박사학위논문

Kiwifruit의 분자육종을 위한 다래나무속 식물의 유전양상 분석과 SCAR marker 개발

Inheritance Analysis and SCAR Marker Development for Molecular Breeding of Kiwifruit in the Genus *Actinidia*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제주대학교 대학원

생물학과

김 성 철

2002 년 6 월

Kiwifruit의 분자육종을 위한 다래나무속 식물의 유전양상 분석과 SCAR marker 개발

지도교수 고 석 찬

김 성 철

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2002년 6월

김성철의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 : 金文洙 (인)

위 원 : 許仁孟 (인)

위 원 : 吳文儒 (인)

위 원 : 權赫謀 (인)

위 원 : 高碩贊 (인)

제주대학교 대학원

2002년 6월

Inheritance Analysis and SCAR Marker Development for Molecular Breeding of Kiwifruit in the Genus *Actinidia*

Seong-Cheol Kim

(Supervised by professor Suck-Chan Koh)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of

the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

Department of Biology

GRADUATE SCHOOL, CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

June, 2002

Abstract

The phylogenetic relationships and the inheritance tendencies were investigated for 23 accessions of the genus *Actinidia* collected in Korea and China from 1994 to 1998. The molecular markers for the efficient breeding of kiwifruits were also developed on the basis of PCR-RAPD and subsequent analysis.

The PCR-RAPD for 23 accessions using 17 arbitrary random primers resulted in generating 223 polymorphic bands among the accessions. The genus *Actinidia* was divided into two large and independent groups on the basis of PCR-RAPD; group I without the hair in fruits and leaves or with a few pubescences only in young stage(*A. arguta, A. melanandra, A. kolomikta, A. polygama* and *A. marcrosperma*), which belongs to the section *Leiocarpae*, and group II with a lot of hairs only in young fruit stage and with a lot of hairs or fuzzes in leaves and branches (*A. chinensis, A. deliciosa,* and *A. eriantha*), which belongs to the section *Stellatae*. Group II especially belongs to the series *Perfectae* of the section *Stellatae* and was divided into two subgroups with a similarity value of 60%; subgroup I containing *A. chinensis* and *A. deliciosa,* and subgroup II containing *A. eriantha*. In contrast, the two species, *A. chinensis* and *A. deliciosa,* which are known to have common parents, were divided into two independent subgroups with a similarity value of 80%.

To select parent plants for the breeding of the genus *Actinidia,* inheritance tendencies of the genus *Actinidia* were investigated by RFLP

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

analysis for the amplified cpDNA genes (*psb*A and *rbc*L), mtDNA genes (*nad*1 and *nad*4), and nrDNA ITS region. The PCR-RFLP results for *psb*A and *rbc*L showed maternal inheritance in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂), and *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂). mtDNA genes, *nad*1 and *nad*4, also showed maternal inheritance in the same crosses. The PCR-RFLP using nrDNA ITS region showed variable inheritance patterns depending on the individuals. To clarify the inheritance variation for the nrDNA ITS region, nucleotide sequences of ITS amplified from *A. chinensis* (♀), *A. arguta* (♂) and their progenies were determined. Nucleotide sequences of the nrDNA ITS 2 among the plants ranged from 220 to 222 bp. The sequence analysis showed that the nrDNA region seems to be mostly under the maternal inheritance, but the possibility of paternal effect and intraspecific variation is still open.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

To develop the sequence characterized amplified region (SCAR) markers for efficient breeding of the genus *Actinidia*, a total of six species-specific fragments(S2-385, S3-387, S7-345, HY-387, HY-591, and N2-611) were selected from the PCR-RAPD using 10-mer arbitrary primer, UBC 376. The multiple sequence alignment analysis revealed that nucleotide sequences of S2-385 were the same as those of HY-387. There was no sequence homology among the other four fragments. The PCR using S2-385 primer specifically amplified 385 bp of single fragment from *A. eriantha, A. chinensis,* and *A. deliciosa*. In the case of HY-591 primer, 591 bp of single fragment was specifically amplified from *A. chinensis* and *A. deliciosa*. These results indicate that S2-385 and HY-591 primers could be probably used as SCAR markers for efficient breeding of the

genus *Actinidia*. The BLAST search result showed that the deduced amino acid sequences from the S2-385 have strong sequence homology with plant cellulose synthase reported previously, which is involved in the biosynthesis of cellulose, a cell wall component. The S2-385 fragment was specifically detected only in the series *Perfectae* C.F. Liang of the section *Stellatae* Li, which has a lot of hairs in leaves and stems, suggesting that the gene including S2-385 fragment is probably involved in hair generation in the phylogenetic group.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Key words: *Actinidia*, PCR-RAPD, phylogenetic relationship, inheritance tendency, SCAR marker, cpDNA(*psb*A, *rbc*L), mtDNA(*nad*1, *nad*4), nrDNA(ITS region)

목 차

page

Abstract ····· i
List of Tables ····· vii
List of Figures ····· viii

Ⅰ. 연 구 배 경 ····· 1

Ⅱ. PCR-RAPD를 이용한 다래나무속 식물의 유연관계분석 ··· 6

1. 서 언 ····· 6
2. 재료 및 방법 ····· 9
2.1 식물재료
2.2 Total DNA 분리 및 정제
2.3 다래나무속 식물의 RAPD 적정조건
2.4 Random primer의 예비검정
2.5 PCR-RAPD 분석
2.6 유연관계 분석
3. 결과 및 고찰 ····· 15
2.1 다래나무속 식물의 RAPD 적정조건
2.2 PCR-RAPD 분석
2.3 유연관계 분석

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅲ. 다래나무속 식물의 내적형질 유전양상 분석 ····· 38

1. 서　　언 ····· 38
2. 재료 및 방법 ····· 41
3.1 식물재료
3.2 Total DNA 분리 및 정제
3.3 Primer 제작
3.4 PCR
3.5 RFLP
3.6 ITS 2 region의 염기서열분석
3. 결과 및 고찰 ····· 46
3.1 엽록체 DNA의 유전양상
3.2 미토콘드리아 DNA의 유전양상
3.3 핵 DNA의 유전양상

Ⅳ. 다래나무속 식물 계통 표지인자탐색과 SCAR marker 개발 ····· 59

1. 서　　언 ····· 59
2. 재료 및 방법 ····· 61
4.1 식물재료
4.2 RAPD를 이용한 계통 특이밴드의 탐색
4.3 계통 특이밴드 회수
4.4 계통 특이밴드 클로닝
4.5 계통 특이밴드 염기서열 분석
4.6 SCAR primer 제작 및 마커 이용성 검정

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 결과 및 고찰 ····· 65
4.1 RAPD 분석 및 특이밴드 클로닝
4.2 계통 특이밴드의 염기서열 분석
4.3 SCAR primer 제작 및 마커 이용성 검정

Ⅴ. 종합고찰 ····· 75

Ⅵ. 참고문헌 ····· 80

초 록 ····· 96

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Tables

Table 1-1. List and origin of *Actinidia* spp. used in this study

Table 1-2. List of UBC primers used for phylogenetic analysis of *Actinidia* spp. by PCR-RAPD

Table 1-3. List of arbitrary 10-mer primers selected for RAPD analysis of *Actinidia* spp.

Table 1-4. Binomial matrix from RAPD analysis

Table 1-5. Distance matrix of *Actinidia* spp. by PCR-RAPD

Table 2-1. List of the cpDNA, mtDNA and nrDNA regions adopted in the study and primer-pair forward/reverse sequences designed for the PCR amplification

Table 3-1. Base construction of each specific sequences in *Actinidia* spp.

Table 3-2. Primers based on the sequences of PCR-RAPD specific bands by UBC 376 primer in *Actinidia* spp.

Table 3-3. Comparison of selected homologous sequences with query sequences of S2-385 ORF site by BLAST

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Figures

Fig. 1-1. Electrophoretic band of total DNA separated from *Actinidia* spp.

Fig. 1-2. RAPD band patterns of total DNA isolate from *A. polygama* showing the effect of templete DNA (A), primer (B), and dNTP (C) amount/concentration on PCR amplification.

Fig. 1-3. RAPD band patterns of total DNA isolated from *A. polygama* showing the effect of $MgCl_2$ (A), Taq DNA polymerase concentration (B), and PCR cycle (C) on PCR amplification.

Fig. 1-4. RAPD band patterns of 23 *Actinidia* spp. using arbitrary primers A~Q.

Fig. 1-5. Dendrogram based on the analysis of PCR-RAPD fragments.

Fig. 2-1. The general structure of two cpDNA region, mtDNA region, and nrDNA region used in this study.

Fig. 2-2.PCR products from *psb*A amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross.

Fig. 2-3. Analysis of inheritance of *psb*A digested with *Hinf*I in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂).

Fig. 2-4. Analysis of inheritance of *psb*A digested with *Hinf*I in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-5. PCR products from *rbc*L amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross.

Fig. 2-6. Analysis of inheritance of *rbc*L digested with *Hae*III (A) and *Alu*I (B) in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂).

Fig. 2-7. Analysis of inheritance of *rbc*L digested with *Alu*I in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-8. PCR products from *nad*1 amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross.

Fig. 2-9. Analysis of inheritance of *nad*I digested with *Hae*III in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂)..

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 2-10. PCR products from *nad*4 amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross.

Fig. 2-11. Analysis of inheritance of *nad*4 digested with *Rsa*I in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂).

Fig. 2-12. PCR products from ITS amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross.

Fig. 2-13. Analysis of inheritance of ITS region digested with *Hae*III (A) and *Msp*I (B) in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂).

Fig. 2-14. Analysis of inheritance of ITS region digested with *Hae*III (A) and *Msp*I (B) in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-15. Nucleotide sequence of ITS2 region from *A. chinensis* (♀).

Fig. 2-16. ITS2 region sequence of progeny I in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-17. ITS2 region sequence of progeny II in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-18. ITS2 region sequence of progeny III in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-19. ITS2 region sequence of progeny Ⅳ in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-20. Nucleotide sequence of ITS2 region in *A. arguta* (♂) .

Fig. 2-21. Multiple alignment of the ITS2 region sequences in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

Fig. 2-22. Phenogram of the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂) generated by UPGMA cluster analysis of ITS2 region.

Fig. 3-1. Vector for the cloning of specific bands in *Actinidia* spp.

Fig. 3-2. Accession specific bands appeared by RAPD using UBC 376 primer in *Actinidia* spp.

Fig. 3-4. Nucleotide sequence of *A. chinensis* var.'Okcheon' specific DNA band (S2-385) amplified with UBC 376 primer.

Fig. 3-5. Nucleotide sequence of *A. chinensis* III specific DNA band (S3-387) amplified with UBC 376 primer.

제주대학교 중앙도서관

Fig. 3-6. Nucleotide sequence of *A. deliciosa* var. 'Gracie' specific DNA band (S7-345) amplified with UBC 376 primer.
Fig. 3-7. Nucleotide sequence of *A. deliciosa* var. 'Hayward' specific DNA band (HY-387) amplified with UBC 376 primer.
Fig. 3-8. Nucleotide sequence of *A. deliciosa* var. 'Hayward' specific DNA band (HY-591) amplified with UBC 376 primer.
Fig. 3-9. Multiple alignment of the specific band sequences by UBC 376 primer in *Actinidia* spp.
Fig. 3-10. Polymerase chain reaction of *Actinidia* spp. using S2-385 primer.
Fig. 3-11. Polymerase chain reaction of *Actinidia* spp. using HY-591 primer.
Fig. 3-12. Analysis of S2-385 sequence using ORF searching program.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 연 구 배 경

다래나무속(*Actinidia*) 식물은 다년생 덩굴성으로 러시아(시베리아 동부와 사할린)와 중국, 한국, 일본, 베트남, 인도, 캄보디아 등 아시아지역의 온대에서 한대지방에 걸쳐 자생하고 있다. 다래나무속은 Dunn(1911)이 24종, Li(1952)가 36종, Darrow(1975)가 25종, 그리고 Everett(1981)는 36종, Liang(1984)은 50종 이상, Okie와 Weinberger(1996)은 60종 이상, Ferguson 등(1990)과 Cui(1993)는 64종, 110개의 분류군 이상이라고 보고한 바 있으며, 우리나라에는 다래(*A. arguta* Planch), 개다래(*A. polygama*), 쥐다래(*A. kolomikta*) 및 섬다래(*A. rufa*) 등 4종이 분포하고 있다(이, 1983).

다래나무속 식물은 당해 년도의 줄기가 이전에 생장한 정아로부터 발생하며 어린 줄기는 털이 없거나 솜털로 덮여 있고, 길고 연한 가지에서 성숙할 때까지 짧은 분지성 가지들이 나온다. 오래된 줄기는 보통 회색 또는 갈색에서 밤갈색으로 변하며 종종 짧고 일직선의 피목이 있다. 잎은 긴 엽병을 갖고 있으며 한 개체에서도 형태와 크기가 매우 다양하다. 잎의 뒷면에 있는 털은 분류에서 중요한 특성으로 이용된다. 몇몇 종들은 부분 낙엽성이지만 거의 모든 종들이 완전 낙엽성이다(Dunn, 1911; Gilg and Werdermann, 1925; P'ei and Law, 1948; Li, 1952; 崔, 1993) .

다래나무속 식물은 기본적으로 자웅이주 식물이다(Schmid, 1978; Ferguson, 1984; Hirsch *et al.*, 1990; Warrington and Weston, 1990). 꽃은 컵모양으로 엽액에 발생하지만 소화서에 발생하기도 하며, 종에 따라 다섯 내지 그 이상의 얇은 꽃잎이 흰색, 노란색, 또는 핑크색으로 달린다. 여기에 수많은 미숙웅예들이 있고, 길고 가느다란 화사들이 중앙에 밀집해 있으며, 노란색, 갈색 또는 보라색에서 검정색으로 되어있다. 암그루의 꽃에는 보통 15~30개의 심피들이 뭉쳐져서 형성된 큰 자방이 난형, 실린더형 또는 병모

양을 하고 있으며, 속이 비어 있는 꽃가루를 생산한다. 각각의 심피자실 내부의 축을 따라 배주가 2줄로 붙어 있으며, 자유로이 신장된 암술대는 복부 표면을 덮는 주두를 갖고 바깥쪽으로 v자 형태를 이루면서 방사형으로 독특하게 퍼져있다. 수그루의 꽃에서도 암술은 형성되지만 암술대가 아주 짧고 주두는 흔적만 남아있으며 자방이 아주 위축되어 있다. 그러나 자웅이주가 절대적인 것은 아니며, 재배중인 kiwifruit(*A. deliciosa*) 가운데 일부에서는 수그루에 작은 과실이 달려 있는 것이 발견되기도 한다. 수그루의 암술은 환경요인에 의해 개체마다 다르게 나타나며 조금 크게 자란 암술을 가진 꽃들은 다른 화분에 노출되었을 때 착과가 이루어지기도 한다(Ferguson, 1984; McNeilage, 1991). 배주의 구조는 다래나무과(Actinidiaceae)의 분류에 이용되는 특성 가운데 하나가 된다(Dunn, 1911; Gilg and Werdermann, 1925; P'ei and Law, 1948; Li, 1952). 과실은 부드럽고 즙이 많으며 수백개의 작고 까만 종자를 갖고 있다. Kiwifruit(*A. deliciosa*)의 대표적인 과실인 헤이워드 품종은 밝은 녹색 과육으로 되어 있으며 많은 종들이 성숙되었을 때도 밝은 녹색을 띈다. 그러나 단일 종내에서도 과육색이 다양하여 *A. chinensis*는 노란색에서 녹황색, 암녹색을 띄기도 한다. 과실의 크기, 형태, 과피의 털의 유무, 맛, 그리고 화학적인 조성은 종에 따라 다양하다(Chang, 1982; Liang, 1984).

다래나무속 식물의 기본 염색체수는 2n=58이다. 그러나 자연계에는 4배체(2n=4x=116), 6배체(2n=6x=174) 등 여러 가지 형태의 배수성을 갖는 종들이 있으며, 현재 널리 재배되고 있는 것은 6배체로서 감수분열은 2배체와 같은 양상으로 이루어진다(渡辺, 1992; Frédrique *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994.; Ferguson *et al.*, 1996).

다래나무속은 적도에서 북위 50도, 즉 열대지방에서 한대까지 널리 분포하고 있다. 그러나 북부에는 몇 종만 존재하며, 건조지역에서는 발견되지 않는다. 주로 중국본토의 가장 서쪽 지방에만 분포하는 것으로 알려지고 있으

며, 지리학적 중심부는 북위 25도에서 30도 사이인 長江(Yangtze river)유역과 西江(Xijiang)유역 사이의 중국 남부에 있는 산맥과 언덕이다. 이 지역에 분포하고 있는 변종들의 복잡성은 이곳이 진화의 중심부임을 시사한다. 그러나 몇몇 종들 특히, 중국 남부지방에 있는 종들은 아주 제한된 지역에서만 발견되고, 가끔은 한 지방에서만 발견되기도 한다(Li, 1952; Liang, 1983).

다래나무속은 과실에 피목의 존재여부, 자방의 형태와 연모 및 잎의 털모양 등을 근거로 하여 4개의 절(section)로 나누어진다(Liang, 1983; 崔, 1993). 그러나 환경에 의해 화색이나 꽃수가 변할 수도 있고, 과실의 크기, 형태, 색과 연모가 바뀔 수 있다. 잎의 크기나 형태 및 연모도 한 나무에서 줄기마다, 같은 해에도 시기에 따라 다르게 만들어지는 등 환경조건에 따라 변이가 다양하게 나타난다. 따라서 다래나무속 식물의 종간 차이와 분류군들 사이의 구분이 아주 복잡하며 잘못 동정되어온 부분이 많은 것으로 알려지고 있다(Dunn, 1911; Li, 1952; Liang, 1983).

제주대학교 중앙도서관

한편 다래나무속에서 경제적으로 가장 가치가 있는 kiwifruit는 두 그루의 암나무와 한 그루의 숫나무에서 유래된 종자가 1904년 중국으로부터 뉴질랜드로 도입되어 1920년대에 선발된 계통으로, 과거에 *A. chinensis* Planch.로 분류되었으나, Liang(1984)에 의하여 *A. deliciosa*(*A. chev.*)C. F. Liang et A. R. Ferguson으로 명명되었다. 따라서 현재 전 세계적으로 재배되고 있는 kiwifruit는 유전적 바탕이 아주 단순하다고 할 수 있다(Ferguson and Bollard, 1990). 그러나 중국에는 다양한 *A. deliciosa*의 야생집단을 보유하고 있으며 또한 지리학적으로도 분포가 다양하여 새로운 다래품종의 육종 가능성이 높음을 시사해 주고 있다. 또한 경제적으로 아주 중요한 다른 종인 *A. chinensis*는 과실의 향이 좋아 kiwifruit보다 높은 평가를 받고 있다. 전 세계의 육종가들은 이 종에서 좋은 과실을 맺는 계통을 선발하는데 주력하고 있으며 앞으로 전세계에서 널리 재배될 것으로 생각하고 있다. 또한 아직 재배되지 않고 야생에서 단순히 채집되는 종들로서 *A. arguta*, *A. chrysantha*,

A. eriantha, A. kolomikta, A. indochinensis, A. latifolia, 그리고 *A. polygama* 등이 있으며 과실 크기, 품질, 그리고 영양성분을 근거로 생과나 가공용 같은 과실의 이용성에 대한 검토가 많이 이루어지고 있다. 특히 *A. eriantha*와 *A. latifolia* 등은 과실의 비타민 C 함량이 매우 높으며, *A. arguta*와 *A. kolomikta*는 맛과 향이 뛰어나고 병에 대한 저항성도 강한 것으로 알려지고 있다(Yin *et al.*, 1981; Hao, 1982; Huang *et al.*, 1983).

한편 국내에는 Kiwifruit가 뉴질랜드로부터 1977년에 도입되어 전라남도, 경상남도 및 제주도 등의 남해안 지역에서 재배되고 있다. 재배면적은 1990년도 813ha에서 1998년 1,270ha, 생산량은 1990년 5,460톤에서 1998년 14,700톤으로 증가하였다. 제주지역에서도 재배면적이 1990년 157ha에서 1998년 195ha, 생산량은 1990년 901톤에서 1998년 2,689톤으로 증가하였다. 그러나 국내에서 재배되고 있는 계통은 거의 대부분 *A. deliciosa* var. 'Hayward'로 숙기 소요일수가 약 180일로서 겨울철 서리를 피하기 위해 11월 10일~11월 15일에 수확하는데, 이때까지도 덜 성숙되어 있기 때문에 아린맛이 강한 것으로 알려지고 있다.

제주대학교 중앙도서관

따라서 현재까지 우리나라에서의 주된 육종목표는 조생종으로서, 당도가 높고 비타민 C 함량이 높으며 과실이 큰 계통선발에 중점을 두고, 1994년부터 중국에서 *A. chinensis* 및 *A. eriantha* 등 우수한 야생종의 수집과 함께 특성검정 및 교배육종이 이루어지고 있으나 아직도 초기단계에 있다(김 등, 미보고; 농림부, 1997; 심 등, 1998a, b). 특히, 일부 종간교배에서는 불화합성에 따른 새로운 품종육성의 한계성, 교배육종시 한 과실에 약 700~1,000개의 종자형성과 90%이상 되는 종자 발아율에 따른 대면적의 포장과 많은 인력소요, 그리고 어린 개체에서는 외형적으로 암수 및 여러 가지 과실특성들에 대한 판별의 어려움 때문에 개화 및 결실까지 3~5년 이상 기다려야 하는 등 육종선발에 많은 문제점이 있다(Zhang *et al.*, 1983; Frédrique *et al.*, 1994). 이러한 문제는 여러 가지 식물에서 공통적으로 겪고 있는 사항

으로서 조기선발을 위한 표지인자 개발 등 효율적인 육종을 위한 생명공학기술의 개발과 적용이 요구되고 있으며 국내에서도 kiwifruit의 육종을 위하여 필요한 실정이다.

따라서 본 연구는 Kiwifruit의 효율적인 육종을 위하여 육종재료로서 이용가치가 큰 계통을 중심으로 다래나무속 식물의 계통간 유연관계 분석과 주요 유전자의 유전양상, 그리고 조기선발을 위한 계통표지인자 개발을 위하여 실시하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. PCR-RAPD를 이용한 다래나무속 식물의 유연관계 분석

1. 서 언

다래나무속 식물은 현재까지 60여종 이상이 알려지고 있으며 동아시아의 온대에서 한대지방에 걸쳐 널리 분포하고 있으나 대부분의 종들은 중국에 자생하며 우리나라에는 다래(*A. arguta*) 등 4종이 보고되고 있다(이, 1982; Liang, 1984; 김, 1990; Cui, 1993).

다래속 식물의 분류에 대한 연구로 1893년 Gilg이 8개의 *Actinidia* 종들에 대하여 취산화서에 속하는 *Pleianthae*와 꽃이 엽액에 홀로 달리는 *Monanthae* 등 두 개의 group으로 나눈 바 있으며(Ferguson *et al.*, 1996), Dunn(1911)은 자방의 형태와 연모의 정도, 그리고 과실에 피목의 존재여부에 따라 4개의 절(section)로 구분하면서 24종이라고 하였다. Li(1952)는 36종으로 묘사하면서 50개 이상의 분류군으로 나누었으며, Dunn의 분류체계가 부적절하다고 하였는데 이는 분명하게 구분될 수 있는 잎의 털구조를 무시하고 자방의 형태와 연모같은 관련요인들의 중요성을 너무 강조하였기 때문이라고 했다. Liang(1983, 1984)은 다래속 식물을 과실 및 식물체의 특성을 근거로 하여 *Leiocarpae, Maculatae, Strigosae* 및 *stellatae* 등 4개의 절로 나누었으며 50종 이상으로 분류하였다. Ferguson 등(1990)은 최근에 64종, 110개의 분류군 이상으로 정리하면서 이 속을 다시 검토할 것을 거론한 바 있다. 그러나 형태학적 특성들은 환경에 따라 변이가 다양하기 때문에 다래나무속 식물의 종간 차이와 분류군들 사이의 구분이 아주 복잡하며 지금까지 잘못 동정되어온 부분이 많은 것으로 알려지고 있다(Dunn, 1911; Li, 1952; Liang, 1983). 환경에 의한 화색이나 꽃수의 변화, 과실의 크기, 형태, 과육

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

색과 연모 등이 바뀔 수 있으며 또한 잎은 한 나무에서도 줄기마다 같은 해에도 시기에 따라 크기나 형태 및 연모가 다르게 만들어진다(Dunn, 1911; Li, 1952; Ferguson *et al.*, 1996). 또한 Liang(1983)은 멸멸 절과 아절들에서 인위성이 가미될 수 있음을 주장하였는데 변이와 종들에 대한 이전 연구자들의 연구결과에 대한 불충분한 정보 때문에 형태학적인 분류체계에서는 멸멸 종들에 대한 분류학적인 위치선정에 많은 어려움이 존재하게 된다고 하였다(Liang, 1982a,b; Testolin *et al.*, 1997; Cipriani *et al.*, 1998). Huang 등(1999)은 다래나무속 식물 61종의 형태학적인 요소들을 토대로 집괴분석을 실시하여 라멜라층의 발달과 털의 모양을 기초로 한 아절 분류는 적절치 않다고 하였다. 또한 이 속을 3개의 절로 나누고 *Vestitae*는 털을 갖고 있는 종들의 있는 절에 포함시키며, 별모양의 털을 갖는 *Stellatae*절과 간단하고 거친 털을 갖는 *Strigosae*절 등 두 개의 절로 나눌 것을 제안하는 등 아직까지도 다래나무속에 대한 분류체계에 많은 논란이 계속되고 있다.

제주대학교 중앙도서관

형태학적인 분류방법과 세포학적인 분류방법은 시간과 노동력이 많이 소요되며, 개체수준의 동정이 어렵고 환경에 따라 변이가 심한 것으로 알려지고 있기 때문에 분자생물학적 기법을 이용한 유연관계 분석에 대한 최근의 연구를 유발시키는 요인이 되어왔다. PCR (Polymerase chain reaction)은 단 하나의 DNA (Deoxyribonucleic acid) 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타날 수 있을 정도로 그 감응도가 높고(Innis and Gelfand, 1990) 소량의 DNA만으로도 수행이 가능하며 실험 기간이 짧고 안전하여 대규모 집단의 스크리닝에 효과적인 방법이다(Tragoonrung *et al.*, 1992). PCR은 1983년 미국의 Mullis 등에 의해 고안되었는데 1990년 Williams 등이 임의 단일 primer를 이용한 PCR 방법에 의해 개체간에 변이를 보여주는 분석결과를 발표함으로써 DNA 염기서열에 대한 어떤 정보도 없이 개체의 전체 게놈을 대상으로 유전변이 분석이 이용이 가능함을 제시하였다. 또한 Welsh와 McClelland(1990)가 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)분석법과 마찬가지로 개체간의

차이를 나타낼 수 있는 지문법에 임의의 primer를 이용하는 PCR-RAPD (Random amplified polymorphic DNA)분석법을 소개한 이후 종 분류기술로서 여러 분야에 걸쳐 급속도로 발전하여 왔다(Welsh and McClelland, 1990; Bloch, 1991). 이 기술은 유전적 변이 분석, 유전자지도 작성, 종간 유전자 흐름의 수준 판정, 모본의 확인 등에 다양하게 이용되며 많은 식물에서 종내 또는 종간 분류에서 유용성이 증명된 바 있다(Roy *et al.*, 1992; Koller *et al.*, 1993; Susan *et al.*, 1993; 예, 1994; Kim *et al.*, 1995; Yoo *et al.*, 1996). 다래나무속에서도 심 등(1998b)이 중국에서 수집된 *A. chinensis* 6계통 등 2종 12계통에 대하여 RAPD에 의한 유연관계 분석을 실시한 바 있으나 국내외의 야생계통과의 비교연구 등에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 1994년부터 1998년까지 중국의 廣東, 江西 및 湖北 지방에서 수집한 *A. chinensis* 등 16계통과 국내에서 수집된 *A. arguta* 등의 7계통 등 8종 23계통을 대상으로 PCR-RAPD 기법을 이용하여 계통간 유연관계를 구명하여 육종을 위한 기초자료로 이용코자 수행되었다.

