

AFLPs에 의한 *Aegilops*의 계통발생학적 재평가

박 용 진* · 심 재 욱**

Application of AFLPs to Phylogenetic Analysis of *Aegilops*

Yong Jin Park* and Jae Wook Shim**

ABSTRACT : *Aegilops* genus is known to include the donor species of the B and D genome of the bread wheat (ABD). An effort to establish a better strategy for phylogenetic relationships about *Aegilops* polyploids by AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) was conducted using the 19 *Aegilops* spp. and *T. aestivum*. The 207 polymorphic bands from the amplified products on the 6% acrylamide denaturing sequencing gels were obtained with the 7 AFLP primer combinations, and used to account for the genetic similarities and cluster analysis using NTSYS program. According to the genome analysis, the Mⁿ-genome of *Ae. heldreichii* was estimated as an intermediate genome between the M-genome of *Ae. comosa* and N-genome of *Ae. uniaristata* and supposed to be incorporated in the establishing process of UM-genome as a possible diploid donor. And *Ae. ventricosa* (DN) was more close to *Ae. umbellulata* (U) than *Ae. squarrosa* (D). The close relationship between *Ae. squarrosa* and *T. aestivum* was perceived as a diploid donor of D-genome. As for the polyploid species, hexaploid *Ae. triaristata* was more closely related to *Ae. columnaris* rather than tetraploid *Ae. triaristata*. The clustered groups were, basically same to the previous Gihara's sections based on phenotypes and pairing analysis of interspecific hybrids. AFLP was evaluated as an efficient and powerful method in the genome evaluation of closely related species.

Key words : *Aegilops*, Phylogeny, Genome analysis, AFLP

밀(*T. aestivum*)의 육종은 근연야생종으로부터 유용한 형질을 도입하여 변이의 폭을 확대하여 왔는데, 그동안 밀과 근연야생종인 *Aegilops* 종과의 속간교잡을 통하여 내병성, 내염성, 제빵특성 등의 형질이 개량되었다^{6,9}. *Aegilops* 속은 밀과 생물학적으로 동일속으로 2배체 11종, 4배체 10종 및 6배체 4종으로 총 25종이 보고되어 있다¹¹.

재배밀의 성립은 *T. urartu* (AA, 2n=14)와 *Aegilops* 속의 *Sitopsis* 절 S-genome형 종과의

자연교잡과, 교잡 F₁의 자연적인 염색체의 배가를 통해 AABB(2n=4x=28)형의 *T. dicoccum*이 성립되었고, 새로 형성된 4배체와 *Ae. squarrosa* (DD, 2n=14)와의 교잡 및 자연적인 염색체 배가에 의해 6배체성 재배밀인 *T. aestivum* (AABBDD, 2n=6x=42)이 성립된 것으로 추정되고 있다^{7, 8, 21}. 따라서 *Aegilops* 속은 6배체 재배밀(AABBDD)에 B 및 D계놈을 공여한 밀 근연속이다. *Aegilops* 속은 7개의 서로 다른 계놈

*농업과학기술원(National Institute of Agricultural Science & Technology, Suwon 441-707, Korea)

**서울대학교 농업생명과학대학(Coll. of Agri. & Life Sci., Seoul Nat'l Univ., Suwon 441-744, Korea) <'97. 9. 18 接受>

형태가 보고되어 있고, 배수체종이 2배체종보다 넓은 지역에 분포하여 배수체종의 분화는 자생지의 적응과 관련이 깊으며, 14종의 배수체종중 10종이 M계능을 공유하고 있다^{11,17)}.

분자유전학의 발달은 DNA의 변이 및 진화에 의하여 동일종의 계통간²³⁾ 및 종속간의 유전적 다양성^{3, 5)}의 비교가 가능하게 하였고, 이와 관련하여 RAPD 및 RFLP 다형에 의한 계통발생학적 연구가 광범위하게 연구되어 왔다^{25, 26)}. 이와 같은 핵산지문기술은 표현형보다 많은 수의 표지인자를 이용할 수 있으면서 환경영향을 배제할 수 있어 다수의 작물에서 유전분석 및 다양성분석에 획기적으로 이용되고 있다. 그동안 *Triticum* 및 *Aegilops*에 속하는 각 종들의 분화 및 진화에 관한 연구는 식물학적인 형태, 교잡친화성, 반복염기서열 및 RFLP probe의 다형성에 의해 연구되었고^{1, 18)}, 최근에는 GISH(Genomic *In Situ* Hybridization)에 의한 계능분석이 시도되고 있다^{12, 19)}. AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)기술은 제한효소처리후 DNA단편을 선택증폭하여 DNA절편의 다형을 비교하는 것으로 최근에 개발된 핵산지문기술²⁴⁾이다. 이기법은 동시에 다수의 유전자를 비교할 수 있으며, PCR반응을 이용하지만 RAPDs(Random Amplified Polymorphic DNAs)보다 재현성이 높아 유전자원의 분류, 계능근연관계 및 분자유전자지도 작성 등에 급속히 이용되고 있다. 특히 AFLP 기술은 분자유전지도작성시 몇 개의 primer 조합에 의해 다수의 markers를 고밀도로 mapping할 수 있는 장점을 갖고 있다^{15, 16)}.

