

제주마의 유전적 고유성 파악을 통한 혈통관리 체계 확립

Fundamental Studies on the Development of Horse Pedigree system with Genetic Analysis of Cheju native Horse

주관연구기관	밀양대학교
연구책임자	조병욱
발행년월	2003-08
주관부처	농림부
사업관리기관	농림기술관리센터
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201100001654
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/02 17:51:30

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

최 중
연구보고서

제주마의 유전적 고유성 파악을 통한 혈통관리 체계 확립

밀 양 대 학 교

농 립 부

최 중
연구보고서

제주마의 유전적 고유성 파악을 통한 혈통관리 체계 확립

밀 양 대 학 교

농 립 부

최 종 보 고 서

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “제주마의 유전적 고유성 파악을 통한 혈통관리 체계 확립” 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 일

주관연구기관명 : 밀양대학교

총괄연구책임자 : 조 병 욱

세부연구책임자 : 조 병 욱

연 구 원 : 김 선 구

연 구 원 : 김 용 균

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 양 영 훈

연 구 원 : 강 기 봉

연 구 원 : 박 영 숙

협동연구기관명 : 축산진흥원

협동연구책임자 : 전 창 익

연 구 원 : 강 대 평

연 구 원 : 장 문 협

연 구 원 : 김 준

요 약 문

I. 제 목

제주마의 유전적 고유성 파악을 통한 혈통관리 체계 확립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

21세기에는 유전자의 개발과 이용에 따라 국가의 부가 결정된다는 언급은 더 이상 터무니없는 것이 아니다. 복제동물의 탄생을 비롯한 최근의 연구결과들은 기존의 상식이 파괴되는 혁신적인 발전을 가져오고 있다. 그야말로 공상과학에 나타나는 유전공학에 의한 미래사회의 건설이 불가능하게만 느껴지지는 않게 되었다. 따라서 유전자의 개발·이용기술의 확보는 국가의 기반 기술로 여겨지고 있으며, 최근에는 선진국에서만 진행되는 인체 유전자 연구도 우리 나라를 비롯한 개발도상국가들 뿐 아니라 후진국들도 연구비 투자를 서두르고 있는 실정이다.

국가적 차원의 유전자 개발 및 이용기술의 확보를 위한 노력들은 근래에 꾸준히 진행되고 있으며, 이러한 노력의 일환으로 지난 1993년에 멸종위기의 생물종의 교역금지 협약(CITES)의 결성과 현재는 130여개국이 참가하고 있는 ‘생물다양성협약’에 우리나라도 1994년에 가입하였다. 따라서 자국의 생물종다양성 보존과 자료교환 및 이익의 균등분배 등에 대한 의무를 지고 있다. 생물종다양성 보존의 필요성은 미래의 생물산업 무기로써 활용뿐만 아니라 지구환경보존 차원의 의미를 갖는 것이지만, 또한, 각 나라별로 가지는 생물집단을 미래 유전자개발 경쟁시대에 유용하게 이용하여 자국의 번영을 얻고자 하는 목적을 갖는다.

가축사육과 이의 산물생산에 있어서도 유용 유전자원을 확보·이용하는 것은 미래 축산업의 경쟁력유지에 있어 필수적인 것으로 여겨진다.

이러한 상황에서 한국의 유일한 향마로서 대표되는 제주 재래마는 농경문화의 발달과 더불어 사육되기 시작하여 오랜 세월동안 제주 지역의 기후풍토에 순화, 적응하면서 타 품종과 교류없이 제주마의 순수한 유전적 특성을 보유하고 있어 체구는 왜소하나 지구력이 강한 소형마로써 그 순수도가 대단히 높아 세계에서는 희귀한 생물학적 및 학술적 가치를 지닌 자원이다

그러나 1960년대 이후 경제성장과 더불어 농기계의 보급, 확대로 수요 감소와 말의 경제가치 감소에 따른 농가의 사육의욕 저하로 제주 재래마의 사육두수는 급격히 감소되면서 1960년대 12,077두였던 것이 1986년 1300여두에 불과한 실정이 되었으며, 또한 외국으로부터 수입된 개량종과의 교잡에 의한 잡종화로 혈통이 문란해져 한때 멸종 위기에 까지 처한 바 있는데 제주 재래마의 순수 혈통을 보존 및 멸종 방지의 대책 일환으로 학계, 관, 산연의 공통적인 인식하에 가축 중에는 진돗개, 오골계에 이어 1985년 2월에 세 번째로 천연기념물 제 347호로 지정되어 현재 제주도 축산진흥원에서 사육되고 있으며, 새로운 축산 소득원으

로 개발 육성하여 농가소득 증대 도모를 위해 제주 경마장 운영으로 점차 증식되어 2000년 현재 4,000여두가 제주도에서 사육되고 있으며 또한 산업적으로는 제주도내에서 승마와 경마를 위해 1800여두 이용되고 있다.

이러한 차원에서 국내 재래 가축의 특성파악과 보존은 절실한 상황이며 산업적 이용성이 증대되고 있는 국내 재래마로써 제주마에 대한 유전적 특성 파악과 이를 통한 혈통등록 및 친자감별 체계의 확립은 빠른 시일내에 이루어져야 유전자를 이용한 생물산업에서 뒤지지 않을 것이다.

본 연구에서 이용 가능한 유전적 특성 파악방법은 전통적인 혈액단백질의 다형을 확인하는 방법과 DNA수준의 제한효소 절편다형 등이 가능하나 이러한 방법들은 시료채취를 위한 채혈 등의 과정이 필요하여 번거러울 뿐 아니라 그 판별의 정확도도 낮은 단점이 있다. 따라서 본 연구에서 이용될 방법은 개체확인 및 친자판별의 효율성, 경제성, 신속 정확한 판정을 위해서는 유전적 다형성이 매우 높은 microsatellite(초위성체) 반복서열을 PCR로 증폭하여 유전자형을 파악하는 것으로, 오차확률이 100만 분의 1 이하 높은 수준의 정확도를 나타낸다.

또한 외래종과 교잡여부를 파악할 수 있는 DNA 표지인자를 개발하기 위해서는 유전체(Genome)의 전 구조를 대상으로 검색할 수 있는 RAPD(Williams 등, 1990)분석 기법을 이용하여 차별적인 구조를 밝힐 수 있다. 일단 발견된 유전적 차이는 보다 안정적인 유전자형 감식을 위해 신장된 PCR primer(SCAR)를 다시 작성하게 되고 이를 바탕으로 유전적 교잡여부를 확인할 수 있게된다.

따라서 DNA수준의 높은 정확도를 얻을 수 있는 기법을 바탕으로 하는 유전적 특이성 규명과 친자감별기법 및 개체식별의 확립은 제주 재래마 영구적 보존과 산업적 활용을 위한 필수적인 상황이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제주마의 유전적 특성 파악을 통한 혈통관리 체계 확립을 위해 3과제로 구분하여 연육을 수행하였다.

1. 제주마의 유전적 특성 파악

(1) 제주마 특이 RAPD 다형성 분석 및 후보유전자 분석

- ▶ 마 품종의 선정 및 DNA 준비
 - 더리브렛, 몽고마, 제주마
 - 혈액으로부터의 DNA 분리·정제
- ▶ 품종간의 RAPD 탐색
 - BS에 따른 품종간 유전거리 추정

(2) 제주마 특이 표지인자의 확보 및 특성 파악

- ▶ 품종 특이 RAPD단편의 염기서열 결정
 - 품종 특이 RAPD 표지인자 분리·정제
 - cloning 및 염기서열 결정
 - GenBank homology 확인

- (3) 제주마특이 단편의 신장 PCR primer 설정
 - ▶ 제주마특이 단편의 신장 PCR primer 설정
 - 제주마 특이 단편의 염기서열을 바탕으로 신장 primer set 작성
 - 작성된 primer를 이용한 PCR 증폭조건 확립
 - 품종별 다수의 개체를 이용한 품종특이성 재현 확인

2. 제주마 친자감별 및 개체식별 기법확립

- (1) 적정 microsatellite 후보 좌위 선정
 - 말의 유전자지도 작성시에 이용된 microsatellite 좌위 중 다형성과 단편의 크기 염색체 상의 위치 등을 고려하여 20개 내외의 후보좌위 선정
- (2) 후보좌위에서 제주마 집단의 다형성 파악
 - 20여 좌위를 대상으로 한 제주마의 유전자형을 결정
 - 다형성 수준, 단편의 크기, 적정 PCR 증폭여부 등을 파악
 - 효율적인 유전자좌 선별
- (3) 선별된 microsatellite에 대한 유전적 상관분석
 - 품종간 및 품종내 유전적 유연관계 분석
- (4) 친자감별 시스템 확립
 - 가계내의 개체들에 대한 microsatellite 유전자형 결정
 - 근연관계가 없는 개체들에 대한 유전자형 파악 및 가계내 개체와의 비교
 - 가계내 유전자형 전이양상 확인 및 친자확인에 대한 오차확률 추정
- (5) 개체에 특이적 유전자형 결정
 - 제주마 임의 개체들에 대한 microsatellite 좌위들에서의 유전자형 결정
 - 개체간의 식별 가능성 추정

3. 제주마의 혈통등록 체계 확립

- (1) 혈통등록을 위한 제주마 집단의 사육 현황 조사
 - 각 지역별 농가별 개체에 대한 자료 수집 및 조사(개체별 표현형관찰, 가계도확인)
- (2) 개체 조사 결과를 바탕으로 한 기초 등록 수행 및 개체별자료의 database 구축
 - 제주마 체형조사 결과에 대한 자료 등록 체계확립
- (3) 개체 조사 결과를 바탕으로 제주마 등록 심사 기준 확립
 - 개체 조사결과를 이용한 제주마의 평균 체형 및 표현형 선정
- (4) 제주마 등록체계 확립
 - 표현형 심사, 자료관리, 개체관리 등에 대한 등록에 대한 체계 수립

(5) 제주마 등록체계내에 친자감별과 개체식별 유전자형의 이용

- Microsatellite좌위 들에 대한 개체별 유전자형을 바탕으로 개체 관리 체계 확립
- 제주마 특이 표지인자의 개체별 진단결과를 혈통관리 체계에 도입

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 제주마 유전적 특성 파악

- RAPD PCR을 이용한 마 품종 유전특성 확립 총 22개 primer
- 제주마(JNH)는 더러브렛종과 다른 고유한 유전적 특성이 있는 것으로 확인
- SCAR primer을 활용한 제주마 특이 인자 식별 가능

나. 제주마의 친자감별 및 개체식별 기법 확립

- MS 좌위를 통한 개체식별기법의 개발과 실용화가 가능케됨.
- 유전현상을 보이면서 다형현상이 높은 10개의 MS좌위에 대한 획득성과는 제주마에 대한 분자유전학적인 친자판정을 가능케 함.
- 제주마의 혈통확립을 위한 친자판정의 체계를 완성하였다. 이로서 친자판정에 따른 시비와 혈통추적의 문제가 해결됨.
- 본 연구결과물과 분석방법에 대한 기법은 제주도 축산진흥원에서 진행되고 있는 제주마 등록관리사업의 효율성에 가장 기본적이면서도 필수적인 수단을 제공하게 됨.

다. 제주마의 혈통등록 체계 확립

- 제주마 일반 외모심사 기준 완료
- 제주마 연령별 발육성적 조사 완료
- 제주마 혈통등록 규정 확립
- 기초 및 혈통등록 266두 완료

SUMMARY

I .Title

Fundamental Studies on the Development of Horse Pedigree system with Genetic Analysis of Cheju native -Horse

II. Object and Significance

The evolutionary origin and classification of Cheju-native horse have been attracted to us for a long time. Cheju-native horse have been well adopted to the rough environment of Cheju island for a long centuries. Living primarily in the mid-mountain area, Cheju-native horse are often compared with the Cheju people whose common feature is small but strong physique being able to overcome the extreme weather. These notable characteristics of Cheju-native horse have made them to be an enduring symbol of Cheju-do, Korea. the advent of improved transportation and farming methods led to a general decline in the Cheju-native horse population. To preserve this important historical treasure, Government designated as a Natural Monument No. 347 on February. As a further commitment to their preservation, Cheju racecourse was constructed to preserve and foster Cheju-native horse through pony racing.

Knowledge of the genetic relationships between Cheju-native horse and other breeds is valuable for use in breeding program and conservation of genetic resource. In the past, such knowledge has been difficult to obtain,since it has largely been based upon observation of phisical appearance and phenotypical characteristics such as body conformation, coat color, body lengths, etc. Cheju native Horse used to farming and military use before industrialization. Since than, the number of Cheju native horse was dramatically decreased because of the improved farming instrument and transportation in 1960. In 1986, Cheju native horse was 1,300 head and almost came to the extermination of a stock(Table 1).

Table 1. Statistics of Cheju horse

(unit : head)

Year	'60	'70	'80	'86	'90	'99	'00	'01	'02
Farm	4,736	4,064	1,541	413	295	167	216	265	265
heads	12,077	7,606	2,401	1,347	1,835	3,478	5,484	6,306	7,282

Recently, researchers have turned to molecular biology and the use of DNA markers for parentage verification. Quicker and more accurate parent identification can be obtained from DNA test than from blood antigen testing. Researchers are using PCR to detect short sequence repeats on the specific locus in genomic DNA, which are referred

to as microposatellites. Most of microsatellite markers are evenly distributed and highly polymorphic, and can be identified within DNA samples using PCR. The alleles of microsatellites with a good polymorphism and a clear aspect of Mendelian inheritance can be used to verify parentages of individuals. The implications of DNA testing to verify parentages will give immense effects to registration system of Cheju horse. The aim of this study was to compare the genetic characteristics of Jeju Native horse with other breed of horse, and to constructed a paternity testing system for individual identification and parentage of JNH. Studies were done to develop of microsatellite DNA markers for identification of individuals and parentage verification of CheJu horses. DNA markers which were developed in these studies will be used to genetically identify individuals more quickly and reliably. Results of this study will be used to promote the pedigree registration system of Cheju horse which is a cultural animal as a valuable genetic resource.

III. Research Contents and Scop

This study was divided 3 sub-project to development of Horse Pedigree system with Genetic Analysis of Cheju Native Horse .

1. Idetification of genetic markers in Horse

RAPD was performed to estimate the genetic characteristics between breeds and to obtain the specific DNA marker for Jeju native horse and other breeds and Two thousand Random primer was prepared from UBC(University of British Columbia, Canada) and operon, to identify the breed specific DNA marker and for the genetic difference between breeds and within., ***Cloning and Sequencing*** of the amplified breed specific fragment was processed according to the procedures of the pGEM-T Easy Vector System(Promega, USA), to development breed specific SCAR,

After determining of the cloned breed-specific fragment sequence, strand-specific oligonucleotide primers which added to the 3'-terminus of random primer(8 to 14 bp) were designed based on the sequence information(Bioneer Co. Korea).

2. Development of Microsatellite DNA markers for Individual Identification and Parentage Verification in Jeju Native Horse

To develop microsatellite markers for individual identification and parentage verification system of Jeju horses researches were done to determine the genetic characteristics of useful microsatellite locus, to confirm the inheritance aspect of alleles on their locus, and to estimate error rates in parentage verification system using the developed set of microsatellite loci. Final goal of this researches was to firmly establish the registration

system of Jeju horses by using parentage verification and identification methods on the basis of molecular genetics.

3. Development of Pedigree System of Jeju Native Horse

In this study, we investigated the documentary records, the body measurements, and the regulations of the other livestock's registration for the general standard of the external shape, the standard of the growth performance, and the legislation of the Cheju horse registration, respectively. In the body measurement, the twelve parts of the Cheju horse were measured which are body height, back height, rump height, chest girth, chest depth, chest width, back width, hip width, rump length, body length, head length, and shank circumference.

IV Results and Suggestion on Utilization of Results

1. Identification of genetic markers in Horse

RAPD was performed to estimate the genetic characteristics between breeds and to obtain the specific DNA marker for Jeju native horse and other breeds. of the initial 1980 random primers, 1,539 primers produced clear and intense bands following PCR amplification. Despite the large number of primers screened, most of the primers generating interpretable amplification profiles showed monomorphic pattern among horse breeds. Among 1539 primers 574 primers were selected to identify the breed specific DNA marker and for the genetic difference between breeds and within. a total of 7,857 bands were generated by 574 primers and the number of amplified products per each primer ranged from 3 to 14 with an average of 5.1. The size of the amplified fragments represented from 150bp to 2600bp.

Genetic similarities was calculated with 13 microsatellite Allele frequencies in comparison of six horse breeds. and were used to estimate expected heterozygosity(He), genetic distance (Ds). The expected heterozygosity(He) 13 microsatellite loci for each breeds were 0.700 for JNH, 0.728 for Tho, 0.797 for Mong, 0.794 for JRH, 0.39 for Jap and 0.705 for Qua. This matrix was used to generate dendrogram by UPGMA methods. The genetic similarity coefficient between Jeju native horse and chinese was 0.175, 0.782 for Jeju native horse and thoroughbred, 0.666 for thoroughbred and japan horse, 0.413 for chinese and japan horse, 0.782 and was the highest value in comparison of pair breeds.

Comparing the pooled DNA from Jeju Native Horse and Thoroughbred, we found 25 primers which identified markers present in the pooled DNA from breed but absent in the other breed. Among 290 random primers, 157 primers were Thoroughbred specific and 133 primers were Jeju Native Horse specific. Testing individual horse revealed that 5 marker showed the similar band pattern between Jeju Native Horse and Thoroughbred. However, 22 marker were wholly absent in breed while present in the

other breed(MG0244, MG0162, MG0003, MG0065, MG0034, MG0055, MG5086, MG5153, MG0085, MG0326, MG6085, MG0446, MG0177, MG0562, MG0171, MG0139, MG0162, MG0443, MG02043, MG0030, MG0126 MG0081.

We cloned and sequenced for specific RAPD fragment for 24 clones. These results demonstrates that non repetital sequence. Therefore, these RAPD bands specifie to breed have potential possibility for genetic marker for specific breed. PAPD bands specifie to breed have potential possibility for genetic marker for specific breed. RAPD bands specific for could be used to distinguish Jeju Native Horsethe from Thoroughbred or other crossbred.

we concluded that RAPD screening of DNA pools of six populaton was an effective approach for identifying markers which distinguish each horse breeds. This approach could be converted to the system based on sequence characterized amplified region (SCAR) and would avoid the technical difficulties inherent in RAPD testing. The power of the test would depend upon the number of markers used and of the relative frequency of the markers within each populations being compared. Increasing the number of markers would make the system even more powerful and this would be particularly important for idetification of JNH.

2. Development of Microsatellite DNA markers for Individual Identification and Parentage Verification in CheJu Native Horse

After the candidate microsatellite markers were analysed and evaluated about the Mendelian inheritance and polymorphisms, a total of ten microsatellite markers(ASB25, HMS5, HTG7, UCDEQ411, UM010, UM012, VHL20, VHL209, VIAS-H39 and VIAS-H64) were selected and determined in this research. Total number of alleles over 10 microsatelliet loci was 68(mean number of alleles per locus was 6.8).

To test the usefulness about the set of selected microsatellite loci in individual identification system, microsatellite genotypes of 100 horses which were gathered from candidate horses for registration were compared each other individual genotype. Any pairs of individuals did not have the same genotypes, indicating that the set of selected microsatellite loci has a good power of individual identification.

A total of 40 foals and 44 individuals for candidate parents were typed for their genotypes in each microsatellite locus and demonstrated to test the usefulness of this set of microsatelliet markers in parentage verification. Given two parents and one offspring the probabilities of exclusion were 1.00000 in the horse group of farms and

0.99996 in the group of Jeju Institute. Using the allele system of microsatellite loci which are developed in these studies allows individuals to be a quick and clear inclusion, as well as exclusion in parentage testing. An individual can be identified positively as the parent rather than merely being eliminated as a positively without critical errors.

The developed system of parent verification will be used to genetically identify individuals and verify parentage of Cheju horses under the registration system of Jeju Institute.

3. Development of Pedigree System of Jeju Native Horse

The general standard of the external shape was established by the documentary records. It was able to use for the Cheju horse registration.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of project.....	11
Section 1 Necessity of reasearch and development.....	11
1. Technique side.....	11
2. Economic and industrial side.....	12
3. Social side.....	12
Chapter 2. Status of development.....	13
Chapter 3. Research contents and Results.....	14
Section 1: Analysis of genetic characteristic between Horre breeds.....	15
1. method.....	15
2. Results and Discussion.....	15
Section 2: Development of Microsatellite DNA markers for Individual Identification and Parentage Verification in CheJu Native Horse.....	86
1. method.....	86
2. Results and Discussiononn	90
Section 3: Development of Pedigree System of Jeju Native Horse.....	100
1. method and Result	100
Chapter 4 Implementation and contribution to related field.....	104
Section 1Implementation.....	104
Section 2 Contribution to related field.....	106
Chapter 5 Application of results.....	107
Chapter 6 References.....	108

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	11
제 1 절 연구개발의 필요성.....	11
1. 기술적 측면.....	11
2. 경제·산업적 측면.....	12
3. 사회 문화적 측면.....	12
제 2 절 연구개발의 목표와 범위.....	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	14
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과.....	15
제 1 절 :제주마의 유전특성 구명 및 유전표지인자 개발.....	15
1. 추진전략.....	15
2. 결과 및 소견.....	17
제 2 절: 제주마의 친잠감별 및 개체식별 시스템 개발.....	86
1. 추진방법.....	86
2. 결과 및 소견	90
제 3 절: 제주마의 혈통등록 체계 확립.....	100
1. 추진방법 및 결과.....	100
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	104
제 1 절 연구개발을 위한 목표달성도.....	104
제 2 절 관련분야에의 기여도.....	106
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	107
제 6 장 참고문헌.....	108
별첨 부록	110

제 1 장 연구개발과제의 개요

국가적 차원의 유전자 개발 및 이용기술의 확보를 위한 노력들은 근래에 꾸준히 진행되고 있으며, 이러한 노력의 일환으로 지난 1993년에 멸종위기의 생물종의 교역금지 협약(CITES)의 결성과 현재는 130여개국이 참가하고 있는 ‘생물다양성협약’에 우리나라도 1994년에 가입하였다. 따라서 자국의 생물종다양성 보존과 자료교환 및 이익의 균등분배 등에 대한 의무를 지고 있다. 생물종다양성 보존의 필요성은 미래의 생물산업 무기로서 활용뿐만 아니라 지구환경보존 차원의 의미를 갖는 것이지만, 또한, 각 나라별로 가지는 생물집단을 미래 유전자개발 경쟁시대에 유용하게 이용하여 자국의 번영을 얻고자 하는 목적을 갖는다.

가축사육과 이의 산물생산에 있어서도 유용 유전자원을 확보·이용하는 것은 미래 축산업의 경쟁력유지에 있어 필수적인 것으로 여겨진다.

이러한 상황에서 한국의 유일한 향마로서 대표되는 제주 재래마는 농경문화의 발달과 더불어 사육되기 시작하여 오랜 세월동안 제주 지역의 기후풍토에 순화, 적응하면서 타 품종과 교류없이 제주마의 순수한 유전적 특성을 보유하고 있어 체구는 왜소하나 지구력이 강한 소형마로써 그 순수도가 대단히 높아 세계에서는 희귀한 생물학적 및 학술적 가치를 지닌 자원이다...

그러나 1960년대 이후 경제성장과 더불어 농기계의 보급, 확대로 수요 감소와 말의 경제가치 감소에 따른 농가의 사육의욕 저하로 제주 재래마의 사육두수는 급격히 감소되면서 1960년대 12,077두였던 것이 1986년 1300여두에 불과한 실정이 되었으며, 또한 외국으로부터 수입된 개량종과의 교잡에 의한 잡종화로 혈통이 문란해져 한때 멸종 위기에 까지 처한 바 있는데 제주 재래마의 순수 혈통을 보존 및 멸종 방지의 대책 일환으로 학계, 관, 산연의 공통적인 인식하에 가축 중에는 진돗개, 오골계에 이어 1985년 2월에 세 번째로 천연기념물 제 347호로 지정되어 현재 제주도 축산진흥원에서 사육되고 있으며, 새로운 축산 소득원으로 개발 육성하여 농가소득 증대 도모를 위해 제주 경마장 운영으로 점차 증식되어 2000년 현재 4,000여두가 제주도에서 사육되고 있으며 또한 산업적으로는 제주도내에서 승마와 경마를 위해 1800여두 이용되고 있다.

이러한 차원에서 국내 재래 가축의 특성파악과 보존은 절실한 상황이며 산업적 이용성이 증대되고 있는 국내 재래마로써 제주마에 대한 유전적 특성 파악과 이를 통한 혈통등록 및 친자감별 체계의 확립은 빠른 시일내에 이루어져야 유전자를 이용한 생물산업에서 뒤지지 않을 것이다.

제 1 절 연구개발의 필요성

가. 기술적측면

본 연구에서 이용 가능한 유전적 특성 파악방법은 전통적인 혈액단백질의 다형을 확인하는 방법과 DNA수준의 제한효소 절편다형 등이 가능하나 이러한 방법들은 시료채취를 위한 채혈 등의 과정이 필요하여 번거러울 뿐 아니라 그 판별의 정확도도 낮은 단점이 있다. 따라서 본 연구에서 이용될 방법은 개체확인 및 친자판별의 효율성, 경제성, 신속 정확한 판정을 위해서는 유전적 다형성이 매우 높은 microsatellite(초위성체) 반복서열을 PCR로 증폭하여 유전자형을 파악하는 것으로, 오차확률이 100만 분의 1 이하 높은 수준의 정확도를 나

타낸다.

또한 외래종과 교잡여부를 파악할 수 있는 DNA 표지인자를 개발하기 위해서는 유전체(Genome)의 전 구조를 대상으로 검색할 수 있는 RAPD(Williams 등, 1990)분석 기법을 이용하여 차별적인 구조를 밝힐 수 있다. 일단 발견된 유전적 차이는 보다 안정적인 유전자형 감식을 위해 신장된 PCR primer(SCAR)를 다시 작성하게 되고 이를 바탕으로 유전적 교잡여부를 확인할 수 있게된다.

따라서 DNA수준의 높은 정확도를 얻을 수 있는 기법을 바탕으로 하는 유전적 특이성 규명과 친자감별기법 및 개체식별의 확립은 제주 재래마 영구적 보존과 산업적 활용을 위한 필수적인 상황이다.

