

최 종
연구보고서

사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정 및 최적 수분수 선발

Selection of Pollinizer and Determination of
Self –incompatibility Genotype in Apple and Pear

연 구 기 관

순 천 대 학 교
원 예 연 구 소

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정 및 최적 수분수 선발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 1일

주관연구기관명 : 순천대학교
총괄연구책임자 : 노 일 섭
세부연구책임자 : 신 동 영
연 구 원 : 김 회 택
연 구 원 : 김 현 중
연 구 원 : 조 지 영
협동연구기관명 : 원예연구소
협동연구책임자 : 신 용 익
연 구 원 : 강 상 조
연 구 원 : 황 해 성
연 구 원 : 황 정 환
연 구 원 : 신 일 섭
연 구 원 : 김 대 일
연 구 원 : 홍 성 식

여 백

요 약 문

I. 제 목

사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정 및 최적 수분수 선발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 외국 농산물의 수입개방에 따라 우리나라의 주요 경제작물이 밀반입되어 국내산과 구별이 되지 않아 시장 유통질서가 유지되지 않고 있다. 뿐만 아니라 밀수 또는 수입 농산물에서 인체에 치명적인 농약이 기준치를 훨씬 넘게 잔류되어 있는 것으로 판명되어 국민 건강을 위협하고 있다. 즉 우리 농산물이 아니면 안심하고 먹을 수 없는 상황이 되었다. 즉 모든 농산물을 브랜드화 하지 않으면 세계 시장에서 경쟁력을 잃게 되고 품질경쟁에 관한 요구도는 점차 확대되고 있다. 이를 위해 우리나라 특유의 고품질 사과, 배 품종을 육성하고 보급해야 할 것이다. 현재 시판되는 사과, 배의 품종은 자가불화합성 기구를 이용하여 합성된 것이며 과원에서의 수분, 수정도 자가불화합성 이론에 근거하여 수확에 이르고 있다. 국내의 사과, 배 품종육성은 대부분 외국품종을 교배하여 선발, 육성한 것으로 양친들의 자가불화합성 유전자형(S-genotype)은 분자적 방법을 이용하여 일본, 유럽, 미국 등의 연구자들에 의하여 밝혀지고 있다. 그러나 국내 육성 사과, 배 품종과 재배되고 있는 국외 사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형은 동정되지 않은 상태이다. 사과, 배는 배우체형 자가불화합성으로 주두측 및 화분측 자가불화합성 유전자 존재하고 이들 간에는 공우성 관계를 나타내므로 수분수 선발에 있어 $S_a S_b$ 를 갖는 품종에 S_a 나 S_b 가 아닌 다른 유전자를 갖는 품종을 수분수로 활용하면 결실율은 거의 100%를 나타내지만, 한쪽이라도 같으면 결실 효율이 50%으로 줄어든다. 만약 유전자형이 같은 수분수는 전혀 결실을 하지 못하게 된다. 이와 같이 수분수의 선발에 있어서 자가불화합성 유전자형이 결정하는 것은 매우 중요하다. 또한 품종육성시의 유묘기에 자가불화합성 유전자형을 알 수 있으면 불필요한 묘목을 도태시킬 수 있어 성목이 될 때까지 드는 비용과 노력이 감소 될 것이다.

본 과제의 연구내용은 화분관 검정에 의한 화분관 행동 관찰, 교배에 의한 결실율 조사, PCR-RFLP분석에 의한 자가불화합성 유전자형 다형성 검토, 주두측

자가불화합성 유전자인 S-RNase의 cloning 및 sequencing에 의하여 국내육성 사과, 배 품종의 S-genotype 결정 등이다. 즉 S-genotype을 유묘기에 결정하는 방법(primer 및 제한효소 선발)을 개발하여 육종현장에서 활용할 수 있도록 하며, 현재 재배되고 있는 사과, 배의 국내품종들의 S-genotype을 결정하여 최적 수분수 선정에 활용토록 하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

세부연구과제	연구개발 내용 및 범위
PCR-RFLP 및 PCR-CAPS 분석에 의한 배 및 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 결정	① 수집유전자원으로부터 DNA 추출, 정제 ② S-RNase 유전자 관련 primer 선발, 합성 ③ S-RNase 특이적 제한효소 선발 ④ DNA 분획단편 분석에 의한 S-genotype결정 ⑤ S-RNase의 염기서열 결정 후 유전자 검색 ⑥ S-RNase의 intron 분석에 의한 S-genotype 결정 ⑦ PCR-RFLP 분석 및 Southern blotting
배(<i>Pyrus pyrifolia</i>)의 새로운 S-RNase의 동정 및 PCR-RFLP에 의한 자가불화합성 유전자형의 결정	① S-RNase의 new allele의 검출 및 염기서열 결정 ② New allele의 intron 분석 ③ New allele의 cloning 및 염기서열 결정 ④ S-RNase 유전자 관련 primer 선발, 합성 ⑤ DNA 분획단편 분석에 의한 S-genotype결정
PCR-RFLP에 의한 자가불화합성 품종과 자가화합성 품종사이의 자식으로부터 자가화합성 계통선발	① 자가화합성 품종과 자가불화합성 품종간의 교잡 후대 육성 ② 교잡후대의 S-RNase 유전자 분석 ③ 교잡후대의 PCR-RFLP 분석 ④ 교잡후대의 자가결실성 조사
화분관검정 및 이면교배에 의한 교배친화성 및 양적, 질적 형질분석 그리고 수분수 선발	① 이면교배 후 교배친에 따른 화분관 행동 조사 ② 공시 품종별 교배조합에 따른 착과율 조사 ③ 수분수에 따른 품종의 형질조사 ④ 품종별 교배 후 결실율조사 ⑤ 화분친에 따른 metaxenia 현상조사 ⑥ 수분수 적합성 검토(최적 수분수 선정)

세부연구과제	연구개발 내용 및 범위
자가불화합성을 이용한 S-호모접합체의 육성 및 선발	① 자식에 의한 자식종자 획득 ② 자식후대의 전개 ③ PCR-RFLP법에 의한 S-호모접합체의 screening ④ S-호모접합체의 육성
자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP법에 의한 배와 사과의 속간 교잡후대 선발	① 배 품종과 사과 품종간의 교잡 ② 수정후 배주 배양 ③ 교잡후대의 육성 ④ 교잡후대의 염색조직으로부터 DNA 추출, 정제 ⑤ S-RNase 유전자 관련 primer에 의한 잡종 선발 ⑥ DNA 분획단편 분석에 의한 S-genotype결정 ⑦ S-RNase의 염기서열 결정 ⑧ 선발된 속간 잡종의 육성 및 형질분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 배 및 사과 품종의 화분관 검정에 의한 자가불화합성 정도 분석, 교배에 의한 결실을 조사, S-RNase유전자의 PCR-RFLP분석, cloning 및 염기서열 분석에 의한 S-유전자형 결정 등을 수행하였다. S-genotype을 유묘기에 결정하는 방법(primer 및 제한효소 선발)을 개발하였으며, 배의 새로운 대립유전자를 발견하였다. 또한 S-호모접합체, 자가결실성 계통 및 속간잡종을 신속, 저비용으로 정확히 선별할 수 있는 S-RNase유전자의 PCR-RFLP 분석 체계를 개발하였다.

1. S-RNase 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의한 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정하였다. 국내육성 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 밝히기 위해 S-RNase 관련 프라이머를 이용하여 15 국내육성 배 품종과 5 일본 배 품종에 대해서 PCR을 수행하였다. 증폭된 단편들의 크기는 S₆ (355 bp) < S₇ (360 bp) < S₁ (375 bp) < S₄ (376 bp) < S₃과 S₅ (384 bp) < S₈ (442 bp) < S₉ (1,323 bp) < S₂ (1,355 bp)의 순이었다. 인트론의 크기는 S₁ = 167 bp, S₂ = 1,153 bp, S₃ = 179 bp, S₄ = 168 bp, S₅ = 179 bp, S₆ = 147 bp, S₇ = 152 bp, S₈ = 234 bp, S₉ = 1,115 bp이었다. S-RNase 인트론간의 염기서열을 비교한 결과는 S₁-과 S₄-RNase는 93.7%, S₃-과 S₅-RNase는 93.3%, S₆-과

S₇-RNase는 78.9%로 나타났다.

2. PCR-RFLP와 S-RNase의 염기서열 분석에 의해 배 20품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다. [(Sinkou(S₄S₉), Niitaka(S₃S₉), Housui(S₃S₅), Kimizukawase(S₁S₅), Ichiharawase(S₁S₈), Mansoo(S₃S₅), Shinil(S₃S₄), Whangkeumbae(S₃S₄), Sunhwang(S₃S₅), Whasan(S₃S₅), Mihwang(S₃S₅), Chengsilri(S₅S₇), Gamro(S₃S₅), Yeongsanbae(S₃S₅), Wonhwang(S₃S₄), Gamcheonbae(S₃S₅), Danbae(S₃S₅), Manpoong(S₃S₅), Soowhangbae(S₃S₄), Chuwhangbae(4S₆)].
3. PCR-CAPS법에 의해 22개의 국내 육성 배 계통과 2개의 국내육성 배 품종 및 3개의 일본 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다. 각각의 S-allele의 특이적인 제한효소 *EcoRI* (S₁- and S₄-RNase), *NdeI* (S₄-RNase), *Eco0109I* (S₃- and S₅-RNase), *AlwNI* (S₅-RNase), *MluI* (S₆- and S₇-RNase), *HinCII* (S₆-RNase)를 선발하였다.
4. 국내 육성 배 5품종과 일본 육성 배 10품종을 재료로 이용하여 S-RNase의 PCR 증폭 반응을 수행하였다. 국내 배 품종 '청실리'에서 새로운 S-RNase 유전자를 발견하였으며, S₁₀으로 명명된 이 유전자는 intron 1,513 bp와 exons 213 bp(71개의 아미노산)로 구성되어있었다. S₁₀-RNase의 아미노산 서열의 분석결과 RNase 활성을 가진 한 개의 histidine 잔기와 S-RNase의 특징적인 cysteine 잔기 세 개를 포함하고 있었다. PCR-RFLP와 염기서열 분석결과 'Chengsilri'의 자가불화합성 유전형은 S₅S₁₀으로 결정되었다.
5. PCR-RFLP에 의해 자가불화합성 품종과 자가화합성 품종간의 교잡 후대로부터 자가화합성 계통을 선발하였다. 배의 자가화합성 품종 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm sm; 주두측 돌연변이체)와 자가불화합성 품종간의 교잡종으로부터 S₄-, S₅-, S₆- 및 S₉-RNase 단편만 증폭되는 8개의 자가화합성 계통을 선발하였다.
6. S-allele 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의해 사과 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다. 16개의 cDNA의 S-RNase의 염기서열 정보를 기초로 S-RNase 특이적인 primer 조합을 디자인하였다. 또한 S-RNase의 염기서열의 보존영역에서 Universal primer(ApFN, anti-ApRN)를 개발하여 국내 육성 사과 품종과 국외의 사과 품종의 자가불화합성 유전자를 증폭하였다. 증폭단편

은 cloning하였으며, 염기서열을 분석하여 6개의 S-RNase의 intron 정보를 얻었다.

7. PCR 및 염기서열을 이용하여 국내 육성 사과 7품종에서 S₉-allele(감홍)와 새로운 S-allele(감홍, 새나라, 홍로)의 염기서열을 동정하였다.
8. 수분수 품종을 선발하기 위해서 자가불화합성 유전자형이 결정된 배, 사과 품종을 이용하여 이면교배와 양적, 질적형질을 조사하였다. 배와 사과품종을 이면교배 후 화분관 검경 결과 동일한 자가불화합성 유전자를 가진 품종간에는 전혀 화분관이 침입하지 못하였으며, 하나의 자가불화합성 유전자가 같은 경우 화분관 침입이 50%가 줄어든 것이 확실하게 나타났다. 또한, 자가불화합성 유전자가 다른 품종들간에는 화분관 침입이 거의 100%이었다.
9. 화분관 검경에 의한 품종간의 불친화 정도와 염기서열 및 PCR-RFLP분석에 의해 결정된 사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형의 결과가 일치함을 보였다. 착과율과 수정율은 그 해의 환경적인 영향을 많이 받았으나, 착과율 조사결과와 화분관 검경 결과가 서로 일치하였다.
10. 수분수에 따른 과실의 형질을 조사하기 위해 이면교배 및 착과율을 조사하였으며, 교배한 과실의 특성 및 호르몬 함량 변화를 조사하였다. 배에서 영산배(S₃S₅)와 장십랑(S₂S₃), 신고(S₃S₉)와 이십세기(S₂S₄), 황금배(S₃S₄)와 이십세기(S₂S₄)를 교배하였을 때 가장 좋은 형질을 나타내는 과실을 얻었다. 사과에서는 후지(S₁S₉)와 세계일(S₃S₉)을 교배하였을 때 가장 좋은 형질을 나타내는 과실을 얻었다.
11. 뇌수분을 통하여 배 7품종과 사과 4품종을 자식(selfing)하였다. PCR-RFLP법에 의해 배 S₃-, S₄-, S₆- 및 S₉-호모접합체와 사과 1 S-호모접합체를 선발하였다.
12. 자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP법에 의해 배와 사과의 상호 속간교잡 후대로부터 배×사과 3계통과 사과×배 2계통의 속간 잡종을 선발하였다.

위와 같은 분자기법의 개발은 육종현장에서의 활용이 용이하고, 자가불화합성 유전자형의 결정은 최적 수분수 선정에 활용 할 수 있다. 또한 개발된 기술은 사과, 배 이외의 배우체형 자가불화합성을 갖고 있는 Prunus속 (자두, 매실, 양앵두, 아몬드 등)에 도입하여 활용할 수 있을 것이다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Selection of Pollinizer and Determination of Self-incompatibility Genotype in Apple and Pear

II. Goal and necessity of the study

Recently, It follows opening the market of foreign agricultural products and the important economic crops of our country is contraband trade and market circulation is does not become the maintenance because the domestic products is not distinction with foreign agricultural products. Smuggling or import agricultural products is ascertained that the fatal agricultural chemical standard goes over far and it is threatening healthily of citizen. When was not the namely our agricultural products and it was relieved and became the situation which is not the possibility of eating. Brand of All agricultural products is necessary because the demand regarding a quality competition magnified gradually. Therefore, our country peculiar quality apple and pear cultivars must raise and supply. Currently the apple and pear cultivar which is marketed to use the self-incompatible organization and pollination and fertilization is performing based on self-incompatible in the orchard. The apple and pear cultivar of domestic is raising and selection to interbreed a most foreign cultivar. The self-incompatibility genotype(S-genotype) of the parents has been identifying to use a molecular method to the researchers of Japan, Europe and the United States. The apple, pear is self-incompatibility. Self-incompatible gene exist two genes with the co-dominance character. To pollinizer selection, fruiting ratio of cultivar has the S_aS_b when to apply the pollinizer has the different gene almost it shows 100%, but when one piece it is same, the fruiting efficiency decreases with 50%. If self-incompatible of pollinizer is same, is not fruiting entirely. Determination of self-incompatibility genotype is very important for pollinizer selection. If know the self-incompatible gene, when raising the cultivar, the expense and the effort will be diminished.

III. Content of research & development and its range

Sub-subject	Content of research & development and its range
Determination of S-genotype of pear and apple cultivars by S-RNase sequencing and PCR-RFLP and PCR-CAPS	<ul style="list-style-type: none"> ① DNA extraction and purification from leaf tissue ② Primer selection and synthesis of S-RNase gene ③ Selection of S-RNase specific endonuclease ④ Determination of S-genotype by DNA fraction ⑤ Sequencing of S-RNase and gene searching ⑥ Determination of S-genotype by intron analysis of S-RNase ⑦ PCR-RFLP analysis and Southern blotting
Identification of a new S-RNase and determination of its S-genotypes by PCR-RFLP in pear	<ul style="list-style-type: none"> ① Detection of new S-allele and sequencing of S-RNase ② Intron analysis of new allele ③ Cloning and DNA sequencing of new allele ④ Primer selection and synthesis of S-RNase gene ⑤ Determination of S-genotype by DNA fraction
Screening method of self-compatible strain from the offsprings between the self-incompatible cultivar and self-compatible cultivar by PCR-RFLP system	<ul style="list-style-type: none"> ① Breeding of hybrids from offsprings of self-compatible cultivar and self-incompatible cultivar ② Analysis of S-RNase gene from offsprings ③ PCR-RFLP analysis of offsprings ④ Investigation of self-fruited from offsprings
Selection of pollinizer and analysis of quality by pollen test and diallel cross	<ul style="list-style-type: none"> ① Investigation of pollen tube behavior following parents after diallel cross ② Investigation of fruit setting following cross combination ③ Investigation of characters following pollinizers ④ Investigation of fruit setting from some cultivars ⑤ Investigation of metaxenia following pollen side cultivar ⑥ Investigation of the best pollinizers

Sub-subject	Content of research & development and its range
Raising and screening of S-homozygote by PCR-RFLP based on self-incompatibility gene	① Obtaining of selfing seed by self-pollination ② Cultivation of offsprings ③ Screening of S-homozygote by PCR-RFLP method ④ Cultivation and breeding of S-homozygotes
Screening of offsprings from intergenus crossing between pear and apple based on S-RNase related PCR-RFLP	① Crossing between pear and apple cultivars ② Ovule culture of post-fertilization ③ Cultivation and breeding of offsprings ④ DNA extraction and purification from leaf tissue in offsprings ⑤ Selection of hybrid by S-RNase related primers ⑥ Determination of S-genotype by DNA electrophoresis ⑦ Sequencing of S-RNase and gene searching ⑧ Analysis of characters, and breeding of selected intergenus hybrids

IV. Results of research & development and suggestions for utilization

This study performed analysis of self-incompatibility degree with pollen test, quality investigation by inbreeding, PCR-RFLP analysis of S-RNase gene, cloning and sequencing for determination of S-genotype in apple and pear cultivars. We were developing the method(primer design and restriction enzyme selection) for determination of S-genotype at young plant and found the new S-allele in pear. In addition, we develop the S-allele specific PCR-RFLP system, which is able to distinguish completely, and rapidly S-homozygotes, self-compatible strains and intergenus hybrid with low pay.

1. To elucidate the S-genotype of Korean-bred pear cultivars, whose parents are heterozygotes, the PCR amplification using S-RNase primers that are specific for each S-genotype was carried out in 15 Korean-bred pear cultivars and 5 Japanese-bred pear cultivars. The difference of the

fragment length was shown in the following order: S₆ (355 bp) < S₇ (360 bp) < S₁ (375 bp) < S₄ (376 bp) < S₃ and S₅ (384 bp) < S₈ (442 bp) < S₉ (1,323 bp) < S₂ (1,355 bp). The size of the introns was as follows: S₁ = 167 bp, S₂ = 1,153 bp, S₃ = 179 bp, S₄ = 168 bp, S₅ = 179 bp, S₆ = 147 bp, S₇ = 152 bp, S₈ = 234 bp, S₉ = 1,115 bp. There were five conservative and five hypervariable regions in the introns of S₁, S₃, S₄, S₅, S₆ and S₇-RNase. A pairwise comparison of these introns of S-RNase revealed homologies as follows: 93.7% between S₁- and S₄-RNase, 93.3% between S₃- and S₅-RNase and 78.9% between S₆- and S₇-RNase.

2. PCR-RFLP and S-RNase sequencing determined the S-genotype of the pear cultivars. The S-genotype was S₄S₉ for Shinkou, S₃S₉ for Niitaka, S₃S₅ for Housui, S₁S₅ for Kimizukawase, S₁S₈ for Ichiharawase, S₃S₅ for Mansoo, S₃S₄ for Shinil, S₃S₄ for Whangkeumbae, S₃S₅ for Sunhwang, S₃S₅ for Whasan, S₃S₅ for Mihwang, S₅S₇ for Chengsilri, S₃S₅ for Gamro, S₃S₄ for Yeongsanbae, S₃S₄ for Wonhwang, S₃S₅ for Gamcheonbae, S₃S₅ for Danbae, S₃S₄ for Manpoong, S₃S₄ for Soowhangbae and S₄S₆ for Chuwhangbae. The information on the S-genotype of pear cultivars will be used for the pollinizer selection and breeding program.
3. S-genotype of the newly bred 22 Korean-bred pear strains, 2 Korean-bred cultivars and 3 Japanese cultivars were identified using PCR-CAPS analysis. S-RNase genes had an intron, which was hypervariable region, between exons whose homologies were fairly high among S₁ to S₇ RNase. In addition, the specific restriction endonucleases for each S-allele were selected such as *EcoRI*(S₁- and S₄-RNase), *NdeI*(S₄-RNase), *Eco0109I*(S₃- and S₅-RNase), *AluNI*(S₅-RNase), *MluI*(S₆- and S₇-RNase), and *HinCII* (S₆-RNase).
4. A PCR amplification using newly designed S-RNase primers was carried out in 5 Korean-bred pear cultivars and 10 Japanese-bred pear cultivars. A new S-allele, designed as S₁₀, was discovered from Chengsilri, which intron S-RNase was constructed 1,513 bp nucleotide and exons were

- constructed 213 bp nucleotide sequence could be translated into 71 amino acid sequences. The S₁₀-RNase contained the conserved regions three cysteine residue characteristic of S-RNase and with one histidine residue essential for RNase activity in pear. The deduced nucleotide sequence of S₁-RNase showed a high similarity to S₄-RNase (97.4%) and S₁₀-RNase shows 77.8 % (S₅) to 84.4% (S₄) similarities with the other S-RNases. S₁₀-RNase had specific restriction endonuclease site, '*Hha*I', with digests 1,235 bp and 491 bp. The S-genotype of 'Chengsilri' was determined S₅S₁₀.
5. Breeding of the pear cultivars depends on artificial pollination that requires much labor, many worker and time period. The pear cultivar 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm; sm= stilar-part mutant) has been used as aa parent to breed a self-compatible cultivars with excellent fruit. We have developed a PCR-RFLP system that could screened out self-compatible strain from the offsprings between the self-incompatible cultivar and self-compatible cultivar. Recently, the nucleotide sequences of the S-RNase(S₁~S₉) were determined from genomic DNA. Using the intron information, we could screened out the self-compatible strains with digestive only S₄-, S₅-, S₆- and S₉-RNase fragments and self-incompatible strain with digestive S₂- and S₉-RNase fragments. Also, we determined the S-genotype of eight self-incompatible strains and screened the eight self-compatible strains by S-allele based PCR-RFLP system.
 6. To resolve the discrepancies in S-allele assignment, we have re-examined the identity of S-alleles known from apple cultivars. Based on nucleotide sequence of 16 cDNA, we designed allele-specific primer pairs to selectively amplify a single S-allele per reaction. In addition, S-RNase universal primer (ApFN and anti-ApRN) developed from conserved region of base sequence, which used to amplify S-gene in domestic bred apple cultivars and world apple cultivars. The amplification fragment was clone and analyzed nucleotide sequence. Therefore, we obtained information of 6 S-RNase sequences.

7. S₉-allele and new S-allele was identified from apple cultivar 'gamheong', 'Saenara' and 'Heongro' by PCR-RFLP and DNA sequencing
8. The pear and apple has gametophytic self-incompatibility that is not fertilization when used the pollen of same cultivar, the pollen tube extension is inhibit by the S-RNase in the stigma side. The self-fruited rate of pear and apple is very low, so orchard must be mixed plant the pollinizer, which is high fruited and compatible. Our research team performed investigation of quality and diallel cross for select pollinizer by using the information of S-genotype of pear and apple cultivar. The result of pollen test was show when self-incompatible gene is different; the pollen tube permeation almost became accomplished 100%. But one self-incompatible gene will be same it was positive for 50% to decrease and pollen and stigma has same S-RNase, pollen tube is can not invade wholly.
9. The non-affinity degree between the cultivars, which is publish to a pollen tube microscopic examination, and the result of S-genotype of apple and pear, which is decided by sequence and PCR-RFLP analysis, was visible agrees. With fruited ratio and fertility ratio it received the environment effect at this year. However, investigation result of fruited ratio and pollen tube test result agreed with each other.
10. We performed diallel cross and fruited ratio investigation to investigate the quality of the fruit and investigated hormone content change and quality of the fruit which it interbreeds. When 'Yeongsanbae'(S₃S₅) with 'Chojuurou'(S₂S₃), 'Niitaka'(S₃S₉) with 'Nijisseiki'(S₂S₄), 'Whangkeumbae'(S₃S₄) with 'Nijisseiki'(S₂S₄) interbreeding in pear, it got the fruit which shows a most good quality. When 'Fuji'(S₁S₉) with 'Sekaiichi'(S₃S₉) interbreeding in apple, it got the fruit which shows a most good quality.
11. By bud pollination, 7 pear cultivars and 4 apple cultivars were performed

selfing. It was success to raising the S-homozygotes. Moreover, we were screened four pear S-homozygotes and one apple S-homozygote by PCR-RFLP analysis.

12. To obtain the intergenus hybrids, pear and apple were crossed reciprocally. We screened out five hybrids from offsprings between pear and apple.

Development of molecular methods is very useful for applying of breeding and determination of S-genotypes is able to apply in pollinizer selection. Namely, we were able to obtain the information, which is when the artificial pollination, how much to use the amount of diluents is efficiently. In addition, developed skill will be able to apply to Prunus genus(plum, mume, almond, sweet cherry), which has self-incompatibility, with apple and pear.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction

Section 1. Purpose and category of study	25
Section 2. Necessity of study	26

Chapter 2. Trend of Research

Section 1. Processing extent of research in the inside and outside of country	29
Section 2. View of future research	31

Chapter 3. Contents and Results of the Study

Section 1. Determination of S-genotype of pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>) cultivars by S-RNase sequencing and PCR-RFLP analyses	33
1. Introduction	33
2. Materials and methods	34
3. Results of the study	35
A. Cloning and sequencing of S-RNase in pear	
B. Determination of S-genotype by PCR-RFLP in pear	
4. Discussion	45
Section 2. Determination of S-genotype of Korean-bred <i>Pyrus pyrifolia</i> strains based on PCR-CAPS	47
1. Introduction	47
2. Materials and methods	48
3. Results of the study	49
A. Analysis of nucleotide sequence of 7 S-RNase	
B. Selection of S-allele specific restriction endonucleases	
C. Determination of S-genotype of pear strains based on PCR-CAPS	
4. Discussion	56
Section 3. Identification of a new S-RNase and determination of its S-genotypes by PCR-RFLP in pear	57
1. Introduction	57

2. Materials and methods	58
3. Results of the study	59
A. Identification of new S-allele by PCR amplification	
B. Analysis of sequencing and PCR-RFLP of new S-allele	
4. Discussion	65
Section 4. Screening method of self-compatible strain from the offsprings between the self-incompatible cultivar and self-compatible cultivar by PCR-RFLP system	71
1. Introduction	71
2. Materials and methods	72
3. Results of the study	74
A. Development of screening method of self-compatible strain	
B. Selection of enzymes and analysis of nucleotide sequence in S-RNase	
C. Screening of self-compatible strain by PCR-RFLP system	
4. Discussion	82
Section 5. Determination of apple cultivars by S-allele sequencing and PCR-RFLP analysis	85
1. Introduction	85
2. Materials and methods	86
3. Results of the study	90
A. Determination and analysis of cDNA sequence by RT-PCR	
B. Identification of S-genotype by PCR-RFLP in apple	
C. Analysis of nucleotide sequence of S-RNase by using the genomic DNA	
D. Renumbering and reconsideration of S-genotype in apple cultivars	
4. Discussion	108
Section 6. Selection of pollinizer and analysis of quality by pollen test and diallel cross	111
1. Introduction	111
2. Materials and methods	112
3. Results of the study	113
A. Investigation of pollen tube behavior after diallel cross	
B. Investigation of fruit setting ratio at cross-combination of pear and apple cultivar	

C. Fruit quality of pear and apple cultivar by pollinizer	
4. Discussion	130
Section 7. Raising and screening of S-homozygote by using the self-incompatibility	131
1. Introduction	131
2. Materials and methods	131
3. Results of the study	132
A. Raising and screening of S-homozygote in pear	
B. Raising and screening of S-homozygote in apple	
4. Discussion	135
Section 8. Screening of offsprings from intergenus crossing between pear and apple based on PCR-RFLP method using self-incompatibility gene	137
1. Introduction	137
2. Materials and methods	138
3. Results of the study	140
A. Intergenus crossing between pear and apple	
B. Screening of intergenus hybrid by RAPD	
C. Screening of intergenus hybrid by PCR-RFLP using self-incompatibility gene	
4. Discussion	145
Chapter 4. Achievement Degree and Contribution to Related Fields	149
Section 1. Achievement degree of research and development toward goals	
Section 2. Contribution to related fields	
Chapter 5. Utilization Plans from Results of Research and Development ..	153
Chapter 6. Science & Technology Information of Foreign Countries	155
Chapter 7. References	163

여 백

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적 및 중요성	25
제 2 절 연구개발의 필요성	26

제 2 장 국내·외의 연구동향

제 1 절 국내·외의 관련연구의 기술현황	29
제 2 절 연구의 전망	31

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 S-RNase 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의한 배(<i>Pyrus pyrifolia</i>) 품종의 자가불화합성 유전자형 결정	33
1. 서론	33
2. 연구재료 및 방법	34
3. 연구결과	35
가. 배 품종의 자가불화합성 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석	
나. PCR-RFLP 분석에 의한 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정	
4. 고찰	45
제 2 절 PCR-CAPS에 의한 국내 육성 배 계통의 자가불화합성 유전자형 결정 ...	47
1. 서론	47
2. 연구재료 및 방법	48
3. 연구결과	49
가. 7개의 자가불화합성 유전자의 염기서열 분석	
나. 자가불화합성 유전자의 특이적인 제한효소 선발	
다. PCR-CAPS에 의한 배 계통의 자가불화합성 유전자형 결정	
4. 고찰	56
제 3 절 배(<i>Pyrus pyrifolia</i>)의 새로운 S-RNase의 동정 및 PCR-RFLP에 의한 자가불화합성 유전자형의 결정	57
1. 서론	57
2. 연구재료 및 방법	58
3. 연구결과	59

가. PCR증폭에 의한 새로운 자가불화합성 유전자 동정	
나. 새로운 S-allele의 염기서열 분석 및 PCR-RFLP 분석	
4. 고찰	65
제 4 절 PCR-RFLP법에 의한 자가화합성 계통선발	71
1. 서론	71
2. 연구재료 및 방법	72
3. 연구결과	74
가. 자가화합계통 선발법 개발	
나. 자가불화합성 유전자의 염기서열 결정 및 제한효소 선발	
다. PCR-RFLP 체계에 의한 자가화합 계통선발	
4. 고찰	82
제 5 절 S-allele 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의한 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 결정	85
1. 서론	85
2. 연구재료 및 방법	86
3. 연구결과	90
가. RT-PCR에 의한 cDNA의 염기서열 결정 및 분석	
나. PCR-RFLP 분석에 의한 사과의 자가불화합성 유전자형 결정	
다. Genomic DNA를 이용한 자가불화합성 유전자의 염기서열 분석	
라. 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 정리	
4. 고찰	108
제 6 절 화분관 검경 및 이면교배에 의한 교배친화성, 양·질적 형질분석 및 최적 수분수 선발	111
1. 서론	111
2. 연구재료 및 방법	112
3. 연구결과	113
가. 이면교배 후 교배친에 따른 화분관 행동조사	
나. 사과, 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과율 조사	
다. 수분수에 따른 품종의 형질조사	
4. 고찰	130
제 7 절 자가불화합성을 이용한 S-호모접합체의 육성 및 선발	131
1. 서론	131
2. 연구재료 및 방법	131

3. 연구결과	132
가. 배 품종의 S-호모접합체 육성 및 선발	
나. 사과 품종의 S-호모접합체 육성 및 선발	
4. 고찰	135
제 8 절 자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP에 의한 배와 사과의 속간 교잡후대 선발	137
1. 서론	137
2. 연구재료 및 방법	138
3. 연구결과	140
가. 배와 사과간의 속간교배	
나. RAPD에 의한 속간잡종 선발	
다. 자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP에 의한 속간잡종 선발	
4. 고찰	145
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제 1 절 연구개발목표의 달성도	149
제 2 절 관련분야의 기여도	150
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	153
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	155
제 1 절 배 및 사과의 자가불화합성 관련 논문 정보	155
제 2 절 해외기관의 연구과제 관련 과학기술정보	159
제 7 장 참고문헌	163

여 백

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적 및 중요성

사회구조 변혁과 국민 생활수준의 향상 및 건강과 보전에 관한 관심도가 높아져 과실 수급량이 기하급수적으로 증가하였다. '70년도에 비하여 재배면적은 약 300% 증가하였으며 생산량은 500% 이상 증산되었다. 사과와 배의 재배면적은 45,000 ha, 배는 23,000 ha로 전체 과수재배면적의 1/3을 차지한다. 1986년도부터 사과, 배가 수출되기 시작하여 수익이 비교적 좋고 타 작물에 비하여 소득이 높다. 사과 (*Malus domestica* BOKH.)의 원산지는 서아시아의 코카사스 지방이라고 알려져 있고, 4000년 전부터 소아시아, 중국, 유럽에 걸쳐 재배되고 있다. 사과는 유럽에서도 가장 오래된 재배역사를 갖는 과수이며 19세기 중엽까지 재배 및 개량의 중심은 중국 및 유럽이었다. 20세기에 들어서는 미국에서 재배 및 개량이 급격히 진전되었으며, 우리나라는 옛날부터 재래종인 능금이 재배되었다. 현재의 개량종 사과는 1884년이래 선교사에 의해 도입된 것이다. 우리 나라에서 육성한 품종은 홍로, 감홍, 새나리, 추광, 화홍, 서광 등이 있다. 사과 및 배는 배우체형 자가불화합성 작물이기 때문에 20% 이상의 수분수의 혼식이 필요하다. 우리나라에서 재배되고 배 종류는 일본배, 중국배, 서양배 등이 있다. 일본 배는 우리나라 중남부와 일본의 중부이남 및 중국의 중부지대에 원생, 분포하는 일본 배나무(*Pyrus serotina*)를 기본종으로 하여 개량된 것이며, 일본의 우량품종이 우리나라에 들어온 시기는 1906년 이후로 우리나라 재배종의 대부분을 차지하고 있으며 주요 품종으로 장십량, 신고, 만삼길, 금촌추 등이 주종을 이루고 있다. 중국배는 중국 북부를 중심으로 아시아 동북부에 원생, 분포하는 산들배(*Pyrus ussuriensis*)를 기본종으로 하여 개량된 것으로 우리나라에서는 鵬梨와 慈梨가 대표적인 품종으로 되어있다. 농촌진흥청 원예연구소에서는 배 품질 고급화를 이룩하여 국제 경쟁력을 제고하기 위해 고품질 품종 육성에 주력하여 '84년에 황금배를 비롯하여 추황배, 영산배, 수황배, 감천배, 화산배를 육성하였으며, '94~95년에는 원황, 만수 등을 육성, 보급하였다. 또한 소비의 고급화, 다양화에 부응하는 동시에 세계 시장 진출의 일환으로 황금

배를 캐나다에 시험수출하여 그 품질을 인정받아 현재 유망 수출 품종으로서의 잠재력을 인정받았다.

본 연구는 생물자원의 동정 및 활용측면과, 현재 직면하고 있는 농산물 수입개방과 UR협상 타결책의 일환인 국내 농산물의 질적 향상 및 브랜드화 할 수 있는 상품생산의 효율 측면에 중요한 의미가 있다. 최근 외국 농산물의 수입개방에 따라 우리나라의 주요 경제작물이 밀반입되어 국내산과 구별이 되지 않아 시장 유통질서가 유지되지 않으며, 불합법적인 농산물이 유통되고 있어도 형태적으로 구분이 불가능한 경우 단속이 곤란한 경우가 있다. 뿐만 아니라 밀수 또는 수입 농산물에서 인체에 치명적인 농약이 기준치를 훨씬 넘게 잔류되어있는 것으로 판명되어 국민 건강을 위협하고 있다. 즉 우리 농산물이 아니면 안심하고 먹을 수 없는 상황이 되었다. 즉 모든 농산물을 브랜드화 하지 않으면 세계 시장에서 경쟁력을 잃게 되고 품질경쟁에 관한 요구도는 점차 확대될 것이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면의 필요성

자가불화합성 현상은 피자식물의 반수 이상인 71과 250속 3000종 이상에서 나타나며 포자체형 자가불화합성과 배우체형 자가불화합성으로 분류된다. 국내의 중요 경제작물인 사과, 배는 배우체형 자가불화합성으로 단일 유전자 좌에 의하여 조절되는 복대립 유전자계를 형성하며 그 유전자가 만드는 산물(S-locus glycoprotein)이 ribonuclease활성을 갖는 것으로 알려졌다. 현재 시판되는 사과, 배의 품종은 자가불화합성 기구를 이용하여 합성된 것이며 과원에서 수분, 수정도 자가불화합성 이론에 근거하여 수확에 이르고 있다. 국내의 사과, 배 품종육성은 대부분 외국품종을 합성하여 선발, 육성한 것으로 양친들의 자가불화합성 유전자형(S-genotype)이 일본 및 미국 과학자들에 의하여 밝혀지고 있다. 그러나 양친이 각각 헤테로 접합체이기 때문에 이들 간의 교배에 의하여 육성된 국내품종(사과 7품종, 배 17품종)의 자가불화합성 유전자형은 분리가 되어 알 수가 없는 상태이다. 이러한 이유로 인하여 국외 품종을 식재한 배, 사과의 수분수에 관련된 정보는 어느 정도 관행에 의하여 알고 있으나 최근 육성된 우량 국내육성 품종의 최

적 수분수에 관련된 정보는 없다. 대기 환경오염과 더불어 매개충의 활동범위가 좁아짐에 따라 서울, 경기 일원의 과수원에서는 100% 가깝게 인공수분(전남 일원 30%)을 하여 사과, 배를 수확한다. 소위 꽃가루 은행에서 수집한 꽃가루를 구입하여 증량제와 섞어 수분시키고 있으나 꽃가루 은행의 꽃가루는 많은 품종을 혼합한 꽃가루이다. 다시 말하면 수개 이상의 자가불화합성 유전자를 갖는 혼합 꽃가루인 셈이다. 이 꽃가루를 이용하여 "후지" 품종(모친명)의 과수원에 인공수분을 하면 부친이 여럿인 "후지"를 생산하는 것이다. 이렇게 하여 생산된 사과, 배는 같은 품종이라도 농가마다 양적, 질적 품질이 상이하다. 또한 결실율에 따라 증량제의 량이 결정되나 정확한 자가불화합성 유전자형을 알고 있으면 화분량을 줄일 수 있어 증량제도 적게 사용되어진다. 배우체형 자가불화합성을 갖는 사과, 배에 있어서 자가불화합성 유전자의 우열관계는 공우성이다. 꽃가루 양의 효율면에서 SaS_b 를 갖는 품종에는 S_cS_d 와 같이 S_a 나 S_b 를 갖고 있지 않은 품종에서 화분을 채취하는 것이 유리할 것이다. 또한 품종육성시의 유묘기에 자가불화합성 유전자형을 알 수 있으면 불필요한 묘목을 도태시킬 수 있어 성목이 될 때까지 드는 비용과 노력이 감소될 것이다.

본 과제의 연구내용은 화분관 검정에 의한 화분관행동 관찰, 교배에 의한 결실을 조사, PCR-RFLP분석에 의한 다형성 검토, S-RNase유전자의 cloning 및 sequencing에 의하여 국내육성 사과, 배 품종의 S-genotype 결정 등이다. 즉 S-genotype을 유묘기에 결정하는 방법(primer 및 제한효소 선발)을 개발하여 육종현장에서 활용할 수 있도록 하며, 현재 재배되고 있는 사과, 배의 국내품종들의 S-genotype을 결정하여 최적 수분수 선정에 활용토록 하고자 한다.

2. 경제·산업적 측면의 필요성

자가불화합성 유전자형을 밝혀 수분수 선발과 우량품종을 육성하여 재배 면적에 따른 생산량을 증대하고 고품질의 과일(브랜드 상품)을 생산함에 따라 농민의 소득도 증대시키고 국제경쟁력도 높일 수 있을 것이다. 그리고 꽃가루 은행의 역할이 점차 증대됨에 따라 품종에 따른 최적 화분을 공급할 수 있는 꽃가루 은행의 설립이 가능케 될 것이다. WTO체제하의 농산물의 수입개방, UPOV에의 가입과 지적재산권 보호의 강화 및 품종등록제 등 국제적으로 농산물에 대한 로열티 문제가 심각하다. 이를 위해 우리나라 특유의 고품질 사과, 배 품종을 육성, 보급

하여야 할 것이다.

3. 사회·문화적 측면의 필요성

국내에서 육성된 사과, 배 품종의 양친이 대부분 외국품종인 관계로 후대의 유전적 변이 폭이 좁다. 본 연구에서 활용하는 분자기술을 이용하여 선발의 효율을 높일 수 있다. 즉 생명공학 기술을 새로운 품종 개발에 신속, 정확히 접목하여 원예산업의 활성화를 도모하는 계기가 될 것이다.

제 2 장 국내·외의 연구동향

제 1 절 국내·외의 관련연구의 기술현황

1. 국외 관련기술 현황

자가불화합성 현상에 관한 유전학적, 생리학적 연구는 19세기 초부터 시작되었으나 분자생물학적인 연구는 1980년 말에 시작되었다. 자가불화합성 연구는 포자체형 자가불화합성과 배우체형 자가불화합성으로 대별되어 진행되고 있다. 포자체형 자가불화합성 연구는 우리 식탁에서 빼놓을 수 없는 배추, 양배추, 무 등의 십자화과 채소류를 중심으로 미국의 코넬대학, 일본의 동북대학 등의 연구진에 의해 많은 연구성과를 거두어 왔다. 배우체형 자가불화합성에 관한 대표적 연구는 오스트레일리아의 Clack 연구진에 의해 *Nicotiana glauca*를 재료로 한 유전적, 분자적 업적이 다수 있다. 일본에서는 국립과수연구소에서 사과품종의 자가불화합성 유전자형분석에 관한 연구와 자가불화합성에 관련 있는 품종, 계통 선발에 관한 연구를 하였다. 1999년에 모리오카의 사과연구소(Soejima Junichi)와 기후대학(Masumoto Shogo 등)이 공동으로 사과의 15품종과 'Megumi'의 자가불화합성품종의 S-genotype에 관해 연구하였으며, Hiratsuka 그룹에 의해 일본 배(Japanese pear)의 자가불화합성 유전자형 해석에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 오사카대학(T. Ishimizu and S. Norioka)에서는 일본 배 품종의 S-유전자형 동정을 위한 PCR방법을 확립하였고(1999), 배우체형 자가불화합성인 장미과 S-RNase의 구조적 특징에 관한 연구를 보고하였다(1998). 또 미에대학(Shin Hiratsuka, Tatsuya Kubo and Yoshiji Okada)은 화주의 단백질 분석에 의한 일본 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 밝혔다(1998). 미국 펜실베이니아 대학의 Kao 그룹에 의해 *Petunia inflata*를 소재로 한 분자적 기능해석(형질전환 실험)에 관한 연구와 코넬대학(Christel R. Schopfer, Mikhail E. Nasrallah)의 양배추의 자가불화합성에 대한 연구에서 화분측에서 자가불화합성에 관여하는 SCR 유전자를 cloning하였다(1999). 그밖에 영국의 Lawrence그룹에 의한 *Papaver rhoeas*의 S유전자 단리에 관한 연구가 진행되고 있다.