제주대학교 중앙도서관

2. 재료 및 방법

2.1 식물재료

본 실험에 이용된 다래나무속 식물은 중국과 제주지역에서 수집하여 제주농업시험장의 육종실험포장에 재식하여 생육중인 8종 23계통을 사용하였다(Table 2-1). 4월에서 6월 사이에 신초 상단부의 완전히 전개된 건전한 어린 잎을 채취하여 수돗물로 깨끗이 세척하고 증류수로 헹군 다음 물기를 제거하고 25℃ 암상태에서 1일간 보관한 후 -70℃에 보관하면서 total DNA분리에 사용하였다.

2.2 Total DNA분리 및 정제

-70℃에서 보관중인 다래나무속 식물 잎 0.5g을 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가한 후 백색분말 상태가 될 때까지 마쇄하여 Dellaporta 등(1983)의 방법을 변형하여 DNA를 분리하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

마쇄가 끝난 시료는 바로 15 mL의 SDS 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 1% PVP-360; 2% SDS; 0.1% β-mercaptoethanol)이 담긴 50 mL의 튜브에 넣고 부드럽게 흔들어 혼합하였다. 25℃에서 2~3 시간 동안 두었다가 5 M potassium acetate(pH 6.5)를 4 mL첨가한 후 얼음에서 5분 동안 유지하여 단백질과 다당류의 침전을 유도하였다. 이를 다시 4℃, 3300 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 상징액만 50 mL의 튜브에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 3시간 동안 보관한 다음 이를 4℃, 3300 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 상징액을 버리고 paper towel을 이용하여 침전된 DNA의 물기를 제거한 후 1 mL의 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 넣어 37℃에서 완전히 용해시킨 다음 5,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상징액을 15 mL 튜브로 옮긴 후 100 μL의 sodium acetate(pH 7.6)와 동량의 isopropanol를

첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 유지한 후 4℃, 3300 rpm으로 10분간 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었다. 이를 다시 70% 에탄올에서 5분 동안 수세하여 불순물을 제거한 다음 실온에서 건조한 후 1.0 mL의 TE 완충액에 녹여 DNA 정제를 위한 시료로 사용하였다. 1%의 agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 분리가 확인된 DNA 시료는 2 μL의 RNase(10 mg·mL^{-1})를 첨가하여 37℃에서 1시간 30분, 그리고 1.5 μL의 proteinase K(10 mg·mL^{-1})를 첨가하고 37℃에서 45분 동안 정치한 후 동량의 페놀을 첨가하여 잘 섞은 다음 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상징액을 회수하고 다시 페놀-클로로포름(25:24)을 첨가하여 잘 섞은 후 15,000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상징액을 회수하고 10분의 1정도의 sodium acetate(pH 7.6)와 두 배의 차가운 ethanol을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 유지하였다가 4℃, 3,300 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상징액을 버리고 침전된 DNA는 70% ethanol로 2회 세척한 다음 진공냉동 건조시킨 후 0.7~1.0 mL의 TE 완충액에 녹인 후 -20℃에 냉동보관 하였다. 최종적으로 얻어진 total DNA는 agarose gel 상에서 전기영동 하여 단일밴드로 나타나는 것을 확인하였고, 확인된 DNA는 UV/VIS spectrophotometer로 정량하여 순도가 1.8 이상 된 것만 실험에 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관

2.3 다래나무속 식물의 RAPD 적정조건

RAPD 적정조건 구명 실험을 위하여 개다래(*A. polygama*)의 잎에서 분리된 DNA를 사용하였다. 각 실험의 PCR 반응용액은 주형 DNA 50 ng, UBC(the Biotechnology Laboratory, University of British Columbia) 399 primer 4.0 pM, dNTP(MBI) 200 μM, *Taq* DNA polymerase (MBI) 2.0 unit, $MgCl_2$ 2.5 mM, 10 X 반응 완충액 2.5 μL을 첨가한 후 3차 증류수를 첨가하여 최종 반응 부피를 25 μL로 하였다. PCR 반응은 94℃ 5분 1 cycle로 DNA를 변성시킨 후 PCR cycle을 제외한 모든 PCR 조건 선발에서 94℃ 1분, 38℃

Table 1-1. List and origin of *Actinidia* spp. used in this study

Science name	Lane number	F(♀)·M(♂)	Origin		Characteristics		
			Nation	Region	Flower color	Fresh color	Hair (leaf, pericarp)
Actinidia arguta I	1	(♀)	Korea	Jeju	White, black pollen	Green	None
〃 II	2	(♂)	〃	〃	〃	-	〃
〃 III	3	(♂)	〃	〃	〃	-	〃
〃 IV	4	(♂)	China	Kwangdong	〃	-	〃
〃 V	5	(♀)	〃	〃	〃	Green	〃
A. kolomikta	6	(♀)	〃	〃	White-pink	Yellow-green	〃
A. polygama	7	(♀)	〃	〃	White, yellow pollen	Yellow	〃
A. melanandra	8	(♀)	〃	〃	White, black pollen	Green	〃
A. macrosperma	9	(♀)	〃	〃	White, yellow pollen	Purple	〃
A. eriantha	10	(♂)	〃	〃	Purple-Red, yellow pollen	Dark green	White-hairs, much
A. chinensis I	11	(♀)	〃	〃	White-yellow, yellow pollen	Yellow	Soft-haired, some
〃 II	12	(♀)	〃	〃	〃	Yellow	〃
〃 var. 'Haenam'	13	(♀)	〃	〃, Jiangxi	〃	Green-yellow	〃
〃 III	14	(♀)	〃	〃, Jiangxi	〃	Yellow	〃
〃 IV	15	(♀)	〃	〃, Hubei	〃	Yellow	〃
〃 var. 'Apple'	16	(♀)	Korea	Jeju	〃	Yellow	〃
〃 var. 'Okcheon'	17	(♂)	China	Kwangdong, Jiangxi	〃	-	〃
〃 V	18	(♂)	〃	〃	〃	-	〃
A. deliciosa var. 'Hwabook 94'	19	(♀)	Korea	Jeju	〃	Yreen	Stiff-haired, much
〃 var. 'Gracie'	20	(♀)	China	Kwangdong	〃	Green	〃
〃 var. 'Hayward'	21	(♀)	Korea	Jeju	〃	Green	〃
〃 I	22	(♂)	China	Kwangdong	〃	-	〃
〃 var. 'Tomuri'	23	(♂)	Korea	Jeju	〃	-	〃

1분, 72℃ 1.5분으로 42 cycle 동안 PCR 증폭을 실시하였으며, 그 후 72℃에서 5분 동안 dimer를 형성한 다음 4℃에서 안정화되도록 하였다.

PCR 증폭을 위한 적정 DNA 농도는 개다래(*A. polygama*)의 주형 DNA를 0~100 ng으로 첨가하고, 기타 주요 요소들은 상기한 반응용액 기준농도로 첨가하여 PCR을 실시한 후 1.2%의 agarose gel 상에서 전기영동을 실시하고, ethidium bromide(EtBr, 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$)로 염색하였고 UV trans- illuminator를 이용하여 DNA 밴드양상을 비교하였다. Random primer의 농도선발은 UBC 399를 0~4.0 pM이 되도록 첨가하였으며, dNTP의 적정농도 선발은 MBI로부터 구입한 dNTP를 0~800 μM이 되도록 첨가하였다. *Taq* DNA polymerase의 농도는 *Taq* DNA polymerase(MBI)를 0~2.0 unit이 되도록 첨가하여 PCR을 실시한 후 1.2%의 agarose gel 상에서 전기영동 후 DNA 밴드양상을 비교하였다.

RAPD를 위한 적정 PCR cycle수의 설정을 위하여 PCR 반응 용액의 주요 요소로서 주형 DNA 20 ng, UBC 410 primer 4.0 pM, dNTP 400 μM, *Taq* DNA polymerase 2.0 unit, $MgCl_2$ 2.5 mM, 10 X 반응 완충액 2.5 μL을 첨가한 후 3차 증류수를 첨가하여 최종 반응 부피를 25 μL로 하였으며, 27, 32, 37, 42, 47회로 증폭횟수를 달리하여 PCR을 실시한 후 1.2%의 agarose gel 상에서 전기영동 후 DNA밴드양상을 비교하였다.

제주대학교 중앙도서관

2.4 Random primer의 예비검정

다래나무속 식물의 RAPD에 적합한 primer를 선발하고자 140개의 UBC random primer(101~120, 301~420)를 이용하여 개다래(*A. polygama*)에서 추출한 DNA를 가지고 동일한 조건하에서 PCR를 수행하였다(Table 1-2). PCR 반응용액은 주형 DNA 20 ng, UBC primer 4.0 pM, dNTP 400 μM, *Taq* DNA polymerase 2.0 unit, $MgCl_2$ 2.5 mM, 10 X 반응 완충액 2.5 μL을 첨가한 후 3차 증류수를 첨가하여 최종 반응 부피를 25 μL로 조성하였으며, 35 cycle로 PCR을 실시하여 종 및 계통간 다형성을 나타내는 primer를 선발하였다.

Table 1-2. List of UBC primers used for phylogenetic analysis of *Actinidia* spp. by PCR-RAPD

UBC No.	Sequence (5′→3′)	G+C content (%)	UBC No.	Sequence (5′→3′)	G+C content (%)	UBC No.	Sequence (5′→3′)	G+C content (%)
101	GCG GCT GGA G	80	321	ATC TAG GGA C	50	371	TCT CGA TTG C	50
102	GGT GGG GAC T	70	322	GCC GCT ACT A	60	372	CCC ACT GAC G	70
103	GTG ACG CCG C	80	323	GAC ATC TCG C	60	373	CTG AGG AGT G	60
104	GGG CAA TGA T	50	324	ACA GGG AAC G	60	374	GGT CAA CCC T	60
105	CTC GGG TGG G	80	325	TCT AAG CTC G	50	375	CCG GAC ACG A	70
106	CGT CTG CCC G	80	326	CGG ATC TCT A	50	376	CAG GAC ATC G	60
107	CTG TCC CTT T	50	327	ATA CGG CGT C	60	377	GAC GGA AGA G	60
108	GTA TTG CCC T	40	328	ATG GCC TTA C	50	378	GAC AAC AGG A	50
109	TGT ACG TGA C	50	329	GCG AAC CTC C	70	379	GGG CTA GGG T	70
110	TAG CCC GCT T	60	330	GGT GGT TTC C	60	380	AGG AGT GAG A	50
111	AGT AGA CGG G	60	331	GCC TAG TCA C	60	381	ATG AGT CCT G	50
112	GCT TGT GAA C	50	332	AAC GCG TAG A	50	382	ATA CAC CAG C	50
113	ATC CCA AGA G	50	333	GAA TGC GAC G	60	383	GAG GCG CTG C	80
114	TGA CCG AGA C	60	334	ATG GCA AAG C	50	384	TGC GCC GCT A	70
115	TTC CGC GGG C	80	335	TGG ACC ACC C	70	385	ACC GGG AAC G	70
116	TAC GAT GAC G	50	336	GCC ACG GAG A	70	386	TGT AAG CTC G	50
117	TTA GCG GTC T	50	337	TCC CGA ACC G	70	387	CGC TGT CGC C	80
118	CCC GTT TTG T	50	338	CTG TGG CGG T	70	388	CGG TCG CGT C	80
119	ATT GGG CGA T	50	339	CTC ACT TGG G	60	389	CGC CCG CAG T	80
120	GAA TTT CCC C	50	340	GAG AGG CAC C	70	390	TCA CTC AGA G	50
121	ATA CAG GGA G	50	341	CTG GGG CCG T	80	391	GCG AAC CTC G	70
122	GTA GAC GAG C	60	342	GAG ATC CCT C	60	392	CCT GGT GGT T	60
123	GTC TTT CAG G	50	343	TGT TAG GCT C	50	393	TTC CAT GCC T	50
124	ACT CGA AGT C	50	344	TGT TAG GCA C	50	394	TCA CGC AGT T	50
125	GCG GTT GAG G	70	345	GCG TGA CCC G	80	395	TCA CTT GAG G	50
126	CTT TCG TGC T	50	346	TAG GCG AAC G	60	396	GAA TGC GAG G	60
127	ATC TGG CAG C	60	347	TTG CTT GGC G	60	397	GGG CTG TGC C	80
128	GCA TAT TCC G	50	348	CAC GGC TGC G	80	398	CAG TGC TCT T	50
129	GCG GTA TAG T	50	349	GGA GCC CCC T	80	399	TTG CTG GGC G	70
130	GGT TAT CCT C	50	350	TGA CGC GCT C	70	400	GCC CTG ATA T	50
301	CGG TGG CGA A	70	351	CTC CCG GTG G	80	401	TAG GAC AGT C	50
302	CGG CCC ACG T	80	352	CAC AAC GGG T	60	402	CCC GCC GTT G	80
303	GCG GGA GAC C	80	353	TGG GCT CGC T	70	403	GGA AGG CTG T	60
304	AGT CCT CGC C	70	354	CTA GAG GCC G	70	404	TCT CTA CGA C	50
305	GCT GGT ACC C	70	355	GTA TGG GGC T	60	405	CTC TCG TGC G	70
306	GTC CTC GTA G	60	356	GCG GCC CTC T	80	406	GCC ACC TCC T	70
307	CGC ATT TGC A	50	357	AGG CCA AAT G	50	407	TGG TCC TGG C	70
308	AGC GGC TAG G	70	358	GGT CAG GCC C	80	408	CCG TCT CTT T	50
309	ACA TCC TGC G	60	359	AGG CAG ACC T	60	409	TAG GCG GCG G	80
310	GAG CCA GAA G	60	360	CTC TCC AGG C	70	410	CGT CAC AGA G	60
311	GGT AAC CGT A	50	361	GCG AGG TGC T	70	411	GAG GCC CGT T	70
312	ACG GCG TCA C	70	362	CCG CCT TAC A	60	412	TGC GCC GGT G	80
313	ACG GCA GTG G	70	363	ATG ACG TTG A	40	413	GAG GCG GCG A	80
314	ACT TCC TCC A	50	364	GGC TCT CGC G	80	414	AAG GCA CCA G	60
315	GGT CTC CTA G	60	365	TAG ACA GAG G	50	415	GTT CCA GCA G	60
316	CCT CAC CTG T	60	366	CCT GAT TGC C	60	416	GTG TTT CCG G	60
317	CTA GGG GCT G	70	367	ACC TTT GGC T	50	417	GAC AGG CCA A	60
318	CGG AGA GCG A	70	368	ACT TGT GCG G	60	418	GAG GAA GCT T	50
319	GTG GCC GCG C	90	369	GCG CAT AGC A	60	419	TAC GTG CCC G	70
320	CCG GCA TAG A	60	370	TCA GCC AGC G	70	420	GCA GGG TTC G	70

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.5 PCR-RAPD분석

각 계통별로 잎에서 분리·정제한 total DNA에 대하여 150개의 primer로 예비검정을 실시하여 그 중 뚜렷한 밴드양상을 나타낸 17개의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1x TBE 완충액(100 mM Tris-borate; 2 mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 1.2% agarose gel 상에서 100 V로 40분간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide(EtBr, 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$)로 염색하였고 UV trans- illuminator를 이용하여 각 계통간 밴드양상을 비교하였다.

2.6 유연관계 분석

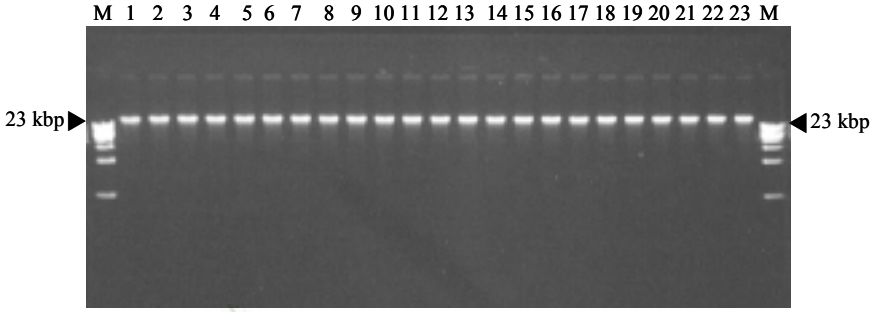
예비 검정에서 종간에 다형성을 나타내는 primer를 이용하여 PCR을 실시하여 전기영동한 후 다형성을 보이는 밴드의 유무에 따라 "0"과 "1"로 표시하는 two-digit numbering system으로 기초자료 행렬을 작성한 다음 binomical matrix를 작성하였다. 각 계통간 유사도는 RAPDistance Ver. 1.04(Saitou and Nei,1987)의 NJTREE program을 이용하여 분석하였고 이를 Phi coefficient에 기초한 distance matrix로 나타내었으며(Sokal and Sneath, 1973), 다시 Neighbor- Joining 방법에 따라 dendrogram을 작성하였다(Nei and Li, 1979; Nei and Hughes, 1992).

제주대학교 중앙도서관

2. 결과 및 고찰

2.1 다래나무속 식물의 RAPD 적정조건

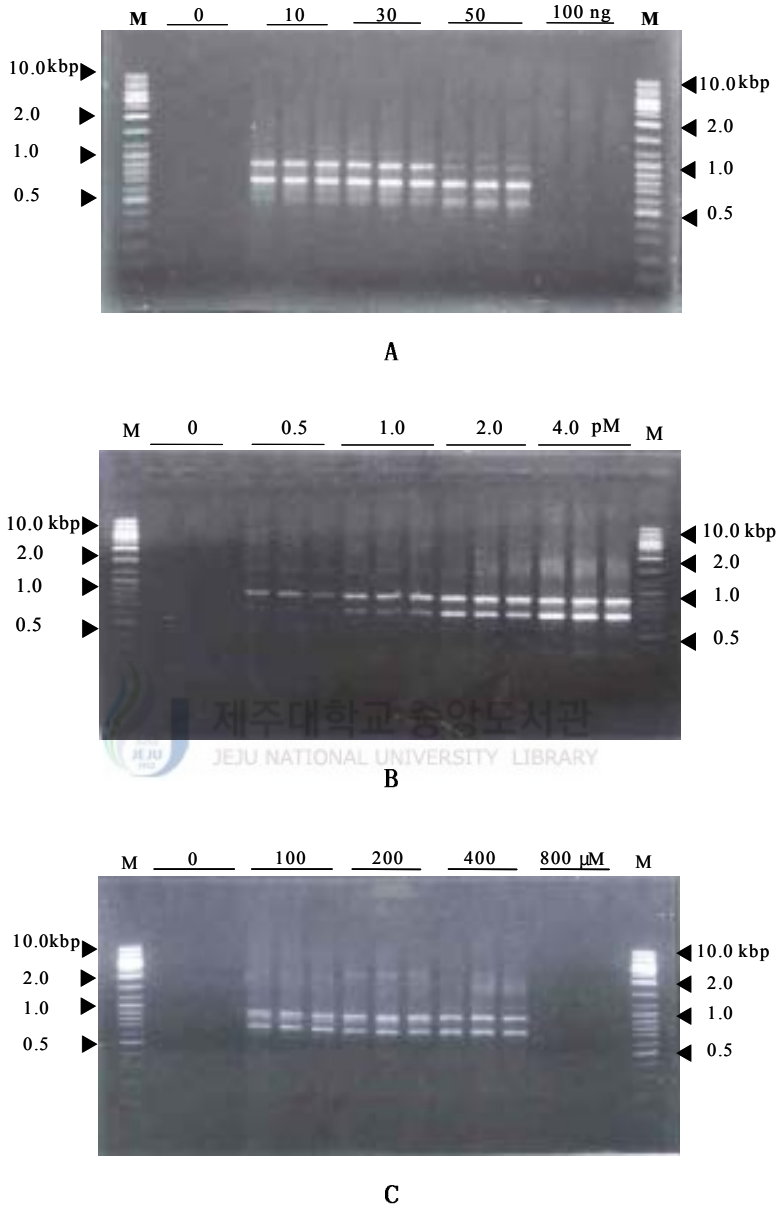
다래나무속 식물의 어린잎으로부터 추출한 DNA를 전기영동한 결과 23 kb 보다 약간 위에서 total DNA가 단일밴드로 나타났다(Fig. 1-1).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

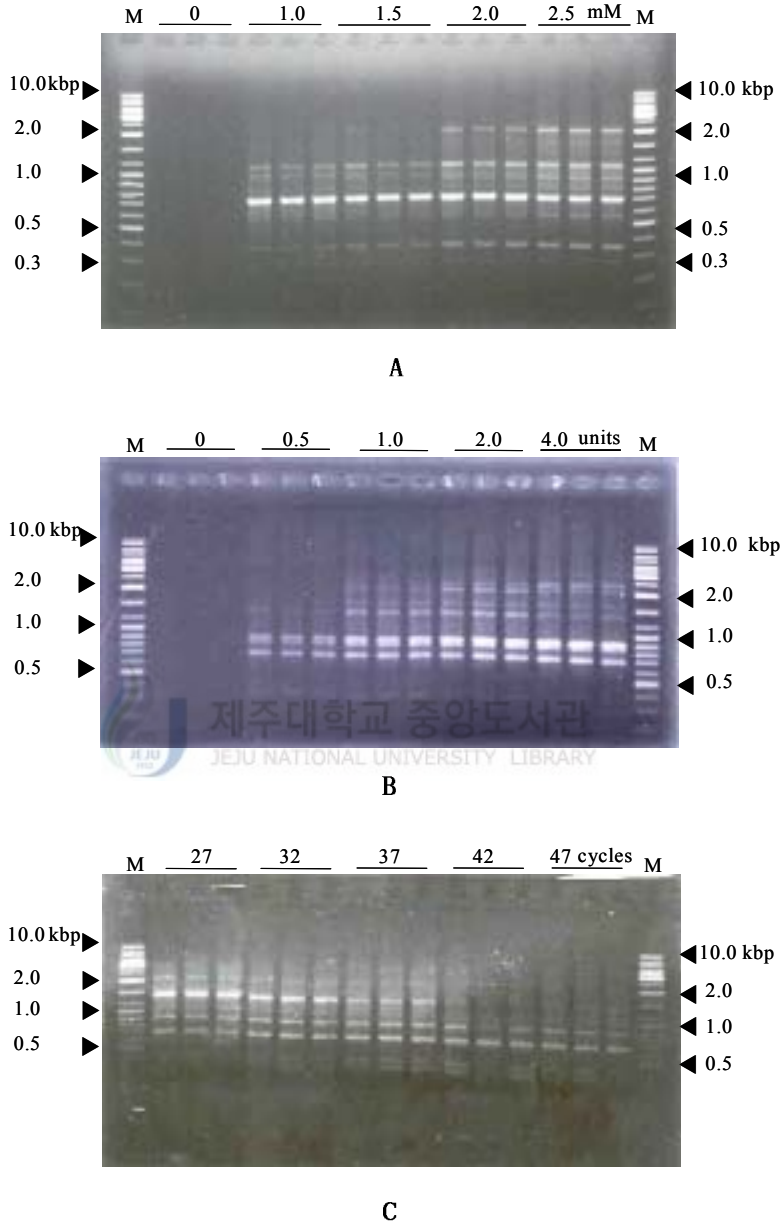
Fig. 1-1. Electrophoretic band patterns of total DNA separated from the leaves of *Actinidia* spp. Each number on the top represents the same one assigned for 23 taxa in Table 1-1.
M : DNA size marker (Lambda DNA/*Hin*dIII marker)

개다래(*A. polygama*)의 어린 잎에서 분리한 total DNA에 대하여 UBC 339 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 적정 PCR조건으로서 25 μL의 반응용액에 주형 DNA의 적정농도는 20~30 ng이었고, random primer는 4.0 pM이었으며, dNTP 농도는 400 μM이었다(Fig. 1-2). $MgCl_2$ 농도는 2.0~2.5 mM이 적정한 것으로 판단되었으며, *Taq* polymerase는 2.0 unit, PCR cycle은 32~37 cycle로 했을 때 가장 좋은 결과를 나타냈다(Fig 1-3).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 1-2. RAPD band patterns of total DNA isolated from *A. polygama* showing the effect of template DNA (A), primer (B), and dNTP (C) amount/concentration on PCR amplification. Numbers on top refer to the component amount/concentration per 25 μL reaction mixture.
M : DNA size marker (GeneRuler™ DNA ladder Mix)



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 1-3. RAPD band patterns of total DNA isolated from *A. polygama* showing the effect of $MgCl_2$ concentration (A), *Taq* DNA polymerase concentration (B), and PCR cycle (C) on PCR amplification.
M : DNA size marker (GeneRuler™ DNA ladder Mix)

2.2 PCR-RAPD분석

다래나무속 식물 23 계통의 유연관계 분석을 위하여 10-mer의 UBC random primer 140개 가운데 계통간 밴드의 다형성을 나타내었던 UBC 102 등 17개의 primer를 선발하였다(Table 1-3).

Table 1-3. List of arbitrary 10-mer primers selected for RAPD analysis of *Actinidia* spp.

Primer	Sequence(5′→3′)	GC content(%)
A(UBC 102)	GGT GGG GAC T	70
B(UBC 103)	GTG ACG CCG C	80
C(UBC 105)	CTC GGG TGG G	80
D(UBC 322)	GCC GCT ACT A	60
E(UBC 337)	TCC CGA ACC G	70
F(UBC 349)	GGA GCC CCC T	80
G(UBC 359)	AGG CAG ACC T	60
H(UBC 368)	ACT TGT GCG G	60
I(UBC 376)	CAG GAC ATC G	60
J(UBC 379)	GGG CTA GGG T	70
K(UBC 381)	ATG AGT CCT G	50
L(UBC 382)	ATA CAC CAG C	50
M(UBC 388)	CGG TCG CGT C	80
N(UBC 391)	GCG AAC CTC G	70
O(UBC 399)	TTG CTG GGC G	70
P(UBC 410)	CGT CAC AGA G	60
Q(UBC 415)	GTT CCA GCA G	60

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

염기구성을 보면 모든 계통에서 PCR 증폭이 일어난 것은 G+C의 함량이 UBC 381과 UBC 382 이외에는 모두 60~80%로, G+C 함량이 비교적 높아야 PCR 증폭이 잘이루어졌으며, 또한 다형성밴드들이 나타났다. 선발된 17개의 primer로부터 223개의 밴드를 얻었는데, 19개는 모든 계통에서 나타나는 공통밴드이고 204개는 다형성을 나타내는 밴드이다.

UBC 102 primer를 이용하여 다래속 식물 23계통에 대하여 PCR을 실시한 결과 총 14개의 밴드가 나타났다. 약 1300 bp, 1200 bp, 650 bp, 그리고 400

bp 부위에서 모든 계통에 공통적인 밴드가 나타났으며 1,030 bp에서 200 bp까지 다형성을 보이는 10개의 밴드가 나타났다(Fig. 1-4A). 또한 계통간의 밴드 패턴을 비교해 본 결과 두 개의 특이적인 밴드가 확인되었는데 약 600 bp 부위에서 *A. eriantha*, *A. chinensis* 및 *A. deliciosa* 에서만 공통적으로 나타나는 밴드와 약 300 bp 부위에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*에서만 공통적으로 나타나는 밴드가 확인되었다.

UBC 103 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 총 21개의 밴드가 나타났으며, 일부 계통간에는 공통밴드가 나타났으나 계통간 특이성을 보이는 밴드는 발견되지 않았다(Fig. 1-4B).

UBC 105 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 450 bp에서 2,800 bp까지 한 개의 공통밴드와 7개의 다형성을 나타내는 밴드 등 총 8개의 밴드가 나타났으며 약 1,030 bp 부위에서 공통적으로 나타나는 밴드가 확인되었다(Fig. 1-4C).