나. 경제·산업적 측면

- 유전자원들의 보존과 지속적인 이용을 위하여 국가적이고 국제적인 노력 및 공조체제가 이루어지고 있는 반면 우리 나라의 경우 재래유전자원의 발굴, 보존, 특성화를 위한 연구 체계가 구축이 되어있지 않고 제주마의 경우 지역적인 유전자원 으로서만 여겨지고 있을 뿐 경제적 가치증진을 위한 국가적 차원의 연구가 절실히 요구된다.
- 특히 제주도는 세계최초의 재래마 경주가 이루어지고 있는 곳으로 제주마 유전 자원의 효율적 이용과 국가 관광산업 자원으로서의 역할도 담당하고 있다. 따라서 제주마의 특이성 규명은 더없이 중요하다고 본다.
- 제주마 경주 출전시에 순수재래마 판정기준이 없어 시비가 일고 있으며 이로인해 교잡마 출전 우승이 나타나게되어 순수 제주마 사육기피에 따른 교잡화가 진행될 우려가 존재한다.
- 혈통에 대한 시비가 빈번함에 따라 제주마 경주에 대한 공정성에 문제가 나타나게 되어 제주마 경주 산업 자체가 위협받는 상황으로 진행될 소지마저 있다.
- 한편 체고만을 기준으로 하여 제주마 경주에 출전하다보니 체고가 초과되어 도태됨으로서 경주 활용기간이 (8.5개월로) 너무 짧다. 경제적 손실이 연간 20억원 이상이며 또한 제주마 수급에도 많은 문제를 안고 있다.
- 따라서 제주마에 대한 객관적이고 정확한 기준 설정은 매우 시급한 상황이다.

다. 사회·문화적 측면

- 본 연구에서는 연구대상으로써 현재 산업적으로 유용하게 이용되고 있을 뿐 아니라 국내 고유 유전자원으로써의 제주마를 대상으로 유전자 수준에서의 특이성을 판별하고자 한다.
- 국제적인 재래자원 보존에 대한 관심의 증가와 필요성의 증대 뿐 아니라, 국내 고유의 문화적 자원으로서의 제주마를 유지 보존하는 것은 국가적 자원으로써 중요한 의미를 둘 수 있을 것이다. 조상들로부터 대대로 이어져 내려오는 문화의 일환으로 재래가축, 제주마를 이용한 승마, 토속마 경주 등은 국민들로 하여금 국가적·문화적 만족감을 높게 할 것이다.
- 또한 제주마가 가지는 독특한 유전적 특성을 구명하고 이를 바탕으로 하여 혈통을 등록 확립할 뿐 아니라, 제주마를 이용한 경마산업과 승마산업 등에 독점적인 특이성을 부여하게 되어 사육농가들에게 제주마 보존의 사명감을 고취할 수 있을 것으로 기대된다.

- 제주마 유전 특성 확립에 의해 세계 최초 국적있는 재래마 경주에 대한 사회적 신뢰 확보와 여론의 지지기반 확립에 필수적인 것으로 판단된다.

제 2 절 연구개발의 목표와 범위

1. 주마의 유전적 특성 파악

- (1) 제주마 특이 RAPD 다형성 분석 및 후보유전자 분석
- (2) 제주마 특이 표지인자의 확보 및 특성 파악
 - 품종 특이 RAPD 표지인자 분리 · 정제
 - cloning 및 염기서열 결정
 - GenBank homology 확인
- (3) 제주마특이 단편의 신장 PCR primer 설정
 - 제주마 특이 단편의 염기서열을 바탕으로 신장 primer set 작성
 - 작성된 primer를 이용한 PCR 증폭조건 확립
 - 품종별 다수의 개체를 이용한 품종특이성 재현 확인

2. 제주마 친자감별 및 개체식별 기법확립

- (1) 적정 microsatellite 후보 좌위 선정
 - 말의 유전자지도 작성시에 이용된 microsatellite 좌위 중 다형성과 단편의 크기 염색체 상의 위치 등을 고려하여 20개 내외의 후보좌위 선정
- (2) 후보좌위에서 제주마 집단의 다형성 파악
 - 20여 좌위를 대상으로 한 제주마의 유전자형을 결정
 - 다형성 수준, 단편의 크기, 적정 PCR 증폭여부 등을 파악
 - 효율적인 유전자좌 선별
- (3) 친자감별 시스템 확립
 - 가계내의 개체들에 대한 microsatellite 유전자형 결정
 - 근연관계가 없는 개체들에 대한 유전자형 파악 및 가계내 개체와의 비교
 - 가계내 유전자형 전이양상 확인 및 친자확인에 대한 오차확률 추정
- (5) 개체에 특이적 유전자형 결정
 - 제주마 임의 개체들에 대한 microsatellite 좌위들에서의 유전자형 결정
 - 개체간의 식별 가능성 추정

3. 제주마의 혈통등록 체계 확립

- (1) 혈통등록을 위한 제주마 집단의 사육 현황 조사
 - 각 지역별 농가별 개체에 대한 자료 수집 및 조사(개체별 표현형관찰, 가계도확인)
- (2) 개체 조사 결과를 바탕으로 한 기초 등록 수행 및 개체별자료의 database 구축
 - 제주마 체형조사 결과에 대한 자료 등록 체계확립
- (3) 개체 조사 결과를 바탕으로 제주마 등록 심사 기준 확립
 - 개체 조사결과를 이용한 제주마의 평균 체형 및 표현형 선정
- (4) 제주마 등록체계 확립
 - 표현형 심사, 자료관리, 개체관리 등에 대한 등록에 대한 체계 수립
- (5) 제주마 등록체계내에 친자감별과 개체식별 유전자형의 이용
 - Microsatellite좌위 들에 대한 개체별 유전자형을 바탕으로 개체 관리 체계 확립
 - 제주마 특이 표지인자의 개체별 진단결과를 혈통관리 체계에 도입

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. DNA 다형현상을 이용한 분자유종 기술개발 연구

DNA 다형현상을 이용한 품종이나 개체 및 친자여부를 감별하는 것은 고전적인 혈액형확인 및 혈액단백 다형 확인 및 유전자지문 기법(Hopkins 등, 1991)등이 사용되어 왔다. 그러나 품종간의 특이적 차이점을 찾아내는 것은 품종내의 다수의 개체들이 가지는 공통의 유전적 특성이 또다른 품종내의 모든 개체들에서는 나타나지 않아야 하므로, 집단의 크기가 큰 가족 품종 집단간의 유의적인 품종식별 표지인자의 개발은 매우 어려운 상황이다.

이를 위해서는 각 좌위내의 유전적 상이정도가 일정 수준 이상이어야 하는데, 이들 여러 대립형질들 중 품종성립시 각 집단의 대립형질이 서로 다른 방향으로 고정될 때 품종간 차별적인 유전자형을 갖게된다. 그러나 이러한 범위에 들 수 있는 DNA 표지인자의 종류는 반복수의 차이에 의해 나타나는 VNTR(variable number of tandem repeat)형태로 minisatellite와 microsatellite 부위에 의한 표지인자들이 포함된다(Jeffreys 등, 1985; Litt 등, 1989). 그러나 이들 표지인자들은 개체간의 유전적 차이를 매우 크게 나타내는 장점이 있는 반면 반복단위 수의 변화가 양방향으로 진행될 수 있기 때문에 품종 형성 과정시에 나타나는 유전자형의 고정효과가 반감되어 품종 특이적인 유전자형이 확립되지 않는다.

그러나 PCR 기법을 바탕으로하는 RAPD 기법은 유전체내의 어떤 부위라도 품종간의 차이를 보이는 밴드를 찾아낼 수 있을 뿐 아니라, 증폭되는 부위의 특성을 파악하여 품종간의 차이를 보이는 유전자의 구조를 연구하는 데에도 유용하게 사용될 수 있다(Williams 등, 1993). Baily와 Lear(1994)는 RAPD기법을 동원하여 아랍종을 다른 종과 구별 할 수 있는 밴드를 성공적으로 관찰하였다. 또한 분리된 품종특이 표지인자는 염기서열 결정을 통해 database상의 염기서열과 비교하여 좌위의 중요성을 판단할 수 있고, 안정적인 품종 특이 표지인자를 얻기위해 PCR증폭 실험에 있어서 재현성이 높은 primer도 개발할 수 있다.

친자감별에 있어서는 microsatellite와 minisatellite를 동시에 사용할 수 있으나 국제적인 유전자지도 작성시 표준적으로 이용되고 있는 microsatellite를 이용하면 손쉽게 증폭 primer를 확보할 수 있을 뿐 아니라, 다양한 유전자형을 관찰 할 수 있으므로 개체의 독특한 유전적 특성을 점검할 수 있으므로 개체 식별을 통한 혈통등록을 위한 표지인자로도 유용하게 사용할 수 있다. Microsatellite는 말의 유전자지도 작성을 위해 개발되었으며 개체간의 큰 유전적 차이를 나타내므로 개체확인과 친자감별을 위해 이용되고 있다(Ellegren 등, 1992; Marklund 등, 1994; Binns 등, 1995).

그러나 제주마에 대한 유전적 연구는 Hayashida 등(1968)에 의해 일본 재래마와 비교를 위해 사용된 경우가 보고되었으며, 제주마 경주가 시작된 이후 제주대학교 오 등(1992, 1995)에 의해 혈액형 단백질의 유전다형을 이용한 연구가 보고되긴 하였으나 이용방법의 한계에 의해 제주마 특이적인 유전적 특성을 발견하는데에는 실패하였다. 그러나 서울대학교의 조 등(1997)과 조와 한(1994), 그리고 황 등(1997)은 국내 고유 축종인 한우와 재래 오골계, 재래닭 등에 대해 유전자 지문과 RAPD기법을 적용하여 재래종 특이적인 표지인자 개발을 보고하였다. 그러나 제주마에 대한 DNA수준의 연구는 전무한 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 : 제주마의 유전특성구명 및 유전표지인자 개발

1. 추진 방법

1). 마품종의 확보

품종내 개체간 변이를 최소화하기 위해서 한국마사회 제주사업본부에서 혈통등록이 되어 품종이 정확한 더러브랫종(100두), 제주 축산진흥원이 보유한 천년기념물 347호(67두)와 2000년 생산된 자마65두를 포함한 132두와 한국마사회 제주경마장에서 실제 경주마도 이용되는 제주경주마 50두 확보 하여 분석에 이용하였다.

2). Random primer는 확보

사용된 Random primer는 UBC (university of Brigishc columbia, Canada)에서 판매되는 G+C 함량이 50~90%인 10bp의 random primer 780 와 operon primer 1200를 사용하였다. 총 1980개의 Random primer를 사용하였다.

3). RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 분석

PCR 수행은 Williams 등(1990)의 수행방법을 변경 수행하였으며 Random primer 1600개에 대하여 각 품종의 30씩 DNA를 같은 양으로 섞은 다음, 각각 임의의 primer에 대하여 다음과 같은 조건으로 PCR machine (PTC 200,100)을 이용하여 수행하였다. 품종 특이성을 보이는 Primer에 대하여는 개체별로 같은 조건으로 수행하였다. 총 25 μ l의 반응액에 Genomic DNA(50ng/ μ l), 10 \times reaction buffer(50mM KCl, 10M

Tris-cl, 1.5mM MgCl₂), dNTP mixture(200μ M) 1unit의 Tag DNA polymerase를 첨가하여 수행하였다. PCR조건은 94. C, 40. C 그리고 72. C에서 각각 30초, 1분, 2분씩 50회로 프로그램하여 실시 하였으며 PCR의 증폭 산물은 1.2% agarose에서 전기영동하여 확인하였다.

4). 품종특이 RAPD 밴드 클로닝 및 염기서열 결정

각각의 품종에 대하여 품종 특이성을 보이는 RAPD 밴드는 TA Cloning Kit을 이용하여 Ligation 시킨 다음 E. Coli (DH5α, JM109)에 transformation 시켜 클로닝 하였다. Cloning한 RAPD marker는 perkin Elmer dye terminator Sequencing kit (PE Applied Bio systems)을 이용하여 forward/reverse의 양방향으로 PCR machine (PTC200)에서 반응시킨 다음 perkin Elmer automatic sequence (ABI 377)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 마(Horse) 특이 RAPD 다형성 분석

마(Horse) 품종간 유전적 특이성 및 품종특이 DNA 표지인자를 찾아 품종간의 유전적 특성을 차별화하여 제주마의 마품종으로서의 고유한 유전적특성을 확립하여 귀중한 제주마 (Jeju Native Horse) 유전자원으로 보존 및 산업적 활용성을 증대하고 특히 혈통등록을 통한 제주마의 타품종과의 교잡화방지 및 순수혈통을 보존하기 위하여 RAPD 다형성 분석 및 Microsatellite 유전자 분석을 수행하였다.

RAPD - PCR 기법을 바탕으로하는 RAPD 기법은 유전체내의 어떤 부위라도 품종간의 차이를 보이는 밴드를 찾아낼 수 있을 뿐 아니라, 증폭되는 부위의 특성을 파악하여 품종간의 차이를 보이는 유전자의 구조를 연구하는 데에도 유용하게 사용될 수 있다(Williams 등, 1993). Baily와 Lear(1994)는 RAPD기법을 동원하여 아랍종을 다른 종과 구별 할 수 있는 밴드를 성공적으로 관찰하였다. 또한 분리된 품종특이 표지인자는 염기서열 결정을 통해 database상의 염기서열과 비교하여 좌위의 중요성을 판단할 수 있고, 안정적인 품종 특이 표지인자를 얻기위해 PCR증폭 실험에 있어서 재현성이 높은 primer도 개발할 수 있다.

본 연구에서는 먼저 RAPD 다형성 분석을 위하여 품종내 개체간 혈연관계가 없는 즉 각 품종별 genomic DNA를 Tho(더러브렛) 25두, JNH(제주마) 25두를 같은 양으로 각각 Pooling하여 UBC780개 primer (University of British Columbia, Canada) 와 Operon, 1200개의 primer 총 1980개의 random primer 각각에 대하여 PCR를 수행한 결과 총 1980의 primer중에서 1,539개의 primer에서 증폭이 확인되었으며, 증폭된 RAPD밴드들은 매우 뚜렷하고 품종간 유전적 차이를 조사할 수 있도록 증폭상태가 매우 양호하게 나타내었다.(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7)

하지만 UBC 780의 primer중에서 558 primer가 증폭되었고, 222 primer는 재수행결과 증폭이 되지 않았다, 반면 operon primer 1200개중 증폭된 primer수는 981개의 primer에서 증폭이 관찰 되어 UBC primer보다는 마품종에서는 operon primer들이 증폭이 잘 되는 것으로 나타났으며, 증폭된 1,539개의 primer중에는 다형이 없는 즉 품종간 차이가 없는 단일 dimer

primer들이 대부분 이었다. 따라서 15,39개의 primer중에서 1차적으로 574개의 primer를 마 품종간 유전적특성 및 품종특이 RAPD DNA marker 개발을 위해 선발 했으며,(Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10) 이들 primer들은 품종별 개체 확대를 실시하여 품종간의 뚜렷한 차이를 나타내는 primer들을 선정하여 각품종의 마 품종 특이 DNA marker를 위해 유용하게 이용 될 것이다.

마품종간 유전적특성 및 품종특이 RAPD DNA marker 개발을 위해 574개의 primer에 의하여 증폭 확인된 총 밴드수는 7,857개의 RAPD 밴드가 확인 되었는데 이는 primer 1개당 최소 3개에서 최대 14개 RAPD 밴드를 생성하였는데 primer당 평균 5.1개로 RAPD primer에 의해 생성된 밴드들은 품종간 유전적특성 분석이나 품종특이 DNA marker를 개발하는데 유용한 것으로 확인되었으며 다형성이 있는 대표적인 primer를 선별하여 Table 1, Table2에 나타내었다. 증폭된 밴드형태가 매우 clear 하고 증폭된 RAPD단편의 크기는 150bp에서 최대 2700bp를 나타내었다

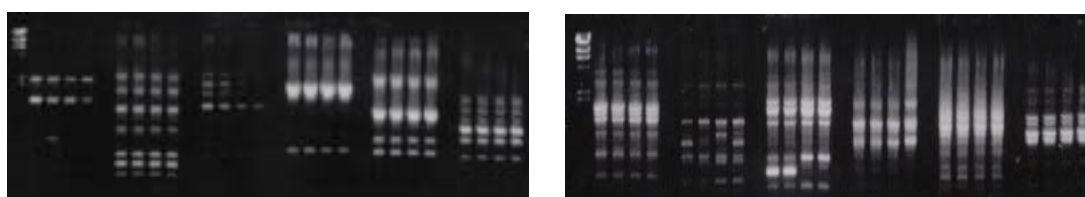


Fig. 1. Polymorphic RAPD profiles obtained with (A) MG146 (B) MG162 (C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).

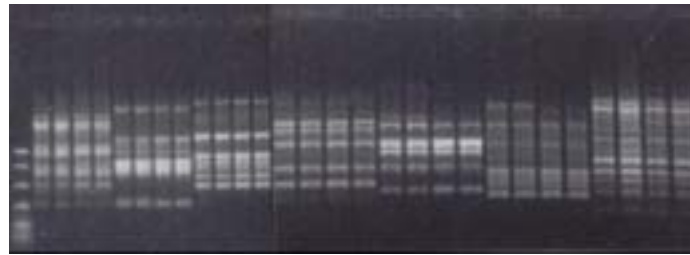


Fig. 2. Polymorphic RAPD profiles obtained with 6303-11, 6303-12, 6303-13, 6303-21, 6303-22, 6303-23, 6303-24 (C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).

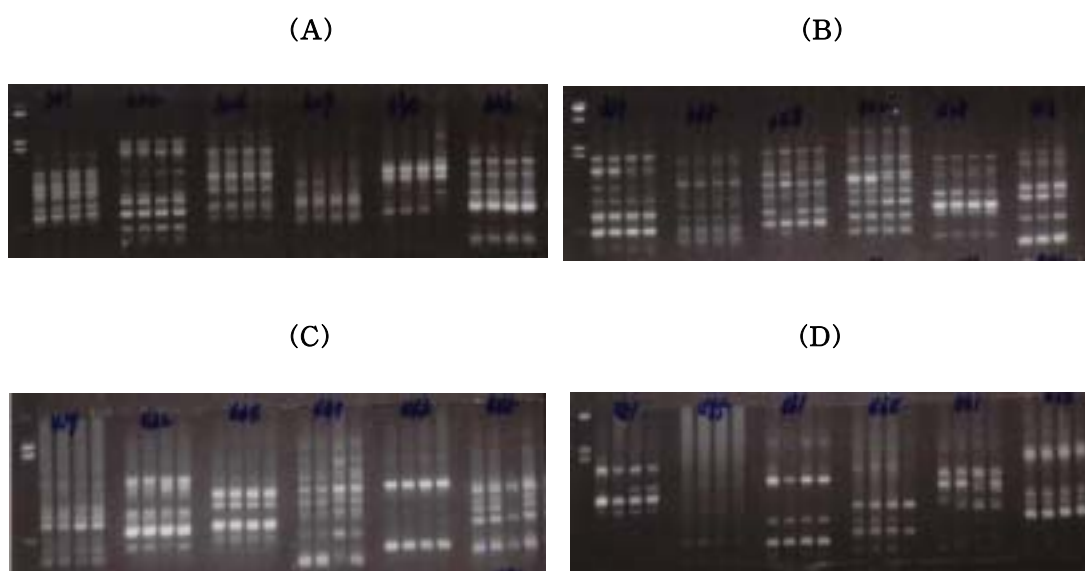


Fig. 3. Polymorphic RAPD profiles obtained with (A)MG301, MG322, MG324, MG329, MG330, MG336 (B). MG337, MG345, MG348, MG402, MG408, MG416 (C) MG419, MG332, MG334, MG339, MG343, MG 445, (D) MG451, MG455, MG461, MG464, MG471, MG478 (C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

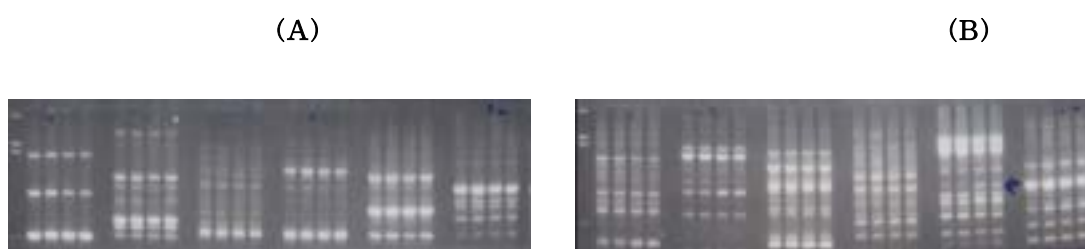


Fig. 4. Polymorphic RAPD profiles obtained with (A) MG259, MG263, MG265, MG267, MG271, MG282 (B) MG283, MG286, MG316, MG318, MG322, MG342 (C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.



Fig. 5. Polymorphic RAPD profiles obtained with MG445, MG436, MG437, MG438, MG439, MG44, MG336 (C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).



Fig. 6. Polymorphic RAPD profiles obtained with MG429, MG430, MG331, MG432, MG433, MG434 (C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).



Fig. 7. Polymorphic RAPD profiles obtained with MG30, MG31, MG32, MG33
(C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

Table 1 Number of RAPD bands per primer in different breeds

breeds prprimer	Cheju-horse	Thorough
MG0003	3 ~ 4(3.5)	2 ~ 3 (2.5)
MG0030	6 ~ 7(6.5)	4 ~ 5 (4.5)
MG0065	5 ~ 6(5.5)	4 ~ 5 (4.5)
MG0079	4 ~ 5(4.5)	3 ~ 4 (3.5)
MG0081	3.0 (3)	2.0 (2)
MG0083	5 ~ 6(5.5)	3 ~ 4 (3.5)
MG0055	4.0 (4)	3.0 (3)
MG0101	2.0 (2)	2 ~ 4 (3.0)
MG0116	0 ~ 7 (6.5)	4 ~ 5 (4.5)
MG0126	5.0 (5)	4.0 (4)
MG0146	3.0 (3)	2.0 (2)
MG0152	4 ~ 5 (4.5)	3 ~ 4 (3.5)
MG0162	3 ~ 4 (3.5)	5 ~ 6 (6.5)
MG0176	6 ~ 7 (6.5)	3 ~ 4 (3.5)
MG0189	3 ~ 4 (3.5)	2 ~ 3 (2.5)
MG0209	5 ~ 6 (5.5)	3 ~ 5 (4.0)
MG0211	4 ~ 5 (4.5)	3 ~ 5 (4.0)
MG0228	6.0 (6.0)	4 ~ 5 (4.5)
MG0230	4.0 (4)	3 ~ 6 (4.5)
MG0232	3 ~ 4 (3.5)	4 ~ 5 (4.5)
MG0244	3 ~ 5 (4.0)	2.0 (2)
MG0273	3.0 (3)	3 ~ 5 (4.0)
MG0308	2 ~ 3 (2.5)	3 ~ 5 (4.0)
MG0419	3 ~ 6 (4.5)	3.0 (3)
MG0434	4.0 (4)	4 ~ 5 (4.5)
MG0593	6 ~ 8 (7.5)	4 ~ 5 (4.5)
MG0634	5 ~ 6 (5.5)	4 ~ 5 (4.5)
MG0648	7 ~ 8 (7.5)	4 ~ 5 (4.5)

Table 2 Number of RAPD bands per primer in different breeds

breeds primer	Cheju-horse	Thoroughbred
MG5177	5~8 (6.5)	3~5 (4.0)
MG5171	2~4 (3.0)	3~4 (3.5)
MG5086	4~6 (5.0)	3.0 (3)
MG5153	3~4 (3.5)	4~5 (4.5)
MG5043	3~7 (5.0)	3~6 (4.5)
MG5154	4~6 (5.0)	4~5 (4.5)
MG5101	7~10 (8.5)	6~9 (7.5)
MG5155	2~6 (4.0)	4~5 (4.5)
MG5139	7~9 (8.0)	6~8 (7.0)
MG5190	4~5 (4.5)	3.0 (3.0)
MG5191	4.0 (4)	5.0 (5)
MG3005	6~7 (6.5)	4~5 (4.5)
MG3018	6~8 (7.0)	7~8 (7.5)
MG3087	6~7 (6.5)	5~6 (5.5)
MG3082	4~0 (4)	3~0 (3)
MG3115	3~0 (3)	3~4 (3.5)
MG3122	4~0 (4)	4~5 (4.5)
MG3124	4~5 (4.5)	4.0 (4)
MG3118	2.0 (2)	1.0 (1)
MG3141	6~8 (7.0)	5~8 (6.5)
MG3195	2.0 (2)	1.0 (1)

2) Pooling된 DNA수준 에서의 마 품종특이의 RAPD 밴드의 분석

본 연구에서는 먼저 RAPD 다형성 분석을 위하여 품종내 개체간 혈연관계가 없는 즉 각 품종별 25두씩을같은 양으로 각각 혼합하여 총 1980개의 random primer 각각에 대하여 PCR를 수행한 결과 1,539개의 primer에서 증폭이 확인되었으며, 증폭된 RAPD밴드들은 매우 뚜렷하고 품종간 유전적 차이를 조사할 수 있도록 증폭상태가 매우 양호하게 나타내었다. 증폭된 1,539개의 primer중에는 다형이 없는 즉 품종간 차이가 없는 단일 primer나 dimer primer들을 대부분 제외 시키고 574개의 primer중에서 품종간 뚜렷한 차이를 나타내는 primer 사진(Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10)처럼 Pooling된 DNA수준 에서의 마 품종특이의 RAPD 밴드의 분석에 사용할 2차적인 primer screeing을 실시한 결과 Pooling된 DNA수준 에서의 JNH(제주마) 특이 primer는 157개, Tho(더러브렛) 특이 RAPD primer는 290개로 총 447개가 품종 특이 RAPD primer로 조사되어 개체별 확대를 통한 품종 특이 RAPD DNA marker개발에 이용하였다.

3) 마 품종특이의 RAPD 밴드의 분석

Genomic DNA를 Pooling하여 확보된 447개의 품종간 차이를 나타내는 primer를 대상으로 개체수를 품종당 5두, 10두, 15두 및 50두씩점차적으로 개체수를 확대 및 반복적으로 PCR를 수행한 결과 그림과(Fig. 11, Fig. 12, Fig13, Fig.14, Fig.15 Fig.16 Fig.17 Fig.18 Fig.19, Fig.20 , Fig.21, Fig.22) 같이 다양한 결과들을 얻었다. 처음에 기대 했던 결과와는 상이한 결과들이 많이 나타내었다. primer에 따라서 개체수를 확대하여 PCR를 수행한 밴드들의 양상과 Genomic DNA를 Pooling하여 PCR를 수행한 밴드형태들은 동일한 형태를 나타내었지만.(Fig. 11), primer에 따라 또는 품종의 개체에따라 밴드의 출현빈도가 다양하게 나타났다.(Fig.16 Fig.17 Fig.18 Fig.19, Fig.20 , Fig.21, Fig.22) Fig 들은 Genomic DNA를 Pooling하여 PCR를 수행한 결과 품종간 뚜렷한 차이를 나타냈지만 개체확대시에는 품종간 차이를 나타내지 않았다, 이런 primer가 대다수로 pooling한 genomic DNA에 품종 관련 Fragment외에 다른 개체 특이 및 QTL 형질관련 locus일수도 있어 RAPD의 문제점으로 지적된다. Fig. 12, Fig13, Fig 14,(A, B, C,D)은 Genomic DNA를 Pooling한 수준에서는 품종간 차이를 나타냈던 primer들이 개체를 확대하여 PCR를 수행한 결과 동일하게 전 개체에서 특이밴드 출현 빈도 및 밴드 패턴이 동일하게 있다.

