

## AFLP 방법을 이용한 담배 버어리종 특이 프라이머의 개발

이영기 · 정석훈 · 금완수 · 이정현 · 이청호\* · 이문수  
KT&G 중앙연구원  
(2006년 11월 17일 접수)

### Identification of tobacco Burley species specific marker in several tobacco species by AFLP

Yung Gi Lee, Suk-Hun Jung, Wan Soo Keum, Jeong Heon Lee,  
Cheong Ho Lee\* and Moon-Soo Rhee  
KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea  
(Received November 17, 2006)

**ABSTRACT :** AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) analysis was conducted to cultivars of tobacco, *Nicotiana tabacum* in order to select the cultivar-specific markers. AFLP results using 12 primer sets revealed genetic diversity among 12 field grown tobacco cultivars. Polymorphic fragments amplified by PCR was purified and cloned to identify their nucleotide sequences. From the sequences of them, 40 primer sets were designed to select cultivar-specific markers. When genomic DNA isolated from tobacco were used as PCR template, a set of primers, BrSF/BrSR showed Burley-specific band patterns. The results indicate that AFLP technique used in this experiments is useful for identifying tobacco cultivars in a rapid manner.

**Key words:** AFLP, *Nicotiana tabacum*

최근 십년간 분자생물학의 발전에 힘입어 분자 수준에서의 재능을 분석할 수 있는 다양한 방법들이 개발되어졌다. 분석 방법들로는 random-amplified polymorphic DNA(RAPD) (Williams *et al.*, 1990; Grando *et al.*, 1996; Mengistu *et al.*, 2000), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), simple sequence repeat polymorphism(SSRP) (Akkaya *et al.*, 1992), 그리고 inverse sequence-tagged repeat

(ISTR) 분석 등이 있다(Sensi *et al.*, 1996).

AFLP 분석법은 최근들어 새롭게 대두되기 시작한 DNA fingerprinting 기법으로서 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 와 RAPD의 유용한 특성들만 간추려 설계된 새로운 분석방법으로 1995년 Vos 등에 의해 개발되었다. AFLP는 염기서열에 대한 사전정보 없이도 한번의 PCR 증폭으로 50~100개의 매우 많은 DNA 단편을 생성하므로 높은 민감도의 DNA 지

\*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

\*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

문 분석을 분석할 수 있는 유용한 수단으로 평가되고 있다(Qi and Lindhout, 1997). AFLP 분석법은 고도의 재현성 및 확실성을 갖춘 강력한 분석기술로서, 제한효소 및 primer의 다양한 조합으로 고도의 다형성과 다수의 polymorphic DNA marker를 신속하게 검출할 수 있는 molecular typing 기법으로서 현재까지 약 1,200여건의 논문을 통하여 식물과 미생물의 typing을 위한 새로운 기법으로 유용하게 이용되고 있다 (Lin *et al.*, 1999, van Lith and Aarts, 1995).

담배속은 Solanaceae과에 속하며 64종 이상의 종을 포함하는 세 종류의 아속(*Rustica*, *Tabaccum*, and *Petunioides*)으로 나뉜다(Goodspeed, 1954). 현재 북위 60도에서 남위 45도 사이에서 재배가 가능한 것으로 보고가 되고 있으며 (Akehurst, 1981), 이중 잘 알려진 담배 종은 *Nicotiana tabacum* L.로서 세계의 약 97개국에서 2,000종 이상의 재배품종이 다양한 목적으로 상업적으로 재배되고 있다. 따라서 다양한 재배품종간의 유전적 차이는 품종마다 각기 다른 물리적, 생리적, 화학적 및 생화학적 차이를 나타내며, 이러한 차이는 각 재배품종 고유의 특징을 구분짓는 핵심요소이다. Ren과 Timko는 (2001) 50여종의 지역적 분포가 다른 야생종 및 재배종 담배품종을 대상으로 한 실험결과 지역적인 분포에 의존하여 품종의 그룹핑이 가능함을 보여주었고, 최근 Positional Cloning 기법의 발전으로 (Meksem *et al.*, 2001) 같은 지역에 분포하는 다양한 재배품종간의 유전적 차이를 구분할 수 있는 primer의 개발이 더욱 용이해졌다.

