



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

화이트 클로버(*Trifolium repens* L.)
모본과 교배종의 외부형태학적 분류
및 분자마커 개발

제주대학교 대학원

분자생명공학전공

한 승 섭

2023년 2월

화이트 클로버(*Trifolium repens* L.) 모본과 교배종의 외부형태학적 분류 및 분자마커 개발

지도교수 이 효 연

한 승 섭

이 논문을 생명공학 석사학위 논문으로 제출함

2023년 2월

한승섭의 생명공학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 김 인 증
위 원 이 효 연
위 원 은 창 호

제주대학교 대학원

2023년 2월

목 차

Abstract-----	iii
List of Tables-----	iv
List of Figures-----	v
I. 서 론-----	1
II. 재료 및 방법-----	5
1. 식물재료-----	5
2. 화이트 클로버 선발-----	7
3. Genomic DNA 추출-----	9
4. RAPD 분석-----	10
5. 선발된 RAPD마커의 SCAR마커로의 전환-----	14
III. 결과 및 고찰-----	16
1. 화이트 클로버의 외부형태학적 분류-----	16
1-1. 화이트 클로버 모본의 외부형태학적 분류-----	17
1-1-1. Ladino-----	17
1-1-2. Green ice-----	18
1-1-3. William-----	19

1-1-4. Pentaphyllum-----	20
1-1-5. Dragon's blood-----	21
1-2. 화이트 클로버 교배종의 외부형태학적 분류-----	23
1-2-1. JH-1(Ladino x Green ice)-----	23
1-2-2. JH-2(Ladino x Green ice)-----	25
1-2-3. JH-3(Ladino x Dragon's blood)-----	26
1-2-4. JH-4(William x Pentaphyllum)-----	27
1-2-5. JH-5(William x Dragon's blood)-----	28
1-2-6. JH-6(Pentaphyllum x Dragon's blood)-----	29
2. RAPD분석을 이용한 모본 및 교배종 화이트클로버의 유연관계 분석-----	30
2-1. JH-1 and JH-2(Ladino x Green ice)-----	30
2-2. JH-3(Ladino x Dragon's blood)-----	35
2-3. JH-4(William x Pentaphyllum)-----	37
2-4. JH-5(William x Dragon's blood)-----	41
2-5. JH-6(Pentaphyllum x Dragon's blood)-----	45
3. 화이트 클로버 품종 선별을 위한 SCAR 마커 개발-----	50
3-1. JH-1 and JH-2(Ladino x Green ice)-----	53
3-2. JH-4(William x Pentaphyllum)-----	56
3-3. JH-5(William x Dragon's blood)-----	59
3-4. JH-6(Pentaphyllum x Dragon's blood)-----	62
IV. 종합 고찰-----	65
V. 참고 문헌-----	68

Abstract

White clover (*Trifolium repens* L.) is an herbaceous perennial plant of the Fabaceae family. It is native in Europe and Central Asia and now globally cultivated as a forage crop. For centuries, white clover has been widely used as a feed for livestock due to its high protein content or as a cover crop due to its spreading properties. In addition, due to characteristics such as color and pattern of leaves, it has excellent potential as an ornamental plant. In this study, I classified 5 types of parental clover (Ladino, Green ice, William, Pentaphyllum and Dragon's blood) and 6 types of hybrids clover [JH-1(Ladino x Green ice (Overlap)), JH-2 [Ladino x Green ice (White V mark)], JH-3 (Ladino x Dragon's blood), JH-4 (Pentaphyllum x William), JH-5 (William x Dragon's blood) and JH-6 (Pentaphyllum x Dragon's blood)) with a 11 Morphological traits such as plant form, leaf shape, leaf edge shape, upper lamina color, lower lamina color, white V mark, midrib color, Front side of leaf pattern, Back side of leaf pattern, flower color and peduncle color. After the morphological classification, I also developed RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and SCAR (Sequence characterized ampified region) markers to classify the parental and hybrids of white clover at the molecular level. In the RAPD analysis, 13 of the RAPD primers (OPC-13, OPD-06, OPE-08, OPE-10, OPE-18, OPG-04, OPG-12, OPH-02, OPH-16, OPH-11, OPI-16, OPJ-12 and OPK-01) were found to exhibit genetic polymorphism between the parental and the hybrids of white clover. In this study, RAPD polymorphism bands showing all the polymorphisms identified in the two parent breeds in the hybrid were converted to SCAR primers by performing sequencing of polymorphic bands. As a result, only about 26% of 38 SCAR primers were converted to SCAR markers. In this study, it was demonstrated that the combination of 11 morphological traits, RAPD and SCAR markers can be used to identify varieties of white clover. It is also expected to be usefully used for breeding and identification of new varieties of white clover in the future.

List of Tables

Table 1. Random primers used in RAPD PCR-----	11
Table 2. Morphological traits of Ladino-----	17
Table 3. Morphological traits of Green ice-----	18
Table 4. Morphological traits of William-----	19
Table 5. Morphological traits of Pentaphyllum-----	20
Table 6. Morphological traits of Dragon's blood-----	22
Table 7. Morphological traits of JH-1 and their parental species(Ladino and Green ice)-----	24
Table 8. Morphological traits of JH-2 and their parental species(Ladino and Green ice)-----	25
Table 9. Morphological traits of JH-3 and their parental species(Ladino and Dragon's blood)-----	26
Table 10. Morphological traits of JH-4 and their parental species(William and Pentaphyllum)-----	27
Table 11. Morphological traits of JH-5 and their parental species(William and Dragon's blood)-----	28
Table 12. Morphological traits of JH-6 and their parental species(Pentaphyllum and Dragon's blood)-----	29
Table 13. List of SCAR primer-----	51

List of Figures

Fig. 1. Images of five white clover parental varieties and six white clover hybrid varieties-----	6
Fig. 2. Characteristics used for the morphological classification of white clover-----	8
Fig. 3. Image of Ladino-----	17
Fig. 4. Image of Green ice-----	18
Fig. 5. Image of William-----	19
Fig. 6. Image of Pentaphyllum-----	20
Fig. 7. Image of Dragon's blood-----	21
Fig. 8. Image of JH-1 and their parental species(Ladino and Green ice)-----	23
Fig. 9. Image of JH-2 and their parental species(Ladino and Green ice)-----	25
Fig. 10. Image of JH-3 and their parental species(Ladino and Dragon's blood)-----	26
Fig. 11. Image of JH-4 and their parental species(William and Pentaphyllum)-----	27
Fig. 12. Image of JH-5 and their parental species(William and Dragon's blood)-----	28
Fig. 13. Image of JH-6 and their parental species(Pentaphyllum and Dragon's blood)-----	29

Fig. 14. RAPD amplification profiles of white clover(Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2)-----	32
Fig. 15. Selected RAPD amplification profiles with Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2-----	34
Fig. 16. RAPD amplification profiles of white clover(Ladino, Dragon’s blood and JH-3)-----	35
Fig. 17. RAPD amplification profiles of white clover(William, Pentaphyllum and JH-4)-----	38
Fig. 18. Selected RAPD amplification profiles with William, Pentaphyllum and JH-4-----	40
Fig. 19. RAPD amplification profiles of white clover(William, Dragon’s blood and JH-5)-----	42
Fig. 20. Selected RAPD amplification profiles with William, Dragon’s blood and JH-5-----	44
Fig. 21. RAPD amplification profiles of white clover(Pentaphyllum, Dragon’s blood and JH-6)-----	47
Fig. 22. Selected RAPD amplification profiles with Pentaphyllum, Dragon’s blood and JH-6-----	49
Fig. 23. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2) and compared to white clover genome sequence-----	54
Fig. 24. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2---	55
Fig. 25. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(William, Pentaphyllum and JH-4) and compared to white clover genome sequence-----	57
Fig. 26. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the William, Pentaphyllum and JH-4----	58

Fig. 27. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(William, Dragon's blood and JH-5) and compared to white clover genome sequence-----60

Fig. 28. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the William, Dragon's blood and JH-5)-61

Fig. 29. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(Pentaphyllum, Dragon's blood and JH-6) and compared to white clover genome sequence-----63

Fig. 30. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the Pentaphyllum, Dragon's blood and JH-6-----65

I. 서론

화이트 클로버(*Trifolium repens* L.)는 유럽과 중앙아시아가 원산지인 전 세계 온대 지역에서 가장 중요한 목초지 다년생 콩과 식물이다(Frame et al., 1986). 화이트 클로버는 단백질 함량이 높아 가축의 사료로 널리 이용되고 있고, 땅에서 잘 퍼져나가고 효율적인 질소 고정을 하는 특성을 가지고 있어 피복작물이나 질소 고정 작물로도 이용되고 있다(Gibson et al., 1985, Frame et al., 1986). 화이트 클로버의 잎은 전반적으로 원형 또는 꺼꾸로 된 하트 모양의 형태를 나타내고 흰색의 V자형 무늬와 3장의 잎을 가지고 있으며 전 세계적으로 다양한 품종들이 재배되고 있다(Caradus, 1986, Griffiths et al., 2019). 여러 분류 기준을 통해 화이트 클로버가 종 내에서 다양한 잎의 색과 무늬를 가지고 있다는 것이 보고되어 있는데, Brewbaker(1955)는 V자 무늬가 나타나지 않는 no V, V자 무늬가 나타나는 Full V, V자 무늬가 중간에 끊긴 형태로 나타나는 Broken V와 V자 무늬가 중간에만 나타나는 V-point 등 총 4가지 형태의 V자형 무늬를 구분하여 화이트 클로버를 분류하였고, Corkill(1971)은 V자 무늬가 나타나는 V marking, 엽병이 붉은색을 띠며 아래 엽신부터 붉은 색을 띠는 Red leaflet, V자형 무늬 위에 붉은 색 V자형 무늬가 나타나는 Halo marking, 엽맥에 붉은 무늬가 나타나는 Red midrib, 녹색 잎 바탕에 전반적으로 붉은 무늬가 나타나는 Diffuse red leaf와 붉은 색의 잎을 띠는 Red leaf 등 총 6가지 형태적 특성에 따라 화이트 클로버를 분류하였다. 또한 Rebecca et al.(2010)은 V자형 무늬가 나타나지 않는 No V mark, V자형 무늬가 나타나는 Full V, V자형 무늬 가운데 형태가 번지듯이 나타나는 Broken V with yellow tip, 연녹색의 잎을 가지는 Marginal mark, 아래 엽신에 붉은 색을 띠는 Redspot, Red leaflet, 엽맥에 붉은 무늬가 나타나는 Red midrib, 붉은 색의 잎을 띠는 Red leaf, 잎 전반적으로 붉은 무늬가 생기는 Red fleck 등 총 9가지 형태적 특성에 따라 화이트 클로버를 분류하였다.

화이트 클로버는 서로 다른 이배체인 두 클로버 *Trifolium occidentale*와 *Trifolium pallescens*

가 교잡된 4배체형태로 존재하는데(Rebecca et al., 2010, Griffiths et al., 2019), 이러한 형태로 인해 이형접합성이 높기 때문에 밖에서 키우게 되면 다형성, 잡종 등이 발생하여 잎의 색, 무늬 등이 더 다양하게 나타난다(Rebecca et al., 2010). 또한, 화이트 클로버는 다양한 환경적 요인에 적응하는 능력이 있어 표현형이 다양해지고(Ballizany et al., 2014), 동일한 식물 내에서 다른 표현형을 보일 수도 있다고 보고되었다(Till, 1987). 또한, 화이트 클로버는 형질이 다양하여 관상용 식물로서의 잠재력이 우수하다고 언급했다(Zhang et al., 2018). 화이트 클로버의 품종은 일반적으로 외부 형태학적 특성에 따라 분류하는데, 이러한 특성은 환경적 요인에 의해 변화할 수 있기 때문에 환경변이에 독립적으로 나타나는 분자마커를 개발하면 더욱 효과적으로 분류할 수 있다(Lee et al., 2011). 식물의 유전적 다형성을 평가하기 위한 분자마커 개발 방법으로는, SSR(Single Sequence Repeats), SNP(Single Nucleotide Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)분석 등이 주로 이용되고 있다(Cho et al., 2017). Zamani et al.(2007)는 이란 석류(*Punica granatum* L.)의 형태학적 특성과 RAPD 마커를 사용하여 24개 유전자형의 유연관계를 밝히고자 하였고, 최근 연구에서도 Meilawati et al.(2021)은 후추(*Piper nigrum* L.)의 교배종과 부모종과의 형태학적 특성과 RAPD 마커를 이용하여 유전적 유연관계를 보고하였다. Anggraheni and Mulyaningsih(2021)는 망고(*Mangifera* spp)의 유전자원 집단에서 우수 형질의 품종 선발을 목적으로 잎의 형태 분류와 RAPD 마커를 이용하여 유전적 다양성을 조사하였다. 국내에서는 장미 속의 유전자원의 유연관계 및 *Rosa rugosa*의 유전적 다형성을 외부 형태학적 분석과 RAPD 분석을 병행하여 연구하였고(Joung et al., 2010), 한국의 5개 지역에서 자생하는 *Perilla*의 유전적 변이를 조사하기 위해 SSR 마커와 형태학적 특성을 사용하여 보고한 바 있다(Oh et al. 2021).

화이트 클로버도 많은 분자마커 실험이 진행되어 왔는데, Jones et al.(2003)은 근친 교배된 화이트 클로버를 사용하여 AFLP를 수행하여 매우 낮은 수준의 다형성이 관찰되었지만, SSR을 수행하여 48%의 다형성의 결과를 확인하였다. Khanlou et al.(2011)은 영국이 원산지

이며 중엽의 표현형이 관찰되는 Aberherald clover, 네덜란드가 원산지이며 대엽의 표현형이 관찰되는 Riesling clover, 그리고 덴마크가 원산지이며 소엽의 표현형이 관찰되는 Rivendel clover의 유전적 다형성을 확인하기 위해 EcoRI/MseI 제한효소와 제한효소 염기서열 뒤에 3bp adapter를 붙인 프라이머 6쌍을 이용하여 AFLP 실험을 진행하여 다형성을 확인하였다. 최근 Ma et al.(2020)은 10종의 화이트 클로버 품종(Sivit, Jumbo, Miligro, EmuNo.2, Klondike, Huia, Haifa, Sulky, Purple, Ladino)을 이용하여 SSR 분석을 수행한 결과 품종들 간에 다형성을 나타내는 것을 확인하였다. 그 외에도, RAPD, SSR등을 이용한 실험들이 진행 되었지만(Gustine et al., 2002, Bortolini et al., 2006, Zhang et al., 2007), 이들 연구는 V자형 무늬를 기반으로 분류한 화이트 클로버를 재료로 수행되었기 때문에 다른 형태의 화이트 클로버와 교배종들을 구분하기에는 불충분하다. RAPD분석은 유전체 DNA상 임의의 위치를 랜덤 프라이머를 이용하여 증폭시키는 방법으로 근연종간 구별에 사용되고 있으며, 환경변이에 독립적으로 나타나기 때문에 품종 구분에 보다 효과적이다(William et al., 1990). 또한 RAPD분석은 다른 분자마커에 비해 신속하고 염기서열에 대한 지식이 필요하지 않으며 저렴하게 할 수 있는 장점이 있다(William et al., 1990). Huang et al.(2000)은 4개의 상업용 국화 품종과 3개의 교배종을 RAPD로 분석하여 모본과 교배종 사이의 유연관계를 확인한 바 있다. 그러나 염기배열 10개 정도의 짧은 임의의 프라이머를 사용하기 때문에 여러 DNA 단편이 증폭되고 재현성이 낮기 때문에 신뢰도가 떨어지는 단점이 있다(Cho et al., 2010, Hong et al., 2016). 이를 단점을 보완하기 위해 SCAR(Sequence Characterized amplified region) 분자마커 방법을 주로 사용한다. SCAR(Sequence characterized amplified region)분석을 병행하여 품종 간 유연관계 및 판별 분자마커 개발에 활용된다. SCAR마커는 RAPD나 AFLP 등에서 임의의 프라이머를 이용하여 증폭된 DNA 단편의 염기서열 정보를 확인한 후, 특이적 프라이머를 설계하여 PCR을 수행하기 때문에 재현성이 높고 다형성이 확인된 개체를 특이적으로 확인할 수 있다(Paran et al., 1993, Cho et al., 2010, Chung et al., 2013, Hong et al., 2016, Han et al., 2021). 국내에서는 은행나무를 식별하는

SCAR 마커를 개발하여 은행나무 수나무를 식별하였으며(Hong et al., 2016), 한국 잔디 중 지 변이개체와 연관된 RAPD-SCAR 마커를 개발하여 한국 잔디 신품종을 식별하였다(Chung et al., 2013).

본 연구는 다양한 형태의 화이트 클로버 모본의 외부 형태학적으로 형질 조사를 수행하였으며, 이를 바탕으로 모본 간의 교배종을 선별하여 외부 형태학적 형질 조사를 통하여 어느 모본과의 교잡종인지를 확인하였다. 또한, RAPD 분석을 통하여 교배종과 모본 사이의 유연관계를 확인하였으며, RAPD 분석에서 선별된 다형성 밴드의 염기서열 정보를 이용하여 SCAR 마커로 전환하여 화이트 클로버 모본과 교배종 품종을 판별할 수 있는 분자마커를 개발하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물 재료

식물 재료는 제주대학교 아열대원예산업연구소에서 육종 중인 화이트 클로버 모본 5종 (Ladino, Green ice, William, Pentaphyllum and Dragon's blood)과 화이트 클로버 교배종 6종 [Ladino x Green ice(Overlap) (이하 JH-1), Ladino x Green ice(White V mark) (이하 JH-2), Ladino x Dragon's blood (이하 JH-3), Pentaphyllum x William (이하 JH-4), William x Dragon's blood (이하 JH-5) 그리고 Pentaphyllum x Dragon's blood (이하 JH-6)] 총 11품종을 선발하여 실험 재료로 사용하였다(Fig. 1).

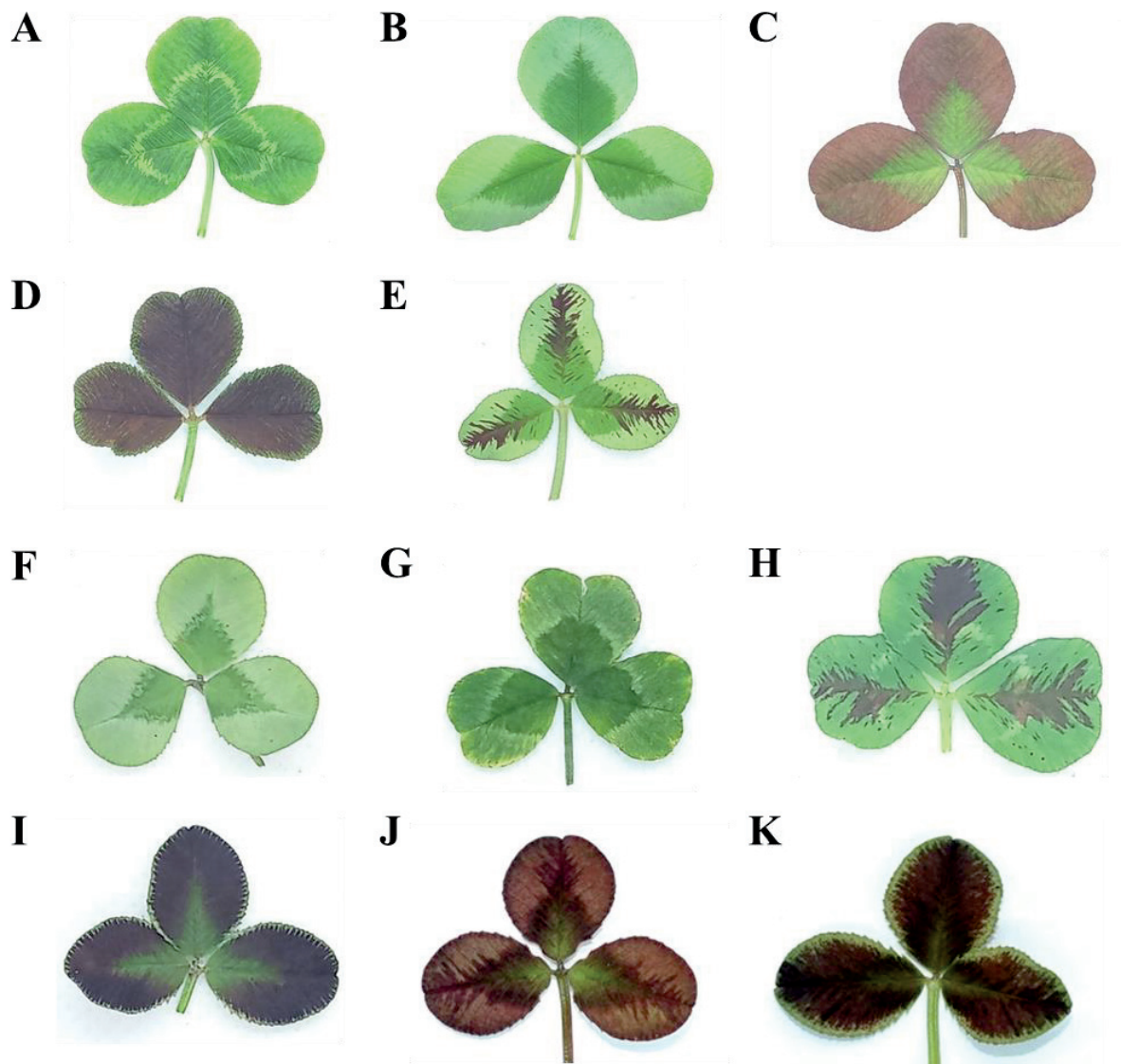


Fig. 1. Images of five white clover parental varieties and six white clover hybrid varieties. (A) Ladino (B) Green ice (C) William (D) Pentaphyllum (E) Dragon's blood (F) JH-1 : Ladino x Green ice(Overlap) (G) JH-2 : Ladino x Green ice(White V mark) (H) JH-3 : Ladino x Dragon's blood (I) JH-4 : William x Pentaphyllum (J) JH-5 : William x Dragon's blood (K) JH-6 : Pentaphyllum x Dragon's blood

2. 화이트 클로버 선발 및 분류

본 실험에서는 농림축산식품부 국립종자원의 화이트 클로버 특성조사요령을 참고하여 식물체 초형(Plant form), 소엽의 모양(Leaf shape), 소엽의 선단모양(Leaf edge shape), 위 엽신색(Upper lamina color), 아래 엽신색(Lower lamina color), 엽맥색(Midrib color), 흰색 V자형 무늬(White V mark), 엽 앞면 무늬 패턴(Front side of leaf pattern), 뒷면 무늬 패턴(Back side of leaf pattern), 화색(Flower color), 및 꽃자루색(Peduncle color) 등 11항목을 기준으로 하여 각 식물체 당 5개체씩 형태학적 분류를 수행하였다(Fig. 2). 본 연구에서 11항목 중에서 소엽은 줄기 정상부터 3절 전개엽의 중앙 소엽을 이용하여 조사하였으며, 색 관련 항목은 RGB 값으로 나타내었다.