Fig14 (A) (B) (C)은 Throughbred종 특이 RAPD Marker를 나타내고 있는데, 더러브렛종 내 개체간 변이가 적게 나타났으며, 전체적으로 볼 때 더러브렛 종 특이 RAPD primer가 많이 관찰 되었다, Fig14(C)는 제주마에서는 breed specific fragment가 밴드형태로 출현하지 않고 no band 형태의 Jeju horse 특이 primer들이 나타나고 있다. Jeju horse Genom 내에는 이와 상보적인 primer sequence가 없던지 전통적인 선발을 통한 체계적인 개량이 이루어 지지않은 것으로 조사되었다.

개체확대를 통한 품종특이 RAPD DNA marker 개발에 선발된 primer들은 최종 22개가 선정되었으며 이 primer들은 한품종 전개체에서 출현하던지 반대품종에서는 전혀 출현하지 않은 primer들로(MG0244, MG0162, MG0003, MG0065, MG0034, MG0055, MG5086, MG5153. MG0085, MG0326, MG6085, MG0446, MG0177, MG0562, MG0171, MG0139, MG0162, MG0443, MG02043, MG0030, MG0126 MG0081)나타내었다..

Fig 15는 JNH종 특이 RAPD 밴드를 나타내고 있는데 이는 Tho종 모든개체에서는MG0562

1100 단편이 하나도 출현하지 않는 반면, JNH에서는 MG5621100이 18개체중 50%인 8개체에서 출현하고 있어 출현하지 않는 개체들이 Jeju Horse 가 아니더라도 단정 하기는 어렵다. 이런류의 primer들이 상당부분을 차지하고 있어, 집단의 순수성이 문제인지 기술상이 문제인지는 좀더 다양한 방법으로 접근할 필요가 있다. 또다른 RAPD의 양상은 Fig. 16, Fig. 17 처럼 primer MG02441200에 의하여 품종당 15두에 PCR를 수행한 결과로서 Tho종의 특이 RAPD fragment를 나타내고있는데 이는 Tho종 모든개체에서는Tho종 특이 fragment인 MG0244-1200 밴드가 출현하는 반면,JNH 에서는 Tho종 특이 fragment인 MG0244-1200가 전개체에서 출현하지 않고 있어

이런 경우 밴드가 출현하지 않으면서 제주마 특이 RAPD DNA marker라 해야 하는지는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. Fig13은 또 다른 RAPD 밴드의 양상인데 데 이는 JNH horse중 모든개체에서는JNH종 특이 fragment인 MG0162-1300가타난 반면, Tho종 특이 fragment인 MG162-1100가 전개체에서 출현하고 있어 한 primer에서 동시에 두품종 특이 fragment가 나타나는 경우로서 매우 중 구분 및 유전적 특성 연구에 매우 유용한 primer로 판단되어 품종특이 primer 로 선별하여 cloming 과 염기서열 분석에 이용하였다.

Fig14 (A) (B) (C)은 Tho종 특이 RAPD Marker를 나타내고 있는데, 더러브랫종내 개체간 변이가 적게 나타났으며, 전체적으로 볼 때 더러브랫특이 RAPD 밴드가 많이 관찰 되었다, Fig13(C)는 Fig.14에서처럼 breed specific fragment가 출현을 하지않는 no band 형태의 JNH 특이 primer들이 나타나고 있다. JNH Genom내에는 이와 상보적인 primer sequence가 없던지 전통적인 선발을 통한 체계적인 개량이 이루어 지지않은 것으로 사료됨. Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21은 Tho종 및 Jeju종 특이 RAPD Marker들이 전개체에 출하지 않고 60% - 85 % 범위내에 출현하는 현상으로서 대부분 pooling DNA수준에서 나타났던 품종 특이 RAPD 밴드들이 위와(Fig. 19, Fig. 20, Fig. 2)같은 이런 형태의 primer별 특이 밴드 출현율이 다양하게 나타내고 있어 품종내 및 품종간 유전적 변이성을 연구하는데는 유용하나 품종특이 RAPD marker를 찾는데는 별로 유용하지 않는 것으로 사료됨.

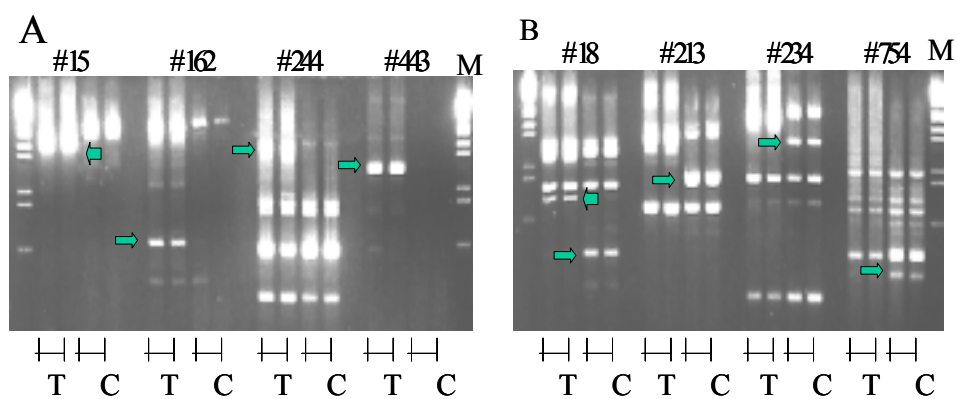


Fig. 8. RAPD assay of horse breed-specific band using pooled genomic DNA
A) Random primer MG15, MG162, MG244 and MG443 showed the Thoroughbred-specific RAPD band patterns 1600bp, 550bp, 1700bp and 1100bp, respectively.
B) Cheju-native horse specific RAPD fingerprint showed in the random primer MG 18 400bp, MG213 850bp, MG234 1300bp and MG754 350bp, respectively.
T : Thoroughbred, C : Cheju-native horse, M : Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

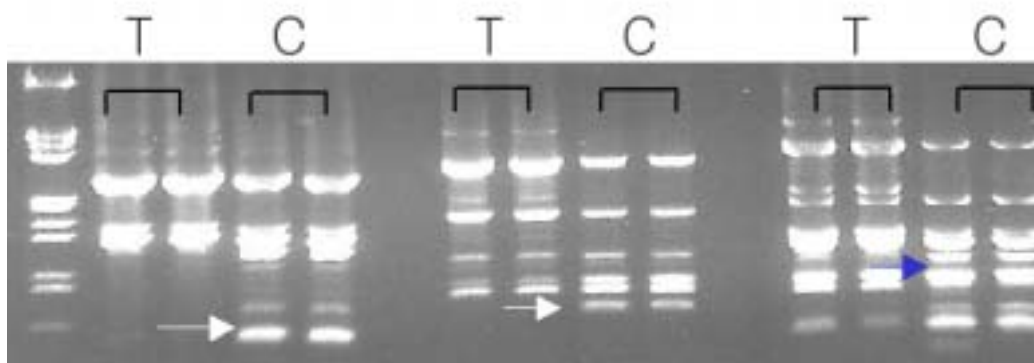


Fig 9. RAPD assay of horse-specific band using pooled genomic DNA
T : Thoroughbred, C : Cheju-horse

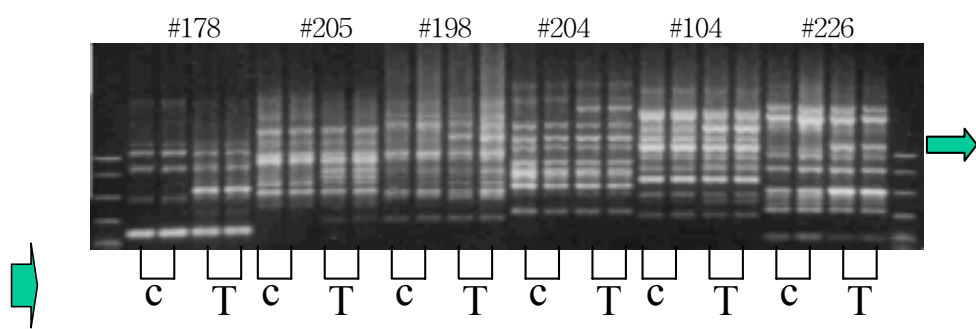


그림 17

Fig10. RAPD assay of horse-specific band using pooled genomic DNA
T : Thoroughbred, C : Cheju-horse

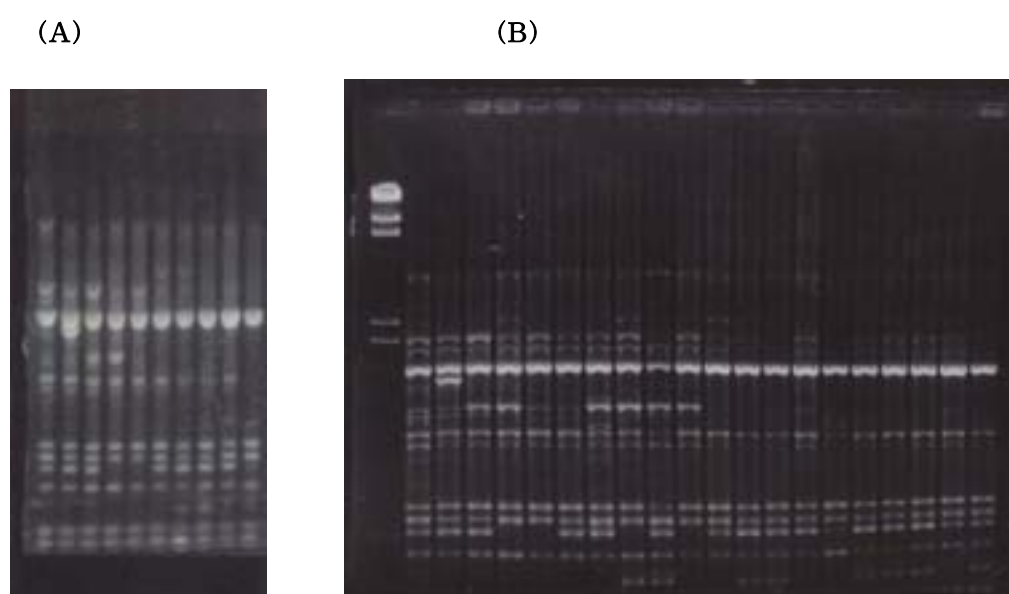


Fig. 11. Polymorphic RAPD profiles obtained with MG85 (C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).

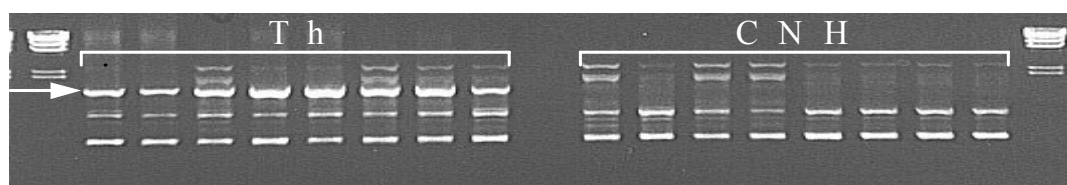


Fig. 12. RAPD analysis of Thoroughbred specific fragment by primer MG244, Th : Thoroughbred, CNH: Cheju- horse

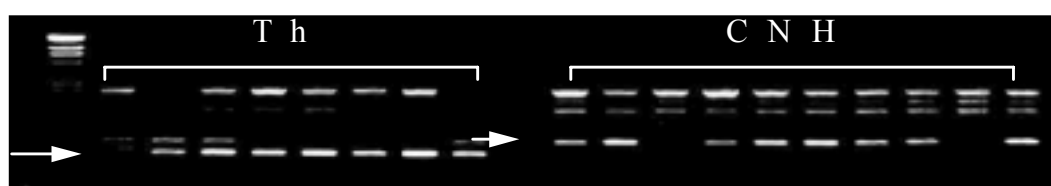


Fig 13. RAPD analysis of Thoroughbred and Cheju-horse specific fragment by primer MG162

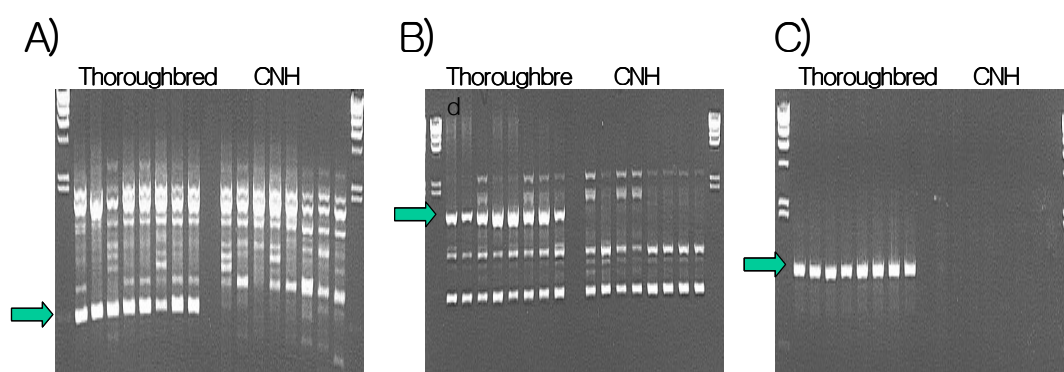


Fig. 14. RAPD analysis of Thoroughbred specific fragment by primer MG326(A), 244(B) and 443(C) M : λ / *Hind* III

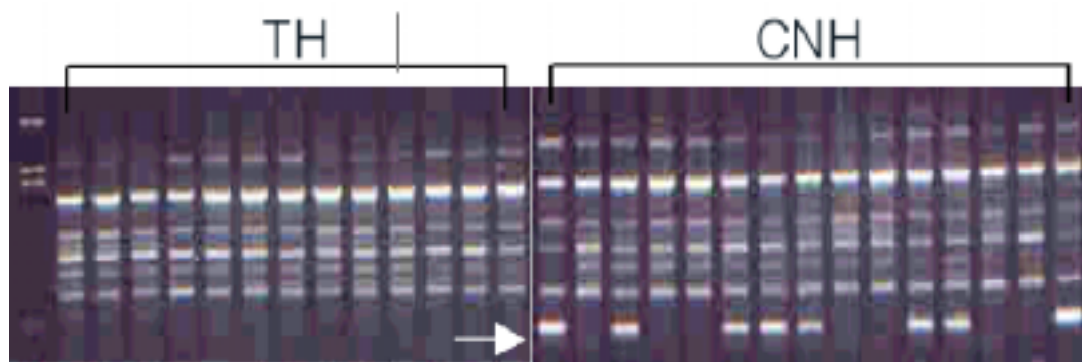


Fig. 15. RAPD analysis of Thoroughbred specific fragment by primer MG 562, Th : Thoroughbred, CNH: Cheju- horse

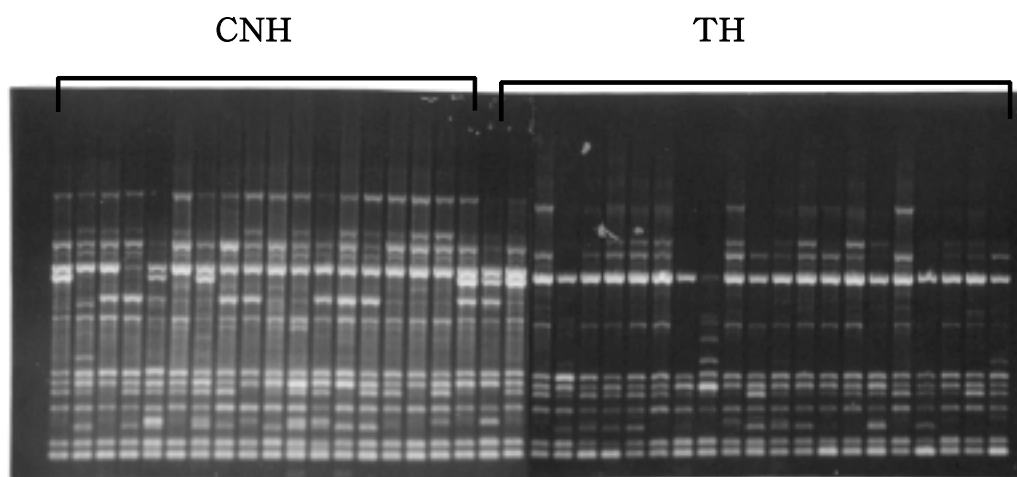


Fig 16. DNA amplification profiles generated with random primers MG 6085, on two breeds of horse (C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).

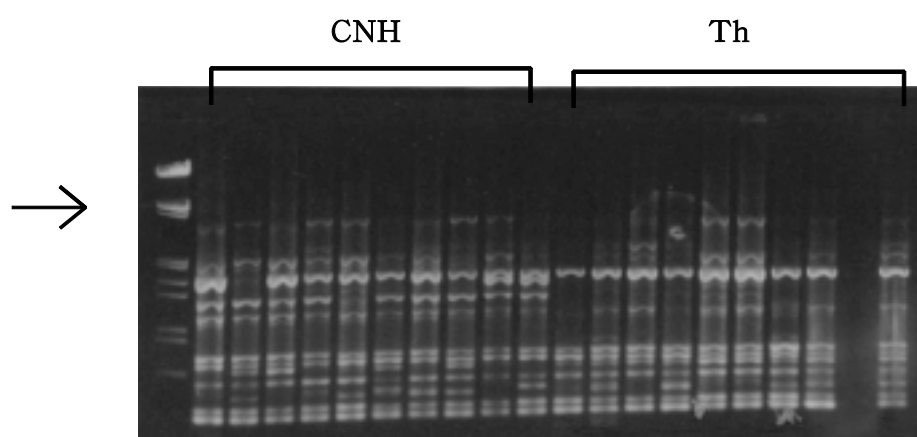


Fig. 17. Polymorphic RAPD profiles obtained with MG085(C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

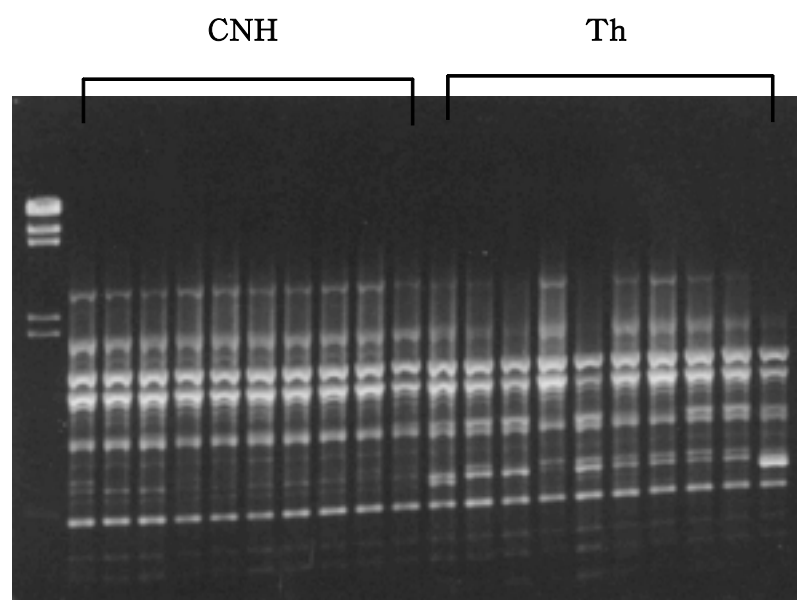


Fig. 18. Polymorphic RAPD profiles obtained with MG009(C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

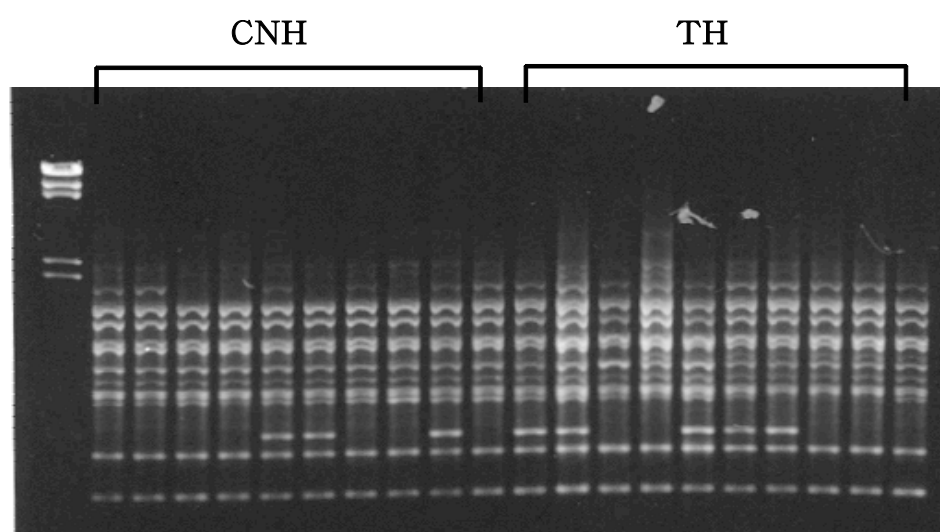


Fig. 19. DNA amplification profiles generated with random primers MG 6142, on two breeds of horse(C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III

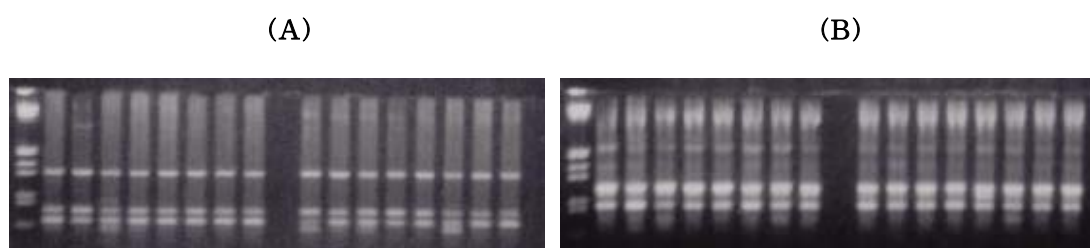


Fig. 20. Polymorphic RAPD profiles obtained with (A)MG119, (B)MG126
(C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

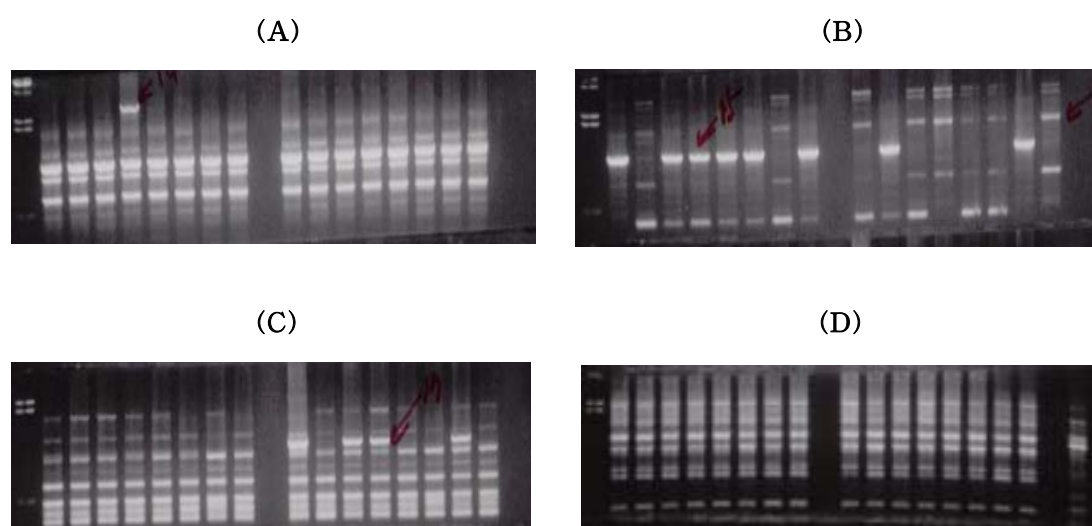


Fig. 21. Polymorphic RAPD profiles obtained with (A)MG434, (B)MG443, (C)MG549, (D)MG731 (C: Cheju Native Horse, T: Throughbreed, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III).

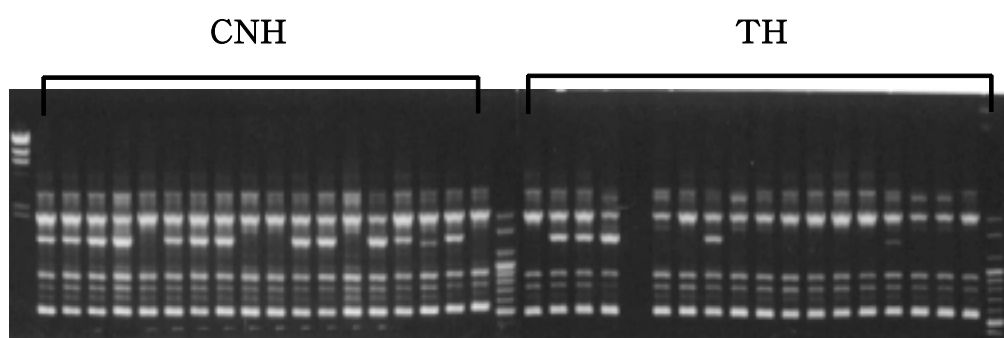


Fig 22. DNA amplification profiles generated with random primers MG 6062, on two breeds of horse(C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

4) 품종특이 밴드 클로닝, 염기서열 결정 및 SCAR Primer 설정

RAPD 분석법의 재현성이 부족하다는 단점을 극복하고자 품종 특이 및 다형성을 보이는 RAPD fragments의 cloning 및 sequencing을 수행하고, RAPD fragments의 sequence에 근거하여 새로운 primer를 합성하여 더욱 안정적이고 정확한 결과로 품종식별을 위한 DNA marker를 개발하고자 하였다. 이러한 PCR 방법을 SCAR-PCR이라 하는데 RAPD 분석방법보다 신속정확하고 단순한 유전분석법으로 이용되어지고 있다. Random primer에 의해 다형화 및 품종특이 RAPD fragment를 gel로부터 elution 하여cloning 과 sequencing을 실시한 후 최초 사용한 RAPD primer base 보다 긴 (14 - 20 mer) c-terminal 과 n-terminal strands-specific oligonucleotide primer pairs를 만들어 특정 품종의 specific band 하나만을 증폭시키는 새로운 SCAR-PCR(sequenced characterized amplified region-PCR) 방법을 (Paran과 Michelmoore, 1993)을 이용하여 마 품종 특이 SCAR-PCR primer를 제작하였다. 개체확대를 실시한 결과 각각의 품종에 대하여 품종 특이성을 보이는 primer는 MG0244, MG0162, MG0003, MG0065, MG0034, MG0055, MG5086, MG5153, MG0085, MG0326, MG6085, MG0446, MG0177, MG0562, MG0171, MG0139, MG0162, MG0443, MG02043, MG0030, MG0126 MG008 로서 22개를 최종 선별하여 특이 밴드들은 TA cloning kit을 이용하여 ligation 시킨 다음 E. coli(JM109 or DH52)에 transformation 시켜 총 22개의 primer 단편을 클로닝 하여 sequencing을 실시 하여 Table. 5 에 나타내었다.

sequence에 근거하여 새로운 primer를 합성하여 최초 사용한 RAPD primer base 보다 긴 14 c-terminal 과 n-terminal strands-specific oligonucleotide primer pairs를 만들어 특정 품종의 specific band 하나만을 증폭시키 결과는 Fig. 29, Fig. 30, Fig. 31에 나타내었다.