최근에는 배의 자가불화합성에 관해서는 고베대학(Castillo Carlos, Takasaki

Takeshi, 2001)과 국립과수과학연구소(Suawamrau Yutaka, Saito Toshihiro, 2002) 등은 새로운 자가불화합성 유전자 동정에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 또한 일본의 고베대학에서는 molecular cloning과 sequencing 분석을 이용한 자가불화합성 품종과 자가화합 품종의 S-allele 동정에 관한 연구를 진행중에 있다. Silvia Zuccherelli 등은 유럽 배 품종의 자가불화합성 특징을 분자적인 방법과 양적, 질적조사를 통하여 밝혀냈으며(2002), 오사카대학(Kiyozumi Daiji 등)에서는 배의 자가불화합성 유전자에 관련성이 높은 UDP-glucose pyrophosphorylase라는 산물을 화분측에서 발견하였다(2002). 그리고 요코하마 대학(Sassa Hidenori)에서는 배에서 주두측에서 발현하는 자가불화합성 유전자가 아닌 화분측에서 발현하는 자가불화합성 유전자에 대한 연구가 진행 중에 있다. 사과와 관련해서는 영국의 원예연구소(Boskovic R. & Tobutt K. R.)는 Isoenzymes 분석을 이용하여 56개의 사과품종의 자가불화합성 유전자형을 동정하였다(1999). 일본 사과연구소(Komori 등)에서는 이미 자가불화합성 유전자가 밝혀진 품종들을 양적 질적인 조사를 통하여 재정립하였다(1999). Van Nerum I. 등은 Boskovic이 단백질 분석에 의해 동정된 56개의 사과품종의 자가불화합성유전자형을 S-allele specific PCR과 염기서열분석을 통하여 14개의 사과품종의 자가불화합성 유전자형을 재정립하였다(2001). 기후대학(Kitahara kentaro & Matsumoto shogo)은 사과품종 'McIntosh'로부터 S₂₅ cDNA 클로닝하였으며, S₂₅-allele의 동정방법을 개발하였다(2002). Broothaerts W.는 이미 양적, 질적인 방법과 분자적인 방법에 의해 동정된 사과와 배의 자가불화합성 유전자들을 새롭게 15 S-allele로 정립하였다(2002). 또한 사과도 현재 주두측에서 발현하는 자가불화합성 유전자가 아닌 화분측에서 발현하는 자가불화합성 유전자를 이미 아몬드와 화분측 유전자를 동정에 성공한 동경대학(Ushijima K. 등)에서 연구가 이루어지고 있다. 즉 사과 및 배와 근연인 Prunus속(매실, 양앵두) 작물로부터 화분측 자가불화합성 유전자인 F-box가 동정되어 그 전모가 밝혀지고 있다.

2. 국내 관련기술 현황

국내의 배우체형 자가불화합성 연구는 성균관대학교 조경학과에서 후지와 쓰가루 단일품종 과원을 위한 꽃사과 수분수 선발에 관한 연구와 황금배 단일 품종 과원을 위한 콩배 수분수 이용에 관한 연구가 있으며, 과수연구소와 서울대학교의

공동연구로 RAPD를 이용하여 사과품종의 분류와 품종판별용 표식선발에 관한 연구가 있다. 나주 배연구소는 배 화분 채취 및 저장에 관한 연구와 배 자식 결실성 품종육성 연구를 하였고, 원예연구소에서는 우리나라 야생배와 재래배의 특성에 관한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 국내의 자가불화합성 관련 연구는 국외의 연구에 비해 부족한 실정이다.

위에서 언급했듯이 일본 등 국외에서는 사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형의 정보를 이용하여 자국내의 사과, 배 품종의 브랜드화하기 위해 필연적으로 밝혀내고 있으며 브랜드화에 의해 국제 시장경쟁에서 한발 앞서 나아가고 있다. 국내에서도 육성한 사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 신속히 결정하여 최적 수분수 활용 및 고품질 상품생산에 활용하여야 하나, 아직은 이면교배 및 결실율을 기초로 한 정보에 의해 과실생산이 이루어지고 있는 실정이다. 그로 인하여 최적 수분수 이용 정보부재, 증량제 사용에 따른 많은 노동력 손실 및 경제적 비용소모, 우량품종을 육성하는데 장기간이 소요되는 문제점 등을 갖고 있다. 총괄 책임자(노일섭 박사)는 본 연구에서 개발한 기술을 기초로 자두, 매실 및 양앵두를 재료로 이용하여 화분측 자가불화합성 유전자 F-box를 이용한 PCR-RFLP 시스템 확립에 관한 연구를 착수하였다. 특히 자두의 주두측 및 화분측 S-genotype 동정에 관한 연구는 품종육종 및 수분수 선정에 매우 필요한 연구과제이다.

제 2 절 연구의 전망

1. 연구전망

최근 동경대학(Ushijima K. 등)과 나라과학기술연구소(Entani T. 등)에서는 포자체형 자가불화합성인 *Brassica*에서 동정된 화분측 자가불화합성 유전자(SP11)의 기능과 같은 역할을 하는 F-box 유전자를 배우체형 자가불화합성인 아몬드와 매실에서 찾아내었다. 하지만 사과, 배의 화분측 자가불화합성 유전자는 동정되지 않았으나 밝혀진다면 주두측과 화분측의 자가불화합성 메카니즘에 대한 정보를 보다 많이 알아낼 수 있을 것이다. 그리고 교배와 결실을 조사 방법에 분자기법(PCR-RFLP 표지 활용, 염기배열 분석)을 도입하여 보다 빠르고 정확하게 유묘기에 자가불화합성 유전자형을 밝히는 기술을 개발하여 육종연한을 단축하고, 국내

육성품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하여 최적 수분수를 활용 할 수 있게 되며, 인공수분시에 효율적인 증량제의 량을 결정할 수 있는 정보를 획득하게 될 것이다. 또한 본 기술의 개발은 사과, 배 이외의 자가불화합성을 갖고 있는 과수류(매실, 양앵두, 아몬드 등)에 도입하여 활용할 수 있을 것이다. 현재 생명공학의 발전에 힘입어 유전자 조작에 의한 형질전환 연구는 1990년 중반부터 시작되어 많은 성과를 이루고 있다. 이러한 형질전환 방법과 기존의 유전자원 개발, 돌연변이 육종, 교배 육종법 및 분자육종법을 병행하면 신품종 개발에 좋은 성과가 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 S-RNase 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의한 배 (*Pyrus pyrifolia*) 품종의 자가불화합성 유전자형 결정

1. 서론

자가불화합성 현상은 피자식물의 반수 이상인 71과 250속 3000종 이상에서 나타나며 포자체형 자가불화합성과 배우체형 자가불화합성으로 분류된다. 또한, 자가불화합성은 동종번식을 억제하며, 단일 복대립 유전자좌에 의하여 조절된다. 자가불화합성은 주두측과 같은 S-allele의 화분 침입을 막는다. 배, 사과 등의 가지과는 배우체형 자가불화합성 현상을 나타내며, 단일 유전자 좌, S-locus의 주두측 산물은 RNase의 활성을 갖는 당단백질(glycoprotein)이며 S-RNase 라고 명명하였다(Kao and Huang, 1994; Matton et al., 1994). 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 동정하기 위해 isoelectricfocusing polyacrylamide 겔 전기영동법 (IEF-PAGE) (Hiratsuka et al., 1995)과 two-dimensional polyacrylamide 겔 전기영동법 (2D-PAGE) (Ishimizu et al. 1996) 방법이 개발되었다. IEF-PAGE와 2D-PAGE 방법은 확실하지만 복잡해서 육종연구자들에게는 폭넓게 사용되지 않고 있다. 근년, 일본 배의 7 S-RNase의 cDNA 염기서열이 밝혀졌으며, 인트론이 삽입되어 있다는 것이 보고되었다(Ishimizu et al., 1998; 1999; Norioka et al., 1995). 장미과인 사과(*Malus x domestica* Borkh.)로부터도 7개의 cDNA가 클로닝되어 염기서열이 결정되었다(Janssens et al., 1995; Sassa et al., 1997). 사과의 염기서열은 배의 염기서열과 매우 밀접하게 관련되어 있었다(Ishimizu et al., 1998; Norioka et al., 1996). 7 S-RNase의 아미노산 서열을 비교 분석한 결과, 5개의 보존영역과 변이가 큰 하나의 변이영역이 존재하는 것이 밝혀졌으며, 변이 영역내에 포함된 인트론은 매우 높은 다양성을 나타냈다(Ishimizu et al., 1998; 1999). 그러나, 국내 육성 배 품종의 자가불화합성 유전자형은 아직 결정되지 않았다. 본 연구에서는 PCR과 RFLP분석에 의해 재배되고 있는 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 분석하였다.

또한 배 품종의 S-RNase 유전자의 클로닝과 염기서열 분석에 의해 S-allele의 인트론 정보를 얻을 수 있었고, 이 정보를 활용하여 품종의 S-genotype을 결정할 수 있었다.

2. 연구재료 및 방법

가. 공시품종 및 엽육 조직 채취

원예연구소(Suwon, Korea)로부터 일본 배 품종과 국내 육성 배 품종의 어린 잎을 채취하였다. 채취 품종은 Suisei, Nijisseikii, Okusankichi, Chojuuro, Imamuraaki, Shinsui, Atago, Shinkou, Niitaka, Housui, Kimizukawase, Ichiharawase, Mansoo, Shinil, Whangkeumbae, Sunhwang, Whasan, Mihwang, Chengsilri, Gamro, Yeongsanbae, Wonhwang, Gamcheonbae, Danbae, Manpoong, Soowhangbae 및 Chuwhangbae이며, 채취한 잎은 70% 에탄올로 표면세척 후 액체질소로 순간 동결시켜 -80℃에 냉동고에 저장하였다.

나. DNA 추출

DNA 추출 방법은 cetyl-tri-methyl-ammonium bromide (CTAB) 방법을 응용하였다(Torres et al., 1993). 실험재료의 어린 엽(1 g)은 막자사발과 액체질소를 이용하여 분쇄 후 추출용액[100mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 20% SDS, 14 mM 2-mercaptoethanol]을 넣고 균질화하여 65℃에서 20분간 방치하였다. 추출 용액은 phenol, chloroform, PrepMate™정제 Kit(Bioneer, USA)에 의해 정제하였다. 정제한 후 isopropanol 1 ml와 3M Na-acetate 0.1 ml을 넣어 혼합하여 원심분리기로 침전하였으며, 상등액을 버리고 건조시킨 다음 TE용액[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA] 0.5 ml를 넣고 잘 녹였다. 0.01% RNase 용액 10 ul 넣고 37℃에서 2 hr 처리하였다. 추출된 DNA 농도는 겔 전기영동법과 분광 광도계를 사용하여 정량하였으며, 정제 DNA는 -20℃에 보관하였다.

다. PCR 증폭 반응

PCR 증폭을 위해 한 쌍으로 조합된 primer를 표준으로 사용하였다. PCR 증폭을 위한 primer 조합은 7 S-RNase의 보전된 염기서열을 기초로 해서 디자인 하

였다(PF1, 5'-TAT TTT CAA TTT ACG CAG CAA-3'; PR2, 5'-C(A/G)T TCG GCC AAA TAA TT(T/G)-3'). PCR 반응용액(25 ul)은 25-50 ng 게놈 DNA, 2 U *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan), 2.5 ul 10X buffer[구성요소: 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 2.5 mM dNTP, 0.1 nM primer 등으로 구성되었다. 증폭은 PE-9700 Cycler (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 실행하였다[pre-denature 1 cycle (94°C, 5분), amplification 30 cycle (94°C, 1분; 54°C, 2분; 72°C, 3분), post-extension 1 cycle (72°C, 7분)]. 증폭된 PCR 산물은 2% Metaphor 아가로스 겔에서 전기영동 후 UV transilluminator상에서 분석하였다. 분자마커는 100 bp DNA Ladder (TaKaRa, Japan)을 사용하였다.

라. PCR 산물의 cloning 및 sequencing

정제된 PCR 산물을 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)를 이용하여 cloning 하였으며, PRISM™ 377 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 분석은 BLASTN 프로그램(NCBI)을 이용하였다.

마. PCR-RFLP 분석

RFLP는 반응용액[8 ul PCR 산물, 2.5 U 제한효소, 1.5 ul 10X 완충용액(750 mM KCl, 150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 92.5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol)]을 잘 혼합한 다음 37°C에 5hr 정도 처리하였으며 2% Metaphor 아가로스 겔에 전기영동하고, UV transilluminator상에서 분석하였다. S-allele 특이적 제한효소 *Sfi*I (S₁), *Nde*I (S₄), *Pvu*MI (S₃과 S₅), *Alu*NI (S₅), *Mlu*I (S₆과 S₇), *Hin*CII (S₆), *Nru*I (S₈), *Bst*BI (S₉)를 처리하였다.

3. 연구결과

가. 배 품종의 자가불화합성 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

1) 자가불화합성 유전자 증폭

아미노산 서열을 기초로 해서 S-RNase 관련 primer 조합(PF1, PR2)을 합성하였으며(Ishimizu et al. 1998), 이 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과, 이미 자

가불화합성 유전자형이 동정된 Suisei (S_1S_4), Nijisseiki (S_2S_4), Housui (S_3S_5), Shinsui (S_4S_5), Imamuraaki (S_1S_6), Okusankichi (S_5S_7), Ichiharawase (S_1S_8), Shinkou (S_4S_9)의 S-RNase를 증폭할 수 있었다(그림 1). 또한 증폭된 각각의 S-allele 크기가 서로 다르다는 것을 알아냈으며, 각각의 S-RNase의 크기는 370 ~1,350 bp 정도였다.

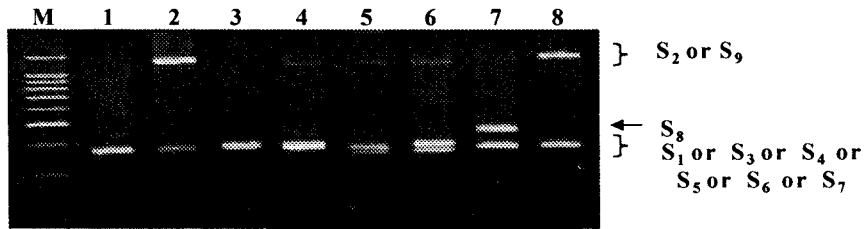


그림 1. Primer PF1과 PR2를 이용하여 PCR 증폭된 일본 배 품종의 S-RNase 단편. Lane 1, Suisei (S_1S_4); lane 2, Nijisseiki (S_2S_4); lane 3, Housui (S_3S_5); lane 4, Shinsui (S_4S_5); lane 5, Imamuraaki (S_1S_6); lane 6, Okusankichi (S_5S_7); lane 7, Ichiharawase (S_1S_8); lane 8, Shinkou (S_4S_9).
★, unknown bands.

2) 자가불화합성 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

9개의 증폭된 S-RNases(S_1 -RNase~ S_9 -RNase)은 pGEM-T 벡터를 이용하여 클로닝 하였으며, 염기서열을 분석하였다(그림 2). S-RNase의 염기서열의 분석결과 상동성이 높은 exon 영역 사이에 한 개의 변이영역이 존재하였다. 또한, S-RNase의 크기는 S_6 (355 bp) < S_7 (360 bp) < S_1 (375 bp) < S_4 (376 bp) < S_3 과 S_5 (384 bp) < S_8 (442 bp) < S_9 (1,323 bp) < S_2 (1,355 bp)의 순서로 나타났으며, exon 영역의 염기서열간의 상동성은 S_1 -과 S_4 -RNase (96%), S_2 -와 S_8 -RNase (82%), S_3 -과 S_5 -RNase (94.7%), S_6 -과 S_7 -RNase (78.7%), S_7 -과 S_8 -RNase (88.6%), S_9 -와 S_4 -RNase (83.3%)로 높게 나타났다. Intron의 크기는 S_1 = 167 bp, S_2 = 1,153 bp, S_3 = 179 bp, S_4 = 168 bp, S_5 = 179 bp, S_6 = 147 bp, S_7 = 152 bp, S_8 = 234 bp, S_9 = 1,115 bp 이었다. Intron간의 염기크기는 5 bp(S_6 과 S_7)~1,006 bp(S_6 과 S_2)의 차이가 났다. 그리고 S_1 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 ,

S7-RNase의 intron내에서 5개의 보존영역과 5개의 변이영역이 존재하는 것을 발견하였다. Intron영역의 염기서열간에는 S1-과 S4-RNase (93.7%), S3-과 S5-RNase (93.3%), S6-과 S7-RNase (78.9%)간에서 높은 상동성을 보였다. 그러나 S2-, S8-, S9-RNase의 intron은 다른 S-RNase와의 intron 크기(S2 = 1,153 bp, S8 = 234 bp, S9 = 1,115 bp)와 비슷하지 않아서 염기서열은 비교할 수 없었다.

```
S1-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAACGATCCTA
S2-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCAGGCTTTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
S3-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
S4-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAACGATCCTA
S5-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCTGGCGGTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
S6-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
S7-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCAGCTGTCTGCAACTCCAAACCTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
S8-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
S9-TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTC
***** ** * ***** ** * ***** ***** ** **
```

```
S1-CTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGAAATGGACCTGACCCAGAAAAATGTAA
S2-CTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAACCAAAGTAGGACGTGACCCAGAATATTGC--
S3-CTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACATGGTAGGACCTGACCCAAGTAAATGC--
S4-CTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGGAATGGACCTGACCCAGAAAAATGCAA
S5-CGGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTCAAGCATGGCAGGACCTGACCCAAGTAAATGC--
S6-CTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACGACGTAGGAGATGACCCAATATACTGCAA
S7-CTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACCTGAATGGACCTCACCCAGAAAAATGCAC
S8-CAGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACCTCGAGTGGACCTCACCCACATAATGCAC
S9-CTGAAAAGTTGTTTACGGTTCATGGTTTGTGGCCTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCAAGAAATGCAA
* ** ***** ***** ** ***** ***** ** * ***** ** **
```

```
S1-GACTACAGCCCTGAATTCTCAGAAGGTAATATTATTAATAATGAGATGGTCAATATTGTTTATT---TCAT
S2-----AAGACAAAGAGATATCGGAAG
S3-----CCGATAAAGAATATTCGGAAGGTAATATTATTAGTAATCCAATCGTCAATATTGTTTATT---TCAT
S4-GACTACAACCATGAATTCTCAGAAGGTAATATTATTAATAATGAGATAGTCAATATTGTTTATT---TCAT
S5-----CCGATAAGGAACATTTCGGAAGGTAATATTATTAGTAATCAGATCGTCAATATTGTTTATT---TCCT
S6-GAATAAAACCATTAATCTCAGCAGGTAATATTATTAATAATCAGATAGTCAATAATGTTTATT---TCAT
S7-TAATGCAACCGTGAATCCTCACAGGTAATATTACTGATAATCAGATAGTCACTATTGTTTATT---TCAT
S8-GAATAAACCGTGAATCTCAGACGTAATATTATTGATAATCAGATTGTTAATATTGTTAGATTAGTCAT
S9-AACTACAATTTTGAACCCCTCAAACG
* ** ***** * ***** ** ** * ** ***** * *****
```

S1-TTATG-----CACTCGT-----
 S2-
 S3-TTATG-----TACTTGTGTGTGT-----GT
 S4-TTATG-----CACGTGT-----
 S5-TTATG-----TACTTGTGCGTGT-----GT
 S6-ATATA-----CATATAG-----
 S7-TTATG-----TACTTGT-----
 S8-TGACGGGGTTTGAACCCAAGTCGTCATGCAAAGTTTCAACATCTTTTCGCGACTGTAGTAAAGAGCTAC
 S9-

*

S1-----GTATATATAGATT-ACAATACTTAA-CATAGATTTTCATGCACGCCTGTGCAAATATTACAATTA
 S2-
 S3-TTGTGTATATTCAATATATACATACTCAAACATAGATTTTCATGCACACGTGTACAAATATTACAATTAG
 S4-----GTATATATACATTACATATGCTCAG-CATAGATTTTCATGCACGCCTGTGCAAATATTACAATTA
 S5-TTGTGTATATTCAATATATACGTCCTCAAACATAGATTTTCATGCACGTGTGTACAAATATTACAATTAG
 S6-----TCAACATATATTTTCATGCACGCCTGTGCAAATATTACAATTGT
 S7-----GTATATATACAT-----ATACTCAA-CATAGATTTTCATGCACGCCTGTGCAAATATTACAATAAA
 S8-TTGCTTATTTTCATATATACATACTCAA-CATAGATTTTCATGCAAGAGTGTGCAAATATTACAATTA
 S9-

**** ***** ** *****

S1-TTTAAAATTTAATCATGAATTGTTTCTATTACAT--AATTCTATTGTCAGATAGGAAATATG---ACAGC
 S2-
 S3-TTCAAATATAATCATAATTTTTTTTTTCTCTCT--TGTG--CATACCAGAGAGAAAAATTACTCGAACA
 S4-TTTAAAATTTAATCATGAATTGTTTCTATTATAT--AATTATATTGTCAGATAGGAAATATG---ACAGC
 S5-TTTAAAATATAATCATAATTTTTTTTTTCTTT--TGTG--CATACCAGAGAGAAAAATTACTCGAACC
 S6-TTTAAAATTTAATCATAAATTTTTTTCTATTATA--TGTTATATTGTCAGATAGGAAATCTG---ACTGC
 S7-TTTAGAAATTTACTTA-----TATCATA--TATTATATTGTCAGATAAAAAATATC---CAAGC
 S8-TTTAAAATTTAATCATAATTATTTTTCTGTTATTATATTATATTGTCAGATAAGATCACTC---AAAGC
 S9-
 ATACAAAGACTC---GAAC
 ATACAAATCTT---ACAA

** ** * * * * * * * * * *

S1-CCAATTGGAAATTATTTGGCCGAACG
 S2-CCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACG
 S3-CCAGCTGGAAATTATTTGGCCGAACG
 S4-CCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACG
 S5-CCAGCTGGCAATTATTTGGCCGAACG
 S6-CCAGTTGATAATTATTTGGCCGAACG
 S7-CCAGTTGAAAATTATTTGGCCGAATG
 S8-CCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAATG
 S9-CCAGCTGGAAACTATTTGGCCAAACG

*** ** ** ***** ** *

S2- *GTAATATAAGTGC*AAAGGGATCCTTTTCGGATTCCCTTCCATCAAATTCTCCCAGCAAACAATCTGAGTTCT
 TGAAATTTGATCCAACCGCTAAAGTTATTATAACTTTTAAAGTGGGCCCTTATTTGTAAGTGTAGATCAA
 TTCAAATGCTCGGATTAGTTGATGGGGATGATTTGATCGAAGGGATCCGAAGAGSATCCCTTTCCTTATAA
 GTAATCAGATAGCCAATATTGGTTATTAATTTATGTTCTCGTGTGTGTGTGCATGTGTAAATATATTAAGAT
 AATGTTAGAAGATGAGAAATTAATGAAAACGGCTTTAAATTTTGAATTTTAAACAAAAAATCATCTAATA
 ACTTTTATTAATGTTAAAGACAAAATAAAGAAAAAGAAAAGAAAATCCCAACCAAGCACGTGCAGGG
 CGTAAGCCAATCCATGTTTCAGTTTTTGGAAATAGTCAATTTAAGGAATAGTGTAGTACTTGTATCTAGATTCA
 GAAATAGTCAGTTTAGAAAATAATAAGAGTACCAGTGTTTAGTTTAGAAAATAGTGACAATACCAGTGT
 GTTAAAGAAATTTGATAATACCCGTGTTTAGGTTTTAAATAATCAGTGTTCAGCTTAAGAAAATAGTGT
 AGTATCCATATTCAATTTAAGAAATAGTCAGTGTCCAATTTAAGAAATAGTCAAGGAGATGAGGAAGTGTGT
 GTGAGTGACGCACGGTGTACCCCGCATCAAATTTTTATTTTATTAACATTTTTAAATTTCCATTA
 TAAGTCTTTTTTCATAAAAAGTTAAGACATTTTCATTAAATAAGTTATTAGATGATTTTTTTTTTTGTTAATA
 AAAAGTTTGGAGATGCTCTTTTTGTTAGAGCTCTCAATTTGTAGACCAAATAGTATGTCACATAAGATACC
 AAACATGTTAATCAACACATAAGTAATGATCTAATTATCAATCACTACATTTTTTAATTTACAAATTTGGTT
 CTTTACTATTATCCTATTTTTTAATATAAATACTCAGCATTAAATTTTCATGCATGCGTTTACAAATATTA
 CAATTAATCGTATTATTCTATATTGTTATATGGGTACGCTTTTATCTTATCAAAAAAATAATATTATCA
 G

S9- *GTAATATTATTCACG*AAAAATTAATATCCAGTCCCTTAGTTATAATGTTTCATTAATTGAGACCTTATTAGTTT
 TTAGATTTTGATTGAAGTCCCTAGCGTTATTGTATAAATGAATTCAAATGTCAGTTACATAATTTTTTTAAA
 TAAAAATTAGTAATTGAACTTACACCCCTATTAACTCCTAACTAATTTTCAATTCAAAACATTTCCAAAA
 ACTAAAAATTAGAATAAGTTTGTACCTATTAAATTTTTATAAAATGATTTTCAATTTGTTAATCTTAAATGT
 AGCCATTCATATAATCCTACATTTACCCATTCTTAAATATACCATTTTGTATATAACATGTACCCTTTTTA
 AAATATAAATGTAACCTTGTATATAAAAATACATTTCAATTTTTTTTCTAAACCATATATTTTAAATTATC
 CATTTTTAATAAAAATGTAACCATTTTTTATATTAATCAATTCAATTTTTTTTTTCGAATCCACTTTTTAA
 ACTTATATGGGTATATTCTATTTCAATGATTTGAGAGTCTATCGATTCCAAGTTAATGGAAGAAATTAAT
 AATGTAAGCCTAATACCTCTTTTTTTTTCTTTCAAAAATGTACCCATGTTTGGTACAATAGTTTTTTTGT
 AGTTTTAATGAATGTACCCATGTTTTCAATTTATATATGATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTA
 TGTGTTTATATGTATAAAAACATATTGGAGGGCATAATTTACTTTAATTTTTTTAATCCTATAAATGGATTTT
 ATTTAAAGTCTCATTGATATAAACAACCAAAATTTTAAATTTTTCATTTAAAATATAATAATTTACAAAA
 AATACATTATTATTAATGTCAAAAACCTTCAATAAAAAAACTGAAAAACAACAAGATTTTAGTCAAGAAT
 ATTCATGATTAGTATCGTTTTCCAAAATCTCCCTATTATTAATAATTAGATAGTCAATCTTGTTTAICTTTTT
 ATATGTACACATGCTCGACATAGATTTTCATGCGCTCGTGAATAATTTACTATTAATTTAAAATTAATCA
 TAATTTTTTTTTCTATTATAATATTATTGTCAG

그림 2. PF1와 PR2 primer에 의해 증폭된 S1- (GenBank Acc. No. AB002139),
 S2- (GenBank Acc. No. AB014073), S3- (GenBank Acc. No. AB025421),
 S4- (GenBank Acc. No. AB009385), S5- (GenBank Acc. No. AB045711),
 S6- (GenBank Acc. No. AB002142), S7- (GenBank Acc. No. AB002143),
 and S8- and S9-RNases 단편의 염기서열을 비교 분석하였다. 모든
 S-RNase의 염기서열이 동일한 곳은 별표(*)로 표시하였으며, S-RNase
 특이적인 제한효소의 염기서열에는 밑줄로 표시하였다. Intron의 염기서열
 은 이태릭체로 나타내었다.

나. PCR-RFLP 분석에 의한 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정

1) 자가불화합성 유전자의 특이적 제한효소 선발

국내 육성 배 품종은 일본 배 품종을 양친으로 사용하였기 때문에 일본 배 품종의 특징을 많이 갖고있으며, 배 품종의 자가불화합성 유전자형은 양친이 2배체인 교배조합에 의해 얻어졌기 때문에 자가불화합성은 헤테로(hetero) 상태이다. 15개의 국내 육성 배 품종과 5개의 일본 배 품종의 자가불화합성 유전자형은 제한효소를 처리하지 않아도 PCR 증폭 산물에 의해 어느 정도는 추정할 수 있었다[예를 들면, Mansoo (S₃S₅), Shinil (S₃, S₅, S₁, S₄), Whangkeumbae (S₃, S₅, S₁, S₄), Sunhwang (S₃S₅), Whasan (S₃S₅), Mihwang (S₃S₅), Chengsilri (S₃, S₅, S₇), Gamro (S₃S₅), Yeongsanbae (S₃S₅), Wonhwang (S₃, S₅, S₁, S₄), Gamcheonbae (S₃S₅), Danbae (S₃S₅), Manpoong (S₃S₅), Soowhangbae (S₃, S₅, S₁, S₄), Chuwhangbae (S₁, S₄, S₆) Shinkou (S₃, S₅, S₉), Niitaka (S₃, S₅, S₉), Housui (S₃S₅), Kimizukawase (S₃, S₅, S₁, S₄), 및 Ichiharawase (S₁, S₄, S₈)]. 그러나 10개의 배 품종의 자가불화합성 유전자형은 결정할 수 있었으나, 나머지는 결정하기가 힘들었다. 왜냐하면, S₁-과 S₄-RNase intron의 크기차이는 단지 1 bp이고, S₃-과 S₅-RNase는 동일했기 때문이다. 이렇게 동일한 크기의 intron을 가진 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 PCR 증폭 단편만으로 결정하는 것은 매우 곤란했다.

그래서 PCR 증폭 단편 크기만을 판단하여 결정이 되지 않는 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하기 위해 PCR-RFLP분석을 수행하였다. PCR-RFLP 분석을 위해, S₁-RNase~S₉-RNase 염기서열을 분석한 후 exon과 intron에서 각각의 S-RNase 특이적인 제한효소를 선발할 수 있었다(표 1). S₁-allele는 *Sfcl*, S₂-allele는 1,355 bp 증폭 단편과 제한효소 *XbaI*, S₃-allele는 *PpuMI*, S₄-allele는 *NdeI*, S₅-allele는 *AlwNI*, S₆-allele는 *HinCII*, S₇-allele는 *MluI*, S₈-allele는 *NruI*, S₉-allele는 *BstBI*에 의해 소화되었다. 그러나 *PpuMI*은 S₅-allele, *MluI*은 S₆-allele를 역시 소화하였다.

표 1. 배 S-RNase의 PCR 증폭 산물 크기, intron 크기, 특이적인 제한효소 및 절단 위치

S-allele	PCR-fragment size	intron size	<i>Sfc</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Ppu</i> M I	<i>Nde</i> I	<i>Alw</i> N I	<i>Hin</i> C II	<i>Mlu</i> I	<i>Nru</i> I	<i>Bst</i> B I
S ₁	375	167	143 and 232	375	375	375	375	375	375	375	375
S ₂	1,355	1,153	1,355	654 and 701	1,355	1,355	1,355	1,355	1,355	1,355	1,355
S ₃	384	179	384	384	118 and 266	384	384	384	384	384	384
S ₄	376	168	376	376	376	236 and 140	376	376	376	376	376
S ₅	384	179	384	384	118 and 266	384	121 and 263	384	384	384	384
S ₆	355	147	355	355	355	355	355	222 and 133	240 and 115	355	355
S ₇	360	152	360	360	360	360	360	360	256 and 104	360	360
S ₈	442	234	442	442	442	442	442	442	442	251 and 191	442
S ₉	1,323	1,115	1,323	1,323	1,323	1,323	1,323	1,323	1,323	1,323	653 and 680

2) PCR-RFLP에 의한 자가불화합성 유전자형 결정

375 bp의 S₁-allele는 *Sfc*I에 143 bp와 232 bp로 소화되었고, 384 bp의 S₃-allele는 *Ppu*MI에 의해 118 bp와 266 bp로 소화되었다. 376 bp의 S₄-allele는 *Nde*I에 의해 236 bp와 130 bp로 소화되었으며, 384 bp의 S₅-allele는 *Alw*NI에 의해 121 bp와 263 bp로 소화되고 또한, *Ppu*MI에 의해 118 bp와 266 bp로 소화되었다. 355 bp의 S₆-allele는 *Hin*CII에 의해 222 bp와 133 bp로 또한, *Mlu*I에 의해 240 bp와 115 bp로 소화되었으며, 360 bp의 S₇-allele는 *Mlu*I에 의해 256 bp와 104 bp로 소화되었다. 442 bp의 S₈-allele는 *Nru*I에 의해 251 bp와 191 bp로 소화되었으며, 1,323 bp의 S₉-allele는 *Bst*BI에 의해 653 bp와 680 bp로 소화되었다. PCR-RFLP 실험에 의해 15개의 국내 육성 배 품종과 5개의 일본 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다(그림. 3).

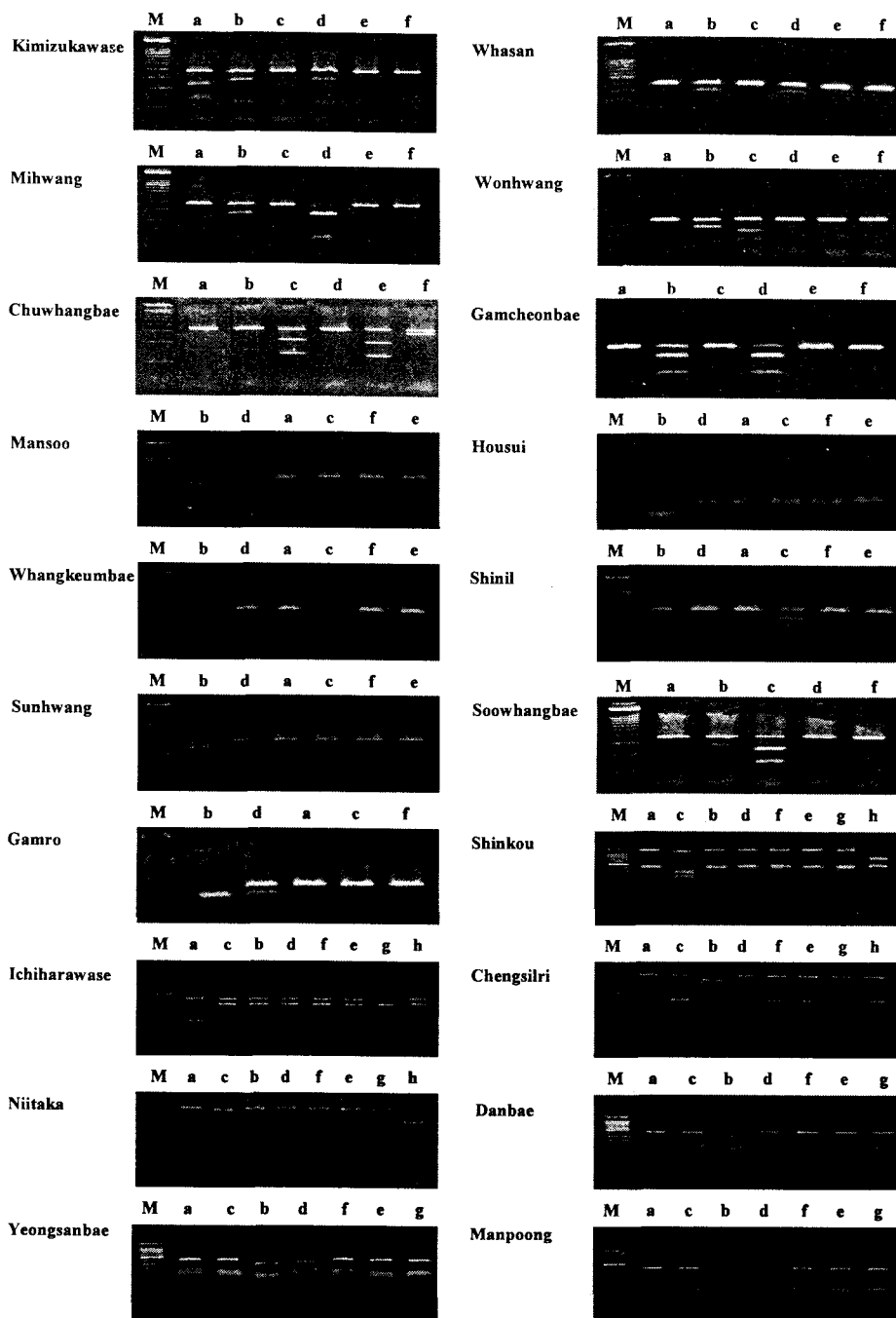


그림 3. S-RNase 특이적인 제한효소 처리된 PCR 단편분석. M: DNA standard marker(크기는 위로부터 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp), 제한효소: a, *SfcI*; b, *PpuMI*; c, *NdeI*; d, *AluNI*; e, *HincII*; f, *MluI*; g, *NruI*; h, *BstBI*.

PCR-RFLP와 염기서열 분석에 의해 결정된 자가불화합성 유전자형은 Shinkou (S₄S₉), Niitaka (S₃S₉), Housui (S₃S₅), Kimizukawase (S₁S₅), Ichiharawase (S₁S₈), Mansoo (S₃S₅), Shinil (S₃S₄), Whangkeumbae (S₃S₄), Sunhwang (S₃S₅), Whasan (S₃S₅), Mihwang (S₃S₅), Chengsilri (S₅S₇), Gamro (S₃S₅), Yeongsanbae (S₃S₅), Wonhwang (S₃S₄), Gamcheonbae (S₃S₅), Danbae (S₃S₅), Manpoong (S₃S₅), Soowhangbae (S₃S₄), Chuwhangbae (S₄S₆)이었다(표 2).

그런데, 동일한 primer쌍으로 국내 배 품종인 'Chengsilri'에서 약 1,700 bp의 PCR 증폭 산물을 검출할 수 있었다. 이것은 다른 증폭산물에 비해 가장 큰 단편으로 아마도 새로운 S-allele일 것으로 추측되었다. 그리고 'Chengsilri'는 384 bp 단편은 S₅-allele 특이적인 제한효소에 의해 소화되었지만 약 1,700 bp 새로운 S-allele 산물은 9개의 S-allele의 특이적인 제한효소에 의해 소화되지 않았다. 그래서 'Chengsilri' 자가불화합성 유전자형은 S₅-RNase와 새로운 S-allele를 갖고있을 것으로 판단되었다.

표 2. PCR-RFLP와 염기서열 분석에 의한 국내 육성 배 품종과 일본 육성 배 품종의 자가불화합성 유전자형 결정

Acc. No.	Cultivar	S ₂ fragment	Sfc	PpuM	AluN	Nde	Mlu	HinC	Nru	BstB	S-genotype
			I	I	I	I	I	II	I	I	
1	Suisei	-	+	-	-	+	-	-	-	-	S ₁ S ₄
2	Nijisseiki	+	-	-	-	+	-	-	-	-	S ₂ S ₄
3	Okusankichi	-	-	+	+	-	+	-	-	-	S ₅ S ₇
4	Chojuurou	+	-	+	-	-	-	-	-	-	S ₂ S ₃
5	Imamuraaki	-	+	-	-	-	+	+	-	-	S ₁ S ₆
6	Shinsui	-	-	+	+	+	-	-	-	-	S ₄ S ₅
7	Atago	+	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₂ S ₅
8	Shinkou	-	-	-	-	+	-	-	-	+	S ₄ S ₉
9	Niitaka	-	-	+	-	-	-	-	-	+	S ₃ S ₉
10	Housui	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
11	Kimitsukawase	-	+	+	+	-	-	-	-	-	S ₁ S ₅
12	Ichiharawase	-	+	-	-	-	-	-	+	-	S ₁ S ₈
13	Mansoo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
14	Shinil	-	-	+	-	+	-	-	-	-	S ₃ S ₄
15	Whangkeumbae	-	-	+	-	+	-	-	-	-	S ₃ S ₄
16	Sunhwang	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
17	Whasan	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
18	Mihwang	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
19	Chengsilri	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₅ S ₇ ?
20	Gamro	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
21	Yeongsanbae	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
22	Wonhwang	-	-	+	-	+	-	-	-	-	S ₃ S ₄
23	Gamcheonbae	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
24	Danbae	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
25	Manpoong	-	-	+	+	-	-	-	-	-	S ₃ S ₅
26	Soowhangbae	-	-	+	-	+	-	-	-	-	S ₃ S ₄
27	Chuwhangbae	-	-	-	-	+	+	+	-	-	S ₄ S ₆

+: PCR 증폭 단편이 S-RNase 특이적 제한효소에 의해 소화된 것.

-: PCR 증폭 단편이 S-RNase 특이적 제한효소에 의해 소화되지 않은 것.

4. 고찰

배 품종의 자가불화합성 유전자형 정보는 육종이나 생산을 위해 매우 중요한 요인이다. 대부분의 국내 육성 배 품종은 일본 배 품종에 의해 개량 육종되었으며, 자가불화합성 유전자형은 알려지지 않았다. 자가불화합성 유전자형 분석은 새로운 품종의 육종과 수분수에 적용하기 위해 필요하다. 배 과수원은 대기오염 등의 환경문제에 의해 수분 매개충의 축소와 활동이 줄어들면서 약 30~100% 정도가 인공수분에 의존하고 있다. 정확한 자가불화합성 유전자형을 모르는 화분을 사용하면 같은 과수원내에서도 상품의 다형성이 높고, 불균일한 과실을 생산하게 된다. 또한, 인공수분은 많은 노동력과 경제적 부담을 요구한다. 그래서 본 연구진은 S-RNase의 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의해 국내 육성 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하는 실험을 하였다. 처음에는 PCR 증폭산물을 *AfaI*, *HaeIII*, *HinfI* 등의 제한효소를 처리하여 6% polyacrylamide 겔에 전기영동(PAGE) 후 자가불화합성 유전자형을 동정하였다(Norioka et al., 1996). 그러나 두개의 S-allele를 가진 PCR 산물을 보편적인 제한효소를 처리하여 자가불화합성 유전자를 동정한다는 것은 매우 힘들었다. 그리하여 본 연구진에 의해 합성된 프라이머(PF1, PR2)조합에 의해 S₁-에서 S₉-RNase 단편은 증폭시켰다. S₉-RNase의 아미노산 서열을 이미 분석된 S₁~S₈-RNase(Castillo et al., 2001)와 비교한 결과, S₉-RNase 역시 3개의 cysteine 잔기와 RNase 활성화에 필요한 1개의 histidine 잔기가 보존되어 있었다. 또한, exon에서 변이영역(HV)은 자가불화합성 반응에서 대립유전자의 특이성을 나타내는 영역으로 고찰되었다(Mation et al., 1997). Exon 영역의 염기서열간의 유사성은 S₁-과 S₄-RNase (96%), S₂-와 S₈-RNase (82%), S₃-과 S₅-RNase (94.7%), S₆-과 S₇-RNase (78.7%), S₇과 S₈-RNase (88.6%), S₉-와 S₄-RNase (83.3%)로 높게 나타났으며, exon사이에 intron이 존재하는 것을 발견하였다. 그래서 본 연구진은 intron 정보를 기초로 염기서열 분석과 PCR-RFLP 분석에 의해 20개 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 동정하였다. 그러나 새로운 S-allele를 가지고 있는 'chengsilri'의 자가불화합성 유전자형은 완벽하게 동정하지 못했다. 이 방법은 *Brassica oleracea*(Brace et al., 1994; Park et al., 2001), *Pyrus pyrifolia*(Ishimizu et al., 1999), *Malus domestica*(Matsumoto and Kitahara, 2000)의 자가불화합성 유전자형 동정을 위해 사용한 방법과 거의 비슷하다. 이 방법은 일본 배(*P. pyrifolia*), 중국 배(*P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*, *P. pashia*, *P.*

hondoensis, *P. aromatica*), 사과(*Malus domestica*), 및 매실(*Prunus mume*)의 자가불화합성 유전자형 동정에도 확실하게 응용할 수 있을 것이다. 또한, 새로운 S-allele의 발견 및 동정을 위한 연구에도 유용하게 이용될 것이다.

