

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0044663 (43) 공개일자 2016년04월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01)	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)	
(21) 출원번호 10-2014-0139084		
(22) 출원일자 2014년10월15일	(72) 발명자	
심사청구일자 2014년10월15일	최병희 서울 양천구 목동동로 100, 1313동 504호 (신정동, 목동신시가시아파트13단지)	
	최인수 경기 부천시 오정구 소사로 835, 3동 407호 (원종동, 동문아파트)	
	(74) 대리인 김순웅	

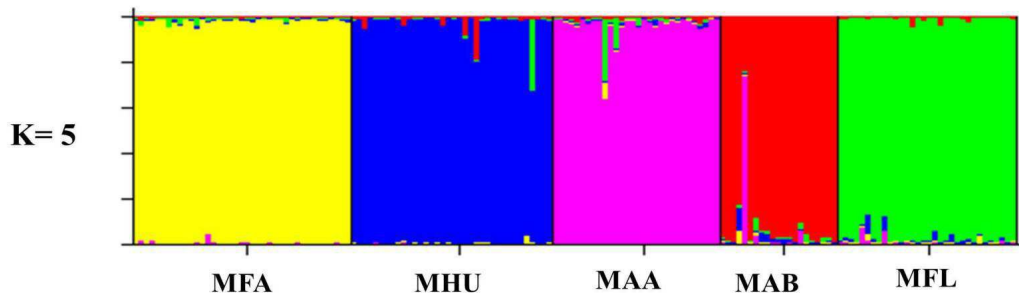
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 솔비나무의 판별 방법

(57) 요약

본 발명은 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커 조성물, 이를 포함하는 솔비나무 판별용 조성물, 키트 및 이를 이용한 솔비나무의 판별방법에 관한 것이다. 본 발명의 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 증폭하는 프라이머 세트를 이용하여 솔비나무의 DNA 다형성을 효과적으로 검출할 수 있고, 유전적으로 유연관계가 깊은 다른나무 속 중간 구분이 가능하여 정확하게 솔비나무를 판별할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커는 솔비나무의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있으며, 솔비나무의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입 시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있다. 또한, 이는 솔비나무의 염색체 지도작성 및 새로운 유용 유전자의 동정은 물론, 유전 육종 및 분자생물학적 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A2A01011428

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업-핵심연구

연구과제명 한반도 온대요소 식물 종들의 분류와 분자계통지리

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1; 서열번호 2; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 6; 서열번호 7; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 서열번호 11; 서열번호 12; 서열번호 13; 서열번호 14; 및 서열번호 15으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 염기서열을 포함하는 솔비나무(*Maackia fauriei*) 특이적 마이크로세틀라이트 마커(microsatellite marker) 조성물.

청구항 2

서열번호 16 및 17; 서열번호 18 및 19; 서열번호 20 및 21; 서열번호 22 및 23; 서열번호 24 및 25; 서열번호 26 및 27; 서열번호 28 및 29; 서열번호 30 및 31; 서열번호 32 및 33; 서열번호 34 및 35; 서열번호 36 및 37; 서열번호 38 및 39; 서열번호 40 및 41; 서열번호 42 및 43; 서열번호 44 및 45; 로 표시되는 염기서열 쌍으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 솔비나무 판별용 프라이머 세트.

청구항 3

제2항의 솔비나무 판별용 프라이머 세트에 의하여 증폭되고, 서열번호 1; 서열번호 2; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 6; 서열번호 7; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 서열번호 11; 서열번호 12; 서열번호 13; 서열번호 14; 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 염기서열, 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 솔비나무 판별용 프로브.

청구항 4

제1항의 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물; 제2항의 솔비나무 판별용 프라이머 세트; 또는 제3항의 솔비나무 판별용 프로브를 포함하는, 솔비나무 판별용 조성물.

청구항 5

제1항의 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물; 제2항의 솔비나무 판별용 프라이머 세트; 또는 제3항의 솔비나무 판별용 프로브를 포함하는, 솔비나무 판별용 키트.

청구항 6

- 1) 시료의 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- 2) 상기 1)단계에서 추출된 DNA를 주형으로 하고, 제2항의 프라이머 세트를 이용하여 표적서열을 증폭하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 증폭된 산물의 대립유전자를 검출하여 유전자형을 결정하는 단계;를 포함하는 솔비나무의 판별방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 1)단계의 시료는 잎, 줄기, 뿌리 및 씨앗으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 솔비나무의 판별방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 2) 단계의 표적서열의 증폭은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction), 다중 중합효소연쇄반응(multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive Polymerase

Chain Reaction), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction), 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction), DNA 칩(DNA chip) 및 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는, 솔비나무의 판별방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 3) 단계의 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는, 솔비나무의 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커 조성물, 이를 포함하는 솔비나무 판별용 조성물, 키트 및 이를 이용한 솔비나무의 판별방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이크로새틀라이트(microsatellite) 마커는 유전체 내에 존재하는 1-5개의 짧은 DNA 반복염기서열(repeat sequence)을 포함하는 150-300 bp(base pairs) 길이의 염기서열단편을 말한다. 또한, VNTRs나 탠덤 반복(tandem repeats)의 변수(variable number)로서 언급되는 경우도 있으며 비 암호화 DNA에 나타나는 경향이 있다. 어떤 마이크로새틀라이트는 각 개체 별로 반복 단위(e.g. AT)가 다양하게 나타나는 경우도 있으며, 예를 들어, 부계 쪽에 12 반복(repeat)과 19 반복의 유전형(genotype)을 갖고 있고 모계 쪽이 18 반복과 15 반복을 가지고 있다면 1차 자손은 12와 15 반복의 유전형을 물려받을 수 있다. 반복서열이 복제되면서 계속해서 자손에게 전달되게 되고, 이와 같은 현상이 오랜 기간동안 진행되면서 개체들 간에 마이크로새틀라이트가 재조합되고 보존되면서 다양성이 나타나게 되는 한편, 교배되지 않은 다른 집단사이에서는 더 다양한 다형성(polymorphism)에 따른 특성화가 이루어질 수 있다. 따라서, 이들 마이크로새틀라이트에 존재하는 반복염기서열은 유전적 관계에 따라 여러 가지 다형성(polymorphism)이 관찰될 수 있어 개체군 및 복잡한 근연 그룹 간의 유전적 현상을 해석하는 분자 마커로 최근 널리 이용되고 있다. 마이크로새틀라이트는 보통 집단유전학의 하디-바인베르크(Hardy-Weinberg) 법칙을 따르고, 각각의 대립 유전자쌍 또는 성염색체상에 특이적으로 존재 가능한 좌위(locus)의 판별이 가능하며, 복수의 마커를 동시에 분석할 수 있어 유전학적 연구에 널리 이용되어 왔다.