제주대학교 중앙도서관

UBC 322 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 3개의 공통밴드와 12개의 다형성 밴드 등 총 15개의 밴드가 나타났다(Fig. 1-4D). 계통들간의 전기영동 패턴을 비교해 본 결과 약 1,500 bp에서 *A. eriantha*, *A. chinensis*, 그리고 *A. deliciosa*에서만 공통적으로 나타나는 특이밴드가 확인되었고, 약 890 bp와 830 bp 부위에서 *A. arguta*에서만 특이적으로 나타나는 밴드가 확인되었다.

UBC 337 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 1개의 공통밴드와 11개의 다형성을 나타내는 밴드 등 총 12개의 밴드가 나타났으며, 500 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. melanandra* 및 *A. deliciosa*에서만 특이적으로 나타나는 밴드가 확인되었다(Fig. 1-4E).

UBC 349 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 2개의 공통밴드와 12개의 다형성을 보이는 밴드 등 총 14개의 밴드가 나타났다(Fig. 1-4F). 1,100 bp 부위에서 *A. chinensis*만의 공통 특이밴드가 확인되었으며, 520 bp

부위에서 *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. polygama*, 그리고 *A. melanandra*에 대하여 공통적으로 나타나는 밴드가 확인되었고 380 bp 부위에서 *A. argruta*와 *A. melanandra*의 공통밴드가 확인되었다.

UBC 359 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 공통밴드가 없이 다형성을 나타내는 밴드가 12개 나타났다(Fig. 1-4G). 1,800 bp, 1,500 bp 및 700 bp 부위에서 *A. arguta*와 *A. kolomikta*에서만 공통적으로 나타나는 밴드가 확인되었으며, 900 bp 부위에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*에서만 공통적으로 나타나는 밴드가 확인되었고, 430 bp 부위에서는 *A. arguta*의 특이 밴드가 나타났다.

UBC 368 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 공통밴드가 없이 다형성을 나타내는 밴드가 12개 나타났다(Fig. 1-4H). 3,000 bp 부위에서 *A. melanandra*의 특이 밴드가 확인되었으며, 1,450 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. melanandra*, *A. macrosperma* 및 *A. polygama* 등에서 공통적으로 나타나는 밴드가 확인되었다. 720 bp 부위에서는 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*에서만 나타나고, 600 bp 부위에서는 *A. deliciosa* 5계통 중 4계통에서만 특이하게 나타나는 밴드가 확인되었다.

UBC 376 Primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동결과 총 14개의 밴드가 나타났으며 모든 계통에서 공통적으로 나타나는 밴드는 없었고 계통간의 특이밴드를 다수 확인할 수 있었다(Fig. 1-4I). 약 1,100 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. polygama*, 그리고 *A. melanandra*의 공통적인 밴드가 확인되었고, 490 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. polygama*, *A. melanandra*, 그리고 *A. marcrosperma*의 공통적인 밴드가 출현하였다. 또한 390 bp 부위에서 *A. eriantha*, *A. chinensis* 및 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드가 나타났고, 550bp와 580bp에서 *A. deliciosa*의 밴드와 약 350 bp 부위에서 *A. marcrosperma*, *A. eirantha*, *A. chinensis* 및 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드가 나타나는 등 계통 특이밴드를 다수 확인할 수

제주대학교 중앙도서관

있었다.

UBC 379 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 2개의 공통밴드와 10개의 다형성을 보이는 밴드 등 12개의 밴드가 나타났으며, *A. arguta*, *A. polygama*, 그리고 *A. macrosperma*의 공통적인 밴드가 확인되었다(Fig. 1-4J).

UBC 381 primer를 이용한 PCR 증폭결과 12개의 밴드가 나타났으며, *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. polygama*, *A. melanandra*의 공통적인 밴드와 *A. chinensis* 및 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드가 확인되었다(Fig. 1-4K).

UBC 382 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과 공통밴드 없이 다형성을 나타내는 11개의 밴드가 나타났으며, 1,700 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. melanandra*, *A. chinensis* 및 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드가 확인되었다. 1,300 bp 부위에서는 *A. eriantha*를 제외한 모든 계통에서 공통적으로 밴드가 출현하였으며, 나머지 밴드는 종간 또는 종 내에서도 계통간 차이를 나타내었다(Fig. 1-4L).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

UBC 388 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 공통밴드 없이 다형성을 나타내는 16개의 밴드가 나타났으며, 2,000 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. melanandra*의 공통적인 밴드가 확인되었고, 1,350 bp 부위에서 *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. melanandra* 및 *A. polygama*의 공통적인 밴드가 확인되었다. 1,200 bp 부위에서는 *A. marcrosperma*와 *A. chinensis* 및 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드가 확인되었고, 1,150 bp 부위에서는 *A. deliciosa* 계통에서만 나타나는 특이밴드가 확인되었으며, 690 bp 부위에서 *A. eriantha*, *A. chinensis* 및 *A. deliciosa*에서만 나타나는 공통적인 밴드가 확인되었다(Fig. 1-4M).

UBC 391 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 1,350 bp 부위와 850 bp 부위의 공통밴드 2개와 10개의 다형성을 나타내는 밴드 등 총 12개의 밴드가 나타났다(Fig. 1-4N). 1,100 bp 부위에서는 *A. eriantha*를 제

외한 모든 계통에서 공통적으로 밴드가 나타났으며, 900 bp 부위에서는 *A. arguta*를 제외한 모든 계통에서 공통적으로 밴드가 나타났고, 480 bp 부위에서는 *A. arguta*와 *A. melanandra*의 공통적인 밴드가 확인되었다.

UBC 399 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 1,100 bp와 420 bp 부위에서 모든 계통에서 나타나는 공통밴드 2개와 6개의 다형성을 나타내는 밴드 등 총 8개의 밴드가 나타났다(Fig. 1-4O). 계통들간의 DNA 전기영동 패턴을 비교한 결과 약 950 bp 부위에서 *A. arguta, A. kolomikta, A. polygama,* 그리고 *A. melanandra*의 공통적인 밴드가 확인되었으며, 350 bp 부위에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드가 확인되었다.

UBC 410 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 200 bp에서 1,500 bp까지 총 11개의 밴드가 나타났으며, 모든 밴드가 계통간 다형성을 나타내었다(Fig. 1-4P). 계통들간의 전기영동 패턴을 보면 1,000 bp 부위에서 *A. arguta*와 *A. kolomikta*의 공통적인 밴드가 나타났으나 많은 밴드들은 같은 종 내에서도 계통간 다양한 특성을 나타내었다.

UBC 415 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 결과에서는 약 220 bp에서 2,000 bp까지 총 18개의 밴드가 나타났으며, 2개의 공통밴드와 16개의 다형성을 나타내는 밴드가 확인되었다(Fig. 1-4Q). 2,000 bp 부위에서는 *A. chinensis*에서만 나타나는 특이밴드가 확인되었으며, 1,300 bp 부위에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*의 공통적인 밴드 및 950 bp 부위에서의 *A. arguta, A. melanandra* 및 *A. eriantha*의 공통적인 밴드, 220 bp 부위에서 *A. deliciosa* 계통에서만 나타나는 특이밴드가 각각 확인되었다.

2.3 유연관계 분석

국내외에서 수집된 다래나무속 식물 8종 23계통의 계통간 유연관계 분석을 위하여 계통간 다형성을 나타내는 17개의 10-base random primer를 사용하여 얻은 223개 각각의 밴드를 하나의 형질로 보아 기초자료 행렬을 작성한 후

제주대학교 중앙도서관

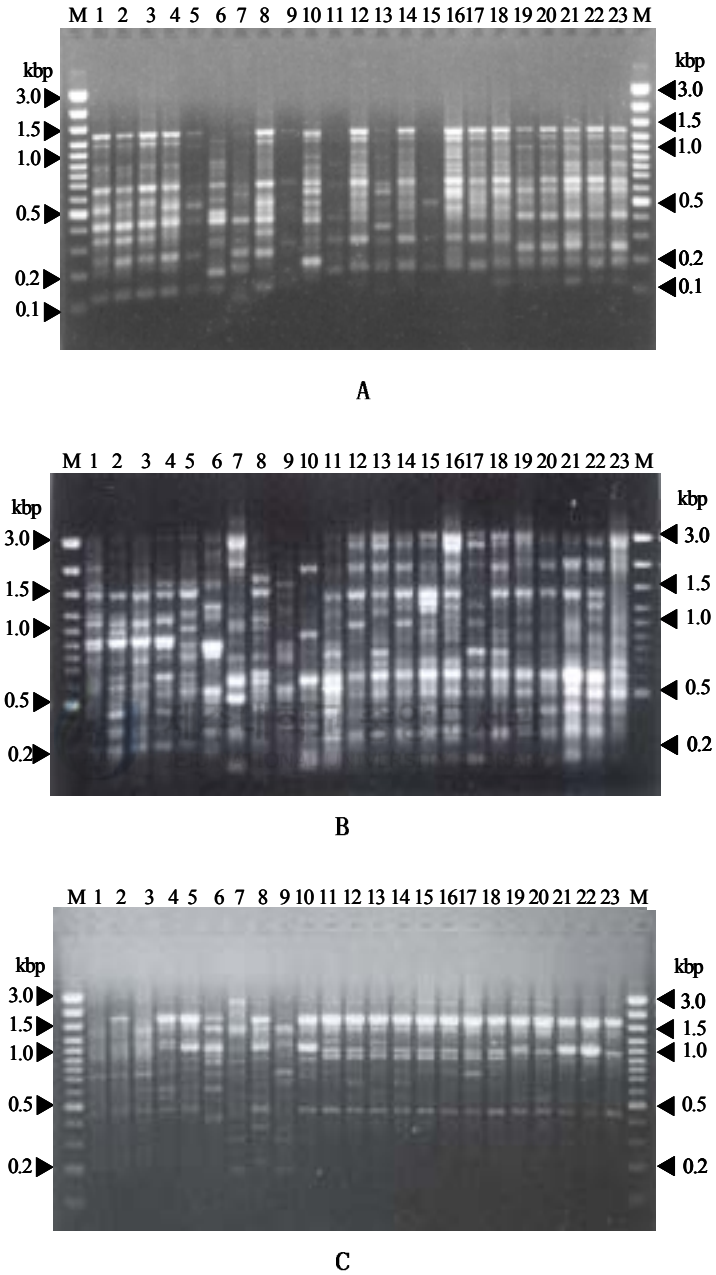
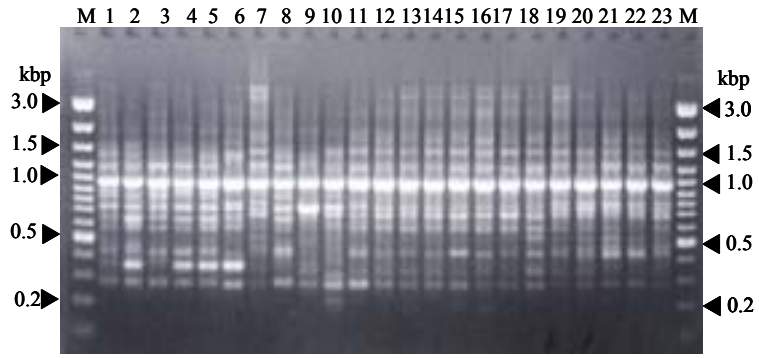
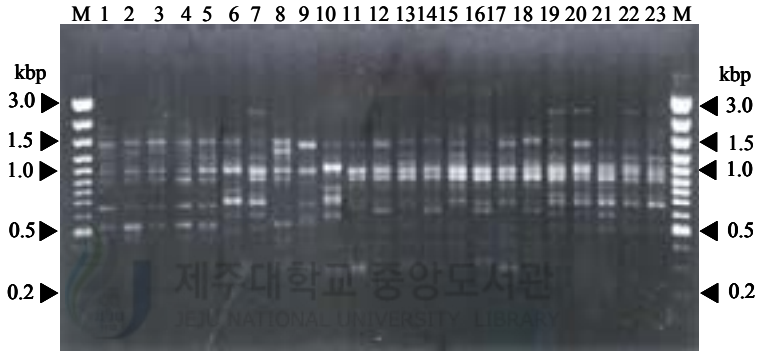


Fig. 1-4. RAPD band patterns of 23 *Actinidia* spp. using arbitrary primers A~Q. Each number on the top represents the same one assigned for 23 taxa in Table 1-1.
M : DNA size marker(GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

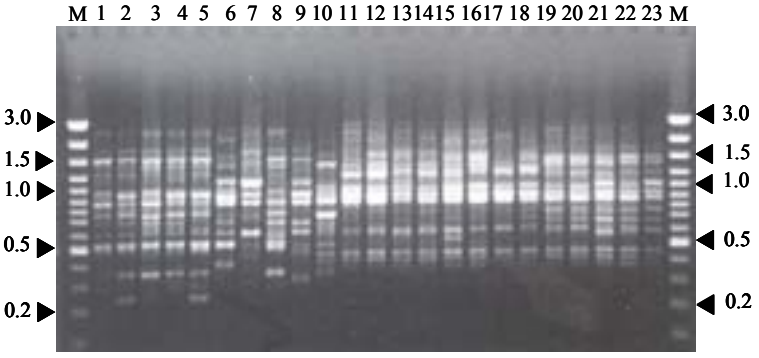


D



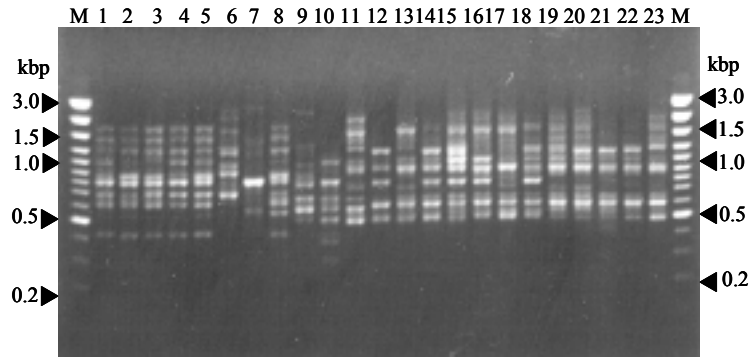
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

E

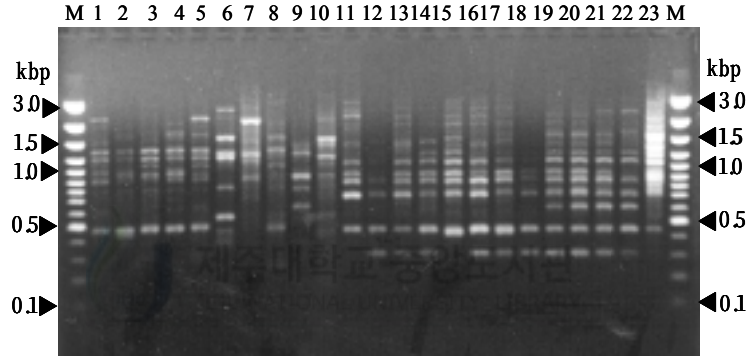


F

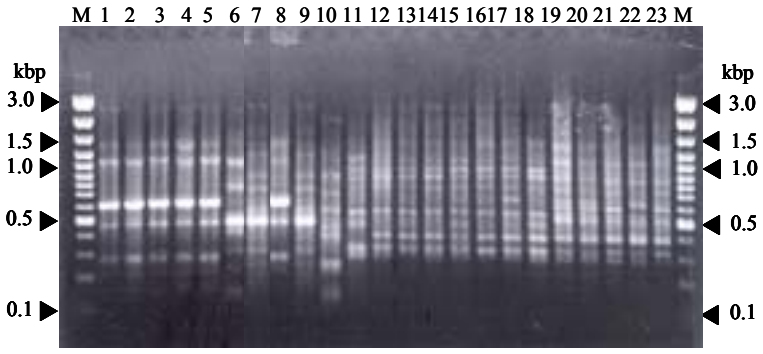
Fig. 1-4. (Continued)



G

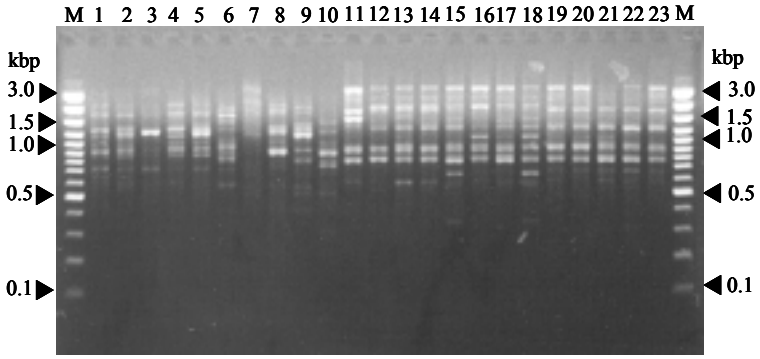


H

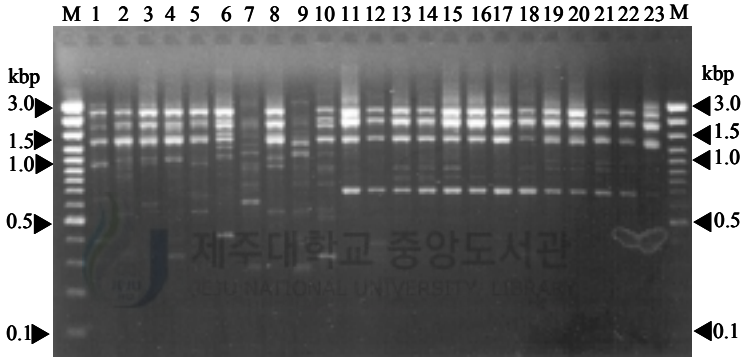


I

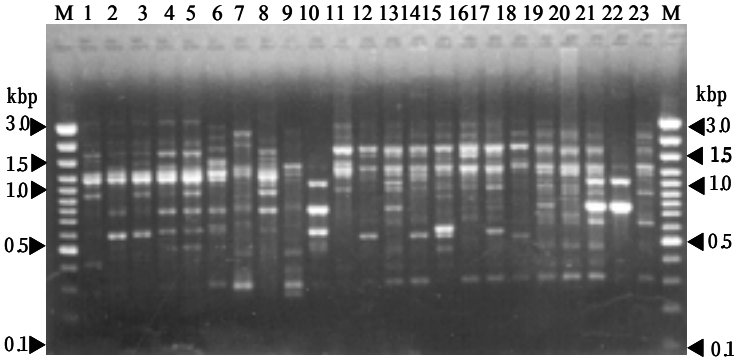
Fig. 1-4. (Continued)



J

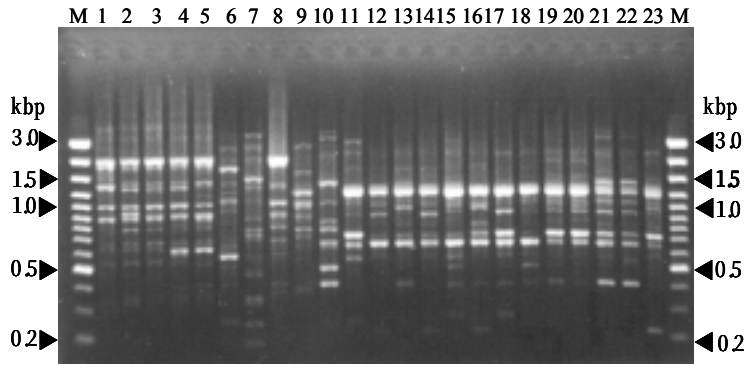


K



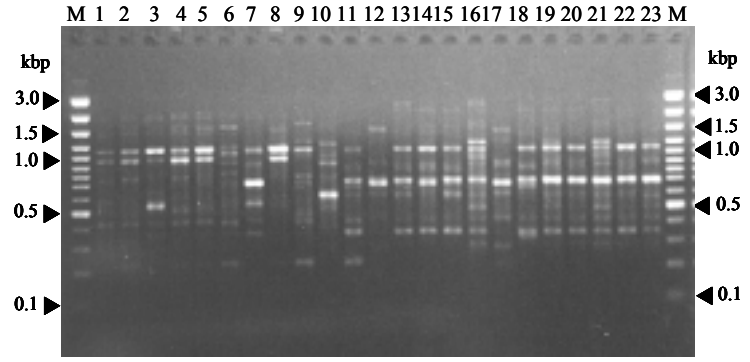
L

Fig. 1-4. (Continued)



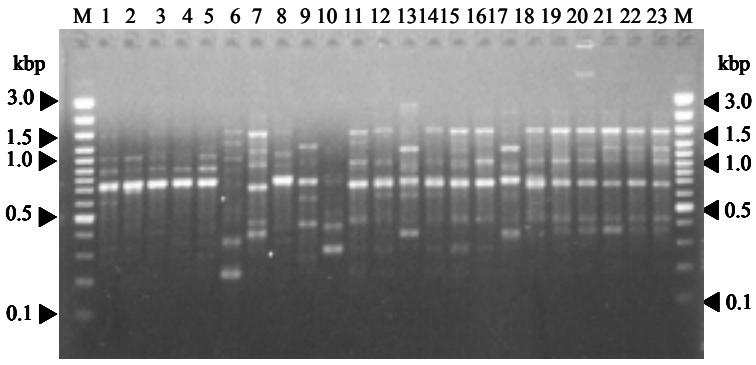
M

N

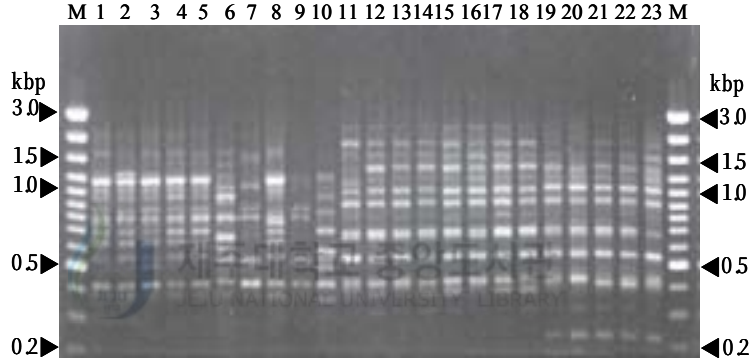


O

Fig. 1-4. (Continued)



P



Q

Fig. 1-4. (Continued)

(Table 1-4), Distance matrix를 작성하였다(Table 1-5). 그 결과, 종간 비교에서 *A. arguta*와 *A. eriantha*가 가장 거리가 먼 것으로 나타났고, *A. arguta*와 *A. melanandra*가 80% 이상의 상동성을 나타내어 가장 유연관계가 가깝게 나타났으며, *A. chinensis*와 *A. deliciosa* 또한 유연관계가 매우 가깝게 나타났다.

이들 계통간 거리지수를 바탕으로 dendrogram을 작성한 결과(Fig. 1-5) 유사도 50% 수준에서 크게 2개의 군으로 나뉘어졌으며 제 1 군은 *A. arguta, A. melanandra, A. kolomikta, A. polygama*와 *A. marcrosperma*를 포함하는 계통들로 *Leiocarpae*절에 속하고, 제 2 군은 *A. chinensis, A. deliciosa* 및 *A. eriantha*를 포함하는 계통들로서 *Stellatae*절에 속하였다. 제 1 군은 주로 과실에는 전혀 털이 없으며 라멜라층이 발달되어 있고, 잎에 털이 전혀 없거나 어렸을 때 극소량의 연모가 있다가 없어지는 특징을 나타내고, 제 2 군은 어린 과실에 털이 많고, 성숙되면서 털이 없어지는 계통 및 잎과 줄기에 털이 아주 많거나 조밀한 솜털이 있는 특징이 있는 것으로 알려져있다. 그러므로 이러한 결과는 Li(1952)와 Liang 등(1983)이 *Actinidia*속의 식물분류에서 털의 유무 및 형태와 정도가 중요한 key가 될 수 있다는 보고와 유사하였다. 제 1 군은 유사도 80% 수준에서 *A. arguta, A. melanandra* 및 *A. kolomikta*를 포함하는 제 1 아군과 *A. polygama*와 *A. marcrosperma*를 포함하는 제 2 아군으로 나뉘어졌는데 이는 Liang(1983, 1984)의 분류체계와 일치하였다. 제 1 아군 내에서의 종간 비교에서는 *A. arguta*와 *A. melanandra*가 가장 가깝게 나타났으며, 이들은 과실크기와 과피색 등 여러 부분이 매우 유사한 계통이다. 그러나 *A. kolomikta*의 경우 *A. arguta* 및 *A. melanandra* subgroup과는 차이가 크게 나타나 이 아절에 대한 보다 정밀한 검토가 필요하다고 생각된다.