제 2 절 PCR-CAPS에 의한 국내 육성 배 계통의 자가불 화합성 유전자형 결정

1. 서론

배(*Pyrus pyrifolia*) 품종은 자가불화합성 유전자에 대하여 F1 잡종이고 그들의 종자는 자가불화합성 시스템에 의해 생산된다. 자가불화합성은 유전적인 관계에 의해 주두측에서 자기자신의 화분관 신장을 억제하여 자가수정을 방해하는 것으로 개화식물에서 보편적으로 유전하는 생식현상이며, S-locus의 복대립유전자에 의해 조절된다(de Nettancourt, 1997). 주두측의 S-locus 산물은 ribonuclease (RNase) 활성을 가지고 있는 glycoprotein으로 알려졌으며 S-RNase라고 하였다(Golz et al., 1995; Matton et al., 1994; Newbiggin et al., 1993). 7개 이상의 S-allele(S₁~S₇)가 *P. pyrifolia*종에서 동정되었다(Terami et al., 1946). 배우체형 자가불화합성 유전자(S-allele)는 자가불화합성 표현형의 안정성과 유전자간의 우열관계를 나타내는 두 가지의 특징(Lee et al., 1981; Nou et al., 1993; Sophia and Daphne, 2001)을 가지고 있으며, 육종계통의 S-allele는 안정된 자가불화합성 부친계통의 선발의 능력을 높이기 위해 동정되었다. 배우체형 자가불화합성인 Rosaceae, Solanaceae, 및 Scrophulariaceae 등에서 주두를 통과하는 화분관이 자가불화합성 요인에 의해 신장억제 되는 것이 발견되었다(Chung, 1997; Kao and McCubbin, 1996; McClure et al., 1989; Murfett et al., 1994, 1995). 근년, 일본 배(*Pyrus serotina*)와 사과(*Malus domestica*)의 cDNA수준의 S-RNases가 cloning 되었으며(Ishimizu et al., 1998; Norioka et al., 1996; Sassa et al., 1996), S-RNases의 여러 가지의 특징이 밝혀졌다(Broothaerts et al., 1995; Sassa et al., 1997). 또한 배와 사과의 자가불화합성 유전자형은 PCR-RFLP 방법에 의하여 결정되어졌다(Ishimizu et al., 1999; Janssens et al., 1995; Kim et al., 2000). 본 연구진은 S-RNase 관련 primer를 합성하여 PCR증폭 반응을 수행 후 증폭된 단편을 cloning하고 염기서열을 결정하였다. 그리고 특이적인 제한효소를 이용하여 PCR-CAPS(PCR-cleaved amplified polymorphic sequence)분석을 수행하여 국내 육성 배(*P. pyrifolia*) 품종과 계통의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 식물재료

배 5품종과 국내 육성 배(*P. pyrifolia*) 22계통을 본 연구에 사용하였다. 국내 육성 배 품종[Whangkeumbae(S₃S₄), Chuwhangbae(S₄S₆)], 일본 육성 배 품종[Kimizukawase(S₁S₅), Chojuurou(S₂S₃), Okusankichi(S₅S₇)], 국내육성 배 계통(NHRI-08, NHRI-11, NHRI-17, NHRI-18, NHRI-19, NHRI-20, NHRI-22, NHRI-24, NHRI-26, NHRI-28, NHRI-30, NHRI-31, NHRI-33, NHRI-34, NHRI-35, NHRI-36, NHRI-38, NHRI-39, NHRI-a, NHRI-b, NHRI-c, NHRI-d) 등은 원예연구소(Suwon, Korea)로부터 수집하였다. 식물재료의 잎은 신속하게 액체 질소로 동결시킨 후 -80℃에 저장하여 사용하였다.

나. 게놈 DNA 추출

게놈 DNA는 Aldrich와 Cullis(1993)의 방법을 응용하여 어린잎에서 추출하였으며, 추출한 게놈 DNA용액은 PrepMate™ 정제 Kit(Bioneer, USA)를 이용하여 정제한 후 37℃에서 1 hr 정도 RNase 처리를 하였다. 정제된 DNA는 겔 전기영동법과 분광광도계를 사용하여 정량 후 -20℃에 저장하였다.

다. PCR 증폭

다수의 S-RNase 염기서열정보를 이용하여 primer(Pf: 5'-CAA TTT ACG CAG CAA TAT CAG-3' Pr: 5'-CTT TTG GCA CTT GAR TTT TGG-3')를 합성하였다(Ishimizu et al., 1998). PCR 증폭은 PE-9700 cyclor (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 수행하였다. PCR 반응 혼합물은 2.5U Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 10x 반응용액, 2.5 mM dNTP로 구성되었으며, PCR 증폭 사이클은 pre-denaturation(94℃, 5분) 1 cycle, amplification (94℃, 1분; 54℃, 2분; 72℃, 3분) 30 cycle, post-extension(72℃, 7분) 1 cycle로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 저분자의 증폭산물과 적은 차이의 증폭산물을 분리할 수 있는 2% Metaphor 아가로스 겔(BMA, USA)에 전기영동 후 UV transilluminator상에서 검출하였다.

라. PCR 산물의 cloning과 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)를 이용하여 cloning 하였으며, PRISM™ 377(Perkin-Elmer, USA)을 사용하여 염기서열을 결정하였다. PCR 산물의 염기서열은 MacDNAsis (Hitachi software, CA, USA)과 BLASTN 프로그램(NCBI, USA)을 이용하여 분석하였다.

마. 특이적인 제한효소를 이용한 PCR단편의 소화

증폭된 PCR 산물은 EcoRI, NdeI, Eco0109I, AlwNI, MluI, HinCII 등에 의해 소화되었다. 반응 혼합물은 37~65℃에서 2시간동안 처리 후 2% Metaphor 아가로스겔상에서 DNA 단편을 분리하였다. CAPS 패턴은 ethidium bromide 용액으로 염색 후 조사하였다.

3. 연구결과

가. 7개의 자가불화합성 유전자의 염기서열 분석

PCR 분석은 Rosaceae의 S-RNase의 아미노산 서열을 기초로 하여 S-allele 특이적인 primer를 합성하여 수행되었다. PCR 결과, 620 bp에서 1,600 bp의 증폭 산물을 얻을 수 있었으며, 증폭된 PCR 단편은 pGEM T Easy 벡터에 의해 cloning하였다. S₁~S₇-RNase간의 염기서열을 비교 분석하였다(그림 4).

배(*P. pyrifolia*)의 S-RNase는 보존된 영역인 두 개의 exon과 그 사이의 변이 영역인 하나의 intron으로 구성되어있었다. PCR 단편의 크기는 S₁=629 bp, S₂=1,609 bp, S₃=638 bp, S₄=630 bp, S₅=638 bp, S₆=612 bp, S₇=614 bp 이었으며, intron은 S₁=167 bp, S₂=1,153 bp, S₃=179 bp, S₄=168 bp, S₅=179 bp, S₆=147 bp, S₇=152 bp 이었다. 증폭 단편들은 intron 크기에 의해 1 bp 에서 997 bp의 차이를 나타내었다. 또한 intron 영역의 염기서열 비교분석 결과, S₁-과 S₄- RNase의 93.7%의 상동성을 나타냈으며, S₃-과 S₅-RNase는 93.3%, S₆-와 S₇-RNase는 78.9%로 높은 상동성을 나타냈다. 5 품종과 22계통은 제한효소 처리가 되지 않은 PCR 단편과 염기서열 정보에 의해 자가불화합성 유전자형을 유추할 수 있었다. 그러나 PCR 산물만 가지고 자가불화합성 유전자형을 동정하기는 매우 어렵다. 왜냐하면 S₁-과 S₄-RNase 증폭 산물크기의 차이는 1 bp 이고, S₃-과 S₅-RNase는

크기가 같기 때문이다. 따라서, 본 연구에서는 염기서열 정보를 이용하여 S-allele의 특이적인 제한효소를 선발하고 절단위치를 찾아내어 PCR-CAPS를 수행, 분석하였다.

S1-CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAACGATCCTACTGACA
 S2-CAATTTACGCAGCAATATCAGCAGGCTTTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACA
 S3-CAATTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACA
 S4-CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAACGATCCTACTGACA
 S5-CAATTTACGCAGCAATATCAGCTGGCGGTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAGGATCCTCCGGACA
 S6-CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACA
 S7-CAATTTACGCAGCAATATCAGCCAGCTGTCTGCAACTCCAAACCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACA
 ***** ** * ***** ***** ***** * ****

S1-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGAAATGGACCTGACCCAGAAAAATGTAAGACTAC
 S2-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAACCAAAGTAGGACGTGACCCAGAATATTGC-----AA
 S3-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACATGGTAGGACCTGACCCAAGTAAATGC-----CC
 S4-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGGAATGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGACTAC
 S5-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAGCATGGCAGGACCTGACCCAAGTAAATGC-----CC
 S6-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACGACGTAGGAGATGACCCAATATACTGCAAGAATAA
 S7-AGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACCTGAATGGACCTCACCAGAAAAATTGCACTAATGC
 ***** ***** * **** * ***** * **

S1-AGCCCTGAATTCAGAGAAGGTAATATTATTAATAATGAGATGGTCAATATTGTTTATTTCAATTTATGCAC
 S2-GACAAAGAGATATCGGAAG
 S3-GATAAAGAATATTCGGAAGGTAATATTATTAGTAATCCAATCGTCAATATTGTTTATTTCAATTTATGTAC
 S4-AACCATGAATTCAGAGAAGGTAATATTATTAATAATGAGATAGTCAATATTGTTTATTTCAATTTATGCAC
 S5-GATAAGGAACATTCGGAAGGTAATATTATTAGTAATCAGATCGTCAATATTGTTTATTTCTTTATGTAC
 S6-AACCATTAATCTCAGCAGGTAATATTATTAATAATCAGATAGTCAATAATGTTTATTTCT-----
 S7-AACCGTGAATCCTCAGGTAATATTACTGATAATCAGATAGTCAATATTGTTTATTTCAATTTATGTAC
 * ** ***** * **** * ***** ** *****

S1-TCGTGT-----ATATATAGATTACAATA--CTTAA-CATAGATTTTCATGCACGCC
 S2-
 S3-TTGTGTGTGTTTGTGTATATCAATATATACAT-A-----CTCAAACATAGATTTTCATGCACACG
 S4--GTGTGT-----ATATATACATTAC-ATATGCTCAG-CATAGATTTTCATGCACGCC
 S5-TTGTGCGTGTGTTTGTGTATATCAATATATACGT--C-----CTCAAACATAGATTTTCATGCACGTC
 S6-----ATATATACAT---ATA-GTCAA-CATATATTTTCATGCACGCC
 S7-TTGTGT-----ATATATACAT---ATA-CTCAA-CATAGATTTTCATGCACGCC
 ***** * * * *****

S1-TGTGCAAATATTACAATTAATT-T--AAAATTTAATCATGAATTGTTT-----CT-ATTACATA-ATAT
S2-
S3-TGTACAAATATTACAATTAGTTC---AAAATATAATCAT-AATTTTTTTTTT--CT--CT-CTT--GTGT
S4-TGTGCAAATATTACAATTAATT-T--AAAATTTAATCATGAATTGTTT-----CT-ATTATATA-ATAT
S5-TGTACAAATATTACAATTAGTT-TT-AAA-TATAATCAT-AATTTTTTTTTTTTCT--TTT-----GTGT
S6-TGTGCAAATATTACAATT-GTT-TTTAAA-TTTAATCATAAATTTTTTT-----CT-ATT--ATATGTGT
S7-TGTCCAAATATTACAATAAATT-TAGAAA-TTTA-----CTTATATCATATATAT

*** ***** ** *** * ** ** *

S1-TCTATTGTCAGATAGGAAATATG---ACAGCCCAATTGGAAATTATTTGGCCGAACGT-TCTCAATCGAA
S2- ATACAAAGACTC---GAACCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTATC-CGATCGAA
S3-GC-AT-ACCAGAGAGAAAAATTACTCGAACCCAGCTGGAAATTATTTGGCCGAACGTAT-TCGATCGAA
S4-TATATTGTCAGATAGGAAATATG---ACAGCCCAAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGT-TCTCAATCGAA
S5-GC-AT-ACCAGAGAGAAAAATTACTCGAACCCAGCTGGCAATTATTTGGCCGAACGTAT-TCGATCGAA
S6-TATATTGTCAGATAGGGAATCTG---ACTGCCAGTTGATAATTATTTGGCCGAACGTG-CTCGATCGAA
S7-TATATTGTCAGATAAAAAATATC---CAAGCCCAAGTTGAAAATTATTTGGCCGAATGTA-CTCGATCGAA

* **** * * * *** ** ***** ** * *****

S1-GCGATCATGTAGG---CTTCTGGGAAAGAGAGTGGCTCAAACATGGCACCTGTGGGTAT---CCCACAATA
S2-AAGCTAATCGAGG---CTTCTGGCGTAAACAGTGGTACAAACATGGCTCCTGTGCGTCT---CCCGATT-
S3-CAAAAA-TAACCTCTTCTGGGATAAAGAGTGGATGAAACATGGCTCCTGTGGGTAT---CCCACAATA
S4-GCGATCATGTAGG---CTTCTGGGAAAGAGAGTGGCTCAAACATGGCACCTGTGGGTAT---CCCACAATA
S5-CAAAAA-TAAACTCTTCTGGGATAAAGAGTGGATGAAACATGGCACCTGTGGGTAT---CCCACAATA
S6-CCGATCATGTAGG---CTTCTGGAATAGACAGTGGAAACAAACATGGCAGCTGTGGGAAAGCGCCACAATA
S7-CCAATCATGTAGG---CTTCTGGAATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGGTAT---CCCGAATA

* * ***** * * ***** ***** * *** ** *

S1--A-AG-GACGACATGCATTA-TTTAAAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCT
S2-GCCGAACCAGA-A-GCATTACTTTGAAA-CAGTAATCAGAATGTTCTTAGCGGAGAAACAAAACGTCTCT
S3-GATAATGA-GA-AC-CATTACTTTGAAACC-GTAATCAAAATGTACATCAGCAAGAAACAAAACGTCTCT
S4--A-AG-GACGACATGCATTA-TTTAAAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCT
S5-GATAACGA-GA-AC-CATTACTTTGAAACC-GTAATCAAAATGTACATCAGCAAGAAACAAAACGTCTCT
S6--A-AG-GACGAAATGCATTACTTTAAA-CAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCT
S7--AT-G-AACGACACGCATTACTTTCAA-CAGTAATCAACATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCT

** ***** ** * ***** * * ***** ** *

S1--GCAATCCTCTCAAAGGCGACGATTCAACCGAACGGGAATAACAG--GTCAGTGGTGGATATTGAAAATG
S2-AG-AATCCTCTCAATGGCGACGATTGAACCGAGGGGAAAAACAG--GACACTGTTGGAAATTCAAAATG
S3-AG-AATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGACGGGAAAAAAG-AG-CACTGTTGGATATTGAAAATG
S4--GCAATCCTCTCAAAGGCGACGATTCAACCGAACGGGAATAACAG--GTCAGTGGTGGATATTGAAAATG

HincII)들을 선발하였으며, PCR 단편의 크기, 제한효소 그리고 절단위치를 표 3에 나타냈다. 또한 S-allele 특이적인 제한효소의 절단위치를 그림 4에 밑줄로 표시하였다. PCR 단편들은 크기가 큰 S₂-allele를 제외한 6 S-allele의 특이적인 제한효소를 이용하여 소화시켰다. S₁-RNase의 *EcoRI*에 의해 629 bp의 PCR 단편을 147 bp와 482 bp로 소화됐다. S₄-RNase는 *EcoRI*에 의해 630 bp의 PCR 단편을 147 bp와 483 bp로 소화되었으며 또한, *NdeI*에 의해 630 bp의 PCR 단편이 230 bp와 400 bp로 소화됐다. S₃-RNase은 *Eco0109I*에 의해 638 bp의 PCR 단편이 112 bp와 526 bp로 소화됐다. S₅-RNase의 638 bp PCR 단편은 *Eco0109I*에 의해 112 bp와 526 bp로 소화되었으며 또한, *AlwNI*에 의해 115 bp와 523 bp로 소화됐다. S₆-RNase의 612 bp PCR 단편은 *MluI*에 의해 252 bp와 360 bp로 소화되었으며 또한, *HincII*에 의해 216 bp와 396 bp로 소화되었다. S₇-RNase의 614 bp PCR 단편은 *MluI*에 의해 250 bp와 364 bp로 소화되었다(표 3).

표 3. 배 계통의 S-RNase 산물의 크기와 S-RNase 특이적인 제한효소 및 절단위치

S-allele	PCR-fragment size*	intron size	<i>EcoR I</i>	<i>NdeI</i>	<i>Eco0109I</i>	<i>AlwNI</i>	<i>MluI</i>	<i>HincII</i>
S ₁	629	167	147, 482	629	629	629	629	629
S ₂	1,609	1,153	1,609	1,609	1,609	1,609	1,609	1,609
S ₃	638	179	638	638	112, 526	638	638	638
S ₄	630	168	147, 483	230, 400	630	630	630	630
S ₅	638	179	638	638	112, 526	115, 523	638	638
S ₆	612	147	612	612	612	612	252, 360	216, 396
S ₇	614	152	614	614	614	614	250, 364	614

다. PCR-CAPS에 의한 배 계통의 자가불화합성 유전자형 결정

배 22계통과 5품종으로부터 Ppf1과 Ppr3 primer를 이용해서 자가불화합성 유전자를 증폭하였으며, S-RNase 특이적인 제한효소를 이용하여 PCR-CAPS를 수행하였으며, 분석결과에 제한효소에 의해 소화된 품종과 계통의 PCR-CAPS 패턴

을 그림 5에 나타냈다.

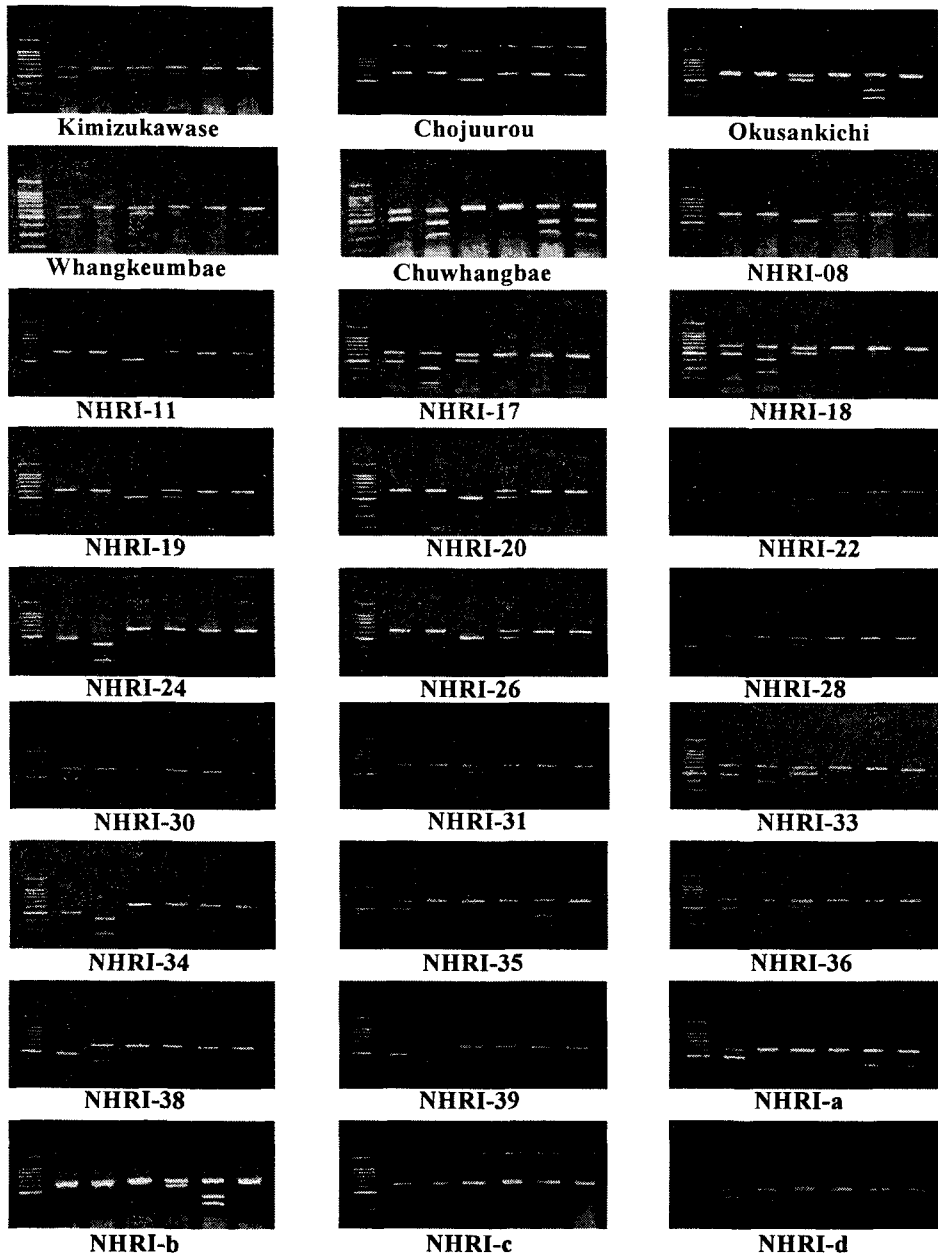


그림 5. 배 22계통의 S-RNase PCR 산물을 각각의 S-RNase 특이적인 제한효소 *EcoR* I, *Nde* I, *Eco0109* I, *AlwN* I, *Mlu* I, *HinC* II 등을 처리 후 2% Metaphor agarose gel에 전기영동을 하였다. 제한효소에 의해 분획된 단편들에 의해 22계통의 자가불화합성 유전자형을 결정할 수 있었다.

약 1,600 bp의 PCR 산물이 'Chojuurou'와 'NHRI-c'에서 증폭되었으며, 이것은 S₂-allele(1,609 bp)로 판명되었다. 그리고 그림 5의 결과에 기초를 두고, 배 5 품종과 국내 육성 배 22계통의 자가불화합성 유전자형을 동정할 수 있었다(표 4).

표 4. PCR-RFLP 분석에 의한 국내 육성 배 22계통의 S-genotype 결정

Acc. No.	Cultivar/ Strain	S ₂ ¹ fragment	EcoR I ²	Nde I	Eco0109 I	AluN I	Mlu I	HinC II	S- genotype
1	Kimizukawase	-	+	-	-	+	-	-	S ₁ S ₅
2	Chojuurou	+	-	-	+	-	-	-	S ₂ S ₃
3	Okusankichi	-	-	-	+	+	+	-	S ₅ S ₇
4	Whangkeumbae	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
5	Chuwhangbae	-	+	+	-	-	+	+	S ₄ S ₆
6	NHRI-08	-	-	-	+	+	-	-	S ₃ S ₅
7	NHRI-11	-	-	-	+	+	-	-	S ₃ S ₅
8	NHRI-17	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
9	NHRI-18	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
10	NHRI-19	-	-	-	+	+	-	-	S ₃ S ₅
11	NHRI-20	-	-	-	+	+	-	-	S ₃ S ₅
12	NHRI-22	-	-	-	+	+	-	-	S ₃ S ₅
13	NHRI-24	-	+	+	-	-	-	-	S ₁ S ₄
14	NHRI-26	-	-	-	+	+	-	-	S ₃ S ₅
15	NHRI-28	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
16	NHRI-30	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
17	NHRI-31	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
18	NHRI-33	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
19	NHRI-34	-	+	+	-	-	-	-	S ₁ S ₄
20	NHRI-35	-	+	+	-	-	+	-	S ₄ S ₇
21	NHRI-36	-	+	+	+	-	-	-	S ₃ S ₄
22	NHRI-38	-	+	+	-	-	-	-	S ₁ S ₄
23	NHRI-39	-	+	+	-	-	-	-	S ₁ S ₄
24	NHRI-a	-	+	-	-	-	+	+	S ₁ S ₆
25	NHRI-b	-	-	-	+	+	+	-	S ₅ S ₇
26	NHRI-c	+	-	-	+	-	-	-	S ₂ S ₃
27	NHRI-d	-	+	+	-	-	+	+	S ₄ S ₆

¹PCR 증폭에 의해 S₂-allele 산물 증폭 및 증폭단편이 S-RNase 특이적인 제한효소에 의해 절단되었을 때 +로 표시하였음.

'Kimizukawase', 'NHRI-24', 'NHRI-34', 'NHRI-38', 'NHRI-39', 'NHRI-a' 등은 S₁-RNase 특이적인 제한효소에 의해 소화되었으며, 'Chojuurou', 'Whangkeumbae', 'NHRI-08', 'NHRI-11', 'NHRI-17', 'NHRI-18', 'NHRI-19', 'NHRI-20', 'NHRI-22', 'NHRI-26', 'NHRI-28', 'NHRI-30', 'NHRI-31', 'NHRI-33', 'NHRI-36', 'NHRI-c' 등은 S₃-RNase 특이적인 제한효소에 의해 소화되었다. 그리고 'Whangkeumbae', 'Chuwhangbae', 'NHRI-17', 'NHRI-18', 'NHRI-24', 'NHRI-28', 'NHRI-30', 'NHRI-31', 'NHRI-33', 'NHRI-34', 'NHRI-35', 'NHRI-36', 'NHRI-38', 'NHRI-39', 'NHRI-d' 등은 S₄-RNase 특이적인 제한효소에 의해 소화되었다. 'Kimizukawase', 'Okusankichi', 'NHRI-08', 'NHRI-11', 'NHRI-19', 'NHRI-20', 'NHRI-22', 'NHRI-26', 'NHRI-b' 등은 S₅-RNase 특이적인 제한효소에 의해 소화되었다. 'Chuwhangbae', 'NHRI-a', 'NHRI-d' 등은 S₆-RNase 특이적인 제한효소에 의해 소화되었다. 'Okusankichi', 'NHRI-35', 'NHRI-b' 등은 S₇-RNase 특이적인 제한효소에 의해 소화되었다.

4. 고찰

배는 배우체형 자가불화합성을 나타내고 있다. 품종육종은 이들 품종간의 교배 후대의 선발에 의해 이루어진다. 육성중인 배 계통의 자가불화합성 유전자형을 유묘기 때 알 수 있으면 선택과 도태가 용이해진다. 그런데 국내 육성 배 품종과 계통도 양친을 주로 품종(S-heterozygote)을 사용하였기 때문에 양친으로부터 분리된 자가불화합성 유전자형을 갖고 있다. 즉 양친이 자가불화합성을 가진 이형접합체이기 때문에 교배실험을 통하여 자가불화합성 유전자형을 판단할 수 있다. 본 연구에서는 각각의 S-RNase 유전자의 염기서열을 분석하였으며, 그 결과 상동성이 높은 exon 영역 사이에 변이 영역인 intron이 있다는 것과 S₁~S₇-RNase간의 염기서열은 변이가 심하다는 것을 알아냈다. 또한, PCR-CAPS 방법을 이용하여 22계통과 2 품종의 자가불화합성 유전자형을 성공적으로 결정하였다. PCR-CAPS 방법은 IEF-PAGE과 2D-PAGE를 사용하는 것에 비해 보다 경제적이고 효율적이다. 왜냐하면 보다 짧은 시간내에 결과를 얻을 수 있고 성숙된 화주(S-RNase의 RNA산물이 발현하는 곳)가 아닌 어린잎으로부터 적은 양의 게놈 DNA에 의해 증폭이 가능하기 때문이다(Norioka et al., 1996). PCR-CAPS법은 계통 육성 후보다 효율적으로 계통의 다양성 및 특이성을 밝혀내므로 육종연한을 단축하는데 기여할 것으로 보인다.

제 3 절 배(*Pyrus pyrifolia*)의 새로운 S-RNase의 동정 및 PCR-RFLP에 의한 자가불화합성 유전자형의 결정

1. 서론

자가불화합성은 개화 식물들에 있어서 자가수정을 막고 타가수정을 촉진시키는 유전적인 생식현상이다. 배우체형 자가불화합성인 배는 단일 유전자좌, S-locus에서 조절되는 복대립 유전자계로 설명되어지며, 9 S-allele(S₁~S₉)가 동정되었다. 배 품종은 이러한 자가불화합성 작용과 더불어 양질의 과실을 생산하기 위해서 적절한 수분수를 심어야 한다. 또한 배 품종의 자가불화합성 유전자형은 수분수의 선발과 육종을 위해 유용하게 사용된다. 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하는 한 방법은 교배 후 화분관을 현미경을 이용한 분석과 과실, 종자형성 등을 분석하는 방법이다. 40개의 일본 배 품종의 자가불화합성 유전자형의 동정은 이 방법을 사용하여 확인되었다(Terami et al, 1946; Hiratsuka et al. 1998). 하지만 교배 실험은 많은 노동력과 많은 시간이 소모된다. 자가불화합성 유전자형의 동정을 위하여, 교배실험의 단점 등을 보완하기 위해 각종 분자 생물학적 방법이 개발되었다. 분자적 방법의 하나로써 주두측의 glycoprotein 분석에 의하여 일본 배 품종의 자가불화합성 인자형이 동정되었으며, RNase 활성을 갖는 'S-RNase'로 확인되었다. 5개의 S-RNases (S₁~S₅)는 isoelectric focusing(IEF)에 의해 확인되었으며, 7개의 S-RNases (S₁~S₇)는 이차원적 겔 전기영동(2D-PAGE)에 의해 동정되었다(Hiratsuka et al, 1995; Sassa et al, 1993; Ishimizu et al, 1996). 최근 7개의 S-RNases(S₁~S₇) cDNAs의 염기서열이 일본 배를 이용하여 확인되었으며(Ishimizu et al, 1998; Norioka et al, 1996), cDNAs의 아미노산 서열의 상동성 분석에 의해 상동성이 높은 5개의 보존된 영역과 아미노산과 염기서열의 변이가 큰 한 개의 hypervariable (HV) 영역이 존재한 것을 알아냈다(Ishimizu et al., 1998; 1999). Ishimizu et al.(1999)은 일본 배 품종에서 7 S-allele 특이적 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 체계를 확립하였다. Castillo et al.(2001)과 Sawamura et al.(2002)은 각각 'Meigetsu'로부터 새로운 S₈-allele와 'Shinsei'로부터 S₉-allele를 검출하였다. Matsumoto et al(1999; 2000)는 9개의 사과의 자가불화합성 유전자형을 S-allele specific PCR-RFLP에 의해 결정하였으며,

새로운 'S_f'와 'S_e'-allele를 발견하였다. Kim et al.(2002)은 PCR-RFLP 분석과 9 S-RNase의 intron 영역의 염기서열 분석에 의해 한국 육성 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다. 본 연구에서는 PCR-RFLP 분석과 염기서열분석으로 'Ichiharawase', 'Chojuurou', 'Niitaka' 및 'Chengsilri'의 자가불화합성 유전자형을 조사하였으며, 'Chengsilri'에서 새로운 S-allele, S₁₀을 동정하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 식물 재료와 DNA 추출

식물재료는 국내 원예연구소로부터 수집한 배(*Pyrus pyrifolia*) 15품종을 사용하였다. 4품종(PCR 산물의 크기가 큰 품종) "Ichiharawase", "Chojuurou", "Niitaka" 그리고 "Chengsilri"은 PCR-RFLP 분석과 염기서열 분석에 사용되었다. 어린잎을 채집 후 -80℃에 저장하였다. Genomic DNA 추출은 CTAB 방법에 의해 수행하였다(Yamamoto et al, 2000).

나. S-RNase 단편 증폭과 PCR-RFLP 분석

Genomic DNA 용액은 먼저 phenol과 chloroform으로 정제 후 DNA PrepMate™ Nucleic Acid 정제 kit(Bioneer, USA)를 사용하여 다시 한번 더 정제하였다. PCR-RFLP방법은 Ishimizu et al.(1999)이 개발한 방법을 응용하였으며, S-RNase 단편들을 증폭하여 각각의 S-allele 특이적 제한효소로 소화하였다. 또한 본 연구에서는 새로운 primer YFQFTQ과 anti-I/TIWPNI/V 조합을 합성하여 PCR 증폭반응을 실시하였으며, 증폭된 S-RNase 단편은 *SfcI* (S₁), *XbaI* (S₂), *PpuMI* (S₃또는 S₅), *NdeI* (S₄), *AluNI* (S₅), *MluI* (S₆또는 S₇), *NruI* (S₈), *BstBI* (S₉), 및 *HhaI* (S₁₀)의 제한효소를 이용하여 소화하였다. 제한효소 처리된 PCR 단편들은 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하였으며, UV transilluminator상에서 분석하였다.

다. S-RNase 단편의 클로닝 및 염기서열 분석

S-RNase 단편들은 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)를 이용하여 클로닝하였으며, 염기서열은 PRISM™ 377 (Perkin Elmer, USA)에 의하여 결정하였으

며, 염기서열 정보는 BLASTN 프로그램과 CLUSTALW Multiple 염기서열 프로그램에 의해 분석하였다.

3. 연구결과

가. PCR증폭에 의한 새로운 자가불화합성 유전자 동정

국내 배 품종 'Chengsilri'에서 새로운 S-RNase 산물을 동정하였다. 자가불화합성 유전자의 아미노산 서열을 기초로 새로운 primer(YFQFTQ, anti-^I/T IWPNI^I/V)를 합성하였다(Ishimizu et al., 1998, Kim et al., 2002). 새로 합성된 primer를 이용하여 10개의 일본 배 품종과 5개의 국내 육성 배 품종의 S-RNase 단편들을 증폭할 수 있었다(그림 6). S₁-, S₃-, S₄-, S₅-, S₆- 및 S₇-RNase 단편은 거의 동일한 크기의 357 bp에서 386 bp 사이에서 검출되었으나 'Meigetsu' (S₁S₈)의 S₈-RNase, 'Shinsei' (S₄S₉)의 S₉-RNase, 'Nijisseiki'(S₂S₄)의 S₂-RNase의 각 단편들은 444 bp (S₈), 1,325 bp (S₉), 1,357 bp (S₂)으로 크기가 서로 다르게 나타났다. 국내 배 품종 'Chengsilri'에서는 약 1,600 bp의 새로운 S-RNase 단편을 얻어내었다. 이 단편은 기존에 단편 크기가 가장 큰 S₂-RNase(그림 6의 lane 13) 보다 더 큰 것으로 S₁₀-RNase로 명명하였다.

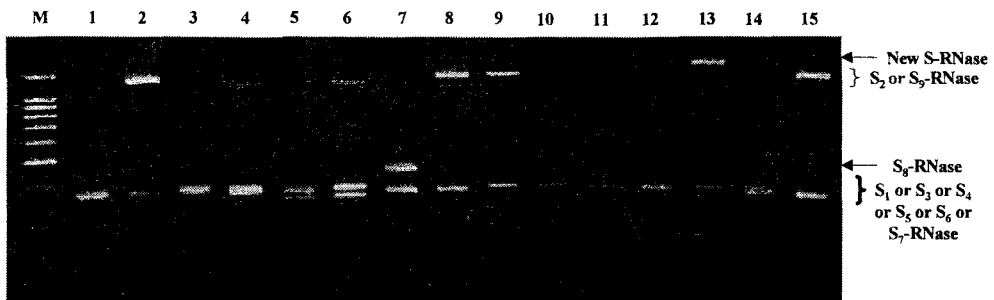


그림 6. Primer YFQFTQ와 anti-^I/T IWPNI^I/V 를 이용하여 PCR 증폭한 배 품종의 S-RNase 산물을 2% Metaphor agarose gel에 전기영동을 하였다. 1: Suisei(S₁S₄), 2: Nijisseiki(S₂S₄), 3: Housui(S₃S₅), 4: Shinsui(S₄S₅), 5: Imamuraaki(S₁S₆), 6: Okusankichi(S₅S₇), 7: Ichiharawase(S₁S₈), 8: Shinsei(S₄S₉), 9: Niitaka(S₃S₇), 10: Yeongsanbae(S₃S₇), 11: Danbae(S₃S₇), 12: Manpoong(S₃S₇), 13: Chengsilri(S₅S₇), 14: Shincheon(S₇S₇), 15: Shinkou(S₄S₉).

나. 새로운 S-allele의 염기서열 분석 및 PCR-RFLP 분석

1) 새로운 S-allele의 염기서열 분석

S₁₀-RNase의 PCR 산물을 pGEM-T Easy 벡터를 이용하여 cloning하였으며, 염기서열을 결정하였다. S₁₀-RNase의 염기서열을 분석한 결과, 상동성이 높은 exon 영역 사이에 hypervariable (HV) 영역인 intron을 한 개 가지고 있었다(그림 7). Intron은 1,513 bp 염기서열을 갖고 있었으며, exon 영역 213 bp 염기서열과 71개의 아미노산 서열로 구성되어 있었다. 또한 S₁₀-RNase의 PCR 단편이 1,235 bp와 491 bp로 소화되는 S₁₀-RNase 특이적인 제한효소 '*Hha*I' 사이트를 찾을 수 있었다. Ishimizu et al. (1999)과 Castillo et al. (2001)는 S₁-에서 S₈-RNase 산물을 증폭하는 reverse primer IIWPNV를 개발하였으며, Sawamura et al., (2002)은 S₉-RNase의 PCR 산물을 증폭하는 reverse primer TIWPNV를 개발하였다. 본 연구진은 새롭게 합성한 reverse primer IIWPNI에 의해 S₁₀-RNase를 증폭할 수 있었다.

TATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAACTCTAACCCCTATTCCTTGTAAACGATCCTACTGAC
 Y F Q F T Q Q Y Q P A A C N S N P I P C N D P T D
 AAGTTGTTACAGGTTTCAGGATTGTGGCCTTCAAAGTTAAAGGACCTGACCCACAGACTGCAAGACCAAAC
 K L F T V H G L W P S K V K G P D P H D C K T K T
 AACAAAGTCTCAGACGGTAATATTAATAATCAAATAGTCAATATTGCTTAGGAAAAATTAGTGTATTGTTTCATATT
 N K S Q T
 TATTAATTTTCATTGACTGAAACTTGATTAGTTTTTAGTTGATTGAACTTCCTATTATTAATGTATTAAAGTATT
 AACGAGTCAGTAACATTGTTTTTAAAAATAAAAATTTGCAATTAATTTAGGATTTTAATACTCACACATTTACTA
 AACTCCTAATTAATTTTCAATTCAAAACATTTCTATAATAACAAATAAATAAAAATAAAAATAAATTGTACTCATT
 AATTTTTCATAAAAAGATTTTTAAAAATTTTAACTTAAATGTACCCATTATATAATATTTCAAACATTTTAATG
 TGTAGTGTACCCATTATTAATATACCAATTTGTTATATGTAAAATTTACCATTTTTAAAAATATAAAAATGTAC
 CCATTTTTCATATAAAATACATTCAATTTCTTTTAAATCCATTTTGAACCTTATATGGGTACATTATCTTCGTAG
 GTACTCTTTTTTCATTGATTGAGAATGTATCCATGTCAAGTTTAAATGAAGAATTTACTAATGTACATTAAGC
 CTAGTATCTATTATTTGGTTTTGAAGAATGTATCCATGTTTTATGTGTTTGTGTATAGATATAGATATATAGATA
 TATATACATATACATGTACATATACATATACATGTACATATACATATACATATATATATATATATATGAAG
 CCTTTAAGGAAAGGTATCCCCATTTTTTTTTTATAAAAAATGGGGATTAGTTGTGGGGTCCATACCACATCGAACT
 TTAACGACCCGAACCTTTTATTTTTCAAGCTGTTCCCTCATAGATCATCCTTGCAAAATATTAGCCAAATGAAAA
 TATTTAAGACATCTAATTTGGGTTAAAAGAAATAAACAAACTTTGTTATATAAGAAACAATGGTATTTGATCTT
 GATAATTAATAGGCAAATGATTTCAAATGAATTGAATTTTTGTAAGGATGATCTATGAATCGAGACTTACAAA
 ATAGATAGTTCCGGATCGTTGAAATTCAGAGT**GCGCC**ATCTTCTAATTTCTTTTTCTTTTTCAAAAAATGGGGA
 TCCCTTTGCATAAAGGGCCTATATATATATGTGTGTGTGTATTGGAGAATAAATCTTTTCATATTTTCA
 TTCCACAAATTATGGGTTTGATTTAAAATCTCATTAAATATAAACACCACAAATTTCAATTTTTGATTTAAAAT
 TATAATAACCTACATAGAAATACGTTATTACATTAATGTCAGAGATTTGATAAAAACTAAAAACCAATAAAGT
 TTTAGTTAAAGAACATTTATAAATAGGGACCACATCTAAAGTCAATTTGTTATTTTCATTTATGTACTTGTGTATA
 TATACATATACACAACATAGATTTTAAATGCACTCTTATGCAAATATTACAATTAATTTAAAATTTAATCATAAAT
 TTTTCTATTGTATATATTATATTGACAGATAGATATATCACTCAAACCCAGTTGGAAATTTATTGGCCAAACAT
 I D I S L K P Q L E I I W P N I
C

그림 7. 국내 육성 배 품종 'Chengsilri'의 S₁₀-RNase의 염기서열을 결정하였다. YFQFTQ와 anti-¹/_TIWPN¹/_V의 primer 위치는 밑줄로 표시하였으며, 1,513 bp의 intron의 염기서열은 이태릭체로 표시하였다. S₁₀-RNase의 특이적인 제한효소 'HhaI'(GCGC)의 염기서열은 진하게 표시하였다.

