

석사학위 논문

RAPD를 이용한 감귤 및 근연속의 분류



제주대학교 대학원

농화학과

윤 수 현

2001년 12월

RAPD를 이용한 감귤 및 근연속의 분류

지도교수 : 류 기 중

윤 수 현

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2001년 12월



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

윤수현의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

위 위

위 원

제주대학교 대학원

2001년 12월

Classification of genus *Citrus* and its related
genera using RAPD

Su-Hyun Yun

(Supervised by Professor Key-Zung Riu)



A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

Department of Agricultural Chemistry
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2001. 12

목 차

<Summary>

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 식물 시료의 채취 및 보관	4
2. Total DNA 분리	4
3. RAPD 적정조건 조사	7
4. RAPD에 의한 품종분류 방법	7
III. 결과 및 고찰	10
1. Total DNA 분리 조건	10
2. RAPD 적정조건	11
3. RAPD에 의한 품종분류	11
4. 종합고찰	30
IV. 요약	33
VII. 참고문헌	35

Summary

This study was performed to optimize the polymerase chain reaction (PCR) conditions for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, through which phylogenic relationships among 72 varieties representing 35 *Citrus* species, 7 hybrids, and 7 related genera were investigated.

1. The optimal PCR conditions for RAPD were 10~40 ng of template DNA, 10~40 ng of primer, 50~150 uM of dNTP, and 1~2 units of Taq polymerase.

2. Of the 168 arbitrary primers tested, 8 showed DNA polymorphism. Forty one DNA bands amplified with these 8 primers were useful for the classification of citrus and its related species.

3. Based on the UPGMA cluster analysis using 41 RAPD bands, 72 varieties were divided into 11 groups, 4 from *Citrus* species and 7 from related genera. Group I; Satsuma mandarin, Orange, Tangerin, Grapdfruit, and most of their hybrids: Group II; Swingle citrumelo, Kao phuang, and Yuma ponderosa: Group III; Melanesian papeda and Mauritius papeda: Group IV; Lemon, Persian lime, and macrophylla: Groups V-XI; *Fortunella*, *Atalantia*, *Severinia disticha*, Australian round lime, *Murraya*, *Poncirus* and Gillet's cherry orange, respectively.

4. Although RAPD analysis was useful for the classification of *Citrus* species and its related genera, some varieties within the species, including satsuma mandarin, orange, and lemon, could not be distinguished through this method.

I. 서론

柑橘類는 운향과(*Rutaceae*), 감귤아과(*Aurantinoideae*), 감귤군(*Aurantinae*)에 속하는 식물 군으로서 현재 재배하고 있는 감귤들은 분류상柑橘屬(*Citrus* L.), 金柑屬(*Fortunella* Swingle), 탕자屬(*Poncirus* RAF.)의 3속이다. 감귤의 원산지는 아시아 대륙의 동남부와 그 주변부로 추정되고 있으며 약 2,000만년~3,000만년 전에 지구상에 최초의 감귤이 생성되었다고 추정되고 있다.

제주도의 감귤재배는 서기 476년, 百濟 文周王 2년에 감귤을 貢物 獻上 했다는 高麗史誌의 기록으로 보아 이보다 훨씬 이전인 것으로 생각된다. 이 당시의 栽培品種은 거의가 濟州 在來種(中國原産으로 사료됨)으로 22개품종이 재배되었으나 생식용으로는 맛이 없고 품질이 떨어져 차차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 瓶橘, 唐柚子, 柚子, 青橘, 洞庭橘, 陳橘 등 몇 가지 在來種만이 제주에 찾아볼 수가 있다. 제주도에서 감귤의 상업적인 재배가 시작된 것은 1910년대 이후이며 진정한 의미의 감귤산업으로 자리잡은 것은 1960년대 후반 일본으로부터 대량의 묘목이 도입되면서부터 이다. 그러나 이때 도입된 묘목중 상당수가 품종이 부정확하고 불량묘목도 많이 포함되어 문제가 되었다.

현재 제주도에 재배 또는 보존되고 있는 감귤류는 온주밀감이 97%(농림부, 1997)를 차지하고 있으며 tangor, 金柑, orange, 그리고 상업적인 재배는 거의 이루어지지 않으나 유전 자원으로서 중요성을 갖고있는 재래귤 등이 있다.

최근 들어서 감귤 유전 자원의 수집이 더욱 활발히 이루어지고 있으며, 현재 제주도에 다수의 芽條變異 品種들을 포함하여 250여종이 수집, 보존되고 있다. 이들 유전자원을 효과적으로 이용하기 위해서는 상호 유연 관계 등을 정확하게 파악할 필요가 있으나 아직 분류체계가 확립되어 있지 않다.

감귤의 분류법은 학자에 따라 차이가 있어 감귤속의 種 수도 3~162종으로

다양하며 대부분의 種 또는 品種들의 분류와 명명도 다배성 등의 요인에 의해 논란이 많다. 전통적인 분류법으로 田中(1977)와 Swingle(1946)의 분류가 가장 광범위하게 이용되고 있으며 각각 162개와 16개의 種(Species)으로 분류하였다.

최근 감귤 분류를 위하여 잎, 과실, 꽃 등의 형태적 형질과 양적 형질을 수치화한 다변량 해석(김, 1988)과 동위효소 분석(문, 1986)등이 이용되고 있으며, 1990년대 부터는 DNA 표식인자를 이용하는 방법 등이 활발하게 연구되고 있다. 특히 식물 분류에 DNA를 이용하면 전통 분류법에서 분류 기준으로 이용하는 식물의 형태적 특징과 생리적 특성등에 대한 환경요인의 영향을 제거할 수 있다는 장점이 있다. DNA를 식물 분류에 이용하는 방법으로는 PCR(Polymerase Chain Reaction)기법을 이용하는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)와 DNA 염기서열의 특정부위를 인지하는 제한효소 처리에 의한 DNA 다형성을 이용하는 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR기법과 RFLP를 혼용한 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)등이 있다. 이중 RFLP와 AFLP는 DNA단편을 많이 얻을 수 있어 Sensitive 하고 강력한 기법이지만 시간과 노력, 비용이 많이 필요하며 시험기법도 비교적 복잡하다는 단점이 있다. 한편 RAPD는 마커자체의 특징이 정확하지 않다든지, 재현성이 떨어지는 등 일부 약점을 갖고 있지만 실험이 간편하고 신속히 이루어진다는 장점 때문에 독자적 또는 RFLP나 AFLP 등과 상호 보완적으로 많이 이용되고 있다.

감귤(Omura 등, 1992; 박 등, 1993; 오, 1996; 한, 1996; Nicolosi 등, 2000)에서도 DNA를 이용한 분류법이 많이 시도되었는데, 초기에는 種(Species)간 분류가 주종을 이루었으나 최근에는 Ponkan(*C. reticulata*)(Filho등, 1998, 2000), Mandarin(Paulo등, 1999)의 분류 등 品種간 분류 연구가 많이 이루어지고 있다. 몇몇 lemon을 대상으로 Genetic origin을 밝히고자 하는 연구도 이루어지고 있다(Pusso, 1998).

감귤류는 다른 대부분의 과수류와 마찬가지로 영년생 작물로서 교배 육종 시 첫 결실에 8-10년이 걸릴 정도로 유년기(Juvenil period)가 길어 品種育成을 목적으로 한 계획교배 및 선발의 효율을 높이는 데도 많은 어려움이 따르고 있다. 또한 감귤종자는 다배성으로서 이는 얻어진 실생묘의 기원, 즉 유성배인지 주심배 인지를 확인하는 과정이 필요하며 현재 이를 실생 육묘 초기에 정확하게 구별하는 방법이 확립되어 있지 않아 교배실생 획득율을 저하시키며 계획 육종의 장애 요인이 되고 있다. 유성배 확인을 비롯한 영년생 작물의 특정 형질에 대한 조기선발 수단으로 DNA를 이용하는 방법인 DNA marker system 개발에 대한 연구가 다수 진행되고 있다. RAPD 기법을 이용한 주심배 실생과 유성배 실생의 구별 가능성에 대한 보고(Luro 등, 1995)나 RFLP 분석(Eldrege 등, 1992)과 RAPD 분석(Cristofani 등, 1999)에 의한 유전자 지도 작성, Citrus Tristeza Virus(CTV) 저항성 관련 분자 marker 개발(Cristofani M., 1999) 등은 전통적인 교배 육종의 육종 효율을 향상시킬 수 있는 기반 기술을 제공할 수 있을 것으로 기대되며, 원형질체 융합에 의한 잡종체의 확인(Gmitter 등, 1996; Guo W.W., 2000; Mendes 등, 2000)과 같은 최신 육종 기법에도 이용되고 있다.

본 연구의 목적은 1) RAPD를 이용하여 감귤屬과 근연屬내 屬간, 種간 그리고 品種간 유연 관계를 밝히며 2) 品種 구분용 primer를 선발하고 3) 육종 효율 증대의 한 방편으로서의 RAPD이용 가능성을 검토하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물시료의 채취 및 보관

본 연구에 이용된 식물재료는 농촌진흥청 제주농업시험장 감귤시험장 유전자원 시험포에서 생육중인 것으로 재래귤을 비롯하여 温州蜜柑, tangerin, tangelo, orange, tangor, grapefruit, lemon 등 감귤류 62품종, 탕자속 3품종, 금감속 2품종 및 5종의 근연속을 포함한 72품종으로 구성되어 있다(Table 1). 시료로는 완전히 전개된 봄순의 건전한 어린잎을 채취하였으며 수돗물로 세척한 후 즉시 total DNA 분리에 이용하거나 또는 필요시까지 -60°C 의 저온냉동고에서 냉동 밀폐 보관하였다.



2. Total DNA 분리

Total DNA의 분리 방법은 다음과 같다. 생체중 1g내외의 시료를 미리 냉각된 mortar에 넣고 액체 질소를 첨가해 가면서 pestle을 이용하여 백색의 분말이 될 때까지 마쇄하였다. 마쇄가 끝난 시료 0.2~0.3g 정도를 1.5ml Effendorf tube에 옮긴 후 0.6ml의 urea extraction buffer(7 M urea, 25mM NaCl, 50mM Tris-HCl<pH 8.0>, 20mM EDTA<pH 8.0>, 1% sarcosine)을 첨가하여 부드럽게 흔들어 혼합한 후 phenol/chloroform(1:1) 용액을 동일부피로 첨가하여 약 10초간 vortexing 한 후 실온에서 15분간 두었다가 4°C 에서 15분간 15,000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 0.5ml을 새 tube에 옮긴다음 3M Sodium acetate $50\mu\text{l}$ 를 첨가하고 99%의 ethanol 1ml을 첨가하여 부드럽게 흔들어 준 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 tube 바닥에 가라앉은 DNA 덩어리를 70% ethanol 용액으로

Table 1. List of *Citrus* and related genera used in this experiment

No.	Common name	Species name according to Tanaka system or hybrid origins
1	Jinkyul(陳橘)	<i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan.
2	Cheongkyul(靑橘)	<i>C. nippokoreana</i> Tan.
3	Hongkyul(紅橘)	<i>C. tachibana</i> (Mak.) Tan.
4	Sadoogam(獅頭柑)	<i>C. pseudogulgul</i> Hort. ex. Shirai
5	Yuzu(柚子)	<i>C. junos</i> Sieb. ex. Tan
6	Dangyooza(唐柚子)	<i>C. grandis</i>
7	Dong-geongkyul(洞庭橘)	<i>C. erythrosa</i> Hort. ex. Tan.
8	Pyunkyul(扁橘)	<i>C. tangerina</i> Hort. ex. Tan.
9	Gamza(柑子)	<i>C. benikoji</i> Hort. ex. Tan.
10	Byungkyul(瓶橘)	<i>C. platymamma</i> Hort. ex. Tan.
11	Gigak(只殼)	<i>C. aurantium</i> L
12	Binkyul(檳橘)	<i>C. leiocarpa</i> Hort. ex. Tan.
13	Inchangkyul(인창귤)	-
14	Ueno wase(上野早生)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
15	Iwasaki wase(岩崎早生)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
16	Nichinan 1 Gou(日南1號)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
17	Ooura wase(大浦早生)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
18	Miyagawa wase(宮川早生)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
19	Okitsu wase(興津朝生)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
20	Miho wase(三保早生)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
21	Morita unshiu(盛田温州)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
22	Aoshima unshiu(青島温州)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
23	Nankan 20 Gou(南柑20號)	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.
24	Wilking	<i>C. reticulata</i> Blanco
25	Clementine	<i>C. clementina</i> Hort. ex. Tan
26	Ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco
27	Nankou(南香)	<i>C. unshiu</i> × <i>C. reticulata</i>
28	King mandarin	<i>C. noblis</i> Lour
29	Willow leaf	<i>C. reticulata</i> Blanco
30	Cara cara navel	<i>C. sinensis</i> (L) Osb
31	Shirayanagi navel(白柳)	<i>C. sinensis</i> (L) Osb
32	Sanguilleli blood	<i>C. sinensis</i> (L) Osb
33	Lane late	<i>C. sinensis</i> (L) Osb
34	Hamlin	<i>C. sinensis</i> (L) Osb
35	Hassaku(八朔)	<i>C. hassaku</i> Hort. ex Y. Tan
36	Natsu Mikan(夏橘)	<i>C. natsudaikai</i> Hay.