본 연구는 재현성이 높으면서 다수의 DNA 단편 다형을 동시에 분석 가능한 AFLP 기술을 이용하여 *Aegilops*종간의 계통발생학적 상호관계를 분석하여 각 계능형간의 근연관계 및 배수체종의 계능분석에 대한 새로운 접근을 시도하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 DNA 추출

밀 근연종 *Aegilops*속의 19종 및 재배밀(*T. aestivum* cv. Chinese Spring)을 공시하였으며, 이때 공시된 재료는 IPSR Collection(영국)중 밀 야생종자원을 분양받아 이용하였다(표 1). DNA추출은 온실에서 6주 정도 자란 유식물의 지상부를 이용하여 phenol/chloroform방법²²⁾에 의해 추출하였다. 생육중인 잎 2~5 g을 분쇄한 후, 20ml의 DNA추출액("S" buffer; 100mM Tris-Cl, pH 8.5, 100mM NaCl, 50mM EDTA, 2H₂O, 2%(w/v) SDS, pH 8.0)을 가하고, Proteinase K(10mg/ml) 100 μ l을 분주하여 65 $^{\circ}$ C 항온수조에서 2시간동안 추출하였다. 온탕추출이 끝난 후, 20ml의 phenol/chloroform용액과 chloroform을 이용하여 세포구성성분을 제거하였으며 15ml(0.6부피)의 2-propanol을 가하여 DNA를 응집시킨 후, 5ml의 1X TE 완충용액에 녹였다. 추출액으로부터 RNA를 제거하고자, 각 시료당 10 μ l의 RNase(10mg/ml)가하여 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 1시간동안 반응시켰으며, 다시 5ml의 phenol/chloroform 및 chloroform으로 위의 과정을 반복하였다. DNA의 포집은 1/10부피의 3M sodium acetate(pH 8.5) 및 2.5부피의 냉각시킨 100% 에탄올을 가하여 실시하였고, 건조후 1X TE완충용액으로 녹여 비색계를 이용하여 DNA량을 정량하거나 agarose gel상에서 band의 양상 및 농담으로 정량하여 실험에 이용하였다.

2. 전계능 DNA의 제한효소절단 및 adaptor 접합

각 시료 DNA의 0.5 μ g을 저빈도 제한효소인 5U Sse I (CCTGCA/GG) 와 고빈도 제한효소의 5U Mse I (T/TAA) 및 8 μ l의 5배 restriction-ligation buffer(50mM Tris-acetate, pH 7.5, 50mM Mg-acetate, 250mM K-acetate, 25mM DTT 및 250ng/ μ l BSA)를 혼합하여 최종 부피가 40 μ l가 되게 하여 37 $^{\circ}$ C에서 2~3시간 동안 제한효소절단 반응을 수행하였다. 제한효소절단반응 후, 미리 준비한 10 μ l의 접합효소액(1 μ l Sse I adaptor(5 pmol/ μ l), 1 μ l Mse I adaptor(50 pmol/ μ l), 1 μ l 10mM ATP, 2 μ l 5X restriction-ligation buffer(50mM Tris-HAc pH 7.5, 50mM MgAc, 250mM KAc, 25mM DTT

Table 1. The wild species of *Aegilops* genus used for the phylogenetic analysis by AFLP

Ploid status	Wild species(Genome symbol, Accession no.)
Diploids	A1 : <i>Ae. sharonensis</i> Eig. (S ^{sh} , 2170001)
	A2 : <i>Ae. longissima</i> Schweinf. et Musch (S ^l , 2150001)
	A3 : <i>Ae. squarrosa</i> Linn. (D, 2220001)
	A4 : <i>Ae. umbellulata</i> Zhuk. (U, 2010001)
	A5 : <i>Ae. comosa</i> Sibth. et Sm. (M, 2110001)
	A6 : <i>Ae. heldreichii</i> Boiss. (M ^h , 2110002)
	A7 : <i>Ae. uniaristata</i> Vis. (N, 2120001)
Tetraploids	A8 : <i>Ae. triaristata</i> Willd. (UM, 2030001)
	A9 : <i>Ae. crassa</i> Boiss. (DM, 2240001)
	A10: <i>Ae. ventricosa</i> Tausch. (DN, 2270001)
	A11: <i>Ae. cylindrica</i> Host. (CD, 2100001)
	A12: <i>Ae. triuncialis</i> Linn. (UC, 2080001)
	A13: <i>Ae. columnaris</i> Zhuk. (UM, 2050001)
	A14: <i>Ae. biuncialis</i> Vis. (UM, 2060001)
A15: <i>Ae. ovata</i> Linn. (UM, 2020001)	
Hexaploids	A16: <i>Ae. crassa</i> Boiss. (DDM, 2250001)
	A17: <i>Ae. juvenalis</i> (Thell) Eig. (DMU, 2040001)
	A18: <i>Ae. crassa</i> subsp. <i>vavilovii</i> Zhuk. (DMS, 2260001)
	A19: <i>Ae. triaristata</i> Willd. (UMN, 2040001)
	A20: <i>T. aestivum</i> L. em Thell. cv. Chinese Spring (ABD)