또한 10개의 S-RNase의 exon 영역의 아미노산 서열을 비교하였다(그림 8). S₁₀-RNase는 RNase 활성에 필요한 histidine 잔기가 1 개 존재하였으며(Castillo et al., 2001), S-RNase의 특징인 3개의 cysteine 잔기도 보존영역에 존재하였다(Kawata et al., 1989). 매우 흥미로운 사실은 S₁₀-RNase는 hypervariable (HV) 영역 내의 아미노산 서열 중 KT와 L의 양쪽 모두의 아미노산을 가지고 있었으나, S₁⁻, S₄⁻, S₆⁻, S₇⁻, S₈⁻ 및 S₉-RNase는 L의 아미노산 서열을 가지고 있지 않았으

며, S₃과 S₅-RNase는 KT의 아미노산 서열을 가지고 있지 않았다. 또한 S₂-RNase는 KT와 L의 양쪽 모두의 아미노산 서열이 존재하지 않았다. 이러한 결과로부터 다른 S-RNase들은 1,513 bp의 가장 큰 intron과 KT, L의 아미노산 서열을 모두 가진 S₁₀-RNase로부터 파생되었다고 생각되었다.

Intron
▼

S1-RNase : YFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTALNSQKIGNM-TAQLEI IWPNV
S2-RNase : YFQFTQQYQQAFCNSNPTPCNDPPDKLFTVHGLWPSSTKVGRDPEYC—KTKRYRKIQRLEPQLEI IWPNV
S3-RNase : YFQFTQQYQLAVCNSNRTLCKDPPDKLFTVHGLWPSNMVGPDPSPKC—PIKNIRKREKLEHGLEI IWPNV
S4-RNase : YFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTTMSQKIGNM-TAQLEI IWPNV
S5-RNase : YFQFTQQYQLAVCNSNRTPCKDPPDKLFTVHGLWPSMAGPDPSNC—PIRNIRKREKLEPQLAI IWPNV
S6-RNase : YFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDPPDKLFTVHGLWPSNDVGDPIYCKNKTIKSQQIGNL-TAQLII IWPNV
S7-RNase : YFQFTQQYQPAVCNSKPTPCNDPPDKLFTVHGLWPSNLNGPHFENCINATVNPRIKNI-QAQLKI IWPNV
S8-RNase : YFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDSPDKLFTVHGLWPSNSSGPHFNCTINTVKSQTIRSL-KAGLEI IWPNV
S9-RNase : YFQFTQQYQPAVCSSNPTPCRDPPDKLFTVHGLWPSNVGSDPKKCKTTILNPQTITNL-TTQLETI IWPNV
S10-RNase : YFQFTQQYQPAACNSNPTPCNDPTDKLFTVHGLWPSKVKGPDPFDCKTKINKSQTIDISLKPQLEI IWPNI
***** * * * ** * ***** * * * ** ****

그림 8. 배 품종에 있어서 10개의 자가불화합성 유전자의 아미노산 서열 비교. 변이 영역(HV region)이 3' 말단쪽에 위치하며, S-RNase의 특징인 3개의 cysteine 잔기와 1개의 histidine 잔기가 보존되어 있다. 또한, S₁₀-RNase만이 전부 소유하고 있는 아미노산 codon(KT와 L)은 밑줄로 나타났다. 배의 S-RNase의 유전자 등록번호는 S₁, AB002139; S₂, AB014073; S₃, AB002140; S₄, AB014072; S₅, AB002141; S₆, AB002142; S₇, AB002143이었다.

또한, 10개의 S-RNase들간의 exon영역의 염기서열 유사성을 비교하였다(표 5). S₁-RNase 염기서열은 S₄-RNase와 97.4%의 높은 상동성을 나타냈으며, S₃-RNase는 S₅-RNase와 94.7%의 상동성을 나타냈다. S₂-와 S₃-RNase는 86.5%, S₆-와 S₄-RNase는 87.1%, S₇-와 S₈-RNase는 88.6% 그리고 S₉-와 S₄-RNase는 83.8%의 상동성을 보였다. S₁₀-RNase는 77.8%(S₅-RNase)에서 84.4%(S₄-RNase)의 상동성을 나타냈다.

표 5. YFQFTQ와 anti-^I/_TIWPN^I/_V primer에 의해 증폭된 단편들의 exon영역의 염기서열간 상동성 분석(%)

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
S ₁		82.9	80.1	97.6	78.7	85.2	85.2	85.2	82.7	82.5
S ₂			86.5	82.8	85.0	82.8	81.0	82.9	77.9	79.7
S ₃				82.4	94.7	79.5	80.1	81.4	78.0	79.7
S ₄					79.5	87.1	87.1	87.1	83.8	84.4
S ₅						78.1	78.7	80.0	76.8	77.8
S ₆							81.3	83.3	80.3	81.6
S ₇								88.6	81.2	80.9
S ₈									81.2	83.7
S ₉										80.5

그리고, 10 개의 S-RNase의 염기서열을 기초로 한 N-J phylogenetic tree는 CLUSTALW 프로그램을 이용하여 작성되었다(그림 9). Cluster 분석결과, S₁-RNase와 S₄-RNase, S₃-RNase와 S₅-RNase, 그리고 S₈-RNase와 S₇-RNase가 동일그룹을 형성하였다. 그러나, S₁₀-RNase는 다른 S-RNases들로부터 조금 벗어난 위치에서 혼자 그룹을 형성하고 있었다. S₁, S₃, S₄, S₅, S₆, S₇ 그리고 S₈-RNase는 147 bp에서 234 bp 사이의 크기의 intron을 가지고 있었으며 S₂, S₉ 및 S₁₀-RNase는 1,153 bp, 1,115 bp 그리고 1,513 bp의 크기가 큰 intron을 가지고 있었다. 크기가 큰 S₂, S₉와 S₁₀-RNase의 intron영역의 염기서열을 비교한 결과, S₂와 S₉-RNase는 49.8%, S₂와 S₁₀-RNase는 49.2% 그리고 S₉과 S₁₀-RNase는 56.5%의 비교적 낮은 상동성을 나타냈다(data not show).

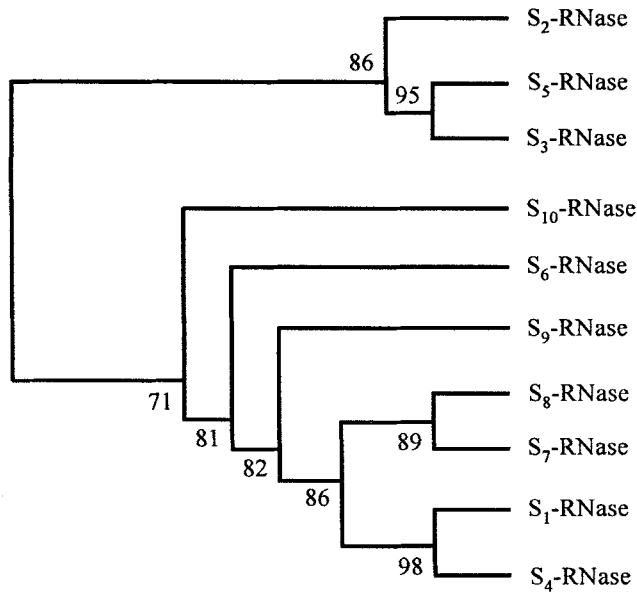


그림 9. CLUSTALW 프로그램을 이용하여 10개의 S-RNase간의 염기서열을 비교 분석하여 Neighbor-joining phylogenetic tree를 작성하였다. 각각의 S-RNase의 상관관계는 percentage로 나타내었다.

2) PCR-RFLP에 의한 자가불화합성 유전자형 결정 및 새로운 S-allele의 확인

S-RNase의 특이적 제한효소 *Sf*CI (S₁), *Xba*I (S₂), *Ppu*MI (S₃), *Nde*I (S₄), *Alu*NI (S₅), *Mlu*I (S₆, S₇), *Nru*I (S₈), *Bst*BI (S₉), *Hha*I (S₁₀)을 이용하여 PCR-RFLP를 수행하였으며, 'Ichiharawase', 'Chojuurou', 'Niitaka' 그리고 'Chengsilri'의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다(그림 10). 'Ichiharawase'는 S₁-과 S₈-RNase 특이적 제한효소에 의해 소화되어 자가불화합성 유전자형은 S₁S₈로 결정되었다. 'Chojuurou'는 S₂-RNase 특유의 제한효소와 S₃-과 S₅-RNase를 소화하는 제한효소에 의해 소화되었다. 그러나 S₅-RNase 만을 소화하는 제한효소에 의해서는 소화되지 않았다. 그러므로 'Chojuurou'의 자가불화합성 유전자형은 S₂S₃로 결정되었다. 'Niitaka'는 S₃-와 S₉-RNase 특이적 제한효소에 의해 소화되었으며, 자가불화합성 유전자형은 S₃S₉로 결정되었다. 물론, 'Ichiharawase', 'Chojuurou', 'Niitaka'의 자가불화합성 유전자형은 이미 PCR-RFLP 시스템에 의해 결정되었다(Carlos et al., 2001, Sawamura et al., 2002, Kim et al., 2002). 동일

한 PCR-RFLP 시스템을 기초로 'Chengsilri'는 S₃⁻, S₅⁻ 그리고 S₁₀-RNase 특유의 제한효소에 의해 소화되었다. 그러나 S₃-특이적 제한효소는 S₃-와 S₅-RNase를 소화한다. 그래서 'Chengsilri'의 자가불화합성 유전자형은 S₅S₁₀으로 결정되었다.

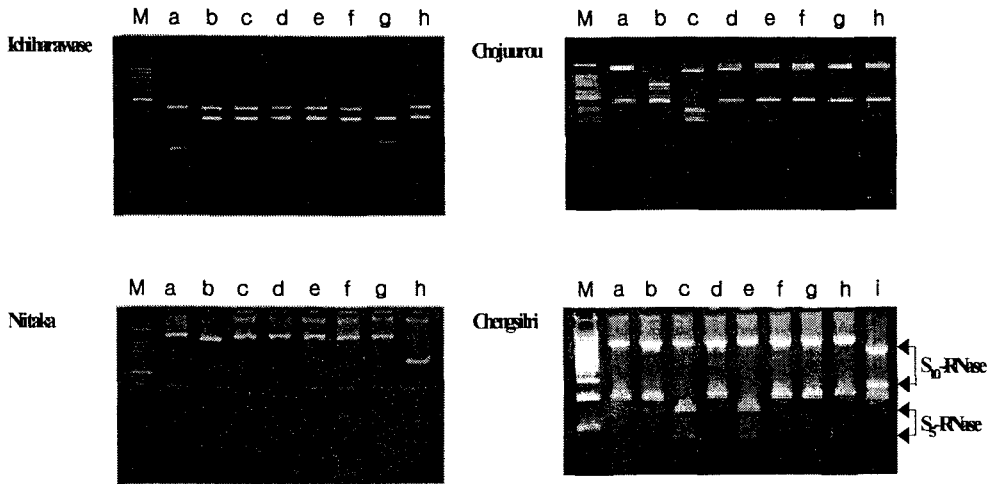


그림 10. 배 4품종을 새로운 YFQFTQ와 anti-^I/T^IWPN^I/v primer를 이용하여 PCR 증폭반응 후 증폭산물을 S-RNase 특이적인 제한효소로 처리하여 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하였다. 제한효소는 *SfcI* (S₁) (a), *XbaI* (S₂) (b), *PpuMI* (S₃ or S₅) (c), *NdeI* (S₄) (d), *AhuNI* (S₅) (e), *MluI* (S₆ or S₇) (f), *NruI* (S₈) (g), *BstBI* (S₉) (h) and *HhaI* (S₁₀) (i) 등을 이용하였다.

4. 고찰

S₁₀-RNase의 염기서열 정보로부터 배 품종의 S₁-RNase에서 S₁₀-RNase 까지 모든 S-RNase를 증폭할 수 있는 새로운 primer를 합성하였으며, S-RNase를 동정하는 방법을 개발할 수 있었다. 이 새로운 primer set를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였으며, 'Chengsilri'로부터 1,726 bp의 새로운 PCR 산물을 얻었다(그림 6). S₁₀-RNase와 다른 9 S-RNases의 exon영역간의 염기서열 상동성은 77.8%에서 84.4%로 높은 상동성을 나타내었다(표 5). 또한 Ishimizu et al., (1999)이 개발한 PCR-RFLP 방법을 사용하여 'Chengsilri'의 S₁₀-RNase를 동정하였다(그림

10). 이 방법은 거의 같은 시스템의 *Brassica oleracea* (Brace et al., 1994), *Pyrus pyrifolia* (Ishimizu et al., 1999) 그리고 *Malus domestica* (Matsumoto 및 Kitahara, 2000)의 자가불화합성 유전자 동정에 사용된 것이다. 이러한 PCR-RFLP 시스템을 더욱 개발하기 위해서는 사과(*Malus domestica*), 일본 배 (*P. pyrifolia*), 중국 배(*P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*, *P. pashia*, *P. hondoensis*, *P. aromatica*), 및 매실(*Prunus mume*) 등에서도 자가불화합성 유전자의 동정을 용이하게 하는 많은 특이적 primer가 개발되어야 할 것이다.

배의 10 S-RNase와 사과의 15 S-RNase, 아몬드 10 S-RNase, Sweet cherry의 6 S-RNase 및 매실의 8 S-RNase의 아미노산 서열을 CLUSTALW의 multiple sequence alignment program에 의해 정렬 후 분석하였다(그림 11). 세 개의 보전영역(C1, C2, C3)과 하나의 hypervariable (HV) 영역이 염기서열내에 포함되어 있었다. 그리고 거의 대부분의 S-RNase는 RNase 활성을 나타내는 1 개의 histidine 잔기와 S-RNase의 특징인 cysteine 잔기 3 개를 보유하고 있지만, 아몬드의 S_d-RNase는 2번째의 cysteine 잔기가 없었으며, 아몬드의 S_f-RNase는 2번째의 cysteine 잔기와 histidine 잔기를 보유하지 않았다.

배의 새로운 S₁₀-RNase는 사과의 S₄, S₂₄, S₂₇, S₂₉, S_f 및 S_g-RNase와 높은 상동성을 나타냈다. 49 S-RNases의 아미노산서열간의 상동성은 약 48%에서 98%으로 배 10 품종간에 77.8%에서 97.6%까지 다양한 상동성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 장미과내의 S-RNase의 분화는 중분화 이전에 발생한 것을 시사할 수 있다. 배우체형 자가불화합성인 5종 작물간의 진화 관계를 이해하기 위해서, 49 S-RNase의 부분적 아미노산 서열을 기초로 CLUSTALW의 Neighbor-joining 방법을 이용해서 phylogenetic tree를 작성하였다(그림 12). CLUSTALW 프로그램의 Cluster 분석은 49개의 S-RNase를 완전하게 두 그룹으로 분리하였다[그룹 I: 배 (*Pyrus pyrifolia*)과 사과(*Malus domestica*), 그룹 II: 아몬드(*Prunus dulcis*), 체리 (*Prunus avium*) 매실(*Prunus mume*)]. 24개의 *Prunus* 속의 S-RNase가 동일 그룹을 이루었으며, 25개의 *Malus* 속과 *Pyrus* 속의 S-RNase들은 또 다른 한 개의 그룹을 이루었다. 이런 trans-species polymorphism은 S-haplotype 다형성이 고대의 기원을 갖고 있으며, 평형선발에 의해 S-allele가 유지되고 있다는 가설이 성립된다.

S1(pear) FTQQYQPAVCNSNPT-PCNDP-TDKLFTVHGLWPSNR-NGPDPEKCKTTA-LNSQKIGNMTAQLEI IWPNV
S2(pear) FTQQYQQAFCNSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSIK-VGRDPEYCKTKR—YRK-IQRLEPQLEI IWPNV
S3(pear) FTQQYQLAVCNSNRT-LCKDP-PDKLFTVHGLWPSNM-VGPDPSKCPITKN—IRKREKLEHQLLEI IWPNV
S4(pear) FTQQYQPAVCNSNPT-PCNDP-TDKLFTVHGLWPSNR-NGPDPEKCKTTT-MNSQKIGNMTAQLEI IWPNV
S5(pear) FTQQYQLAVCNSNRT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSM-AGPDPSNCPITRN—IRKREKLEPQLAI IWPNV
S6(pear) FTQQYQPAVCNSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSND-VGDDPIYCKNKT-IKSQQIGNLTAQLII IWPNV
S7(pear) FTQQYQPAVCNSKPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNL-NGPHENCINAT-VNPHRIKNIQAQLKI IWPNV
S8(pear) FTQQYQPAVCNSNPT-PCKDS-PDKLFTVHGLWPSNS-SGPHFNCTINTT-VKSQTTIRSLKAQLEI IWPNV
S9(pear) FTQQYQPAVCSSNPT-PCRDP-PDKLFTVHGLWPSNV-NGSDPKCKTTI-LNPQTTINLTTQLEI IWPNV
S10(pear) FTQQYQPAACNSNPT-PCNDP-TDKLFTVHGLWPSKV-KGPDHDCCKTKINKSQTIDISLKPQLEI IWPNI
S2(apple) FTQQYQPAACNSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNM-NRSELFNCSSSN-VIYAKIQNIRTQLEMIWPNV
S3(apple) FTQQYQPAVCSSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNV-NGSDPKCKTTI-LNPQTTINLTAQLEI IWPNV
S4(apple) FTQQYQPAACNSNPT-PCKDP-TDKLFTVHGLWPSNK-IGRDEYCKTRN—RRKRAKLEPQLEI IWPNV
S7(apple) FTQQYQLAACNSKPI-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSDS-NGHDFVNCSSKST-VDAQKIGNLTTQLEI IWPNV
S9(apple) FTQQYQPAVCHFNPT-PCRDP-PDKLFTVHGLWPSNS-SGNDPIYCKNIT-MNSTKIANLTARLEI IWPNV
S10(apple) FTQQYQPAVCNSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNV-NGSDPKCKATT-LNPQTTINLKAQLEI IWPNV
S24(apple) FTQQYQPAVCNSNPT-PCKDP-TDKLFTVHGLWPSNS-NGNDEPKYCNAGQ—YQT-MKILEPQLVI IWPNV
S26(apple) FTQQYQPAVCNSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNS-TGRDPKYCNPSN-VTSHMLKNLTAQLEI IWPNV
S27(apple) FTQQYQPAVCNFNPT-PCKDP-TDKLFTVHGLWPSNN-VGGDPESCKITRN—HRTRAKALEPQLEI IWPNV
S29(apple) FTQQYQPAVCNFTAT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNA-KGNDEPGCKTOK—YQK-MQILEPQLEI IWPNV
Se(apple) FTQQYQPAVCNSNPT-PCNDP-PEKLFVHGLWPSNK-NGDPEKCKNIQ-MNSQKIGNMAAQLEI IWPNV
Sf(apple) FTQQYQPAVCNSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNS-NGNDEYCKAPP—YHT-IKMLEPQLVI IWPNV
Sg(apple) FTQQYQPAVCHSNPT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSDS-NGNDEPKYCKAPP—YQT-IKILEHQLAI IWPNV
St(apple) FTQQYQLAVCNSNRT-LCKDP-PDKLFTVHGLWPSM-VGPDPSKCPITKN—IRKREKLEPQLEI IWPNV
Sz(apple) FTHQYQPAVCNSNRT-PCKDP-PDKLFTVHGLWPSNR-NGDPEYCKNIT-LDVTIKIGNLQAQLDI IWPNV
Sa(almond) FVQQWPPITCAVSKQ-PCYQNP-SIFTIHGLWPSNYSKAWANCITRTRFN—SLAPKLEAKLKI SWPDV
Sb(almond) FVQQWPPINCRVRIKRPCSNPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCGSQFNFTKVSFKMRVKLKR SWPDV
Sc(almond) FVQQWPPINCRVIRKRPCSNPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCGTKFDARKVYPEMRSOLKISWPDV
Sd(almond) FVQQWPPITICRLSSK-PSNQHRELPQFTIHGLWQGNYSNPRKPSNCGSQFNFMKVPQLRTKLR SWPDV
Se(almond) FVQQWPPINCRVRTK—CSKPRELQVFTIHGLWPSNYSNPT-PSNCGSKFDDRNVSQLRNKLKR SWPDV
Sf(almond) FVQQWPPITICRESGK-PSNRRPLIFTIRGWPSNYSNPRMRSNCTGSOFFK—ILSPRLRSKLERAWPDV
Sg(almond) FVQQWPPINCRVRIKRPCSKPRELQVFTIHGLWPSNYSNPRIPSNCTGSOFFKQNLVYPLQSVLKR SWPDV
Sh(almond) FVQQWPPINCIIRTK—CSKPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTMPSNCGSFFDARKVYPLRRTKLR SWPDV
Si(almond) FVQQWPPINCRVRIKRPCNPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTKPSKCTGPKFDARKVSPKMRILKISWPDV
Sj(almond) FVQQWPPINCRVRIKRPCSKPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCGSOFDARNLAPQMRITKLR SWPDV
S1(cherry) FVQQWPPINCRVRIKRPCSKPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCGSKVEDRKVYPLRSLKR SWPDV
S2(cherry) FVQQWPPINCRVRIKRPCSNPRELQVFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCGSOFDGRKVSQLRRAKLR SWPDV

S3(cherry) FVQQWPPITTCRVQKK—CSKPRPLQNFTHGLWPSNYSNPTMPSNCGSRFKKELLSPRMQSKLKI SWPNV
S4(cherry) FVQQWPPITNCRVRNK—PCTKPRPLQNFTHGLWPSNYSNPTMPSKCTGSLFNERKVVYPQLRSDLKISWPDV
S5(cherry) FVQQWPPITNCRVRNK—CSNPRPLQYFTTHGLWPSNYSNPKMPSNCTIGSQFNEKSVYVPRLRSLKRI SWPDV
S6(cherry) FVQQWPPITNCRVRNK—CSNPRPLQYFTTHGLWPSNYSNPTMPSNCTIGSQFNR—ILSPQLRSLKLT SWPDV
MSRN-1(mume) FVQQWPPITTCRVGRK—CSNPRPIQIFTTHGLWPSNYSNPTMPSNCTIGSQFKESMVSPLRSLKRSWPNV
MSRN-2(mume) FVQQWPPITNCRVRNK—CSKPRPLQNFTHGLWPSNYSNPTMPSNCGSQFDARKVSPQLRNKLR SWPDV
MSRN-3(mume) FVQQWPPITNCRARRR—PCSKPRPLQNFTHGLWPSNYSNPTMPSNCKGSGFEARKVYPQLRSLKI SWPDV
PMSRN-2(mume) FVQQWPPITTCRFRKK—CFKPRPLQIFTTHGLWPSNYSNPTMPSNCTIG—SEF—KELPPRLRPLKISWPNV
PMSRN-4(mume) FVQQWPPATCIRS NK—PCTKPRPLQIFTTHGLWPSNYSNPTMPSNCRGSLFEITRKLSPQLRSLKRSWPNV
PMSRN-5(mume) FVQQWPPITNCRVRNK—PCSKPRPLQNFTHGLWPSNYSNPTMPSNCGSKYEDRKVYPKLRSLKRSWPDV
PMSRN-6(mume) FVQQWPPITCKLSSRPSK—KHREPLQIFTTHGLWPSNYSNPTMPSNCTIGSKYNDKLYPKLRSLKRSWPNV
PMSRN-7(mume) FVQQWPPITTCRVRRK—PCTKPRPLQIFTTHGLWPSNYSNPTMPSNCGSQFKDKGVYPQLRSLKRSWPDV
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

그림 11. 배, 사과, 아몬드, 체리, 매실 등의 49개의 S-RNase의 아미노산 서열을 비교 분석하였다. 유전자 등록번호는 배: S₁, AB002139; S₂, AB014073 S₃, AB002140; S₄, AB014072; S₅, AB002141; S₆, AB002142; S₇ AB002143. 사과: S₂, U12199; S₃, U12200; S₄, AF327223; S₇, U19792; S₉ U19793; S₁₀, AF239809; S₂₄, AF016920; S₂₆, AF016918; S₂₇, AF016919 S₂₉, AY039702; S_e, AB035273; S_f, D50837; S_g, AB019184; S_t, AB035928 S_z, AB062100. 아몬드: S_a, AB050393; S_b, AB011469; S_c, AB011470; S_d AB011471; S_e, AF177923; S_f, AF157009; S_g, AF177924; S_h, AF267510 S_i, AF267512; S_j, AF267513. 체리: S₁, AB028153; S₂, AB010304; S₃ AB010306; S₄, AB028154; S₅, AJ298314; S₆, AB010305. 매실: MSRN-1 AB047100; MSRN-2, AM047101; MSRN-3, AB047102; PMSRN-2 AF432846; PMSRN-4, AF432848; PMSRN-5, AF432849; PMSRN-6 AF432852; PMSRN-7, AF432850 등이다.

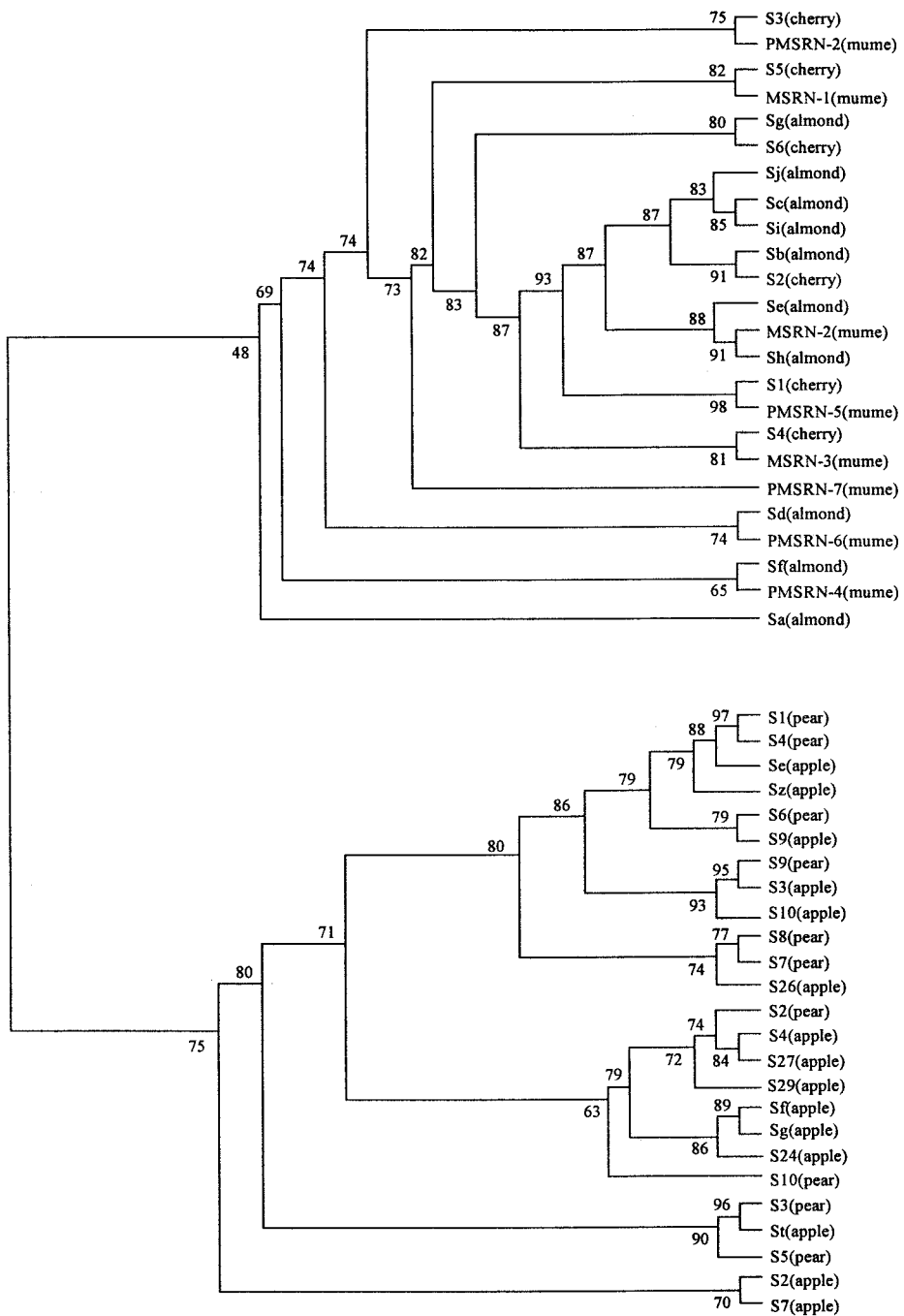


그림 12. CLUSTALW 프로그램을 이용하여 49 S-RNase의 Neighbor-joining phylogenetic tree를 작성하였다. 상관관계는 퍼센트로 나타내었음.

여 백

제 4 절 PCR-RFLP법에 의한 자가화합성 계통 선발

1. 서론

배는 자가불화합성 과수이며, 과실을 맺기 위해 인공교배가 요구된다. 거의 대부분의 재배 배 품종은 자가불화합성 시스템에 의해 생산된 종자를 이용한 F1 잡종이다. 또한 배 품종은 배우체형 자가불화합성(GSI)으로 GSI는 개화식물에서 보편적으로 유전된 재생산 현상으로 유전적인 관계에 의해 주두측에서 화분을 거절하여 자가수정을 억제하는 것으로 배 품종은 10개($S_1 \sim S_{10}$ -allele)의 단일 S-locus에 의해 조절된다(Kikuchi, 1929). 주두의 S-locus 산물은 ribonuclease (RNase)의 활성을 갖는 glycoprotein으로 S-RNase라고 한다(Sassa et al., 1992). 배우체형 자가불화합성은 화주내에서 거절반응이 일어나며, S-allele간에는 공우성 관계를 나타내는 특징을 가지고 있다. 그러므로 육성계통에서 S-allele의 동정은 안정된 자가불화합성을 가진 어버이 계통의 선발효율의 증가를 위해 요구되며, 교배와 육종을 위해 중요한 요인이다.

Rosaceae, Solanaceae 및 Scrophulariaceae의 배우체형 자가불화합성 체계에서 S-RNase는 주두를 통과하는 자신의 화분관 신장을 막는 것으로 알려졌다(Kao and McCubbin, 1996). 일본 배(*Pyrus serotina*)와 사과(*Malus domestica*) S-RNases의 cDNA가 cloning되었으며(Norioka et al., 1996; Mastumoto et al., 1999; 2000), S-RNase의 상세한 특징이 분석되었다(Broothaerts et al., 1995).

'Nijisseiki'의 자가화합성 변이품종인 'Osanijisseiki'는 S_4 -RNase의 5'말단과 3'말단의 primer를 이용한 Long PCR 증폭결과 S_4 -RNase 유전자의 4.7 kbp가 결실된 사실을 알아냈으며, S_2 -와 S_4 -RNase를 증폭하는 primer를 이용하여 PCR 증폭결과 'Osanijisseiki'는 S_4 -RNase의 PCR 산물이 증폭되지 않았다(Sassa et al., 1996). 일본 배와 사과 품종은 PCR-RFLP에 의하여 자가불화합성 유전자형이 결정되었다(Janssens et al., 1995; Ishimizu et al., 1999; Kim et al., 2002a, b). 주두에서 S-RNase 유전자는 명확하게 발견되었으며, 일본 배 품종으로부터 7개의 S-RNase($S_1 \sim S_7$)가 cloning되었다(Norioka et al., 1996; Ishimizu et al., 1998). 최근, 일본 배 품종 'Ichiharawase'에서 새로운 S_8 -RNase와 'Shinkou'에서 S_9 -RNase가 각각 동정되었다(Castillo et al., 2001; Sawamura et al., 2002).

본 연구는 S-RNase 관련 primer를 합성하여 PCR 증폭 후 증폭된 단편을 cloning하였고 염기서열을 분석하였으며, S-allele 특이적인 제한효소를 이용하여 PCR 산물의 PCR-RFLP 분석을 수행하였다. 그리고 PCR-RFLP 체계를 이용하여 자가불화합성 품종 'Niitaka' (S₃S₉), 'Whasan' (S₃S₅), 'Chuwangbae' (S₄S₆)와 자가화합성 품종인 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm)의 사이의 자식으로부터 자가화합계통을 선발하였다.

2. 연구재료 및 방법

1) 재료 및 DNA 추출

자가불화합성 품종 'Niitaka' (S₃S₉), 'Whasan' (S₃S₅), 'Chuwangbae' (S₄S₆)와 자가화합성 품종 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm) 사이의 자식으로부터 16개의 국내육성 배계통을 수집하여 본 연구재료로 사용하였다(표 6). 그리고 각 계통의 S-phenotype은 aniline blue 염색 후 형광현미경을 통하여 화분관 행동 관찰과 결실성에 의하여 결정되었다. 후대 계통들은 원예연구소로부터 분양된 것이다. 식물재료의 잎을 액체질소에 넣어 얼린 후 -80℃에 보관하였다. Genomic DNA는 CTAB 방법을 응용하며 어린잎에서 추출하였으며, DNA PrepMate™ 핵산 정제 kit(Bioneer, USA)를 이용하여 정제시켰다. 정제 후 RNase 넣고 37℃에서 1 hr 동안 처리하였다. DNA 정량은 겔 전기영동법과 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 정제된 DNA는 -20℃에 보관하였다.

2) PCR 분석

Oligonucleotide primer는 S-RNase 염기서열 정보를 이용하여 합성하였다 (Ishimizu et al, 1999, Kim et al, 2002a). PCR 증폭 primer는 PF (5'-TAT TTT CAA TTT ACG CAG CAA-3)와 anti-PR4 (5'-C(A/G)T TCG GCC AA ATA ATT-3)이다. PCR 증폭은 미국 Perkin-Elmer사의 PE-9700 시스템을 이용하여 수행하였으며, 기본적인 반응 혼합물은 2.5 U Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan), 10x 반응액, 2.5 mM dNTP 혼합물로 구성되었다. PCR 증폭반응은 pre-denature (94℃, 5분) 1 cycle, amplification (94℃, 1분; 52℃, 2분; 72℃, 3분) 30 cycle, post-extension (72℃, 5분) 1 cycle로 수행하였다. 또한 증폭된 PCR 산물을 1% 아가로스겔에 전기영동 후 UV transilluminator상에서 검출하였다.

표 6. 자가불화합성 품종과 자가화합성 품종의 후대 16계통의 S-phenotype

Acc. No.	Strain	Parents	S-phenotype ²	Origin
1	90-11-46	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SC	NHRI
2	91-13-57	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SC	NHRI
3	93-7-45	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SI	NHRI
4	93-9-9	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SC	NHRI
5	93-9-56	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SI	NHRI
6	93-10-47	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SI	NHRI
7	93-10-56	Niitaka(S ₃ S ₉) × Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm)	SC	NHRI
8	95-3-84	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Whasan(S ₃ S ₅)	SC	NHRI
9	95-4-35	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Whasan(S ₃ S ₅)	SI	NHRI
10	95-4-46	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Whasan(S ₃ S ₅)	SC	NHRI
11	95-3-67	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Chuwhangbae(S ₄ S ₆)	SC	NHRI
12	95-3-71	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Chuwhangbae(S ₄ S ₆)	SC	NHRI
13	95-3-72	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Chuwhangbae(S ₄ S ₆)	SI	NHRI
14	95-3-73	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Chuwhangbae(S ₄ S ₆)	SI	NHRI
15	95-3-75	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Chuwhangbae(S ₄ S ₆)	SI	NHRI
16	95-3-76	Osanijisseiki(S ₂ S ₄ sm) × Chuwhangbae(S ₄ S ₆)	SI	NHRI

²S-phenotypes were determined by aniline blue staining method and fruit setting, SC: Self-compatibility, SI: Self-incompatibility.

³NHRI: National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration in Korea.

3) PCR 산물의 클로닝과 염기서열 분석

각 PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)를 사용하여 클로닝하였으며, 염기서열 결정은 PRISM™ 377(Perkin-Elmer, USA)을 사용하여 수행하였다. PCR 산물의 염기서열은 MacDNAsis (Hitachi software, Calif, USA)와 BLASTN 프로그램(NCBI)을 이용하여 결정 및 분석하였다.

4) 제한효소에 의한 PCR 단편의 소화

증폭된 PCR 산물은 제한효소 *Xba*I (S₂), *Eco*0109I (S₃와 S₅), *Nde*I (S₄), *Alw*NI (S₅), *Hin*CII (S₆) 및 *Bst*BI (S₉)에 의해 소화되었다. 반응 혼합물은 37~65 °C에서 6 hr 동안 처리하였으며, 2% Metaphor 아가로스 겔(BMA, USA)에 전기영동하여 분리된 RFLP 패턴은 ethidium bromide로 염색하여 조사하였다.

3. 연구결과

가. 자가화합계통 선발법 개발

1) PCR-RFLP에 의한 자가화합성 계통 선발법 개발

배(*Pyrus pyrifolia* Nakai) 품종은 배우체형 자가불화합성을 나타내고 있으며, 배의 육종은 많은 노동력과 시간이 요구되는 인공수분에 의존하고 있다. 하지만 'Nijisseiki'(S₂S₄) 변이종인 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm; sm= stylar-part mutant)을 부친으로 이용하면 충실한 과실과 자가화합성 품종을 육종할 수 있다. 그러나 전통적 방법인 교배 육종으로는 'Osanijisseiki'의 후대 계통들의 자가화합성을 결정하는데 6년 정도 걸린다. S-allele는 멘델의 법칙에 의해 유전되며, 'Osanijisseiki'가 부친인 경우 자가불화합성 자식(S₄sm-allele를 포함하고 있지 않음)과 자가화합성 자식(S₄sm-allele를 포함함)은 1 : 1비율로 분리된다(그림 13).

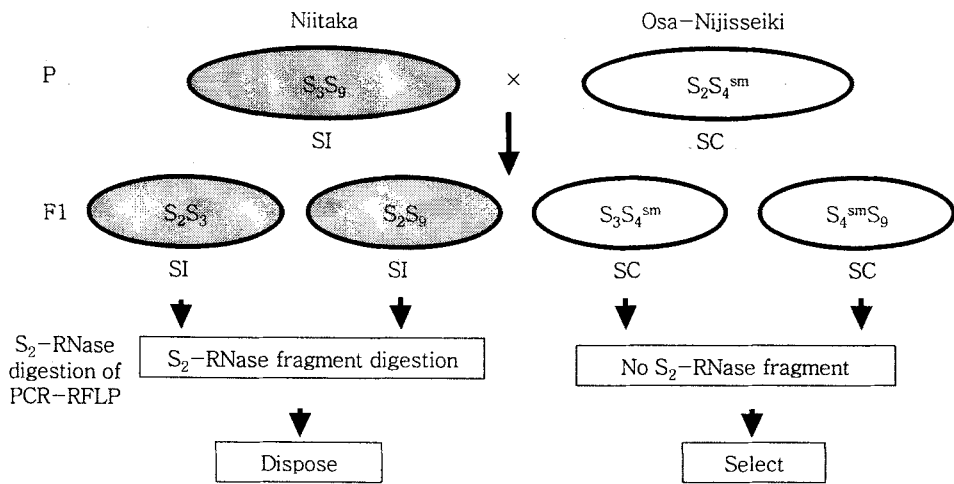


그림 13. PCR-RFLP 방법에 의해 자가불화합성 품종 'Niitaka'(S₃S₉)와 자가화합성 품종 'Osaniijisseiki' (S₂S₄sm)의 F1 계통으로부터 자가화합성 계통을 선발하는 모식도.

나. 자가불화합성 유전자의 염기서열 분석 및 제한효소 선발

1) 자가 불화합성 유전자의 염기서열 결정

최근 본 연구진은 일본 배와 국내 육성 배 품종에서 S-RNase의 염기서열을 결정하였으며, 배의 S-RNase가 두 개의 보존영역인 exon과 하나의 변이 영역인 intron로 구성된 것을 밝혔다(Kim et al., 2002a, b). PCR 증폭은 9개의 배 S-RNase 염기서열을 기초로 하여 각각의 exon 영역에서 S-RNase 특이적 primer PF (FTQQYQ)와 anti-PR((I/T)IWPNV)의 조합을 이용하여 수행되어졌다. 증폭된 PCR 단편들은 pGEM T Easy 벡터에 의해 cloning하였다. S₁-RNase~S₉-RNase 간의 부분적인 염기서열과 아미노산 서열을 비교 분석하였다(그림 14). 9개의 S-RNase 아미노산 서열간에는 세 개의 상동성이 높은 영역(C1, C2, C3)과 하나의 변이가 큰 영역(HV)이 존재하였다. 아미노산 서열의 비교결과 3개의 cysteine 잔기와 1개의 histidine 잔기가 보전되어 있었다. 그리고 각각의 S-RNase의 intron 크기는 S₂= 1,153 bp, S₃= 179 bp, S₄= 168 bp, S₅= 179 bp, S₆= 147 bp, S₉= 1,115 bp 이었다.

표 7. F1 계통으로부터 자가화합성 계통을 선발하는데 사용되는 S-RNase 특이적인 제한효소 및 절단 위치(bp)

S-allele	PCR-fragment size	intron size	<i>Xba</i> I	<i>PpuM</i> I	<i>Nde</i> I	<i>AluN</i> I	<i>HinC</i> II	<i>BstB</i> I
S ₂	1,355	1,153	654 and 701	1,355	1,355	1,355	1,355	1,355
S ₃	384	179	384	118 and 266	384	384	384	384
S ₄	376	168	376	376	236 and 140	376	376	376
S ₅	384	179	384	118 and 266	384	121 and 263	384	384
S ₆	355	147	355	355	355	355	222 and 133	355
S ₉	1,323	1,115	1,323	1,323	1,323	1,323	1,323	653 and 680

다. PCR-RFLP 체계에 의한 자가화합성 계통 선발

사용된 모든 품종과 계통은 이형접합체로서 S₄sm-allele를 포함한 계통을 제외하고, S-heterozygote는 두 종류의 S-allele가 검출될 것이다. Universal primer PF와 anti-PR를 이용하여 PCR 증폭반응 후 1% 아가로스겔에 전기영동하였다(그림 15). 아가로스겔에서, S₂⁻와 S₉⁻allele의 PCR 산물은 약 1,350 bp 크기에서 검출되었으나 다른 S-allele들은 380 bp 크기에서 검출되었다. 16 계통의 PCR 증폭 결과, 7 계통에서 1,350 bp와 380 bp의 단편이 모두 증폭되었으며, 증폭된 PCR 산물은 S₂⁻, S₃⁻, S₄⁻, S₅⁻, S₆⁻ 및 S₉⁻allele가 검출되었다. 나머지 9 계통은 한 개의 PCR 단편만이 증폭되었다. 그런데, 증폭된 한 개의 PCR 단편은 크기가 비슷한 두 개의 S-RNase의 증폭 산물이거나, S₄sm-allele의 S-RNase 유전자가 결실되어 PCR 증폭에서 검출되지 않고 다른 하나의 S-RNase만이 증폭된 경우였다.

