1 0 0	1 1 1 0 1 0
DS15-2	1 0 0 1 0 1 0 1	1 0 1 0 0 0 0 1 0	0 1 1 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 0 1 0	0 0 1 1 1 0	1 0 0 1 0 0	1 1 1 0 1 0
DS16-1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1 1	1 0 0 1 0 0	1 1 1 0 1 0
DS16-2	1 0 0 1 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1 1	1 0 0 1 0 0	1 1 1 0 1 0
DS17-1	1 0 0 1 0 1 0 1	1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 0 1 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 0 1 0	0 0 1 1 1 0	1 0 0 1 0 0	1 1 0 0 1 0
DS17-2	1 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 1 0 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1 1	1 0 0 1 1 0	1 1 1 0 1 0
SK 1	0 1 1 0 0 0 0 1	0 0 1 0 0 1 0 0 0	1 0 1 0 1 1 1 0	0 0 1 1 1 1	1 1 0 0 1 0	1 1 0 0 1 1	1 0 0 1 1 0	1 1 1 0 0 1
SK 2	0 1 1 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1 1 1 0	0 0 1 1 1 1	1 1 0 0 1 0	1 1 0 0 1 1	1 1 0 0 0 0	1 1 1 0 0 0
SK 3	0 1 1 0 0 0 0 1	0 0 1 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 1 1	1 1 0 0 1 0	0 1 0 0 1 1	1 0 0 0 0 0	1 1 1 0 0 0
SK 4	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1 1 1 0	0 0 1 1 1 1	1 1 0 0 1 0	0 1 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0	1 1 1 0 0 0
An 1	0 1 1 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0
An 2	0 1 1 0 0 0 1 1	1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1 1	1 1 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0
An 3	0 0 1 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 0 0 1 0	0 1 1 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1 1	1 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 0 0
An 4	0 1 1 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 1 1	1 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0
Jang 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 1	0 0 1 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0
Jang 2	0 1 1 0 0 0 1 1	0 1 1 0 1 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1 1 0	0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1 1	1 1 0 0 0 0	1 1 1 0 0 0
Jang 3	0 1 1 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1 1 1 0	0 0 0 0 1 1	1 1 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0	1 1 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0
Jang 4	0 1 1 0 0 0 1 1	1 0 1 0 1 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1 1 0	0 0 0 0 0 1	1 1 0 1 0 0	0 0 0 0 1 1	1 1 0 0 0 0	1 1 1 0 0 0

[†] 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음. [‡] DS : 신흥종 용천(Dragon Sky), SK : SK중지, An : 안양중지, Jang : 장성중지

<61>

Primer sample	OPZ-7	OPZ-11	OPZ-13	OPZ-14	OPZ-17	OPZ-19	OPZ-20	OPU-1
[†] DS1-1	1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 0 1	0 1 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0	1 0 0 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 0	1 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS1-2	1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 0 1	0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 0	1 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS2-1	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 0 1	0 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	1 1 0 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS2-2	1 0 0 0 1 1 0 0	1 0 1 0	0 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	0 0 1 0 0 1 0 1	1 1 1 1 1 1 0	0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
DS3-1	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 1 0	0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1 0	1 0 0 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS3-2	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	1 0 0 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	0 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS4-1	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 1 0	0 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	1 0 0 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 0 0	0 1 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS4-2	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 0 1	0 1 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0	1 0 1 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 0	0 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS5-1	1 0 0 1 1 1 1 1	0 0 0 1	0 1 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0	1 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	0 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS5-2	1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 0 1	0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1 0	1 0 1 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 0	1 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS6-1	1 1 0 1 1 1 1 0	0 0 1 0	0 1 0 0 0 0	1 1 0 0 1 0	1 0 1 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS6-2	1 0 0 1 1 1 1 0	1 1 1 0	0 1 1 0 1 0	1 1 0 0 1 0	1 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 0 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS7-1	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 0 1	0 1 1 0 1 0	1 1 0 0 1 1	1 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 0 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS7-2	1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 0 0	0 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0	1 1 1 1 1 1 1	1 0 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS8-1	0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 1 1 0 0	0 1 1 0 0 1 1	0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0
DS8-2	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 0 1	0 1 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0	1 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	0 0 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS9-1	1 0 0 1 1 1 1 0	1 0 1 0	0 1 1 0 1 0	1 1 0 0 1 0	1 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS9-2	1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 1 0	0 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	1 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS10-1	1 0 0 1 1 0 1 0	1 0 0 1	0 1 1 0 1 0	1 1 0 0 1 0	1 1 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 0	0 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0
DS10-2	1 0 1 1 1 1 1 0	1 0 1 0	0 1 1 0 1 0	1 0 0 0 1 0	1 1 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0
DS11-1	1 0 0 1 1 0 1 0	1 0 0 1	0 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0	0 0 0 1 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 0	0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0

<62>

DS12-1	10011010	1001	011010	110010	00011100	1111111	110	00001110100
DS12-2	10111110	1010	011010	110010	10011100	1111111	110	00001110100
DS13-1	10101110	1010	011010	000000	10011100	1111111	100	00001110100
DS13-2	10011110	0001	011010	010000	11011100	1111111	110	00001110100
DS14-1	10001110	1010	001010	010010	01011101	1111110	010	00000010100
DS14-2	10011110	1010	011010	110010	11011100	1111111	110	00001110100
DS15-1	10101100	1010	011010	010000	10011100	1111111	100	00001110100
DS15-2	10101110	1010	011010	010010	10011100	1111111	100	00001010100
DS16-1	10101110	1001	011010	110010	11011100	1111010	100	00001110100
DS16-2	10011110	1001	011010	000000	00011100	1111111	100	00001010100
DS17-1	10011110	0000	011010	110010	11011100	1111111	000	00011110100
DS17-2	10011110	1001	011010	110010	00011100	1111111	100	00011110100
SK 1	10001110	1010	001011	001011	01001100	1111010	010	00001110011
SK 2	10001110	0001	001010	000111	01001100	1011010	000	00001110111
SK 3	10001110	0010	001010	000011	00000100	1111010	000	00001111011
SK 4	10001110	0010	001010	000010	00000101	0010010	000	00001111011
An 1	10011110	0010	011010	000000	00010100	1111110	000	00000010010
An 2	10011110	0010	011010	000010	10010100	1111110	100	00101110100
An 3	10101110	1010	011010	000000	10010100	1111110	100	00001110100
An 4	10101110	1010	011010	000000	10010101	1111110	100	00001110100
Jang 1	00000000	0000	101010	000000	00001001	0110010	000	00000000000
Jang 2	10101110	1001	001010	000000	01001101	1111110	011	00001111000
Jang 3	10101110	1110	001011	000011	01001101	1111110	011	00001000000
Jang 4	10101110	0010	001010	000010	00010100	1111110	011	00001010000

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음. † DS : 신포종 용천(Dragon Sky), SK : SK중지, An : 안양중지, Jang : 장성중지

Primer sample	OPW-2	OPV-11	OPAJ-12	OPAD-2	OPV-2
†DS1-1	010100	1100011001	11111	00011	0001
DS1-2	010100	0100011001	11111	00011	0001
DS2-1	110101	1101010001	11111	00000	0001
DS2-2	000000	0101110000	11111	00011	0011
DS3-1	110101	1100010000	11111	00011	0011
DS3-2	110101	1100011001	11111	00011	0001
DS4-1	010100	1101010100	11111	00000	0001
DS4-2	010100	0010000000	11111	00011	0001
DS5-1	010100	0000000000	00000	00011	0001
DS5-2	010100	0000000000	11111	00000	0001
DS6-1	010100	1100010001	00000	10011	1001
DS6-2	000000	0000000000	11111	10011	1001
DS7-1	110110	1100011001	11111	00000	1101
DS7-2	110111	1100011001	11111	00011	1101
DS8-1	001000	1100010001	11111	10011	1101
DS8-2	110111	1100011001	11111	00000	1101
DS9-1	110111	1100010001	11111	10011	0000
DS9-2	000000	1100010001	11111	10011	1001
DS10-1	110111	1100011001	11111	00111	1111
DS10-2	110111	1100110001	11111	00111	1111
DS11-1	110111	1100111001	11111	00000	1111
DS11-2	110111	1100010001	11111	10111	1111

DS12-1	110111	1100111001	11111	00111	1111
DS12-2	110111	1100110001	11111	10111	1111
DS13-1	010101	1100010001	11110	00000	1111
DS13-2	010100	1100011001	11110	00011	0001
DS14-1	000100	0100111001	00000	10111	1001
DS14-2	010100	1101010001	11110	10111	0001
DS15-1	000000	1100011001	00000	00011	0001
DS15-2	010100	1100011001	11110	10111	1001
DS16-1	010100	1100011001	11110	00111	0001
DS16-2	000000	1100011001	00000	00000	0001
DS17-1	010100	1100011001	11110	10011	1001
DS17-2	000001	1100011001	00000	00011	0001
SK 1	010000	0101010001	01100	01011	0011
SK 2	010000	0101010000	01100	01011	1001
SK 3	010000	0101010001	00000	00011	0011
SK 4	000000	0000000000	00000	00011	0011
An 1	000000	0000001000	00000	00000	0000
An 2	010101	1100011001	00100	00011	0001
An 3	010100	1100010001	00100	00011	0001
An 4	010100	1100011001	00100	00011	0001
Jang 1	000000	0001000010	00000	00000	0001
Jang 2	000110	1100011001	01111	00000	1001
Jang 3	000110	0100011001	01111	00011	0011
Jang 4	000110	1100011001	00000	00011	0000

[†] 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음. [‡] DS : 신포종 용천(Dragon Sky), SK : SK중지, An : 안양중지, Jang : 장성중지

<65>

<66>

RAPD 결과에 따른 matrix 로 NTSYSp2 를 이용하여 근연관계를 살펴보고, 그 결과로 DS 3-1, 4-1, 6-2, 9-1, 9-2, 10-2, 11-2, 12-2, 13-1, 13-2, 14-2, 15-2, 16-1, 17-1 이 가장 가까운 유전 근연관계를 나타내었다(도 1). 근연관계 분석 결과 DS 9-1, 11-2, 12-2 이 가장 비슷한 유전체 조성을 보였다. 가장 유사성을 보이는 DS 9-1, 11-2, 12-2를 용천중지를 대표할 수 있는 신포종 용천(Dragon Sky) 대표종으로 선발하였다.

<67>

실시예 5. 두 번째 RAPD를 통한 신포종 용천(Dragon Sky)의 특이적인 RAPD band 분석

<68>

선발된 용천(Dragon Sky) 대표종 DS 9-1, 11-2, 및 12-2를 다른 잔디류인 안양중지, 장성중지, SK중지, Zenith, 조이시아 코리아나(*Z. koreana*), 건희, 고려잔디(*Z. matrella*, PI 231146, PI 264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 및 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020)들과 RAPD 를 통하여 용천(Dragon Sky) 대표종 특이 RAPD marker 개발을 위한 PCR 을 수행하였다. 2번(1, 2차)에 걸쳐 RAPD를 진행하였고, 1차 RAPD 분석에 사용한 Operon primer 는 12개이며, 사용한 primer 의 sequence 는 아래와 같다(표 6).

<69> [표 6]. 1차 RAPD분석에 사용한 Operon primers

Operon primer No.		Sequence
OPA	1	5'-CAGGCCCTTC-3'
	2	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPAD	2	5'-CTGAACCGCT-3'
OPAJ	12	5'-CAGTTCCCGT-3'
OPC	15	5'-GACGGATCAG-3'
	19	5'-GTTGCCAGCC-3'
	20	5'-ACTTCGCCAC-3'
OPW	2	5'-ACCCCGCCAA-3'
OPZ	4	5'-AGGCTGTGCT-3'
	6	5'-GTGCCGTTCA-3'
	14	5'-TCGGAGGTTC-3'
	19	5'-GTGCGAGCAA-3'

<70>

<71> 위의 RAPD 결과물 중 OPW-2(5'-ACCCCGCCAA-3') 에서 용천중지만의 고유의 band를 확인할 수 있었다. OPW-2 의 1244 bp(서열번호 1)에 있는 RAPD bands는 다른 잔디류에서 보이지 않는 용천중지만의 고유의 RAPD bands를 보여주고 있기 때문에 이들 마커를 신제품 용천(Dragon Sky)의 특이 RAPD 마커로 확인하였다 (도 2).