Table 1. (Continued)

No.	Common name	Species name according to Tanaka system or hybrid origins
37	Kawano natsudaidai(川野夏橘)	<i>Citrus natsudaidai</i> Hay.
38	Kiyomi(清見)	<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>
39	Shiranuhi(不知火)	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>
40	Seihou(清峰)	<i>C. sinensis</i> × <i>C. reticulata</i>
41	Sanboukan(三保柑)	<i>C. sulcata</i> Hort. ex. Tan
42	Iyo(伊預柑)	<i>C. iyo</i> Hort. ex. Tan
43	Kinkouji(金柑子)	<i>C. obovoidea</i> Hort. ex. Tan
44	Tsunokaori(津之香)	<i>C. sinensis</i> × <i>C. reticulata</i>
45	Shiikuwasa	<i>C. depressa</i> Hay
46	Swingle citrumelo	<i>C. paradisi</i> × <i>Poncirus trifoliata</i>
47	Sour orange	<i>C. aurantium</i> L.
48	Melanesian papeda	<i>C. macroptera</i> Montr.
49	Mauritius papeda	<i>C. hystrix</i> D.C.
50	Atalantia	<i>Atalantia buxifolia</i>
51	Persian lime	<i>C. latifolia</i> Tan
52	Kao phuang	<i>C. maxima</i> (Burm) Merr.
53	macrophylla	<i>C. macrophylla</i> Wester
54	Sudachi	<i>C. sudachi</i> Hort. ex Shirai
55	Calamondin	<i>C. madurensis</i> Lour.
56	Yuma ponderosa	<i>C. limon</i> × <i>C. medica</i>
57	Myrtle-leaf	<i>C. myrtifolia</i> Raf.
58	Bouquet de fleurs	<i>C. aurantium</i> L.
59	Duncan	<i>C. paradisi</i> Macf.
60	Triumph	<i>C. paradisi</i> Macf.
61	Burgundy	<i>C. paradisi</i> Macf.
62	L.F Tecla	<i>C. limon</i> (L) Burm.
63	Allen eureka	<i>C. limon</i> (L) Burm.
64	Rubidoux	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
65	Trifoliata	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
66	Flying dragon(비룡)	<i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf.
67	Australian round lime	<i>Microcitrus australis</i>
68	Murraya	<i>Murraya paniculata</i>
69	Severinia disticha	<i>Severinia disticha</i>
70	Gillet's cherry orange	<i>Citropsis gilletiana</i>
71	Nagami or Oval kumquat	<i>Fortunella margarita</i> (Lour) Swing
72	Marumi or Round kumquat	<i>Fortunella japonica</i> (Thunb) Swing

2회 세척한 다음 진공 또는 실온 건조하였다. 건조가 끝난 DNA 덩어리는 0.5 ml TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA<pH 8.0>)에 녹이고 동일 부피의 phenol/chloroform 용액을 첨가하여 잘 섞은 후 15,000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 새 tube로 옮긴 후 다시 phenol/chloroform 용액을 동일부피로 첨가하여 원심분리를 하였다. 최종적으로 99% ethanol 1ml을 첨가하여 10,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 수거된 DNA를 70% ethanol을 2회 세척 후 진공 또는 자연 건조시켰다. 건조가 끝난 DNA는 200 μ l의 TE buffer에 완전히 녹인 후 RNase를 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리 후 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다. 최종적으로 얻어진 total DNA는 agarose gel 상에서 전기영동하여 하나의 밴드로 나타나는 것을 확인하고, 확인된 DNA는 UV/VIS spectrophotometer로 정량하여 본 시험에 이용하였다.

3. RAPD 적정조건 조사



감귤류 및 근연속을 이용한 RAPD분석을 위해 PCR에 관여하는 주요 요소들인 template DNA, primer, dNTP, *Taq* DNA polymerase 각각의 최적 농도를 구명하고자 시험을 수행하였다. 이 시험에 공통적으로 이용된 품종은 陳橘이며 primer는 OPAO1(Operon co.)을 이용하였다. 각각 8수준의 처리별로 시험을 수행하였는데 template DNA는 0, 1, 10, 20, 40, 80, 150, 200ng, primer는 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 150ng, dNTP는 0, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 400uM, *Taq* DNA polymerase는 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5의 각각의 농도별로 PCR을 수행하였다. 각 조건별 시험수행 시 PCR 반응용액은 template DNA 20ng, primer 10ng, dNTP 100uM, 2mM, 10 \times reaction buffer 2.5 μ l, *Taq* DNA polymerase 1unit 그리고 나머지는 멸균된 증류수로 총 반응 용액량을 25 μ l로 맞추었다. PCR의 main cycle 수는 45로 고정하였다.

4. RAPD에 의한 품종분류 방법

각 품종별 RAPD를 수행하기 전 Operon사의 random primer 중 168개의 primer를 대상으로 밴드 증폭여부를 조사한 다음 밴드의 다양성이 인정되는 8종의 Primer(Table 2)를 선발하여 본 시험에 이용하였다.

PCR 반응 조건은 template DNA 20ng, primer 20ng, dNTP 150uM, Mg²⁺ 2mM, 10×reaction buffer 2.5μl, Taq DNA polymerase 1unit 를 각각 혼합하여 총 반응 용액량은 25μl로 하여 부족한 양은 멸균수로 채웠으며 PCR 횟수는 45cycle로 하였다.

Thermal cycler의 program은 처음에 94℃에서 5분간 DNA의 두 가닥을 분리시킨 다음, 94℃에서 1분간, 38℃에서 1분간, 72℃에서 2분간씩 각각 처리하여 DNA를 증폭시키는 것을 1 cycle로 하였고, 각 cycle을 반복하여 DNA 증폭이 끝난 후 마지막으로 72℃에서 10분간 안정화시킨 다음 4℃에서 유지하였다.

PCR을 통해 증폭된 DNA sample은 1.5% Agarose gel에서 전기영동하여 EtBr 용액에서 20분간 staining한후 UV하에서 band를 확인하였고, polaroid camera(Model : H-45)를 이용하여 촬영하였다. 공시한 72개 품종에 대한 유연관계 분석을 위한 집괴분석은 NTSYSpc(F.James, 1998. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.0)을 이용하였으며 얻어진 유사계수를 이용하여 Dendrogram을 작성, 품종간 유연관계 분석에 이용하였다.

본 시험과정에서 사용된 시약 중 PCR 용액제조에 사용된 시약은 모두 Promega 사의 것이었으며 그 외에는 모두 Sigma Chemical 사의 molecular biology grade reagent를 사용하였다. 그리고 일반적인 시약의 조제, 용액의 조성 등은 Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 행하였다. PCR 기종은 Perkin Elmer 사의 Thermal cycler 480 기종이었으며 원심분리기는 한일(주)의

MICRO 17R 기종을 사용하였고 power supply는 Hoffer사의 PS 500XT 모델 이었다.

Table 2. The primer codes and sequences used in this study

No.	Sequence(5' to 3')
OPK 14	CCCGCTACAC
OPL 03	CCAGCAGCTT
OPT 04	CACAGAGGGA
OPW 17	GTCCTGGGTT
OPX 20	CCCAGCTAGA
OPY 05	GGCTGCGACA
OPY 14	GGTCGATCTG
OPY 15	AGTCGCCCTT

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Total DNA 분리 조건

Total DNA 분리는 예(1994)의 방법을 변형하여 수행하였다. 수행 전 과정에서 1.5ml tube를 사용하였다. DNA 추출 과정 초기 단계의 시료 마쇄 과정에서부터 일차 원심분리 후 DNA를 침전시키는 과정까지 걸리는 시간을 단축하는데 역점을 두었는데 이는 순수도가 높은 DNA를 얻기 위한(박, 1995) 것이다. 이 단계에서 실제 시료 마쇄 단계 후 추출 buffer에 노출되는 시간이 길어질 경우 추출용액이 짙은 갈색으로 되는 경향이 있었고 polysaccharides로 추정되는 물질이 다량 침전되어 순도가 높은 DNA를 확보하는데 어려움이 있었다. 이 경우 추출 과정을 거친 후 최종 TE buffer에 녹인 후 육안으로 볼 때 무색이 되지 않고 갈색을 띠어 DNA 정제가 제대로 되지 않았음을 알 수 있었다. 이는 DNA 추출의 초기 단계가 추출된 DNA의 순도를 결정하는 중요한 단계임을 의미한다. 이러한 문제는 시료 마쇄에 걸리는 시간을 최소화 단축하고 추출 buffer에 노출되는 시간을 단축함으로써 상당히 극복되었다.

DNA 일차 침전 후 정제 과정에서 phenol/chloroform 용액으로 불순물을 제거해 주었는데 이 과정은 보통의 경우 2회 실시하였으나 필요한 경우 3회까지 실시하였다. 최종적으로 ethanol 침전 후 200 μ l TE buffer에 녹인 다음 RNase 처리를 한 후 1.2% agarose gel 상에서 전기영동을 하여 Ethidium bromide로 염색한 후에 UV transilluminator 상에서 DNA 밴드를 관찰한 결과 약 21kb 부근에서 total DNA가 single 밴드로 나타났다. Agarose gel 상에서 확인된 DNA는 UV spectrophotometer로 정량 하였는데 약 0.3~0.7 μ g로 이는 실험 수행에 충분한 양이었다. DNA 순도는 대부분의 품종이 1.70~1.85 사이로 나왔으며 일부 품종이 1.60 내외로 나왔다.

2. RAPD 적정 조건

본 실험에 앞서 陳橘의 total DNA를 이용하여 template DNA, primer, dNTP, *Taq* DNA polymerase 농도별 PCR 결과는 그림 1 에서 보는바와 같다.