따라서 본 실험에서는 형광물질을 이용한 AFLP 분석방법을 이용하여 현재 9종의 국내 재배종과도, 부분 3품종을 합한 총 12개의 재배 품종 담배에 대한 생엽 시료를 대상으로 유전적 다형성을 구분하고 이를 기반으로 품종 특이적 primer를 선별하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

현재 국내에서 재배중인 담배 품종 9개와 모,

부분 품종 3개를 포함하여 총 12개(NC82, MSTC613, KB108, KF109, KB111, KF113, KF114, KF118, MSNC567, 대구골드, TC499 및 CK369) 재배품종을 정석훈박사와 금완수 박사(KT&G 중앙연구원 생물자원연구소)로부터 제공받아 공시재료로 사용하였다.

담배로부터 총 게놈 DNA의 분리 및 제한효소 처리 담배 생엽으로부터 Nucleospin™ plant mini kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany)를 이용하여 제조사의 표준정제 방법에 따라 총 게놈 DNA를 순수분리하였다. AFLP 분석에 사용되어질 제한효소를 선별하기 위하여 순수분리된 게놈 DNA 500 ng을 대상으로 *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I, *Mse* I, *Xba* I, *Xho* I를 단일 또는 2개의 제한효소를 조합하여 37 °C에서 3시간 동안 처리하였다.

### 담배 총 게놈 DNA의 제한효소 처리 및 adaptor ligation

담배 잎으로부터 순수분리된 게놈 DNA 500 ng에 제한효소 완충용액 2.5  $\mu$ l과 제한효소 *Eco* RI과 *Mse* I를 각각 10 Unit씩 첨가한 후 총 부피가 25  $\mu$ l가 되도록 증류수를 첨가한 다음 37 °C에서 3시간 동안 반응하였다. 반응이 완료된 후 70 °C에서 15분동안 방치하였으며 이를 adaptor ligation에 사용하였다. 제한효소 반응이 끝난 반응액에 제한효소 부위 특이적인 adaptor를 ligation 하기 위해 각각 100 pmole의 *Eco* RI adaptor와 *Mse* I adaptor를 첨가하고 5  $\mu$ l의 10X ligase buffer와 5 Unit의 T<sub>4</sub> DNA ligase를 첨가한 다음 총 부피가 50  $\mu$ l가 되도록 증류수를 첨가하였다. Ligation 반응은 20 °C에서 16시간 동안 실시하였으며, 반응이 완료된 후 반응액을 1:10으로 희석하여 이를 PCR 반응에 사용하였다.

### AFLP 분석

Adaptor ligation이 완료된 분석액을 대상으로 *Eco* RI primer (5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3')와 *Mse* I primer (5' GAT GAG TCC TGA GTA AC 3')를 이용하여 pre-PCR

을 수행하였다. PCR 반응액의 조성은 1 : 10으로 희석된 분석액 5 $\mu$ l, PCR 완충액 5  $\mu$ l, 10mM dNTP 3.5  $\mu$ l, 10 pmole의 *Eco* RI primer, 10 pmole의 *Mse* I primer 그리고 5 unit의 Taq polymerase이다. 반응액의 최종 부피는 50  $\mu$ l이었다. pre-PCR의 반응조건은 72 °C에서 2분 방치 후 94 °C에서 30초, 56 °C에서 60초 그리고 72 °C에서 90초의 cycle 반응을 20회 실시하였으며, 60 °C에서 30분을 추가 반응하였다. 반응이 완료된 용액은 1 : 10으로 희석한 후 selective PCR에 사용하였다.