<72>

2차 RAPD 는 60개의 Operon Primer 로 진행하였다. 추가로 RAPD 를 진행한 방법은 다음과 같다. 실시예 4의 신 품종 용천(Dragon Sky) 대표종 3개체(DS 9-1, DS 11-2, DS 12-2)를 선발하였다. 선발된 신제품 용천(Dragon Sky)을 타 잔디들[안양중지, 장성중지, SK중지, 건희, 제니스, 조이시아 코리아나(*Z. koreana*), 고려잔디(*Z. matrella*, PI231146, PI264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020), 들잔 디(*Z. japonica*, PI 338566)]과 RAPD를 통하여 비교하였다. 사용된 primer 는 QIAGEN 사의 Operon 10-mer Primers (OPA series, OPC series, OPD series 각각 20개) 60개를 각각 사용하였고 표 7에 도시하였다.

<73>

[표 7]. 2차 RAPD분석에 사용한 Operon primers

Operon primer No.		Sequence	Operon primer No.		Sequence	Operon primer No.		Sequence
OPA	1	5'-CAGGCCCTTC-3'	OPC	1	5'-TTCGAGCCAG-3'	OPD	1	5'-ACCGCGAAGG-3'
	2	5'-TGCCGAGCTG-3'		2	5'-GTGAGGCGTC-3'		2	5'-GGACCCAACC-3'
	3	5'-AGTCAGCCAC-3'		3	5'-GGGGGTCTTT-3'		3	5'-GTCGCCGTCA-3'
	4	5'-AATCGGGCTG-3'		4	5'-CCGCATCTAC-3'		4	5'-TCTGGTGAGG-3'
	5	5'-AGGGGTCTTG-3'		5	5'-GATGACCGCC-3'		5	5'-TGAGCGGACA-3'
	6	5'-GGTCCCTGAC-3'		6	5'-GAACGGAATC-3'		6	5'-ACCTGAACGG-3'
	7	5'-GAAACGGGTG-3'		7	5'-GTCCCGACGA-3'		7	5'-TTGGCACGGG-3'
	8	5'-GTGACGTAGG-3'		8	5'-TGGACCGGTG-3'		8	5'-GTGTGCCCCA-3'
	9	5'-GGGTAACGCC-3'		9	5'-CTCACCGTCC-3'		9	5'-CTCTGGAGAC-3'
	10	5'-GTGATCGCAG-3'		10	5'-TGTCTGGGTG-3'		10	5'-GGTCTACACC-3'
	11	5'-CAATCGCCGT-3'		11	5'-AAAGCTGCGG-3'		11	5'-AGCGCCATTG-3'
	12	5'-TCGGCGATAG-3'		12	5'-TGTCATCCCC-3'		12	5'-CACCCTATCC-3'
	13	5'-CAGCACCCAC-3'		13	5'-AAGCCTCGTC-3'		13	5'-GGGGTGACGA-3'
	14	5'-TCTGTGCTGG-3'		14	5'-TGCGTGCTTG-3'		14	5'-CTTCCCCAAG-3'
	15	5'-TTCCGAACCC-3'		15	5'-GACGGATCAG-3'		15	5'-CATCCGTGCT-3'
	16	5'-AGCCAGCGAA-3'		16	5'-CACACTCCAG-3'		16	5'-AGGGCGTAAG-3'
	17	5'-GACCGCTTGT-3'		17	5'-TTCCCCCAG-3'		17	5'-TTTCCACGG-3'
	18	5'-AGGTGACCGT-3'		18	5'-TGAGTGGGTG-3'		18	5'-GAGAGCCAAC-3'
	19	5'-CAAACGTCGG-3'		19	5'-GTTGCCAGCC-3'		19	5'-CTGGGGACTT-3'
	20	5'-GTTGCGATCC-3'		20	5'-ACTTCGCCAC-3'		20	5'-ACCCGGTCAC-3'

<74>

<75> PCR band 의 유무에 따라서 1과 0으로 coding 을 하였다. Coding 된 결과를 표 8에 나타내었고, NTSYSpc2 를 이용하여 신평종 용천(Dragon Sky) 대표종과 타 잔디류간의 근연관계를 살펴보았다(도 3).

<76> [표 8]. 신평종 용천(Dragno Sky) 대표종 3계통과 타 잔디류 간의 2차 RAPD 분석에 의한 binomial data matrix code

sample \ Primer	OPA-1	OPA-2	OPA-3	OPA-4	OPA-5	OPA-6	OPA-7
DS 9-1	† 1 0 1 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1	0 1 0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0 1 1 0
DS 11-2	1 0 1 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1	0 1 0 0 0 1 0	0	0 0 0 0 0 1 1 0
DS 12-2	1 0 1 1 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1	0 1 0 0 0 1 0	0	0 0 0 0 0 1 1 0
AnYang	1 0 1 1 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 1 1 1	0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1	0 1 0 0 0 0 0	0	0 0 1 0 0 1 1 0
JangSung	0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 1 0 0	1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0	1 1 0 0 0 0 0	0	0 1 1 0 1 0 1 0
SK	0 0 1 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0	1 1 0 1 0 1 0	0	0 1 1 0 1 0 0 0
Zenith	0 0 0 1 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0	1 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 1 0	0 1 0 0 0 1 0	0	0 0 0 0 0 0 0 0
Z. koreana	1 0 1 1 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1	0 1 0 1 0 0 0	0	0 1 0 1 1 0 1 0
Konhee	0 1 0 1 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 0 1	0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 1	0 1 0 0 0 0 0	0	1 1 0 0 1 0 1 0
Z. matrella PI 231146	0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 1 0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 0 1	0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 1 1	0 1 0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 1 0 1 0
Z. matrella PI 264343	0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1 0 0	0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0	0	0 0 0 1 0 0 0 0
Z. sinica PI 553019	1 0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 1 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0	0 1 0 0 0 0 0	0	0 0 1 0 1 0 0 0
Z. macrostachya PI 553020	1 0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 1 1 1 0	0 0 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 1	0 1 0 0 0 0 0	0	0 0 0 1 0 1 1 0
Z. japonica PI338566	0 0 0 0 0 1 0	1 1 0 0 1 1 0 0 0 1	0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0	0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1	0	0 0 0 0 0 0 0 1

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample \ Primer	OPA-8	OPA-9	OPA-10	OPA-11	OPA-12	OPA-13	OPA-14	OPA-15
DS 9-1	† 1 1 1 0 0 1 0 0 1 0 0	1 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1	1 1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 0 1 1 0 0	1 1	0 1 1 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0
DS 11-2	1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 0	1 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1	1 1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 0 1 1 0 0	1 1	0 1 1 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0
DS 12-2	1 1 1 0 0 1 0 0 1 0 0	1 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1	1 1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 0 1 1 0 0	1 1	0 1 1 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0
AnYang	0 1 1 0 0 1 1 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 0 0 1 0 1	1 1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 0 0 1 0	1 1	0 1 1 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	1 0 1 0 0 0 0
JangSung	0 1 1 0 0 1 0 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 0 0 1 0 0	0 1 0 1 1 0 1 0 1 0	1 1 1 0 0 1 0 0 0	1 0	1 0 1 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	1 0 0 0 0 0 0
SK	0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0	1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1	0 0 0 1 1 0 1 1 1 0	1 1 1 1 0 1 0 0 0	1 0	1 0 0 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	1 0 0 0 0 0 0
Zemith	0 1 1 1 0 1 0 1 1 0 0	1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0	0 1 0 1 1 0 1 0 1 0	1 1 0 1 0 1 1 0 0	1 0	1 0 0 1 1 0 1 0 0	1 1 0 1	1 0 1 0 0 0 0
Z. koreana	0 1 1 1 0 1 0 0 1 0 0	0 1 1 0 1 1 0 0 1 0 1	0 1 0 1 1 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0	1 0 1 0 1 0 1 0 0	0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0
Konhee	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 1 1 1 1 0 0 1 0 1	0 1 1 1 0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 1	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1	1 0 0 0 0 0 0
Z. matrella PI 231146	0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0	1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 1	0 1 1 0 1 1 0 0 0	1 0 1 0 1 1 0 0 1	0 0	0 1 1 1 0 1 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0
Z. matrella PI 264343	0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1 1 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0
Z. sinica PI 553019	0 1 0 1 0 0 1 1 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0	0 1 0 1 1 0 1 1 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	1 0	1 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0
Z. macrostachya PI 553020	0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 1	0 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1	0 1 0 1 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0	1 0	0 1 1 1 0 1 1 0 1	1 0 0 0	0 0 1 0 0 0 0
Z. japonica PI338566	0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0	1 0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0	0 1 1 1 0 0 0 1 0	1 0 1 1	0 1 0 1 1 1 1

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample \ Primer	OPA-16	OPA-17	OPA-18	OPA-19	OPA-20	OPC-1	OPC-2	OPC-3	OPC-4
DS 9-1	[†] 0	0	0 0 0 0 1	0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 1	1 1 1 0 1 0 1	0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 1 0 1	0	0
DS 11-2	0	0	0 0 0 0 1	0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 1	1 1 1 0 1 0 1	0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 1 0 1	0	1
DS 12-2	0	0	0 0 0 0 1	0 1 0 1 1 1 0 0	0 0 1	1 1 1 0 1 0 1	0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 1 0 1	0	1
AnYang	0	0	1 1 0 0 1	1 1 0 0 1 0 1 0	0 0 1	1 0 1 0 1 0 1	0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 1 1 0 1	0	1
JangSung	0	0	0 0 0 0 1	0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1	0 0 1 0 1 0 1	0 1 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 0 1	0	0
SK	0	0	0 1 0 0 1	0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 0	0 1 1 0 1 0 1	0 1 0 1 1 1 1 0 0 1 0 1 0 1	0	0
Zenith	0	0	0 1 0 0 1	0 1 0 0 1 0 0 0	0 1 1	0 0 1 0 1 0 1	1 1 0 0 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0	0	0
Z. korana	0	0	0 1 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0	0 0 1 0 1 0 1	0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 1	0	0
Konhee	0	0	0 0 0 1 1	0 1 0 0 1 0 0 1	0 1 0	0 1 1 1 1 0 1	0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 0 1 0 1	0	0
Z. matrella PI 231146	0	0	0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 1 0	0 0 0	1 0 0 1 1 0 1	0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0	0	0
Z. matrella PI 264343	0	0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1	0	0
Z. sinica PI 553019	0	0	0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	0
Z. macrodactyla PI 553020	0	0	0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0	1 0 1 0 1 0 1	1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1	0	0
Z. japonica PI338566	0	0	0 1 1 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0	1 0 0	0 1 0 1 1 1 0	0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 0	0	0

