

석사학위논문

# RAPD를 이용한 제주재래감귤의 분류 및 식별표지 선발

제주대학교 대학원

원예학과



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

오 진 보

1996년 12월

# RAPD를 이용한 제주재래감귤의 분류 및 식별표지 선발

지도교수 문 두 길

오 진 보

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

1996년 12월



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

오진보의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

위

위

제주대학교 대학원

1996년 12월

---

Classification of Citrus Growing in Cheju by RAPD and  
Selection of Markers for Species or Cultivars Identification

**Jin Bo Oh**

(Supervised by Professor Doo-Khil Moon)

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.

## 약 어

CTAB	:	Hexadecyltrimethylammonium bromide
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
DNase	:	Deoxyribonuclease
dATP	:	2'-deoxyadenosin 5'-triphosphate
dCTP	:	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	:	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	:	2'-deoxythymidine 5'-triphosphate
dNTP	:	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
kb	:	kilobase pairs
MW	:	Molecular weight
PCR	:	Polymerase chain reaction
RAPD	:	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	:	Restriction fragment length polymorphism
RNase	:	Ribonuclease
TE	:	Tris-EDTA
UPGMA	:	Unweight pair-group method using averaged

# 목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 연구사	
1. 형태적 형질에 의한 감귤분류	5
2. 다변량 해석과 성분분석에 의한 감귤분류	5
3. 동위효소 분석에 의한 감귤분류	6
4. RFLP기법을 이용한 감귤분류	7
5. RAPD기법을 이용한 감귤분류 연구	7
III. 재료 및 방법	
1. 식물시료의 채취 및 보관	9
2. Total DNA분리, 정성 및 정량	10
3. 감귤류의 RAPD 적정조건 구명	12
4. RAPD에 의한 재래감귤 분류	13
5. 제주재래감귤 식별 RAPD표지 선발	15
6. 분석 시약 및 기기	15
IV. 결과 및 고찰	
1. Total DNA분리, 정성 및 정량	16
2. 감귤류의 RAPD 적정조건 구명	18
3. RAPD에 의한 재래감귤 분류	23
4. 제주재래감귤 식별 RAPD표지 선발	40
V. 적 요	42
VI. 참고문헌	44

## SUMMARY

In order to examine the taxonomic relationships among citrus growing in Cheju, Korea, the optimum composition of PCR reaction solution was determined, and DNA polymorphism of 23 spp or cvs of *Citrus* and the related genera was observed by RAPD technique using 11 arbitrary 10-mer primers.

The results obtained are summarized as follows:

1. The optimum composition of 25 $\mu$ l reaction mixture for RAPD of citrus consisted of 10ng template DNA, 1.5units Taq polymerase, 2mM MgCl<sub>2</sub> and 200 $\mu$ M dNTP.
2. The results of screening in terms of RAPD amplificatory ability of 100 rando primers (2-base 10-mer 67%(G+C)) were 26(good), 56(commom), 18(no amplification), respectively.
3. Out of the 26 primers of good amplification, 11primers generated 66 polymorphic RAPD bands in 23 spp or cvs of *Citrus* and the related genera.
4. Among 21 spp or cvs of the *Citrus* were classifide into 4 groups at euclid similarity coefficient 0.53: the first groups included citrus spp native to Cheju excluding yooja, Washington navel orange and satsuma mandarin, the second hassaku, natsudaikai and Duncan grapefruit, the third Lisbon lemon, and the forth yooja. This classification was not consistent with those of Swingle and Tanaka, but consistent with that of Scora.
5. At euclid similarity coefficient 0.66, citrus spp native to Cheju were divided into 5 subgroups: the first subgroup included inchangkyool and satsuma mandarin, the second dangyooja, sadookam, dongjeongkyool and jikak, the third jinkyool, hongkyool, pyunkyool, binkyool, chenongkyool and kamja, the fourth byungkyool, and the fifth yooja.

- 
6. Byungkyool, jikak and yooja could be identified with only one RAPD band, and dangyooja, dongjeongkyool and sadookam with two RAPD bands.
  7. All of 23 spp or cvs tested were identified by the combination of 66 bands generated by 11 primers.

## I. 서 론

감귤류는 식물학상 운향과(Rutaceae)의 감귤아과(Aurantioideae)에 속하는 상록성 과수로서 적도를 중심으로 남·북위 40도의 열대 및 아열대 지역에서 널리 재배되고 있는 과수이다(Davies와 Albrigo, 1994).

우리나라의 감귤 재배면적은 1995년 현재 22,233ha로서 과수 총재배면적의 13.8%를 차지하고 있으며, 과실 생산량은 538,916톤(M/T)으로 국내 과실 총생산량의 28.4%를 점유하고 있다(농림수산부, 1995).

감귤의 원생지는 동부 아라비아의 동쪽에서 필리핀 군도의 지역과 히말라야 남부에서 인도네시아, 오스트레일리아에 이르는 광범위한 지역으로 보이며, 그 중심지는 인도의 북동부와 버마의 북부지역으로 추정되어지고 있다(Davies와 Albrigo, 1994). 우리나라 감귤재배 역사는 그 시원이 분명히 밝혀지지 않고 있으며, 옛 문헌을 토대로 선사시대 부터 감귤이 제주도에 자생하여 온 것으로 추정하고 있다(신, 1972). 재래 감귤은 오랜 기간 지역 풍토에 적응하여 왔기 때문에, 최근 도입되고 있는 우량 계통에 지역 적응성을 부여하기 위해 이들 새로운 계통과 재래 감귤과의 교배 육종의 필요성이 논의되고 있다(문, 1986).

감귤류의 대부분 종들은 다배성이라는 생식특성과 종·속간 교잡이 가능하며, 외부형태만으로는 유연관계나 분류에서 어려움에 봉착하게 된다(Hirai와 Kajiura, 1987; 岩政, 1976; Yamamoto 등, 1993). 이러한 여러가지 난점으로 인하여 감귤종 또는 품종들의 유전적 특성 파악에 어려움이 있으며, 육종 목표에 적합한 교배친을 선정함에 있어서도 그 선택 폭이 넓지 못한 실정이다. 그러므로 감귤류 식물의 제반 형질의 유전현상 구명 노력과 아울러 유전 자원의 분류 및 평가의 중요성이 대두되고 있다. 1992년 이후 유전 자원 수집이 다변화되면서 1992년 현재 제주도 내에는 일본으로부터 93품종, 이태리, 중국에서 각각 22품종, 3품종의 도입 품종과 도내 재래귤 12종 변이 지 육성된 2품종으로 총 132 품종 또는 계통의 유전 자원이 확보되어 있는데(김, 1994), 아직 이들에 대한 체계적인 평가가 미흡한 실정이며, 또한 지금까지 재배되어 오고 있는 재배종 또는 품종에서 새로운 품종 선발을 위한 아조변이 탐색도 주로 육안 검사에 의존하여 이루어지고 있는 실정이다. 지금까지 제주도 감귤류의 분류 및 유연관계 추정은 영양·생식기관 또는 세포 기관의 형태적인 형질

분석(홍 등, 1976; 김과 허, 1978; 김 등, 1979; 김, 1988)과 과피·잎의 성분분석(고 등, 1982; 김, 1982) 등이 주로 이루어져오는 한편 동위원소 및 DNA 다형분석(이 등, 1993; 분, 1986; 신 등, 1995) 등이 단편적으로 시도된 바 있다.

최근 분자 생물학의 발달과 더불어 DNA 염기 서열의 주기적으로 반복된 변이를 조사하는 DNA 지문법(Jeffery 등, 1985)과 DNA염기서열의 특정부위를 인지하는 제한효소처리에 의한 단편차이를 이용하는 RFLP(Bostein 등, 1980)기법으로 종간, 종내 개체간의 유전변이를 확인하는 새로운 방법이 활용되고 있다. 이러한 방법은 DNA 염기서열상의 염기하나 차이로도 서로 다른 결과를 나타낼수 있어 매우 정밀하게 유전자 변이 식별이 가능한 반면, 많은 시간과 노력이 소요되며, 다른 방법에 비하여 상대적으로 비용이 많이 들고 위험성이 있는 동위원소를 사용해야 하므로 실제 육종방법에 응용 뿐만 아니라 유전자 탐색과 분리 적용에 부적합한 면이 있다(신, 1993).

PCR기기를 이용하여 Taq polymerase 와 primer 등으로 DNA의 특정 부위를 증폭시키는 RAPD기법(William 등, 1990)은 실험 조작이 간편하고 DNA다형성을 보기가 용이하며, 소량의 DNA로도 분석이 가능하고 동위원소를 사용하지 않은 안전성과 실험 비용이 경제적인 장점이 있다(Halward 등, 1992; Wough와 Powell, 1992). 이러한 RAPD 분석법은 과수류의 품종식별, 육종 집단의 해석 및 조기 선발, 유전자 지도 작성, 계통 분류에 널리 응용되고 있다(大村, 1994).

이 연구의 목적은 1) 감귤류의 RAPD적정 조건을 구명하고, 2) RAPD 기법을 이용하여 제주재래 감귤을 중심으로 한 감귤류 간의 유연 관계를 밝히며, 3) 재래 감귤등의 판별용 RAPD 표지를 탐색하고자 하였다.

## II. 연구사

### 1. 형태적인 형질에 의한 감귤 분류

감귤속 식물의 분류는 Hooker(1875)에 의해 4종이 보고된 이후, 田中(1977)는 화서의 유무에 의해 초생 감귤아속(subgenus Archicitrus)과 후생감귤아속(subgenus Maticitrus)으로 대별하였고 162종을 인정한 반면, Swingle(1967)은 재배종과 야생종에 기초하여 감귤아속(subgenus Citrus)과 파페다아속(subgenus Papeda)로 나누고 16종만을 기록하고 있을 정도로 커다란 차이를 보이고 있다.

우리나라의 감귤류에 대한 분류는 정(1957)이 지각(*C. aurantium*), 유자(*C. junos*), 홍귤(*C. deliciosa*), 귤(*C. nobilis*)을 기록한 이래, 홍 등(1976)은 감자(*C. benikoji*), 진귤(*C. tachibana*), 당유자(*C. grandis*)의 학명을 확인한 바 있다.

김과 허(1978)는 동정귤(*C. suavissima*), 병귤(*C. platymamma*)을 추가 확인하고 당유자는 *C. tenuissima*로 추정하는 한편, 진귤은 *C. tachibana*와는 별개의 종(species)이라고 보고하였다.

김(1988)은 사두감(*C. pseudogulgul*), 빈귤(*C. leiocarpa*), 감자(*C. benikoji*)를 추가로 학명을 확인하고, 동정귤, 진귤 및 홍귤의 학명을 *C. erythrosa*, *C. sunki*, *C. tachibana*로 각각 분류하는 한편, 당유자는 홍 등(1976)의 분류와 동일한 학명인 *C. grandis*로 재차 확인하였다. 그러나 제주도식물도감(1992)에는 당유자가 김과 허(1978)에 의하여 확인된 학명인 *C. tenuissima*로 기재 되어있다.

### 2. 다변량해석과 성분분석에 의한 감귤의 분류

고전적인 감귤 분류에 있어서는 몇가지 형태적 형질만을 분석대상으로 했기 때문에 분류에 혼란이 있었다(Barrett와 Rhodes, 1976). Alkane(Nordby 등, 1979), penolic compounds(Esen과 Soot, 1974), coumarins(Gray와 Waterman, 1978) 성분분석으로 분류를 시도한 바도 있으나, 생화학적 분류에 있어서도 어느 한가지 성분만을 대상으로 생화학적인 유연관계를 충분히 설명하기는 어렵다(김, 1988). 따라서 식물체의 화기, 잎 등에 대한 형태적인 형질 뿐만 아니라 식물체내에 존재하는 phenol, flavonoids 화합물이나 당(糖)의 조성 등 가능한 많은 수의 조사형질을 수리화하여 유연관계를 추정하는 다변량해석 방법은 원예 분야의 연구에도 다양하게 응용되고

있다(Iezzoni와 Peritt, 1991). 다변량 해석에 의한 감귤 품종의 분류 및 유연관계에 대한 연구에서, Scora(1975)는 형태, 어린줄기 마쇄물 갈변현상, 동위효소분석 등을 기초로하여 감귤속을 열대원산인 파페다아속(subgenus *Papeda*)과 온대원산인 감귤아속(subgenus *Citrus*)으로 대별하고 감귤아속에는 문단(*C. grandis*), 씨트론(*C. medica*), 만다린(*C. reticulata*)등 단지 세 개의 기본종만이 인정된다고 하였다. 半田과 大垣(1985)도 감귤류의 화기 및 잎의 형태적 형질을 수리화 한 다변량분석 결과 감귤은 기본 3종으로 분류됨이 인정된다고 보고한 바 있다.

재래 감귤에서도 다변량 해석과 성분분석에 의한 분류 및 유연관계분석이 이루어져 왔었다.

김 등(1979)은 8종의 재래 감귤의 기공구조를 관찰한 결과, 중간 차이는 없었고 염색채수는 모두 18개 이었으나 지각(광귤)의 경우 4배체( $2n=36$ )의 것도 관찰 되었으며, 엽병의 유관속초내 섬유세포의 유무에 따라 두 집단으로 나누어 진다고 하였다.

김(1985)은 재래감귤 12종의 영양·생식기관 등 형태적인 형질 64개 항목을 수리화 하여 다변량분석 결과, 유연관계는 당유자와 지각, 편귤과 감자 그리고 동정귤, 진귤, 청귤, 병귤과 홍귤은 각각 하나의 군(group)으로 이루어진 반면, 유자, 사두감, 병귤은 이들 군과는 원연(遠緣)으로 보고한 바 있다. 그러나 잎의 클로로포름 가용 성분 분석(김, 1982)과 과피의 flavonoids 성분분석(고 등, 1990)에서는 뚜렷한 결론을 얻지 못하였다.



### 3. 동위효소 분석에 의한 감귤분류

1950년대 초에 다형형태로 존재하는 식물효소들이 발견되었으며(McMillin, 1983), 동위효소는 동일한 기질의 특이성을 가지는 분자구조가 다른 효소들로서, 동위효소 분석은 식물육종학, 집단유전학 및 분류학, 세포유전학 등의 원예학연구에 다양하게 응용될 수 있다고 하였다(Peirce와 Brewbaker, 1973). 동위효소 분석에 의한 감귤 품종의 분류(Zheng 등, 1993; Soost 등, 1981; Hirai와 Kajiura, 1987; Torres 등, 1978; Ashri 등, 1991), 속간교잡 후대 유전분석(Anderson 등, 1991; Rahman와 Nito, 1994; Xiao 등, 1992)등의 연구가 이루어졌다.