Template DNA의 경우에는 1ng 이상 모든 농도에서 밴드가 나타났으며 농도가 높을수록 밴드의 밝기가 보다 선명하였지만 큰 차이는 보이지 않았으며 10ng 이상이면 충분할 것으로 생각되었다. primer의 경우에는 1ng과 5ng 처리에서 밴드의 수가 적었으며 10ng이상 처리에서는 처리간 차이가 거의 없어 10ng 이상이면 적절할 것으로 생각되었다. dNTP의 경우 1uM 처리에서는 희미한 하나의 단일 밴드만 나타났고 400uM에서는 반응이 일어나지 않았다. dNTP의 경우 농도가 높을 경우 마그네슘 이온과 결합이 일어나면서 마그네슘 이온의 농도가 감소되어 반응이 일어나지 않을 수도 있다고 했는데(박, 1995) 본 실험에서도 유사한 결과를 보였다. 10uM에서 200uM까지의 처리에서는 처리간 차이가 크지 않았으나 150uM과 200uM처리에서 상단부에 약간의 background 가 발생하였다.

Taq DNA polymerase의 경우 0.1unit 처리에서 증폭된 밴드의 수가 다른 처리에 비해 적고 희미하였으며 0.5unit - 2unit 사이에서는 밴드가 깨끗이 나타났다. 그러나 3unit-5unit 사이의 처리에서는 농도가 높을수록 강한 background가 나타났으며 밴드가 오히려 희미해지고 구분할 수 없는 결과를 보였다. 이상의 결과 template DNA는 10~40ng, primer 농도는 10~40ng, dNTP의 농도는 50~150uM, *Taq* DNA polymerase 의 농도는 1~2unit 가 적합한 농도로 생각되었다.

3. RAPD에 의한 품종분류

본 시험에 공시된 감귤속과 근연속의 종 및 품종간 유연관계를 밝히기 위

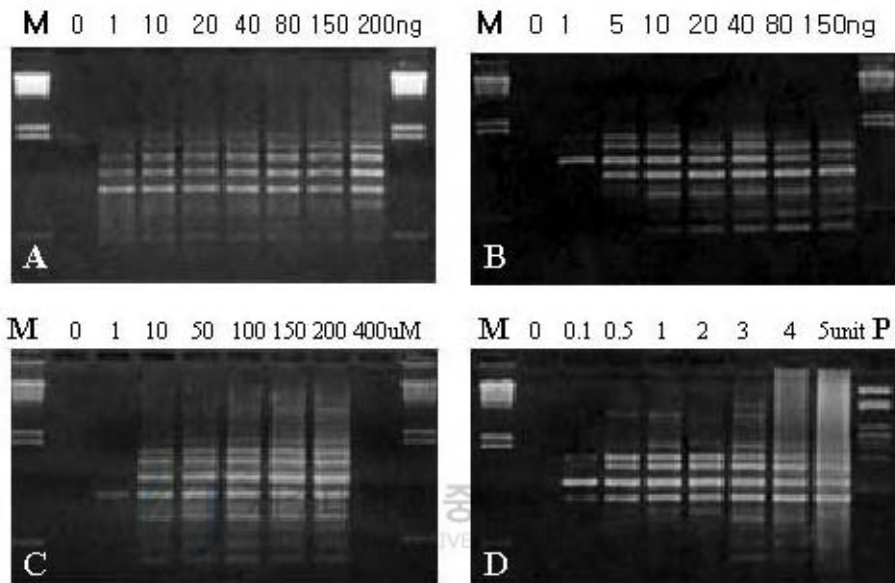


Fig. 1. The effects of concentration of template DNA(A), Primer(B) and dNTP(C) and Taq polymerase(D) on PCR amplification. Total DNA of Jinkyul and OPA01 were used as a template DNA and a primer, respectively. P : DNA size marker(λ -HindIII+ λ -Pst I)
M : DNA size marker(λ -HindIII)

해 밴드의 다양성이 인정된 8개의 primer(Table 2)를 이용하여 얻어진 41개의 Polymorphic band를 바탕으로 품종간 유연관계를 분석하였다. 모든 분석과정에서 비교적 밴드가 뚜렷하고 사진 및 UV transilluminator 상에서 품종간 구분이 비교적 뚜렷한 밴드들을 분석에 이용하였고 일부 품종간 밴드 차이가 인정되었으나 밴드양상이 뚜렷하지 못하고 결과분석에 왜곡을 줄 수 있다고 판단되는 밴드는 제외하였다.

OPK14 primer(그림 2)의 경우 밴드양상이 비교적 뚜렷한 5개의 밴드를 분석에 이용하였는데 1,550bp 밴드의 경우 감귤속 품종 중 温州蜜柑(14~23), tangerin(24~29), orange(30~34) 및 陳橘(1), 青橘(2), 紅橘(3)등의 재래귤에서 나타났지만 근연속 내에서는 나타나지 않았다. 950bp 밴드는 탕자속(64~66) 3품종과 Gillet's cherry org.(70) 에서만 밴드가 없고 나머지 모든 품종에서 나타났으며, 800bp 밴드의 경우 Swingle citrumelo(46)를 제외한 감귤속 모든 품종에서 밴드가 나타났고 근연속 내에서는 Murraya속(68) 에서만 나타나고 나머지 근연속 내에서는 나타나지 않았다.

OPL03 primer(그림 3)의 경우 밴드 양상이 뚜렷한 밴드는 5개였으며 나머지는 밴드가 희미하였고 품종간 차이가 명확하지 않았다. 5개의 밴드중 모든 품종에서 나타난 밴드는 750bp였다. 이중 750bp는 모든 품종에서 나타났고, 품종간 다양성을 보이는 4개의 밴드를 결과 분석에 이용하였다. 1150bp 밴드는 근연속인 68, 69, 70 품종을 제외한 모든 품종에서 나타났고, 850bp 밴드는 재래귤(1~13), 温州蜜柑(14~23), tangerin(24~29), orange(30~34)등의 품종에서는 나타나지 않았고 탕자속(64~66)과 이의 교배종인 Swingle citrumelo(46), papeda(48, 49번) 및 근연속인 50번, 69번 등 8 품종에서만 나타났다. 650bp 밴드의 경우 재래귤 중 2,3번 품종과 lemon(62,63), 金柑(71,72) 및 51, 53, 55, 56, 67번 등 12품종에서 나타났다. 600bp 밴드의 경우 재래귤 중 1, 3, 5, 7, 8, 9, 13번에서 나타났는데 温州蜜柑 중 일부품종 과 탕자속(64~66) 및 이의 교배종인 46번 등에서 밴드가 나타나지 않았다. 温州蜜柑(14~23)중

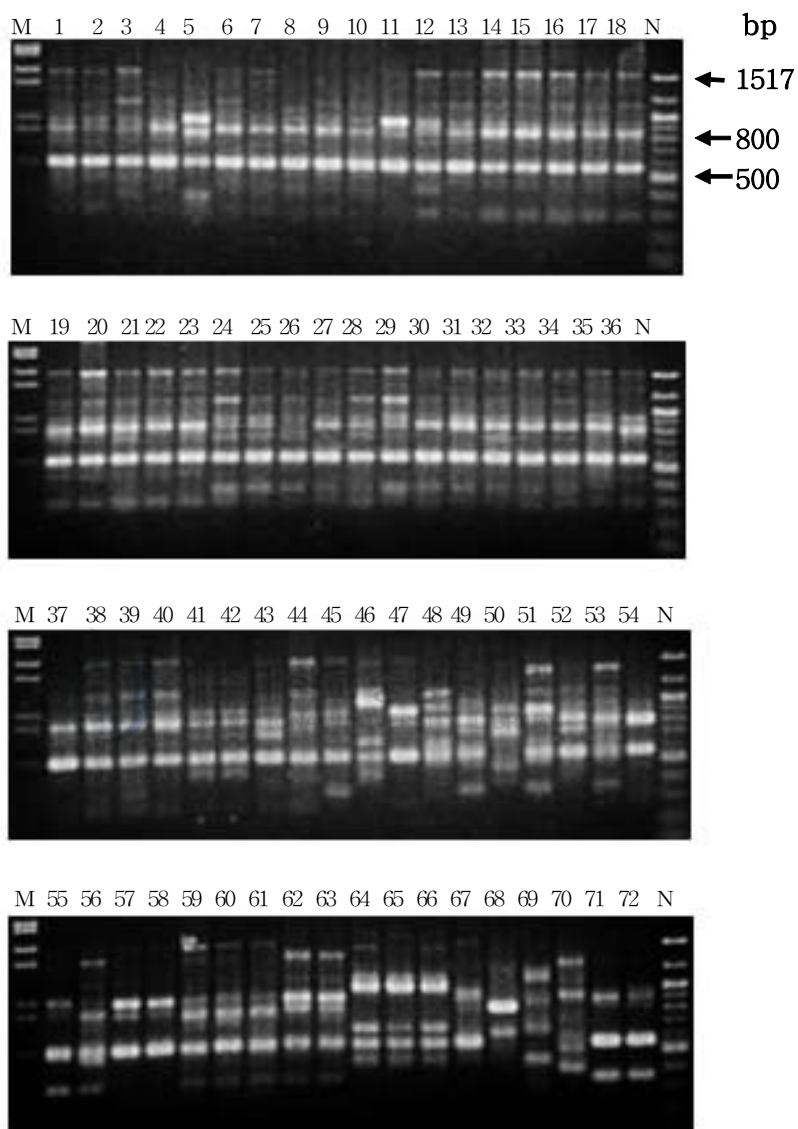


Fig. 2. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPK14. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

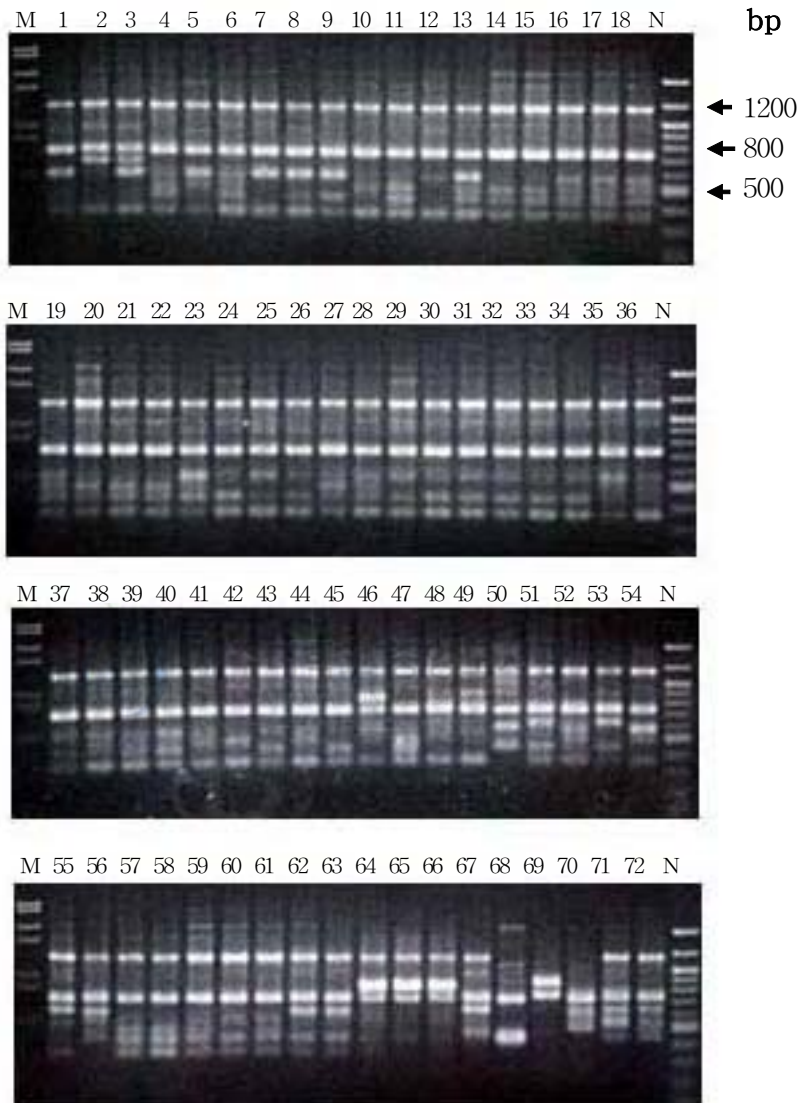


Fig. 3. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPL03. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