[†] 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample \ Primer	OPC-5	OPC-6	OPC-7	OPC-8	OPC-9	OPC-10	OPC-11
DS 9-1	[†] 1 1 0 1	0 0 0 1 0 1 0 0 0	1 0 1 1 0 0 0 1	0 1 0 1 1 1 1 1 1	0 1 0 0 1 0 1 1	0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 1	0 0 1 1 0 1 0 0 1
DS 11-2	1 1 0 1	0 0 0 1 0 1 0 0 0	1 0 1 1 0 0 0 1	0 1 0 1 1 1 1 1 1	0 1 0 0 1 0 1 1	0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 1	0 0 1 1 0 1 0 0 1
DS 12-2	1 1 0 1	0 0 0 1 0 1 0 0 0	1 0 1 1 0 0 0 1	0 1 0 1 1 1 1 1 1	0 1 0 0 1 0 1 1	0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 1	0 0 1 1 0 1 0 0 1
AnYang	1 1 0 0	1 0 0 1 0 1 0 0 0	1 1 1 1 1 0 1 0	0 1 1 1 1 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0 1 1	0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 0 1	1 0 1 1 0 0 0 0 1
JangSung	1 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 1 1	0 1 1 1 1 1 1 1 0	0 1 0 0 1 0 1 1	0 1 0 0 1 1 0 1 0 1 1 0 0 1	0 0 1 1 0 1 0 0 1
SK	1 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 0	1 1 1 1 1 0 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 0	0 1 0 0 1 0 1 1	0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 1 0 0 1	1 0 1 1 0 0 1 0 1
Zenith	1 1 0 0	1 0 0 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 1 1	1 1 0 1 1 1 1 1 0	0 1 1 0 1 0 1 1	1 1 0 1 1 1 0 0 0 1 1 0 0 1	1 0 1 1 0 1 0 0 1
Z. korana	0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 1 1 0 0 0 1 1
Konhee	1 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 1	1 1 1 0 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 0 1 1	0 1 1 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 0	1 0 1 1 0 0 1 0 1
Z. matrella PI 231146	0 0 0 0	1 1 1 0 0 1 0 0 0	1 1 0 1 0 0 0 0	0 1 1 0 0 1 0 1 1	0 1 1 0 1 0 1 1	1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 1 0 0 1
Z. matrella PI 264343	1 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 0 1 1 0 1	0 1 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0	0 0 1 1 0 1 0 0 1
Z. sinica PI 553019	1 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 1 1 1 1	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 1 0 1	1 0 1 1 0 0 0 0 1
Z. macrodactyla PI 553020	1 1 0 0	1 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 1 1 0 0 0	0 1 1 0 0 1 0 0 1	0 1 0 0 1 0 1 1	1 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1 1 0 1	0 0 1 1 0 1 1 0 1
Z. japonica PI338566	0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 1 1 1 0 0	0 0 1 1 1 0 0 1 1	1 0 0 1 0 1 1 0	0 1 0 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0

[†] 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample \ Primer	OPC-12	OPC-13	OPC-14	OPC-15	OPC-16	OPC-17	OPC-18	OPC-19	OPC-20
DS 9-1	† 1 1 0 1 0 1 1 1	0 1 0 0 1 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 1	1 0 0 1 0 0 1 1 1	0 0 1 0 1 1 1	0	1 1 1 0 1	0	0
DS 11-2	1 1 0 1 0 1 1 1	0 1 0 0 1 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 1	1 0 0 1 0 0 1 1 1	0 0 1 0 1 1 1	0	1 1 1 0 1	0	0
DS 12-2	1 1 0 1 0 1 1 1	0 1 0 0 1 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 1	1 0 0 1 0 0 1 1 1	0 0 1 0 1 1 1	0	1 1 1 0 1	0	0
AnYang	1 1 0 0 1 1 1 0	1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1	0 0 1 1 0 0	1 1 1 1 0 1 1 0 1	1 0 1 0 1 1 1	0	1 1 1 0 0	0	0
JangSung	1 0 1 1 0 1 1 1	0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1	0 0 1 1 0 0	0 1 1 1 1 1 1 0 1	1 0 1 0 1 1 1	0	0 1 0 1 0	0	0
SK	1 1 1 1 1 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 1 1 0 0	0 1 1 0 0 0 1 0 1	1 0 1 0 1 1 1	0	0 1 0 1 0	0	0
Zenith	1 1 1 1 0 0 1 1	0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1	0 0 1 0 0 1	1 1 1 0 0 0 1 0 1	1 0 1 0 1 1 0	0	1 0 0 1 0	0	0
Z. korana	0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1	0	0 0 0 0 0	0	0
Konhee	1 1 0 0 1 0 1 1	0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 1	1 0 1 1 0 1	0 1 1 1 0 0 1 0 1	0 1 1 1 1 1 1	0	0 1 0 0 0	0	0
Z. matrella PI 231146	1 1 0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1	1 1 1 1 0 0	1 1 1 1 0 0 1 1 0	0 1 1 0 1 1 0	0	0 1 0 0 0	0	0
Z. matrella PI 264343	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 1	0	0 0 0 0 0	0	0
Z. sinica PI 553019	0 0 1 0 0 0 1 1	1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1	0 0 1 0 0 0	0 1 1 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1 0 0	0	0 0 0 0 0	0	0
Z. macrostachya PI 553020	1 0 1 0 0 1 1 1	1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1	0 0 1 1 0 0	0 1 1 0 0 0 1 0 1	0 0 1 0 1 0 0	0	0 0 0 0 0	0	0
Z. japonica PI338366	0 0 1 0 1 0 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0	1 0 0 0 1 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0	0

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample \ Primer	OPD-1	OPD-2	OPD-3	OPD-4	OPD-5	OPD-6	OPD-7	OPD-8
DS 9-1	† 0	0 1 0 1 0 1 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 0 0 1 0	0	0 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1	1 1 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1
DS 11-2	0	0 1 0 1 0 1 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 0 0 1 0	0	0 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1	1 1 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1
DS 12-2	0	0 1 0 1 0 1 1 0 0 1	0 0 1 0 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 0 0 1 0	0	0 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1	1 1 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1
AnYang	0	0 1 1 1 0 1 0 0 1 0	0 1 1 0 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 0 0 0 0	0	1 0 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1	1 1 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 1
JangSung	0	0 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 0 0 0 0	0	1 0 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1	1 1 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0
SK	0	0 1 1 0 0 1 1 0 1 0	0 0 1 0 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 1 1 0 0	0	0 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 0	1 1 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0
Zenith	0	0 1 1 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 1 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 0 0 1 1	0	0 0 1 1 0 1 0 1 1 1 0 0	1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0
Z. korana	0	0 1 0 1 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1 1	0 0 0 1	1 0 0 1 0 1 0 1 0	0	0 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1	1 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0
Konhee	0	0 1 0 1 0 0 0 0 1 0	0 0 1 1 1 1	0 0 0 1	1 1 0 1 0 1 0 1 0	0	0 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1	1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0
Z. matrella PI 231146	0	1 1 0 1 0 1 1 0 0 0	1 0 0 1 1 1	1 0 1 0	1 1 0 1 0 1 0 1 0	0	0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 0	0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1
Z. matrella PI 264343	0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 1 1 1 0 0 1	0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 1
Z. sinica PI 553019	0	0 1 1 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 0 0	0 0 0 1	1 1 0 0 1 0 0 0 1	0	0 1 1 0 0 1 0 1 0 0 0 1	0 1 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 1 0
Z. macrostachya PI 553020	0	0 1 1 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0	0 1 0 0 1 1 1 1 1	0	0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0	0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 1
Z. japonica PI338366	0	0 0 0 0 1 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1 0	0 1 1 0	0 0 1 1 1 1 0 0 0	0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1 0 0

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample \ Primer	OPD-9	OPD-10	OPD-11	OPD-12	OPD-13	OPD-14	OPD-15	OPD-16	OPD-17	OPD-18
DS 9-1	† ₀	0	0 0 1 0 1 1 0 1 0	0 0	0 0 1 1 0 0 0 1 1	0	0 0 0 0 0 1 1	0 0 0 0	0	1 1 1 1 0 1 1 0 0 0
DS 11-2	0	0	0 0 1 0 1 1 0 1 0	0 0	0 0 1 1 0 0 0 1 1	0	0 0 0 0 0 1 1	0 0 0 0	0	1 1 1 1 0 1 1 0 0 0
DS 12-2	0	0	0 0 1 0 1 1 0 1 0	0 0	0 0 1 1 0 0 0 1 1	0	0 0 0 0 0 1 1	0 0 0 0	0	1 1 1 1 0 1 1 0 0 0
AnYang	0	0	1 1 1 0 1 1 0 0 0	0 0	0 0 1 1 0 0 1 1 1	0	0 0 0 0 0 1 1	0 1 0 0	0	1 1 1 1 1 1 0 0 1 1
JangSung	0	0	1 1 1 0 1 1 0 0 1	0 0	0 0 0 0 0 1 1 1 1	0	0 0 0 1 0 1 1	0 1 0 0	0	0 1 1 1 1 1 0 0 1 0
SK	0	0	1 1 1 0 1 1 0 0 1	0 0	0 0 0 0 0 1 1 1 0	0	0 0 1 0 0 1 1	1 0 1 1	0	0 1 1 1 1 1 0 0 0 0
Zenith	0	0	1 1 1 0 1 1 0 0 1	0 0	0 1 1 1 0 1 1 1 1	0	1 1 0 0 0 1 1	1 1 0 0	0	0 1 1 1 1 1 0 0 1 0
Z. koreana	0	0	1 1 1 0 1 1 0 0 1	0 1	0 1 1 1 0 1 1 1 1	0	0 1 1 0 0 0 0	1 1 0 0	0	0 1 1 1 0 1 0 0 1 0
Konhee	0	0	1 1 1 0 0 1 0 0 1	0 1	0 1 1 1 0 1 1 1 1	0	0 0 1 0 0 0 1	0 1 0 0	0	0 1 1 1 0 1 0 0 1 0
Zmatrella PI 231146	0	0	1 1 0 0 1 0 0 1 0	0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0	0 1 1 1 1 1 0 0 0 0
Zmatrella PI 264343	0	0	0 0 0 0 0 1 1 1 0	0 0	0 0 0 0 0 1 1 1 1	0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0	0 1 1 1 0 1 0 0 0 0
Z. sinica PI 553019	0	0	1 1 1 1 0 1 0 0 0	0 0	0 0 0 1 0 1 1 1 1	0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0	0 1 0 1 1 1 0 0 1 0
Z. macrostachya PI 553020	0	0	1 1 1 0 1 0 0 0 0	0 0	0 0 0 1 0 1 1 1 0	0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0	0 1 0 1 1 1 0 0 1 0
Z. japonica PI338566	0	0	0 0 1 0 1 0 1 0 1	1 0	1 0 0 0 1 1 1 1 0	0	0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0	0	0 1 0 1 0 0 1 1 0 1

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

sample	Primer	OPD-19	OPD-20
DS 9-1	†	0	0 0 0 0
DS 11-2	0	0	0 0 0 0
DS 12-2	0	0	0 0 0 0
AnYang	0	0	1 0 1 0
JangSung	0	0	0 1 0 0
SK	0	0	1 1 0 0
Zenith	0	0	0 1 0 0
Z. koreana	0	0	1 0 0 0
Konhee	0	0	1 0 0 0
Z. matrella PI 231146	0	0	0 0 0 0
Z. matrella PI 264343	0	0	0 0 0 0
Z. sinica PI 553019	0	0	0 0 1 0
Z. macrostachya PI 553020	0	0	0 0 0 0
Z. japonica PI338566	0	0	0 1 0 1

† 1은 band 존재, 0은 band 존재하지 않음.

<83>

<84>

<85>

PCR product 내 band 의 존재 유무에 따라 coding 을 했으며 NTSYSpc version 2.0 을 이용하여 근연관계를 분석한 다음 신품종 용천(Dragon Sky)과 다른 잔디들간의 상호 유전연관성을 비교한 결과 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종 3개체는 다른 Zoysiagrass류와 다른 품종으로 확인되었다.

<86>

실시예 7. 신품종 용천(Dragon Sky)의 대표종으로 선발된 계통과 같은 계통의 재 선발

<87>

RAPD 를 통해 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 같은 유전성을 가진 용천중지의 재연성 확인을 위한 연구를 하였다. 실시예 2의 시험포장 III의 9번 지역에서 sampling 한 것에서 35개의 용천중지 Genomic DNA extraction 을 했으며, 그 중 RAPD를 이용하여 9개체를 선발하였다. 선발된 9개체는 OPA-8와 OPA-10 primer 를 이용하여 RAPD를 분석하였고(도 5), 최종 재연성이 있는 3개체(DS 18, 20, 24) 선발하였다. 재연성을 통해 선발된 개체는 SCAR marker와 STS marker로 개발하는데 사용하였다.

<88>

실시예 8. 신품종 잔디 용천(Dragon Sky)의 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker 개발

<89> 8-1. OPA-8 primer를 이용한 마커개발

<90> 신품종 용천(Dragon Sky)에서 근연관계로 나타난 결과로 신품종 용천(Dragon Sky) 3 클론(DS 9-1, DS 11-2, DS 12-2)를 선발하였으며(실시예 4), 용천중지는 다른 잔디들[안양중지, 장성중지, SK중지, 건희, 제니스, 조이시아 코리아나(*Z. koreana*), 고려잔디(*Z. matrella*, PI231146, PI264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020), 및 들잔디(*Z. japonica*, PI 338566)]와 RAPD 를 통하여 비교를 하였다. 사용된 Operon Primer 는 OPA series, OPC series, OPD series 이며, 총 60개 Operon Primer (표 7)를 사용하여 RAPD를 진행하여 얻어진 PCR product 를 확인하였다.