재래감귤에서도 동위효소분석이 이루어져 왔는데, 문(1986)은 동위효소를 표지로 하여 교잡실생과 주심배실생을 조기에 식별 할수 있는 방법을 검토하는 한편, 대다수 재래감귤의 기원은 유자(*C. junos*)의 후손일 가능성이 크다고 추정하였다. 또한,

이 등(1993)과 신 등(1995)은 등전점 전기영동방법으로 제주 재래귤 4종과 온주밀감, 오렌지등 일부 품종분류를 시도한 바 있다.

#### 4. RFLP 기법을 이용한 감귤분류

RFLP분석은 DNA상의 염기배열을 독특하게 인식하여 절단하는 제한 효소처리에 의해 만들어지는 절편크기의 차이를 이용하는 방법이다(Botstein 등, 1980).

염기배열상 한개의 염기에 이상이 생기게 되면 절편의 수나 길이가 서로 다르게 나타나는 사실에 기초하여 집단 및 유전연구, 형질개량의 유전적 식별, 유전자분리 및 cloning을 위한 표지 등에 다양하게 이용되고 있다(Neale과 Williams, 1991).

감귤류에 있어서도 RFLP를 이용한 연구가 이루어져 왔는데, 속간 잡종의 유전 연구(Roos 등, 1992), 엽록체 DNA를 이용한 감귤분류 및 유전자 지도작성(Green 등, 1986), 세포 유전연구(Albanese 등, 1992) 등이 수행된 바 있다. 그러나 RFLP는 모든 DNA분자들이 제한효소에 의하여 절단이 가능한 모든 부위에서 잘라져야 하므로 순도가 높은 DNA를 다량으로 필요하며(Williams 등, 1991) 또한 시험과정이 복잡하고 방사성 동위원소를 사용해야 하는 위험성과 비용이 많이 요구되는 단점이 있다(Halward 등, 1992; Torres 등, 1993; Waugh와 Powell, 1992).

#### 5. RAPD 기법을 이용한 감귤 분류

Wilde 등(1992)은 코코아 13품종의 RAPD연구에서 이용한 14개의 primer중에서 9개는 다형성이 나타나고, 나머지 5개는 이용이 불가능하였다고 하였다. 방사성 동위원소로 표지된 total DNA를 PCR산물(product)에 hybridization한 결과, 확실한 반응이 나타나지 않은 것으로 보아 low copy sequence들만 증폭되었음을 알 수 있었다고 한다. 또한, PCR 결과로 나온 밴드를 탐침(Probe)으로하여 hybridization한 결과 동일한 위치에서 밴드를 나타내는 DNA는 모두 같은 염기서열의 DNA로 구성되었음을 증명하였다.

Koller 등 (1993)은 RAPD기법을 이용한 사과나무의 품종연구 결과 random primer 1개로써 사과 11개 품종의 구분이 가능했던 반면, 예(1994)는 16개 random primers를 이용하여 후지등 40품종을 분류하였다.

박(1995)은 복숭아 23품종을 16개 primer로 품종을 구분하는 한편, 품종 특이적인 밴드를 회수하여 이를 탐침(Probe)으로하여 RFLP 분석 및 표지를 선발하고자 시도한 바 있다.

Lu 등(1996)이 배의 대목 18품종을 80개 primer 중에서 20개의 primer를 선발하여 RAPD표지를 검색한 결과, 6개의 primer 만으로도 품종 식별 및 유연관계 추정 가능성이 있었다고 보고한 바 있다.

과수중 감귤류에 대한 RAPD연구는 Luro 등 (1992)이 감귤속의 15품종, 감감속 2품종, 탕자속 1품종 등 총 18품종을 repetitive nucleotide sequence(minisatellite 또는 VNTRs)로 구성된 15-mer, 14-mer의 primer를 합성하여 분류 및 계통발생을 분석한 바 있는데, 1개의 primer로도 18종의 구분이 가능하였으며 2개의 primer분석에 의한 표현도(phenogram)를 구성하였을 때, 감귤속의 15품종은 Barrett와 Rhodes(1976) 그리고 Scora(1975)가 제안한 문단(*C. grandis*), 씨트론(*C. medica*) 및 만다린(*C. reticulata*)로 구분됨을 인정할 수 있었다고 보고한 바 있다.

Luro 등(1995)은 short repetitive nucleotide sequence로 이루어진 또다른 3개의 primers 중에 단지 1개의 primer만으로도 레몬의 주심배 실생과 집합배 실생 구분이 가능하였고, 3개의 primer를 탐침으로 하여 RFLP분석을 한 결과 background가 심하여 밴드분석은 불가능 하였지만, 수많은 minisatellite sequence가 존재함을 확인할 수 있었다고 한다. 또한 앞의 primer를 이용하여, 만다린, 스위트 오렌지 각각 10개 품종을 분류한 결과, 만다린 품종군은 관별이 가능하였지만 스위트 오렌지 품종군 분류는 힘들었다고 하였다. Omura 등(1993)은 만다린의 polygalacturonase와 halcone flavone isomerase에 coading된 유전자의 3', 5' 그리고 promoter의 영역을 기초하여 합성한 6개의 single 또는 double primer를 이용하여 만다린 16개 품종을 구분하였고, single primer가 double primer보다 만다린 품종간 다형성(polymorphism)의 빈도수가 높았다고 하였다.

이상과 같이 감귤을 비롯한 과수류에 RAPD이용율이 높아서 그 이용범위가 급속도로 확대되어 감과 더불어 식물체의 genomic DNA를 간편하게 신속히 분리 정제할 수 있는 방법(Edwards 등, 1991)과 재현성을 보완하기 위한 Hot start방법(Eron 등, 1991) 등 RAPD에 관련된 기술도 아울러 개선되거나 개발되고 있는 실정이다.

국내 감귤류를 대상으로한 RAPD연구는 이 등(1993)과 신 등(1995)에 의하여 제주재래감귤 4종, 온주밀감 및 오렌지 품종을 분류하기 위해서 2개의 random primer를 이용한 시험 결과 오렌지류, 온주밀감 및 재래감귤류간의 분류가 가능하였다고 하였으나, 제주재래감귤로 알려진 모든 종 또는 품종을 대상으로 체계적인 RAPD분석결과는 보고 된바 없다.

### III. 재료 및 방법

#### 1. 식물시료의 채취 및 보관

이 연구에 공시된 식물재료는 제주도농촌진흥원 감귤 품종보존포(상귀, 도련동)에 보존되고 있는 재래감귤 및 도입 품종(표 1)으로부터 채취하였다. 신초 생육이 왕성한 5월에 완전히 전개된 건전한 어린 잎을 이용하였다. 채취후 수도물로 일차 세척후 증류수로 행군 다음 물기를 제거 즉시 total DNA를 분리하였으며, 필요시 -70°C에 냉동 밀폐 보관하였다가 DNA를 분리 하였다.

Table 1. Citrus spp or cvs and the related genera used for RAPD analysis in this experiment

No	Common or local name	Scientific name
Native spp or cvs <sup>2)</sup>		
1	Byungkyool(병굴)	<i>C. platyamma</i> Hort. ex TANAKA
2	Dangyooja(당유자)	<i>C. grandis</i> OSBECK
3	Jikak(지각)	<i>C. aurantium</i> LINN
4	Pyunkyool(편굴)	<i>C. tangerina</i> Hort. ex TANAKA
5	Yooja(유자)	<i>C. junos Sieb.</i> ex TANAKA
6	Dongjeongkyool(동정굴)	<i>C. erythrosa</i> Hort. WX TANAKA
7	Jinkyool(진굴)	<i>C. sunki</i> Hort. ex TANAKA
8	Kamja(감자)	<i>C. benikoji</i> Hort. ex TANAKA
9	Inchangkyool(인창굴)	?
10	Cheongkyool(청굴)	<i>C. nippokoreana</i> TANAKA
11	Hongkyool(홍굴)	<i>C. tachibana</i> TANAKA
12	Sadookam(사두감)	<i>C. pseudogalgul</i> Hort. ex TANAKA
13	Binkyool(빈굴)	<i>C. leiocarpa</i> Hort. ex TANAKA
Recently introduced spp or cvs and the related genera		
14	'Miyagawa Early' Satsuma mandarin	<i>C. unshiu</i> MARC. cv. Miyagawa
15	Washington navel orange	<i>C. sinensis</i> OSBECK
16	'Aoshima' Satsuma mandarin	<i>C. unshiu</i> MARC. cv. Aoshima
17	Lisbon lemon	<i>C. limon</i> Burm. f. 'Lisbon'
18	Kumquat	<i>Fortunella margarita</i> SWINGLE
19	Trifoliolate orange	<i>Poncirus trifoliata</i> LINN
20	Duncan grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf 'Duncan'
21	'Okitsu Early' Satsuma mandarin	<i>C. unshiu</i> MARC. cv. Okitsu
22	Hassaku	<i>C. hassaku</i> Hort. ex TANAKA
23	Natsudaidai	<i>C. natsudaidai</i> HAYATA

<sup>2)</sup>Scientific names by Kim(1988).

## 2. Total DNA 분리, 정제 및 정량

감귤품종보존포에서 채취한 감귤의 잎은 Chee 등(1991)방법을 변형하여 total DNA를 분리,정제하였는데 그 분리 방법은 다음과 같다(그림 1).

먼저 생체중 3g 내외의 시료를 채취하여 mortar에 넣고 액체질소를 첨가한 후 pestle을 이용하여 부드러운 백색의 분말상태가 되도록 마쇄하였다. 마쇄가 끝난 시료는 15ml의 CTAB buffer [50mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.7M NaCl, 50mM EDTA (pH 8.0), 140mM  $\beta$ -mercaptoethanol] 를 넣고 부드럽게 혼합하여서 50ml centrifuge tube로 옮긴 다음 60°C의 항온기에서 30분간 처리 후 실온에서 냉각시켰다. 원시액의 1/2부피로 chloroform:octanol(24:1) 혼합액을 첨가하고 4°C, 3,500×g로 10분간 원심 분리 과정을 2회 반복으로 실시한 후, 상정액만을 새 tube로 옮겨 10ml CTAB buffer 를 재차 첨가하여 얼음상자 속에서 8시간(overnight) 방치한 후 동일조건으로 원심 분리하였다. DNA회수는 원심분리하여 얻은 상정액의 1/5, 2배 부피로 5M NaCl과 95% EtOH를 각각 첨가하여 -20°C에서 DNA를 침전시킨 후 76% EtOH-10mM NaOAc와 70% EtOH-10mM NH<sub>4</sub>OAc을 각각 10ml washing buffer를 단계적으로 처리한 다음 자연건조 또는 진공건조하였다.

회수된 DNA를 6ml TE buffer [10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA] 에 용해한 다음 5 $\mu$ l RNAase A(10mg/ml), 50 $\mu$ l proteinase K(100mg/ml)를 각각 처리하고 38°C에서 1시간 동안 방치한 후 동일 부피의 중화된 phenol(pH 8.0)을 첨가하여 10분동안 천천히 고루 섞은 다음 4°C에서 3,500×g로 10분동안 원심분리하였다. 상정액을 수거하고 phenol:chloroform(1:1)을 넣고 다시 10분 동안 조심스럽게 흔든후, 10분 동안 3,500×g에서 원심분리하여 상정액을 얻어서 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 동일부피로 혼합하여 다시 원심분리 하였다. 최종적으로 95% EtOH 과 5M NaCl을 2배, 1/5부피로 각각 첨가하여 -20°C에서 1시간이상 보관 후 800×g로 원심분리하여 DNA덩어리를 수거하였다.

DNA세척은 2회 70%에탄올을 넣고 가볍게 흔든 후 상정액은 버리고 진공 또는 자연건조 시킨후 200-800 $\mu$ l TE buffer [10mM Tris-HCl( pH8.0), 1mM EDTA] 에 녹인후 -20°C에 냉동 보관하였다.

최종적으로 얻어진 total DNA는 0.8% agarose gel상에서 전기영동하여 단일밴드로 나타나는 것을 확인하고, UV/VIS Spectrophotometer로 280nm와 260nm에서 흡광도를 측정하여 DNA순도검정 및 정량을 하였다.

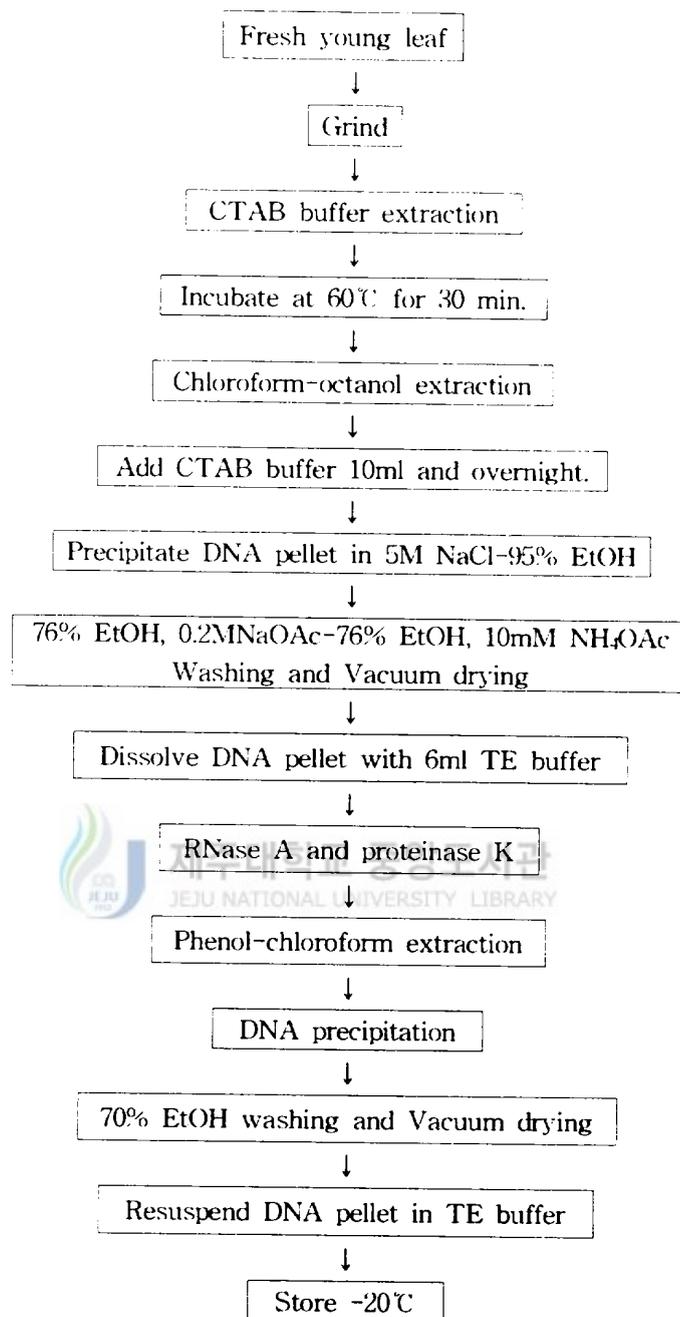


Fig. 1. Procedure to prepare total DNA from citrus leaf.