PCR 반응액의 조성은 1 : 10으로 희석된 분석액 5  $\mu$ l, PCR 완충액 2  $\mu$ l, 10mM dNTP 1  $\mu$ l, 5 pmole의 FAM-*Eco* RI primer, 5 pmole의 *Mse* I primer 그리고 2 unit의 Taq polymerase이다. 반응액의 최종 부피는 20  $\mu$ l이었다. Selective-PCR의 반응조건은 94 °C에서 2분 방치 후 94 °C에서 30초, 65 °C에서 54 °C까지 cycle당 1 °C씩 온도를 내려가며 30초, 72 °C에서 120초의 touch down PCR을 실시하였으며, 반응 완료 후 94 °C에서 30초, 56 °C 30초, 72 °C 120초의 cycle 반응을 23회 실시한 다음 60 °C에서 30분 동안 추가 반응하였다. PCR이 완료된 반응액중 1  $\mu$ l를 취해 ABI Prism™ 3100 capillary sequencer (Applied Biosystem Inc. USA)에서 전기영동을 하였으며 이때 size standard는 ROX dye로 표시된 500 bp ladder marker를 사용하였다. 전기영동이 완료된 후 각 담배 품종간의 증폭된 단편들의 차이는 GeneScan™ analysis program(Applied Biosystem Inc. USA)을 이용하여 확인하였다.

#### 유전자 재조합 및 품종 특이적 primer 조합 선별

AFLP분석 결과 유전적 다형성을 보이는 특이 유전자들을 재조합하기 위해 selective PCR이 완료된 반응액을 전기영동 한 후 특이유전자가 위치할 것으로 추정되는 위치의 band를 Gel extraction kit (Qiagen GmbH, Germany)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 순수분리하였다. 분리된 단편들은 재조합 벡터인 pBluescript II SK-의 *Sma* I 위치에 T<sub>4</sub> DNA ligase를 이용하여 재조합 하였

으며, 재조합이 확인된 클론은 ABI Prism™ 3100 capillary sequencer (Applied Biosystem Inc. USA)을 이용하여 염기서열분석을 하였다. 분석된 염기서열 결과를 바탕으로 다양한 프라이머를 제작하였으며, 이를 이용하여 재배종 잎담배 생엽을 대상으로 PCR을 실시하여 이 중 재배종 판별이 가능한 품종 특이적 primer 조합을 선별하였다.

## 결과 및 고찰

### 재배종 담배의 AFLP 분석

담배 식물체의 총 게놈 DNA를 이용하여 AFLP 분석시 정확도와 효율을 고려할 때 적당한 크기의 DNA 절편들로 효소적 절단이 필수적이다. 따라서 본 실험에서는 100 bp에서 2,000 bp 사이의 범위 안에 절편들이 분포될 수 있도록 총 7종의 제한효소를 단일 또는 이중으로 처리할 결과 *Eco* RI + *Mse* I, *Bam* HI + *Mse* I을 이중처리하는 것이 가장 유용한 것으로 확인되었으며, 이 중 *Eco* RI과 *Mse* I이 이중으로 처리된 담배 총 게놈 DNA를 AFLP 분석에 사용하였다.

AFLP분석을 위해 FAM dye가 표시된 *Eco* RI primer 2종 FAM-E-AAC 및 FAM-E-AGC와 10종의 *Mse* I primer(M-xxx)들을 디자인하여 합성하였다(Table 1).

합성된 primer를 조합한 총 20 set중 17개의 primer set를 사용하여 순수 분리된 총 12종의 담배 게놈 DNA를 대상으로 pre-PCR과 selective AFLP-PCR을 수행하였다. pre-PCR 결과 의도한 대로 약 200 bp에서 2,000 bp 정도의 smear band들이 보이는 것을 확인하였고 이 반응액을 가지고 다양한 희석 비율로 selective PCR을 한 결과 pre-PCR 용액을 1 : 10으로 희석하여 selective PCR을 한것이 band peak의 높이가 가장 적절하였다.

공시 재배 품종 잎담배의 총 게놈 DNA를 대상으로 실시한 AFLP 시험 결과를 GeneScan 분석 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 총 17set의 primer 조합중 12 set의 primer 조합에서 재배 품종간 유전적 다형성을 보이는

Table 1. Primers used for AFLP analysis

5' Primer*	Sequences	3'Primer**	Sequences
FAM-E-AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC	M-CGG	GATGAGTCCTGAGTAACGG
		M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA
		M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC
		M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
		M-CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
FAM-E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAAGC	M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
		M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC
		M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
		M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT
		M-CGT	GATGAGTCCTGAGTAACGT

\* FAM labelled *Eco RI* primers, \*\* Primers containing *Mse I* recognition site.