<91> 60개의 Operon Primer 를 사용하여 그 중 SCAR marker 로 전환이 가능한 primer 를 선발했으며, OPA-8 의 primer 를 사용했을 때 용천 클론에서만 볼 수 있는 polymorphic band 를 확보할 수 있었기 때문에 OPA-8를 선택하였다.

<92> 위의 specific band를 agarose gel elution(Mega-spinkit, iNtRON), vector ligation (pGEM[®] T Easy Vector System I, Promega), transformation (JM 109 Competent Cells, Promega), miniprep (DNA-spin kit, iNtRON), sequencing (Big Dye[®] Terminator V1. 1, Applied Biosystems) 과정을 통해 specific band의 sequence를 확인하였다. Sequence 결과로 하기 표 9의 forward primer 와 reverse primer 를 각각 디자인하여 primer 를 합성하였다.

<93> [표 9] 용천중지 특이 염기서열 확인을 위한 primer 제작

RAPD primer	Sequence of RAPD primer (5' → 3')	Designed primer set	Size(bp)	Designed primer(5' → 3')
OPA-08	GTG ACG TAG G	OPA08-T7-SCAR	2354	GTG ACG TAG GTG AAG GCG TTG
		OPA08-SP6-SCAR		GTG ACG TAG GGT ATT ACG CCT CG

<94>

<95> PCR 반응액은 isolation DNA 1.5 μ l, 10X PCR buffer 2.5 μ l, dNTP 1.6 μ l, Taq polymerase (5 U/ μ l) 0.2 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, distilled water 17.2 μ l 을 사용하였다. 조건은 94℃ 에서 4분간 denature 후 94℃ 에서 30초, annealing temperature 45초(매번 온도와 시간을 변경하면서 진행), 72℃ 에서 1분간 extension 과정을 30회 반복 후 72℃ 에서 4분, 4℃ 로 PCR 반응을 종료하였다. PCR 반응 후 0.1% agarose gel 과 EtBr 을 이용해서 electrophoresis 을 시행하였으며, UV illuminator 을 통하여 결과를 확인하였다.

<96> OPA-8 primer 를 이용하여 신품종 용천(Dragon Sky) 고유의 SCAR marker 확보를 위해 디자인 한 primer 를 사용하였지만, SCAR marker 로 전환하지 못하였다. 그러나 OPA-8 primer 를 이용한 RAPD 에서 신품종 용천(Dragon Sky) 고유의 specific band 를 확인할 수 있었고(도 4), 향후 OPA-8 primer 를 사용한 RAPD 실험시 타 잔디류와 비교할 수 있는 용천중지 고유의 RAPD specific band (2354 bp)로 활용할 수 있다. 또한 OPA-8 primer 에서 얻은 RAPD Polymorphism fragment 는 sequencing 을 통하여 서열번호 2의 full sequence를 밝혔다.

<97> 8-2. OPW-2, OPZ-4 primer를 이용한 SCAR 마커개발

<98> 첫번째 시행한 RAPD (실시예 5)에서 사용한 Operon 10-mer primer 33개에서 신품종 용천(Dragon Sky)만의 polymorphic band가 있다고 판단이 되는 18개의 primer를 이용하여 RAPD를 다시 실험하였다(표 10).

[표 10]. SCAR marker로의 전환을 위해 사용한 Operon 10-mer primer

Operon primer No.			Sequence		
OPAD	2		5'-CTGAACCGCT-3'	3	5'-CAGCACCGCA-3'
OPAJ	12		5'-CAGTTCCCGT-3'	4	5'-AGGCTGTGCT-3'
OPC	15		5'-GACGGATCAG-3'	5	5'-TCCCATGCTG-3'
OPU	1		5'-ACGGACGTCA-3'	6	5'-GTGCCGTTCA-3'
OPV	2		5'-AGTCACTCCC-3'	7	5'-CCAGGAGGAC-3'
OPW	11		5'-CTCGACAGAG-3'	13	5'-GACTAAGCCC-3'
	2		5'-ACCCCGCCAA-3'	14	5'-TCGGAGGTTT-3'
				17	5'-CCTTCCCACT-3'
				19	5'-GTGCGAGCAA-3'

RAPD 에 사용된 신품종 용천(Dragon Sky)은 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 같은 계통을 재 선발한 실시예 7 의 신품종 용천(Dragon Sky, DS-18, DS-20, DS-24)를 사용했다. OPW-2 primer로 RAPD 진행시 사용한 잔디는 신 품종 용천(Dragon Sky, DS-18, DS-20, DS-24), 안양중지, 장성중지, SK중지(일명), Zenith, 고려단지(*Z. matrella*, PI 264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 및 들잔디(*Z. japonica*, PI 338566)를 사용하였고, OPZ-4 primer 로 RAPD 진행시 사용한 잔디는 용천(Dragon Sky, DS-18, DS-20, DS-24), 장성중지, SK중지(일 명), Zenith, 건희, 고려단지(*Z. matrella*, PI 264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 및 들잔디(*Z. japonica*, PI 338566)를 사용하였다. Phylogenetic relationship 을 분석하기 위해 RAPD 결과로 1과 0으로 coding 한 결과에서 OPZ-04가 가능성이 있어 이에대한 실험을 진행하였고, OPZ-04을 이용하여 얻은 PCR 산물에 서도 염기서열정보를 이용하여 최종적으로 SCAR marker 로의 안정된 분자마커로의 전환할 수 있었다.

결국 OPW-2, OPZ-4 primer 를 사용하여 polymorphic band 를 확보할 수 있었으며, 용천중지 고유의 SCAR marker 로 전환할 수 있었다. OPW-2 와 OPZ-4에서 얻는 polymorphic band 로 cloning 과 sequencing 을 통해 각각의 polymorphic band 의 sequence 를 알 수 있었으며, 표 11의 forward primer 와 reverse primer[서열번호 6(AGG CTG TGC TCA CCG CTT G) 및 서열번호 7(AGG CTG TGC TGC ATG CGG 의 SCAR 프라이머 세트), 서열번호 8(ACC CCG CCA AAT TGA CAC) 및 서열번호 9(ACC CCG CCA ACG TCC AGT C)의 SCAR 프라이머 세트]로 디자인하여 SCAR marker 전환 시 사용했다.

[표 11] 용천중지 특이 SCAR 마커 의 forward primer 와 reverse primer 염기서열

RAPD primer combination	Sequence of RAPD primer (5'→3')	SCAR primer set	Size (bp)	Sequence of SCAR primers(5'→3')	Annealing temperature (°C)	PCR condition †
OPZ-4	AGG CTG TGC T	SCAR3F	752 (서열번호 3)	AGG CTG TGC TCA CCG CTT G	63	60, 45, 90, 30
		SCAR3R		AGG CTG TGC TGC ATG CGG		
OPW-2	ACC CCG CCA A	SCAR1F	1244 (서열번호 1)	ACC CCG CCA AAT TGA CAC	62	60, 45, 90, 28
		SCAR1R		ACC CCG CCA ACG TCC AGT C		

† Denaturation time(sec), annealing time(sec), extension time(sec), the number of cycles

그 결과로 신품종 용천(Dragon Sky) 고유의 SCAR marker 2개를 확보할 수 있었으며(도 6 및 도 7) 2개의 SCAR markers 를 이용한 용천중지 specific 한 PCR products 에 대한 sequence 를 제시할 수 있었다. 또한 SCAR markers 를 이용한 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 PCR products 를 얻었다. 이 2개의 SCAR markers를 통하여 신품종 용천(Dragon Sky)이 타 잔디류와 다른 품종이라는 것을 검정할 수 있었다.

실시예 9. AFLP 분석 및 신품종 잔디 용천(Dragon Sky) STS (Sequence Tagged Sites) marker 개발

<108> 9-1. AFLP 분석

<109> 신품종 용천(Dragon Sky) 대표계통과 그 밖의 잔디품종들에서 genomic DNA 를 추출하여 AFLP 를 시행하였다. 신품종 용천(Dragon Sky)와 타 잔디종[안양중지, 장성중지, SK중지, 제니스, 조이시아 코리아나(*Z. koreana*), 건희, 고려잔디(*Z. matrella*, PI 231146, PI 264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020), 및 들잔디(*Z. japonica*, PI 338566)]은 genomic DNA를 추출 시 bulk로 추출했다. Restriction enzyme 으로는 EcoRI 과 MseI 을 이용하였으며, selective primer는 용천중지의 genome 크기를 감안하여 addition nucleotide를 3개 사용하였다.

<110> AFLP는 digestion, adaptor ligation, pre-amplification, selective amplification 을 순서대로 시행하였다. Digestion 은 5X reaction buffer (AFLP Core Reagent Kit) 5 μ l, restriction endonuclease (EcoR I / Mse I, AFLP Core Reagent Kit) 2 μ l, genomic DNA (300 ng) 2.5 μ l, distilled water 15.5 μ l 를 넣고, PCR 반응을 수행하였다. 조건은 37℃ 에서 2시간 30분, 70℃ 에서 15분을 한 후 바로 얼음에서 5분간 incubation 시켰다.

<111> Adaptor ligation은 digested DNA 25 μ l, adaptor ligation solution (AFLP Core Reagent Kit) 24 μ l, ligase(AFLP Core Reagent Kit) 1 μ l 를 20℃ 에서 3시간 incubation 시켰다. 반응 후 1/10으로 dilution 해서 pre-amplification 할 때 사용할 수 있게 했다.

<112> Pre-amplification 은 adaptor ligated DNA (1/10) 5 μ l, pre-amplification primer mix (AFLP Core Reagent Kit) 40 μ l, 10X Ex reaction buffer 5 μ l, Ex-Taq polymerase 0.2 μ l, distilled water 0.8 μ l 를 넣고 PCR 반응을 하였다. PCR 반응은 94℃ 에서 1분간 denature 후 94℃ 에서 30초, 56℃ 에서 30초 annealing, 72℃ 에서 1분간 extension 과정을 30회 반복 후 72℃ 에서 4분, 4℃ 로 PCR 반응을 종료한다. PCR 이 끝나면 selective amplification 을 하기 위해서 PCR 산물을 1/50로 dilution 했다.

<113> Selective amplification은 Pre-amp DNA (1/50) 2 μ l, AFLP selective primer E 0.6 μ l, AFLP selective primer M 0.6 μ l, dNTP 1.6 μ l, 10X PCR buffer 2.5 μ l, BSA (Promega, 10 mg/ml) 1 μ l, Taq polymerase 16.5 μ l 로 PCR 반응을 시작했다. AFLP 분석에 사용한 Adapter and selective primer sequences는 하기 표 12에 나타내었다.

<114> [표 12] AFLP 분석에 사용한 adapter 와 selective primer 염기서열.