[0003] 솔비나무(*Maackia fauriei*)는 콩과(Leguminosae), 다릅나무속(Genus *Maackia*)에 속하는 낙엽교목으로 우리나라 특산 식물이며, 제주도의 저지대 계곡에서 아고산대 습지까지 다량으로 분포되어 있다. 최근에는 항암효과가 있는 솔비나무 특이 펩티드단백질이 발견되는 등 앞으로 자원식물로서 각광을 받을 것으로 기대되고 있다. 솔비나무의 근연 분류군으로는 우리나라 내륙에서 만주지방까지는 다릅나무(*M. amurensis*)가, 중국 남부에는 *M. hupehensis*가, 일본에는 개물푸레나무(*M. amurensis* var. *buergeri*) 및 *M. floribunda*이 분포하고 있다. 지리적으로 구분되어 분포하는 상기 솔비나무의 근연분류군들은 변이가 다양해 개화-결실기가 아닌 경우 솔비나무와 형태적인 구별이 어려울뿐만 아니라, 솔비나무에 대한 분류학적 연구 역시 이루어지지 않은 실정이다.

[0004] 이에 본 발명자들은 다릅나무 속 중 솔비나무를 명확하게 판별하고, 솔비나무 유전자원의 특성을 구명하기 위해 연구하던 중, 솔비나무의 게놈 DNA로부터 특정 마이크로새틀라이트 마커를 선별하고, 이를 증폭하는 프라이머 세트를 제작한 결과, 이를 이용하여 솔비나무의 DNA 다형성을 효과적으로 검출할 수 있으며, 유전적으로 유연관계가 깊은 다릅나무 속 중간 구분을 가능하게 하여 정확하게 솔비나무를 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커 조성물을 제공하는 것이다.

- [0006] 또한 본 발명의 목적은, 솔비나무 판별용 프라이머 세트 및 프로브를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한 본 발명의 목적은, 솔비나무 판별용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한 본 발명의 목적은, 솔비나무 판별방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1; 서열번호 2; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 6; 서열번호 7; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 서열번호 11; 서열번호 12; 서열번호 13; 서열번호 14; 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 염기서열을 포함하는 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은, 서열번호 16 및 17; 서열번호 18 및 19; 서열번호 20 및 21; 서열번호 22 및 23; 서열번호 24 및 25; 서열번호 26 및 27; 서열번호 28 및 29; 서열번호 30 및 31; 서열번호 32 및 33; 서열번호 34 및 35; 서열번호 36 및 37; 서열번호 38 및 39; 서열번호 40 및 41; 서열번호 42 및 43; 서열번호 44 및 45;로 표시되는 염기서열 쌍으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 솔비나무 판별용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은, 상기 솔비나무 판별용 프라이머 세트에 의하여 증폭되고, 서열번호 1; 서열번호 2; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 6; 서열번호 7; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 서열번호 11; 서열번호 12; 서열번호 13; 서열번호 14; 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 염기서열, 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 솔비나무 판별용 프로브를 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은, 상기 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물; 상기 솔비나무 판별용 프라이머 세트; 또는 상기 솔비나무 판별용 프로브를 포함하는, 솔비나무 판별용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은, 상기 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물; 상기 솔비나무 판별용 프라이머 세트; 또는 상기 솔비나무 판별용 프로브를 포함하는, 솔비나무 판별용 키트를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은, 1) 시료의 게놈 DNA를 추출하는 단계; 2) 상기 1)단계에서 추출된 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 표적서열을 증폭하는 단계; 및 3) 상기 2) 단계에서 증폭된 산물의 대립유전자를 검출하여 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 솔비나무의 판별방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 및 이를 증폭하는 프라이머 세트를 이용하여 솔비나무의 DNA 다형성을 효과적으로 검출할 수 있고, 유전적으로 유연관계가 깊은 다른나무 속 중간 구분이 가능하여 정확하게 솔비나무를 판별할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커는 솔비나무의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있으며, 솔비나무의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입 시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있다. 또한, 이는 솔비나무의 염색체 지도작성 및 새로운 유용 유전자의 동정은 물론, 유전 육종 및 분자생물학적 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 선발된 콜로니를 이용하여 PCR 수행한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트를 증폭하는 프라이머 및 Genescan 프로그램을 이용하여 대립유전자(allele)를 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 솔비나무 및 근연분류군 5개 집단 158개체를 나타낸 도이다.(MHU 는 *M. hupehensis*, MAA는 *M. amurensis* var. *amurensis*, MAB는 *M. amurensis* var. *buergeri*, MFL는 *M. floribunda*, MFA는 *M. fauriei*를 각각 나타냄)
- 도 4는 STRUCTURE 프로그램을 이용하여 솔비나무 및 근연분류군 집단의 유전적 구조를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 1; 서열번호 2; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 6; 서열번호 7; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 서열번호 11; 서열번호 12; 서열번호 13; 서열번호 14; 및 서열번호 15으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 염기서열을 포함하는 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, "마이크로새틀라이트(Microsatellites)"란 진핵세포(eukaryotes) 유전자 전역에 걸쳐 분포하는 모노-, 디-, 트리- 및 테트라뉴클레오타이드 형태의 짧은 반복 염기서열을 의미한다. 일반적으로 이러한 반복 서열은 염색체 내에서 10 내지 40 번 정도 단순반복 (tandem repeat)된 형태로 존재한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, "마커(marker)"는 유전적으로 불특정 연관된 유전자좌(genetic locus)를 동정할 때 참고점으로 사용되는 염기서열을 말한다. 이 용어는 또한 마커 서열을 증폭할 수 있는 프라이머 세트로 사용되는 핵산과 같은 마커 서열에 상보적인 핵산 서열에도 적용된다. 분자마커(molecular marker)의 유전자 지도상의 위치는 유전자좌로 일컬어진다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로새틀라이트 마커는 Mfau1(서열번호 1), Mfau12(서열번호 2), Mfau17(서열번호 3), Mfau23(서열번호 4), Mfau25(서열번호 5), Mfau35(서열번호 6), Mfau41(서열번호 7), Mfau44(서열번호 8), Mfau47(서열번호 9), Mfau49(서열번호 10), Mfau53(서열번호 11), Mfau56(서열번호 12), Mfau57(서열번호 13), Mfau61(서열번호 14) 또는 Mfau62(서열번호 15)인 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에서는, 솔비나무의 잎에서 게놈 DNA를 분리하고, 염기서열을 분석한 후, 최종적으로 마이크로새틀라이트 제작에 적합하고 반복서열을 포함하는 염기서열을 결정하여 상기와 같이 서열번호 1 내지 15로 이루어진 솔비나무 마이크로새틀라이트 좌위를 선별하였다.
- [0023] 또한 본 발명은, 서열번호 16 및 17; 서열번호 18 및 19; 서열번호 20 및 21; 서열번호 22 및 23; 서열번호 24 및 25; 서열번호 26 및 27; 서열번호 28 및 29; 서열번호 30 및 31; 서열번호 32 및 33; 서열번호 34 및 35; 서열번호 36 및 37; 서열번호 38 및 39; 서열번호 40 및 41; 서열번호 42 및 43; 서열번호 44 및 45;로 표시되는 염기서열 쌍으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 솔비나무 판별용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 수 있다. 상기 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 프라이머 세트에는 상기 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커를 증폭시킬 수 있는 서열이 모두 포함되며, 당업계에 공지된 방법에 의하여 디자인할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서는, 선별된 마이크로새틀라이트를 증폭할 수 있는 프라이머 세트(서열번호 16 내지 45)를 제작하였으며, 상기 프라이머 세트를 이용하여 솔비나무의 유전형을 분석한 결과, 대립유전자의 수는 4 내지 20이며, 관측이형접합율(Observed heterozygosities, H_o)는 0.297부터 0.897까지이고, 기대이형접합율(expected heterozygosities, H_e)는 0.539부터 0.898까지이며, 솔비나무 마이크로새틀라이트 마커들 간에 유 의한 연관비평형(linkage disequilibrium, LD)값을 가지는 것은 없는 것으로 확인하였다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는, 본 발명에 따른 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 솔비나무 및 근연분류군 5개 집단 158개체의 유전자형을 분석한 결과, 각 집단군이 특정한 유전적 클러스터로 할당되고, 대립인자 풍부도(RA; allelic richness)는 8.02 ~ 9.76까지이고, Private allelic richness는 0.99 ~ 2.77임을 확인하였다. 또한, 관측이형접합율(H_o)은 0.640부터 0.702까지이고, 기대이형접합율(H_e)은 0.699부터 0.843까지임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 솔비나무 마이크로새틀라이트를 이용하여 유전적으로 유연관계가 깊은 다릅나무 속 중간 구분이 가능하며 정확하게 솔비나무를 판별할 수 있음을 확인하였다.

