

농수산기술개발사업

차나무의 품종화 및 우량품종 보급을  
위한 세포 및 분자적 연구

(1차년도 중간보고서)

1995년 12월

주관연구기관 순천대학교

농림수산부



# 중 간 보 고 서

과 제 명 : 차나무의 품종화 및 우량품종 보급을 위한 세포 및 분자적 연구

1995년도 농수산기술개발사업에 의하여 연구개발 중인 차나무의 품종화 및 우량품종 보급을 위한 세포 및 분자적 연구에 관한 연구개발사업의 1차년도 중간보고서를 붙임과 같이 제출합니다.

붙 임 : 중간보고서 20부

1995년 12월 15일

주관연구기관장 : 순천대학교총

총괄연구개발책임자 : 이 선 하



농 립 수 산 부 장 관 귀 하

# 농수산물기술개발사업 중간보고서

1. 과 제 명 : 차나무의 품종화 및 우량품종 보급을 위한 세포 및 분자적 연구

2. 연구개발사업 목표

가. 최종연구 개발사업 목표

- 1) 국내외 차나무의 유전자원 확보와 분석
- 2) 차나무의 세포, 분자유종적 연구를 통한 우량종 육성
- 3) 차나무의 유용 marker의 탐색, 개발 및 육종사업에 활용
- 4) 우량 품종의 조직배양을 통한 대량증식방법 확립

나. 당해년도 연구개발 목표

- 1) 유전자원의 확보 및 우량품종 도입
- 2) 재분화계 확립
- 3) 품종분화의 RAPD분석
- 4) 차 엽록체 DNA의 추출과 분석

3. 계획대비진도표(1차년도)

※ 당초 사업계획서상의 연구개발사업 추진계획에 대하여 작성

구 분 연구개발내용	연 구 개 발 기 간												진 도 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1) 유전자원 확보 및 우량 품종 도입													100%
2) 재분화계 확립													100%
3) 품종 분화의 RAPD 분석													100%
4) 엽록체 DNA 추출과 분석													100%
총진도율													100%

※ 당초계획은 ————으로, 진도는 ————으로 표시

(진도설명)

(1) 유전자원 확보 및 우량 품종 도입

국내 지역의 수집목표 40지역에서 6개 지역 추가

외국 품종은 1차년도 수집분 25품종

(2) 재분화계 확립

callus에서 유기된 식물체의 기내 삽목중(300개체)

(3) 품종 분화의 RAPD 분석

완결하여 차학회지에 투고

(4) 엽록체DNA(cpDNA)의 추출과 분석

차의 엽록체 DNA의 추출 방법의 확립 및 library 작성

5. 주요연구개발 사업내용 및 중간결과

가. 유전자원 확보 및 우량 품종 수집

- 1) 국내 자생지 46개지역 차품종 수집
- 2) 일본 차 25 품종 분양(静岡 野菜 茶業試驗場)

나. 재분화계 확립 (별첨 1 참조)

1) 차나무 의 기관별 Callus 유도

- 가) 재료 및 방법:
- 0 국내 야생차 잎, 절간, 절간표피조직 이용
  - 0 MS배지, 0.75%한천, pH 5.8, Sugar 3%
  - 0 2,4-D, BA, NAA, Kinetin, IBA의 5 식물호르몬 조합
  - 0 배양온도 26℃, 암흑조건, 50일 배양

- 나) 결과:
- 0 엽절편의 Callus 유도율은 제1엽이 가장 높았다.
  - 0 줄기절편에서는 제 1, 2 절간의 Callus 분화율이 높았다.
  - 0 표피조직에서는 완전한 절간의 60% Callus 형성율로 나타났다.
  - 0 식물호르몬 조성에서는 IBA와 BA 조합이 효과적이었다.

2) 대량증식 방법 확립

\* 기내 삽목에 의한 shoot 분화 및 발근력 조사(별첨 1 사진 참조)



다. 품종 분화의 RAPD 분석(별첨 2 참조)

1) 재료 및 방법:

0 분석식물 한국자생차 23개 지역 23개체  
일본녹차 25품종

0 genome DNA 추출 : CTAB법

0 RAPD 분석: 20개 primer 사용

0 PCR조건: predenature 94°C for 2min. - denature 94°C for 30sec.  
- annealing 36°C for 1min. - extension 72°C for 2min.  
15cycles - denature 94°C for 30sec. - annealing 45°C  
for 1min. - extension 72°C for 2min. 25cycles  
- postextension 72°C for 10min. - soaking 4°C

0 전기영동: 1.5% agarose gel, 4V/cm running.

2) 결과

0 20개의 primer를 사용한 RAPD 분석에서 212개 DNA 단편 검출  
0 각 primer 별, 개체별 단편수는 5-16개로 변이, 크기는 250-3000bp  
0 40개의 개체 특이적 유전자 marker 검출  
0 녹차 품종 및 국내 지역별 개체군을 5개 유전적 집단군으로 구분  
0 일본 녹차 품종내에는 한국 야생차의 유전자가 섞여 있는 것으로 판명

라. 엽록체 DNA(cpDNA)의 추출과 분석(별첨 3 참조)

1) 엽록체 DNA 추출 방법 확립

0 분석종: 국내 야생종(전남 향림사)

0 cpDNA 추출 방법: - 50g 차 잎 채취  
- 액체질소에 넣어 1500-1800rpm으로 분쇄

- Tris-HCl+EDTA+BSA 용액으로 total DNA 추출
- gradient 용액(Sucrose+Sorbital+Tris-HCl+EDTA)에서 cpDNA 분리
- proteinase 처리로 protein 제거
- DNA 추출 방법으로 cpDNA 추출
- agarose gel 전기영동
- 시금치 유래의 cpDNA probe로 cpDNA 확인

- 0 결과:
- 차 엽록체 DNA의 genome 크기는 약 133.96 Kbp였다.
  - Plasmid vector 및  $\lambda$  Phage vector를 이용하여 엽록체 DNA의 library 작성

## 6. 기대되는 성과

- 0 국내외로 부터 많은 차나무 변이종과 품종이 수집되어 품종육성을 위한 유전자원이 확보된다.
- 0 각기관(잎, 줄기, 경정)으로 부터 조직배양에 의한 재분화계를 확립하여 단기간에 우수품종의 대량증식이 가능해진다.
- 0 RAPD분석에 의한 종 특이적 marker가 탐색되어 차나무의 동정, 분류가 분자적 차원에서 가능해진다.
- 0 cpDNA의 제한효소 mapping의 기초단계를 확립한다.



# 별첨 1

## 國內 야생차의 잎과 줄기 배양에 따른 Callus 誘導

Callus Induction in Leaf and Stem Segment Cultures of Korean Spontaneous Tea Plant

### 1. 서론

식물 바이오테크놀로지의 활용은 그 기술의 급속한 진전에 따라 농작물의 종묘 생산에 큰 공헌을 하고 있다. 현재 조직 배양을 통하여 상업적으로 종묘 생산이 되고 있는 작물은 100종을 넘고 있다. 특히 채소류(감자, 딸기, 마늘 등) 및 화훼류(안개꽃, 카네이션, 미니장미, 심비디움 등)에 있어서 무균병주 생산 및 번식용도로도 조직배양의 기술이 활용되고 있다.

조직배양을 이용해서 종묘를 생산하는 경우에 있어서 그 목적은 크게 2가지로 분류된다. 즉, Callus나 체세포로부터 부정아나 액아 등을 소재로 하여 clone을 증식하는 측면과, 무병주묘의 육성 및 유전 자원을 보호하는 측면으로 대별 된다. 이러한 방법의 체계화는 유전적 변이의 확대, 육종 기간의 단축, 2차산물의 생산 등에도 불가결한 기술로써 중요한 의미를 갖는다. 일반적으로 부정 기관의 분화는 초본성 식물보다 목본성 식물이 더 어려운 것으로 알려져 있다. 목본성 식물에서는 체세포성 조직을 배양하여 재분화계를 확립한 예가 그다지 많지 않으며, 재분화율도 대체로 저조하다.

차에 있어서 callus 증식율을 높이기 위한 배양 방법이나 배양 조건에 대한 검토는 주로 일본 학자들에 의해 보고되고 있다(Doi 1981; Kato et al. 1990; Kuranuki 1978, 1986, 1992; Nakamura 1987, 1990; Shibata 1993). 그 중에는 배양 온도, 유리 아미노산 농도, 다당류의 영향 등을 검토한 예도 있으며, 기관별, 부위별 재료 채취 시기별 및 품종별로 callus 유도에 관한 보고도 있다(Doi 1983a, b; Kim 1986; Nakamura 1984). 그러나 대부분의 보고는 일본의 육성품종을 대상으로 실시한 것이며, 우리나라의 자생종을 대상으로 보고된 예는 미진한 상태이다. 본 연구에서는 국내 자생종을 재료로 이용하여 배지 조건에 따른 기관별 및 부위별 callus 유도율을 검토 하고자한다.

### 2. 재료 및 방법

#### 1. 葉切片의 培養

1995년 6월 1-10일 사이에 전남 강진군에 소재하는 (주)장원산업에서 재배중인 국내의 자생종으로부터 전정후 새로 나온 5엽 개엽기의 신초를 이용하였다. 생장점 부위로부터 제 1엽, 제 2엽 및 제 3엽을 절취한 후 70% 에탄올 용액에 20초간 각반 하면서 침지 시켰다. 그후 3% calcium hypochlorite 용액으로 10분간 살균하여 멸균수로 수세 하였다.

엽절편은 무균 샐레 상에서 주맥과 측맥간의 조직을 이용하여 약 7×7 mm의 크기로 조제하였다. 엽절편의 치상수는 시험관당 1개로 하여 한천 배지상에 치상하였다. 사용한 시험관은 직경 25mm, 길이 150mm 로 배지량은 15ml을 넣었다. 한천 배지는 MS 배지(Murashige and Skoog 1962)를 기본으로 하였으며, 한천농도 0.75%, pH 5.8, sugar농도 3%, 식물생장 호르몬 조건을 5가지로 하였다 (A: 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA, B: 10mg/L NAA + 10 mg/L BA, C: 2 mg/L IBA + 4 mg/L BA, D:  $10^{-4}$  mg /L NAA +  $10^{-4}$  mg /L Kinetin, E: 4 mg/L IBA + 2 mg/L BA).

배양온도는 26℃로 일정하게 하였으며, 광조건은 암흑 상태로 유지하였다. Callus 유도율은 치상 후 30, 40 및 50일 후에 조사하였으며, callus 는 크기에 따라 4등분으로 구분하였다(G<sub>0</sub>: callus없이

생존해 있는 절편, G<sub>1</sub>: 절편의 일부를 덮은 callus, G<sub>2</sub>: 절편의 상측 전 표면을 덮은 callus, G<sub>3</sub>: G<sub>2</sub> 보다 큰 callus). 그 예를 Photo. 1에 나타냈다.

## 2.2 莖切片의 培養

엽절편의 채취와 동일한 시기인 5엽 전개기의 신초로부터의 절편을 이용하였다. 성장점 방향으로부터 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 절간별로 나누었으며, 제 2 및 제 3 절간으로부터는 유관속을 제외한 표피조직만을 분리하여 시료로 이용하였다. 시료의 크기는 3-4 mm로 절단하여 치상하였다.

멸균방법, 시험관 크기, 배지량, 배지의 종류, 배양조건 및 측정방법은 엽절편의 배양과 동일하였다. 또한 엽절편 및 경절편 공히 1 시료 배지당의 공시 시험관 수는 50본 이었다.

## 3. 실험 결과 및 고찰

### 3.1 신초의 공시기관별 및 부위별 callus 유도율

호르몬조성에 따른 공시 기관별 callus 유도율을 종합한 결과를 Table 1에 나타냈다. 엽절편 및 경절편에서 공히 갈변화된 조직과 오염된 조직이 다수 나타났다. 엽절편에서는 오염율(19.6%)보다 갈변화(32.8%)되는 경향이 높았으며, 경절편에서는 오염율(30.96%)이 대단히 높았다. 특히 제 2 및 제 3 절간의 표피조직은 callus유도 없이 생존하여 있는 절편을 관찰 할수 없었다.

엽절편에 있어서 갈변화의 경향이 높은 원인은 분명하지는 않지만 살균제의 종류, 농도 및 시간 등이 요인이므로 이 요인들의 적정화로 갈변율을 낮출 수 있다고 생각되었으며, 시료 채취가 1번차기에 가까울수록 갈변화율은 높아질 것으로 생각되었다. 초기의 차 조직배양에 있어서 어려웠던 점은 오염율이 타 식물에 비교하여 높았던 것이었다. 살균농도에 있어서도 calcium hypochlorite 3-10% 범위에서 실험자에 따라 그 폭이 넓은 것을 알 수 있으며 (Kuranuki and Shibata 1992, 1993; Nakamura 1991; Nakamura and Shibata 1990), 살균 시간과의 조합에 있어서 최적조건을 잡기가 어려운 것은 시료 채취시기, 절편의 생육단계, 기관 및 부위별로 조직의 생육이 각각 다르기 때문이라고 생각되었다.

### 3.2 치상후 경과일수에 따른 기관별 callus 유도율

치상일수에 따른 기관 및 부위별 callus 유도율을 Table 2에 나타냈다. 치상후 30일째(DAI 30)의 관찰에서 제 2, 3엽보다 제 1 엽의 callus 유도율이 높았으며(Fig. 1) DAI 30, 40 및 50에 있어서 유도율은 제 1 엽(L1) > 제 2 엽(L2) > 제 3 엽(L3) 순이었다(Fig. 2). 제 3 엽에 있어서 DAI 30 보다 DAI 40에서 유도율이 감소한 것은 오염이 원인이었다. 치상후 50일째의 경절편에 있어서 제 1 절간이 58.4%로 가장 높은 유도율을 나타냈으며 제 1 절간(S1) > 제 2 절간(S2) > 제 3 절간(S3) > 제 4 절간(S4) > 제 2, 3 절간의 표피조직(EL)의 순이었다(Fig. 3).

S1에 있어서는 DAI 30에서 40 사이에 높은 유도율을 나타냈으며(40%→55%), DAI 30과 DAI 50 간에는 약 20%의 증가율을 나타냈다. S2는 치상후 경과일수에 따라 점진적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4). 경절편으로부터의 표피조직의 callus 유도율은 완전한 경절편의 60%정도를 나타냈다(Fig. 3). 이러한 결과는 세포조직이 많은 손상을 입었기 때문으로 판단되었으며, 치상후 경과일수에 따라 점진적으로 유도율은 증가하는 경향을 보였고, 치상후 50일째는 약 30%의 분화율을 나타냈다(Fig. 5). 이러한 결과는 Nakamura(1985a)가 보고한 결과와 다소 상이한 점이 있었다. 그의 보고는 배양 65일 후의 조사에 있어서 callus화율은 제 2 절간이 91.6%로써 가장 높았고, 그 다음이 제 5 절



간(89.5%) > 제 3 절간(88.6%) > 제 4 절간(85.3%) > 제 1 절간(58.1%)의 순이었다. 상이함의 원인은 시료 채취시기에 기인 되었다고 생각된다. 그는 1 번차기의 신초를 사용하였으며(4월말), 본 실험의 채취시기는 3번차기 후의 전정후 도장지를 이용하였기 때문에 제 1 절간의 생육단계가 진전되어 1 번차기의 제 2, 3 절간과 유사한 성장 및 발육정도를 갖는 시기일 것으로 추론 할 수 있었다.

엽절편의 경우는 경절편에 비하여 callus유도율이 낮았다(DAI 50, 엽절편 : 경절편 = 45.2% : 56.0%). 이것은 경절편에 비하여 엽절편은 세포 분열능이 낮은 것으로 해석되며 Toi(1983)의 보고와도 일치하였다.

### 3.3 호르몬조성에 따른 callus의 크기

공시기관별 및 호르몬조성별로 callus 크기의 관찰결과를 Table 1에 나타냈다. 제 1 엽절편에 있어서 C, D 및 E 호르몬조성은 A 및 B 호르몬조성에 비교하여 G<sub>1</sub> 크기의 callus가 많이 유도 되었으며, 제 2 및 제 3 엽절편일수록 호르몬조성별의 효과가 없어졌다. 그러나 전반적으로 엽절편에서는 G<sub>1</sub> 이 G<sub>2</sub> 및 G<sub>3</sub> 보다 많았다. 경절편에서는 C 및 E 호르몬조성이 60-70% 정도의 callus유도율을 보였으며, G<sub>3</sub> callus는 C 호르몬조성에서 많이 나타났다.

경절편의 표피조직에 있어서 C호르몬조성은 다른 조성보다 3-4배의 G<sub>3</sub> callus를 유도하였다. 경절편에 있어서 callus의 크기는 제 1 절로부터 제 4 절로 갈수록 약간씩 커지는 경향을 알 수 있었다. 즉 호르몬 종류 및 조성에 있어서 신속한 callus증식을 유도하기 위해서는 2-4 mg/L사이의 IBA와 BA가 적당하였으며, 차의 callus유도에 있어서 IBA와 BA의 조합이 2,4-D 나 NAA 조합보다 유리하다고 판단되었다.

### 3.4 호르몬조성에 따른 기관별 callus 유도율

엽과 경절편을 합하여 호르몬조성별 callus유도율을 Fig. 6에 나타냈다. C 및 E 호르몬조성은 각각 A 및 B 호르몬조성에 비교하여 약 3배의 유도율을 나타냈으며, BA를 포함한 한천배지는 callus 증식에 대하여 유효하지 않다고 보고한 Nakamura등(1984)의 결과와는 상반되었다. 그러나 BA농도가 높을 수록 증식율이 저하하는 경향은 일치하였으며 호르몬간의 길항작용(특히 BA 와 2,4-D 및 NAA간)이 나타나는 것이 그 원인으로 생각되었다.

엽절편에 있어서 호르몬조성별 callus 유도율을 Fig. 7에 나타냈다. 앞에서 기술한 바와 같이 각 호르몬조성에서 공히 L1 > L2 > L3의 순으로 callus 분화율이 높았으며 D > C > E > B > A의 호르몬조성 순으로 callus분화율이 높게 나타났다. 엽절편에서는 NAA와 Kinetin조합이 IBA와 BA 조합보다 우수한 결과를 나타냈다. Toi(1983a)의 보고에서도 엽조직에 있어서는 NAA농도를 10<sup>-4</sup>M로 할 경우는 Kinetin 농도를 10<sup>-4</sup> 및 10<sup>-5</sup>M 조건에서 callus유도율이 가장 높았다고 하였다. 또한 약배양의 callus유도율에 있어서도 10<sup>-5</sup>M NAA + 10<sup>-5</sup>M Kinetin 조합이 가장 높은 결과를 나타냈다고 보고하였다(Toi, 1983b).

경절편에 있어서 호르몬조성별 callus유도율을 Fig. 8에 나타냈다. 경절편 전체에 있어서는 E > C > D > B > A의 호르몬조성순으로 callus화율이 높았으며, 절간별에 있어서 S1 및 S4는 C > E > D > B > A의 순, S2 및 S3에서는 각각 E > C > B > D > A 및 E > C > D > B > A의 순으로 callus화율이 높았다. 어느 절편에서도 A 호르몬조성이 가장 낮은 callus화율을 나타냈다. 필자 등의 견해로서는 제 1 절편은 너무 어린 생육단계이며, 제4 절편은 경화 정도가 높기 때문에 조직의 분화능이 낮은 것으로 추정되었으며, 제 2 및 제 3 절간이 최적의 분화능을 갖고 있다고 판단되었다.

Nakamura(1988, 1989)는 가을에 채취한 야부기따의 신초로부터 경절편간의 callus유도율을 조사

하였다. 그의 보고에 의하면 callus화율은 제 2-5 절간의 경우 85-95%로 높았지만, 제 1 절간에서는 낮았다고 하였다. 경절편의 표피조직에 있어서 호르몬조성별 callus 유도율을 Fig. 9에 나타냈다. C 및 E 호르몬조성은 약 45%이상의 callus화율을 나타냈으며, A 및 B 호르몬조성보다 약 3배 높았다. 이 결과는 Kato(1985)가 보고한 바와 같이 동일한 조건의 43.6%와 거의 일치하였으며, 완전한 경절편의 4%에 비교하여 부정아 형성율이 22.2%로 약 5.5배 높은 것으로 보고되었다. 표피조직만의 배양의 경우 callus 분화율은 낮으나 부정아 형성율이 높은 원인은 분명히 밝혀지고 있지 않지만, *Torenia fournieri*(Chlyah, 1974)에서도 보고된 바가 있다.

#### 4. 적요

국내 자생차를 이용하여 기관별, 부위별 및 호르몬조성별로 callus유도율을 검토한 결과는 다음과 같다.

- 1) 엽절편은 경절편에 비하여 갈변화율이 높았으며(32.8%), 경절편은 엽절편에 비하여 오염율이 높았다(30.96%).
- 2) 치상후 경과일수별 엽절편의 callus유도율은 L1(45.2%) > L2(35.2%) > L3(30.0%)의 순이었다.
- 3) 치상후 50일째의 경절편에있어서 callus화율은 S1(58.4%) > S2(56.0%) > S3(50.0%) > S4(45.2%) > EL(30.0%)의 순이었다.
- 4) 제 2, 3절간으로 부터의 표피조직의 callus유도율은 완전한 경절편의 60%정도를 나타냈다.
- 5) 엽 및 경절편에 있어서 callus화율을 높이기 위해서는 2-4 mg/L 범위의 IBA 와 BA조합이 필요하였으며 이것은 2,4-D와 NAA 조합보다 유리하였다.

#### 5. 인용문헌

- Chlyah, H. (1974) Inter-tissue correlation in organ fragments. Organogenetic capacity of tissue excised from stem segments of *Torenia fournieri* Lind cultured separately in vitro. *Plant Physiol.* 54, 341-348.
- Doi, Y. (1981) Frequency of root differentiation in anther culture of tea. *Study of Tea.* 60, 1-3.
- Doi, Y. (1983a) Callus induction and root differentiation in stem and leaf segment cultures of tea plant. *Study of Tea.* 57, 7-11.
- Doi, Y. (1983b) Varietal differences of callus induction rate and root differentiation rate in anther culture of Tea. *Study of Tea,* 57, 13-17.
- Kato, M. (1985) Regeneration of plantlets from tea stem callus. *Journ. J. Breed.* 35, 317-322.
- Kato, M., N. Haruyama and S.Kako (1990) Somatic embryogenesis from leaf culture of plants. *Japan J. Plant Breed. Letters* 40, 4108-109.
- Kim, J. S. (1986) Studies on propagation of korean tea plant by tissue culture. *Jour. Korean For. Soc.* 75, 25-31.
- Kuranuki, Y. (1978) Effects of sucrose and growth substances concentration of medium on the formation of multicellular pollen grains in anther culture of tea plant. *Study of Tea.* 48, 11-15.