Adapter sequence		
EcoR I	5'- CTCGTAGATGACTGCGTACC	
	CATCTACTGACGCATGGTTAA - 3'	
Mse I	5'- GACGATGAGTCCTGAG	
	ACTCAGGACTCAT - 3'	
Selective primer sequence		
EcoR I primer(E)	5'- GACTGCGTACC/AATTC - 3'	
E+AAC	Selective primer	Primer
		AAG
		ACA
		ACT
		ACC
		ACG
		AGC
		AGG
Mse I Primer(M)	5' - GATGAGTCCTGAG/TAA - 3'	
M+CAA	Selective primer	Primer
		CAC
		CAG
		CAT
		CTA
		CTC
		CTG
		CTT

<115>

- <116> PCR 반응은 94℃ 에서 1분간 denature 후 94℃ 에서 1분, 65℃ 에서 1분 annealing(각 cycle마다 1℃ 씩 온도가 낮아지게 프로그램 하였음), 72℃ 에서 1분간 extension 과정을 10회 반복 후 94℃ 에서 30초, 56℃ 에서 30초, 72℃ 에서 1분, 33회 반복했다.
- <117> AFLP product 는 5X TBE buffer 20 ml, 40% acrylamide 15 ml, Urea 42 g, ammonium persulfate 100 μ l, TEMED 100 μ l로 6% acrylamide gel 에서 electrophoresis 를 통해서 용천중지의 특이적인 밴드를 확인하였다. 1500~200V 로 2시간 30분 ~ 3시간정도 전기영동을 하고, Promega 의 SILVER SEQUENCE[®] Staining Reagents 를 이용하여 Silver staining 을 해서 band 확인을 하였다.
- <118> 신포종 용천(Dragon Sky) Polymorphism fragment 가 확인된 AFLP primer 조합에서 polymorphism fragment 를 isolation 하기 위해서 fragment 를 분리한 후 50 μ l 의 distilled water 에서 10분간 incubation 하였다. 15분간 boiling 한 후 3분간 원심분리 하였다. 원심분리가 끝난 다음 새로운 tube 에 상등액을 옮긴 후 3 volume 의 100% Ethyl alcohol 과 0.1 volume 의 3M Sodium acetate (pH 7.0) 을 넣어서 -20℃ 에서 overnight 하였다. overnight 가 끝난 후 14,000rpm 에서 10분간 원심분리를 하며, 상등액을 제거하고 100% Ethyl alcohol 의 volume 보다 더 많은 양의 차가운 70% Ethyl alcohol 을 넣고 14,000 rpm 에서 2분간 원심분리를 해 주었다. 상등액은 제거하고 상온건조 시킨 다음 최종 distilled water 10 μ l 에 녹여주었다.
- <119> Isolation 한 polymorphism DNA fragment 와 해당 fragment 가 나오게 한 primer 조합을 이용하여 PCR 을 수행 하였다. 반응은 polymorphism DNA fragment 5 μ l, primer A 0.6 μ l, primer B 0.6 μ l, dNTP 1.6 μ l, 10X PCR buffer 2.5 μ l, Taq polymerase (5 U/ μ l) 0.2 μ l, distilled water 14.5 μ l 으로 하였다. PCR 반응은 94℃ 에서 1분간 denature 후 94℃ 에서 30초, 56℃ 에서 30초 annealing, 72℃ 에서 1분간 extension 과정을 30회 반복 후 72℃ 에서 4분, 4℃로 PCR 반응을 종료하였다.
- <120> Polymorphism fragment 의 isolation 이 된 것은 agarose gel elution (Mega-spin kit, iNtRON), vector ligation(pGEM[®] T Easy Vector System I, Promega), transformation(JM 109 Competent Cells, Promega), miniprep(DNA-spin kit, iNtRON), sequencing(Big Dye[®] Terminator V1. 1, Applied Biosystems) 과정을 통해서 polymorphism fragment의 sequence를 확인하였다.
- <121> Sequence로 각각의 AFLP selective primer 조합에 따라 새로운 forward primer 와 reverse primer 를 각각 디자인 하여 primer를 합성하였다. 합성한 다음 PCR 조건 중 각각의 forward 와 reverse primer 별로 annealing temperature 를 조절하면서 STS marker 로 개발을 하였다. PCR 반응액은 isolation DNA 1.5 μ l, 10X PCR buffer 2.5 μ l, dNTP 1.6 μ l, Taq polymerase (5 U/ μ l) 0.2 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, distilled water 17.2 μ l 이다. PCR 조건은 94℃ 에서 4분간 denature 후 94℃ 에서 30초, annealing temperature (primer별로 온도 다름) 45초, 72℃ 에서 1분간 extension 과정을 30회 반복 후 72℃ 에서 4분, 4℃로 PCR 반응을 종료한다. PCR 반응 후, 0.1% agarose gel 과 EtBr 을 이용해서 electrophoresis 를 시행하였으며, UV illuminator 을 통하여 결과를 확인하였다.
- <122> 신포종 용천(Dragon Sky)중지 대표 계통인 9-1, 11-2, 12-2의 genomic DNA 를 extraction 하고, 그 밖의 잔디 종[안양중지, 장성중지, SK중지, 제니스, 조이시아 코리아나(*Z. koreana*), 건희, 고려잔디(*Z. matrella*, PI 231146, PI 264343), 갯잔디(*Z. sinica*, PI 553019), 왕잔디(*Z. macrostachya*, PI 553020), 들잔디(*Z. japonica*, PI 338566)]은 bulk 로 genomic DNA를 추출하였다. 그런 다음 Digestion, Adaptor ligation, Pre-amplification, Selective amplification 을 순서로 실험을 진행하였다. AFLP selective primer 는 총 31개 조합을 이용하였으며 그 sequence 는 표 13에 나타내었다.

[표 13]. AFLP 분석에 사용한 Adapter and selective primer sequences

AFLP Primer combination No.	AFLP Primer combination	AFLP Primer combination No.	AFLP Primer combination
1+1	E+ AAC / M+ CAA	3+1	E+ ACA / M+ CAA
1+2	E+ AAC / M+ CAC	3+2	E+ ACA / M+ CAC
1+3	E+ AAC / M+ CAG	3+3	E+ ACA / M+ CAG
1+4	E+ AAC / M+ CAT	3+4	E+ ACA / M+ CAT
1+5	E+ AAC / M+ CTA	3+5	E+ ACA / M+ CTA
1+6	E+ AAC / M+ CTC	3+6	E+ ACA / M+ CTC
1+7	E+ AAC / M+ CTG	3+7	E+ ACA / M+ CTG
1+8	E+ AAC / M+ CTT	3+8	E+ ACA / M+ CTT
2+1	E+ AAG / M+ CAA	4+1	E+ ACT / M+ CAA
2+2	E+ AAG / M+ CAC	4+2	E+ ACT / M+ CAC
2+3	E+ AAG / M+ CAG	4+3	E+ ACT / M+ CAG
2+4	E+ AAG / M+ CAT	4+4	E+ ACT / M+ CAT
2+5	E+ AAG / M+ CTA	4+5	E+ ACT / M+ CTA
2+6	E+ AAG / M+ CTC	4+6	E+ ACT / M+ CTC
2+7	E+ AAG / M+ CTG	4+7	E+ ACT / M+ CTG
2+8	E+ AAG / M+ CTT		

AFLP 후 primer 조합 1-2에서는 4개, 1-3는 2개, 1-4는 2개, 1-5는 4개, 1-6은 2개, 1-7은 4개, 2-3은 5개, 2-4는 1개, 3-2는 1개, 4-4는 1개, 4-7은 2개의 polymorphic fragments 가 확인이 되었다. 총 31개의 primer 조합 중 11개의 primer 조합에서 28개의 polymorphic fragments 를 얻었으며, 추가로 1-6, 1-7, 2-3는 AFLP 를 한 번 더 반복해서 실험하였고 1-6은 1개, 1-7은 1개, 2-3은 5개의 polymorphic fragments 를 추가로 얻을 수 있었다(도 8).

9-2. AFLP 분석 후 polymorphic fragment를 이용한 STS marker의 개발

35개의 polymorphic fragments 에 대한 isolation을 한 다음 PCR 을 통해 각각의 polymorphic fragment 의 size 를 확인하였다. Polymorphic fragment 를 size 확인 후 cloning 과 sequencing 을 하였다. 실험 결과가 좋지 않는 30개의 polymorphic fragments 를 제외하고 STS marker 로 전환하기 위하여 프라이머를 디자인하였다 (표 14).

[표 14]. STS 프라이머

AFLP primer combination	STS primer set	Full size(bp)	Sequence of STS primers(5' → 3')
E+ AAC / M+ CAG	STS 1-3-1S	204	GAA AAG TTC TAC TAG AAG ATG GG
	STS 1-3-1E		CCC AGA TGA TTC GTT GAC C
	STS 1-3-2S	204	GAA AAG TTC TAC TAG AAG ATG GG
	STS 1-3-2E		CCA GAT GAT TCG TTG ACC TC
E+ AAG / M+ CAG	STS 2-3-2S	200	ATT CTC AAA TGG AAA GGA GTA CTG
	STS 2-3-2E		GCT AGT GGC TCT TTG CTC G
E+ ACT / M+ CTG	STS 4-7-1S	258	GAA TGA TAA CAT GCT CCG AC
	STS 4-7-1E		CAT CCT GTA GTC CCT TTT AG
	STS 4-7-2S	257	CAA GAA TGA TAA CAT GCT CCG
	STS 4-7-2E		CAT CAT GTA GTC CCT TTT AG

표 14의 STS 프라이머에 관하여 예를 들어 STS 4-7-1에 대해 설명한다. Full size를 찾기 위한 방법으로서 polymorphic fragment 에 있는 E+ACT/M+CTG 의 sequence 를 보고 찾는 것이다. 258 bp가 바로 polymorphic fragment 의 full size이다. 그런데, STS 4-7-1과 STS 4-7-2 는 똑같은 E+ACT/M+CTG AFLP primer combination

이 같다. 따라서 STS primer set을 같은 sequence로 짤 수가 없다. 따라서, full sequence 내에서 primer set을 다시 디자인한다. 그리고 PCR 후 sequence를 보고 기대하였던 size (즉 full size 내에서 primer를 제작했기 때문에 당연히 size가 작아진다.)가 나왔으면 그것을 보고 STS marker로의 전환이 가능한 primer 제작이 되었다라고 결론을 내릴 수 있다. 본 발명에서 Gel 상에서는 190 bp의 size 사진이 나왔고, 도 10과 11에 나타내었다.

<131> 전환된 STS markers를 이용하여 annealing temperature와 time을 조절하면서 PCR을 수행하였고, 최종적으로 E+ACT / M+CTG(primers : 서열번호 8의 STS 4-7-1S, 서열번호 9의 STS 4-7-1E)와 E+ACT / M+CTG(primers : 서열번호 11의 STS 4-7-2S, 서열번호 12의 STS 4-7-2E)에서 STS marker를 확보했다. PCR의 annealing temperature는 52.5℃이며 45초 동안 30 cycle을 반응시켰다.

<132> 그 결과 STS 4-7-1S/STS 4-7-1E에서는 190bp 크기의 서열번호 10의 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 PCR products를 볼 수가 있었으며, STS 4-7-2S/STS 4-7-2E에서는 192bp 크기의 서열번호 13의 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 PCR products를 확인하였다(도 9). 이상의 결과에서 AFLP에서 polymorphic DNA fragment는 STS marker로 전환이 가능한 것을 확인할 수가 있었다. 따라서 신품종 용천(Dragon Sky)는 타 잔디류와 확연하게 다른 신품종 용천(Dragon Sky) 고유의 STS markers를 가질 수 있게 되었으며 타 잔디류와 다른 계통임이 증명되었다.

산업이용 가능성

<133> 본 발명에 따르면 기존 한국 잔디에 사용되지 않았던 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 분석을 실시하여, 기존의 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석에 비해 훨씬 더 세밀한 genotyping을 할 수 있다.

<134> 또한 본 발명에 따르면 한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky)에 RAPD를 이용한 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker와 AFLP를 이용한 STS(Sequence Tagged Sites) marker를 제작하고, 상기 제작한 마커를 이용하여 신품종 용천(Dragon Sky)에 대한 품종선별에 정확성을 기할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<135> 도 1은 신품종 용천(Dragon Sky) 34개 클론의 첫 번째 RAPD products로 Binomial matrix를 작성하여 용천종지간의 phylogenetic relationship을 본 사진이다.

<136> 도 2는 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 3개 클론과 타 품종간의 RAPD products 비교로서 OPW-2에서 용천 특이적 RAPD marker를 확보한 사진이다.

<137> 도 3은 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 타 품종간의 RAPD products로 Binomial matrix를 작성하여 phylogenetic relationship을 본 사진이다.

<138> 도 4는 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 다른 품종간의 RAPD product 비교로서 OPA-08 primer를 사용하였을 때 용천 특이적 Polymorphic product를 확보한 사진이다.

<139> 도 5는 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 3개 클론과 타 품종간의 RAPD products 비교로서 OPW-2와 OPZ-19 primer에서 삼덕 특이적 RAPD marker를 확보한 사진이다.