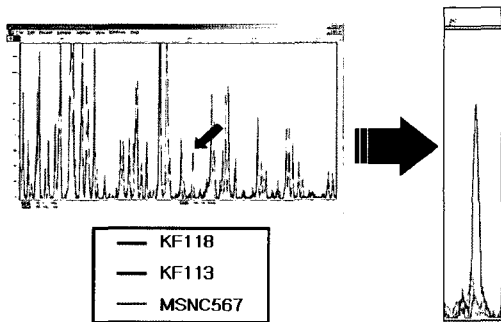


Fig. 1. GeneScan result of AFLP using primer set P2 (FAM-E-AGC / M-CAA) to distinguish 3 breeding lines of tobacco cultivar.

결과를 얻었다(Fig. 1, Table 2).

품종별 다형성 절편의 재조합

Primer set P1(FAM-E-AGC / M-CGG), P4 (FAM-E-AGC / M-CAG), P10(FAM-E-AAC / M-CGT)을 이용한 PCR을 통해 얻은 증폭절편 중 담배 재배품종간 다형성을 보인 절편들을 순수 분리한 후, 이를 클로닝 벡터 pBluescript II SK-의 *Sma I* 위치에 재조합 하였다(Fig. 2). 유전적 다형성을 보인 절편을 동정하고 향후 재배종 담배 품종 분석에 이용하기 위하여 7종의 절편에 대한 염기서열을 분석한 결과 재배품종간에 염기서열상 상이한 부분을 발견하였는 바, 이는 담배

Table 2. GeneScan result of AFLP using primer sets

Primer set	Polymorphic peak (bp)	Primer set	Polymorphic peak (bp)
FAM-E-AGC / M-CGG	97, 134, 253	FAM-E-AAC / M-CGT	190, 197, 200
FAM-E-AGC / M-CAA	190, 230, 200	FAM-E-AAC / M-CGG	244
FAM-E-AGC / M-CAG	212	FAM-E-AAC / M-CAC	200
FAM-E-AGC / M-CAT	200	FAM-E-AAC / M-CAG	130, 135
FAM-E-AGC / M-CTG	190	FAM-E-AAC / M-CAT	200, 226, 265
FAM-E-AGC / M-CTT	100	FAM-E-AAC / M-CTC	210

재배품종간에 유전적 다형성을 보이는 좋은 증거이며, 또한 데이터베이스를 통한 분석 결과 이들의 염기서열이 벼(*Oryza sativa*)나 애기장대(*Arabidopsis*)의 일부 유전자 절편과 유전적 상관관계가 높은 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 이들 절편의 염기서열 정보를 이용하여 품종 특이적인 primer를 선별할 수 있는 가능성을 확인하였다.

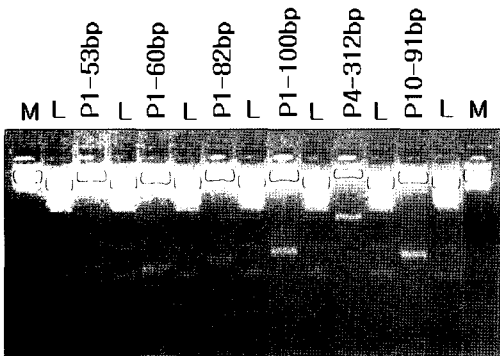


Fig. 2. Gel electrophoretic patterns of DNA fragments inserted into pBluescript II SK-. Size markers are 500bp ladder(lane M) and 100bp ladder(lane L). P1, P4 and P10 indicates primer set used to amplify.