제 2 아군은 과실 및 잎에 라멜라층이 발달하지 않은 계통들이면서 과육색이 황색 또는 홍색에 가깝고, 과실은 *A. polygama*가 약 7.0 g에 당도가 13.7 °Brix

Table 1-4. Binomial matrix from RAPD analysis

Lane	UBC102	UBC103	UBC105	UBC322	UBC337
	111	32221111111	21111	1111	211111
	32096655443322	092086532109986665443	86410974	542088876655432	854411988765
	00305050805050	00000000032009500505	00003005	000093028370458	005050550000
	00000000000000	00000000000000000000	00000000	000000000000000	000000000000
1	11011001011010	00000110110111000010	00001011	011111010110101	010001100101
2	11011010011010	00000101111011010110	01001011	001111010110111	010001100001
3	11011010011010	00000110110101001010	00101011	001111010110101	010001100001
4	11011001011010	00000110110111111011110	01101001	001111010110111	010001100101
5	11011001011010	00000110101111111011110	01101001	011111010110111	010001100101
6	11001000110001	00000101100111000111 0	01101110	011100111110111	010001010100
7	11001000010011	10100000011101010011 0	10101000	001100111001101	110001100110
8	11001011011010	00001010111101111101 0	01101001	001101010110101	010101100011
9	11001000010000	00000100000101001101 0	00101010	000100110001001	001001000000
10	11011111010001	00010000000000011111 1	01101101	100100111000001	001011011100
11	11111100010101	10000010110001011110 1	01111101	101100111010101	001001100010
12	11111100010101	11010011010000010110 1	01101101	101100111010101	001001100010
13	11111100011101	11010010110001010110 1	01111101	101100111010101	000001100000
14	11111100010101	11010011010000010110 1	01101101	101100111010101	000001100010
15	11111100010101	11000011111000010110 1	01101101	101100111010101	001001100110
16	11111101010101	11010011110000010110 1	01101101	101100111010101	001001100100
17	11111100010101	11000001010001010110 1	01101111	101100111010101	001001100100
18	11111100010101	11010010011001010110 1	01101101	101100111011101	011001100010
19	11111100010111	11000010010000010110 1	01101001	101100111011101	111001101111
20	11111100010111	10010010010000010110 1	01101001	101100111011101	101001101111
21	11111100010111	10010010010000010110 1	01001001	101100111011101	100001101111
22	11111100010111	10010011010000010110 1	01001001	101100111011101	100001101101
23	11111100010111	10010000010000010110 1	01001001	101100111011101	100001101101

(Continued)

Table 1-4. (Continued)

Lane	UBC349	UBC 359	UBC368	UBC376
	11111	21111	321111	11
	5421098765543	085299887644	054219976543	10986655443332
	0050558858268	000030500093	005003020550	00502085959505
	0000000000000	000000000000	000000000000	00000000000000
1	1100001111101	011110011101	011101000010	10000100100010
2	1100001111101	011100111101	001101000010	10000100100010
3	1100001111101	011100111101	001111000010	10000100100010
4	1100001111101	011110011101	001101000010	10000100100010
5	1100001111101	011110111101	011111000010	10000100100010
6	1101101111100	010110101000	101100100110	10011000110000
7	1101001111110	000000010100	011101000000	00100000100100
8	1100001111101	011110111101	001110000010	10000100100010
9	1001101101110	000000010110	001001100000	00100000100100
10	0100011111110	000010010110	010101000000	00100000001101
11	0110011101010	111111000110	000011110010	01100000000110
12	0110011101010	000111010110	000011110011	01100000001110
13	0110011101010	010011000110	010011110011	01100000001110
14	0110011101010	010111010110	000111110011	01100000001110
15	0110011101010	010111010110	010111110010	01100000001110
16	0110011101010	010011010110	010011110011	01100000001110
17	0010011101010	010011000110	000011110011	01101000001110
18	0010011111010	010111010110	000011110011	01100000101110
19	0010011111010	010111000110	010111111011	00101111001110
20	0010011111010	010111000110	010111111011	00101111001110
21	0010011111010	000111000110	010111111011	00101111001110
22	0010011111010	000111000110	010111111011	00101111001110
23	0010011111010	000111000110	010111110010	00101111001110

(Continued)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1-4.(Continued)

Lane	UBC379	UBC 381	UBC382	UBC388
	3211111	221111111	211111	2111111
	109542198776	50854221076432	87532199863	0753210998766554
	000000000500	00000500000029	00000050030	0505053505090900
	000000000000	00000000000000	00000000000	0000000000000000
1	001011110010	10101000100100	01011010000	1001001010000000
2	001011110010	10101000101000	01011000100	1011001110000000
3	001010010010	10101000101010	01011010010	1011001010000000
4	001011110010	10101000100000	01011000110	1011001010001000
5	001011110010	10101000100000	01011010110	1011001010001000
6	011110011010	11111101000100	01111000111	0111001000000100
7	001001110000	10110110101001	00010000011	0011001010100000
8	011011010000	10101001100000	01111110110	1001001010000000
9	011011111000	00010110100001	00110100011	0000101010100000
10	000011011100	11101000100010	00000100110	0010001001010011
11	101100011001	10101000001000	11111010000	0000100010110100
12	111010011000	10101000001000	11011000010	0000100010110000
13	111010011001	10101000101000	11011110101	0000100100110001
14	111010011001	10101000101000	11011010011	0000100010110001
15	110010011010	10101000101000	11011010010	0000100100110011
16	110010111000	10101000001000	11010010011	0000101100110001
17	110010011000	10101000001000	11010010011	0000100010110001
18	110010111010	10101000001000	11010010011	0000100000110011
19	101010011010	10101000101000	11011011101	0000110110110001
20	101010011010	10101000101000	11011011001	0000110110110001
21	101010011010	10101000101000	11011101111	0010110010110001
22	101010011010	10101000101000	00010100101	0010110010110001
23	101010011010	10101000101000	11011001011	0000110010110001

(Continued)

Table 1-4. (Continued)

Lane	UBC391	UBC399	UBC410	UBC 415
	21111	11	111	21111
	576319887643	21976543	51099764332	053209988766555432
	050500500085	00500825	00050058600	000055050082830082
	000000000000	00000000	00000000000	0000000000000000000
1	000110101011	01100010	00111000000	010111011101010110
2	000110101011	01100010	00111000000	010111011101010110
3	000110101011	01100110	00111000000	010111011101011110
4	000110101011	01100010	00111000000	010111011101010110
5	000110101111	01100010	00111000000	010111011101010110
6	000111101101	01100010	10110000101	010111001111110110
7	001111101000	01111010	11010011000	010010011000010100
8	000111101111	01100010	11011000000	010111001111010110
9	001111110100	11010010	00001110000	000010011000010100
10	000101101100	11001010	00000010010	000111100110111110
11	010111101000	01010011	10011110000	111010101110010100
12	000111101000	01010011	10011110000	111010100110010110
13	110111101000	01011011	01011111000	111010100110010100
14	010111101000	01010011	10011110000	111010100110010110
15	010111101000	01011011	10011010000	111010100110010110
16	110111101100	11010011	10011010000	111010100110010100
17	010111101100	01011011	01011011000	111010101110010110
18	010111111100	01010011	10011010000	111010100110010110
19	010111111100	11010011	10011011000	011010100110010101
20	010111111100	01010011	11011011000	011010100110010101
21	010111101100	11010011	11011011000	011010100110010101
22	110111101100	01010011	11011010000	011010100110010101
23	110111101100	01010011	11011010000	011010100110010101

제주대학교 중앙도서관

Table 1-5. Distance matrix of *Actinidia* spp. by PCR-RAPD

NO[z]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0.0																						
2	0.102	0.0																					
3	0.102	0.077	0.0																				
4	0.077	0.071	0.100	0.0																			
5	0.084	0.088	0.106	0.036	0.0																		
6	0.330	0.339	0.340	0.303	0.295	0.0																	
7	0.399	0.388	0.398	0.387	0.395	0.427	0.0																
8	0.179	0.154	0.163	0.147	0.134	0.316	0.399	0.0															
9	0.506	0.514	0.503	0.489	0.495	0.476	0.314	0.489	0.0														
10	0.528	0.515	0.505	0.473	0.469	0.471	0.462	0.473	0.474	0.0													
11	0.474	0.462	0.443	0.451	0.457	0.469	0.450	0.416	0.492	0.446	0.0												
12	0.493	0.481	0.462	0.460	0.475	0.477	0.439	0.433	0.481	0.384	0.113	0.0											
13	0.488	0.477	0.477	0.475	0.471	0.500	0.447	0.440	0.508	0.394	0.135	0.128	0.0										
14	0.472	0.469	0.442	0.450	0.455	0.467	0.429	0.414	0.489	0.385	0.114	0.042	0.093	0.0									
15	0.458	0.456	0.447	0.446	0.434	0.463	0.424	0.420	0.526	0.353	0.140	0.088	0.119	0.071	0.0								
16	0.484	0.500	0.491	0.470	0.458	0.478	0.441	0.453	0.482	0.350	0.164	0.102	0.106	0.094	0.084	0.0							
17	0.502	0.509	0.481	0.488	0.484	0.460	0.430	0.461	0.470	0.386	0.157	0.113	0.117	0.105	0.113	0.100	0.0						
18	0.479	0.468	0.459	0.457	0.445	0.465	0.418	0.422	0.466	0.385	0.162	0.101	0.149	0.093	0.093	0.097	0.108	0.0					
19	0.458	0.456	0.456	0.446	0.435	0.487	0.417	0.430	0.512	0.404	0.207	0.184	0.177	0.158	0.156	0.170	0.172	0.151	0.0				
20	0.462	0.469	0.460	0.459	0.447	0.500	0.411	0.434	0.518	0.407	0.200	0.177	0.170	0.150	0.158	0.171	0.165	0.153	0.024	0.0			
21	0.478	0.467	0.467	0.447	0.444	0.489	0.399	0.431	0.515	0.377	0.231	0.182	0.183	0.164	0.188	0.193	0.188	0.183	0.053	0.045	0.0		
22	0.482	0.470	0.480	0.460	0.456	0.494	0.411	0.451	0.521	0.378	0.247	0.196	0.188	0.177	0.202	0.189	0.193	0.197	0.088	0.072	0.042	0.0	
23	0.467	0.475	0.465	0.455	0.451	0.489	0.405	0.446	0.516	0.391	0.222	0.180	0.189	0.161	0.177	0.182	0.177	0.181	0.080	0.055	0.043	0.053	0.0

[z]Species names for each numbers are presented in Table 1-1.

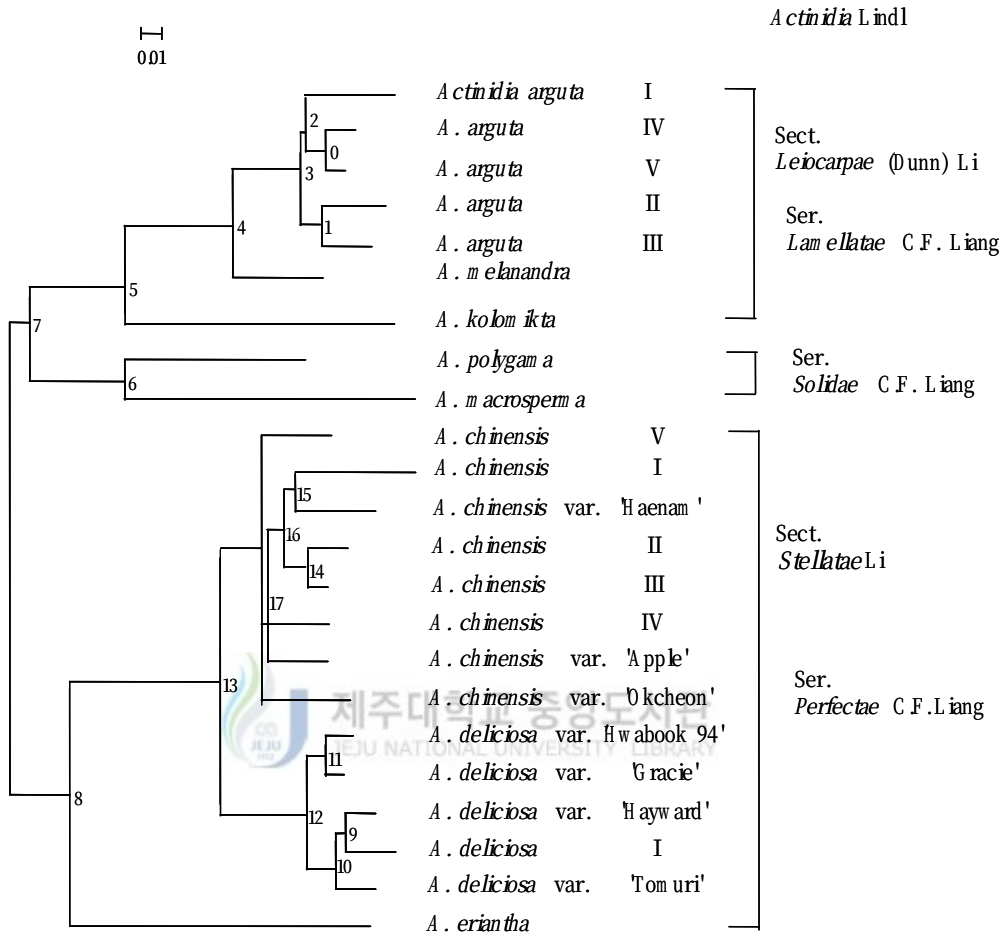


Fig. 1-5. Dendrogram based on the analysis of PCR-RAPD fragments.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

였으며 *A. marcrosperma*는 약 7.5 g에 당도가 12.5 °Brix로 나타난 계통이다(김 등, 2002). 한국과 일본, 러시아(시베리아) 등에서 자생하고 있는 다래(*A. arguta*), 쥐다래(*A. kolomikta*)는 병에 대한 저항성을 나타내며 과실의 맛이 좋고 향이 뛰어나고 비타민 C가 다량 함유되어 있다. *A. kolomikta*의 경우 과육색이 녹황색으로 내한성이 강하여 북위 50도 이상의 지역에서도 자연적으로 생장하며 영하 35℃이하에서도 견뎌낼 수 있어 과수들이 자라기 어려운 지역에서도 생존할 수 있는 잠재적인 가치를 갖고 있으며(Evreinoff, 1949; Poyarkova, 1949; Vitkovskii *et al.*, 1972), *A. arguta*는 과실이 5 g 정도로서 생과와 가공용으로 먹을 수 있다(Poyarkova, 1949; Bibikaw *et al.*, 1969; Goodell, 1982; 제시, 2002). 러시아에서는 쥐다래와 다래를 상업화시키기 위하여 과실크기가 큰 계통의 선발과 교잡으로 야생에서 자라는 것보다는 월등히 뛰어난 것이 개발되었으나 크게 성공하지는 못했다(Evreinoff, 1934, 1949; Zhang, 1981). 미국에서는 다래의 상업적인 잠재력이 오랜 동안 논의되어 왔으나 뚜렷한 결과는 없었다(Darrow, 1975). 그러나 kiwifruit의 성공과 함께 야생종들에 대한 관심이 크게 증가하였으며, 이들을 이용한 육종이 크게 흥미를 끌고 있다(Goodell, 1982). 특히 kiwifruit의 크기, 품질, 그리고 저장성과 같은 특성들이 단지 제한적인 선발에 의해 두드러지게 개량되어왔다는 점을 생각해보면 육종에서의 이용가치는 클 것으로 여겨진다.

제 2 군은 *A. chinensis*, *A. deliciosa* 및 *A. eriantha*가 포함되었으며, 이 군에서 *A. chinensis*는 부드러운 털이 많이 있다가 점차 없어지거나 일부에서만 나타나는 종이고, *A. deliciosa*는 거칠고 성긴 털이 성숙 시까지도 밀생하는 특성을 나타내며, *A. eriantha*는 하얗고 부드러운 털이 밀생하는 특성을 갖고 있었다. 제 2 군은 다시 유사도 60% 수준에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*를 포함하는 아군과 *A. eriantha* 등 2개의 아군으로 나뉘어졌으며, *A. chinensis*와 *A. deliciosa*를 포함하는 group은 다시 약 80% 수준에

서 별도의 subgroup으로 나뉘어졌다. 제 2군은 Liang(1983, 1984)과 Ferguson과 Bollard(1990)의 보고를 토대로 볼 때 털의 구조가 별 모양으로서 Stellatae 절에서도 *Perfectae* series에 속하는 것으로 분류하고 있으며, *A. chinensis*와 *A. deliciosa*는 같은 부모에서 유래된 것으로 알려지고 있는데(Cipriani *et al.*, 1998) 본 실험에서도 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*가 속한 제 1 아군과 *A. eriantha*에 대한 보다 더 정밀한 검토가 필요하다고 생각되며, 줄기나 과실의 피목 유무 및 라멜라층의 발달여부보다는 털의 모양과 양이 더 큰 분류 기준이 될 수도 있다고 생각되었다.

한편 'Hayward'의 우연실생으로서 2000년 품종 등록된 'Hwabook 94'는 'Hayward'선발 당시에 같이 선발된 것으로 알려진 'Gracie'와 유연관계가 큰 것으로 나타났다. 중국에서 수집된 *A. chinensis* 계통들 가운데 *A. chinensis* var. 'Haenam'과 *A. chinensis* III는 주로 廣東, 江西 지역에 분포하는 계통으로서 제주에서 재배할 경우 두 계통 모두 수확기가 10월 1일경이었으며 이 때 평균 과중은 *A. chinensis* var. 'Haenam'이 116.5 g이고 *A. chinensis* III는 61.3 g이었으며 평균 당도는 각각 15.8 °Brix와 14.5 °Brix로서 'Hayward'의 12.8 °Brix에 비하여 당도가 높은 계통이다. *A. chinensis* IV는 廣東과 湖北지방에 분포하는 계통으로서 제주에서는 수확기가 10월 20일로서 평균 과중이 93.3 g이고 평균 당도가 14.5 °Brix를 나타냈다. *A. chinensis* var. 'Okcheon'은 *A. chinensis* var. 'Haenam'의 수분수이고, *A. chinensis* V는 *A. chinensis* III과 *A. chinensis* IV의 수분수이다. 또한 이들 *A. chinensis* 계통들은 과실의 크기가 *A. deliciosa*와 거의 같은 대과계통으로서 조기수확이 가능하며 특히 수확 시 과실에 털이 거의 없는 특징을 갖고 있다(김 등, 2002; 농림부, 1997).

제주대학교 중앙도서관

Ⅲ. 다래나무속 식물의 내적형질 유전양상분석

1. 서 언

오늘날 세계적으로 널리 재배되고 있는 kiwifruit는 중국 長江(Yangtze river) 유역에서 수집된 *A. deliciosa*의 종자와 식물체들 가운데 두 개의 암그루와 한 개의 수그루에서 파생된 종자에서 유래하였다(Ferguson and Bollard, 1990). 이들 종자의 일부가 1904년 뉴질랜드로 수입되고 선발된 후 과실의 크기가 크고, 과형이 둥글고 길며, 과육색이 녹색이고 딱딱한 심부위가 적은 과실을 가진 우량계통들이 'Hayward', 'Gracie', 'Abbott', 'Allison', 'Bruno', 그리고 'Monty' 품종 등으로 선발되었는데, 이중에서 'Hayward' 품종이 묘목 형태로 뉴질랜드로부터 전세계에 퍼져 나갔다.(Ferguson, 1983; 山根, 1989; Ferguson and Bollard, 1990).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

우리나라를 포함한 전세계에서 재배되고 있는 품종군은 소수의 교배 종자로부터 육성된 것이기 때문에 유전적 변이폭이 매우 적기 때문에 현존하는 품종으로부터 품종을 개량하는데 한계가 있어 다른 과수에 비하여 kiwifruit의 생산 및 소비를 다양화하는 품종육성이 어려운 것으로 여겨진다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 다른 다래나무속 식물의 유전형질를 이용하는 육종이 필요하다. Kiwifruit의 육종은 과실크기, 수량성, 과육색, 털의 유무, 향기, 그리고 당 및 비타민, 무기성분 등의 다양한 형질개량을 목표로 하고 있다. 그러나 이들 형질의 유전적 특성은 아직까지 밝혀지지 않았으며, 많은 연구자들에 의하여 유전자원의 특성과 분포 등에 대한 연구와 함께 *A. chinensis* 계통 육종 및 종간교잡을 이용한 육종이 진행되고 있다(Liang, 1984; Ferguson *et al.*, 1990; Cui, 1993; Ferguson and McNeilage, 1999;

Huang *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999). 그러나 일부 종간 교배시 과실의 퇴화 및 불화합성 등이 알려지면서 종간교잡에 의한 유용형질을 가진 종 생산이 어렵고, 다래가 자웅이주 식물이기 때문에 과실의 크기나 품질처럼 암나무의 육종형질의 가치를 가늠하기가 어려운 점 등 많은 문제점을 보이고 있다(Schmid, 1978; Ferguson, 1984; 제시, 2002 미발표). 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 배유배양(Gui *et al.*, 1982), 배배양(Mu *et al.*, 1992), 체세포 교잡(Hirsch *et al.*, 2001) 및 원형질체 배양(Mii and Ohashi, 1988; Oliveira and Pais, 1991), 형질전환(Janssen and Gardner, 1993; Nakamura et al., 1999)등 여러 가지 연구들이 진행되고 있으며, 또한 육종효율을 높이기 위한 표지인자의 개발(Harvey *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 1998)이 활발히 진행되고 있다.

엽록체와 미토콘드리아는 일반적으로 교잡시 재조합이 일어나지 않기 때문에 진핵생물에서는 양친 중 한쪽으로부터 유전되며(Harris and Ingram, 1991; Birky, 1995), 핵 DNA에 비하여 엽록체 유전자는 염기의 치환율이 1/4~1/3, 미토콘드리아 유전자는 1/20로 변이율이 아주 낮기 때문에 식물에서 gene history 연구에 유용하다(Palmer *et al.*, 1988; Crawford, 1991). 또한 ITS(internal transcribed spacer) region은 핵 리보좀 DNA의 일부로서 비교적 잘 보존되어 있지만 ITS 1과 ITS 2는 5.8S, 18S 및 25S 등에 비하여 계통간 변이가 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들은 유연관계 분석(Palmer *et al.*, 1988; Clegg and Zurawski, 1992; Yamamoto *et al.*, 1993; Cipriani, 1994; Soltis and Soltis, 1997; Cipriani *et al.*, 1998; Jung, 2001), 자가불화합성 관련 연구(Lilly and Havey, 2001) 등 식물의 분자계통 및 유전연구에 널리 이용되고 있으며, 특히 다래나무속에 대한 연구는 Crowhurst 등(1990)이 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*의 핵과 엽록체 유전자의 RFLP분석을 이용한 종의 분류, Cipriani 등(1998)이 엽록체 DNA를 이용한 *Actinidia*속 20 계통의 유연관계 분석 등이 있다.

제주대학교 중앙도서관

또한 엽록체와 미토콘드리아는 화색, 과육색 및 당도 결정 등과도 관련성이 많은 것으로 알려지고 있으며(Tilney-Bassett, 1994), 나자식물에서는 대부분 부계유전하지만 피자식물에서는 모계유전하는 것으로 알려지고 있다(Corriveau and Coleman, 1988). 그러나 이것이 절대적인 것은 아니며(Birky, 1983) 양친 모두에서 유전하거나 부계유전한다는 보고도 있다(Kirk and Tilney-Bassett, 1978; Corriveau and Coleman, 1988; Boblenz *et al.*, 1990; Harris and Ingram, 1991; Derepas and Dulieu, 1992).

한편 다래나무속과 관련해서는 Cipriani(1995), Testolin과 Cipriani(1997) 및 Chat 등(1999)이 엽록체 DNA와 미토콘드리아 DNA에 대하여 PCR-RFLP 전기영동 패턴을 이용한 유전양상을 보고한 바가 있으나 아직까지도 이에 대한 연구가 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 kiwifruit의 육종을 위한 토대를 마련하고자 엽록체 DNA인 *psb*A와 *rbc*L , 미토콘드리아의 DNA인 *nad*1과 *nad*4 및 핵 리보좀 DNA인 ITS region에 대한 유전양상을 분석하였다.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 재료 및 방법

3.1 식물재료

다래나무속 식물의 엽록체 DNA, 미토콘드리아 DNA 및 핵 DNA 단편의 유전양상을 분석하기 위하여 농촌진흥청 제주농업시험장 육종포장에 재식된 *A. melanandra* (♀), *A. chinensis* (♂) 및 이들의 교배실생묘, 그리고 *A. chinensis* (♀), *A. arguta* (♂) 및 이들의 교배실생묘를 이용하였다.

3.2 Total DNA분리 및 정제

-70℃에서 보관중인 다래나무속 식물 잎 0.5 g을 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가한 후 백색분말 상태가 될 때까지 마쇄하여 Dellaporta 등(1983)의 방법을 변형하여 DNA를 분리하였다. 최종적으로 얻어진 total DNA는 agarose gel 상에서 전기영동하여 단일밴드로 나타나는 것을 확인하였고, 확인된 DNA는 UV/VIS spectrophotometer로 정량하여 순도가 1.8 이상이 된 것만 실험에 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관

3.3 Primer 제작

엽록체 DNA는 rubisco large subunit 유전자(*rbc*L)와 photosystem II D1 유전자(*psb*A), 미토콘드리아 유전자는 미토콘드리아의 respiratory chain complex에 있는 NADH dehydrogenase subunit 가운데 하나인 *nad*1 및 *nad*4, 그리고 핵 유전자는 nuclear small rDNA와 nuclear large rDNA 사이에 위치한 것으로 알려져 있는 Internal transcribed spacer region(ITS region)을 사용하였다.

엽록체 DNA인 *rbc*L 및 *psb*A는 Cipriani와 Morgante(1993)의 방법에 따라 primer sequence를 제작하여 이용하였고(Table 2-1, Fig. 2-1A), 미토콘드리

아 유전자인 *nad*1과 *nad*4는 Demesure 등(1995)이 사용하였던 primer sequence를 제작하여 사용하였다(Table 2-1, Fig. 2-1B).

핵 유전자인 ITS1과 ITS4는 White 등(1990)이 사용하였던 primer sequence를 참고하여 제작·사용하였다(Table 2-1, Fig. 2-1C).

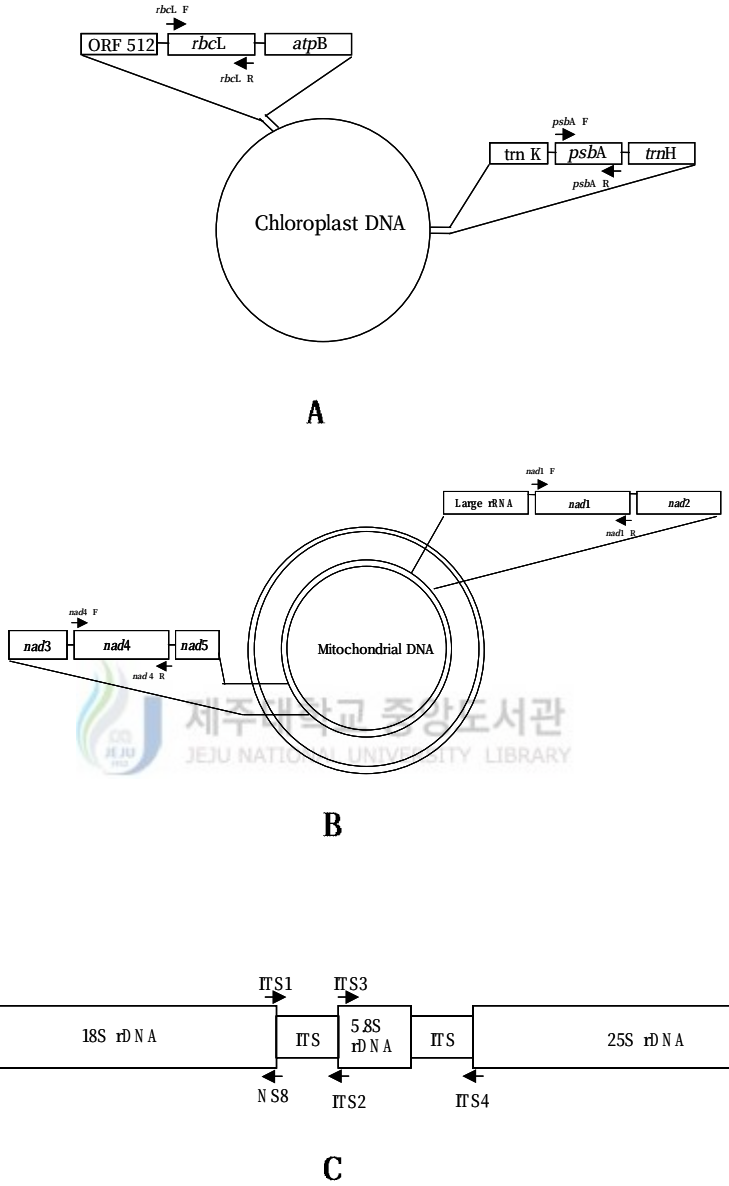
Table 2-1. List of the cpDNA, mtDNA and nuclear DNA regions adopted in the study and primer-pair forward/reverse sequences designed for the PCR amplification

DNA region	Primer-pair sequence	Reference
Chloroplast DNA		
*rbc*L	for. 5′-TTGGCAGCATTCCGAGTAA-3′	Cipriani &
	rev. 5′-TGTCCTAAAGTTCCTCCAC-3′	Morgante(1993)
*psb*A	for. 5′-CCATGACTGCAATTTTAGAG-3′	〃
	rev. 5′-ACTTCCATACCAAGGTTAGC-3′	
Mitocondrial DNA		
*nad*1	for. 5′-GCATTACGATCTGCAGCTCA-3′	Demesure *et al.*(1995)
	rev. 5′-GCAGCTCGATTAGTTTCTGC-3′	
*nad*4	for. 5′-CAGTGGGTTGGTCTGGTATG-3′	〃
	rev. 5′-TCATATGGGCTAATGAGGAG-3′	
Nuclear DNA	ITS1 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′	White *et al.*(1990)
	ITS3 5′-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3′	〃
	ITS4 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	〃

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.4 PCR

PCR 증폭을 위한 반응용액은 primer를 각각 4.0 pM, dNTP 200 mM, $MgCl_2$ 2.0mM, *Taq* polymerase 2.5 unit, 주형 DNA 20~30 ng을 첨가한 후 멸균 증류수를 첨가하여 최종 volume을 50 μL로 조정하였다. PCR 수행조건은 *rbc*L은 94℃에서 5분, 그리고 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1.5분으로 30 cycle를 실시한 후 72℃에서 5분 동안 DNA dimer를 형성하였으며, *psb*A는 95℃에서



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3-1. The general structure of two cpDNA regions, two mtDNA regions, and nrDNA region used in this study. Arrows indicate the positions and orientations of the primers used. A: cpDNA regions(*psb*A and *rbc*L); B: mtDNA regions(*nad*1 and *nad*4); C: nrDNA ITS region.

2.5분, 그리고 94℃ 30 초, 50℃ 30초, 72℃ 1.5분으로 30 cycle를 실시한 후 72℃에서 5분 동안 DNA dimer를 형성하였다. 미토콘드리아 DNA인 *nad*1과 *nad*4 및 핵 DNA인 ITS region은 94℃에서 5분, 그리고 94℃ 30 초, 60℃ 30 초, 72℃ 1분으로 30 cycle를 실시한 후 72℃에서 5분 동안 DNA dimer를 형성하였다. 모든 PCR 산물은 1.2% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 증폭여부를 확인하였다.