### 3. 감귤류의 RAPD적정조건 구명

RAPD분석을 위한 PCR조건에 template DNA, Taq polymerase, dNTP, MgCl<sub>2</sub> 등은 반응용액을 구성하는 필수적인 요소들이다. 그러므로, 감귤류의 genomic DNA을 이용하여 RAPD분석함에 있어서 PCR에 관여하는 주요 요소들의 첨가량의 차이가 PCR산물에 어떤 영향을 주는지를 확인하고, 아울러 이들 각 요소들의 최적 농도를 확인함으로써 감귤류의 RAPD 적정조건을 구명하고자 몇가지 시험을 수행하였다.

이 시험에서는 재래귤인 동정귤 및 유자의 genomic DNA를 이용하였으며, 각 시험의 표준 PCR반응액은 template DNA 10ng, Taq polymerase 1.5units, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 μM primer(UBC715, 713), 200 μM dNTP(Promega, USA) 나머지는 멸균된 3차증류수로 충당하여 25 μl로 조정한 다음 PCR반응은 94℃에서 120초간 예열한 후 94℃에서 45초, 38℃에서 60초, 72℃에서 120초를 1 cycle로 하여 45 cycle 반응시켰다. PCR산물들은 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 밴드양상을 조사하였다.

#### 3.1 Template DNA농도

PCR증폭에 있어 총반응용액 25 μl 중에 포함되는 적정 total DNA양을 확인하고자 동정귤의 total DNA를 template DNA로하고 1, 5, 10, 20, 40, 80ng 씩으로 2반복으로 농도를 달리하여 반응액을 조제하여 PCR을 행한후 agarose gel 상에서 DNA밴드 양상을 관찰하였다.

Template DNA의 첨가량 외에 다른 요소들은 앞의 반응용액 기준농도에 준하여 첨가하였으며, primer는 UBC715를 사용하였다.

#### 3.2 dNTP 농도

dNTP의 최적농도를 구명하고자 동정귤의 total DNA를 이용하였으며 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP의 첨가량을 25, 50, 100, 200, 400 μM 씩으로 하여 각각 반응용액을 조제하였다. dNTP 이외의 다른 요소들은 상기한 반응용액 기준농도로 조절하였으며, primer는 UBC713을 사용하였다.

조제된 용액은 PCR을 통하여 DNA를 증폭한 다음 agarose gel상에서 전기영동하여 DNA밴드 양상을 조사하였다.

### 3.3 Taq polymerase 농도

감귤류 total DNA의 PCR 증폭반응을 가장 효과적으로 수행할 수 있는 Taq polymerase의 적정 첨가량을 구명하기 위하여 Taq polymerase 농도를 0.5, 1.5, 3, 4unit로 달리하고 유자의 total DNA와 Primer UBC715를 이용하여 반응용액을 조제하였다. 다른 첨가요소들은 상기한 반응용액 기준농도로 조절하였으며, 조제된 용액은 PCR 후 agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA 밴드양상을 검정하였다.

### 3.4 MgCl<sub>2</sub> 농도

MgCl<sub>2</sub> 최적농도를 구명하기 위하여 유자의 total DNA와 UBC715 Primer를 이용한 PCR반응용액중 MgCl<sub>2</sub> 농도를 1, 2, 4, 6mM로 달리 하였으며 MgCl<sub>2</sub>를 제외한 다른 요소들은 상기한 반응용액 기준농도에 따라 첨가하였다. 조제된 반응용액은 PCR을 행한 후 agarose gel상에서 밴드양상을 확인하였다.

## 4. RAPD에 의한 재래감귤 분류

### 4.1 Random primer의 예비검정

재래감귤의 RAPD에 적합한 primer를 선택하고자 Univ. of British Columbia Biotechnology Lab. (Canada)로부터 구입한 67% (G+C, 10-mer인 random primer 100개를 대상으로 하여(표 2), 동정귤의 total DNA를 template DNA로 하고 동일한 조건하에서 PCR을 수행하였다. PCR 반응용액은 template DNA 10ng, dNTP 200μM, Taq polymerase 1.5 unit, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10x reaction buffer 2.5μl가 혼합된 용액으로 하였으며, 총반응 용액량은 25μl로서 부족량은 멸균수로 보충하였다. annealing온도 36℃와 PCR횟수는 50 cycle로 고정 시험하여 밴드양상이 뚜렷한 primer 26개를 선발하였다.

Table. 2. The primer codes and sequence tested in this study

NO.	Sequence (5' to 3')	NO.	Sequence (5' to 3')
UBC 701	CCC ACA ACC C	UBC 751	CCC ACC ACA C
UBC 702	GGG AGA AGG G	UBC 752	CCC TCC TCT C
UBC 703	CCA ACC ACC C	UBC 753	GGG AGG AGG A
UBC 704	GGA AGG AGG G	UBC 754	GGG TGG TGG T
UBC 705	GGA GGA AGG G	UBC 755	CCC ACC ACC A
UBC 706	GGT GGT TGG G	UBC 756	CCC TCC TCC T
UBC 707	CCC AAC ACC C	UBC 757	GGA AGG GAG G
UBC 708	GGG TGG TGG G	UBC 758	GGT TGG GTG G
UBC 709	CCT CCT CCC T	UBC 759	CCA ACC CAC C
UBC 710	GGT GGT GGG T	UBC 760	CCT TCC CTC C
UBC 711	CCC TCT CCC T	UBC 761	GAG AGG AGG G
UBC 712	GGG TGT GGG T	UBC 762	GTG TGG TGG G
UBC 713	CCC TCC CTC T	UBC 763	CAC ACC ACC C
UBC 714	GGG TGG GTG T	UBC 764	CTC TCC TCC C
UBC 715	CCA CCA CCC A	UBC 765	AGG GAG GAG G
UBC 716	GGA GGA GGG A	UBC 766	TGG GTG GTG G
UBC 717	CCC ACA CCC A	UBC 767	ACC CAC CAC C
UBC 718	GGG AGA GGG A	UBC 768	TCC CTC CTC C
UBC 719	CCC ACC CAC A	UBC 769	GGG TGG TGG G
UBC 720	GGG AGG GAG A	UBC 770	GGG AGG AGG G
UBC 721	CCC TTC CCT C	UBC 771	CCC TCC TCC C
UBC 722	CCT CTC CCT C	UBC 772	CCC ACC ACC C
UBC 723	CCC TCT CCT C	UBC 773	GGG TTG TTG G
UBC 724	CTC CCT CCT C	UBC 774	GGT GTG TGG T
UBC 725	GGG TTG GGT G	UBC 775	GGT TTG GTG G
UBC 726	GGT GTG GGT G	UBC 776	CTT CCC TCC T
UBC 727	GGG TGT GGT G	UBC 777	GGA GAG GAG A
UBC 728	GTG GGT GGT G	UBC 778	CCA CAC CAC A
UBC 729	CCC AAC CCA C	UBC 779	CCT TTC TCC C
UBC 730	CCA CAC CCA C	UBC 780	CCT CTT CCT C
UBC 731	CCC ACA CCA C	UBC 781	GGG AAG AAG G
UBC 732	CAC CCA CCA C	UBC 782	GGG AAG AGA G
UBC 733	GGG AAG GGA G	UBC 783	GGT GGG TTG T
UBC 734	GGA GAG GGA G	UBC 784	GTG GGT GTT G
UBC 735	GGG AGA GGA G	UBC 785	CAC CCA ACC A
UBC 736	GAG GGA GGA G	UBC 786	TCC CTT CCT C
UBC 737	GGT GGG TGT G	UBC 787	CCC TTC TTC C
UBC 738	GGT GGG TGG T	UBC 788	CCT TCC CTC T
UBC 739	GGA GGG AGA G	UBC 789	GGA AGG GAG A
UBC 740	GGA GGG AGG A	UBC 790	GGG TGT GGT T
UBC 741	CCT CCC TCT C	UBC 791	GTG GGT TGT G
UBC 742	CCT CCC TCC T	UBC 792	CAA CCC ACA C
UBC 743	CCA CCC ACA C	UBC 793	CTC CTC TCT C
UBC 744	CCA CCC ACC A	UBC 794	GAG GGG AAA G
UBC 745	GGG AAG AGG G	UBC 795	TGG TGT GGG T
UBC 746	GGG TGT TGG G	UBC 796	AGA GGG AGG A
UBC 747	CCA CCA ACC C	UBC 797	CCA CCA ACA C
UBC 748	CCC TTC TCC C	UBC 798	GAG AGG AAG G
UBC 749	GGG AGG AGA G	UBC 799	TGT GGT GGT G
UBC 750	GGG TGG TGT G	UBC 800	TCT CCC TCC T

## 4.2 RAPD에 의한 재래감귤 분류

RAPD기법을 이용하여 재래감귤의 유연관계를 확인하고 재래감귤 판별을 위한 RAPD표지를 탐색하기 위하여 표 1의 재래감귤 13종과 도입종을 공시하였다. 전술한 방법에 따라 분리, 정제 및 정량한 total DNA를 이용하였으며, 앞의 random primer 예비 검증실험에서 이용성이 높다고 판단된 26개의 primer중 11개를 사용하였다. PCR 반응용액은 template DNA 10ng, primer 0.4nM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, USA)를 200 $\mu$ M, Taq polymerase(Promega, USA) 1.5unit, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 10x reaction buffer 2.5 $\mu$ l를 첨가 하였고, 나머지는 멸균수를 보충하여 총 25 $\mu$ l용액으로 처리 하였다. PCR반응은 94 $^{\circ}$ C에서 120초간 예열한 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 38 $^{\circ}$ C에서 60초, 72 $^{\circ}$ C에서 120초를 1cycle로 하여 45cycle을 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분을 더 유지시켰다. PCR산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 밴드양상을 조사하였다.

## 4.3 집괴분석

공시한 23개 감귤류의 유연관계 분석을 위한 집괴분석의 자료행렬은 11개의 primer를 사용하여 얻어진 RAPD밴드 중 다형성이 인정되는 밴드가 나타나면 '1'로, 그렇지 않으면 '0'으로 표시 하였다.

집괴분석은 개인용컴퓨터 통계 package인 spss/sp+(Ver. 3.0)를 이용하여 유클리드 유사도(eluclid similarity)에 기초한 비가중평균결합(unweighted average linkage)으로 얻어진 유사도계수를 이용하여 수지도(dendrogram)를 작성하였다.

## 5. 재래감귤 식별 RAPD 표지선발

앞의 RAPD분석에 의한 제주재래감귤 등의 분류 시험에서 다형성이 인정되었던 66개의 밴드중 중 또는 품종간의 특이적인 밴드를 분석하였다.

## 6. 분석시약 및 기기

이 시험과정에서 사용한 시약은 특별한 언급이 없는 경우는 Sigma Chemical사(미국)의 molecular biology reagents를 사용하였고, 시약의 조제, 용액의 조성 등은 Sambrook 등(1989)과 Chee 등(1991)의 방법에 준하여 수행하였다.

PCR기종은 Perkin Elmer사의 Hot start PCR Amplification방식인 Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9600 기종이었다.

## IV. 결과 및 고찰

### 1. 감귤류의 total DNA분리, 정제 및 정량

처음에 Chee 등(1991)의 방법에 따라 total DNA를 분리하고자 시도하였으나 순수도가 높은 DNA의 분리에는 성공하지 못했다. 그 이유는 식물체 조직에서 DNA분리시 polysaccharides오염이 흔히 일어난다고 보고한 바가 있는데(Dolye와 Dolye, 1987), 본 실험에서도 polysaccharides로 추정되는 물질에 의하여 추출된 DNA가 갈색으로 오염되었으며, 0.8% agarose gel상에서 전기영동하여 관찰하였을 때도 DNA밴드가 길게 끌린 양상으로 나타났다.

DNA로부터 polysaccharides를 제거하기 위해서는 고농도 염용액(1.0 ~ 2.5M NaCl)에서 에탄올로 침전 (Fang 등, 1993; Micheals 등, 1994), CTAB사용(Murray와 Thampson, 1980) 등이 이용되어지고 있다.

이 실험에서는 시료마쇄후 1차 DNA침전직전에 추출용액의 1/3부피로 CTAB Buffer를 재차 가하여 얼음 상자에 8시간(overnight) 방치한후, 2배 부피의 95% 에탄올에 5M NaCl 7mM를 첨가하여 polysaccharides를 침전시킴으로서 DNA오염을 회피할 수 있었다.

Total DNA를 일차적으로 분리한 다음 0.8% agarose gel상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후에 UV Transilluminator상에서 DNA를 확인한 결과 약 3.5kb 부근에서 total DNA가 단일밴드로 나타났으나 DNA로부터 단백질 또는 RNA를 제거할 수 있는 효소를 처리하지 않았기 때문에 1.5kb 부근에서 RNA로 추정되는 밴드가 길게 끌려서 나타났다(그림 2. A). 그래서 RNase A와 proteinase K를 처리후 phenol-chloroform으로 불순물을 제거 하였을때 깨끗한 DNA단일밴드가 21kb부근에서 나타남을 확인하였다(그림 2. B).

각 각의 DNA는 일부 back ground가 완전히 사라지지 않고 남아있는 경우도 있었는데, 각 DNA순수도를 260nm와 280nm에서의 흡광도 비율 즉  $A_{260}/A_{280}$ 의 값이 1.75-1.85 정도인 것만을 보관하였으며, 만일 앞의 비율범위를 벗어난 경우 phenol-chloroform처리를 다시 반복하거나 새로 DNA분리를 하였다.

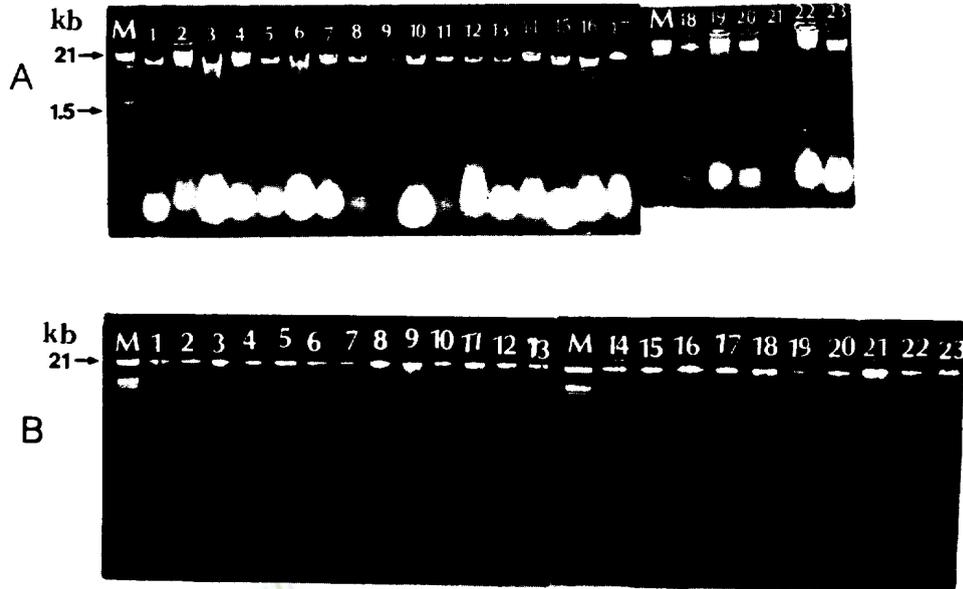


Fig. 2. Separation of total DNA from citrus leaf 0.8% agarose gel.