- [0028] 또한 본 발명은, 상기 솔비나무 판별용 프라이머 세트에 의하여 증폭되고, 서열번호 1; 서열번호 2; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 6; 서열번호 7; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 서열번호 11; 서열번호 12; 서열번호 13; 서열번호 14; 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 염기서열, 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 솔비나무 판별용 프로브를 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 '프로브'란 혼성화 프로브를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0030] 또한 본 발명은, 상기 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물; 상기 솔비나무 판별용 프라이머 세트; 또는 상기 솔비나무 판별용 프로브를 포함하는 솔비나무 판별용 조성물을 제공한다.
- [0031] 또한 본 발명은, 상기 솔비나무 특이적 마이크로세틀라이트 마커 조성물; 상기 솔비나무 판별용 프라이머 세트; 또는 상기 솔비나무 판별용 프로브를 포함하는, 솔비나무 판별용 키트를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 "키트"는 상기 프라이머 세트 또는 프로브 이외에 샘플을 담은 구획된 캐리어 수단, 용기, PCR 반응 용 버퍼, 및 DNA 증합효소 등을 포함할 수 있으며, 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 포함하며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0033] 또한 본 발명은, 1) 시료의 게놈 DNA를 추출하는 단계; 2) 상기 1)단계에서 추출된 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 표적서열을 증폭하는 단계; 및 3) 상기 2) 단계에서 증폭된 산물의 대립유전자를 검출하여 유전자형을 결정하는 단계;를 포함하는 솔비나무의 판별방법을 제공한다.
- [0034] 상기 1)단계의 시료는 잎, 줄기, 뿌리, 씨앗 등 식물체의 일부분일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 상기 1) 단계에서 DNA의 추출은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 상기 2) 단계에서 표적서열의 증폭은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction), 다중 중합효소연쇄반응(multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive Polymerase Chain Reaction), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction), 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction), DNA 칩(DNA chip) 및 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법 등 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 중합효소연쇄반응(PCR)이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 상기 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)은 PCR 반응에 필요한 당업계에 공지된 여러 성분을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR 반응 혼합액에는 분석하고자 하는 솔비나무에서 추출된 게놈 DNA와 본 발명에서 제공되는 솔비나무 마이크로세틀라이트를 증폭하는 프라이머 이외에 적당량의 DNA 증합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH_2O)을 포함한다. 상기 PCR 완충용액은 Tris-HCl, MgCl_2 , KCl 등을 포함한다. 이 때 MgCl_2 농도는 증폭의 특이성과 수량에 크게 영향을 준다. 바람직하게는 1.5-2.5 mM의 범위로 사용될 수 있다. 일반적으로 Mg^{2+} 가 과량인 경우는 비특이적인 PCR 증폭산물이 증가하고, Mg^{2+} 가 부족한 경우 PCR 산물의 산출율이 감소한다. 상기 PCR 완충용액에는 적당량의 Triton X-100이 추가로 포함될 수도 있다.
- [0038] 상기 3) 단계의 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법 등 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 이에 제

한되지 않는다.

[0039] 상기 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다.

[0040] 상기 형광 측정 방법은 마커의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다.

[0041] 또한, 상기 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬 광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0042] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0043] 실시예 1. 솔비나무 개체 수집

[0044] 솔비나무(*Maackia fauriei*) 특이적 마이크로새틀라이트 마커를 개발하기 위한 재료수집을 하기와 같이 수행하였다.

[0045] 제주도 한라산에서 솔비나무 39개체를 수집하였다. 또한 개발된 마커를 적용하여 유전적 다양성 파악을 위해 추가적으로 근연분류군 4개 집단에서 개체간의 간격을 5~10m 두고, 자생지 집단 규모에 따라 집단 당 21~39개체에서 소엽을 채취하였다. 채집한 솔비나무의 증거표본은 인하대학교 식물표본실(IUI)에 보관하였고, 솔비나무와 근연분류군의 채집정보를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Code	Taxon	Locality	Latitude, Longitude	Alt.(m)	No. of samples
1	<i>M. fauriei</i>	Mt. Halla, Jeju-do	33° 21'N, 126° 27'E	1100m	39
2	<i>M. amurensis</i> var. <i>amurensis</i>	Mt. Jirisan, Gyeongsangnam-do	35° 22'N, 127° 52'E	960m	30
3	<i>M. amurensis</i> var. <i>buergeri</i>	Mt. Kirigamine, Nagano Pref.	36° 06'N, 138° 10'E	1600m	21
4	<i>M. hupehensis</i>	Zhexitianchi, Zhejiang Prov.	30° 17'N, 119° 06'E	1100m	36
5	<i>M. floribunda</i>	Mt. Karakunidade, Kagoshima Pref.	31° 56'N, 130° 51'E	1200m	32
TOTAL					158

[0047] 실시예 2. 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 좌위 마커 개발

[0048] 솔비나무 특이적 마이크로새틀라이트 좌위 마커 개발을 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0049] 2-1. 솔비나무의 DNA 추출

[0050] 상기 실시예 1에서 수집한 솔비나무 개체의 DNA 추출을 하기와 같이 수행하였다.