- Kuranuki, Y. (1986) Effects of transplantation on division of pollen grains in anther culture of Tea Plant. Study of Tea. 64, 7-10.
- Kuranuki, Y. (1992) Effects of sampling time of seeds, desiccation of excised axes, and combinations of plant growth regulators on the tea embryonic axes culture. Tea Research Journal. 76, 1-8.
- Kuranuki, Y. and Shibata, M. (1992) Effects of concentrations of plant growth regulators on the shoot apex culture of tea plants. Tea Research Journal. 16, 1-6. Kuranuki, Y. and Shibata, M. (1993) Improvement of medium components for *in vitro* cutting of tea plant, (2) Optimum concentration of plant growth regulator. Tea Research Journal. 77, 47-55.
- Murashige, T and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiol. Plant 15, 473-497.
- Nakamura, Y. (1985) Effects of origin of explants on differentiation of root and its varietal difference in tissue culture of tea plant. Study of Tea. 62, 1-7.
- Nakamura, Y. (1987) Shoot tip culture of tea cultivar Yabukita. Study of Tea. 65, 1-7.
- Nakamura, Y. (1988) Efficient differentiation of adventitious embryos from cotyledon culture of *Camellia sinensis* and other *Camellia* species. Tea Research Journal. 67, 1-11.
- Nakamura, Y. (1989) Differentiation of adventitious buds and its varietal difference in stem segment culture of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Tea Research Journal. 70, 41-49.
- Nakamura, Y. (1990) Effects of sugars on the formation of adventitious buds and the growth of axillary buds in tissue culture of tea. Bull. Shizuoka Tea Exp. stn. 15, 1-5.
- Nakamura, Y. (1991) *In vitro* propagation techniques of tea plant. Tea Research Journal. 74, 31-38.
- Nakamura, Y. Ohira, K. and Ojima, K. (1984) Cultivation and characteristics of tea callus. Study of Tea. 60, 7-14.
- Nakamura, Y. and Shibata, M. (1990) Micropropagation of tea plant (*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze) through *in vitro* cuttings. Tea Research Journal. 72, 9-17.
- Shibata, M. and Y. Kuranuki (1993) Improvement of medium components for *in vitro* cuttings of tea plant. (1) Effects of concentrations of some components of MS medium and comparison between MS medium and woody plant medium. Tea Research Journal. 77, 39-45.



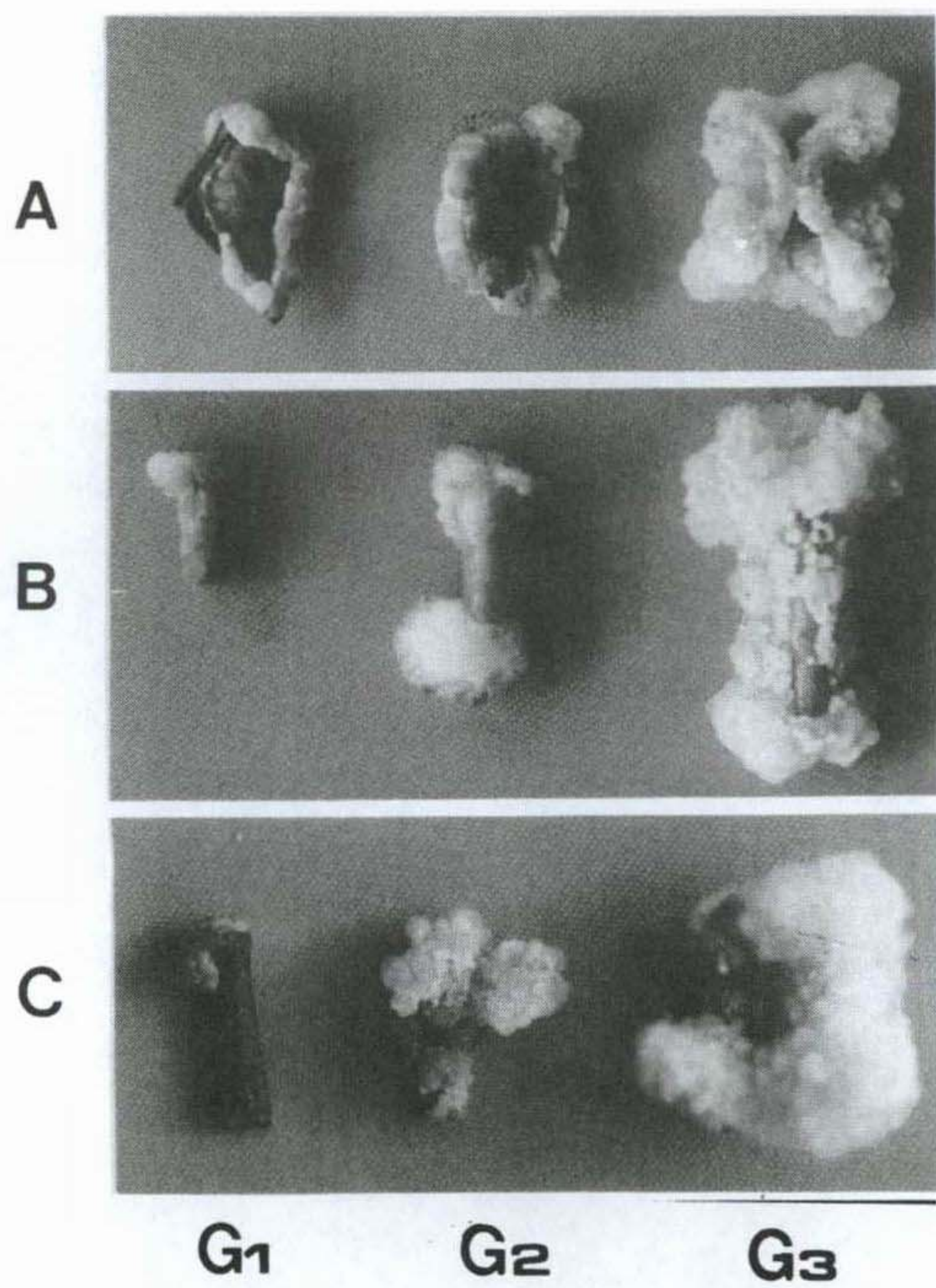
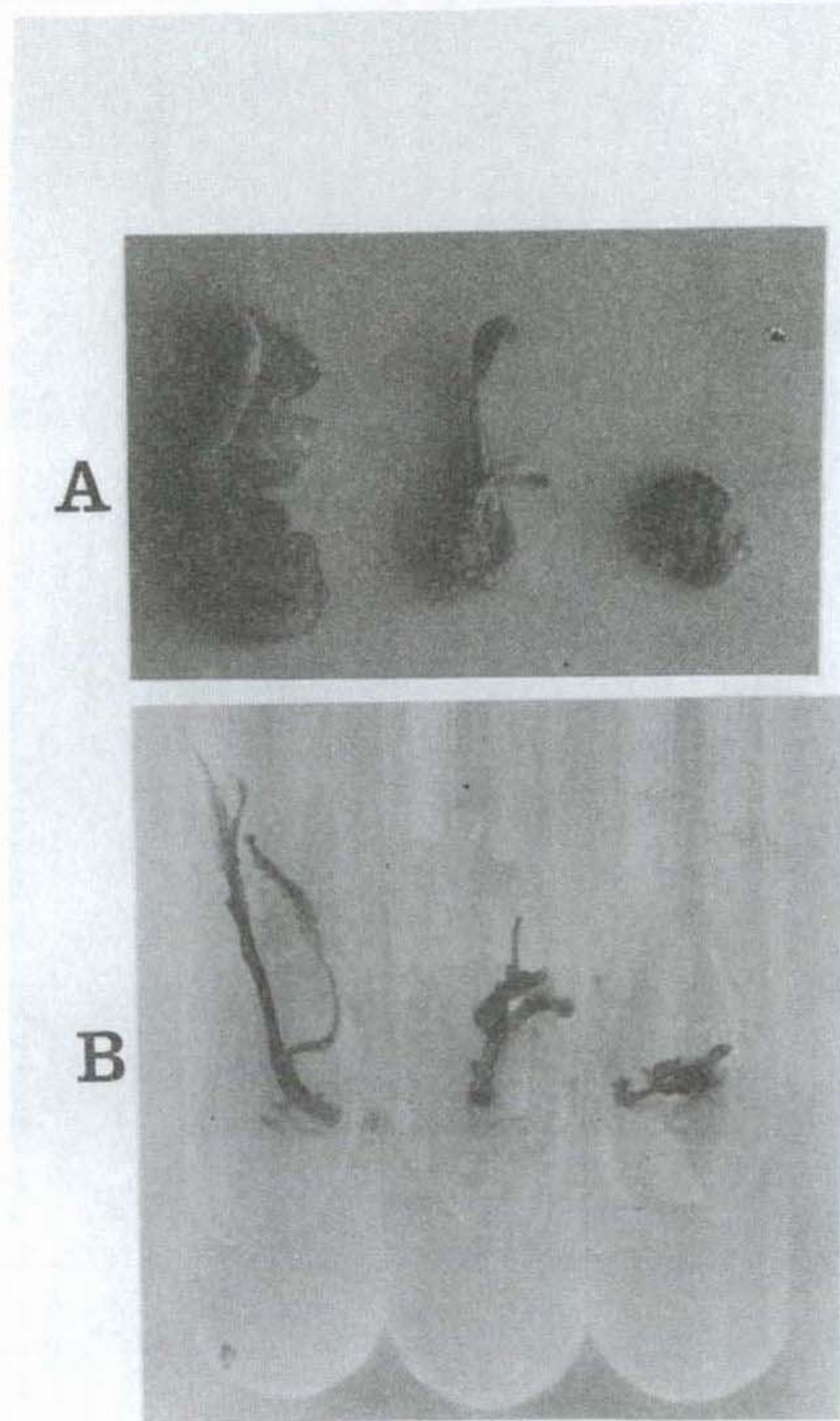


Fig. 1. Callus condition in leaf (A), stem, and epidermal layer of stem at 50 days after culture. G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> were graded as size.



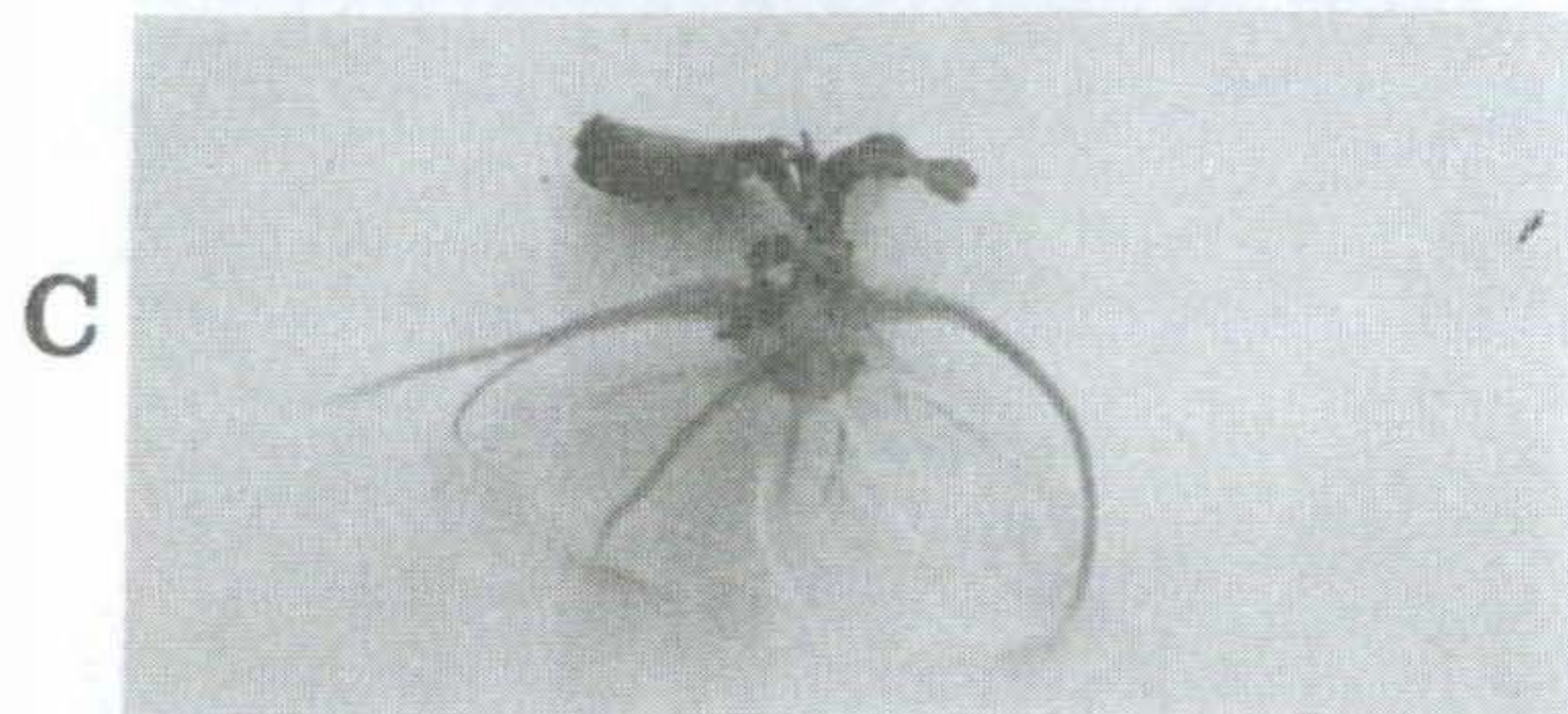
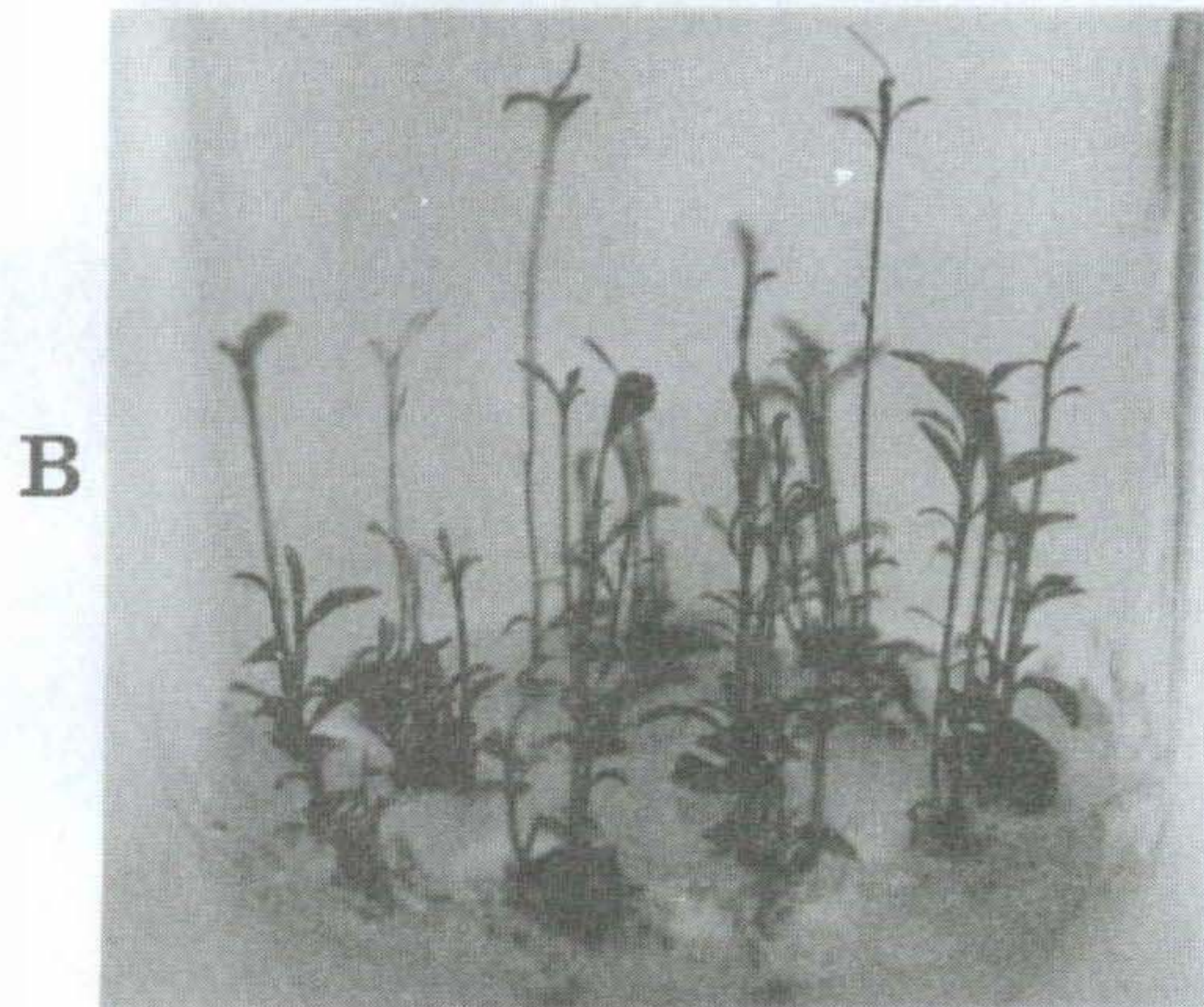
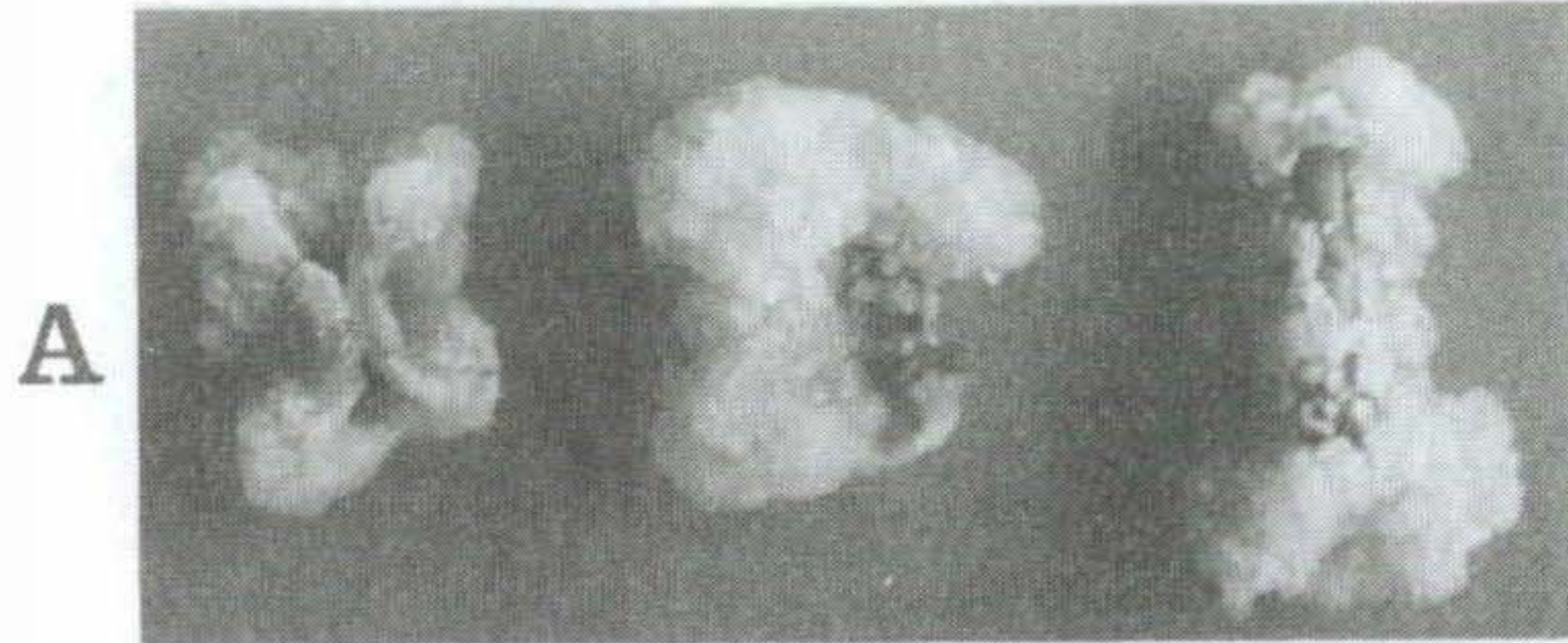
\*\*\* 국내 자생차의 생장점 배양



A: 호르몬조성에 따른 엽비대 및 callus 분화  
B: 호르몬조성에 따른 shoot의 생장



\*\*\* Callus로부터 shoot 및 root 분화  
(재분화 및 발근 실험)



- A: 엽 및 경절편으로 부터의 callus 유도  
B: callus로부터 shoot 분화  
C: shoot로부터 근분화



Table 1. Callus induction rate in leaf and stem segment culture of Korean tea plant

( Unit : no )

Organ	Phyto-hormone condition	Callus induction				Living without callus (G <sub>0</sub> )	Dead in browning	Contamination	Total number of inoculation
		Size							
		G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	Total				
L1	A	4	6	3	13	4	23	10	50
	B	6	6	6	18	12	18	2	50
	C	16	8	4	28	2	9	11	50
	D	17	9	2	28	7	6	9	50
	E	12	8	6	26	2	8	14	50
L2	A	4	2	4	10	4	12	24	50
	B	6	4	1	11	0	23	16	50
	C	10	5	5	20	8	10	12	50
	D	7	6	10	23	7	10	10	50
	E	4	10	10	24	4	18	4	50
L3	A	6	1	1	8	4	18	20	50
	B	5	2	2	9	4	28	9	50
	C	4	5	4	13	3	31	3	50
	D	8	7	7	22	3	15	10	50
	E	4	6	13	23	7	17	3	50
S1	A	10	4	8	22	5	17	6	50
	B	14	4	8	26	0	12	12	50
	C	8	11	16	35	0	3	12	50
	D	13	8	7	28	0	7	15	50
	E	7	7	21	35	2	2	11	50
S2	A	14	5	2	21	3	4	22	50
	B	10	12	4	26	8	6	10	50
	C	10	13	10	33	2	2	13	50
	D	6	14	6	26	9	4	11	50
	E	4	10	20	34	3	3	10	50
S3	A	6	3	9	18	4	10	18	50
	B	15	2	3	20	14	4	12	50
	C	10	12	9	31	2	4	13	50
	D	9	5	9	23	4	5	18	50
	E	4	17	12	33	3	7	7	50
S4	A	2	2	10	14	7	5	24	50
	B	12	4	2	18	3	2	27	50
	C	8	5	16	29	1	9	11	50
	D	6	3	13	22	5	5	18	50
	E	9	8	13	30	4	6	10	50
EL	A	2	2	3	7	0	14	29	50
	B	3	4	0	7	0	24	19	50
	C	4	5	15	24	0	9	17	50
	D	1	6	7	14	0	14	22	50
	E	6	8	9	23	0	7	20	50

L1: first leaf, L2: second leaf, L3: third leaf, S1: first stem, S2: second stem, S3: third stem, S4: fourth stem, EL: epidermal layer from S2 and S3, A: MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA, B: MS + 10 mg/L NAA + 10 mg/L BA, C: MS + 2 mg/L IBA + 4 mg/L BA, D: MS + 10<sup>-4</sup> mg/L NAA + 10<sup>-5</sup> mg/L Kinetin, E: MS + 4 mg/L IBA + 2 mg/L BA.