이상의 결과에서처럼 품종 SCAR PCR 에 의하여 나타난 밴드들은 단일 밴드로 출현 하였으며, 품종식별을 위해 매우 유용한 DNA marker임이 확인 되었다. SCAR primer 22개를 제작하여 다시 재현성을 확인하였으며, 재현성과정에서 SCAR PCR 반응조건이 primer 마다 반응조건을 다르게 해야하는 어려움이 있었으며(Fig.32), 최종 SCAR primer 10를 제작하여 품종확인에 이용하였다.

Table 3 Evaluation of frequencies and identification of breed specific RAPD Markers

RAPD marker	Thoroughbred (%)	Cheju-horse (%)
MG0126	1.00	0.00
MG0162 ₁₁₀₀	0.00	1.00
MG0264	1.00	0.00
MG0443 ₉₀₀	0.00	1.00
MG0005	0.12	0.91
MG0562 ₅₀₀	1.00	0.00
MG0220	0.80	0.20
MG0244 ₁₄₀₀	1.00	0.00
MG0053 ₁₁₀₀	1.00	0.00
MG0177 _{2000bp}	1.00	0.00
MG0204	0.00	1.00
MG0171	1.00	0.00
MG0177 ₁₈₀₀	0.00	1.00
MG0139	1.00	0.00
MG0085 ₁₀₀₀	1.00	0.00
MG0326 ₈₀₀	1.00	0.00
MG6085 ₁₃₀₀	1.00	0.70
MG0085 ₁₁₀₀	0.00	1.00
MG0009 ₉₀₀	0.00	1.00
MG4043 ₁₁₀₀	0.00	7.00
MG0434 ₁₇₀₀	0.00	0.10
MG0549 ₁₂₀₀	0.00	0.85
MG6062 ₁₃₀₀	0.20	0.80
MG0446 ₈₀₀	1.00	0.00

Table 4 Evaluation of frequencies and identification of breed specific

RAPD Markers

RAPD marker	Thoroughbred (%)	Cheju-horse (%)
MG0244 ₁₂₀₀	1.00	0.00
MG0443	1.00	0.00
MG0562 ₅₀₀	0.00	1.00
MG0162 ₁₀₀₀	1.00	0.00
MG0003	1.00	0.13
MG0030	0.00	1.00
MG0065	1.00	0.13
MG0081	0.00	1.00
MG0146	0.66	0.00
MG0005	0.93	0.00
MG0034	1.00	0.00
MG0055	1.00	0.06
MG0096	0.13	0.93
MG0755	0.00	0.86
MG0220	0.86	0.00
MG0264	0.00	0.86
MG5086	1.00	0.00
MG5213	0.00	0.86
MG5153	1.00	0.00

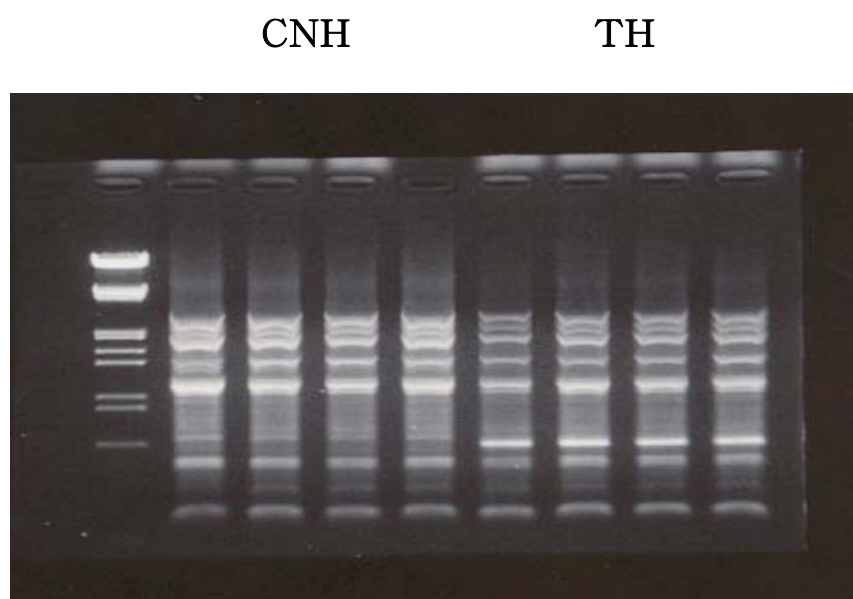


Fig. 23. DNA amplification profiles generated with random primers MG 030 on two breeds of horse(CNH: Cheju Native Horse, Th: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

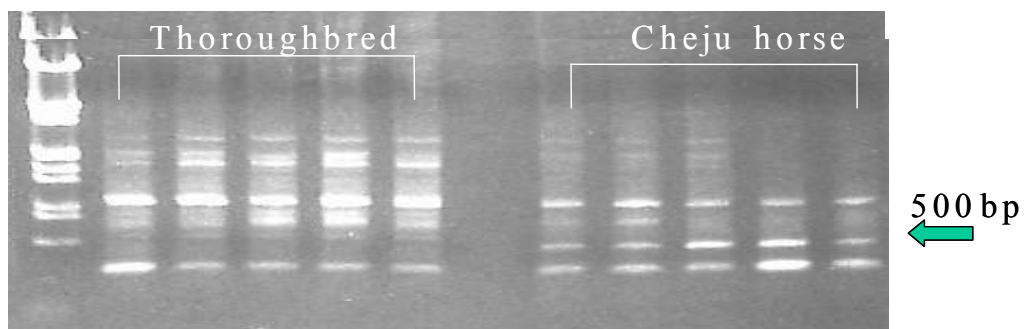


Fig. 24. RAPD analysis of Cheju horse specific fragment by primer MG 562
M : λ / *Hind* III

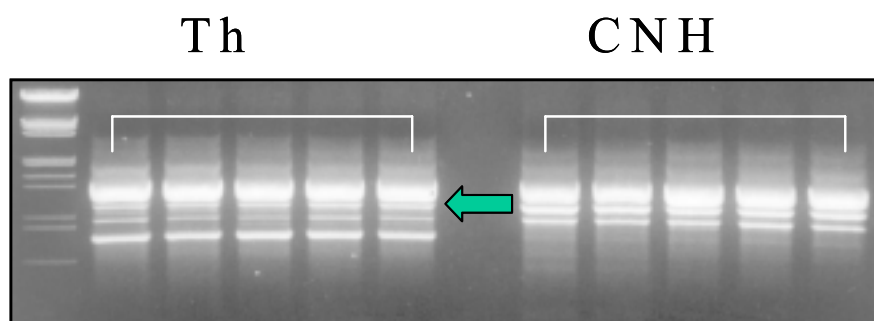


Fig. 25. (A) DNA amplification profiles generated with random primers MG053, on two breeds of horse(CNH: Cheju Native Horse, Th: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

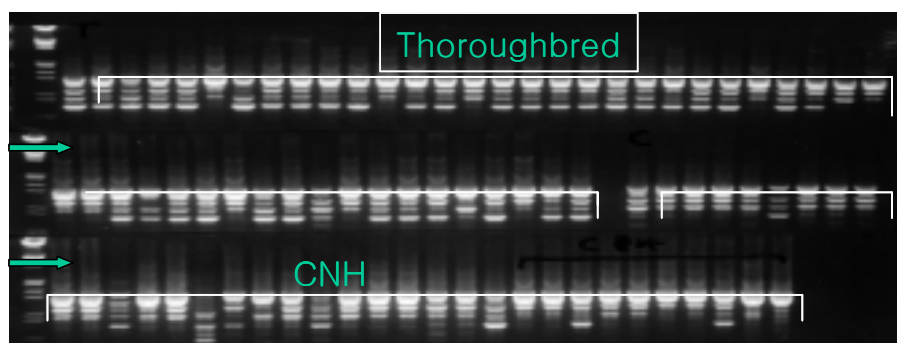


Fig. 26. (A) DNA amplification profiles generated with random primers MG053, on two breeds of horse(CNH: Cheju Native Horse, Th: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

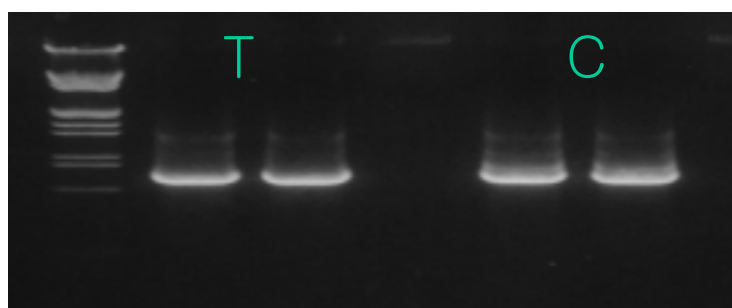


Fig. 27. The second - PCR amplification profiles generated with random primers MG053 on two breeds of horse(C: Cheju Native Horse, T: Thoroughbred, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

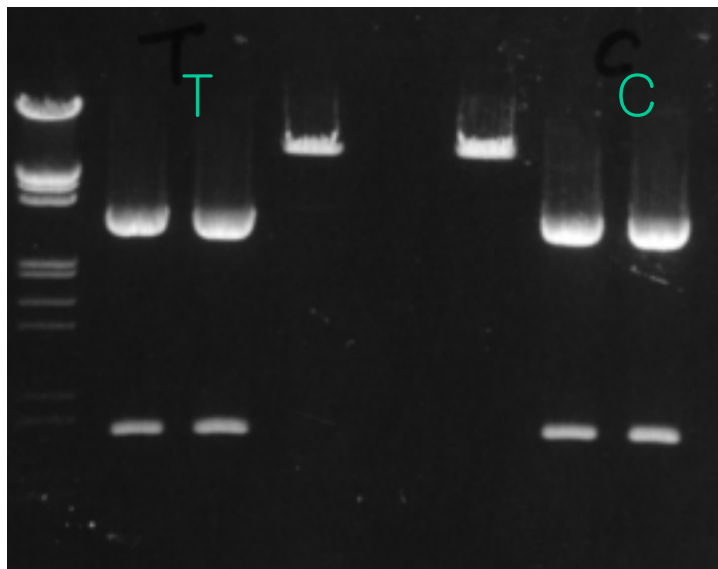


Fig. 28. Electrophoresis of PCR products fragment inserted - plasmid (TA vector) M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

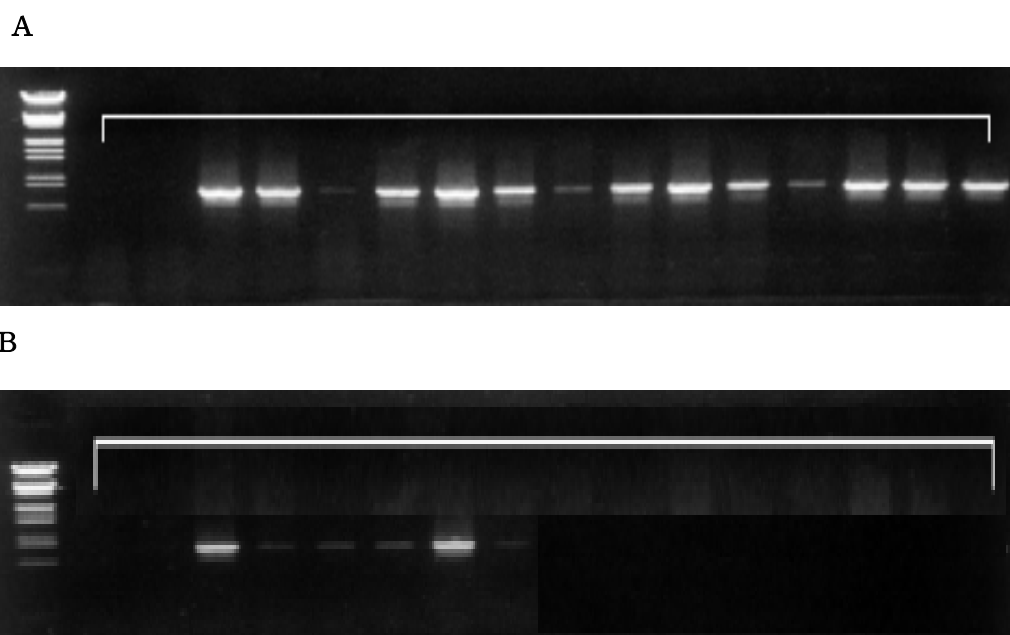


Fig. 29. Electrophoresis of SCAR-PCR products fragment M : Lamda / *EcoRI*+*Hind* III. A : Thoroughbred , B : Cheju Native Horse

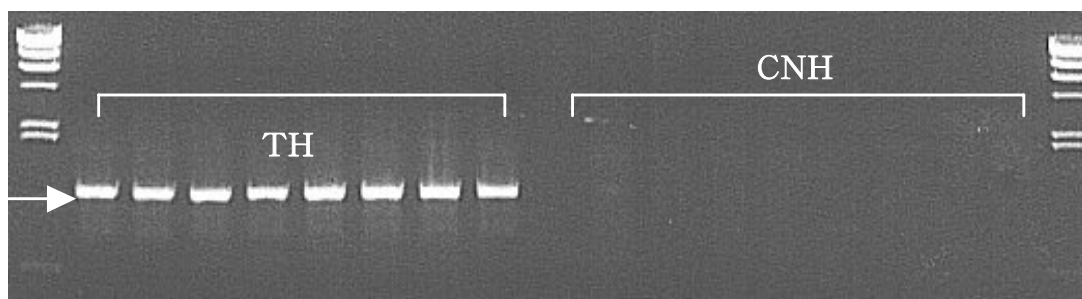


Fig. 30 Electrophoresis of SCAR-PCR products fragement by primer MG 0446, M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III. TH : Thoroughbred , CNH : Cheju Native Horse

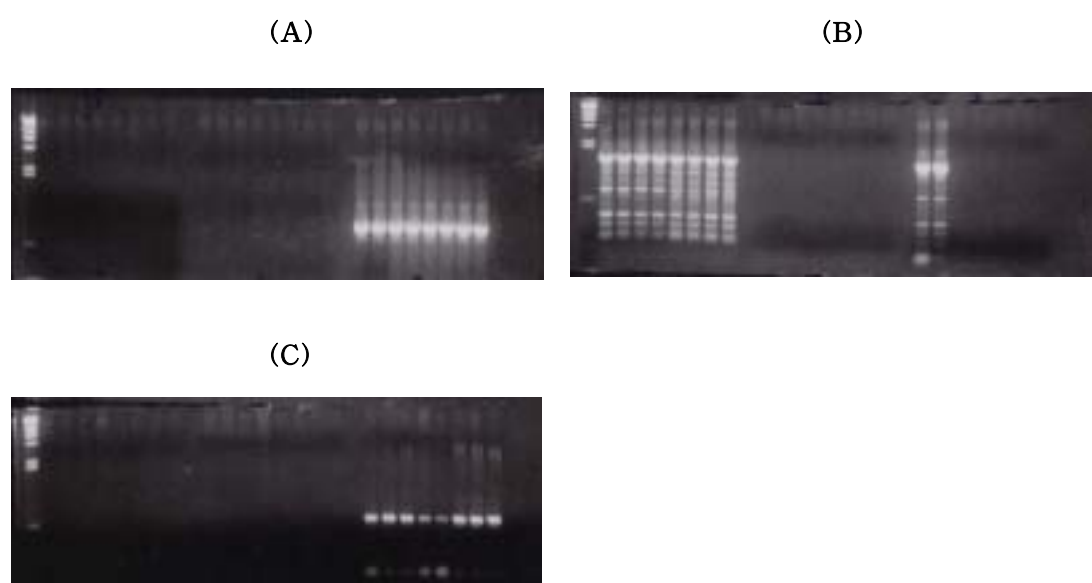


Fig. 31. Electrophoresis of SCAR-PCR products fragment M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III. (A)MG244-1, (B)MG34-3, (C)MG30-1

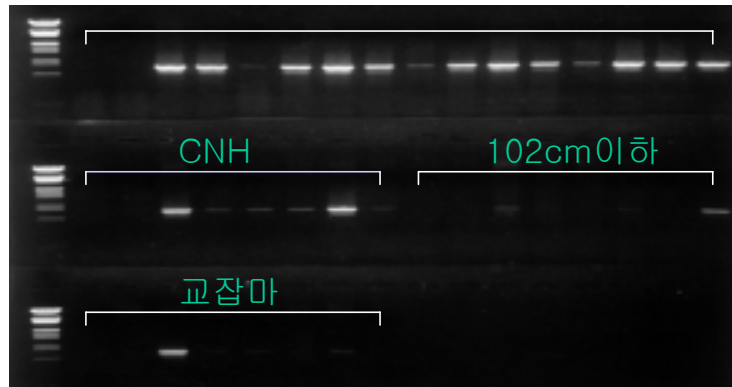


Fig. 32. Electrophoresis of SCAR-PCR products fragment M: Lamda / *EcoRI*+*Hind* III.

Table 5 partial nucleotide sequence of the RAPP-PCR

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
60-4	6304	352	CCATCCGTTGGGAAAAGATGAACATGGAAAGTAGCCAGAG GTCAGATAATATATAAATTTATATGCTGTATAAGCAATA TGGAGTCTATCCTGAAAAGGATGAAGAACCACTAGAAAGG TTTAAGTAGAGGGTAATATGATGAGGTTGCATTTTAAAA AAGAGACCCAAACAAACACTGTCATGGTGGAGGAAGGAAC AACACTTGAGAACCACTGTTGGGGTGGGAATCCATCACAA TAGTCTAAAATCGAGACAATGGACACGGAAGTTAGGAAG AAGGAAAGGAGCAGAGATCTGAAGAGTGAGGGATTGCCTC TGTGGTCAATTCATCACATATGGCGCAACGGATGG
64-7	6304	390	ACTGGCCTGAGGAACAGCTGGCTCTTCTTAGTGAAGACCA CACTGGTCACTGAGAGTTACTCATTATGTCTGAGTTATTA GGTGAGCTCTTGGGAAGAGAGTATACACTGTGGCACCAGT GAGGCCTGAGTTCAAATTCCTTCTCTACCACTCGACAG TCACATGATCATAAGCAAGTTACTTAACTTCCTTCAATCA TGA CT TGGTGACCTGTAAAATGGAGATGACATCTTTCCAG TTTAGAGTGTTGCAGTATGGATTGATAGAGATAATGTGT GTCTAACACCAAACACAGAGTCAGGCCAGT
9-5	6304	416	GAGCCCCGAAGAGCCAAAGTAACCCTGAAAAACAAGAAC AAAGCTGGAGGTATCACCTCTCCGATTTAAAAATATACT ACAAAGCTATAATAGTCAAGACAGCTTGGTACTGGAACAA AAATGGACACACAGATCAATGGAATAGAATCTAGAGCTC AGAAATAAACCCACACATCTATGGACAGCTAATTTATGAC AAAGGAGCCAAGAACATAAAATGGAGAAAGAAAACCTCTT TTTAATAAACGGTGTTGGGAAAACCGGACAGCCACTTTCA AAAGAATGAAAGTAATATCAATGTTTTGATTGCGAGGGT GGACCTAAGGAAACTATTTATGTTTTGTCTCAGGACCAAT GAGATAATAAGGATGGCTTTGCTGCTAAAATACACAGCCT TATAATGGGTTCGGGGCTC

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
9-6	6304	416	GAGCCCCGAAGAGCCAAAGTAATCCTGAAAAACAAGAA CAAAGCTGGAGGTATCACCCCTCTCCGATTTAAAAATATA CTACAAAGCTATAATAGTCAAGACAGCTTGGTACTGGAA CAAAAATGGACACACAGATCAATGGAATAGAATCTAGAG CTCAGAAATAAACCCACACATCTATGGACAGCTAATTTA TGACAAAGGAGCCAAGAACATAAAAATGGAGAAAGAAAAC TCTTTTAAATAAACGGTGTTGGGAAAACCGGACAGCCAC TTTCAAAAGAATGAAAGTAATATCAATGTTTTGATTGCG AGGGTGGACCTAAGGAACTATTTATGTTTTGTCTCAGG ACCAATGAGATAATAAGGATGGCTTTGCTGCTAAAATAC ACAGCCTTATAATGGGTTCGGGCTC
9-7	6304	416	GAGCCCCGAACCCATTATAAGGCTGTGTATTTTAGCAGCA AAGCCATCCTTATTATCTCATTGGTCCTGAGACAAAACA TAAATAGTTTCCTTAGGTCCACCCTCGCAATCAAAACATT GATATTACTTTCATTCTTTTGCAAGTGGCTGTCCGGTTT TCCCAACACCGTTTATTAAAAAGAGTTTTCTTCTCCAT TTTATGTTCTTGGCTCCTTTGTCATAAATTAGCTGTCCA TAGATGTGTGGGTTTATTTCTGAGCTCTAGATTCTATTC CATTGATCTGTGTGTCCATTTTTGTTCCAGTACCAAGCTG TCTTGACTATTATAGCTTTGTAGTATATTTTTAAATCGG AGAGGGTGATACCTCCAGCTTTGTTCTTGTTTTTTCAGG ATTACTTTGGCTCTTCGGGGCTC
14-1-1	6304	192	ACTCCTGCGAGACAAGGCGGGTGTGGAGTAAGTGCTTGTT GCTGAATGCTGGTGATGGGGTTCTGGTTCACGTCGGTCC TAGCGACAGTGGCGATGCTGGCTCTGAGGAGGTGATGGCG GTTATGGTGAGGTGCTAATGGTGGAGGCGATGCTGGTGAC CTGAAGGCACAGTAATGGTGGTCGCAGGAGT
14-4-2	6304	179	ACTCCTGCGACACCAAGGCTGACTGGCACGGTACTAAGAG GCAGGTCACTAAAGGCTGTATACAGGATGACTCCATGTA TGTAACGTTTATAAACAGGAGAAGCTAAACTATAAGAGG TTGTAAATCTACAGCAAAAAGCAAGGAGCTAATGATCGC AGGAGCTAATGATCGCAGGAGT

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
36-2	6304	418	GTCGGTTGTCATGGCCTTTGCTGTGCTTTTATCGTAATGT CAAGGTGGAAAATCACAGACATATTCAAAGGTCGGACGAT GTAGGGAGCCCGGATGGGCAGTGGGCCCTGAGGGCCGTCCC ACACCCTGTAGCTTTTCATTTCCTGTGGATTTTCATTAGGCA ACGTTGCTCCTTAATGTCTTTAGTGAGATAGAATTCACAT ACCATAAAACTGCATTTAAAGCAAGCTTGTCCACACGCGG CTCAGGATGGCTTTGAATGAGACCCAACACAAATTCATAA ACTTTCTTAAAACATTATGAGTTTTTTTTTTTTTAGCTCAT CAGCTGTCACTAGTGTTAGTATATTTTATGTGTGGCCCCAA GACAATTTTTCTTCTTCCATTGTGGCCACGGAAGCCACA AGATTGGACAACCGAC
5-1	6304	713	CCCAGCTAGAACACAGGACTGAATTTAAGACCGAAAGCAG ACCTGCTAACTGCTCACTCATTGCCAAGTGTGAAAAAC AAACATATTAACACAGCTTTGGACTTTTTACAAGGTTTT TGTTTGTGTACCCAGACGGGAATGTACACAGAGATGAGGA GACTATTATTGGGGGAGGGGAGTAAGTCAGTTTGAAAAAC ATCAGACAACATATTGTTTTTCATATTTAATATTTTCTAC CTCTCAGAGCTGCTTAACTTTTACAGAGATTCTCGAATAC TTAATTAGAAAAACTTTTCTAAACGCCCACTGGTCCATCC AGAAGGATGAATAACAAGAATATTTTTTAAGGATGCTGA AATTAAAAAAACAAGAAAACAAAAAACCTTTACTTTCAC AATTCTTGGCTGCTCTGAGAGCCCTTATTGAGCCATTTTA ATTGGGTCACTAATTCAATAGCAGCCAGAAAAAGTAGAA CCTCAAATTACTCATAGAAGAACATGTGATTTCCAACCCA TTATAACTCAACAGAGACCACAAGACTATAGGAATAAAC TCTTAGGAGCTGTGCTAGGCATTTACCAACAGCACAGCCA ATCTTCATGACAACCGTGCAAAGTACACCTCTCAGGCCCA ATTTACCGATGACGGAGAGAGACTCAGGCAAGTTAACCCA GTTCGTGGGATGTCTCAACTAGTACATGTCTAGCTGGG