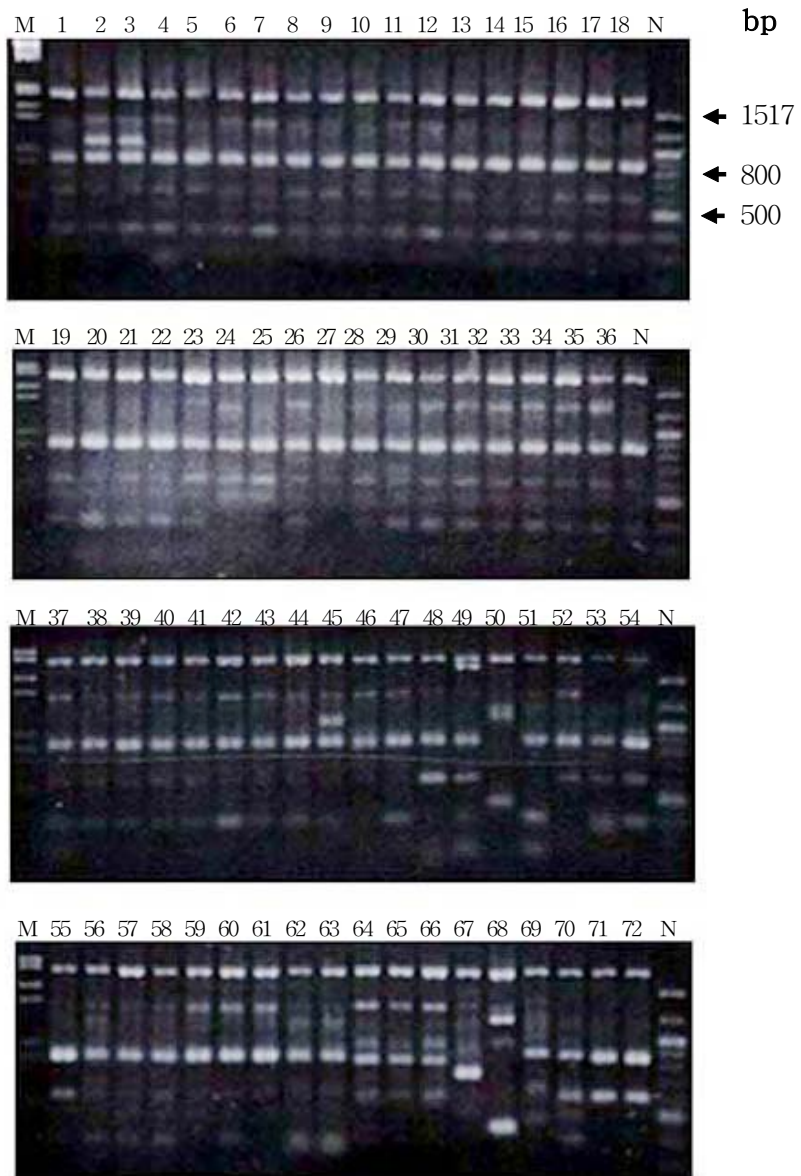


Fig. 4. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPT04. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

14,15,20,21,22번 품종에서 나타나지 않았는데 main 밴드가 아닌 minor 밴드에서의 차이로 밴드 양상이 뚜렷하지 않았다.

OPT04 primer(그림 4)의 경우 밴드양상이 뚜렷한 밴드는 모두 5개였다. 이중 1900bp 밴드는 모든 품종에서 나타났으며 1000bp 밴드는 재래귤 중 2, 3번 품종과 45번, 탕자속(64~66)에서만 나타났다. 850bp 밴드는 감귤속 모든 품종에서 나타났으며 근연속 중에서는 金柑(71,72)에서만 나타났다. 700bp 밴드는 Australian round lime(67번)에서만 특이적으로 나타났다.

OPW17(그림 5) primer의 경우는 3개의 밴드가 비교적 뚜렷한 양상을 보였는데 800bp 밴드의 경우 温州蜜柑(14~23) 및 tangerin(24~29)에서는 나타나지 않았지만 orange(30~34) 및 일부 tangor(35~44)에서는 나타나는 특성을 보여 mandarin과 오렌지를 구분할 수 있는 밴드로 판단되었다.

OPX20(그림 6) primer에서는 5개의 밴드를 대상으로 분석에 이용했는데 5개의 밴드 모두 상당한 다양성을 보여주고 있으며, 다른 primer에서는 구분이 잘 안되었던 tangerin(24~29)에서 24번과 25번을 제외한 나머지 품종들이 구분이 가능하였다. 또 grapefruit(59~61)에서 700bp 및 탕자 속(64~66)내에서 700bp, 500bp등의 다양성을 보이는 밴드들이 나타났다. 金柑(71,71)에서는 700bp 밴드가 차이를 보였다. 温州蜜柑(14~23)내에서는 900bp 밴드가 차이를 보여주고 있었다.

OPY05(그림 7) primer에서는 모두 6개의 밴드가 뚜렷한 양상을 보였고 이중 550bp 밴드가 모든 품종에 공통적이었다. 재래귤, tangor 및 근연속 등에서는 밴드들이 다양성을 나타냈으나 温州蜜柑 및 tangerin 내에서 다양성을 보이는 밴드는 나타나지 않았다.

OPY14(그림 8) primer에서는 모두 8개의 밴드가 뚜렷한 양상을 보였는데 본 실험에 이용된 primer중 가장 우수한 다양성을 보여주고 있었다. 모든 품종에 공통적인 밴드는 없었으며 2,080bp 밴드가 68번 품종에, 2,050bp 밴드가 70번 품종에, 2030bp 밴드는 72번 품종에서만 각각 특이적으로 나타났다.

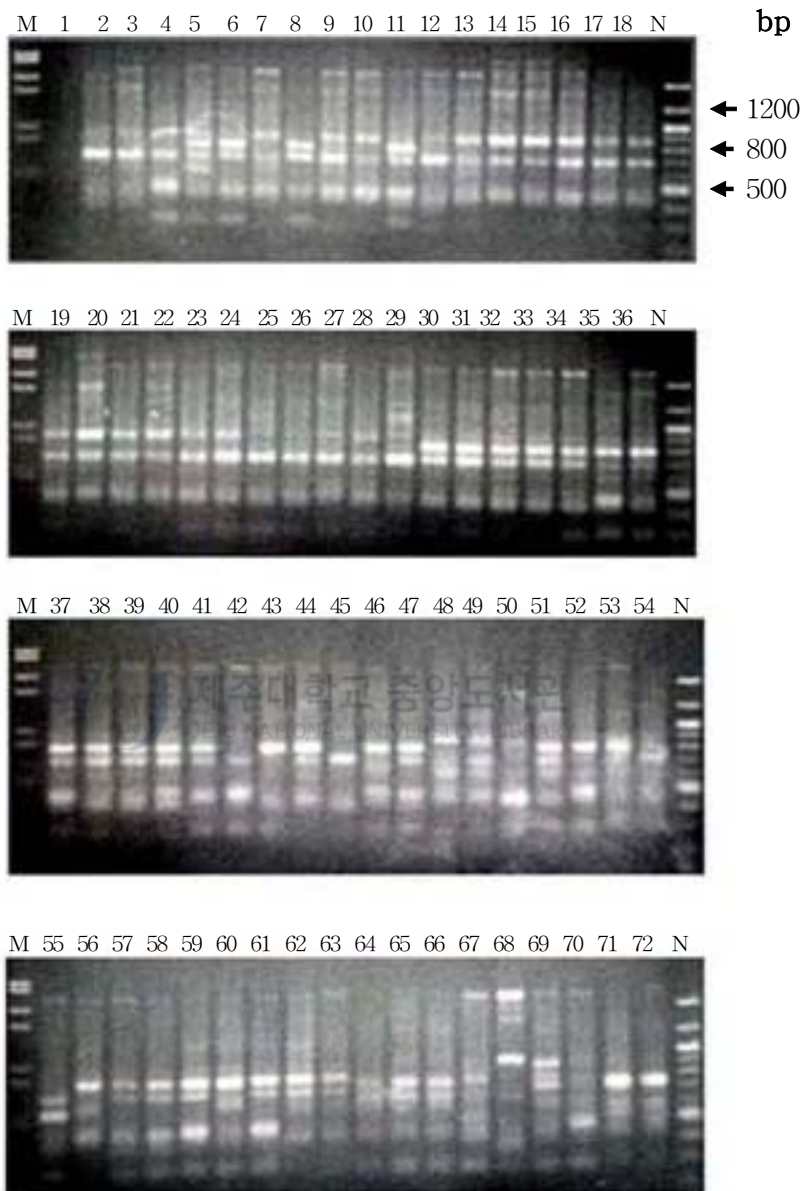


Fig. 5. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPW17. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

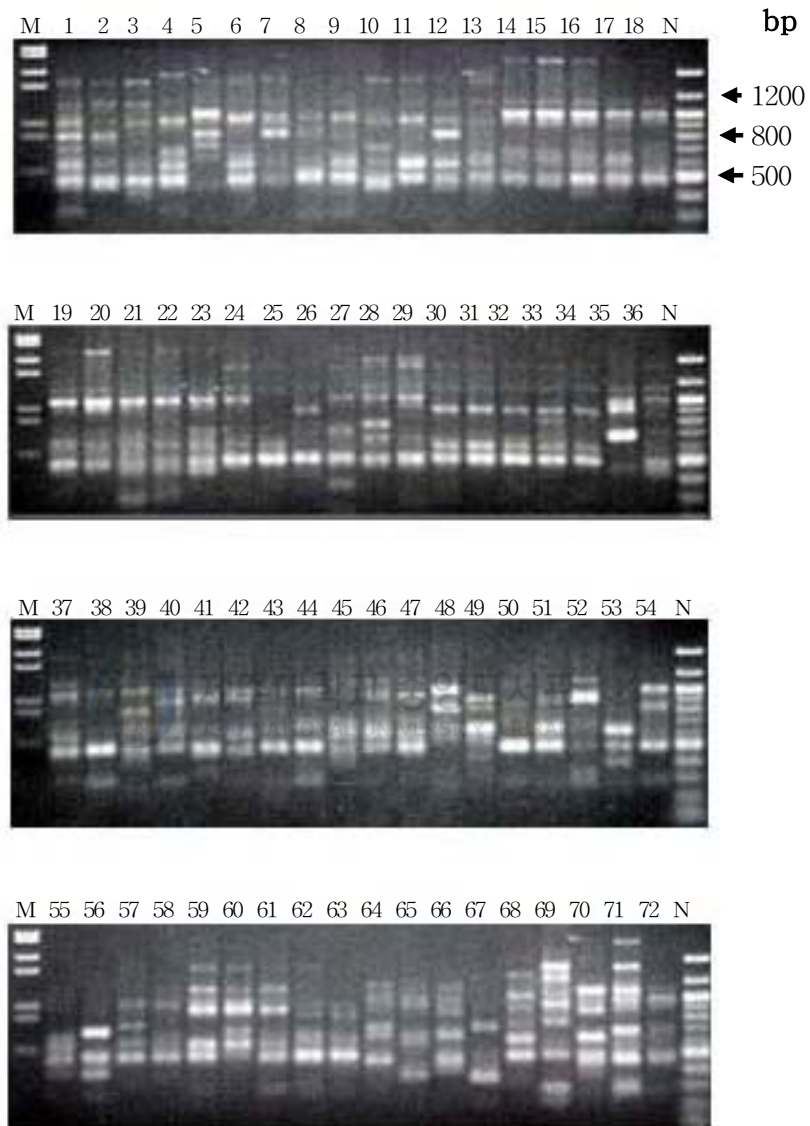


Fig. 6. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus Citrus and 10 varieties of related genera amplified with primer OPX20. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