a) All the accessions were distributed from The IPSR Collection of Wheat and Related Species(1989), UK.

and 250 ng / μ l BSA), 0.2 μ l T4 DNA ligase (5U / μ l), 4.8 μ l dH₂O)을 제한효소 절단반응액에 분주하여 12시간 이상 adaptor 접합반응(ligation reaction)을 수행하였으며, T0.1E(10mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1mM EDTA)로 10배 희석한 후 PCR에 의한 1차 예비증폭반응에 이용하였다.

3. 1차 증폭, Primer 표식 및 2차 증폭

1차 예비증폭 반응액의 조성은 5 μ l의 Restriction-Ligation 10배 희석액, 0.2mM dNTP 혼합액, 0.1mM S00 primer, 1mM M00 primer(표 2), 0.4U Taq polymerase, 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl)이었고, 증폭조건은 94 $^{\circ}$ C 30초, 56 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분으로 30 cycles을 실시하였다. 증폭과정이 종료한 후 T0.1E buffer로 10배 희석 후, 2차 선택적 증폭반응에 이용하였다.

³²P-ATP에 의한 primer의 표식은 10개 시료를 기준으로 하여 S-primer 0.5 μ l(50ng / μ l)를 이용하여 T4-polynucleotide kinase 0.25 μ l(10U

/ μ l)로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 실시하였고, 반응종료 후 65 $^{\circ}$ C에 10분간 방치하여 효소액의 활성을 중지시켜, 2차 선택증폭반응을 실시하였다. 2차 선택증폭 반응액의 조성은 10배 희석한 1차 증폭액 2.5 μ l, 0.25 μ l S-(³²P ATP로 표식) primer (50ng / μ l), 0.3 μ l M-primer(50ng / μ l), 0.2U Taq polymerase, 1X PCR buffer, 0.2mM dNTP 혼합액을 이용하였다. 반응 종료후, 증폭액과 동량의 DNA변성용 loading buffer(98% formamide, 10mM EDTA pH 8.0, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol)을 분주한 후, 100 $^{\circ}$ C 열판에서 3분간 반응액을 열변성시킨 후 gel 분석에 이용하였다.

4. 전기영동 및 autoradiography

2차 증폭산물의 DNA다형을 분석하고자 6% denaturing polyacrylamide sequencing gel 용액(Anachem, 19:1)을 이용하였으며, 유리판은 분리를 용이하게 하기 위해 Repel(BDH)을 상판에 처리하였고, 0.5cm 폭의 49개의 wells을 갖는

Table 2. The sequences of adaptors and primers selected from the 20 primer combinations for performing DNA finger-printing by AFLP analysis in the genus, *Aegilops*

Adaptor and primers	Nucleotide sequences	Application
Mse I adaptor	5'-GACG ATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-3'	Adaptor ligation
Sse I adaptor	5'-CTC GTAGACTGCGTACATGCA-3' CATCTGACGCATGT	Adaptor ligation
S-primers		
S00(SseI+0)	5'-GTAGACTGCGTACATGCAG -3'	Preamplification
S15(SseI+2)	5'-GTAGACTGCGTACATGCAG CA-3'	Selective
S20(SseI+2)	5'-GTAGACTGCGTACATGCAG GC-3'	amplification
S24(SseI+2)	5'-GTAGACTGCGTACATGCAG TC-3'	
M-primers		
M00(MseI+0)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA -3'	Preamplification
M02(MseI+1)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA C-3'	Selective
M20(MseI+2)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA GC-3'	amplification
M40(MseI+3)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA AGC-3'	
M56(MseI+3)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA CGC-3'	
M69(MseI+3)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA GCG-3'	
M86(MseI+3)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA TCT-3'	
M88(MseI+3)	5'-GATGAGTTCTGAGTAA TGC-3'	
Primer combinations for selective amplification (Total 7 combinations)	S00-M86, S15-M02, S15-M20, S20-M69, S20-M88, S24-M40, S24-M56	

sharktooth comb를 이용하여 겔을 준비하였다. 전기영동액으로는 1X TBE buffer를 이용하였으며 2차 증폭액 2.5 μ l를 loading한 후 60W의 전하로 1.5~2.0시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 종료된 후, 젤건조기를 사용하여 80 $^{\circ}$ C, 감압 조건에서 2~3시간동안 건조하여, X-ray film (X-OMAT)이나 phospho-imager(Molecular Dynamics)를 이용하여 증폭산물의 다형성 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 2배체종 계통간 계통발생학적 비교