- A : before treatment of RNase A and proteinase K
- B : after treatment of RNase A and proteinase K
- M : Molecular size marker( $\lambda$ -Hind III - EcoR I).

Weeden 등(1992)은 재현성있는 RAPD결과를 얻는데 있어서 template DNA의 순수도가 결정적인 영향을 미친다고 하였는데 이 실험의 결과에서도 유사하였다.

이 시험에서 DNA 추출시간은 Chee 등(1991)의 방법보다 약 하루 더 걸렸으나 DNA오염을 줄일 수 있었으며, 또한 RNase A와 proteinase K를 처리한 후 불순물을 phenol-chloroform으로 신중히 처리함으로써 분리한 시료 23개 모두 순도 높은 DNA를 얻을 수 있었다.

## 2. 감귤류의 RAPD 적정조건 구명

### 2.1 Template DNA 농도

Template DNA의 농도별 효과를 알아보기 위하여 동정균의 total DNA와 primer UBC715를 이용하여 PCR한 결과는 그림 3에서 보는 바와 같다.

1~80ng까지 모든 처리에서 재현성이 인정되었으며 고농도인 80ng으로 높아질수록 밴드의 굵기에는 무관하였으나 선명한 밴드로 나타나는 경향이 있었다. 그러나 1ng과 5ng에서는 약한밴드로 나타났다.

Koller등(1993)은 사과 'Glockenapfel' 품종에서 template DNA를 최고 55ng부터 최저 2000배 이상으로 희석하여 농도를 달리하여 시험한 결과, DNA농도차에 의한 밴드수는 차이가 없고 밴드의 굵기가 낮은 농도에서는 약해진다고 보고하였으며, 또한 Weeden 등(1992)은 포도의경우 template DNA농도가 3ng에서 30ng까지 10배 정도 차이가 나도 RAPD밴드양상에는 큰 영향을 주지 않았다고 하여 이 실험과 유사한 결과를 보고한 바 있다.

감귤류인 경우 Sugawara 등(1995)은 온주밀감, 오렌지, 금감품종의 template DNA농도를 10ng을 기준하여 1/5로 희석한 경우에는 희미한 밴드로 나타나서 관독이 힘들었으나 5 ~ 50ng까지는 진한 밴드들로 일정하게 나타난다는 결과를 보고한 바 있어 본 실험과 유사한 경향을 보였다, 박(1995)은 복숭아의 경우 1ng의 농도에서는 일부 밴드가 사라지거나 끊었으며, 전혀 나타나지 않은 경우도 있었다고 하여 이 실험의 결과와는 차이가 있었다. Weeden 등(1992)은 template DNA순수도가 RAPD결과를 얻는데 있어 결정적인 영향을 미친다고 하였는데 이 실험에 있어서도 DNA 순수도가 높은(1.75-1.85)것을 이용하였으므로 DNA자체에서는 별 문제가 없었던 것으로 보아 이와 같이 상이한 결과는 그들이 사용한 품종, primer종류, PCR조건, 반응용액의 구성성분이 이 실험에서와 달랐기 때문으로 생각된다.

감귤류에서 다른 연구자들의 사용한 template DNA농도를 분석하여 볼때, Luro 등(1992)은 primer의 염기수에 따라 5-20ng으로 DNA농도를 달리하였으며, Dang 등(1995)과 Omura 등(1993)은 각각 25, 10ng으로 primer종류 또는 품종에 따라 DNA적정농도가 달랐다고 하였다. 그러므로 RAPD에 있어서 적정 template DNA 양은 실험조건에 따라 미리 확인 할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

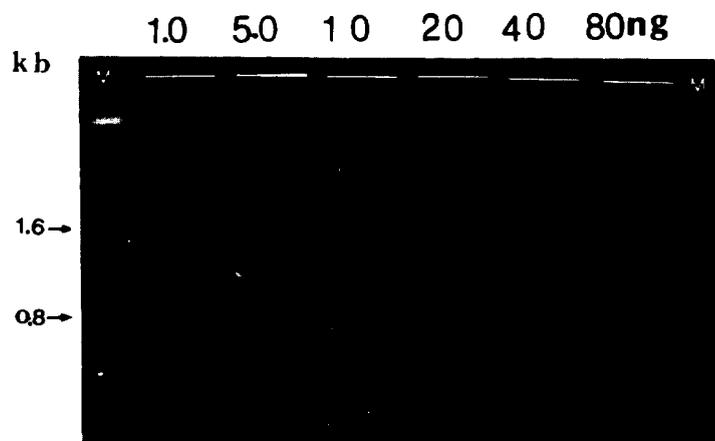


Fig. 3. RAPD band patterns of total DNA from *C. erythrosa* showing the effect of template DNA concentration on PCR amplification. Numbers on top refer to the amount of template DNA per 25 $\mu$ l reaction mixture. Primer UBC715 (CCACCACCCA) was used. M: DNA molecular size marker( $\lambda$ -HindIII + EcoRI).

이상의 결과를 종합해 볼 때 25 $\mu$ l의 반응용액에 첨가되는 template DNA양은 10~80ng 범위에서는 밴드양상에 영향을 주지 않을 것으로 나타났으나 10ng의 농도로 사용하는 것이 적절하다고 판단되었다.

## 2.2 dNTP 농도

감귤류의 RAPD연구에 적합한 dNTP농도를 구명하고자 동정균의 앞에서 분리한 DNA를 이용하여 PCR반응용액내의 dNTP를 농도별로 첨가하여 시험한 결과는 그림 4와 같다. 농도 25 $\mu$ M인 경우 반응이 전혀 나타나지 않았고, 50 $\mu$ M농도에서는 한 처리가 비특이적으로 나타나서 반복성이 결여 되었다. 농도100 $\mu$ M과 200 $\mu$ M인 경우에는 선명한 밴드로 나타났다. 400 $\mu$ M인 경우에는 밴드가 약하게 나타났으며 일부 밴드가 사라졌다.

Yoon(1992)은 재현성있는 RAPD 표지들의 증폭을 위해서는 PCR에 사용되는 성분(reaction component)들이 농도가 PCR결과에 상호의존 관계에 있으며 dNTP

농도는 200  $\mu$ M에서 가장 재현성 있는 RAPD 표지들이 증폭되었다고 하여 이 실험에서와 유사한 결과를 발표한 바 있다.

박(1994)은 복숭아 'Hakuho' 품종에서 50  $\mu$ l PCR 반응액인 경우도 dNTP농도가 200-400  $\mu$ M이 적당하다고 보고하였으며, 감귤의 경우도 Luro 등(1992, 1995), Sugawara 등(1995) 그리고 Deng 등(1995)은 각각 200, 160, 100  $\mu$ M을 이용한 결과와 비교하여 볼 때, 이 실험에서의 적정 dNTP농도인 100~200  $\mu$ M과 유사하였다.

이상을 종합해 볼 때, dNTP농도는 100-200  $\mu$ M의 범위에서 밴드가 깨끗하고 반복성있게 나타나 감귤류 RAPD연구에 적합한 것으로 생각되었다.

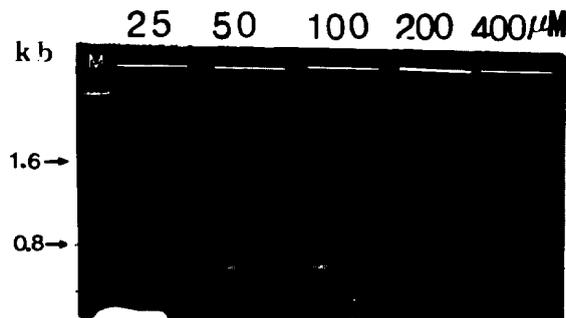


Fig. 4. RAPD band patterns of total DNA from *C. erythrota* showing the effect of dNTP concentration on PCR amplification. Numbers on top refer to the concentration of dNTP of per 25  $\mu$ l reaction mixture. Primer UBC713 (CCCTCCCTCT) was used. M: Molecular size marker ( $\lambda$ -HindIII + EcoR I).

### 2.3 Taq polymerase 농도

PCR반응액중 Taq polymerase 농도가 RAPD 밴드양상에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 유자의 total DNA를 이용하여 Taq polymerase를 PCR한 결과는 그림 5와 같다. Taq polymerase 농도를 0.5 unit로 한 경우 재현성이 없는 희미한 밴드들로 구성된 반면, 1.5unit에서는 모든 밴드가 재현성이 인정되면서도 선명하게 나타났다. 고농도인 3unit 와 4unit 에서는 일부 반복성이 없는 밴드들의 수가 증가 되고 또한 선명도가 약하게 나타났다.

이상의 결과로 볼 때 Taq polymerase 농도는 1.5unit 범위를 사용함이 적당하다고 생각되었다.

Taq polymerase는 제조방식, 보관상태에 따라서 활성이 차이가 있을 수 있으므로 단순히 농도만을 가지고 언급하기에는 부족한 감이 없지 않다. 예(1994)는 사과에서 2unit 정도 사용함이 적당하다고 하여, 이 실험의 결과와 유사하였다. Hoelzel과 Green(1992)은 Taq polymerase 적정농도는 Template DNA 종류나 순수도 차이에 따라 달라질 수 있다고 하였으며, 일반적으로 반응용액 50 $\mu$ 당 Taq polymerase를 0.5-2.5unit 정도 사용함이 적당하다고 한 바있어, 이 실험의 결과와는 다소 상이하였다. 이상에서 보는 바와 같이 이 실험결과 적정 Taq polymerase 1.5unit 범위는 PCR 반응용액 총량보다 반응용액속에 함유된 DNA의 양과 순도에 관계가 있을 것으로 생각되었다.



Fig. 5. RAPD band patterns of total DNA from *C. junos* Sieb showing the effect of Taq polymerase concentration on PCR amplification. Numbers on top refer to the amount of Taq polymerase per 25 $\mu$  amplification mixture. Primer UBC715 (CCACCACCCA) was used. M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII - EcoR I).

### 2.5 MgCl<sub>2</sub>농도

유자의 total DNA를 이용하여 1, 2, 4, 6mM농도의 MgCl<sub>2</sub>효과를 알아 보기 위하여 PCR실험결과를 그림 6에서 보는 바와 같다.

농도가 1mM인 경우 PCR반응이 전혀 일어 나지 않았으나 2mM에서 재현성이 있는 선명한 밴드양상으로 나타났다. 3mM 또는 4mM인 경우는 반복성이 없거나 약한 밴드로 나타났다. MgCl<sub>2</sub> 농도는 DNA증폭 여부에 매우 중요한 변수로 작용하

여 낮은 MgCl<sub>2</sub>농도에서는 DNA단편의 수가 극히 적어지거나 전혀 생성되지 않은 반면, 적정 농도로 증가 함에 따라 정상적인 밴드 양상으로 회복됨은 primer와 template DNA결합이 안정화에 기인한다(Kanzan 등, 1993; Staub 등, 1996). 羅 등 (1995)은 MgCl<sub>2</sub>농도가 PCR 산물의 재현성에 큰 영향을 주어 너무 낮거나 높으면 PCR산물의 재현성이 없고 밴드의 선명도가 저하되는 경향이 있으며 반응액 중 MgCl<sub>2</sub> 농도는 2.0 mM이 최적이라 보고 한 바 있으며, 감귤류 연구(Luro 등, 1995; Sugawara 등, 1995)에서도 MgCl<sub>2</sub>농도를 2mM을 사용한바 있어, 이 실험에서의 결과와 유사하였음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 MgCl<sub>2</sub>농도는 2mM정도인 것으로 판단되었다.

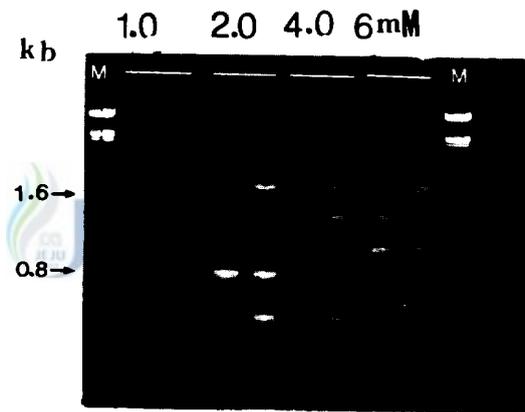


Fig. 6. RAPD band patterns of total DNA from *C. junos* Sieb showing the effect of MgCl<sub>2</sub> concentration on PCR amplification. Numbers on top refer to the concentration of MgCl<sub>2</sub>. Primer UBC715(CCACCACCCA) was used. M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII-EcoR I).

### 3. RAPD 분석에 의한 재래감귤 분류

#### 3.1 Random primer의 예비검정

재래감귤 및 최근 도입된 감귤품종별 RAPD를 하기 전에 미리 감귤류에 적합한 primer를 선별하고자, UBC 10-mer random primer의 100종을 이용하여 동정귤의 total DNA를 template DNA로 하고 동일한 조건에서 PCR을 수행하였다.

Primer선발은 밴드양상에 따라서 3등급으로 구분하여 보았을 때 밴드가 굵고 깨끗하게 나타나서 이용성이 높다고 판단된 것은 Good, 다소 흐릿한 밴드양상을 보이나 그래도 이용가능한 것으로 보이는 primer는 Common으로, 전혀 밴드가 나타나지 않았던 primer는 Non으로 표시하였다 (표 3).

Table 3. RAPD amplification abilities of random primers

Grade		primer number											
G <sup>z)</sup>	UBC	701	702	703	705	709	714	715	725	726	729	731	733
		734	739	742	744	747	751	765	769	773	774	776	781
		782	792										
C <sup>v)</sup>	UBC	704	706	707	708	710	711	712	713	716	717	719	721
		722	723	724	727	728	730	732	737	740	745	746	748
		749	754	755	756	757	758	759	760	763	766	767	770
		771	772	773	775	777	778	779	780	783	785	786	789
		791	794	795	796	797	798	799	800				
N <sup>x)</sup>	UBC	718	720	735	736	738	741	743	750	752	761	762	764
		768	784	787	788	790	793						

<sup>z)</sup> good band pattern

<sup>v)</sup> common band pattern

<sup>x)</sup> No amplification.