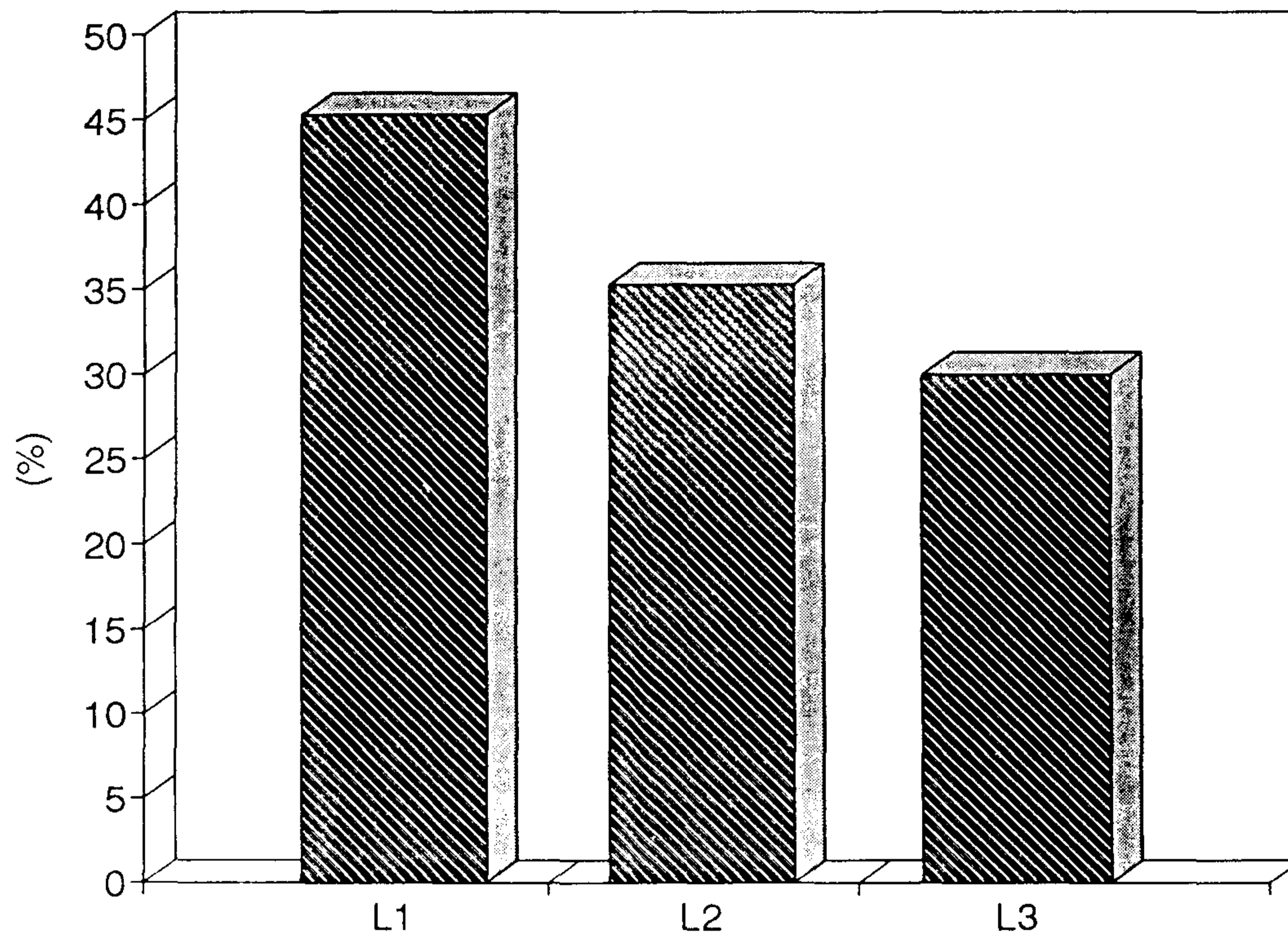


Fig 1. Histogram of callus induction rate in leaf organ



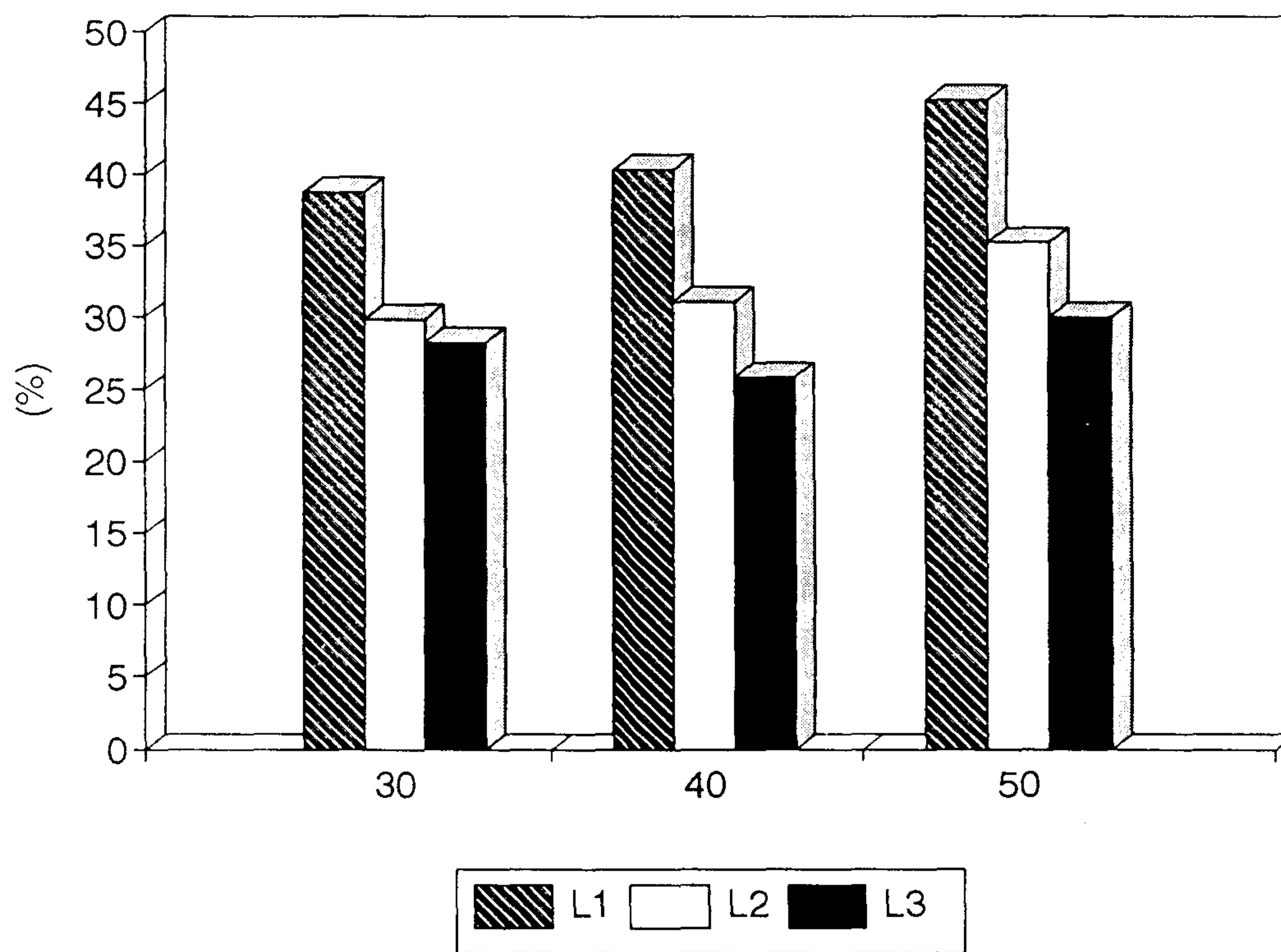


Fig 2. Histogram of callus induction rate between leaf organs and day after inoculation

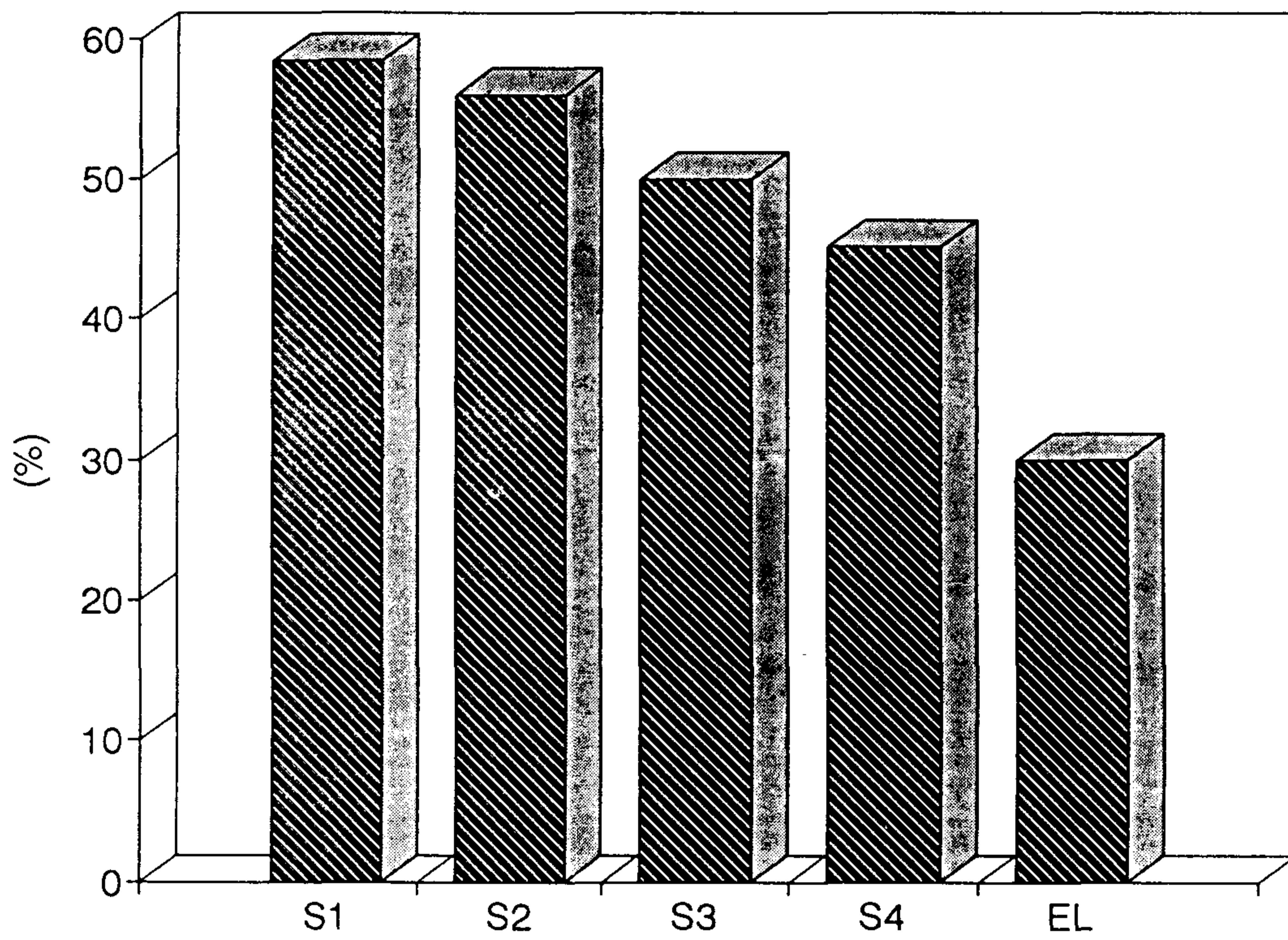


Fig 3. Histogram of callus induction rate following 50 day after inoculation in each stem organs



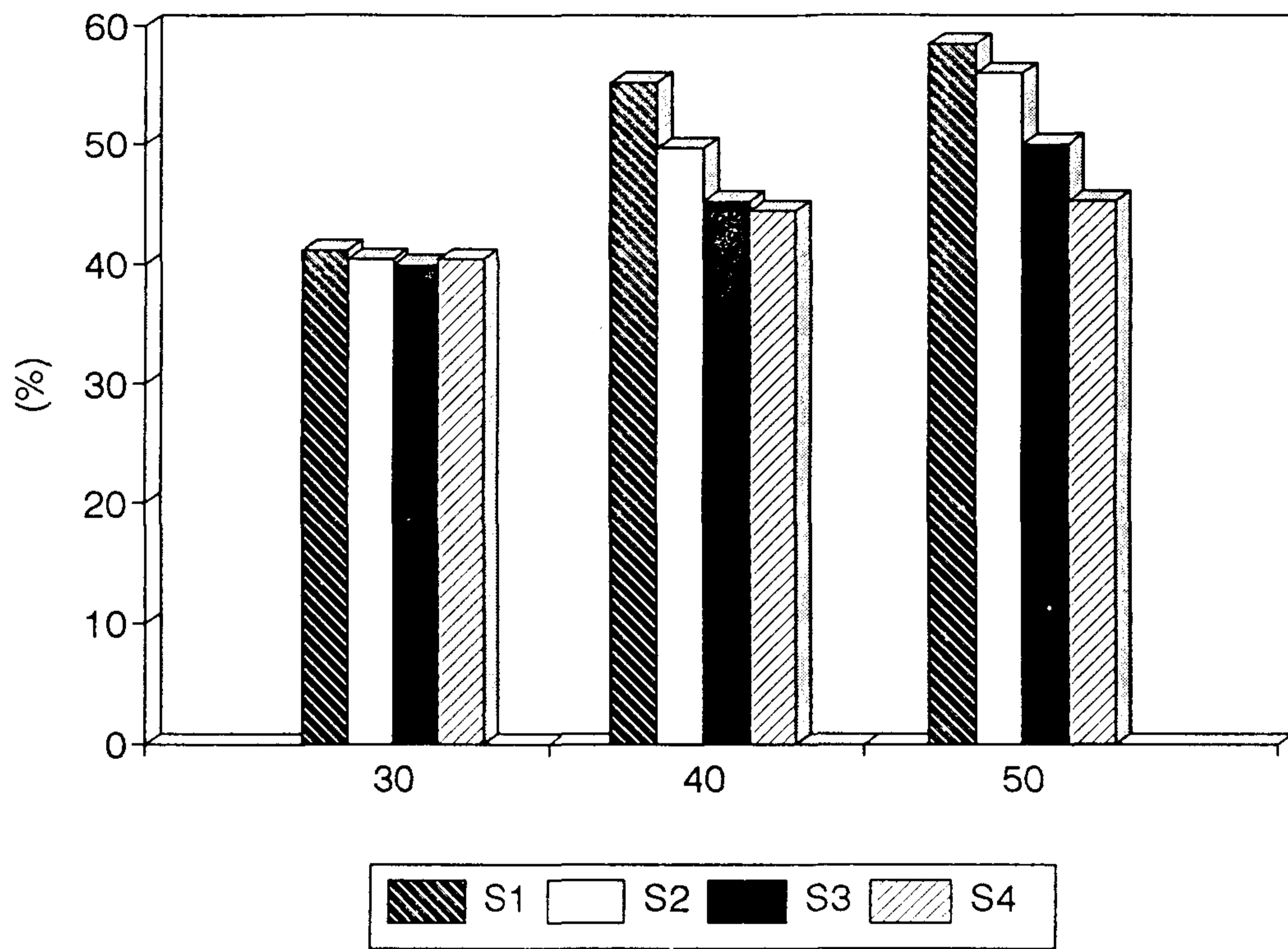


Fig 4. Histogram of callus induction rate between stem organs and day inoculation

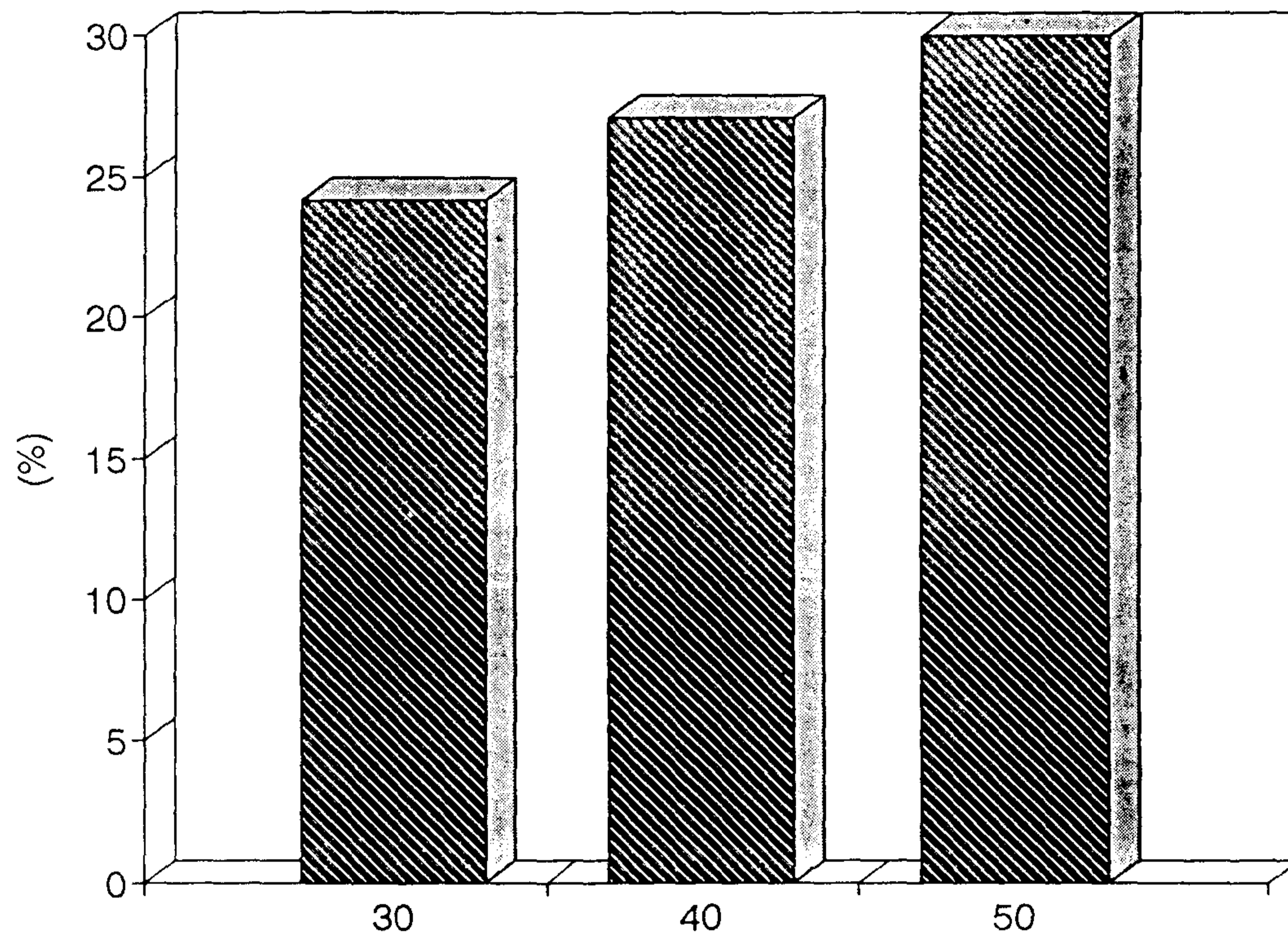


Fig 5. Histogram of callus induction rate following day after inoculation in epidermal layer from second and third stems



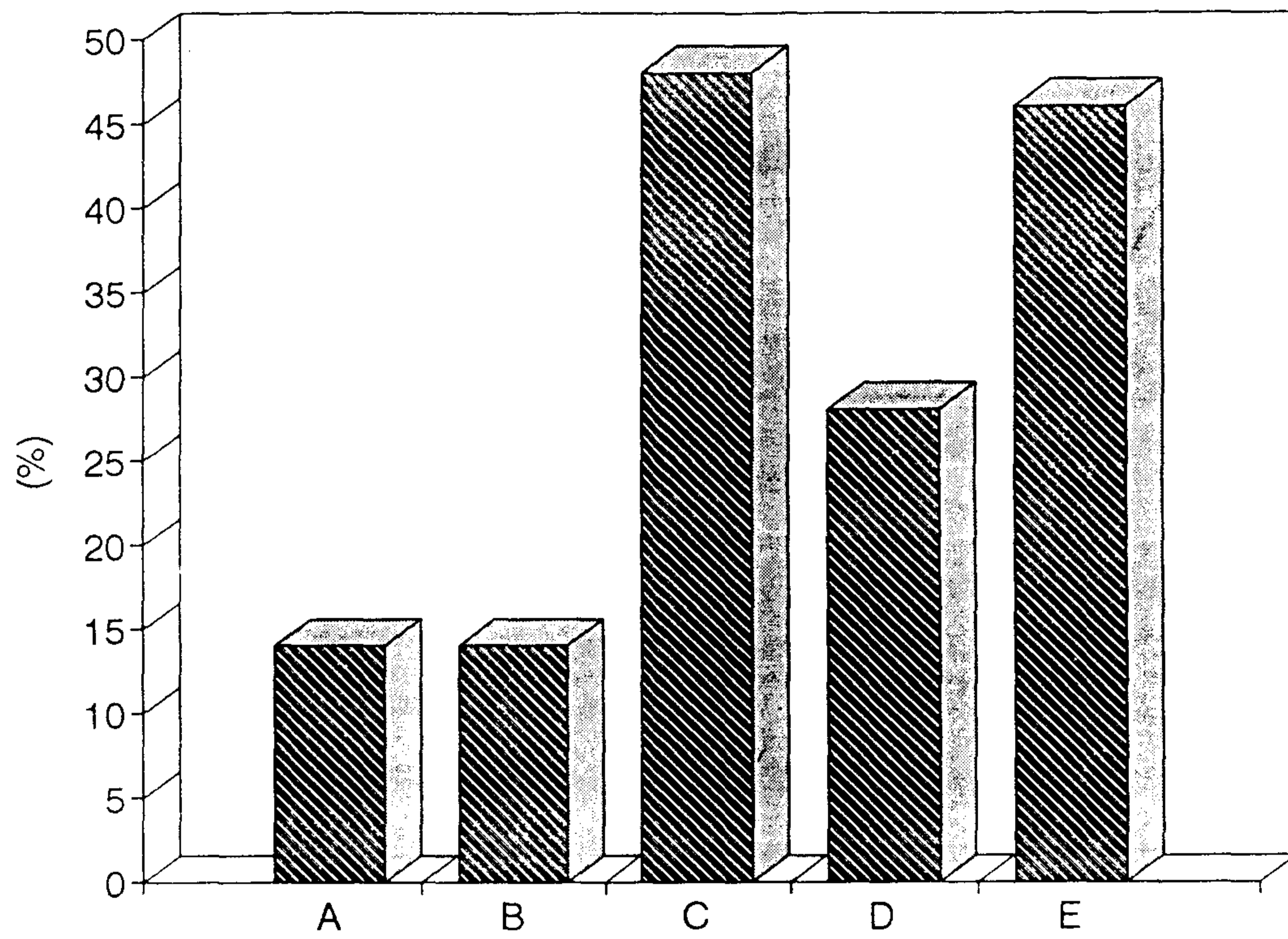


Fig 6. Histogram of callus induction rate following phytohormonal condition in leaf and stem organs



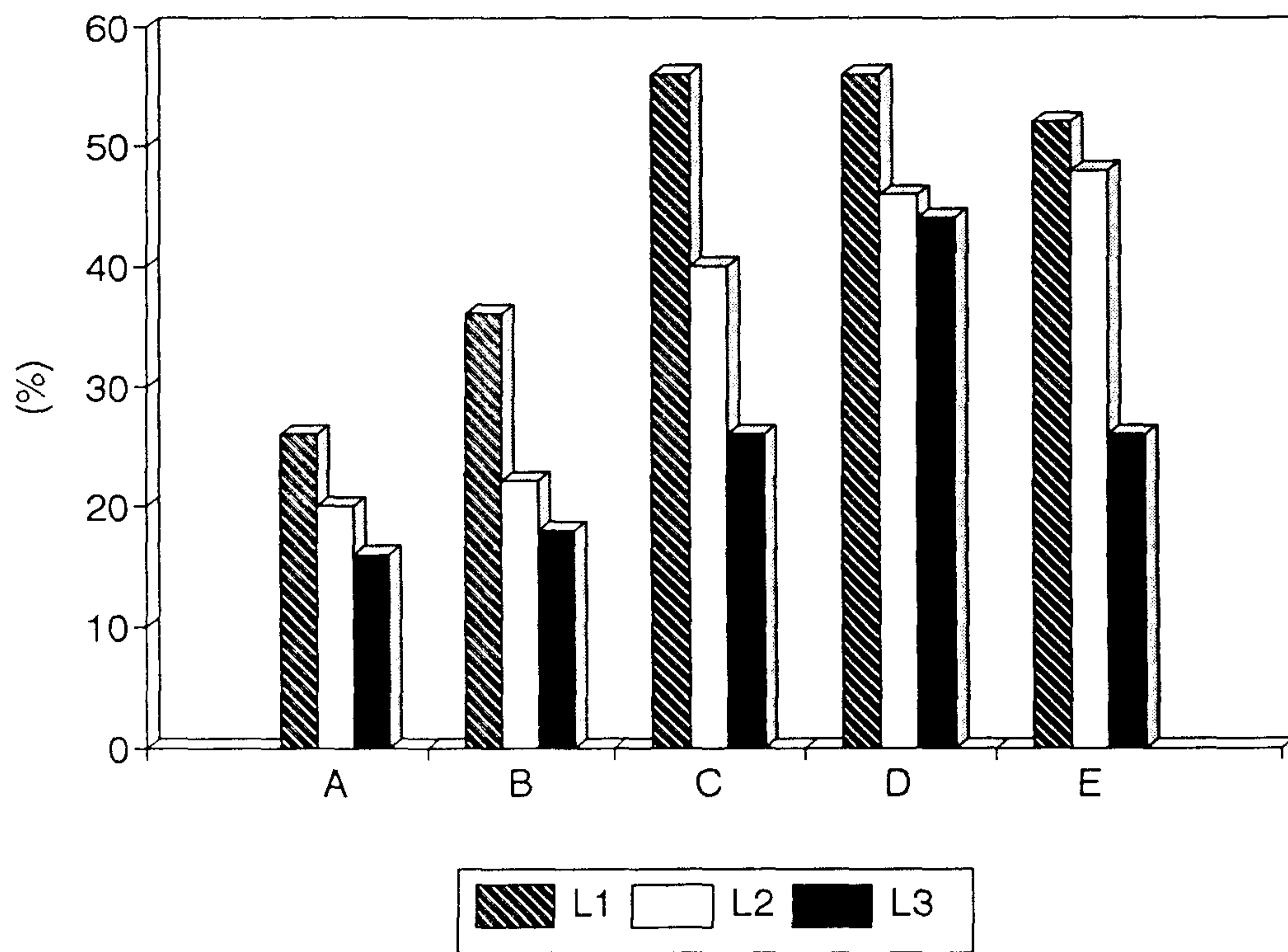


Fig 7. Histogram of callus induction rate following phytohormonal condition in leaf organs

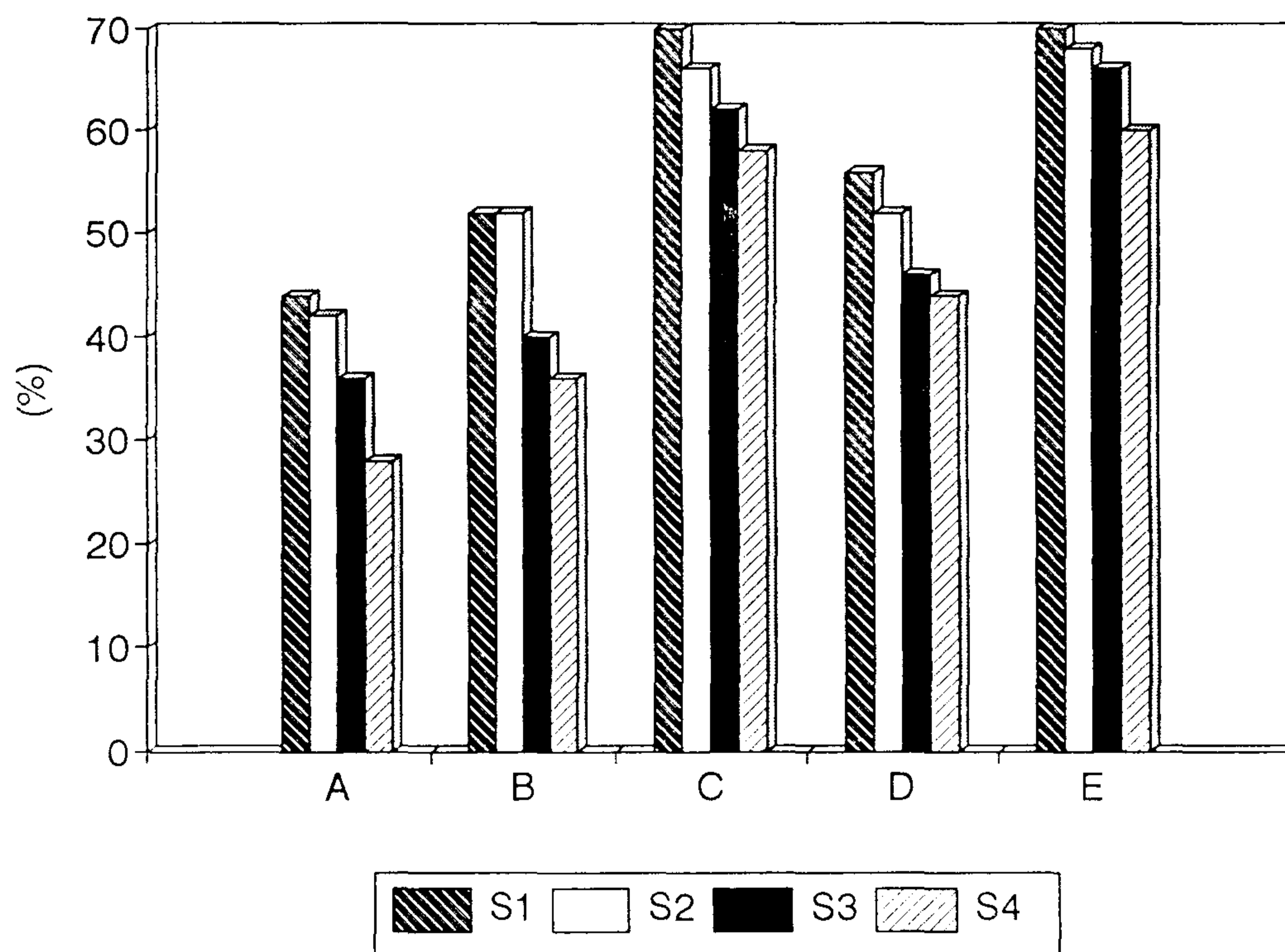


Fig 8. Histogram of callus induction rate following phytohormonal condition in stem organs

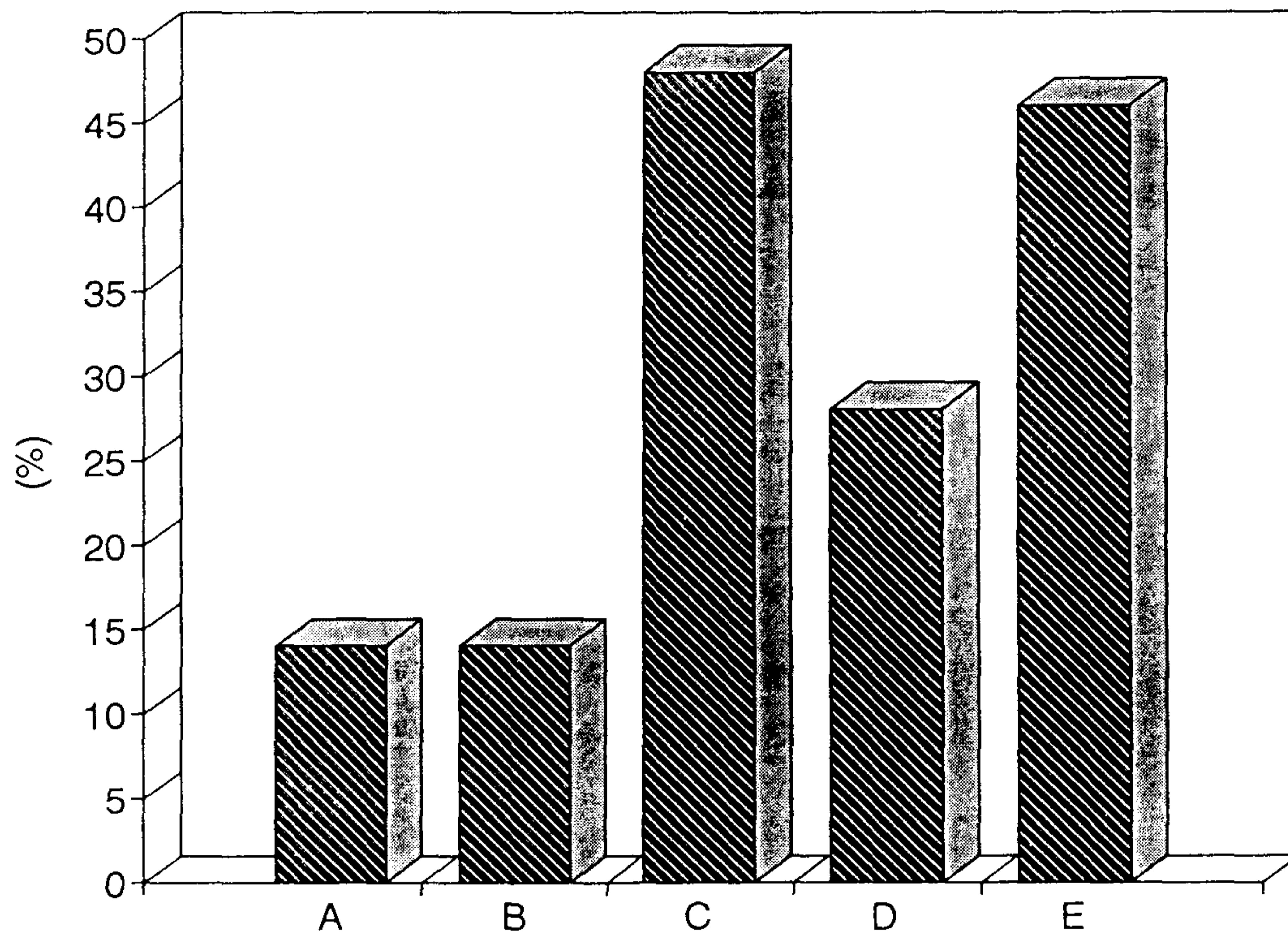


Fig 9. Histogram of callus induction rate following phytohormonal condition in epidermal layer from second and third stems



## 별첨 2

### RAPD marker를 이용한 韓國 野生 茶나무 및 日本 茶品種의 同定

#### I. 서론

*Camellia*는 약 200여종이 넘는 방대한 속으로써 *Camellia sinensis*, *C. japonica*, *C. sasanqua*, and *C. oleifera* 등의 주요 경제작물 및 관상식물들을 포함하고 있다(Heywood 1978, Cronquist 1981). 그중 차나무(*C. sinensis*)는 우리나라 남부 지방에만 분포하고 있으며, 잎과 싹초를 이용하여 녹차를 제조하고 있다. 식물학적으로 *C. sinensis*는 4개의 변종(varietiy)으로 구분되어지며(Chang and Bartholomew 1984), 그중 2개의 변종 *assamica*와 *sinensis*는 각각 인도, 중국, 일본, 한국등에서 홍차 및 녹차의 원료로 개발되었다.

우리나라에는 녹차의 품종이 등록되어있지 않으며, 육종사업을 위한 정보도 미진하다. 차나무는 강한 자가불화합성을 가지고 있으며 복대립유전자에 의하여 제어되고있다는 것으로 알려져 있기 때문에(de Netancourt 1977) 유전적 다양성이 심할것으로 생각된다. 또한 자연계에는 헤테로상태로 존재하면서 타식에 의하여 변식을 할것이다. 그러나 농가에서는 균일한 묘가 필수적이어야 하며 신속히 증식시켜야만 하기 때문에 일반적으로 삽목에의해 증식, 보급한다.

이러한 상황에서 우리나라 남부지방에 자생하는 차나무의 유전적 배경을 정확히 파악하여 실제 품종동정등의 육종사업에 이용하고자 유전적 marker를 탐색하고자 한다. 형태적 특징 등의 전통적 품종동정만으로는 불분명한 상태를 해명할수가 없다(Wrigley *et al.* 1987).

분자 marker에 의한 품종동정은 최근 20년간 행하여지고 있으며, 그중 단백질, isozyme분석은 tomato, potato, rice, maize, celery 및 brassica등에서 보고되었다(Tanksely and Orton 1983). 이러한 기술의 주된 한계성은 개체간 또는 유연관계가 긴밀한 종간의 불충분한 marker수와 상이한 환경조건하에서 성장한 종간의 구분이 뚜렷하지 않은 점이다.

Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 및 Random amplified polymorphic DNA(RAPD)는 보다더 정확한 polymorphism을 검출할 수 있는 기술이긴하나, RFLP는 노동력과 비용이 많이 드는 단점이 있다. 상대적으로 Williams 등(1990)에 의하여 고안된 RAPD 기술은 신속하고, 비용이 적게들뿐아니라 적은량의 DNA로 실험이 가능한 장점이 있다(Welsh and McClelland 1990). RAPD marker 에 의한 품종동정은 wheat(Devos and Gale 1992), brassica(Hu and Quiros 1991, Demeke *et al.* 1992), celery(Yang and Quiros 1993), barley(Tinker *et al.* 1993), buffalograss(Huff *et al.* 1993), papaya(Stiles *et al.* 1993), apple(Koller *et al.* 1993), allium(Susan *et al.* 1993), Japanese potato(Mori *et al.* 1993) 및 junipers(Adams *et al.* 1993) 등에서 보고되었다.

본실험에서는 RAPD marker에 의하여 한국 자생차 및 일본 녹차품종의 특이적 지표를 탐색하고, 이들간의 유연관계를 파악하였다.

#### II. 재료 및 방법

##### 1. 식물 재료

우리나라 자생차나무 23종과 일본 녹차품종 25종을 공시하였다(Table 1 및 2). 국내 자생차는 사찰주변에서 채취하였으며, 일본 품종은 일본 국립 야채, 차업시험장(시즈오카, 일본)으로부터 분양받았다.

## 2. 게놈 DNA추출 및 정제

차나무의 성숙한 식물체로부터 어린 엽조직을 절단하여 주맥과 엽맥을 분리한후 남은 조직을 작은 조각으로 자른 후 액체 질소로 순간 동결하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 저장한다. 유발과 유봉은 미리 액체 질소로 냉각 시켜둔다. 약 1g의 엽조직과 적은 양의 액체질소를 유발에 넣은 후 백색의 분말이 될때까지 마쇄한다.

DNA의 추출과정은 Dellaporta et al.(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 엽조직의 분말은  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 미리 가열된 15ml의 추출 완충액(100mM Tris-HCl, pH8.0; 50mM EDTA ; 500mM NaCl ; 30mM  $\beta$ -mercaptoethanol과 1.3% SDS)이 들어있는 50ml 원심관으로 옮긴다. 원심관은  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열한 후 12,000 x g에서 원심하여 세포 덩어리를 제거한다. 상등액에 동량의 TE-포화 페놀을 첨가하여 한번의 페놀 추출을 하고 동량의 Chloroform/iso-amylalcohol(24 : 1)을 첨가하여 두 번의 추출을 한다. 상등액에 0.8배의 iso-propylalcohol을 첨가하여 1시간동안  $0^{\circ}\text{C}$ 에 방치후 12,000 x g 에서 20분동안 원심하여 DNA를 침전시킨다. 침전물을  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 약 10분간 건조하여 1ml의 TE로 용해한다. 동량의 10% CTAB를 첨가하고 최종농도가 0.7M이 되도록 NaCl을 첨가한후 30분 동안 실온에 방치한 후 12,000 x g 에서 15분동안 원심하여 DNA를 침전시킨다. 침전물은 0.3M Na-acetate를 함유한 냉 70% 에탄올로 수세한 후 0.3M Na-acetate가 포함된 400 $\mu$ l의 TE로 용해한다. 동량의 4M ammonium acetate 를 첨가하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치한 후 12,000 x g에서 10분간 원심한다. 동량의 이소프로판올을 첨가하여  $0^{\circ}\text{C}$ 에 1시간 방치한 후 원심하여 DNA를 침전시킨다. DNA는 0.4ml의 TE로 용해한다. RNA를 제거하기 위해서 RNase A를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치하였다. DNA는 1.5ml튜브에서 두 번의 페놀추출을 하여 더욱 정제하였다. DNA를 동량의 iso-propyl alcohol로 침전시킨후 건조하였다. 건조된 DNA는 DNA fluorometer를 이용하여 최종 농도가 500ng/ $\mu$ l가 되도록 TE로 용해하였다. DNA정량은 Hoefer사의 DNA fluorometer를 이용하였다.

## 3. DNA 증폭

Williams(1990)등의 방법을 약간 변형하여 10-mer용 primer(Kit B from Operon Technologies, Alameda, California) 및 12-mer용 primer(Kit A2, C1, C4, Takara, Japan) 20개를 PCR반응에 사용하였다. 반응 조건은 25ng의 template DNA, 2 $\mu$ M의 primer, 각 150 $\mu$ M의 dNTP, 2mM의  $\text{MgCl}_2$ , 10mM의 Tris-HCl(pH 8.0), 50mM의 KCl, 0.001%의 gelatin, 0.5U의 Taq DNA polymerase(한국생공)를 포함하는 25 $\mu$ l의 반응액 하에서 실시



하였다. 증폭은 94°C, 2분; 94°C, 30초, 36°C, 30초, 72, 2분 이상 2 회; 94°C, 20초, 36°C, 15초, 45°C, 15초, 72°C, 1분 30초 이상 20 회; 94°C, 20초, 36°C, 15초, 45°C, 15초, 72°C, 2 분 이상 19 회; 72°C, 10분 실시하였으며, 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 (4V/cm), ethidium bromide(0.5g/ml)로 염색후, UV하에서 촬영하였다(Hoefer Co. USA).

#### 4. Data 분석

Primer 집단으로부터 무작위로 선발된 20종의 random primer(Table 4)에서 증폭된 총 70개의 band를 유(+), 무(-)로 표기하여 binary data matrix에 입력하였다. cluster 분석은 UPGMA(unweighted pair group method for arithmetic averages)를 이용하였으며, 품종간의 계통도 및 pairwise difference를 계산하기 위하여 Swofford사의 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 2.4) program을 이용하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 차에 있어서 최적의 증폭조건

최적의 template DNA, *Taq* DNA polymerase,  $Mg^{2+}$  농도 와 annealing 온도를 결정하기 위해서 총 81조합을 denaturing 94°C, annealing 36°C 또는 45°C, extension 72°C(이상 45회전)에서 수행 하였다(Table 3). 모든 실험은 3반복 하였으며 가능한 DNA농도에 영향을 받지 않도록 충실히 수행 하였다. DNA 양이 50ng/25 $\mu$ l 일때는 100nM의 primer에서 다른 band pattern을 나타내었다. 25ng일때는 다양한 band pattern을 나타내었으며, 100ng일때는 비특이적인 band 또는 smear한 band pattern을 나타내었다(A). *Taq* DNA polymerase의 농도가 증가함에 따라 band수가 증가하였으며, 결과적으로 비 특이적인 band로 검출되었다. 본 실험에서는 0.25U와 0.5U/25 $\mu$ l 에서 가장 간단하고 확실한 band pattern을 나타내었다.  $MgCl_2$ 의 경우 최종 농도가 1.5mM, 2.0mM과 2.5mM로 실험한 결과 단지 2.0mM에서만 특이적인 band pattern을 얻을수 있었으며 1.5mM에서는 비특이적인 band pattern을 나타내었다(B). Annealing 온도가 36°C일때는 다양한 band pattern을 나타내었으며, 45°C에서도 지속적으로 적당한 band pattern을 나타내었다. 가장 좋은 결과는 annealing 36°C, 15 cycles과 45°C, 25 cycles일때 검출 가능 하였다.

#### 2. RAPD 다형성 및 특이적인 marker 동정

본 실험에 사용한 primer는 OPB kit(20 primer), TAA2 kit(12 primers), TAC1 kit(12 primers) 와 TAC4 kit(12 primers)중 증폭이 잘된 20개를 선발 하였으며 이중에는 10mer가 9개 12mer가 11개 포함되어 있었다. 20개의 primer로 부터 총 212개의 band를 검출하였으며(Table 2 and Appendix), 각 primer당 band수는 다양 하였으며 가장 적은 것은 primer R 일때 5개, 가장 많은 것은 primer K, L 일때 16개 였으며, primer 1개당 평균 10.6개의 bands 가 검출 되었다. 10-mer와 12-mer인 primer의 경우 증폭된 band수나 정도로 볼때 별 차이를 발견할 수 없었다. 증폭된 단편의 크기는 약 250bp(primer D, I, K, O, M)에서 3000bp(primer J) 이었다. 증폭된 단편의 크기와 GC 함량을 비교한 결과 본 실험에서는 차이를 볼 수 없었다.

20개의 primer를 이용하여 한국 야생 차나무와 일본 재배 품종의 특이적인 marker를 동정 하였다(Table 3 and Appendix). 이중 시료 No. 5, 6, 10, 20, 28은 특이 적인 marker가 검출되지 않았으나, 나머지 시료들은 특이적인 marker로써 구분 가능 하였다. 총 212개의 band중 유용한 marker는 18.9%(40 fragments)이었다. 특히, 시료 No. 15(Dongyangdaweon)와 No. 43(Kurasawa)은 11의 특이적인 markers가 검출되었다. 특이적인 marker A-a는 한국 개체인 시료 No. 1, 4, 12와 일본 품종인 No.34 에서 검출 되었다. 그러나 Q-a marker는 일본 품종인 시료 No.31, 32, 40, 43과 한국 개체 No.15에서만 검출 되었다. 이런 결과로 볼때 일본 재배 품종과 한국 개체간에는 유전적 연관이 큰 것으로 사료된다. primer L의 경우 12 개의 특이적인 band를 검출할 수 있었으나, primer F 의 경우는 특이적인 band가 검출되지 않았다(Table 3).

유전자가 발현 함에 있어서 몇몇 내적인 요소 또는 외적인 요인에 의해서 영향을 받으며, allozyme 또는 단백질 분석의 확실성은 자원의 변화가 없음을 기초로 한다. 이런것을 비교 함으로써, 실질적으로 RAPD는 다른 조건의 변화없이 단순히 primer의 변화에 의해서 동정 할수 있다. RAPD의 발현은 DNA를 분리함에 있어서 다른 재료에 영향을 받지 않으며, 반복 실험을 통해 지속적으로 변함 없이 검출된다. RAPD기술은 DNA를 동정하는 기술중에서 가장 간단하고 빠르며 비용과 노동력이 적게 들고 단시간에 분석이 가능한 방법이다. 따라서, RAPD data는 품종 식별과 세포질 유지에 있어서 적용될 수 있을 것이라 사료 된다.

### 3. 한국 야생 차나무와 일본 품종간의 유전적 관계

한국 야생 차나무와 일본 품종을 포함한 48개에서 검출된 band의 유(1), 무(0)를 이용해서 모든 시료간의 유전적 거리를 산출 하였다. 유전적 거리의 수치는 Euclidian 값을 이용해서 산출 하였으며, 우선 23개 한국 야생 차나무를 비교 하였으며, 다음으로 일본품종을 포함한 48개의 시료간에도 비교 분석 하였다. 한국 야생 차나무 간에는 sample no. 4(Songgwangsa)와 no. 9(Daeheungsa)에서 Euclidian값 14.0으로 가장 낮았으며, 반면 sample no. 1(Baegyangsa) and no. 2(Cheoneunsa)에서 Euclidian값이 46.5로 가장 높았다. 그리고, 48개의 시료를 모두 분석 하였을 경우는 일본 품종인 samples no. 24(Yabukita)와 no. 48(Yaeho)에서 가장 낮았으며(13.0),

한국 야생 차나무인 sample no. 1(Baegyangsa)와 no. 8(Geumsansa)에서 78.8로 가장 높았다. Euclidian값을 비교 분석한 결과 한국 야생 차나무보다 일본 품종의 유전적 배경이 더 좁은 것으로 나타났다. 한국 야생 차나무와 일본 품종의 유전적 거리를 기초로하여 Ward method(Fig. 1)를 통해 cluster분석한 결과 48개의 시료는 Euclidian값 약 45이하에서 5군 (I군, samples no. 1, 32, 19, 26, 23, 4, 9, 15, 13, 5, 7, 22, 27; II군, samples no. 2, 11, 17, 12, 28, 24, 48, 29, 20, 18, 45, 3, 6, 38; III군, samples no. 8, 36, 10, 42; IV군, samples no. 39, 35, 41, 40, 33, 34; V군, samples no. 16, 30, 43, 44, 37, 21, 31, 25, 46, 47)으로 나눌 수 있었다. 한국 야생 차나무의 약 78%(18/23plants)는 I, II군에 포함되어 있었으며, 일본 품종의 경우는 대부분 III, IV, V군에 포함되었다. 특히, 홍차용 Assam계인 시료 no. 31(Hatumomizi), 37(Benihomare), 39(Indo 131)와 40(Benihuzi)는 IV, V군에 포함되어 있었다. 시료 no. 14, 16 와 21은 한국 야생 차나무 임에도 불구하고 일본 품종과 마찬가지로 IV, V군에 포함되어 있었는데, 이것이 일본으로 부터 도입된 것인지, 또는 일본품종과 교잡을 한 것인지는 분명하지 않다.



#### 4. F<sub>1</sub>의 RAPD marker 분석

유전적 지표로써의 RAPD marker 효용성을 검토하기 위하여 3개의 유전자형(two parent cultivars and their F<sub>1</sub>)을 12개의 random primer에 의하여 분석되었다.(Table 4 and Fig. 2). 부모형(Yaeho and Yabukita)에서 44개의 단편이 검출되었다. 그중 74.5%(31/44 fragments)는 F<sub>1</sub>(Ooiwase)에 유전되었다. 그리고 대부분의 단편들은 F<sub>1</sub>에 독립적으로 유전되었다. primer E alc M에 의하여 검출된 모친의 일부 단편들은 F<sub>1</sub>에서 검출되지 않았다. 반면 J 및 P primer를 이용하였을 때 부모에서 검출되지 않은 단편이 F<sub>1</sub>에서 검출되었다.

### IV. 적요

한국 야생차의 지역간 유연성을 밝히고 일본 재배 품종과의 유전적 차이를 규명하고자 RAPD 분석을 하였다. 차나무 잎에서 추출한 DNA의 증폭은 50ng의 template DNA, 0.5U의 *Taq* polymerase, 2mM의 Mg<sup>2+</sup>가 가장 최적의 조건이었으며, annealing 온도는 36/45°C의 2단계 활용이 가장 신뢰성있는 DNA 단편을 검출할 수 있었다. 시판의 random primer 20종을 이용하여 총 212개의 DNA 단편을 검출하였으며, 증폭된 단편의 크기는 약 250bp에서 3000bp 사이에 나타났다. 한국의 개체 및 일본 품종에서 검출된 특이적 RAPD marker는 18.9%(40/212)를 차지 하였다. Euclidian값에 의한 유전적 거리를 계산한 결과 한국 집단내에서는 Songgwangsa와 Daeheungsa 사이에서 최소값(14.0)이 나타났으며, Baegyangsa와 Cheoneunsa 사이에서 최대값(46.5)이 나타났다. 또한 일본 품종을 포함한 전 표본의 결과로부터는 Yabukita와 Yaeho 사이에서 최소값(13.0)이 나타났으며, Baegyangsa와 Geumsansa에서 최대값(78.8)이 나타났다. Cluster 분석중에서 Ward method를 이용한 dendrogram 분석 결과, 48 표본은 약 45의 Euclidian값 이하에서 5군으로 나누어졌다. 이러한 결과로부터 한국 야생차 집단과 일본의 녹차품종은 매우 긴밀한 유전적 관계를 갖고 있으며, 일본 품종의 유전적 배경이 한국 집단보다 좁은 것으로 추정되었다. RAPD marker를 유전적 marker로써의 평가에 있어서 증폭된 전 단편의 77.3%(34/44 fragments)가 F<sub>1</sub>에 유전되었다.

### V. 참고문헌

Heywood, V.H. (1978) Flowering plants of the world. Oxford. Univ. Press

Cronquist, A. (1981) An integrated system of flowering plants Columbia Univ. Press.

de Nettancourt, D. (1977) "Incompatibility in Angiosperms", p. 230. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Wrigley, C.W., I.L. Batey and J.H. Skerritt (1987) Complementing traditional methods of identifying cereal varieties with novel procedures. Seed Sci. Technol. 15, 679-688.

Tanksley, S.D. and T.J. Orton (1983) Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, Amsterdam.

Williams, J.G.K., 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.

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

Devos, K.M. and M.D. Gale (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84, 567-572.

Hu, J. and C.F. Quiros (1991) Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10, 505-511.

Demeke, T., R.P. Adams and R. Chibbar (1992) Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84, 990-994.

Yang, X. and C. Quiros (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86, 205-212.

Tinker, N.A., M.G. Fortin and D.E. Mather (1993) Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85, 976-984.

Huff, D.R., R. Peakall and P.E. Smouse (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides*(Nutt.) Engelm.]. *Theor. Appl. Genet.* 86, 927-934.

Stiles, J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshidi and R. Manshardt (1993) Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85, 697-701.

Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott and C. Gessler (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85, 901-904.

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

Mori, M., K. Hosaka, Y. Umemura and C. Kaneda (1993) Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. *Jpn. J. Genet.* 68, 167-174.

Chang, H.T. and B. Bartholomew (1984) *Camellias*. B.T. Batsford, London.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21.

Rogers, J.S. (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in genetics VII*. Univ. Texas Publ. 7213, 145-153.

Manly, B.F.J. (1986) *Multivariate statistical analysis: a primer*. p. 100-113. Chapman and Hall, London.



Table 1. Origins of 23 Korean spontaneous green tea plants and 25 Japanese green tea cultivars used in this study

Sample No.	Location and cultivar	Collected address and source
1	Baegyangsa (K)	Jeollanam-do, Jangseong-gun, Bugha-myeon, Yagsu-ri
2	Cheoneunsa (K)	Jeollanam-do, Gure-gun, Gwangig-myeon, Banggwang-ri
3	Boseongchasi-I (K)	Jeollanam-do, Boseong-up Youngmun-ri
4	Songgwangsa (K)	Jeollanam-do, Seungju-gun, Songgwang-myeon, Sinpyeong-ri
5	Bulgabsa (K)	Jeollanam-do, Yeonggwang-gun, Bulgab-myeon, Moag-ri
6	Seonunsa (K)	Jeollabuk-do, Gochang-gun, Asan-myeon, Sangin-ri
7	Hwaeomsa (K)	Jeollanam-do, Gure-gun, Masang-myeon, Hwangjeon-ri
8	Geumsansa (K)	Jeollabuk-do, Gimge-gun, Geumsan-myeon, Geumsan-ri
9	Daheungsa (K)	Jeollanam-do, Heanam-gun, Samsan-myeon, Gurim-ri
10	Borimsa (K)	Jeollabuk-do, Jangheung-gun, Yuchi-myeon, Bongdeog-ri
11	Cheongsimmureung (K)	Jeollanam-do, Boseong-up Youngmun-ri
12	Boseongchasi-II (K)	Jeollanam-do, Boseong-up Youngmun-ri
13	Sanjangsikpum (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun Hoicheon-myeon Hoiryeng-ri
14	Gwangyangdaab (K)	Jeollanam-do, Gwangyang-gun, Baab-myeon, Gosa-ri
15	Dongyangdaweon (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun, Boseong-up, Bongsan-ri
16	Seonamsa (K)	Jeollanam-do, Suncheon-si, Ssangam-myeon, Jughak-ri
17	Daeweonsa (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun, Mundeog-myeon, Jugsan-ri
18	Ssanggyesa (K)	Gyeongsangnam-do, Hadong-gun, Hwagae-myeon, Unsu-ri
19	Ggoddongsan (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun, Hoecheon-myeon, Yeonggweon-ri
20	Mannyeonsa (K)	Jeollanam-do, Hwasun-gun, Hwasun-up, Donggu-ri
21	Jeungsimsa (K)	Jeollanam-do, Gwangju-si, Dong-gu, Ullim-dong
22	Hyangrimsa (K)	Jeollanam-do, Suncheon-si, Seoghyeon-dong
23	Geumgogsa (K)	Jeollanam-do, Gangjin-gun Gundong-myeon Geumgog-ri
24	Yabukita (J)	selected from seedlings of Shizuoka native species
25	Kanayamidori (J)	S6 x Yabukita
26	Okumusasi-I (J)	Sayamamidori x Yamatomidori
27	Yamakai (J)	selected from natural seedlings of Yabukita
28	Hukumidori (J)	Yabukita x 23F1-107(Sayamamidori)
29	Okuyutaka-II (J)	Yutakamitori x F1 NN8(Tamamitori x S6)
30	Karabeni (J)	selected from seedlings of China species(Gohokusyou)
31	Hatumomizi (J)	Ai2 x NKa05
32	Kuritawase (J)	selected from Shizuoka native species
33	Benihikari (J)	Benikaori x Cn1
34	Natumidori (J)	selected from seedlings of Shizuoka native species
35	Izumi (J)	selected from seedlings of Benihomare
36	Toyoka (J)	Sayamamitori x Yabukita
37	Benihomare (J)	selected from India seedlings
38	Yutakamidori (J)	selected from seedlings of Asatuyu
39	Indo(131) (J)	selected from seedlings of India hybrids
40	Benihuzi (J)	Benihomare x C19
41	Ooiwase (J)	Yaeho x Yabukita
42	Tamamidori (J)	selected from seedlings of Uji species
43	Kurasawa (J)	selected from natural seedlings of Yabukita
44	Yamatomidori (J)	selected from seedlings of Nara native species
45	Asagiri (J)	selected from seedlings of Kyotohu native species
46	Sayamakaori (J)	selected from natural seedlings of Yabukita
47	Asatuyu (J)	selected from seedlings of Uji species
48	Yaeho (J)	selected from Yaeho-machi of Sizuoka native species

\*Ai: native species from Assam region in India, Nka: collected from Japanese species of Kakosima prefecture, C: introduced from china. S: strain. (K): Korean individual plants, (J): Japanese cultivar.

Table 2. Nucleotide sequences of random primers OPB kit(Operon Technologies Inc.), TAA and TAC kits(Takara Co. Inc.) for amplification of genomic DNA in green tea plants

Primer symbol	Nucleotide sequence	GC content (%)	No. of fragments amplified	Source
A	5'-GTTTCGCTCC-3'	60	11	OPB-01
B	5'-TGCGCCCTTC-3'	70	14	03
C	5'-TGCTCTGCCC-3'	70	10	06
D	5'-GGTGACGCAG-3'	70	9	07
E	5'-GTCCACACGG-3'	70	15	08
F	5'-CTGCTGGGAC-3'	70	11	10
G	5'-GTAGACCCGT-3'	60	8	11
H	5'-CCTTGACGCA-3'	60	7	12
I	5'-GGAGGGTGTT-3'	60	9	15
J	5'-GCCTGCCTCACG-3'	75	10	TAA2-02
K	5'-ACTGACCTAGTT-3'	42	16	03
L	5'-AGAATTGGACGA-3'	42	16	01
M	5'-CTCCTGCTGTTG-3'	58	11	04
N	5'-CTCAGCGATACG-3'	58	10	05
O	5'-ATCGCGGAATAT-3'	42	12	07
P	5'-GACCTGCGATCT-3'	58	9	10
Q	5'-AAGGCGCGAACG-3'	67	15	11
R	5'-TTGCCGGGACCA-3'	67	5	12
S	5'-AGGGCTCTAGGC-3'	67	8	TAC4-62
T	5'-GAGGAGAAACGG-3'	58	8	TAC1-04
Total			212	



Table 3. Korean individual plant- and Japanese cultivar-specific RAPD markers amplified with 20 primers, the band symbols were agreed with in appendix

Sample No.	Individuals and Cultivar	Specific marker(Primer-band)
1	Baegyangsa	A-a, N-a
2	Cheoneunsa	n.d
3	Boseongchasi-I	H-a, L-a
4	Songgwangsa	P-a, A-a
5	Bulgabsa	n.d
6	Seonunsa	n.d
7	Hwaeomsa	Q-b, R-a, R-b
8	Geumsansa	B-a
9	Daeheungsa	H-b, L-d
10	Borimsa	n.d
11	Cheongsimmureung	A-b, S-a
12	Boseongchasi-II	A-a, H-a, L-d
13	Sanjangsikpum	O-a, P-b, Q-c
14	Gwangyangdaab	D-b, K-b, L-c, O-b
15	Dongyangdaweon	C-a,b D-a, I-a, Q-a,c R-a R-b, S-a, T-a,b
16	Seonamsa	B-a, D-b, K-b, N-a
17	Daeweonsa	L-d, P-a
18	Ssanggyesa	L-c, O-a
19	Ggoddongsan	K-b, M-c, S-a
20	Mannyeonsa	n.d
21	Jeungsimsa	E-a, K-b
22	Hyangrimsa	E-b, M-a, P-a
23	Geumgogsa	D-a, G-b, L-a
24	Yabukita	J-a,
25	Kanayamidori	D-a
26	Okumusasi I	G-a, L-c
27	Yamakai	O-a
28	Hukumidori	n.d
29	Okuyutaka	H-a, R-b
30	Karabeni	K-b, Q-c
31	Hatumomizi	Q-a, b
32	Kuritawase	Q-a, b
33	Benihikari	O-b
34	Natumidori	A-a, G-a
35	Izumi	C-c, G-b, N-b, P-a
36	Toyoka	K-c, M-b, P-a
37	Benihomare	C-c, G-b
38	Yutakamidori	E-a
39	Indo(131)	D-a, E-a, K-a, L-b, N-b
40	Benihuzi	G-b, K-a, Q-a, b
41	Ooiwase	N-a, P-a
42	Tamamidori	A-b, D-b, K-c
43	Kurasawa	D-a, D-b, E-a, b, G-b H-a I-a, M-a, b, O-a, b
44	Yamatomidori	L-c, N-b
45	Asagiri	G-b, L-a, P-b
46	Sayamakaori	J-a, K-b, L-a
47	Asatuyu	P-a
48	Yaeho	M-b

\*n.d: not detected.

Table 4. The segregation of the parents and its F<sub>1</sub> fragment patterns for 12 random primers

Primer symbol	Sample No.		
	48(♀, Yaeho)	41(F <sub>1</sub> , Ooiwase)	24(♂, Yabukita)
C	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
D	+	+	+
	-	+	+
	-	+	+
	+	+	+
E	+	n.d	-
	+	n.d	+
	+	+	+
	+	n.d	+
	+	+	+
	+	+	+
F	+	+	+
	+	+	+
I	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
L	-	-	+
	+	+	+
	+	+	+
J	+	+	+
	+	+	+
	+	-	+
	-	+(HS)	-
	+	+	+
K	-	-	+
	+	+	+
M	-	-	+
	+	+	+
	+	n.d	+
	+	+	+
	+	+	+
O	+	+	+
	+	+	-
P	+	-	+
	-	-	+
	+	+	+
	-	+(HS)	-
V	+	+	+
	-	+	+
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+

+: Intensely staining fragment, -: no visible fragment, HS; F<sub>1</sub> hybrid specific fragment, n.d: Maternal have a fragment but did not inherited in F<sub>1</sub>. Primer V: 5'-AGGCTCTAGGC-3', the other primer symbol were agreed with Table 2.



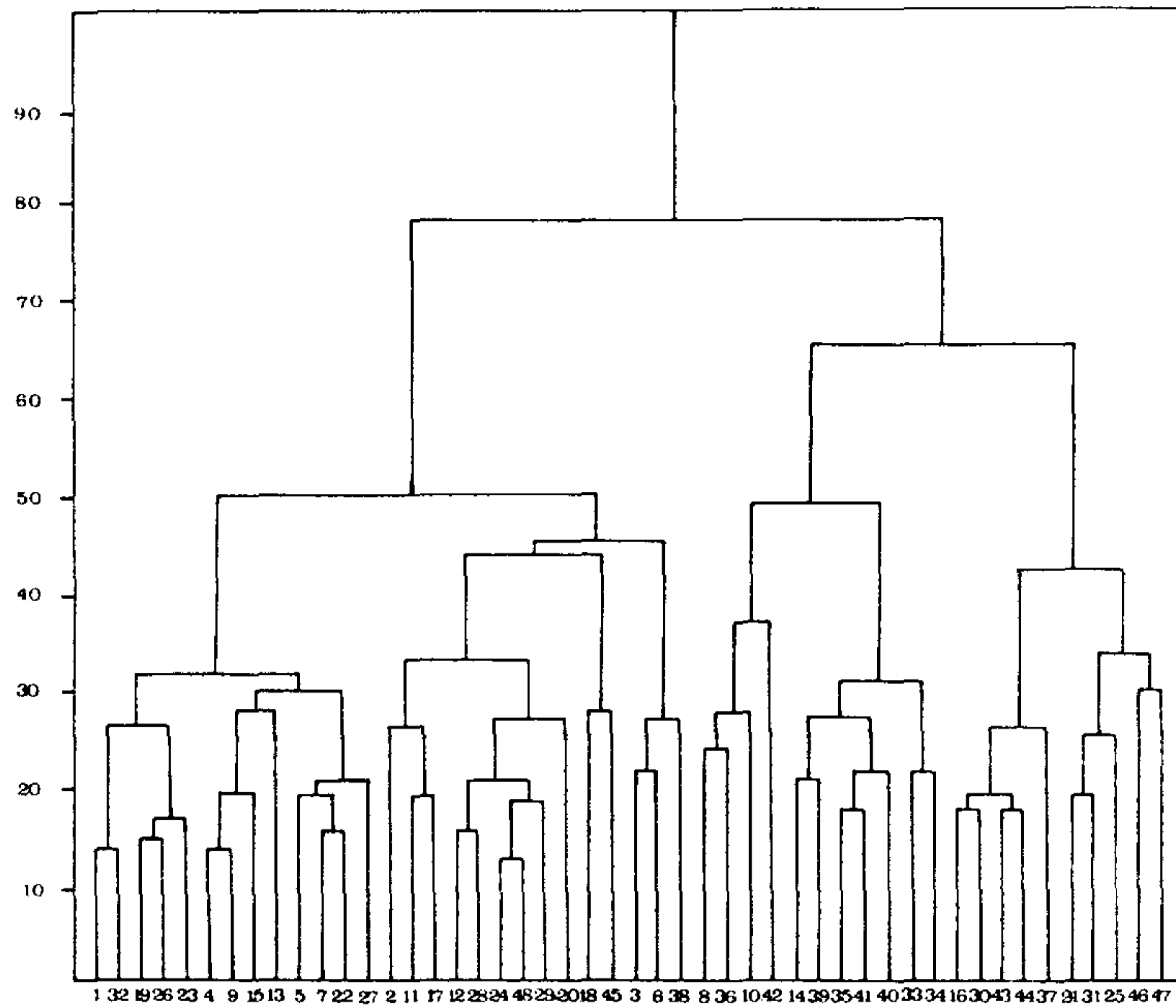


Fig. 1 . Dendrograph constructed from matrix of RAPD-based genetic distances between 27 Korean individual tea plants and 25 Japanese green tea cultivars.

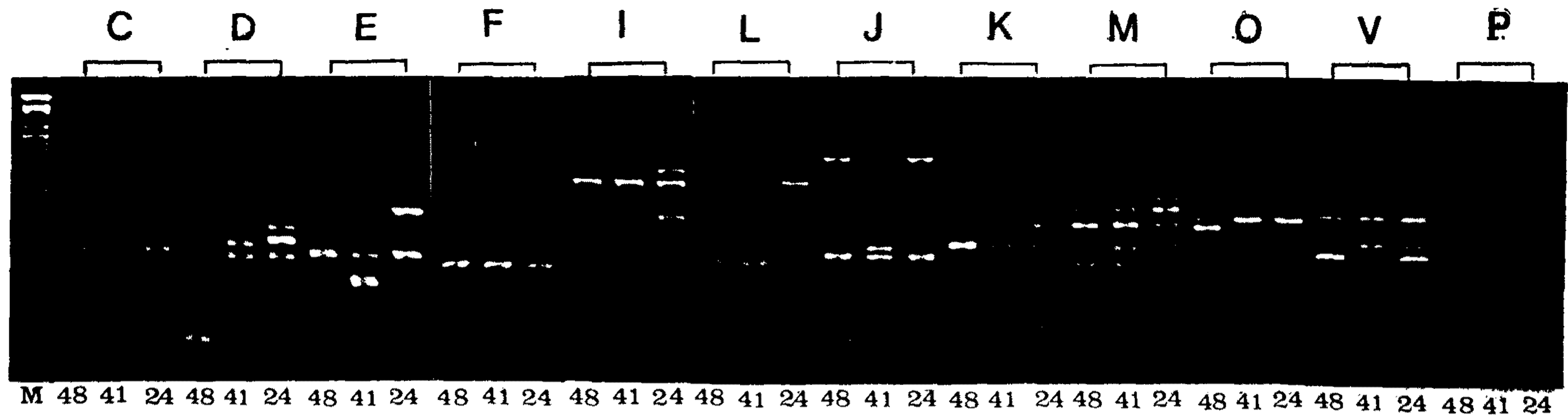
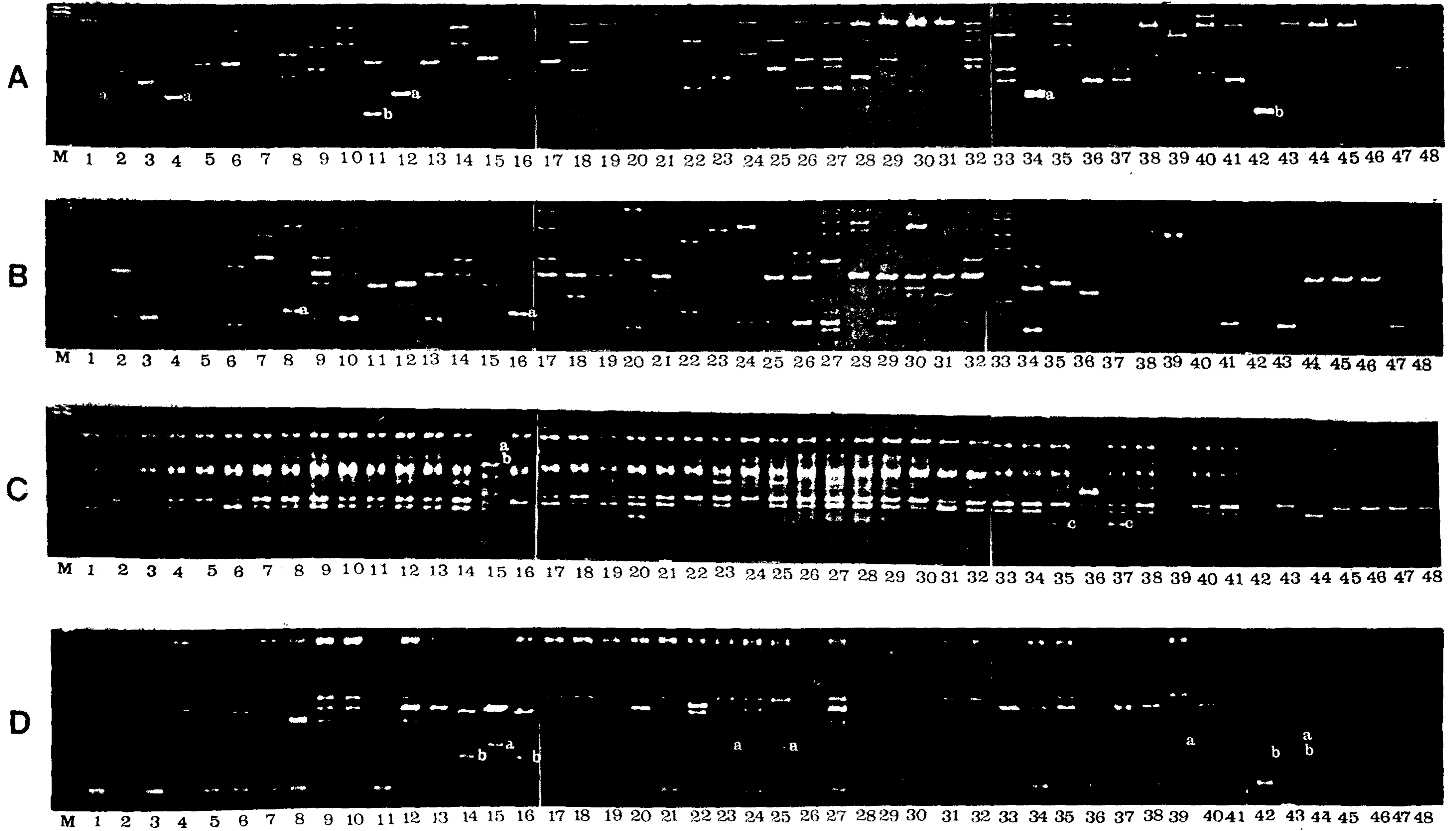
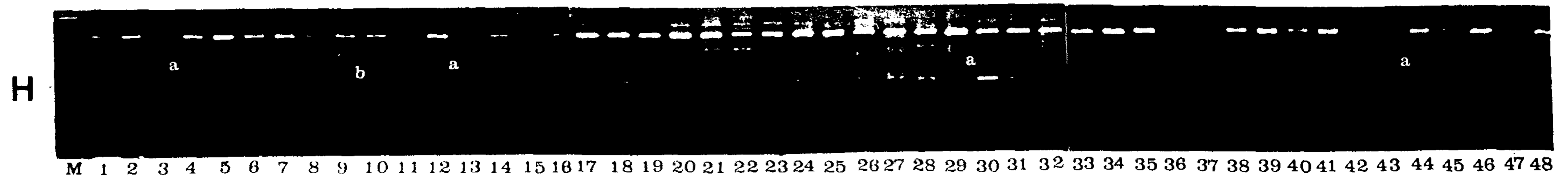
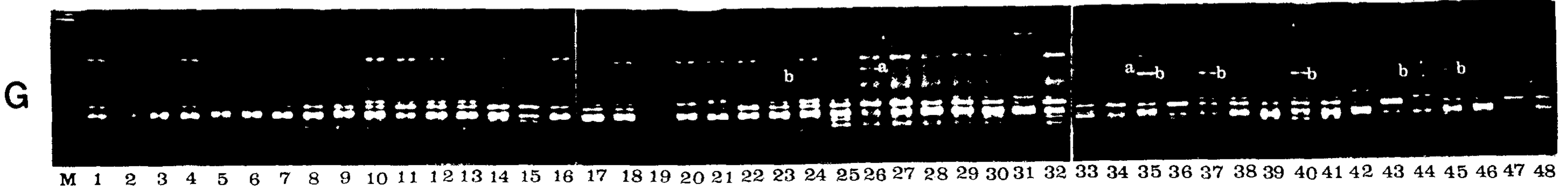
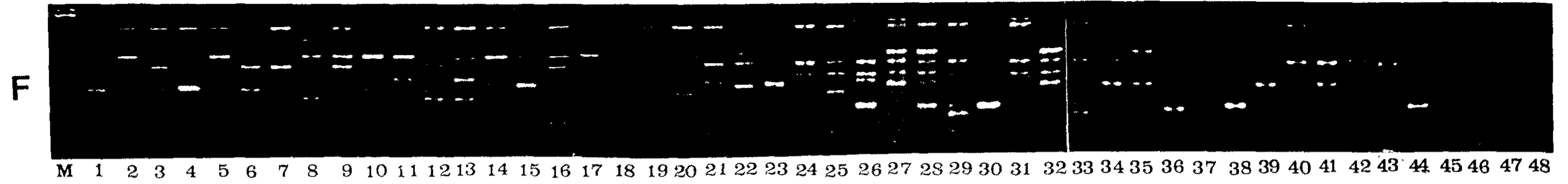
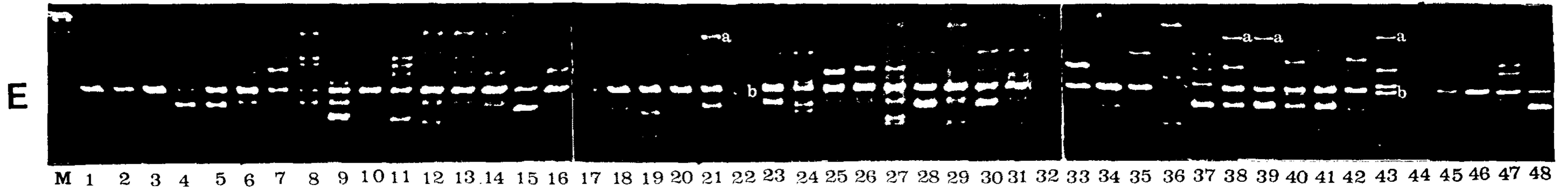


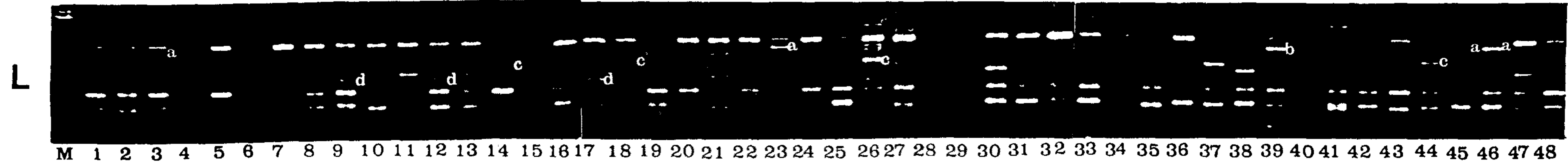
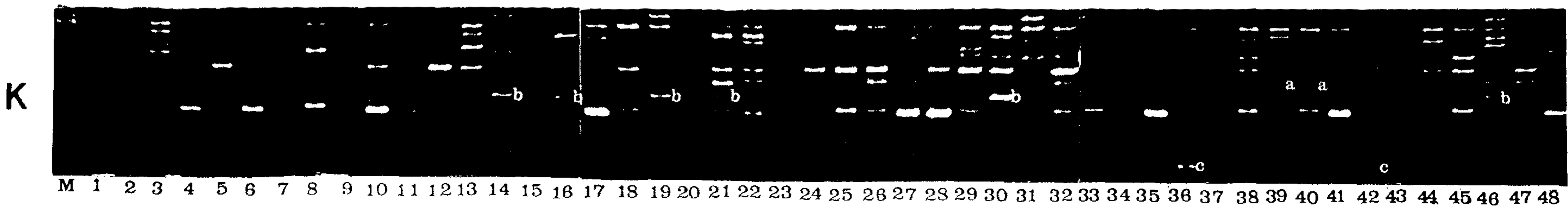
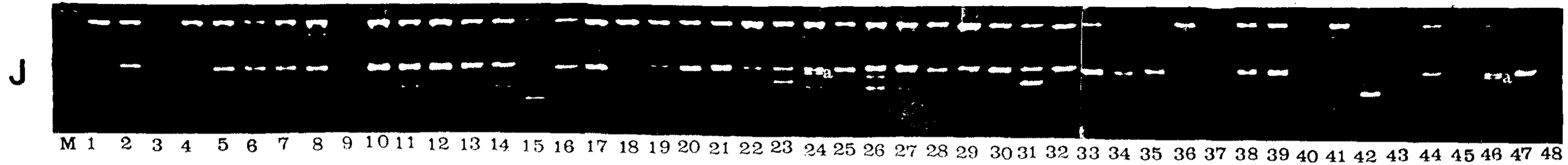
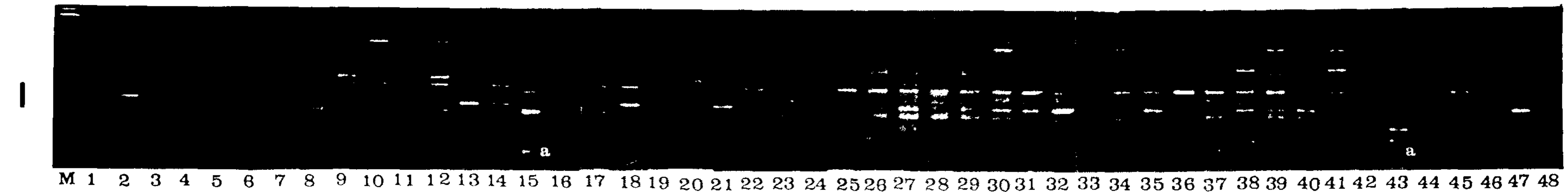
Fig. 2. RAPD analysis of parents and its F<sub>1</sub> hybrids in *C. sinensis*. The primer C, D, E, F, I, L, J, K, M, O, P were agreed with Table 2 and primer V: 5'-AGGGCTCTAGGC-3'. Lane M: molecular weight markers(PstI-digested lamda DNA). The scored fragments are given in Table 4.



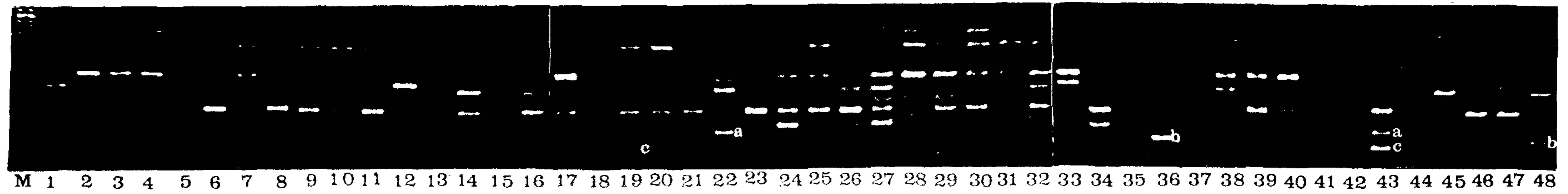




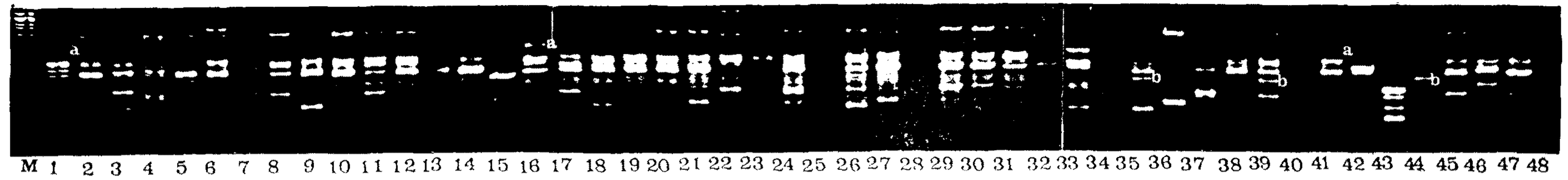




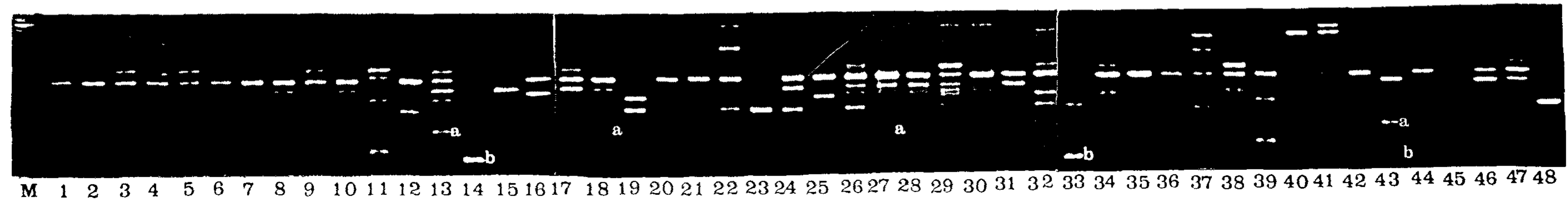
M



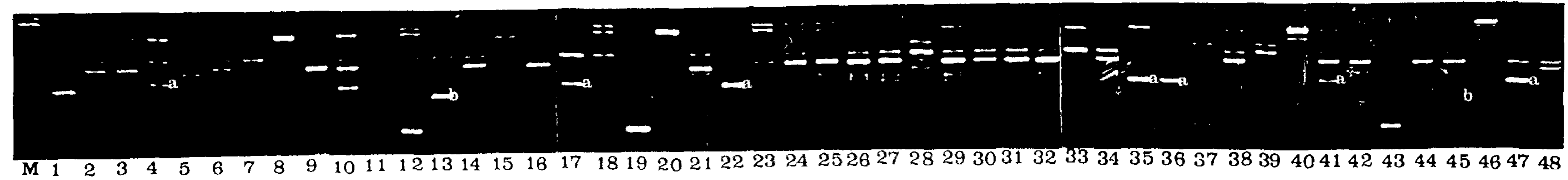
N



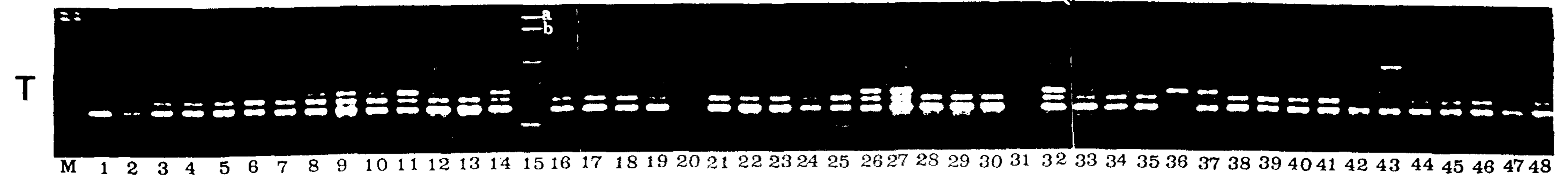
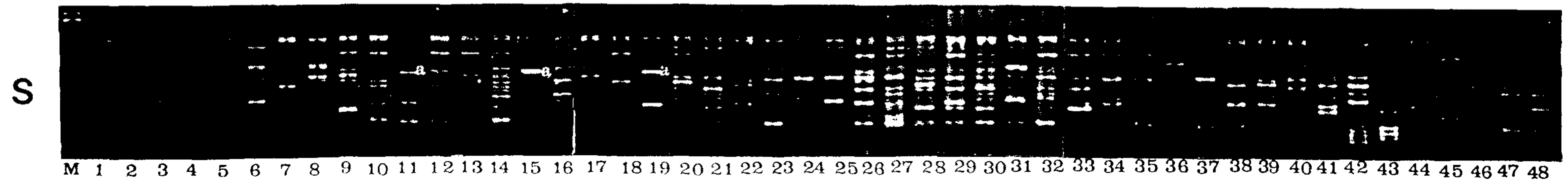
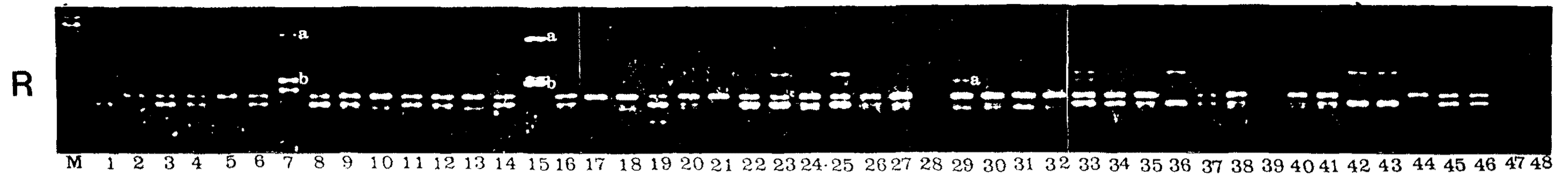
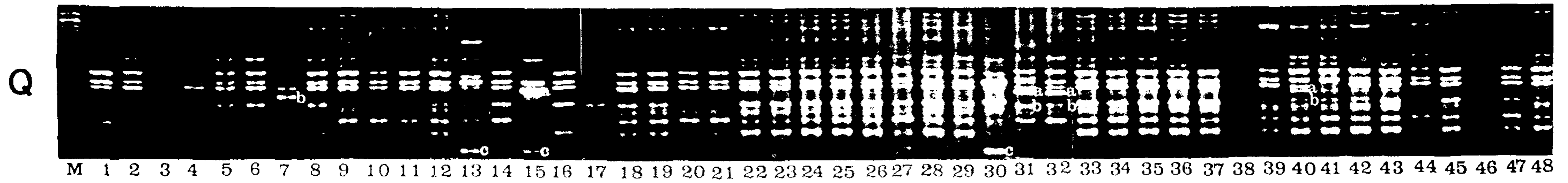
O



P







## 별첨 3

### 國內 野生種 茶의 葉綠體 DNA library 作成

Construction of Chloroplast DNA Library in Korean Spontaneous Tea Plant

#### 1. 서론

국내 자생종 차의 품종화를 위한 일환으로써 보다 정밀한 분자적 동정의 정보가 필요하다고 생각되어 우선적으로 게놈 크기가 작은 엽록체 DNA의 분석에 착안 하였다. 일본은 1992년도까지 약 44품종이 등록되어 다양한 차를 생산하고 있다. 이러한 품종 육성은 주로 교배육종 후 형질선발의 과정으로 개량된 것이며, 금후 고품질의 경쟁력 있는 품종을 육성하려면 보다 적극적인 유전 공학적 기법의 도입이 필요하다.

품종 육성에 이용되고 있는 바이오테크놀러지 기술로써는 세로 융합과 DNA 조환 기술 등이 있으나 전자의 경우는 많은 시료수와 선발 과정상 시간이 많이 소요된다. 그리하여 유전자를 직접 개변하는 기술을 이용하여 광합성을 행하는 기관인 엽록체를 구성하는 단백질을 개변함으로써 보다 광합성량이 많은 차 품종을 육성할 수 있으리라고 생각했다. 엽록체를 구성하는 단백질을 code하는 유전자는 핵 DNA 와 엽록체 DNA로 나눌 수 있으며, 어느 쪽이든 혹은 양자를 모두 개변 할 수 있을 것이다.

엽록체 DNA는 그 유전 양식이 모성 유전을 하기 때문에 DNA 조환은 일어나지 않고 모친의 엽록체 DNA만이 자손에 전달된다. 즉, 엽록체 DNA는 지금까지의 육종방법에서는 손을 대지 않은 부분이라고 말할 수 있다. 또한 게놈 크기가 작기 때문에 DNA 의 구조나 발현, 엽록체 DNA 상에 code되어 있는 단백질의 역할 등, 게놈이 어떻게 움직이고 있는가 등을 조사하는데 상당히 유리하다. 특히, 광합성에 관여하는 유전자를 엽록체 DNA 분자당 1개 이기 때문에 더욱 유리한 개변 영역이라고 생각된다. 엽록체에 DNA를 도입한 보고는 Ti Plasmid을 사용한 방법(Block et al. 1985)과 세포 융합방법(Medgyesy et al. 1985) 및 Microprojectiles법(Boynton et al. 1988, Blowers et al. 1989,) 등이 있다.

고등식물의 세포중에는 10-200개의 엽록체가 존재하며, 엽록체 1개당 copy수는 십여개에서 부터 수백개 정도까지 존재한다고 알려져 있다(石田, 1987). 또한, 엽록체의 수는 식물 종, 생육시기 및 광 등에 의해서도 크게 좌우되므로 엽록체 DNA를 개변하는 경우 copy 수가 적은 시기에 DNA를 도입 할 필요가 있다.

본 연구에서는 국내 자생차 엽록체 게놈에 어떠한 유전자가 code 되어 있는가를 해석하고, 유용유전자를 cloning 하기 위한 일환으로써 엽록체 게놈 library를 작제 하였다.



## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1 실험 재료

본 연구에 이용된 식물 재료는 향림사(전남 순천시 소재)에 재식중인 국내 자생종 *C. sinensis*를 이용했다. 엽록체 DNA 추출에 이용한 엽은 제1번 차기의 제 2 및 제 3 엽을 이용하였다.

### 2.2 방법

#### (1) 엽록체 DNA의 추출

500ml용의 blender cup에 50g의 엽을 넣고, 액체질소를 넣어 3-4회 10,000rpm에서 거칠게 파쇄 시킨 후, 6초간 3회, 18,000rpm으로 분쇄 시켰다. 이것을 엽 50g당 250mL의 KA + BS buffer(50mL Tris-HCl pH 8.0, 0.1% BSA, 5mM 2-mercaptoethanol)로 추출하고, gauze 및 miracloth로 여과하여 10,000 x g로 10분 원심한 후, 상청을 버리고 침전물은 엽 50g당 2.5ml의 KA + S buffer(50mL Tris-HCl pH 8.0, 0.35M sucrose, 7mM EDTA pH 8.0, 5mM 2-mercaptoethanol)에 용해 시켰다. 이 용액을 5ml씩 sucrose gradient에 상층하고 2,200 x g, 30분간 원심하였다. 45-60%의 계면 부근에 생긴 엽록체의 band를 pipette로 취한 뒤 3 배량의 KB buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0)를 첨가하여 6,000 x g, 10분간 원심하였다. 다시금, 침전물을 엽 200g당 1mL의 멸균 KB buffer로 녹인 후 nurse flask에 옮겨, sodium N-lauroyl sarcosinate을 이용하여 실온 15분, proteinase k로 37 °C, O/N 보온하였다. 다음에 phenol/chloroform(1/1, v/v)로 2회씩 추출, EtOH 침전하여 70% EtOH로 3회 수세후, 진공건조하여 200mL의 TE buffer에 용해시켰다.

#### (2) 엽록체 DNA library의 작제

엽록체 DNA를 cloning 하기 위하여 Zabarovsky등(1986)의 방법에 따라  $\lambda$ Fix vector를 이용하여 cloning하였다.  $\lambda$ Fix DNA를 제한요소 *Xho*I으로 완전 분해하고, 절단한 부위의 돌출 부분을 Klenow효소로 제거하였다. 한편, insert DNA는 *Sau* 3AI으로 부분 절단하여 절단한 부위의 돌출 부분을 제거하였다. 이렇게 처리한 vector와 insert DNA를 연결 반응하면 vector와 insert DNA는 결합하지만 insert DNA를 크기별로 분획할 필요가 없고 이 단계의 DNA손실을 적게 할 수 있었다.

우선, cloning하고 싶은 엽록체 DNA를 *Sau*3AI로 부분절단 하였다. 이 때 9-22kb의 DNA 단편이 가장 많이 생성되는 조건을 조사하기 위하여 예비실험을 행하여 엽록체 DNA 18.3 $\mu$ g당 5 units의 *Sau*3AI으로 37°C, 5분간 열처리하여 효소를 실활시키고, phenol처리 후 EtOH침전시켜 진공건조 후 20 $\mu$ L의 TE buffer로 용해하였다. 이것을 부분적인 환원반응을 시키기 위하여 eppendorf tube속에서 반응시킨 후 50 $\mu$ L의 1 $\times$ SET buffer(100mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA)을 첨가, 다시금 22.5 $\mu$ L의 10 $\times$ SET buffer를 첨가시켰다. phenol/chloroform처리로 2회 추출, ETDH침전시켜 진공건조후 20 $\mu$ L의 TE buffer로 용해시켰다. 이



와 같이 조제된 Insert DNA를 Takara사( Japan )의 ligation Kit를 이용하여  $\lambda$ Fix vector 와 ligation 시켰다. 다음에 Stratagene사 (America)의 Gigapack Gold kit를 이용하여 packaging반응을 하여 염록체 DNA library로 하고, 최종적으로 이 phage액을 500 $\mu$ l의 SM buffer(0.1M NaCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% gelatin)과 20 $\mu$ l의 chloroform을 첨가하여 4°C에 보관하였다.

### (3) 염록체 DNA의 plasmid vector에 cloning

Phage vector를 이용한 cloning에서 cover할 수 없었던 염록체 DNA 단편을 cloning 하기 위하여 plasmid vector를 이용해서 염록체 DNA를 cloning하였다. plasmid vector에는 가급적 큰 DNA 단편이 cloning되도록 pBR 322를 사용했다. 우선 염록체 DNA를 BamHI으로 완전히 절단하고, 이것을 phenol추출하고 EtOH 침전했다. vector 및 Insert DNA를 혼합 후, Takara사의 DNA ligation kit를 이용해서 ligation반응을 하였다. 반응 후, *E. coli*(HB 101)에 형질전환하고 조환체 plasmid를 선별하였다. 이 조환체 plasmid 중 목적의 DNA 단편을 갖는 plasmid를 선별하기 위하여 Southern hybridization을 하였다.

### (4) probe작제 및 Southern blot분석

벼 및 시금치 염록체 DNA의 clone으로 부터의 probe는 Boehringer Mannheim사 (Germany)의 Non-radioactive DNA labeling and detection kit를 이용해서 이하와 같이 작제 하였다. probe로 하고 싶은 DNA 단편을 포함하는 plasmid를 적당한 제한효소로 절단한 후 저용점 agarose gel전기영동을 하여 목적의 DNA 단편을 절출하였다.

agarose조각을 열로 용해시켜 phenol처리한 후 DNA를 추출하고 250ng씩 정량하였다. 이 DNA를 100°C에서 5분간 열변성시켜서 얼음물속에서 냉각 시킨 후 Digoxigenin이 표식된 dUTP를 포함하는 dNTP labeling mixture와 Hexanucleotide mixture를 첨가하여 이것에 klenow enzyme(2 units)를 넣어 37°C, 2시간 이상 보온했다. 반응 후 EtOH 침전시켜 70% EtOH로 수세후 진공 건조하여 50 $\mu$ l의 TE buffer에 용해했다.

이 probe를 사용할 때는 사용 직전에 다시 한번 열처리한 후 급냉하여 사용하였다. cloning된 Insert DNA를 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose gel 전기영동후, gel의 사진을 촬영하였다. 그리고 이 gel과 2xSSC에 침적해둔 nylon membrane을 pharmacia LKB의 Vacugene에 set하고 진공시켜 gel을 고정하였다. depurine액(0.25N HCl), 중화액 (0.5M Tris-HCl pH 7.0, 3M NaCl)로 10분간씩 처리후, 20xSSC로 60분간 처리하였다. membrane을 잘 풍건시킨 후 UV( $\lambda = 302\text{nm}$ )를 5분간 조사하여 DNA를 membrane에 결합시켰다. membrane을 20mL hybridization용액(5xSSC, 0.5%(w/v) blocking reagent, 0.1%(w/v)sodium N-lauroly sarcosinate, 0.02%(w/v) SDS)를 넣은 hybrid-bag에 밀봉하고 65°C에서 2시간이상 prehybridization을 하였다. 용액을 버리고 열처리한 probe 5 $\mu$ l를 포함하는 hybridization 용액 2.5ml을 넣어서 65°C에 O/N보온하였다. 50ml의 수세액 A(2xSSC, 0.1%(w/v)SDS)로 5분 2회, 50ml의 수세액 B(0.1xSSC, 0.1% SDS)로 65°C, 15분, 2회, buffer 1(100mM Tris-HCL pH7.5, 150mM NaCl)로 실온 1분간 수세한 후 100ml의 buffer 2(0.5% blocking reagent



nt in buffer 1)로 30분간 실온에서 진탕하였다. 다시금 buffer 1로 1분간 수세하고 20ml의 buffer 1 과 4 $\mu$ l의 항체결합 시약을 넣어 30분간 실온에서 진탕한 후, 100ml의 buffer 1로 15분간 2회 수세하였다. 그리고 20ml의 buffer 3(100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>)로 2분간 진탕한후 10ml의 발생용액(NBT 및 X-phosphate solution in buffer 3) 을 넣은 비닐봉지에 membrane을 밀봉하고 암실에서 O/N 방치하였다. 발색된 membrane은 수세후 풍건시켜 보존하였다. 또한 형광 발색의 기질인 LumigenPPD를 이용하여 X-ray film상에 검출하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 엽록체 DNA의 제한효소 절단 pattern 해석

추출된 엽록체 DNA를 *Bam*HI(B), *Eco*RV(E), *Hind*III(H), *Xho*I(X), B + E, B + H, B + X, E + H, E + X, H + X등의 제한효소로 절단한 후 agarose gel 전기영동을 하였다. Fig.1에 엽록체 DNA의 제한효소 pattern, Table 1에 단편의 크기를 나타냈다. *C. sinensis* 엽록체 DNA 크기는 약 133.96 Kbp 이었다. 그러나 agarose 전기영동으로는 해석 불가능한 작은 DNA단편이 있을 것이므로 이 크기 보다는 약간 클 것으로 생각된다. 또한 DNA량이 다소 적었던 *Bam*HI, *Hind*III, *Xho*I 에서는 다소 검출되지 않은 단편이 있을 것이다. 단일 제한효소 절단에서는 *Bam*HI이 28개의 단편으로 가장 그 수가 많았으며 가장 큰 단편은 20Kb 전후였다. 엽록체 DNA의 구조는 조류, 수태 및 유관속 식물에 있어서 상당히 보존되어 있다(Palmer and stein 1986; Palmer 1987). 엽록체 DNA의 보존성은 *li*verwort, tobacco 및 rice 등의 전 계놈의 DNA염기배열에 의하여 확인되었다(Ohyama et al. 1986). 따라서 염기 배열 내에서의 적극적인 변화 즉, 반복 배열의 역위, 결실, 삽입, 전이 등은 식물분화의 과정 중에서 크게 일어나지 않는다(Palmer et al. 1988). 모든 피자 식물의 엽록체 DNA는 원형이며 120-217Kb 사이의 크기를 갖고 있다. 이 DNA 구조의 특성은 크고 작은 단일 copy 영역에 의해 구분된 반복배열(IR)의 존재이다(Kolodner and Tewali 1979; Koller and Pelius 1980; Chu and Tewari 1982). 피자식물에 있어서 IR의 크기는 대부분에 있어서 약 25Kb이며 이보다 아주 크거나 작은 종은 극히 드물다. 또한, 쌍자엽 식물과 단자엽 식물의 엽록체 DNA 크기는 20Kb 정도의 차이가 있는 것으로 알려져 있으나 그렇지 않은 종도 있어 더욱 많은 연구의 성과가 기대 된다.

#### 3.2. 엽록체 DNA의 cloning과 그 구조 해석

엽록체 DNA를 보다 상세하게 해석하기 위하여  $\lambda$  phage vector 및 plasmid vector를 이용해서 cloning 할 필요가 있다고 생각 했다. 신엽으로 부터 엽록체 DNA library를 추출하여 *Sau*3AI으로 부분 절단하고 엽록체 DNA library를 얻었다.

또한 시금치 및 벼의 엽록체 DNA의 clone bank로 부터 적당한 clone을 선발하여 이것을 probe로 이용하여 plaque hybridization을 행함으로써 positive한 clone을 다수 선발하였다. 각 clone의 DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 후, agarose gel전기영동, Southern hybridization에 의해 이들 clone군의 제한효소 지도를 작성중이다(실험중).

다음은 엽록체 DNA를 plasmid cloning 하기 위하여 우선 엽록체 DNA를 *Bam*HI으로 완전 분해한 pBR322에 cloning하여 차 엽록체 DNA의 plasmid library를 적제하고, 다수의 colony를 얻었다. 각 colony로 부터 plasmid DNA를 추출한 후 Insert DNA를 *Bam*HI



으로 절단한 후 0.8% agarose gel상에 분획 하였다(Fig. 2a,b). Insert DNA단편의 크기는 100-4,000bp정도 사이에 다수 존재 하였으며 기대의 큰 단편(약 10Kb)은 좀처럼 얻기가 어려웠다. 다음은 이들 단편중 가급적 큰 단편을 대상으로 엽록체 DNA 전 clone을 DIG labeling후 probe로 이용하여 Southern blot분석을 행하였다. 그 예를 Fig. 3a, b에 나타냈다. Fig. 3a에서의 A 및 B의 위치의 단편이 Fig. 3b의 동일 위치에 반응하지 않았다. 그 이유로는 1) cpDNA가 아니고 nDNA 혹은 mtDNA 단편일 가능성, 2) cpDNA 이긴하나 시금치 엽록체 DNA상에 존재하지 않는 단편일 가능성 등을 열거 할 수 있다. 이러한 절차를 통하여 최종적으로 74단편을 선별하여 크기 순으로 나열한 것이 Fig. 4 이다. 약 10Kb이상의 단편이 3개뿐이며 대부분 작은 단편이 삽입 되었고, double copy가 포함 된 것도 있었다(36, 53, 59, 62 Lane).

현재 이들 단편이 차 엽록체 DNA의 전 clone을 cover하는 가를 검토 중이며, 각 clone에 대한 제한효소 map을 작성 중이다. 그 한예를 Fig. 5 및 Fig. 6에 나타냈다. 이용한 probe는 각각 벼 유래의 B8 및 P7 clone을 이용하였으며, 사용된 제한효소는 Fig. 1과 동일하다.

#### 4. 적요

엽록체 DNA의 제한효소 pattern으로 판단하면 국내 자생종 *C. sinensis* 엽록체 DNA 크기는 약 133.96 Kbp 이었다. 단일 제한효소 절단에서는 *Bam*HI이 28개의 단편으로 가장 그 수가 많았으며 가장 큰 단편은 20Kb 전후였다.

엽록체 DNA를 보다 상세하게 해석하기 위하여  $\lambda$  phage vector 및 plasmid vector를 이용해서 cloning 할 필요가 있다고 생각 했다. 신엽으로 부터 엽록체 DNA library를 추출하여 *Sau*3AI으로 부분 절단하고 엽록체 DNA library를 얻었다. 또한 시금치 및 벼의 엽록체 DNA의 clone bank로 부터 적당한 clone을 선별하여 이것을 probe로 이용하여 plaque hybridization을 행함으로써 positive한 clone을 다수 선별하였다.

엽록체 DNA를 plasmid cloning 하기 위하여 우선 엽록체 DNA를 *Bam*HI으로 완전 분해한 pBR322에 cloning하여 차 엽록체 DNA의 plasmid library를 적제하고, 다수의 colony를 얻었다. Insert DNA단편의 크기는 100-4,000bp정도 사이에 다수 존재 하였으며 기대의 큰 단편(약 10Kb)은 좀처럼 얻기가 어려웠다. 최종적으로 74단편중 약 10Kb이상의 단편이 3개뿐이며 대부분 작은 단편이 삽입 되었고, double copy가 포함 된 것도 있었다(36, 53, 59, 62 Lane). 현재 이들 단편이 차 엽록체 DNA의 전 clone을 cover하는 가를 검토 중이며, 각 clone에 대한 제한효소 map을 작성 중이다.

#### 5. 인용문헌

- Blocks, A. D., J. Schell and M. V. Montagu (1985) Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 4: 1367-1372.
- Blowers, A. D., L. Bogorad, K. B. Shark and J. C. Sanford (1989) Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: Foreign DNA can be stably maintained in the chlorosome. Plant Cell 1: 123-132.
- Boynton, J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. R. Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, J. C. Sanford (1



988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectile s. Science 240: 1534-1538.

Chu, N. M., K. K. Tewari (1982) Mol. Gen. Genet. 208: 335-341.

石田政弘 (1987) 「葉緑体の分子生物学」東京大学出版会 pp. 25-26, 57-62.

Koller, B., H. Delius (1980) Mol. Gen. Genet. 178: 261-269.

Kolodner, R., K. K. Tewari (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 41-45.

Medgyesy, P., Fejes, E. and Maliga, P. (1985) Interspecific chloroplast re-combination in a *Nicotiana* somatic hybrid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6960-6964.

Table 1. Size in kbp and number of restriction fragments of *Camellia sinensis* chloroplast DNA. The numbers in brackets on the right of each column indicate the stoichiometry those fragments located in the inverted repeats

No.	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RV	<i>Hind</i> III	<i>Xho</i> I	<i>Bam</i> HI+ <i>Eco</i> RV	<i>Bam</i> HI+ <i>Xho</i> I	<i>Eco</i> RV+ <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RV+ <i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III+ <i>Xho</i> I
1	19.0	20.0	16.8	20.5	10.5(2)	14.2(2)	10.5	20.0	10.5(2)
2	16.8	14.2(2)	14.2	18.0	8.5(2)	7.5	8.0(2)	14.2	8.4
3	10.5	12.0	12.0	14.2(2)	7.1	7.1(2)	6.4(2)	9.5(2)	8.0(2)
4	8.9	9.5	10.1	11.2	6.4	6.4	5.9(2)	8.0(2)	7.1
5	6.6(2)	7.5	9.5(2)	9.5	6.2(2)	5.3	5.7	6.2	6.4
6	5.9	7.1	8.9	8.4	5.9	5.0	5.3	5.3(2)	6.2(2)
7	5.5	5.9	8.0	7.1(2)	5.1	4.1(2)	5.1	4.8	5.7
8	5.1	5.3	5.5	5.9	4.8	4.3	4.6(2)	4.4(2)	5.3
9	4.4	5.0	5.0	4.3	4.4	4.0	4.3(2)	4.0	4.8
10	4.1	4.8(2)	4.6	4.0	4.0(2)	3.4(2)	3.7(2)	3.5(2)	4.4(2)
11	3.7(2)	3.8	3.8(2)	3.7(2)	3.6	3.2(2)	3.4	3.3	4.0
12	3.4(2)	2.9(2)	3.4	3.3	3.2(2)	2.9(2)	3.2	3.1	3.8
13	3.2	2.8(2)	2.9	1.3	3.0(2)	2.7	2.7(2)	2.7(2)	3.7
14	2.8	2.4(2)	2.7		2.7(2)	2.5	2.5	2.3(2)	3.2(2)
15	2.5	1.9	2.1		2.3(2)	2.3	2.3(2)	1.8	2.7
16	2.4	1.3	1.9		1.9(2)	2.2(2)	2.2(2)	1.3(2)	2.6(2)
17	2.3	1.1	1.7(2)		1.8(2)	2.1(2)	1.8	1.2	2.5
18	2.2		1.6		1.5(2)	1.7	1.7	1.1(2)	1.9
19	2.0		1.5		1.3(2)	1.6(2)	1.6(2)		1.6(2)
20	1.9		1.4(2)		1.1	1.3	1.5		1.38
21	1.7		1.3		1.0	1.3	1.3(2)		
22	1.6(2)				0.8	1.2(2)	1.2		
23	1.5(2)				0.7	0.9	0.8(2)		
24					0.6	0.8(2)	0.7		
25						0.7(2)	0.6		
26						0.6			
Total	134.7	134.6	135.3	136.4	135.4	132.9	131.0	134.8	130.7
Mean value		<b>133.96</b>							



Table 2. Callus induction rate in leaf and stem segment culture following day after inoculation

Day after inoculation	Organ (%)							
	Leaf			Stem				
	L1	L2	L3	S1	S2	S3	S4	EL
DAI 30	38.7	29.8	28.2	41.1	40.3	39.8	40.3	24.2
DAI 40	40.3	31.1	25.8	55.2	49.7	45.2	44.4	27.4
DAI 50	45.2	35.2	30.0	58.4	56.0	50.0	45.2	30.0

DAI: day after inoculation, L1: first leaf, L2: second leaf, L3: third leaf, S1: first stem, S2: second stem, S3: third stem, S4: fourth stem, EL: epidermal layer from S2 and S3.