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
5-2	6304	713	CCCAGCTAGACCTCTGTTACATAAAAGTCAACTGATTGTAG ATATTAATCCCATCTGTGAAATATCTTCACAGCAACATCT AGATCAGTGTTTGGTTGAATAACTGGGTACTGTAGCCTAA CCAAGTTGACACGTAAAACTGACCATCATACCATGCTTCC ACTACTGTGCTCATTCCCTGAACACTCCATTTCTTATCATT CCCATGAAATCTTGGCATATTTCCCTTCCCTTGGTCTGGAG GACTCCTATTCTCCTTCTCAGTCACCTGATTTCCACCTCTA AGAACCTACGCAAATGTTGCTTCTCCCATGGAACCCTCCT TGACTTCCCCAGGGAGAGTTCTTTGCACCTCTTCTGGGCTC ACACAACATTTGCTCATACTCATGTTTTTGGCACATTGCCA CTCTGTCCCATCAGTATTTGCTTCTGTCTCCATTTTCCCCA ACATATTCTGAAGTACTTGAGAACAGGGACTGTATTTTA TTGATCTCTTGGTCTTCAGCACAGTGCCAGGCATGGAAGC GCTATAAATGGAAGCTGTAAATAGGGAGGCTGAGTTAAC TGGAGAGCCTGCAACTTACTAGGGAAGTATGGTTTTTGGTG TTTGGCAAAGCAGACAGGCGGCATGAGCCTAAGCTCATGA GAGCAGCTCTAACTTCCCCTCTAGCTGGㅎ
5-6	6304	713	CCCAGCTAGAACACAGGACTGAATTTAAGACCGAAAGCAG ACCTGCTAACTGCTCACTCATTGCCAACTGTTTGAAAAAC AAACATATTAACACAGCTTTGGACTTTTTTACAAGGTTTT TGTTTGTGTACCCAGACGGGAATGTACACAGAGATGAGGA GACTATTATTGGGGGAGGGGAGTAAGTCAGTTTGAAAAAC ATCAGACAACATATTGTTTTTCATATTTAATATTTTCTAC CTCTCAGAGCTGCTTAACTTTTACAGAGATTCTCGAATAC TTAATTAGAAAAACTTTTCTAAACGCCCACTGGTCCATCC AGAAGGATGAATAACAAGAATATTTTTTTAAGGATGCTGA AATTAAAAAAACAAGAAAACAAAAAACCTTTACTTTCAC AATTCTTGGCTGCTCTGAGAGCCCTTATTGAGCCATTTTA ATTGGGTCACTAATTCAATAGCAGCCTGAAAAAGTAGAAC CTCAAATTACTCATAGAAGAACATGTGATTTCCAACCCAT CATAACTCAACAGAGACCACAAGACTATCGGAATAAACTC TTAGGAGCTGTGCTAGGCATTTACCAACAGCACAGCCAAT CTTTCATGACAACCGTGCAAAGTACACCTCTCAGGCCCAAT TTACCGATGACGGAGAGAGACTCAGGCAAGTTAACCCAGT TCGTGGGATGTCTCAACTAGTACATGTCTAGCTGGG

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
52-7	6304	357	GACGACCGCAGGCACAAAGTTTATATGTGGGAAAGCCAGA ATGCACACTCAAACATTCTGATTCCAGAGTCTGTGATTT TCGTGTGTGTGTGTGAGGAAGATTGGCCCTGAGCTAACAT CTGTGCCAATCTTCCACTATTTTATGTGGGATGCCATCAC AGTGTGGCCTGAGAAATGGTGCTAGGACTGTGCCCAGGAT CTGAACCTGTGAACCAGGGCCATCAAAGTGGAGTACGCAA ACTTAACCACTATGCCACCAGCCGGGCCCCCAGATTCTGT GATTTTTTTAATCACTCTAGACCAGTCATCCTTAAACTTT TTCTGCAAAATGGTCAGATAATAAGGTGTTGCGGTCGTC
22-4S	217	658	CATTCCCTTTCNAATTCCCGCGTNGGGAGCTCTCCCATAT GGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTACA GGTAGACTTAAAGCTGATTCTCTTGAAATGTTGTTTATC TCAACCTAAGGAAGAACAGTGTACAACCATTTCTGGGAT TGAGGTTTTTTTAAAACAACTGACCAAAAATATGCTCAG ACCTTAATTTGAACTCTTCTGGGGAATGTACACATGGAA TTACGTTTGATCAAATTTGGACAACACATTTACTAATCA TTCTGTCTTTCTACTCACTTCTCACTCATGTGCTGATCCT GTTATAAATTTTTTCCCATCCCCAGTCTACCTGTAATCGA ATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCTG GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACT GGCCGCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG GTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGC CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCT TCCCAACAGTTGCCGCAGCCTGAATGGCGAAATGGGACGC CGCCCTGTAGCCGGCGCATTAAACCGCGGCGGGTGTGTGG GNGGTTACCNCCNCCACT

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
19-2T	146	662	TTNTATCTCTTTCCATTTGCACCCGNCGTCGCATGCTCCC GGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATGTGTTGCC TTTAACATGTAATGANTGAAGCTGGGGGACATAATTTTG TCATAAGACAAAAACAACCGATAAAACACAGCACTAAC TGAAAAACATAATAAACACAAATTTTGATTACTAAAGA ATTCACAAAGATGTAGAAGAAAACTTAACCACAGTTAA ACAAAATATACCTCATTTTAAATATGTTTGGCTGTAGGG CCCTCGTCTTTAAAGTCATCTCTAAATCCTAGAAAAGACG CTAAGTATCGAAATTTTTTCTCTTTTGACACATGAAAGG AAAATGGGAGATGTACCACAATCAGCAATGAAGAGTCAC AAACAGACCCAAAGAAATGACAAGCTGGCTTTCCTGTC ATAACTGGAGGGTCATCAACTAGAAAAATACCATGATGA AAGCACCGCAACACATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGC CTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA TGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCT TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGNTTCCTGTGTGAAAT TGGTATCCGGCTCACAATTNCN
16-2S	146	652	TNCNAATCCCTTTCCATTTCCCGCGTGGNGAGCTCTCCCA TATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCCTAGTGAT TATGTGTTGCGGGGCTTTCATCATGGTATTTTTCTAGTT GATGACCTCCAGTTATGACAGTGAAAGCCAGCTTGTCAT TTCTTTGGGTCTGTTTGTGACTCTTCATTGCTGATTGTGG TACATCTCCCATNTCCCTTTCATGTGTCAAAGAGAAAA AATTTGATACTTAGCGTCTTTTCTAGGATTTAGAGATG ACTTTAAAGACGAGGGCCCTACAGCCAATCATATTAAAA ATGAGGTATATTTTGTTTAACTGTGGTTAAGTTTTTCTT CTACATCTTTGTGAATTCTTTAGTAATCAAATTTGTGT TTATTATGTTTTTCAGTTAGTGCTGTGTTTTATCGGTTG TTTTTTGTCTTATGACAAAATTATGTCCCCCAGCTTCAT TCATTACATGTAAACGCAACACATAATCGAATTCCTCGC GCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATT CGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGGCCGTCGT TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTCCGCCTACCCAA CTTAATCGCCTT

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
17-1T	65	752	TNTTTAANCCCTTTGCCATTCCCCGCCCCGNCGTCGCATG CTCCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGGG GCGGGAACCTTGGGAATATGTGGGCCTGTTTGGATGATT CCTGAAGGTGATTATCAGAAACGTCAAGGACGGTAATG TTTTCCGTTGGTTCCTGGGCTTAGCACCGATCAGGTTCT CTTGGTAGTATTCCTCTTCATGTATTTGGAATGGTCTA GCCTTCTGTAGCATCAGTAAGCCTTTTGAGGTGATTTT CCATCCTTGGAAGTTCACCTTCTCTAATCTCTTTCAGCC CCCAGAGCTGTATGCCGTCCTTCTGGACCCCCCTTTTGA TTTTTGATTGTAGGTGAATTTATTGCCGTGACCCTGCA TTACAATATGCTATGTCTTTNAGATTTACAGCCTCATC GATTTANACTTCCGTGTAGGTGACATCGTCTTCACCACC GTAAGCCGAATCACAGGCCGTCACCACACACTTTGCGCC TCATCATCACTTTTACCCTTCCTTCCGGCCCCCTAAATCN ACTAANNGGAAATTCNNCNGGGNCCGCCTTGCCAAGGNT CGNANCCANTANTTNNGGGNAAAAAACCTTTCCCCCAA AACGGCCNTTTTGNGGAAATGCCNNTAAANNCTTTTGG ANGGNAANTTCCAAAANACGGGGGTNACNCTNGGTTNN CNNNTANGGNCTTTGTANCCNNANNANATCCCC
16-7C	65	672	TNNTTNANNCCNTTGGAATCCCCCGCGTTGGGAGCTCTC CCTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTG ATTCGGGGCGGGATTGAGGGTGAAAGTGATGATGAGGC GCAAGTGTGTGGTGACGGCCTGTGATTTCGGCTTACGGTG GTGAAGACGATGTCACCTACACGGAAGTCTAAATCGAT GAGGCTGTAAATCTGAAAGACATAGCATATTGTAATGC AGGGTCACGGCAATAAATTCACCTACAATCAAAAATCC AAAAGGGGGTCCAGAAGGACGGCATAACAGCTCTGGGGGC TGAAAGAGATTAGAGAAGGTGAACTTCCAAGGATGGAA AATCACCTCAAAAGGCTTACTGATGCTACAGAAGGCTA GACCATTCCAAATACATGAAGAGGAATACTACCAAGAG AACCTGATCGGTGCTAAGCCCAGGAACCAACGGAAAACA TTACCGTCCTTGACGTTTCTGATAATCACCTTCAGGAAT CATCCAAACAGGCCACATCTTCCCAAGTTCCC GCCCT AATCGAATTCCCGCGGCCGNCATGGCGGGCCGGGAGCCA TGCGACGTCGGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAT TACAATTCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCCC

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
MG-3C	0053	656	<p>TNTNATCCTTGCATTCCGCGTTGGGAGCTCTCCCTATGNT CGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTTCCCTC GTGCTNTGTGGTGGGAATGTAAAATAGTGCAGCTGCTGT CAGAACAGCTTGGGGGTTTCCTTAAAAAACTAAAATAGGA TTGCCATGTGACCCAGCAATTCCACACCTGGGTATGCGTG CAACAGAATTGAAAGCAAGGTCTTGATCAGATATTTGTA CACGTGTTTCATAGCAGCATTATTCACAACAGCCAAAACT GGAAACAACCCAAGTGCCCATCAACAGATGATGGATAAA CAAAATGTGGTCTACACTCACAATGGAATATTATTCGGG CTTAAAAAGGGAGGAAATTCTGACACCTGCTTCAACATG GATGAACCCTGAGGCCGTTATGCTAAGTGAAATAAGCTA GTCACAGAAGGACAAATCCTGTAGGATTCCACTTATATC TTTTACCTGAACAAGTCAAAATCATAGAGACAGAAAATA CGATAAAGGTTCTTGGGGAGGGGGCGGGAGGAATGTAGAG TTACTGTTAAGTGGAATAGAGTTTCTGTTTGGGATGAC GTGAAAGTTGTGGAGGTGGATGGTGAGGATTGCACAACA GTGTGAATGTACTTAAT</p>
MG-4T	0030	675	<p>GNNNNNNNNNNNAGCTTTGACTNCATGNCCNTTTNCNCCC GNCGTTCGCATGCTCCCGGCCGCGCATGGCGGCCGCGGAATT CGATTCCGGCTTATGAATCATCTTGCTGTACTATATCACC ATCTTTGTCCCACTAAAACCTTCTCACATAAGGCAATTTG TGTCTTTGGTAACATTTGCTAAAGATCTGTGGATGGTAA AAGGAAAGGATTTTACAGAGACATTATAAAGAAAACCTT CGAAGTAAACATTAAACATTTTCTTAAAAAGTCTTCAA TCACAACCCACAGGGGTTTTTCATGACCATGCTAACCTA TAGGTTTTCTTAACCCACACCAACTTCCCCGGCCCTGCT TCCTTCCATCTCTCCTCCTCGCGTCATGCTCTCCAGAATA AAAACAACTCCTCTCTTCATCTCACACAGAACACTTCAG CCTTCTTTCTTGCCTTTGATGTTTCTGGGTTCATGTTTCA GGTGTCTCTCCTTCCATCCGCAAAAGTTCTTAAAGACATC TTCCTGAAGAAAGATTACTCTCTCTAAAAGAATATCTGA TGCCAGGTGTCAAGAGGATACATCTGNTGCTTCTATAGCT ATAAAGGACTCTAATATTCCACATGGACACCAAATATTA TCATCTTAATAAATATTATACCTCACACTTATATNf</p>

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
26-6	549	661	GTTGATTCCATTNGCATCCCCGCGTTGGGAGCTCTCCCTA TGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCC GGCTTATGAGGCAATGGGTTTCGTCTTCCAGGTAAGTGAG ACCTTATGTCTCACAATCAAGTGATAAAAACAAACATGTT CTTATTTTTTAGATGACACACTAAAGATTGGTTTTGTGTAT AACTTTTTTTCATTTGACAATAACTCCATGTGATTTAGAT AAATGAACAGTCCTTGTGTTTTCTCCATCCCTGTGGCAAT TTCTAAGATGAAAATACTAGACAAGCGTGAAAAGAATCT ACAAGGATGGCTGCTTTTGTCCCTTTCCATTCTTAATTTT CAGATTCTAGTTGAAAAATAGACTTTGGATAGGCAATAA ATTATTCTTCTTTTCAAGTATGAGGAACTATTTTTTAAC AACAGAAAGGCTTACAGACATCTGCCTGATTAAAGTTGA TCTTTTAGAACTGATTGGTTGACAAAATAACCAATGACC CAGAGCTACTATGAGTTGTGAGCTTAGTAATACTTTCTG ATAATTTTTTATTTTATCAATTACAGNACTAGATCTATAT ATAAAAAAATAGTACATATGTGTATATGTATGTGTGGTG CATCATATGTATATGAAAAA
25-5T	55	658	GNCNGATCCCTTTGCCAATTNCCGCCCCGACGTTCGCATGCT CCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTTCGATTTCCCTCGT GCTTTACTGACNTNAGGGCGACACAAGTCCTTCCCTGTGTG CTTCCCAGGGCCCAGCCACCGCCCTGCACCTCTTCCCTGGA TTGTCTCATTTTACCCCATGGGCATCGTCTCCATTTTCTG AGCTGGGAAAGGAGTCACAGACAGATTAAGTAACCTTGCC CAGGGTCACACCTGAGCCAGGATCTGCACCTGGGCAGTCT GACATGGAAGACATCCACCCATCTATTTCTTCTTCAAGTT GTGGTAAAATACACATAAAATTCACTGTTTCACAATCTT TAAGTGTATAGTTCACTAGCATTAAGTACATTCACACTG TTGTGCAATCCTCACCATCCACCTCCACAACCTTTCACGTC ATCCCAAACAGAACTCTATTCCCCTTAACAGTAACTCT ACATTCCCTCCCGNCCCCTCCCCAGGAACCTTTNTCGGANCC TCNGCCNCTATGATTTNGNNCNTNCANGTACNTTNTGN NAATGGANANNTAATCNATTACAGCNCTAGATCNATATA TAAAAAATAGTACATATGTGTATATGTATGTNTGNGCAT ACATATGTATATGAAAAA

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
21-3T	162	652	TTNTTTCCATCCATTTGCNCGTCGCATGCTCCCGGCCGCC ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAACTTACCGCTGCCTTA AGAAAGTATTAAAGAAAAGACAGGAAGAAAGAAAAAAA GCAGAAAGTTTACTACTGAGGAAGATAAGAATCATACTA AATATGACAAATTCATCAAATTAGCACTTACAGAAAACA GAAAATTTACAAAATACTACTTTATAGAGTTAAAAAAA AAAAAAAGGACTTGGGACAGCCTACAGACGGAGAGGCG ACTCACCTGTCCGAAGAAGGCCACTCGGAAGTACGTCCCC AAGAGCCTGCGGCCCGAGTGCATGACCTCGGTCACTTTGC TGTAGGCCCGGTGTAGGGTGTTCATAGAGATGAGCCAGCCT CTGAAAACAGAACAAAACCCATTTCTCCCACTTGCAACT AGTAGAATCAATTTCAAATAACAATTAAATGAGATAA TGTAGGTGAAAATTCCTTGGAGTTGAGTTAAAAAAAAGA AAAGATCAAGAATGTATTTTGTCTGTACAACTGGTAGAG ATCACTTCTGAATTGTAATGTTTCCTACCCAAAGGGCCAT CTTGCGTATTGAGGACCTATCAGATTTCCATACTGCGGTA AGTTAATCNTAC
20-3S	162	652	ATCAATCCCTTTCCATTCCCGCGTNNGGAGCTCTCCCAT TGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCCTAGTGATTAA CTTACCGCTTTATGGAAATCTGATAGGTCTCAATACGCA AGATGGCCCTTTGGGTAGGAAACATTACAATTCAGAAGT GATCTCTACCAGTTGTACAGACAAAATACATTCTTGATC TTTTCTTTTTTTTAACTCAAGTCCAAGGAATTTTCACCT ACATTATCTCATTTAATTGTTATTTTGAAATTGATTCTA CTAGTTGCAAGTGGGAGGAAATGGGTTTTGTTCTGTTTT CAGAGGCTGGCTCATCTCTATGACACCCTACACGGGCCT ACAGCAAAGTGACCGAGGTCATGCACTCGGGCCGCAGGCT CTTGGGGACGTACTTCCGAGTGGCCTTCTTCGGACAGGTG AGTCTCCTCTCCGTCTGTAGGCTGTCCCAAGTGGTTTTTT TTTTTTTTTTAACTCTATAAAGTAGTATTTTGTAATTTT CTGGTTTCTGGAAGTGCTAATTTGATGAATTTGGCATAT TTAGTATGATTCTTATCTTNCTCAATAAGTAACTTTCT GCNTTTTTTCTNTCTTCCTGGCTTTCTTTTATTACCTTCTT AAAGNCNGGNGG

Table 5 Continued

clone No.	primer	reading 염기수	Sequences
MG	562	530	CAAAGTAGCCAGGCTGGGAAGCAGATCATCTAATGTGAG TGTGACCCACGTTGGCCACACTGTTGAGAAGGCTCAGGCA GGGTGGGAAAGAGAAAATACAGCAGAAAGAGCATAGGCAC TCTATATAAATATATTGAGGACTTTTATTGAAAATCAC TTAAAATCACAAATGGAGACCCAATATCCATTGCACAAC TATGCACGGAAAGCTAAAAAAGCTAAAGAAGGCAAGGA AATAGGCAGAAATTTGAGGTAATCACTGAGCAGCCCTAG GTTTTGCTGGCTAAAGAGTAAGTGAGTTTAGGGGGCAAG CATAGGAACCAGTTGGTAAAGATAATTTCTCACTGGCTT CCCTGAATTCATGGG TTCAGGGCTGTATAACCCA ACTTG TTATGAAGAAGATTGGGAGGAATCTGATAATAAAAGTC ATAGTATCACATTAAGTTAAGATCTAGGCAGAGTTAGTT TTAAGAAGTCTATGTCCGAAATAGTTGACTCTTGAAACA CATACAGGGCTACTTTG

5) Microsatellite loci 분석에 의한 품종별 유전적 다양성

Microsatellite는 생물체의 유전정보를 가장 많이 제공해주는 유전분석 기법으로서 이들 maker들은 매우 다형적이며, 염색체상에 전역에 걸쳐 골고루 분포되어 있다. 따라서 Microsatellite marker는 생물체 집단간의 유전적 배경 및 유전적 관련성을 연구하는데 가장 많이 이용되고 있어 제주마 유전자원의 유전적 특성을 찾고 타품종간의 유전적거리를 추정하고 또한 타품종과의 유전연관성을 파악하기 위하여 최근에 가장 많이 사용되고 있는 유전 분석법으로 본 연구에 반드시 추가하여 제주마의 유전적 고유성 파악을 통한 혈통관리 추가로 결과를 제출하기로 하였다.

1. 공시동물

Microsatellite를 이용한 마의 유전적특성 및마품종간 유전적거리 추정을 위해서는 더러브렛 44두(Tho), 축산진흥원 보유마 41두(JNH), 일본재래마 5두(Jap), 쿼터호스 11두(QUa), 제주경주마 56두(JRH), 중국말 39두(Mon)등 총 196두를 분석에 이용하였다.

2. Microsatellite marker의 선정 및 PCR

DNA분석을 위한 microsatellite 좌위는 AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20, TKY321, CA425, ASB17, LEX33 13개의 microsatellite를 이용하였으며, Multiplex-PCR은 GeneAmp PCR system 9600(Perkin-Elmer,USA)을 이용하여 수행하였으며, PCR과정은 먼저 95℃ 12분 heating하여 denaturation을 유도하고, 95℃ 30초간 denaturation, 58℃에서 30초간 annealing 그리고 72℃에서 1분간의 extension 의 3단계로 총 20회 반복과 다시 95℃ 30초간 denaturation, 56℃에서 30초간 annealing 그리고 72℃에서 1분간의 extension 의 3단계로 총 15회 반복하였다. 그리고 72℃에서 30분간 extension을 실시 하였다. 증폭된 DNA는 2.5% agarose gel에 전기영동하여 products를 확인 하였다.

3. Microsatellite의 분석

PCR 수행후, 증폭산물들을 유전자형 자동분석기(Perkin Elmer ABI Prism 310 Genetic Analyzer, USA)에 의해 전기영동하고 검출된 각 유전자좌의 대립유전자는 Genescan analysis software (Version 2.1)을 이용하여 각 PCR 단편들의 크기를 3차원 최소자승법(third order least squares method)으로 분석하였고, Genotyper analysis (Version 2.5)을 이용하여 microsatellite loci별 대립유전자의 정확한 크기를 결정하였다.

3. 품종 집단의 유전적 관련성 분석

대립유전자들의 크기가 microsatellite maker에 따른 입력양식, 관측된 이형질성(observed heterozygosity) 및 대립유전자 빈도는 microsatellite Toolkit software (Park 2000)를 이용하였으며, 기대된 이형질성(Expected heterozygosity)과 표준오차, 분석된 microsatellite loci별 공시품종에 대한 전체 이형질성(Ht) 및 품종집단내 이형질성(Hs) 유전자 분화정도(Gst), 그리고 집단간 표준 유전적 거리(Ds) 및 표준오차는 Nei(1972, 1978)의 방법으로, Da genetic distances의 추정은 Nei등 (1983)의 방법을 사용하는 집단유전학 분석프로그램인

DISPAN(Ota, 1993) package를 이용하여 계산하였으며, 또한 DISPAN을 이용하여 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic mean) (Sneath 와 Solkal, 1973) 와 Neighbor-Joining(N.J) method(Saitou 와 Nei, 1987)를 이용하여 각 유전적거리 (Ds and Da)에 의한 phylogenetic tree를 작성하였다.

주성분 분석 (Principal compo analysis; multivariate statistical analysis)은 XLSTAT(<http://www.xlstat.com>) package를 이용하여 실시하였고, Microsat package(<http://hpgl.stanford.edu/projects/crosat/>)를 이용하여 각 개체들이 가지는 공유대립 유전자 빈도(allele-sharing)를 기준으로 개체별 유전적 거리를 분석하였다. 모든 phylogenetic tree는 TreeView(version 1.6)을 이용하였다.

4. 결 과

가) 분석된 microsatellite loci별 특성

마(Horse) 6 품종, 196두에 대한 13개의 microsatellite에 대한 대립유전자의 수는 139개 검출되었으며(Table. 6), 분석된 모든 집단에서 매우 다형적이다. 각 유전자 좌위에 있어서 대립유전자의 수는 7개(HMS6) - 16개(ASB17)의 범위였으며, 분석되어진 전체 개체들의 유전적 다양성을 나타내는 유전자 좌위별 이형질성능(Expected total heterozygosity)은 0.661 - 0.874, 품종집단간 유전자 변이도(Gst; coefficient of gene differentiation)는 0.062(CA425) 및 0.192(LEX33)이었으며, 평균 0.1의 분석된 품종 집단간 유전자 빈도를 보였다. 각 집단에서 얻어진 microsatellite loci의 다양성을 비교하기 위해 사용되어진 13종의 microsatellite에 대한 대립유전자빈도 분포를 Table. 7에 나타내었다. 집단별로 각 대립유전자에 대해서로 다른 빈도를 보이면서 집단별 독특한 양상을 보이고 있다. 즉, 어느 집단에서 frequency가 높은 대립유전자들이 다른 집단에서는 낮게 검출되고, 또는 그 반대의 경우등의 차이점이 있다. 유전자좌위 AHT4의 100bp의 대립유전자의 경우 다른 품종에서는 발견되지않고, 제주마에서만 0.8상의 빈도를 보이고 있다. 제주마에서 빈도는 낮지만 제주마의 독특한 대립유전자들(AHT4의 100, ASB의 223, AHT4의 148, ASB2의 222), 더터브렛종의 경우(HTG10의 112), 쿼터호스 5개, 중국말 13개등 이상의 결과를 살펴보더라도, 마품종의 외형상 형태 및 지리적분포가 각 유전자좌위별 대립유전자간에는 관련성이 있음을 추정할 수 있다.

나. 품종 집단간 유전적 거리 및 유연관계 분석

대립유전자 빈도를 근거로 하여 Da gnetic distnce (Nei 등, 1983)와 standard genetic ditance(Nei 1972, 1978)는 DISPAN 프로그램을 이용하여 계산하여 나타냈다. 품종간 가장 가까운 유전적 거리를 보이는 그룹은 JNH와 Mong으로서 Da gnetic distnce 와 standard genetic ditance에서 0.014와 0.182로 검출되었다. 반면 JNH와 교잡종이라 할 수 있는 JRH와의 유전적 거리는 Da gnetic distnce 와 standard genetic ditance에서 0.20와 0.31로 두 번째로 유전적거리가 가까운 것으로 제주마에 아주유사한 유전적 거리를 가지고 있는 것으로 판단됨.

Da gnetic distnce의 matrix를 이용하여 NJ(Neighbor joining)tree 및 UPGMA tree 를 작성하여 Fig와 Fig에 나타내었으며, 또한standard genetic ditance를 이용하여 NJ 및 UPGMA tree를 작성하여Fig. 33, Fig. 34, Fig. 35, Fig. 36 에 제시하였 제시하였다.

Fig. 37, Fig. 38에 분석되어진 197두 전체에 대한 simple allele-sharing 측정수준을 이용하여 neighbor-joiningtree를 나타내었다. 각 품종 집단별로 강력한 군집을형성하고 있으며, 특히 제주마인 JNH는 독특 하면서도 강력한 군집을 이루고 있어 유전적 및 외형적으로 제주마는 고유한 특징을 가지고 있는 것으로 판단됨.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때 제주마는 독특한 유전적 특징을 가지고 있는 것으로 조사되었고, 물론 타 Mong품종과 유전적 거리가 가까운 점은 있으나 소, 돼지 역시 아시아 계통들은 진화론적으로 그 기원이동일한 것으로 사료되므로, 특히 본 연구결과 중국말, 교잡종, 더러브렛종이나 퀴터호스와는 뚜렷한 유전적 특성 차이를 나타내었고, 특히 천년기념물 347호로 지정되어 축산진흥원 보유중인 말들은 유전적 순수성이 높은 것으로 관찰 되었다.