3.5 RFLP

RFLP는 *Hae*III 등 20 개의 제한효소를 사용하여 적정 제한효소를 선발하였으며, 이때 반응액은 PCR 산물 3 μL(100 ng·μL^{-1}), 10x 완충액 1 μL, 제한효소 1 μL(10 unit·μL^{-1}), 그리고 멸균 증류수 5 μL를 첨가하여 최종 반응 부피를 10 μL로 조절한 후 37℃에서 4시간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 3.0%의 Metaphor agarose gel (FMC Bioproducts) 상에서 전기영동을 실시한 후 밴드양상을 비교하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.6 ITS2 region의 염기서열 분석

PCR 결과 증폭된 ITS2 region은 AdvanTAge PCR Cloning Kit(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 클로닝을 수행하였다. 형질전환은 10F′ *E. coli*를 competent cell로 하여 형질전환을 실시한 다음 40 mg·mL^{-1}의 X-gal과 IPTG 및 50 μg·mL^{-1} ampicillin을 포함하고 있는 고체 LB 배지를 이용하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후 흰색 콜로니를 선발하였다. 선발된 흰색 콜로니는 액체 LB 배지를 이용하여 37℃, 18시간 동안 225 rpm으로 진탕배양하였다. 배양된 대장균으로부터의 플라스미드 DNA 분리는 Wizard® SV Mini Preps DNA purification system(Promega, USA)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 수행하였다. 분리된 플라스미드는 제한효소 *Eco*RI을 처리하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨 후 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 클로닝 여부를 확인하였다.

클로닝이 확인된 DNA들은 Cy5-labeled vector inner primer 인 M13-40 primer(5′-CGCCAGGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3′)와 M13 reverse primer(5′-TTT CACACAGGAAACAGCTATGAC-3′)를 포함하고 있는 Cy5 Autocycle Sequencing Kit(Pharmacia, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 결과 및 고찰

3.1 엽록체 DNA의 유전양상

엽록체 DNA의 유전양상을 분석하기 위하여 *A. melanandra* (♀), *A. chinensis* (♂) 및 교배실생묘, 그리고 *A. chinensis* (♀), *A. arguta* (♂) 및 교배실생묘를 대상으로 *psb*A와 *rbc*L에 대하여 PCR을 실시한 후 제한효소를 처리하여 RFLP 패턴을 비교하였다.

*psb*A에 대한 PCR 증폭 결과 약 1,000 bp 부위에 단일밴드로서 나타났다(Fig. 2-2). 제한효소 *Hin*fI을 처리한 결과(Fig. 2-3), 모계인 *A. melanandra*는 약 540 bp, 280 bp, 그리고 180 bp 부위 등 3개의 밴드를 얻었으며, *A. chinensis*는 약 360 bp, 270 bp, 200 bp, 그리고 170 bp 부위 등 4개의 밴드가 나타났다. 한편 이들의 교배실생묘에서는 모계인 *A. melanandra*와 같은 위치에서 밴드가 출현하여 *A. melanandra*와 *A. chinensis*을 교배할 경우 *psb*A가 모계유전하는 양상을 보였다. *A. chinensis*와 *A. arguta* 양친과 교배실생의 *psb*A에 대하여 제한효소 *Hin*fI을 처리한 결과(Fig. 2-4), 모계인 *A. chinensis*는 약 350 bp, 280 bp, 190 bp, 그리고 180 bp부위 등 4개의 밴드를 얻었으며, *A. arguta*는 약 540 bp, 400 bp, 280 bp, 그리고 180 bp 부위 등 4개의 밴드가 검출되었다. 한편 이들의 교배실생묘에서는 모계인 *A. chinensis*와 같은 위치에서 밴드가 나타나 *A. chinensis*와 *A. arguta*를 교배할 경우 *psb*A가 모계유전하는 것으로 판단되었다.

*rbc*L의 유전양상을 분석하기 위하여 PCR을 실시한 결과 약 1,300 bp 부위에 단일밴드로 나타났으며(Fig. 2-5), 총 10 개의 제한효소 가운데 *Hae*III와 *Alu*I 등 2 개가 선발되었고 이를 이용하여 *rbc*L의 유전양상을 분석하였다(Fig. 2-6). 제한효소 *Hae*III를 처리한 결과(Fig. 2-6A), 모계인 *A. melanandra*는 700 bp, 380 bp 등 2개의 뚜렷한 밴드를 얻었으며, *A.*

제주대학교 중앙도서관

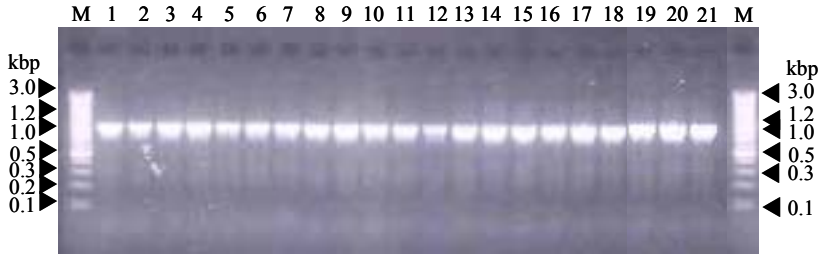


Fig. 2-2. PCR products from *psb*A amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross. Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~20: progeny; lane 21: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

Fig. 2-3. Analysis of inheritance of *psb*A digested with *Hinf* I in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂). Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~20: progeny; lane 21: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

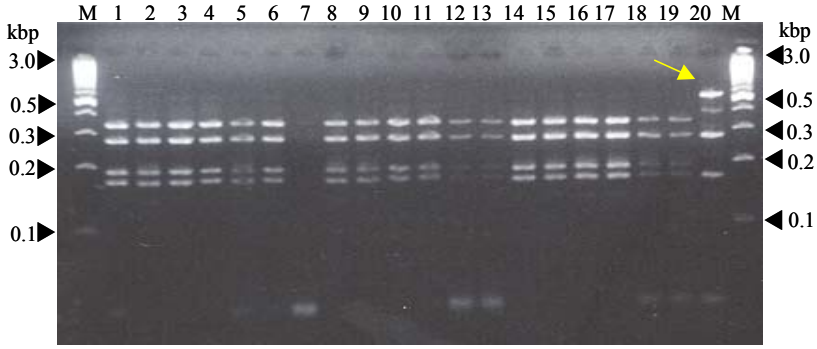


Fig. 2-4. Analysis of inheritance of *psb*A digested with *Hinf* I in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂). Lane 1: *A. chinensis* (♀) ;lane 2~19: progeny; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

Fig. 2-5. PCR products from *rbc*L amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross. Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~19: progeny; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

A

B

Fig. 2-6. Analysis of inheritance of *rbc*L digested with *Hae*III (A) and *Alu*I (B) in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂). Lane 1 : *A. melanandra* (♀); lane 2~19: progeny; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

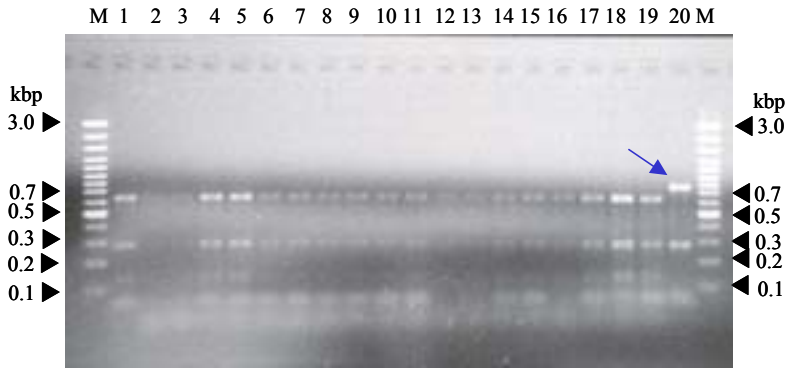


Fig. 2-7. Analysis of inheritance of *rbc*L digested with *Alu*I in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂). Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~19: progeny ; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

*chinensis*는 이들 밴드 이외에 1,050 bp 부위에 뚜렷한 밴드 등 3개의 밴드가 검출되었다. 한편 *Alu*I을 처리한 결과(Fig. 2-6B)에서는 모계인 *A. melanandra*는 750 bp, 290 bp 등 2개의 뚜렷한 밴드 이외에 90 bp의 밴드 등 3개를 얻었으며, *A. chinensis* 는 650 bp, 290 bp, 140 bp 및 90 bp 등 4개의 밴드가 확인되었다. 한편 이들의 교배실생묘에서도 *Hae*III 및 *Alu*I 처리 모두에서 모계인 *A. melanandra*와 같은 위치에서 밴드가 검출됨으로써 *A. melanandra*와 *A. chinensis*을 교배할 경우 *rbc*L은 모계유전을 하는 것으로 나타났다. 또한 모계인 *A. chinensis*와 부계인 *A. arguta* 및 교배실생묘의 *rbc*L에 대한 RFLP에서는 제한효소 *Alu*I을 처리한 결과(Fig. 2-7) 모계인 *A. chinensis*는 650 bp, 280 bp, 150 bp, 그리고 90 bp 등 4개의 밴드를 얻었으나, *A. arguta*는 750 bp, 280 bp, 그리고 90 bp 등 3개의 밴드만이 검출되었다. 한편 이들의 교배실생묘에서는 모계인 *A. chinensis*와 같은 위치에 밴드가 나타나 *A. chinensis*와 *A. arguta*를 교배할 경우 *rbc*L은 모계유전하는 것

으로 판단되었다.

Testolin과 Cipriani(1997)는 *A. chinensis* x *A. eriantha*, *A. chrysantha* x *A. polygama*,그리고 *A. chrysantha* x *A. valvata*에서 PCR-RFLP를 이용하여 유전양상을 분석한 결과 부계유전하는 것으로 보고하였으며, Chat 등(1999)은 *A. deliciosa*의 종내 품종간 교배를 실시한 후 143개체에 대한 PCR-RFLP 전기영동 패턴을 비교한 결과 대부분이 부계유전을 하지만 극히 일부에서 모계유전하는 것이 확인되었다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 *psb*A와 *rbc*L 유전자가 *A. melanandra* x *A. chinensis* 및 *A. chinensis* x *A. arguta*의 모든 실생묘에서 모계유전하는 것으로 나타났다.

3.2 미토콘드리아 DNA의 유전양상

다래나무속 식물의 미토콘드리아 유전양상 분석을 위하여 *A. melanandra* (♀)와 *A. chinensis* (♂) 및 이들의 교배실생묘로부터 Respiratory chain complex에 있는 NADH dehydrogenase subunit 가운데 하나인 *nad*1과 *nad*4에 대해 PCR 증폭을 실시한 후 제한효소를 처리하여 RFLP 패턴을 비교하였다.

제주대학교 중앙도서관

*nad*1은 PCR 증폭 결과 약 1,700 bp 부위에 단일밴드로서 나타났고(Fig. 2-8) 14 개의 제한효소 가운데 모계와 부계에서의 RFLP 패턴이 다른 것은 *Hae*III로서 이를 이용하여 비교분석을 실시하였다(Fig. 2-9). 본 실험결과 모계인 *A. melanandra*는 280 bp, 250 bp, 210 bp, 190 bp, 180 bp, 170 bp, 100 bp, 그리고 90 bp 등 8의 밴드가 확인되었으나, 부계인 *A. chinensis*는 180 bp 위치의 밴드를 제외한 7개의 밴드가 나타났고, 이들의 교배실생묘에서는 모계인 *A. melanandra*와 같은 전기영동 패턴을 나타내었다. *nad*4는 PCR 증폭 결과 약 2.5 kb 부위에 단일밴드로서 나타났으며(Fig. 2-10) 제한효소 *Rsa*I으로 처리한 결과(Fig. 2-11) 모계인 *A. melanandra*는 550 bp, 390 bp, 330 bp, 270 bp, 190 bp 등에서 밴드가 확인되었으나, 부계인 *A. chinensis*는 이외에 230 bp 위치에서 밴드가 확인되었으며, 이들의 교배

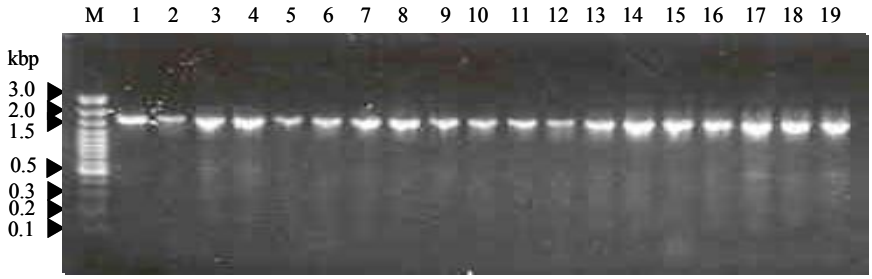


Fig. 2-8. PCR products from *nad*1 amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross. Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~18: progeny; lane 19: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 2-9. Analysis of inheritance of *nad*1 digested with *Hae*III in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂). Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~14: progeny; lane 15: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

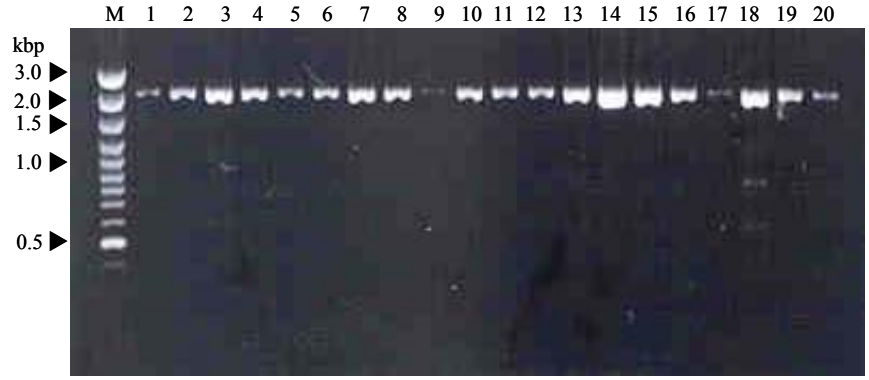


Fig. 2-10. PCR products from *nad*4 amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross. Lane 1 : *A. melanandra* (♀); lane 2~19: progeny; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

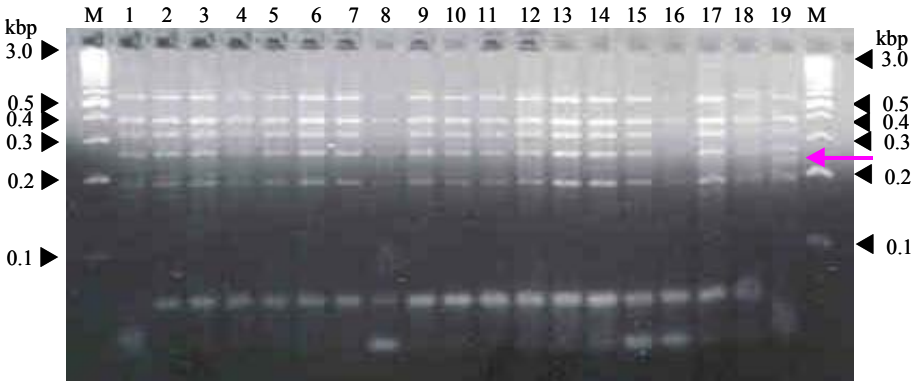


Fig. 2-11. Analysis of inheritance of *nad*4 digested with *Rsa*I in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂). Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~18: progeny; lane 19: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

실생묘에서는 모계인 *A. melanandra*와 같은 전기영동 패턴을 나타내었다.

본 실험 결과 모계로서 *A. melanandra*와 부계로서 *A. chinensis*를 교배할 경우 *nad*1과 *nad*4 모두에서 모계와 같은 RFLP 패턴을 나타내는 것으로 보아 미토콘드리아 유전자는 모계유전하는 것으로 판단된다. 한편, Testolin과 Cipriani(1997)는 *A. chinensis* x *A.eriantha*, *A. chrysantha* x *A. polygama*,그리고 *A. chrysantha* x *A. valvata*에서 PCR-RFLP를 이용하여 유전양상을 분석한 결과 모계유전하는 것으로 보고하였으며, Chat 등(1999)도 또한 *A. deliciosa*의 종내 품종간 교배 시에 모계유전을 하는 것으로 보고하였는바, 본 연구결과도 이들의 보고와 일치하였다.

3.3 핵 DNA의 유전양상

다래나무속 식물의 ITS region을 PCR 증폭 후 전기영동을 실시한 결과 약 700 bp 부위에서 단일밴드를 얻을 수 있었으며(Fig. 2-12), RFLP를 위한 제한효소로는 *Hae*III와 *Msp*I에서 부계와 모계에서 다양성을 보이는 전기영동 패턴을 얻을 수 있었다(Fig. 2-13, 2-14).

제주대학교 중앙도서관

모계인 *A. melanandra*와 부계인 *A. chinensis* 및 이들의 교배실생묘의 ITS region의 RFLP 전기영동 패턴을 보면 *Hae*III를 처리할 경우(Fig. 2-13A) 모계에서는 350 bp와 280 bp 등의 밴드를 확인할 수 있었으며 교배실생묘 또한 같은 밴드양상을 나타냈으나 부계인 *A. chinensis*에서는 450 bp와 220 bp 부위의 밴드가 나타났다. 제한효소 *Msp*I을 처리할 경우에는(Fig. 2-13B) 모계에서 300 bp, 280 bp 및 100 bp 등의 밴드를 확인할 수 있었으며 교배실생묘 또한 같은 밴드양상을 나타냈으나 부계인 *A. chinensis*에서는 550 bp와 130 bp 부위에서 2개의 밴드만이 확인되었다. 또한 모계로서 *A. chinensis*와 부계로서 *A. arguta* 및 이들의 교배실생묘의 ITS region의 PCR산물에 *Hae* III를 처리할 경우(Fig. 2-14A) 모계에서는 400 bp, 190 bp 및 90 bp 등의 밴드를 확인할 수 있었으며 부계인 *A. arguta*에서는 400 bp, 320 bp,

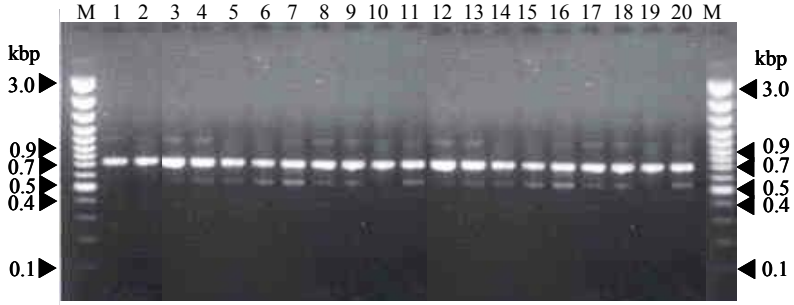
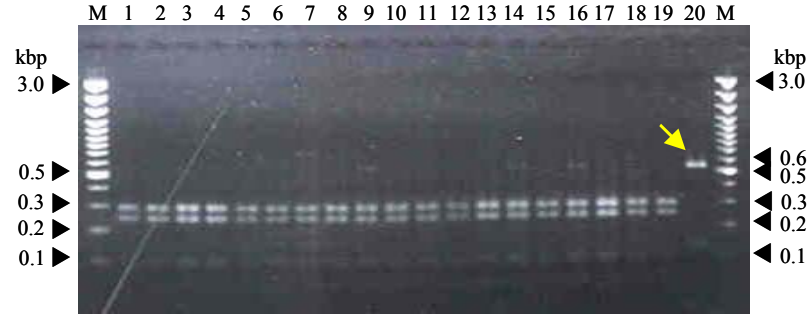


Fig. 2-12. PCR products from ITS amplified sequence in progeny from *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) cross. Lane 1 : *A. melanandra* (♀); lane 2~19: progeny; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

A



B

Fig. 2-13. Analysis of inheritance of ITS digested with *Hae*III (A) and *Msp*I (B) in the crosses between *A. melanandra* (♀) and *A. chinensis* (♂). Lane 1: *A. melanandra* (♀); lane 2~19: progeny; lane 20: *A. chinensis* (♂)
M : DNA size marker(GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

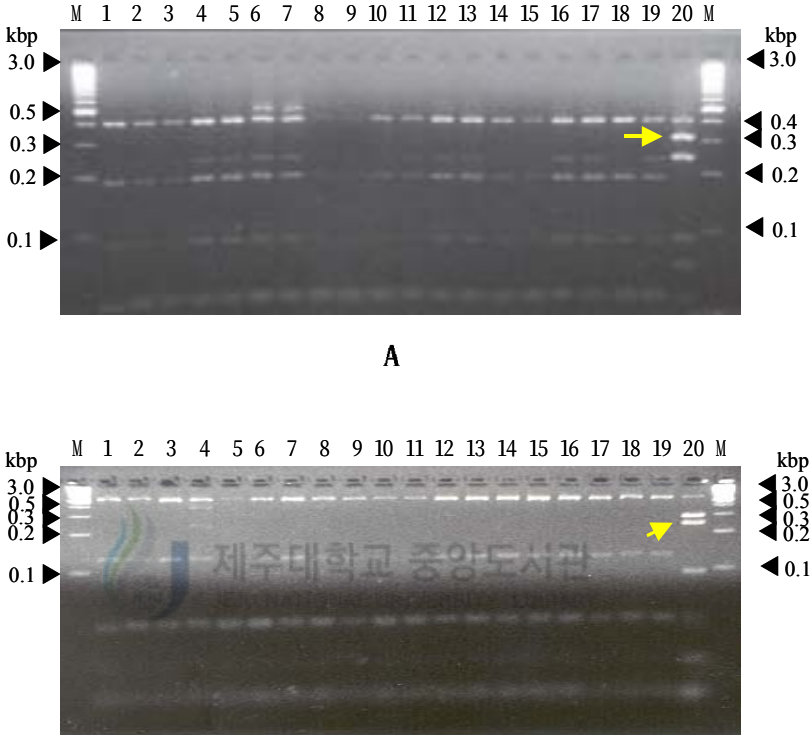


Fig. 2-14. Analysis of inheritance of ITS digested with *Hae*III (A) and *Msp*I (B) in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂). Lane 1: *A. chinensis* (♀); lane 2~19: progeny; lane 20: *A. arguta* (♂) M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

250bp, 90 bp 및 약 70 bp 부위의 밴드가 나타났다. 교배실생묘에서는 모계와 유사한 전기영동 패턴을 나타내었으나 일부 개체에서 모계 또는 부계와 다른 약 500 bp 부위의 밴드가 나타나거나 부계와 같은 250 bp 부위의 밴드가 나타나기도 하였다. 제한효소 *Msp*I을 처리할 경우(Fig. 2-14B)는 모계에서 550 bp,120 bp 및 50 bp 등의 밴드를 확인할 수 있었으며 부계인 *A. chinensis*에서는 550 bp, 300 bp, 250 bp, 그리고 90 bp와 50 bp 부위의 밴드 등 모계보다 여러개의 밴드양상을 나타냈다. 또한 교배실생묘에서도 모계와 유사한 RFLP 패턴을 나타내었으나 2개 개체에서 부계 또는 모계와 다른 밴드가 출현하였다. ITS region의 유전양상을 염기수준에서 검토하기 위하여 모계인 *A. chinensis*와 부계인 *A. arguta* 그리고 이들의 실생묘에 대하여 ITS2의 염기서열 분석을 실시한 결과 모계인 *A. chinensis*는 염기수가 221개였고, 부계인 *A. arguta*는 염기수가 222 개였으며 교배실생묘에서는 220에서 222 개로 나타났다(Fig. 2-15~2-20). 모계인 *A. chinensis*와 부계인 *A. arguta* 및 이들의 교배 실생묘의 ITS2의 염기서열 분석 결과를 가지고 Multiple alignmemt program을 이용하여 비교한 결과(Fig. 2-21) 교배실생에서는 대부분의 염기들이 모계와 일치하였으나 일부는 모계와 달리 부계와 일치하거나 부계 또는 모계와 전혀 다른 염기들이 출현하였다. 또한 Phylip program을 이용하여 유연관계를 비교한 결과에서도 교배실생들이 모계와 group을 형성하는 것이 확인되었다(Fig. 2-22). 이상의 결과로 볼 때 다래나무속 식물에서의 핵 DNA는 주로 모계로부터 유전되지만 부계의 영향 및 자체변이도 수반되고 있는 것으로 확인되었다.

제주대학교 중앙도서관

```
  1 CATTGTGTTGCCCACCCAACTCAAGTCTTACCAAGGATTGGTTGTGGGTGGGCGGATATT
 61 GCCCCCCCCGTGCACATTAGTGAACGGTCGGCCTAAAAATAAAGTCCTTAGCAATGGACGT
121 CACAACAAGTGGTGGTTGACAAACCGTTGCGTCCTGTTGTGCTTGCCCCCATTGCTAATG
181 GTTTACTTTTGACCCTAATGTGCTGTTATCACGGCTTCGAT
```

Fig. 2-15. Nucleotide sequence of ITS2 region from *A. chinensis* (♀).

```
  1 CATTGTGTCGCCcaCCCGACTCAAGCCTTACCAAGGCTCCGTGTGGGTGGCCGGATATTG
 61 CCCCCCCCGTGCACACCAGTGAACGGTCGGCCTAAAAATGAAGTCCTTGGCAATGGACGTC
121 ACAGCAAGTGGTGGTTGACAAACCGTTGCGTCCTGCTGTCTTCGCTCCCATTGCTAACGG
181 TTTACTTTGGACCCTAACGTGCCGTTGCCACGGCTTCGAT
```

Fig. 2-16. ITS2 region sequence of progeny I in the crosses between *A. chinensis* and *A. arguta*.

```
  1 CATTGTGTTGCCCACCCAACTCAAGTCTTACCAACGATTGGTTGTGGGTGGGCGGATATT
 61 GCCCCCCCCGTGCACATTAGTGAACGGTCGGCCTAAAAATAAAGTCCTTAGCAATGGACGT
121 CACAACAAGTGGTGGTTGACAAAcCGTTGCGTCCTGTTGTGCTTGCCCCCATTGCTAATG
181 GTTTACTTTTGACCCTAATGTGCTGTTATCACGGCTTCGAT
```

Fig. 2-17. ITS2 region sequence of progeny II in the crosses between *A. chinensis* and *A. arguta*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

```
  1 CATTGTGTCGCCCACCCGACTCAAGCCTTACCAAGGGCTCCGTGTGGGTGGCCGGATATT
 61 GCCCCCCCCGTGCACACCAGTGAACGGTCGGCCTAAAAATGAAGTCCTTGGCAATGGACGT
121 CACAGCAAGTGGTGGTTGACAAACCGTTGCGTCCTGCTGTCTTSGCTCCCATTGCTAACG
181 GTTTACTTTGGACCCTAATGTGCCGTTGCCACGGCTTCGAT
```

Fig. 2-18. ITS2 region sequence of progeny III in the crosses between *A. chinensis* and *A. arguta*.

```
  1 CATTGTGTTGCCCACCcAACTCAAGTCTTACCAAGGAATTGGGTGTGGGTGGCCGGATAT
 61 TGCCCCCCCCGTGCACATTAGTGAACGGTCGGCCTAAAAATAAAGTCCTTAGCAATGGACG
121 TCACAACAAGTGGTGGTTGACAAACCGTTGCGTcCTGTTGTGCTTGCCCCCATTGCTAAT
181 GGTTTACTTTTGACCCTAATGGGCTGTTATCACGGCTTCGAT
```

Fig. 2-19. ITS2 region sequence of progeny IV in the crosses between *A. chinensis* and *A. arguta*.

```
  1 CATTGTGTCGCCCACCCTACCCGAGCCTTACCAAGGGCCGGGCGCGGGTGGGCGGAAATT
 61 GACCCCCCCGTGCACGTCAGTGAGTGGTCGGTCTAAAAATGAAGTCCTCGGCGACGGACGT
121 CACGACAAGTGGTGGTTGACAAACCGTTGCGTCCTGTCGTGGTCGCCCCCGTTGCCGAAC
181 GTTTGCTCTTCGACCCTAACGTGCCGTTGCCACGGCTTCGAT
```

Fig. 2-20. Nucleotide sequence of ITS2 region in *A. arguta* (♂).