Aegilops 종간의 계통을 비교 분석하고자 각 species의 계통DNA를 이용하여 AFLP분석을 실시한 과정 및 결과는 표 2 및 그림 1과 같다.

Adaptor와 상보적인 염기서열을 갖고 있으며 selective base가 없는 S-primer(S00) 및 M-primer(M00)을 이용하여 1차 예비증폭을 수행한 후, 반응액의 5~10 μ l를 취하여 1kb ladder DNA와 같이 1.0% agarose gel상에서 전개하여 증폭 여부를 조사하였다. 정상적으로 증폭된 반응액을 selective base가 1~3개인 primer를 이용하여 2차 선택증폭을 실시하였다. 증폭산물의 다형정도를 비교하여 양호한 AFLP primer 조합을 선정하고자, 임의로 선택한 20개의 primer 조합에서 S00/M86 등 7개의 조합을 표 2에서와 같이 선발하였다. 그림 1은 S-primer로 S15(SseI+CA)을 이용하고 M-primer로 M02(MseI+C) 및 M20(MseI+GC)을 이용하여 증폭한 후 겔에 전개한 증폭산물로, primer의 selective base수가 증가할수록 증폭되는 band 수는 감소하였으며, 증폭된 단편중 50~700bp 사이에 판독이 용

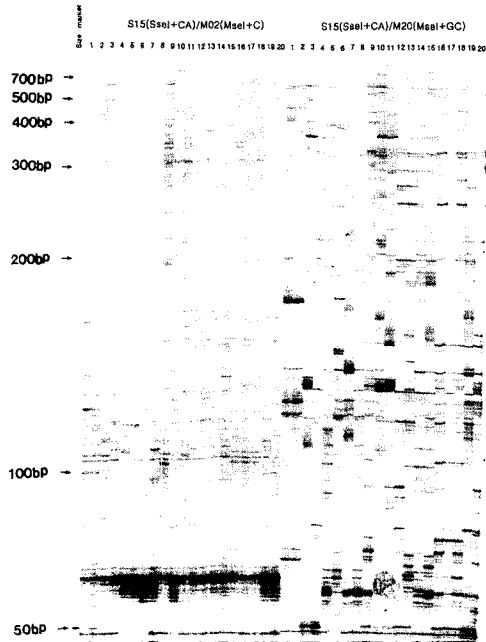


Fig. 1. Examples of AFLP profiles with 19 *Aegilops* spp. including different diploid and polyploid species using the 2 different primer combinations, S15(2 base selective)/M02(1 base selective) and S15/M20(2 base selective).

이한 다형 band들을 이용하여 종간 근연관계비교에 이용하였다.

선발된 7개의 primer조합을 이용하여 다형을 분석한 결과, primer조합당 최대 44개 이었고 평균 29.6개 band를 나타내었으며 총 207개의 polymorphic bands가 조사되었다. 공시된 *Aegilops* 종들간 AFLP다형을 NTSYS 프로그램²⁰⁾으로 분석하여 얻은 공시된 종들간의 유전적 유사도값은 표 3과 같았다. *Aegilops* 2배체종중, *Ae. sharonensis*와 *Ae. longissima*간의 유전적 유사도값은 가장 높았고(0.754), 다음으로 *Ae. comosa*와 *Ae. heldreichii*간(0.686)이 높았다. 이와 같은 결과는 전자의 2 종들은 S계놈을 기본계놈으로 갖고 있으며 후자는 M계놈을 기본계놈으로 갖는 점¹⁴⁾과 잘 일치하였다. 특히 *Ae. heldreichii*는 *Ae. uniaristata*와도 유사성치가