<140> 도 6은 SCAR marker를 이용하여 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 타 잔디류와 비교한 사진이다.

<141> 도 7은 SCAR marker를 이용하여 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 타 잔디류와 비교한 사진이다.

<142> 도 8은 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 대표종과 다른 품종간의 AFLP 한 결과에서 용천 고유의 polymorphic AFLP fragments를 isolation한 사진이다.

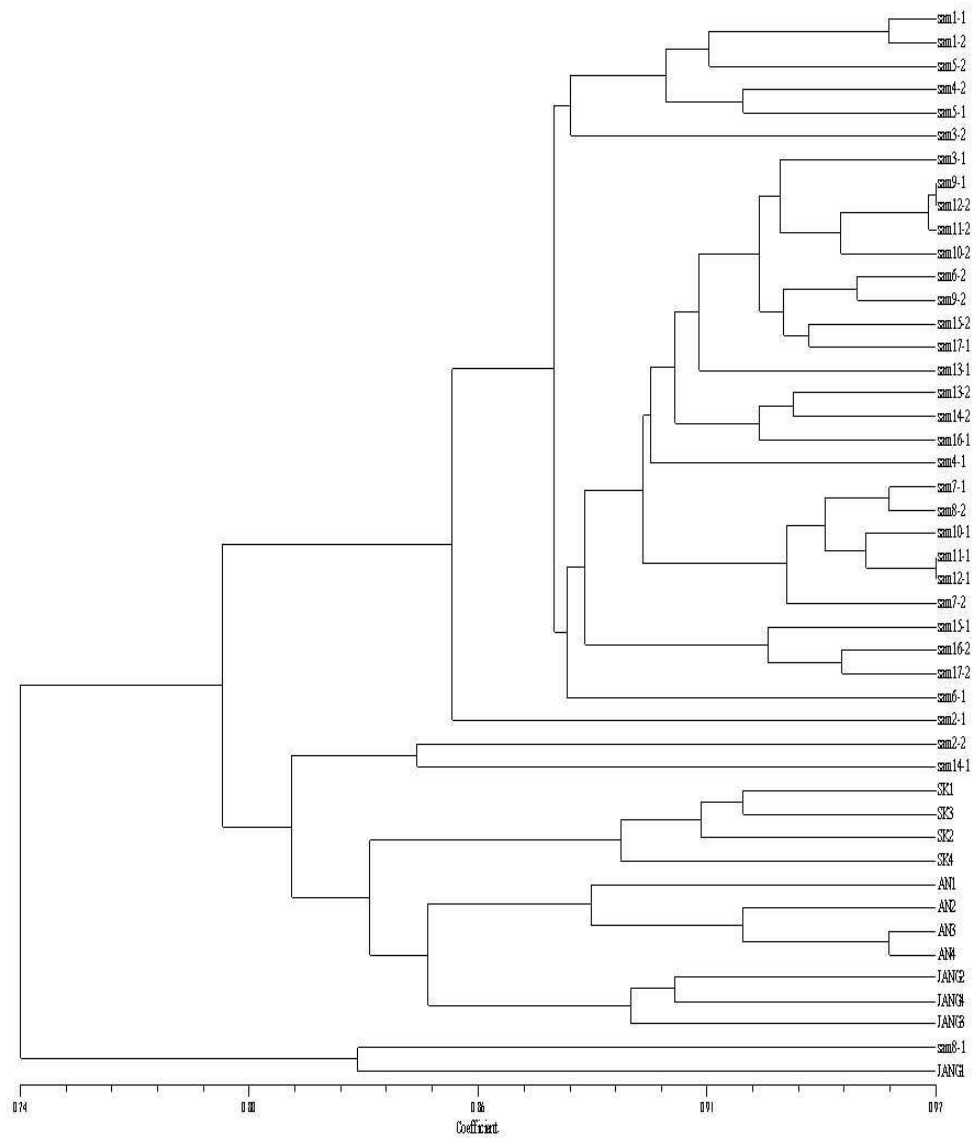
<143> 도 9는 선발된 신품종 용천(Dragon Sky) 특이적인 STS marker를 이용한 용천종지 특이적인 PCR products를 나타내는 사진이다.

<144> 도 10은 프라이머 STS 4-7-1S 및 STS 4-7-1E 조합으로 수행한 PCR 반응의 산물의 서열과 그 주변서열을 나타낸다.

<145> 도 11은 프라이머 STS 4-7-2S 및 STS 4-7-2E 조합으로 수행한 PCR 반응의 산물의 서열과 그 주변서열을 나타낸다.

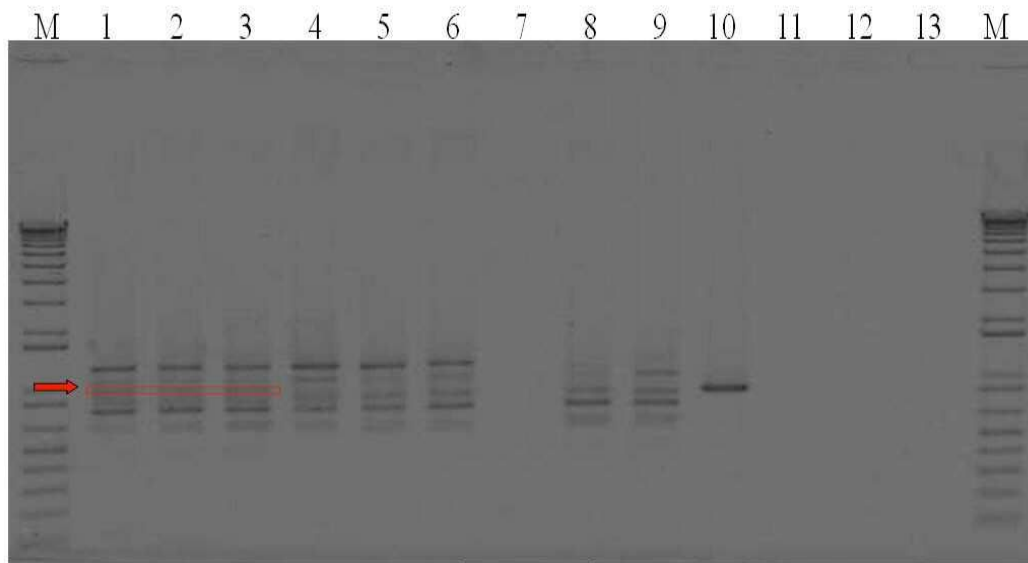
도면

도면1



sam : SamDeok Zoysiagrass, SK : SK Zoysiagrass , AN : AnYang Zoysiagrass, JANG : JangSung Zoysiagrass

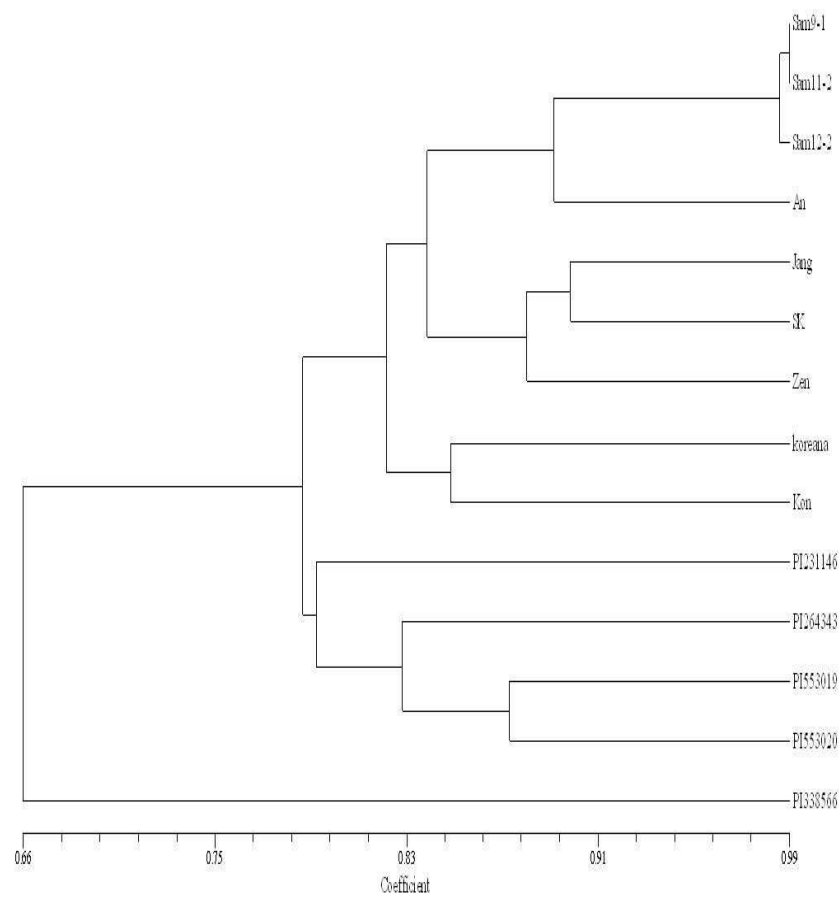
도면2



OPW-2

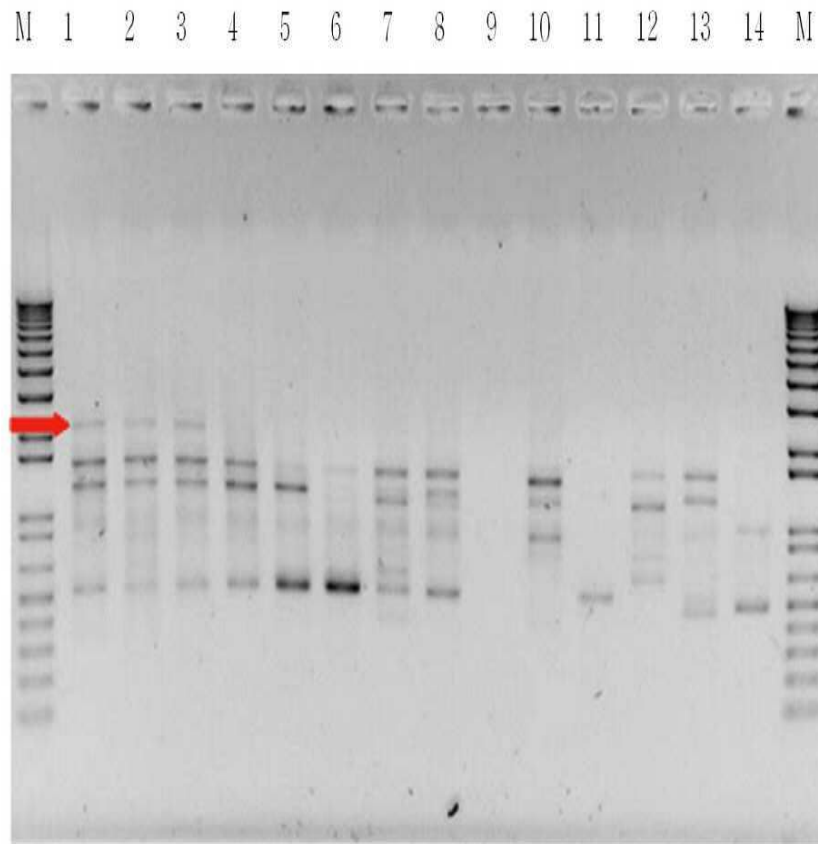
lane 1 : 용천증지 9-1	lane 8 : 조이시아 코리아나(<i>Z. koreana</i>)
lane 2 : 용천증지 11-2	lane 9 : 건희
lane 3 : 용천증지 12-2	lane 10 : 고려잔디(<i>Z. matrella</i> , PI 231146)
lane 4 : 안양증지	lane 11 : 고려잔디(<i>Z. matrella</i> , PI 264343)
lane 5 : 장성증지	lane 12 : 갯잔디(<i>Z. sinica</i> , PI 553019)
lane 6 : SK 증지	lane 13 : 왕잔디(<i>Z. macrostachya</i> , PI 553020)
lane 7 : 제니스	M : 1Kb DNA Ladder