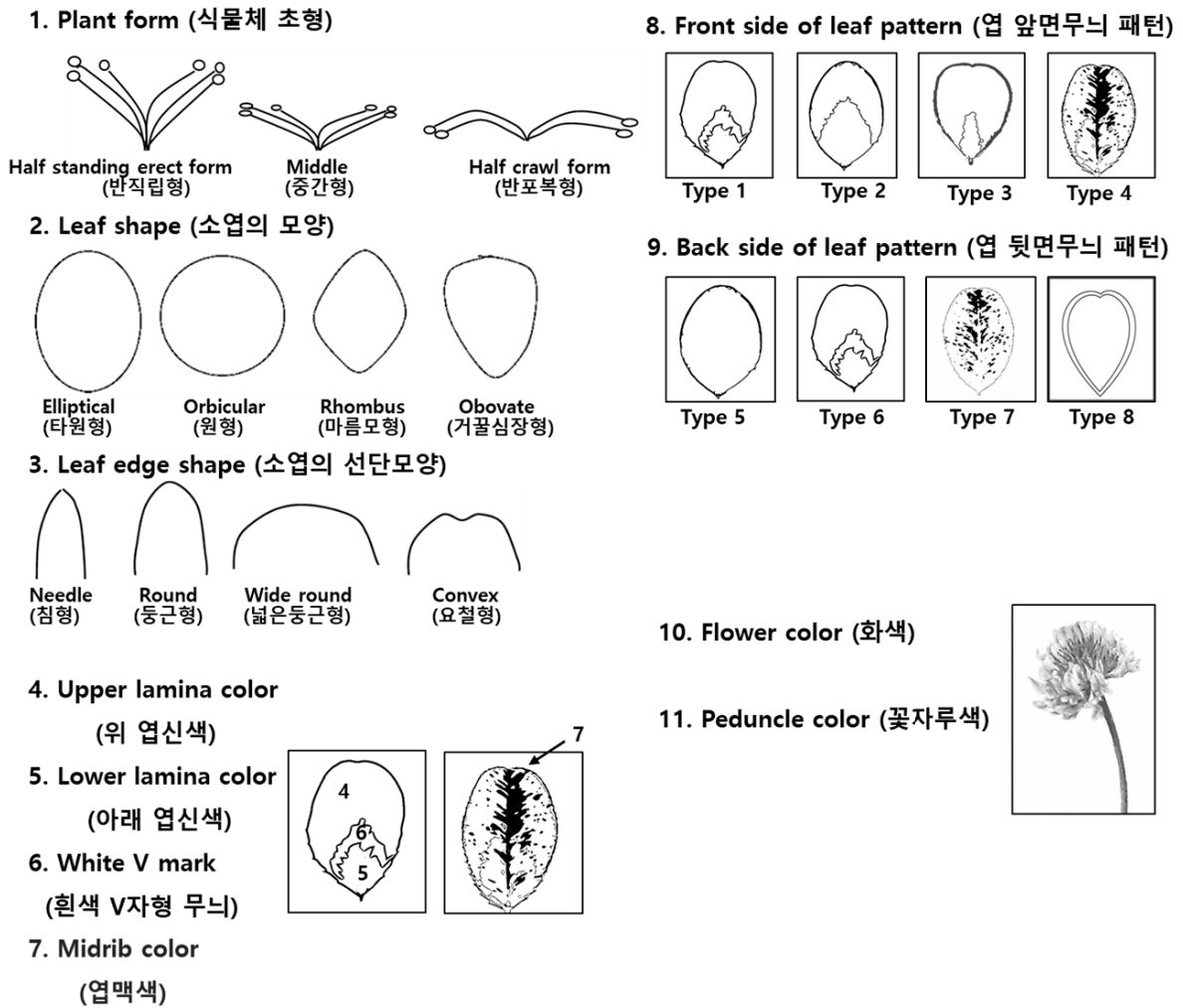


Fig. 2. Characteristics used for the morphological classification of white clover (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Korea Seed & Variety Service, 2012).

3. Genomic DNA 추출

화이트 클로버 모본 5종과 교배종 6종의 잎을 채취하여 액체질소로 동결시킨 후 막자사발을 이용해 분쇄하였다. 분쇄 조직의 Genomic DNA 추출은 CTAB method를 변형하여 이용하였다(Porebski et al., 1997).

시료 50mg을 1.5mL tube로 옮긴 후 CTAB buffer(2% CTAB, 1.5M NaCl, 100mM Tris, 20mM EDTA, 0.3% B-mercaptoethanol)를 1mL 첨가하여 vortexing 한 후 65°C에서 10분간격으로 inverting을 하여 30분간 반응시켰다. 상층액 700 μ L을 새 1.5mL tube로 옮긴 후 Chloroform : Isoamylalcohol(24:1) 용액 600 μ L 넣고 5분동안 inverting 한 후 10000rpm에 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액 600 μ L를 새 tube에 옮기고 RNase A(10mg/ μ L) 1 μ L를 첨가하여 37°C에서 15분 반응시킨 후, Chloroform : Isoamylalcohol(24:1) 용액을 600 μ L 첨가하여 5분 inverting 시키고 10000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 새 2mL tube에 상층액 500 μ L, 4M NaCl 250 μ L, 100% EtOH 1mL 첨가하여 5회 inverting 시킨 후 12000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 70% EtOH 1mL 넣고 12000rpm으로 원심분리 후 상층액을 버리고 15분 동안 상온에서 건조 후 TE buffer 100 μ L를 첨가하여 DNA를 용해하였다. 추출한 genomic DNA는 1.5% 아가로오스 겔을 이용하여 전기영동 상에서 확인하였으며 ThermoFisher Scientific사 NanoDrop 2000으로 정량하여 genomic DNA의 농도를 5ng/ μ L로 맞춰 PCR에 사용하였다.

4. RAPD 분석

랜덤 프라이머는 OPA부터 OPL까지 240개의 프라이머를 이용하여 RAPD를 수행하였다 (Table 1). 다양한 외부형태학적 특징과 유전적 다형성을 확인하기 위해 모본 화이트 클로버 2종과 외부형태학적 특징이 유사한 교배종을 그룹으로 분류하여 Ladino, Green ice, JH-1, JH-2를 첫 번째 그룹, Ladino, Dragon's blood, JH-3를 두 번째 그룹, William, Pentaphyllum, JH-4을 세 번째 그룹, William, Dragon's blood, JH-5를 네 번째 그룹, Pentaphyllum, Dragon's blood, JH-6를 다섯 번째 그룹으로 나누어 RAPD PCR을 수행하였다.

RAPD PCR 반응에는 TOPsimple DyeMIX-nTaq(Enzynomics, Seoul, Korea) PCR tube에 주형 DNA 25ng과 10pmol 랜덤 프라이머를 첨가 후 증류수로 20 μ L를 맞췄다. PCR 증폭은 Takara사의 TaKaRa Thermal Cycler Dice Touch TP350을 이용하였으며 94°C에서 5분 동안 denaturation을 수행하고, [94°C에서 denaturation 1분, 40°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분] 35cycle을 수행한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 2% 아가로오스 겔로 확인하였다. PCR 및 전기영동에서 모본과 교배종 사이에서 다형성을 보이는 밴드가 관찰되는 RAPD 마커는 Re-PCR을 통해 재확인하였다.

Table 1. Random primers used in RAPD PCR

Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPB-01	GTTTCGCTCC	OPC-01	TTCGAGCCAG	OPD-01	ACCGGAAAGG
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPB-02	TGATCCCTGG	OPC-02	GTGAGGCGTC	OPD-02	GGACCCAAACC
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPB-03	CAITCCCCCTG	OPC-03	GGGGGTCTTT	OPD-03	GTGCGCCGTCA
OPA-04	AATCGGGCTG	OPB-04	GGACTGGAGT	OPC-04	CCGCATCTAC	OPD-04	TCTGGTGAGG
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPB-05	TGCGCCCTTC	OPC-05	GATGACCCGCC	OPD-05	TGAGCGGACA
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPB-06	TGCTCTGCCC	OPC-06	GAACGGACTC	OPD-06	ACCTGAAACGG
OPA-07	GAAACGGGTG	OPB-07	GGTGACGCAG	OPC-07	GTCCCGACGA	OPD-07	TTGGCACGGG
OPA-08	GTGACGTAGG	OPB-08	GTCCACACGG	OPC-08	TGGACCGGTG	OPD-08	GTGTGCCCCA
OPA-09	GGTAAACGCC	OPB-09	TGGGGGACTC	OPC-09	CTCACCGTCC	OPD-09	CTCTGGAGAC
OPA-10	GTGATCGCAG	OPB-10	CTGCTGGGAC	OPC-10	TGTCTGGGTG	OPD-10	GGTCTACACC
OPA-11	CAATCGCCGT	OPB-11	GTAGACCCGT	OPC-11	AAAGCTGCGG	OPD-11	AGCGCCATTG
OPA-12	TCGGCCGATAG	OPB-12	CCITGACGCA	OPC-12	TGTCATCCCC	OPD-12	CACCGTATCC
OPA-13	CAGCACCCAC	OPB-13	TTCGCCCGCT	OPC-13	AAGCCTCGTC	OPD-13	GGGGTGACGA
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPB-14	TCCGCTCTGG	OPC-14	TGCGTGCTTG	OPD-14	CTTCCCCAAG
OPA-15	TTCCGAAACC	OPB-15	GGAGGGTGT	OPC-15	GACGGATCAG	OPD-15	CATCCGTGCT
OPA-16	AGCCAGCGAA	OPB-16	TTTGCCCGGA	OPC-16	CACACTCCAG	OPD-16	AGGGCGTAAG
OPA-17	GACCGCTTGT	OPB-17	AGGGAACGAG	OPC-17	TTCCCCCCAG	OPD-17	TTTTCCACGG
OPA-18	AGGTGACCGT	OPB-18	CCACAGCAGT	OPC-18	TGAGTGGGTG	OPD-18	GAGAGCCAAC
OPA-19	CAAACGTCGG	OPB-19	ACCCCCGAAG	OPC-19	GTTGCCAGCC	OPD-19	CTGGGGACTT
OPA-20	GTTGCGATCC	OPB-20	GGACCCCTTAC	OPC-20	ACTTCGCCAC	OPD-20	ACCCGGTCAC

Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece
OPE-01	CCCAAGGTCC	OPF-01	ACGGATCCTG	OPG-01	CTACGGAGGA	OPH-01	GGTCGGAGAA		
OPE-02	GGTGCGGGAA	OPF-02	GAGGATCCCT	OPG-02	GGCACTGAGG	OPH-02	TCGGACGTGA		
OPE-03	CCAGATGCAC	OPF-03	CCTGATCAC	OPG-03	GAGCCCTCCA	OPH-03	AGACGTCCAC		
OPE-04	GTGACATGCC	OPF-04	GGTGATCAGG	OPG-04	AGCGTGTCTG	OPH-04	GAAAGTCGCC		
OPE-05	TCAGGGAGGT	OPF-05	CCGAATCC	OPG-05	CTGAGACGGA	OPH-05	AGTCGTCC		
OPE-06	AAGACCCCTC	OPF-06	GGGAATTCGG	OPG-06	GTGCCTAAC	OPH-06	ACGCATCGCA		
OPE-07	AGATGCAGCC	OPF-07	CCGATATCCC	OPG-07	GAACCTGCGG	OPH-07	CTGCATCGTG		
OPE-08	TCACCCACGGT	OPF-08	GGGATAICGG	OPG-08	TCACGTCCAC	OPH-08	GAAACACCCC		
OPE-09	CTTACCCCGA	OPF-09	CCAAGCTTCC	OPG-09	CTGACGTAC	OPH-09	TGTAGCTGGG		
OPE-10	CACCAGGTGA	OPF-10	GGAAAGTTGG	OPG-10	AGGGCCGTCT	OPH-10	CCTACGTCAG		
OPE-11	GAGTCTCAGG	OPF-11	TTGGTACCCC	OPG-11	TGCCCCGTCT	OPH-11	CTTCCGCACT		
OPE-12	TTATCGCCCC	OPF-12	ACGGTACCAG	OPG-12	CAGCTCACGA	OPH-12	ACGGCATGT		
OPE-13	CCCAGATTCGG	OPF-13	GGCTGCAGAA	OPG-13	CTCTCCGCCA	OPH-13	GACGCCACAC		
OPE-14	TGCGGCTGAG	OPF-14	TGCTGCAGGT	OPG-14	GGATGAGACC	OPH-14	ACCAGTTGG		
OPE-15	ACGCACAACC	OPF-15	CCAGTACTCC	OPG-15	ACTGGGACTC	OPH-15	AATGGCGCAG		
OPE-16	GGTGACTGTG	OPF-16	GGAGTACTGG	OPG-16	AGCGTCCCTCC	OPH-16	TCTCAGCTGG		
OPE-17	CTACTGCCGT	OPF-17	AACCCGGGAA	OPG-17	ACGACCGACA	OPH-17	CACTCTCCTC		
OPE-18	GGACTGCAGA	OPF-18	TTCCCGGGTT	OPG-18	GGCTCATGTG	OPH-18	GAATCGGCCA		
OPE-19	ACGGCGTATG	OPF-19	CCTCTAGACC	OPG-19	GTCAGGGCAA	OPH-19	CTGACCCAGCC		
OPE-20	AACGGTGACC	OPF-20	GGTCTAGAGG	OPG-20	TCTCCCTCAG	OPH-20	GGGAGACATC		

Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece	Primer	Sequenece
OPI-01	ACCTGGACAC	OPI-01	CCCGGCATAA	OPK-01	CATTCGAGCC	OPL-01	GGCATGACCT		
OPI-02	GGAGGAGAGG	OPI-02	CCCGTTGGGA	OPK-02	GTCTCCGCAA	OPL-02	TGGGCGTCAA		
OPI-03	CAGAAGCCCA	OPI-03	TCCTCCGCTTG	OPK-03	CCAGCTTAGG	OPL-03	CCAGCAGCTT		
OPI-04	CCGCCTAGTC	OPI-04	CCGAACACGG	OPK-04	CCGCCCAAAC	OPL-04	GACTGCACAC		
OPI-05	TGTTCCACGG	OPI-05	CTCCATGGGG	OPK-05	TCTGTCGAGG	OPL-05	ACGCAGGCAC		
OPI-06	AAGGCGGCAG	OPI-06	TCGTTCCGCA	OPK-06	CACCTTTCCC	OPL-06	GAGGGAAGAG		
OPI-07	CAGCGACAAG	OPI-07	CCCTCTCGACA	OPK-07	AGCGAGCAAG	OPL-07	AGGCCGGAAC		
OPI-08	TTTGCCCGGT	OPI-08	CATACCGTGG	OPK-08	GAACACTGGG	OPL-08	AGCAGGTGGA		
OPI-09	TGGAGAGCAG	OPI-09	TGAGCCTCAC	OPK-09	CCCTACCGAC	OPL-09	TGCGAGAGTC		
OPI-10	ACAACGCGAG	OPI-10	AAGCCCGAGG	OPK-10	GTGCAACGTG	OPL-10	TGGGAGATGG		
OPI-11	ACATGCCCGTG	OPI-11	ACTCCTGCGA	OPK-11	AAIGCCCCCAG	OPL-11	ACGATGAGCC		
OPI-12	AGAGGGCACA	OPI-12	GTCCCCGTGT	OPK-12	TGGCCCTCAC	OPL-12	GGGCGGTACT		
OPI-13	CTGGGGCTGA	OPI-13	CCACACTACC	OPK-13	GGTTGTACCC	OPL-13	ACCGCCTGCT		
OPI-14	TGACGGCGGT	OPI-14	CACCCGGATG	OPK-14	CCCCGCTACAC	OPL-14	GTGACAGGCT		
OPI-15	TCATCCGAGG	OPI-15	TGTAGCAGGG	OPK-15	CTCCTGCCAA	OPL-15	AAGAGAGGGG		
OPI-16	TCTCCGCCCT	OPI-16	CTGCTTAGGG	OPK-16	GAGCGTCGAA	OPL-16	AGGTTGCAGG		
OPI-17	GGTGGTGATG	OPI-17	ACGCCAGTTC	OPK-17	CCCAGCTGTG	OPL-17	AGCCTGAGCC		
OPI-18	TGCCCCAGCCT	OPI-18	TGGTCGCAGA	OPK-18	CCTAGTCGAG	OPL-18	ACCACCCACC		
OPI-19	AATGCGGGAG	OPI-19	GGACACCCACT	OPK-19	CACAGGCGGA	OPL-19	GAGTGGTGAC		
OPI-20	AAAGTGCGGG	OPI-20	AAGCGGCCTC	OPK-20	GTGTCGCGAG	OPL-20	TGGTGGACCA		

5. 선발된 RAPD마커의 SCAR마커로의 전환

RAPD PCR을 통해 모본과 교배종 사이에 특이적인 다형성을 나타내는 밴드를 선발 하여 PrimePrep Gel purification kit(GeNet Bio, Seoul, Korea)를 사용하여 PCR 산물을 회수하였다. 메스를 이용해서 아가로오스겔을 자르고, Gel-B buffer를 gel 무게의 3배 넣어 50°C에서 10분간 녹인 후 PrimePrep Gel purification kit으로 옮겨 13000rpm으로 1분간 원심분리하였다. 내린 용액을 버리고 Gel-B buffer 500μL 넣고 13000rpm으로 1분 원심분리 후, PW buffer를 700 μL 넣어 13000rpm으로 30초간 원심분리를 수행하였다. 13000rpm으로 1분동안 원심분리를 하여 남은 용액을 내리고, 새로운 1.5mL tube로 교체 후, PE buffer를 50μL 넣어주고 상온에서 1분간 방치한 후에 13000rpm으로 1분 원심분리하여 DNA를 회수하였다.

Gel elution을 통해 정제된 PCR 산물을 ThermoFisher Scientific사의 MG TA TOPO Cloning Kit를 이용하여 pTA TOPO vector에 Ligation한 후, DH5-a Competent cell에 형질전환 하여 50μg/μL kanamycin을 포함하는 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 16시간 정도 배양하였다. 생성된 콜로니를 선발하여 콜로니 PCR을 수행하였다. PCR반응은 94°C에서 denaturation 10분 반응시키고 [94°C에서 denaturation 30초, 58°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분] x 28cycle 반복한 후, 72°C에서 extension을 5분간 반응시켰다. 콜로니 PCR 산물을 전기영동으로 확인하여 RAPD 분석에서 확인했던 밴드와 사이즈에 차이가 없는 콜로니를 선발하여 50μg/μL kanamycin을 포함하는 LB 액체배지에서 37°C에서 16시간 정도 배양하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA는 바이오닉스 (<http://www.bionicsro.co.kr>)에 염기서열 분석을 의뢰하였다.

선발된 RAPD 다형성 밴드의 염기서열 결과를 NCBI Blast(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 이용하여 상동성 분석 및 염기서열을 토대로 20mer 내외 크기의 SCAR 프라이머를 디자인하였다. 제작한 SCAR 프라이머를 검정하기 위하여 모본과 교배종을 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응에는 TOPsimple DryMIX-nTaq(Enzymomics, Seoul, Korea) PCR tube에 주형 DNA 25ng과 10pmol 랜덤 프라이머를 첨가

후 증류수로 20 μ L를 맞췄으며, PCR 증폭은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 denaturation을 수행하고, [94 $^{\circ}$ C에서 denaturation 30초, 55~60 $^{\circ}$ C에서 annealing 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 extension 1분] 30cycle을 수행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 2% 아가로오스 겔로 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화이트 클로버 외부형태학적 분류

작물의 양적 형질은 환경적 요소에 의해 변화할 수 있기 때문에 품종 구분에 사용이 어렵다고 보고되었으며(Lee et al., 2011), 화이트 클로버의 경우에는 환경적 요인에 따라 다양한 형태적 특성이 나타난다고 보고되었다(Ballizany et al., 2014). 따라서, 환경에 영향을 덜 받는 11가지의 특성조사 항목을 이용하여 다섯 종의 화이트 클로버 모본을 외부 형태학적으로 분류하였으며, 잎과 꽃의 색 분류는 RGB 값으로 나타내었다(Fig. 3~13, Table 2~12).

1-1. 화이트 클로버 모본의 외부형태학적 분류

1-1-1. Ladino

Ladino는 반포복과 반직립의 중간 형태 초형으로 생육하는 것을 확인하였다. 소엽의 모양은 거꿀심장형이며 선단 모양은 넓은 둥근형의 선단 모양을 나타내며, 소엽의 아래위 엽신색은 진한 황록색 [RGB(83, 134, 56)]을 띠는 특성을 가지고 있다. 소엽의 앞과 뒷면 무늬 패턴은 모두 V자형 흰색 무늬를 나타낸다(Type 1과 Type 6). 꽃의 형질을 조사한 결과, 화색은 녹색을 띤 흰색 [RGB(229, 241, 241)]을 띠며 꽃자루 색은 진한 황록색 [RGB(123, 151, 98)]을 띠고 있다(Fig. 3, Table 2).



Fig. 3. Image of Ladino.

Table 2. Morphological traits of Ladino.

No.	Morphological trait	Ladino
1	Plant form	Middle
2	Leaf shape	Obcordate
3	Leaf edge shape	Wide round
4	Upper lamina color (RGB)	83, 134, 56
5	Lower lamina color (RGB)	83, 134, 56
6	White V mark (RGB)	209, 209, 146
7	Midrib color (RGB)	
8	Front side of leaf pattern	Type 1
9	Back side of leaf pattern	Type 6
10	Flower color (RGB)	229, 241, 241
11	Peduncle color (RGB)	123, 151, 98

1-1-2. Green ice

Green ice의 식물체 초형은 반직립 형태로 소엽의 모양은 타원형이며 선단 모양은 요철형을 나타낸다. 소엽의 위 엽신은 중간 정도의 황록색 [RGB(142, 191, 136)]을 띠고, 아래 엽신은 진한 황록색 [RGB(88, 137, 66)]을 나타낸다. 소엽의 앞면 무늬 패턴은 위 엽신과 아래 엽신이 나뉘는 특징(Type 2)을 가지며, 뒷면 무늬 패턴은 무늬가 없는 특징(Type 5)을 나타낸다. 꽃의 형질 조사에서는, 화색과 꽃자루 색은 Ladino와 같은 형질을 가지고 있다 (Fig. 4, Table 3).



Fig. 4. Image of Green ice.

Table 3. Morphological traits of Green ice.