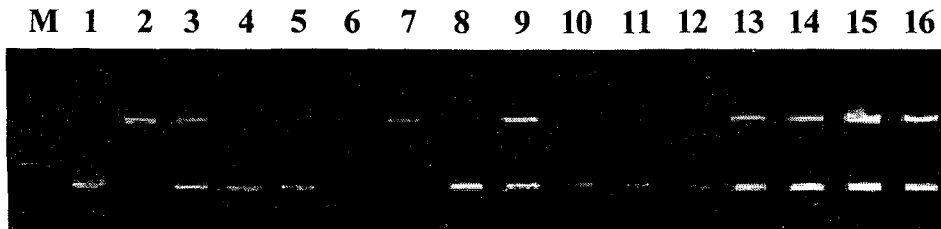


그림 15. 자가불화합성 유전자를 증폭하는 PF+PR primer를 이용하여 자가불화합성 품종 'Niitaka' (S₃S₉), 'Whasan' (S₃S₅), 'Chuwangbae' (S₄S₆)와 자가화합성 품종 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm)의 후대 계통을 PCR증폭 후 S-RNase 산물을 전기영동한 것이다. 자가화합성 유전자인 S₄sm-RNase 산물은 PF+PR primer에 의해 340 bp 산물이 증폭되지 않는다.

증폭된 PCR 단편들은 각각의 S-allele 특이적 제한효소에 의해 소화하였다 (그림 16~21). 93-7-45, 93-9-56는 S₂-RNase와 S₃-RNase의 제한효소에 의해 소화되어 자가불화합성 계통으로 결정되었으며, 자가불화합성 유전자형은 S₂S₃로 결정되었다(그림 16).

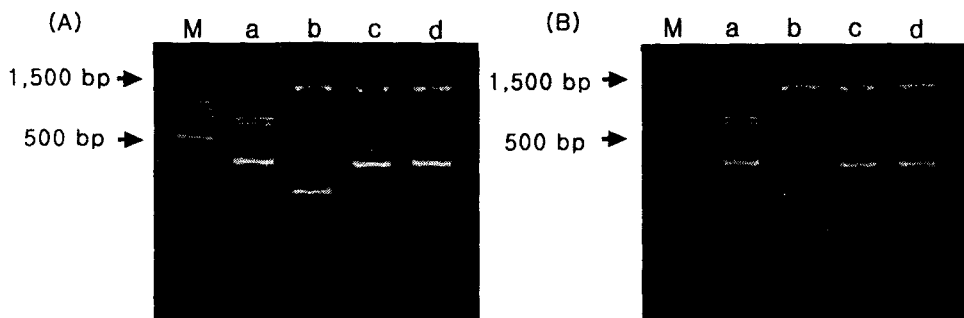


그림 16. (A) 93-7-45, (B) 93-9-6-56 계통의 PCR 산물을 S-RNase 특이적인 제한효소로 처리 후 분획된 단편의 패턴을 나타낸 것이다. 제한효소는 a: *Xba* I (S₂-specific), b: *Eco0109* I (S₃ or S₅-specific), c: *Nde* I (S₄-specific), d: *BstB* I (S₉-specific)을 사용하였다.

그리고 91-13-57, 93-10-56는 S₉-RNase의 제한효소에서만 소화되어 자가화합성 계통으로 결정되었으며, 자가불화합성 유전자형은 S₄smS₉으로 동정되었다. 93-10-47은 S₂-RNase와 S₉-RNase의 제한효소에 의해 소화되어 자가불화합성 계통으로 결정되었으며, 자가불화합성 유전자형은 S₂S₉으로 동정되었다(그림 17).

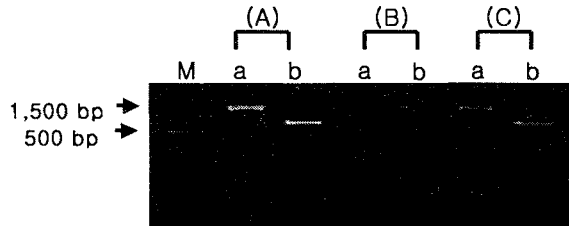


그림 17. (A) 91-13-57, (B) 93-10-47, (C) 93-10-56 계통의 PCR 산물을 S₂, S₉-RNase 특이적인 제한효소로 처리 후 분획된 단편의 패턴을 나타낸 것이다. 제한효소는 a: *Xba* I (S₂-specific), b: *BstB* I (S₉-specific)을 사용하였다.

S₅-RNase의 제한효소에 의해 소화되지 않고, 단지 S₃-RNase의 제한효소에 의해 소화된 두 계통(90-11-46, 93-9-9)을 자가화합성 계통으로 결정하였으며, 자가불화합성 유전자형은 S₃S₄sm으로 동정되었다(그림 18).

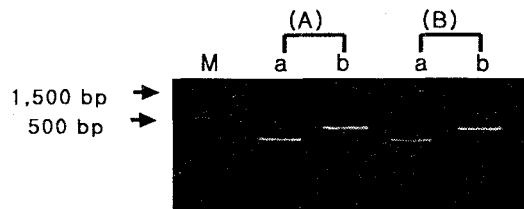


그림 18. (A) 90-11-46, (B) 93-9-9 계통의 PCR 산물을 S-RNase 특이적인 제한효소로 처리 후 분획된 단편의 패턴을 나타낸 것이다. 제한효소는 a: *Eco0109* I (S₃ or S₅-specific), b: *Nde* I (S₄-specific)을 사용하였다.

또한, 3 계통(95-3-84, 95-4-35, 95-4-46)은 S₂-, S₃-, S₄-, S₅-RNase 등의 제한효소에 의해 소화되었다(그림 19). 2 계통(95-3-84, 95-4-46)은 S₂-RNase의 PCR 산물이 증폭되지 않고, S₅-RNase의 제한효소에 의해서만 소화되었다. 그래

서 2 계통은 자가불화합성 유전자형이 $S_4^{sm}S_5$ 인 자가화합성 계통이었다. 그러나 95-4-35는 S_2^- 와 S_5^- -RNase의 제한효소에 의해 소화되었으며, 자가불화합성 유전자형이 S_2S_5 인 자가불화합성 계통으로 결정되었다.

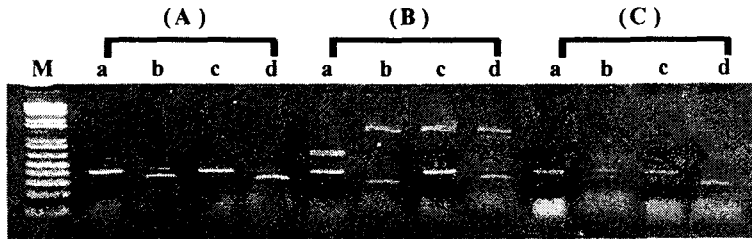


그림 19. (A) 95-3-84, (B) 95-4-35, (C) 95-4-46 계통의 PCR 산물을 S-RNase 특이적 제한효소로 처리 후 분획된 단편의 패턴을 나타낸 것이다. 제한효소는 a: *Xba*I (S_2 -specific), b: *Eco*O109I (S_3^- or S_5^- -specific), c: *Nde*I (S_4^- -specific) d: *Alu*NI (S_5^- -specific)을 사용하였다.

그림 20과 그림 21는 S_2^- , S_4^- , S_6^- -RNase의 제한효소를 처리한 것으로, 그림 20의 2 계통(95-3-67, 95-3-71)은 S_2^- -RNase PCR 산물이 증폭되지 않고, 그림 21의 4 계통(95-3-72, 95-3-73, 95-3-75, 95-3-76)에서는 S_2^- -RNase PCR 산물이 증폭되었다. 그리고 그림 20의 각각 두 계통은 S_4 또는 S_6^- -RNase의 제한효소에 의해 소화되었으며, 자가화합성 계통으로 결정되었으며, 자가불화합성 유전자형은 $S_4^{sm}S_4$ (95-3-67)과 $S_4^{sm}S_6$ (95-3-71)으로서 확인되었다. 그림 21에서 4 계통은 S_2^- 와 S_6^- -RNase의 제한효소에 의해 소화되어 자가불화합성 유전자형이 S_2S_6 인 자가불화합성 계통으로 결정되었다.

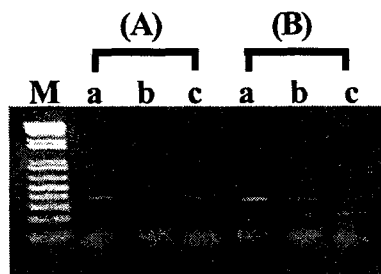


그림 20. (A) 95-3-67, (B) 95-3-71 계통의 PCR 산물을 S-RNase 특이적인 제한효소로 처리 후 분획된 단편의 패턴을 나타낸 것이다. 제한효소는 a: *Xba*I (S_2 -specific), b: *Nde*I (S_4 -specific) c: *Hin*CI (S_6 -specific)을 사용하였다.

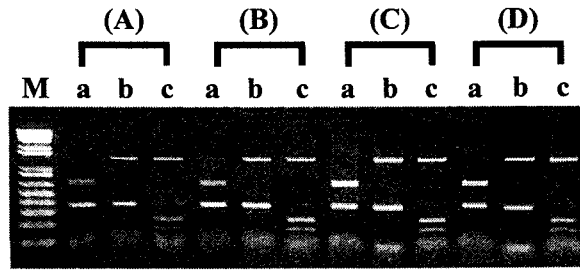


그림 21. (A) 95-3-72, (B) 95-3-73, (C) 95-3-75, (D) 95-3-76 계통의 PCR 산물을 S-RNase 특이적인 제한효소로 처리 후 분획된 단편의 패턴을 나타낸 것이다. 제한효소는 a: *Xba*I (S_2 -specific), b: *Nde*I (S_4 -specific), c: *Hin*CII (S_6 -specific)을 사용하였다.

본 연구에서는 자가불화합성 품종과 자가화합성 품종사이의 자식의 자가불화합성 유전자형을 결정하였으며, PCR-RFLP법에 의해 S_4^{sm} -allele를 가진 자가화합성 계통을 선발하였다. 이런 PCR-RFLP 시스템을 이용하여 8개의 자가불화합성 계통의 자가불화합성 유전자형을 결정하였으며, 8개의 자가화합성 계통을 선발하였다. 그 결과를 표 8에 나타냈다.

표 8. PCR-RFLP 방법에 의해 자가불화합성 품종 'Niitaka' (S₃S₉)¹, 'Whasan' (S₃S₅), 'Chuwangbae' (S₄S₆)와 자가화합성 품종 'Osanijisseiki' (S₂S₄sm)의 후대 계통의 자가불화합성 유전자형을 결정하였으며, 자가화합성 계통을 선발함.

Acc. No.	Strain	<i>Xba</i> I	<i>Ppu</i> MI	<i>Nde</i> I	<i>Alu</i> NI	<i>Hin</i> CII	<i>Bst</i> BI	S- genotype	S- phenotype
1	90-11-46	-	+ ²	-	-	-	-	S ₃ S ₄ sm	SC ^y
2	91-13-57	-	-	-	-	-	+	S ₄ sm S ₉	SC
3	93-7-45	+	+	-	-	-	-	S ₂ S ₃	SI ^x
4	93-9-9	-	+	-	-	-	-	S ₃ S ₄ sm	SC
5	93-9-56	+	+	-	-	-	-	S ₂ S ₃	SI
6	93-10-47	+	-	-	-	-	+	S ₂ S ₉	SI
7	93-10-56	-	-	-	-	-	+	S ₄ sm S ₉	SC
8	95-3-84	-	+	-	+	-	-	S ₄ sm S ₅	SC
9	95-4-35	+	+	-	+	-	-	S ₂ S ₅	SI
10	95-4-46	-	+	-	+	-	-	S ₄ sm S ₅	SC
11	95-3-67	-	-	+	-	-	-	S ₄ sm S ₄	SC
12	95-3-71	-	-	-	-	+	-	S ₄ sm S ₆	SC
13	95-3-72	+	-	-	-	+	-	S ₂ S ₆	SI
14	95-3-73	+	-	-	-	+	-	S ₂ S ₆	SI
15	95-3-75	+	-	-	-	+	-	S ₂ S ₆	SI
16	95-3-76	+	-	-	-	+	-	S ₂ S ₆	SI

¹F1 계통의 PCR 단편이 제한효소에 의해 소화되었을 때 +로 표시하였다.

^ySC : 자가화합성, ^xSI : 자가불화합성.

4. 고찰

배는 자가불화합성을 가진 식물이며 결실하기 위해 최근 인공교배가 많이 늘어나고 있다. 배우체형 자가불화합성인 배는 복대립 유전자계에 의해 조절되며 (Kikuchi, 1929), 10개의 S-allele를 가지고 있다. 교배시 수분수와 자가불화합성 유전자형이 전혀 다를 경우는 100%가 결실이 이루어지지만, 한쪽이유전자 타입이

같은 경우에는 50%로 결실율이 감소하게되며, 전부 같은 경우에는 전혀 결실이 되지 않는다. 그리고 인공교배는 화분을 화분은행에서 사서 사용하므로 경제적 부담을 주며, 많은 노동력과 시간등이 소요된다. 이런 문제점을 해결하기 위해 우수한 과실을 맺는 자가화합성 품종을 이용한다면 보다 수분효율을 증가할 수 있고, 인공교배에 의한 부담 등을 해소할 수 있다. 배의 우수한 형질을 갖는 자가화합성 품종을 육종하기 위해 최근 배 품종에서는 'Nijisseiki' (S_2S_4)의 자가화합성 변이품종인 'Osanijisseiki' ($S_2S_4^{sm}$)과 'Akibae' ($S_4^{sm}S_5$)를 이용하고 있다(Morimoto et al., 2001). 'Osanijisseiki' ($S_2S_4^{sm}$)는 S_4 -RNase의 5'말단과 3'말단의 primer를 이용한 Long PCR에 의해 증폭된 S-RNase산물 중 S_4 -RNase 유전자 4.7 kbp가 결실된 사실을 알아냈으며, S_2 -와 S_4 -RNase를 증폭하는 primer를 이용한 PCR에서 S_4 -RNase 산물이 증폭되지 않았다(Sassa et al., 1996). 본 연구에서는 PCR-RFLP 방법에 의해 배의 자가화합성 품종 'Osanijisseiki' ($S_2S_4^{sm}$ sm; 주두측 돌연변이체)와 자가불화합성 품종간의 교잡종으로부터 S_4^- , S_5^- , S_6^- 및 S_9 -RNase 단편만 증폭되는 8개의 자가화합성 계통을 선발하였다. 하지만 자가화합성 계통을 결정하는데 교배 육종과 같은 전통적인 방법에 의해서는 6년 또는 그이상의 시간이 소요된다. 그러나, 이번 연구에 의해 보다 빠른 육종단계에서 자가화합 품종의 자식으로부터 자가화합성 계통을 선발하기 위한 필요한 노동력을 감소시키며, 기간을 단축할 수 있는 PCR-RFLP 시스템을 개발하였다. 사과품종에서는 'Ralls Janet'과 'Jonathan'에 교배에 의해 유전적 돌연변이가 아닌 자가화합성 품종인 'Megumi'가 생산되었다(Saito et al., 1978; Ishiyama et al., 1995). 'Megumi'의 자가화합성 유전자형은 S_2S_9 로 동정되었으며, 24~88.6%로 높은 자가결실성을 가지고 있었다(Matsumoto et al., 1999). 그리고 Prunus 속인 아몬드와 매실에서도 자가화합성을 유전자(S_f)를 가진 아몬드: 'Genco' (S_1S_f)와 'Tuono' (S_1S_f), 매실: 'Benisashi' (S_7S_f)와 'Shinpeidayu' (S_3S_f) 품종을 교배하여 자가화합성 (S_1S_f , S_3S_f , S_7S_f , S_fS_f) 계통이 생산되었다(Ortega E. and F. Dicenta, 2003; Tao et al., 2002). 생산된 자가화합성 계통의 선발에는 본 연구에서 사용한 PCR-RFLP 방법을 이용한다면 보다 쉽고 빠르게 선발할 수 있을 것이다. 그리고 자두, 살구, 복숭아 등의 자가화합계통을 선발하는데 적용이 가능하다.

여 백

제 5 절 S-RNase 염기서열과 PCR-RFLP 분석에 의한 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 결정

1. 서론

모든 사과 품종은 자가수분 후 수정이 억제되는 자가불화합성 기구를 갖고 있다(de Nettancourt, 2001). 사과와 많은 다른 종에서 작용하는 자가불화합성 현상은 S 유전자좌에 복대립 유전자가 존재하는 것으로 알려졌다(S-gene), 이것은 주두측에서 발현하는 ribonucleases의 일종으로 알려졌다. 자성측 자가불화합성 유전자인 S-RNase는 동일한 S 유전자좌에 존재하는 아직 밝혀지지 않는 옹성측 유전자와 상호작용하며, 자가 화분관의 RNA를 분해함으로써 자식을 방어하는 것으로 알려졌다(Golz et al., 2001). S 유전자좌의 복대립 유전자 산물간의 인식은 주두측에서 화분관 신장이 계속 진행될 것인지 멈추게 될 것인지를 결정한다. 배우체형 자가불화합성 체계는 유전학적으로 품종의 S-allele 구성에 의해 타가수분 현상을 유도한다. 이것은 과수원의 조성상 매우 중요하다(Schneider et al., 2001). 또한 결실을 하지 않는 교배를 피하고 정확한 육종계획을 선정하는 것도 중요하다. 품종간에 교배화합성 정도를 표현형적으로 평가하는 것은 매우 어렵다. 왜냐하면 수분 검정은 환경과 생리적인 요인에 의해 변화가 있기 때문이다. 주두측을 통과하는 화분관 신장을 형광현미경으로 분석하는 방법을 이용하여 Kobel 그룹의 연구진(1939)은 사과에서 11개의 S-allele($S_1 \sim S_{11}$)를 식별하였으며, 14개의 2배체와 12개의 3배체 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다. 그런데, 3배체 품종을 포함한 5개의 자가불화합성 유전자형은 S_x 또는 S_y 의 특이적인 S-allele가 존재하여 부분적인 실험밖에 할 수 없었다. 최근에 Komori et al., (2000)는 주요 일본 재배 사과 품종사이의 불화합성 관계를 조사하여, 10개의 S-allele($S_a \sim S_i$ 와 S_z)를 동정하였으며 4개의 S-allele는 Kobel 그룹이 동정한 것과 일치한 것으로 발표하였다. IEF와 2D-PAGE 분석법에 의해 이미 $S_a \sim S_f$ 의 S-allele의 산물이 동정되었다(Sassa et al., 1994, 1996). 또한 Sassa 등이 동정한 S_e -allele와 Komori등이 동정한 S_c -allele(Komori et al., 2000)는 서로 다른 것이었다. 또한 RNase 활성을 염색하는 IEF와 NEPHGE 방법을 사용하여 Boskovic과 Tobutt(1999)는 $S_1 \sim S_{11}$ 의 유전자 산물을 확인했다.

거의 대부분의 새로운 S-allele는 단일 품종에서 나타났으며, IEF와 NEPHGE 분석법을 이용하여 그 차이를 구별하였다. Van Nerum et al., (2001)은 염기서열 정보를 이용하여 사과 품종에서 S₂₂ (Alkmene), S₂₃ (DelbardJubile)와 S₂₅ (Merlijn)가 동일하다는 것을 밝혔으며, 또한 이것은 이미 Verdoodt et al., (1998)가 동정한 S_{27b}-allele와 일치하였다. 게다가 'Telamon'에서 추정된 S₂₅-allele는 S₁₀-allele의 염기서열과 일치하였으며, 동일한 연구에 의해 'Japanese' S_g (Matsumoto et al., 1999) 유전자가 Boskovic와 Tobutt(1999)의 S₂₀ 유전자와 일치한다는 것을 밝혀냈다. Kobel's의 S₁~S₁₁유전자(S₆, S₈, S₁₁을 제외함)는 여러 연구 그룹(S₂, S₃: Broothaerts et al., 1995; S₅, S₇, S₉: Janssens et al., 1995; S₁, S₉: Sassa et al., 1996; S₄, S₁₀: Van Nerum et al., 2001; S₁₀: Kitahara와 Matsumoto 2002)에 의해 cloning되어 염기서열이 결정되었다. 기존의 11개 S-allele 이외의 추가적으로 S-allele가 보고되었다(Verdoodt et al., 1998: S₂₄, S₂₆, S_{27a}; Matsumoto, 1999, Matsumoto와 Kitahara, 2000: S_g, S_e; Van Nerum et al., 2001: S_{27b}; Schneider et al., 2001: S₂₈, "S₁₀" 그러나 진짜 S₁₀과 다름). S_e 유전자의 염기서열은 Schneider et al., (2001)이 cloning한 S₂₈과 동일하였으며, 또한 GenBank에 S₃₀과 S-RNase I라고 등록되었다(AF201748과 AB017636).

본 연구진은 최근 몇 년 동안의 연구되어진 자가불화합성 유전자형 결정을 새롭게 정립하였다. 먼저 Kobel이 관측한 표현형과 Boskovic와 Tobutt(1999)가 검출한 S-RNase 밴드로 알려진 S-allele coding 영역의 염기서열간의 상관관계를 분석하였으며, S-RNase 유전자 산물들의 염기서열을 분석하여 S-allele의 번호를 다시 정립하였다. 그리고 16개의 S-RNase 아미노산 서열을 비교 분석하여 universal S-RNase 프라이머를 합성하여 자가불화합성 유전자를 증폭하였으며, 증폭된 단편들을 cloning하여 intron 정보를 알아냈다. 또한 국내 육성 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 PCR 및 염기서열 분석을 통하여 결정하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 실험재료 수집

사과 품종은 원예연구소 및 대구 사과연구소에서 자가불화합성 유전자형이 결정된 국외 16품종과 자가불화합성 유전자형이 결정되지 않은 국외 25품종, 국내 육성 7품종을 수집하였다(표 9, 10).

표 9. 국외 육성 사과품종

Acc No.	Cultivar	Parents	S-genotype
1	Ontario	-	S ₁ S ₈
2	Ralls Janet	-	S ₂ S ₃
3	Elstar	-	S ₃ S ₅
4	Tsugaru	Golden Delicious(S ₂ S ₃)×Jonathan(S ₇ S ₉)	S ₃ S ₇
5	Wellington	-	S ₈ S ₉
6	Granysmith	-	S ₃ S ₁₀
7	Fuji	Ralls Janet(國光)×Delicious(S ₉)	S ₉ S _f
8	American summer pearmain(祝)	-	S _f S _g
9	Jonadel	Jonathan×Delicious	S ₉ S _e
10	Gala	-	S ₂ S ₅
11	Greensleeves	James Grieve×Golden Delicious	S ₂ S ₅
12	Megumi	Ralls Janet(國光)×Jonathan(S ₇ S ₉)	S ₂ S ₉
13	Akagi	Golden Delicious(S ₂ S ₃)×?	S ₃ S ₇
14	Sekaiichi(世界一)	Delicious(S ₉)×Golden Delicious(S ₂ S ₃)	S ₃ S ₉
15	Jonagold		S ₂ S ₃ S ₉
16	Mutsu(陸奥)	Golden Delicious(S ₂ S ₃)×Indo(S ₇ S _g)	S ₂ S ₃ S _g
17	Ambicious	-	
18	Akane	Jonathan×Worcester Pearmain	Japan
19	Aori No.3	-	
20	Chesapeak apple	-	
21	Goro		
22	Hanaiwai		
23	Hourei		
24	Kagayaki		
25	Koutokn		
26	Macoun		
27	Molle's Delicious	-	
28	Mujon		
29	Patricia		
30	Puritan		
31	Red Queen		
32	Russian		
33	Starkrimson		
34	Starking		
35	Staymared		
36	Suntan	Cox's Orange Pippin×Court Pendu Plat	England
37	Sunlight(38)		
38	Super Early Blaze		
39	Super Golden Delicious		
40	Summer champion		
41	Wickson		

표 10. 국내 육성 사과 품종

Acc. No.	Cultivar	Parents	S-genotype
1	Hongro	Spur Early Blaze×Spur Golden Delicious	S ₇ S _N
2	Kamhong	Spur Early Blaze×Spur Golden Delicious	S ₉ S _N
3	Saenara	Spur Early Blaze×Spur Golden Delicious	S ₇ S _N
4	Chukwang	Fuji(S ₉ S _f)×Molle's Delicious	S ₇ S _?
5	Hwahong	Fuji(S ₉ S _f)×Sekaiichi(S ₃ S ₉)	S ₃ S _?
6	Seokwang	Molle's Delicious×Gala(S ₂ S ₅)	S ₇ S _?
7	Hwarang	Fuji 아조변이	S ₇ S _?

나. Total RNA 추출 및 RT-PCR

1) Total RNA의 추출

어린잎의 Total RNA는 Chang et al., (1993)이 사용한 방법을 응용하여 추출하였다. 어린잎을 1.5ml Eppendorf tube의 뚜껑을 이용하여 직접 채취 후 튜브에 액체질소를 넣고 마쇄하였다. 추출용 완충액 (10mM Tris-HCl, pH 8.5, 50mM KCl, 1% SDS, 14mM 2-mercaptoethanol)과 동량의 phenol/chloroform을 넣고 30초간 vortex한 후 1,2000rpm에서 5분간 원심분리 하였으며, 수층(total RNA)을 RT-PCR의 시료로 사용하였다.

2) RT-PCR

역전사는 반응용액 20 ul [RNA 1 ul (ca. 1 ug), Oligo dT-Adaptor primer 또는 Oligo dT-3' Adaptor primer (TaKaRa Shuzo co., Ltd., Kusatsu, Shiga, Japan) 0.125 uM, AMV Reverse Transcriptase (TaKaRa Shuzo co., Ltd.) 0.25 U, RNase inhibitor (TaKaRa Shuzo co., Ltd.) 20 U, dNTP 1 mM, MgCl₂ 5 mM, 1X RNA PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl)]를 가지고 수행하였다. PCR 반응은 GeneAmp 2400(Perkin Elmer Co., Ltd., Urayasu, Chiba, Japan)을 이용하였으며, 조건은 [RT; 42°C, 60분 → 99°C, 5분 → 4°C]으로 실행하였다. 본 PCR은 반응용액 100 ul [RT reaction mixture 20 ul, 0.2 uM S-RNase Primer, 0.2 uM M13 primer M4 또는 3' Adaptor primer (TaKaRa Shuzo co.,

Ltd.), 2,5 mM MgCl₂, 1X RNA RCR buffer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (TaKaRa *Taq*TM: TaKaRa Shuzo co., Ltd.)을 사용하였으며, 반응 조건은 94°C, 2분 → 35 cycle (94°C, 1분 → 50°C, 1분 → 72°C, 2분) → 72°C, 10분으로 PCR을 수행하였다. 1.2% agarose gel에서 1 x TAE로 전기영동하였으며, EtBr로 염색하고 UV상에서 확인하였다.

다. DNA 추출 및 정제

사과 품종 잎을 채취 후 DNeasy[®] Plant Mini Kit(QIAGEN, Germany)와 CTAB법을 변형하여 DNA를 추출 및 정제하였다. CTAB법을 변형한 DNA 추출방법은 신엽 1g을 액체질소에 넣고 막자사발에서 마쇄하였다. 추출 buffer 15ml와 2-mercaptoethanol 750 μ l, 20% SDS 1ml 를 첨가한 후 65°C에서 10분간 반응시키고 5M potassium acetate 5ml를 첨가한 후 얼음에 20분간 방치하였다. 원심 후 상등액을 다른 튜브에 옮긴 후 isopropanol을 10ml 첨가하고 -20°C에 20분간 방치하였다. 튜브를 꺼내 다시 원심시킨 다음 상등액을 버리고 건조시킨 후 1×TE buffer 500 μ l로 녹였다. 동량의 phenol과 chloroform 첨가하여 정제하고 isopropanol 500 μ l와 3M Na-acetate 75 μ l를 넣고 원심시켜 상등액을 버리고, 다시 70% EtOH 500 μ l 넣은 후 원심시켰다. Pellet은 건조 후 1× TE buffer 녹여 정량 후 냉동 보관하였다.

라. S-RNase의 cloning 및 sequencing

PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector(Promega, USA)를 이용하여 ligation시켰으며, 반응 조건은 PCR 산물 4 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l, 2X buffer 5 μ l, pGEM-T Easy vector 1 μ l를 혼합 후 4°C에서 12시간 동안 incubation하였다. Ligation 산물은 *E. coli*(HB101, JM109) competent cell를 이용하여 transformation시킨 후 배양하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA 30% PEG를 정제하여 sequencing을 수행하였다. Sequencing은 dye-terminator method로 PRISMTM 377(Perkin Elmer, USA)를 사용하였다. 염기서열은 MacDNAsis(Hitachi software, Calif., USA)와 BLASTN(NCBI) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

마. PCR-RFLP 분석

S-allele 특이적 cloning 산물을 분획하는 제한효소를 선발하여 PCR-RFLP를 수행하였다. PCR 증폭은 Perkin-elmer사의 PE-9700을 이용하고 2분간 94°C에서 free denaturation시킨 후 denaturation 93°C에서 1분, annealing 55°C에서 2분, extension 72°C에서 3분간 30회 반응시켰으며, free extension은 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 증폭반응은 25 μ l 반응액으로 2.5 μ l buffer(조성: 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin)를 첨가하고 genomic DNA 2.5 μ l(약 50ng), primer 100pM, dNTP 2.5mM 그리고 Taq polymerase 1 unit를 첨가하였다. 증폭된 PCR산물을 4~6염기 인식 제한효소로 소화하였다. 그 반응조건으로는 total volume 5 μ l로 0.5 μ l 10 x buffer(750mM KCl, 150mM Tris-HCl pH 7.5, 92.5mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol)를 첨가하고 PCR 산물 2.5 μ l, restriction endonuclease 2.5units, distilled water 1.8 μ l를 첨가하였다. 반응액은 최적온도에서 2시간 incubation시킨 후 1 x TBE buffer를 포함한 1.5~2% agarose gel 또는 3% Metaphor agarose gel에서 100V, 1시간 전기영동으로 분리한 후 UV transilluminator상에서 촬영, 분석하였다.

3. 연구결과

가. RT-PCR에 의한 cDNA의 염기서열 결정 및 분석

1) 16 cDNA의 염기서열 결정

본 연구진은 RT-PCR를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, cloning 후 염기서열을 결정하였다. 그리고 Genbank에서 부족한 염기서열 정보를 보충하여 16개의 사과 자가불화합성 유전자의 염기서열을 비교 분석하였다(그림 22). 염기서열의 상동성은 S-allele 간에 상당히 변화가 크게 나타났으며, S₁-과 S₂-allele간에는 70%의 상동성을 나타냈으며, S₂-allele는 S₂₀-과 S₂₄-allele에서 70%의 상동성으로 약간 낮게 나타났다. 이와 반대로, S₃-과 S₁₀-allele는 96% 이상, S₂₀-과 S₂₄-allele는 95% 이상으로 높은 상동성을 나타냈다. S₁₆-와 S₂₂-allele는 99%로 거의 염기서열이 일치하였다. 그래서 자가불화합성 표현형에 영향을 미치는 아미노산 서열로 치환하였으며 그들의 아미노산 서열은 S₂₇-allele와 차이를 나타내었다. 각각의 S-allele 염기서열의 비교 분석한 결과를 아래에 나타내었다. 또한 몇 개의 보존된 영역을 확인 할 수 있었다. 가장 높은 상동성을 가진 보존영역은 N-terminus의

근방에 위치하였으며, 200개(1~200 bp)의 잔기로 이루어져 있었다. 몇몇 대립 유전자는 보전영역 이외에서도 매우 높은 상동성을 나타냈다. 이것은 다른 S 대립 유전자를 충분히 식별하기 위한 염기서열 분석에 있어서 장애가 되었다. Primer 조합은 가장 변이가 큰 영역에서 디자인하였으며, 200~1,000 bp 사이에 증폭된 산물을 얻었다. 그리고 S₃과 S₁₀의 intron의 크기가 1 kbp 이상이어서 두 번째 exon영역에서 primer를 선발하였다. 또한 S-allele 특이적인 primer를 합성하였다 (그림 22). 또한 S 대립 유전자가 동정되지 않을 것을 예상하여 특이적인 PCR를 수행하기 위해 S-allele 특이적 염기서열을 가진 primer조합을 선발하였다. 이미 각각의 S-allele 동정을 위한 primer가 정해진 것도 있지만 새롭게 합성한 것도 있다. 4개의 대립 유전자(S₁, S₃, S₅, S₁₀)를 위해 cloning하였던 S 대립 유전자와 일치하는 단편을 증폭하기 위해 한 개 이상의 primer를 사용하여 실험하였다. 총 16개의 primer 조합 중 S₂(Broothaerts et al., 1995), S₅, S₉(Janssens et al., 1995), S₄/S_{27a}/S_{27b}, S₂₆(Verdoodt et al., 1998), S₂₀(Van Nerum et al., 2001), S₁/S₃/S₇/S₁₀/S₂₄/S₁₄/17/21(Broothaerts et al., 2002)은 이미 보고되어진 것이다.

S1-RNase	ATGGTGA---CGGGGATGATATATGTGGTTATGATGGTATTTTCTACTAATTTTATTAATA
S2-RNase	ATGGGGACTACGCCGATGTATATATAGTTACGATGTTATTTTCATTAATTTGTATTAATA
S3-RNase	ATGGGGATTACAGGGATGATATATATGGTTACAATGGTATTTTTCATTAATTTGTATTAATA
S4-RNase	ATGGGGATTACGAGGATGATATACATGGTTACGATGTTATTTTTCATTACTTGTATCAATA
S5-RNase	-----
S7-RNase	ATGGGGATTACGGGGATGATATATATGGTTACGATAGTATTTTTCATTAATTTGTTTTACTA
S9-RNase	ATGGGGATTACGGGGATGATATATATGGTTACTATGGTATTTTTCATTAATTTGTATTAATA
S10-RNase	ATGGGGATTACAGGGATGATATATATGGTTACAATGGTATTTTTCATTAATTTGTATTAATG
S16-RNase	ATGGGGATTACAGGGATGATATCCATGATTACGATGGTATTTTTCATTACTTGTATTAATA
S19-RNase	ATGGGAATTACGGGGATGATATATATGTTTACAATGGTATTTTTCATTAATAGTATTAATA
S20-RNase	ATGGGGA---CGGGGATTATATATATGGTTATGATGGTATTTTCTACTAATTTTATTAATA
S22-RNase	ATGGGGATTACAGGGATGATATCCATGATTACGATGGTATTTTTCATTACTTGTATTAATA
S23-RNase	-----
S24-RNase	ATGGGGA---CCGGGATGATATATATGGTTATGATGGTATTTTCTACTAATTTTATTAATA
S26-RNase	ATGGGGATTACGGGGATAACATATGTGGTTACGATGGTATTTTTCATTAATTTGTATTAATA
S29-RNase	ATGGGTTTTACGGGAATGATATATATGGTTACGATGGTATTTTTCATTAATTTGTTACTAATA
S1-RNase	TTGCTTCGTCACGGTGGGATTCGATTATTATCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
S2-RNase	TTGCTTCGICTACGGTGGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
S3-RNase	TTGCTTCGTCGCGGTGAAATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
S4-RNase	TTGCTTCGTCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
S5-RNase	-----
S7-RNase	TTGCTTCGTCGCGGCGAGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAGTATCAGTTGGCT
S9-RNase	TTGCTTCCCCTACGGTAGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
S10-RNase	TTGCTTCGTCGCGGTGAAATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT

S16-RNase TTGTCTTCGTCACGGTGGGATTTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
 S19-RNase TTGTCTTCGTCACGGTGGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCC
 S20-RNase TTGTCTTCGTCACGGTGGGATTTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
 S22-RNase TTGTCTTCGTCACGGTGGGATTTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
 S23-RNase -----
 S24-RNase TTGCCTTCGTCACGGTGGGATTTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
 S26-RNase TTGTCTTCGTACACGGCGGGATATGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT
 S29-RNase TTGTCTTCGTCACGGTGGGATTTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT

S1-RNase GTCTGCAACTCTAATCCAACCTCTTGTAAAGGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S2-RNase GCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S3-RNase GTCTGCAGCTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT
 S4-RNase GCCTGTAACCTAATCCACTCCTTGTAAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT
 S5-RNase -----GGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S7-RNase GCCTGCAACTCTAAACCTATTCCTTGTAAAGGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S9-RNase GTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAGAGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S10-RNase GTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCCGACAAGTTGTTTACGGTTCAT
 S16-RNase GTCTGCAACTTTAATCCTACTCCATGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S19-RNase GTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCTGAAAAATGTTTACGGTTCAC
 S20-RNase GTCTGCCACTCTAATCCAACCTCTTGTAAAGGATCCTCTGACAAGTTGTTTACTGTTTAC
 S22-RNase GTCTGCAACTTTAATCCTACTCCATGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S23-RNase GCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCTGCAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S24-RNase GTCTGCAACTCTAATCCAACCTCTTGTAAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACTGTTTAC
 S26-RNase GTCTGCAACTCTAATCCTACCCCTTGTAAAGGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC
 S29-RNase GTCTGCAACTTTACTGCTACTCCTTGTAAAGGATCCTCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC

***** * * . ** ***** *****

S1-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACCTCGAATGGAATGACCCAGAATATTGTAAGGCACCG-CCATA
 S2-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACATGAATCGAAGTGAATTATTTAATTCAGTAGTTCAAACGTT
 S3-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAAACAATCTTTG
 S4-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACAAAATAGGACGTGACCCAGAATATTGCAAGACAAGGAATC--
 S5-RNase GGATTGTGGCCTTCAAACCTTAAATGGACCTGACCCAGAAAATGCAAGGTCAAACCCACG
 S7-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAGACTCGAATGGACATGACCCAGTAAATTCAGTAAATCAACCGTG
 S9-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACAGCTCAGGAAATGACCCAAATATACTGCAAGAATACAACCATG
 S10-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAGCTACAATCTTA
 S16-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACAACGTAGGAGGTGACCCAGAATCTTGCAAGATAAGGAATC--
 S19-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACAAGAATGGACCTGACCCAGAAAATGCAAGAATATACAAATG
 S20-RNase GGGTTGTGGCCTTCAAGACTCGAATGGAAATGACCCAAAATATTGCAAGGCGCCG-CCATA
 S22-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACAACGTAGGAGGTGACCCAGAATCTTGCAAGATAAGGAATC--
 S23-RNase GGTTTATGGCCTTCAAACCTGGAACCTACCCGACCAATCTTCTGCAAGAATACAACCATT
 S24-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACCTCGAATGGAAATGACCCAAAATATTGCAACGCACAG-CAATA
 S26-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACCTCAACAGGACGTGACCCAAAATATTGCAATCCATCAAACGTG
 S29-RNase GGTTTGTGGCCTTCAAACGCGAAGGAAATGACCCAGAAGTTGCAAGACACAG-AAATA

** ** . ***** * * ** . : ** *

▽ intron

S1-RNase -----TCATACGATAAA---AATGCTCGAACCCAGTTGGTAATTATTTGGCCGAACGTA
 S2-RNase ACTTATGCGAAGATACA---AAATATCCGAACCCAGTTGGAAATGATTGGCCAAACGTA
 S3-RNase AACCTCAAACGATAAC---AAATCTTACAGCCAGCTGGAAATATTGGCCAAACGTA
 S4-RNase GTCGGAAGAGAGCAAA---AACACTCGAACCCAGTTGGAAATATTGGCCGAACGTC

S5-RNase GCGTCTCAAACGATAGATACATCACTCAAACCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA
S7-RNase GATGCTCAGAAGTTAGG---AAATCTGACAACCTCAGTTGGAAATAATTTGGCCGAACGTA
S9-RNase AATTCTACTAAGATAGC---AAATCTGACAGCCCGTTGGAAATTATTTGGCCCAACGTA
S10-RNase AATCCTCAAACGATAAC---AAATCTTAAAGCCAGCTGGAAATTATTTGGCCAAACGTA
S16-RNase ATCGAACGAGAGCAA---AGCACTCGAACCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA
S19-RNase AATTCTCAGAAGATAGG---AAATATGGCAGCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA
S20-RNase -----TCAGACGATAAA---AATACTCGAACACCAGTTGGCAATTATTTGGCCGAACGTA
S22-RNase ATCGAACGAGAGCAA---AGCACTCGAACCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA
S23-RNase ACGCCTCAGCAGATAGG---ACATATCGAAGCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA
S24-RNase -----TCAGACGATGAA---AATACTCGAACCCAGTTGGTAATTATTTGGCCGAACGTA
S26-RNase ACTTCTCATATGCTAAA---AAATATCCAAGCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA
S29-RNase -----TCAGAAGATGCA---AATACTCGAACCCAGTTGGAAATTATTTGGCCGAACGTA

. * . * . * . * * * * * * * * * * * *

S1-RNase CTCAATCGAAACGATCATGAAGGCTTCTGGCGTAAACAGTGGGATAAACATGGCTCTTGT
S2-RNase TTCAATCGAAAAATCATTTAGGCTTCTGGAATAGAGAGTGGAAACAAACACGGCCCTGT
S3-RNase CTCAATCGAAAGGCTCATGCACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCACCTGT
S4-RNase CTCGATCGAACCAATCATACAGGCTTCTGGCGTAGACAGTGGAAAAACATGGCACCTGT
S5-RNase TTCAATCGAGCCGATCATGAAGGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAACATGGCACCTGT
S7-RNase TACAATCGAACCGATCATATAAGCTTCTGGGATAAACAGTGGAAACAAACATGGCACCTGT
S9-RNase CTCGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGAAACAAACATGGCAGCTGT
S10-RNase CTCAATCGAAGGCTCATGTACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCGCCTGT
S16-RNase CTCGATCGAACCAATCATACAGCCTTCTGGCGTAGACAGTGGATAAACATGGCACTTGT
S19-RNase CTCAATCGAACTGATCATGTAGGCTTCTGGGAAAGAGAGTGGCTCAAACATGGCACCTGC
S20-RNase CTCAATCGAAACGATCATGAAGGCTTCTGGCGTAAACAGTGGGAGAAACATGGCTCCTGT
S22-RNase CTCGATCGAACCAATCATACAGCCTTCTGGCGTAGACAGTGGATAAACATGGCACTTGT
S23-RNase TTCAATCGAACCAATCATTTGGTCTTCTGGAATAAACAGTGGAAACAAACATGGCAGCTGT
S24-RNase CTCAATCGAAACGATCATGAAGGCTTCTGGCGTAAACAGTGGGAGAAACATGGCTCCTGT
S26-RNase CTCAATCGAACGATCATATAGGCTTCTGGGAAAGACAATGGAAAAACATGGCAGCTGT
S29-RNase TACAATCGAACCGCTAATGAAGTCTTCTGGCGTAAACAGTGGTATAAACATGGCTCCTGT

:*.*****. .*.** . ***** :*. * * * * * * * * * * *

S1-RNase GCGTCTTCCCAATACAGAACCAGAAGCATTACTTTGATACAGTAATCAAATGTACACA
S2-RNase GGGTATCCCACAATACGGAACGACTTGCATTACTTTCAAACAGTAATCAAATGTACATA
S3-RNase GGGTACCCACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACATA
S4-RNase GGGTATCCCACAATACAGAACGAGAATGATTACTTTGAAACAGTAATCAAATGTACATA
S5-RNase GGGTCTCCCACAATAATAGACAAGAACCATTACTTTGAAACAGTAATCGAAATGTACATA
S7-RNase GGACATCCCACAATAATGAACGACATTCATTACTTTCAAACAGTAATCAAATGTACATA
S9-RNase GGGCATCCCGCAATACAGAACGACATGCATTATTTGCAAACAGTAATCAAATGTACATA
S10-RNase GGGTACCCACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACATA
S16-RNase GGGTATCCCACAATACAGAACGAGAATGATTACTTCGAAACAGTAGTCAAATGTACATA
S19-RNase GGGTATCCCACAATAAGGGACGACATGCATTACTTAAAAACAGTAATCAAATGTACATA
S20-RNase GCGTCTTCCCAATACAGAACCAGAAGCATTACTTTGATACAGTAATCAAATGTACACA
S22-RNase GGGTATCCCACAATACAGAACGAGAATGATTACTTCGAAACAGTAGTCAAATGTACATA
S23-RNase GGGTATCCCATAATAAATGACGAAATACAATACTTTGAACTGTAATCAAATGTACATA
S24-RNase GCGTCTTCCCAATACAGAACCAGAAGCATTACTTTGATACAGTAATCAAATGTACACA
S26-RNase GGGGTCCTCCGCAATAACGAACGAGGTGGATTACTTTCAAACAGTAATCAAATGTACATA
S29-RNase GCGTCTCCCCATTACAGAACCAGACGCATTACTTTGAAACAGTAATCAAATGTACAGA

* . *

S1-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCAATATAAAACCTGGTAGGAAA
S2-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTGATATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCGGATGGAAAT
S3-RNase ACCAAGAAACAAAATGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCAAAATTAACCGGAGAAGAAA
S4-RNase ACCGAGAAACAAAACGTCTCTCGAATCCTCTCAAATGCAAAGATTGAACCGACGGGCAA
S5-RNase ACCGAGAAAGCAAACGTCTCTTATATCCTATCCAAAGCCAAATATCAATCCGGATGGTAAA
S7-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTAAAATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCGGAGGGGAAA
S9-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCGGAGGGGAAA
S10-RNase ACCAAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCAAGATTAAACCGGAGGGGAGA
S16-RNase ACTGAGAAACAAAACGTCTCTAAAATCCTCTCAAATGCAAAGATTGAACCGGACGGGATA
S19-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTGCAATCCTCGCAAAGCCGATGATTCAACCGAACGGGCAA
S20-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCAATATAAAACCGGGTAGGAAA
S22-RNase ACCGAGAAACAAAACGTCTCTGAAAATCCTCTCAAATGCAAAGATTGAACCGGACGGGATA
S23-RNase ATCAAGAAACAAAACGTCTCTAAAATCCTCTCAAAGGCCAAGATTAAACCGGAGGGGAAA
S24-RNase ACCCAGAAACAAAACATCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCAATATAAAACCGGGTAGGAAA
S26-RNase ACCCAGAAACAAAATGTATCCAAAATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCGAGGGGCGA
S29-RNase ACCCAGAAACAAAACGTCTCTTACATCCTCTCAAAGGCCAATATTGAACCGAAGGGGGAA
* ****.***** .*. ** ** ** .*. ** *: ** *:** . . .