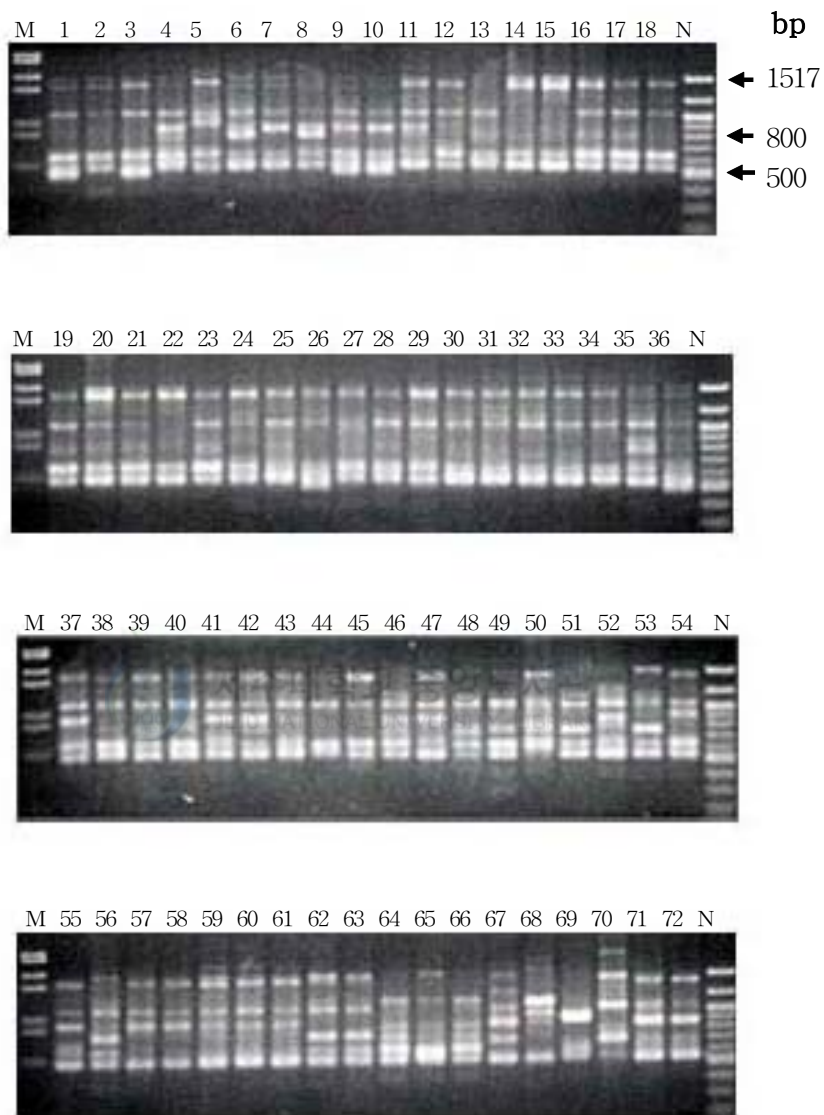


Fig. 7. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPY04. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

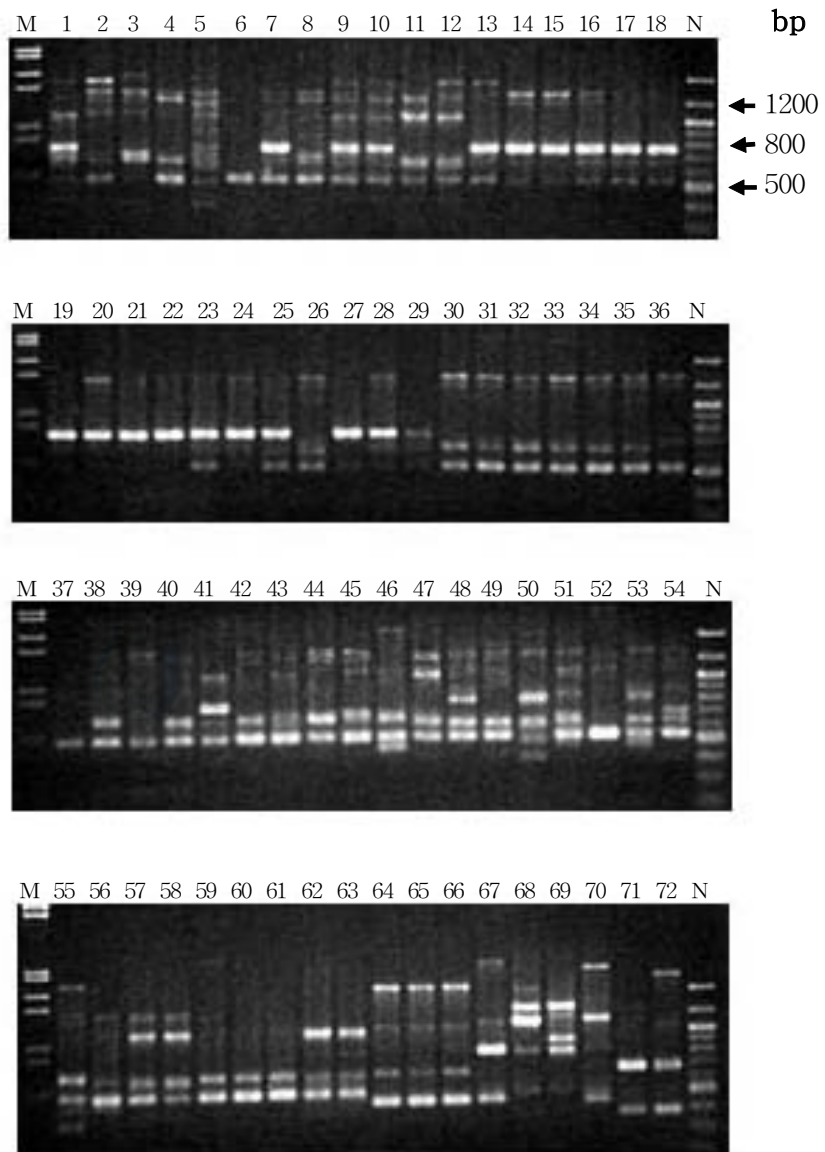


Fig. 8. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPY14. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

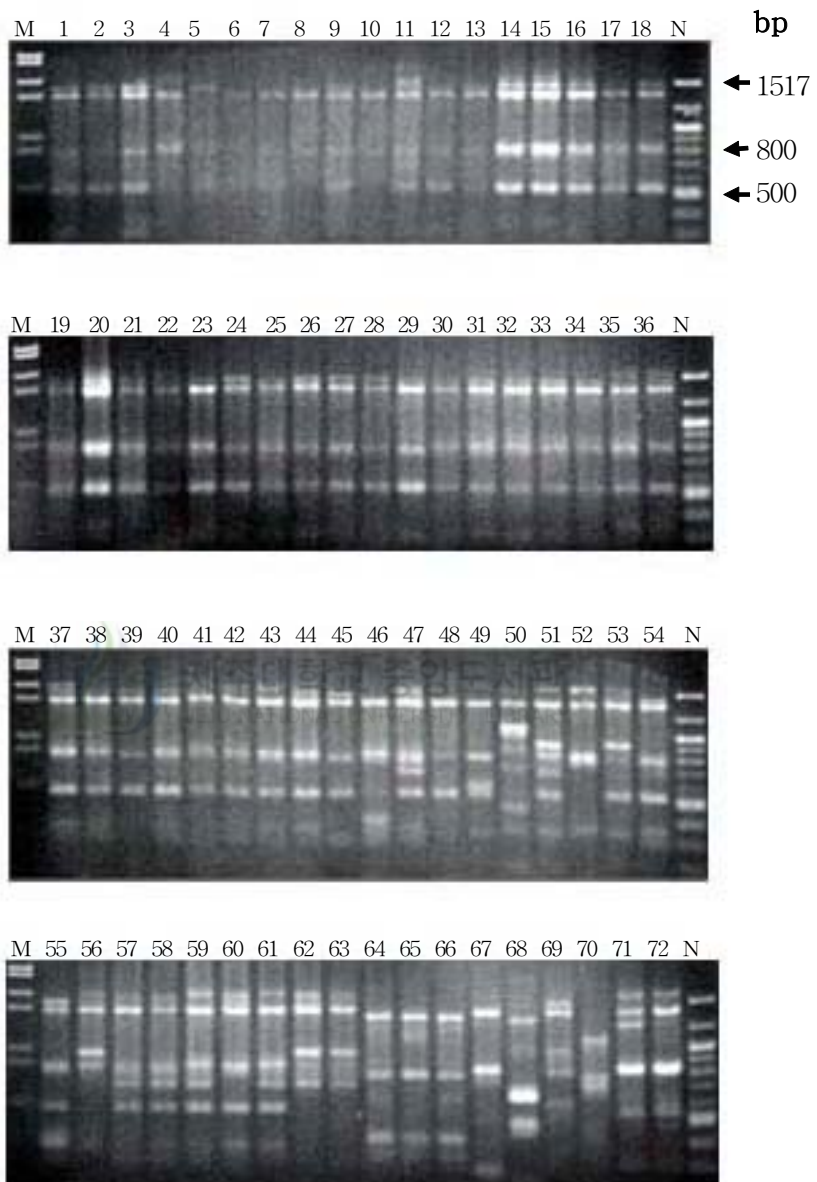


Fig. 9. The RAPD band patterns of 62 varieties of genus *Citrus* and 10 varieties of related genera amplified with primer OPY15. The figure on each lane is the sample code in table 1.
M : DNA size marker(λ -EcoR I + λ -HindIII)
N : DNA size marker(100bp Ladder)

1500bp 밴드는 탕자 속(64~66)과 이의 잡종인 46번 품종 그리고 50번, 55번, 68번등 에서 나타났다. 500bp 밴드가 溫州蜜柑 내에서 다양성을 보여주었다. 750bp는 main 밴드에서 차이를 보여주었는데 溫州蜜柑 및 tangerin에서 밴드가 나타났지만 orange를 비롯하여 이의 교배종인 tangor 계통에서는 밴드가 나타나지 않았다. 이러한 밴드 특성은 전통 교배 육종에서 교배 빈도가 높은 溫州蜜柑 및 tangerin과 orange, tangor 사이의 잡종체 확인에 이용할 수 있을 것으로 여겨진다.

OPY15(그림 9) primer에서도 OPY14 primer와 마찬가지로 8개의 밴드가 나타났다는데 재래귤, 溫州蜜柑, tangerin, orange 및 tangor 사이에서는 별다른 차이를 보이지 않고 있고 비교적 원시 감귤 품종 및 근연속에서 다양성을 보이고 있었다.