No.	Morphological trait	Green ice
1	Plant form	Half standing erect
2	Leaf shape	Elliptical
3	Leaf edge shape	Convex
4	Upper lamina color (RGB)	142, 191, 136
5	Lower lamina color (RGB)	88, 137, 66
6	White V mark (RGB)	
7	Midrib color (RGB)	
8	Front side of leaf pattern	Type 2
9	Back side of leaf pattern	Type 5
10	Flower color (RGB)	234, 234, 241
11	Peduncle color (RGB)	108, 147, 31

1-1-3. William

William의 식물체 초형은 반직립 형태로 소엽의 모양은 타원형이며, 선단 모양은 요철형을 나타낸다. 소엽의 위 엽신은 검붉은색 [RGB(205, 121, 136)]이며 아래 엽신은 선명한 황록색 [RGB(174, 208, 112)]을 띄고 있다. 소엽의 앞면 무늬 패턴은 아래 엽신색이 번지듯이 나타나는 특징(Type 3)을 가지고, 뒷면 무늬 패턴은 무늬가 없이 검붉은색을 띄는 특징 (Type 5)을 가지고 있다. 꽃의 형질 조사 결과, 화색은 중간 정도의 적자색 [RGB(254, 167, 245)]을 띄며 꽃자루 색은 검붉은색 [RGB(75, 35, 36)]을 띄고 있다(Fig. 5, Table 4).

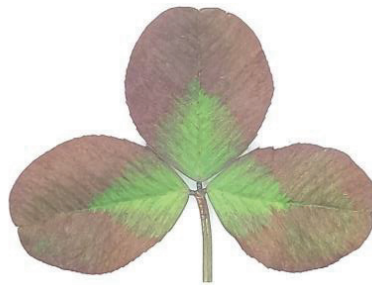


Fig. 5. Image of William.

Table 4. Morphological traits of William.

No.	Morphological trait	William
1	Plant form	Half standing erect
2	Leaf shape	Elliptical
3	Leaf edge shape	Convex
4	Upper lamina color (RGB)	205, 121, 136
5	Lower lamina color (RGB)	174, 208, 112
6	White V mark (RGB)	
7	Midrib color (RGB)	
8	Front side of leaf pattern	Type 3
9	Back side of leaf pattern	Type 5
10	Flower color (RGB)	254, 167, 245
11	Peduncle color (RGB)	75, 35, 36

1-1-4. Pentaphyllum

Pentaphyllum의 식물체 초형은 반직립 형태로 소엽의 모양은 거꿀심장형이며, 선단 모양은 요철형을 나타낸다. 소엽의 엽신은 진한 갈색 [RGB(101, 62, 75)]을 띠고 있다. 소엽의 앞면 무늬와 뒷면 무늬 모두 잎의 가장자리와 엽신의 색이 다른 특징을 가지고 있다 (Type 8). 꽃의 형질 조사에서는, 화색은 흰색 [RGB(239, 252, 250)]을 띠며 꽃자루 색은 황록색 [RGB(188, 223, 132)]을 띠고 있다(Fig. 6, Table 5).



Fig. 6. Image of Pentaphyllum.

Table 5. Morphological traits of Pentaphyllum.

No.	Morphological trait	Pentaphyllum
1	Plant form	Half standing erect
2	Leaf shape	Obcordate
3	Leaf edge shape	Convex
4	Upper lamina color (RGB)	101, 62, 75
5	Lower lamina color (RGB)	101, 62, 75
6	White V mark (RGB)	
7	Midrib color (RGB)	
8	Front side of leaf pattern	Type 8
9	Back side of leaf pattern	Type 8
10	Flower color (RGB)	239, 252, 250
11	Peduncle color (RGB)	188, 223, 132






1-1-5. Dragon's blood

Dragon's blood의 초형은 반직립 형태를 나타내고 있으며, 소엽 모양은 타원형으로, 선단 모양은 넓은 둥근형을 나타낸다. 소엽의 위 엽신은 중간 정도의 황록색 [RGB(194, 216, 170)]이며, 아래 엽신은 진한 황록색 [RGB(107, 155, 64)]을 나타낸다. 소엽의 앞면무늬 패턴은 Green Ice처럼 위 엽신과 아래 엽신의 색이 나뉘어져 있으며, 검붉은색 [RGB(90, 55, 54)]의 엽맥무늬가 아래위 엽신에서 나타나는 특징(Type 4)을 가지고 있다. 또한 뒷면 무늬 패턴은 검붉은색 [RGB(90, 55, 54)]의 엽맥무늬가 나타나는 특징(Type 7)을 가지고 있다. 꽃의 형질을 조사한 결과에서는, 화색과 꽃자루 색은 Ladino와 Green Ice와 유사한 형질을 나타낸다(Fig. 7, Table 6).



Fig. 7. Image of Dragon's blood.

Table 6. Morphological traits of Dragon's blood

No.	Morphological trait	Dragon's blood
1	Plant form	Half standing erect
2	Leaf shape	Elliptical
3	Leaf edge shape	Wide round
4	Upper lamina color (RGB)	194, 216, 170 
5	Lower lamina color (RGB)	107, 155, 64 
6	White V mark (RGB)	
7	Midrib color (RGB)	90, 55, 54 
8	Front side of leaf pattern	Type 4
9	Back side of leaf pattern	Type 7
10	Flower color (RGB)	251, 250, 255 
11	Peduncle color (RGB)	156, 195, 113 

1-2. 화이트 클로버 교배종의 외부형태학적 분류

화이트 클로버 교배종은 화이트 클로버 모본의 11가지 형태학적 분류를 기준으로 하여 모본 간의 교배종들 중에서 6종을 선발하였다.

1-2-1. JH-1(Ladino x Green ice)

JH-1 교배종은 Ladino와 유사한 반직립과 반포복의 중간 형태의 초형을 가지고, Green ice와 유사한 중간 정도의 황록색을 띄는 위 엽신 [RGB(139, 173, 87)]과 엽 뒷면무늬 패턴 (Type 5)을 나타내며, 소엽의 앞면 무늬 패턴은 Green ice의 위 엽신과 아래 엽신의 색이 나뉘는 앞면무늬 패턴과 Ladino의 V형태의 흰색 앞면무늬 패턴이 겹쳐진 형태(Type 1+2)를 나타내는 형질을 나타낸다(Fig. 8, Table 7).

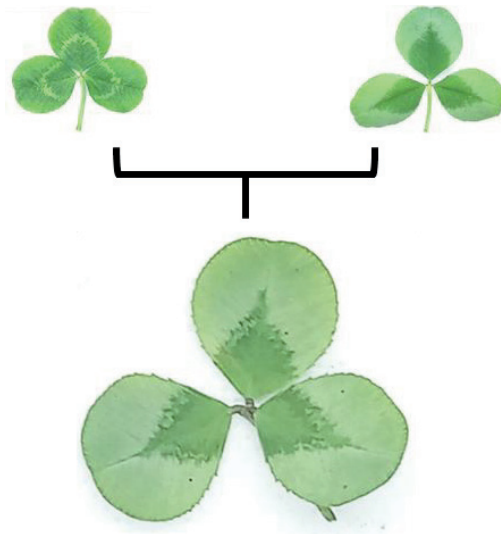


Fig. 8. Image of JH-1 and their parental species(Ladino and Green ice).

Table 7. Morphological traits of JH-1 and their parental species(Ladino and Green ice).

No.	Morphological trait	Ladino	Green ice	JH-1
1	Plant form	Middle	Half standing erect	Middle
2	Leaf shape	Obcordate	Elliptical	Obcordate
3	Leaf edge shape	Wide round	Convex	Wide round
4	Upper lamina color (RGB)	83, 134, 56	142, 191, 136	139, 173, 87
5	Lower lamina color (RGB)	83, 134, 56	88, 137, 66	110, 153, 45
6	White V mark (RGB)	209, 209, 146		
7	Midrib color (RGB)			
8	Front side of leaf pattern	Type 1	Type 2	Type 1 + Type 2
9	Back side of leaf pattern	Type 6	Type 5	Type 5
10	Flower color (RGB)	229, 241, 241	234, 234, 241	236, 244, 241
11	Peduncle color (RGB)	123, 151, 98	108, 147, 31	121, 140, 50

1-2-2. JH-2(Ladino x Green ice)

JH-2 교배종은 Green ice와 유사한 반직립의 초형을 가지고, Green ice와 유사한 중간 정도의 황록색을 띠는 위 엽신 [RGB(177, 197, 151)]과 엽 뒷면무늬 패턴(Type 5)을 나타내며, 소엽의 앞면 무늬 패턴은 Green ice의 위 엽신과 아래 엽신의 색이 나뉘는 앞면무늬 패턴과 Ladino의 V형태의 흰색이 나타나 겹쳐진 형태(Type 1+2)를 나타내는 형질을 가진다 (Fig. 9, Table 8).



Fig. 9. Image of JH-2 and their parental species(Ladino and Green ice).

Table 8. Morphological traits of JH-2 and their parental species(Ladino and Green ice).

No.	Morphological trait	Ladino	Green ice	JH-2
1	Plant form	Middle	Half standing erect	Half crawl erect
2	Leaf shape	Obcordate	Elliptical	Obcordate
3	Leaf edge shape	Wide round	Convex	Convex
4	Upper lamina color (RGB)	83, 134, 56	142, 191, 136	177, 197, 151
5	Lower lamina color (RGB)	83, 134, 56	88, 137, 66	129, 177, 75
6	White V mark (RGB)	209, 209, 146		
7	Midrib color (RGB)			
8	Front side of leaf pattern	Type 1	Type 2	Type 1 + Type 2
9	Back side of leaf pattern	Type 6	Type 5	Type 5
10	Flower color (RGB)	229, 241, 241	234, 234, 241	249, 248, 248
11	Peduncle color (RGB)	123, 151, 98	108, 147, 31	166, 202, 102

1-2-3. JH-3(Ladino x Dragon's blood)

JH-3 교배종은 Ladino와 유사한 반직립과 반포복의 중간 형태의 초형을 가지고, Ladino와 유사한 진한 황록색을 띠는 엽신 [RGB(144, 183, 100)]을 나타내며, 소엽의 앞면 무늬 패턴은 Ladino의 V형태의 흰색 앞면무늬 패턴과 Dragon's blood의 검붉은색의 엽맥무늬가 나타나는 특징을 모두 가진다(Type 1+4). 또한, 엽 뒷면 무늬 형태에도 Dragon's blood의 검붉은색 엽맥무늬를 나타낸다(Fig. 10, Table 9).

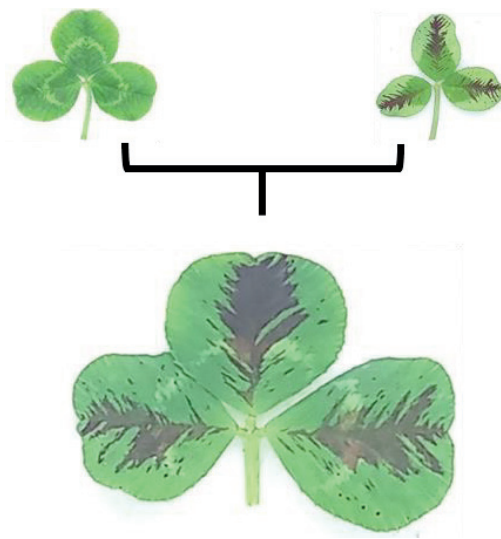


Fig. 10. Image of JH-3 and their parental species(Ladino and Dragon's blood).

Table 9. Morphological traits of JH-3 and their parental species(Ladino and Dragon's blood).

No.	Morphological trait	Ladino	Dragon's blood	JH-3
1	Plant form	Middle	Half standing erect	Middle
2	Leaf shape	Obcordate	Elliptical	Obcordate
3	Leaf edge shape	Wide round	Wide round	Convex
4	Upper lamina color (RGB)	83, 134, 56	194, 216, 170	144, 183, 100
5	Lower lamina color (RGB)	83, 134, 56	107, 155, 64	144, 183, 100
6	White V mark (RGB)	209, 209, 146		208, 197, 151
7	Midrib color (RGB)		90, 55, 54	119, 71, 60
8	Front side of leaf pattern	Type 1	Type 4	Type 1 + Type 4
9	Back side of leaf pattern	Type 6	Type 7	Type 7
10	Flower color (RGB)	229, 241, 241	251, 250, 255	238, 244, 232
11	Peduncle color (RGB)	123, 151, 98	156, 195, 113	110, 131, 43

1-2-4. JH-4(William x Pentaphyllum)

JH-4 교배종은 William과 Pentaphyllum과 유사한 반직립의 초형을 가지고, Pentaphyllum과 유사한 진한 갈색을 띠는 엽신 [RGB(94, 40, 42)]을 나타내며, 소엽의 앞면 무늬 패턴은 Pentaphyllum의 잎 가장자리와 엽신의 색이 다른 패턴과 William의 아래 엽신색이 변지듯이 나타나는 특징을 모두 가진다(Type 3+8). 또한, 엽 뒷면 무늬 형태에도 Pentaphyllum의 잎 가장자리와 엽신의 색이 다른 패턴을 나타낸다(Fig. 11, Table 10).

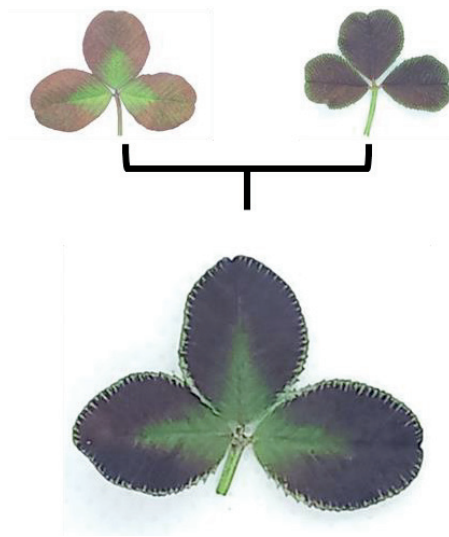


Fig. 11. Image of JH-4 and their parental species(William and Pentaphyllum).

Table 10. Morphological traits of JH-4 and their parental species(William and Pentaphyllum).

No.	Morphological trait	William	Pentaphyllum	JH-4
1	Plant form	Half standing erect	Half standing erect	Half standing erect
2	Leaf shape	Elliptical	Obcordate	Elliptical
3	Leaf edge shape	Convex	Convex	Wide round
4	Upper lamina color (RGB)	205, 121, 136	101, 62, 75	94, 40, 42
5	Lower lamina color (RGB)	174, 208, 112	101, 62, 75	132, 120, 60
6	White V mark (RGB)			
7	Midrib color (RGB)			
8	Front side of leaf pattern	Type 3	Type 8	Type 3 + Type 8
9	Back side of leaf pattern	Type 5	Type 8	Type 8
10	Flower color (RGB)	254, 167, 245	239, 252, 250	243, 246, 246
11	Peduncle color (RGB)	75, 35, 36	188, 223, 132	164, 188, 78

1-2-5. JH-5(William x Dragon's blood)

JH-5는 William와 유사한 적자색의 위 엽신색 [RGB(154, 48, 66)]을 가지고 있으며, William의 아래 엽신색 [RGB(112, 123, 62)]이 번지듯이 나타나는 특징과 Dragon's blood의 검붉은색의 엽맥무늬가 나타나는 특징을 모두 가진다(Type 3+4). 또한, 엽 뒷면 무늬 형태에도 William의 적자색과 Dragon's blood의 엽맥무늬를 모두 나타낸다(Fig. 12, Table 11).

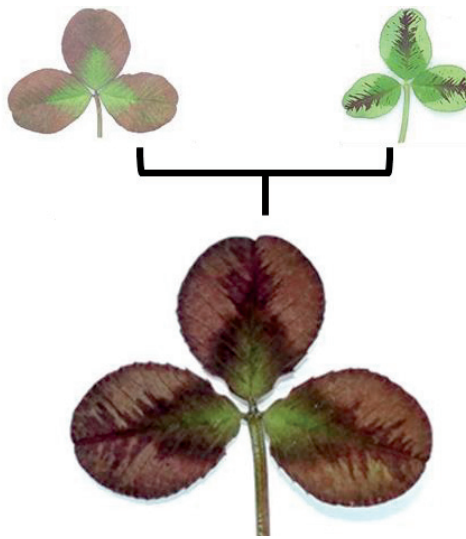


Fig. 12. Image of JH-5 and their parental species(William and Dragon's blood).

Table 11. Morphological traits of JH-5 and their parental species(William and Dragon's blood).

No.	Morphological trait	William	Dragon's blood	JH-5
1	Plant form	Half standing erect	Half standing erect	Half standing erect
2	Leaf shape	Elliptical	Elliptical	Obcordate
3	Leaf edge shape	Convex	Wide round	Convex
4	Upper lamina color (RGB)	205, 121, 136	194, 216, 170	154, 48, 66
5	Lower lamina color (RGB)	174, 208, 112	107, 155, 64	112, 123, 62
6	White V mark (RGB)			
7	Midrib color (RGB)		90, 55, 54	97, 39, 43
8	Front side of leaf pattern	Type 3	Type 4	Type 3 + Type 4
9	Back side of leaf pattern	Type 5	Type 7	Type 7
10	Flower color (RGB)	254, 167, 245	251, 250, 255	170, 20, 53
11	Peduncle color (RGB)	75, 35, 36	156, 195, 113	74, 31, 34

1-2-6. JH-6(Pentaphyllum x Dragon's blood)

JH-6는 Pentaphyllum과 유사한 진한 갈색의 위 엽신색 [RGB(94, 43, 55)]을 가지며 잎 가장자리와 색이 엽신의 색이 다른 패턴을 보이고, Dragon's blood의 아래 엽신색 [RGB(112, 122, 57)]과 검붉은색의 엽맥무늬가 나타나는 특징을 모두 가진다(Type 4+8). 또한, 엽 뒷면 무늬 형태에도 Pentaphyllum의 진한 갈색과 Dragon's blood의 엽맥무늬를 모두 나타낸다(Fig. 13, Table 12).

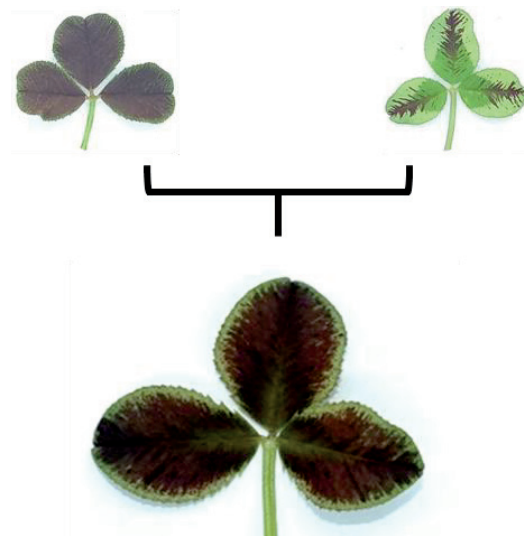


Fig. 13. Image of JH-6 and their parental species(Pentaphyllum and Dragon's blood).

Table 12. Morphological traits of JH-6 and their parental species(Pentaphyllum and Dragon's blood).

No.	Morphological trait	Pentaphyllum	Dragon's blood	JH-6
1	Plant form	Half standing erect	Half standing erect	Half standing erect
2	Leaf shape	Obcordate	Elliptical	Elliptical
3	Leaf edge shape	Convex	Wide round	Wide round
4	Upper lamina color (RGB)	101, 62, 75	194, 216, 170	94, 43, 55
5	Lower lamina color (RGB)	101, 62, 75	107, 155, 64	112, 122, 57
6	White V mark (RGB)			
7	Midrib color (RGB)		90, 55, 54	68, 39, 49
8	Front side of leaf pattern	Type 8	Type 4	Type 4 + Type 8
9	Back side of leaf pattern	Type 8	Type 7	Type 7 + Type 8
10	Flower color (RGB)	239, 252, 250	251, 250, 255	233, 238, 235
11	Peduncle color (RGB)	188, 223, 132	156, 195, 113	135, 149, 89

2. RAPD분석을 이용한 모본 및 교배종 화이트클로버 유연관계 분석

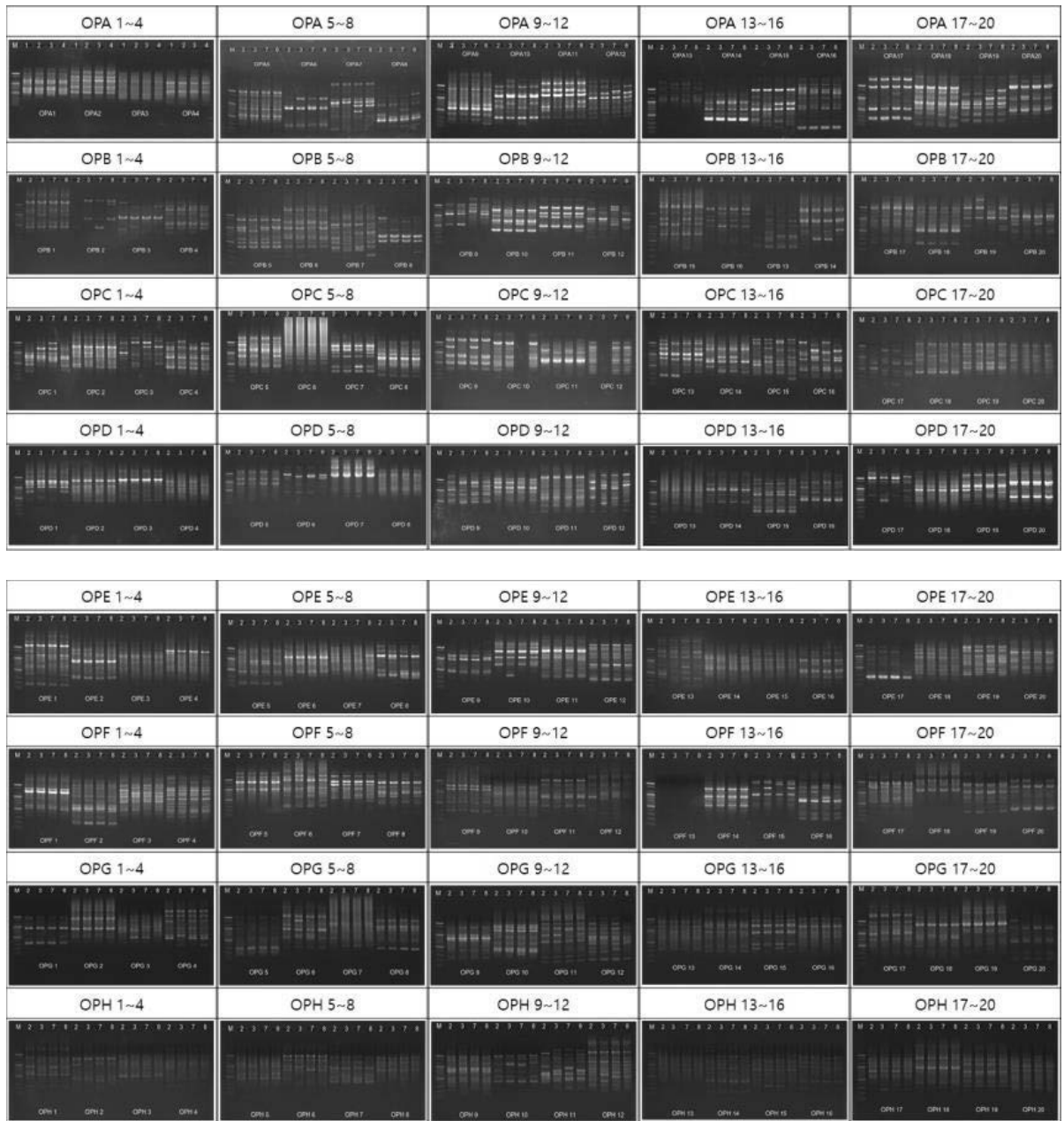
화이트 클로버의 형질에 대한 유전적 다형성을 분석하기 위해 5종의 화이트 클로버 모본과 6종의 화이트 클로버 교배종을 총 5개의 그룹으로 분리하여 240개의 랜덤 프라이머를 사용하여 RAPD PCR분석을 수행하였다. 또한, RAPD 분석 결과 중에서 교배종에서 모본 2품종에서 발견된 다형성 밴드가 모두 나타나는 랜덤 프라이머에 관해서는 품종 식별 특이적 마커로 사용 가능한지를 재확인하기 위해서 모든 모본을 포함하여 PCR과 전기영동으로 확인하였다(Fig. 14~22).