높은데(0.609), 실제적으로 수형 및 종실형태에서 *Ae. heldreichii*는 *Ae. comosa*와 *Ae. uniaristata*간의 중간특성을 갖고 있다. 따라서 이 3 종들은 동일계놈에서 분화된 것으로 생각되며, 유전적 유사도값(표 3)으로 평가해 볼 때, *Ae. heldreichii*는 두종의 중간형태를 점하는 것으로 판단되었다. 반면, *Ae. heldreichii*는 *Ae. comosa*와 동일종의 subspecies로 취급되는데¹¹⁾, 두 종간의 유전적 유사도가 0.686으로, 독립된 종으로 취급되는 *Ae. sharonensis*와 *Ae. longissima*간의 유사성치(0.754)보다 낮은 점에서, heterochromatin 및 반복염기서열의 분포에 의한 Badaeva et al.²⁾의 결과와 일치하고 있었다. 전체적으로 2배체종간의 유사도 최저값은 0.483으로, 각 계놈간에 최소한 48.3%이상 유전적인 배경을 공유하고 있는 것으로 평가되었다. 특히, *Ae. squarrosa*는 2배체종에서 재배밀과 가장 가까운 근연관계에 있는 것으로 나타나(표 3) 밀의 D계놈의 직접적인 공여종으로 평가되었다.

2. 배수체종의 계놈 재평가

*Aegilops*배수체종은 대부분 U 및 M계놈에 의해 성립되었으며 배수체종의 분화는 2배체종의 각 계놈의 재편성과정에 의해 발생한 것으로 보고되어 있다^{14, 17)}. 염색체대합분석에 의하여 *Aegilops*의 4배체종중 *Ae. columnaris*, *Ae. triaristata*, *Ae. biuncialis* 및 *Ae. ovata*는 UM형의 계놈을 갖는 것으로 보고되어 있는데, U계놈을 갖는 *Ae. umbellulata*와 M 및 M^h형의 *Ae. comosa* 및 *Ae. heldreichii*를 이용하여 이들 배수체종의 계놈을 평가한 결과는 그림 2와 같다. U형인 *Ae. umbellulata*와의 유전적인 유사도에서 *Ae. triaristata*는 0.710으로 가장 크고 *Ae. ovata*가 가장 낮은 것으로 나타났으며, *Ae. columnaris* 및 *Ae. biuncialis*는 유사한 정도의 값을 보였다. 따라서 *Ae. ovata*의 U계놈은 다른 UM형 배수체종보다 계놈분화가 큰 것으로 나타났다. M계놈형(*Ae. comosa*) 및 M^h형(*Ae. heldreichii*)과 배수체종간의 비교분석에서는 기본적으로 모든 배수체종에서 U계놈보다 분화가 크게 진행된 것으로 판단되며(그림 2), 모든 배수체종에

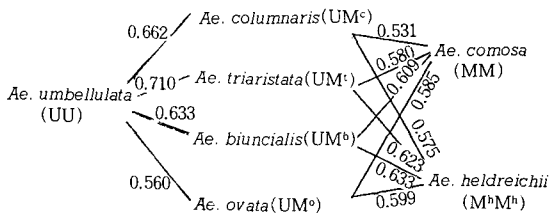


Fig. 2. Genomes of the UM type-polyploids were evaluated by the paired genetic similarities between each polyploid and possible their diploid donor.

서 M계놈보다는 M^b계놈에 더 근연인 것으로 나타났다. 또한 배수체종간에서는 *Ae. columnaris*의 M계놈의 분화가 가장 컸고, *Ae. biuncialis*의 M계놈이 가장 계놈분화가 작은 것으로 나타났다. 따라서 M 및 M^b계놈을 가진 2배체종을 genome analyzer로 이용하여 배수체종과의 유전적 유사도값에 의해 배수체종의 계놈 공여종을 살펴본 결과, 4배체 *Aegilops*종 중 UM 형태의 계놈을 갖는 배수체종들은 M계놈보다 M^b계놈과 보다 근연인 것으로 나타나 *Ae. heldreichii*가 이들 배수체종의 M계놈의 공여종으로 판단되었다. 또한 배수체종 중 *Polyeides*(Gihara's Section, 군집2)에 속하는 *Ae. columnaris*, *Ae. triaristata*(6x), *Ae. ovata*는 S계놈과 유연관계가 높은 것으로 나타났는데(표 4), 이들 배수체종이 갖는 M계놈은 S 계놈과 근연형태의 변형된 중간종에 의해 성립되었거나 S 계놈이 직접 관여한 것으로 판단되었고, 동일한 현상이 *Ae. crassa*(4x)와 *Ae. juvenalis*에서도 보였다. *Ae. ventricosa*는 D 계놈과 N계놈으로 구성되어 있는데, 본 결과에서는 U 계놈이 N 계놈보다 *Ae. ventricosa*와 높은 유연관계를 나타내고 있었다(표 3). 이상의 결과를 종합하여 볼 때, *Aegilops* 배수체종에 대한 AFLP분석결과는 기존의 계놈분석 결과^{13, 14)}와 대체로 일치하지만 S 및 U 계놈이 배수체종의 형성에 관여한 여부는 차이가 있어, 계놈 DNA조성 측면에서 다수의 accessions에 의한 재평가가 필요한 것으로 생각되었다.