S1-RNase AACAGGCCACTGGTGGACATTGAAAATGCCATACGCAATGTTATCAACAATATGACACCA
S2-RNase ATCAGGACACAGAAGGAAATGTAGATGCCATAAGAAAAGGTATCCATGGTAAGGAACCA
S3-RNase TTCAGGACACGGGACGACATTGTGAATGCCATAAGCCAAAGTATCGACTATAAGAAACCA
S4-RNase AGCAGACCGCTGGTGGACATTGAAAATGCCATACGCAACGGTACCCACAATAAGAAACCG
S5-RNase GGCAGGACACGGAAGGATATTCAAATGCCATACGCAATAGTACCAACGATAAGGAACCA
S7-RNase CCCAGGAAACAGGTAGATATTGTAATGCCATACGCAAAGGTACAAACGATAAGGAACCA
S9-RNase TTCAGGACACAGAAGGAAATGAAAAGGCCATACGCAAAGGTACCAATAATAAGGAACCC
S10-RNase TTCAGGACACGGGACGACATTGTAATGCCATAAGCCAAAGTATCGACTATAAGAAACCA
S16-RNase AAGAGAACACTGGCGGACCTTGAATGCCATACGCAAGTGGTACTGACACAAGAACCA
S19-RNase AACAGGTCAATGGTGGATATTGAAAATGCCATACGCAAGTGGTACCAACAATATGAAACCA
S20-RNase AACAGGACACTGGTGGATATTGAAAATGCCATACGCAATGTTATCAACAATATGACACCA
S22-RNase AAGAGAACACTGGCGGACCTTGAATGCCATACGCAAGTGGTACGGACAACAAGAAACCA
S23-RNase AACAGGACACGGACGGAAATATAAACGCCATAAGCATTAGTACCAACAATATGACACCA
S24-RNase AACAGGACACTGGTGGATATTGAAAATGCCATACGTAATGTTATCAACAATATGACACCA
S26-RNase ATCAGGATGCTGAAGGATATTGAAGATGCCATACGCAATGGTACCAACAATAAGAAACCA
S29-RNase AAAAGGACACGGGTGGACATTGAAAATGCCATACGTAAGTGGTACCAACAATATGGTACCA
** . . * . ** .** :. . : *****.* . . ** * . *:** ***

S1-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATACTAGGACATCATTGACTGAATTGGTTGAGGTTGGTCTT
S2-RNase AACCTCAAGTGCCAAAAGAATACTCA-----GATGACTGAATTGGTTGAGGTCACCTCTT
S3-RNase AAATTCAGTGCAAGAACAATAATCA-----GATAACTGAATTGGTTGAGGTCGGTCTT
S4-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATAATGG-----GGTACTGAATTGGTTGAGATCACTCTT
S5-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATAATGG-----GATAACTGAATTGGTTGAGGTCCTCTCTT
S7-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATAACCA-----GGTACTGAATTGGTTGAGGTCACCTCTT
S9-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATAGTCA-----GAGGACTGAATTGGTTGAGGTCACTATT
S10-RNase AAATTCAGTGCAAGATCAATAATCA-----GACAACCTGAATTGGTTGAGGTCGGTCTT
S16-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAAGAGAAG-----GGTACTGAATTAGTTGAGGTCACCTCTT
S19-RNase AAATTCAGTGTCAAAAGAATACTAGGACAACGAC---GGAATTGGTTGAGGTCACCTCTT
S20-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATACTAGGACATCATTGACTGAATTGGTTGAGGTCGGTCTT
S22-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATAATGG-----GGTACTGAATTAGTTGAGGTCACCTCTT
S23-RNase AAATTCAGTGCCAAAAGAATAATGG-----GACGATTGAATTG-----
S24-RNase CAATTCAGTGCCAAAAGAATACTAGGACATCATTGACTGAATTGGTTGAGGTCGGTCTT

```

S26-RNase      AAACTCAAGTGCCAAAAGAATAGTAG-----GATGACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTT
S29-RNase      AAACTCAAGTGCCAAACGAATGGTAG-----GATGACTGAATTGGTTGAGGTC-----
                . * . * * * * * . * . * * * . . . * . * * * * .
S1-RNase       TGCAGTGATAGCAACTTAACGCAGTTCATAAATTGCCCCGCCCATTTCCACAAGGATCA
S2-RNase       TGCAGCGATGGCAACTTAAGCAGTTCATAGATTGCCCCACCATTTTCCAAATGGATCA
S3-RNase       TGCAGCGATAAAACACTTAACGCAGTTCATAGATTGCCCCGCCCATTTCCACAAGGATCA
S4-RNase       TGCAGCGATAAAAACAGAGCACATTTTCATTGATTGCCCCAATCCCTTCTACCCGGATCA
S5-RNase       TGCAGCAATTACTTCGGAATAAATTTTCATAAATTGCCCCAACAAAACCTCCAGGAAAACA
S7-RNase       TGCAGTAATCGCAACCTAACGGGTTTCATAAATTGCCCCGCCATATTTCCAAATGGATCA
S9-RNase       TGTAGCGATCGCAACTTAACCCAGTTCATAGATTGTCCCGCCCTATTTTAAATGGATCA
S10-RNase      TGCAGCGATAAAACACTTAACGCAGTTCATAAATTGCCCCAACCCATTTCCCTAAGGATCA
S16-RNase      TGCAGCGATAAAAACAGAGCACATTTTCATAGATTGCCCCAACCCCTTCCAACCAGGGTCA
S19-RNase      TGCCGTGATAGAGACTTAACGAAGTTCATAAATTGCCCCAACCA---CCACAAGGATCA
S20-RNase      TGCAGCGATAGCAACTTAACGCAGTTCATAAATTGCCCCGCCCATTTCCACAAGGATCA
S22-RNase      TGCAGCGATAAAAACAGAGCACATTTTCATAGATTGCCCCAACCCCTTCCAACCAGGATCA
S23-RNase      -----
S24-RNase      TGCAGCGATAGCAACTTAACGCAGTTCATAAATTGCCCCGCCCATTTCCACGAGGATCA
S26-RNase      TGCAGAGATAGCAACTTAACACAGTTCATAAATTGCCCCAGCCCAATTTCTACCAGGATCA
S29-RNase      -----

S1-RNase       CGGAATTTCTGCCCCACCAA---TATTCAGTATTAA
S2-RNase       CGACATAACTGCCCCACCAATCATATTCTGTATTAA
S3-RNase       CCATTTTCTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAA
S4-RNase       CCATATTTGTGCCCCAACATCAGTATCCGGTATTAA
S5-RNase       CGATATTCCTGTCTACCAATGATATCCATTATTAA
S7-RNase       CGATATTCCTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAA
S9-RNase       CGATACTACTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAA
S10-RNase      CCATATTTCTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAA
S16-RNase      CCATATTTATGCCCCACCAACAATATCCTGTATTAA
S19-RNase      CGATATCTCTGCCCCGCCGA---TGTTCAGTATTAA
S20-RNase      CGGTATTTCTGCCCCACCAG---TATTCAGTATTAA
S22-RNase      CCATATTTATGCCCCACCAACAATATCCTGTATTAA
S23-RNase      -----
S24-RNase      CGGTATTTCTGCCCCACCAA---TATTCAGTATTAA
S26-RNase      CCATTTCTCTGCCCCGCCAA---TATTCGGTATTAA
S29-RNase      -----

```

그림 22. 사과 S-RNase 유전자간의 염기서열 비교, 분석. S-allele 특이적인 primer 위치는 음영으로 표시하였다. cDNA 염기서열에서 단백질 전사 개시 위치(ATG)와 3' 말단 영역인 stop codon은 진하게 나타냈다. Intron의 위치는 삼각형으로 표시하였다. 5'-나 3'- 말단영역의 염기서열이 결정 안된 것은 CLUSTALW 프로그램에 의해 정리하여 "-"로 표시하였다.

2) S-allele 특이적 primer 선발 및 S-allele number 재정립

Kobel(1939)의 분류 체계에 따라 확인된 대립 형질 염기서열을 결정하기 위해, 본 연구에서는 Kobel이 S 인자형을 할당한 사과 품종을 이용하여 연구하였다. 결정된 염기서열을 통하여 각각의 S-allele를 선발하기 위한 primer 조합과 최적 조건을 선정하여 표 11에 나타냈다. 또한 S-allele 특이적인 PCR 및 염기서열 결정 방법 등에 의해 자가불화합성 유전자형이 결정된 수많은 품종들을 분석하였으며, 일반적인 사과품종들의 자가불화합성 유전자형을 결정하기 위해서 세계적으로 보고되었으며 증명된 재배 품종을 선정하였다(표 12). 또한 Kobel이 관측한 표현형과 Boskovic와 Tobutt(1999)가 검출한 S-RNase 밴드와 다른 연구진 등에 의해 알려진 S 대립 유전자 영역의 염기서열간의 상관관계를 분석하여 S-allele의 번호를 다시 정립하였다.

표 11. 사과 S-allele 특이적 PCR 분석을 위한 primer 조합 및 조건

S-allele ^a	Primers	Sequence	PCR programme ^c	Size of PCR product (bp) ^d
S ₁	FTC168	5'-ATATTGTAAGGCACCGCATATCAT-3'	Standard	530
	FTC169	5'-GGTTCGTATTGGGAAGACGCACAA-3'		
S ₂	OWB122	5'-GTTCAAACGTGACTTATGCG-3'	Standard	449
	OWB123	5'-GGTTTGGTTCCTTACCATGG-3'		
S ₃	FTC177	5'-CAAACGATAACAAATCTTAC-3'	A 57°C	437
	A3PR	5'-ATTGGTGGGGCAGAAAAATG-3'		
S ₄	FTC5	5'-TCCCACAATACAGAACGAGA-3'	Standard, <i>TaqI</i>	274 (197)
	OWB249	5'-CAATCTATGAAATGTGCTCTG-3'		
S ₅	FTC10	5'-CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC-3'	Standard	346
	FTC11	5'-TAATAATGGATATCATTGGTAGG-3'		
S ₇	FTC143	5'-ACTCGAATGGACATGACCCAGT-3'	Standard	302
	FTC144	5'-TGTCGTTCAATTATTGTGGGATGTG-3'		
S ₉	FTC154	5'-CAGCCGGCTGTCTGCCACTT-3'	Standard	343
	FTC155	5'-CGGTTTCGATCGAGTACGTTG-3'		
S ₁₀	FTC12	5'-CCAAACGTAICTCAATCGAAG-3'	Standard	209
	FTC228	5'-ATGTCGTCCCGTGTCTGAATC-3'		
S _{16(27a)}	FTC5	5'-TCCCACAATACAGAACGAGA-3'	Standard, <i>TaqI</i>	274 (243)
	OWB249	5'-CAATCTATGAAATGTGCTCTG-3'		
S ₁₉₍₂₈₎	FTC229	5'-TCTGGGAAAGAGAGTGGCTC-3'	Standard	304
	FTC230	5'-TTTATGAACTTCGTTAAGTCTC-3'		
S ₂₀	FTC141	5'-ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC-3'	E 45 sec, <i>NarI</i>	920 (800)
	FTC142	5'-AGCCGRGCTCTTAATACTGAATAC-3'		
S _{22(27b)}	FTC5	5'-CACAATACAGAACGAGA-3'	Standard, <i>TaqI</i>	274 (199)
	OWB249	5'-CAATCTATGAAATGTGCTCTG-3'		
S _{23(10b)}	FTC222	5'-CAATCGAACCAATCATTGGT-3'	Standard	237
	FTC224	5'-GGTGTCAATATTGTTGGTACTAATG-3'		
S ₂₄	FTC231	5'-AAATATTGCAACGCACAGCA-3'	Standard	580
	FTC232	5'-TTGAGAGGATTTACGAGATG-3'		
S ₂₆	FTC14	5'-GAAGATGCCATACGCAATGG-3'	A 55°C	194
	FTC9	5'-TTAATACCGAATATTGGCG-3'		
S ₂₉	A29PF	5'-AGAAGGTTGCAAGACACAGAAATA-3'	Standard	
	A29PR	5'-TCTGGTTCTGTAATGGGGGAGACG-3'		
S _{14/17/21} ^b	FTC141	5'-ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC-3'	E 45 sec, <i>NarI</i>	920 (900)
	FTC142	5'-AGCCGRGCTCTTAATACTGAATAC-3'		

^a괄호안에 있는 S-allele는 이미 밝혀낸 것이며, 새로운 S-allele도 같이 표시하였다. ^b그룹 S₁₄, S₁₇, S₂₁는 primer 하나로 S_{14/17/21} 어느 것이든 증폭이 가능하며 S₂₀의 primer와 같다. ^cA=Annealing 온도, E=Extension 반응시간. ^dPCR 증폭산물의 크기와 제한효소에 의해 분리된 단편의 크기를 나타낸 것이다.

표 12. 사과 S-allele 번호의 재정립 및 주요 재배 품종의 S-유전자형

S-allele (old name) ^a	S-allele (new) ^b	GanBank no.	Sequence cloned from ^c	Reference cultivar ^d
S ₁ , S _f	S ₁	D50837	Fuji ¹	Fuji (S ₁ S ₉)
S ₂ , S _a	S ₂	U12199	Golden Delicious ²	Golden Delicious (S ₂ S ₃)
S ₃ , S _b	S ₃	U12200	Golden Delicious ²	Golden Delicious (S ₂ S ₃)
S ₄	S ₄	AF327223	Gravenstein ³	Gloster (S ₄ S ₁₉)
S ₅	S ₅	U19791	Queen' s Cox ⁴	Gala (S ₂ S ₅)
S ₇ , S _d	S ₇	AB032246 U19792	Akane ⁵ Idared ⁴	Idared (S ₃ S ₇)
S ₉ , S _c	S ₉	U1979 D50836	Queen' s Cox ⁴ Fuji ¹	Fuji (S ₁ S ₉)
S ₁₀ , S _i , S ₂₅	S ₁₀	AB052683	Discovery ^b , Maypole ⁶ , McIntosh ⁷ , Prima ³ , Telamon ³	McIntosh (S ₁₀ S ₍₂₅₎)
S _{27a} , S ₁₆	S ₁₆	AF016919	Baskatong ⁸	Baskatong (S ₁₆ S ₂₆)
S ₂₈ , S _e , S ₃₀ , S ₋₁ , S ₁₉	S ₁₉	AB035273 AB017636	Delicious ⁹ Starking Delicious ¹⁰	Delicious (S ₉ S ₁₉)
S ₂₀ , S _g	S ₂₀	AB019184	Indo ¹¹	Mutsu (S ₂ S ₃ S ₂₀)
S _{27b} , S ₂₂ , S ₂₃ , S ₂₅	S ₂₂	AF327222	Alkmene ³ , Delbard Jubile ³ , Merlijn ³	Alkmene (S ₅ S ₂₂)
"S _{10b} "	S ₂₃	AF239809	Granny Smith ¹²	Granny Smith (S ₃ S ₂₃)
S ₂₄ , S _h	S ₂₄	AB032246 AF016920	Akane ⁵ Braeburn ⁸	Braeburn (S ₉ S ₂₄)
S ₂₆	S ₂₆	AF016918	Baskatong ⁸	Baskatong (S ₁₆ S ₂₆)

^aDNA 염기서열 분석과 단백질 분석에 의해 결정된 S-allele. ^b재정립한 S-allele.

^cReferences: ¹Sassa et al. 1996; ²Broothaerts et al. 1995; ³Van Nerum et al. 2001; ⁴Janssens et al. 1995; ⁵Kitahara et al. 2000; ⁶Broothaerts unpublished and Richman et al. 1997; ⁷Kitahara and Matsumoto 2002; ⁸Verdoodt et al. 1998; ⁹Matsumoto et al. 2000; ¹⁰Okuno 2000, GenBank submission; ¹¹Matsumoto et al. 1999; ¹²Schneider et al. 2001. ^d각각의 S-allele 동정에 사용된 사과품종과 자가불화합성 유전자형.

나. PCR-RFLP 분석에 의한 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 결정

1) PCR 증폭을 위한 S-RNase 관련 primer 선발

이미 보고된 사과 품종의 자가불화합성 유전자의 염기서열 정보와 본 연구에서 동정된 cDNA의 염기서열 정보를 기초로 하여 S-RNase의 보존된 영역으로부터 S-RNase를 검출할 수 있는 universal primer를 합성하였다(표 13). 사과는 밝혀진 자가불화합성 유전자가 많아 염기서열을 정렬하여 비교, 분석하는데 많은 어려움이 따랐다. 사과의 경우 ApF3 + ApR1 primer 조합으로 PCR을 수행한 결과 사과 42품종에서 S-RNase를 검출하였으며, 다른 primer에 비해 매우 효율적인 것으로 밝혀졌다.

표 13. 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 결정을 위한 primer 조합

Name	Forward/ Reverse	Sequence	Position in S gene
Ppsf5		5'-TATTTTCAATTTACGCAGCAA-3'	
ApF1		5'-GATCCTMKGAMAARTTG-3'	
ApF2	Forward	5'-TTTACBGTTTCAYGGDTTGTGG-3'	
ApF3		5'-CAATTTACGCAGCARTAT-3'	
ApF4		5'-GATCCTCCTGACAAGTTGTTT-3'	
ApFN		5'-AARTTGTTTACBGTTCA-3'	S-RNase (보존영역)
Ppsr6		5'-C(A/G)TTCGGCCAAATAATT-3'	
ApR1		5'-TBGGCCAAATHATTDCCA-3'	
ApR2	Reverse	5'-GTACATTYYGAYTACTGT-3'	
ApR3		5'-ACRTTCGGCCAAATAATT-3'	
ApRN		5'-TGTACATTYYGAYTACWGT-3'	

2) S-RNase 관련 primer를 이용한 PCR증폭

가) universal primer를 이용한 자가불화합성 유전자 증폭

사과 품종의 자가불화합성 유전자는 배 품종의 자가불화합성 유전자와 매우 높은 상동성을 나타내고 있다는 것을 본 연구진은 이미 발표하였다(Kim et al., 2002). 그래서 배 S-RNase 유래의 universal primer(Ppsf5 + Ppsr6)를 원예연구소에서 수집한 사과 24품종과 대구사과연구소에서 수집한 사과 3품종을 이용하여 PCR증폭 후 제한효소를 처리하지 않고 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하였다(그림 23). 이미 밝혀진 것과 같이 사과의 자가불화합성 유전자는 매우 다양

한데 배 유래의 primer를 사용하였을 때에는 몇 개의 품종에서만 증폭된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 증폭된 단편의 크기가 거의 동일하여 제한효소를 처리하지 않고서는 자가불화합성 유전자형을 결정하기가 곤란하였다.

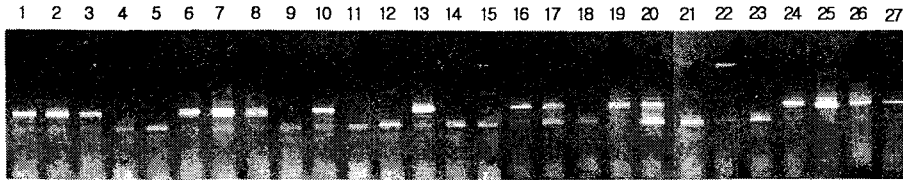


그림 23. 원예연구소에서 수집한 사과 24품종과 대구사과연구소에서 수집한 사과 3품종을 S-RNase 특이적 primer(Ppsf5 + Ppsr6)를 이용하여 PCR증폭 후 제한효소를 처리하지 않고 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하였다. 제한효소를 처리하지 않고 자가불화합성 유전자형을 추정하기가 곤란함을 알 수 있다.

배의 universal primer가 아닌 사과의 S-RNase의 염기서열 정보를 기초로 합성한 S-RNase 특이적 primer 조합 ApF4 + ApR3를 이용하여 PCR증폭 후 제한효소의 소화없이 2% Metaphor agarose gel에 전기영동을 하였다. 많은 S-allele PCR 산물들이 증폭되었으며, 증폭된 단편들을 분석한 결과 6 그룹으로 나누어졌으며, 매우 유효한 primer조합임을 알 수 있었다(그림 24).

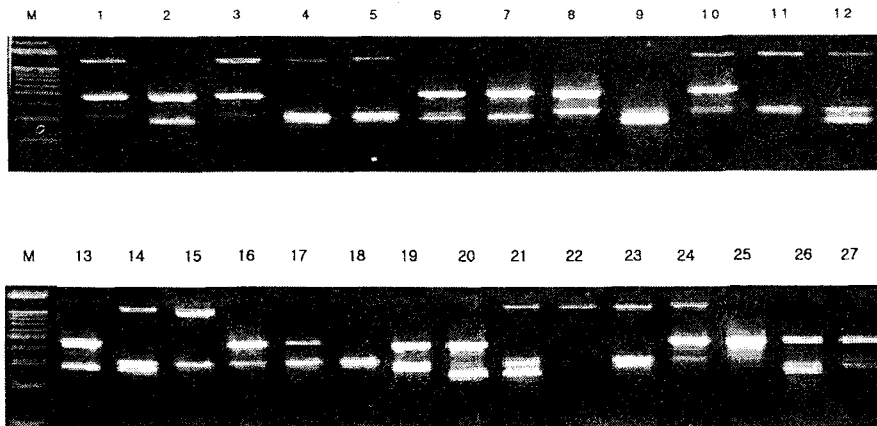
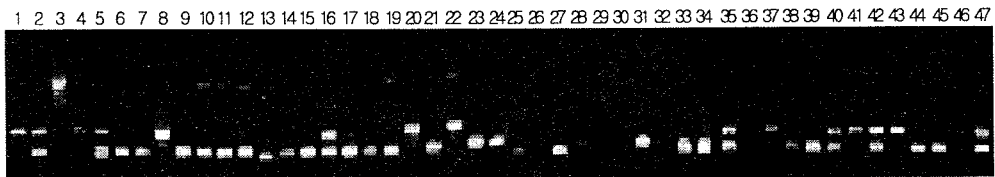


그림 24. 국내 및 국외 육성 사과품종을 primer 조합 Apsf6 + Apsr6를 이용하여 PCR증폭 후 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하였다. 증폭된 단편들을 분석한 결과 6 그룹으로 나누어졌으며, 서로 다른 각각의 PCR 증폭 단편을 cloning하였다.

또한 사과와 universal primer ApF3+ApR1 조합을 이용하였을 때에 가장 많은 S-RNase 산물을 증폭할 수 있었다. 사과 47품종 중 42개의 품종에서 자가불화합성 산물을 증폭하였다(그림 25-A). 증폭된 자가불화합성 16품종의 PCR 단편은 pGEM-T Easy Vector에 의한 cloning 및 염기서열 결정에 이용하였다(그림 25-B). 그리고 ApF3+ApR1의해 증폭되지 않은 산물이 ApF3과 ApR2을 사용하였을 때 증폭되었다. 증폭된 S-RNase 산물은 pGEM-T Easy Vector를 이용하여 cloning 하였다. 하지만 완벽하게 S-RNase 산물을 증폭하지 못했기에 본 연구진은 16개의 cDNA의 아미노산 서열과 염기서열을 분석하여 새로운 universal primer(ApFN+ApRN)를 합성하였으며, universal primer와 특정 S-allele 특이적인 primer 조합에 의하여 국, 내외 육성 사과품종 및 계통의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다.

A



B

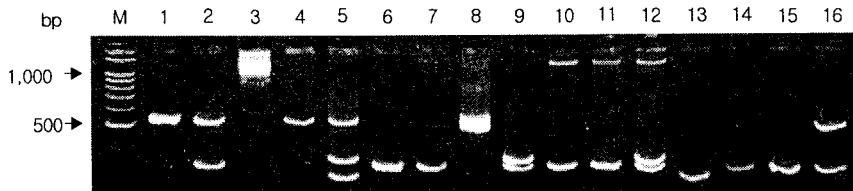


그림 25. Ap3F+Ap1R primer를 이용하여 PCR증폭 후 0.8 % agarose gel(A) 및 2% Metaphor agarose gel(B)에 분획한 전기영동상. 각각의 S-RNase간의 intron 영역의 변이에 의해 PCR 증폭 단편의 크기가 다르게 나타남을 알 수 있었다. (1) Ontario, (2) Ralls Janet, (3) Elstar, (4) Tsugaru, (5) Wellington, (6) Granysmith, (7) Fuji, (8) American summer pearmain, (9)Jonadel, (10) Gala, (11) Greensleeves, (12) Megumi, (13) Akagi, (14) Sekaiichi, (15) Jonagold, (16) Mutsu, (17) Ambitious, (18) Akane, (19) Aori No.3, (20) Chesapeak apple, (21) Goro, (22) Hanaiwai, (23) Hourei, (24) Kagayaki, (25) Koutokn, (26) Macoun, (27) Molis (28) Mujon, (29) Patricia, (30) Puritan, (31) Red Queen, (32) Russian, (33) Starking, (34) Staymared, (35) suntan, (36) Sunlight, (37) Super Early Blaza, (38) Super Golden Delicious, (39) Summer champion, (40) Wickson, (41) Hongro, (42) Kamhong, (43) Saenara, (44) Chukwang, (45) Hwahong, (46) Seokwang, (47) Hwarang.

나) S-allele 특이적 primer를 이용한 자가불화합성 유전자 증폭

본 연구진에 의해 밝혀진 S-allele 특이적인 제한효소(표 10)를 이용하여 사과 품종의 PCR 증폭반응을 수행하였다. S₁-allele specific primer에 의해 'Ontario', 'Fuji', 'Ralls Janet', 'American summer pearmain' 등에서 S₁-allele 산물이 증폭되었으며, S₂-allele specific primer에 의해서는 'Ralls Janet', 'Gala', 'Greensleeves', 'Megumi', 'Jonagold', 'Mutsu' 등에서 S₂-allele 산물이 증폭되었다. S₃-allele specific primer에 의해서는 'Elstar', 'Tsugaru', 'Granny smith', 'Akaki', 'Sekaiichi', 'Jonagold', 'Mutsu' 등에서 동정되었다. S₉-allele specific primer에 의해서는 'Wellington', 'Fuji', 'Jonade', 'Megumi', 'Sekaiichi', 'Jonagold', 국내 육성 품종 '감홍' 등에서 S₉-allele 산물이 증폭되었다(그림 26). 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T Easy vector에 cloning한 후 염기서열을 결정하는데 이용하였다.

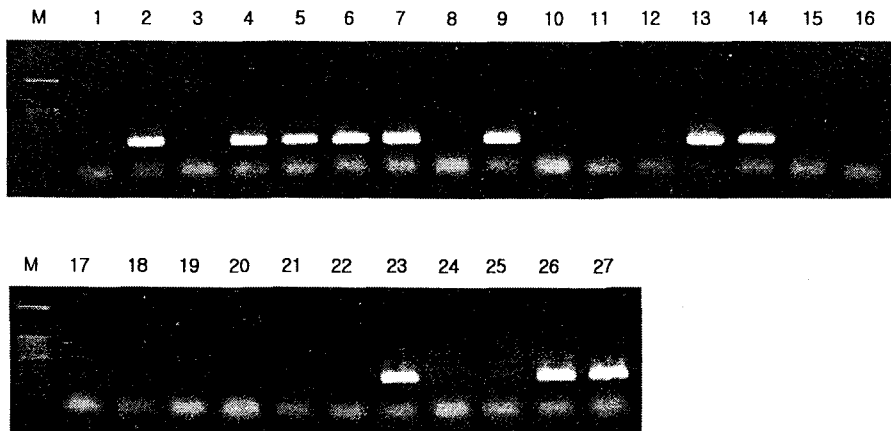


그림 26. 국내 및 국외 육성 사과품종을 S₉-allele specific primer(FTC154 + FTC155)를 이용하여 PCR증폭 후 제한효소 소화없이 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하였다. Acc. no. 2, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 23, 26, 27의 품종이 S₉-allele를 갖고 있었다.

다. Genomic DNA를 이용한 자가불화합성 유전자의 염기서열 분석

ApF3+ApR1 primer를 이용하여 자가불화합성 산물을 증폭하였으며, 사과 16품종의 PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector에 cloning 하였다. Cloning 후 sequencing 결과 6 S-RNase 염기서열 및 intron 정보를 결정하였다(그림 27, 28). PCR 증폭산물의 크기는 S₂=349 bp, S₇=320 bp, S₉=350 bp, S_e=450 bp, S₁=540 bp, S_g=514 bp이었다. Intron

크기는 S₂=147 bp, S₇=118 bp, S₉=144 bp, S_e=168 bp, S₁=344 bp, S_g=318 bp이었다. Exon 영역의 염기서열을 비교한 결과, S₉와 S_e-RNase는 84%, S_g와 S_f-RNase는 94%의 높은 상동성을 나타내었다.

S₁-allele

**CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCAACCTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGT
TGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACCTCGAATGGAAATGACCCAGAATATTGTAAGGCACCCGCATATC
ATACGGTAATATTATTAGCATAATCAGATAGTCAATATTATTTCTCTCATTATGTACTTGTGTGTGTATATA
TATATTTTTGGATAATGCTAAAGTCACCAAGTTTTTAAACCAATTATGTGTCACAGTATAAAAAAACACGTTA
ATCAACACTTAAATAATAATTCAATCATCAACATCTACATCATTGATTACAAAAAGTTTGTCTTCCTAGCATT
ACTCTATATTTTTTTATATATACATATACTCAACACAGGTTTTCATGCAGGCGTGTAGAAATATTACAATTAAT
TAAAAATTAATCATAAATTATTTCTATTATATATTATTATATTGTCAGATAAAAAATGCTCGAACCCAGTTGGC
AATGATTTGGCCCAACG**

S₂-allele

**CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGATCCTCCTGACAAGT
TGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACATGAATCGAAGTGAATTATTTAATTGCAGTAGTTCAAACGTGA
CTTATGCGAAGGTAATATTATTAACAATCAGATATTCAATATTGTTTATTTTCATATTATACATATACTCAACATA
GATTTTTATGCCAGCGTGTGCAAACATTACATTTAATTTAAAAATTAATCATAAACTTTTTCTATTATTTATTAT
GTTGTCAGATACAAAATATCCGAACCCAGTTGGCAATAATTTGGCCAAACG**

S₇-allele

**CAATTTACGCAGCAGTATCAGTTGGCTGCCTGCAACTCTAAACCTATTCCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGT
TGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCCAGACTCGAATGGACATGACCCAGTAAATTGCAGTAAATCAACCGTGG
ATGCTCAGAAGGTAATCTTATCAATAATCTAATACTCAACATATATGTTTCATACAAGTGCAAATATTACAATTA
TTTCAATTTAATCATAAATGTTTTCTATTTATATATTTTTATTTATATTGGCAGTTAGGAAATCTGACAACCTCAG
TTGAAAATAATTTGGCCCAACG**

S₉-allele

**CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGATCCTCCTGACAAGT
TGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGCTCAGGAAATGACCCAATATACTGCAAGAATACAACCATGA
ATTCTACTAAGGTAATATTATTAATAATCAGATGTTCAATATTGTTTATTTCTTATATACATATACTCAACATGA
ATTTTCATGCATGCTAGTGAATAATTACAATTAATTTAAAAATTAATCATAAATTTTTCTATTATATTATATT
GTCAGATAGCAAATCTGACAGCCCGTTGGTAATAATTTGGCCAAACG**

S₁₉-allele

CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAACGATCCTCCTGAAAAAT
 TGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAAGAATGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGAATATACAAATGA
 ATTCTCAGAAGGTAATATTATTAATAATGAGATAGTCAATATTGTTTATTTTCATTATGTACTTGTGTATAAAAT
 ATATTACATATACTCAACATAGATTTTCATGCACGCCTGTGGAAATATTACAATTAATTTAAAAATTTAGTCATGA
 ATTGTTTCTATTATATAATTATATTGTTAGATAGGAAATATGGCAGCCAGTTGGCAATAAATTTGGCCCAACG

S₂₀-allele

CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTCTAATCCAACCTCCTTGTAAAGGATCCTCCTGACAAGT
 TGTTTACTGTTACGGGTTGTGGCCTTCAACTCGAATGGAATGACCCAAAATATTGCAAGGCGCCGCCATATC
 AGACGGTAATATTATTAGCATAATCAGATAGTCAATATTGTTTATCTCATTATGTACTTGTGTGTATATATA
 TATTTTGGATAATGCTAGAGCCACCAAATTTTAAACCAAATGATGCATTATATAAGTACGCTAATTAACACTT
 AAGTAATAATTCATCATCAACATCTACATAATTTGGTTACAAAAATTTAATCTTACTATCATTACTCTATATT
 TTTTGTATATACATATAGTCAACACAGGTACAAATATTACAATTAATTTAAAATTTAATCATAAATTATTTC
 GTTATATATTATTATATTGTCAGATAAAAAATACTCGAACACCAGTTGGCAATAAATTTGGCCCAACG

그림 27. Ap3F+Ap1R primer를 이용하여 증폭한 사과 품종의 6 S-RNase 산물을 cloning 후 염기서열을 결정하였다. Primer site는 진하게 표시하였으며, intron의 염기서열은 이태릭체로 표기하였다.

S1 -RNase	CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTCTAATCCAACCTCCTTGTAAAGGAT
S2 -RNase	CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGAT
S7 -RNase	CAATTTACGCAGCAGTATCAGTTGGCTGCCTGCAACTCTAACCTATTCCTTGTAAAGGAT
S9 -RNase	CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAGAGAT
S19-RNase	CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAACGAT
S20-RNase	CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTCTAATCCAACCTCCTTGTAAAGGAT
	*****.***** ** * .***.*** **:*:* *****. ***
S1 -RNase	CCTCCTGACAAGTTGTTTACCGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACCTCGAATGGAATGAC
S2 -RNase	CCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACATGAATCGAAGTGAA
S7 -RNase	CCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAACTCGAATGGACATGAC
S9 -RNase	CCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGCTCAGGAAATGAC
S19-RNase	CCTCCTGAAAAATGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAAGAATGGACCTGAC
S20-RNase	CCTCCTGACAAGTTGTTTACTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAACTCGAATGGAATGAC
	*****.**,***** ***** *****.**, :. : **. **.
S1 -RNase	CCAGAATATTGTAAGG-----CACCGCCATATCATACGGTAATATTATTAGCATAATCA
S2 -RNase	TTATTTAATTCAGTAGTTCAAACGTGACTTATGCGAAGGTAATATTATTA--ACAATCA
S7 -RNase	CCAGTAAATTCAGTAAATCAACCGTGGATGCTCAGAAGGTAATCTTATCA--ATAATC-


```

S1 -RNase   TAAATTATTTCTATT-----ATATATTATTATATTGTCAGATAAAAAATGCTCGAACCCCA
S2 -RNase   TAAACTTTTTCTATT-----ATTTATT---ATGTTGTCAGATACAAAATATCCGAACCCA
S7 -RNase   TAAATGTTTTCTATTTATATATTTTTATTATATTGGCAGTTAGGAAATCTGACAACCTCA
S9 -RNase   TAAATTTTTCTATT-----ATATTAT-----ATTGTCAGATAGCAAATCTGACAGCCCG
S19-RNase  TGAATTGTTTCTATT-----ATATAATT--ATATTGTTAGATAGGAAATATGGCAGCCCA
S20-RNase  TAAATTATTTCCGTT-----ATATATTATTATATTGTCAGATAAAAAATACTCGAACCCA
          *..**   ***** ..**   **:::..:   .*** **::** **:: . * . * .
          .

S1 -RNase   GTTGGCAATGATTGGCCCAACG
S2 -RNase   GTTGGCAATAAATTGGCCAAACG
S7 -RNase   GTTGGAAATAAATTGGCCCAACG
S9 -RNase   GTTGGTAATAAATTGGCCAAACG
S19-RNase  GTTGGCAATAAATTGGCCCAACG
S20-RNase  GTTGGCAATAAATTGGCCCAACG
          ***** **..*****.****

```

그림 28. 사과 품종의 6 S-allele 염기서열을 비교, 분석하였다. 염기서열간에 보존된 염기는 별표(*)로 나타났다. Intron의 염기서열은 이태릭체로 표기하였다.

또한 국내 육성 품종(홍로, 감홍, 새나라)의 PCR 증폭 단편을 pGEM-T Easy vector를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 감홍은 S₉-allele를 가지고 있었으며, 홍로, 감홍, 새나라에서 새로운 S-allele를 동정하였다(그림 29). 새로운 S-allele의 PCR증폭 단편의 크기는 539 bp이며, intron 크기는 345 bp이었다. BLASTN 프로그램을 이용하여 새로운 S-allele를 분석하였다. 새로운 S-allele는 사과의 S₁-allele와 96%, S₈와 94%, S₉와 88%의 높은 상동성을 나타냈지만 동일하지는 않았다. S₂₀-allele와 64%의 상동성을 나타냈다.

CAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCGCACTCTAATCCAACCTCCTTGTAAGGATCCTCCTGA
 CAAGTTGTTTACCGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACCTCGAATGGAAATGACCCAGAATATTGCAAGGCAC
 CGCCATATCATACGGTAATATTATTAGCATAATCAGATAGTCAATATTATTTCTCTCATTATGTACTTGT
 GTGTGTATATATATATATTTTTGGATAATGCTAAAGTCACCAAGTTTTTAAACCAAAATTATGTGTCACAGT
 AGAAAATAAACGACGTTAATCAACACTTAAATAATAATTCAATCATCAACATCCACATCATTTTTATTACAA
 AATAGTTTGTCTTCCTAGCATTACTCTATATTTTTTTTATATATACATATACTCAACACAGGTTTTTCATGC
 AGGCGGTAGAAAATATTACAATTAATTTAAGATTTAATCATAAATTATTTCTATTATATATTATTATATTG
 TCAGATAAAAATGCTCGAACCCAGTTGGCAATAATTTGGCCCA

그림 29. 국내 육성 사과 품종의 새로운 S-allele의 염기서열. Primer 위치는 진하게 표시 하였으며, intron은 이태릭체로 표기하였다.

라. 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 정리

마지막으로 본 연구진은 PCR 및 염기서열 정보에 의해 밝혀진 사과품종의 자가불화합성 유전자형과 이미 밝혀진 사과품종의 자가불화합성 유전자형을 정리하여 표 14에 나타냈다. 50 품종의 자가불화합성 유전자형을 정리하였지만 사과 품종은 약 3,000종에 이르기 때문에 계속해서 연구를 수행해야 할 것이다.