2-1. JH-1 and JH-2(Ladino x Green ice)

Ladino와 Green ice 모본 2품종과 형질이 유사하여 교잡되었다고 예측되는 JH-1와 JH-2 교배종 2품종, 총 4품종을 첫 번째 그룹으로 분리하여 RAPD를 수행한 결과, 총 13개의 랜덤 프라이머(OPA-06, OPB-02, OPC-07, OPC-09, OPC-13, OPD-01, OPD-06, OPF-15, OPG-04, OPG-15, OPH-11, OPJ-06, OPJ-07)에서 모본과 교배종 사이에 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 14). 이 중에서 OPA-06, OPB-02, OPC-07, OPC-09, OPD-01, OPF-15, OPG-15, OPH-11, OPJ-06, OPJ-07 랜덤 프라이머에서는 교배종이 두 품종의 모본 중에서 한 품종에서만 다형성 밴드가 확인되었고, OPC-13, OPD-06, OPG-04 랜덤 프라이머는 교배종에서 모본 두 품종 사이에서 확인된 다형성 밴드를 모두 나타내었다(Fig. 14).

Ladino와 Green ice의 교배종으로 예측되는 JH-1, JH-2로 분류한 첫 번째 그룹에서 RAPD를 수행한 결과(Fig. 15), OPC-13 에서는 JH-1에서는 Ladino에만 확인되는 약 800bp, 2500bp 다형성 밴드와 Green ice에만 확인되는 약 750bp, 2100bp 다형성 밴드를 모두 확인하였고, JH-2에서는 Ladino에만 확인되는 약 2500bp 다형성 밴드와 Green ice에만 확인되는 약 750bp, 2100bp 다형성 밴드를 모두 확인하였다. 또한, Ladino와 Green ice에서는 교배종과 공유되지 않는 약 280bp 다형성 밴드가 확인되었으며, JH-2의 RAPD 패턴과 Dragon's blood의 RAPD 패턴이 유사하다는 것을 확인하였다(Fig. 15A). OPD-06 에서는 JH-1과 JH-2

에서 Ladino에서 확인되는 약 1750bp 다형성 밴드와 Green ice에서 확인되는 약 1550bp 다형성 밴드를 모두 확인하였다. 또한, JH-2에서 모본과 공유하지 않는 약 1400bp 다형성 밴드가 확인되었으며, JH-1의 RAPD 패턴과 Dragon's blood의 RAPD 패턴이 유사하다는 것을 확인하였다(Fig. 15B). OPG-04 에서는 JH-1에서 Ladino에만 확인되는 약 400bp, 1400bp 다형성 밴드와 Green ice에만 확인되는 약 1700bp 다형성 밴드를 모두 관찰할 수 있었고, JH-2에서 Ladino에만 확인되는 약 400bp, 1400bp 다형성 밴드와 Green ice에만 확인되는 약 250bp, 1700bp 다형성 밴드를 모두 확인하였다. 또한, JH-2의 RAPD 패턴이 William의 RAPD 패턴과 유사하다는 것을 확인하였다(Fig. 15C).



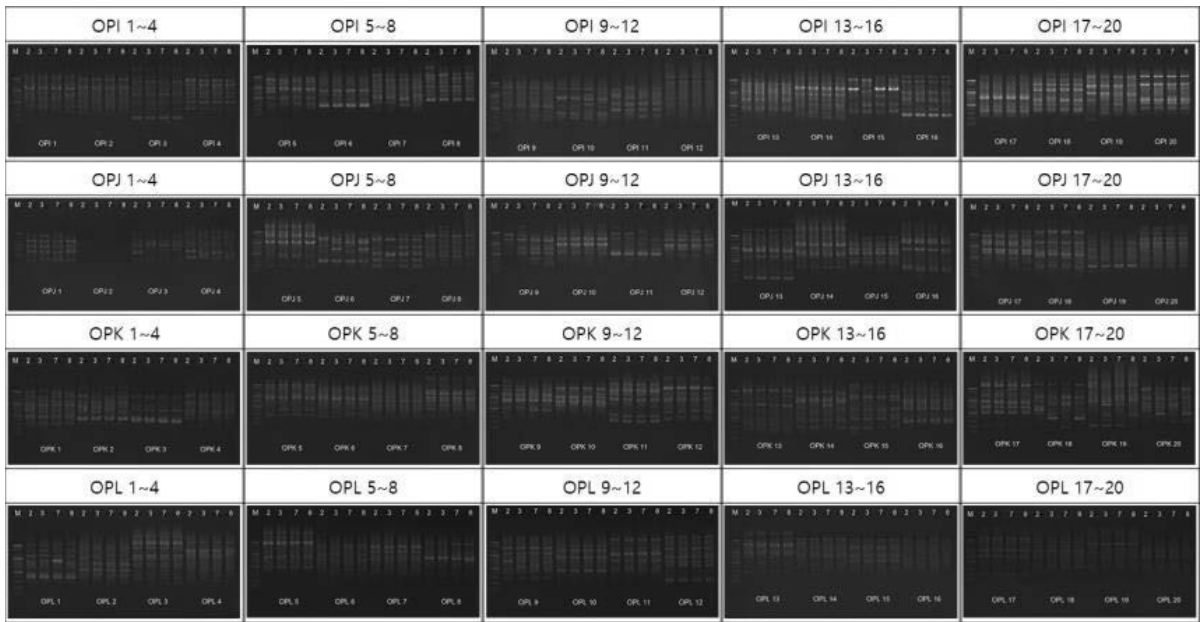


Fig. 14. RAPD Amplification profiles of white clover(Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2). Lane M : 100bp ladder, Lane 2 : Ladino, Lane 3 : Green ice, Lane 7 : JH-1, Lane 8 : JH-2

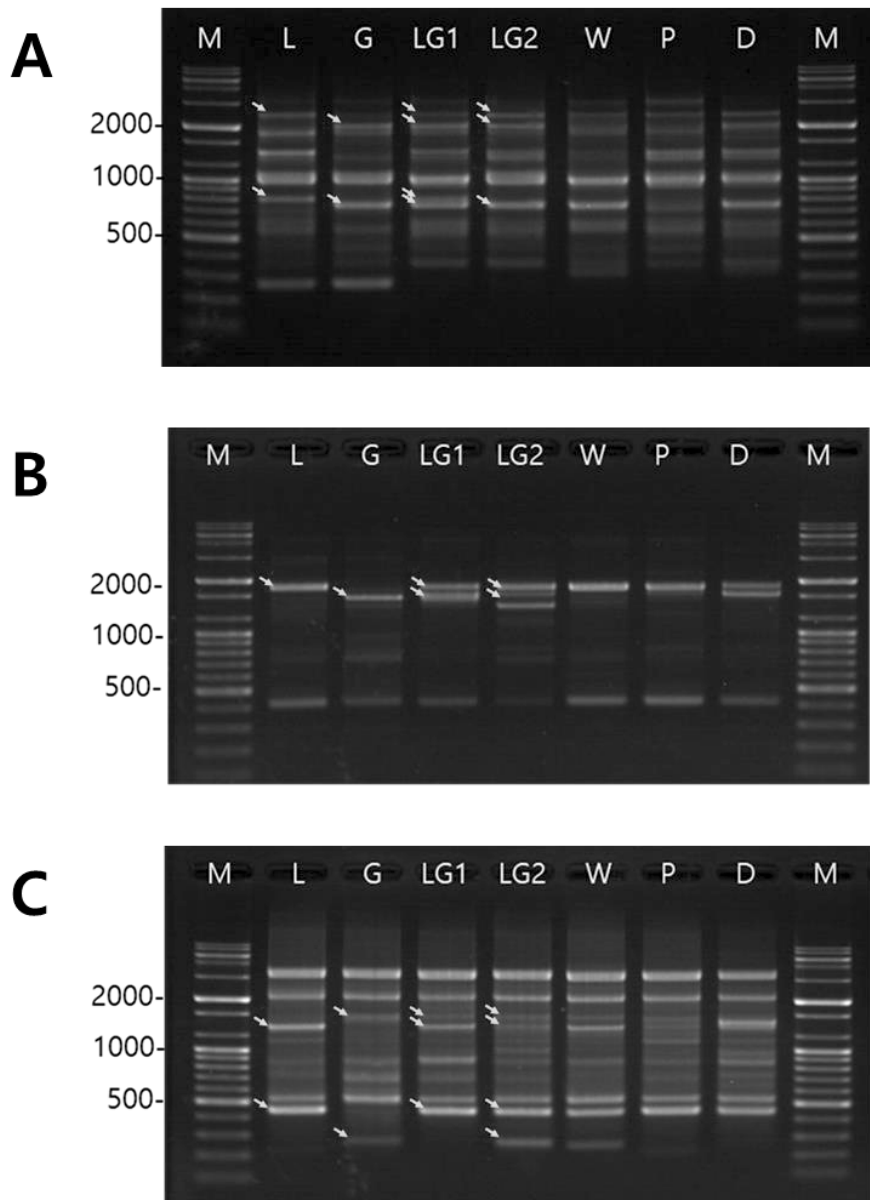
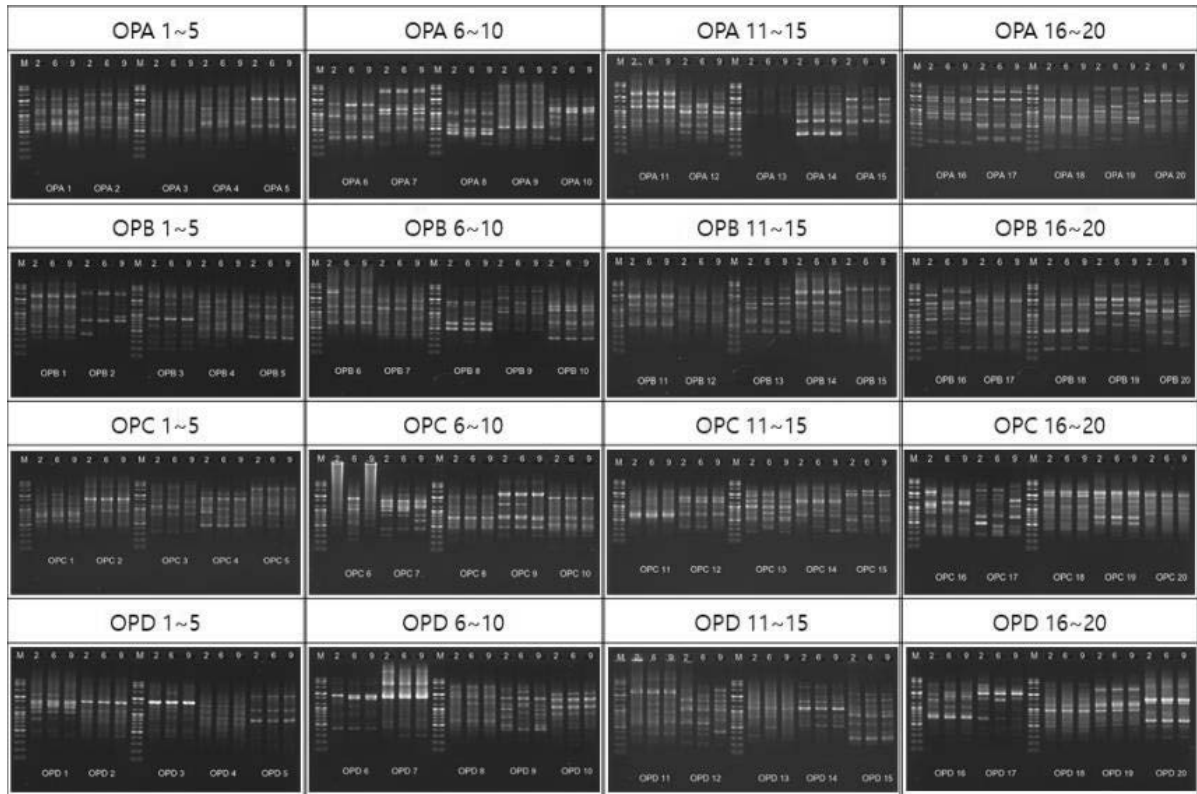


Fig. 15. Selected RAPD amplification profiles with Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2. (A) RAPD amplified with OPC 13 primer (B) RAPD amplified with OPD 6 primer (C) RAPD amplified with OPG 4 primer, Lane M : 100bp plus ladder, Lane L : Ladino, Lane G : Green ice, Lane W : William, Lane P : Pentaphyllum, Lane D : Dragon's blood, Lane LG1 : JH-1, Lane LG2 : JH-2

2-2. JH-3 (Ladino x Dragon's blood)

Ladino와 Dragon's blood 모본 2품종과 형질이 유사하여 교잡되었다고 예측되는 JH-3 교배종 1품종, 총 3품종을 두 번째 그룹으로 분리하여 RAPD를 수행한 결과, 모본과 교배종 사이의 유의미한 다형성 밴드가 확인되지 않았다(Fig. 16).



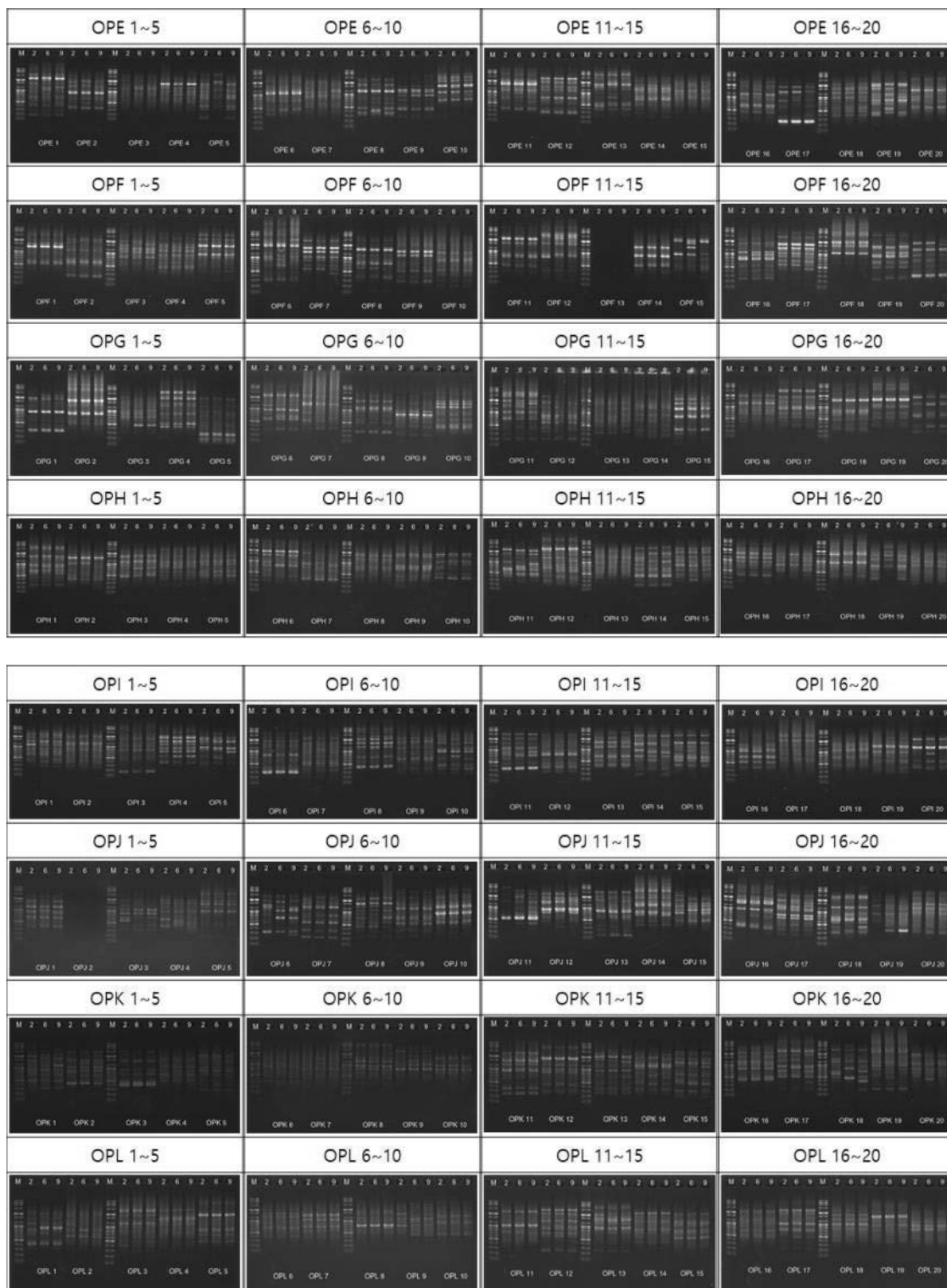
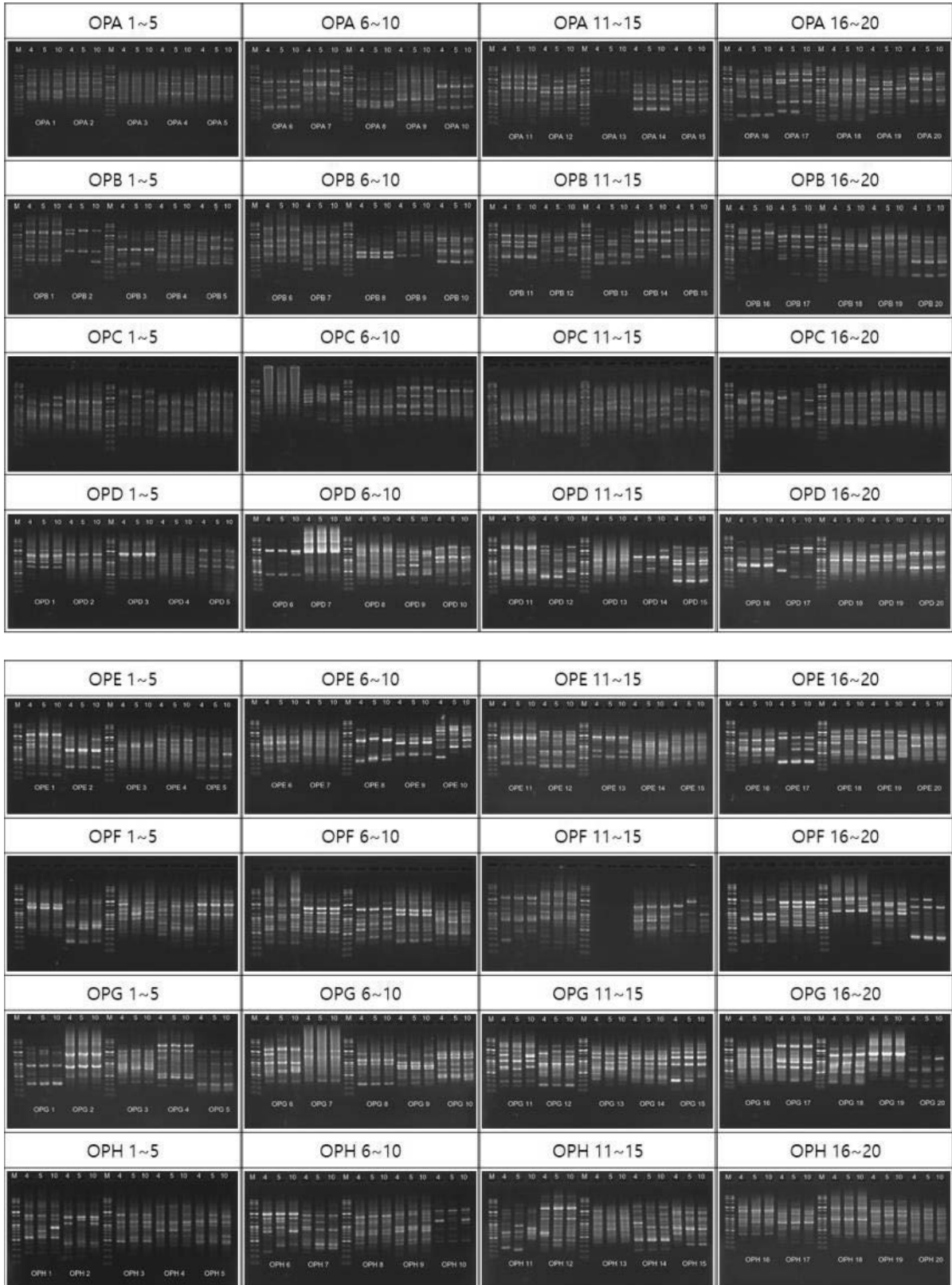


Fig. 16. RAPD Amplification profiles of white clover(Ladino, Dragon's blood and JH-3). Lane M : 100bp plus ladder, Lane 2 : Ladino, Lane 6 : Dragon's blood, Lane 9 : JH-3

2-3. JH-4(William x Pentaphyllum)

모본 William와 Pentaphyllum 2품종과 형질이 유사하여 교잡되었다고 예측되는 JH-4 교배종 1품종, 총 3품종을 세 번째 그룹으로 분리하여 RAPD를 수행한 결과, 총 8개의 랜덤 프라이머(OPB-13, OPE-18, OPE-17, OPE-18, OPH-02, OPI-16, OPJ-12, OPK-01)에서 모본과 교배종 사이에 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 17). 이 중에서 OPB-13, OPE-17, OPE-18 랜덤 프라이머에서는 교배종이 두 품종의 모본 중 한 품종에서만 다형성 밴드가 확인되었고, OPE-18, OPH-02, OPI-16, OPJ-12, OPK-01 랜덤 프라이머는 교배종이 모본 두 품종사이에서 확인된 다형성 밴드를 모두 나타내었다(Fig. 17).