3. 군집분석

*Aegilops*의 2배체 및 배수체종들의 AFLP분석에 의한 결과를 조사된 결과를 NTSYS 프로그램²⁰⁾을 이용한 비가중평균법(UPGMA, Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Means)으로 군집분석을 실시하여 작성된 군집을 도식으로 나타낸 것이 그림 3 이다. Gihara는 *Aegilops* 속을 *Polyeides*, *Cylindropyrum*, *Comopyrum*, *Amblyopyrum*, *Sitopsis* 및 *Vertebrata* Section으로 분류한 바 있는데^{14,17)}, 본 실험 결과는 Gihara의 체계에 기본적으로 일치하였다. 각 군집별 종의 분포를 살펴보면, 군집 1은 *Sitopsis*의 *Ae. sharonensis* 및 *Ae. longissima*가 속하였고, 군집 2는 *Polyeides*의 *Ae. umbellulata*, *Ae. triuncialis*, *Ae. columnaris*, *Ae. triaristata*(4x), *Ae. triaristata*(6x) 및 *Ae. biuncialis*가 속하였는데, 모두 U계놈을 공유하고 있었다. Kimber¹³⁾의 *Polyeides* 세군으로 분류하여 보면, U계놈이 거의 분화되지 않은 *Ae. triuncialis*, *Ae. columnaris* 및 *Ae. triaristata*(6x)와 U계놈의 분화가 큰 *Ae. triaristata*(4x), *Ae. biuncialis*, *Ae. ovata*의 군으로 재분류되었다. 군집 3은 *Comopyrum*의 *Ae. comosa*, *Ae. heldreichii* 및 *Ae. uniaristata*가 속하였으며, 이는 Gihara review(Lilienfeld¹⁴⁾의 M-family 혹은 Kimber¹³⁾의 D genome cluster와 일치하였다. Kimber(1987)는 *Vertebrata*를 D계놈의 분화 정도에 따라 2개의 세군으로 구분하였는데, D계놈의 분화가 거의 없는 *Ae. squarrosa*, *Ae. cylindrica*, *Ae. ventricosa*가 군집4로, D계놈의 분화가 큰 *Ae. crassa*(4x), *Ae. crassa*(6x), *Ae. crassa* subsp. *vavilovii* 및 *Ae. juvenalis*는 군집 5에 속하였고, 이 두 군집은 Gihara의 D-family 및 Kimber의 D계놈 cluster와 일치하였다. 특히 계놈의 조성 및 군집형태에 따라, 6배체 *Ae. triaristata*의 분화를 추종하여 보면, 4배체 *Ae. triaristata*로 부터 유래된 것보다는 *Ae. columnaris*와 동일한 공통조상에서 분화된 것으로 생각되었다(그림 3).

Table 3. The matrix of genetic similarities among the species by the 207 polymorphic bands, using 7 AFLP primer combinations to investigate phylogenetic relationships in the genus, *Aegilops*

Species	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	
A1	1.000																				
A2	0.754	1.000																			
A3	0.488	0.531	1.000																		
A4	0.565	0.589	0.594	1.000																	
A5	0.483	0.517	0.570	0.541	1.000																
A6	0.507	0.541	0.565	0.594	0.686	1.000															
A7	0.522	0.585	0.551	0.560	0.594	0.609	1.000														
A8	0.546	0.580	0.517	0.710	0.580	0.623	0.551	1.000													
A9	0.527	0.541	0.546	0.488	0.425	0.469	0.483	0.517	1.000												
A10	0.469	0.502	0.652	0.604	0.580	0.536	0.589	0.585	0.536	1.000											
A11	0.507	0.531	0.662	0.536	0.522	0.546	0.522	0.546	0.643	0.633	1.000										
A12	0.541	0.594	0.551	0.696	0.498	0.541	0.575	0.618	0.551	0.599	0.676	1.000									
A13	0.585	0.551	0.507	0.662	0.531	0.575	0.570	0.652	0.565	0.585	0.604	0.715	1.000								
A14	0.556	0.560	0.498	0.633	0.609	0.633	0.464	0.729	0.498	0.546	0.614	0.647	0.681	1.000							
A15	0.560	0.575	0.531	0.560	0.585	0.599	0.517	0.647	0.512	0.541	0.618	0.633	0.657	0.725	1.000						
A16	0.527	0.522	0.556	0.449	0.435	0.440	0.435	0.459	0.681	0.507	0.652	0.493	0.488	0.507	0.551	1.000					
A17	0.551	0.527	0.541	0.502	0.459	0.454	0.469	0.522	0.676	0.483	0.570	0.575	0.570	0.541	0.575	0.783	1.000				
A18	0.522	0.536	0.512	0.473	0.459	0.444	0.498	0.473	0.696	0.522	0.570	0.536	0.483	0.483	0.536	0.792	0.787	1.000			
A19	0.531	0.546	0.522	0.638	0.507	0.570	0.623	0.609	0.551	0.580	0.589	0.662	0.676	0.618	0.652	0.541	0.585	0.536	1.000		
A20	0.459	0.541	0.614	0.575	0.473	0.517	0.493	0.546	0.546	0.614	0.614	0.570	0.546	0.498	0.551	0.585	0.560	0.589	0.522	1.000	