### 3.2 RAPD에 의한 제주 감귤류 분류

공시한 종 및 품종의 잎에서 분리된 total DNA를 이용하여 primer 종류별로 각각 동일한 조건하에서 PCR하여 얻어진 RAPD밴드 양상의 차이를 비교하였다. 앞의 random primer 예비검정시 (Good)등급으로 분류된 26개의 primer중에 11개를 이용하여 PCR 한 결과 공시한 23종 또는 품종으로부터 다형성(polymorphism)이 인정되는 66개의 밴드가 나타났다.

UBC 703 primer는 1.6kb이하에서 3-7개의 밴드로 다양하게 나타났다(그림 10). 0.8 kb부근에서는 리스본 레몬(17), 금감(18), 탕자(19)를 제외한 모든 감귤류에서 공통적으로 밴드가 나타났다. 1.4kb범위에 지각(3)은 독특한 밴드가 나타나서 감귤류간의 식별표지로 이용가능할 것으로 판단되었다.

UBC731 Primer에서, 0.8~1.6kb범위의 병귤(1)과 편귤(4)인 경우 그림 8 에서는 희미한 밴드로 잘 식별이 안되고 있으나 UV하에서는 2개의 밴드형태로 나타났다. 금감(18)은 재래감귤 등의 감귤속과 유사한 밴드형태를 보인 반면, 탕자(19)는 전혀 다른 위치에 특이적인 밴드가 2개 나타났으며, 와싱턴 네블오렌지(15)에서도 0.8kb 범위에 RAPD표지로 이용가능한 밴드 1개가 출현하였다.

탕자는 감귤류의 식물에서 진화되어 오는 동안 다른 감귤류와는 개화시기가 달라 독립적인 진화의 경로를 이루어왔다(백, 1994).

UBC734 primer인 경우(그림 9), 1.6kb이상에서는 비특이적인 밴드형태로 나타나 관독이 곤란하여 데이터메트릭스(표 5) 분석에서 제외시켰다. 0.8~1.6kb에서 던칸 그레이프후룻트(20), 팔삭(22) 그리고 하귤(23)은 모두 동일한 밴드양상을 보였다. 이들은 문단의 교잡에 의해 발생되었을 가능성이 높은 것으로 추정되고 있다 (Barrete와 Rhodes, 1976 ; Green 등 1986 ; 半田 등, 1986 ; Torres 등, 1978; Yamamoto 등, 1993).

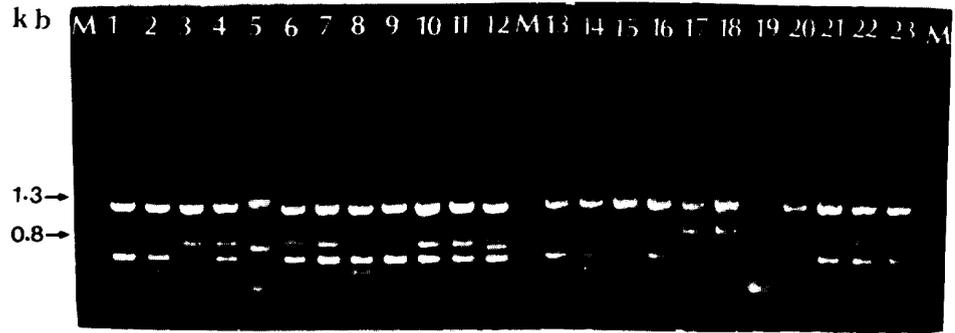


Fig. 7. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC703(CCCACCACCC).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII - EcoR I).

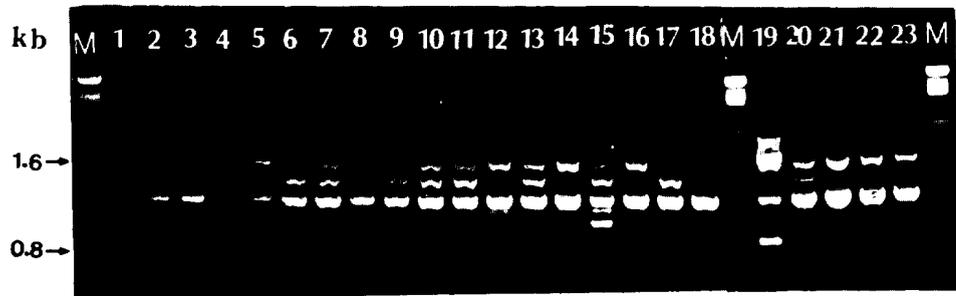


Fig. 8. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC731(CCCACACCAC).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII - EcoR I).



Fig. 9. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC 734(GGAGAGGGAG).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -Hind III - EcoR I).

UBC739 Primer는 0.8~1.6kb사이에 3~8개의 밴드가 나타났으나 관독이 곤란한 경우도 있었다(그림 10). 1.4kb에 금감(18), 탕자(19) 그리고 던칸 그라이프후룻트(20)는 밴드가 나타나지 않았다. 1.5kb의 유자(5)와 0.9kb 부근에서 레몬(17), 금감(18) 그리고 탕자(19)도 각각 1개씩 품종에 따른 적인 밴드가 나타났다.

UBC742 Primer 인 경우, 2.0kb이하에 유자(5)는 단지 5개의 밴드로만 나타난 반면 감자(8), 사두감(12) 그리고 하귤(23) 등은 10개의 밴드가 나타나서 종특이적인 계놈(genome) DNA의 영역이 증폭되었던 것으로 생각된다(그림11).

유자는 Swingle(1967)과 田中(1977)가 분류상 견해를 달리하여 전자는 파페다아속(subgenus *Papeda*)으로, 후자는 후생감귤아속(subgenus *Matacitrus*)에 배치하고 있다. 또한 유자는 동위효소분석 결과(Hirai 등, 1986), Ichang 파페다와 유전적으로 관련된 것으로 추정된바 있으며, 그리고 외부형태적인 형질을 대상으로 다변량 해석한 결과(김, 1988)에서도 재래감귤간에는 원연(遠緣)으로 나타난 바 있다.

UBC744 Primer는 0.5~2.5kb 범위에 5~7개의 밴드가 나타났다(그림 12). 1.4kb 부근의 재래감귤(1~13)중 유자(5)만이 단일밴드로 나타났으며, 씨트론(*C. medica*)과 라임(*C. aurantifolia*)의 교잡(hybride)종으로 추정(Barrett와 Rhodes, 1976; Luro 등, 1992; Swingle, 1967)되는 레몬(17)은 4개의 밴드가 인접된 특이한 양상을 보였다. 금감(18)은 2.0kb에 뚜렷한 3개의 밴드로 나타나 다른 감귤류와는 밴드양상이 다르게 나타났다. 금감은 일반 감귤들과 개화기의 차 등으로 두 식물이 오랜 세월동안 생태적인 단절이 지속되어 왔지만 계놈(genome)도 동일하고 교잡도 용이한 것으로 보아 밀접한 관계를 가지고 이 세상에서 진화되어온 것만은 부인할 수 없다(한 등, 1991).

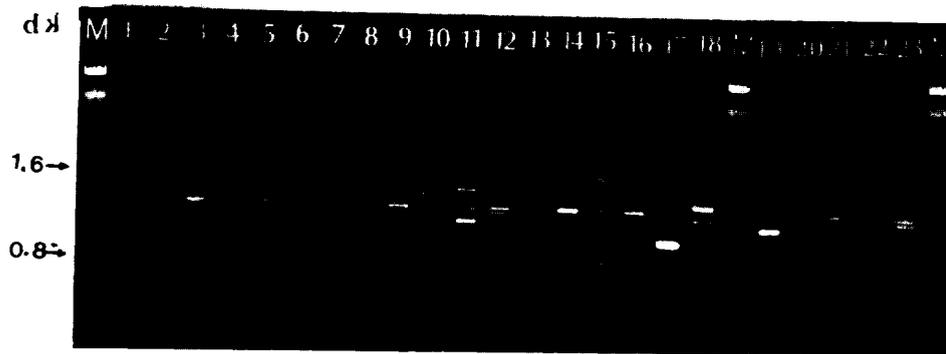


Fig. 10. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC739(CGACGGAGAG).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII + EcoR I)



Fig. 11. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC742(CCTCCCTCCT).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII + EcoR I)

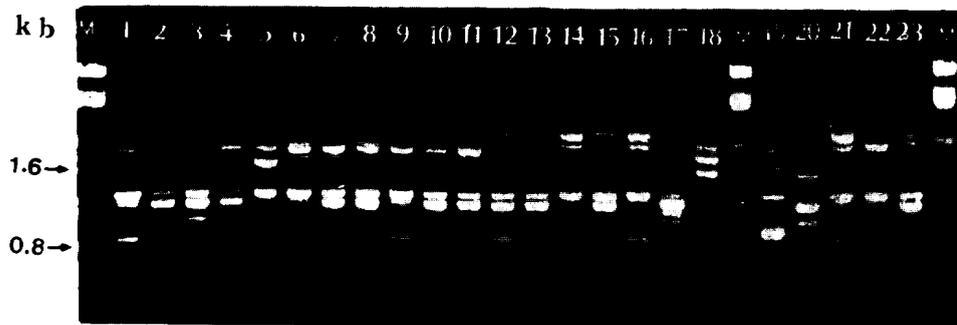


Fig. 12. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC744(CCACCCACCA).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII + EcoR I)

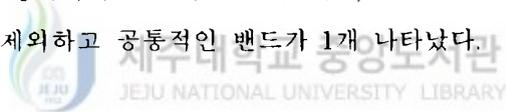
UBC747 Primer는 0.5~2.0kb사이에 리스본 레몬(17)과 던칸 그레이프후룻트에서 1개의 밴드만 나타났다(그림 13). 0.5kb범위에서 재래감귤(1~13)중 병귤(1),감자(8)그리고사두감(12)은 밴드가 없는 양상을 보였으며, 2.0kb부근에서는 금감(18)만이 3개의밴드가 인접된 형태로 나타났다.

UBC769 Primer인 경우, 공시한 23개감귤류에서 6~8개의 밴드가 나타났다(그림 14). 0.5kb에서는 유자(5), 리스본 레몬(17), 금감(18), 탕자(19) 그리고 던칸 그레이프후룻트(20)는 밴드가 나타나지 않았다.

재래감귤(1~13)의 전체적인 밴드양상중 편귤(4)과 홍귤(11)은 매우 유사하였으며 또한 당유자(12), 인창귤(9) 그리고 사두감(12)간에 공통적인 밴드가 많았다.

0.8kb 또는 2.0kb에서 던칸 그레이프후룻트(20), 리스본 레몬(17) 그리고 탕자(20)는 품종에 따른 특이적인 밴드가 각각 1개씩 나타났다.

UBC773 Primer의 경우에(그림 15), 1.4kb이상에서는 비특이적인 밴드양상으로 나타나 데이터메트릭스(표 5)작성시 제외시켰다. 0.5kb에는 리스본 레몬(17), 금감(18), 탕자(19), 던칸 그레이프후룻트(20), 팔삭(22) 그리고 하귤(23)에서만 각각 1개의 밴드가 나타났는데, 이중 던칸 그레이프후룻트, 팔삭 그리고 하귤은 문단과 밀접하게 연관된 것으로 추정되어지고 있다(半田과 大垣, 1985; Hirai 등, 1986). 0.8kb 부근에서 탕자(19)를 제외하고 공통적인 밴드가 1개 나타났다.



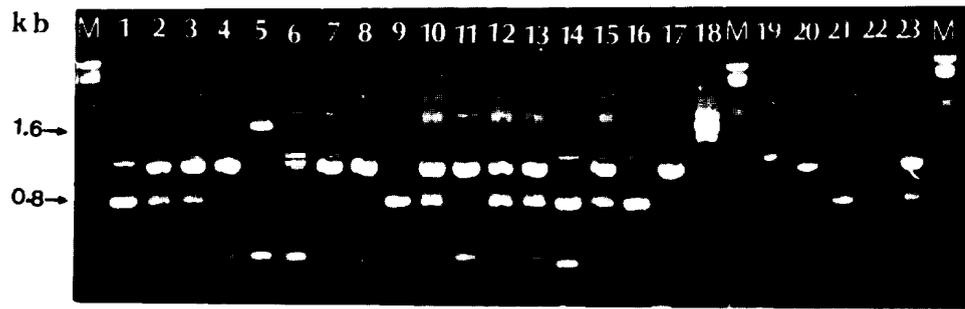


Fig. 13. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC747(CCACCAACCA).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII - EcoR I)

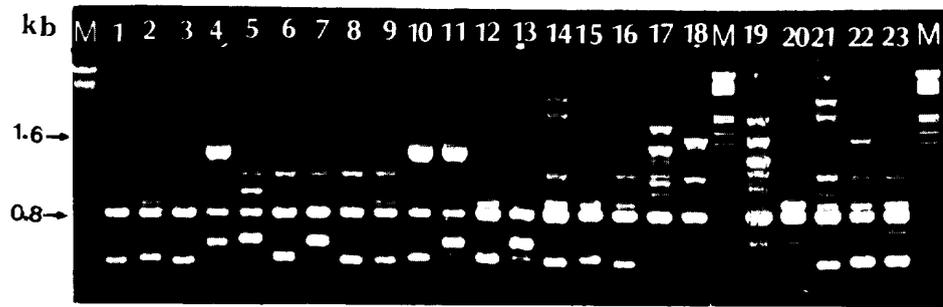


Fig. 14. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC769(GGGTGGTGGG).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII - EcoR I)

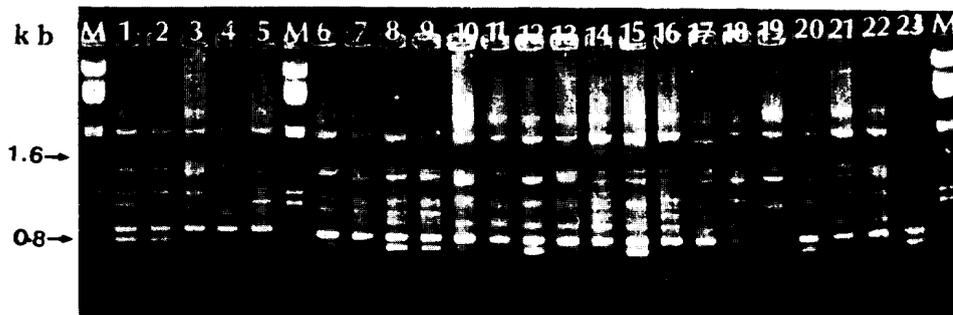


Fig. 15. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC773(GGGTGTGTGT).  
 1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
 M: Molecular size marker( $\lambda$ -HindIII - EcoR I)

UBC781 Primer는 1.4kb이상에서는 공시한 모든 감귤류에서 공통적으로 4개이상의 밴드가 나타났으나 품종간 차이는 인정할 수 없었다(그림 16).