본 실험에서는 8개의 primer를 이용해서 얻은 품종간 차이를 보이는 밴드중 품종간 차이가 비교적 명확하고 밴드 양상이 뚜렷한 41개의 밴드를 대상으로 결과를 분석하였다. 전기영동 사진판독과정에서 실제 품종간 차이를 보이는 밴드의 수는 41개 이상이었지만 많은 품종에서 밴드의 유, 무를 판독하기 힘든경우와 밴드의 밝기가 현저히 떨어지는 것 등은 결과 분석에서 제외하였다. 품종 별로 밴드 차이를 보면 58개 품종의 구분이 가능하였다. 溫州蜜柑 및 Tangerin중 上野早生(14)과 岩崎早生(15)사이, 大浦早生(17), 宮川早生(18), 南柑20號(23)와 南香(27) 사이, Clementine(25)과 Willow leaf(29) 사이, 오렌지(30~34) 5품종 사이, 淸見(38)과 津之香(44) 사이, Yuma ponderosa(56)와 Burgundy(61) 사이, Myrtle-leaf(57)과 Bouquet de fluers(58)사이, Lemon(62~63) 사이에서는 각각 품종간 차이가 없었다. Tangerin(24~29)내에서 차이를 보이는 밴드는 OPY 750bp 밴드 등 모두 7개의 밴드가 나타났는데 이중 25번 과 29번 품종간에 차이를 볼 수 있는 밴드는 나타나지 않았고 orange(30~34) 내에서도 품종간 차이를 보이는 밴드가 나타나지 않았는데 이러한 결과들로부터 추정해보면 溫州蜜柑이나 orange는 대표적 다배성 품종으로서 대

부분이 아조변이 또는 주심배 실생에 의해 품종이 분화되어 유전적 조성의 변화가 적어 RAPD 방법으로서 품종간에 강한 다형성을 보여주는 데에는 한계가 있는 것으로 보아진다. 이 등(1993), Kagami 등(1994)은 温州蜜柑 내에서 실험에 이용한 어떤 primer에서도 계통간 식별을 할 수 없었다고 보고하였고, 일부 primer에서 温州蜜柑내 계통간 차이가 있었다는 보고(한, 1996; 오, 1996)가 있었지만 이 역시 보다 많은 primer를 사용해봐야 할 것으로 보았으며 RFLP를 같이 이용할 때에도(Federici 등, 1998) 그 결과는 크게 다르지 않다고 했는데, 본 실험에서도 OPL03, OPX20, OPY14에서 温州蜜柑내 차이를 보였지만 main 밴드에서의 차이는 볼수 없었다. main 밴드 수준에서의 차이를 볼려면 아주 광범위한 primer 탐색이 필요할 것으로 생각되었으며 RFLP나 AFLP 방법을 병행하는 것이 필요 할 것으로 생각되었다.

8개의 primer를 이용하여 얻은 RAPD 결과중 다형성을 보이는 41개 밴드를 품종별로 비교해서 밴드가 있는 품종은 “1”로, 밴드가 없는 품종은 “0”으로 코드화 하여 표 3과 같이 작성하여 분석에 이용하였다. 표 3의 데이터를 바탕으로 NTSYSpc(James, 1998. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.0)를 이용하여 품종간의 類似度를 측정하였으며, 이로부터 얻어진 DICE 類似係數를 바탕으로 집괴분석을 한 결과는 그림 10과 같다. 유사계수 0.75를 기준으로 할 때 본 시험에 이용된 72품종은 11개 군으로 분류될 수 있었다. I 군에는 温州蜜柑, Orange, Tangerin, Grapefruit 및 이들의 교잡종 대부분이 포함되어 있었고, II 군에는 Swingle(46), Kao phuang(52), Yuma ponderosa(56)이, III 군에는 Melanesian papeda(48), Mauritius papeda(49)이, IV 군에는 Lemon, Perisian lime(51), macrophylla(53) 이 V에서 XI 군까지는 근연속들인 金柑속(71, 72번), Atalantia(50), Severinia disticha(69), Australian round lime(67), Murraya(68), Poncirus속(64~66), Gillet's cherry org.(70). 이 각각 1개씩의 군을 이루었다. 근연속들이 각각 1개씩 7개의 군을 형성하였고 Citrus속이 모두 4개의 군을 형성하였다. 재래귤

Table 3. Coded data matrix of 41 RAPD bands in 63 cultivars of the genus *Citrus* and 9 cultivars of related genera.

Cultivar	K14	L03	T04	W17	X20	Y05	Y14	Y15
	1	1	1		1	11	2221	111
	59854 55055 00000	1866 5550 0000	087 050 000	887 500 000	09875 00000 00000	40986 55055 00000	00058754 85300505 00000000	54098765 00505055 00000000
Jinkyul	11110	1001	010	101	01110	11001	00000110	11001001
Cheongkyul	11110	1010	110	101	01101	11001	00000010	11001001
Hongkyul	11110	1011	110	101	01001	11001	00000000	11001001
Sadoogam	01110	1000	010	111	01011	11111	00000010	01001001
Yuzu	01110	1001	010	111	10100	11001	00000010	11001001
Dangyuza	11110	1000	010	101	00001	11111	00000010	01001001
Dong-geongkyul	11110	1001	010	011	00101	11101	00000110	01001001
Pyunkyul	01110	1001	010	101	00001	11111	00000010	01001001
Gamza	01110	1001	010	101	00001	11101	00000110	11001001
Byungkyul	01110	1000	010	111	01010	11101	00000110	11001001
Gigak	11110	1000	010	101	01001	11101	00000010	11001001
Binkyul	11110	1000	010	101	01101	11001	00000010	11001001
Inchangkyul	11110	1001	010	101	01001	11001	00000110	11001001
Ueno wase	11110	1000	010	101	11001	11001	00000110	11001001
Iwasaki wase	11110	1000	010	101	11001	11001	00000110	11001001
Nichinan 1 Gou	11110	1001	010	101	11001	11001	00000110	11001001
Ooura wase	11110	1001	010	101	10001	11001	00000110	11001001
Miyagawa wase	11110	1001	010	101	10001	11001	00000110	11001001
Okitsu wase	11110	1001	010	101	10001	11001	00000100	11001001
Miho wase	11110	1001	010	101	11001	11001	00000100	11001001
Morita unshiu	11110	1001	010	101	10001	11001	00000100	11001001
Aoshima unshiu	11110	1000	010	101	10001	11001	00000100	11001001
Nankan 20 Gou	11110	1001	010	101	10001	11001	00000110	11001001
Wilking	11110	1000	010	101	00001	11001	00000100	11001001
Clementine	11110	1001	010	101	00001	11001	00000110	11001001
Ponkan	11110	1001	010	101	11001	11001	00000010	11001001
Nankou	11110	1001	010	101	10001	11001	00000110	11001001
King mandarin	11110	1001	010	101	10111	11001	00000110	11001001
Willow leaf	11110	1001	010	101	00001	11001	00000110	11001001
Cara cara navel	11110	1001	010	111	01001	11001	00000010	11001001
Shirayanagi navel	11110	1001	010	111	01001	11001	00000010	11001001
Sanguilleli blood	11110	1001	010	111	01001	11001	00000010	11001001
Lane late	11110	1001	010	111	01001	11001	00000010	11001001
Hamlin	11110	1001	010	111	01001	11001	00000010	11001001
Hassaku	11110	1001	010	111	11011	11111	00000010	01001001
Natsu	11110	1001	010	111	10000	11111	00000010	01001001

Table 3. (Continued)

Cultivar	K14	L03	T04	W17	X20	Y05	Y14	Y15
	1	1	1		1	11	2221	111
	59854	1866	087	887	09875	40986	00058754	54098765
	55055	5550	050	500	00000	55055	85300505	00505055
	00000	0000	000	000	00000	00000	00000000	00000000
Kawano natsudaidai	01110	1001	010	011	10001	11101	00000010	11001001
Kiyomi	11110	1001	010	011	10001	11001	00000010	11001001
Shiranuhi	11110	1001	010	011	10101	11001	00000010	11001001
Seihou	11110	1001	010	011	11001	11001	00000010	11001001
Sanboukan	01111	1001	010	011	11001	11101	00000110	01001001
Iyo	01111	1000	010	001	11001	11101	00000010	01001001
Kinkouji	11110	1001	010	010	10001	11101	00000010	01001001
Tsunokaori	11110	1001	010	011	10001	11001	00000010	11001001
Shiikuwasa	11110	1001	110	001	00001	11001	00000010	11001001
Swingle citrumelo	11011	1101	010	010	00001	01101	00010011	01001001
Sour orange	11110	1001	010	011	00001	11101	00000010	01001101
Melanesian papeda	01110	1101	010	000	10100	01001	00001010	01001001
Mauritius papeda	01110	1101	010	001	01100	01001	00000010	01001001
Atalantia	01111	1101	000	000	00001	11001	00011010	01100101
Persian lime	01100	1010	010	011	00001	01001	00000010	01011001
Kao phuang	01110	1001	010	010	01001	01101	00000010	01001000
macrophylla	01110	1010	010	010	00001	01001	00001011	01010001
Sudachi	01110	1001	010	111	10101	11101	00000010	11001001
Calamondin	11110	1011	010	001	00001	11101	00010010	11001001
Yuma ponderosa	11110	1011	010	010	00011	01101	00000010	01011000
Myrtle-leaf	11110	1000	010	011	00001	11100	00000010	01001101
Bouquet de fleurs	11110	1000	010	011	00001	11100	00000010	01001101
Duncan	11110	1001	010	011	01001	11100	00000010	01001101
Triumph	11110	1001	010	010	01011	11100	00000010	01001001
Burgundy	11110	1001	010	011	01001	11100	00000010	01001101
L.F Tecla	01110	1010	010	011	00001	11001	00000010	01010100
Allen eureka	01110	1010	010	011	00001	11001	00000010	01010100
Rubidoux	00011	1100	100	000	00011	00011	00010001	00000000
Trifoliata	00011	1100	100	000	00000	00011	00010001	00000000
Flying dragon	00011	1100	100	000	00001	00011	00010001	00000000
Australian round lime	01010	1011	001	000	00010	01000	00001001	01001000
Murraya	01100	0000	000	100	10001	00000	10011010	00000010
Severinia disticha	01001	0100	000	011	01101	00101	00001010	11010000
Gillet's cherry org.	00000	0011	000	000	00001	01000	01000001	00100100
Nagami kumquat	01010	1010	010	001	10011	11100	00000000	01001001
Marumi kumquat	01010	1010	010	001	10001	11100	00100000	01001001