William와 Pentaphyllum의 교배종으로 예측되는 JH-4 그룹의 RAPD 결과(Fig. 18) OPE-18에서는 JH-4에서 William에만 확인되는 약 1000bp 다형성 밴드와 Pentaphyllum에만 확인되는 약 2500bp 다형성 밴드를 모두 확인하였다. OPH-02에서는 JH-4에서 William에만 확인되는 약 1100bp 다형성 밴드와 Pentaphyllum에만 확인되는 약 1000bp, 1300bp 다형성 밴드를 확인하였다(Fig. 18B). OPI-16에서는 JH-4에서 William에만 확인되는 약 1600bp 다형성 밴드와 Pentaphyllum에만 확인되는 약 450bp 다형성 밴드를 확인하였다. 또한, William에서 교배종과 공유하지 않는 약 850bp 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 18C). OPJ-12에서는 JH-4에서 William에만 확인되는 약 600bp 다형성 밴드와 Pentaphyllum에만 확인되는 약 1100bp 다형성 밴드를 확인하였다. 또한, William와 Pentaphyllum에서 교배종과 공유하지 않는 약 1300bp 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 18D). OPK-01에서는 JH-4에서 William에만 확인되는 1200bp 다형성 밴드와 Pentaphyllum에만 확인되는 1800bp 다형성 밴드를 확인하였다.



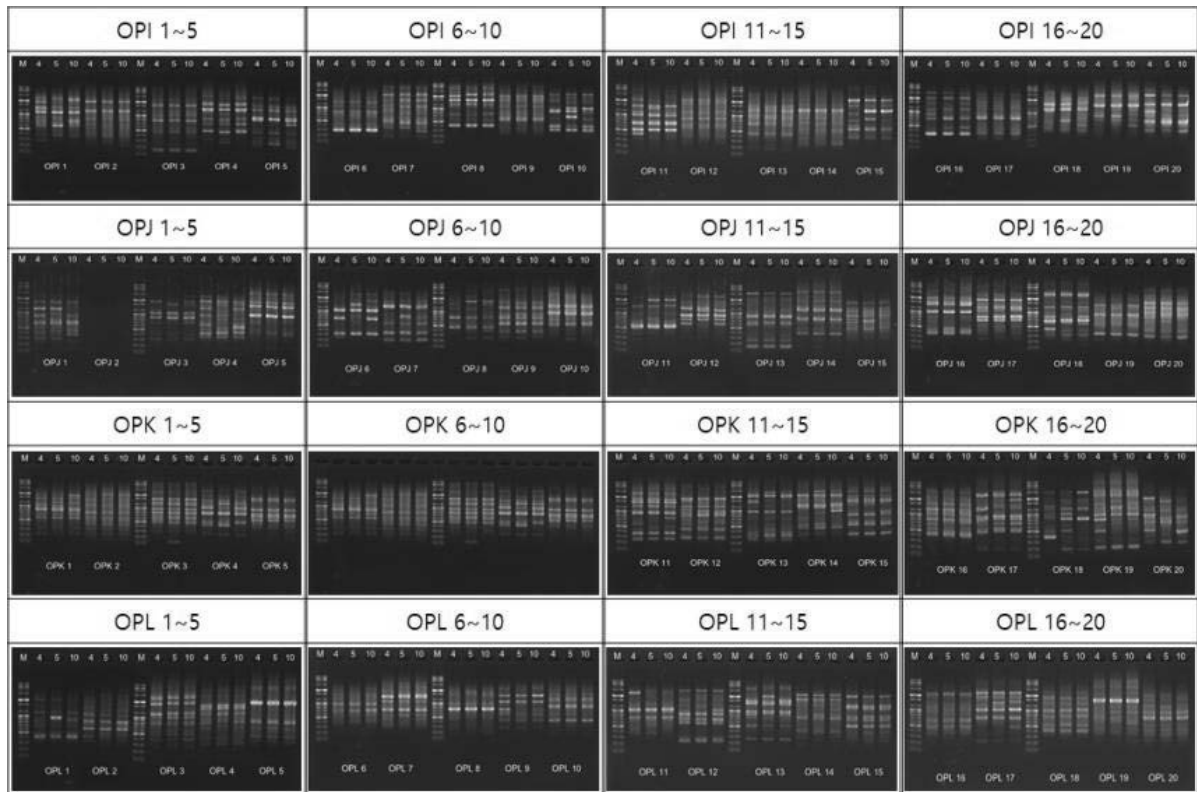


Fig. 17. RAPD Amplification profiles of white clover(William, Pentaphyllum and JH-4). Lane M : 100bp plus ladder, Lane 4 : William, Lane 5 : Pentaphyllum, Lane 10 : JH-4

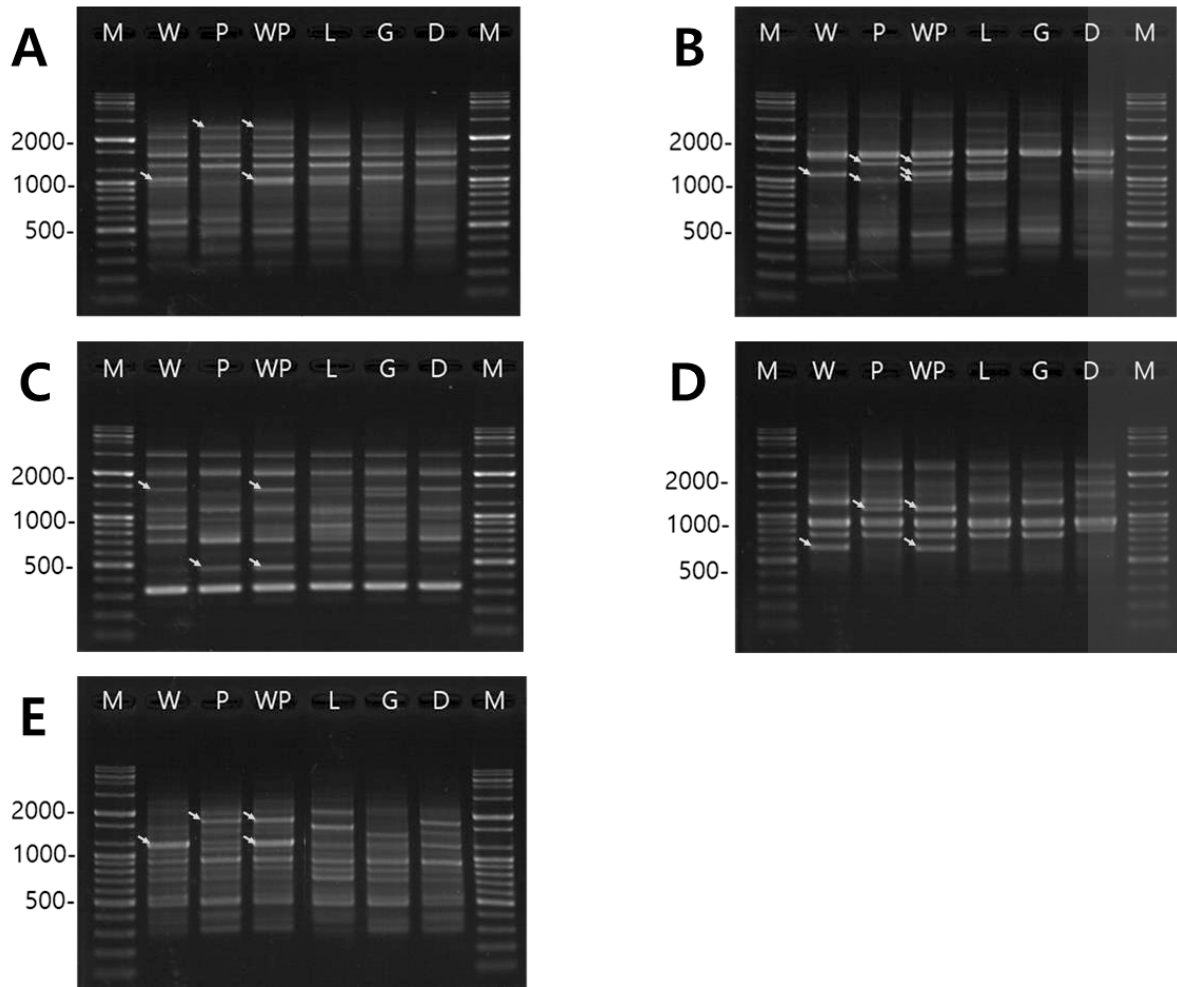
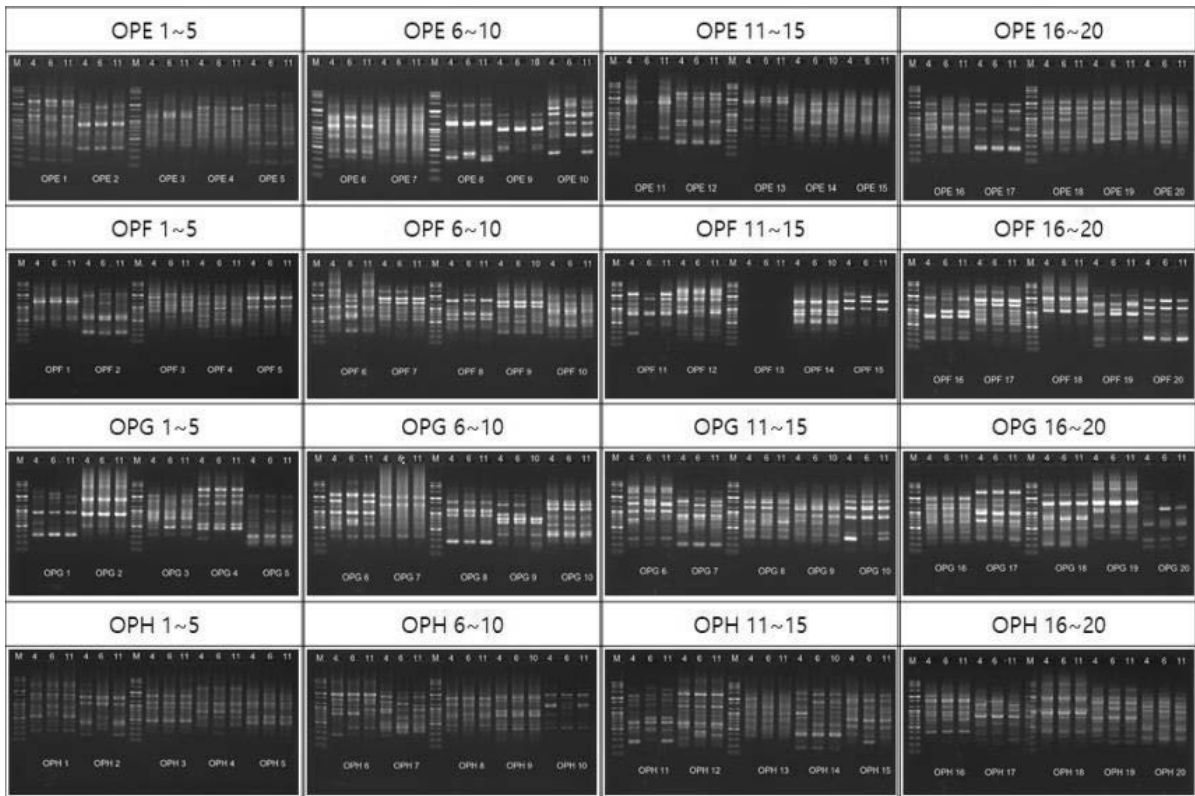
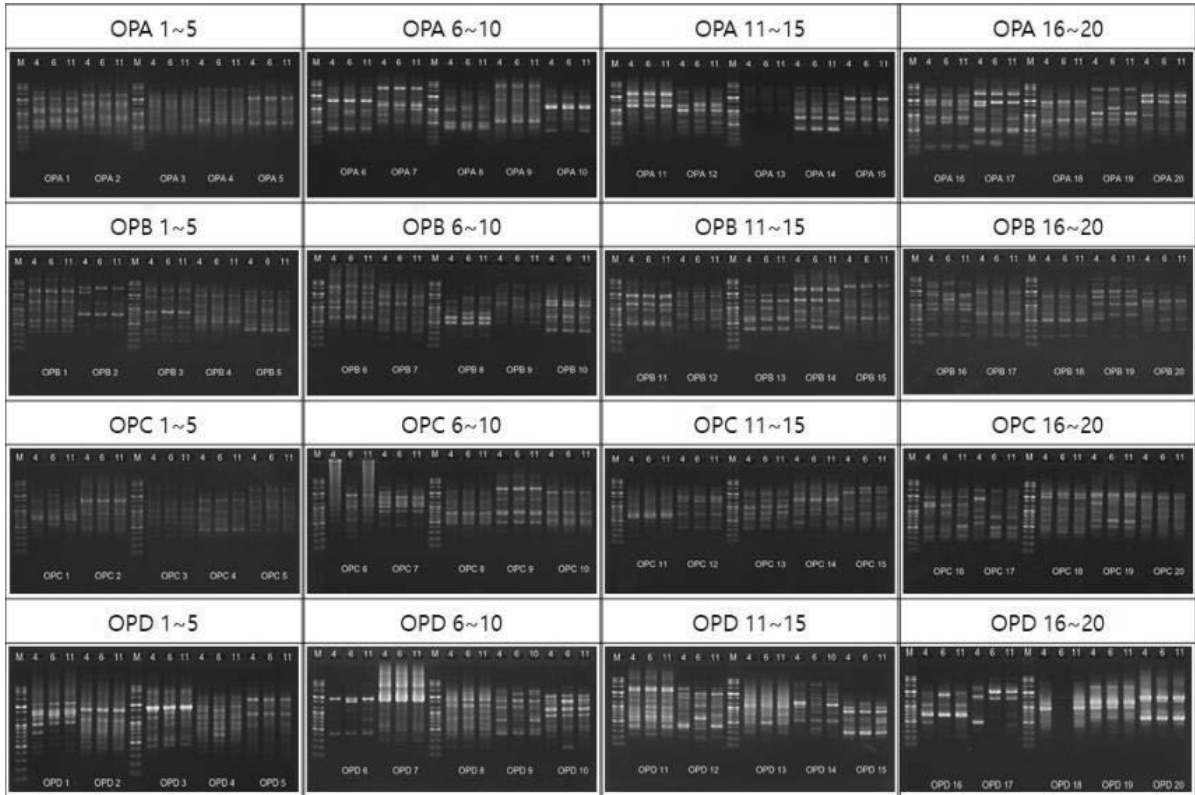


Fig. 18. Selected RAPD amplification profiles with William, Pentaphyllum and JH-4. (A) RAPD amplified with OPE 18 primer (B) RAPD amplified with OPH 2 primer (C) RAPD amplified with OPI 16 primer (D) RAPD amplified with OPJ 12 primer (E) RAPD amplified with OPK 1 primer, Lane M : 100bp plus ladder, Lane L0 : Ladino no V mark, Lane L : Ladino, Lane G : Green ice, Lane W : William, Lane P : Pentaphyllum, Lane D : Dragon's blood, Lane WP : JH-4

2-4. JH-5 (William x Dragon's blood)

William와 Dragon's blood 모본 2품종과 형질이 유사하여 교잡되었다고 예측되는 JH-5 교배종 1품종, 총 3품종을 네 번째 그룹을 분리하여 RAPD를 수행한 결과, 총 10개의 랜덤 프라이머(OPA-08, OPB-10, OPC-15, OPE-09, OPE-10, OPG-06, OPG-12, OPH-11, OPK-17, OPL-09)에서 모본과 교배종 사이에 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 19). 이 중에서 OPA-08, OPB-10, OPC-15, OPE-09, OPG-06, OPK-17, OPL-09 랜덤 프라이머에서는 교배종이 두 품종의 모본 중 한 품종에서만 다형성 밴드가 확인되었고, OPE-10, OPG-12, OPH-11 랜덤 프라이머는 교배종이 모본 두 품종 사이에서 확인된 다형성 밴드를 모두 나타내었다(Fig. 19). William와 Dragon's blood의 교배종으로 예측되는 JH-5 그룹 RAPD 결과(Fig. 20) OPE-10 에서는 JH-5에서 William에만 확인되는 약 350bp 다형성 밴드와 Dragon's blood에만 확인되는 750bp, 1500bp 다형성 밴드를 확인하였다. 또한, Dragon's blood에서 교배종과 공유되지 않는 약 2200bp 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 20A). OPG-12 프라이머는 JH-5에서 William에서 확인되는 약 1500bp 다형성 밴드와 Dragon's blood에서 확인되는 1300bp 다형성 밴드를 확인하였고, William에서 교배종과 공유되지 않는 약 650bp 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 20B). OPH-11 에서는 JH-5에서 William에만 확인되는 약 250bp 다형성 밴드와 Dragon's blood에만 확인되는 800bp 다형성 밴드를 확인하였다. 또한 William에서 교배종과 공유되지 않는 약 550bp 다형성 밴드와 JH-5에서 모본과 공유되지 않는 약 2500bp 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 20C).



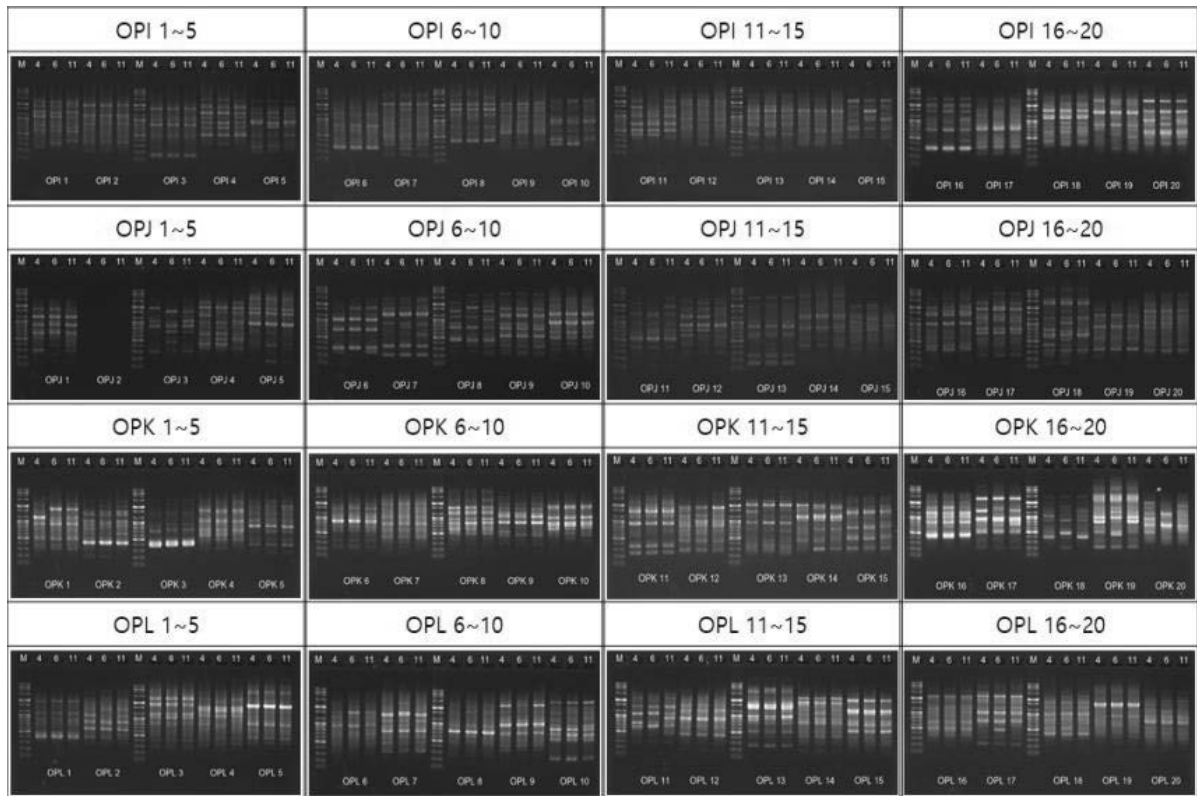


Fig. 19. RAPD Amplification profiles of white clover(William, Dragon's blood and JH-5). Lane M : 100bp plus ladder, Lane 4 : William., Lane 6 : Dragon's blood, Lane 11 : JH-5

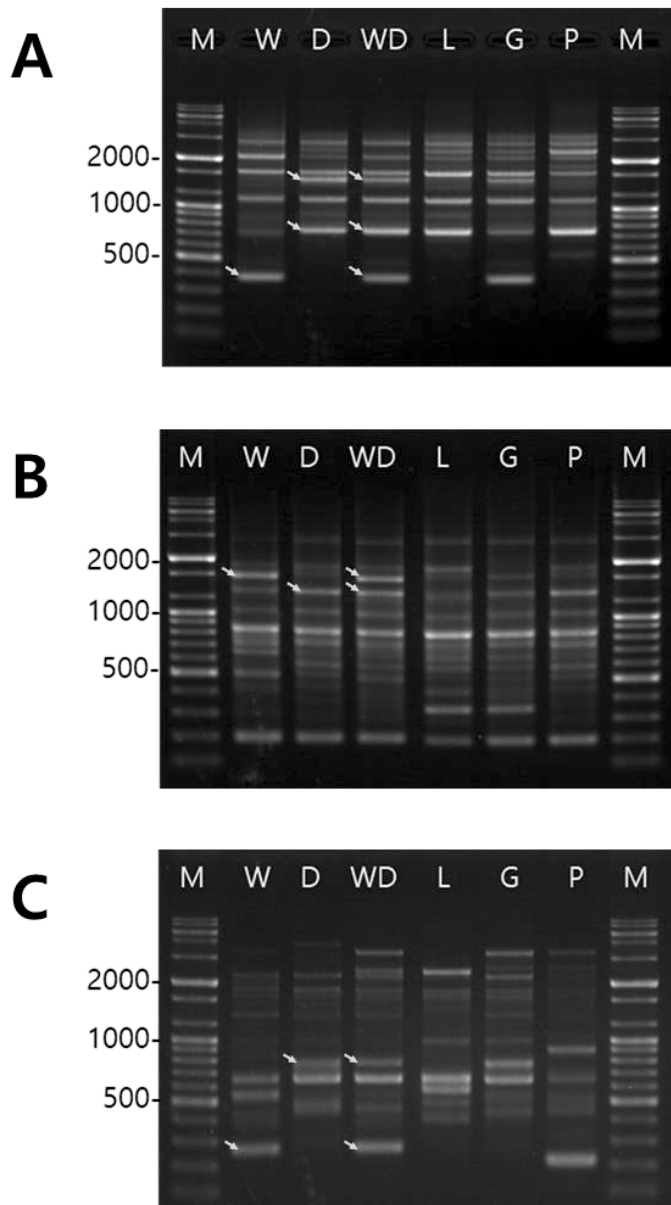


Fig. 20. Selected RAPD amplification profiles with William, Dragon's blood and JH-5. (A) RAPD amplified with OPE 10 primer (B) RAPD amplified with OPG 12 primer (C) RAPD amplified with OPH 11 primer, Lane M : 100bp plus ladder, Lane L : Ladino, Lane G : Green ice, Lane W : William, Lane P : Pentaphyllum, Lane D : Dragon's blood, Lane WD : JH-5