[0051] 보다 구체적으로, 증류수로 세척된 잎의 주맥을 제거한 후, 액체질소에 넣고 막자사발을 이용하여 파쇄한 다음 G-spinTM 2p Kit for plant(Intron)를 사용하여 솔비나무 개체의 DNA를 추출하였다. 상기 추출된 DNA를 35 μl 용출 버퍼에 녹였다. 상기 용출 버퍼에 녹은 DNA는 EtBr(Ethidium bromide, 0.5% $\mu\text{l}/\text{ml}$)로 염색한 0.7% 아가로스 겔(100V, 30min)에 전기영동한 후 UV(Dual-intensity Transilluminator) 조명 아래에서 1kb Ladder와 형광의 밝기를 상대 비교하여 그 농도를 확인하였다. 추출된 DNA는 사용할 때까지 -20℃ freezer에 보관하였다.

[0052] 2-2. 제한효소 처리

[0053] 상기 실시예 2-1에서 확보한 DNA를 제한효소 MboI(Promega)을 이용하여 GATC 서열부분을 임의로 잘랐다. 보다 구체적으로, DNA 30 μ l, 10x buffer 10 μ l, BSA 1 μ l, MboI enzyme 2.5 μ l 및 3차 증류수 56.5 μ l를 섞어 총 100 μ l의 반응액을 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 5 μ l를 전기영동으로 확인하였다. 제한효소 처리가 잘 되었으면 나머지 95 μ l를 아가로스 겔에 나누어 전기영동한 후, 100bp ladder marker로 300 ~ 700bp 부분을 확인하여, 상기 확인된 겔을 잘라낸 후 튜브에 담았다. 상기 튜브에 담은 겔에서 DNA를 정제하여 총 35 μ l를 맞추어, 그 중 5 μ l를 전기영동하여 잘라낸 부분을 확인하였다.

[0054] 2-3. 링커와 DNA의 결합

[0055] 상기 실시예 2-2의 선별된 DNA를 링커와 결합하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0056] 구체적으로, 상기 실시예 2-2에서 선별된 DNA 조각에 SAUL A(5'-GCG GTA CCC GGG AAG CTT GG-3', 서열번호 46)와 SAUL B+P(5'-GAT CCC AAG CTT CCC GGG TAC CGC-3', 서열번호 47)링커를 연결시키고 링커가 연결된 DNA 조각만을 선별하기 위해 링커를 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다. 이 때 링커를 이중가닥으로 만들기 위해 SAUL A 4 μ l와 SAUL B+P 4 μ l, 1M NaCl 2 μ l 및 3차 증류수 30 μ l를 섞고 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 85℃에서 2분, 65℃에서 15분, 37℃에서 15분 25℃ 30분으로 1번 반복하였다. 링커와 정제한 DNA의 라이게이션을 위하여, DNA 15 μ l, 이중가닥 링커 10 μ l, 10x ligation buffer 3 μ l 및 T4 DNA ligase 2 μ l를 4℃에서 하룻밤 두었다. 그 후, 링커와 결합된 DNA를 70℃ 워터 베스(water bath)에 넣어 리가아제를 비활성화시키고, 링커와 결합된 DNA 8 μ l, 프라이머로 사용할 SAUL A 3.2 μ l, dNTP 14 μ l, 10x Taq buffer 28 μ l, Taq polymerase 7 μ l 및 3차 증류수 139.8 μ l를 섞어 총 200 μ l로 맞추고, PCR용 튜브 총 9개 중 3개에 50 μ l를 담고 1개에 25 μ l, 5개에 5 μ l를 담은 후, PCR을 수행하였다. 이 때 PCR 조건은 94℃에서 30초 동안 이중가닥을 풀어주고, 68℃에서 30초, 72℃에서 1분, 72℃에서 10분을 30번 반복하여 수행하였다. 가장 알맞은 PCR 조건을 찾기 위하여, 15번 반복하였을 때 정지 버튼을 눌러 PCR을 잠시 정지시킨 후, 50 μ l를 담은 튜브 3개와 25 μ l 1개를 빼고, 다시 PCR을 수행하였다. 18번 반복이 되었을 때에도 정지시킨 후, 5 μ l가 들어있는 튜브 한 개를 빼고 PCR을 재수행하였다. 21번, 24번, 27번, 30번 반복 시 마다 튜브를 한 개씩 빼고 PCR을 종료하였다. 상기 PCR 수행이 끝난 후, 전기영동으로 밴드를 확인하여 증폭이 알맞게 된 조건을 선택하여 그 조건에 맞게 50 μ l를 담은 튜브 3개와 25 μ l를 담은 튜브 1개를 다시 PCR을 해주었다. PCR이 끝난 후, 50 μ l로 정제하였다.

[0057] 2-4. 프로브 결합 및 목적 DNA 선별

[0058] 상기 2-3에서 정제한 PCR 산물에 프로브를 결합하고, 반복염기서열을 가진 목적 DNA인 마이크로새틀라이트를 선별하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0059] 보다 구체적으로, 상기 실시예 2-3에서 정제한 PCR 산물을 95℃에서 15분 동안 이중가닥을 풀어준 후, 바로 얼음에 2분 간 넣어 단일가닥으로 만들었다. 단일가닥으로 만들어 준 PCR 산물 45 μ l과 (AG)₁₅, (AC)₁₅, (ACG)₁₀, (CAA)₁₀, (GAA)₁₀, (ACAT)₇, (AGAT)₇과 같은 반복서열을 갖는 비오틴화된 프로브 각 2 μ l, 6x SSC 및 0.1% SDS 용액 141 μ l를 섞어 95℃에서 15분 반응시킨 후, 65℃에서 하룻밤 두었다. 프로브와 결합된 PCR 산물에서 반복염기서열을 가진 부분을 선별하기 위하여, 마그네틱 비드(Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles, Promega)를 먼저 0.5x SSC 및 0.1% SDS 용액 100 μ l로 3번 세척한 후, 150 μ l의 6x SSC 및 0.1% SDS 용액을 넣어 준비하였다. 세척한 비드와 반복염기서열을 가진 부분을 결합시키기 위하여 두 용액을 섞은 후, 43℃의 워터 베스에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 후, 자력을 가진 마그네틱 바에 상기 반응된 용액을 넣은 튜브를 꽂아 비드와 결합된 반복염기서열 부분이 자력에 이끌려 선별될 수 있도록 1분 동안 방치하였다. 자력에 이끌린 반복서열부분을 제외한 나머지 반복염기서열이 없는 부위는 버린 후, 400 μ l의 2x SSC 및 0.1% SDS 용액을 다시 섞어 상온에서 5분 간 방치하였다. 그 후, 다시 마그네틱 바에 꽂아 상기의 방법으로 반복염기서열 부위를 선별하였다. 이와 같은 과정을 한번 반복 후, 400 μ l의 1x SSC 및 0.1% SDS 용액을 넣어 45℃에서 5분 간 반응시켰다. 그 후, 마그네틱 바로 반복염기서열을 가진 부분을 선별하고, 같은 과정을 3번 반복하였다. 마지막으로 60℃에서 5분간 대기한 후, 마그네틱 바에 1분간 꽂아놓았다. 자력에 이끌린 반복서열부위를 제외한 나머지 용액을 버린 후, 95℃의 TE 버퍼 50 μ l를 넣고 95℃에서 10분 간 비드와 반복염기서열을 가진 부분을 분리시킨 후, 마그네틱