Table 6 Characterization of the 13 microsatellite loci analyzed in 10 cattle breeds

Locus	Size range(bp)	No. of alleles	Ht*	Hs†	Gst‡
AHT4	100~160	10	0.827	0.761	0.080
AHT5	130~148	8	0.818	0.730	0.107
ASB2	221~259	14	0.845	0.690	0.184
HMS3	133~171	10	0.804	0.731	0.090
HMS6	157~169	7	0.750	0.649	0.124
HMS7	171~185	8	0.742	0.676	0.089
HTG4	128~142	8	0.661	0.598	0.095
HTG10	90~110	12	0.793	0.687	0.134
VHL20	84~104	10	0.834	0.699	0.161
TKY321	208~232	13	0.875	0.781	0.106
CA425	230~250	12	0.752	0.705	0.062
ASB17	91~121	16	0.863	0.766	0.112
LEX33	198~216	11	0.864	0.698	0.192

* Ht ; Expected total heterozygosity.

† Hs ; Expected within-population heterozygosity.

‡ Gst ; Coefficient of gene differentiation.

Table 7 Allele frequencies of 13 Microsatellite loci for 6 Horse breeds.

Locus	Population					
AHT4	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
100	8.54	–	–	–	–	–
144	12.20	10.00	13.64	18.75	14.10	13.64
146	4.88	10.00	–	8.04	10.26	–
148	–	20.00	18.18	9.82	7.69	23.86
150	7.32	–	9.09	1.71	7.69	20.45
152	24.39	–	4.55	8.93	6.41	–
154	–	10.00	–	0.89	1.28	–
156	6.10	–	–	1.79	–	–
158	8.54	20.00	54.55	16.96	43.59	42.05
160	28.05	30.00	–	24.11	8.97	–
3=10	8	6	5	9	8	4
AHT5	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
130	14.63	10.00	45.45	25.89	14.10	11.36
132	7.32	10.00	31.82	23.21	32.05	48.86
134	50.00	40.00	–	10.71	17.95	1.14
136	–	20.00	4.55	12.50	6.41	21.59
138	20.73	20.00	–	13.39	15.38	13.64
140	7.32	–	4.55	14.29	11.54	3.41
144	–	–	13.64	–	–	–
148	–	–	–	–	2.56	–
3=8	5	5	5	6	7	6
ASB2	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
221	3.66	–	–	1.79	3.85	4.55
223	7.32	–	–	–	–	–
225	–	–	–	4.46	–	–
237	3.66	–	–	4.46	1.28	–
239	–	–	4.55	–	–	–
241	29.27	–	4.55	22.32	11.54	13.64
243	1.22	–	–	–	2.56	9.09
245	2.44	–	13.64	17.86	15.38	19.32
247	45.12	10.00	27.27	25.89	29.49	3.41
249	3.66	90.00	4.55	7.14	15.38	11.36
251	–	–	–	1.79	2.56	2.27
253	3.66	–	4.545	14.29	16.67	18.18
255	–	–	36.36	–	1.28	18.18
259	–	–	4.55	–	–	–
3=14	9	2	8	9	10	9

Locus		Population				
HMS6	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
157	8.54	40.00	18.18	10.71	8.97	11.36
159	1.22	–	4.55	8.93	8.97	4.55
161	17.07	–	9.09	24.11	25.64	45.45
163	–	–	–	7.14	1.28	–
165	50.00	–	4.55	18.75	25.64	–
167	23.17	60.00	63.64	30.36	25.64	38.64
169	–	–	–	–	3.85	–
3=7	5	2	5	6	7	4
HMS7	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
171	2.44	–	9.09	7.14	7.69	15.91
173	–	–	–	1.79	5.13	–
174	–	–	–	–	1.28	–
175	65.85	70.00	27.27	34.82	39.74	15.91
177	–	–	18.18	10.71	12.82	25.00
179	7.32	30.00	22.73	16.07	12.82	27.27
181	10.98	–	22.73	27.68	12.82	15.91
185	13.41	–	–	1.79	7.69	–
3=8	5	2	5	7	8	5
HTG4	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
128	9.76	20.00	27.27	18.75	14.10	55.68
130	36.59	–	–	10.71	14.10	–
132	41.46	70.00	45.45	58.04	57.69	34.09
134	–	–	–	0.89	–	5.68
136	–	10.00	22.73	0.89	3.85	–
138	12.20	–	4.55	8.04	8.97	4.55
140	–	–	–	2.68	–	–
142	–	–	–	–	1.28	–
3=8	4	3	4	7	6	4
HTG10	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
90	1.22	–	22.73	9.82	2.56	43.18
92	3.66	–	–	–	3.85	–
94	–	20.00	4.55	6.25	7.69	9.09
96	–	–	–	7.14	3.85	1.14
98	15.85	10.00	4.55	14.29	5.13	23.86
100	4.88	–	–	1.79	5.13	–
102	26.83	–	–	19.64	28.21	15.91
104	–	–	4.55	8.04	7.69	–
106	2.44	–	–	5.36	8.97	–
108	45.12	70.00	63.64	22.32	19.23	5.68
110	–	–	–	5.36	7.69	–
112	–	–	–	–	–	1.14
3=12	7	3	5	10	11	7

Locus	Population					
VHL20	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
84	–	–	4.55	–	–	12.50
86	4.88	–	68.18	31.25	11.54	18.18
88	–	–	–	2.68	3.85	–
92	–	–	4.55	11.61	12.82	15.91
94	34.15	10.00	13.64	17.86	26.82	32.95
96	–	–	–	6.25	6.41	20.45
98	7.32	40.00	–	3.57	12.82	–
100	53.66	30.00	–	12.50	25.64	–
102	–	20.00	9.09	1.79	–	–
104	–	–	–	12.50	–	–
3=10	4	4	5	9	7	5
TKY321	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
208	8.54	–	4.55	7.14	–	–
210	1.22	40.00	–	25.89	2.56	29.55
212	–	–	–	–	2.56	–
214	1.22	–	–	12.50	5.13	–
216	8.54	–	9.09	15.18	2.56	21.59
218	8.54	40.00	9.09	13.39	24.36	7.95
220	–	–	4.55	–	2.56	4.55
222	20.73	20.00	–	16.96	19.23	–
224	–	–	–	1.79	–	–
226	1.22	–	31.82	4.46	12.82	5.68
228	37.80	–	22.73	2.68	3.85	14.77
238	12.20	–	18.18	–	21.79	15.91
232	–	–	–	–	2.56	–
3=13	9	3	7	9	11	7
CA425	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
230	–	20.00	–	–	–	–
232	–	20.00	–	2.68	–	–
234	–	–	–	1.79	–	2.27
236	28.05	30.00	27.27	13.39	12.82	20.45
238	–	–	–	–	6.41	–
240	2.44	–	4.55	–	11.54	1.14
242	29.27	20.00	22.73	14.29	24.36	7.95
243	–	–	–	0.89	–	–
244	40.24	10.00	40.91	53.57	38.46	51.14
246	–	–	4.55	12.50	6.41	15.91
248	–	–	–	–	–	1.14
250	–	–	–	0.89	–	–
3=12	4	5	5	8	6	7

Locus		Population				
ASB17	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
91	–	–	4.55	4.46	–	2.27
93	–	20.00	22.73	2.68	1.28	30.68
95	4.88	–	–	3.57	3.85	–
97	3.66	–	4.55	1.79	7.69	–
99	1.22	–	–	2.68	3.85	–
101	7.32	–	–	8.04	3.85	–
103	–	–	–	–	3.85	–
105	–	50.00	9.09	0.89	3.85	2.27
107	28.05	–	50.00	44.64	14.10	23.86
109	20.73	–	–	8.04	2.56	17.05
111	6.10	–	–	6.25	10.26	–
113	4.88	–	4.55	0.89	12.82	1.14
115	20.73	20.00	–	16.07	20.51	9.09
117	2.44	10.00	4.55	–	2.56	13.64
119	–	–	–	–	3.85	–
121	–	–	–	–	5.13	–
3=16	10	4	7	12	15	8
LEX33	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
198	13.41	–	–	–	20.51	–
200	52.44	–	–	0.89	44.87	–
201	–	–	–	6.25	–	–
202	–	–	40.91	15.18	–	18.18
204	–	–	4.55	10.71	–	30.68
206	30.49	–	–	3.57	14.10	–
208	2.44	60.00	9.09	21.43	3.85	17.05
210	–	10.00	–	2.68	7.69	–
212	1.22	30.00	36.36	15.18	8.97	23.86
214	–	–	9.09	16.07	–	10.23
216	–	–	–	8.04	–	–
3=11	5	3	5	10	6	5
HMS3	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
133	–	–	–	–	2.56	–
153	17.07	20.00	22.73	25.89	7.69	57.95
157	–	–	–	–	1.28	–
161	9.76	50.00	31.82	9.82	15.38	6.82
163	–	–	–	5.36	6.41	2.27
165	37.80	–	18.18	14.29	17.95	12.50
167	15.85	30.00	13.64	27.68	33.33	20.45
169	13.41	–	13.64	5.36	6.41	–
170	–	–	–	–	1.28	–
171	6.10	–	–	11.61	7.69	–
3=10	6	3	5	7	10	5

Table 8 Expected and observed heterozygosity as well as mean number of alleles (MNA) observed across 13 Microsatellite loci for each breed.

population	n	Expected Hz \pm S.E	Observed Hz	MNA
JNH	41	0.700 \pm 0.024	0.675	6.23
Jap	5	0.639 \pm 0.053	0.708	3.46
Qua	11	0.705 \pm 0.028	0.755	5.46
JRH	56	0.794 \pm 0.021	0.804	8.38
Mong	39	0.797 \pm 0.020	0.649	8.62
Tho	44	0.728 \pm 0.024	0.691	5.85

Table 9 Matrix of Da genetic distance observed between Horse breeds.

	JNH	Jap	Qur	JRH	Mong
Jap	0.4146				
Qua	0.3725	0.3944			
JRH	0.2013	0.3431	0.2242		
Mong	0.1414	0.3520	0.2776	0.1373	
Tho	0.3930	0.4103	0.1701	0.1841	0.2668

Table 10. Matrix of standard genetic distance (Ds) and standard errors observed between the Eastem Asian breeds and reference breeds

	JNH	Jap	Qua	JRH	Mong	Tho
JNH	–	0.1821	0.1614	0.0868	0.0438	0.1314
Jap	0.5616	–	0.1812	0.1357	0.1218	0.1139
Qua	0.6054	0.4805	–	0.0513	0.1150	0.0697
JRH	0.3140	0.4206	0.2199	–	0.0802	0.0397
Mong	0.1753	0.4136	0.3607	0.1697	–	0.1001
Tho	0.7824	0.6663	0.2717	0.2328	0.4028	–

Fig 33. Neighbor-joining tree Constructed Using Da genetic distance matrix, showing the genetic relationships among the horse breeds. Numbers indicates the bootstrap values in percentase.(1000)

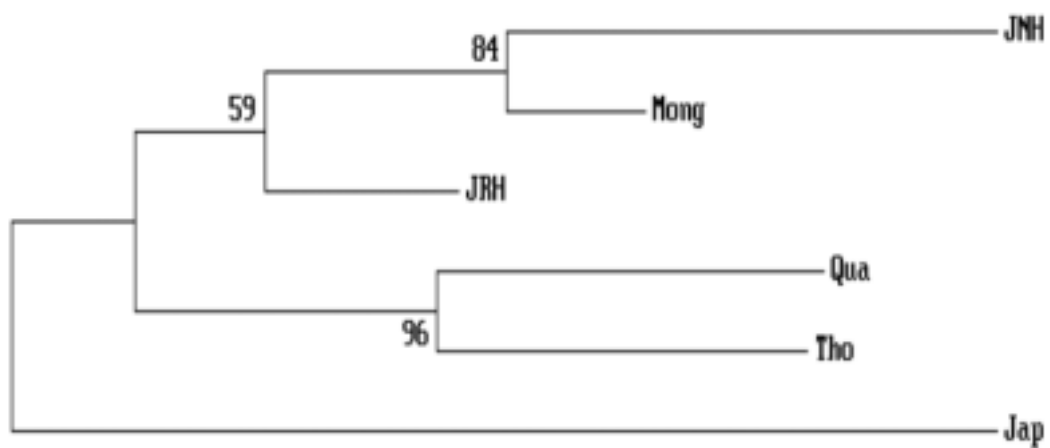


Fig 34. UPGMA tree, Da showing the genetic relationships among the horse breeds.

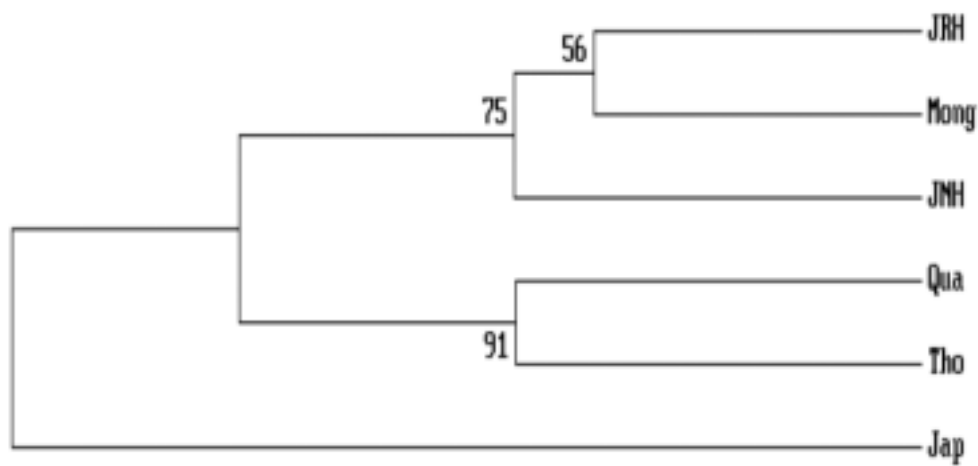


Fig 35. Neighbor-joining tree, Ds showing the genetic relationships among the horse breeds.

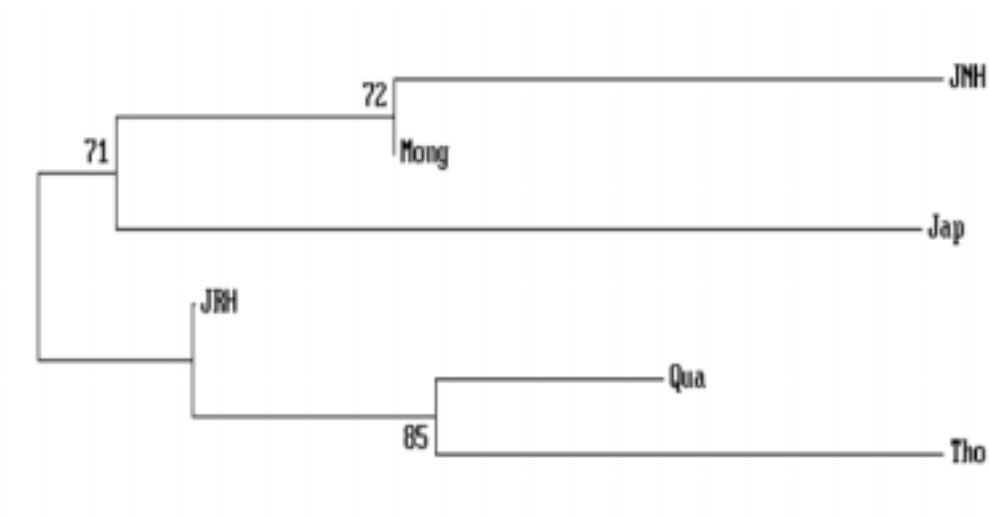


Fig 36. UPGMA tree, Ds, showing the genetic relationships among the horse breeds.

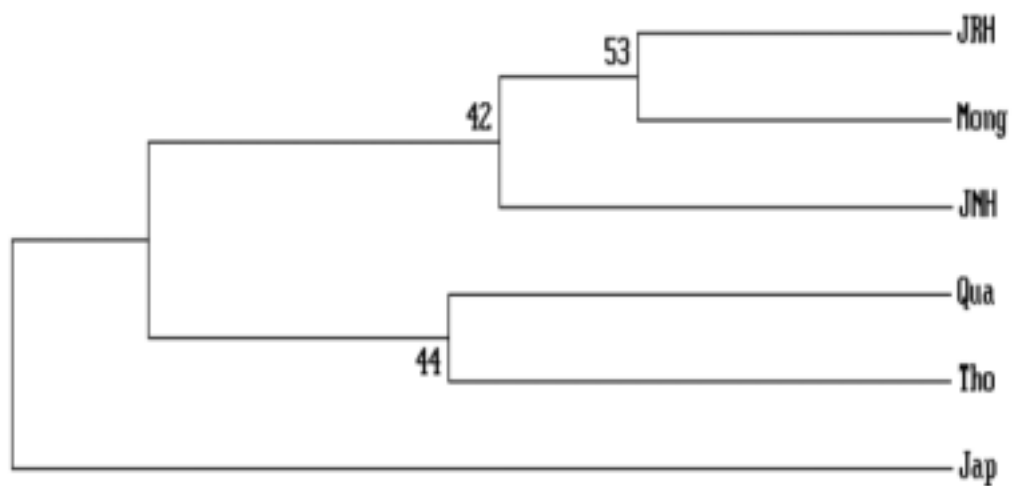


Fig. 37. Neighbor-joining dendrogram constructed from allele-sharing distances among 362 individuals from 2 European, 3 Asian, 2 African taurines, and 2 Asian indicines, outgrouped as Bali, Indonesian Bos banteng.

Individuals analysis

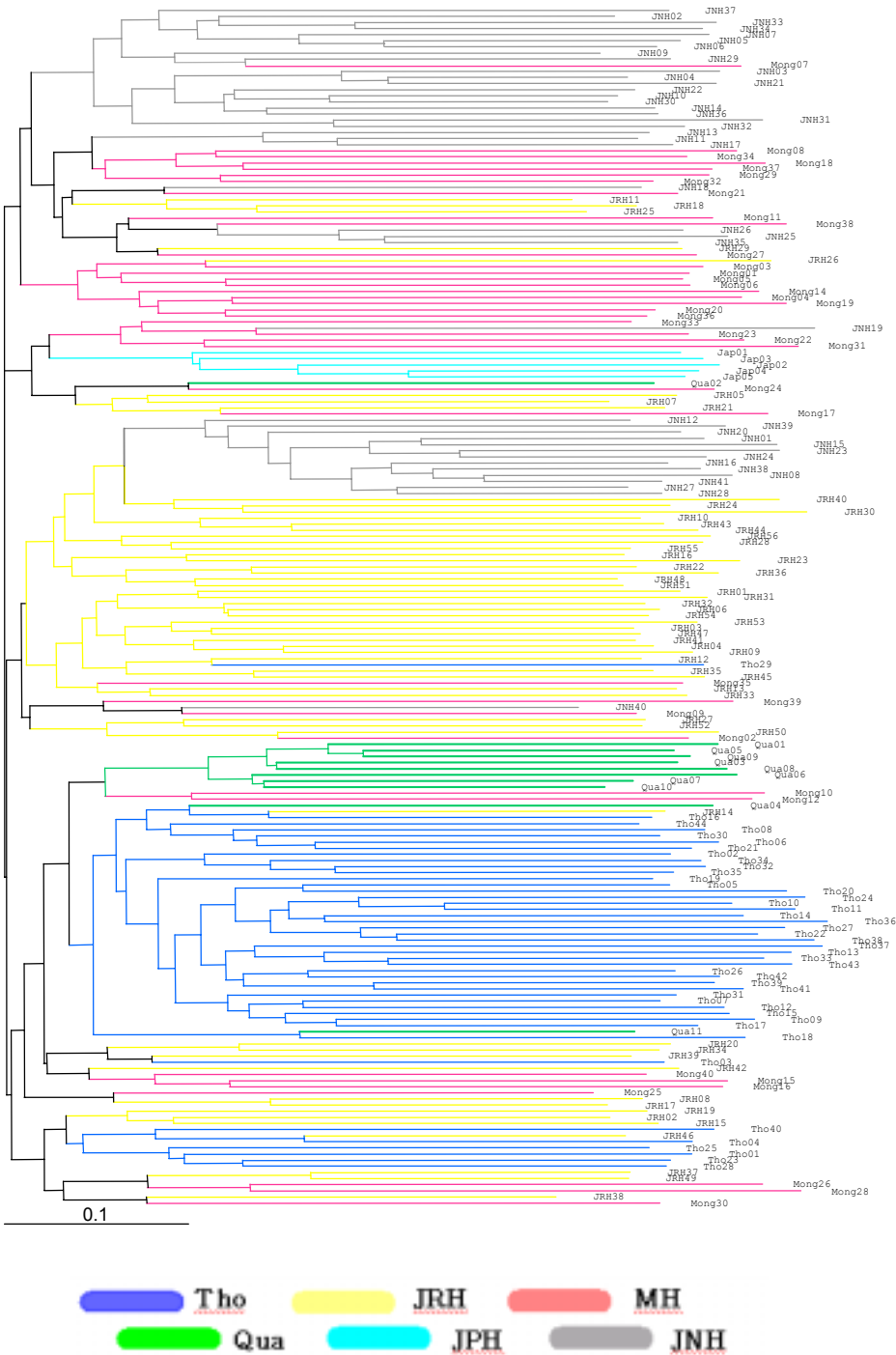
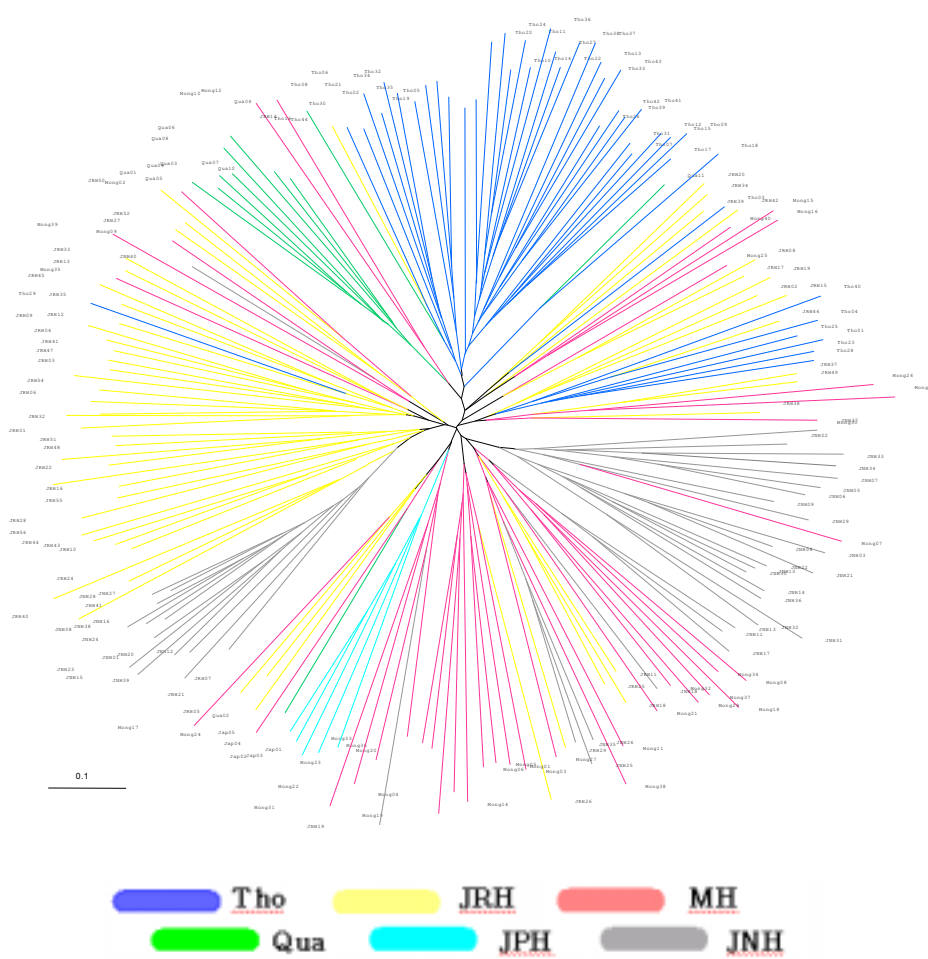


Fig. 38. A neighbor-joining dendrogram was constructed from allele-sharing distances among 224 individuals in 7 European *Bos taurus* Breeds.



제 2절: 제주마의 친자감별 및 개체식별 기법 확립

1. 추진 방법

1) 공시재료 확보 및 DNA 추출

농가로부터 등록검사가 의뢰된 제주마 100두와 제주도 축산진흥원에서 생산된 자마 40 및 부모 및 선조마 60 두에 대한 혈액으로부터 DNA를 추출하였다.

DNA 추출방법은 혈액 10 ml를 EDTA함유 시험관으로 채집한 후 NH_4Cl lysis buffer로 적혈구를 파괴시키고 백혈구 펠렛 침전물을 모은다. 침전물은 3 ml의 DNA extraction buffer에 재차 부유시킨 후 200 μl 의 10% SDS와 Proteinase를 첨가한 후 50-60°C에서 소화시킨다. 소화된 산물에는 1 ml의 6 M NaCl을 균질되게 섞어 실온에 5 분 정도 정치한 후 2500xg에서 15 분간 원심분리 한다. 원심분리된 상층액은 15 ml conical tube로 옮긴 후 2-2.5 배의 100% EtOH를 첨가하여 DNA를 꺼내어 1.5 ml tube에 넣어 0.1-1 ml TE Buffer로 재차 용해한 후 분석실험에 이용하였다.

2) MS좌위에 대한 PCR 증폭

해당 좌위에 대한 MS인자들의 증폭은 Table 11과 같이 각 MS 좌위별 Primer 조합을 제작하고 각각의 반응조건(denature, annealing, extension, cycles)을 설정하여 MS 좌위의 단편을 증폭하였다.

PCR reaction은 0.2 μl tube에 Template DNA 50 ng, primer 각 5 pmol, dNTP 각 250 μM , MgCl_2 1.5 mM, KCl 40 mM, Tris-HCl 10 mM, Taq DNA polymerase 1.0 unit을 첨가하여 PCR 반응 총량을 20 μl 로 조정하였다. PCR reaction은 thermo cycler에서 94°C에서 4분간 denaturation 시킨 후 다음 94°C에서 15초간 DNA 변성 (denaturation), 54 - 56°C 15초간 primer 부착 (annealing), 72°C에서 30초간 확장(extension) 주기의 반응을 30회 계속한다. 마지막으로 72°C에서 5분간 연장반응을 종결하였다. PCR 산물은 4°C에 보관하면서 Polyacrylamide 전기영동에 이용하였다.

Table 11. MS marker 좌위와 primer 조합 및 증폭조건

MS 좌위	PCR 증폭 Primer 조합	PCR 반응온도
ASB25	F: 5'-GAAACATTGGTACAGAGGCAGA-3' R: 5'-TGCTCCTGCTCCTCTCTCAG-3'	Annealing: 56 °C Extension: 72 °C
HMS5	F: 5'-TCAGACTCCTGGAACAAATCC-3' R: 5'-CGTCAGAGTTCAAAGTAGAACCA-3'	Annealing: 52 °C Extension: 72 °C
HTG7	F: 5'-GCAGAACATCCCTCCTTG-3' R: 5'-ACTCTTCCACCCTGTCCT-3'	Annealing: 58 °C Extension: 72 °C
UCDEQ411	F: 5'-TGCTGCGAGTCAGTGGCT-3' R: 3'-ATGCCTCACATCCCTGGGT-3'	Annealing: 56 °C Extension: 72 °C
UM010	F: 5'-CAGCCATTGGAAATCTACGTG-3' R: 5'-CCCAGGCTATATCCTTCTACAG-3'	Annealing: 56 °C Extension: 72 °C
UM012	F: 5'-TAAGGAATTTAGACTATGACTGAGGA-3' R: 5'-ACTGTCAGGGGCCTGTATTT-3'	Annealing: 54 °C Extension: 72 °C
VHL20	F: 5'-CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG-3' R: 5'-AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG-3'	Annealing: 56 °C Extension: 72 °C
VHL209	F: 5'-TCTTACATCCTTCCATTACAATA-3' R: 5'-TGATACATATGTACGTGAAAGGAT-3'	Annealing: 46 °C Extension: 46 °C
VIAS-H39	F: 5'-AATGTGATTATAGCAGATAGGGTT-3' R: 5'-CTATCCAATCTTCACAATCATGTA-3'	Annealing: 56 °C Extension: 72 °C
VIAS-H64	F: 5'-CCCTCTCTCTCTCAAGTGCAA-3' R: 5'-TTTGTATTCTCCTCTTTACTTTCCA-3'	Annealing: 54 °C Extension: 72 °C

3) Polyacrylamide 전기영동과 MS 인자의 명명

증폭된 MS 인자의 다형 현상은 Polyacrylamide gel (10% Acrylamide 20 ml, 200 ul APS, 20 ul TEMED)을 만들고 1X TBE buffer로 15 mA, 3W에서 2시간동안 전기영동을 한 후 Silver staining에 의하여 증폭조건과 bands 유전양상을 관찰하였다.

증폭된 단편들의 인자는 그 크기가 중간에 위치한 인자를 M으로 하여 인자의 이름을 증폭된 DNA의 길이 순으로 알파벳으로 배정하여 분석에 이용하였다.

4) 유전현상 관찰과 친자판정

가계가 확인된 부, 모, 자손의 시료들을 이용하여 각 좌위별로 PCR에 의한 MS좌위 증폭과 Polyacrylamide 전기영동으로 대립인자의 bands 유전현상을 확인 분석하였다.

5) 친자판정 확률, 오판확률의 계산(PE, probability of exclusion)

친자판정의 효율성과 정확성 분석을 위하여 다음과 같은 4가지 조건으로 분석하였다(Jamieson et al, 1997, Animal Genetics).

- PE by general exclusion probability
- PE in terms of power of allelic probability
- PE by one parent genotype unavailable
- PE by given two parents, one offspring

6) 유전자형 판정에 따른 개체식별 및 친자감별 수행

선발된 microsatellite 유전좌위인 VIAS-H39, VHL20, ASB25, UCDEQ411, UM010, VIAS-H64, UM012, HTG7, HMS5, VHL209 좌위에 대한 유전자형 평가를 위한 PCR산물 확보(MS 단편 증폭)는 전년도에 이미 개발 검증된 Primer 조합을 이용하였다.

증폭된 MS단편을 이용하여 Polyacrylamide gel에서 전기영동을 하였고 Silver staining 처리 후 전년도와 동일한 인자의 이름을 이용하여 인자형을 판독하였다. 또한 동시에 각 band들의 다형현상 및 유전양상 판정을 수행하였다.

친자판정의 효율성(PE, Probability of exclusion)과 오판확률은 가계를 구성하고 있는 개체들에 대해서 분석이 완료된 후 4가지 방법(PE by general exclusion probability; PE in terms of power of allelic probability; PE by one

parent genotype unavailable; PE by given two parents, one offspring, Jamieson et al, 1997, Animal Genetics)으로 비교하여 평가하였다.

2. 결과 및 고찰

1) MS 좌위별 관측된 대립인자의 수와 인자의 종류

제주마에 대한 MS의 인자형을 조사한 결과 표 2와 같이 멘델유전이 확인된 총 10개의 MS좌위에서 68개의 인자로 평균 6.8개의 인자가 복대립으로 각 좌위에 출현되고 있었다.

인자의 길이에 따른 인자의 명칭은 표기와 인식이 편리하도록 임의로 명명하였는데, 그 인자들을 크기의 순서로 나열했을 때에 가운데에 위치한 인자를 'M'으로 하여 좌우에 알파벳의 순서로 명명하여 이용하였다. 이들 10개의 MS좌위들 가운데 9개의 MS좌위는 2 pb의 반복서열에 따른 차이로 규칙적으로 길이의 차이가 나타나는 것으로 분석되었다. VIAS-H39의 좌위는 4bp의 반복서열로 154pb, 158bp 및 162bp의 길이로 3종류가 출현하고 있었다.

이상의 복대립좌위의 MS인자들은 모두 멘델의 유전양상을 보여주고 있었다.

2) 농가의 제주마에 대한 유전자형 판정 및 개체식별 시도

표 3은 농가로부터 수집된 제주마집단에서 임의로 선정된 100두의 혈액표본을 이용하여 DNA를 추출한 후 genomic DNA의 MS 좌위에 대한 인자형을 판정한 결과다.

인자형의 조합을 개체식별코드로 이용할 때 그 효율성을 알아보기 위하여 개체식별력을 개체확인검사인 동질성 검사로 100 두의 표본에 대하여 실시한 바 동일한 인자형을 소유한 개체는 한 건도 출현되지 않았다. 이는 농가로부터 수집된 표본집단인 제주마들은 서로간에 microsatellite의 인자형에 의하면 충분한 식별이 가능한 것으로 하겠다.

근친번식이 심하게 진행되는 폐쇄집단에서는 동일한 인자형을 소유한 개체의 출현확률이 세대가 증가될수록 점차 높아져갈 것으로 볼 수 있다. 또한 선발 개량이 진행됨에 따라 한정된 적은 수의 종모마들이 집중적으로 자손생산에 활용이 될 경우에는 유사한 인자형을 소유한 개체들의 출현빈도에 영향을 주게된다는 사실은 부인할 수 없다.

선발과 개량에 대한 인위적인 영향력이 미약한 현재로서는 동일 인자형을 소유한 개체출현의 정도는 매우 미약할 것으로 생각된다. 결론적으로 본 10개의 유전좌위의 인자형은 개체식별에 유용하게 쓰일 수 있는 것으로 판단되었다.

3) 친자판정과 효율성진단

친자판정의 시도와 그 효율성을 진단하기 위하여 가계가 구성될 수 있는 집단인 축산진흥원에 사육중인 제주마의 혈액표본을 이용하여 VHL20, VIASH39, ASB25, UCDEQ411, UM010, VIAS-H64, UM012, HTG7, HMS5, VHL209 의 10개 MS 좌위에 대한 MS 인자분석을 시도하였다(Table 14, 15, 16).

Table 14은 2002년도 출생한 자마(망아지)들에 대한 개체식별 MS 인자형이며, 표 5는 부모마 집단에 대한 개체의 MS 인자형을 분석한 것이다. 이들 분석된 MS 인자형들을 근거로 친자판정을 시도한 결과는 Table 16에 제시되었다. 또한 이 MS 인자형에 대한 데이터뱅크를 구축하면 부모에 대한 정보가 없어도 데이터뱅크를 조회하면 부모에 대한 추적이 가능할 것으로 분석되었다. 친자판정성적을 보면 40두의 자마(망아지)에 대한 평가를 하였는데 2두를 제외한 38두의 자마에 대한 부모확인 판정이 가능했다. 판정이 불가한 2마리 가운데 한 마리(개체번호 2102512)는 친부-부정이 나타나 현재로서는 그 이유를 알 수 없었다. 또 한 마리(개체번호 2102515)는 친자의 일치확율이 90%로 유전인자의 변이(mutation) 또는 판독 오류로 생각되고 있다.

이와 같이 개체식별을 위한 MS 좌위에 대한 분석은 친자판정에 이용에도 매우 효과적이며 본 연구결과에서 엄선된 10개의 MS좌위는 효과적으로 이용될 것으로 판단된다.

Table 12 Microsatellite 좌위별 관측된 대립인자수와 인자의 길이

MS 좌위	대립인자 수	Size(bp)[인자명]
VHL20	9	86[I], 88[J], 92[L], 94[M], 96[N], 98[O], 100[P], 102[Q], 104[R]
VIAS-H39	3	154[L], 158[M], 162[N]
ASB25	6	54[B], 72[K], 74[L], 76[M], 78[N], 80[O], 82[P]
UCDEQ411	8	71[J], 73[K], 75[L], 77[M], 79[N], 81[O], 83[P], 85[Q]
UM010	10	87[K], 89[L], 91[M], 93[N], 95[O], 97[P], 99[Q], 101[R], 103[S], 105[T]
VIAS-H64	12	67[B], 75[F], 79[H], 81[I], 83[J], 85[K], 87[L], 89[M], 91[N], 93[O], 97[Q], 99[R]
UM012	5	90[K], 92[L], 94[M], 96[N], 98[O]
HTG7	6	86[I], 88[J], 92[L], 94[M], 96[N], 98[O]
HMS5	3	84[L], 86[M], 90[O]
VHL209	6	84[K], 88[M], 90[N], 92[O], 96[Q], 98[R]

Table 13. Microsatellite 좌위를 이용한 농가집단 개체의 유전자형

개체	VHL -20	VIAS -H39	ASB -25	UCDEQ -411	UM -010	VIAS -H64	UM -012	HTG7	HMS5	VHL -209
2002001	IQ	LL	LM	KK	LR	IQ	MM	JJ	MO	KN
2002002	IP	LM	KM	KM	LN	IJ	MM	JJ	LM	NN
2002003	PP	LM	LL	KP	LL	IQ	NN	JJ	LO	KN
2002004	PP	LM	MP	KP	LL	IR	MM	JJ	LL	KN
2002005	OP	LL	BL	KP	LL	QQ	KM	JJ	LM	KN
2002006	OP	LL	KM	KP	LM	IQ	NN	JJ	MM	NO
2002007	IQ	LM	KO	KP	NQ	JN	KM	JJ	LM	KN
2002008	PP	LL	BL	MO	LR	NR	MN	JJ	LO	KO
2002009	PP	LN	LM	MP	LL	IQ	NN	JJ	MM	NQ
2002010	PP	LL	LM	MP	RR	JQ	MN	JJ	MM	NN
2002011	MP	LM	BM	JN	LT	BI	KN	JL	LO	KK
2002012	IM	LN	BL	OP	KM	FJ	KL	MN	LO	KN
2002013	LO	LM	LL	KN	KL	FN	LM	JL	LO	OQ
2002014	II	LN	BB	OP	MN	FQ	KN	LM	MO	NN
2002015	IM	LL	BL	JP	LQ	HI	MM	JO	MO	KK
2002016	MP	LM	BL	OP	LN	II	LM	JO	LM	NN
2002017	OQ	LM	LL	PP	KN	IN	KM	MN	LL	KN
2002018	LP	LL	BL	NP	KL	IN	LM	JL	LM	NO
2002019	OQ	LL	BL	JO	LN	IN	NN	LO	LO	KN
2002020	IM	LM	BL	OP	QR	IQ	LM	JO	LM	NN
2002021	MP	MN	KL	KO	NQ	IQ	LM	LO	LL	NN
2002022	IO	LL	BM	KO	LN	IQ	MN	JL	LM	NN
2002023	PP	LL	BL	MP	LR	IR	MN	JJ	LM	NN
2002024	IM	LL	BM	JP	QR	JN	KL	JN	LM	KO
2002025	MP	LL	LL	PP	KM	JQ	MN	MN	LL	KK
2002026	PQ	LL	LL	KM	LL	QR	KM	JJ	MO	KQ
2002027	PP	LL	LM	JP	QR	MQ	MN	JL	MO	NO
2002028	II	LL	MN	JO	QR	JQ	KM	MN	MM	KK
2002029	IM	LM	LL	JN	QR	QQ	KM	MM	LM	KM
2002030	IQ	LL	MM	OP	PR	IJ	MM	JJ	LO	NQ
2002031	IQ	MN	LP	JP	LN	MN	KN	LM	LO	OO
2002032	IR	LM	BK	OP	MQ	JK	LO	MN	MO	NR
2002033	MM	LM	MP	KN	NS	BN	KL	JL	LM	KM
2002034	MP	NN	LO	KO	LN	IN	KN	JN	LM	KN
2002035	MR	LL	LP	OP	LM	HJ	LM	JL	MM	KN
2002036	OQ	LL	LM	KN	LN	FN	MO	JJ	LM	KN
2002037	OQ	LL	LM	OP	QQ	JJ	NN	JJ	MO	NQ
2002038	PP	LL	MM	KM	LL	IQ	MM	JJ	LM	NN
2002039	PR	LL	LM	KP	NR	JQ	MN	LN	MM	NO
2002040	PR	LN	LM	JK	NN	FJ	LM	JN	LM	KM
2002041	QR	LL	LM	KP	NQ	MN	MN	LN	MM	KK
2002042	PR	NN	LL	OO	LN	JM	MM	JM	LL	NP
2002043	II	LN	BN	KO	LN	MN	MN	LM	LM	NO
2002044	IR	LL	BL	OO	LO	NR	MN	LN	LL	NO
2002045	MR	LL	LL	LP	QQ	NO	MO	JJ	LM	OO

2002046	PR	LL	MM	KO	RR	IQ	NN	JL	LO	NN
2002047	MN	LN	LM	LP	NR	JM	NN	LL	LO	KQ
2002048	IM	LL	LN	JN	QR	QQ	NN	MM	LM	KM
2002049	MQ	LL	BB	JP	LL	FI	KM	JL	LO	NN
2002050	IM	LN	BL	KO	LL	NQ	NO	LN	LM	NO
2002051	JM	LL	BO	PP	LM	HI	MN	JN	LO	KN
2002052	MQ	LL	LL	NO	RR	HQ	KN	LM	LL	MN
2002053	II	LN	LL	OP	QQ	HQ	LM	NN	LO	NO
2002054	MM	MM	LM	PP	QR	IQ	NN	JN	MO	KN
2002055	JQ	LL	LN	JP	MN	IQ	KM	MM	LO	NN
2002056	IP	LM	LN	NO	NN	IQ	MN	JM	MO	KN
2002057	JP	LL	LN	PP	MN	IQ	MN	MN	LL	KN
2002058	IM	LN	LP	JO	LN	MN	MN	LM	LO	OO
2002059	PR	LL	LP	OO	KN	HQ	KN	JL	LM	KM
2002060	LO	LL	MM	JJ	LM	JQ	NN	JN	MO	KO
2002061	LM	LN	NO	JO	LQ	JN	NO	JN	MM	KR
2002062	II	LM	BL	JK	NQ	FJ	KO	NO	LL	KN
2002063	IM	LL	KL	MO	NP	NN	NO	MN	LL	KN
2002064	IM	LL	LO	KK	NN	FN	MN	JN	LM	KO
2002065	IM	LL	LO	KO	QR	BI	LN	LM	LO	KK
2002066	IQ	LM	LL	JJ	NR	IN	KK	MN	LL	NO
2002067	MR	MM	LM	JJ	NR	JM	KL	JJ	LL	KK
2002068	IM	LL	MM	JK	LL	JQ	LL	LL	LL	KN
2002069	MP	LN	MP	JM	LL	BJ	LN	JO	LM	OO
2002070	IR	LL	BM	JO	KL	IJ	KL	JM	LO	KM
2002071	RR	LL	LM	JO	KN	BB	KM	JM	LM	NO
2002072	IP	LM	LL	JO	KN	HN	MN	LM	LM	KO
2002073	IQ	LL	LL	JO	LN	IN	LN	JM	MM	KN
2002074	IR	LN	MN	JP	KK	BF	NN	JN	LM	KO
2002075	LL	LL	LL	KN	LL	MN	MN	JJ	MM	KN
2002076	IP	LL	MN	KO	OO	BF	MN	JJ	MM	NO
2002077	MP	LM	LP	KP	KR	QQ	LM	JJ	LM	NO
2002078	IM	MN	KN	MP	LN	IN	MN	LN	LM	NN
2002079	IM	LM	LM	OO	LL	IN	LN	MM	LO	MO
2002080	IQ	LL	BN	JP	OQ	BH	LO	JM	LO	MN
2002081	MP	LL	LM	JP	KO	BJ	MM	JJ	LO	NN
2002082	PR	LN	LM	KO	LL	BN	MM	JL	LM	NO
2002083	RR	LN	BL	KO	NO	BN	MM	LM	LM	NN
2002084	PR	LL	MM	JO	OO	BR	MM	JM	LL	NN
2002085	MP	NN	KK	KO	MM	FN	MN	JM	LL	NQ
2002086	IR	LN	BL	JO	NN	FN	MN	MN	LM	NO
2002087	OP	LL	LP	JP	KN	JN	KM	MM	LM	KN
2002088	PR	LN	MN	JP	KK	JN	LL	LM	LL	KN
2002089	PR	LL	LL	JP	LN	NQ	LM	LM	LM	KO
2002090	MP	LL	BK	KO	LL	QQ	KL	JJ	LM	OR
2002091	II	LL	KP	JO	KK	QQ	MM	JN	OO	NN
2002092	RR	LN	LL	JO	OO	RR	MM	LL	LM	NO
2002093	PP	LL	BM	KO	NR	II	KM	JJ	LM	OR
2002094	IM	LM	MM	KO	NR	MN	LN	MM	LM	KN
2002095	RR	LL	MM	KO	OO	BB	KM	JM	LO	KN

2002096	LM	LL	LM	KP	LN	IN	KN	JO	MO	KN
2002097	OR	LN	LL	NP	NN	JO	LM	JL	LM	NN
2002098	RR	LL	BM	OO	OQ	BB	MN	LM	LL	KN
2002099	IQ	LL	LM	OP	KN	NN	KN	JM	LM	NN
2002100	PR	LM	BO	KP	LL	NQ	KK	JN	LO	QR

Table 14. 차마(망아지)의 개체식별을 위한 MS좌위의 인자형 조합

개체	VHL -20	VIAS -H39	ASB -25	UCDEQ -411	UM -010	VIAS -H64	UM -012	HTG7	HMS5	VHL -209
2102501	MR	LM	LL	PP	KN	NQ	LM	LM	LL	OO
2102502	MR	LM	BP	JO	LN	NN	KM	JM	LM	NO
2102503	IP	LL	LN	KP	NN	QQ	MO	NO	LL	NO
2102504	PR	MN	LL	PP	KN	NQ	LM	MN	LM	KO
2102505	MP	LN	LN	KL	KN	JQ	MN	JN	LM	KN
2102506	MR	LN	LP	OP	LL	JJ	NO	MM	LL	KO
2102507	MM	LN	LP	OP	KL	IJ	LM	LN	LL	KO
2102508	MP	LL	LP	PP	KK	JM	MN	LM	LL	KN
2102509	MP	LN	LP	OO	LR	JN	LM	LL	LL	OO
2102510	IP	LN	LL	NP	KN	NN	KM	LN	LM	KP
2102511	PP	LN	LL	OP	KN	QQ	MM	LN	MM	OO
2102512	MM	LN	OP	JP	KN	IN	LN	MM	LL	KN
2102513	PP	LM	LL	KP	KN	NN	LM	MM	LM	KO
2102514	MR	LN	LL	PP	KK	NN	MM	MM	LM	KK
2102515	MP	LM	KP	OO	KN	NN	KM	JM	LL	KO
2102516	MM	LM	LP	PP	NR	JQ	MN	LN	LM	OO
2102517	MP	LN	LL	PP	KN	NQ	MN	NN	MO	KO
2102518	MP	NN	LL	KP	KN	IQ	MM	NN	LM	KO
2102519	JM	LN	LL	OP	KK	MN	MN	JN	LM	KK
2102520	MP	LN	LP	KP	KM	JN	MN	JM	LM	KN
2102521	PP	LN	LL	KP	NN	IQ	MM	MM	LM	NO
2102522	IM	LM	LP	PP	MN	NQ	MN	MN	LM	NO
2102523	PP	LL	LL	KO	NQ	JN	MM	NO	LL	KN
2102524	JM	LL	LP	OP	KL	HQ	LM	LM	MM	KO
2102525	MR	LM	LM	PP	KN	JQ	MM	MN	LL	KN
2102526	MM	LN	BL	PP	KL	BN	MM	MM	LM	KN
2102527	PQ	LN	BL	JK	KM	BQ	MN	MN	LM	KQ
2102528	MP	LN	LL	PP	MN	NQ	MN	MN	LL	KO
2102529	OP	LL	LL	OP	KN	MQ	MM	LN	LM	KN
2102530	OP	LL	LL	NP	LN	NN	KM	LN	LL	OO
2102531	PP	LN	LL	KO	NR	JQ	MM	JN	LL	KN
2102532	MP	MN	LL	JP	KQ	NQ	LM	JN	LM	KN
2102533	PR	LM	LL	KP	KR	IN	LM	MM	LL	KO
2102534	MM	LN	BL	MP	KN	QQ	MN	MO	MO	KO
2102535	MM	LM	KL	KP	NP	NN	MO	MN	LL	OQ
2102536	MM	LN	LL	KP	KN	MQ	MN	MN	MO	KK
2102537	MM	LN	BL	KO	NQ	IN	MN	NO	LO	NO
2102538	JP	LL	LL	JP	KK	JQ	LM	LM	LL	KK
2102539	IP	MN	LL	KO	KN	QQ	KM	MN	LM	KN
2102540	MQ	MN	LL	JK	KQ	IN	MM	LM	LO	NO

Table 15. 개체식별을 위한 MS좌위의 부모집단의 인자형 조합

개체	VHL -20	VIAS -H39	ASB -25	UCDEQ -411	UM -010	VIAS -H64	UM -012	HTG7	HMS5	VHL -209	암/수 (M/F)
96000014	MM	LN	PP	OP	KL	JN	MN	LM	LL	KO	M
93000226	MP	LN	LL	KP	KN	NQ	MM	MN	LM	KO	M
98000039	MR	LM	LL	JO	NQ	IN	MM	MM	LO	NO	M
96000009	PP	LL	PP	MP	LM	JQ	LM	LM	LM	KK	M
74000239	JR	LL	LP	JO	NL	HN	KL	LL	LM	MO	F
79000247	MQ	LM	BL	JO	QN	IJ	MN	LO	LO	NN	F
79000253	PR	LM	LL	OP	RK	JN	LN	LL	LM	OO	F
80000217	MP	LL	LP	MP	LL	HQ	LM	JL	MM	KK	F
81000215	II	MM	KL	KO	MN	QQ	KM	MN	MM	KN	F
87000257	MR	LN	LP	OP	LK	MN	LN	LN	LO	KO	F
87000258	MP	LN	LL	KP	QK	IM	MM	NN	LL	KN	F
87000262	IM	LM	LL	JO	RQ	IN	LM	JN	LL	MN	F
87000263	MR	MM	LL	JK	RL	IQ	LM	JM	LL	KO	F
88000269	PR	LN	LL	OP	KK	NQ	LM	JL	LM	KO	F
88000274	MP	LL	BL	OP	RK	QQ	MN	JN	OM	KO	F
89000289	OP	LN	LL	OO	RR	JM	MM	JL	LL	NN	F
89000290	JM	LM	LP	KO	RK	MN	KN	JM	LM	KN	F
89000303	OP	LL	LP	KN	LL	NQ	KK	LL	LM	OQ	F
90000314	MM	LM	BL	OO	QM	II	MN	MO	OO	NN	F
91000326	QR	LL	BL	JM	MM	BQ	KN	MM	LL	OQ	F
91000337	IP	LM	KL	KO	NK	MQ	KM	JN	LM	NN	F
92000442	IM	LN	BL	MP	RK	MQ	MN	NO	LO	KN	F
93000463	PR	LM	LL	OP	RN	NN	KL	LM	LL	OO	F
93000467	PP	LL	LL	PP	KQ	JM	MN	MN	LL	KN	F
93000470	MP	LN	LL	PP	KM	IQ	KN	MN	LM	KN	F
93000471	PR	LL	LM	JP	NR	IN	MM	MN	LL	NN	F
93000472	MM	LL	BL	MP	KL	BQ	MN	MM	LM	KN	F
93000473	IP	LL	LN	OP	NN	NQ	KO	MO	LL	NN	F
93000477	MR	LM	LL	PP	MK	JN	LN	LM	LL	KO	F
93000478	MP	LL	BL	OP	QM	JJ	MN	MO	LL	KN	F
94000605	OR	LL	LL	JO	RN	MN	MM	LM	LL	NN	F
94000607	RR	LM	LN	LP	NN	JN	LM	MO	LL	KO	F
95000003	MR	LL	LL	PP	MK	JN	MM	JM	LL	KO	F
95000005	MO	LM	LP	MP	RM	JJ	NN	LM	LM	KO	F
95000009	IP	LM	KP	OP	NM	JQ	KN	MM	LM	KN	F
95000010	JM	LL	LP	JP	KN	HJ	LM	LM	LL	KM	F
95000012	PP	LN	LP	OP	RM	JQ	MN	JM	LL	KN	F
95000017	MM	LL	LL	OP	QK	IJ	LN	MN	LL	KN	F
95000019	MR	LM	LN	LP	NM	JJ	NO	JM	LL	KN	F
95000026	PR	LM	BL	JN	RN	NQ	KK	JM	LM	NN	F
96000019	MP	LL	LL	PP	QM	IQ	MN	MN	LL	KN	F
97000017	PR	LM	LL	JO	NN	NQ	KK	JM	LL	NN	F
98000008	PR	LM	LM	PP	RN	JN	MM	MM	LL	NN	F
98000033	IO	LL	LL	JN	LN	NN	KK	LM	LM	OP	F

Table 16. 개체와 부모의 MS 좌위의 인자형을 이용한 친자 판정성적

개체 (Progeny)	부 (Sire)	모 (Dam)	일치율 (Probability)	판정
2102501	93000226M	93000477F	1.00	친자
2102502	96000014M	95000026F	1.00	친자
2102503	93000226M	93000473F	1.00	친자
2102504	93000226M	94000607F	1.00	친자
2102505	93000226M	95000019F	1.00	친자
2102506	96000014M	96000013F	1.00	친자
2102507	96000014M	95000017F	1.00	친자
2102508	96000014M	93000467F	1.00	친자
2102509	96000014M	79000253F	1.00	친자
2102510	93000226M	98000033F	1.00	친자
2102511	93000226M	88000269F	1.00	친자
2102512	?	93000470F		부, 불명
2102513	93000226M	93000463F	1.00	친자
2102514	93000226M	95000003F	1.00	친자
2102515	96000014M	91000337F	0.90	MS 변이
2102516	93000226M	95000005F	1.00	친자
2102517	93000226M	88000274F	1.00	친자
2102518	93000226M	87000258F	1.00	친자
2102519	93000226M	89000290F	1.00	친자
2102520	93000226M	95000012F	1.00	친자
2102521	93000226M	93000471F	1.00	친자
2102522	93000226M	95000009F	1.00	친자
2102523	93000226M	93000478F	1.00	친자
2102524	93000226M	74000239F	1.00	친자
2102525	93000226M	98000008F	1.00	친자
2102526	93000226M	93000472F	1.00	친자
2102527	93000226M	91000326F	1.00	친자
2102528	93000226M	96000019F	1.00	친자
2102529	93000226M	94000605F	1.00	친자
2102530	93000226M	89000303F	1.00	친자
2102531	93000226M	89000289F	1.00	친자
2102532	93000226M	87000262F	1.00	친자
2102533	93000226M	87000263F	1.00	친자
2102534	93000226M	92000442F	1.00	친자
2102535	93000226M	79000222F	1.00	친자
2102536	93000226M	87000257F	1.00	친자
2102537	93000226M	90000314F	1.00	친자
2102538	93000226M	95000010F	1.00	친자
2102539	93000226M	81000215F	1.00	친자
2102540	93000226M	79000247F	1.00	친자

4) 개방집단과 폐쇄집단간에 효율성 비교분석

개방집단과 폐쇄집단간에 효율성을 비교분석하기 위하여 농가집단과 축산진흥원집단이 이용되었다. 농가집단은 근연관계가 비교적 없는 집단인 반면에 진흥원집단은 폐쇄유지되어 근연관계가 비교적 높은 집단이 되겠다. MS 좌위의 이용 효율성의 평가는 친자판정확률을 4가지(GEP, PAP, OPU, TPO) 조건에 따른 계산 방법으로 비교 분석하였다(Table 17).

분석한 결과 단일 좌위에만 의존했을 때 친자판정에 비교적 높은 정보를 제공할 수 있는 좌위는 VHL20, UM010, UCDEQ411, VIAS-H64 이었으며, 10개의 전체 좌위에 의존한 판정효율은 방법과 조건에 따라서 다소 차이가 있지만 96.15 %에서 100 %에 달하는 것으로 나타났다. 특히 부모와 자식에 대한 정보가 있는 경우에는 MS 좌위에 의한 친자판정효율은 농가집단에서는 100 %로 축산진흥원의 폐쇄집단에서는 99.996 %에 달하는 것으로 분석되었다.

축산진흥원집단에서 판정율이 100%에 다소 미흡한 것처럼 보이지만 이는 10만 건에 4회의 오판 확률로서 매우 작은 것이며 이의 현상은 이 집단의 개체들은 근친번식의 누적에 의한 MS 인자의 단순화와 인자의 고정화 진행되어 가고 있기 때문인 것으로 판단된다.

Table 17. MS의 10개 좌위를 이용할 때 유전자형에 따른 친자식별에 있어서 효율성 평가를 위한 친자판정 확률값(PE, Probability of Exclusion)

방법 MS좌위	GEP		PAP		OPU		TPO	
	농가	진흥원	농가	진흥원	농가	진흥원	농가	진흥원
VHL20	0.51359	0.64524	0.51359	0.64524	0.33752	0.47140	0.70137	0.82247
VIAS-H39	0.30083	0.22688	0.30083	0.22688	0.15625	0.09272	0.45209	0.36636
ABS25	0.29228	0.53134	0.29208	0.53134	0.13107	0.35151	0.46977	0.72413
UCDEQ411	0.50163	0.59343	0.50153	0.59343	0.32155	0.41545	0.69507	0.77376
UM010	0.58866	0.64404	0.58856	0.64404	0.40990	0.46977	0.77363	0.82482
VIAS-H64	0.56627	0.70925	0.56637	0.70925	0.38804	0.54667	0.75080	0.87532
UM012	0.44099	0.49376	0.44099	0.49376	0.26484	0.31852	0.62875	0.67512
HTG7	0.50255	0.48414	0.50265	0.48414	0.32463	0.30624	0.68467	0.66981
HMS5	0.23428	0.33309	0.23428	0.33309	0.11375	0.19372	0.36536	0.48102
VHL209	0.42890	0.45873	0.42890	0.45873	0.26639	0.28677	0.59582	0.64278
친자 판별력	0.99949	0.99740	0.99949	0.99740	0.98812	0.96159	1.00000	0.99996

*, GEP, PE by general exclusion probability; PAP, PE in terms of power of allelic probability; OPU, PE by one parent genotype unavailable; TPO, PE by given two parents, one offspring)

제 3 절 : 제주마의 혈통등록 체계 확립

1. 추진 전략 및 결과

농업·군사용 및 운반수단으로 이용되어 오던 제주마는 산업화에 따른 농기계 보급 및 운송수단의 변화로 '60년대이후 급격히 감소하여 '86년도에는 1,300여마리로 멸종위기까지 도달하였다.

제주마의 유전자원보존을 위하여 제주도에서는 제주마를 국가지정 천연기념물로 지정요청하였고, '86년도에 제주마가 천연기념물 제347호로 지정(70마리내외, 문화재청) 보호받게되어 멸종위기에서 벗어나게 되었다.

또한 '91년 한국마사회에서 제주마보호육성을 위하여 제주경마공원을 설립하고 제주산마경마시행으로 마필사육기반이 조성되었으나, 경마시행은 제주마의 교잡을 초래한 원인이 되기도 하였다. 경마는 경주능력이 우수한 마필을 필요로 하였고, 마필사육농가에서는 경주능력향상을 위하여 제주마의 개량보다는 단기간에 경주능력을 향상시킬 수 있는 외국산 마필과의 혼혈번식을 통한 마필생산으로 사육두수가 양적으로는 증가하였으나 순수혈통의 제주마 사육두수를 감소시키는 결과를 남겼다.

Table 18. 제주마 사육현황

(단위 : 마리)

구분	'60	'70	'80	'86	'90	'99	'00	'01	'02
농가수	4,736	4,064	1,541	413	295	167	216	265	265
마리수	12,077	7,606	2,401	1,347	1,835	3,478	5,484	6,306	7,282

현재 제주도에는 7,282마리의 제주마가 사육되고 있으며 제주경마장 경주용으로 1,141마리가 등록되어 500여 마리가 활용되고 있으며, 관광승마장(21개소)에서 승마용으로 1,234마리가 이용되어 관광수입원으로 활용되고 있으며, 기타 양축농가에서 번식용으로 4,907마리가 이용되고 있다.

순수혈통의 제주마 유전자원보존을 위하여 문헌적고찰을 통하여 제주마의 일반외모심사기준을 표 2와 같이 정립하여 제주마 순수혈통보존을 위하여 제주마외모기준을 정립하였다.

Table 19. 제주마의 일반외모심사 기준

부 위	설 명	배점기준	
		암	수
1. 일반외모 체형, 체격 품위, 자질 성정	○ 엉덩이 높이(尻高)가 체고(體高)보다 높거나 같으며, 흉위(胸圍)는 넓고 관위(管圍)는 좁으며 체폭(體幅)이 좁고, 지장율(肢長率)은 크며, 체형은 소형이면서 강인한 인상을 주는 것	9	11
	○ 체격은 왜소하며 중구(中驅)는 약간 길고 체위 각 부위의 균형이 양호 하며, 외모는 비교적 경쾌 할 것	7	8
	○ 고장(尻長), 견장(肩長), 상박장(上膊長), 대퇴장(大腿長)이 비교적 작아서 경종형(輕種形)을 많이 혼합한 독특한 체형을 한 것	7	8
	○ 암수 각기 고유의 성징을 구비하면서 성질은 온순하며 영리하고, 운동에 끈기를 보이고 동작은 침착하며 체질과 지구력이 강인 할 것	7	8
	소 계	30	35
2. 머리, 목	○ 머리형태는 직두(直頭)에 가깝고 체격에 비해 머리가 크고 눈은 둥글 것	5	5
	○ 목은 굵고 수평경(水平頸)에 가까운것	5	5
	○ 갈기 털은 다른 종의 말보다 많고 윤택할 것	5	5
	소 계	15	15
3. 전·중구, 어깨, 등, 배, 허리	○ 기갑은 약간 길면서 높은 형태를 이루며, 어깨는 적당한 경사와 알맞은 길이에 부착이 좋고 상박(上膊) 및 견부(肩部)의 부착상태가 양호하면서 여유가 있는 것	8	8
	○ 등의 모양은 단배형(短背形)으로 넓고 곧으며, 적당한 경사를 이룰 것	6	6
	○ 배는 짧고 굵으며 허리의 형태는 거의 저요(低腰)를 이룰 것	6	6
	소 계	20	20
4. 후구 엉덩이, 꼬리, 유기, 생식기	○ 엉덩이는 완만한 경사를 이루며 궁둥이는 돌출되지 않을 것 (卵圓尻)	7	6
	○ 꼬리털은 굵고 길이는 적당하며 힘이 있고 부착이 좋으며, 향문은 잘 긴장 될 것	7	6
	○ 암말은 유방이 균등하게 발달하고 유연하며 유두의 위치 및 그 형태가 좋고, 음부는 발육이 정상이고, 숫말은 고환이 정상이고 표피가 늘어나 있지 않은 것	9	6
	소 계	23	18
5. 지제, 보양	○ 다리는 짧고 굵으며 발굽은 굵고 견고할 것	6	6
	○ 걸음걸이는 바르고 탄력이 있으며 좌우요동이 적고 발디딤이 확실할 것	6	6
	소 계	12	12
계		100	100

※ 실격조건

1. 부당한 수단으로 실격조건을 은폐시킨 것
2. 다음의 유전적 불량형질이 있다고 판단되는 것
 - 1) 동요병 (Wobbler) 2) 백내장 (Cataract)
 - 3) 앵무새입증 (Parrot Mouth) 4) 천명증 (Laryngeal Hemiplegia)
 - 5) 단고환 (Monorchidism) 6) 잠복고환 (Cryptorchidism)

제주마 혈통관리를 위하여 제주마 외모심사기준에 적합한 마필에 대하여 12개월(체고, 배고, 고고, 흉위, 흉심, 흉폭, 요폭, 곤폭, 고장, 체장, 두장 및 전관위)를 측정하여 개체별 발육상태를 조사하였으며, 연령별 표준발육 기준치는 양 등(2002년)이 보고한 자료를 인용하였다.

Table 20. 연령별 발육성적기준

(단위 : cm)

구 분		6월령	12월령	18월령	24월령	30월령	36월령	42월령	48월령
체 고	♀	98.5	109.1	114.1	116.1	116.8	117.6	119.0	121.0
	♂	97.0	107.6	113.1	115.9	117.7	119.5	121.8	124.5
배 고	♀	99.1	108.6	112.3	113.3	113.3	113.7	114.7	116.1
	♂	98.3	107.3	111.4	113.2	114.5	116.4	118.8	121.1
고 고	♀	102.3	113.0	117.7	119.0	119.1	119.1	119.6	120.4
	♂	100.8	111.3	116.4	118.6	119.5	120.4	121.7	123.0
흉 위	♀	107.1	123.3	130.7	133.4	134.7	136.5	139.8	144.4
	♂	105.3	121.0	128.4	131.7	133.7	136.5	140.8	146.1
흉 심	♀	40.7	47.7	50.9	52.2	52.9	53.7	55.0	56.4
	♂	39.8	46.7	50.3	52.0	53.2	54.7	56.7	59.1
흉 폭	♀	19.6	22.5	24.2	25.2	26.1	27.0	28.2	29.6
	♂	19.2	21.8	23.3	24.3	25.2	26.1	27.0	27.4
요 폭	♀	25.0	29.1	31.4	32.8	33.8	34.8	36.0	37.1
	♂	24.4	28.4	30.7	32.2	33.7	35.4	37.5	39.8
고 폭	♀	27.8	33.5	36.3	37.7	38.7	39.7	41.3	43.0
	♂	27.2	32.5	35.2	36.6	37.5	38.3	39.2	40.1
체 장	♀	96.9	111.7	117.7	119.0	118.8	119.1	120.9	123.9
	♂	96.0	109.9	115.8	117.4	117.7	118.7	121.1	124.9
두 장	♀	36.4	40.8	42.9	43.9	44.6	45.5	46.8	48.5
	♂	36.4	40.8	43.2	44.5	45.3	46.2	47.2	48.5
전관위	♀	12.9	14.2	14.7	14.8	14.7	14.6	14.5	14.3
	♂	13.1	14.5	15.1	15.3	15.3	15.3	15.3	15.2
고 장	♀	30.8	34.5	36.3	36.8	36.8	36.7	36.6	36.4
	♂	30.3	34.0	35.7	36.4	36.7	37.2	37.9	38.8

제주마의 외모심사기준, 표준발육성적기준표에 의하여 건강상태가 양호한 개체에 대하여 제주마 기초등록관리를 하고 있으며, 기초등록관리 마필사이에서 태어난 개체에 대하여 혈통등록관리를 하고 있다.

시험수행 이후 기초등록관리 및 혈통등록관리하고 있는 마필의 수치는 표 4와 같다.

Table 21. 기초 및 혈통등록관리 마필 (단위 : 마리)

등록두수	혈 통 등 록			기 초 등 록		
	소계	진홍원	농가	소계	진홍원	농가
266	185	87	98	81	-	81

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2000-2001)	○ 제주마 특이 RAPD 다형성 분석 및 후보유전자 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 마 품종의 선정 및 DNA 준비 <ul style="list-style-type: none"> - 더러브렛, 몽고마, 제주마 - 혈액으로부터의 DNA 분리·정제 ▶ 품종간의 RAPD 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - BS에 따른 품종간 유전거리 추정
	○ Microsatellite 후보 좌위 결정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 적정 microsatellite 후보 좌위 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 말의 유전자지도상의 microsatellite 20여 좌위선정 ▶ 후보좌위에서의 제주마 집단의 다형성 파악 <ul style="list-style-type: none"> - 다형성 수준, 단편의 크기, 적정 PCR 증폭여부 등을 파악 - 효율적인 유전자좌위 선별 - 20여 좌위를 대상으로 한 제주마의 유전자형을 결정
	○ 제주마 집단의 기초조사 및 기본 등록	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈통등록을 위한 제주마 집단의 사육 현황 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 각 지역별 농가별 개체에 대한 자료 수집 (개체별 체형, 표현형관찰, 가계도확인)
2차년도 (2001-2002)	○ 제주마 특이 표지인자의 확보 및 특성파악	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 품종 특이 RAPD단편의 염기서열 결정 <ul style="list-style-type: none"> - 품종 특이 RAPD 표지인자 분리·정제 - cloning 및 염기서열 결정 - GenBank homology 확인
	○ 선별된 microsatellite 좌위들에 대한 유전자형 판별 및 유전상관분석	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 선별된 microsatellite에 대한 multiplex PCR 조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 증폭 단편의 크기 범위, primer 결합 온도, PCR 증폭 조건, primer간의 상보성 여부를 점검하여 PCR 실시 및 적정 PCR 증폭조건을 가지는 primer set를 조합 ▶ 대립유전자 빈도에 따른 품종집단간의 상관관계 추정
	○ 제주마의 기초등록, 심사기준 설정, 등록체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 개체 조사 결과를 바탕으로 한 기초 등록 수행 및 개체별자료의 database 구축 ▶ 개체 조사 결과를 바탕으로 제주마 등록 심사기준 확립 ▶ 제주마 등록체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 표현형 심사, 자료관리, 개체관리 등에 대한 등록에 대한 체계 수립

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
3차년도 (2002-2003)	<p>○ 제주마특이 단편의 신장 PCR primer 설정</p> <p>○ 확립된 microsatellite 유전자형을 이용한 친자감별 및 개체 식별 실시</p> <p>○ 개체 유전자형이 도입된 제주마 혈통등록 체계의 확립</p>	<p>▶ 제주마특이 단편의 신장 PCR primer 설정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제주마 특이 단편의 염기서열을 바탕으로 신장 primer set 작성 - 작성된 primer를 이용한 PCR 증폭조건 확립 - 품종별 다수의 개체를 이용한 품종특이성 재현 확인 <p>▶ 친자감별 시스템 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 가계내의 개체들에 대한 microsatellite 유전자형 결정 - 근연관계가 없는 개체들에 대한 유전자형 파악 및 가계내 개체와의 비교 - 가계내 유전자형 전이양상 확인 및 친자확인에 대한 오차확률 추정 <p>▶ 개체 특이 유전자형 결정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제주마 임의 개체들에 대한 microsatellite 좌위들에서의 유전자형 결정 <p>▶ 제주마 등록체계내에 친자감별과 개체식별 유전자형의 이용</p> <ul style="list-style-type: none"> - Microsatellite좌위 들에 대한 개체별 유전자형을 바탕으로 개체 관리 체계 확립 - 제주마 특이 표지인자의 개체별 진단결과를 혈통관리 체계에 도입

2. 연구개발목표의 달성도

유전자원들의 보존과 지속적인 이용을 위하여 국가적이고 국제적인 노력 및 공조체제가 이루어지고 있는 반면 우리 나라의 경우 재래유전자원의 발굴, 보존, 특성화를 위한 연구 체계가 구축이 되어있지 않고 제주마의 경우 지역적인 유전자원 으로서만 여겨지고 있을 뿐 경제적 가치증진을 위한 국가적 차원의 연구가 절실히 요구되어 진다. 특히 제주도는 세계최초의 재래마 경주가 이루어지고 있는 곳으로 제주마 유전 자원의 효율적 이용과 국가 관광산업 자원으로로서의 역할도 담당하고 있다. 따라서 제주마의 특이성 규명은 더없이 중요하다고 본다.

본 연구에서는 연구대상으로써 현재 산업적으로 유용하게 이용되고 있을 뿐 아니라 국내 고유 유전자원으로써의 제주마를 대상으로 유전자 수준에서의 특이성을 확립함으로써, 국제적인 재래자원 보존에 대한 관심의 증가와 필요성의 증대 뿐 아니라, 국내 고유의 문화적 자원으로로서의 제주마를 유지 보존하는 것은 국가적 자원으로써 중요한 의미를 둘 수 있을 것이다. 조상들로부터 대대로 이어져 내려오는 문화의 일환으로 재래가축, 제주마를 이용한 승마, 토속마 경주 등은 국민들로 하여금 국가적·문화적 만족감을 높게 할 것이다. 또한 제주마가 가지는 독특한 유전적 특성을 구명하고 이를 바탕으로 하여 혈통을 등록 확립할 뿐 아니라, 제주마를 이용한 경마산업과 승마산업 등에 독점적인 특이성을 부여하게 되어 사육농가들에게 제주마 보존의 사명감을 고취할 수 있을 것으로 기대된다. 제주마 유전 특성 확립에 의해 세계 최초 국적있는 재래마 경주에 대한 사회적 신뢰 확보와 여론의 지지기반 확립에 필수적인 것으로 판단된다.

제주마 특이 RAPD 다형성 분석 및 후보유전자 분석에는 마품종을 5품종으로 확대하여 품종간의 품종간의 RAPD 다형 탐색을 위하여 1978개의 RAPD primer을 사용하여 제주마 특이 표지인자의 확보(30여개) 및 특성 파악을 계획진도되로 수행하였으며, 종 특이 RAPD단편의 염기서열결정 품종 특이 RAPD 표지인자 분리·정제 cloning 및 염기서열 결정 GenBank homology 확인하는 과정을 걸쳐 제주마특이 단편의 신장 PCR primer 설정 제주마 특이 단편의 염기서열을 바탕으로 신장 primer set 작성 작성된 primer를 이용한 PCR 증폭조건 확립 품종별 다수의 개체를 이용한 품종특이성 재현 확인을 하여 제주마의 유전적 특성을 확립 하는데 많은 기술적 기여를 하였다고 사료되며. 또한 최근 가장 널리 쓰이고 있는 생물유전정보 분석기술인 Microsatellite loci 분석에 의한 품종별 유전적 다양성 및 품종 집단간 유전적 거리 및 유연관계 분석을 추가로 실시하여 제주마의 유전적 특성을 확립하는데 기대이상의 연구결과와 기술적인 결과가 초래됐다고 사료된다. 이상의 연구결과를 종합해 볼 때 제주마는 독특한 유전적 특성을 가지고 있는 것으로 조사되었고, 물론 타 Mong품종과 유전적 거리가 가까운 점은 있으나 소, 돼지 역시 아시아 계통들은 진화론적으로 그 기원이동일한 것으로 사료되므로, 특히 본 연구결과 중국말, 교잡종, 더러브렛종이나 쿼터호스와는 뚜렷한 유전적 특성 차이를 나타내었고, 특히 천년기념물347호로 지정되어 축산진흥원 보유중인 말들은 유전적 순수성이 높은 것으로 관찰 되었다.

본 협동과제인 제2과제도 계획진도에 따라 전년도에 개발된 10개의 MS 좌위들을 이용하여 100두의 농가의 등록 후보마의 유전자형 분석을 완료하여 개체들간

의 비교분석을 한 결과 동일한 유전자형을 소유한 개체가 전무한 상태로 이들 MS 좌위들은 개체식별용으로 활용가치가 충분한 것으로 판단되었다.

축산진흥원에서 혈통보존되고 있는 집단에서 자마(망아지)집단과 부모집단의 유전자형 분석이 완료되었고, 분석된 MS 좌위의 유전자형에 의거하여 친자판정이 가능함을 확인하였다. 또한 부모에 대한 정보가 전혀 없을 경우에도 집적된 데이터뱅크를 이용하면 부모의 추적도 가능한 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구는 개발목표에 대한 달성도가 100 % 에 도달했고, 이로서 MS 좌위를 이용한 제주마의 친자감별 및 개체식별 기법을 마련했다고 하겠다

3 관련분야의 기술발전에의 기여도

① 연구성과

- MS 좌위를 통한 개체식별기법의 개발과 실용화가 가능케 됨.
- 유전현상을 보이면서 다형현상이 높은 10개의 MS좌위에 대한 획득성과는 제주마에 대한 분자유전학적인 친자판정을 가능케 함.
- 제주마의 혈통확립을 위한 친자판정의 체계를 완성하였다. 이로서 친자판정에 따른 시비와 혈통추적의 문제가 해결됨.
- 본 연구결과물과 분석방법에 대한 기법은 제주도 축산진흥원에서 진행되고 있는 제주마 등록관리사업의 효율성에 가장 기본적이면서도 필수적인 수단을 제공하게 됨.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

개체식별 및 친자감별 기법확립을 위한 MS 유전좌위 선발과 이에 따른 실용적인 연구결과물은 개체식별 및 친자판정에 효율적으로 이용될 수 있는 것으로 검토되었다. 이로서 현재 제주도 축산진흥원에서는 제주마 등록사업을 위한 개체식별 및 친자판정에 본 연구결과물과 개발된 방법을 이용하게 될 것이다. 이에 따라 제주마의 보존과 활용을 위하여 분자유전학적인 접근법을 이용한 혈통정립사업이 진행될 것으로 진단되고 있다.

6장 참고 문헌

Bailey, E. and T. L. Lear. 1994. Comparison of Thoroughbred and Arabian horse using RAPD markers. Anim Genet. 25:105-108.

Cargill, S. L., G. B. Anderson and J. F. Medrano. 1995. Development of a species - specific marker using RAPD analysis to distinguish between sheep and goats. Anim. Biotechnol. 6:93-100.

Cho, B. W., K. C. Hwang, H. K. Lee, K. J. Lee and J. Y. Han. 1997. Application of DNA markers to characterize cattle breed using random amplified polymorphic DNAs. Anim. Genet. and Breeding. 1:39-48.

Hong, Y. H., I. C. Cheong, T. H. Kim, H. B. Kim, D. H. Yoon, H. S. Kim, B. W. Cho and J. Y. Han. 1998. Development of sequence characterized amplified regions(SCARs) showing Korean cattle(Hanwoo) specificity. Anim. Genet. and Breeding. 2:107-114.

Ishida, N., T. Hasegawa, T. Oyunsuren and H. Mukoyama. 1996. PCR-RFLP analysis of the cytochrome b gene in horse mitochondrial DNA. Anim. Genet. 27:359-363.

Kemp. S. J. and A. J. Teale. 1994. Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveal polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiated *Bos indicus* and *Bos taurus*, the major subspecies of domestic cattle. Anim Genet. 25:82-88.

Kim, K. I., Y. H. Yang, S. S. Lee, C. Park, R. Ma, J. L. Bouzat and H. A. Lewin. 1999. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. Anim. Genet. 30:102-108.

Paran, I. and R. Michelmore, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning of a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Habor Laboratory.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. A. Rafalski and S. V. Tingy. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

Innis, M. A. Gelfand, D. H., Suninsky, J. J. and White, T. J. 1990. PCR Protocols, ed 1. Academic Press, San Diego, p 482.

Jacquard, A. 1974. The genetic structure of population. Springer, Verlag. Berline.

Jeffreys, A. j., Wilson, V and Thein, S. L. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. Nature 316:76

Krawetz, S. A. 1989. The polymerase chain reaction:opportunities for agriculture. Ag. Biotech. News Infomation. 1:897

Michelle Pellissier Scott, Kenneth M. Haymes and Williams Scott N. 1992. Parentage analysis using RAPD PCR. Nucleic Acids Research. 20:5493.

Quiros, C. F., Hu, J. and Delseny, M. 1991. Development and chromosomal locaticon of genomespecific markers by polymerase chain reaction in Brassica. Theor. Appl. Genet. 82:627

Rohrer, G. A., Taylor, J. F., Davis, S. K., Sanders. J. O., Turnerand, J. W. and Womack, J. E. 1991. Randomly amplified polymorphic DNA markers(RAPD) between Angus and Brahman cattle in a study to identify genes controlling carcass merit. J. of Anim.Sci. 69(suppl.1):201.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Manaitis, T. 1989. molecular cloning a laborarory manual. 2nd. ED. Cold spring Habor Laboratory.

SAS. 1985. SAS user guide. Statistical analysis system institute.

Waugh, R. and Powell. W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. TIBTECH. 10: 186.

Williams, J. K. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski,J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucleic Acids Res. 18:6531.

Zhang,Y., Wang, Y., Cao, H., Pang, Z., Chen, Y. and Lu, J. 1990. Hemoglobin polymorphism of chionese yellow cattle breeds and their classification. Characteristics of chinese yellow cattle ecospecies and their course of utilization. Agricultural Publishing House, Beijing, Chian.