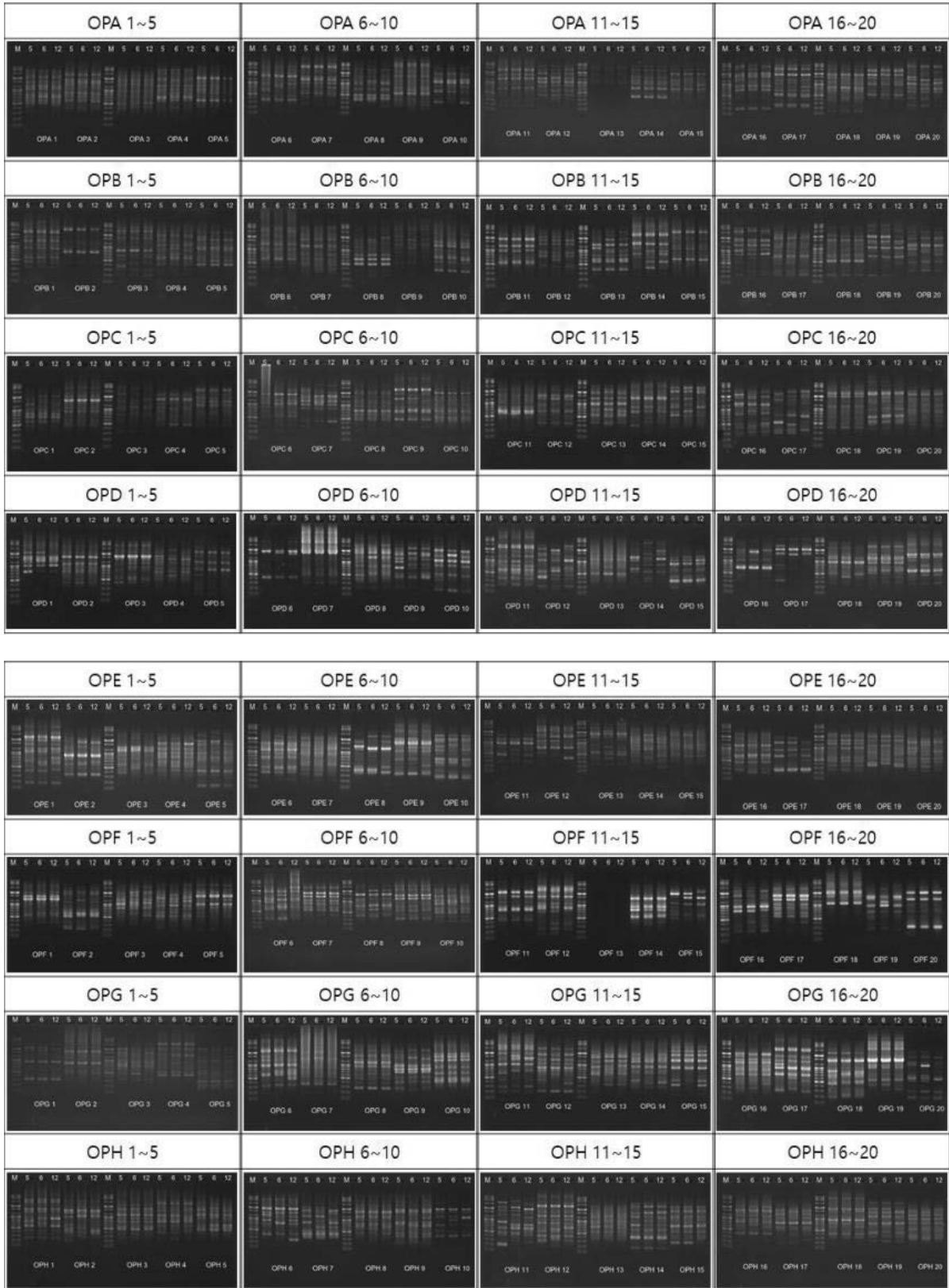
2-5. JH-6(Pentaphyllum x Dragon's blood)

Pentaphyllum와 Dragon's blood 모본 2품종과 형질이 유사하여 교잡되었다고 예측되는 JH-6 교배종 1품종, 총 3품종을 마지막 그룹으로 분리하여 RAPD를 수행한 결과, 총 8개의 랜덤 프라이머(OPA-10, OPE-02, OPE-08, OPE-19, OPG-15, OPH-06, OPI-20, OPJ-08)에서 모본과 교배종 사이에 다형성 밴드가 확인되었다(Fig. 21). 이 중에서 OPA-10, OPE-02, OPE-19, OPG-15, OPI-20, OPJ-08 랜덤 프라이머에서는 교배종이 두 품종의 모본 중 한 품종에서만 다형성 밴드가 확인되었고, OPE-08, OPH-06 랜덤 프라이머는 교배종이 모본 두 품종 사이에서 확인된 다형성 밴드를 모두 나타내었다(Fig. 21).

Pentaphyllum과 Dragon's blood의 교배종으로 예측되는 JH-6 그룹 RAPD 결과(Fig. 22) OPE-08 에서는 JH-6에서 Pentaphyllum에만 확인되는 약 500bp, 1800bp 다형성 밴드와 Dragon's blood에만 확인되는 약 1300bp, 2500bp 다형성 밴드를 확인하였다. 또한, Pentaphyllum과 Dragon's blood에서 교배종과 공유하지 않는 약 450bp 다형성 밴드가 확인되었으며, JH-6 RAPD의 패턴과 Ladino RAPD의 패턴이 유사하다는 것을 확인하였다(Fig. 22A). OPH-06 에서는 JH-6에서 Pentaphyllum에만 확인되는 약 900bp 다형성 밴드와 Dragon's blood에만 확인되는 약 800bp 다형성 밴드를 확인하였다. 또한, Dragon's blood에서 교배종과 공유되지 않는 약 400bp 다형성 밴드와 JH-6에서 모본과 공유하지 않는 약 280bp 다형성 밴드가 확인되었으며, JH-6의 RAPD 패턴과 William의 RAPD 패턴이 유사하다는 것이 확인되었다(Fig. 22B).

RAPD 분석 결과 모본과 교배종이 공유하는 다형성 밴드만이 아닌 공유하지 않는 다형성 밴드도 확인이 되었는데 OPD-06, OPH-06 OPH-11 랜덤 프라이머에서 모본에서 확인되지 않고 교배종에서만 확인되는 다형성 밴드가 확인되었고, OPC-13, OPE-08, OPE-10, OPG-12, OPH-02, OPH-06, OPH-11 OPI-16, OPJ-12 랜덤 프라이머에서 교배종에서 확인되지 않고 모본에서만 확인되는 다형성 밴드가 확인되었다. 다형성 밴드가 교배종이 뿐만 아니라 다른 모본에서 나타나는 경우도 존재하였다. JH-1과 JH-2 RAPD의 패턴과 유사한 William

와 Dragon's blood의 RAPD 패턴이 확인되지만, William의 붉은 위 엽신색과 Dragon's blood 붉은 엽맥 무늬의 특징을 가져 외부형태학적으로는 큰 차이가 관찰되었다. JH-4도 Dragon's blood의 유사한 RAPD 패턴이 확인되지만, Dragon's blood의 붉은 엽맥 무늬의 특징을 가져 외부형태학적으로는 큰 차이를 나타낸다. JH-6의 RAPD 패턴과 유사한 Ladino와 William의 RAPD 패턴이 확인되지만, Ladino의 White V mark와 William의 붉은 위 엽신색의 특징을 가져 외부형태학적으로는 큰 차이를 나타낸다. 본 실험 결과를 통해 RAPD 분석과 외부형태학적 분류 기준을 사용하여 화이트 클로버의 교배종의 유래를 확인할 수 있다. 또한 RAPD 분석 결과에서 선발된 마커들을 이용하여 화이트 클로버 품종을 식별할 수 있음이 확인되었다.



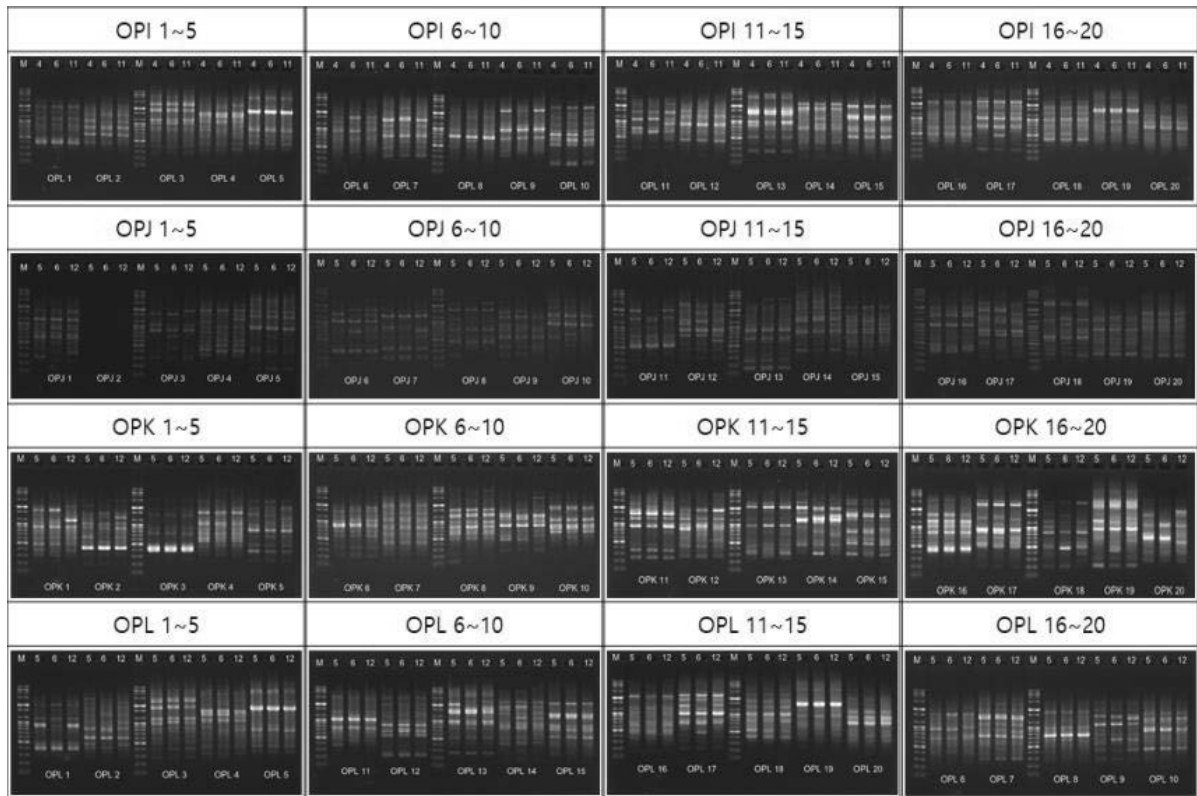


Fig. 21. RAPD Amplification profiles of white clover(Pentaphyllum, Dragon's blood and JH-6). Lane M : 100bp plus ladder, Lane 5 : Pentaphyllum., Lane 6 : Dragon's blood, Lane 12 : JH-6

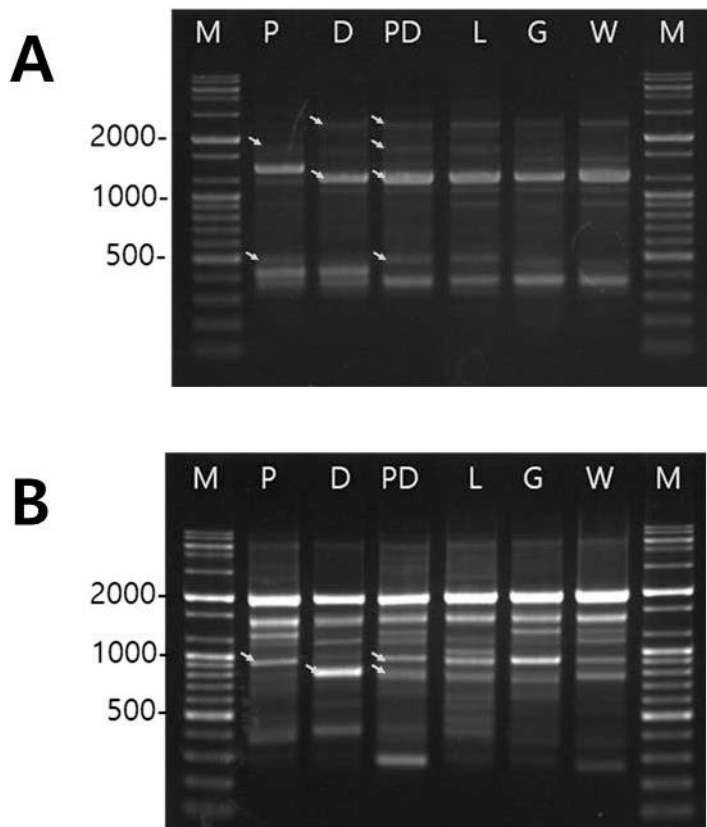


Fig. 22. Selected RAPD amplification profiles with Pentaphyllum, Dragon's blood and JH-6. (A) RAPD amplified with OPE 8 primer (B) RAPD amplified with OPH 6 primer, Lane M : 100bp plus ladder, Lane L : Ladino, Lane G : Green ice, Lane W : William, Lane P : Pentaphyllum, Lane D : Dragon's blood, Lane PD : JH-6

3. 화이트 클로버 품종 선별을 위한 SCAR 마커 개발

RAPD 분석은 10bp 수준의 짧은 프라이머를 이용하여 낮은 온도에서 PCR 반응을 수행하기 때문에 반응조건의 차이에 따라 비특이적 밴드가 확인되어 재현성에 문제가 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 RAPD 분석에서 확인된 염기서열을 분석 후, 프라이머의 길이를 늘려 재현성과 안정성을 높인 SCAR 마커 기법이 제안되었다(Paran and Michelmore., 1993). 본 실험에서는 RAPD 분석 결과 중 교배종에서 모본 2품종에서 확인된 다형성이 모두 나타나는 OPC-13, OPD-06, OPE-08, OPE-10, OPE-18, OPG-04, OPH-02, OPH-06, OPH-11, OPH-12, OPI-16, OPJ-12 그리고 OPK-01 프라이머로 수행한 다형성 밴드의 염기서열 분석을 수행하였으며, NCBI Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 통해 상동성을 분석 후, NCBI Primer-Blast(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)를 이용하여 38종의 SCAR 프라이머 제작 및 PCR을 수행하여 SCAR 마커로 전환하고자 하였다(Table 13). 그 결과 화이트 클로버의 모본과 교배종을 구분할 수 있는 10종의 SCAR 마커가 개발되었다(Fig. 23~30).

Table 13. List of SCAR primer.

ID	Primer	Tm(°C)	(%)	Size(bp)
1-5 F	5'-CACCCTTCATTTGCAATAAG-3'	51.9	38.1	994bp
1-5 R	5'-CTTTGAGGATGCTACAATGT-3'	51.3	40	
1-8 F	5'-AGCCTCGTCAAAATTAATCG-3'	51.3	40	740bp
1-8 R	5'-CTCGTCCATCAATTTTCTCA-3'	51.3	40	
2-4 F	5'-ACCTGAACGGAGAAGGGA-3'	54.3	55.56	1680bp
2-4 R	5'-GAACGGTCTATTCTTGATAATG-3'	52.5	36.36	
2-5 F	5'-TCCCTCCCAGTTGAGAGC-3'	56.6	61.11	1532bp
2-5 R	5'-GGTAATGATCGAGCAGTCACTA-3'	56.3	45.45	
4-1 F	5'-CGGTGTCTGGCAAAAAATTAATTCG-3'	57.3	40	1340bp
4-1 R	5'-CGTGTCTGAAGACGAAGTAG-3'	55.4	50	
4-2 F	5'-GTGTATGAGTCTGTATCCGTGC-3'	58.1	50	1533bp
4-2 R	5'-ATGGTAGATTGGAAGGACTAGT-3'	54.4	40.91	
5-4 F	5'-CGTGTCTGTGAGATCTGGTG-3'	57.5	55	457bp
5-4 R	5'-CGTGTCTGTATCCGTGTTTC-3'	55.4	50	
5-5 F	5'-CGTGTCTGGCAAAAAATCAA-3'	51.3	40	441bp
5-5 R	5'-AGCGTCTCTGTAAGATACTG-3'	53.4	45	
6-3 F	5'-GCGTGCCTGAAAAAGCTCTAG-3'	57.8	52.38	245bp
6-3 R	5'-CGTGTATGTGGAACGAGTAACAA-3'	56.6	43.48	
8-3 F	5'-GTCCCGTGGTTTCTGAAATTC-3'	55.9	47.62	1132bp
8-3 R	5'-CCCTTGGTGGAAAGCACATGT-3'	57.8	52.38	
9-3 F	5'-CCCCTGGTTGAGAGGGAA-3'	56.6	61.11	610bp
9-3 R	5'-GTCCCGCGGTATCTTTATCTAC-3'	58.1	50	
10-1 F	5'-ACCAGGTGATGTAGGAACAAG-3'	55.9	47.62	1632bp
10-1 R	5'-CAACAGGTGAATATTCCTGTACT-3'	54.9	39.13	
10-2 F	5'-CGAAGGCTTCTCCAGTAATTGA-3'	56.3	45.45	1654bp
10-2 R	5'-CCAGGTGAACCAGGGGAT-3'	56.6	61.11	
11-1 F	5'-ACCGGGTGACATAAAGCAC-3'	54.9	52.63	731bp
11-1 R	5'-ACCAGGTGAGTCATCACTG-3'	54.9	52.63	
11-3 F	5'-ACCTTCTCCCTATTAGCAATTG-3'	54.4	40.91	703bp
11-3 R	5'-GTCCTGCAATGGACAAAGTA-3'	53.4	45	
12-1 F	5'-ACCAGGTGAACATAAAATCCG-3'	53.9	42.86	373bp
12-1 R	5'-ACCAGGTGATGCAAACTGAAT-3'	53.9	42.86	
OPD 6-L F 2	5'-CCTGAACGGGTGGAATTTTG-3'	57.3	50	1762 bp
OPD 6-L R 1762	5'-AAAGAAGAGCCAGCTTCCAG-3'	56.7	50	
OPD 6-G F 6	5'-AACGGTCCCTCCCAGTTG-3'	60.2	61	1533 bp
OPD 6-G R 1533	5'-ACGGGTAATGATCGAGCAG-3'	58.7	55	
14-2 F	5'-CTTCCGCACTCAAGAGGAAC-3'	57.5	55	637bp
14-2 R	5'-TCCGCACTCTGGGATTGCCA-3'	59.5	60	
15-1 F	5'-CCGCACTACATCACAATA-3'	53.4	45	257bp
15-1 R	5'-CTTCCGCACTATTATAAAGC-3'	51.3	40	

17-5 F	5'-ACGCATCGCATTGCAAGAGCAA-3'	58.1	50	907bp
17-5 R	5'-ACGCATCGCAAAATAAGAGCTTC-3'	56.6	43.5	
18-2 F	5'-ACGCATCGCAGAGTCTTAGT-3'	57	50	254bp
18-2 R	5'-ACGCATCGCACAACTA-3'	55	47	
4-3 F	5'-GTGGACCCAGAACGTCCTAA-3'	59.03	55	930 bp
4-3 R	5'-TTGCTCCAGATGCTGTTGTCA-3'	60.3	48	
5-4-1 F	5'-TATGCATATCGCTGGCTGGAG-3'	60	52	1286 bp
5-4-1 R	5'-AGTAACGCGACATCGGTGAA-3'	59.8	50	
6-1 F	5'-GCTCGCCTTGCAAAGGTAAT-3'	59	50	399 bp
6-1 R	5'-CGCCCTCCGCATAATTGAAC-3'	60	55	
1-1 F	5'-CTCGCACGGACTGAGATGAA-3'	60	55	880 bp +
1-1 R	5'-GCATGTTTTGTTGGCCGGAT-3'	60	50	
1-2 F	5'-CCACAGCAGTCCACTACTCC-3'	60	60	617 bp +
1-2 R	5'-AAGTTGCATAGGCGATGGCT-3'	60	50	
2-1 F	5'-GCGAAAGTCTCCGCCATTA-3'	60	55	1155 bp +
2-1 R	5'-GTCGAACAGCACACTCCAGA-3'	60	55	
2-4-1 F	5'-AAGAATGAGGCAAGAAGGAGCC-3'	58.4	50	936 bp
2-4-1 R	5'-ATCCGCTCATCTCACTGTGT-3'	56.9	50	
2-5-1 F	5'-GAACCTGGAGCATCTTAATTTATGT-3'	53.1	36	980 bp
2-5-1 R	5'-GGACTGCAGAAACAACAATCTCA-3'	56	43.5	
4-6 F	5'-TGCCTTGATCAACGTGCAAC-3'	57.4	50	959 bp
4-6 R	5'-GACGTGAAGAGTGC GTTCCT-3'	58.7	55	
6-2 F	5'-CATTCGAGCCCCACAAAAC-3'	58.2	55	1166 bp
6-2 R	5'-CGAGCCATTGAGAACGGGAA-3'	58.9	55	
7-4 F	5'-TCCAGTAACCCCTCACTCTCA-3'	58.2	52.4	1459 bp
7-4 R	5'-CACGAACAAGATCTTCAGCAACA-3'	56.2	43.5	
7-5 F	5'-ATTGATGACTCAGCTGCCCTC-3'	58.3	52.4	966 bp
7-5 R	5'-TGTCCCTGCTCATTGAGTT-3'	57.2	50	
7-7 F	5'-TGAGAGGGGCTACTCCAAG-3'	60	60	914 bp
7-7 R	5'-GGAAGTCAAGTCGCGAGGA-3'	58.5	55	
9-1 F	5'-CACCACGGTCTTTTACACG-3'	57.5	55	1677 bp
9-1 R	5'-GGTCGAGCCAAGGGTCTTAC-3'	59.3	60	
9-3-1 F	5'-CCACGGTACCTAAAAATACACTGC-3'	56.6	45.8	1714 bp
9-3-1 R	5'-TCACCACGGTTCCAAATTCT-3'	54.9	45	
10-2-1 F	5'-ACGCATCGCAAACTAGTAATAGAA-3'	54.5	36	709 bp
10-2-1 R	5'-AGCATCAATAACATCCTCCAAAGC-3'	56	41.7	

3-1. JH-1 and JH-2(Ladino x Green ice)

JH-1과 JH2를 OPC-13 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 740bp 다형성 밴드는 화이트 클로버의 *Trifolium occidentale*의 1번 염색체(Ch. 1O)와 6번 염색체(Ch. 6O)에서 각각 93.76%와 92.19%의 상동성이 관찰되었고(Fig. 23A), OPD-06 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 1762bp 밴드는 각각 *Trifolium occidentale*의 8번 염색체(Ch. 8O)에서 91.64%의 상동성, *Trifolium pallescens*의 4번 염색체(Ch. 4P)의 91.41%의 상동성이 관찰되었다(Fig. 23B). 또한, OPG-04 프라이머로 RAPD를 수행해서 확인된 1533bp 다형성 밴드는 *Trifolium occidentale*의 5번 염색체(Ch. 5O)에서 97.73%의 상동성, *Trifolium pallescens*의 3번 염색체(Ch. 3P)에서 92.66%의 상동성이 관찰되었다(Fig. 23C).