바에 쪼개고 1분간 방치하였다. 그 후, 비드를 제외한 용액 30 μ l를 보관하여 마이크로세틀라이트 부분을 선별하였다.

[0060] 2-5. 선별한 마이크로세틀라이트 부위의 풍부화(richness)

[0061] 상기 실시예 2-4에서 선별한 마이크로세틀라이트 부위의 풍부화를 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0062] 먼저, 상기 실시예 2-4에서 선별한 마이크로세틀라이트 부위를 이용하여 PCR을 수행하였다. 풍부화한 마이크로세틀라이트 부위 5 μ l, 프라이머로 이용할 SAUL A 10 μ l, dNTP 4 μ l, 10x Taq buffer 20 μ l, Taq polymerase 4 μ l 및 3차 증류수 157 μ l를 섞어 총 200 μ l로 만들었다. 링커 결합할 시의 PCR 수행과 마찬가지로 알맞은 조건을 알아내기 위해, PCR용 튜브 총 9개 중 3개에 50 μ l를 담고 1개에 25 μ l, 5개에 5 μ l를 담았다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 이중가닥을 풀어주고, 68 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 10분을 30번 반복하여 수행하였다. 이때, 가장 알맞은 조건을 찾기 위하여, 15번 반복했을 때 PCR 수행을 잠시 정지시킨 후, 50 μ l를 담은 튜브 3개와 25 μ l 1개를 빼고, 다시 PCR을 시작하였다. 18번 반복이 되었을 때에도, PCR 수행을 정지시킨 후, 5 μ l가 들어있는 튜브 한 개를 빼고 PCR을 재수행하였다. 21번, 24번, 27번, 30번 반복 시 마다 튜브를 한 개씩 빼고 PCR을 종료하였다. PCR 수행이 끝난 후, 전기영동으로 밴드를 확인하여 증폭이 알맞게 된 조건을 선택하여 그 조건에 맞게 50 μ l를 담은 튜브 3개와 25 μ l를 담은 튜브 1개를 다시 PCR을 하였다. PCR이 끝난 후, 50 μ l로 DNA를 정제하였다.

[0063] 실시예 3. 마이크로세틀라이트 라이브러리의 선발

[0064] 상기 실시예 2-5에서 선발한 마이크로세틀라이트 라이브러리의 선발을 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0065] 보다 구체적으로, 상기 실시예 2-5에서 선발한 마이크로세틀라이트를 확인하기 위하여, pGEM[®] T Easy Vector System(Promega)으로 TA 클로닝을 하였다. 먼저 풍부화한 마이크로세틀라이트 부위를 pGEM vector에 라이게이션을 하기 위하여 2x 라이게이션 버퍼 5 μ l, pGEM vector 1 μ l, 풍부화한 마이크로세틀라이트 부위 3 μ l 및 T4 리가아제 1 μ l를 섞어 상온에서 1시간 동안 두었다. 그 후, 벡터를 *E. coli*에 형질전환하기 위하여, 상기 상온에 둔 용액 5 μ l를 *E. coli*에 섞어준 후, 얼음에서 20분간 두었다. 그 후, 42 $^{\circ}$ C에서 열 충격을 준 후, 다시 얼음에 2분간 식혀주었다. 형질전환이 끝난 후, 클로닝을 하기 위하여 액체 LB배지 500 μ l를 넣어 1시간 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 콜로니를 생성하기 위하여 5000rpm에서 30초간 원심분리한 후, 카르베닐실린이 첨가된 고체 LB 배지에 X-Gal 40 μ l 및 IPTG 10 μ l를 함께 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양하였다. 그 후, 형질전환이 잘 이루어진 흰색 콜로니들만 떼어, 콜로니 PCR을 수행하여 200-500bp의 사이즈에 해당하는 클론들을 선별하였다. 프라이머로는 M13F(-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3', 서열번호 48) 및 M13R(-40)(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', 서열번호 49)을 이용하였고, PCR 조건은 이중가닥을 풀어주기 위해 95 $^{\circ}$ C에서 5분, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 50 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 25번 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 수행하였다(도 1 참조). 클론들이 마이크로세틀라이트를 갖고 있는지 여부를 확인하기 위하여 BigDye Terminator version 3.1을 이용해서 ABI 3730xl sequencer(Applied Biosystems)로 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0066] 도 1에 나타난 바와 같이, 다양한 길이의 마이크로세틀라이트 서열을 포함하고 있는 라이브러리가 확보된 것을 확인하였다.

[0067] 실시예 4. 마이크로세틀라이트 마커의 선발

[0068] 마이크로세틀라이트 마커의 선발을 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0069] 보다 구체적으로, 상기 실시예 3에서 분석된 염기서열을 바탕으로 확보된 라이브러리를 이용하여 마이크로세틀라이트의 양 옆의 보전적인 부위에 Primer 3 software(Rozen and Skaletsky 2000)를 이용하여 프라이머를 제작하였다. 프라이머는 비용을 절감하기 위해 Schuelke(2000)의 방법에 따라 M13(-21)(5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3')염기서열을 붙인 순방향 및 역방향 특이 프라이머;와 형광물질(6FAM)을 붙인 비특이 M13(-21)를 제작하였다. 그 후, 상기 실시예 2-1에서 분리한 DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. 상기 제작된 순방향 프라이머 0.125 μ l, 역방향 프라이머 0.5 μ l, dNTP 0.6 μ l, 5x Taq Buffer 6 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l x 10, 형광물질(6FAM)을 붙인 비특이 M13(-21) 프라이머 0.5 μ l 및 3차 증류수 20.775 μ l를 섞어 PCR 혼합액을 만들고, 상기 실