표 14. 사과 품종의 자가불화합성 유전자형 정립

Acc No.	Cultivar	S-genotype	Acc No.	Cultivar	S-genotype
1	Ontario	S ₁ S ₈	26	Telamon	S ₁₀ S ₇
2	Ralls Janet	S ₂ S ₃	27	Bohnappel	S ₉ S ₁₆ S ₁₉
3	Elstar	S ₃ S ₅	28	Wellington	S ₈ S ₉
4	Tsugaru	S ₃ S ₇	29	Safner Rosen	S ₃ S ₇ S ₈
5	Wellington	S ₈ S ₉	30	Oetwiler (Reinette)	S ₃ S ₆
6	Gransmith	S ₃ S ₁₀	31	Oberrieder Flanzriente	S ₃ S ₆
7	Fuji	S ₁ S ₉	32	Champagner Reinette	S ₂ S ₄
8	American summer pearmain	S ₁ S ₂₀	33	Gravenstein	S ₄ S ₂₀ S ₇
9	Jonadel	S ₉ S ₁₉	34	Gloster 69	S ₄ S ₁₉
10	Gala	S ₂ S ₅	35	Coxs Orange	S ₅ S ₉

Acc No.	Cultivar	S-genotype	Acc No.	Cultivar	S-genotype
11	Greensleeves	S ₂ S ₅	36	Breaburn	S ₉ S ₂₄
12	Megumi	S ₂ S ₉	37	Kaiserapfel	S ₁ S ₁₀ S ₁₅
13	Akagi	S ₃ S ₇	38	Baskatong	S ₁₆ S ₂₆
14	Sekaiichi	S ₃ S ₉	39	Blenheim Orange	S ₁ S ₃ S ₁₇
15	Jonagold	S ₂ S ₃ S ₉	40	Menzaner Jugerapfel	S ₃ S ₅ S ₁₈
16	Mutsu	S ₂ S ₃ S ₂₀	41	Starking Delicious	S ₁₉ S _?
17	Golden Delicious	S ₂ S ₃	42	Indo	S ₂₀ S _?
18	Delicious	S ₉ S ₁₉	43	Ribston Pippin	S ₁ S ₉ S ₂₁
19	McIntosh	S ₁₀ S ₍₂₅₎	44	Alkmene	S ₅ S ₂₂
20	Jakob Lebel	S ₁ S ₃ S ₁₄	45	Delbard Jubile	S ₂₂ S _?
21	Citron drliver	S ₃ S ₅ S ₁₂	46	Merlijn	S ₂₂ S _?
22	Adams Pearmain	S ₁ S ₃ S ₁₀	47	Worcester Pearmain	S ₂ S ₂₄
23	Discovery	S ₁₀ S _?	48	Tydemans' Early Worester	S ₂₂ S ₂₄
24	Maypole	S ₁₀ S ₁₆	49	Trajan	S ₂ S ₂₂
25	Prima	S ₁₀ S _?	50	Kamhong	S ₉ S _N

4. 고찰

사과는 경제적 작물로써 중요함에도 불구하고 여러 품종들의 자가불화합성 유전자형의 정보가 밝혀지지 않았다. 이에 비해 sweet cherry의 경우에는 수분의 자가불화합성 그룹의 수가 명확하게 밝혀졌다(Wiersma et al., 2001; Sonneveld et al., 2001). 그리고 sweet cherry와 다른 *Prunus* 속은 자가불화합성 반응이 매우 강해서 쉽게 자가불화합성 유전자를 동정할 수 있었다. 이에 비해 사과에서는 수분에 관한 연구들의 해석이 매우 부족하다. 그래서 품종간의 제안된 화합성관계가 자가불화합성 유전자형과 종종 일치하지 않을 때도 있다. 지금까지 사과의 자가불화합성 연구는 Kobel 그룹의 연구진(1939)은 사과에서 11개의 S-allele(S₁~S₁₁)를 식별하였으며, Komori et al., (2000)는 주요 일본 재배 사과 품종사이의 불화합성 관계를 조사하여, 10개의 S-allele(S_a~S_i와 S_z)를 동정하였다. 4개의 S-allele는 Kobel 그룹이 동정한 것과 일치한 것으로 발표하였다. 그리고, Sassa et al., (1994, 1996)는 IEF와 2D-PAGE 분석법을 이용하여 S_a~S_f의 S-allele의 산물이 동정하였다. 또한, Boskovic과 Tobutt(1999)는 IEF와 NEPHGE 방법을 사용하여 S₁~S₁₁의 유전자 산물을 확인했다. 그리고 첫 번째로 Janssens et al., (1995)은 각각의 S-allele의 염기서열 결정 및 분석방법을 이용하여 S₅, S₇, S₉-allele의 염기서열을

보고하였다. Verdoodt et al., (1998)과 Van Nerum et al., (2001)는 이 방법을 여러 가지에 응용하였으며, Sakurai et al., (1997, 2000), Matsumoto와 Kitahara, (2000, 2002)는 이런 방법에 의해 자가불화합성유전자형을 결정하는데 사용하였다. 그리고 Verdoodt et al., (1998)는 호모접합체의 선발에 이용하였으며, Jansses et al., (1996)와 Schneider et al., (2001)은 과수원에서 수분수 연구에 사용하였다. 본 연구 역시 사과와 배의 게놈 DNA에서 S-allele의 구별을 위한 분자적 방법을 개발하여 사용중이다. 이런 염기서열 정보를 이용하여 Van Nerum et al. (2001), Kitahara et al., (2000), Matsumoto et al., (1999), Matsumoto와 Kitahara, (2000)는 S-allele specific 프라이머를 디자인 하였으며, 이것을 이용하여 사과품종들의 자가불화합성유전자형 동정에 사용하였다. 하지만 16개의 cDNA의 S-RNase의 염기서열 정보를 기초로 S-RNase 특이적인 primer 16 조합을 디자인하여 정리하였으며, 또한 16 S-RNase의 염기서열의 보존영역에서 분자마커 (ApFN, anti-ApRN)를 개발하였다. 이 분자 마커는 많은 품종을 보다 쉽고 빠르게 자가불화합성을 결정하였다. 국내 육성 사과 품종과 국외의 사과 품종의 자가불화합성 유전자를 본 연구진이 개발한 분자마커를 이용하여 증폭하였다. 증폭단편은 클로닝하였으며, 염기서열을 분석하여 6개의 S-RNase의 인트론 정보를 얻었으며, 국내 육성 사과 품종에서 새로운 S-allele(감홍, 새나라, 홍로)의 염기서열을 동정하였다. 그리고 Kobel이 동정한 자가불화합성의 표현형과 Boskovic와 Tobutt(1999), Verdoodt et al., (1998), Van Nerum et al., (2001), Sakurai et al., (1997, 2000), Matsumoto와 Kitahara, (2000, 2002) 등에 의해 결정된 염기서열정보 등을 토대로 S-allele의 번호를 다시 정립하였다. 개발된 분자마커를 이용한 PCR-RFLP 분석과 S-allele 염기서열정보 등을 이용하여 50개의 사과 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였다.

사과의 품종은 약 3000종으로 아직까지 자가불화합성 유전자형이 동정이 안된 품종이 세계적으로 넓게 분포해 있으며, 밝혀지지 않는 새로운 S-allele 역시 많을 것이다. 본 연구에서 개발된 분자마커와 S-allele specific 프라이머 정보는 동정되지 않는 품종에 이용하므로 보다 빠르고 확실하게 자가불화합성 유전자형을 결정할 수 있을 것이며, S-allele 번호를 재정립한 것은 새로운 S-allele를 동정하였을 때 새로운 유전자인지 아닌지 구별할 수 있는 지표로 사용할 수 있을 것이다. 또한, 사과와 같은 배우체형 자가불화합성을 가진 식물의 자가불화합성 유전자형을 동정하는데 매우 유용하게 사용될 것이다.

여 백

제 6 절 화분관 검정 및 이면교배에 의한 교배친화성, 양·질적 형질분석 및 최적 수분수 선발

1. 서론

배(*Pyrus pyrifolia*)와 사과(*Malus domestica*)는 장미과의 과수로써 배우체형 자가불화합성을 나타내고 있다. 자가불화합성이란 자웅의 생식기관이 정상임에도 불구하고 같은 품종의 화분이 수분되었을 때 화분관 신장이 화주측의 receptor인 S-RNase에 의해 거절되어 수정이 이루어지지 않는 현상이다(Hiratsuka, S. et al., 1987, 1991, 1995; Yamashita, K. et al., 1990). 화분측 ligand는 아직 밝혀지고 있지 않으나 Prunus속에서 밝혀진 F-box가 제 1 후보일 것이다. 배 품종 신세기, 행수 및 만삼길 등은 비교적 자가결실율이 높지만 과형이 나쁘고 크기가 작아 실용성이 거의 없다. 이와 같은 자가불화합성 현상을 회피하여 과실생산을 하기 위해서는 화합성이 높고 열매가 잘 맺히는 타 품종을 수분수로 섞어 심거나 고접을 해야 한다. 또한 배, 사과의 경우 품종간에 교배친화성 정도가 다르므로 신규과원 조성시에는 수분수 선정 및 배치에 조심해야 한다. 수분수 품종은 재배 품종간의 화합성, 꽃가루량과 경제적인 재배가치를 고려하여 결정하여야 한다. 특히 타가불화합성이 있는 품종이나 꽃가루량이 아주 적거나 없는 신고, 황금배, 영산배 품종은 수분수로 쓸 수 없다. 주 품종에 대한 수분수의 재식비율은 20% 정도이나 최근에는 환경오염 등으로 인한 방화곤충 등의 서식지가 파괴되어 숫자가 격감하고 개화기 기상 불순 등의 문제도 있어 가능한 1:1 또는 2:1로 재식하고 있다. 또한 배, 사과 품종의 결실안정을 도모하기 위해 인공수분을 실시하고자 하는 재배농가에서 개화기에 인공수분에 사용하는 화분에 대한 증량제를 첨가하여 사용하고 있으며, 첨가 정도는 화분의 발아율을 근거로 하여 결정하고 있다. 그러나 배, 사과는 수분할 품종과 같은 유전자를 가진 화분은 수정에 이르지 못하는 불화합성을 가지고 있고, 하나의 품종은 2개의 유전자를 가지고 있다(Ishimizu T. et al., 1998). 따라서 화분의 불화합성 유전자형이 전혀 다른 화분을 이용할 경우에는 발아율에 근거하여 증량제를 첨가하여도 상관이 없다. 그러나 2개의 불화합성 유전자중 어느 하나가 수분할 품종과 서로 같은 유전자를 가지고 있는 경우가 있다.

이 경우에 이론적으로 재배자가 채취한 화분량의 1/2은 사용할 수 없는 화분이 될 수 있다. 따라서 화분 발아율이 80%이면, 유전자 하나가 중복된 경우 이 화분은 화분 발아율이 40%인 동량의 꽃가루와 같다고 할 수 있기 때문에 증량제의 첨가 수준은 40% 발아율을 가진 꽃가루와 같은 수준으로 사용하여야 한다. 결론적으로 가장 적합한 화분 채취용 품종은 불화합성 유전자가 전혀 다른 품종이어야 한다. 그러나 지금까지는 재배되고 있는 배, 사과품종의 자가불화합성 유전자형이 결정되지 않아 최적의 수분수와 적당한 화분채취용 품종을 선발하는데 많은 어려움이 있었다. 본 연구진은 위와 같은 문제점을 해결하기 위하여 배 계통 및 품종의 자가불화합성 유전자형을 동정하는데 성공하였다(Kim et al 2002).

본 연구에서는 건전한 꽃가루를 많이 생산하고 주 품종과 화합성이 높으며, 개화기가 비슷하거나 약간 빨라야 하고 경제성이 높은 수분수 품종을 선발하기 위해서 자가불화합성 유전자형이 결정된 배, 사과 품종을 이용하여 이면교배와 양적, 질적형질을 조사하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 공시 재료

국내·외 육성 사과, 배 품종을 망라하여 공시하였다. 국내 육성 품종은 사과 7 품종(홍로, 화홍, 추광, 감홍, 서광, 새나라, 선홍)과 배 17 품종(황금배, 추황배, 영산배, 수황배, 감천배, 화산, 원황, 미황, 신일, 만수, 감로, 선황, 미니배, 만풍배, 조생황금, 신천, 한아름)을 공시하였으며, 자가불화합성이 밝혀진 국외 육성 사과(14 품종), 배 품종(5품종)을 공시재료로 사용하였다. 재식 거리와 수형은 사과는 4m × 2m, 세장방추형이며, 배는 5m × 2m, 개심자연형이었다. 공시시료의 수령은 2~10년생을 사용하였으며 2년간 2차례 조사하였다.

나. 화분관검경 및 이면교배에 의한 교배친화성과 S-genotype 분석

1) 이면교배

꽃피는 시기가 수원보다 이른 남부지역에서 화분을 채취하여 발아시킨 다음 풍선상기에 제응을 실시하고 교배조합 표에 의해 수분을 하였다. 수분 후 화기는 다시 봉지를 씌우고 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72시간 경과 후 FAA용액에 고정된 뒤 화분관 검경을 실시하였다.

2) 화분관 검경

FAA로 고정시킨 암술을 분리하여 1N NaOH 용액에 담가 60°C에서 1시간 30분 정도 처리한 후 1N NaOH를 제거하고, 주두를 포함한 화주를 0.1% aniline blue가 첨가된 0.1N K₃PO₄ 용액에 침지 후 상온에서 염색을 실시하였다. 염색된 주두를 slide glass에 squashing 하여 형광현미경으로 화분관 행동을 조사하였다.

다. 공시 품종별 교배조합에 따른 착과율 조사 및 품질의 형질 조사

1) 교배 조합에 따른 착과율 조사

결실율에 의한 교배친화성을 분석하기 위하여 품종간에 교배를 하여 관행법에 준하여 결실율을 조사하였으며 착과 정도를 퍼센트로 표시하였다.

2) 수분수에 따른 품종의 형질조사

과실 특성조사는 수정율, 과중, 당도, 산도, 종자수, 천립중 등을 농촌진흥청 시험연구조사 기준표에 준하여 조사하였다.

3. 연구결과

가. 이면교배 후 교배친에 따른 화분관 행동조사

자가불화합성 유전자형, 즉 S-genotype의 조합에 따른 화주내의 화분관 선단 발달양상을 형광현미경을 이용하여 측정된 결과 배에서는 발아 초기 화분관의 발아와 신장이 사과에 비하여 느리게 진행되었으며 72시간 경과 후 자가불화합성 정도에 따른 차이를 가장 잘 관찰할 수 있었다. 자가불화합성 유전자가 모두 같은 경우(S₄S₅×S₄S₅)와 하나가 동일한 경우(S₄S₅×S₃S₅)에는 유전인자가 모두 다른 경우(S₄S₅×S₂S₃)에 비하여 화분관 신장이 현저히 줄어든 양상을 나타내었다(그림 30).



'S₄S₅×S₂S₃'

'S₄S₅×S₃S₅'

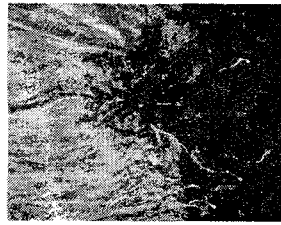
'S₄S₅×S₄S₅'

그림 30. 배의 화주내에서 S 유전자형 조합에 따른 화분관 신장(수분 후 72시간 경과). 주두와 S 유전자형이 동일한 화분은 화주의 상단부위에서 화분관 신장이 정지됨.

또한 사과에서는 이러한 현상이 보다 뚜렷하였으며 S-genotype이 동일한 경우 화분관 자체의 발아와 신장이 억제되었고 하나가 동일한 경우는 초기에 발아가 잘 안되었으나 72시간 경과후에는 상당수 발아되는 현상을 보였으나 화분관 신장 도중 선단부분이 굵어지며 신장이 멈추는 현상을 발견할 수 있었다. 반면 자가불화합성 유전인자가 모두 다른 경우 화분의 발아와 화분관 신장이 원활히 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다(그림 31).



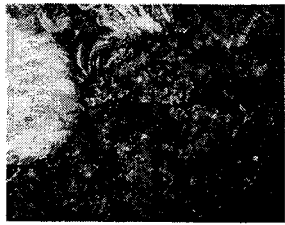
4hr



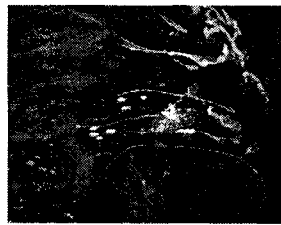
24hr
조합 A(S₃S₇×S₃S₇)



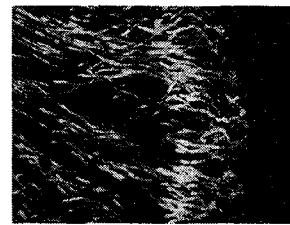
72hr



4hr



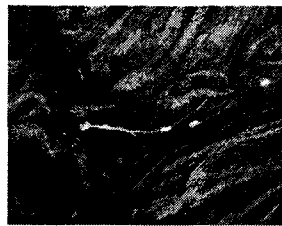
24hr
조합 B(S₃S₇ × S₇S₉)



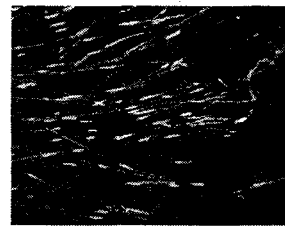
72hr



4hr



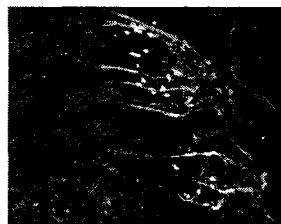
24hr
조합 B(S₃S₇ × S₂S₃)



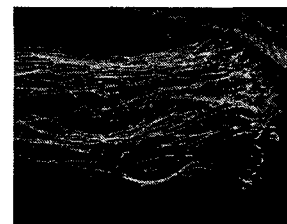
72hr



4hr



24hr
조합 C(S₃S₇ × S₁S₈)



72hr

그림 31. 사과 화주내에서 S 유전자형의 교배조합 및 수분 후 경과시간에 따른 화분관 신장. S 유전자형이 2개가 모두 다른 조합(조합 C)이 2개가 모두 동일하거나(조합 A) 1개가 동일한 경우(조합 B)보다 수분 후 빠른 시간 내에 화분관이 발아하는 것을 알 수 있었음.

1차년도에는 사과 14조합, 배 9조합의 화분관 신장 정도를 조사하였으며, 2차년도에는 배 40조합, 사과 32조합의 화분관 신장 정도를 조사하였다. 조사결과, 1차년도 사과품종에서는 화합(+)이 7조합, 반화합(+-)이 3조합, 불화합(-)이 4조합으로 나타났으며, 배 품종에서는 화합(+)이 4조합, 반화합(+-)이 4조합, 불화합(-)이 1조합으로 나타났다(표 15). 2차년도 배 품종에서는 화분관 침입 수 50 이상(++)이 22조합, 화분관 침입 수 20~50(+)이 10조합, 화분관 침입 수 0~20(+-)이 4조합, 화분관 침입 수 0~5(-)이 4조합으로 나타났으며, 사과 품종에서는 화분관 침입 수 50 이상(++)이 19조합, 화분관 침입 수 20~50(+)이 9조합, 화분관 침입 수 0~20(+-)이 3조합, 화분관 침입 수 0~5(-)이 1조합으로 나타났다(표 16, 17). 배와 사과품종을 이면교배 후 화분관 검경을 분석한 결과 동일한 자가불화합성 유전자를 가진 품종간에는 전혀 화분관이 침입하지 못하였으며, 하나의 자가불화합성 유전자가 있을 경우 화분관 침입이 50%가 줄어든 것이 확실하게 나타났다. 또한, 자가불화합성 유전자가 다른 품종들간에는 화분관 침입이 거의 100%이었다. 화분관 검경에 의한 품종간의 불친화성 정도와 염기서열 및 PCR-RFLP분석에 의해 결정된 사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형의 결과가 일치함을 보였다.

표 15. 교배친에 따른 화분관 행동 조사(1 차년도)

과 종	교배조합	교배화수 (화)	화분관 신장정도	비 고
사과	후지(S ₁ S ₉) × 홍로(S ₇ S ₇)	90	+ -	시료 채취시간은 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 시간단위로 하였다. 시험구당 5화 × 3 반복 하였으며, FAA고정액에 고 정하고 형광현미 경으로 관찰하였 다.
	후지(S ₁ S ₉) × 세계일(S ₃ S ₉)	90	+	
	후지(S ₁ S ₉) × 후지(S ₁ S ₉)	90	-	
	추광 × Gala(S ₂ S ₅)	100	+	
	서광 × Gala(S ₂ S ₅)	100	+	
	국광 × Gala(S ₂ S ₅)	100	+	
	Gala(S ₂ S ₅) × Gala(S ₂ S ₅)	100	-	
	세계일(S ₃ S ₉) × 쓰가루(S ₃ S ₇)	90	+ -	
	Ontario(S ₁ S ₈) × Wellington(S ₈ S ₉)	90	+	
	감홍(S ₉ S ₇) × Megumi(S ₂ S ₉)	90	+ -	
	Akagi(S ₃ S ₇) × 쓰가루(S ₃ S ₇)	90	-	
	Ontario(S ₁ S ₈) × Granysmith(S ₃ S ₂₃)	90	+	
	쓰가루(S ₃ S ₇) × 국광	90	+	
Megumi(S ₂ S ₉) × Megumi(S ₂ S ₉)	90	-		
배	태백(S ₄ S ₅) × 장십랑(S ₂ S ₃)	90	+	
	태백(S ₄ S ₅) × 감천배(S ₃ S ₅)	90	+	
	태백(S ₄ S ₅) × 행수(S ₄ S ₅)	90	-	
	황금배 × 이십세기	100	+ -	
	황금배 × 장십랑	100	+ -	
	추황배 × 장십랑	100	+	
	수황배 × 장십랑	100	+	
	수황배 × 조생적	100	+ -	
	영산배 × 장십랑	100	+ -	

+ : 화합, - : 불화합, + - : 반화합

표 16. 배 품종의 화분관 행동 관찰에 의한 화분관 신장 정도 조사(2 차년도)

과 종	교배조합	교배화수 (화)	화분관 신장정도	비 고
배	황금배×신흥(S ₄ S ₉)	150	+	시료 채취시간은 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 시간단위 로 하였다. 그리고 시험 구당 5화 × 3 반복하였으 며, FAA고정액에 고정하 고 형광현미경으로 관찰 하였다. ++: 화분관 침입 수 50이상, +: 화분관 침입 수 20~50, +-: 화분관 침입 수 0~20, -: 화분관 침입 수 0~5.
	황금배×이십세기(S ₂ S ₄)	120	+	
	황금배×풍수(S ₃ S ₅)	100	+	
	황금배×명월(S ₁ S ₈)	100	++	
	영산배×신흥(S ₄ S ₉)	100	++	
	영산배×이십세기(S ₂ S ₄)	100	++	
	영산배×풍수(S ₃ S ₅)	100	-	
	영산배×명월(S ₁ S ₈)	100	++	
	추황배×신흥(S ₄ S ₉)	150	+	
	추황배×이십세기(S ₂ S ₄)	150	+	
	추황배×풍수(S ₃ S ₅)	150	++	
	추황배×명월(S ₁ S ₈)	150	++	
	수황배×신흥(S ₄ S ₉)	120	+	
	수황배×이십세기(S ₂ S ₄)	80	+	
	수황배×풍수(S ₃ S ₅)	80	+	
	수황배×명월(S ₁ S ₈)	100	++	
	신고×신흥(S ₄ S ₉)	100	+	
	신고×이십세기(S ₂ S ₄)	100	++	
	신고×풍수(S ₃ S ₅)	100	+	
	신고×명월(S ₁ S ₈)	100	++	
	만풍×신흥(S ₄ S ₉)	120	++	
	만풍×이십세기(S ₂ S ₄)	120	++	
	만풍×풍수(S ₃ S ₅)	120	-	
	만풍×명월(S ₁ S ₈)	120	++	
	단배×신흥(S ₄ S ₉)	80	++	
	단배×이십세기(S ₂ S ₄)	80	++	
	단배×풍수(S ₃ S ₅)	80	-	
	단배×명월(S ₁ S ₈)	80	++	
	신일×신흥(S ₄ S ₉)	100	+-	
	신일×이십세기(S ₂ S ₄)	100	+-	
	신일×풍수(S ₃ S ₅)	100	+-	
	신일×명월(S ₁ S ₈)	100	++	
	감천배×신흥(S ₄ S ₉)	100	++	
	감천배×이십세기(S ₂ S ₄)	100	++	
	감천배×풍수(S ₃ S ₅)	100	-	
	감천배×명월(S ₁ S ₈)	100	++	
청실리×신흥(S ₄ S ₉)	50	++		
청실리×이십세기(S ₂ S ₄)	50	++		
청실리×풍수(S ₃ S ₅)	50	+-		
청실리×명월(S ₁ S ₈)	50	++		

표 17. 사과 품종의 화분관 행동 관찰에 의한 화분관 신장 정도 조사(2 차년도)

과 중	교배조합	교배화수 (화)	화분관 신장정도	비 고
사과	후지×Akagi(S ₃ S ₇)	100	+	시료 채취시간은 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 시간 단위로 하였다. 시험구 당 5화 × 3 반복하였으 며, FAA고정액에 고정 하고 형광현미경으로 관찰하였다.
	후지×Gala(S ₂ S ₅)	100	++	
	후지×Jonadel(S ₉ S _e)	100	+	
	후지× 축(S _f S _g)	100	++	
	쓰가루×Akagi(S ₃ S ₇)	90	-	
	쓰가루×Gala(S ₂ S ₅)	90	++	
	쓰가루×Jonadel(S ₉ S _e)	90	++	
	쓰가루× 축(S _f S _g)	90	++	
	세계일×Akagi(S ₃ S ₇)	120	+	
	세계일×Gala(S ₂ S ₅)	120	++	
	세계일×Jonadel(S ₉ S _e)	120	+ -	
	세계일× 축(S _f S _g)	120	++	
	국광×Akagi(S ₃ S ₇)	80	++	
	국광×Gala(S ₂ S ₅)	80	+ -	
	국광×Jonadel(S ₉ S _e)	80	++	
	국광× 축(S _f S _g)	80	+	
	Wellington×Akagi(S ₃ S ₇)	100	++	
	Wellington×Gala(S ₂ S ₅)	100	++	
	Wellington×Jonadel(S ₉ S _e)	100	+	
	Wellington× 축(S _f S _g)	100	+	
	추광×Akagi(S ₃ S ₇)	100	++	
	추광×Gala(S ₂ S ₅)	100	++	
	추광×Jonadel(S ₉ S _e)	100	++	
	추광× 축(S _f S _g)	100	+	
	서광×Akagi(S ₃ S ₇)	150	++	
	서광×Gala(S ₂ S ₅)	150	+	
	서광×Jonadel(S ₉ S _e)	150	++	
	서광× 축(S _f S _g)	150	++	
	화랑×Akagi(S ₃ S ₇)	120	+ -	
	화랑×Gala(S ₂ S ₅)	80	++	
	화랑×Jonadel(S ₉ S _e)	80	+	
	화랑× 축(S _f S _g)	100	++	

++: 화분관 침입 수 50 이상, +: 화분관 침입 수 20~50, +- : 화분관 침입 수 0~20, -: 화분관 침입 수 0~5.

현재 국내의 많은 농가가 신고품종을 많이 재배하고 있다. 수분수로써 '추황'을 사용하고 있으며 결실이 잘된다. 결실이 잘되는 이유는 신고(S₃S₉) 품종과 추황(S₄S₆) 품종의 자가불화합성 유전자형이 전혀 다르기 때문이다. 그리고 신고는 추황배의 풍부한 꽃가루를 받아 결실이 잘 되지만 정작 추황배는 신고가 꽃가루가 없어 수분, 수정이 안되어 큰 문제가 되고 있다. 이러한 과원은 시급히 꽃가루가 풍부하면서 자가불화합성 유전자형이 다른 품종을 심거나 또는 고접해야 한다. 이와 같이 자가불화합성 유전자형은 수분수 선발에 있어 매우 중요한 역할을 한다.

나. 사과, 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과율 조사

1년차에는 사과 10조합과 배 24조합을 교배하여 착과율을 조사하였다(표 18). 수정율 5% 이하의 교배조합은 불친화성으로 판단되나 1년차에 조사한 사과는 전반적으로 저온의 기상영향을 받아 수정율이 낮았다. 2년차와 3년차에서는 배 품종 150 조합의 착과수 및 수정율을 조사한 결과 수정율 5% 이하가 8조합에서 나타났으며(표 19-1, -2, -3, -4), 사과 품종 32 교배조합중 수정율 5% 이하가 1 조합이었다(표 20). 착과율과 수정율은 그 해의 환경적인 영향을 많이 받았으나, 착과율 조사결과 화분관 검정 결과와 일치하였다.

표 18. 사과, 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과율 조사(1 차년도)

과 종	교 배 조 합	교 배 화 수	착 과 수	수 정 율(%)
사 과	감 홍 × 선 홍	130	25	19.2
	새나라 × 선 홍	210	60	28.6
	서 광 × 선 홍	140	75	53.6
	양 광 × 선 홍	100	0	0
	추 광 × 선 홍	200	0	0
	쓰가루 × 선 홍	100	20	20.0
	홍 로 × 선 홍	240	85	35.4
	후 지 × 선 홍	400	170	42.5
	홍 월 × 선 홍	100	25	25.0
	Red del. × 선 홍	100	15	15.0
	소 계 10 조합	1,720	475	27.6
배	감천배 × 원황	170	149	87.6
	원황 × 감천배	130	115	88.4
	선황 × 감천배	84	80	95.2
	만수 × 추황배	116	98	84.4
	황금배 × 만수	131	105	80.1
	원황 × 만수	131	119	90.8
	신천 × 원황	57	55	96.5
	신천 × 수황배	45	41	91.1
	신천 × 추황배	60	45	75.0
	신천 × 선황	33	4	12.1
	신천 × 조생황금	39	0	0
	감로 × 선황	66	0	0
	감로 × 미니배	45	0	0
	감로 × 조생황금	45	5	11.0
	감로 × 신일	42	25	59.5
	원황 × 만풍	42	0	0
	만풍 × 원황	45	2	4.4
	황금배 × 신일	48	4	8.3
	황금배 × 조생황금	45	0	0
	조생황금 × 신일	69	0	0
	미니비 × 선황	45	39	86.7
	신고 × 만풍	45	24	53.3
	만삼길 × 만풍	45	43	95.6
	신흥 × 신일	60	50	79.4
	소 계 24 조합	1,639	1,003	61.1
합 계	34 조합	3,359	1,478	44.0

표 19-1. 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과수 및 수정율(2, 3차년도)

과 종	교 배 조 합		교배화수	착과수	수정율 (%)
	종자친	화분친			
배	미니배	신 일	150	115	76.7
	미니배	만 풍	150	114	76.0
	미니배	추황배	150	126	84.0
	미니배	풍 수	62	3	4.8
	신 천	미니배	100	47	47.0
	신 천	선 황	100	35	35.0
	신 천	신 일	100	48	48.0
	신 천	화 산	100	34	34.0
	신 천	만 풍	100	28	28.0
	신 천	감천배	100	34	34.0
	신 천	미 황	100	31	31.0
	신 천	신세기	28	25	89.3
	감 로	원 황	100	42	42.0
	감 로	수황배	100	50	50.0
	감 로	화 산	100	31	31.0
	감 로	만 풍	100	33	33.0
	감 로	감천배	100	57	57.0
	감 로	추황배	100	67	67.0
	감 로	미 황	100	50	50.0
	감 로	만 수	100	34	34.0
	감 로	풍 수	50	1	2.0
	선 황	원 황	200	197	98.5
	선 황	풍 수	50	1	2.0
	원 황	미니배	200	127	63.5
	원 황	선 황	200	179	89.5
	원 황	조생황금	200	164	82.0
	원 황	신 일	200	127	63.5
	원 황	수황배	200	107	53.5
	원 황	화 산	200	147	73.5
	원 황	황 금	200	4	2.0
	원 황	풍 수	62	53	85.5
	천의천	금촌조생	48	45	93.8
	한아름	신세기	56	32	57.1
	단 배	장십량	54	54	100
	단 배	신세기	58	54	93.1
	단 배	만 수	56	52	92.9
조 옥	수황배	80	70	87.5	
애탕리	수황배	64	37	57.8	

표 19-2. 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과수 및 착과율

과 중	교 배 조 합		교배화수	착과수	착과율(%)
	종자친	화분친			
배	원 황	추황배	200	131	65.5
	원 황	만 수	200	182	91.0
	조생황금	미니배	150	118	78.7
	조생황금	선 황	100	66	66.0
	조생황금	수황배	150	120	80.0
	조생황금	만 풍	150	137	91.3
	조생황금	추황배	100	80	80.0
	조생황금	미 황	150	125	83.3
	조생황금	신세기	50	9	18.0
	신 일	선 황	100	67	67.0
	신 일	신세기	50	4	8.0
	황금배	미니배	100	93	93.0
	황금배	선 황	200	192	96.0
	황금배	장십랑	200	150	75.0
	황금배	수황배	100	89	89.0
	황금배	화 산	150	124	82.7
	황금배	만 풍	100	56	56.0
	황금배	감천배	150	114	76.0
	황금배	추황배	200	183	91.5
	황금배	미 황	100	67	67.0
	황금배	만삼길	100	95	95.0
	황금배	신세기	58	34	58.6
	수황배	미니배	100	40	40.0
	수황배	선 황	150	98	65.3
	수황배	원 황	150	63	42.0
	수황배	신 일	100	75	75.0
	수황배	장십랑	100	72	72.0
	수황배	화 산	150	79	52.7
	수황배	만 풍	100	79	79.0
	수황배	풍 수	52	46	88.5
	영산배	미니배	100	67	67.0
	영산배	선 황	100	82	82.0
	영산배	원 황	150	90	60.0
	영산배	조생황금	150	110	73.3
	영산배	신 일	100	82	82.0
	영산배	장십랑	150	131	87.3
영산배	수황배	100	87	87.0	
영산배	화 산	150	98	65.3	
영산배	만 풍	150	70	46.7	

표 19-3. 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과수 및 착과율

과 종	교 배 조 합		교배화수	착과수	착과율(%)
	종자친	화분친			
배	영산배	감천배	150	123	82.0
	영산배	추황배	150	112	74.7
	영산배	미 황	100	88	88.0
	영산배	만 수	100	70	70.0
	영산배	만삼길	150	97	64.7
	화 산	미니배	150	87	58.0
	화 산	선 황	150	150	100
	화 산	원 황	200	165	82.5
	화 산	조생황금	200	189	94.5
	화 산	신 일	150	123	82.0
	화 산	장십량	150	72	48.0
	화 산	수황배	150	117	78.0
	화 산	만 풍	150	61	40.7
	화 산	추황배	100	42	42.0
	화 산	만삼길	100	51	51.0
	만 풍	선 황	150	94	62.7
	만 풍	원 황	150	7	4.7
	만 풍	신 일	150	131	87.3
	만 풍	만 수	100	57	57.0
	만 풍	풍 수	52	41	78.8
	신 고	미니배	200	148	74.0
	신 고	선 황	150	132	88.0
	신 고	원 황	200	184	92.0
	신 고	조생황금	150	132	88.0
	신 고	신 일	150	139	92.7
	신 고	수황배	100	87	87.0
	신 고	화 산	200	140	70.0
	신 고	감천배	150	137	91.3
	신 고	추황배	200	179	89.5
	신 고	미 황	100	86	86.0
	신 고	만 수	100	88	88.0
	감천배	미니배	100	62	62.0
	감천배	선 황	200	180	90.0
	감천배	조생황금	150	115	88.2
	감천배	신 일	100	90	90.0
	감천배	장십량	150	150	100
감천배	수황배	150	126	84.0	
감천배	화 산	150	4	2.7	
감천배	만 풍	100	52	52.0	

표 19-4. 배 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과수 및 착과율

과 종	교 배 조 합		교배화수	착과수	착과율(%)
	종자친	화분친			
배	감천배	추황배	150	115	76.7
	감천배	만삼길	200	180	90.0
	추황배	선 황	150	150	100
	추황배	조 옥	44	39	88.6
	추황배	취 성	50	46	92.0
	추황배	원 황	150	44	29.3
	추황배	신 일	150	75	50.0
	추황배	장십량	100	87	87.0
	추황배	수황배	150	112	74.7
	추황배	만 풍	150	70	46.7
	추황배	감천배	150	111	74.0
	추황배	미 황	150	67	44.7
	추황배	만 수	100	48	48.0
	추황배	만삼길	200	190	95.0
	미 황	미니배	100	48	48.0
	미 황	선 황	150	71	47.3
	미 황	원 황	150	110	73.3
	미 황	신 일	100	36	36.0
	미 황	수황배	200	138	69.0
	미 황	화 산	150	4	2.6
	미 황	만 풍	100	58	58.0
	미 황	감천배	150	82	54.7
	미 황	추황배	150	124	82.7
	만 수	미니배	100	49	49.0
	만 수	선 황	100	55	55.0
	만 수	원 황	150	51	34.0
	만 수	조생황금	100	70	70.0
	만 수	신 일	100	38	38.0
	만 수	장십량	150	76	50.7
	만 수	수황배	150	93	62.0
	만 수	화 산	150	3	2.0
	만 수	감천배	150	13	8.7
만 수	추황배	150	127	84.7	
만 수	미 황	150	13	8.7	

※ 수정율 5% 이하의 교배조합은 불화합성으로 판단됨

표 20. 사과 주요 육성품종별 교배조합에 따른 착과수 및 수정율(2년차)

과 중	교 배 조 합	교 배 화 수	착 과 수	수 정 율(%)
사과	후지×Akagi(S ₃ S ₇)	100화	54	54
	후지×Gala(S ₂ S ₅)	100화	89	89
	후지×Jonadel(S ₉ S _e)	100화	48	48
	후지× 축(S _f S _g)	100화	94	94
	쓰가루×Akagi(S ₃ S ₇)	90화	3	3.3
	쓰가루×Gala(S ₂ S ₅)	90화	78	86.6
	쓰가루×Jonadel(S ₉ S _e)	90화	83	92.2
	쓰가루× 축(S _f S _g)	90화	86	95.5
	세계일×Akagi(S ₃ S ₇)	120화	52	43.3
	세계일×Gala(S ₂ S ₅)	120화	114	95
	세계일×Jonadel(S ₉ S _e)	120화	60	50
	세계일× 축(S _f S _g)	120화	108	90
	국광×Akagi(S ₃ S ₇)	80화	77	96.3
	국광×Gala(S ₂ S ₅)	80화	34	42.5
	국광×Jonadel(S ₉ S _e)	80화	72	90
	국광× 축(S _f S _g)	80화	41	51.3
	Wellington×Akagi(S ₃ S ₇)	100화	96	96
	Wellington×Gala(S ₂ S ₅)	100화	86	86
	Wellington×Jonadel(S ₉ S _e)	100화	61	61
	Wellington× 축(S _f S _g)	100화	54	54
	추광×Akagi(S ₃ S ₇)	100화	94	94
	추광×Gala(S ₂ S ₅)	100화	96	96
	추광×Jonadel(S ₉ S _e)	100화	90	90
	추광× 축(S _f S _g)	100화	49	49
	서광×Akagi(S ₃ S ₇)	150화	138	92
	서광×Gala(S ₂ S ₅)	150화	63	42
	서광×Jonadel(S ₉ S _e)	150화	145	96.6
	서광× 축(S _f S _g)	150화	130	86.6
	화랑×Akagi(S ₃ S ₇)	120화	70	58.3
	화랑×Gala(S ₂ S ₅)	80화	77	96.3
	화랑×Jonadel(S ₉ S _e)	80화	50	62.5
	화랑× 축(S _f S _g)	100화	91	91

※ 수정율 5% 이하의 교배조합은 불화합성으로 판단됨

다. 수분수에 따른 품종의 형질조사

수분수에 따른 과실의 형질을 조사하기 위해 이면교배 및 착과율을 조사하였다(표 21). 그리고 2001년도에 교배조합을 작성하여 교배한 과실의 특성 및 호르몬 함량 변화를 조사한 결과를 표 22, 23, 24에 나타냈다. 배에서 영산배(S₃S₅)와 장십랑(S₂S₃)을 교배하였을 때 수정율이 36.2%로 낮았지만 과중이 590g으로 가장 무거웠으며, 당도 역시 14.4로 높았다. 그리고 신고(S₃S₉)와 이십세기(S₂S₄)는 수정율이 91.8%로 높게 나타났으며, 당도가 14.9로 매우 높았다. 현재 재배가 늘고 있는 황금배(S₃S₄)와 이십세기(S₂S₄)를 교배하였을 때 수정율과 과중은 낮게 나타났지만 당도가 14.9로 매우 높게 나타났다. 그리고 배는 수분수에 따른 시기별 과실 내 호르몬 함량 변화 결과 IAA는 분리되는 후대의 S-genotype이 많을수록 함량이 높았다(약 2배). 사과에서는 후지(S₁S₉)와 세계일(S₃S₉)을 교배하였을 때 수정율은 51.3%으로 낮았지만 과중은 350g으로 무거웠으며 당도 역시 15로 높게 나타났다. 홍로와 후지(S₁S₉)는 수정율, 과중, 당도 모두가 현저하게 낮게 나타났다. 또한 S-genotype별로 교배조합을 작성하여 착과율 및 채종립수를 조사하였다. (표 25, 26).

표 21. 사과, 배 수분수 품종에 따른 착과수 및 수정율(1 차년도)

과 종	교배조합	교배화수	착 과 수	수정율(%)
사과	홍로(S ₇ S ₇)×후지(S ₁ S ₉)	120 화	65	54.2
	홍로(S ₇ S ₇)×추광(S ₇ S ₇)	82 화	44	53.7
	홍로(S ₇ S ₇)×감홍(S ₉ S ₇)	34 화	19	55.9
	서광 × 후지	150 화	75	50.0
	서광 × 홍로	90 화	47	52.2
	서광 × 감홍	100 화	30	30
배	장십랑(S ₂ S ₃)×신수(S ₄ S ₅)	150 화	140	93.3
	장십랑(S ₂ S ₃)×원황(S ₃ S ₄ ?)	150 화	143	95.3
	장십랑(S ₂ S ₃)×이십세기(S ₂ S ₄)	66 화	61	92.4
	황금배 × 이십세기	250 화	192	76.8
	황금배 × 장십랑	722 화	340	47.1
	추황배 × 장십랑	354 화	150	42.4
	수황배 × 장십랑	500 화	258	71.5
	수황배 × 조생적	200 화	146	73
	영산배 × 장십랑	420 화	152	36.2

표 22. 배 수분수 품종에 따른 과실특성(2 차년도)

교배조합	수정율 (%)	과중 (g)	당도 (°Bx)	산도 (%)	종자수 (개/과)	천립중 (g)
장십랑 × 신수	93.3	420	13.9	0.11	3.7	49.8
장십랑 × 원황	95.3	435	13.4	0.14	4.8	46.7
장십랑 × 이십세기	92.4	234	11.8	0.20	1.4	50.2
황금배 × 이십세기	76.8	320	14.9	0.15	5.2	34.8
황금배 × 장십랑	47.1	330	14.4	0.13	6.9	36.2
추황배 × 장십랑	42.4	408	15.0	0.16	7.4	43.6
수황배 × 장십랑	71.5	356	13.4	0.07	7.8	37.2
수황배 × 조생적	73	320	12.8	0.10	6.0	42.6
영산배 × 장십랑	36.2	590	14.4	0.12	6.5	60.6
신고 × 추황배	90.2	350	13.2	0.10	8.1	45.0
신고 × 만삼길	92	390	13.2	0.16	3.4	52.9
신고 × 신흥	56.4	410	12.8	0.14	5.2	52.2
신고 × 이십세기	91.8	430	14.9	0.13	3.1	52.9
단배 × 행수	64.3	240	10.5	0.24	1.7	50.5

※ 과실 형질조사는 숙기, 과중, 당도, 육질, 품질, 저장성 등을 농촌진흥청 시험연구 조사기준표에 준하여 조사함.