선발된 염기서열 정보를 이용하여 특이적 프라이머를 합성하여 SCAR마커로 활용할 수 있는지 확인하기 위해서 모본과 교배종을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 1-8 프라이머는 Green ice와 교배종에서만 743bp 밴드가 확인되었고, Ladino에서는 확인되지 않았으며(Fig. 24A), 4-2와 OPD6-L 프라이머는 Ladino와 교배종에서 각각 1533bp와 1733bp 밴드가 확인되었지만 Green ice에서는 확인되지 않았다(Fig. 24B, Fig. 24C). 본 실험을 통해 OPD6-L + 1-8 프라이머 조합 또는 OPD6-L + 4-2 프라이머 조합이 JH-1과 JH-2 교배종이 Ladino와 Green Ice 모본 2품종의 교배에 의해 만들어진 것임을 증명할 수 있는 마커로써 활용 가능하다는 것이 확인되었다.

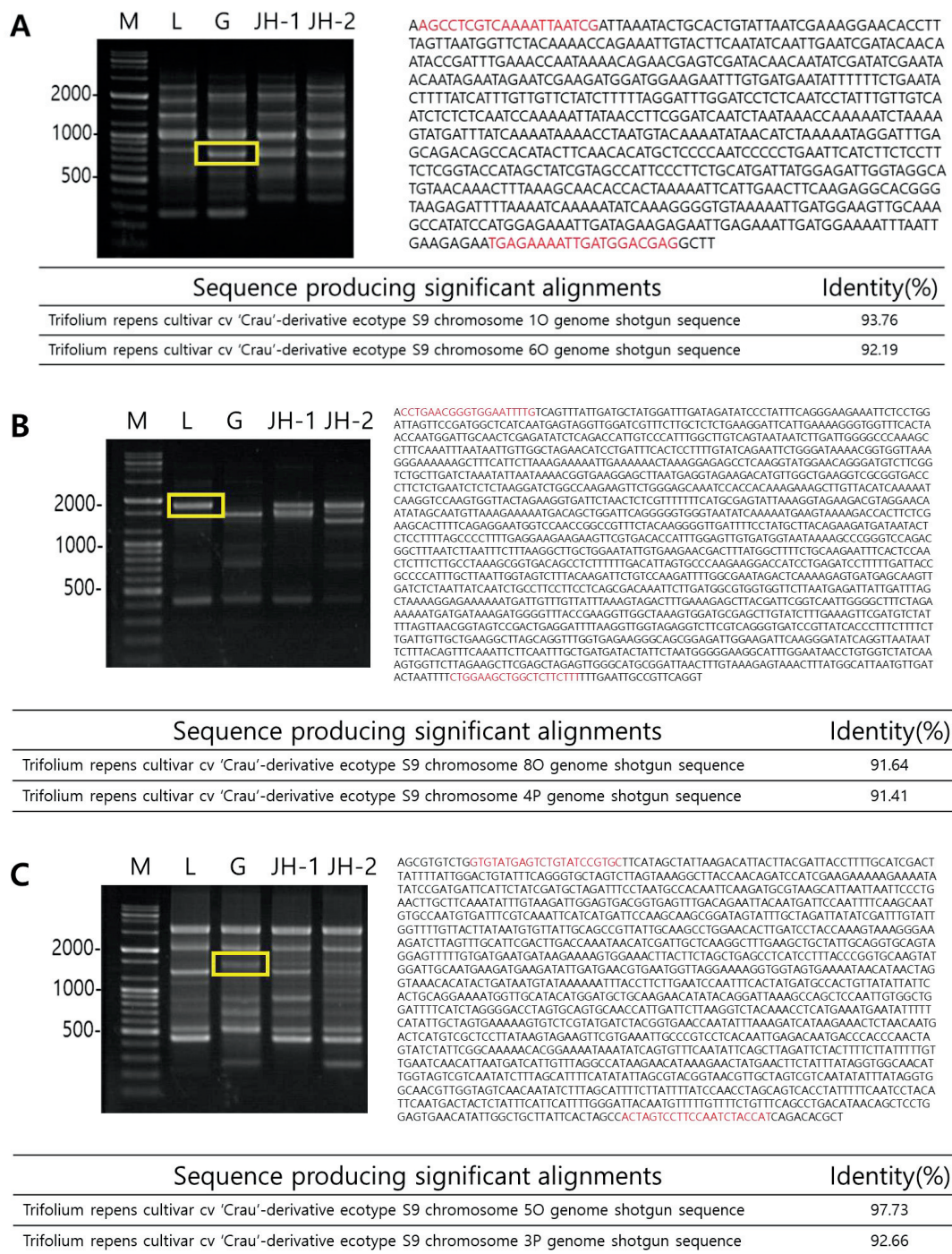


Fig. 23. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2) and compared to white clover genome sequence. The sequence of SCAR primer are indicated in red color. Lane M : 100bp ladder, Lane L : Ladino, Lane G : Green ice, Lane JH-1 : JH-1, Lane JH-2 : JH-2. (A) Sequence of OPC-13 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-1 (B) Sequence of OPD-06 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-1 (C) Sequence of OPG-04 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-1

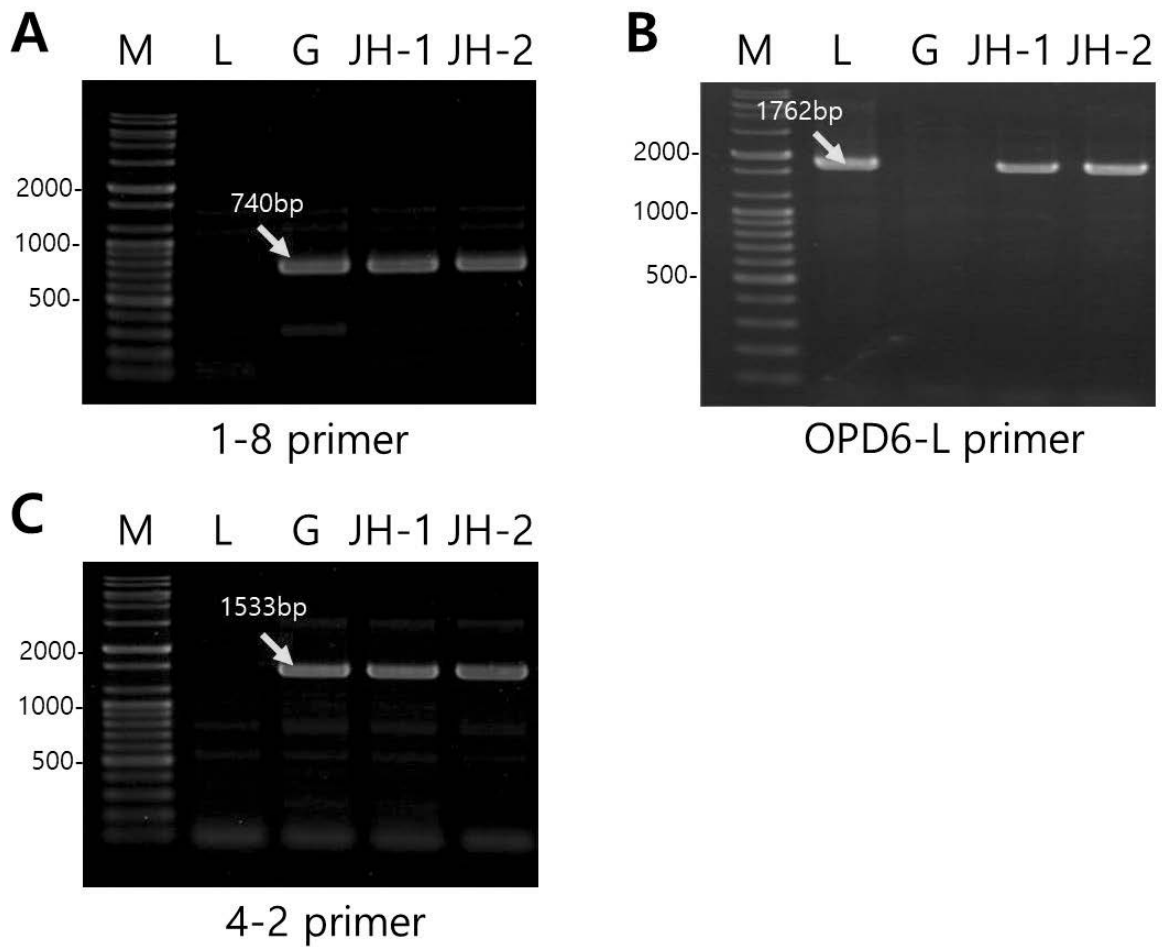
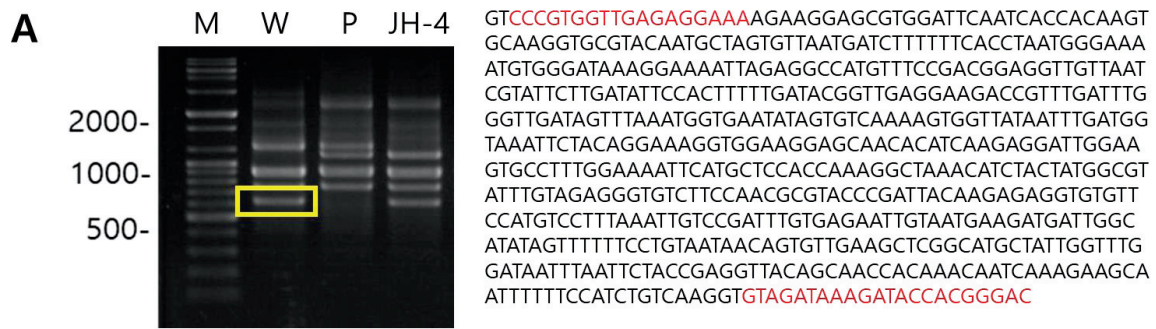


Fig. 24 . Amplification of the PCR-based SCAR markers for the Ladino, Green ice, JH-1 and JH-2. Lane M : 100bp ladder, Lane L : Ladino, Lane G : Green ice, Lane JH : JH-1, Lane JH-2 : JH-2. (A) Identification of Green ice, JH-1 and JH-2 using SCAR marker derived from OPC-13 fragment (B) Identification of Ladino, JH-1 and JH-2 using SCAR marker derived from OPD-06 fragment (C) Identification of Ladino, JH-1 and JH-2 using SCAR marker derived from OPG-04 fragment

3-2. JH-4(William x Pentaphyllum)

JH-4를 OPI-16 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 457bp 다형성 밴드는 *Trifolium occidentale*의 3번 염색체(Ch. 3O)와 4번 염색체(Ch. 4O)에서 각각 80.63%, 78.63%의 상동성이 관찰되었으며(Fig. 25A), OPJ-12 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 610bp 다형성 밴드는 *Trifolium occidentale*의 7번 염색체(Ch. 7O)와 8번 염색체(Ch. 8O)에서 각각 98.36%와 73.66%의 상동성이 관찰되었다(Fig. 25B).

선발된 염기서열 정보를 이용하여 특이적 프라이머를 합성하여 SCAR마커로 활용할 수 있는지 확인하기 위해서 모본과 교배종을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 6-1 프라이머는 Pentaphyllum과 교배종에서만 399bp의 밴드가 확인되었고(Fig. 26A), 9-3 프라이머는 William과 교배종에서 610bp 밴드가 확인되었지만 Pentaphyllum에서는 확인되지 않았다(Fig. 26B). 본 실험을 통해 6-1 + 9-3 프라이머 조합으로 JH-4 교배종이 William와 Pentaphyllum 모본 2품종의 교배에 의해 만들어진 것임을 증명할 수 있는 마커로써 활용 가능하다는 것이 확인되었다.



Sequence producing significant alignments	Identity(%)
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 70 genome shotgun sequence	98.36
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 80 genome shotgun sequence	73.66



Sequence producing significant alignments	Identity(%)
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 30 genome shotgun sequence	80.63
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 40 genome shotgun sequence	78.63

Fig. 25. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(William, Pentaphyllum and JH-4) and compared to white clover genome sequence. The sequence of SCAR primer are indicated in red color. Lane M : 100bp plus ladder, Lane W : William, Lane P : Pentaphyllum, Lane JH-4 : JH-4 (A) Sequence of OPI-16 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-4. (B) Sequence of OPJ-12 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-4

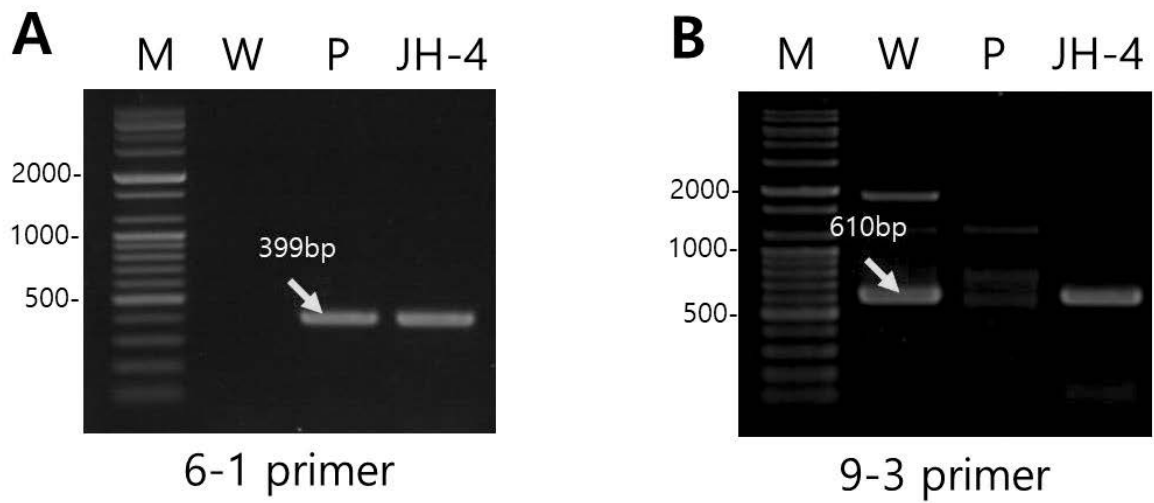
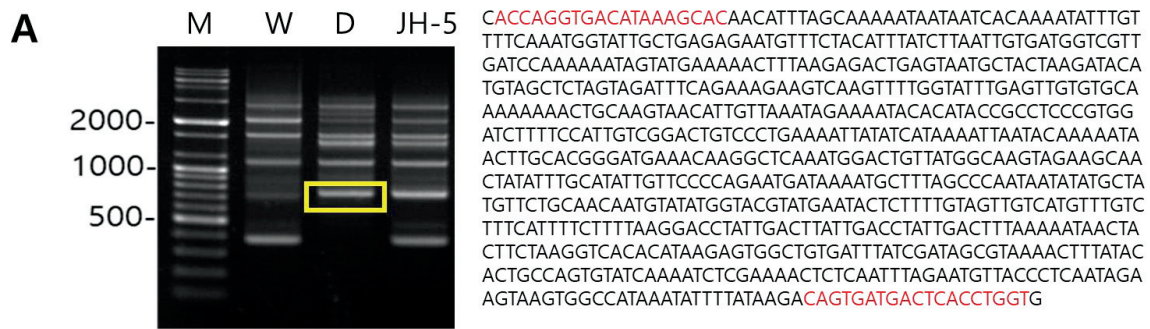


Fig. 26. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the William, Pentaphyllum and JH-4. Lane M : 100bp plus ladder, Lane W : William, Lane P : Pentaphyllum, Lane JH-4 : JH-4. (A) Identification of Pentaphyllum and JH-4 using SCAR marker derived from OPI-16 fragment (B) Identification of William and JH-4 using SCAR marker derived from OPJ-12 fragment

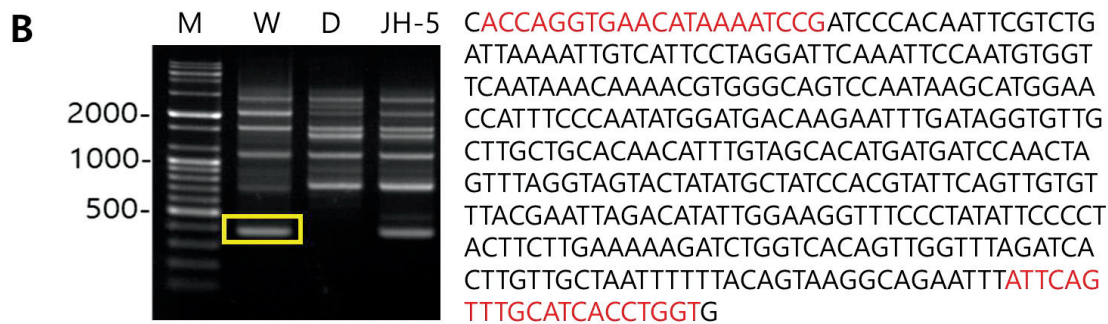
3-3. JH-5(William x Dragon's blood)

JH-5를 OPE-10 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 다형성 밴드 중 731bp의 다형성 밴드는 *Trifolium pratense*의 4번 염색체(Ch. 4P)와 *Trifolium occidentale*의 6번 염색체(Ch. 6O)에 각각 99.68%와 91.94%의 상동성이 확인되었고(Fig. 27A), 373bp의 다형성 밴드는 *Trifolium pratense*의 4번 염색체(Ch. 4P)와 *Trifolium pratense*의 7번 염색체(Ch. 7P)에서 각각 약 97.99%와 90.59% 상동성이 확인되었다(Fig. 27B). 또한, OPH-11 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 257bp 다형성 밴드는 *Trifolium pratense*의 1번 염색체(Ch. 1P)와 *Trifolium occidentale*의 4번 염색체(Ch. 4O)에 각각 약 93.82%와 99.61%의 상동성이 확인되었다(Fig. 27C).

선발된 염기서열 정보를 이용하여 특이적 프라이머를 합성하여 SCAR마커로 활용할 수 있는지 확인하기 위해서 모본과 교배종을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 11-1 프라이머는 731bp 밴드가 Dragon's blood와 교배종에서 확인되었지만 William에서는 나타나지 않았다(Fig. 28A). 또한, 12-1, 15-1 프라이머는 각각 373bp와 257bp 크기의 다형성 밴드가 William과 교배종에서 확인되었지만, Dragon's blood에서는 나타나지 않았다(Fig. 28B, 28C). 본 실험을 통해 11-1 + 12-1 프라이머 조합 또는 11-1 + 15-1 프라이머 조합이 JH-5이 William와 Dragon's blood 모본 2품종의 교배에 의해 만들어진 것임을 증명할 수 있는 마커로써 활용 가능하다는 것이 확인되었다.



Sequence producing significant alignments	Identity(%)
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 4P genome shotgun sequence	99.68
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 6O genome shotgun sequence	91.94



Sequence producing significant alignments	Identity(%)
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 4P genome shotgun sequence	97.99
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 7P genome shotgun sequence	90.59

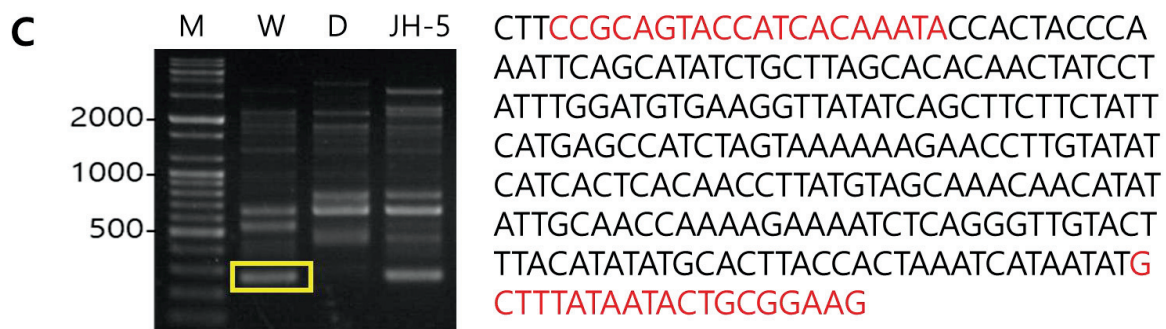


Fig. 27. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(William, Dragon's blood and JH-5) and compared to white clover genome sequence. The sequence of SCAR primer are indicated in red color. Lane M : 100bp plus ladder, Lane W : William., Lane D : Dragon's blood, Lane JH-5 : JH-5. (A) Sequence of OPE-10 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-5 (B) Sequence of OPE-10 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-5 (C) Sequence of OPH-11 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-5

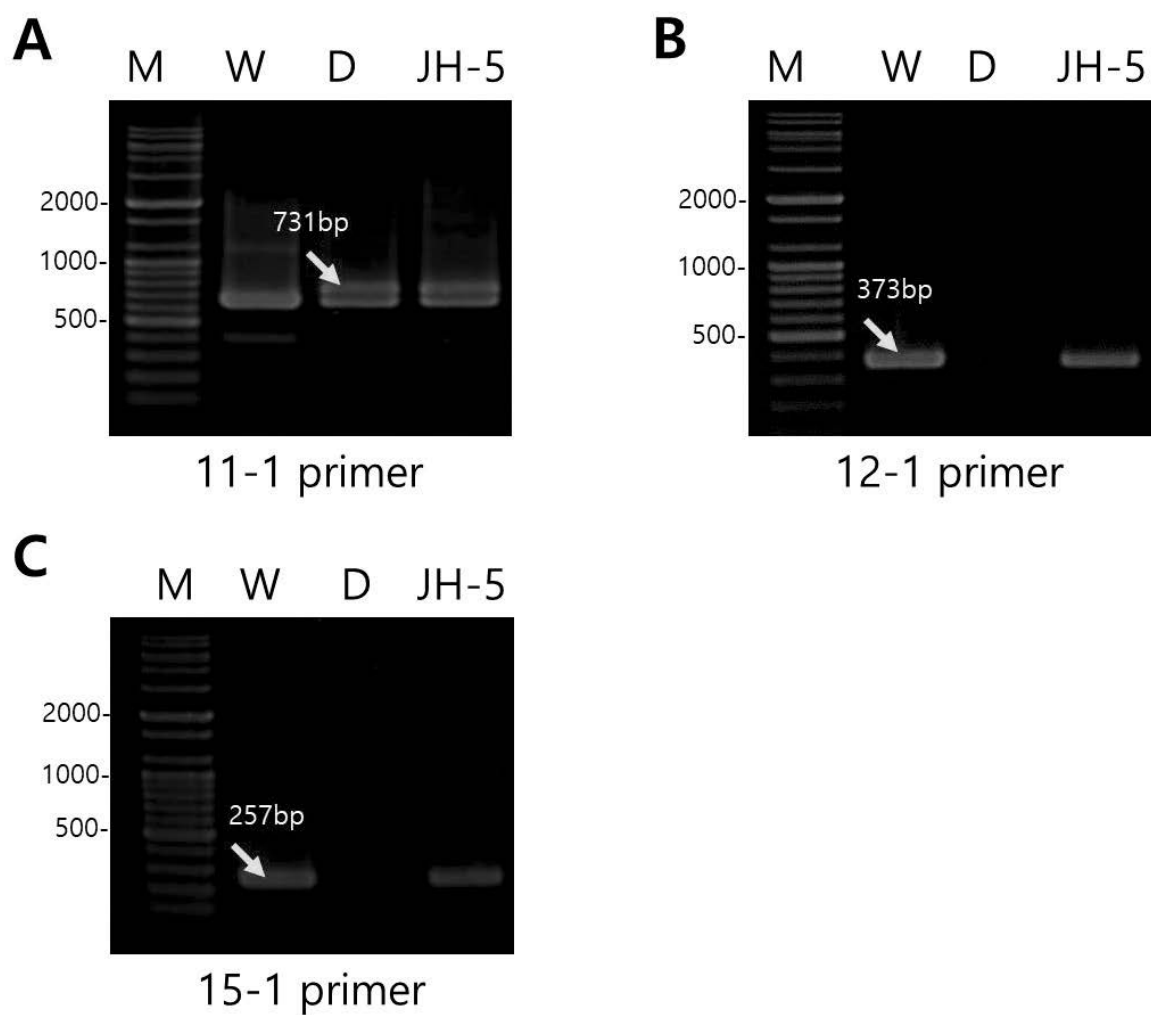
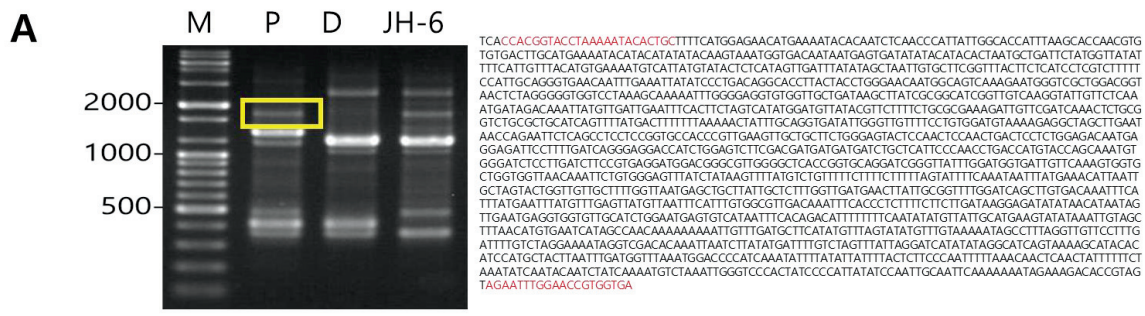