시에 2-1에서 분리한 DNA 희석액을 1 μ l 섞어서 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 2분 동안 이중가닥 DNA를 단일가닥으로 풀어주고, 95℃에서 30초, 55℃에서 45초, 72℃에서 1분을 35번 반복하여 증폭한 후 마지막 72℃에서 10분 동안 수행하였다. PCR을 통하여 집단의 다양성을 나타내는 프라이머를 선별하여 하기 표 2에 나타내었고, 최초 집단과 다른 집단의 최소 24 개체들을 이용하여 PCR 수행한 후, GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard와 같이 ABI 3730xl sequencer로 분석하였다. 술비나무 개체를 분석한 결과, Mfau11(서열번호 1), Mfau12(서열번호 2), Mfau17(서열번호 3), Mfau23(서열번호 4), Mfau25(서열번호 5), Mfau35(서열번호 6), Mfau41(서열번호 7), Mfau44(서열번호 8), Mfau47(서열번호 9), Mfau49(서열번호 10), Mfau53(서열번호 11), Mfau56(서열번호 12), Mfau57(서열번호 13), Mfau61(서열번호 14) 및 Mfau62(서열번호 15)로, 총 15개의 술비나무 마이크로새틀라이트 좌위를 확인하였으며, 이의 반복 모티프(Repeat motif)를 하기의 표 2에 나타내었다. 또한, 상기 실험 결과를 도 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

[0070]

Locus	NCBI GenBank accession no.	Primer sequences (5'→3')	Repeat motif	Size range (bp)	No. of allele	프라이머 서열번호
Mfau11	KJ955996	F: GACTTACCGTTTGAAGTTGC	(GA) ₃₄	161-225	20	16
		R: AGCCTCATTCTTCCTCATT				17
Mfau12	KJ955997	F: TTTGTACCGAATACCTGTC	(TG) ₂₄	173-221	15	18
		R: CTACTCAGCTTTGCCACTTT				19
Mfau17	KJ955998	F: AAGGGTGC GAATATGCCA	(AAC) ₉	218-236	5	20
		R: GGTCAATATGTCTCAGAGGA				21
Mfau23	KJ955999	F: TGCAGTCATGTAGGATTAC	(TC) ₃₂	236-296	15	22
		R: TTGACCACAGAAAGTCAACC				23
Mfau25	KJ956000	F: ACACGACTCATGTTTCCCT	(TC) ₁₄	226-268	16	24
		R: ATGGAGTTGTGGTCGAGC				25
Mfau35	KJ956001	F: TGAAAGGACTTCACCCGA	(CA) ₁₅	239-303	15	26
		R: AGACCAGGAACCATGCTG				27
Mfau41	KJ956002	F: GCACACGGAGGAAATGAC	(GA) ₁₃	151-177	11	28
		R: AACAAACCCTAGCACCGCTC				29
Mfau44	KJ956003	F: CGACCTCATCTCCATAACAGC	(CT) ₃₄	181-219	9	30
		R: AACTACCAAGCTCAGAGGA				31
Mfau47	KJ956004	F: TGATTGGACATGCATCAGG	(AG) ₂₂	304-340	4	32
		R: TAATTGACCGGGCGGTT				33
Mfau49	KJ956005	F: CAAACATTGAGTCTCGGGTG	(GA) ₂₆	264-294	13	34
		R: CACTTGAACCACTGCGAT				35
Mfau53	KJ956007	F: GAGTTTGTCTATGCAGCCT	(TC) ₁₇	242-276	10	36
		R: GCAGAGATTGTCCGCGAA				37
Mfau56	KJ956009	F: AGTCAGCCATACGATTAGGAG	(TC) ₂₂	357-379	10	38
		R: ACGCGAATGACAGCTTCGA				39
Mfau57	KJ956010	F: AAATCCCACAATATTACGC	(GT) ₂₇	202-248	12	40
		R: TATCCAGTTGGTTCACCTC				41
Mfau61	KJ956011	F: CTACGAGAATCGAATTTGGAC	(CA) ₁₂	198-220	10	42
		R: GGTGCTGGGTCATTAAGTC				43
Mfau62	KJ956012	F: GGAGTTTCAATCCAACG	(GT) ₁₁	218-224	4	44
		R: TGAAAGTGATGGGCTCAA				45

표 3

[0071]

Locus	<i>M. fauriei</i> (n=39)		Cross-amplification			
	<i>H</i> _o	<i>H</i> _e	MHU	MAA	MAB	MFL
Mfau11	0.846	0.898	+	+	+	+
Mfau12	0.838	0.873	+	+	+	+
Mfau17	0.487	0.726	+	+	+	+
Mfau23	0.744	0.858	+	+	+	+
Mfau25	0.694	0.893	+	+	+	-

Mfau35	0.795	0.871	+	+	+	+
Mfau41	0.897	0.822	+	-	-	-
Mfau44	0.421	0.628	+	+	+	+
Mfau47	0.514	0.655	+	+	+	+
Mfau49	0.771	0.831	+	+	+	+
Mfau53	0.595	0.807	+	-	-	-
Mfau56	0.639	0.821	+	-	-	-
Mfau57	0.846	0.851	+	+	+	+
Mfau61	0.513	0.754	+	+	+	+
Mfau62	0.297	0.539	+	-	+	+
관측이형접합율 (H_o ; observed heterozygosity), 기대이형접합율 (H_e ; expected heterozygosity), MHU = <i>M. hupehensis</i> , MAA = <i>M. amurensis</i> var. <i>amurensis</i> , MAB = <i>M. amurensis</i> var. <i>buergeri</i> , MFL = <i>M. floribunda</i> .						

[0072] 도 2 및 표 2에 나타난 바와 같이, 총 대립유전자의 수는 4 내지 20인것인 것 확인하였다.

[0073] 또한, 표 3에 나타난 바와 같이, 관측이형접합율(Observed heterozygosities, H_o)는 0.297부터 0.897까지인 것으로 나타났으며, 기대이형접합율(expected heterozygosities, H_e)는 0.539부터 0.898까지임을 확인하였다. 또한, 솔비나무 마이크로새틀라이트 마커들 간에 유의한 연관비평형(linkage disequilibrium, LD)값을 가지는 것은 없는 것으로 확인하였다.

[0074] 실시예 5. 솔비나무 및 근연분류군 집단의 유전적 구조와 다양성 파악

[0075] 솔비나무 및 근연분류군 집단의 유전적 구조 와 다양성 파악하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0076] 보다 구체적으로, 상기 실시예 4에서 개발한 15개의 마커 중 8개(Mfau11, Mfau12, Mfau17, Mfau35, Mfau44, Mfau49, Mfau57, Mfau61)를 이용하여 솔비나무 및 근연분류군 5개 집단 158개체(도 3)의 유전자형을 분석하였다. 상기 집단 중, MHU은 *M. hupehensis*를, MAA는 *M. amurensis* var. *amurensis*를, MAB 는 *M. amurensis* var. *buergeri*를, MFL는 *M. floribunda*를, MFA는 *M. fauriei*를 나타낸다. 집단의 유전적 구조는 STRUCTURE 프로그램에서 $K = 5$ 로 구하였다(도 4). 또한, 상기 집단의 유전적 다양성을 분석하였다. 기초 유전 다양성 정보, 즉 대립인자 풍부도(RA; allelic richness), the range of allele sizes(RAS), 관측이형접합율(Observed heterozygosities, H_o), 기대이형접합율(expected heterozygosities, H_e) 및 근친교배계수(FIS; inbreeding coefficient)는 개체군내에서 FSAT 2.9.3.2 프로그램을 사용하여 계산한 후, Private allelic richness는 hp-rare 1.0 프로그램으로 구하였다. 그 결과를 도 4 및 표 4에 나타내었다.