1 Similarity value = $2nAB / (nA + nB)$, nAB: shared band no., nA and nB: band no. in each species

2 Note: A1-*Ae. sharonensis*, A2-*Ae. longissima*, A3-*Ae. squarrosa*, A4-*Ae. umbellulata*, A5-*Ae. comosa*, A6-*Ae. heldreichii*, A7-*Ae. uniaristata*, A8-*Ae. triaristata*(4x), A9-*Ae. crassa*(4x), A10-*Ae. ventricosa*(4x), A11-*Ae. cylindrica*(4x), A12-*Ae. triuncialis*(4x), A13-*Ae. colummaris*(4x), A14-*Ae. biuncialis*(4x), A15-*Ae. ovata*(4x), A16-*Ae. crassa*(6x), A17-*Ae. juvenalis*(6x), A18-*Ae. Ae. crassa* subsp. *varilovii*(6x), A19-*Ae. triaristata*(6x), A20-*T. aestivum*.

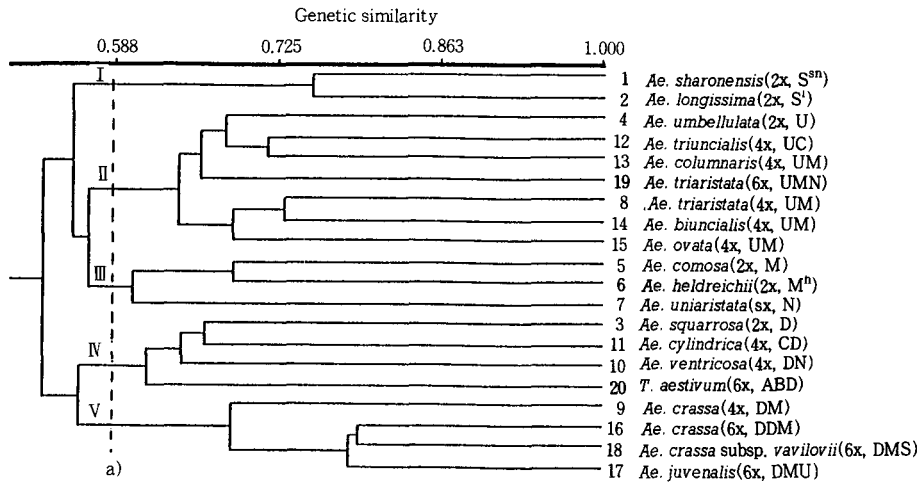


Fig. 3. Phenogram depicting phylogenetic relationships among 19 *Aegilops* spp. and *T. aestivum*, constructed by NTSYS using UPGMA method. Total 207 polymorphic bands produced by 7 primer combinations of AFLP were investigated. a) *Aegilops* spp. were classified into 5 groups at this level.

일반적으로 *Triticeae*내 각 계놈의 분화와 배수체종의 성립과정에서 염색체의 구조적 재편성에 관여되고 있어^{4, 10)}, 보다 정확한 계놈분석을 위해서는 기존의 염색체대합분석 등의 세포유전기법^{13, 14)}에 의한 유전분석은 분자유전기술과 병행한 종합적인 방법에 의해 이루어져야 할 것으로 판단되며, 특히 AFLP분석은 앞으로 생물다양성분석, 종분류 및 계놈분석 등의 작물유전연구에 활발히 이용될 것으로 평가되었다.

적 요

각 계놈형간의 근연관계 및 배수체종의 계놈분석에 관한 새로운 접근을 시도하고자, *Aegilops* 19종 및 재배밀(*T. aestivum*)을 공시하여 AFLP 분석을 실시하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. AFLPs를 이용한 *Aegilops*종들간 근연관계를 분석한 결과, 7개의 primer 조합에서 총 207개의 다형 band를 조사하였으며 조합당 평균 다형 band수는 29.8개 이었다.
2. 각 계놈간 유연관계로 보아 *Ae. heldreichii* (M^h)는 *Ae. comosa*(M)와 *Ae. uniaristata*

(N)의 중간위치의 계놈으로 나타났고, UM계놈을 가진 4배체종의 M계놈 공여종으로 판단되었다. 그리고 *Ae. squarrosa*는 재배밀의 D계놈 공여종임을 확인하였다.