Page 1.1

	1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90	
1 Progeny-II	CATTGTGTTGCCCAC CCAACTCAAGTCTTA CCAACG-ATTGG-TT GTGGGTGGGCGGATA TTGCCCCCCCGTGCA CATTAGTGAACGGTC	88
2 *A. arguta*	CATTGTGTCGCCCAC CCTACCCGAGCCTTA CCAAGG-GCCGG-GC GCGGGTGGGCGGAAA TTGACCCCCCGTGCA CGTCAGTGAGTGGTC	88
3 Progeny-IV	CATTGTGTTGCCCAC CCAACTCAAGTCTTA CCAAGG-AATTGGGT GTGGGTGGCCGGATA TTGCCCCCCCGTGCA CATTAGTGAACGGTC	89
4 *A.chinensis*	CATTGTGTTGCCCAC CCAACTCAAGTCTTA CCAAGG-ATTGG-TT GTGGGTGGGCGGATA TTGCCCCCCCGTGCA CATTAGTGAACGGTC	88
5 Progeny-I	CATTGTGTCGCCCAC CCGACTCAAGCCTTA CCAAGG-CTCCG--T GTGGGTGGCCGGATA TTGCCCCCCCGTGCA CACCAGTGAACGGTC	87
6 Progeny-III	CATTGTGTCGCCCAC CCGACTCAAGCCTTA CCAAGGGCTCCG--T GTGGGTGGCCGGATA TTGCCCCCCCGTGCA CACCAGTGAACGGTC	88

Page 2.1

	91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180	
1 Progeny-II	GGCCTAAAAATAAAG TCCTTAGCAATGGAC GTCACAACAAGTGGT GGTTGACAAACCGTT GCGTCCTGTTGTGCT TGCCCCCATTGCTAA	178
2 *A. arguta*	GGTCTAAAAATGAAG TCCTCGGCGACGGAC GTCACGACAAGTGGT GGTTGACAAACCGTT GCGTCCTGTCGTGGT CGCCCCCGTTGCCGA	178
3 Progeny-IV	GGCCTAAAAATAAAG TCCTTAGCAATGGAC GTCACAACAAGTGGT GGTTGACAAACCGTT GCGTCCTGTTGTGCT TGCCCCCATTGCTAA	179
4 *A.chinensis*	GGCCTAAAAATAAAG TCCTTAGCAATGGAC GTCACAACAAGTGGT GGTTGACAAACCGTT GCGTCCTGTTGTGCT TGCCCCCATTGCTAA	178
5 Progeny-I	GGCCTAAAAATGAAG TCCTTGGCAATGGAC GTCACAGCAAGTGGT GGTTGACAAACCGTT GCGTCCTGCTGTCTT CGCTCCCATTGCTAA	177
6 Progeny-III	GGCCTAAAAATGAAG TCCTTGGCAATGGAC GTCACAGCAAGTGGT GGTTGACAAACCGTT GCGTCCTGCTGTCTT CGCTCCCATTGCTAA	178

Page 3.1

	181 195 196 210 211 225	
1 Progeny-II	TGGTTTACTTTTG-A CCCTAATGTGCTGTT ATCACGGCTTCGAT	221
2 *A. arguta*	ACGTTTGCTCTTCGA CCCTAACGTGCCGTT GCCACGGCTTCGAT	222
3 Progeny-IV	TGGTTTACTTTTG-A CCCTAATGGGCTGTT ATCACGGCTTCGAT	222
4 *A.chinensis*	TGGTTTACTTTTG-A CCCTAATGTGCTGTT ATCACGGCTTCGAT	221
5 Progeny-I	CGGTTTACTTTGG-A CCCTAACGTGCCGTT GCCACGGCTTCGAT	220
6 Progeny-III	CGGTTTACTTTGG-A CCCTAATGTGCCGTT GCCACGGCTTCGAT	221

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 2-21. Multiple alignment of the ITS2 region sequences in the crosses between *A. chinensis* (♀) and *A. arguta* (♂).

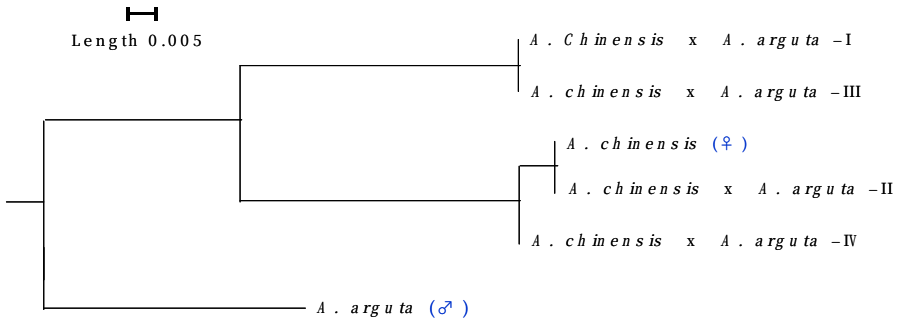


Fig. 2-22. Phenogram of *A. chinensis* (♀), *A. arguta* (♂), and their progenies generated by UPGMA cluster analysis of ITS2 region .

Ⅳ. 다래나무속 식물 계통 표지인자 탐색과 SCAR 마커개발

1. 서 언

세계적으로 kiwifruit의 육종에 대한 본격적인 연구는 1980년대 이후에 시작되었는데 1990년 초까지는 야생에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*를 대상으로 대과형(>80 g), 고비타민(>120 ㎎/100 g), 그리고 당함량이 14% 이상으로 높은 우량계통을 선발하여 왔고, 1990년대 이후부터 *Actinidia* 종들간의 교배육종을 통한 신품종 육성이 이루어지고 있다. 그러나 다래나무속 식물은 기능적으로 자웅이주 식물로서 자연상태에서도 2배체(2n=2x=58), 4배체(2n=4x=116), 6배체(2n=6x=174) 등 여러 가지 형태의 배수성을 갖는 종들이 다양하게 분포하고 있는데 현재 널리 재배되고 있는 품종은 6배체이다. 또한 과실 한 개 당 700~1,000개의 종자가 있으며 발아율도 90%이상으로 높고, 어린개체에서는 외형적으로 암수 및 여러 가지 과실특성들을 판별하기 어렵기 때문에 개화 및 결실까지 3~5년이상 기다려야 하는 등 육종선발에 많은 어려움이 있다(Zhang *et al.*, 1983; 渡辺, 1992; Frédrique *et al.*, 1994). 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 육종효율을 높여줄 수 있는 표지인자의 개발이 요구되고 있다.

경제형질 마커를 이용한 유식물의 선발은 조기선발을 가능하게 하여 육종포장, 선발노력 등을 줄여 육종효율을 크게 증대시킬 수 있다. 또한 특정 질적 및 양적형질과 연관되어 있는 DNA 표지인자들은 연관정도가 높을수록 그 이용성이 증대된다. 이들 마커개발은 RAPD(Welsh and McClelland, 1990; Willians *et al.*, 1990; This *et al.*, 1997; del Rio and Bamberg, 2000), AFLP (Amplified fragment length polymorphism)(Lin and Kuo, 1995; Negi

et al., 2000), 그리고 SSR (Simple sequence repeat)(Powell *et al.*, 1996) 등의 기법에 의하여 크게 향상되었다. 특히 특정 질적형질에 대한 DNA 표지 인자는 분리집단을 이용하여 BSA (Bulked segregation analysis)를 통해 효율적으로 이루어질 수 있다(Michelmore *et al.*, 1991). 또한 특이적으로 신뢰도가 높은 PCR-based SCAR (Sequence characterized amplified region) 마커들의 경우는 RAPD 단편의 염기서열을 바탕으로 개발될 수 있다(Martin *et al.*, 1991; Paran and Michelmore, 1993; Barzen *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 1998; Brahm *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001). 다래나무속 식물에서는 *A. deliciosa*에서 품종판별을 위한 Isozyme(Messina *et al.*, 1991), RAPD(Harvey *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 1998)와 AFLP(Xiao *et al.*, 1999)를 이용한 성관련 SCAR 마커 개발에 대한 연구가 시도되고 있으나 아직까지도 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 PCR-RAPD를 이용하여 계통 특이밴드를 선발하고, 이 특이 밴드로부터 SCAR 마커의 개발 가능성을 검토하여 kiwifruit의 육종효율을 향상시키기 위한 기초자료로 이용하고자 실시하였다.

제주대학교 중앙도서관

2. 재료 및 방법

4.1 식물재료

본 연구에 사용된 다래나무속 식물은 중국과 제주지역에서 수집하여 제주농업시험장의 육종실험포장에 재식되어 생육중인 8종 23계통을 이용하였다(Table. 2-1). 4월에서 6월 사이에 신초 상단부의 완전히 전개된 건전한 어린 잎을 채취하여 수돗물로 깨끗이 세척하고 증류수로 헹군 다음 물기를 제거하고 25℃ 암상태에서 1일간 보관한 후 -70℃에 보관하면서 total DNA분리에 사용하였다.

4.2 RAPD를 이용한 계통 특이밴드의 탐색

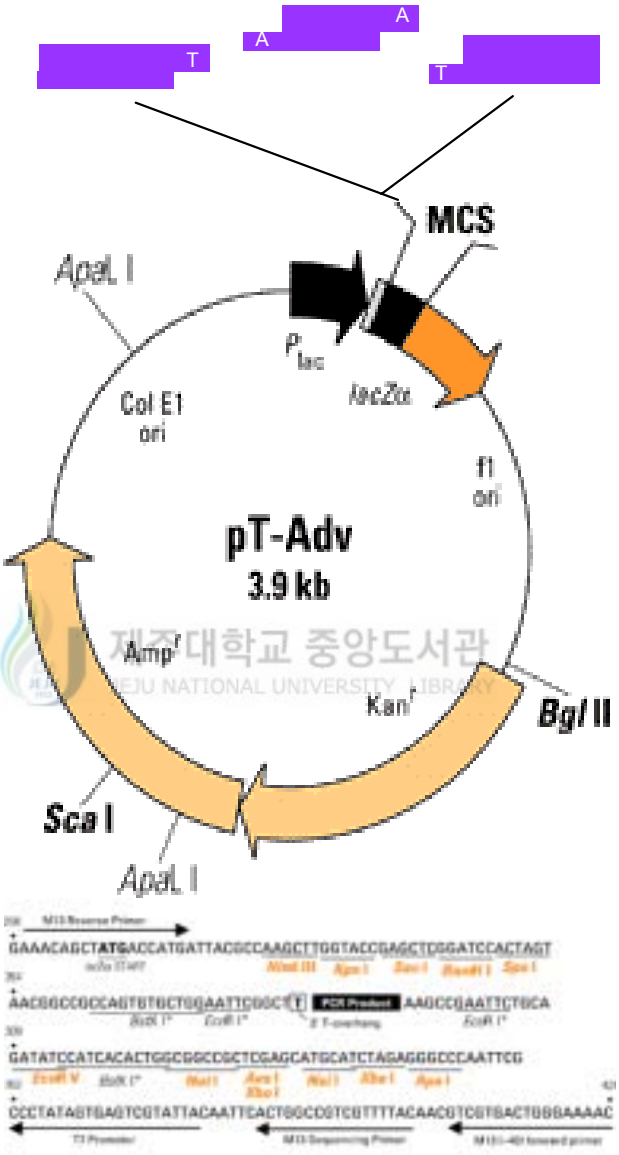
다래나무속 식물의 계통판별 및 육종시 유용한 표지인자로 이용될 수 있는 마커를 개발하기 위하여 *A. deliciosa* cv. 'Hayward' 등 8종 23계통의 식물의 잎에서 Dellaporta 등(1983)의 방법을 변형하여 DNA를 분리·정제한 후 140개의 UBC primer(UBC 101~120, 301~420)를 이용하여 계통간 특이밴드를 나타내는 primer를 선발하였다. PCR 반응용액은 주형 DNA 20 ng, UBC primer 4.0 pM, dNTP(MBI) 400 μM, *Taq* DNA polymerase(MBI) 2.0 unit, $MgCl_2$ 2.5 mM, 10 X 반응 완충액 2.5 μL을 첨가한 후 3차 증류수를 첨가하여 최종 반응 부피를 25 μL로 하였다. PCR 반응은 94℃ 5분 1 cycle로 DNA를 변성시킨 후 94℃ 1분, 38℃ 1분, 72℃ 1.5분으로 35 cycle동안 증폭한 다음 72℃에서 5분 동안 dimer를 형성한 후 4℃에서 안정화 시켰다. PCR 산물은 1.2% agarose gel 상에서 100 V로 40분동안 전기영동을 실시하여 계통 특이밴드를 선발하였다.

4.3 계통 특이밴드 회수

계통 특이밴드를 클로닝하기 위하여 RAPD를 실시한 후 2%의 low melting agarose (Promega, USA) gel 상에서 전기영동을 실시하였으며 완충액은 TBE (Tris-borate/EDTA) buffer를 사용하였다. 전기영동 후 UV transilluminator 상에서 band를 확인하고, 확인된 밴드를 잘라내어 새로운 microtube에 옮긴 다음 완충액을 첨가하여 65℃에서 10분 동안 처리하여 완전히 녹인 후 Wizard® PCR Preps DNA purification system (Promega, USA)을 이용하여 용액으로부터 DNA를 순수 분리하였으며, 최종적으로 멸균수에 녹인 후 클로닝에 이용하였다(Soltis and Soltis, 1997).

4.4 계통 특이밴드 클로닝

PCR 결과 얻은 계통 특이밴드들은 pT-Adv 벡터에 ligation을 하였고(Fig. 3-1) AdvanTAge PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)를 이용하여 클로닝을 실시하였다. Ligation 반응용액은 50 ng의 PCR 산물, 1 μL의 1x ligation 완충액, 50 ng의 pT-Adv Vector, 그리고 1 μL의 T4 DNA ligase, 멸균수 4 μL을 첨가하여 최종 반응 부피를 10 μL로 하였으며, 14℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 형질전환은 Top 10F′ *E. coli*를 competent cell로 하여 형질전환을 실시한 다음 40 mg·mL^{-1} 의 X-gal과 IPTG 및 50 ng·mL^{-1} ampicillin을 포함하고 있는 LB 배지를 이용하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후 흰색 콜로니를 선발하였다. 선발된 흰색 콜로니는 액체 LB 배지를 이용하여 37℃에서 18시간, 225 rpm으로 진탕배양하였다. 배양된 대장균으로부터 플라스미드의 분리는 Wizard® SV Mini Preps DNA purification system(Promega, USA)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 수행하였다. 분리된 플라스미드 DNA는 제한효소 *Eco*RI을 처리하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨 후 1.2% agarose gel 상에서 클로닝 여부를 확인하였다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3-1. Vector for the cloning of specific bands in *Actinidia* spp.

4.5 계통 특이밴드 염기서열분석

클로닝이 확인된 DNA들은 Cy5-labeled vector inner primer인 M13-40 primer(5′-CGCCAGGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3′)과 M13 reverse primer(5′-TTTCACA CAGGAAACAGCTATGAC-3′)를 포함하고 있는 Cy5 Autocycle Sequencing Kit (Pharmacia, USA)를 이용하여 반응시킨 후, ALFexpress II DNA sequencer (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정을 위한 전기영동은 7 M urea를 포함하는 6%의 acrylamide gel 상에서 0.5 x TBE buffer를 이용하여 1500 V로 700분 동안 실시하였다.

4.6 SCAR primer 제작 및 마커 이용성 검정

클로닝과 염기서열 분석이 완료된 DNA들은 NCBI (National Center for Biotechnoloy Information)의 Gene search 및 Blast program과 Multiple alignments program인 Clustal W를 이용하여 유전자들의 특성과 분석된 염기서열들 간의 상동성을 비교하였으며, 이 결과를 바탕으로 19~22 base 길이의 SCAR primer를 제작하였다. 제작된 SCAR primer들은 kiwifruit의 육종시 마커로서의 가능성을 검토하기 위하여 PCR을 행하였으며 RAPD에서와 동일한 반응용액을 사용하였다. PCR 반응은 94℃ 5분 1 cycle로 DNA를 변성시킨 후 94℃ 1분, 48℃ 1분, 72℃ 1.5분으로 30cycle 동안 증폭한 다음 72℃에서 5분 동안 dimer를 형성하였다. 이들 PCR product는 4℃에서 안정화시킨 후 1.2% agarose gel 상에서 100 V로 40분 동안 전기영동을 실시하였다.

제주대학교 중앙도서관

3. 결과 및 고찰

4.1 RAPD분석 및 특이밴드 클로닝

Kiwifruit의 육종효율 향상을 위하여 계통 특이밴드를 선발한 후 표지마커 개발 가능성을 검토하였다. 본 실험결과 UBC 376 primer를 이용하여 PCR을 실시한 경우 약 600 bp 부위에서 *A. arguta* 계통 특이밴드와 약 400 bp 부위에서 다른 계통들에서는 보이지 않지만 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*에서 공통으로 갖고있는 밴드들이 확인되어 계통 표지마커 개발 가능성이 있음을 암시하여 주었다(Fig. 3-2).

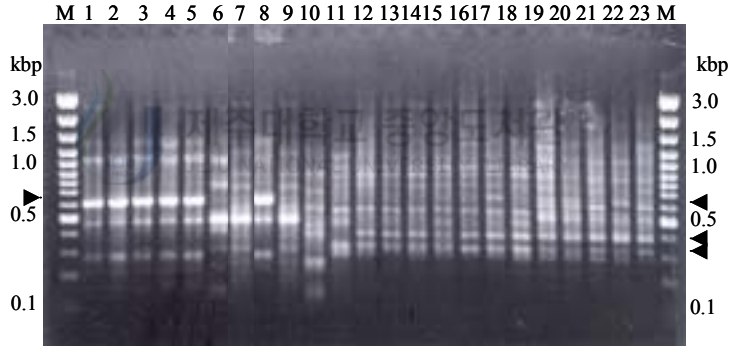


Fig. 3-2. Accession specific bands appeared by RAPD using UBC 376 primer in *Actinidia* spp. Numbers represent the same one assigned for 23 taxa in Table 1-1. Arrow heads indicate the positions of the specific bands for marker development. M : DNA size marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus)

4.2 계통 특이밴드의 염기서열분석

특이밴드를 분리한 후 클로닝하여 최종적으로 *A. arguta* V의 611 bp (N2-611), *A. chinensis* var. 'Okcheon'의 385 bp (S2-385), *A. chinensis* III의 387 bp (S3-387), *A. deliciosa* var. 'Gracie'의 345 bp (S7-345), *A. deliciosa*

```
  1 CAGGACATCGCCGTGAGAGGAATTGGCCGAGCCAAATGGAGGCGAAGAGGAAAGGAGGCT
 61 CATAAGAGGAAAGAGCCTGATACAAGGCGATCTGATTATAGGGGACGATGAACGGAGGAG
121 CAAGAAGTCTAATCGGGGACTCGAGGTGGAACAGTGACAGACGACCTCGTACTCCAACCT
181 CGTCGCACGGAGCTGGTGTTACCTCCGCTTAATGCTCCTATTGCCCAAGTCCTCACAGAA
241 ATCAAGCATGAAAAGTTCGTCAAGTGGCCCTCGAAAATCAAGACTGATCCCTGGAAGAGA
301 AATAAAAACAAATACTACGAGTTTCACCGAGACCATGGCCATAACACCGAAGACTGCTTT
361 CATCTAAAAGAGCAAATAGCCGACCTCATCAAAAGAGGTATCTGAGAAAGTACGTTGGAG
421 ATCGCCCTTCTCCCAATTCACCGGAAAGAAGATATGGCGACAATCGACCTACAGCTGGAG
481 ACATTCAGGTAATACACGGCGGGTTTGGATCCGGAGGGAGTTCGAATTCATCCAGAAAGA
541 GGCACGCTAGAAGTGCAGACAGGCTATCCGAAGAAGTTTACAATCTCTCCTCACCCATGT
601 CCGATGTCCTG
```

Fig. 3-3. Nucleotide sequence of *A. arguta* V specific band(N2-611) amplified with UBC 376 primer.

```
  1 CAGGACATCGCAGCCAATCCATGCCAAACCTTATCTATGTATCCAGACAGAAAAGCAAAA
 61 CATCCCCACATCATTTTAAGGCTGGTGCTCTCAATGCCCCTGGTAAGCAAATCTATCAAA
121 CGAATCCTACAAAAAAAAGGCTCATGTTTAGCTAATTATCACTTCATTAATTAAGTTAGGG
181 TAAATTATCACTGTAGCTCAGTGTTTAATACGAGGGAGCTTCTAAATGCAAGCCAGGTGG
241 GTCTCATCACACCCCAAAAAATGGGGAAAATATTACAGTTTTATCCTCGAGTAAAATTAC
301 CACAAAGGGCACAATAGCCACCATGGCCCACAAAGGTTCTTGCGTAGAGAGGGAGTGAGT
361 GGTCTGTTGCATTGGCGATGTCCTG
```

Fig. 3-4. Nucleotide sequence of *A. chinensis* var. 'Okcheon' specific DNA band(S2-385) amplified with UBC 376 primer.

```
  1 CAGGACATCGCAGGCCAATCCATGCCAAATCTTATCTATGTATCCAGACAGAAAAGCAAA
 61 ACATCCCCACATCATTTTAAGGCTGGGTGCTCTCAATGCCCTGGTAAGCAAATCTATCAA
121 ACGAATCCTACAAAAAAAAGGCTCATGTTTAGCTAATTATCACTTCATTAATTAAGTTAG
181 GGTACATTATCACTGTAGCTCAGTGTTTAATACGAGGGAGCTCCTAAATGCAAGCCAGAT
241 GGGTCTCATCACACCCCCAAAAAATGGCCCAAATATTACAGTTTTATCCTCGAGTAAAAT
301 TACCACAAAGGCACAATAGCCACCATGCCCCACAAAGGTTCTTGCGTAGAGGGGAAGTGA
361 GTGGTGTGTTGCATTGGCGATGTCCTG
```

Fig. 3-5. Nucleotide sequence s of *A. chinensis* III specific DNA band (S3-387) amplified with UBC 376 primer.

```
  1 CAGGACATCGCCGACGGGGTGCTGGAAGTGCTGCTGCCGGGCTATGAGCCGCAGGGGCTG
 61 GACATCCACGCGGTGGTGCAGACCCGCCGCAACCAGCCCGATAAGGTCAGGCTGATCGTG
121 GAACACCTGCGCAACTGGTTCAAGGACGCCGACTGGACGCGCTGAGCGCAGCCCGCCGGC
181 ATCGGTGGCGTCCTAGCGGAACACCACGGTCTTGTTGCGGTTGAGCAGGATGCGGTGCTC
241 GACGTGGCTGCGCACGGCGCGCGACAGCACCAGCGATTCGATATCGCTGCCGACCTGGGT
301 CAGGTCCTGCGCCGTCATGGTGTGGTCGACCCGCTCGATGTCCTG
```

Fig. 3-6. Nucleotide sequence of *A. deliciosa* var. 'Gracie' specific DNA band(S7-345) amplified with UBC 376 primer.

```
  1 CAGGACATCGCAGGCCAATCCATGCCAAACCTTATCTATGTATCCAGACAGGAAAACGCA
 61 AAACATTCCCACATCACTTTAAGGCCGGTGCTCTCAATGCCTTGGTAAGCAAATATATCA
121 AACGAACCCTACAAAAAAGGCTCATGTTTAGCTAATTATCACTTCATTAATTAAGTTGGA
181 GTAAATTATCACTGTAGCTCAGTGTTTAATACGAGGGAGATTCTAAATGCAAGCCAAATA
241 GGTCTCAGCACGCCCCAAAAAATGGGGGAAAATATTACAGTTTTAGCCTCGAGTAAAATT
301 ACCACAAAGGGCACAATAGCCACCATGGCCCACAAAGGTTCTTTCATAGAGAGGGACAGA
361 GTGGTCCGTTGCATTGGCGATGTCCTG
```

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3-7. Nucleotide sequence of *A. deliciosa* var. 'Hayward' specific DNA band(HY-387) amplified with UBC 376 primer.

```
  1 CAGGACATCGGGTACGTAAAGGGCGACCTGCACAGACGGACAAAAGTAAACGGCCGGGGC
 61 GAGGCCGCTCAAAACCCCTTCGGCGTGGAGATCAGGCCACGGTGGTGACAGCGGGTAAAA
121 TAGCCTTGAGGAGAATTATGGAGCGTGTTTTTCGTGTTTAAGCGTGTACCTTTGTTTAAT
181 GGGGGGAGCGGCCTTTTTATAGATGGAGTAATGGGCCGTGCCCATGGATCACGGCGAGAT
241 CCTCGGAAGGATAAGTATGGAATGATATCTCGGAGATATAGGAGACATAATTGGGAAGAT
301 TGCCATTTGGAGAGTATCCCCGTAATTGTCGGTGCCGTGGAGGAGAAAATCTCGCGATGG
361 CCGTATAAATGGGGATCTGGTGGAGATTGATCAGGCCAAGTATTCTACCTCGCCCAAGGG
421 CGAGGAGGAGAGAGTACTTTGGCTCTGGGCTAGCTCAGTGGAGATAGCTTGGCGAGGTTC
481 CGTCCTGAACGTCGGACTCGTTTTACCTCGATCAAGAGGGTTCGGAGATAACGTTTGGTA
541 TTGTAAATGTGGAGATGGGATTTCATGGGATTGATGTATGGCGATGTCCTG
```

Fig. 3-8. Nucleotide sequence of *A. deliciosa* var. 'Hayward' specific DNA band(HY-591) amplified with UBC 376 primer.

var. 'Hayward'의 387 bp (HY-387), 그리고 *A. deliciosa* var. 'Hayward'의 591 bp (Hy-591)의 염기서열을 결정하였다(Fig. 3-3~ 3-8). 각 염기서열의 G+C함량은 42.6%~67.0%였으며 S2-385가 가장 낮은 42.6%인 반면 S7-345는 67.0%로 가장 높은 함유율을 나타내었다(Table 3-1).

Table 3-1. Base construction of each specific sequences in *Actinidia* spp.

Specific band	Base construction				G+C content
	A	T	G	C	(%)
N2-611	195	114	158	144	49.4
S2-385	125	96	77	87	42.6
S3-387	96	125	92	74	42.9
S7-345	57	57	123	108	67.0
HY-387	130	92	77	88	42.6
HY-591	144	143	197	107	51.4

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4.3 SCAR primer 제작 및 마커 이용성 검정

특이밴드로부터 얻은 염기서열을 Multiple alignment program을 이용하여 비교한 결과, S2-385과 S3-387는 93%, 그리고 S2-385과 HY-387은 91%의 상동성이 있었으나 나머지 밴드들은 각각의 밴드간에 상동성이 거의 없는 것으로 나타났다. 한편 HY-387은 S3-387과 primer sequence가 일치하여 HY-387을 제외한 5개의 염기서열을 primer 제작에 이용하였다(Fig. 3-9).