표 4

[0077]

population	N	R_A	Private allelic richness	H_o	H_e	F_{IS}
MFA	39	9.05	2.77	0.689	0.804	0.143
MHU	36	7.48	1.01	0.690	0.699	0.013
MAA	30	9.24	2.34	0.640	0.774	0.179
MAB	21	8.02	0.99	0.650	0.798	0.183
MFL	32	9.76	1.73	0.702	0.843	0.167
Total mean	32	8.71	1.77	0.670	0.784	0.137

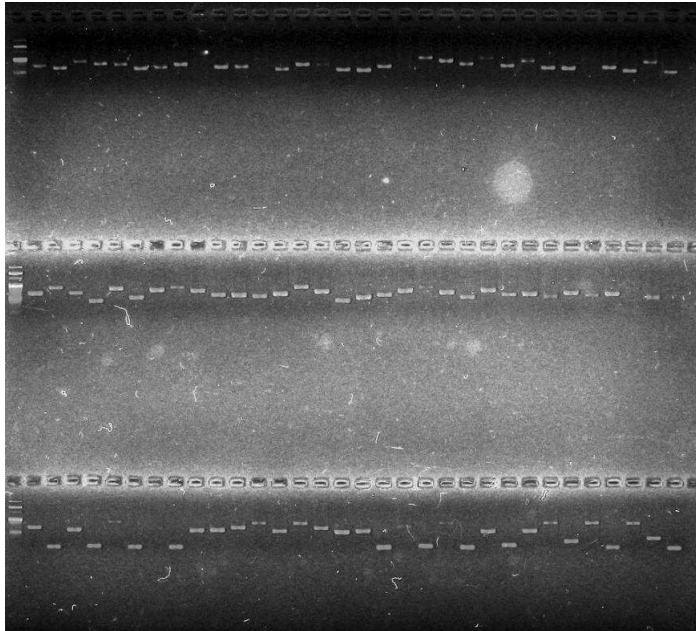
[0078] 도 4에 나타난 바와 같이, 각 분류군이 특정한 유전적 클러스터로 할당 되는 것을 확인하였다.

[0079] 또한, 표 4에 나타난 바와 같이, 대립인자 풍부도(RA; allelic richness)는 8.02 ~ 9.76까지 나타났으며, 일본 큐슈 지방의 *M. floribunda*(MFL 집단)가 가장 높은 수치가 나타남을 확인하였다. Private allelic richness는 0.99 ~ 2.77까지이고, 제주도의 솔비나무(*M. fauriei*)가 가장 높게 나타남을 확인하였다.또한, 관측이형접합율(H_o)은 0.640부터 0.702까지이며, 기대이형접합율(H_e)은 0.699부터 0.843까지임을 확인하였다.

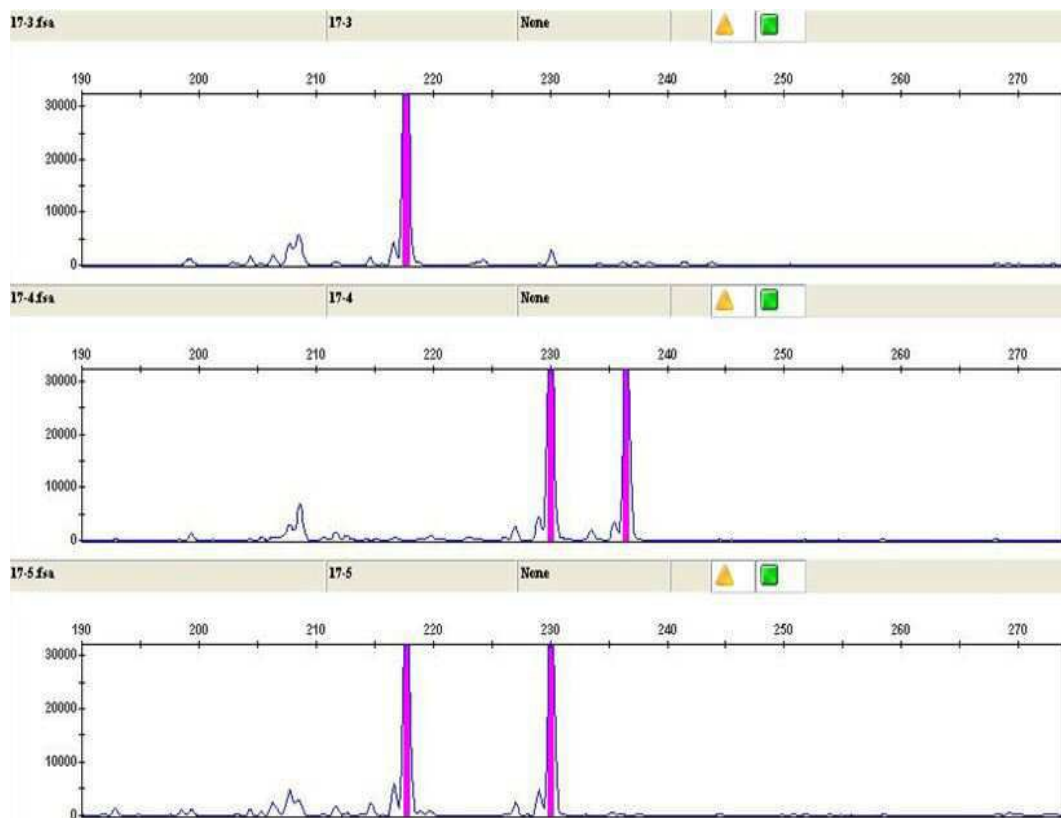
[0080] 따라서, 상기 8개의 술비나무 특이적 마이크로새틀라이트 마커는 술비나무의 유전적 다양성을 평가하기에 효과적임을 확인하였다.