Fig. 28. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the William, Dragon's blood and JH-5. Lane M : 100bp plus ladder, Lane W : William., Lane D : Dragon's blood, Lane JH-5 : JH-5. (A) Identification of Dragon's blood and JH-5 using SCAR marker derived from OPE-10 fragment (B) Identification of William and JH-5 using SCAR marker derived from OPE-10 fragment (C) Identification of William and JH-2 using SCAR marker derived from OPH-11 fragment

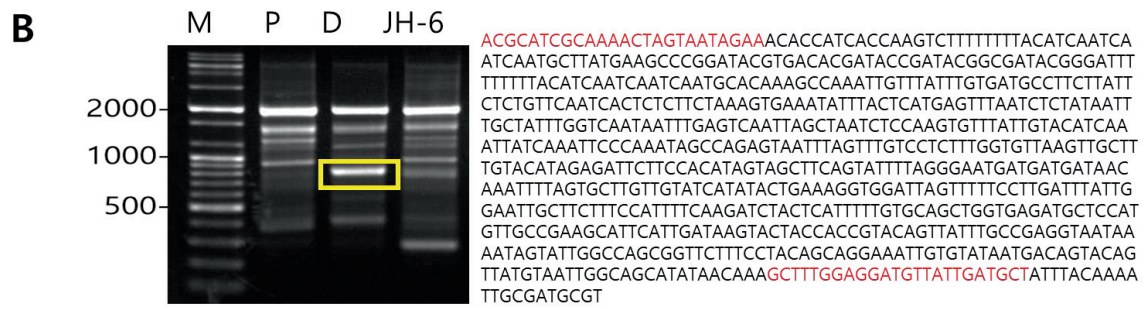
3-4. JH-6(Pentaphyllum x Dragon's blood)

JH-6를 OPE-08 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 1717bp 다형성 밴드는 *Trifolium pratense*의 5번 염색체(Ch. 5P)와 6번 염색체(Ch. 6P)에 각각 99.82%와 93.49%의 상동성이 확인되었다(Fig. 29A). 또한, OPH-06 프라이머로 RAPD를 수행하였을 때 확인된 720bp 다형성 밴드는 *Trifolium pratense*의 2번 염색체(Ch. 2P)와 1번 염색체(Ch. 1P)에 각각 97.79%와 97.24%의 상동성이 확인되었다(Fig. 29B)

선발된 염기서열 정보를 이용하여 특이적 프라이머를 합성하여 SCAR마커로 활용할 수 있는지 확인하기 위해서 모본과 교배종을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 9-3-1 프라이머는 *Pentaphyllum*과 교배종에서만 1714bp 밴드가 확인되었고(Fig. 30A), 10-2-1 프라이머는 *Dragon's blood*와 교배종에서 720bp 밴드가 확인되었지만 *Pentaphyllum*에서는 확인되지 않았다(Fig. 30B). 본 실험을 통해 9-3-1 + 10-2-1 프라이머 조합이 JH-6 교배종이 *Pentaphyllum*와 *Dragon's blood* 모본 2품종의 교배에 의해 만들어진 것임을 증명할 수 있는 마커로써 활용 가능하다는 것이 확인되었다.



Sequence producing significant alignments	Identity(%)
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 5P genome shotgun sequence	99.82
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 6P genome shotgun sequence	93.49



Sequence producing significant alignments	Identity(%)
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 2P genome shotgun sequence	97.79
Trifolium repens cultivar cv 'Crau'-derivative ecotype S9 chromosome 1P genome shotgun sequence	97.24

Fig. 29. Isolation of DNA fragment obtained by RAPD profiles(Pentaphyllum, Dragon’s blood and JH-6) and compared to white clover genome sequence. The sequence of SCAR primer are indicated in red color. Lane M : 100bp plus ladder, Lane P : Pentaphyllum., Lane D : Dragon’s blood, Lane JH-6 : JH-6. (A) Sequence of OPE-08 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-6 (B) Sequence of OPH-06 primer RAPD-derived DNA fragment to JH-6

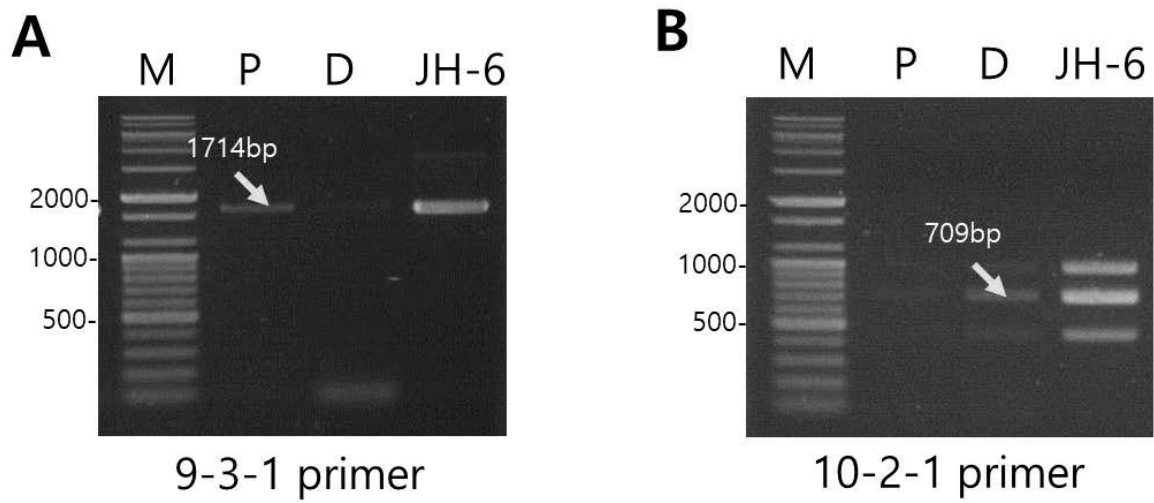


Fig. 30. Amplification of the PCR-based SCAR markers for the Pentaphyllum, Dragon's blood and JH-6. Lane M : 100bp plus ladder, Lane P : Pentaphyllum., Lane D : Dragon's blood, Lane JH-6 : JH-6. (A) Identification of Pentaphyllum and JH-6 using SCAR marker derived from OPE-08 fragment (B) Identification of Dragon's blood and JH-6 using SCAR marker derived from OPH-06 fragment

IV. 종합 고찰

농림축산식품부 국립종자원은 화이트 클로버의 신품종 보호 출원 및 등록을 위해서 식물체 초고, 초형, 포복경, 중간 소엽, 꽃 등의 28가지 특성 조사 요령을 지정하였으며, 이 중에서 출원 품종의 10개 이상의 주요 형태적 특성을 필요로 한다. 그러나 양적 특성의 경우에는 작물이 환경적 요소에 의해 변화할 수 있기 때문에 품종 구분에 사용하기 어렵다고 보고되었으며(Lee et al., 2011), 화이트 클로버의 경우에는 환경적 요인에 따라 다양한 형태적 특성이 나타난다고 보고되었다(Ballizany et al., 2014). 국내에서는 달래나 장미 등 여러 식물 연구에서 외부 형태학적으로 분류하는 연구가 이루어져 있지만 형태학적 만으로는 기온, 습도, 날씨 등 환경적인 영향으로 변이가 다양하게 일어나기 때문에 정확한 분류를 하기에는 한계가 있다고 보고되었다(Joung et al., 2010, Lee et al., 2011). 또한 화이트 클로버의 품종을 줄기 길이, 포복경 두께 등의 양적 특성으로 분류하기가 어려웠는데, 이는 화이트 클로버가 다양한 환경적 요인에 의해 형태학적 변이가 다양하게 나타나기 때문으로 추정된다(Rebecca et al., 2010). 또한, 이전 연구에서 화이트 클로버를 V자 무늬가 나타나지 않는 no V, V자 무늬가 나타나는 Full V, V자 무늬가 중간에 끊긴 형태로 나타나는 Broken V와 V자 무늬가 중간에만 나타나는 V-point 등 총 4가지 형태의 V자형 무늬를 통해 구분하였으며(Brewbaker et al., 1955), 다른 연구에서는 V자형 무늬가 나타나지 않는 No V mark, V자형 무늬가 나타나는 Full V, V자형 무늬 가운데 형태가 번지듯이 나타나는 Broken V with yellow tip, 연녹색의 잎을 가지는 Marginal mark, 아래 엽신에 붉은색을 띠는 Redspot, Red leaflet, 엽맥에 붉은 무늬가 나타나는 Red midrib, 붉은색의 잎을 띠는 Red leaf, 잎 전반적으로 붉은 무늬가 생기는 Red fleck 등의 형태적 특성에 따라 분류하였다(Rebecca et al., 2010). 따라서, 본 연구에서는 농림축산식품부 국립종자원의 화이트 클로버 특성조사요령을 참고하여 환경에 영향을 덜 받는 11가지 외부 형태학적 특성을 기준으로 하여 모본과 모본간 교배종을 분류하였다.

또한, 본 연구결과에서 모본과 교배종이 RAPD를 이용하여 품종 분류가 가능하다는 것을 확인하였다. 화이트 클로버 이외에 국화 속의 교잡종을 대상으로 RAPD분석을 통해 모본 2품종과 교배종 사이에서 다형성을 보이는 마커로 유연관계를 확인하였으며(Huang et al., 2000), 여름양송이에서도 RAPD를 이용하여 교배종 선발을 하였다(Oh et al., 2015). 또한, RAPD 분석 결과에서 화이트 클로버 교배종에서는 모본에서 확인된 다형성 밴드뿐만 아니라 교배종에서만 확인되는 다형성 밴드도 확인하였다. 이는 RAPD마커에서 다형성은 염기서열의 결실 및 삽입 등의 변화 혹은 감수분열 과정에서의 재조합 또는 돌연변이에 의한 결과라고 보고되었다(William et al., 1990, Huang et al., 2000). 그리고, RAPD 분석에서 선발된 마커들이 부모로 예측된 모본 이외의 나머지 3종의 모본에 대해서도 판별 마커로서 사용 가능한 것을 확인하였다. 또한, 교배종에서 선발된 RAPD 마커들의 일부에서는 형태학적 분류에서 부모로 예측되는 모본 이외의 나머지 모본에서도 비슷한 RAPD 패턴이 확인되었지만 이는 형태학적 분류와 RAPD 패턴을 조합하면 교배종을 구별하는데 활용 가능할 것으로 판단된다. 국내에서는 장미의 유전자원을 형태학적 분류와 RAPD분석을 병행하여 유전적 다양성을 확인하였고, 달래와 산달래의 형태적 분류와 ISSR 분석을 병행하여 유전적 다양성을 확인하여 여러 분자마커 연구에 활용이 가능할 것이라고 보고한 바 있다(Joung et al., 2010, Lee et al., 2011).

본 실험에서는 모본과 교배종간의 유연관계가 확인된 RAPD 마커를 대상으로하여 10종의 SCAR 마커로 전환하였다. 1-8, 4-2와 OPD6-L 프라이머를 사용하여 Ladino, Green ice, JH-1과 JH-2를 분류하였고(Fig. 24), 6-1과 9-3 프라이머를 사용하여 William, Pentphyllum과 JH-4를 분류하였다(Fig. 26). 또한, 11-1, 12-1 그리고 15-1 프라이머를 사용하여 William, Dragon's blood 및 JH-5를 분류하였고(Fig. 28), 9-3-1과 10-2-1 프라이머를 사용하여 Pentaphyllum, Dragon's blood 및 JH-6를 분류하였다(Fig. 30). 이를 통해 외부형태학적으로 구분이 힘든 화이트 클로버 품종을 분자적으로 분류할 수 있다는 것을 확인하였다. 본 실험에서 화이트 클로버 모본 및 교배종간의 유연관계가 확인된 RAPD 마커가 SCAR마

커로 전환하는 과정에서 총 38종 SCAR 프라이머 중 약 26%인 10종만이 SCAR 프라이머로 전환되었는데, 이는 RAPD 분석에서 비슷한 크기의 염기서열들이 혼재되어 RAPD 마커에서 SCAR마커로 전환하는 과정에서 나타나는 현상으로 보고되었다(Paran et al., 1993, Bernet et al., 2003, Cho et al., 2013).

본 실험에서 화이트 클로버 모본과 교배종을 대상으로 하여 개발된 외부형태학적 특성 분류, RAPD 및 SCAR 마커는 다양한 무늬의 화이트 클로버 유전자원에 적용하여 품종을 식별하는 데 사용이 가능함을 보여준다. 화이트 클로버는 영양번식을 주로 증식 수단으로 하는 품종으로 우수 신품종을 개발하여 실용화를 할 경우에 품종 보호권이 침해되기 쉬우므로 본 연구에서 개발된 외부형태학적 특성 분류 및 분자마커는 지식 재산 보호에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 참고 문헌

- Anggraheni YGD, Mulyaningsih ES (2021) Diversity Assessment of Mango (*Mangifera* spp) Plant Collection of Cibinong Germplasm Garden Based on Leaves Morphology and RAPD Markers. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 715 012045
- Ballizany W, Hofmann R, Jahufer M, Barrett B (2014) Variation for Constitutive Flavonols and Morphological Traits in a New White Clover Population. *Environ Exp Bot* 105:65-69
- Bernet GP, Bramardi S, Carbonell EA, Asins MJ (2003) Applicability of Molecular Markers in the Context of Protection of New Varieties of Cucumber. *Plant Breeding* 122, 146-152
- Brewbaker J (1955) V-Leaf Markings of White Clover. *J. Hered.* 46(3):115–123
- Bortolini F, Dall Agnol M, Schifino Wittmann MT (2006) Molecular Characterization of the USDA White Clover (*Trifolium repens* L.) Core Collection by RAPD Markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 1081–1087
- Caradus JR (1986) World Checklist of White Clover Varieties. *New Zealand J. Agric. Res* 14(2):119-164
- Cho KH, Heo S, Kin HR, Kim JH, Shin IS, Han SE, Kim SH, Kim DH (2010) Discrimination of Korean Apple Cultivars Using Combination of RAPD-SCAR Markers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28(5):828-835

- Cho KH, Cho KS, Han JH, Kim HR, Shin IS, Kim SH, Chun JA, Hwang, HS (2013) Development of Sequence Characterized Amplified Region Markers for Cultivar Identification in Persimmon Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31(6):798-806
- Cho KH, Kwack YB, Park SJ, Kim SH, Lee HC, Kim MY (2017) Genetic diversity in kiwifruit germplasm evaluated using RAPD and SRAP markers. J Plant Biotechnol 44:303-311
- Chung SJ, Park SU, Kim HJ, Yang GM, Choi JS, Oh CJ, Jang DH, Song IJ, Lee GJ (2013) RAPD-SCAR Markers Linked to Medium-Leaf Zoysiagrass Ecotypes. Weed Turf. Sci. 2(2):191-197
- Corkill L (1971) Leaf Marking in White Clover. *J. Hered* 62(5):307–310
- Frame J, Newbould P (1986) Agronomy of White Clover, *Adv. Agron* 40:1-88
- Gibson PB, Cope WA (1985) White Clover, *Clover Science and Technology* 25 Chapter 20:471-490
- Griffiths AG, Moraga R, Tausen M, Gupta V, Bilton TP, Campbell MA, Ashby R, Nagy I, Khan A, Larking A, Anderson C, Franzmayr B, Hancock K, Scott A, Ellison NW, Cox MP, Asp T, Mailund T, Schierup MH, Andersen SU (2019) Breaking Free: The Genomics of Allopolyploidy-Facilitated Niche Expansion in White Clover, *Plant Cell* 31: 1466–1487
- Gustine DL, Voigt PW, Brummer E, Papadopoulos YA (2002) Genetic variation of RAPD Markers for North American White Clover Collections and Cultivars. *Crop Sci.* 42:343-347
- Han HS, Jung JS (2021) Development of a Female-associated SCAR Marker in *Schisandra nigra* Max. *J. Life Sci.* 31(6):537-542

- Hong YP, Lee JW (2016) Development of SCAR Marker for Identifying Male Trees of *Ginkgo biloba* using Multiplex PCR, J. Korean For. Soc 105(4):422-428
- Huang SC, Tsai CC, Sheu CS (2000) Genetic Analysis of *Chrysanthemum* Hybrids Based on RAPD Molecular Markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 257-262
- Jones ES, Hughes LF, Drayton MC, Abberton MT, Michaelson-Yeast TPT, Bowen C, Forster JW (2003) An SSR and AFLP Molecular Marker-based Genetic Map of White Clover(*Trifolium repens* L.). Plant Sci. 165:531-539
- Joung YH, Kim ST, Kim GJ, Lee JH, Gi GY, Han TH (2010) Genetic Relationship of Genus *Rosa* Germplasm and Genetic Diversity of *Rosa rugosa* in Korea, Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28(6):1003-1013
- Khanlou KM, Vandepitte K, Asl LK, Bockstaele EV (2011) Towards an Optimal Sampling Strategy for Assessing Genetic Variation Within and Among White Clover (*Trifolium repens* L.) Cultivars using AFLP, Genet. Mol. Biol. 34(2):252-258
- Lee SB, Kim CK, Oh JY, Kim KM (2011) Classification of *Allium monanthum* and *A. grai* by ISSR Markers, Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29(6):600-609
- Ma S, Han C, Zhou J, Hu R, Jiang X, Wu F, Tian Ke, Nie G, Zhant X (2020) Fingerprint Identification of White Clover Cultivars Based on SSR Molecular Markers. Mol. Biol. Rep. 47:8513–8521
- Meilawati NLW, Darajat J, Bermawie N (2021) Genetic Relationship of Parents and Progeny Derived from Crossed Pollination of *Piper nigrum* L. Based on Morphology and RAPD Markers. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 762 012070

- Oh YL, Jang KY, Kong WS, Shin PG, Kim ES, Oh MJ, Choi IG (2015) Selection of *Agaricus bitorquis* hybrid strains based on RAPD analysis. J Mushroom. 13(3):243-249
- Oh JS, Sa KJ, Park H, Hyun DY, Lee SK, Rhee JH, Lee JK (2021) Genetic Variation of Native *Perilla* Germplasms Collected from South Korea Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers and Morphological Characteristics. Plants (Basel). 10(9):1764
- Paran I, Michelmore RW (1992) Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. Plant Mol. Biol. Rep. 15(1):8-15
- Rebecca MT, Han YH, Maria JM, Joseph HB, Wayne AP (2010) Leaf Trait Coloration in White Clover and Molecular Mapping of the Red Midrib and Leaflet Number Traits, Crop Science Volume 50, Issue 4:1260-1268
- Till I (1987) Variability of Expression of Cyanogenesis in White Clover. Heredity (Edinb.) 59:265-271
- William JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18(22) 6531-6535
- Zamani Z, Sarkhosh A, Fatahi R, Ebadi A (2007) Genetic Relationships Among Pomegranate Genotypes Studied by Fruit Characteristics and RAPD Markers. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 82:1, 11-18

Zhang H, Tian H, Chen M, Xiong J, Cai H, Liu Y (2018) Transcriptome Analysis Reveals Potential Genes Involved in Flower Pigmentation in a Red-flowered Mutant of White Clover(*Trifolium repens* L.), *Genomics* 110 191–200

Zhang Y, Sledge MK, Bouton JH (2007) Genome Mapping of White Clover(*Trifolium repens* L.) and Comparative Analysis Within the Trifolieae using Cross-species SSR Markers. *Theor. Appl. Genet.* 114:1367–1378

감사의 글

학부생일 때부터 시작해 3년의 석사 기간을 거쳐 졸업을 할 때까지 많은 경험을 하였고 많은 사람들을 만났습니다. 부족한 저를 오랫동안 지도해주신 이효연 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 또한, 바쁘신 와중에 논문 심사에 임해주신 김인중 교수님과 실험을 같이 설계하고 지도해주신 은창호 박사님께도 감사의 인사를 전합니다. 연구실 분들께도 항상 감사합니다. 논문과 실험을 봐주시고 이끌어주시는 선현진 교수님과 강홍규 교수님, 식물 재료를 키울 때 많은 도움을 주신 진일두 교수님과 정옥철 연구원님, 항상 친절하고 재밌는 박미영 연구원님과 정혜린 연구원님, 저희의 편의를 위해 고생하시는 최수정 선생님, 그리고 공부할 때 많은 도움을 준 손지희 선배님께도 감사의 말씀을 전합니다. 마찬가지로 같이 고생한 율유안, 서여월에게도 감사의 말 전합니다. 마지막으로 부모님께 감사의 말씀을 전해드리고 싶습니다. 제주대학교에서 공부하는 동안 항상 저를 위해 기도해주시고 응원해주셨습니다. 언제나 감사하고 사랑합니다. 그 외에도 도움을 주신 많은 분들께 정말 감사의 말씀을 드리며 마치겠습니다.