계통 특이 SCAR 마커를 개발하기 위한 SCAR primer는 UBC 376 primer를 포함하여 19~22 base 길이로 각각의 forward와 reverse primer를 제작하였다(Table 3-2). 이들 SCAR primer를 이용하여 *A. arguta* 2 계통, *A. eriantha* 1 계통, *A. chinensis* 6 계통 및 *A. deliciosa* 5 계통을 대상으로

```
Page 1.1
                1          15 16          30 31          45 46          60 61          75 76          90
   1 S2-385 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- 0
   2 S3-387 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- 0
   3 HY-387 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- 0
   4 N2-611 CAGGACATCGCCGTG AGAGGAATTGGCCGA GCCAAATGGAGGCGA AGAGGAAAGGAGGCT CATAAGAGGAAAGAG CCTGATACAAGGCGA 90
   5 S7-345 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- 0
   6 HY-591 ---------------- ---------------- ---------------- ------CAGGACATCG GGTACGTAAAGGGCG ACCTGCACAGACGGA 40
Page 2.1
                91         105 106         120 121         135 136         150 151         165 166         180
   1 S2-385 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------CAG--GA CATCGCAG-CCAATC 19
   2 S3-387 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------CAG--GA CATCGCAGGCCAATC 20
   3 HY-387 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------CAG--GA CATCGCAGGCCAATC 20
   4 N2-611 TCTGATTATAGGGGA CGATGAACGGAGGAG CAAGAAGTCTAATCG GGGACTCGAGGTGGA ACAG-TGACAGACGA CCTCGTACTCCAACC 179
   5 S7-345 ---------------- ---------------- ---------------- ---------------- ---------CAG--GA CATCGCCGACGGGGT 20
   6 HY-591 CAAAAGTAAACGGCC GGGGCGAGGCCGCTC AAAACCCCTTCGGCG TGGAGATCAGGCCAC GGTGGTGACAGCGGG TAAAATAGCCTTGAG 130
Page 3.1
                181        195 196        210 211        225 226        240 241        255 256        270
   1 S2-385 -CATGCCAA--ACCT TATCT-ATGTATCCA GACAGAAA--A--GC AAAACATCCCCA-CA TCATTTT-AAGGCTG G--TGCTC-TCAA-T 95
   2 S3-387 -CATGCCAA--ATCT TATCT-ATGTATCCA GACAGAAA--A--GC AAAACATCCCCA-CA TCATTTT-AAGGCTG GG-TGCTC-TCAA-T 97
   3 HY-387 -CATGCCAA--ACCT TATCT-ATGTATCCA GACAGGAA--AACGC AAAACATTCCCA-CA TCACTTT-AAGGCCG G--TGCTC-TCAA-T 98
   4 N2-611 TCGTCGCACGGAGCT GGTGTTACCTCCGCT TAATGCTCCTATTGC CCAAG-TCCTCA-CA GAAATC--AAGCATG AAAAGTTCGTCAAGT 265
   5 S7-345 GC-TGGAAG--TGCT GCTGC-CGGGCTATG AGCCGCAGG---GGC TGGACATCCACG-CG GTGGTG--CAGACCC G---CCGCAACCA-- 95
   6 HY-591 GAGAATTATGGAGCG TGTTTTTCGTGTTTA AGCGTGTACCTTTGT TTAATGGGGGGAGCG GCCTTTTTATAGATG GAGTAATGGGCCG-T 219
Page 4.1
                271        285 286        300 301        315 316        330 331        345 346        360
   1 S2-385 GCCCCTGG-TAAG-C AAATCT-ATCA-AAC GAATCCTACAAAAAA A---GGCT-CATGTT -T------AGCTAAT- --------TATCAC-- 161
   2 S3-387 GCCC-TGG-TAAG-C AAATCT-ATCA-AAC GAATCCTACAAAAAA AA--GGCT-CATGTT -T------AGCTAAT- --------TATCAC-- 163
   3 HY-387 GCCT-TGG-TAAG-C AAATAT-ATCA-AAC GAACCCTACAAAAAA ----GGCT-CATGTT -T------AGCTAAT- --------TATCAC-- 162
   4 N2-611 GGCCCTCG-AAAATC AAGACTGATCC-CTG GAAGAGAAATAAAAA CAAATACTACGAGTT -TCACCGAGACCATG GCCA---TAACACCG 349
   5 S7-345 GCCC--GA-TAAGGT CAGGCTGATCG-TGG AACACCTGCGCAACT ---------------- ---------------- ---------------- 136
   6 HY-591 GCCCATGGATCACGG CGAGATCCTCGGAAG GATAAGTATGGAATG ATA--TCTCGGAGAT ATAGGAGACATAATT GGGAAGATTGCCATT 307
Page 5.1
                361        375 376        390 391        405 406        420 421        435 436        450
   1 S2-385 ---------TTCAT- TAATTAA--GT---- TAGGGTAAATTATCA CTGTAGCTCAGTGTT TAA------TACGAGG GAG-------C------ 219
   2 S3-387 ---------TTCAT- TAATTAA--GT---- TAGGGTACATTATCA CTGTAGCTCAGTGTT TAA------TACGAGG GAG-------C------ 221
   3 HY-387 ---------TTCAT- TAATTAA--GT---- TGGAGTAAATTATCA CTGTAGCTCAGTGTT TAA------TACGAGG GAG-------A------ 220
   4 N2-611 AAGACTGCTTTCATC TAAAAGA--GCAAA- TAGCCGACCTCATCA AAAGAGGTATCTGAG AAAG-----TACGTTG GAGATCGCCC------ 427
   5 S7-345 --GG-----TTCA-- --AGGAC--GC--C- GACTGGACGCGCTGA GCGCAGCCCGCCG-G CAT--------CGGTG GCG------------- 190
   6 HY-591 TGGAGAGTATCCCCG TAATTGTCGGTGCCG TGGAGGAGAAAATCT CGCGATGGCCGTATA AATGGGGATCTGGTG GAGATTGATCAGGCC 397
Page 6.1
                451        465 466        480 481        495 496        510 511        525 526        540
   1 S2-385 -----TTCTA---AA TGCAA--GCCAGGTG G-----GTCT--CAT CACACCCC-AAAA-A ATGGGGAAA--AT-- ---ATTACA------G 278
   2 S3-387 -----TCCTA---AA TGCAA--GCCAGATG G-----GTCT--CAT CACACCCCCAAAA-A ATGGCCCAA--AT-- ---ATTACA------G 281
   3 HY-387 -----TTCTA---AA TGCAA--GCCAAATA G-----GTCT--CAG CACGCCCCAAAAA-A TGGGGGAAA--AT-- ---ATTACA------G 280
   4 N2-611 -----TTCTCCC-AA TTCACC-GGAAAGAA G-----ATATGGCGA CAATCGACCTACA-G CTGGAGACA--TTCA GGTAATACACGGCGG 502
   5 S7-345 -----TCCTA----G CGGAA----CACCAC G-----GTCTTGTTG CGGTTGAGCAGGA-T GCGGTGC-----TC-- ------GACGT-----G 246
   6 HY-591 AAGTATTCTACCTCG CCCAAGGGCGAGGAG GAGAGAGTACTTTGG CTCTGGGCTAGCTCA GTGGAGATAGCTTGG CGAGGTTCC------G 482
Page 7.1
                541        555 556        570 571        585 586        600 601        615 616        630
   1 S2-385 TTTT--ATCCTC--- GAGTAA-AATTA--C CACAAAG-GGCACAA TAGCCACCATGGCCC ACAAAGGTTCTTGCG TAGAGAGGGAGTGAG 359
   2 S3-387 TTTT--ATCCTC--- GAGTAA-AATTA--C CACAAAG-G-CACAA TAGCCACCATGCCCC ACAAAGGTTCTTGCG TAGAGGGGAAGTGAG 361
   3 HY-387 TTTT--AGCCTC--- GAGTAA-AATTA--C CACAAAG-GGCACAA TAGCCACCATGGCCC ACAAAGGTTCTTTCA TAGAGAGGGACAGAG 361
   4 N2-611 GTTTGGATCCGGAGG GAGTTCGAATTCATC CAGAAAGAGGCACGC TAG------AAGTGC- AGACAGGCTATC-CG AAGAAGTTTACAATC 585
   5 S7-345 GCTGCGCACGGC--- GCGCGA-CAGCA--C CAGCGAT--TCGATA TCGC------TG-CCG ACCTGGGTCAGGTCC TGCGCCGTCATGGTG 322
   6 HY-591 TCCT-GAACGTC--G GACTCGTTTTACCTC GATCAAGAGGGTTCG GAGATA--ACGTTT- GGTATTGTAAATGTG GAGATGGGATTTCAT 566
Page 8.1
                631        645 646        660 661        675 676        690 691        705 706        720
   1 S2-385 TGGTCTGTTGCATTG GCGATGTCCTG    385
   2 S3-387 TGGTGTGTTGCATTG GCGATGTCCTG    387
   3 HY-387 TGGTCCGTTGCATTG GCGATGTCCTG    387
   4 N2-611 TCTCCTCACCCATGT CCGATGTCCTG    611
   5 S7-345 TGGTC-GACCCGCT- -CGATGTCCTG    345
   6 HY-591 GGGATTGATGTATGG -CGATGTCCTG    591
```

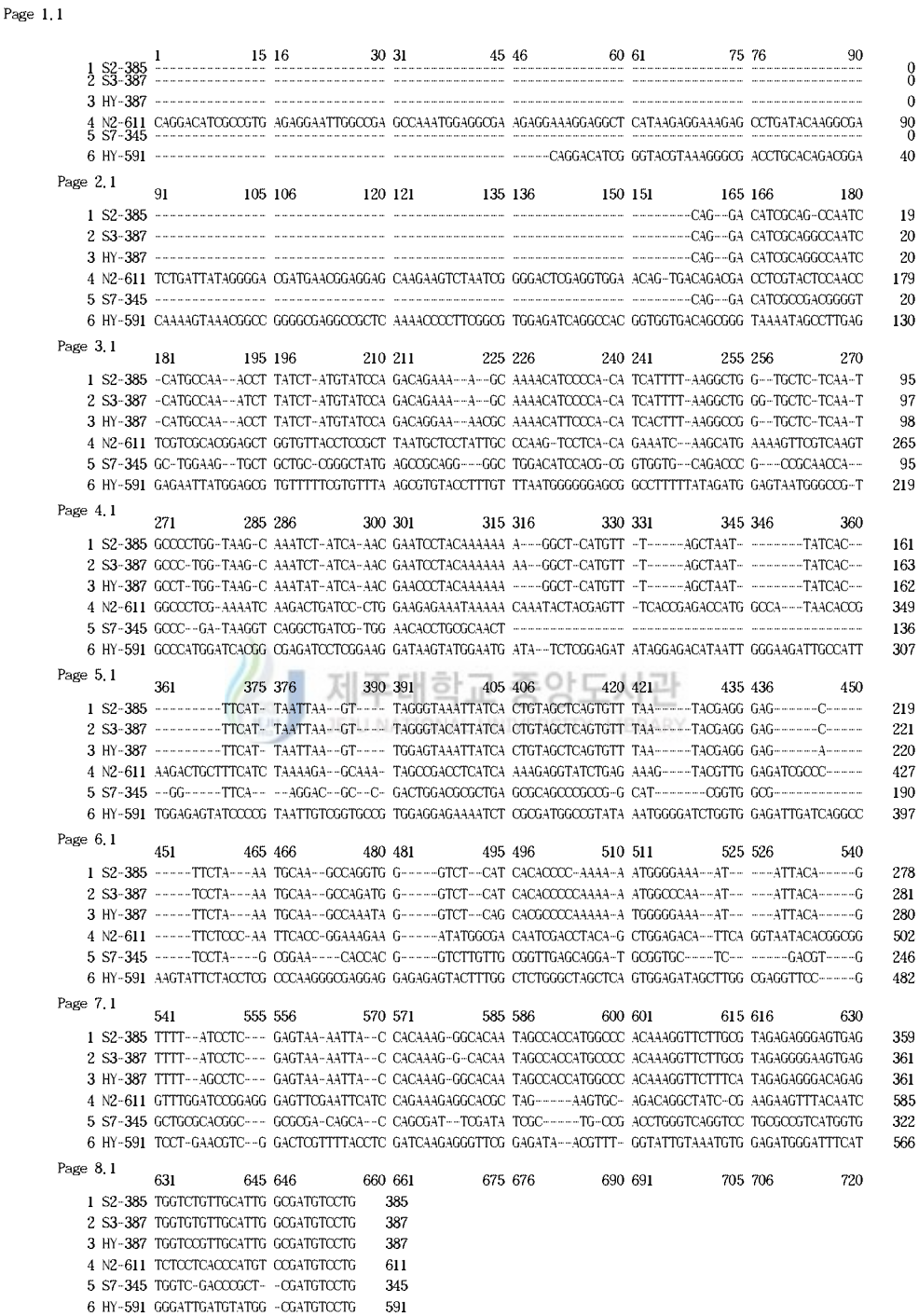


Fig. 3-9. Multiple alignment of the specific band sequences by UBC 376 primer in *Actinidia* spp.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 3-2. Primers based on the sequences of PCR-RAPD specific bands by UBC 376 primer in *Actinidia* spp.

Primer name	Sequences	GC contents (%)	Expected band site(bp)
N2-611	F: 5′-CAG-GAC-ATC-GCC-GTG-AGA-G-3′	63.2	611
	R: 5′-CAG-GAC-ATC-GGA-CAT-GGG-T-3′	57.9	
S2-385	F: 5′-CAG-GAC-ATC-GCA-GCC-AAT-C-3′	57.9	385
	R: 5′-CAG-GAC-ATC-GCC-AAT-GCA-ACA-G-3′	54.6	
S3-387	F: 5′-CAG-GAC-ATC-GCA-GGC-CAA-TC-3′	60.0	387
	R: 5′-CAG-GAC-ATC-GCC-AAT-GCA-AC-3′	55.0	
S7-345	F: 5′-CAG-GAC-ATC-GCC-GAC-GGG-GT-3′	70.0	345
	R: 5′-CAG-GAC-ATC-GAG-CGG-GTC-GA-3′	65.0	
HY-591	F: 5′-CAG-GAC-ATC-GGG-TAC-GTA-AAG-3′	52.4	591
	R: 5′-CAG-GAC-ATC-GCC-ATA-CAT-CA-3′	50.0	

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

PCR을 실시한 결과 두 개의 primer가 표지마커로서의 가능성을 보여주었다 (Fig. 3-10, 3-11). S2-385 primer는 *A. eriantha*, *A. chinensis*, 그리고 *A. deliciosa* 모두에서 385 bp 부위에 특이한 단일밴드가 나타났으나 *A. arguta*에서는 수그루의 경우 550 bp와 720 bp 부위에서 두 개의 밴드가 형성되었으며, 암그루는 550 bp 부위에서만 단일밴드가 희미하게 나타났다(Fig. 3-10). HY-591 primer는 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*에서는 600 bp 부위에 특이한 밴드가 나타났으나 *A. arguta*와 *A. eriantha*에서는 밴드가 나타나지 않았으며, *A. chinensis*와 *A. deliciosa* 계통들 가운데에서도 단일밴드 또는 2 개의 밴드들이 나타났다(Fig. 3-11).

S2-385의 염기서열에 대해 open reading frame(ORF) searching program을 이용하여 단백질 발현 가능성을 검색한 결과(Fig. 3-12), 37~150 bp 등 5개의

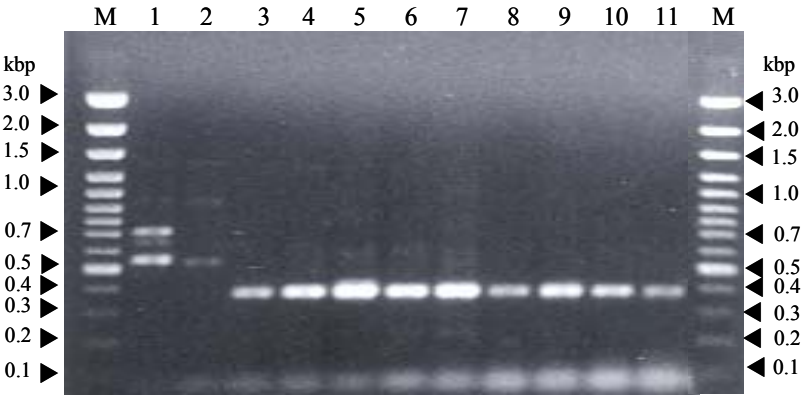


Fig. 3-10. Polymerase chain reaction of *Actinidia* spp. using S2-385 primer. Lane 1:*A. arguta* (♂); lane 2: *A. arguta* (♀); lane 3: *A. eriantha* (♂); lane 4 ~ lane 5: *A. chinensis* (♀); lane 6 : *A. chinensis* (♂); lane 7~lane 9: *A. deliciosa* (♀); lane 10~lane 11: *A. deliciosa* (♂).
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

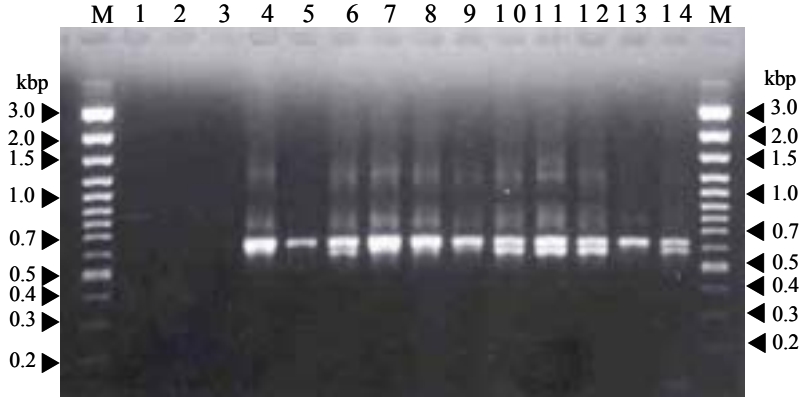
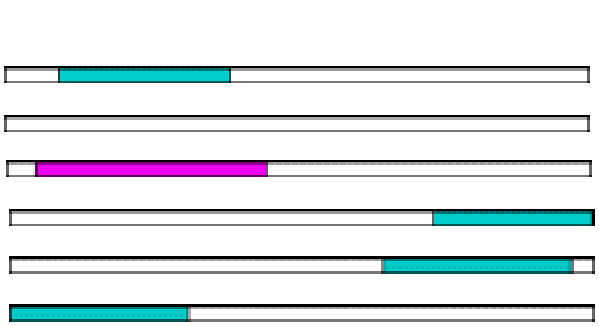


Fig. 3-11. Polymerase chain reaction of *Actinidia* spp. using HY-591 primer. Lane 1, *A. arguta* (♂); lane 2: *A. arguta* (♀); lane 3: *A. eriantha* (♂); lane 4 ~7: *A. chinensis* (♀); lane 8~lane 9: *A. chinensis* (♂); lane 10~ lane 12: *A. deliciosa* (♀); lane 13~lane 14: *A. deliciosa* (♂).
M : DNA size marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus)



Frame	from	to	Length
+1	37	150	114
+3	21	173	153
-1	281	384	105
-2	247	372	126
-3	1	119	119

Length: 50 aa

```
21 atgccaaaccttatctatgtatccagacagaaaagcaaaacatcc
    M  P  N  L  I  Y  V  S  R  Q  K  S  K  T  S
66 ccacatcattttaaggctggtgctctcaatgcccctggtaagcaa
    P  H  H  F  K  A  G  A  L  N  A  P  G  K  Q
111 atctatcaaacgaatcctacaaaaaaaggctcatgtttagctaat
    I  Y  Q  T  N  P  T  K  K  G  S  C  L  A  N
156 tatcacttcattaattaa 173
    Y  H  F  I  N  *
```

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3-12. Analysis of S2-385 sequence using ORF searching program.

ORF가 확인되었다. 각 염기쌍 해당되는 각각의 아미노산을 대입하고, 이들 아미노산 서열들에 대해 NCBI Blast program(Altschul *et al.*, 1997)을 이용하여 homology search를 실시하였다. 검색결과 153 개(21번-173번 염기)의 염기쌍을 50 개의 아미노산으로 전환하였을 경우 다양한 식물체에서 분리된 cellulose synthase와 높은 상동성(53~92%)을 보여주었으며(Table 3-3), S3-387과 HY-387 또한 cellulose 합성과 연관성이 있는 것으로 확인되었다.

GeneBank 검색 결과와 계통간의 PCR 산물의 전기영동 결과를 토대로 볼 때 S2-385 primer를 이용하여 PCR을 수행했을 때 나타나는 385 bp 위치의 밴드는 *Stellatae* 절의 *Perfectae* 아절에 속하는 계통에서만 나타난 것이었다(Fig. 3-10). 이는 털이 별 모양이면서 과실, 잎, 그리고 가지에 털이 많은 계통으로 알려지고 있으며, HY-591 primer를 이용한 PCR에서 단일 또는 2개의 밴드로 증폭이 일어난 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*계통들은 다래나무속에서 과실이 가장 큰 계통이다(Dunn, 1911; Liang, 1983; Shim *et al.*, 1998b). 따라서 이들 S2-385 primer와 HY-591 primer는 kiwifruit육종 시 SCAR 마커로서 이용 가치가 충분히 있을 것으로 판단되었다.

제주대학교 중앙도서관

Table 3-3. Comparison of Selected homologous sequences with query sequence of S2-385 ORF site by BLAST

Proteins (Enzymes)	Plant source	Identities	Positives	Homologous site	Genebank Accession No.
Cellulose synthase isolog	*Arabidopsis thaliana*	23[1]/25[2](92%[3])	24[1]/25[2](96%[3])	272～296	AC002343
Cellulose synthase isolog	*Arabidopsis thaliana*	23/25(92%)	24/25(96%)	260～284	AC002343
Cellulose synthase isolog	*Arabidopsis thaliana*	23/25(92%)	24/25(96%)	252～276	AY070072
Cellulose synthase catalytic subunit	*Gossypium hirsutum*	15/26(57%)	19/26(72%)	503～528	AF150630
Cellulose synthase catalytic subunit - like protein	*Arabidopsis thaliana*	15/26(57%)	19/26(72%)	453～478	NM_123770
Cellulose synthase catalytic subunit	*Nicotiana alata*	16/26(61%)	19/26(72%)	526～551	AF304374
CSLH1	*Oriza sativa*	17/25(68%)	20/25(80%)	246～270	AF435646
Putative cellulose synthase	*Oryza sativa*	15/26(57%)	19/26(72%)	430～455	AP003237
Cellulose synthase-like protein OsCslE1	*Oryza sativa*	14/26(53%)	20/26(76%)	261～286	AF432500
Cellulose synthase-4	*Zea mays*	15/26(57%)	19/26(72%)	517～542	AF200528
Cellulose synthase-3	*Zea mays*	15/26(57%)	19/26(72%)	260～285	AF200527
Cellulose synthase-9	*Zea mays*	15/26(57%)	19/26(72%)	519～544	AF200533

[1] Number of amino acids exactly matched in homologous sequences of S2-385 sequence and Genebank search products.

[2] Number of total amino acids in homologous sequences of S2-385 sequence and Genebank search products.

[3] Rate of homologous amino acids from total amino acids in S2-385 sequence and Genebank search products.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 종합고찰

Kiwifruit는 원산지가 중국이며 비타민 C와 무기성분이 많고 다른 과수에 비하여 영양적 가치가 높아 21 세기에 가장 인기를 얻을 과수로 인식되고 있다 (Huang *et al.*, 1983). 그러나 전세계적으로 재배되고 있는 것은 *A. deliciosa* var. 'Hayward' 단일 품종으로 털이 많고 아린 맛 때문에 다른 과실에 비하여 소비가 아주 낮다. 따라서 1990년대 이후 털이 없고, 과실이 크며(> 100 g), 고당도(> 14%), 고비타민 C(> 120 mg / 100 g) 품종육성을 위한 유전자원의 분류 및 특성 평가와 함께 교배육종이 활발히 진행되고 있다. 우리나라에서는 1970년대 중반 뉴질랜드에서 'Hayward' 품종이 도입되어 재배되어 왔으나 소비자의 기호와 재배여건에 맞지 않아 새로운 품종육성 요구가 계속되어 왔다. 본 연구는 우리나라의 여건에 맞는 새로운 품종육성을 위하여 1994년부터 1998년까지 중국 廣東, 江西 및 湖北 지방과 국내에서 수집한 다래나무속 식물을 대상으로 계통특성 및 계통간 유연관계를 구명하고, 계통 표지마커 개발과 함께 엽록체, 미토콘드리아 및 핵유전자의 유전양상을 밝힘으로써 다래나무속 식물의 효율적인 육종을 위한 기초자료로 이용하고자 실시하였다.

제주대학교 중앙도서관

본 연구에서 조사된 7 종 23 계통은 그림 1-10에서 보는 바와 같이 2 개의 군으로 크게 나뉘어 졌으며, 제 1 군은 *A. arguta*, *A. melanandra*, *A. kolomikta*, *A. polygama*와 *A. marcrosperma* 등과 같이 주로 과실에 전혀 털이 없으며 라멜라층이 발달하며, 잎에는 털이 전혀 없거나 어렸을 때 극소량의 연모가 있다가 없어지는 계통으로서 *Leiocarpae*(Dunn) Li 절에 포함되었다. 제 2 군은 *A. chinensis*, *A. deliciosa* 및 *A. eriantha* 등과 같이 어린 과실에 털이 많고 성숙하면서 털이 없어지는 계통 및 잎과 줄기에 털이 아주 많거나 조밀한 솜털이 있는 계통으로서 *Stellatae* Li 절에 속하는 것으로 나

타났다(Liang, 1984). 이는 Li(1952)와 Liang 등(1983)이 다래나무속의 식물 분류에서 털의 유무 및 형태와 양이 중요한 분류 기준이 될 수 있다는 보고와 같이 큰 분류군을 나누는 기준이 되었다. 제 1 군은 유사도 80% 수준에서 *A. arguta, A. melanandra* 및 *A. kolomikta*를 포함하는 제 1 아군과 *A. polygama*와 *A. marcrosperma*를 포함하는 제 2 아군으로 나뉘어졌다. 제 1 아군은 Liang(1984)의 분류체계에 따르면 *Lamellatae* C. F. Liang 아절에 속하였으며 종간 비교에서는 *A. arguta*와 *A. melanandra*가 가장 가깝게 나타났는데, 이들은 과실크기가 5 g 내외로 비슷하고, 과육색이 녹색인 점 등 여러 부분이 유사한 계통이다. *A. kolomikta*는 과육색이 녹황색 계통으로서 저온에 강하고 비타민 C 함량이 높은 것으로 알려져 있는데, *A. arguta* 및 *A. melanandra* 그룹과는 차이가 크게 나타나 이 아절에 대한 보다 정밀한 검토가 필요하다고 사료되었다(Bibikaw *et al*, 1969; Cipriani *et al.*, 1998). 제 2 아군은 *Solidae* C.F. Liang 아절에 속하며 과실 및 잎에 라멜라층이 발달하지 않으면서 과육색이 황색 또는 홍색에 가깝고, 당도가 높은 계통이다(Vitkovskii *et al.*, 1972; 김 등, 미발표). 이들의 특성을 토대로 할 때 kiwifruit육종에서 털이 없는 과실을 목표로 할 경우는 이 절에 속한 모든 종이 이용이 가능하고, 비타민 C 함량이 많은 계통과 추운 지방에서의 재배를 목적으로 할 때는 *A. kolomikta,* 과육색의 변화를 필요로 할 경우는 *A. polygama*와 *A. marcrosperma*가 육종소재로서 이용이 가능할 것으로 사료된다.

제 2 군은 *A. chinensis, A. deliciosa* 및 *A. eriantha*가 포함되었으며, *Stellatae* 절에서도 *Perfectae* 아절에 속하는 것으로 *A. chinensis*는 부드러운 털이 많이 있다가 점차 없어지거나 일부에서만 나타나는 종이고, *A. deliciosa*는 거칠고 성긴 털이 성숙시까지도 밀생하는 특징을 보이며, *A. eriantha*는 하얗고 부드러운 털이 밀생하는 특성을 갖고 있었다(Liang, 1983, 1984; Ferguson and Bollard, 1990). 제 2 군은 다시 유사도 60% 수준

제주대학교 중앙도서관

에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*를 포함하는 아군과 *A. eriantha* 등 2 개의 아군으로 나뉘어졌으며, *A. chinensis*와 *A. deliciosa*를 포함하는 아군은 다시 약 80% 수준에서 별도의 그룹으로 나뉘어졌다. *A. chinensis*와 *A. deliciosa*는 같은 부모에서 유래된 것으로 알려지고 있는데(Cipriani *et al.*, 1998) 본 연구에서도 유사한 결과를 보여주었다. 또한 본 연구에 이용된 *A. chinensis* 계통들은 털이 적고 대부분 10월 초~중순이 수확기이며, 과실의 크기가 60 g 이상이고 당도가 높아 조숙, 대과계통의 육종시 자원으로서의 이용가치가 클 것으로 판단되었다(김 등, 2002; 농림부, 1997).