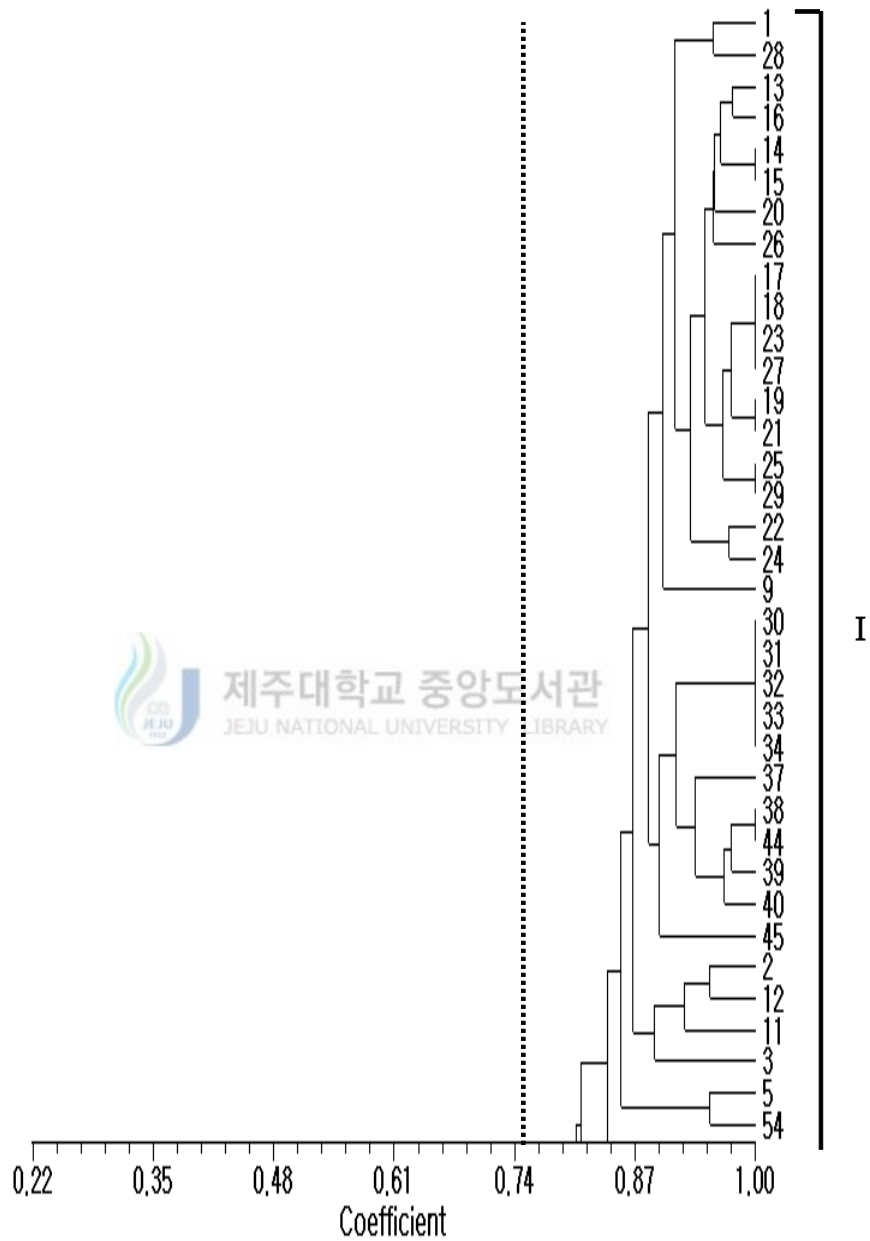


Fig. 10. Dendrogram obtained from the UPGMA cluster analysis by using 41 RAPD band of 62 varieties of the genus *Citrus* and 10 varieties of related genera

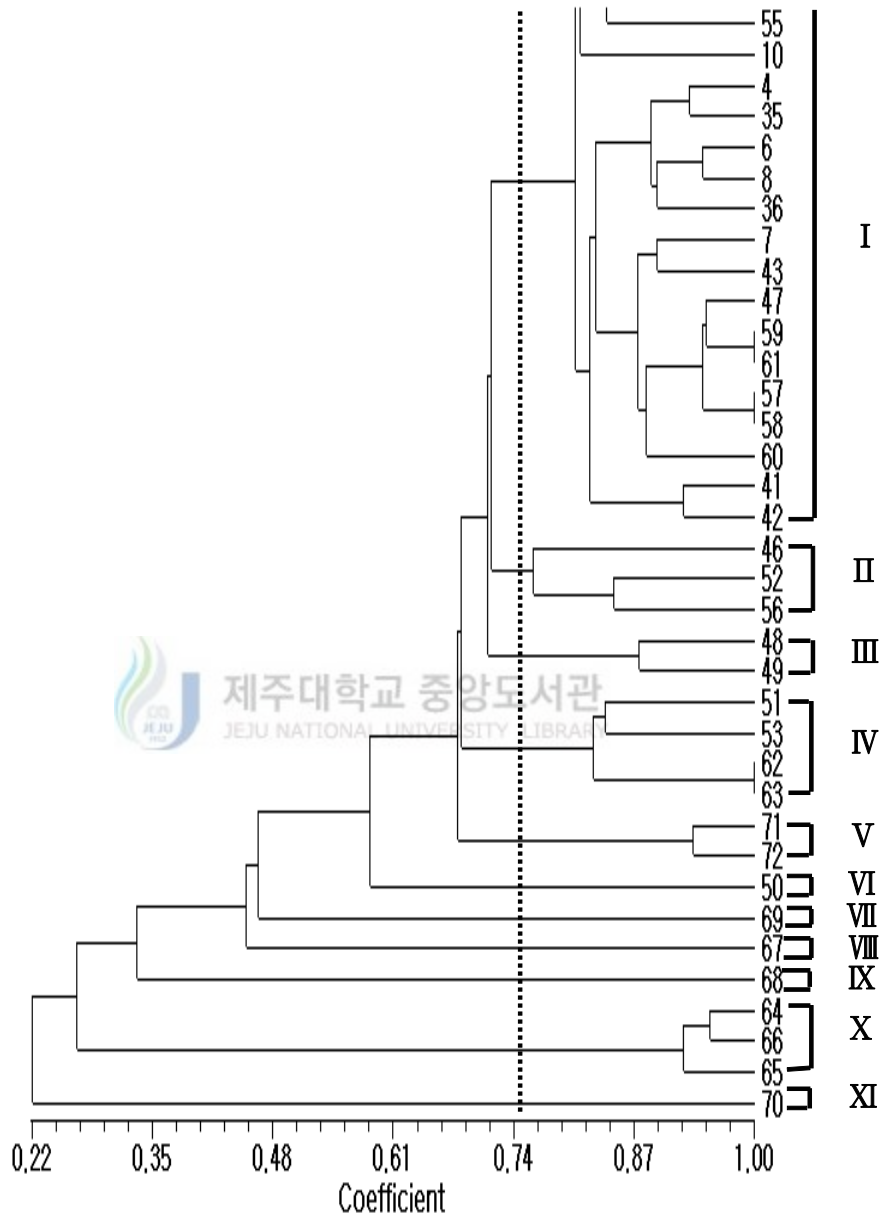


Fig. 10. (continued)

및 대부분의 재배종을 포함하고 있는 I 군을 세분하여 살펴보면 温州蜜柑과 tangerin, 陳橘, 인창굴이 유전적으로 가까움을 보여주고 있으며, orange와 tangor 계통인 淸見(40), 不知火(38), 淸峰(36), 津之香(44)등이 근연 관계에 위치하고 있었다. 柚子(5)와 Sudachi(28)가 근연 관계에 위치했는데 Sudachi의 유래를 추측할 때 柚子의 변이로부터 나왔을 가능성이 높다고 하였는데(松本官司 등, 1997) 본 실험 결과도 이와 유사한 결과를 보여주고 있었다. Grapefruit, 八朔, 夏橘, 三保柑, 伊預柑과 재래굴중 獅頭柑, 唐柚子, 洞庭橘, 扁橘등이 유전적으로 가까움을 보여주고 있다. 인창굴은 제주도 재래굴중 아직 분류가 되어있지 않은 품종(자연 교잡 실생)으로서 본 시험 결과에서 陳橘과 더불어 温州蜜柑과 근연 관계를 이루고 있는데 陳橘과는 OPX20 primer의 800bp, 750bp에서 温州蜜柑과는 OPX primer의 1,000bp에서만 밴드차이를 보이고 있었다. 형태적 특징으로는 과실의 크기, 과실 착색시기, 과피 돌기 현상 및 엽 형태에서 陳橘과 거의 유사한 특징을 보이고 있어 이들 품종에서 유래한 우연 실생일 것으로 추정된다.

기존 대분류 체계인 Swingle 분류법과 비교해 보면, 일부 품종에서 차이가 있는데 洞庭橘 과 扁橘이 温州蜜柑(Tangerin 포함)과 가까이 위치하여야 하나 八朔, 夏橘, grapefruit과 가까이 위치하였고, 只殼이 Sour orange, Myrtle-leaf 과 Bouquet defluers에 인접해 있어야 하나 温州蜜柑 및 orange와 가까이 있었다. 伊預柑이 Orange와 가까이 있어야 하나 grapefruit과 인접하여 있었다. 그 외 나머지 품종들은 대체적으로 Swingle 분류체계에 근접하는 결과를 보여주고 있었다. 소 분류 체계인 Tanaka 분류법과는 비교가 곤란하였는데 유사계수 0.9를 기준으로 하면 근접하는 결과를 보이고 있으나 이는 밴드차이가 2개 내외이고 밴드양상이 뚜렷하지 못한 minor 밴드들로서 실질적으로 분류하기에는 어려웠다. Citrus속 내의 種들을 유사계수 0.75수준에서 분류를 하기 위해서는 orange와 温州蜜柑을 기준으로 하여 산술적으로 계산했을 때 필요한 primer수와 polymorphic 밴드의 수가 본 시험에 이용한 것보다 2배는 더 있어야 보다 정확한 분류가 이루어 질 것으로 생각되었다.

4. 종합고찰

감귤류 RAPD를 위한 Total DNA를 추출 하는데 있어서 시료의 마쇄 단계에서부터 첫 원심분리후 DNA pellet을 얻기까지의 과정을 신속히 수행하는게 추출 전과정의 성공 여부를 좌우하는 매우 중요한 요소임을 알 수 있었다. 이것은 추출되는 DNA양의 감소를 초래하지만 RAPD는 PCR기법의 특성상 아주 소량의 DNA만 소요되기 때문에 본 시험을 수행하는 데에는 문제가 되지 않았다.

감귤류의 RAPD에 적합한 조건을 확립하기 위하여 Template DNA, dNTP, primer, *Taq* DNA polymerase등 몇 가지 요인을 대상으로 시험을 수행한 결과 template DNA 10~40ng, primer 10~40ng, dNTP 20~150uM, *Taq* DNA polymerase 1~2unit 가 각각 적합한 조건이었다. 그러나 이상의 요인은 RAPD를 수행하기 위한 최소한의 조건으로 Mg^{2+} 이온 농도와 *Taq* polymerase 농도의 상호효과, PCR을 수행하는데 따른 denaturation, annealing 및 extension 각각의 온도 수준 및 지속시간과 제조회사에 따른 PCR machine의 heating 방식이나 heating block의 재질 등이 RAPD 결과에 영향을 미칠 수 있는 조건들로서 보다 정밀한 조건확립을 위한 연구가 추후 수행되어야 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 10-mer primer를 이용했는데 8개의 Random primer를 대상으로 RAPD를 수행한 결과 총 90개의 밴드가 증폭되었으며 이중 41개의 band가 품종간 다양성을 보여주었다. 8개의 primer중 OPX20 primer의 900bp, 800bp, 700bp 밴드는 종간 차이뿐만 아니라 다른 primer에서는 잘 차이가 나지 않았던 温州蜜柑과 tangerin 사이 또는 종 내에서의 품종구별에 비교적 뚜렷하고 신뢰성 있는 밴드들을 보여줘 품종간 또는 잡종체 식별에 이용성이 있을 것으로 판단된다. 감귤속과 근연속 사이에서는 본 시험에 공시한 primer뿐만 아니라 감귤屬에서 차이가 거의 나지 않는 primer에서도 屬간 차이를 볼

수 있는 밴드들이 많이 나왔다. 특히 탕자屬과 *Microcitrus*屬은 대목으로 널리 쓰일뿐만 아니라 대목 육종을 위한 교배친으로도 많이 사용되고 있어 교배에 의한 대목 육종시 분자 marker 개발 등에 이용 가능성이 클 것으로 생각된다.