0.5kb에서 정도(16)은 품종특이적인 밴드가 1개 나타나서 온주밀감인 궁천(14), 홍진(21)간의 판별용 표지로 이용가능할 것으로 판단되었으며, 인창귤(9)에서도 특이적인 밴드가 1개 나타났다.

재래감귤(1~13)의 외부 형태적인 화기 구조중 유일하게 꽃차례(花序)를 이루는 당유자(2)와 사두감(12)의 밴드양상은 특이하였다. 또한 탕자(19)는 다소 희미한 1~2개의 밴드양상으로 나타나서 다른 감귤류와 비교해 볼때 특이하였다.

UBC783 Primer인 경우에, 0.5~1.9kb사이에서는 뚜렷한 3~6개의 밴드로 나타났으나, 1.9kb이상인 경우 극히 희미한 밴드로 이루어져 데이터분석(표 5)에 이용이 곤란 하였다(그림 17). 1.8kb부근에서 온주밀감(14, 16, 21), 와싱톤 네블로렌지(15)는 1개의 밴드였으나 공시한 나머지 감귤류에서는 2~3개의 밴드로 이루어진 양상을 보였다.

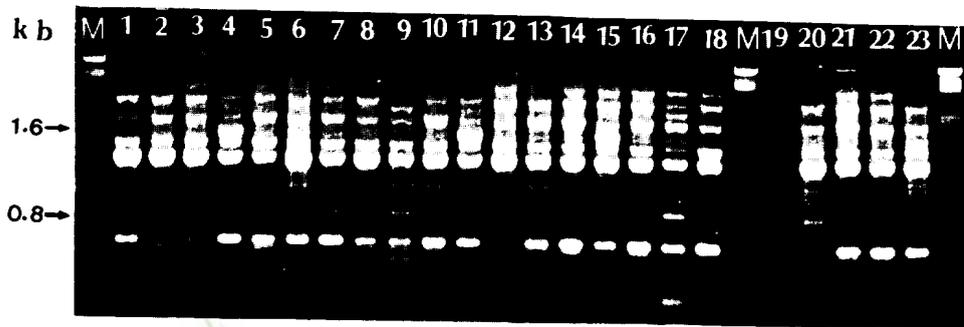


Fig. 16. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC781(GGGAAAGAAAGG).  
1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
M: Molecular size marker( $\lambda$ -Hind III-EcoR I)

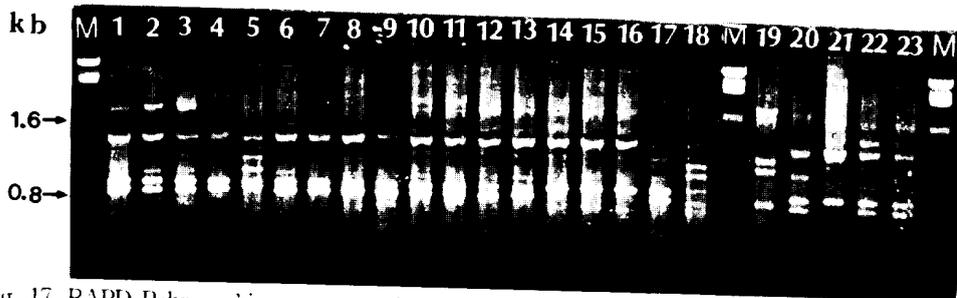


Fig. 17. RAPD Polymorphisms generated by primer UBC783(GGTGGGT(TGT)).  
1-23: Refer the name of the Citrus spp or cvs and the related genera in table 1.  
M: Molecular size marker( $\lambda$ -Hind III-EcoR I)

### 3.3 집괴분석

공시한 재래 감귤 및 온주밀감, 감감, 탕자 등 23종 또는 품종을 대상으로 11개의 primer를 이용하여 RAPD를 수행한 결과 품종간 차이가 나타나는 66개의 밴드를 코드화하여 이를 표 5에서와 같이 정리하였고 유클리드 유사계수에 기초한 비가중 평균결합법으로 집괴 분석한 결과는 그림 18과 같다. 감귤속(genus)간 유클리드 거리계수에 의한 집괴분석시 유사도의 기준은 스위트 오렌지와 만다린, 팔삭, 하귤, 그레이프 후룻트가 각각 동일한 군 또는 근연관계로 나타났지만, 리스본 레몬은 이들 군과는 원연으로 보고한바 있는 수리분류학적인 연구(Barrett과 Rhodes, 1976; 半田와 大垣, 1985), 생화학적인 연구(Hirai와 Kajiura, 1986; Torres등, 1978), RFLP와 RAPD연구(Green 등, 1986; Luro 등 1992; Yamamoto 등, 1993) 등을 고려한 0.53(굵은점선)으로 하였을 때, 공시한 종 또는 품종들은 크게 6개군으로 분류되었다.

세 1군에는 유자를 제외한 제주재래감귤, 와싱턴 네블오렌지, 그리고 온주밀감이 속하였다. 특히 제주재래감귤간의 변이성은 유자를 제외하고 상대적으로 크지 않은 것으로 나타나서 특이하였다.

문(1986)은 동위효소분석에서 Pgm(Phosphoglucumutase)의 유전자형이 동형 또는 이형상태로 재래감귤은 모두가 F인자를 가지며, 또한 Got-1(Glutamate oxaloacete transaminase-1)의 유전자조성도 사두감을 제외하고 모든 종 또는 품종이 S인자를 공통적으로 가지고 있다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 대다수의 재래감귤들은 오랜기간동안 섬이라는 제한된 상황에서 상호간 유전자 혼입이 이루어졌을 가능성이 크다고 추정된다.

온주밀감(*C. unshiu*)과 스위트오렌지(*C. Sinensis*)류인 와싱턴 네블오렌지 경우에 半田와 大垣(1985)은 다변량 해석 결과 동일한 군에 속하였으며 Luro 등(1992)이 감귤속에 대한 RAPD분석 결과에서도 앞의 결과와 유사하게 보고한 바 있다. Hirai와 Kajiura(1987) 그리고 Hira 등(1986)의 동위효소 분석결과에서도 Got-1, Got-2, Mdh-2, Px(peroxidase), Ppo(Polyphenol oxidase), Sod(Superoxide dismutase)-2 그리고 Sod-3 등은 모두 동일한 대립유전자를 공통으로 가지며, 또한 Got-3에서도 이형집합유전자중 하나의 인자는 서로 동일하였다는 결과를 고찰해 볼 때 온주밀감과 스위트오렌지는 매우 밀접한 근연관계임을 알 수 있었다.

문단(pummelo)의 교잡으로부터 파생된 것으로 추정되고 있는 (Barrett와 Rhodes, 1976; Green 등, 1986; 半田와 大垣, 1985; Luro 등, 1992; Torres 등, 1978;

Yamamoto 등, 1993) 팔삭, 하귤 및 그레이프후룻트 등은 모두 제3군에 속하였다. 리스본 레몬과 유자는 앞의 군(群)에 속한 식물들과는 원연(遠緣)인 각각 하나의 군으로 나타났다. 유자는 Swingle(1967)과 Tanaka(1977)가 분류상 견해를 달리하여 전자는 Ichang 파페다와 중국 만다린의 교잡실생으로 보아 파페다아속(Subgenus papeda)의 *C. ichangensis* hybrid로 인정하고 있는 반면, 후자는 교잡이 되지 않은 자연적인 실생으로 하여 초생감귤아속(Subgenus Matacitrus)의 유자구(section Osmocitrus)에 *C. junos* Seib로 분류하고 있다. 그러나 Hirai 등(1986)는 유자의 유전자형인 Mdh-1의 대립유전자가 BB인데 반하여, 중국 만다린에서는 B대립유전자가 발견되지 않은 점을 들어 유자는 Ichang 파페다와 중국 만다린의 후손은 아니라고 제안하는 한편, 유자의 유전자형인 Got-2의 대립유전자중 B인자는 파페다 레몬에서 나타난 점과 중국의 파페다는 단배성이며, 다소 유전적으로 다양성이 있음을 건주어 볼 때 Got-2의 B대립 유전자가 Ichang 파페다에 존재함을 배제할 수는 없다고 보고한 바 있다. 이어서, Hirai와 Kajiura(1987)는 Ichang 파페다(*C. ichangensis*)는 유자, Ichagn 레몬, 그리고 동부아시아의 몇가지 감귤에 영향을 준 것으로 추정되며, 감귤아속(subgenus)의 종 또는 품종들이 파페다에서 진화되어온 경우에는 다계통적인 진화경로를 이루어 왔을 가능성이 있다고 보고한 바 있다.

리스본 레몬인 경우, Swingle(1967)은 레몬의 기원을 명확히 설명할 수는 없지만, 씨트론(*C. medica*)의 또다른 한종(Species)이거나 라임(*C. aurantiifolia*)과 교잡되었을 가능성이 있다는 견해를 밝힌 바 있으며, 다변량해석(Barrett와 Rhodes, 1976)과 RAPD분석(Luro, 1992)에서도 씨트론, 라임 그리고 확인할 수 없는 종과의 교잡실생을 그 기원으로 추정하였다.

이상의 감귤속 유연관계 분석결과를 감귤속 분류에 널리 적용되어 오고 있는 형태적인 형질에 기초한 Swingle(1967), 田中(1977)의 분류체계와 비교 하기에는 일부 한정된 종(Species)만을 대상으로 하였기 때문에 전체적으로 설명하기에는 어려웠으나, 부분적으로는 비교 가능하였다. 제1군의 유자를 제외한 제주재래감귤, 스위트 오렌지인 와싱턴 네블오렌지, 만다린 등이 근연적(近緣的)인 유연관계로 나타난 점은 앞의 형태적 형질에 의한 분류체계로는 설명이 곤란하였다. 따라서 본 유연관계 분석 결과를 계통학적인 수리분류학연구(Barrett와 Rhodes, 1976; 半田과 大垣, 1985), 생화학적인 연구(Hirai와 Kajiura, 1987; Torres 등, 1978) 그리고 분자생물학적인 연구(Green 등, 1986; Luro 등, 1992; Yamamoto 등, 1993)와 비교 고찰해 볼 때, 유자를

세외한 재래감귤, 와싱턴네블오렌지, 온주밀감을 포함하는 만다린(*C. reticulata*)군(I group), 팔삭, 하귤, 던칸 그레이프후룻트는 문단과 유전적으로 관련된 것으로 추정되는 군(III group), 그리고 이들 군과 원연으로 나타난 리스본 레몬(II group)의 기원은 씨트론(*C. medica*)의 교잡실생으로 추정되고 있는 점과, 유자(IV group)가 Swingle의 분류체계에서 *C. ichangensis* hybrid로 분류된 점을 고려해 볼 때, 이러한 분류적 유연관계는 Scora(1975)가 제안한 감귤속 분류에 의해 과페다아속과 감귤아속의 문단(*C. grandis*), 씨트론(*C. medica*) 및 만다린(*C. reticulata*)등 세 개의 기본종을 인정한 분류와 유사하였다.

재래감귤간의 분류적 유연관계(그림 18)는 김(1988)의 재래감귤에 대한 다변량 해석법에서 지각과 당유자가 동일한 군(group)에 속한 점을 고려한 유클리드 유사계수 0.66(가는 점선)을 기준하여, 감귤속 분류와 구별하기 위하여 소군(subgroup)으로 분류한 결과 5개의 소군으로 이루어졌다.

A소군에는 온주밀감을 포함한 인장귤이 속하였다. 인장귤은 지금까지 재배감귤의 분류연구(홍 등, 1976; 정, 1957; 김, 1988; 김과 허, 1978)에서 전혀 언급되지 않은 점으로 미루어 보아 재래감귤과 동종이명이거나 재래감귤 분류에 누락되었을 가능성을 배제할 수 없지만, 이 시험결과에서 재래감귤과는 유연관계가 멀었고 특히 재래감귤중 인장귤만이 최근 도입품종인 온주밀감에 가까운 것으로 나타나서 재래감귤로서 특이하였다. 인장귤에 대한 형태적인 분류 뿐만 아니라 재래감귤들과의 유연관계 분석에 대한 차후 검토가 있어야 할 것으로 생각되었다.

B소군에는 당유자, 사두감, 지각, 동정귤 그리고 스위트 오렌지류인 와싱턴 네블 오렌지가 속하였다. 김(1988)의 재래감귤 검색표에 의하면 재래감귤중 당유자, 사두감, 지각 만이 화서를 이루어 총상구조이며 화계(花系)의 융합성이 약하고 과실이 큰 것이 공통적인 특징을 가지고 있다고 하였다. 또한, 田中の 분류체계에 따라 당유자와 사두감은 팔삭, 그레이프후룻트와 동등한 문단구(section *Cephalocitrus*)로, 지각은 스위트 오렌지인 와싱턴 네블오렌지와 함께 아우란티움구(section *Aurantium*)로 하고 있다. 이 시험의 결과에서, 지각은 아우란티움구인 것으로 인정이 되었으나, 당유자와 사두감은 팔삭이나 그레이프후룻트와는 다른 소군으로 분류되었다.

동정귤은 김(1988)과 김·허(1978)가 분류상 견해를 달리하고 있는 재래감귤이다. 김과 허(1978)에 의하면, 동정귤은 당유자의 과면(果面)의 요철(凹凸)보다 더 심하게 나타나고, 지각과 같이 경침이 없으며, 과중은 50 ~ 80g 정도인 특징이 있다고 보

고한바 있다. 또한, 학명을 *C. suavisissima*로 확인한바 있다. 그러나, 김(1988)은 *C. suavisissima*(Mac Ather Orange)인 경우에 과실이 크고(220g) 종자표면에 망상의 무늬가 있으며 백색 단배성인데 반하여, 동정귤은 과실이 작고 배(胚)는 녹색 단배성인 점에서 김과 허(1978)와는 다른 견해로 *C. erythrosa*로 학명을 확인하였다. 그러나 양자 모두 동정귤을 田中의 분류체계에서 후생감귤아속(subgenus *Metacitrus*)의 밀감구(section *Acrumen*)에 배치하는데 일치하고 있다. 이 시험에서의 유연분석결과도 동정귤이 후생감귤아속에 속하는 것은 인정되었지만 밀감구와는 원연으로 나타났다.

김(1988)의 외부형태적인 형질의 다변량해석에 의한 재래감귤간의 유연관계 분석에서 홍귤, 빈귤, 청귤, 진귤, 동정귤은 하나의 군(group)으로 나타났으나, 이중 동정귤은 과표면(果表面)의 사두감이나 당유자처럼 요철(凹凸)이 있어 특이하고(김과 허, 1978) 또한 동위효소분석(문, 1986)에서 홍귤, 빈귤, 청귤, 진귤 등 재래감귤의 과반수는 소유자의 후손일 가능성이 높다고 추정된 바 있는데, 동정귤은 그 대상에서 제외된 점으로 미루어 보아 유자보다는 당유자 또는 사두감과 유전적으로 관련이 있을 것으로 추정 되었다.

C소군에는 진귤, 홍귤, 편귤, 빈귤, 청귤, 감자가 속하였다. C소군에 속한 재래감귤중 편귤과 감자인 경우, 김(1988)은 형태적형질의 다변량해석법에 의한 유연관계 분석에서 별도의 군(group)으로 분류된다고 보고한바 있다. 그러나 재래감귤의 동위효소분석(문, 1986)결과 C소군에 속한 재래감귤 모두 유자의 후손으로 추정된다고 하였는데, 그러한 이유로는 소유자의 *Mdh-1*이 독특하게 MM이고 Tanaka(田中) 분류체계에서 유자(소유자) 전후에 위치한 C소군에 속한 모든 재래감귤과 병귤은 FM으로 M인자를 이형집합상태로 가지고 있으며, 또한 PX표현형에 있어서도 소유자가 PX-9이상의 동위효소들을 많이 가지고 있는데, *Mdh-1*이 FM인 앞의 재래감귤 모두가 PX-9이상의 동위효소를 가지고 있는점으로 미루어 이들 재래감귤들은 소유자 후손일 가능성이 높다고 하였다. 그러나 Hirai 등(1986)은 제주도 원생(原生)청귤(*C. nippokoreana*)과 일본 기원의 만다린인 경우, Got-2의 A와 *Mdh-1*의 B를 가지고 있으나 중국기원의 만다린에서는 나타나지 않는 점을 들어 각각 그 기원을 달리하는 한편 *Mdh-1*의 B(M;문, 1986) 대립인자는 유자에도 발견되었으나, 유자는 중국으로부터 도입된 점과 만다린은 엽익(葉翼)이 없을뿐만 아니라 향미(香味)도 유자와 달

라서 유자가 유전적으로 만다린에 영향을 주었다고 추정하기는 어렵다고 보고한 바 있다. 그리고 홍귤(Korai-tachibana)과 온주밀감은 Mdh-2의 대립유전자를 각각 다른 BB와 DD인 동형접합 상태로 나타난 Hirai 등(1986) 동위효소분석 결과를 미루어 볼 때 본 시험의 온주밀감과 홍귤은 원연(遠緣)임을 알 수 있었다.

이상의 결과를 고찰해볼때, C소군에 속한 재래감귤들은 김(1988)의 외부형태적형질에 의한 田中の 분류체계상에서 후생감귤아속(subgenus Metacitrus)의 밀감구(section Acrumen)에 배치한 점은 인정되었으나 감귤류의 식물들은 종 또는 속간 교잡이 가능한 것이 많아서 잡종으로 형성된 종(species)의 경우, 유연관계 분석에 혼란을 초래할 수 있다. 따라서 대부분의 육상식물의 경우에 모계유전하는 것으로 알려진 cpDNA(엽록체 DNA)와 mtDNA(미토콘드리아 DNA)분석은 잡종으로 형성된 종(species)인 경우 그 모계쪽의 계통을 파악할 수 있는 장점이 있어(이, 1993), 차후 재래 감귤에서도 mtDNA 또는 cpDNA분석에 의한 유연관계 분석도 병행되어야 할 것으로 생각되었다.

재래감귤중 병귤과 유자는 앞의 군에 속한 재래감귤들과는 원연으로 각각 독립적인 군으로 나타났다. 병귤의 경우 형태적으로 재래감귤중 독특한 Collared 과형을 가진 것이 특징이며(김 등, 1978; 김, 1988) 형태적 형질을 수리화한 유연관계(김, 1988)에서도 재래감귤간에 원연인 것으로 나타나서 이실험의 결과와 유사하였다.

유자는 김(1988)의 형태적적인 유연관계 분석에서도 재래감귤간에 독립적이었고, 또한 동위효소분석(문, 1986)에서도 Mdh-1의 대립인자가 독특한 MM인 동형접합체를 가지고 있어 재래감귤중에 특이함을 알 수 있었다.

Table 5. Coded data matrix of 67 RAPD bands in Citrus spp or cvs and the related genera.

Species or cultivars	UBC-703 <sup>2</sup>			UBC-731			UBC-734			UBC-739			UBC-742																					
	0 <sup>1</sup>	0	1	0	1	12	0	0	2	0	0	1	1	2																				
Byungkyool	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	2											
Dangyoaja	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0										
Jikak	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0									
Pyunkyoool	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0									
Yooja	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0									
Dongjeongkyool	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0								
Jinkyool	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0								
Kamja	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0							
Inchangkyool	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0							
Cheongkyool	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0							
Hongkyool	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0							
Sadookam	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0					
Binkyool	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0					
Miyaga Early	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0					
Washington navel orange	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0					
Aoshima unshiu	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0					
Lisbon lemon	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0				
Oval kumquate	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0				
Trifoliolate orange	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Duncan grapefruit	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Okitsu Early	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0		
Hassaku	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	
Natsudaidai	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0

to be continued.



Table 6. Euclidean similarity coefficient matrix between Citrus spp or cvs and related genera

Spp or Cvs <sup>a)</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	1.000																						
2	0.108	1.000																					
3	0.100	0.129	1.000																				
4	0.105	0.123	0.120	1.000																			
5	0.071	0.079	0.073	0.082	1.000																		
6	0.122	0.138	0.133	0.161	0.083	1.000																	
7	0.098	0.134	0.146	0.180	0.082	0.166	1.000																
8	0.117	0.139	0.131	0.147	0.079	0.156	0.147	1.000															
9	0.113	0.131	0.120	0.115	0.078	0.149	0.117	0.127	1.000														
10	0.110	0.134	0.138	0.174	0.079	0.138	0.144	0.138	0.154	1.000													
11	0.098	0.118	0.126	0.213	0.082	0.138	0.248	0.135	0.111	1.159	1.000												
12	0.116	0.215	0.126	0.112	0.076	0.123	0.113	0.123	0.126	0.114	0.108	1.000											
13	0.121	0.135	0.152	0.148	0.079	0.152	0.152	0.159	0.143	0.178	0.130	0.121	1.000										
14	0.107	0.125	0.155	0.111	0.085	0.131	0.118	0.115	0.143	0.143	0.111	0.113	0.135	1.000									
15	0.111	0.143	0.137	0.131	0.076	0.164	0.133	0.128	0.140	0.143	0.117	0.126	0.158	0.134	1.000								
16	0.104	0.121	0.117	0.113	0.083	0.134	0.120	0.106	0.151	0.137	0.113	0.110	0.129	0.279	0.138	1.000							
17	0.091	0.106	0.108	0.105	0.071	0.133	0.106	0.099	0.111	0.111	0.097	0.093	0.117	0.113	0.141	0.109	1.000						
18	0.058	0.058	0.059	0.061	0.057	0.059	0.060	0.060	0.057	0.069	0.060	0.058	0.060	0.059	0.062	0.060	0.058	1.000					
19	0.053	0.052	0.051	0.053	0.051	0.053	0.053	0.054	0.052	0.052	0.053	0.051	0.052	0.054	0.052	0.053	0.050	0.049	1.000				
20	0.081	0.094	0.084	0.084	0.067	0.088	0.084	0.091	0.084	0.082	0.080	0.093	0.085	0.083	0.051	0.082	0.079	0.055	0.050	1.000			
21	0.113	0.126	0.122	0.117	0.085	0.141	0.125	0.122	0.144	0.158	0.118	0.114	0.146	0.345	0.125	0.217	0.101	0.059	0.054	0.080	1.000		
22	0.089	0.113	0.110	0.096	0.072	0.103	0.097	0.108	0.097	0.094	0.093	0.116	0.098	0.098	0.097	0.096	0.089	0.057	0.052	0.115	0.098	1.000	
23	0.089	0.123	0.098	0.091	0.072	0.096	0.095	0.097	0.095	0.095	0.091	0.120	0.096	0.095	0.097	0.097	0.090	0.056	0.050	0.123	0.095	0.124	1.000

<sup>a)</sup>See Table 1 for the names corresponding to the number.

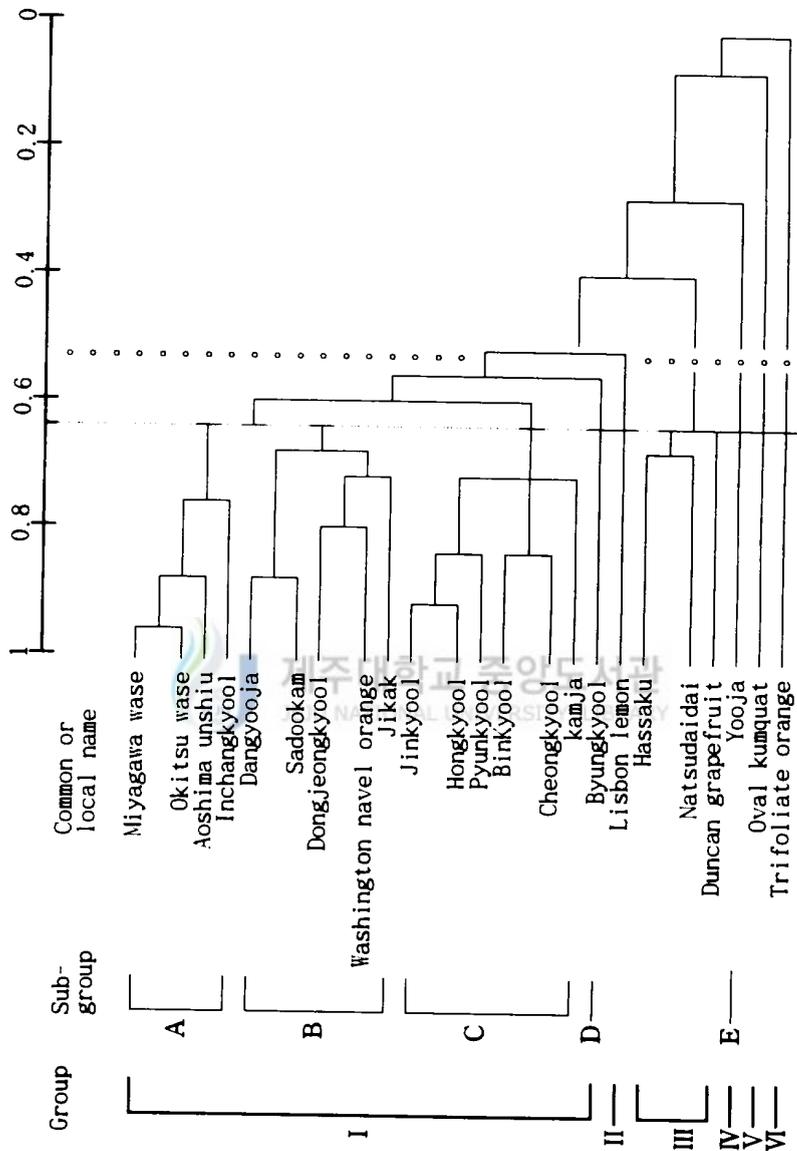


Fig. 18. Dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis based on euclid similarity coefficient by using 66 RAPD bands of the Citrus spp or cvs and the related genera.

#### 4. 제주 재래감귤의 식별 표지선발

Primer 11개를 이용하여 PCR한 결과로 얻은 66개 RAPD밴드들 가운데 하나 혹은 두 개의 밴드로 제주재래감귤과 최근도입된 온주밀감, 귤감, 탕자를 각각 감별할 수 있는 RAPD표지를 선발하였다(표 7, 8).

재래감귤간에는 병귤, 지각, 유자는 단 한 개의 밴드만으로도 식별이 가능하였다. 두 개 밴드를 표지로 하였을 때는 당유자, 동정귤, 사두감이 추가된 총 6개 재래감귤을 식별할 수 있었으며, 이 경우는 두 밴드 각각의 유무에 의하여 중간차이가 구분되었다(표 7).

공시한 23종을 대상으로 한 경우, 병귤, 네블오렌지, 하귤등 9개 품종이 하나 혹은 두 개 밴드로 식별이 가능 하였다(표 8). 그러나 관찰된 66개의 밴드조합을 모두 이용하면 온주밀감의 조생계통인 궁천조생과 홍진조생의 차이를 포함하여 공시된 모든 종 또는 품종구별이 가능하였다. 그러나 한 두개의 primer에 의한 감귤식별용 표지를 선발하기 위해서는 보다 많은 primer를 검토해야 할 것으로 생각되었다.

Table 7. RAPD markers for the identification of Cheju native Citrus spp or cvs

Common or local name	RAPD marker
Byungkyool	UBC 703-1.6 <sup>2)</sup> (a) <sup>1)</sup>
Jilkak	UBC 703-1.6(p)
	UBC 703-1.3(a) and 703-1.6(p)
Yooja	UBC 703-1.6(p) or 734-0.8(a) or 739-0.8(a)
	or 747-0.9(p) or 769-0.8(p)
Dangyooja	UBC 781-0.8(a) and 734-0.9(p) or 731-1.3(a)
Dongjeongkyool	UBC 742-1.3(a) and 703-1.6(a)
Sadookam	UBC 781-0.8(a) and 734-0.9(a) or 731-1.3(p)
	UBC 731-1.3(p) and 703-1.6(a) or 734-0.9(a)
	or 742-1.3(p) or 747-0.9(a) or 769-0.8(a)

<sup>2)</sup>Molecular size(kb)

<sup>1)</sup>a: band absent, p: band present.