한편, 유전자원의 특성에 대한 정밀한 평가가 이루어지더라도 이들 주요 형질의 유전양식에 대한 사전지식이 없을 경우 교배육종 시 수많은 노력과 포장 및 비용이 소요될 것이다. 따라서 올바른 양친선정을 위하여 목표형질의 유전양상에 대한 기초연구가 반드시 필요하다. 엽록체와 미토콘드리아는 화색, 과육색, 당도 및 비타민 합성 등 식물체에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Tilney-Bassett, 1994; Wheeler *et al.*, 1998). 최근 당합성과 관련하여 다래나무에서 sucrose phosphate synthase와 xyloglucan endotrans- glycosylase 유전자 연구가 이루어진 바 있으며(Atkinson and Gardner, 1993; Schröder *et al.*, 1998; Langenkamper *et al.*, 2002), Wheeler 등(1998)이 애기장대를 이용한 연구를 통하여 비타민 C의 합성에 대한 D-Glucose-6-P → GDP-D-mannose →GDP-L-galactose → L-Galactose → L-Galactono-1,4- lactone → Ascorbic acid의 합성경로가 일반적으로 받아들여지면서 이에 대한 연구가 활발히 시도되고 있다. 따라서 이들 형질의 유전양상은 계통들의 기원 추정과 함께 식물육종에 필수적인 조건이 될 수밖에 없다. 본 연구결과 엽록체 유전자인 *psb*A와 *rbc*L은 *A. melanandra* (♀) x *A. chinensis* (♂) 및 *A. chinensis* (♀) x *A. arguta* (♂) 모두에서 모계유전 양상을 나타냈으며(Fig. 3-2~3-7), 미토콘드리아 유전자인 *nad*1과 *nad*4 또한 모계유전 양상을 나타냈다(Fig. 3-8~3-11). Testolin과

Cipriani(1997)는 *A. chinensis* x *A. eriantha* 등 여섯 종의 교배조합에서 엽록체가 부계유전하는 것으로 보고하였으며, Chat 등(1999)은 *A. deliciosa*는 종내에서 대부분이 부계유전을 하지만 극히 일부에서 모계유전을 확인하였다. 그러나 본 연구에서는 엽록체 유전자가 모계유전하는 것으로 나타나 종 또는 계통에 따라 유전양상이 달라지는 것으로 보이며 앞으로 더 많은 종들에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 핵 DNA인 ITS region은 주로 모계유전을 하지만 일부 염기가 부계로 치환 또는 새로운 염기로 대치되는 것으로 사료되었다(Fig. 3-12~ 3-14).

Kiwifruit의 육종에서 목표형질을 갖는 개체의 조기선발은 육종기간의 단축과 함께 경비절감에 필수적이다. 이에 대한 연구로서 많은 식물에서 SCAR 마커개발이 시도되고 있으며 본 연구에서도 털이 많은 계통과 과실의 크기가 가장 큰 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*의 계통특이 SCAR 마커를 개발하고자 하였다. 10 base 크기의 UBC primer 140 개 가운데 계통 특이밴드를 나타내는 UBC 376 primer를 이용하여 N2-611 등 6 개의 계통 특이밴드를 얻었으며(그림 2-1, 2-5~2-10), 이 중 S2-385, S3-387와 HY-387 서열은 cellulose 합성과 관련이 있는 유전자일 것으로 판단되었고, N2-611과 HY-591은 지금까지 알려지지 않은 새로운 유전자일 것으로 사료되었다. UBC 376 primer를 포함하는 각각의 SCAR primer를 19~22 base 길이로 제작한 후 계통별로 PCR을 실시한 결과 S2-385 primer과 HY-591 primer에 의해 특이적으로 증폭되는 계통들이 확인되었다. S2-385 primer는 *Stellatae* Li 절의 *Perfectae* C.F. Liang 아절에 속하는 계통에서만 특이밴드를 증폭시켰는데, 잎과 가지에 털이 많은 이들 계통에서 털 생성과 관련이 있는 유전자일 것으로 여겨졌다. HY-591 primer는 *A. chinensis*와 *A. deliciosa* 등 다래나무속 가운데 과실이 가장 큰 계통에서만 특이밴드를 증폭시켰다(Dunn, 1911; Liang, 1983; Shim *et al.*, 1998b). 따라서 이들 S2-385 primer와 HY-591 primer는 향후 신품종 개발을 위한 kiwifruit의 육종 시 SCAR 마커로서 이용가능성이 클 것으로

제주대학교 중앙도서관

사료된다.

이상에서 본 바와 같이 kiwifruit의 육종은 우수한 유전자원의 수집과 함께 철저한 육종전략을 바탕으로 진행되어야 짧은 기간에 저렴한 비용으로 올바른 목표에 도달할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구를 통해 다래나무속 식물들에 대한 계통특성과 유연관계 분석, 주요 형질의 유전양상 분석이 이루어졌으며, 또한 목표 품종의 조기선발을 위한 SCAR 마커가 개발되었다. 이상의 연구결과들은 앞으로 새로운 다래 품종을 개발하기 위한 육종에서 육종효율을 향상시키는데 크게 기여할 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅵ. 참고문헌

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

André, E. 1898. *Actinidia Kolomikta*. *Revue Horticole* 70:36-37.

Atkinson, R.G. and R.C. Gardner. 1993. A polygalacturonase gene from Kiwifruit. *Plant Physiol.* 103(2):669-670.

Barzen, E., R. Stahl, E. Fuchs, D.C. Borchardt, and F. Salamini. 1997. Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet *Rr*1 allele conferring resistance to *rhizomania*. *Mol. Breed.* 3:231-238.

Bibikaw, Y.A., I.I. Chakalinskaya, and I.P. Dudzinskaya. 1969. The accumulation of ascorbic acid in fruit and leaves of some species of vines. *Vestsi Akademii Navuk Belaruskai SSR, Serya Biyalagichnykh Navuk*. 2:37-41.

Birky, C.W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 92:11331-11338.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Bloch, W. 1991. A biochemical perspectives of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30:2735-2747.

Boblenz, K., T. Nothnagel, M. Metzlaff. 1990. Paternal inheritance of Plasteds in the genus *Daucus*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 489-491.

Brahm, L., T. Röcher, and W. Friedt. 2000. PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. *Crop Sci.* 40:676-682.

Cao, W., G.R. Hughes, H. Ma, and Z. Dong. 2001. Identification of molecular markers for resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum Wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102:551-554.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Chang, Q.Q. 1982. The Actinidias in Fujian. *Wuyi Sci. Journal* 2: 25-35.

Chat, J., L. Chalak, and R.J. Petit. 1999. Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit. *Theor. Appl. Genet.* 99: 314-322.

Cipriani G. 1994. Uso di RFLPs di DNA nucleare e cloroplastico per studi filogenetici nel genere *Actinidia* (Nuclear and chloroplast DNA RFLPs as tools for phylogenetic studies in the genus *Actinidia*). Ph.D. thesis, University of Udine, Italy

Cipriani, G., R. Testolin, and M. Morgante. 1995. Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* Revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments. *Mol. Gen. Genet.* 247:693-697.

Cipriani, G., R. Testolin, and R. Gardner. 1998. Restriction-site variation of PCR-amplified chloroplast DNA regions and its implication for the evolution and taxonomy of *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 96:389-396.

Clegg, M.T. and G. Zurawski. 1992. Chloroplasts DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In: Molecular systematics of plants (Soltis, P.S., D.E. Soltis, and J.J. Doyle, eds.). Chapman and Hall, New York. pp 1-13.

Corriveau, J.L. and A.W. Coleman . 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and Results over 200 angiosperm species. *Am. J. Bot.* 75: 1443-1458.

Crawford, D.J. 1991. Plant molecular systemetics: Macromolecular approaches. John Wiley and Sons, New York.

Crowhurst, R.N., R. Lints, R.G. Atkinson and R.C. Gardner. 1990. Restriction fragment length polymorphism in the genus *Actinidia* (Actinidiaceae). *Plant Syst. Evol.* 172:193-203.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Cui Z.X. 1993. *Actinidia* in China. Shandong Scientific Press, Jinan, Shandong.

Darrow, G.M. 1975. Minor temperate fruits. In: Advances in Fruit breeding (Janick, J. and J.N. Moor, eds.). Purdue University Press, West Lafayette, Indiana. pp. 269-284.

Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hick. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Rep.* 1: 19-21.

del Rio, A.F. and J.B. Bamberg. 2000. RAPD markers efficiently distinguish heterogenous populations of wild potato(*Solanum*). *Gen. Res. Crop Evol.* 47: 115-121.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Derepas, A., and H. Dulieu. 1992. Inhertance of the capacity to transfer plastids by the pollen parent in *Petunia Hybrida*. *Hort. J. Hered.* 83:6-10.

Dunn, S.T. 1911. A revision of the genus *Actinidia*, Lindl. *J. Linn. Soc. Lond. Bot.* 38:350-373.

Echt, C.S., L.A. Erdahl, and T.J. McCoy. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 33:84-87.

Everett, T.H. 1981. The New York botanincal garden illustrated

encyclopedia of horticulture. Vol. 1. Garland Publishing, Inc., New York.

Evreinoff, V.A. 1949. Notes Sur les variétés d'*Actinidia*. *Revue Horticole* 121:155-158.

Ferguson, A.R. 1984. Kiwifruit: a botanical review. *Hort. Rev.* 6: 1-64.

Ferguson, A.R. and M.A. McNeilage. 1999. *Actinidia* Germplasm for Kiwifruit Breeding. *Acta Hort.* 498:37~42.

Ferguson, A.R., A.G. Seal and R.M. Davison. 1990. Cultivar improvement, genetics and breeding of kiwifruit. *Acta Hort.* 282:335-347.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ferguson, A.R. and E.G. Bollard. 1990. Domestication of the kiwifruit. In: Kiwifruit: science and management (Warrington, I.J. and G.C. Weston, eds.), Ray Richards Publisher in association with the New Zealand *Soc. Hort. Sci.*, Auckland. pp. 165~246.

Ferguson, A.R., A.G. Seal, M.A. McNeilage, L.G. Fraser, C.F. Harvey, and R.A. Beatson. 1996. Kiwifruit. In: Fruit breeding. Vol. 2. Vine and small fruit sp. (J. Janick and J.N. Moore, eds.). Wiley, New York. pp. 371~417.

Frédrique, O.S., J.M. Legave, M.F. Nicole, and A.M. Hirsch. 1994. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Scientia Hort.* 57: 303-313.

Gilg, E. and E. Werdermann. 1925. Actinidiacea. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien, nebst ihren Gattugen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen. Vol 21. 2nd rev. ed. (Engler,[H.G.]A. and K.[A.E.] Plantl, eds.). Leipzig, Verlag Wilhelm Engelmann. pp. 36-47.

Gill, G.P., C.F. Harvey, R.C. Gardner, and L.G. Fraser. 1998. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 439-445.

Goodell, E. 1982. Two promising fruit plants for northern landscapes. *Arnoldia*(Boston) 42:102-133.

Gui, Y.L., S.K. Mu, and T.Y. Xu. 1982. Studies on morphological differentiation of endosperm plantlets of Chinese gooseberry *in vitro*. *Acta Bota. Sinica* 24:216-221.

Hao, R. 1982. Gerplasm resources of wild fruits in the Chang Bai Shan mountain region. *Acta Hort. Sinica* 9:9-16.

Harris, S.A. and R. Ingram. 1991. Plastid DNA and biosythematics: the effect of inreaspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40: 393-412.

Harvey, C.F., G.P. Gill, L.G. Fraser, and M.A. McNeilage . 1997. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

ratio in diploid *A. chinensis*. *Sex plant Reprod.* 10:149-154.

Hirsch, A.M., D. Fortune, and P. Blanchet. 1990. Study of dioecism in Kiwifruit, *Actinidia deliciosa* Chevalier. *Acta Hortic.* 282:367-376.

Hirsch, A.M., R. Testolin, S. Brown, J. Chat, D. Fortune, J.M. Bureau and D.D. Nay. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia*(kiwifruit). *Plant cell Rep.* 20(6): 508-516.

Huang, H., J. Li, P. Lang, and S. Wang. 1999. Systemetic relationship in *Actinidia* as revealed by cluster analysis of digitized Morphological descriptors. *Acta Hort.* 498: 71～78

Huang, Z.F., M.Y. Liang, C.G. Huang, and R.G. Li. 1983. A preliminary study on the character and nutritive composition of *Actinidia* fruits. *Guihaia* 3:53-56.

Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis, M.A. *et al.*, eds). Academic Press, San Diego. pp. 3-12.

Janssen, B.J. and R.C. Gardner. 1993. The use of transient GUS expression to develop an Agrobacterium-mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 13:28-31.

Jung, Y.H. 2001. Molecular phylogeny of the genus Prunus in Korea and Japan inferred from nuclear ribosomal and chloroplant DNA sequence.

제주대학교 중앙도서관

Ph.D. thesis, Cheju National University, Korea

Kim, C.S., G.P. Lee, D.H. Han, K.H. Ryu, and C.H. Lee. 2000. SCARs markers derived from RAPD for cultivar identification on *Pyrus pyrifolia*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41(2):125-128.

Kim, Y.Y., J.O. Hyun, K.N. Hong, T.B. Choi, and K.S. Kim. 1995. Genetic variation of natural populations of *Pinus densiflora* in Korea based on RAPD marker analysis. *Kor. J. Breed.* 27:23-48.

Kirk, J.T.O. and R.A.E. Tilney-Bassett. 1978. The plasted: their chemistry, structure, growth and inheritance. 2nd ed. Elsevier/north-Holland Biomedical Press, Amsterdam

Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDremott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:901～ 904.

Langenkamper, G., R.W.M. Fung, R.D. Newcomb, R.G. Atkinson, R.C. Gardner, and E.A. MacRae. 2002. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *J. Mol. Evol.* 54 (3): 322-332.

Li, H.L. 1952. A. taxonomic review of the genus *Actinidia*. *J. Arnold Arbor.* 33:1-6.

Liang, C.F. 1982a. An addition to the infraspecific taxa of *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 20:101-104.

제주대학교 중앙도서관

Liang, C.F. 1982b. New taxa of the genus *Actinidia* Lindl. *Guhaia* 2:1-6.

Liang, C. F. 1983. ON the distribution of *Actinidias*. *Guihaia* 2: 1-6.

Liang, C.F. 1984. *Actinidia*. In: Flora reipublicae popularis sinicae. Vol. 49(2). (Feng, K.M., ed.). Beijing Science press, Beijing. pp. 196-268.

Lilly, J.W. and M.J. Havey. 2001. Sequence analysis og a chloroplast intergenic spacer for phylogenetic estimates in Allium section Cepa and PCR-based polymorphism detecting mixtures of male-fertile and male-sterile cytoplasmic onion. *Theor. Appl. Genet.* 102: 78-82.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Lin, J.J. and J. Kuo. 1995. AFLP. A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17:70-71.

Martin, G.B., J.K.G. Willians, and S.D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to the *Pseudomonas* resistance gene on tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88:2336-2340.

McNeilage, M.A. 1991. Sex expression in fruiting male vines of kiwifruit. *Sex Plant Reprod.* 4:274-278.

Messina, R., R. Testolin, and M. Morgante. 1991. Isozymes for cultivar

identification in kiwifruit. *Acta Hort.* 297:63-69.

Michelmore, R.W., I. Paran, R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistant genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genome regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88:9828-9832.

Mii, M., H. Ohashi. 1988. Plantlet regeneration from protoplasts of kiwifruit, *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Hortic.* 230:167-170.

Mu, X.J., D.R. Tsai, H.X. An, and W.L. Wang. 1992. Embryology and embryo rescue of interspecific hybrids in *Actinidia*. *Acta Hortic.* 297:93-97.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Nakamura, Y., H. Sawada, S. Kobayashi, I. Nakajima, and M. Yoshikawa. 1999. Expression of soybean β-1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants. *Plant Cell Rep.* 18:527-532.

Negi, M.S., M. Devic, M. Delseny, and M. Lakshmikumaran. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in Brassica juncea and conversion to SCAR marker for rapid selection. *Theor. Appl. Genet.* 101:146-152.

Nei, M. and A.L. Hughes. 1992. Balanced polymorphism and evolution by the birth and death process in the MHC loci. Proceedings of the

11th Histocopatibility workshop and conference. 2: 27-38.

Nei, M. and W.L. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 76: 5269-5273.

Oliveira, M.M. and M.S.S. Pais. 1991. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var *'deliciosa'* cv 'Hayward'(Kiwifruit). *Plant Cell Rep.* 9:643-646.

Okie, W.R. and J.H. Weinberger. 1996. Kiwifruit. In: Fruit breeding: vine and small fruit (Janick, J. and N. Moore, eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 371-417.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Palmer, J.D., R.K. Jansen, H.J. Michaels, M.W. Chase, and J.A. Manhart. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75:1180-1206.

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

P'ei, C. and Y.W. Law. 1948. Notes on *Actinidia* of Szechuan and Sikang. *Bot. Bul. Acad. Sin.* 2: 25-33

Powell, W., G.C. Machray, J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by

simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215-222.

Poyarkova, A.I. 1494(1974). Actinidiacea van Tiegh. In: Flora of the USSR. Jersalem, Israel Program for Scientific Translations (Shishkin, B. K., ed.). Malvales, Parietales, Myrtiflorae. Vol. XV. pp. 138-147.

Roy A., N. Frascaria, J. Mackay and J. Bousquet. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaneinsis*. *Theor. Appl. Genet.* 85:173~180.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Schmid, R. 1978. Reproductive anatomy of *Actinidia chinensis* (Actinidiaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik, *Pflanzengeographie* 100:149-195.

Schröder, R., R.G. Atkinson, G. Langenkämper, and R.J. Redgwell. 1998. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta* 204:242-251.

Shim, K.K., Y.M. Ha, D.H. Son, and K.H. Chung. 1998a. RAPD variation in *Actinidia chinensis* clones collected from mountainous regions of China. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(4):460-463.

Shim, K.K., Y.M. Ha, D.H. Son, and K.H. Chung. 1998b. Comparison of Morphological characteristics of leaf, stem, flower, and fruit between *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(5):537-541.

Sokal, R.R. and P.H.A. Sneath. 1973. Numerical Taxonomy (Freeman, W.H., ed.). San Francisco.

Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1997. Phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato: A comparison of topologegies based on 18S rDNA and rbcL sequences. *Amer. J. Bot.* 84:504-522.

Susan, W.E., G. Peter, and J.S. Robert. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.

Testolin, R., G. Cipriani, and G. Costa. 1997. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 94:897-903.

This, P., C. Cuisset, J.M. Boursiquot. 1997. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:492-501.

Tilney-Bassett, R.A.E. 1994. Nuclear controls of chloroplast inheritance in higher plants. *J. of Heredity* 85: 347-354.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Tragoonrung, S., V. Kanazin, P.M. Hayes, and T.K. Blake. 1992. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor. Appl. Genet.* 84:1002-1008.

Vidal, J.R., P. Delavault, M. Coarer, and A. Defontaine. 2000. Design of Grapevine(*Vitis vinifera L.*) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 101:1194-1201.

Vitkovskii, V.L., G.N. Berestova, N.M. Bocharnikova, N.L. Neronova, T.G. Belyaeva, G.K. Koval. 1972. The prospects of cultivating cranberries, cornelian cherries and other non-popular species. *Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike i Selektsii* 46:225-242.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Warrington, I.J. and G.C. Weston. 1990. Kiwifruit science and management. Ray Richards Publisher, Palmerston North. pp. 21-31

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

Wheeler, G.L., M.A. Jones, and N. Smirnoff. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393:365-368.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Ampification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and application (Innis, Gelfand, M.D., J. Sninsky, T. White, eds.). Academic Press, San

Francisco. pp. 315-322.

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

Xiao, X.G., L.S. Zang, S.H. Li, B. Wang, R. Testolin, and G. Cipriani. 1999. First step in the search for AFLP markers linked to sex in *Actinidia*. *Acta Hort.* 498:99-104.

Yamamoto, M., S. Kobayashi, Y. Nakamura, and Y. Yamada. 1993. Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by RFLP analysis of Mitochondrial and Cholroplast DNA. *Japan. J. Breed.* 43:355-365.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Yan G.J., A.R. Ferguson, M.A. McNeilage. 1994. Ploidy races in *Actinidia chinensis*. *Euphytica* 78 : 175-183.

Yin, W.F., X. Li, Z.Z., Li. 1981. Mihoutao. Beijing, Zhongguo Caizhen Jingji Chubanshe.

Yoo, K.O., W.T. Lee, N.S. Kim, J.H. Kim, and H.T. Lim. 1996. Comparative studies in the *Hanabusaya asiatica* and its allied groups based on RAPD analysis. *Kor. J. Soc. Hort. Sci.* 37:324-328.

Zhang, R.M. 1981. Selected varieties of kiwifruit. In: Mihoutaode Zaipei he Liyong(Qu, Z.Z., ed.). Beijing, Nongye Chubanshe. pp. 134-141.

崔政學. 1993. 中國徽候桃. 山東科學技述出版社, 濟南

김천환, 김성철, 문두영, 성기철, 이재욱, 권혁모, 문두길, 심경구. 2002. Kiwifruit 신품종 육성을 위한 국내외 주요 다래나무속 식물의 특성. 한국자원식물학회 ‘ 2002년도 춘계 학술발표대회’. 15(1): 36.

이창복. 1982. 대한식물도감. 향문사, 서울. pp 541-542.

농림부. 1997. 참다래 조생종 신품종 육성 기술 개발. 농림수산 특정연구사업 보고서.

渡辺慶一. 1992. キウイフルーツの 增殖並びに 開花・結實に 關する 生理生態學的 硏究. 博士學位論文. 日本大學. 日本

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

山根弘康. 1989. キウイフルーツ. In : "植物 遺傳資原 集成 (加賗勝久 編集). 講談社, 東京. pp. 1209～1213.

예병우. 1994. RAPD를 이용한 사과품종의분류와 품종판별 표지의 선발. 박사학위논문. 서울대학교. 한국

초 록

다래속 식물의 효율적인 육종을 위하여 1994년부터 1998년까지 중국의 廣東, 江西 및 湖北 지방에서 수집한 *A. chinensis* 등 16 계통과 국내에서 수집된 *A. arguta* 등 7 계통을 대상으로 PCR-RAPD를 이용하여 계통간 유연관계를 구명하고, 계통 표지마커를 개발하였으며, 엽록체, 미토콘드리아 및 핵 유전자의 유전양상을 분석하였다.

PCR-RAPD를 위하여 10 base pair의 random primer 17 개로부터 223 개의 밴드를 얻었으며, 23 계통에 대한 PCR-RAPD 결과 크게 2 개의 군으로 나뉘어졌다. 제 1 군(*A. arguta, A. melanandra, A. kolomikta, A. polygama*와 *A. marcrosperma*)은 주로 과실에 전혀 털이 없으며 잎에는 털이 전혀 없거나 어렸을 때 극소량의 연모가 있다가 없어지는 그룹으로서 *Leiocarpae* 절에 속하였다. 제 2 군(*A. chinensis, A. deliciosa* 및 *A. eriantha*)은 어린 과실에서는 털이 많았다가 성숙하면서 털이 없어지는 계통 및 잎과 줄기에 털이 아주 많거나 조밀한 솜털이 있는 그룹으로서 *Stellatae* 절에 속하였다. 제 2 군은 *Stellatae* 절에서도 *Perfectae* 아절에 속하는 것으로 *A. chinensis, A. deliciosa* 및 *A. eriantha*가 포함되었으며 다시 유사도 60% 수준에서 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*를 포함하는 그룹과 *A. eriantha* 등 2 개의 그룹으로 나뉘어졌다. 반면, 같은 부모에서 유래된 것으로 알려지고 있는 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*는 80% 수준에서 별도의 그룹으로 나뉘어졌다.

Kiwifruit의 육종시 부모 본 선발을 위한 자료로 이용하고자 모계인 *A. melanandra*와 부계인 *A. chinensis* 및 이들의 교배 실생묘, 그리고 모계인 *A. chinensis*와 부계인 *A. arguta* 및 이들의 교배 실생묘에 대하여 엽록체 DNA (*psb*A와 *rbc*L), 미토콘드리아 DNA(*nad*1와 *nad*4) 및 핵 DNA (ITS region)에 대한 PCR 증폭을 실시한 후 제한효소를 처리하여 RFLP 패턴을 비교하여

이들 유전자의 유전양상을 비교하였다. 엽록체 유전자인 *psb*A와 *rbc*L은 *A. melanandra*(♀) x *A. chinensis*(♂) 및 *A. chinensis*(♀) x *A. arguta*(♂) 모두에서 모계유전 양상을 나타냈으며, 미토콘드리아 유전자인 *nad*1과 *nad*4 또한 모계유전 양상을 나타냈다. 핵 DNA인 ITS region은 모계와 유사한 전기영동 패턴을 나타내었으나 일부 개체에서 모계 또는 부계와 다른 밴드가 나타나거나 부계와 같은 밴드가 나타나기도 하였다. ITS region의 유전양상을 염기서열 수준에서 검토하기 위하여 모계인 *A. chinensis*와 부계인 *A. arguta* 그리고 이들의 실생묘에 대한 ITS2의 염기서열을 분석한 결과 220 bp에서 222 bp로 확인되었으며, 주로 모계로부터 유전되지만 부계의 영향 및 자체 변이도 수반되고 있는 것으로 나타났다.

Kiwifruit의 육종 시 조기선발에 이용하기 위하여 10 base 크기의 UBC 376 primer를 이용하여 PCR-RAPD를 실시한 후 N2-611 등 6 개의 계통 특이밴드를 선발하여 Sequence Characterized Amplified Region(SCAR) 마커로서의 이용가능성을 탐색하였다. 이들 특이밴드로부터 얻은 염기서열을 multiple sequence alignment program을 이용하여 비교한 결과, S2-385와 Hy-387의 염기구성이 거의 일치하는 결과를 보여주었으며, 나머지 밴드들은 유연관계가 거의 없었다. SCAR 마커를 개발하기 위하여 UBC 376 primer를 포함하는 각각의 primer를 19~22 base 길이로 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 *A. arguta* 2 계통, *A. eriantha* 1 계통, *A. chinensis* 6 계통 및 *A. deliciosa* 5 계통을 대상으로 PCR을 실시한 결과, S2-385 primer는 *A. eriantha*, *A. chinensis*, 그리고 *A. deliciosa*에서 385 bp 크기의 특이밴드를 증폭시켰으며, HY-591 primer는 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*에서만 591 bp 크기의 특이밴드를 증폭시켰다. 따라서 이러한 결과는 향후 kiwifruit의 육종에 이들 마커가 유용하게 사용될 수 있음을 제시한다. S2-385의 염기서열에서 유래한 아미노산 서열에 대해 BLAST search program을 사용하여 GenBank database를 검색한 결과, 세포벽 구성 성분의 하나인 cellulose 합성에 관련된

제주대학교 중앙도서관

cellulose synthase와 높은 서열 상동성을 보여주었다. PCR시 나타난 385 bp 크기의 밴드는 *Stellatae* 절의 *Perfectae* 아절에 속하는 계통에서만 특이적으로 나타나는 것으로서 이는 잎과 가지에 털이 많은 이들 계통에서 털의 생성과 연관성을 갖는 유전자의 일부로 사료된다.

Key words: 다래나무속, PCR-RAPD, 유연관계, 유전양상, SCAR 마커, cpDNA(*psb*A, *rbc*L), mtDNA(*nad*1, *nad*4), nrDNA(ITS region),

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY