

석사학위논문

RAPD를 이용한 온주밀감의 품종식별

제주대학교 대학원

원예학과



1996 년 12 월

RAPD를 이용한 온주밀감의 품종식별

지도교수 한 해 룡

한 봉 훈

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

1996년 12월

 제주대학교 중앙도서관
한봉훈의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	文斗 趙
위 원	朴 康 奎
위 원	李 海 容

제주대학교 대학원

1996년 12월

Identification of Cultivars by RAPD
in Satsuma Mandarin

Bong Hun, Han

(supervised by professor Hae Ryong, Han)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1996. 12.

목 차

Summary	-----	1
I. 서론	-----	2
II. 연구사	-----	4
III. 재료 및 방법	-----	6
IV. 결과 및 고찰	-----	12
V. 적요	-----	21
VI. 참고문헌	-----	22



Summary

For the identification of cultivars of satsuma mandarin by RAPD, total DNAs from 21 cultivars were randomly amplified by PCR using 62 primers of 2-base 10-mer 67% G+C. The results obtained were summarized as follows;

1. Among 62 primers, 30 primers generated observable bands after PCR.
2. Four among the above 30 primers resulted in the different band patterns in 4 cultivars of Miyagawa, Aoe, Aoshima, Silver hill.
3. 21 DNA fragments showing differences among cultivars resulted from PCR using 4 primers.
4. 15 cultivars among 21 tested showed the unique combination of bands.
5. Dendrogram obtained from RAPD was not consistent with the traditional systematic diagram.
6. Cultivars of satsuma mandarin were suggested to be identified by RAPD with the selection of more primers.

I. 서론

1910년경 제주도에서 재배되기 시작하여 1960년대 이후 제주도의 주요 산업으로 등장한 감귤의 재배면적은 1995년 현재 21,605ha이고 그중 온주밀감의 재배면적은 21,178ha로 감귤재배면적의 98%를 차지하고 있다. 농가는 26,589 가구에 이르고 있고 조수입은 제주 GRP의 14%를 차지하고 있으며, 농업조수익의 52%정도를 점하고 있어 제주 경제의 상당 부분을 차지하고 있다. 과실생산량은 538,916톤(M/T)으로 국내 과종의 28,4%를 점유하고 있다(농림수산부, 1995).

제주감귤 품종의 대부분은 온주밀감이지만 일본에서 도입된 묘목이 정확한 경로를 거치지 않았거나 정확한 경로를 거쳐서 도입이 되었다하더라도 도입 후 과실 간에 차이를 보이는, 품종이 불분명한 것이 많아서 확실한 품종의 식별이 시급한 실정이다.

감귤류의 분류는 잎, 과실, 꽃등의 형태적 형질과 양적 형질을 수리화한 다변량 해석(金 등, 1985)과 다형현상(polymorphism)을 보이는 동위효소 분석(문, 1986)등이 이루어져 왔다. 동위효소는 환경에 의해 효소형은 변하지 않으나 (Arulsekhar 와 Parfitt, 1980) 식물의 발육단계나 추출에 사용된 조직의 차이에 따라 영향을 받을 수 있다(Mcmillin, 1983., 김, 1993). 그러므로 이러한 방법들은 실험의 정확도가 떨어지거나 시험시기에 따라 결과가 달라질 수 있고, 밀감류와 같이 아조변이가 일어난 개체의 판별은 거의 불가능하다.

세계 각처에서 감귤류의 계보작성은 물론이고 과실의 품질에 관여하는 여러 가지 유전자를 찾는 데, DNA 염기서열의 주기적으로 반복된 변이를 조사하는 DNA 지문법(DNA fingerprinting)(Jeffrey, 1985)과 DNA 염기서열의 특정부위를 인지하는 제한효소 처리에 의한 단편 차이를 이용하는 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)(Botstein, 1980), random primer를 이용하여 다형성을 조사하는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)(大村, 1994)등이 이용되고 있다.

그렇지만, DNA 지문법이나 RFLP방법은 DNA 염기 서열상의 자연돌연변

이에 의한 염기하나의 차이도 서로 다른 결과를 나타낼수 있어 변이 식별이 가능하지만, 시간과 노력이 너무 소요되고 다른 방법보다 상대적으로 비용이 많이 들며 위험 부담이 있는 동위원소를 사용해야 하고, 기술 습득하는데는 많은 기간이 소요되는 등 제약점이 있다(신, 1993).

PCR(polymerase chain reaction)이 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)기술에 쓰이면서 종의 분류와 유전자 지도 작성에 많이 이용되고 있는데 이것은 형성되는 마커 자체의 특징이 정확하지 않다든지 유전 마커로는 조합간에서의 공동화가 곤란한 것이 많은 등의 결점을 갖고 있어서 계보분석상의 약점이 되고 있기도 하지만, 동위효소 혹은 RFLP에 비교하여 개놈전체에서의 다형정보를 정리할 수 있는 이점이 있다. 무엇보다도 RAPD기법은 실험조작이 간편하고, DNA다형성을 보기가 쉬우며, 소량의 DNA로도 분석이 가능하고, 동위원소를 사용하지 않는 안전성과 실험비용이 상대적으로 저렴한 장점으로 인해 여러 분야에서 이용되고 있다.

온주밀감의 품종을 식별함으로써 제주에 맞는 특정 품종을 재배하여, 정확한 상품을 출하하여 경쟁력을 높이는 한편, 보다 나은 품종을 육성하고 보존하기 위한 유전 자원의 확보 차원에서와 돌연변이체(아조변이, 집목부변이 등)를 구별하고 교잡육종을 통한 품종 육성기간의 단축이라는 점에서도 품종 식별은 필요하다. 그래서 이 실험은 RAPD를 이용한 온주밀감의 품종 식별을 시도하고자 수행하였다.

II. 연구사

온주밀감의 원산지는 일본으로 지금으로부터 300여년 이전에 중국의 浙江省에서 들여와 九州에서 재배되었던 일종의 감귤실생에서 지주변이가 발생하여 씨가 없는 양질의 본종이 되었다고 한다. 이러한 온주밀감의 초기의 계통은 原木에서 在來系와 伊木力系로 나뉘고, 재래계는 다시 平系, 池田系, 早生系(靑江早生, 宮川早生)로, 伊木力系는 尾張系로 나뉘어 각각 여러 갈래로 분화되어 왔는데, 보통은 숙기별로 極早生, 早生, 普通温州인 3부류로 나누어지고 있다(岩政, 1976).

온주밀감은 아조변이, 우발실생 등과 같은 개체에서 비롯된 품종 또는 계통이 수십종에 이르고 있어서 숙기별로 다양하게 나뉘지고 있다. 그동안에는 다행히도 다른 과실에 비해 외형적인 특징이 그나마 다양하기 때문에 여러 가지 분류시도가 이루어져 왔는데 위에서 언급했듯이 지난 20여년 사이의 분류 시도를 보면 다양한 방법으로 온주밀감을 분류하려 했던 시도들을 엿볼 수 있으며 분자생물학적 접근은 비단 온주밀감에서 뿐만 아니라 모든 식물 중, 특히 식량자원식물에서 유전자의 확보를 위한 기초다지기의 측면에서도 활발히 이루어지고 있다고 할 수 있을 것이다.

감귤속 식물에 있어서는 Hooker(1875)가 4종을 보고한 이래 田中(1977)의 분류, Swingle(1967)의 분류가 가장 큰 뼈대를 이뤄 왔고, 이것은 하나의 text로서 현재에도 여러 가지 시도의 비교대상으로서 중요한 몫을 차지 하고 있다.

1980년대 초반까지의 형태적 특성에서 본 계통간의 분류, 80년대 초반에서 부터의 동위효소, 페놀화합물의 분석 그리고 이것들의 품종간 계절적 추이, 80년대 후반부터 90년대에 들어서는 DNA fingerprint의 작성, RFLP 분석에 의한 품종의 동정 및 분류, PCR법의 등장 및 이의 개량에 의한 RAPD를 비롯한 여러 가지 분자생물학적 접근 등이 그것인데, 이를 토대로하여 요사이 는 형태적 접근, 생화학적 접근(동위효소, 페놀화합물 등), 분자유전학적 접근의 세가지를 종합한 분류시도까지 이루어지고 있다(Dario Grattapaglia 등,

1992., 유, 1993., 신, 1993).

RAPD 분석은 Williams 등(1990)의 보고 이래, 과수에서도 품종동정, 육종 집단의 해석 및 조기선발, 유전자 지도 작성, 계통분류로의 응용 등 여러 가지 이용 가능성이 검토되고 있다(Nybom, 1994; 大村, 1994). RAPD 분석에서는 종래의 동위효소 분석과 같이 외적 환경이나 영양상태 등의 영향을 받지 않고 또한 기관 특이성 없이 그 이용성도 높다고 생각된다. 게다가 시료로 소량의 DNA를 필요로 하는것만으로 그 다형의 검출방법도 간단하다는 등, 실제 육종 현장에서 분자마커로서의 유효성도 크다. 다만 RAPD 분석을 실제에 응용할 경우, 가장 문제가 되는 것은 그 재현성이다. RAPD 재현성에 영향을 미치는 요인으로서 주형으로 사용하는 DNA의 양과 질(Gogorcena · Parfitt, 1994 ; Graham 등, 1994 ; Williams 등, 1994), 반응액의 buffer 조성 및 어닐링 온도(Levi 등, 1990), 여러 가지 요인이 보고되고 있고 분석하는 수종에 따라서도 그 적정조건은 다른 것이라 여겨지고 있다. RAPD 분석은 감귤의 유연관계 추정(Omura 등, 1993), 모친과 화분친 교배에 의한 F1검정(Omura 등, 1993), 주심배와 교잡배 실생 구별(Luro, 1995), 감귤키메라 품종의 식별(Sugawara 등, 1995), 전기융합에 의한 cybrid 유기(Moriguchi 등, 1996)등에서 RAPD 표지(marker) 선발과 유전자 지도(gene mapping)작성을 위한 기초자료로 이용되고 있다.

국내에서도 감귤의 계보작성에 관한 논문들이 출간되고는 있으나 주로 재래귤과 잠감, 오렌지류 등의 비교 및 계보 작성에 그치고 있고, 온주밀감의 여러 계통에 관해서는 연구가 미흡한 실정이다(문, 1986., 김, 1988., 이, 1993., 신, 1995., 오, 1996).

최근 RAPD에 의한 품종의 동정에 있어서는 온주밀감은 단일 품종이어서 외견상 차이가 많이 나는 계통을 사용하여 분류를 시도하였지만 불가능 하였다는 보고(Kagami 등, 1994)와 더 많은 프라이머를 사용해야겠다는 보고와(신 등, 1995., 이 등, 1993), 그리고 RAPD는 random primer를 사용하는 것이기 때문에 다양한 primer를 이용한다면 온주밀감의 품종 역시 분류가 가능할 것이라는 오(1996)의 보고와 같은 긍정적인 사례도 있었는데, 아직 제주에서 재배되고 있는 온주밀감품종을 다수 공시하여 RAPD분석을 한 예가 없다.

II. 재료 및 방법

식물재료는 제주도 농촌진흥원 상귀시험포장 및 도련 모수원에 재식된 은주밀감 품종 중 21종을 공시하였다(표 1). 병충해의 피해가 없는 음엽인 봄순을 택하여 채취하고 아이스박스에 넣어 실험실로 옮긴 뒤, 수돗물에 깨끗이 씻어 물기를 제거하고 -70℃의 deep freezer에 보관 하였다가 DNA를 분리하였다.

Table 1. List of 21 Satsuma Mandarin cultivars in Cheju for RAPD analysis

No.	Name	No.	Name
1	宮川早生 Miyagawa Early	12	富士早生 Fuji Early
2	新益早生 Sinik Early	13	久能温州 Kunou unshiu
3	岡本早生 Okamoto Early	14	Silver hill Silver hill unshiu
4	徳森早生 Tokumori Early	15	林温州 Hayashi unshiu
5	森早生 Mori Early	16	今村温州 Imamura unshiu
6	上野早生 Ueno Early	17	青島温州 Aoshima unshiu
7	原口早生 Haraguchi Early	18	壽太郎温州 Zutarou unshiu
8	興津早生 Okitsu Early	19	紀州葵温州 Kishuaoi unshiu
9	高林早生 Kobayashi Early	20	愛媛9号 Ehime 9
10	青江早生 Aoe Early	21	大谷系林 Ookeihayashi
11	橋本早生 Hasimoto Early		

DNA분리 과정에서 CTAB extraction buffer, 76% EtOH 0.2M NaOAc, 76% EtOH 10mM NH₄OAc, TE pH 8.0 buffer는 Chee 등(1991)의 방법(표 2)을, 그 외의 시약 조제 및 DNA band의 관찰 등에는 Sambrook 등(1989)의 방법을 따랐다. 원심분리기는 비전과학(주)의 Vs-21 CF 모델을, DNA band의 관찰은 UV transilluminator(Vilber lourmat. TFX-20M)를 사용하였다.

Table. 2. Solutions used for the extraction of DNA

CTAB extraction buffer(stock 1 liter)	
H ₂ O	730ml(sterile, double-distilled)
1M Tris-HCl pH 7.6	100ml
5M NaCl	140ml
0.5M EDTA pH 8.0	20ml
CTAB	10g
β -mercaptoethanol	10ml(add just prior to use)

76x EtOH, 10mM NH₄OAc(stock 100ml)	
Absolute EtOH	76ml
1M NH ₄ OAc	1ml
H ₂ O	23ml(sterile, double-distilled)

76x EtOH, 2M NaOAc(stock 500ml)	
Absolute EtOH	380ml
2.5M NaOAc pH 6.3	40ml
H ₂ O	80ml(sterile, double-distilled)

TE pH 8.0 buffer(stock 100ml)	
1M Tris-HCl pH 8.0	1.0ml
0.5M EDTA pH 8.0	0.2ml
H ₂ O	98.8ml(sterile, double-distilled)

Total DNA분리는 chee(1991)가 사용했던 방법을 변형했는데 방법은 다음과 같다. 얼려있는 시료를 2-3g 정도 mortar에 넣고 액체질소를 2-3회 부어서 pestle로 미세한 분말이 되게 마쇄하고, 미리 준비해 둔 CTAB buffer를 15ml 붓고 천천히 흔들어준 뒤 50ml의 centrifuge tube로 옮겨, 60℃의 항온수조에서 30분간 incubation한 후 실온에서 10-15분간 냉각시켰다. 시료 부피의 1/2 Chloroform : Octanal(24:1)을 첨가하여 서서히 흔들어 준 뒤 3,000 rpm, 10분간 원심분리했다.

상징액을 조심스레 따라낸 뒤 위의 과정을 반복하고, 상징액을 15ml의 tube에 반씩 나눠 따라냈다. 5M NaCl을 1/10 부피로 첨가하고 95% EtOH를 1.5배에서 2배 정도의 부피를 더하고 얼음이 든 상자에 꽂아 두었다.

DNA가 뭉쳐지면 그것을 피펫으로 조심스럽게 뽑아내어 10ml의 76% EtOH, 10mM NaOAc와 70% EtOH, 10mM NH₄OAc washing buffer를 단계적으로 처리한 다음 자연건조 또는 진공건조 하였다. DNA를 TE buffer에 녹인 다음 5 μ l RNAase A(10mg/ml), 50 μ l proteinase K(100mg/ml) 처리 후 각각 38℃에서 1시간 보관한 뒤 동일 부피의 phenol(pH 8.0)을 첨가하여 10분동안 천천히 흔들어 주고 4℃에서 3,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 상징액을 수거하고 phenol : chloroform(1:1)을 넣고 다시 10분 동안 조심스럽게 흔든 후, 10분 동안 3,000rpm에서 원심분리하여 상징액을 뽑아냈다.

그리고 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)을 동일부피로 혼합하여 다시 원심분리하였다. 최종적으로 냉장된 에탄올을 2배 첨가하여 -20℃에서 1시간 이상 보관 후 1,500rpm으로 원심분리하여 DNA덩어리를 수거하였다.

DNA세척은 2회 70%에탄올을 넣고 가볍게 흔든 후 상층액은 버리고 진공 또는 자연건조 시킨후 200-600 μ l TE buffer에 녹이고 냉장 보관하였다.

분리한 DNA들이 단일밴드로 나타나는 것을 확인한 뒤 지금까지의 온주 밀감 분류체계에 나타난 품종중 원연으로 알려진 조생계의 궁천, 청강, 미장계의 실버힐, 청도 4품종으로 프라이머를 선별했다. 프라이머는 UBC Biotechnology Lab.(Canada)의 2-base 10-mer, 67% G+C인 random

primer(표 4)를 사용하며 품종간 band 차이를 보이는 primers를 선발하여 전체품종에 대한 시험을 실시했다.

PCR 반응용액(표 2)은 template DNA 10ng, dNTP 300 μ M, Tag polymerase 2 unit, 2.5mM MgCl₂, 10X reaction buffer 2.7 μ l가 혼합된 용액으로 하였는데, 총반응 용액량은 25 μ l로서 부족량은 멸균수로 보충하였다(표 3). Annealing온도 38℃와 PCR 횟수는 45 cycle(그림 2)로하여 밴드양상이 뚜렷한 것을 선택했고, RAPD 역시 위의 조건대로 실시하였다. 증폭된 DNA sample을 미리 준비한 Agarose gel에서 전기영동을 하였는데 EtBr은 gel이 굳기 전 70℃에서 첨가하였다. UV하에서 나타난 band를 확인한 뒤 적당한 크기로 gel을 자르고 polaroid Camara(Photoman™ Direct Copy System)를 사용하여 촬영을 했다. Band의 차이는 양쪽 Marker를 기준으로 하여 band의 양상을 관찰했다.사용된 시약은 모두 Promega사의 것이었으며, PCR기종은 Perkin Elmer 사의 Gene Amp®PCR System 9600기종과 Thermal cycler 480이었고, Power supply는 Pharmacia사의 Electrophoresis Constant Power Supply Ecps 3000/150이었다.



Table 3. PCR reaction buffer

DNA	10ng
Primer	2 μ l
Taq DNA Polymerase	2unit
× 10 Buffer	2.7 μ l
MgCl ₂	2.5mM
dNTPs	300uM
Ddw	
Total	25 μ l

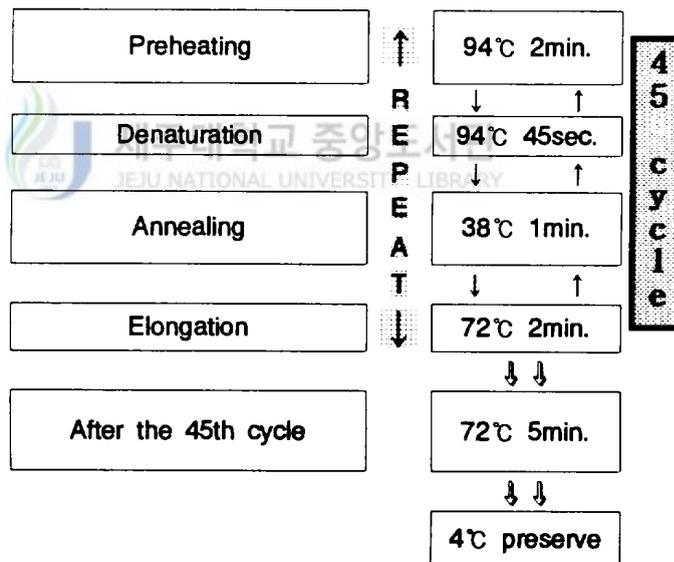


Fig. 2. PCR reaction Cycle.

Table. 4. The primer codes and sequence tested in this study

NO.	Sequence (5'to3')	NO.	Sequence (5'to3')
UBC 714	GGG TGG GTG T	UBC 221	CCC GTC AAT A
UBC 716	GGA GGA GGG A	UBC 222	AAG CCT CCC C
UBC 721	CCC TTC CCT C	UBC 223	GAT CCA TTG C
UBC 732	CAC CCA CCA C	UBC 224	TCT CCG GTA T
UBC 733	GGG AAG GGA G	UBC 225	CGA CTC ACA G
UBC 754	GGG AGG AGG A	UBC 226	GGG CCT CTA T
UBC 755	CCC ACC ACC A	UBC 227	CTA GAG GTC C
UBC 773	GGG TTG TTG G	UBC 228	GCT GGG CCG A
UBC 781	GGG AAG AAG G	UBC 229	CCA CCC AGA G
UBC 783	GGT GGG TTG T	UBC 230	CGT CGC CCA T
UBC 791	GTG GGT TGT G	UBC 231	AGG GAG TTC C
UBC 201	CTG GGG ATT T	UBC 232	CGG TGA CAT C
UBC 202	GAG CAC TTA C	UBC 233	CTA TGC GCG C
UBC 203	CAC GGC GAG T	UBC 234	TCC ACG GAC G
UBC 204	TTC GGG CCG T	UBC 235	CTG AGG CAA A
UBC 205	CGG TTT GGA A	UBC 236	ATC GTA CGT G
UBC 206	GAG GAC GTC C	UBC 237	CGA CCA GAG C
UBC 207	CAT ATC AGG G	UBC 238	CTG TCC AGC A
UBC 208	ACG GCC GAC C	UBC 239	CTG AAG CGG A
UBC 209	TGC ACT GGA G	UBC 240	ATG TTC CAG G
UBC 210	GCA CCG AGA G	UBC 241	GCC CGA CGC G
UBC 211	GAA GCG CGA T	UBC 242	CAC TCT TTG C
UBC 212	GCA GCG TGA C	UBC 243	GGG TGA ACC G
UBC 213	CAG CGA ACT A	UBC 244	CAG CCA ACC G
UBC 214	CAT GTG CTT G	UBC 245	CGC GTG CCA G
UBC 215	TCA CAC GTG C	UBC 252	CTG GTG ATG T
UBC 216	CAT AGA CTC C	UBC 262	CGC CCC CAG T
UBC 217	ACA GGT AGA C	UBC 268	AGG CCG CTT A
UBC 218	CTC AGC CCA G	UBC 271	GCC ATC AAG A
UBC 219	GTG ACC TCA G	UBC 283	CGG CCA CCG T
UBC 220	GTC GAT GTC G	UBC 290	CCG CGA GCA C

Ⅲ. 결과 및 고찰

Total DNA를 분리함에 있어서 대개의 경우는 어린 잎을 대상으로 하는데 (예, 1994, 박, 1995), 이 실험에서는 이미 굳어진 봄순을 사용하였다. 여기에서 어린 잎 2-3g에 맞는 buffer의 양을 기준으로 해서 DNA추출을 했기 때문에 성숙한 잎이 어린 잎보다 DNA의 양은 적고, 순도는 떨어지며 엽내 부산물은 오히려 많아 다당류의 침전 문제라든가 DNA 오염 등의 문제(Dolye 등, 1987, Wu 등, 1994)가 있어서 앞으로 DNA 추출시 엽경별 buffer의 적당량을 파악하여 그에 따른 DNA의 순도와 양을 밝혀낸다면 시료채취를 위해 어린 잎이 나오는 시기를 기다려야 하는 불편함도 줄어들라고 생각이 되었다. 이 실험에서도 polysaccharides로 추정되는 물질 때문에 추출한 DNA가 갈색빛을 띄었으며 전기영동하였을 때 DNA가 끌리는 것을 볼 수 있었는데 (예, 1994), 이것은 phenol처리를 한다든지 미미한 경우는 EtOH에 여러번 헹굼으로써(Fang, 1993) 극복할 수 있었다.

분리한 DNA는 ethidium bromide를 첨가한 0.8% agarose gel상에서 전기영동하여 UV하에서 DNA를 확인했다. 그 결과 약 3.5kb 부근에서 total DNA가 Single 밴드로 나타났지만 DNA로부터 단백질이나 RNA를 제거하지 않았기 때문에 1.5kb 부근에서 RNA가 상당량 검출되었다(그림 3上).