3. 6배체성 *Ae. triaristata*(UMN)는 4배체성 *Ae. triaristata*(UM)보다는 *Ae. columnaris*(UM)와 더 근연인 것으로 나타났다. 그리고 *Ae. ventricosa*(DN)은 U계놈이 N계놈보다 더 근연인 것으로 나타났다.
4. AFLPs에 의한 군집형성은 5개의 군집으로 구분되었고 이는 기본적으로 Gihara의 Section군과 일치하였고, 다양성분석, 계놈분석 등에 보다 효율적인 것으로 평가되었다.

LITERATURE CITED

1. Appels R. and Dvorak J. 1982. Relative rates of divergence of spacer and gene sequences within the rDNA region of species in the *Triticeae* : Implications for the maintenance of homogeneity a repeated gene family. *Theor. Appl. Genet.*

- 63:361-365.
2. Badaeva E.D, Friebe B and Gill B.S. 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. I. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* 39:293-306.
 3. Delseny M, McGrath J.M, This P, Chevre A.M and Quiros C.F. 1990. Ribosomal RNA genes in diploid and amphiploid *Brassica* and related species : organization, polymorphism, and evolution. *Genome* 33:733-744.
 4. Devos K.M. and Gale M.D. 1993. The genetic maps of wheat and their potential in plant breeding. *Outlook on Agric.* 22: 93-99.
 5. Doyle J.J and Beachy R.N. 1985. Ribosomal gene variation in soybean(*Glycine*) and its relatives. *Theor. Appl. Genet.* 70:369-376.
 6. Dhaliwal H.S, Sigh H, Gill K.S and Randhawa H.S. 1993. Evaluation and cataloging of wheat germplasm for disease resistance and quality. In: Damania AB (ed) biodiversity and wheat improvement. John Wiley & Sons, Chichester pp. 123-140.
 7. Dvorak J. 1988. Cytogenetical and molecular inferences about the evolution of wheat. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge(UK)* pp. 187-192.
 8. _____ and Zhang H-B. 1992. Reconstruction of the phylogeny of the genus *Triticum* from variation in repeated nucleotide sequences. *Theor. Appl. Genet.* 84:419-429.
 9. Feldman M and Sears E.R. 1981. The wild gene resources of wheat. *Sci. Amer.* 244:98-109.
 10. Friebe B, Tuleen N, Jiang J and Gill B.S. 1993. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. *Genome* 36:731-742.
 11. Gupta P.K. 1991. Cytogenetics of wheat and its close wild relatives-*Triticum* and *Aegilops*. In : *Chromosome engineering in plant: genetics, breeding, evolution* (New York, USA). Elsevier pp. 243-262.
 12. Jiang J and Gill B.S. 1994. Different species specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Res.* 2: 59-64.
 13. Kimber G. 1987. Evolutionary patterns in the wheat group. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge(UK)* pp. 47-51.
 14. Lilienfeld F.A. 1951. H.Kihara: Genome-analysis in *Triticum* and *Aegilops*. X. Concluding review. *Cytologia* 16:101-123.
 15. Mackill D.J, Zhang Z, Redona E.D and Colowit P.M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *genome* 39:969-977.
 16. Maughan P.J, Saghai-Marooof M.A, Buss G.R and Huestis G.M. 1996. Amplified fragment length polymorphism(AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93:392-401.
 17. Miller T.E. 1987. Systematics and evolution. In : Lupton FGH(ed) *wheat breeding: Its scientific basis*. London/ New York, Champman and Hall. pp. 1-30.
 18. Mori N, Liu Y-G and Tsunewaki K. 1995. *Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA: 2. Wild tetraploid wheats*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 129-134.
 19. Mukai Y, Endo T.R and Gill B.S. 1991. Physical mapping of the 18S-26S rRNA

- multigene family in common wheat: Identification of new locus. *Chromosoma* 100:71-78.-
20. Rohlf F.J. 1993. numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1. 80. 100 North Country Road, Setauket, New York.
 21. Sasanuma T, Miyashita N.Y and Tsunewaki K. 1996. Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA: 3. Intra and inter specific variations of five *Aegilops sitopsis* species. *Theor. Appl. Genet.* 92:928-934.
 22. Sharp P.J, Kreis M, Shewry P.R and Gale M.D. 1988. Location of (β)-amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor. Appl. Genet.* 75:286-290.
 23. Tsegaye S, Tesemma T, Belay G. 1996. Relationships among tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) landrace populations revealed by isozyme markers and agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.* 93:600-605.
 24. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23(21):4407-4414.
 25. Wang Z.Y, Second G and Tanksley S.D. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 83: 565-581.
 26. Wilkie S.E, Isaac P.G and Slater R.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.