도면3



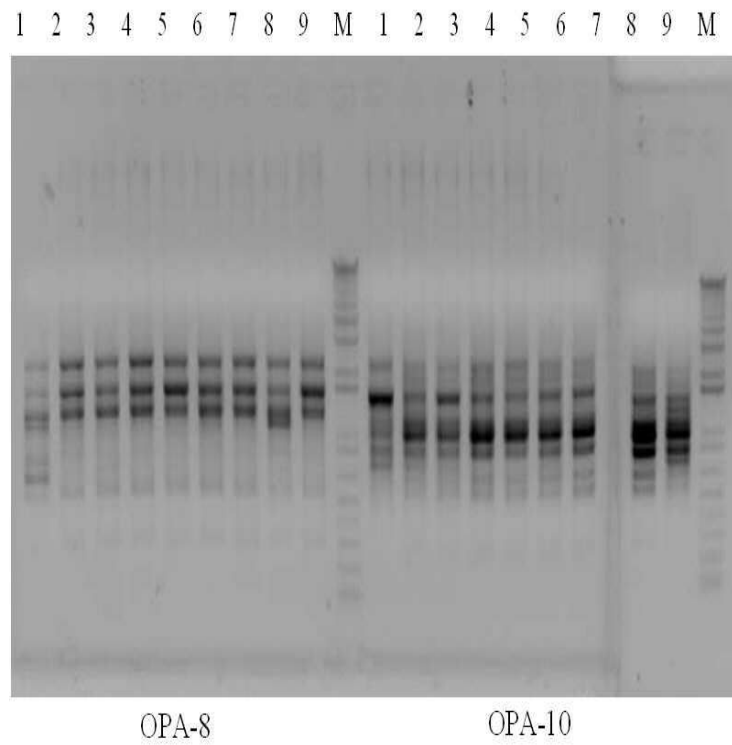
Sam : SamDeok Zoysiagrass, SK : SK Zoysiagrass , An : AnYang Zoysiagrass, Jang : JangSung Zoysiagrass, Zen : Zenith, Koreana : Z. Koreana, Kon : Konhee Zoysiagrass, PI 231146 : Z. matrella, PI 264343 : Z. matrella, PI 553019 : Z. sinica, PI 553020 : Z. macrostachya, PI 338566 : Z. japonica

도면4



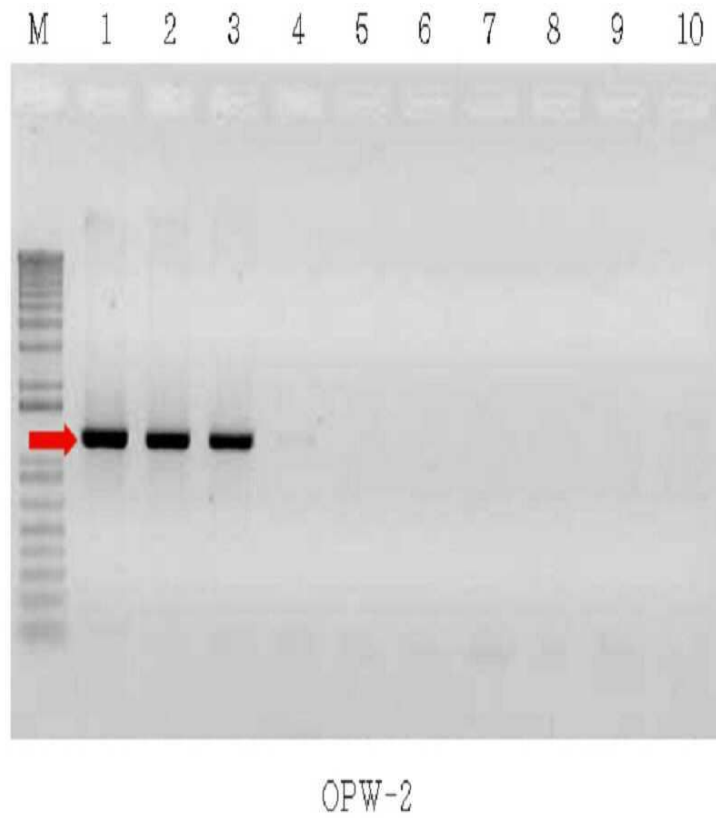
Lane 1 : Dragon Sky 9-1, lane 2 ; Dragon Sky 11-2, lane 3 ; Dragon Sky 12-2, lane 4 : AnYang, lane 5 : JangSung, lane 6 : SK, lane 7 : Zenith, lane 8 : *Z. koreana*, lane 9 : KonHee, lane 10 : *Z. matrella*(PI 231146), lane 11 : *Z. matrella*(PI 264343), lane 12 : *Z. sinica*(PI 553019), lane 13 : *Z. macrostachya*(PI 553020), lane 14 : *Z. japonica*(PI 338566), M : 1Kb DNA Ladder

도면5



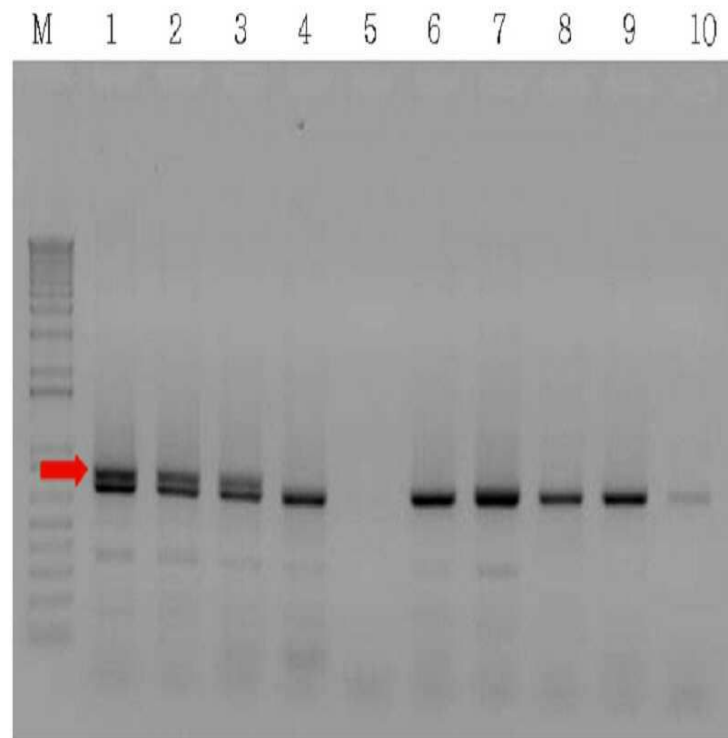
Lane 1 : DS 4, Lane 2 : DS 5, lane 3 : DS 11, lane 4 : DS 18, lane 5 : DS 20, lane 6 : DS 23, lane 7 : DS 24, lane 8 : DS 27, lane 9 : DS 29, M : 1Kb DNA ladder

도면6



Lane 1 : Dragon Sky-18, lane 2 : Dragon Sky-20, lane 3 : Dragon Sky-24, lane 4 : AnYang, lane 5 : JangSung, lane 6 : SK, lane 7 : Zenith, lane 8 : *Z. matrella*(PI 264343), lane 9 : *Z. sinica*(PI 553019), lane 10 : *Z. japonica*(PI 338566)

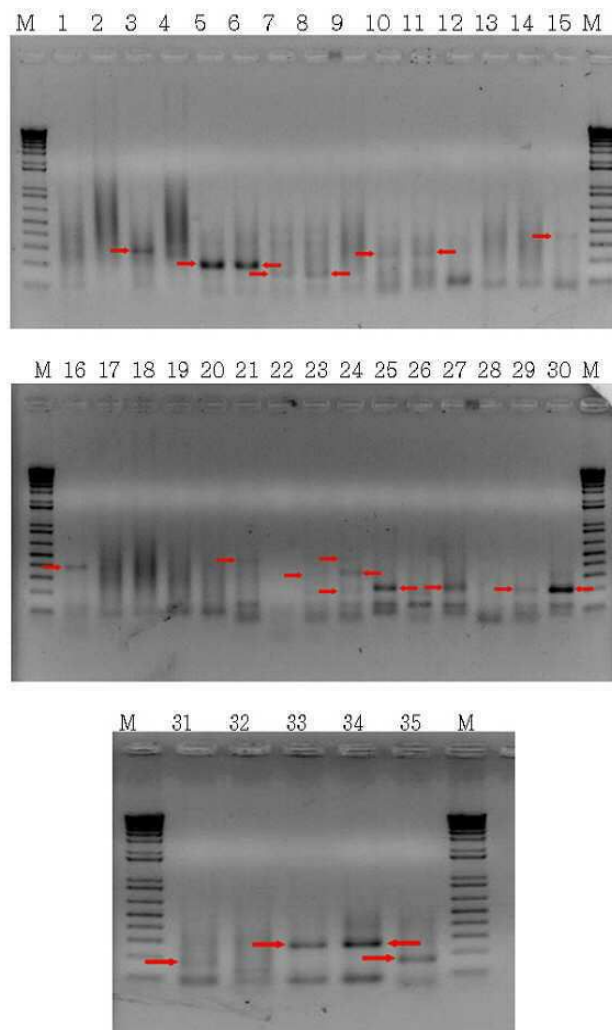
도면7



OPZ-4

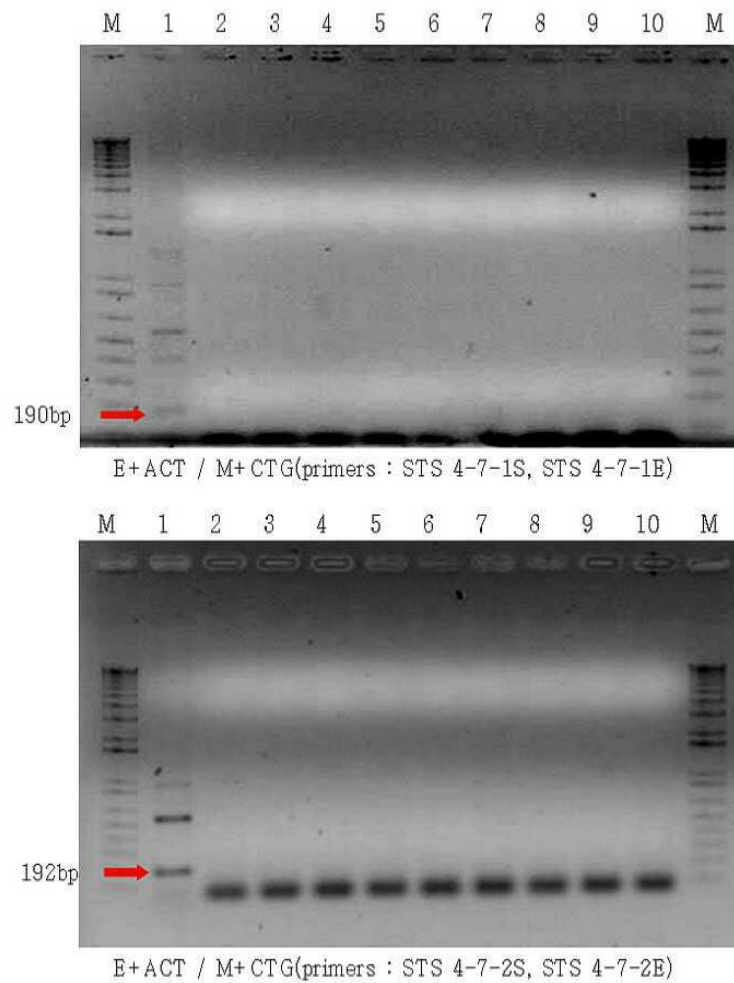
Lane 1 : Dragon Sky-18, lane 2 : Dragon Sky-20, lane 3 : Dragon Sky-24, lane 4 : JangSung, lane 5 : SK,
lane 6 : Zenith, lane 7 : KonHee, lane 8 : *Z. matrella*(PI 264343), lane 9 : *Z. sinica*(PI 553019), lane 10 : *Z. japonica*(PI 338566)