Table 8. RAPD markers for the identification of Citrus spp or cvs and the related genera

Common or local name	RAPD marker
Byungkyool	UBC 703-1.6 <sup>z)</sup> (a) <sup>y)</sup> and 731-0.8(a) or 742-1.5(p) or 744-1.4(a)
Jikak	UBC 703-1.6(p) and 734-2.0(a)
Yooja	UBC 703-1.6(p) or 769-0.8(p) UBC 747-0.9(p) and 744-1.5(a)
Washington navel orange	UBC 731-1.3(p)
Lisbon lemon	UBC 739-0.9(p) or 769-2.0(p)
Oval kumquat	UBC 739-0.9(p) or 742-2.0(p) or 747-2.0(p)
Trifoliolate orange	UBC 731-0.8(p) or 744-0.5(a)
Duncan grapefruit	UBC 744-1.4(a) or 773-0.8(a)
Hassaku	UBC 70.-1.6(p) and 7.4-2.0(a)

<sup>z)</sup>Molecular size(kb)

<sup>y)</sup>a: band absent, p:band present

## V. 적 요

감귤류의 RAPD분석의 기초를 확립하고자 PCR반응용액을 구성하는 각 요소들의 최적농도를 구명하였으며, 제주재래감귤을 중심으로 23종 또는 품종의 감귤에 대해 RAPD방법으로 그 분류적 유연관계를 밝히고 아울러 판별용 RAPD 표지를 선별한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 감귤류의 RAPD분석에는 25 $\mu$ l 반응용액 기준으로 template DNA 10ng, Taq polymerase 1.5unit, dNTP 200 $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2mM을 각각 첨가하는 것이 적당하였다.
2. 감귤류 RAPD분석에 적합한 primer를 선별하고자 (G+C 67%인 10-mer random primer 100종을 대상으로하여 시험한 결과 이용성이 우수, 보통 그리고 반응이 안 되는 primer는 각각 26, 56, 18 종으로 나타났다.
3. 예비실험에서 이용성이 높다고 판단된 26개의 primer중 11개를 이용하여 PCR한 결과 종 또는 품종간 다형성이 인정되는 RAPD 밴드는 66개였다.
4. 집괴분석에 의한 감귤속(genus)간 분류적 유연관계는 유클리드 유사계수 0.53을 기준하였을 때 유자를 제외한 재래감귤, 와싱턴 네블오렌지 그리고 온주밀감으로 구성된 하나의 군과 팔삭, 하귤 그리고 던칸 그레이프후룻트가 또 하나의 군(group)으로 이루어진 반면 리스본 레몬, 유자는 이들 군과는 원연으로 나타났다. 이와같이 분류되어진 결과는 Swingle 또는 田中の 분류체계와는 상이하였으나 Scora(1957)의 감귤속 분류결과와는 유사하였다.
5. 재래감귤간의 분류적 유연관계 분석은 감귤속분류와 구별하기 위하여 소군(subgroup)으로하고 유클리드 유사계수 0.66으로 하였을 때 5개군으로 나누어졌다. 인창귤 및 온주밀감의 소군, 당유자, 사두감, 지각, 동정귤 및 와싱턴 네블오렌지의 소군 그리고 진귤, 홍귤, 편귤, 청귤 및 감자의 소군으로 분류되었으며 병귤과 유자는 이들군에서 각각 원연으로 나타났다.

6. 제주재래감귤의 관별용 표지를 선별한 결과 병귤, 지각, 유자는 단 한개의 밴드 만으로도 식별이 가능하였으며, 두 개의 밴드를 표지로 한 경우에는 총 6개의 재래 감귤을 식별할 수 있었다. 감귤속 뿐만 아니라 탕자, 금감 등 23종 또는 품종은 하나 혹은 두개의 RAPD 밴드를 표지하였을 때 9개 종 또는 품종 구별이 가능 하였다.

7. 11개의 primer에 의한 66개의 밴드조합을 이용하면 23개의 종 또는 품종이 모두 구별되었다.

## VI. 참고문헌

1. Albanese, G., R. Renis, and G.R. Recupero. 1992. RFLP analysis of different lemon cultivars. Proc. Int. Soc. Citriculture. pp. 208-209.
2. Anderson, C.M., S.C. Willam, and G.A. More. Isozymic identification of zygotic seedling in Swingle citrumelo *Citrus paradisi* × *poncirus triplata* nursery and field populations. J. Ame. Soc. Hort. Sci. 116(2): 322-326.
3. Ashari, S., D. Aspinall, and M. Sedgley. 1989. Identification and investigation of relationships of mandarin type using isozyme analysis. Scientia Horticulture. 40: 305-315.
4. Barrett, H.C. and A.M. Rhodes. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. Syst. Bot. 1: 105-136.
5. 白子勳. 1994. 果實生理學(柑橘). 光文堂. pp. 13-22.
6. Bostein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Amer. J. Hum. Genet 32: 314-331.
7. Chee, P.P., R.F. Drong, and J.L. Slightom. 1991. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. Plant Molecular Biology Manual. C3: 1-28.
8. 제주도. 1992. 제주도 식물도감(증보판). 경신인쇄사. pp. 252-254.
9. Davies, F.S. and L.G. Albrigo. 1994. Citrus. pp. 1-4. Redwood Books Co., Wiltshire.
10. Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl. Aci. Res. 19(6): 1349.
11. Eron, J.J., P. Gorezyca, and J.C. Kaplan. 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplificatin heating. Nucl. Aci. Res. 19: 3749.
12. Esen, A. and R.K. Soost. 1974. Polyphenenol oxidase-catalyed browning of young shoot extracts of Citrus taxa. J. Amer. Soc. 99(6): 484-489.
13. Fang G., S. Hammar, and R. Grumet. 1993. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13: 52-56.
14. Gray, A.I. and P.G. Waterman. 1978. Coumarins in the Rutaceae. phytochemistry 17: 845-864.
15. Green, R.M., A. Vardi, and E. galum. 1986. The plastome of Citrus. physial map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera.. Theor. Appl. Gente 72: 170-177.

16. Halward, T., t. Stalker, E. LaRue and G. Kochert. 1992. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plant Mol. Biol. 18: 315-325.
17. 半田 高, 大垣智昭. 1985. 形態形質の數量化によるカンキツ類の分類-多變量解析の4手法の適用-. 園學雜. 54(2): 145-154.
18. 韓海龍, 權五均. 1993. 柑橘園藝新書. 先進文化社. pp. 3-7.
19. Hirai, M. and I. Kajiura. 1987. Genetic analysis of leaf isozymes in Citrus. Japan. J. Breed. 36: 377-388.
20. Hirai, M., I. Kozaki, and I. Kajiura. 1986. Isozyme analysis and phylogenic relationship of Citrus. Japan. J. Breed. 36: 377-389.
21. Hoelzel, A.R. and Green. 1992. Analysis of population level variation by sequencing PCR amplified DNA. In: Molecular genetic analysis of populations. A Prectical Aproch. pp. 159-187. IRL press.
22. Hooker, J.D. 1875. The flora of British India. Reeve & Co., London. 7 Vol.(Rutaceae) 1: 484-517. 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. Webber( eds.), The Citrus industry, Vol. I. Univ. Calif. Div. Agri. Sci., Berkley, CA.
23. Iezzoni, A.f. and M.P. Pritts. 1991. Applicatons of principal component analysis to horticultural research. HortSci. 26: 334-338.
24. 岩政正男. 1976. 柑橘の品種. 靜柑連. pp. 10-29.
25. Jeffrey, S.A.J., V. Wilson, and S.L. Thein. 1985. Hypervariable minisatelite regions in human DNA. Nature. 314: 39-41.
26. 鄭台鉉. 1957. 韓國植物圖鑑. 新志社. pp. 260-262.
27. Kanzan, K., J.M. Manners, and D.F. Canero. 1993. Genetic variation in agronomically important speices of *stysanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 85: 882-888.
28. 金漢鏞. 1988. 濟州在來柑橘(Citrus spp.)의 分類와 有用形質 및 遺傳標識에 關한 研究. 全南大學校 博士學位 論文.
29. 金漢鏞. 1994. 柑橘品種改良 現況과 方向, 2000年代를 對備한 柑橘育種研究 方向. 農業振興廳濟州柑橘研究所. 行政刊行 9405: 3-6.
30. 金京植, 金文洪. 1979. 濟州道 在來柑橘의 植物學的研究(第五報) · 在來柑橘의 細胞分類學的研究. 제주대논문집(자연과학편) 11:99-103.
31. 金文洪, 許仁玉. 1978. 濟州道 在來柑橘의 植物學的研究(第四報), 在來柑橘의 分類學的研究. 제주대논문집(자연과학편) 10: 107-112.
32. Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDremott, and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85: 901-904.
33. 高月子, 許仁玉, 金昌玟. 1982. 濟州道産 柑橘屬 植物의 成分分類學的 研究. 韓國植物學會志. 25: 9-19.

34. 羅正榮, 米森敬三 杉浦明. 1995. 가키의品種同定のためのRAPD分析. 園學雜. 64(3): 535-541.
35. 李載順. 1993. RFLP 및 PCR을 이용한 포플러 葉綠體 DNA研究. 忠南大學院 博士論文. pp. 14-15.
36. 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.
37. 이장복. 1982. 대한식물도감. 향문사. pp. 503-504.
38. Levi, A., L.J. Rowland, and J.S. Hartung. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA markers from DNA of woody plant. HortSci. 28(12): 1188-1190.
39. Lu, Z.X., G.L. Reighard, W.V. Baird, A.G. Abbott, and S. Rajapakse. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. HortSci. 31(1): 127-129.
40. Luro, F., F. Laigret, J.M. Bove, and P. Ollitrault. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA(R.A.P.D) to Citrus genetics and taxonomy. Proc. Int. Soc. Citriculture. pp. 225-228.
41. Luro, F., F. Laigret, J.M. Bov, and P. Ollitrault. 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. HortSci. 30(5): 1063-1067.
42. Michaels, S.D., M.C. John, and R.M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. Biotechniques 17(2): 274-276.
43. 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.
44. Michaels, S.D., M.C. John, and R.M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. Biotechniques 17(2): 274-276.
45. 文斗吉. 1986. 濟州在來柑橘의 同位酵素分析과 交雜實生의 早期識別方法에 關한 研究. 서울대학교 박사학위논문.
46. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8: 4321-4325.
47. Neale, D.B. and C.G. Williams. 1991. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. Can. J. for. Res. 21: 545-554.
48. Nishiura, M., S. Kamyu and S. Esaki. 1971. Flavonoids in Citrus and related genera, Part III. Flavonoid pattern and Citrus taxonomy. Agr. Bio. Chem. 35: 1691-1706.
49. Nordby, H. E., S. Nagy, and J. M. Smoot. 1979. Selected leaf waxes in chemo taxonomy of Citrus. J. Amer. Hort. Sci. 104: 3-8.
50. 농림수산부. 1996. 농림수산통계연보. 서울. pp. 97.

51. Omura, M., T. Hidaka, H. Nesumi, T. Yoshida, and I. Nakamura. 1993. PCR markers for Citrus identification and mapping. pp. 66-73 In: T. Hayashi, M. Omura, and N.S. Scott(eds.). Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees. Fruit tree Research station, Tsukuba, Japan.
52. 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36集. pp. 37-40.
53. 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.
54. 朴漢用. 1995. RAPD와 RFLP를 이용한 복숭아品種識別용標識의選別. 서울대학교박사학위논문.
55. Peirce, L.C. and J.L. Brewbaker. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. HortSci., 8: 17-22.
56. Rahman, M.M. and N. Nito. 1994. Use of glutamate-oxaloacetate transaminase isozymes for detection of hybrids among genera of the 'true Citrus fruit trees'. Scientia Horticulturae 58: 197-206.
57. Roose M.L., D.C. Jarrell and R.S. Kupper. Genetic mapping in a Citrus × poncirus F<sub>2</sub> population. Proc. Int. Soc. Citriculture pp. 210-213.
58. Roy, A., N. Frascaria, J. Mackay, and J. Bousquet. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghniensis*. Tehor. Appl. Genet. 85: 173-180.
59. Sambrook, J., W.F. Fritsh, and T. Maniatus. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
60. Scora, R. W. 1975. On the history and origin of Citrus. Bull. Torrey Bot. Club. 102: 369-375.
61. 辛康玉, 李明烈, 陳庸文, 柳震彰. 1995. 同位酵素형태와 RAPD를 이용한 柑橘類의品種區分. 農業論文集 37: 193-198.
62. 申瑾澈. 1972. 古書에 依한 濟州柑橘의 史的考察. 農村振興廳.
63. 申正燮. 1993. 식물유용유전자 탐색을 위한 RFLP 및 PCR기술의 응용. 資源植物의 探索, 開發 및 活用戰略. 한국식물학회 '93심포지움. pp. 85-98.
64. Soost, T.K. and A.M. Torres. 1981. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture. pp. 7-10.
65. Staub, J., J. Bacher, and K. Poetter. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. HortScience 31(2): 262-266.
66. Sugawara, K., A. Oowada, T. Moriguchi and M. Omura. 1995. Identification of Citrus chimeras by RAPD markers. Hort. Scie. 30(6): 1276-1278.

67. 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.
68. 田中長三郎. 1977. カンキツ分類への推論. 柑橘研究 14:1-6.
69. Torres, A.M., T. Millan, and J.I. Cubero. 1993. Identifying Rose cultivars using random Amplified polymorphic DNA Markers. HortScience 28(4): 333-3314.
70. Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Focus 10: 186-191.
71. Weeden, N.F., G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen, and M.A. Lodhi. 1992. Identification and reliability of RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. pp. 12-17. Joint plant breeding symposia series. Minnesota.
72. Wilde, J., R. Wough, and W. Powell. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 83: 871-877.
73. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalsiy, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primer are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
74. Xiao, S.Y., W.C. Zhang, and J.S. Cheng. 1992. Genetic studies of several isozyme in cutrus. Proc. Int. Soc. Citruculture pp. 214-216.
75. Yamamoto M., S. Kobayashi, Y. Nakamura, and Y. Yamada. 1993. Phylogenic relationships of Citrus revealed by diversity of cytoplasmic genomes. pp. 39-45 In: T. Hayashi, M. Omura and N.S. Scott (des.). Techniques on gene diagonosis and breeding in fruit trees. Fruit Tree Research Station, Twukuba, Japan.
76. Yoon, C.S. 1992. Examination of parameters affecting polymerase chain reaction in studying RAPD. Korean Mycol. 20: 315-323.
77. 丙秉佑. 1994. RAPD를 이용한 사과品種의 分類와 品種識別標識의 選別. 서울대학교 박사학위논문.
78. Zheng, X.H., Y. Ootani and M. Sawamura. 1993. Isozymic analysis of peroxidase and esterase in Citrus flavedo. Biosci. Biotech. Biochem. 57(10): 1800-1802.

## 감사의 글

이 논문이 완성 되기까지 충고와 격려를 하여 주신 문두길 지도교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 이 논문의 마무리에 조언을 해주신 한해룡 교수님과 박용봉 교수님 그리고 평소 예정과 관심으로 이끌어 주신 백자훈 교수님, 장전익교수님, 강훈교수님께도 감사드립니다.

김기욱 박사의 조언은 논문 실험 수행에 많은 도움이 되었으며 또한, 바쁜신 가운데에도 data 분석을 위하여 시간을 내주신 산림청 남부육종장 김찬수 연구사님 그리고 분석시료 채취에 도움을 준 제주도 농촌진흥원 강증훈 연구사님께도 감사를 드립니다.

실험이 진행되는 동안, 실험실 생활을 같이 하면서 도움을 준 오현우학형에게도 감사드립니다.

끝으로 그간 손자, 손녀를 돌보아 주신 장모님 그리고 어려운 여건속에서도 뒷바라지 해주 아내에게 고마움을 전합니다.

지금 이 글을 쓰는 순간 까지도 자식의 앞날을 걱정하면서 투병중인 어머니께 두손모아 깊은 감사를 드립니다.