### 품종별 특이 탐침의 선별

AFLP 결과로부터 선별된 품종 특이적 유전자 단편들을 이용하여 공시 담배 재배품종을 대상으로 재배 품종간 유전적 차이가 PCR 기법으로 가능한지의 여부와 이를 위한 재배 품종 특이적 marker를 선별하기 위하여 각 유전자 절편에 대한 총 40여개의 primer 조합을 디자인하고 이를 합성하였다. 합성된 primer의 조합을 이용한 PCR실험을 공시 재배 품종의 담배 총게놈 DNA를 대상으로 수행한 결과 버어리종만을 특이적으로 구별해낼 수 있는 primer조합을 선별하고 이를 각각 BrSF/BrSR로 명명하였으며(Fig. 3), 이들 primer조합을 이용하여 PCR을 실시해본 결과 약 1.3 kbp의 버어리종 특이절편이 증폭됨을 확인할 수 있었다. 그러나 절편의 크기가 담배 건엽의 분석 또는 정량적 분석 적용시 한계가 있으므로

로 이를 극복하기위해 300 bp 이하의 단편이 증폭될 수 있는 primer 조합에 대한 선별 실험을 계속해야 할 것이며, 다른 담배 재배 품종을 선별할 수 있는 primer의 선별연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다. 또한 증폭된 절편은 향후 DNA chip등을 통한 고효율 판별시스템 개발에 필요한 담배 재배 품종 특이적 marker로의 사용이 가능할 것이다.

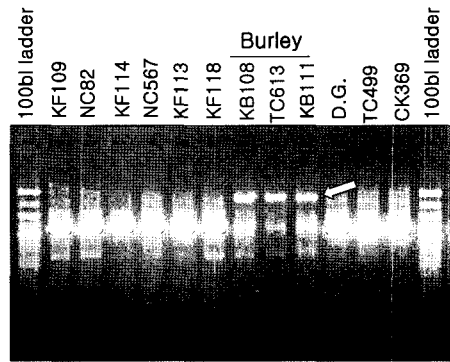


Fig. 3. Gel electrophoresis pattern of PCR using Burley-specific primer set. Arrow indicates specific band for Burley.

## 결론

현재 국내 재배 중인 담배 품종 9개와 모,부분 품종을 합한 총 12 재배품종의 게놈 DNA를 대상으로 실시한 AFLP 시험 결과 총 17set의 primer 조합중 12set의 primer 조합에서 담배 재배 품종간 유전적 다형성을 보이는 결과를 얻었다. 유전적 다형성을 보이는 특정 유전자 절편들을 재조합 하였으며, 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열 결과를 바탕으로 담배 재배 품종 특이적 marker를 선별하기 위하여 다양한 primer 를 합성하였고, 합성된 primer의 조합을 이용하여 담배 재배품종의 생엽시료로부터 분리된 총 게놈 DNA를 대상으로 PCR실험을 수행한 결과 버어리종만을 특이적으로 구별해낼 수 있는 BrSF/BrSR primer조합을 일차 선별하였다. 이 primer 조합을 이용하여 1.3 kbp 크기의 버어리종 특이 증폭 절편을 얻을 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Akehurst, B. C. (1981) Tobacco. Longman, New York, USA.
- Akkaya, M. S, Bhagwat, A. A. and Cregan, P.B. (1992) Length polymorphism of simple sequence repeat in soybean. *Genetics* 132: 1131-1141.
- Goodspeed, T. H. (1954) The genus *Nicotiana*. Chronica Botanica, Waltham, Mass.
- Grando, M. S., De Micheli, L., and Scienza, A. (1996) Characterization of *Vitis* germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 43: 187-192.
- Lin J. J., Kuo J. and Ma J. (1999) A PCR-based DNA finger-printing technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res.* 24: 3649-3650.
- Meksem, K., Ruben, E., Hyten, D., Triwitayakorn, K. and Lightfoot, D. A. (2001) Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA Markers. *Mol. Genet. Genomimics* 265: 207-214.
- Mengistu, L. W., Muller-Warrant, G. W., and Barker, R. E. (2000) Genetic diversity of *Poa annua* in western Oregon grass seed crops. *Theor. Appl. Genet.* 101: 70-79.
- Qi X and Lindhout P. (1997) Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet.* 254: 330-336.
- Ren, N. and Timko, M. P. (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* 44: 559-571.
- Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W., and Biricolti, S. (1996) Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35: 183-188.
- van Lith L. A. J. T. and Aarts H. J. M. (1995) Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Letters in Appl. Microbiol.* 19: 273-276.
- 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 Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Levak, K. J., Rafaski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphism amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.