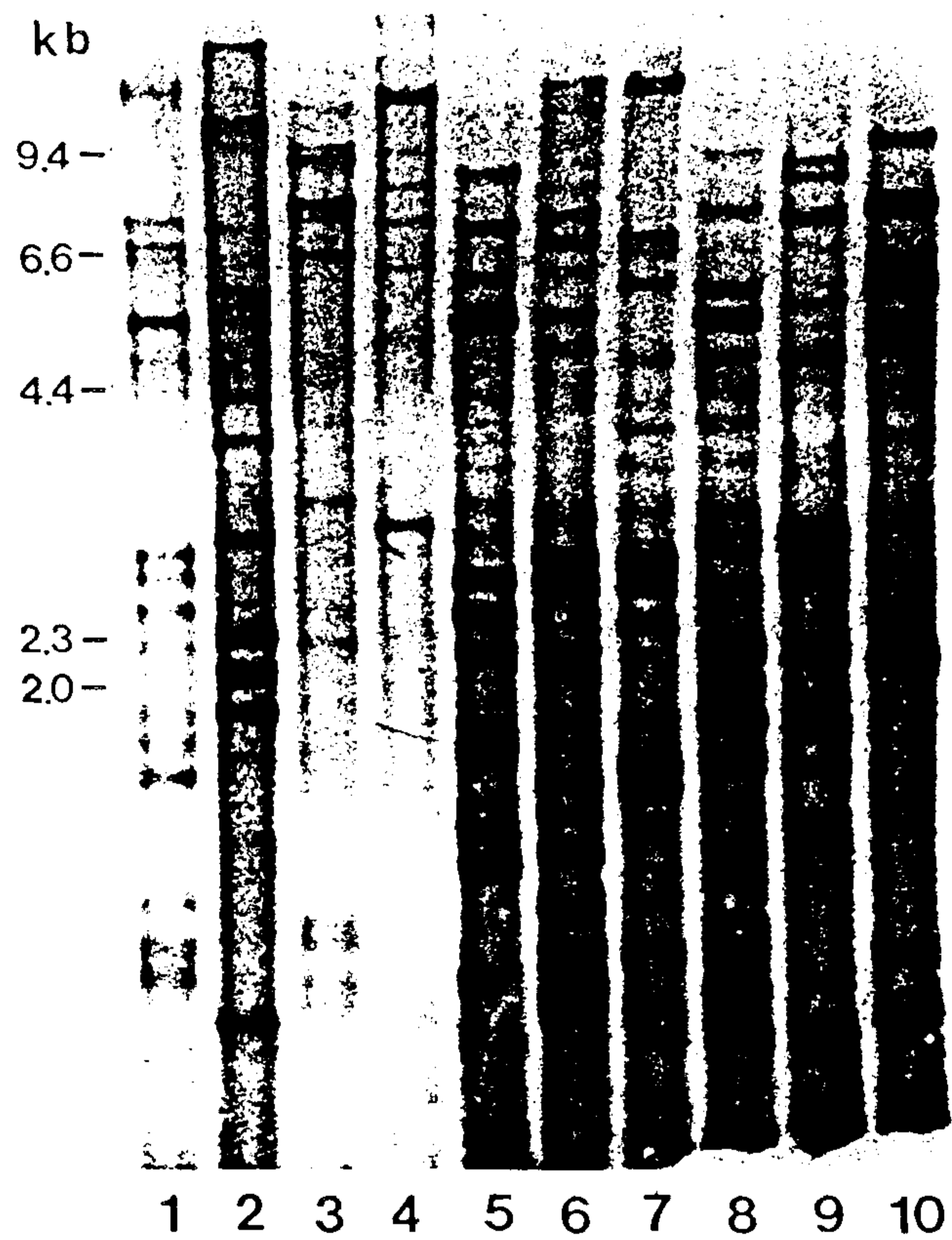


Fig. 1. Restriction fragment patterns of the *Camellia sinensis* chloroplast genome. Electrophoresis was performed in 0.8% agarose gels. 1: *Bam*HI, 2: *Eco*RV, 3: *Hind*III, 4: *Xho*I, 5: B+E, 6: B+H, 7: B+X, 8: E+H, 9: E+X, 10: H+X. The numbers on the left indicate the sizes(Kbp) of marker fragment.



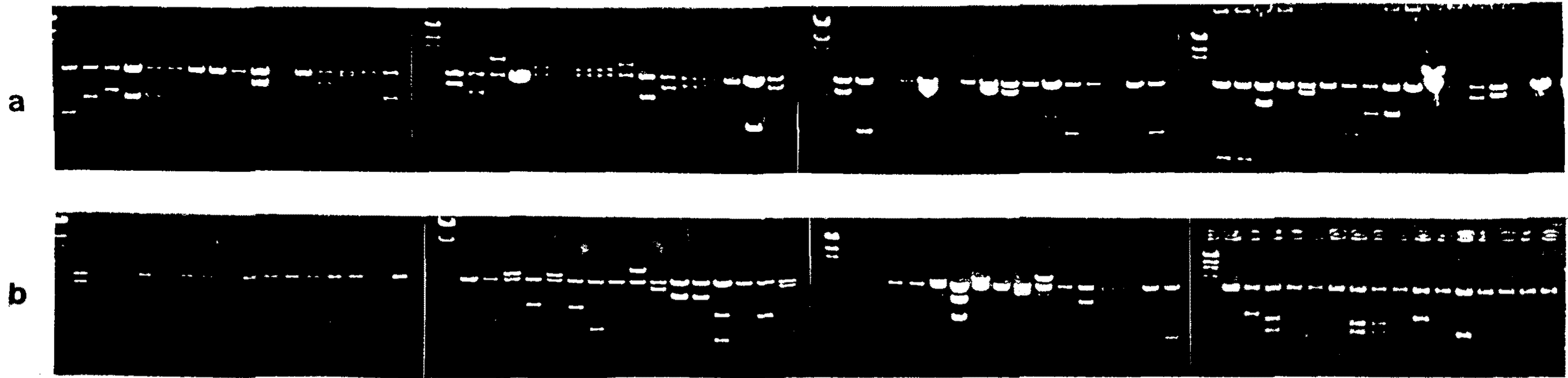


Fig. 2. Clone bank of *C. sinensis* cpDNA. *Bam*HI clones(1-108) and the cpDNA(lane furthest right) were digested with *Bam*HI and separated on a 0.8% agarose gel.

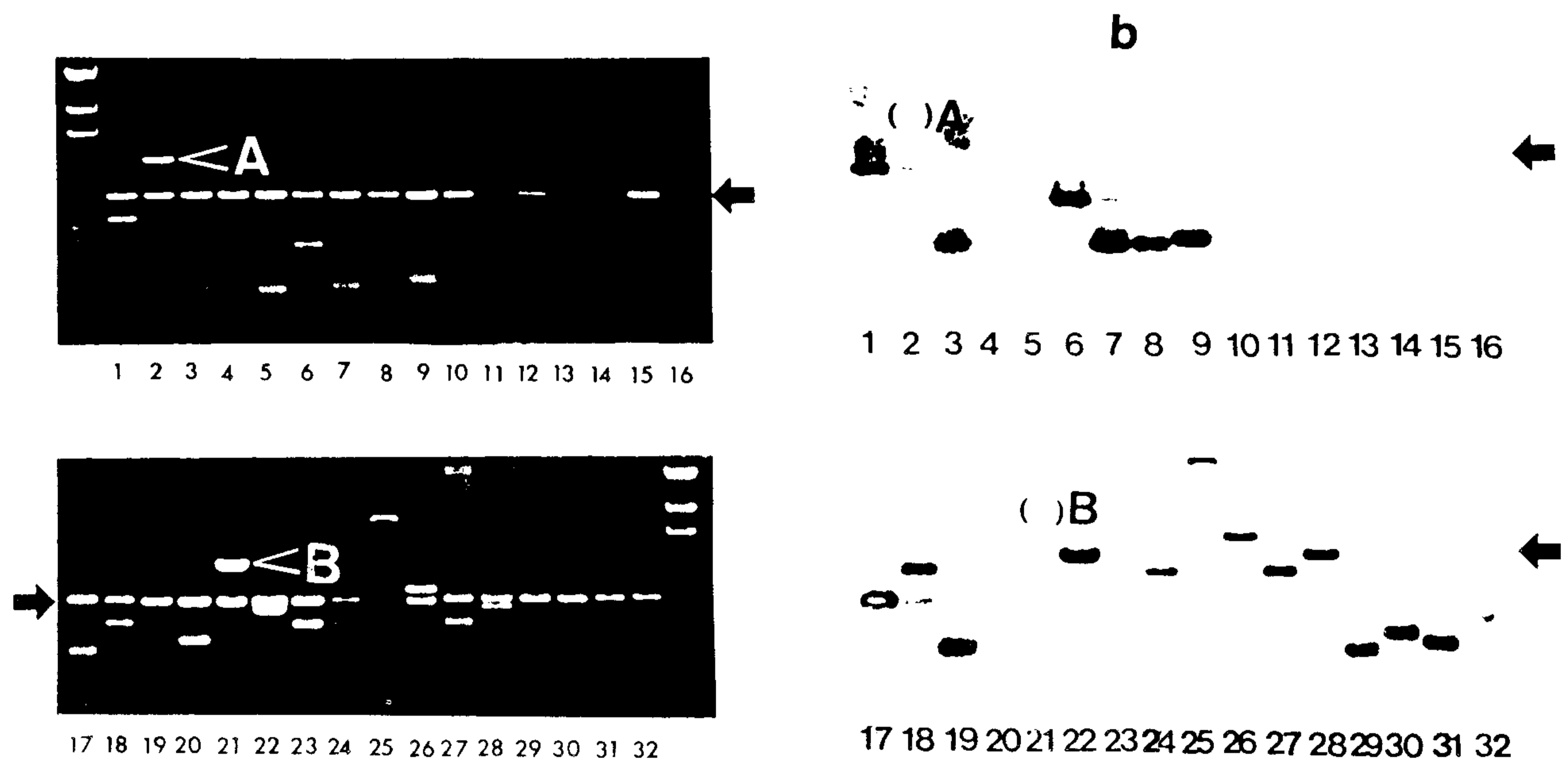


Fig. 3. Southern hybridization patterns of *C. sinensis* cpDNA. Probe: spinach total clone.



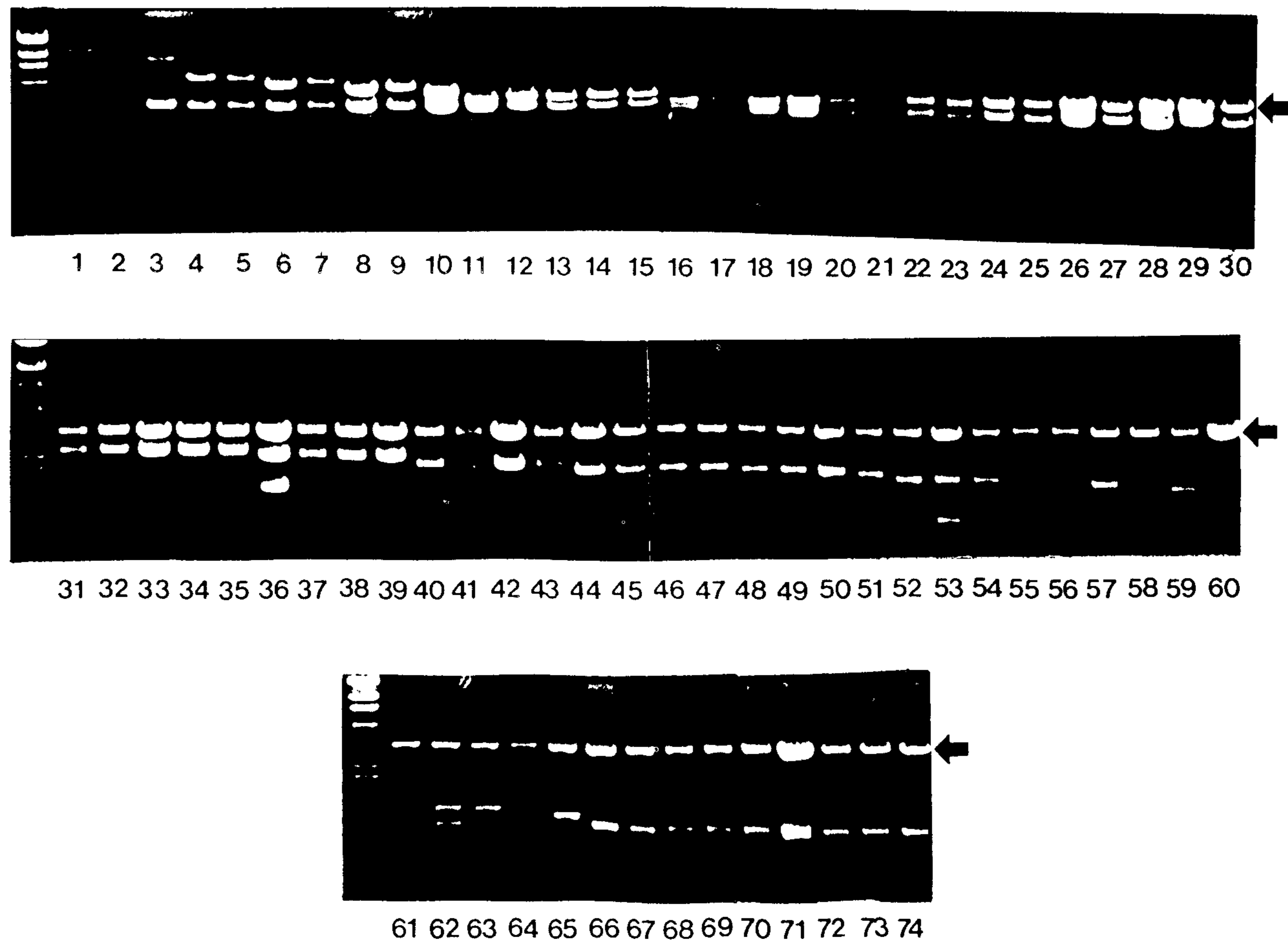


Fig. 4. Clone bank of *C. sinensis* cpDNA. *Bam*H1 clones(1-74) and the cpDNA(lane furthest right) were digested with *Bam*H1 and separated on a 0.8% agarose gel. Arrow indicates the vector(pBR322).

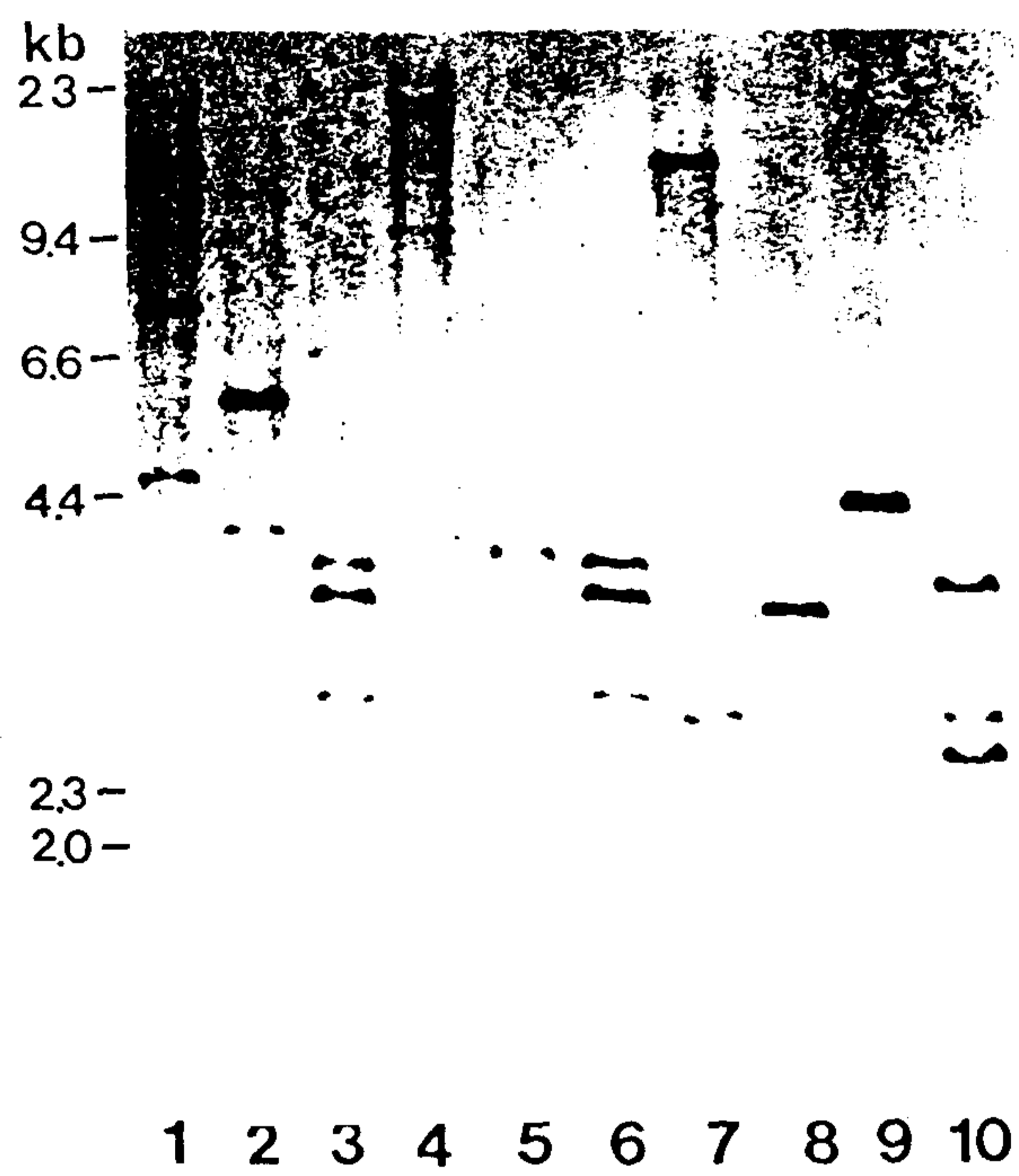


Fig. 5. Southern hybridization patterns of *C. sinensis* cpDNA  
Probe: B8 clone from rice.



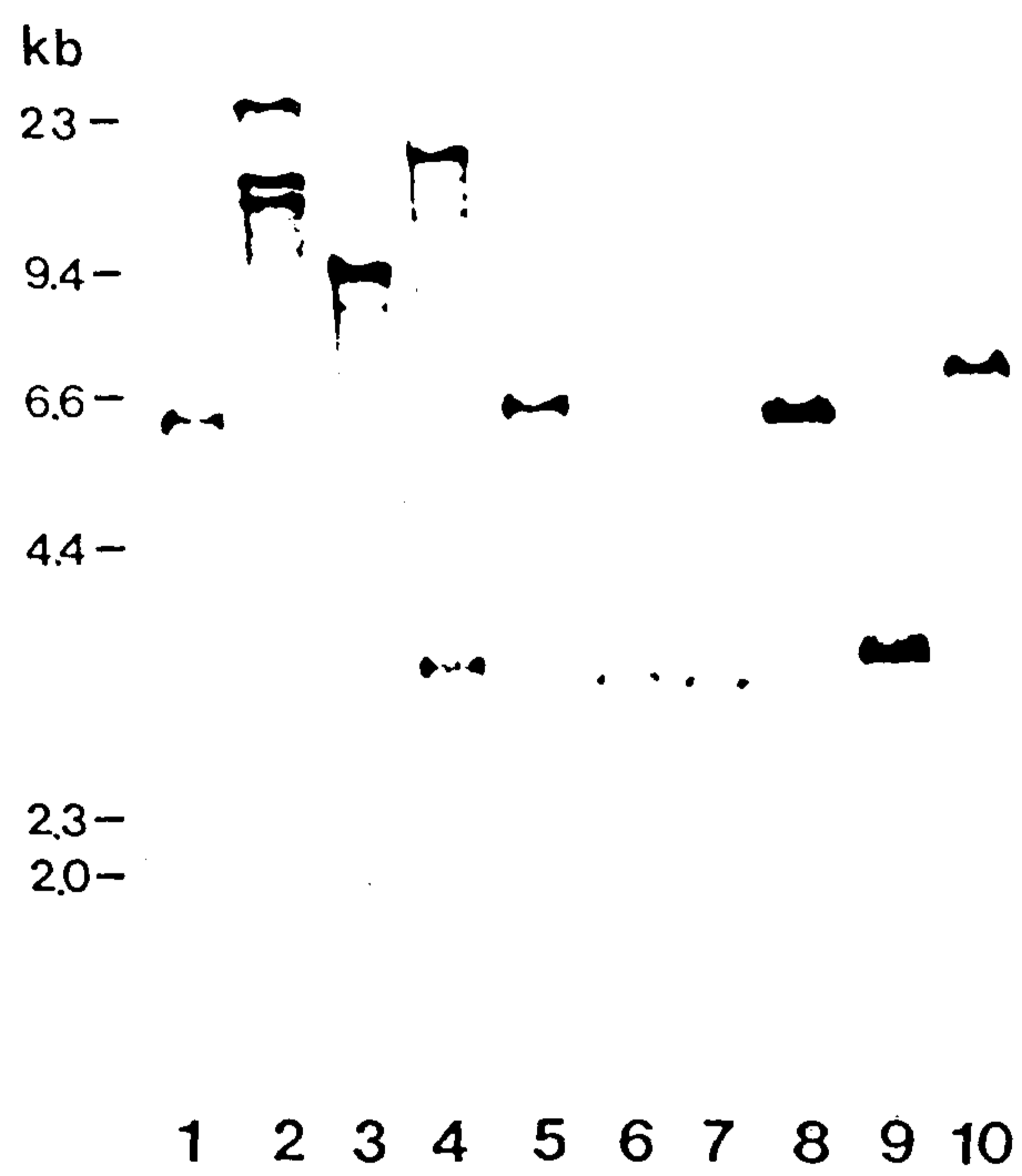


Fig. 6. Southern hybridization patterns of *C. sinensis* cpDNA  
 Probe: P7 clone from rice.