도면8



Lane 1~4 : E+ AAC / M+ CAC-1, 2, 3, 4, lane 5~6 : E+ AAC / M+ CAG-1, 2, lane 7~8 : E+ AAC / M+ CAT-1, 2, lane 9~12 : E+ AAC / M+ CTA-1, 2, 3, 4, lane 13~14 : E+ AAC / M+ CTC-1, 2, lane 15 : E+ AAC / M+ CTC(반복), lane 16~19 : E+ AAC / M+ CTG-1, 2, 3, 4, lane 20 : E+ AAC / M+ CTG(반복), lane 21~25 : E+ AAG / M+ CAG-1, 2, 3, 4, 5, lane 26~30 : E+ AAG / M+ CAG-1, 2, 3, 4, 5(반복), lane 31 : E+ AAG / M+ CAT, lane 32 : E+ ACA / M+ CAC, lane 33~34 : E+ ACT / M+ CTG-1, 2, lane 35 : E+ ACT / M+ CAT

도면9



Lane 1 : Dragon Sky, lane 2 : AnYang Zoysiagrass, lane 3 : JangSung Zoysiagrass, lane 4 : SK Zoysiagrass, lane 5 : Zenith, lane 6 : Konhee Zoysiagrass, lane 7 : *Z. matrella*(PI 231146), lane 8 : *Z. matrella*(PI264343), lane 9 : *Z. sinica*(PI 553019), lane 10 : *Z. macrostachya*(Pi553020)

도면10

E+ ACT / M+ CTG (primers : STS 4-7-1S + STS 4-7-1E)

```

1 GACTGCGTACCAATTCCTCAGAACTAACAAGAATGATAACATGCTCCGA 50
51 CTTGAGCAGTTTAGGAACTGCTGGAAGGCTCTAGGGGAATAAAGATGGAA 100
101 TGACTTCTAATGTTTAGGTCCGTATGATTTGAAATACTTGCACATAGACC 150
151 GCACAAAAGCGTTCCTGGAAATCTCAGCCCCAAAAAGGACGTTTCTAGTAAT 200
201 TCTAAAAGGGACTACAGGATGAAAAACAATAGTTTTGGCAGTTACTCAGG 250
251 ACTCATCA 258
    
```

도면11

E+ ACT / M+ CTG (primers : STS 4-7-2S + STS 4-7-2E)

```

1 GACTGCGTACCAATTCCTCAGAACTAACAAGAATGATAACATGCTCCGA 50
51 CTTGAGCGATTTAGGAACTTCTGGAAGGCTCTAGGGGAATAAAGATGGAA 100
101 TGACTCAAATTTTTAGGTCCGTATGATTTGAAATACTTGCACACAAACCG 150
151 CGAGAAAAGCGTTCCTGGAAATCTCAGCCCCAAAAAGGACGTTTAGTAATT 200
201 CTAAAAGGGACTACATGATGAAAAACAATAGTTTTGGCAGTTACTCAGGA 250
251 CTCATCA 257
    
```

서 열 목 록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> A molecular genetic marker specific to novel grass species Dragon Sky
- <160> 13
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1244
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OPW2 RAPD Polymorphic Fragment

<400> 1

accccgccaa attgacacta agtgccatta tatactccac gagccgtcac accacacgtg	60
gccgcgtacg tctcgttcta ttgtgatgca tactactgca acgaatctcc acggggccccg	120
accgcacagc caaaagctag gccgatctcc ctgacctct cccgttgccg accggaccgg	180
ccgattcccc cggtagagacg gagaccaca cacgcacaga cgaaggccgc aagccaatag	240
atgcggctg gcggcaggca ctatgatctc cgtggatacg tcgcacatgc gtcgggatcc	300
attgatcagg tcccatcg ctgcgagatc tgcagtacag ttagcaacc tgaatacccc	360
gtccctgttc ccattcgtgc aagcggacga attcgtagta ctagtagtat ctacgcagc	420
gccctgcgcg ccgcacgtc cactgactgg ggacactacc gtcctgtac agtaaagcct	480
ggccatctac gacgttgaca tctgcctgt gagtgagcga gtgtgagagc cttttgacta	540
ccgcctggcc tgaggtctcg acggatcgtg atgaaaggca ggttgccatc ggagagaaaa	600
gtccatcaa ccaggcgaac gcgcgggcgc ccgcgatcgc gcggggatag acacgtcag	660
gtcgtgccgc gcgttttatt tagcagctcc gtctctact cgccagtcgc cacagcccat	720
ccatatcgcg tcgccgtgtg tggccggttg tggatggggt tggcaggcaa agcggcagcg	780
accaaccga cggagagagg gaggcggagg cggtagtcgc ctttgtgggc cgaggacgt	840
aataatgcgg ggtttttgc gcggtgacgc gcgcgagcac tagcaggcag ctctccccga	900
agcccacgac gcgcggcgtg ggacctctc tcggcccggc aagttgccgc aatttttccc	960

ctccctctc cctgtcgccg ggcagcagtc gcgtcgccg cggtgctttg gtccgcccg 1020

gtgccacgaa cggcgaccaa atgcttagcc cctaagcaag gaagcgccgc aggtggatgg 1080

ccgggctgct gtctcgctc acttacatcg cgcggccggc cgcgcgtcat gcaacacatc 1140

cggatccgga tgcgcgatga actcatgcgt tttccgttc gttcattggg tattcgctcc 1200

tggtgccttt tggttaactg gatgggactg gacgttggcg gggt 1244

<210> 2
 <211> 2354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> OPA_08 RAPD Polymorphic Fragment

<400> 2
 gtgacgtagg tgaaggcgtt gatgacgtcg gcgtcgctga cgtctcgag ctgcttttc 60

ttgcgcgaaa atcgctgaat gtagctcag agggactcac cgggcttctg ttgtaatc 120

tacagatctc aggacgtacc cgggcgggta taggtcctct ggaagtggc gatgaaggca 180

caacgaaggt ccaccagtc gtggatgctg tcctcggaa ggtgttcgag ccacctctg 240

gccgaatcgg acaggaagag cagcaggtac tggatggcga agaggtggtc ggcgccaccg 300

gtcggcatg caggcaata gtcctcgagc cagtgggcgg gaattgtctc agcagtgtac 360

cggatgatgt tggttggagc gcggaacttg tcagggaagc cggctcttct gatgcgggcc 420

tcgaacgtc gaggtccgat gtcctcgagg ccgagggttc aagcgtcgtc gtagctgtgc 480

cgctcaggac gtcgctcgaa ggatcggtcg cggccggagt cggagtggcg gtcactcctg 540

gcacgccttc gtgcctcgat ggtgtgacga gcgtcacggt gtcccccaa gcggtagcgg 600

atgttgccga ccgagtggc gggttttcgt gtctcagagt cctgacgaag tgatagtctg	660
ggttgttgca gagtgccatc aaggtagacg cggagacgat cgtaagtctc cttgaggaca	720
ggttttgtca gggtggggag actcataaag gatgcaggcc gctgtcgcta gattctcgta	780
tggcgatca aaggaaggcg taccaccgtc catgatctgc tgatgagcag tgcgggctcg	840
ggcttgggca ccaccgctcg tcgcggcgac acccttactg gtatggcagt ggctgatccc	900
gatctttcga tgagaggagg atagcttcga ttgggggtgg atacgacgtt ggctgtccga	960
ctacaacaac caacagggtt gctgcgcctt agcaacaggt acaccggctc cgatttgttg	1020
ttgttcttgc tgtgccaaga acaacctga acctgcgagc aaccgagaac aagcaagaac	1080
aagacgaaca ggtagacaac tcacagatct ggatataatc acgaaattgg ggttctgaat	1140
caagcaaatc ggggtggtctc gtcgacacac gcgtttacaa ggaagtagct aaggctaaac	1200
ttgcatctga acaaaaccca ccctcaaatg acggctgcca caggtttata tagtggaag	1260
acgtcctgga ggcgtggggg gactcaaacc ctaacttaga gagggccctt aatgggctaa	1320
actggataca atgggcctca gcccacgact gggggtccga acgcctttct gacgtttctg	1380
atcacgtcta gaggagttag aagctgagat tggaccatc tgaaagtaga ctttgagatc	1440
tttctatga gtactcattt gccttcaaca acttccggag tgaaaagttag tgaccgaaac	1500
aatccagccc tgattgatgg tccgatcctg ctttatggc ctggtgctcc tcccagttc	1560
ccaatcataa caaaatcacc acaaggattt agtagtacc cattctgaga agaactacta	1620
tagacagtga gaaatgactt gacctgataa ttaagttgac gcgctcgagc tcgtgtcatg	1680
ggctcttctt gtgcaattgg ttgtgtgtg tctgtggaag tgatgtctc atcaattacc	1740
cttcaaatcg cccccggtcg taagtttgcg tcggagtgcg tactcaatca cagtgagagc	1800

gcgatggtgt ggagaaggat cgtcatgtgc tgccttgccg cgggtttcgt cctgtgcggc	1860
tttggcatgc aacatgaagc actcacggga agggctcgtgg cccaacacgc tgtgaggcaa	1920
agaacgaaga agacggcgtc gaggaagcg acgtttaggt aaacgccgt ttcgcgagat	1980
ctaaaggtag aggtcgtcgc cgttgtcggc gacgaagtcc gggctcccga agcgggaaggc	2040
ctggcttgca gcgaaatgg gtatgttcca cgatcgaccg tcacgggcga tggcaaccgc	2100
aaaatccccg aaaaacagtc gagagatgga ggaatcttcg actaaagcga aaatcgaagc	2160
catcgaaca acgagtgaac acgaaccgaa aaccctacc tggcatgcca actgttggtg	2220
tttcgtacac gaacacagta aattttatat gatcggacgg gggatcgtgc atttccggaa	2280
tcgagttagt ctacaagcga gactcaaagg ttagcccgat tcgggccacc tcgagcgta	2340
ataccctacg tcac	2354

<210> 3
 <211> 752
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> OPZ_4 RAPD Polymorphic Fragment

<400> 3 aggctgtgct caccgcttgt gcgaatcatc atgggggttt ctaccacgc caaccgtat	60
actactggct tgatgaacc ggctgtcga tgtactcttt tttttaaat tgttgcgtc	120
gttgatttca aacttcaact ttaatcattc gttttatata aaaattaatt caaatattta	180
aaattataac ttgaattct aactactttg ataataaagc aaattataat aaaatatata	240

atattcatca aactttttta aataaaacga atggtcaaaa ttgatgtttg attttaaaaa	300
cggagggagt atgttattag gctgtcccaa gggtcatca tatttccatg caccgtgaca	360
agaatttctt cggcatgcgt agcaggaatg atgtaaataa gtatacctaa gttagcctct	420
gaacctcttt aattttataa aatgaattag ttctcaaaa gttaaagaaa ttagaaaact	480
taatttatgt ttigaactta aaagttaga ggataacatt atgatctcta gtttacacc	540
tatgcatgtg ccgtttacgt acctacctac tctacttagg aggatttgct tggtgcaaga	600
aactcaactc caacaaatat ttaatttgtg tcgtgatgag tagagtggaa aaatgttctg	660
aacgttcagc aaatgtttct cgagctccaa accctccttt tggcgctac aaaagcgttc	720
gcggtttgac acacccgcat gcagcacagc ct	752

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4	
accccgccaa attgacac	18

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 5	
accccgccaa cgtccagtc	19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6
 aggctgtgct caccgcttg 19

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 aggctgtgct gcatgcgg 18

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 8
 gaatgataac atgctccgac 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

catcctgtag tcccttttag

20

<210> 10

<211> 190

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR product

<400> 10

gaatgataac atgctccgac ttgagcagtt taggaactgc tggaaggctc taggggaata

60

aagatggaat gacttctaata gtttaggtcc gtatgatttg aaatacttgc acatagaccg

120

cacaaaagcg ttcttggaat tctcagccca aaaaaggacg ttcagtaatt ctaaaaggga

180

ctacaggatg

190

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

caagaatgat aacatgtcc g

21

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

catcatgtag tcccttttag

20

<210> 13

<211> 192

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR product

<400> 13

caagaatgat aacatgctcc gacttgagcg atttaggaac ttctggaagg ctctagggga

60

ataaagatgg aatgactcaa attttaggt ccgtatgatt tgaaatactt gcacacaaac

120

cgcgagaaaag cgttcctgga aatctcagcc caaaaaagga cgtttagtaa ttctaaaagg

180

gactacatga tg

192