다형성이 인정되었던 41개의 밴드를 대상으로 집괴분석을 한 결과 DICE 유사계수 0.75를 기준으로 했을 때 전체 72品種을 11개 군으로 분류할 수 있었다. *Citrus*屬이 모두 4개의 군을 형성하였고 근연속들이 각각 1개씩 7개의 군을 형성하였다. 본 시험의 집괴분석 결과를 Swingle의 분류체계와 비교하여 보면 모든 種과 屬의 구분이 가능하였으나 유사계수를 바탕으로 한 品種간 위치는 일부 다른 결과를 보였다. Tanaka 분류체계를 기준으로 할 때에는 Myrtle-leaf과 Bouquet defluers, Clementine 과 Willow leaf 사이에서 각각 種간 구분이 되지 않았다. 그리고 種간 유사계수가 0.9이상일 때 차이를 보이는 밴드는 1~2개에 불과하였으며 밴드양상이 뚜렷하지 않은 경우가 많아 사실상 분류가 곤란하였다. RAPD가 여러 연구자들에 의해 지적됐듯이 재현성 또는 non-specific 밴드 증폭 등의 문제점들을 갖고 있는데 본 연구에서도 이러한 예를 찾을 수 있었다. 川野夏橘은 夏橘의 아조변이 品種으로서 통상적인 RAPD 결과에서는 아주 근연의 결과를 보여줄 것으로 예상되었다. 그러나 본 결과에서는 OPK14 primer의 1,550bp등 5개의 band에서 차이를 보였으며 温州蜜柑 내에서도 OPL03의 600bp, OPX20의 900bp가 温州蜜柑 간 밴드의 차이를 보여주고 있으나 밴드양상이 비교적 약한 minor 밴드들로서 品種 관별용 표지로서 이용은 어려울 것으로 보인다. 이러한 결과들은 種간 또는 같은 種내에 속하는 品種 및 아조변이체 간의 정확한 분류를 위해서는 RAPD 밴드중 밴드양상이 뚜렷하고 재현성있는 밴드만을 결과 분석에 이용한다든지 또는 보다 정밀한 실험 조건 확립, 그리고 많은 연구자(박 등, 1994; 박, 1995; 오, 1996)들이 지적하는 바와 같이 보다 많은 primer의 선발이 필요할 것으로 생각된다. 또한 RAPD 기법을 단독으로 이용하기 보다는 좀 더 정확한 분류를

위해서 RFLP 나 AFLP 기법을 병행(Paulo J. 1999) 하는 것이 좀 더 효율적 일 것으로 생각된다.

RAPD 결과중 육종적 측면에서 이용 가능한 분자 marker를 개발하고자 하였다. OPY14 primer의 750bp가 main 밴드에서 차이를 보여주었는데 温州蜜柑 및 Tangerin, 陳橘, 洞庭橘, 柑子, 瓶橘에서 밴드가 나타났지만 Orange를 비롯하여 이의 교배종인 tangor과 Tangerin 중 유일하게 Ponkan이, 그리고 근연속을 포함한 나머지 전 品種에서는 공통적으로 밴드가 나타나지 않았다.

이 밴드가 나타난 品種들은 살펴보면 Swingle의 분류법을 기준으로 할 때 삼보감을 제외한 모든 品種이 *C. reticulata*로서 Tangerin을 포함한 温州蜜柑 과 orange를 구별 할 수 있는 신뢰성 있는 밴드로 감귤 육종에서 서로간에 교배가 많이 이루어지고 있고 다배성인 두 그룹간의 잡종체 확인에 이용성이 클 것으로 판단된다. 이 밴드에 대하여서는 추후 전체 염기서열을 분석하여 이를 바탕으로 한 primer 제작을 통해 전통적인 교배 육종에 이용할 수 있는 분자 marker 개발에 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 OPK14 primer 800bp 밴드, OPL03 primer의 850bp, 600bp 밴드, OPY14 1500bp 밴드 등은 탕자와 grapefruit 그리고 이의 교배종인 Swingle citrumelo에서 교배 양친 간에는 밴드 존재 유무가 차이가 나고 교배종인 Swingle citrumelo는 교배부분인 탕자와만 밴드 유무가 일치하고 있으며, OPW17 primer의 800bp는 각각 공통적으로 温州蜜柑에는 없고, orange 및 淸見(38번)등의 tangor에는 나타났는데, 이러한 밴드들도 감귤 교배 육종시 주심배와 교잡배를 구분 하는데 이용 가능성이 있다고 생각된다.

이러한 결과들은 RAPD가 감귤 육종 연구에 이용할 수 있는 가능성을 보여주었고, 品種 육성 연구 발전을 위한 기초 자료로서 가치가 있다고 생각한다.

IV. 요약

본 연구는 RAPD를 위한 PCR 적정조건을 구명하고 RAPD를 이용하여 72 품종의 감귤屬(35 종, 7 교배종) 및 근연屬(7속)의 유연 관계를 밝히고자 수행하였으며 주요 결과는 아래와 같다.

1. RAPD를 위한 적정 PCR 조건으로 반응액 최종부피 25ul에 필요한 template DNA의 양은 10~40ng, primer의 양은 10~40ng, dNTP의 농도는 50~150uM, *Taq* DNA polymerase의 양은 1~2unit 였다.

2. 168개의 primer를 검토하여 品種간 DNA의 다형성을 보이는 8개의 primer를 선발하였고, 이들 primer를 사용하여 RAPD를 수행한 결과 품종간 차이를 보이는 DNA 밴드는 41개였다.

3. 41개 밴드를 대상으로 品種별 유연관계를 조사한 결과 본 시험에 이용된 72品種은 감귤속 4군 및 근연속 7군등 총 11개 군으로 분류되었다. I 군에는 温州蜜柑, orange, tangerin, grapefruit 및 이들의 교잡종 대부분이 포함되었으며 II 군에는 Swingle citrumelo, Kao Phuang, Yuma ponderosa, III 군에는 Melanesian papeda, Mauritius papeda, IV 군에는 Lemon, Persian lime, macrophylla가 포함되었다. 그리고 근연속인 금감속, *Atalantia*, *Severinia disticha*, Australian round lime, *Murraya*, *Poncirus*속, Gillet's cherry orange 가 V 군에서 XI 군까지 각각 1개씩의 군을 이루었다.

4. RAPD를 이용했을 때 감귤의 대부분의 종과 근연屬을 분류, 동정할 수 있었다. 그러나 濶州蜜柑, orange, lemon 등에서는 같은 종내의 일부 品種간에는 차이가 없었다.



IV. 참고문헌

Cristofani, M., M.A. Machado and D. Grattapaglia. 1999. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata*(L.) Raf. and mapping of *Citrus tristeza* virus resistance gene. *Euphytica*, 109(1):25-32.

Elisiario, P.J., E.M. Justo and J.M. Leitaó. 1999. Identificatio of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 81. 289-299

Federici, C.T., D.Q. Fang, R.W. Scora and M.L. Roose. 1998. Phylogenetic relationship within the genus *Citrus*(*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theror Appl Genet.* 96. pp 812-822.

Filho, H.D.C., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C.P. Moreira and J. Jr. Pompeu. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins(*Citrus* spp.) using RAPD Markers. *Euphytica*. 102(1):133-139

Filho, H.D.C., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon and J. Jr. Pompeu. 2000. The use of random amplified polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin(*Citrus reticulata* Blanco) accessions. *Genetics and Molecular Biology.* 23:169-762.

Fo, F.A.A.M., F.C. Jr. Gmitter, J.W. Grosser. 1996. New tetraploid breeding parents for triploid seedless *Citrus* cultivar development. *Fruit Varieties Journal*, 50(2):76-80.

Guo, W.W., X.X. Deng and H.L. Yi. 2000. Somatic hybrid between navel orange(*Citrus sinensis*) and grapefruit(*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* 116:281-285

Levi, A., Lisa J. Rowland, and John S. Hartung. 1993. Production of Reliable Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Markers from DNA of Woody Plants. *HortScience* 28(12):1188-1190.

Luro, F., L. Frederic, B. Joseph-Marie and O. Patrick. 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA(R.A.P.D) to Citrus Genetics and Taxonomy. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, pp. 225-228.

Luro, F., L. Frederic, B. Joseph-Marie and O. Patrick. 1995. DNA Amplified Fingerprinting, A Useful Tool for Determination of Genetic Origin and Diversity Analysis in Citrus. *HortScience* 30(5):1063-1067

한봉훈. 1996. RAPD를 이용한 온주밀감의 품종식별. 제주대학교 석사학위논문. pp. 21.

한해룡, 권오균. 감귤원예신서. 선진문화사. pp. 58-71.

Hyun, J.W., L.W. Timmer, Lee, S.C., Yun, S.H., Ko, S.W., and Kim, K.S.. 2001. Pathological Characterization and Molecular Analysis of *Elsinoe* Isolates Causing Scab Diseases of Citrus in Jeju Island in Korea. *Plant disease*, vol. 85:1013-1017

岩政正男. 1976. 柑橘の品種. 靜柑運.

김한용. 1988. 제주 재래 감귤(Citrus spp.)의 분류와 유용형질 및 유전표식에 관한 연구. 전남대학교 박사학위논문.

Kennard, W.C., K. Poetter, A. Dijkhuizen and V. Meglic. 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. Theor Appl Genet 80:42-48.

이명렬, 류영진, 정태영, 박용환. 1993. 동위효소 및 DNA 표식인자에 의한 제주 감귤류의 품종분류. 농진청 농업논문집 35(2) : 193-197.

Mendes-da-Gloria, F.J., de Assis Alves Mour ao Filho F., L.E.A. Camargo, B.M.F. Mendes. 2000. Caipira sweet orange+Rangpur lime: A somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian Citrus industry. Genetics and Mocular Biology, 23(3):661-665.

Mestre, P.F., M.J. Asins, J.A. Pina, E.A. Carbonell and L. Navarro. 1997. Molecular markers flanking Citrus tristeza virus resistance gene from Poncirus trifoliata(L.) Raf.. Theoretical and Applied Genetics. 94:458-464

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

문두길. 1986. 제주 재래 감귤의 동위효소 분석과 교잡실생의 조기식별 방법에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문.

Nicolosi, E., Z.N. Deng, A. Gentile, S. La. Malfa, G. Continella and E. Tribuato. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theror Appl Genet.* 100. pp. 1155-1166.

농림부. 1997. '97과수실태조사.

Omura, M., R. Motohashi, T. Matsuyama and Akihama T.. 1992. DNA Fingerprinting in *Citrus* Cultivars. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 221-224

박한용. 1995. RAPD와 RFLP를 이용한 복숭아 품종 판별용 표지의 선발. 서울대학교 박사학위논문. pp. 14-21.

Rohlf, F.J.. 1990. NTSYS-PC, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.60. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY11794.

Russo, M.P., M. La Rosa, A. Astuto and G.R. Recupero. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis of selfed progeny for the understanding of the genetic origin of some lemon cultivars. *Advances in Horticultural Science.* 12(2):85-88.

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

Saunt, J., 2000. Citrus Varieties of the world. Sinclair International Limited, England.

Swingle, W.T. and P.C. Reece. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In : W. Reuther, L.D. Batchelor, and H. H. J. Webber(eds.). The Citrus industry. Vol. I. Univ. Calif. Div. Agri. Sci. Berkley, Calif.

Yoshimura, S., A. Yoshimura, Rebecca J. Nelson, Twng Wah Mew and N. Iwata. 1995. Tagging *Xa-1*, the Bacterial Blight Resistance Gene in Rice, by Using RAPD Markers. Breed Science 45 : 81-85.

양경애. 1999. 삼보감(*Citrus sulcata* Takahashi)과 오렌지(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel)와의 원형질체 융합. 제주대학교 석사학위 논문.



오진보, 문두길, 한해룡, 김한용. 1996. RAPD를 이용한 제주 재래 감귤의 DNA 다형분석. 한국원예학회 논문발표요지 : 184-185

예병우. 1994. RAPD를 이용한 사과 품종의 분류와 품종 판별 표지의 선발. 서울대학교 박사학위논문.