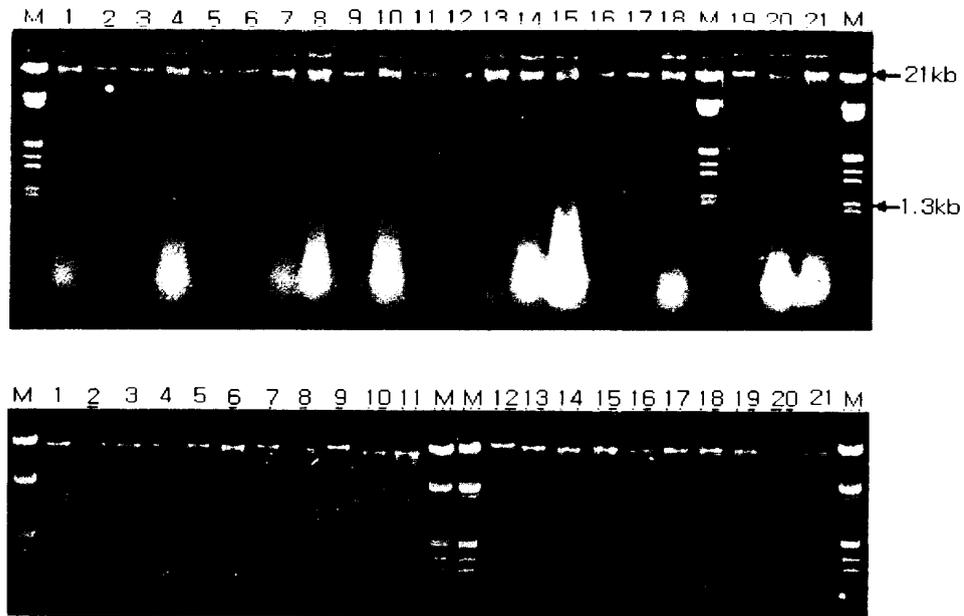


Fig 3. Separation of citrus total DNA on 0.8% agarose gel
 Upper : before treatment of RNase A and proteinase K
 Lower : after treatment of RNase A and proteinase K.

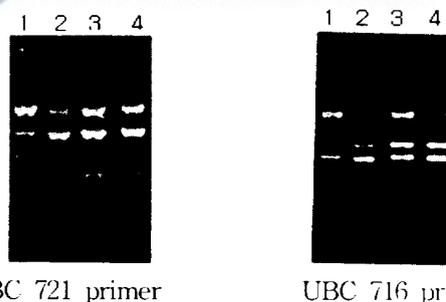


Fig. 4. RAPD band patterns of total DNA from 4 cultivars of satsuma mandarin by use of two primers. Line 1 is miyagawa, line 2 is Aoe, line 3 is Aoshima and line 4 is Silverhill. Differences in band patterns among cultivars were generated by UBC 721 primer, while no difference by UBC 716 primer.

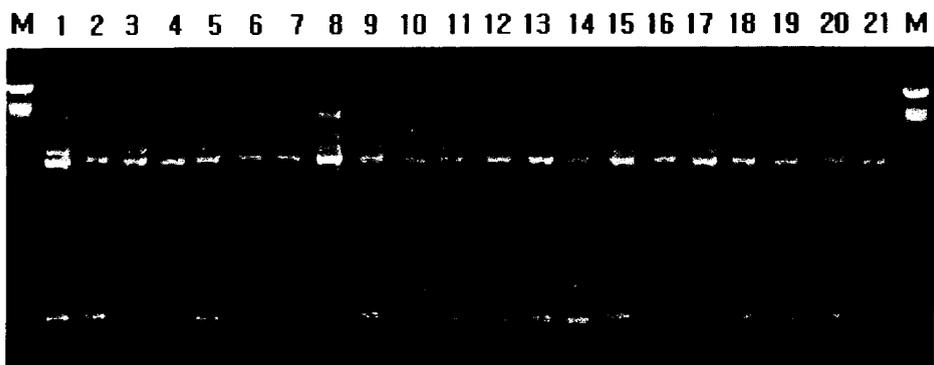


Fig. 5. RAPD polymorphisms in 21 Satsuma Mandarin cultivars with primer UBC 714(GGG TGG GTG T). The numbers on top represent the cultivar number listed in Table 1. M : DNA size marker(λ -HindIII).



Fig. 6. RAPD polymorphisms in 21 Satsuma Mandarin cultivars with primer UBC 783(GGT GGG TTG T). The numbers on top represent the cultivar number listed in Table 1. M : DNA size marker(λ -HindIII).



Fig. 7. RAPD polymorphisms in 21 Satsuma Mandarin cultivars with primer UBC 721(CCC TTC CCT C). The numbers on top represent the cultivar number listed in Table 1. M : DNA size marker(λ -HindIII).

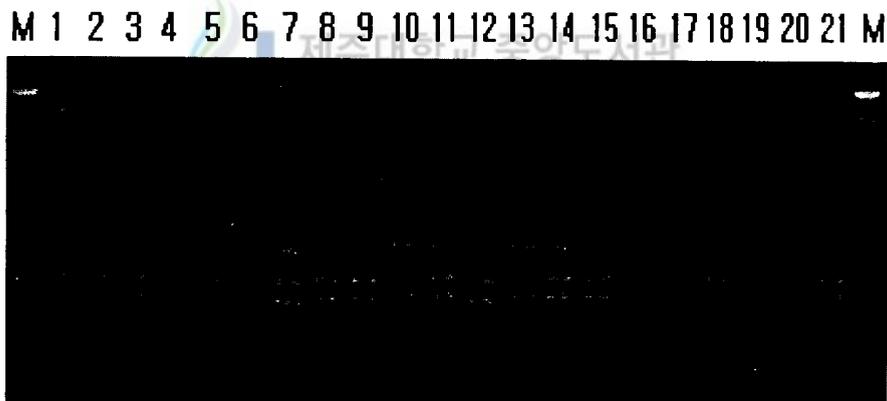


Fig. 8. RAPD polymorphisms in 21 Satsuma Mandarin cultivars with primer UBC 773(GGG TTG TTG G). The numbers on top represent the cultivar number listed in Table 1. M : DNA size marker(λ -HindIII).

RNAase A와 proteinase k 처리후 phenol-chloroform 정제과정을 거친 DNA는 단일밴드가 21kb부근에 형성되었다(그림 3下). 이 과정에서도 상징액을 따라낼 때와 마찬가지로 추출한 DNA를 조심스럽게 다뤄서 덩어리가 조각나지 않도록 하며 작은 양이기 때문에 손실되는 일이 없도록 주의를 기울여야 했다.

62 종류의 프라이머에 의해 증폭된 DNA 산물에 대한 전기영동결과 30개의 primers는 band를 형성시켰으나 나머지 32개에서는 band 형성이 이루어지지 않았다(표 5). Band를 형성한 30개의 primers 중에도 품종간에 차이를 보인 것과 보이지 않은 것이 있었다(그림 4).

4품종간에 band 차이를 보인 primers 4개를 가지고 전체 품종에 대해 PCR한 결과는 그림 5, 6, 7, 8에 나타났다.

714번 프라이머의 경우는 20kb 부근에서 靑江早生, 久能溫州, 紀州葵溫州 품종이, 19kb부근에서는 櫛森早生, 上野早生, 久能溫州, 今村溫州, 紀州葵溫州 품종이 밴드를 형성하지 않았고, 721번 프라이머의 경우는 0.94kb 부근에서 橋本早生만이 밴드를 형성하고 있어서 다른 계통과는 다른 대별되는 표지로서의 활용 가능성을 보여줬다. 773번 프라이머에서는 0.86, 0.66kb 부근에서 愛媛9호만이 밴드를 형성하고 있어서 이것 역시 표지활용 가능성이 있었고, 783번 프라이머에서는 21kb에서 興津早生, 靑島溫州 품종이 밴드를 보였는데, 이 둘은 773번 프라이머의 0.86kb에서 밴드양상의 차이를 보였으므로 계통간에 차이가 있음을 알 수 있었다.

이들 밴드양상을 관찰한 결과(표 6)를 가지고 RAPDistance Package Version 1.04를 이용해 18가지의 Dendrogram을 그린 결과 각각의 dendrogram 사이에서는 큰 차이를 볼 수 없었으나 이미 알려진 계통도와는 다른 경향을 보여주었다(그림 9).

18개의 Dendrogram 중 上野, 今村, 櫛森, 久能, 紀州葵의 경우는 上野와 櫛森이 조생계이고 나머지는 미장계로 알려져 있지만 Yule & Kendal의 방법을 제외하면 항상 같은 그룹을 짓고 있었으며, 특히 靑島와 興津이 오히려 宮川과 興津보다 가까운 위치에 있었고 宮川이 있는 자리에 岡本이 위치하는 경우도 10가지나 되었다. 新益과 橋本은 18가지 중 17가지 방법에서 같은 그룹을 지었다. 또한 나머지 품종들에 있어서도 이미 알려져 있는 분화도와는 다른 모양을 나타내었고 경우에 따라 위치가 바뀌었다.

Table 5. RAPD amplification of random primers

NO.		NO.		NO.	
UBC 714	O ²⁾	UBC 211	O	UBC 232	X
UBC 716	O	UBC 212	O	UBC 233	X
UBC 721	O	UBC 213	O	UBC 234	X
UBC 732	O	UBC 214	O	UBC 235	X
UBC 733	O	UBC 215	O	UBC 236	X
UBC 754	O	UBC 216	X	UBC 237	O
UBC 755	O	UBC 217	X	UBC 238	X
UBC 773	O	UBC 218	O	UBC 239	O
UBC 781	O	UBC 219	X	UBC 240	X
UBC 783	O	UBC 220	X	UBC 241	O
UBC 791	O	UBC 221	X	UBC 242	X
UBC 201	X ²⁾	UBC 222	X	UBC 243	O
UBC 202	X	UBC 223	X	UBC 244	O
UBC 203	X	UBC 224	X	UBC 245	O
UBC 204	X	UBC 225	X	UBC 252	O
UBC 205	X	UBC 226	X	UBC 262	O
UBC 206	X	UBC 227	X	UBC 268	O
UBC 207	X	UBC 228	X	UBC 271	O
UBC 208	X	UBC 229	X	UBC 283	O
UBC 209	X	UBC 230	X	UBC 290	O
UBC 210	O	UBC 231	X		
				Total	30/62

Z) O : amplification, X : no amplification

Table 6. Coded data matrix of 21 RAPD bands in 21 Satuma Mandarins

Cultivars	Primer band size (bp)	714	721	773	783
		221 009998 220443 774771		988 433 700	4211 2095865 6208664 8744086
1. Miyagawa Early		111011	010	1011000	00011
2. Sinik Early		111011	011	0111000	00011
3. Okamoto Early		111111	011	1111000	01111
4. Tokumori Early		110000	010	0101000	00000
5. Mori Early		111011	010	1111000	00011
6. Ueno Early		110000	010	0100000	00000
7. Haraguchi Early		111111	010	1111100	00011
8. Okitsu Early		111011	010	1011000	11111
9. Kobayasi Early		111011	011	1111000	00011
10. Aoe Early		011011	010	0100100	00000
11. Hasimoto Early		111011	111	0111000	00011
12. Fuji Early		111000	010	0111000	00001
13. Kunou unshiu		010000	010	0101100	00000
14. Silver hill unshiu		111111	011	0111100	00011
15. Hayashi unshiu		111111	011	1111100	00011
16. Imamura unshiu		110000	010	0101000	00000
17. Aoshima unshiu		111011	010	1011100	11111
18. Zutarou unshiu		111011	011	1111000	00011
19. Kishuaoi unshiu		010000	010	0101100	00011
20. Ehime 9		111011	011	0000011	00011
21. Ookeihayashi		111011	011	1111000	00011

RAPD 분석에 의한 과수의 가지변이 품종의 식별에 대하여 Kaemmer 등 (1992)은 바나나에서, Yang · schmidt(1994)는 앵두 대목에서 어느 것도 조직 배양개체에 방사선을 조사하여 유도한 돌연변이체가 RAPD 분석에 의해 식별이 가능하다고 하였다. Mulcahy 등(1993)은 사과에서는 가지 변이에 의해 생긴 품종을 RAPD에 의해 식별할 수 없었다고 한 반면 예(1994)는 식별이 가능하다고 하였다. Kagami 등(1994)은 PCR법에 의한 감귤 품종간의 계통간의 식별 시험에서 온주밀감은 시각적인 식별이 비교적 쉽다고 생각되는 계통을 포함하여 공시재료로 하였으나 어느 Primer를 이용하여도 계통간 식별을 할 수 없었다고 보고 하였다.

이것은 Demeke(1992)가 적절한 구분을 위해서는 샘플수가 19개인 경우 적어도 10개의 프라이머에 약 100개의 total band가 필요하다고 보고했다.

이 실험에서 21개의 품종을 대상으로 4개의 primers를 이용한 RAPD 결과 품종간 차이를 보이는 21개의 bands를 얻었는데 이 결과를 가지고 종간의 구별에서처럼 dendrogram을 그릴 수는 없었다. 그러나 壽太郎温州, 高林早生, 大谷系林 3품종과 今村温州, 櫛森早生 두 품종 만이 똑같은 band 조성을 보였고 나머지 15개 품종은 품종 고유의 band 조성을 보여주었는데 이것은 RAPD분석을 온주밀감 품종의 동정에 응용할 수 있다는 가능성을 시사하는 것으로서 적당한 primer를 선택하고 보다 많은 수의 primers를 선별한다면 모든 품종이 구분이 가능할 것으로 생각되었다.

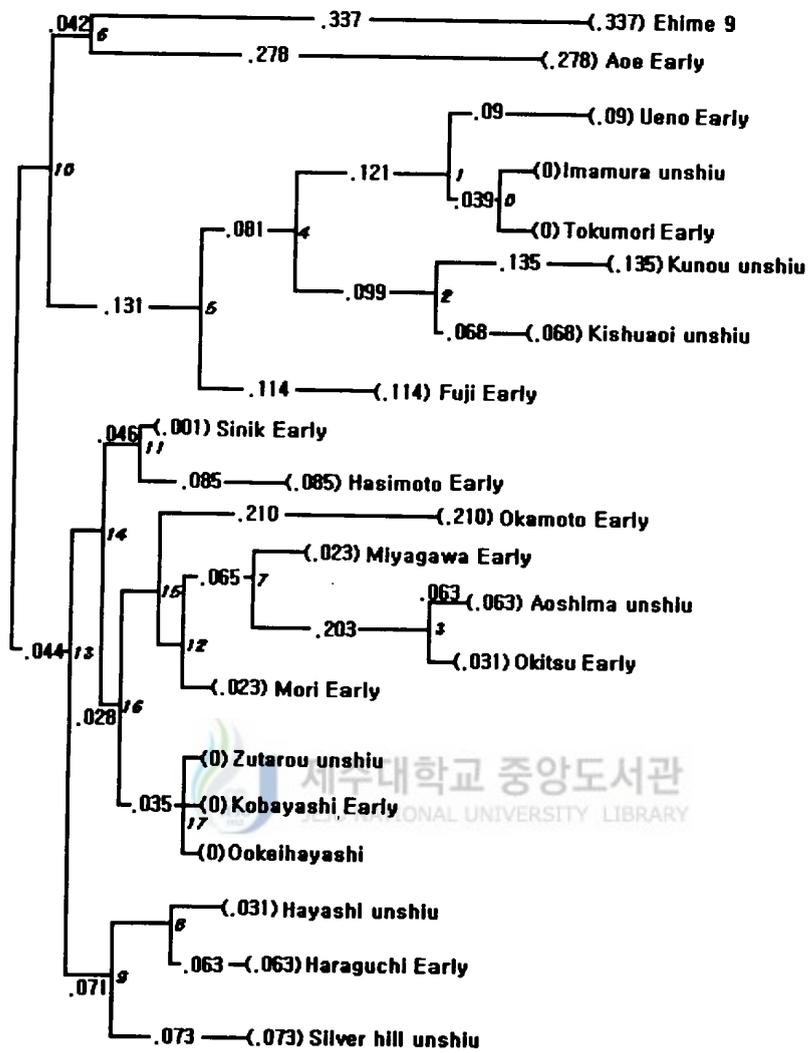


Fig 9. Dendrogram obtained from the RAPDistance program(Sokal & Sneath -3-) by using RAPD band of 21 Satsuma mandarins.

IV. 적 요

RAPD 방법에 의해 온주밀감의 품종식별 가능성을 검토하기 위하여 21개의 품종을 대상으로 2-base 10-mer 67% G+C인 random primers 62개를 사용하여 PCR한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 공시한 62개의 primers 중 PCR 결과 band 형성이 분명하게 된 것은 30 개였다.
2. 비교적 유연관계가 먼 宮川, 靑江, 靑島, Silver hill 4품종간에 band 조성의 차이를 보인 primers는 4종이었다.
3. 4개의 primers를 이용하여 21품종에 대해 PCR한 결과 품종간에 차이를 보이는 band는 21개였다.
4. 21 품종 중 15 품종은 품종 고유의 band 조성을 보여 품종구분이 가능하였다.
5. Band 조성을 기초로 작성한 dendrogram은 품종계통도와 차이가 컸다.
6. 적절한 primers 선발을 계속하면 RAPD 방법의 의해 온주밀감내 품종구분이 가능할 것으로 생각되었다.

V. 참고문헌

1. Botstein, J.B., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Amer. J. Hum. Genet.* 32 : 314-331.
2. Chee, P. P., R. F. Drong & J. L. Slightom. 1991. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. *Plant Molecular Biology Manual*. C₃ : 1-28.
3. Demeke, T., R. P. Adama, R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*. 84 : 990-994.
4. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19 : 11-15.
5. Fang G., S. Hammar, and R. Grumet. 1993. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13 : 52-56.
6. Gogorcena, Y. D.E. Parfitt. 1994. Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Sci. Hortic.* 59 : 163-167.
7. Graham, J., R.J. McNicol, K. Greig and W.T.G. Van De Ven. 1994. Identification of red raspberry cultivars and an assessment of their relatedness using fingerprints produced by random primers. *J. Hort. Sci.* 69:123-130.
8. Grattapaglia, D., Chaparro, J., Wilcox, P., McCord, S., Werner, D., Amerson, H., McKeand, S., Bridgwater, F., Whetten, R., O'Malley, D., and Sederoff, R. 1992. Mapping in Woody Plants with RAPD Markers: Application to Breeding in Forestry and Horticulture. *Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia*

Series, Minnesota Univ. 37-40.

9. 韓海龍, 權五均. 1993. 柑橘園藝新書. 先進文化社. pp.3~7.
10. Hooker J. D. 1875. The flora of British India. Reeve & Co., London. 7vol(Rutaceae). 1 : 486~517 Quoted from W.T. Swingle, and P.C. Reece, 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In : W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Weeber (eds.), The Citrus industry, Vol. I. Univ. Calif. Div. Agri. Sci., Berkely, CA.
11. 岩政正男. 1976. 柑橘の品種. 靜柑連. pp. 49-53.
12. Jeffrey, J.T., K. Tanabe, F. Tamura, and K. Banno. 1991. Identification of *Pyrus* species by peroxidase isozyme phenotypes of flower buds. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 60 : 513-519.
13. Kaemmer, D., Afza, K. Weising, G. Kahl and F. J. Novak. 1992. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana(*Musa* spp.). Bio/Technol. 10 : 1030-1035.
14. Kagami, H., Y. Murakami, S. Kusaba and M. Fukumoto. 1994. PCR法によるカンキツ品種内の系統間の識別の試み. 園學雜(日本) 63別1 : 74-75.
15. 김한용. 1988. 제주재래감귤(*Citrus* spp.)의 분류와 유용형질 및 유전표식에 관한 연구. 전남대학교 박사학위논문.
16. 李明烈, 柳榮鎮, 鄭泰英, 朴用煥. 1993. 同位酵素 및 DNA 標示因子에 의한 濟州柑橘類의 品種分類. 農業論文集 35 : 193-197.
17. Levi, A., L. J. Rowland and J. S. Hartung. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) markers from DNA of woody plants. HortScience. 28 : 1188-1190.
18. 마-카-によるカンキツキメラ品種の識別. 1995. 藝學雜(日本) 64別1(果樹). pp. 142-143.
19. Mcmillin, D.E. 1983. Plant isozymes : A historical perspective. pp. 3-10. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. part A. Elsevier Science Publishers.
20. 문두길. 1986. 제주재래감귤의 동위효소분석과 교잡실생의 조기식별방

법에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문.

21. Moriguchi, T., Hidaka, T., Omura, M. 1996. Genotype and Parental Combination Influence Efficiency of Cybrid Induction in Citrus by Electrofusion. *HORTSCIENCE*, 31(2), pp. 275-278.

22. Mulcahy, D.L., M. Cresti, S. Sansavini, G. C. Douglas, H. F. Linskens, G. B. Mulcahy, R. Vignani and M. Pancaldi. 1993. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Hortic. Sci.* 54 : 89-96.

23. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321-4325.

24. 농림수산부. 1995. 농림수산통계연보.

25. Nybom, H. 1994. DNA fingerprinting - A useful tool in fruit breeding. p.257-262.

26. 오진보, 문두길, 한해룡, 김한용. 1996. RAPD를 이용한 제주재래감귤의 DNA 다형분석. *한국원예학회 논문발표요지* : 184-185.

27. 大村三男. 1994. 果樹, 特にカンキツにおける DNA マーカーの作出とその育種的利用. *育種學最近の進歩*. 第30集. p. 37-40.

28. Parafitt, D.E. and S. Arulsekere. 1989. Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114 : 486-491.

29. 박한용. 1995. RAPD와 RFLP를 이용한 복숭아품종 판별용 표지의 선발. 서울대학교 박사학위논문.

30. Sambrook, J., W. F. Fritsch, and T. Maniatus. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

31. 신정섭. 1993. 식물 유용 유전자 탐색을 위한 RFLP 및 PCR기술응용. *한국식물학회 '93 심포지움*. pp. 85-98.

32. 신경옥, 이명렬, 진용문, 류진창. 1995. 동위효소 형태와 RAPD를 이용한 감귤류의 품종구분. 1995. *농업논문집* 37(2) : 193-198.

33. Sugawara K., A. Oowada., T. Moriguchi and M. Omura. 1995. Identification of Citrus chimeras by RAPD markers. Hort. Sci. 30(6) : 1276-1278.
34. Swingle, W.T. and P.C. Reece. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In : W. Reuther, L.D. Batchelor, and H. H. J. Webber (eds.). The Citrus industry. Vol. I. Univ. Calif. Div. Agri. Sci. Berkley, Calif.
35. 田中長三郎. 1977. 칸킷트分類への推論. 柑橘研究 14 : 1-6.
36. Williams, G.K, A.R. Kubelik, K.L. Libak, J.A. Raialsik, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.
37. Wu, L. and Hong Lin. 1994. Identifying Buffalograss [*Buchloe dactyloides*(Nutt.) Engelm.] Cultivar Breeding Lines Using Random Amplified polymorphic DNA(RAPD) Markers. J. AMER. SOC. HORT. SCI. 119(1) : 126-130.
38. 예병우. 1994. RAPD를 이용한 사과 품종의 분류와 품종 판별 표지의 선발. 서울대학교 박사학위논문.
39. Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 205-212.
40. Yang, H. and H. Schmidt. 1994. Selection of a mutant from adventitious shoot formed in X ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. p.287-290. In : H. Schmidt and M. Kellerhals (eds.). Progress in temperate fruit breeding. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. Quoted from Luo, Z. R., Yonemori, K., Sugiura, A. 1995. Evaluation of RAPD Analysis for Cultivar Identification of Persimmons. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64(3) : 535-541.

감사의 글

계획은 사람이 하더라도 그 일을 이루시는 이는 하나님이니라는 고백을 다시 하게하시는 주님, 감사합니다.

좌충우돌 이리저리 헤매는 저를 끝까지 지도해주시고 준비성과 정확성을 배워주신 한해룡 교수님, 같은 방 식구처럼 지도해주시고 상대방의 의견에 그럴수도 있다는 자세를 보여주신 문두길 교수님, 다른 관점에서 사물을 볼 수도 있다는 걸 알게하신 백자훈 교수님, 항상 따뜻한 조언을 주신 소인섭 교수님, 믿음의 선배로서 충고를 아끼지 않으신 박용봉, 장전익 교수님께 감사드리고 강훈 교수님께도 감사의 마음을 드립니다.

지난 2년간 조그만 일이라도 마다하지 않고 도움을 준 상우형, 고맙구요. 실험 중에 많은 조언과 도움을 준 순보누나, 현우형, 오진보 선배께 특별히 감사드리고 상업형과 논문정리시 자기 일 처럼 정리를 도와준 동혁형, 영준형, 성미와 자료수집에 도움을 준 동원형, 냉정한 충고조차 마다하지 않은 성원누나, 상진형, 민정 고마워요. 논문을 정리하는 마지막 날까지도 도움을 주신 강성근, 강종훈 선배님께도 감사드립니다. 그리고 6년간 깊은 소리 한번 하지 않고 묵묵히 같이 걸어온 익진, 고맙다.

끝으로 기도로 붙들어주신 목사님 내외분, 언제나 관심을 가지고 지켜봐주신 형님가족, 누님가족, 故人이 되셨지만 막내라고 항상 귀여워 해 주시고 책임감을 일깨워주시던 仲父님께 감사드리고, 언제나 한결같이 믿고 지켜봐 주신 부모님께 감사드립니다.