도면

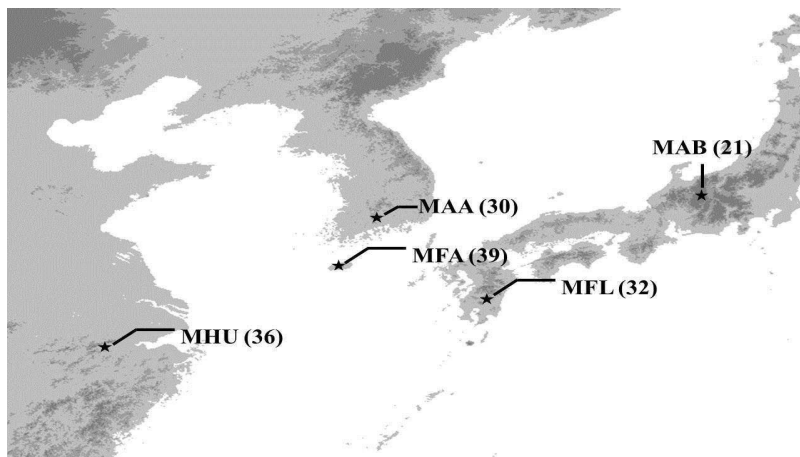
도면1



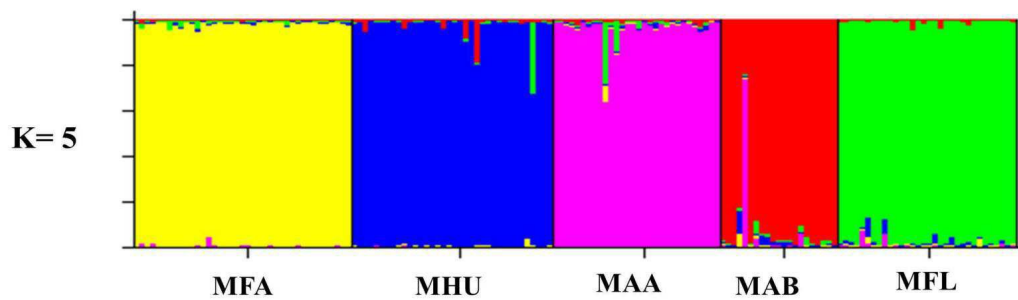
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Maackia fauriei-Specific microsatellite markers and Method for Discerning of Maackia fauriei Using the Same
- <130> Inha-1-142
- <160> 49
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 68
- <212> DNA
- <213> Maackia fauriei_ Locus Mfaul1
- <400> 1

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga 60

gagagaga 68

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> Maackia fauriei_ Locus Mfaul2

<400> 2

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtg 48

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Maackia fauriei_ Locus Mfaul7

<400> 3

aacaacaaca acaacaacaa caacaac 27

<210> 4

<211> 64

<212> DNA

<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau23

<400> 4

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 60

tgtg 64

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau25

<400> 5

tctctctctc tctctctctc tctctctc 28

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau35

<400> 6

cacacacaca cacacacaca cacacacaca 30

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau41
 <400> 7
 gagagagaga gagagagaga gagaga 26

<210> 8
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Maackia fauriei_ Locus Mfau44
 <400> 8
 ctctctctct ctctctctct ctctctctcc ctctctctct ctctctctct ctctctctct 60
 ctctctct 68
 <210> 9
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Maackia fauriei_ Locus Mfau47
 <400> 9
 agagagagag agatagagag agacagagag agagagagag agag 44
 <210> 10
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Maackia fauriei_ Locus Mfau49
 <400> 10
 gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga ga 52
 <210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Maackia fauriei_ Locus Mfau53
 <400> 11
 tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctc 34
 <210> 12
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Maackia fauriei_ Locus Mfau56
 <400> 12

tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctc	44
<210> 13	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau57	
<400> 13	
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgt	54
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau61	
<400> 14	
cacacacaca cacacgcaca caca	24
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Maackia fauriei_ Locus Mfau62	
<400> 15	
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gt	22
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Locus Mfau11 Forward primer	
<400> 16	
gacttaccgt ttgaagttgc	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Locus Mfau11 Reverse primer	
<400> 17	
agcctcattt cttcctcatt	20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfaul2 Forward primer
 <400> 18
 tttgtaccga atacctgtcc 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfaul2 Reverse primer
 <400> 19
 ctactcagct ttgccacttt 20

<210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfaul7 Forward primer
 <400> 20
 aagggtgcga atatgcca 18

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfaul7 Reverse primer
 <400> 21
 ggtcaatatg tctcagagga 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfaul23 Forward primer

<400>	22	
tcagtcacg taggattac		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Locus Mfau23 Reverse primer	
<400>	23	
ttgaccacag aaagtaacc		20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Locus Mfau25 Forward primer	
<400>	24	
acacgactca ttgtttccct		20
<210>	25	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Locus Mfau25 Reverse primer	
<400>	25	
atggagttgt ggtcgagc		18
<210>	26	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Locus Mfau35 Forward primer	
<400>	26	
tgaaggact tcaccga		18
<210>	27	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau35 Reverse primer

<400> 27

agaccaggaa ccatgctg 18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau41 Forward primer

<400> 28

gcacacggag gaaatgac 18

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau41 Reverse primer

<400> 29

aacaaaccct agcaccgctc 20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau44 Forward primer

<400> 30

cgacctcadc tccataacag c 21

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau44 Reverse primer

<400> 31

aactaccaag ctcagagga 19

<210> 32

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfau47 Forward primer
 <400> 32
 tgattggaca tgcacgagg 19
 <210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfau47 Reverse primer
 <400> 33
 taatttgacc gggcgggtt 18

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfau49 Forward primer
 <400> 34
 caaacattga gtctcgggtg 20
 <210> 35
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfau49 Reverse primer
 <400> 35
 cacttgaacc actgcgat 18
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Locus Mfau53 Forward primer
 <400> 36

gagttttgtc tatgcagcct	20
<210> 37	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Locus Mfau53 Reverse primer	
<400> 37	
gcagagattg tcggcgaa	18
<210> 38	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Locus Mfau56 Forward primer	
<400> 38	
agtcagccat acgattagga g	21
<210> 39	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Locus Mfau56 Reverse primer	
<400> 39	
acgcgaatga cagcttcga	19
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Locus Mfau57 Forward primer	
<400> 40	
aaactccac aatattacgc	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Locus Mfau57 Reverse primer

<400> 41

tatccagttt ggttcacctc 20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau61 Forward primer

<400> 42

ctacgagaat cgaacattgg ac 22

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau61 Reverse primer

<400> 43

ggtgctgggt cattaagtc 19

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau62 Forward primer

<400> 44

ggagttttca atccaacg 18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Locus Mfau62 Reverse primer

<400> 45

tgaaagtgat gggtctca 18

<210> 46

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SAUL A linker

<400> 46
 gcggtacccg ggaagcttgg 20

<210> 47
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SAUL B+P linker

<400> 47
 gatcccaagc ttcccggtta ccgc 24

<210> 48
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> M13 Forward primer

<400> 48
 gtaaaacgac ggccag 16

<210> 49

<211>

17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> M13 Reverse primer

<400> 49
 caggaaacag ctatgac 17