표 23. 배 수분수에 따른 시기별 과실내 호르몬 함량 변화 (단위 : µg/g Fw)

S 인자형 조합	DAFB ²	IAA	Zeatin riboside	GA			ABA
				GA ₃	GA ₄	GA ₇	
S ₂ S ₃ ×S ₂ S ₄ (장십랑×이십세기)	75	-	0.370	0.670	-	1.660	0.515
	150	0.110	-	2.540	-	0.710	2.911
S ₂ S ₃ ×S ₃ S ₄ (장십랑×원황)	75	-	0.150	0.780	-	0.300	0.494
	150	0.094	0.040	1.280	-	0.180	1.614
S ₂ S ₃ ×S ₄ S ₅ (장십랑×신수)	75	-	-	0.650	-	0.330	0.589
	150	0.203	-	1.250	0.100	0.220	1.039

² DAFB : 만개후 시료채취시기까지의 일수, 장십랑 만개일 4월 21일, 수확일 9월 21일.

표 24. 사과 수분수 품종에 따른 과실특성(1 차년도)

교배조합	수정율 (%)	과중 (g)	당도 (°Bx)	산도 (%)	종자수 (개/과)	천립중 (g)
홍로 × 후지	54.2	280	14.6	0.24	7.8	60.3
홍로 × 추광	53.7	300	14.4	0.25	8.4	49.1
홍로 × 감홍	55.9	324	11.3	0.12	7.8	54.2
서광 × 후지	50.0	300	13.3	0.14	5.7	45.2
서광 × 홍로	52.2	295	12.1	0.18	2.4	49.3
서광 × 감홍	30.0	340	13.3	0.09	7.3	51.4
후지×모리스	84.4	300	14.0	0.19	6.2	48.3
후지×세계일	51.3	350	15.0	0.18	7.9	57.6
새나리 × 후지	92.0	314	12.2	0.24	2.8	50.2
새나리 × 쓰가루	63.2	320	13.7	0.14	2.5	52.6

표 25. 배 수분수에 따른 품종의 형질조사를 위한 교배조합(2 차년도)

교 배 조 합	교배화수(화)	착과수(과)	착과율(%)	채종립수(립)
장십랑(S ₂ S ₃) × 이십세기(S ₂ S ₄)	124	42	33.9	80
장십랑(S ₂ S ₃) × 풍 수(S ₃ S ₅)	100	60	60	283
장십랑(S ₂ S ₃) × 군총조생(S ₁ S ₅)	116	75	64.7	225
풍 수(S ₃ S ₅) × 장십랑(S ₂ S ₃)	98	94	95.9	280
풍 수(S ₃ S ₅) × 군총조생(S ₁ S ₅)	104	104	100	436
풍 수(S ₃ S ₅) × 이십세기(S ₂ S ₄)	109	71	65.1	357

표 26. 사과 수분수에 따른 품종의 형질조사를 위한 교배조합(2 차년도)

교 배 조 합	교배화수 (화)	착과수 (과)	착과율 (%)	채종립수 (립)
쓰가루(S ₃ S ₇) × 홍옥(S ₇ S ₉)	66	34	51	238
쓰가루(S ₃ S ₇) × Golden Del.(S ₂ S ₃)	130	43	33	86
쓰가루(S ₃ S ₇) × Ontario(S ₁ S ₈)	16	2	12	15
혜(S ₂ S ₉) × 갈라(S ₂ S ₅)	158	57	36	218
혜(S ₂ S ₉) × 세계일(S ₃ S ₉)	50	16	32	42
혜(S ₂ S ₉) × Ontario(S ₁ S ₈)	126	87	69	435

4. 고찰

사과, 배는 배우체형 자가불화합성 성질을 지니고 있으므로 수분수의 역할이 매우 크다고 할 수 있다. 더욱이 '신고', '후지' 품종의 편중 재배가 심화되고 있는 국내 실정에서는 적절한 수분수의 선발 및 배치가 정형과 생산 및 과실의 품질에 영향을 미치는 중요한 요소임에도 불구하고 그 역할이 간과되어왔다.

본 연구에서는 염기서열 정보와 PCR-RFLP 분석에 의해 사과, 배 품종의 자가불화합성 유전자형을 결정하였으며, 자가불화합성 정보를 이용하여 이면교배 후 화분관 검경 및 양적·질적 형질을 조사하였다. 배 품종 중 현재 가장 많이 재배되고 있는 신고(S₃S₉)의 수분수로는 이십세기(S₂S₄), 추황배(S₄S₆), 만삼길(S₅S₇)이 적합하며, 장십랑(S₂S₃)의 수분수로는 군총조생(S₁S₅), 청실리(S₅S₁₀)가 적합하였다. 영산배(S₃S₅)에는 장십랑(S₂S₃)이 적합하였으며, 그 외 신육성 품종에 관하여 교배 조합에 따른 착과율을 조사하였다. 그리고 화분 채취용 배 품종으로는 추황(S₄S₆), 행수(S₄S₅), 풍수(S₃S₅), 감천(S₃S₅) 등이 적합하였다. 사과품종에서는 후지(S₁S₉)에 세계일(S₃S₉), 홍옥(S₇S₉), 쓰가루(S₃S₇) 등을 수분수로 사용하는 것이 좋았으며, 골든델리셔스(S₂S₃)에는 홍옥(S₇S₉), 인도(S₂₀S₇)가 수분수로 적합하였다. 또한 델리셔스(S₉S₇)에는 골든델리셔스(S₂S₃), 서광에는 쓰가루(S₃S₇), 감홍에는 홍월, 홍로에는 추광이 수분수로 적합하였다. 그러나 화분이 없거나 적은 배 품종(황금배, 영산배, 신고)과 사과 품종(조나골드, 육오, 와인애플)들은 수분수로 사용하기에 적합하지 않았다.

본 연구를 통하여 사과, 배 품종의 화분관 검경 및 이면교배에 의한 교배친화성 검정 결과(착과수 및 수정율)가 PCR-RFLP 방법에 의해 동정된 자가불화합성 유전자형과 상관이 높다는 것을 알 수 있었으며, 이들 결과로부터 각 품종의 최적 수분수를 예측할 수 있게 되었다. 향후 이러한 결과를 바탕으로 매실, 복숭아, 살구, 및 자두 등 핵과류의 자가불화합성 S 유전자형을 구명함으로써 육종 및 품질 향상에 일익이 되기를 기대한다.

제 7 절 자가 불화합성을 이용한 S-호모접합체의 선발

1. 서 론

배, 사과는 자가수분하여도 수정이 일어나지 않거나 종자가 맺지 않는 현상을 나타내는 자가불화합성(Self-incompatibility) 식물이다(de Nettancourt, 1977). 상호보완성이 있는 2개의 기본집단으로부터 뇌수분(bud pollination)에 의해 자식계통을 육성하면 자식약세와 함께 동형성이 증가한다. 매 세대 원예적 형질에 대하여 선발하고, 자식(selfing)하는 과정을 계속하여 동형성(homozygosity)이 매우 높은 근교계(inbred line)를 얻는다. 이들 근교계간의 가능한 한 많은 조합을 작성하여, 그 작성된 조합들을 포장에 재배, 조합능력을 검정하여 최고로 우량한 조합을 찾아낸다. 최고로 우량한 조합은 뇌수분 혹은 고농도 탄산가스 처리로 자가불화합성을 극복하여 자식종자를 채종한다. 채종포에는 자가불화합성이나 상호 화합성이 높으며 조합능력이 우수한 양친을 교호(alternate planting)로 심어 방임수분으로 일대잡종(F1 hybrid)을 채종한다. 이렇게 하여 새로운 우량품종을 육성하게 된다. 본 연구진의 새로운 품종을 육성하기 위해 뇌수분을 이용하여 호모개체를 육성하였으며, PCR-RFLP법에 의해 호모개체를 선발하였다.

2. 연구재료 및 방법

가. 연구재료

자가불화합성(S) 호모접합체를 육성 및 선발하기 위해 배 7품종[팔달($S_4S_?$), 미상(S_4S_6), 신세기(S_3S_4), 신흥(S_4S_9), 조생적(S_4S_5), 행장(S_4 , S_2 or S_9), 화홍(S_4 , S_2 or S_9)]과 사과 4품종 Gala(S_2S_5), Akagi(S_3S_7), Wellington(S_8S_9), Megumi(S_2S_9)를 공시하였다.

나. 뇌수분에 의한 S-호모접합체 육성

자가불화합성은 자가수정을 억제하기 위한 식물의 자가면역 현상이다. 자가불화합성을 나타내기 위해서는 불화합성 유전자의 유전물질(S-RNase)이 생성되어야 한다. 불화합 물질이 가장 왕성하게 생성되는 시기는 개화시기이다. 하지만 어린 꽃망울이나 이미 시들은 노화(老花)에서는 불화합 물질이 없다. 따라서 꽃망울이

나 노화에서는 자가수분하면 화분이 발아하여 정상적으로 화분관이 신장해 들어
가 수정하여 씨를 맺는다. 이와 같이 자가불화합 식물에서 꽃망울이나 노화에서는
자가 가임성을 나타내는 현상을 위임성(pseudo-fertility)이라 한다. 육종이나 소규모
원종 증식에서는 자가불화합성을 회피하여 꽃망울(花雷, bud) 상태에 자가수분
하여 자식종자를 얻는다. 본 연구진은 개화 전후의 일정한 시기에 따라 뇌수분을
실시하여 호모접합체를 육성하였다(표 27).

다. PCR-RFLP법에 의한 S-호모접합체 선발

자식 후 얻어진 자식계통의 엽 1g를 채취하였으며, CATB법을 응용하여
Genomic DNA을 추출하였다. 추출용액은 먼저 페놀과 클로로포름으로 정제하였
다. 배의 S-RNase 관련 primer YFQFTQ과 anti-I/TIWPNI/V를 이용하여 PCR
증폭반응을 실시하였다. PCR 증폭은 pre-denature 1 cycle (94°C, 5분),
annealing 30 cycle (94°C, 1분; 54°C, 2분; 72°C, 3분), post-extension 1 cycle (72
°C, 7분)의 조건으로 실시하였다. 단편의 크기가 비슷한 PCR 증폭산물은 S-allele
특이적인 제한효소를 처리하여 S-호모접합체를 선발하였다.

3. 연구결과

가. 배 품종의 S-호모접합체 육성 및 선발

7개의 배 품종을 자식하였다(표 27). 그러나 '팔달'은 자가불화합성이 매우 강
하여 자식 종자를 전혀 얻지 못하였으며, '조생적', '행장', '화홍'은 자식종자를
얻었지만 종자 결실율이 매우 낮았으며 모두가 S-헤테로접합체(S-heterozygote)
이었다. 그러나 '미상', '신세기', '신홍'에서 S-호모접합체(S-homozygote)를 얻을
수 있었다. S-호모접합체 선발은 자식 후 얻어진 계통을 PCR-RFLP법에 의하여
실시하였다(그림 32). '미상'은 자가불화합성 유전자가 S₄S₆으로 S₄-allele의 특이
적인 제한효소 *NdeI*과 S₆-allele의 특이적인 제한효소 *HinCII*를 처리하여 선발하
였다. 자식 계통 30(S₄S₆)은 S₄⁻, S₆-allele 특이적인 제한효소에 의해 소화되었기
때문에 S₄⁻, S₆-allele를 모두 가지고 있는 S-헤테로접합체이었다. 그러나 32은
S₆-allele, 39와 49는 S₄-allele의 각각 한 개의 S-allele 특이적인 제한효소에 의해
소화되었다. 그러므로 32(S₆S₆), 39(S₄S₄), 49(S₄S₄)은 단일유전자인 호모접합체로
결정하였다. '신세기'(S₃S₄)의 자식계통에서는 62(S₃S₄)는 S-헤테로접합체이고,

74(S₄S₄), 77(S₄S₄), 95(S₃S₃)는 S-호모접합체로 결정되었다. 그리고 '신흥'(S₄S₉)은 S₄-allele와 S₉-allele의 PCR 증폭산물의 크기의 차이가 많이 나기 때문에 제한효소 처리하지 않고도 호모성과 헤테로성을 구분할 수 있었다. 111, 123, 158, 161, 170은 자불화합성 유전자형이 S₄S₉인 S-헤테로접합체이며, 114, 126, 133은 S₉S₉, 122은 S₄S₄인 S-호모접합체이었다.

표 27. 배 품종의 자가수분에 의한 S-호모접합체 육성 및 선발

품종명	교배조합	S-genotype	자식에 의해 얻어진 계통
팔달(S ₄ S ₇)	압리× 이십세기	-	-
미상(S ₄ S ₆)	-	S ₄ S ₆	봉2, 뇌7, 개3, 노4
		S ₄ S ₄	뇌3, 뇌6, 뇌16, 뇌17
신세기(S ₃ S ₄)	이십세기× 장십랑	S ₆ S ₆	봉1, 봉4, 뇌15, 뇌18, 개2, 노1, 노2, 노3
		S ₃ S ₄	개1, 망1, 망4, 망7, 망10, 망20, 망21, 망22, 망23, 망24, 망25, 망36, 망39, 망42, 망43, 망44, 망45, 망46
		S ₃ S ₃	뇌1, 뇌3, 망33
신흥(S ₄ S ₉)	이십세기 우연실생	S ₄ S ₄	망11, 망12, 망13, 망14, 망15, 망16, 망17, 망18, 망19, 망26, 망27, 망28, 망29, 망30, 망31, 망32, 망34, 망35, 망37, 망38, 망40, 망41, 망47, 망48
		S ₄ S ₉	봉1, 봉2, 봉3, 봉11, 봉13, 봉15, 봉18, 봉21-1, 봉21-3, 봉21-5, 봉21-6, 봉21-7, 뇌3, 뇌6, 개7, 개12, 개13, 개15, 개16, 노3, 노6, 노7
		S ₄ S ₄	봉12, 봉14, 봉21-8, 뇌1, 뇌2, 뇌4, 뇌5, 뇌7, 개2, 개3, 개6, 개10, 개11, 노2, 노5, 노8
신흥(S ₄ S ₉)	이십세기× 압리	S ₉ S ₉	봉4, 봉7, 봉10, 봉16, 봉21-4
		S ₄ S ₅	조생적1
조생적(S ₄ S ₅)	우연실생	S ₄ S ₅	조생적1
행장(S ₄ , S _{20r} S ₉)	우연실생	hetero	봉1
화홍(S ₄ , S _{20r} S ₉)	이십세기× 압리	hetero	봉1

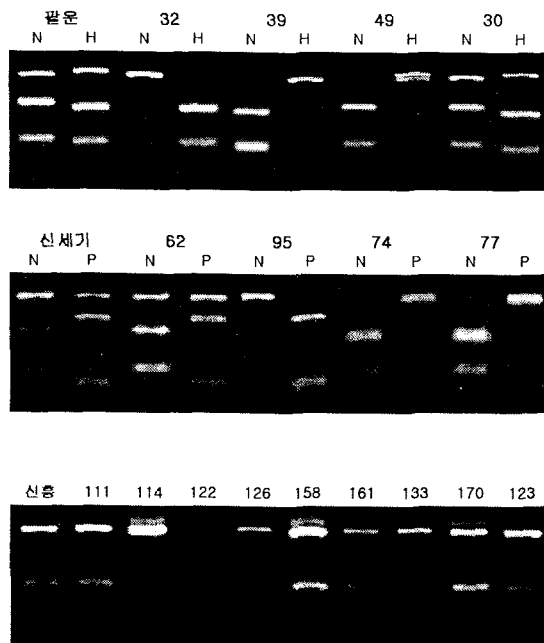


그림 32. PCR-RFLP에 의한 배의 S-호모접합체 선발

나. 사과 품종의 S-호모접합체 육성 및 선발

사과 4품종을 뇌수분에 의해 자식하였다(표 28). Gala(S₂S₅), Akagi(S₃S₇), Wellington(S₈S₉)에서는 자식종자를 얻지 못하였다. 그러나 Megumi에서 자식종자를 얻을 수 있었으며, 원교 5(S₂₂)와 원교 7(S₉S₉)의 단 2개의 S-호모접합체를 얻을 수 있었다.

표 28. 사과 품종의 자가수분에 의한 S-호모접합체 육성 및 선발

품종명	교배조합	S-genotype 자식에 의해 얻어진 계통	
Gala(S ₂ S ₅)	우연실생	-	-
Akagi(S ₃ S ₇)	Golden Delicious(S ₂ S ₃)×?	-	-
Wellington(S ₈ S ₉)	우연실생	-	-
Megumi(S ₂ S ₉)	Ralls Janet × Jonathan	S ₂ S ₉	원교 12, 원교 14,
		S ₂ S ₂	원교 5
		S ₉ S ₉	원교 7

4. 고찰

사과, 배는 오랜 재생산 주기와 큰나무 규모의 강한 heterozygosity의 성격을 나타낸다. 이러한 이유로 재래적 방법에 의해 유전적 개량은 field 실험을 위한 공간의 한계와 시간이 많이 걸리는 문제점을 안고 있다. 그러나 본 연구진은 새로운 우량품종을 육성하기 위해 뇌수분을 통하여 배 7품종과 사과 4품종을 자식 (selfing)하였으며, 자식으로부터 얻어진 자식계통을 PCR-RFLP법에 의해 배 4 S-호모접합체와 사과 1 S-호모접합체를 신속하고 정확하게 선별할 수 있었다. 그리고 사과품종에서 'Megumi'는 'Ralls Janet'과 'Jonathan'을 교배하여 얻어진 유전적 돌연변이가 아닌 자가화합성 유전자형이 S_2S_9 이고, 24~88.6%로 높은 자가결실성을 가진 자가화합성 품종이었다(Matsumoto et al., 1999). 그래서 'Megumi'에서는 호모접합체를 얻을 수 있었으나 자가불화합성인 세 품종에서는 호모접합체를 얻을 수가 없었다. 배 품종 역시 자가불화합성 정도가 강한 품종에서는 호모 접합체를 얻을 수가 없었다. 그렇지만 배 품종은 사과 품종에 비해 호모개체를 더 많이 선별할 수 있었다. 그 이유는 불화합성 정도의 차이에 의한 것이라고 볼 수 있었다. Hofer와 Lespinasse, (1996)는 호모접합체를 얻기 위해 사과로부터 약배양과 소포자 배양 그리고 미숙한 배낭의 기내배양 등의 방법을 이용하여 haploids를 유도하는 실험을 하였다. 세포학적 분석은 유도된 배낭과 신초의 사이의 배수성 수준의 분포를 나타냈다(Hofer 1997). 그래서 homozygosity의 조사는 최우선적으로 이루어져야 한다. 사과에서 약 배양도 미숙한 자엽과 배낭을 이용한 기내배양 등에 의해 유도된 Haploids는 isozymes법을 이용하여 zygoty의 특성을 설명하였다(Hofer et al., 2002). 그리고 homozygosity을 포괄적으로 설명하기 위해서 simple sequence repeat(SSRs)의 분석을 하였다. 하지만 약 배양도 자엽과 배낭을 이용한 기내 배양에 의해 만들어진 반수체 식물은 재순화 과정에서 환경에 대한 적응이 매우 약하여 많이 실패하였다. 하지만 뇌수분에 의해 얻어진 자식계통의 종자들은 쉽게 발아하고 생육이 활발하게 이루어졌다. 그리고 isozyme, SCAR maker, random amplified polymorphic DNA(RAPD) maker 그리고 SSR maker를 이용하여 homozygosity을 선별하는 것에 비해 본 연구진에 의해 개발된 PCR-RFLP법을 이용하여 homozygosity을 선별하는 것이 보다 신속하고 정확하며 효율적이었다.

여 백

제 8 절 자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP에 의한 배와 사과의 속간 교잡후대 선발

1. 서 론

속간 교잡육종(breeding by generic-hybridization)은 원연간 교잡을 하여 그 후대에 나타나는 폭넓은 변이 중에서 신종을 선발하여 육성보급하기 위한 육종방법이다. 또한 속간교잡은 품종간 교잡에서 얻을 수 없는 새로운 유전자형을 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 속간교잡은 종자를 얻기가 어렵고, 잡종후대를 양성하기도 어려우며, 양친의 계놈이 다르기 때문에 염색체가 서로 대합하여 유전자를 교환하기가 매우 어려운 문제점을 갖고 있다. 많은 연구자들이 많은 작물에서 원연 교잡으로부터 잡종을 개발하였으며, 이때 생기는 문제점들을 보고하였다(McCray, 1933; Oka, 1957; Oka, 1962; Stebbins, 1958; Phillips, 1977; Zeven, 1981). 일본 배와 사과의 속간교잡은 Shimura 등(1980), Banno 등(1994), Sakurai와 Shimura(1994), 및 Sakuma(2000) 등에 의해 보고되었다. Shimura 등(1980)은 속간의 F1 종자를 얻었다고 보고하였다. 그러나 종자에서 잡종 치사성을 나타냈기 때문에 성숙한 잡종은 얻지 못하였다. 그래서 Sakurai와 Shimura(1994)은 일본 배와 사과의 속간교잡을 할 때 교잡 치사성을 극복하기 위해 4 배체의 일본 배 'Tosanishiki' 와 4배체의 사과 'NYE-60'을 교배하였으며, 'NYE-60'×'Tosanishiki'의 조합으로부터 후대 묘목을 얻는데 성공하였다. 그리고 Banno 등(1994)은 일본 배('Osa-Nijisseiki', 'Kikusui', 'Kosui')와 사과('Tsugaru', 'Orin', 'Fuji')의 속간 교잡에 의해 발생한 미성숙한 배(embryo)를 배양하여 대략 100개 정도의 묘목을 얻었다. 이것들은 일반적으로 모본의 영향을 받은 것으로 밝혀졌지만 양쪽의 영향을 받은 몇 개의 개체는 육성되었다. 그러나 DNA 분자적 marker에 의해 속간잡종임을 확인하지는 못했다. Rudenko(1979)는 여러 가지 배수성을 가진 모과(quince)×사과(apple)와 사과(apple)×배(pear)의 잡종을 얻었으며 과실의 표현형을 평가하였다. Xiang(1994년)은 사과 근경에 접을 붙여서 사과와 중국배의 잡종을 얻고 미성숙한 식물을 얻었다.

본 연구는 배의 신선한 맛과 사과의 당도, 향기, 적색과피, 장기저장성 등 유용한 유전자가 조합된 새로운 과실을 육종하기 위하여 배와 사과를 상호교잡하여

속간잡종을 육성하였다. 잡종 실생의 엽으로부터 DNA를 추출하여 자가불화합성 유전자를 이용한 PCR-RFLP법과 random primer를 이용한 RAPD법에 의해 배와 사과속의 속간 교잡후대를 선발하였다.

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료 및 교배

속간잡종을 얻기 위해 4 품종의 배 'Chuwhangbae'(S₄S₆), 'Whangkeumbae'(S₃S₄), 'Nijisseki'(S₂S₄) 및 'Yakumo'(S₄S₆)와 2 품종의 사과 'Fuji'(S₁S₉)와 'Tsugaru'(S₃S₇)를 사용하였다. 교배 조합은 표 29와 같이 작성하였으며, 모친으로 사용하는 꽃눈은 수술을 제거하고 약 1년 정도 -20℃에 보관된 부친의 꽃가루를 이용하여 수분을 실시하였다. 수분된 꽃은 수분 후 즉시 방수처리가 된 종이커버를 덮어씌웠다. 결실율은 수분 후 60일 이내에 측정하였으며, 150일 후에는 과실을 수확하였다. F1 종자는 5℃에서 120일 동안 젖은 모래 속에 보관하였다.

표 29. 속간잡종을 얻기 위한 사과, 배의 교배 조합

Acc. No.	Cross combination	
	Female parents	Male parents
1	Whangkeumbae(S ₃ S ₄)	Fuji (S ₁ S ₉)
2	Nijisseki(S ₂ S ₄)	
3	Yakumo(S ₄ S ₆)	Tsugaru(S ₃ S ₇)
4	Whangkeumbae(S ₃ S ₄)	
5	Tsugaru(S ₃ S ₇)	Chuwhangbae(S ₄ S ₆)
6	Tsugaru(S ₃ S ₇)	Nijisseki(S ₂ S ₄)

나. F1 묘목의 RAPD 분석

DNA 추출 방법은 cetyl-tri-methyl-ammonium bromide (CTAB) 방법을 응용하였다(Torres et al., 1993). 추출 용액은 phenol, chloroform, PrepMate™정제 Kit(Bioneer, USA)에 의해 정제하여 RAPD 분석에 사용하였다. 19개의 10 bp random primer(Operon technology Inc., 'KIT A')를 이용하여 PCR 증폭 반응을

수행하였다. 반응 용액은 전체 50 μ l속에 2.5mM dNTP mixture, PCR buffer, 2.5U Taq DNA polymerase, 10 pmol primer 및 500 ng genomic DNA를 혼합하였다. 증폭 반응은 3 min at 95 °C, 45 cycles of 1 min at 93 °C, 2 min at 40 °C, 2 min at 72 °C, 및 5 min at 72 °C의 증폭사이클을 이용하였다. 증폭된 단편은 2% agarose gels (NuSieve 3 : 1 agarose)에 전기영동 후 ethidium bromide에 염색하여 분석하였다.

다. 자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP

사과와 배의 S-RNase의 자가불화합성 염기서열은 상동성이 매우 높다. 그래서 본 연구진은 Ishimizu et al., (1999)와 Matsumoto와 Kitahara (2000)논문을 토대로 사과와 배의 S-RNase를 모두 증폭할 수 있는 primer조합을 디자인하였다. Primer는 FTQQYQ (5'-TTT ACG CAG CAA TAT CAT-3')와 ant-¹/MWPN (AC^G/A TTC GGC CAA AT^A/C ATT-5')를 사용하였다. PCR 반응용액(25 μ l)은 25-50 ng 게놈 DNA, 2 U Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 2.5 μ l 10X buffer[100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 2.5 mM dNTP, 0.1 nM primer 등으로 구성되었다. 증폭은 PE-9700 Cyclor (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 실행하였다[pre-denature 1 cycle (94°C, 5분), amplification 30 cycle (94°C, 1분; 54°C, 2분; 72°C, 3분), post-extension 1 cycle (72°C, 7분)]. 증폭된 PCR 산물은 2% Metaphor agarose gel에서 전기영동 후 UV transilluminator상에서 촬영, 분석하였다.

RFLP는 반응용액[8 μ l PCR 산물, 2.5 U 제한효소, 1.5 μ l 10X 완충용액(750 mM KCl, 150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 92.5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol)]을 잘 혼합한 다음 37°C에 5hr 정도 처리하였으며 2% Metaphor agarose gel에 전기영동하고, UV transilluminator상에서 분석하였다. 배의 S-allele 특이적 제한효소 NdeI (S₄), PpuMI (S₃과 S₅), AlwNI (S₅), HincII (S₆)를 처리하였으며 사과는 S-allele 특이적인 primer(표 30)를 사용하여 속간잡종을 검정하였다.

표 30. 사과 S-allele 특이적 PCR 분석을 위한 primer 조합 및 조건

S-allele	Primers	Sequence	PCR program	Size of PCR product (bp)
S ₁	FTC168	5'-ATATTGTAAGGCACCGCCATATCAT-3'	Standard	530
	FTC169	5'-GGTTCGTATTGGGGAAGACGCACAA-3'		
S ₂	OWB122	5'-GTTCAAACGTGACTTATGCG-3'	Standard	449
	OWB123	5'-GGTTTGGTTCCTTACCATGG-3'		
S ₃	FTC177	5'-CAAACGATAACAAATCTTAC-3'	A 57°C	437
	A3PR	5'-ATTGGTGGGGCAGAAAAATG-3'		
S ₉	FTC154	5'-CAGCCGGCTGTCTGCCACTT-3'	Standard	343
	FTC155	5'-CGGTTTCGATCGAGTACGTTG-3'		

3. 연구결과

가. 배와 사과간의 속간 교배

교배 실험 결과, 배 1,060화에 사과 화분을 교배하여 148개 종자를 수확하였다. 평균 착과율은 11.3%였으며 1 과실당 종자수는 4.2개로 배 품종간 조합 또는 사과 품종간 조합에 비해 극히 낮았다. 또한 사과 534화에 배 화분을 교배한 경우는 43개가 착과되었으며, 15개의 종자를 수확하였다(표 31). 사과를 모수로 하는 것보다 배를 모수로 하여 사과 화분을 교배한 경우가 더 높은 착과율과 과실당 더 많은 종자를 수확할 수 있었다.

표 31. 배와 사과의 속간교배에 의한 결실율과 과실당 종자수

Cross combination	Number of flowers pollinated	Fruit set (%)	No. of seed per fruits	No. of seeds harvested
<u>Pear/Apple</u>				
Whangkeumbae/Fuji	306	36(11.7)	3.8	53
Nijisseki/Fuji	309	25(8.1)	5.6	48
Yakumo/Tsugaru	170	25(14.7)	5.1	25
Whangkeumbae/Tsugaru	275	30(10.9)	2.5	22
<u>Apple/Pear</u>				
Tsugaru/Chuwangbae	210	20(9.5)	2	10
Tsugaru/Nijisseki	324	23(7.0)	1	5

교배조합별 종자 발아율은 배를 모수로 한 경우 평균 65.2%, 사과를 모수로 했을 때는 55.0%로 배를 모수로 한 조합이 높았다. 이 결과는 志村의 결과와 유사하나, Berkut가 사과와 서양배 조합에서 발아력이 21.1%라고 한 결과와는 차이가 있었다(표 32). 온실내에서 발아된 잡종 실생은 많은 개체가 발아후 한달내에 고사하였으며 발아 6개월 후에는 배×사과 62개체, 사과×배 8개체만이 남았다. 유묘의 고사에 대한 근본적 원인을 밝혀 낼 수가 없었으나 신초 정부 및 선단부부터 흑변하여 고사하는 것으로 보아 Crane의 보고처럼 뿌리 발육에 장애가 일어나 양분 흡수의 기능이 저하된 것으로 생각된다.

표 32. 속간교배에 의해 수확된 종자의 발아율

Cross combination	Number of seeds tested	No. of seeds germinated	Germination (%)	No. of ^a /seedings survived
<u>Pear/Apple</u>				
Whangkeumbae/Fuji	50	33	66	30
Nijisseki/Fuji	20	5	25	4
Yakumo/Tsugaru	25	20	80	18
Whangkeumbae/Tsugaru	20	18	90	10
<u>Apple/Pear</u>				
Tsugaru/Chuwhangbae	10	5	50	5
Tsugaru/Nijisseki	5	3	60	3

^a Number was counted six months after sowing.

나. RAPD에 의한 속간잡종 선발

본 연구에서는 RAPD 분석을 통하여 F1 실생중 속간잡종을 동정하였다. PCR 산물을 전기영동에 의해 분석한 결과, 배와 사과간에는 67개의 다형성을 보였다. 속간교배에 이용한 배와 사과를 동정하기 위한 primer는 OPA-8 (5'-GTGACGT AGG-3')가 가장 적합하였으며, 6개의 다형성 단편이 증폭되었다(그림 33). 다형성을 나타내는 세 개의 단편들은 배의 특이적인 단편들이었으며, 다른 다형성을 나타내는 세 개의 단편들은 사과의 특이적인 단편들이었다.

그리고 'Whangkeumbae'×'Fuji'와 'Nijisseki'×'Fuji'의 속간 실생은 6개의 다형성을 나타내는 특이적 단편이 증폭되었다. 이것은 속간교배에 사용한 배와 사과의 양친으로부터 모두 이어 받은 것으로 배와 사과의 속간교배에 얻어진 두 개의

속간 실생이 진정한 속간잡종이라는 것을 보여주었다.

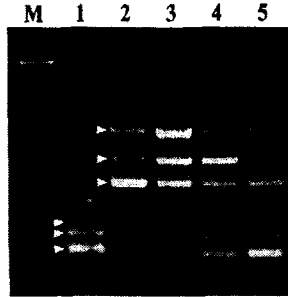


그림 33. 속간교배에 사용한 양친과 두 개의 속간잡종을 primer OPA8에 의한 PCR 증폭반응 후 전기영동에 의해 분석한 것이다. M: HindIII+X174/HaeIII, 1: 배 'Whangkeumbae'(S₃S₄), 2: 사과 'Fuji'(S₁S₉), 3: 사과 'Tsugaru', 4: 'Whangkeumbae'×'Fuji', 5: 'Tsugaru'×'Chuwangbae'.

다. 자가불화합성 유전자의 PCR-RFLP에 의한 속간잡종 선발

6개의 속간 교배조합으로부터 얻은 잡종 실생의 자가불화합성 유전자형을 S-allele 특이적 PCR-RFLP 분석법을 이용하여 결정하였다. 배 품종 'Whangkeumbae'(S₃S₄), 'Nijisseki'(S₂S₄)와 사과 품종 'Fuji'(S₁S₉)의 속간교배에 의해 얻어진 34개 잡종 실생을 'Fuji'(S₁S₉)의 S-allele 특이적 primer로 PCR 증폭하였다. S₁-allele 특이적 primer(FTC168+FTC169)에서 'Fuji'는 약 530 bp에서 단일단편의 증폭산물이 증폭되었으나, 34개의 잡종 실생과 'Whangkeumbae', 'Nijisseki'는 증폭되지 않았다. 또한 S₉ 특이적 primer(FTC154+FTC155)에서는 Fuji와 잡종 실생인 247, 263 및 266에서 약 340 bp에서 단일단편의 증폭산물을 확인할 수 있었다(그림 34). 잡종 실생으로부터 S-RNase를 증폭시킨 결과 S₂-RNase의 크기인 약 1,300 bp의 단편은 증폭되지 않았으나, S₃-과 S₄-RNase로 추정되는 약 370 bp의 단일단편이 증폭되었다. 증폭된 산물을 S₃과 S₄의 특이적 제한효소로 소화한 결과 247, 263 및 266은 배의 S₄-RNase를 포함하고 있었다(그림 35). 사과 S₁-, S₉-allele 특이적 primer에 의해 증폭되지 않았던 후대들을 배 S-RNase 동정용 primer에 의해 속간잡종 후대에서 배의 S-RNase가 증폭되었다. 증폭된 산물은 S-RNase 특이적 제한효소로 소화한 결과, 그림 36과 같이 'Whangkeumbae'의 자식에 의해 S₃과 S₄를 가진 계통(222, 223, 224, 226)과 S₄-

호모접합체(230)가 동정되었으며, 교배과정에서 오염으로 생각되어지는 S₃과 S₄ 이외의 S-RNase가 동정된 개체도 있었다(227, 232). 이상의 결과로 34개의 'Whangkeumbae', 'Nijisseki' × 'Fuji'의 잡종 실생중 247, 263 및 266은 사과 'Fuji'의 S₉-RNase와 배 'Whangkeumbae'과 'Nijisseki'의 S₄-RNase가 교배된 순간 잡종임이 검증되었다.

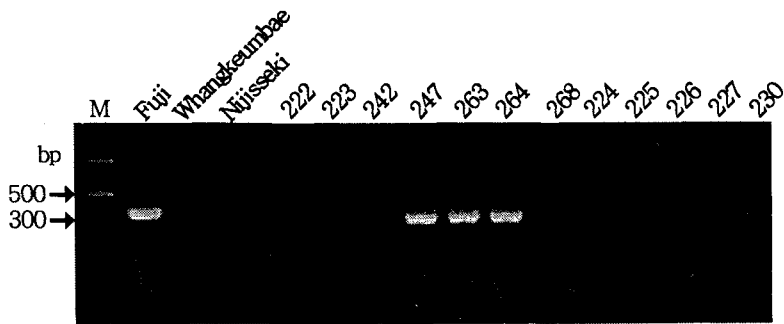


그림 34. 사과의 S₁-, S₉-allele 특이적 primer를 사용하여 배 'Whangkeumbae', 'Nijisseki'와 사과 'Fuji'를 교배한 실생 잡종 후대의 PCR 증폭.

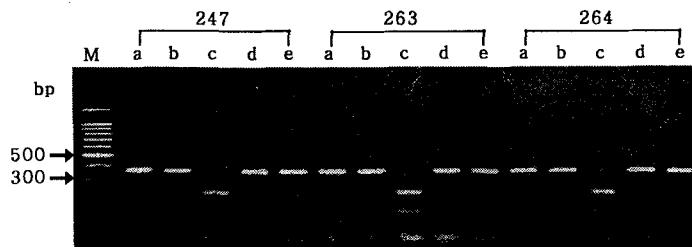


그림 35. S₉-allele 특이적 primer에 의해 증폭된 실생 잡종후대를 배의 S-RNase를 증폭하는 primer(YFQFTQ+anti-¹/₇IWPN¹/_v)로 증폭 후 S-RNase 특이적 제한효로 소화한 결과. a, *Sfi*I (S₁); b, *Ppu*MI (S₃ or S₅); c, *Nde*I (S₄); d, *Mlu*I (S₆ or S₇); e, *Nru*I (S₈)

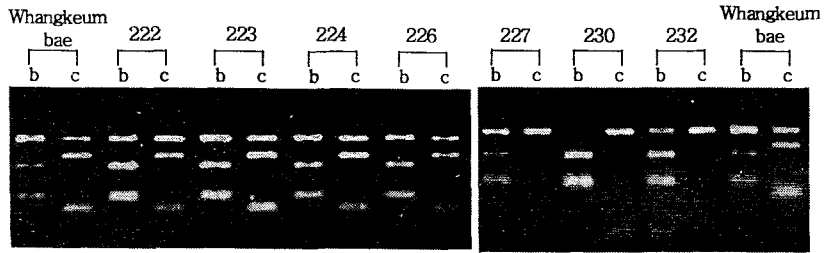


그림 36. 사과 S₁-, S₉-allele 특이적 primer에 의해 증폭되지 않았던 후대들을 배 S-RNase 증폭용 primer로 증폭 후 'Whangkeumbae'의 S₃과 S₄ 특이적 제한 효소로 소화한 결과. b, *PpuMI* (S₃ or S₅); c, *NdeI* (S₄)

배의 'Whangkeumbae' (S₃S₄)와 'Yakumo'(S₄S₆)를 모수로 하여 사과 'Tsugaru'(S₃S₇)의 화분을 교배한 실생 잡종 28개체를 사과 S₃-과 S₇-allele 특이적 primer로 증폭한 결과, 'Tsugaru'는 약 500과 350 bp에서 단일단편이 증폭되었으나 'Whangkeumbae'와 'Yakumo'는 PCR 산물이 증폭되지 않았으며 실생 잡종에서도 증폭된 단편을 확인할 수 없었다.

사과의 'Tsugaru'(S₃S₇)를 모수로 하고 배 'Chuwhangbae'(S₄S₆)과 'Nijisseki'(S₂S₄)의 화분을 교배하였을 때 실생 잡종 15개체를 획득하였다. 'Tsugaru' × 'Chuwhangbae'의 실생 잡종인 10개체에서 S₃-allele 특이적 primer로 PCR 증폭한 결과 254, 256, 261 및 262에서 약 500 bp에서 PCR 산물이 증폭되었으며, S₇-allele 특이적 primer에서는 259, 260, 264, 269, 270 및 274의 실생 잡종 개체로부터 약 350 bp 산물이 증폭되었다(그림 37). 또한 'Tsugaru' × 'Nijisseki' 경우 S₃-allele 특이적 primer에서는 PCR 산물이 증폭되지 않았으며, S₇-allele 특이적 primer에서는 257에서만 약 350 bp의 증폭산물을 얻을 수 있었다. S₃- 또는 S₇-allele 특이적 primer에서 증폭된 속간잡종 개체들의 정확한 S-genotype을 동정하기 위하여 배의 S-RNase를 증폭한 결과, 'Tsugaru' × 'Chuwhangbae' 후대 261과 269에서 'Chuwhangbae'의 S₄-와 S₆-RNase의 크기인 약 350 bp의 단편이 증폭되었다(그림 38).

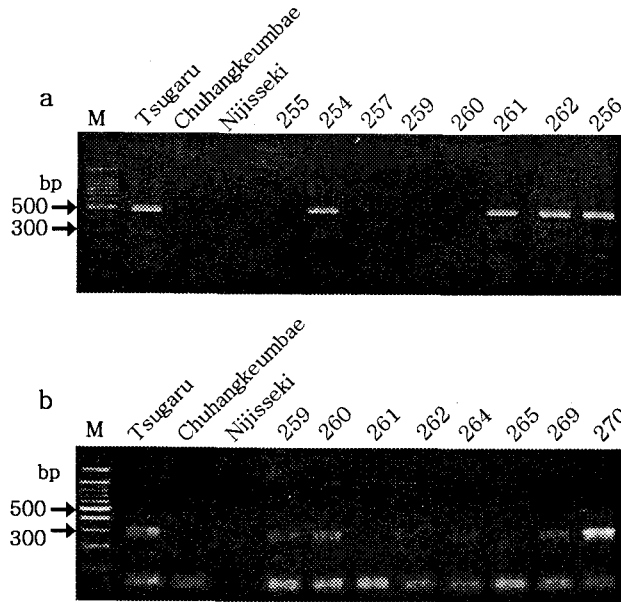


그림 37. 'Tsugaru' × 'Chuwhangbae'의 교배 후대를 S₃-(a)과 S₇-allele(b) 특이적 primer로 PCR 증폭한 결과임.

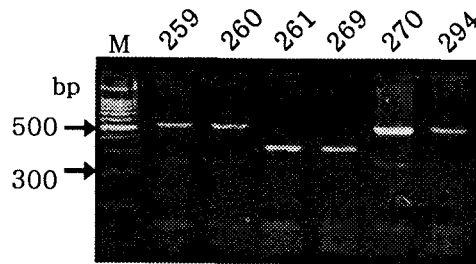


그림 38. 사과 S₃- 및 S₇-allele의 산물이 증폭된 'Tsugaru' × 'Chuwhangbae'의 교배 후대를 배의 S-RNase 검출용 primer로 증폭한 결과. 261 및 269 개체는 약 350 bp의 산물이 검출된 것으로 보아 추황 유래의 S-RNase 유전자 산물로 추정됨.

4. 고찰

배의 신선한 맛과 사과의 당도, 향기, 적색 과피, 장기저장성 등 유용한 유전자를 조합하여 새로운 과실인 “사과-배(사과×배)”를 육성하거나 또는 좋은 형질을 가진 사과에 배의 신선한 맛이나 다른 품종의 꽃가루를 받지 않아도 결실할 수

있는 배 품종인 오사이십세기의 자가화합성을 도입한 “배사과(배×사과)”를 육성하기 위하여 속간교잡을 실시하였다. 더욱이 서로가 각각 상호의 병에 걸리지 않는다고 하는 성질을 이용하여 복수의 병해에 강한 잡종 육성이나 21세기 꿈의 과실 육성을 목표로 배와 사과를 상호 교배하여 수는 극히 작지만 발아된 잡종 종자를 얻었다.

6개의 교배조합('Whangkeumbae'×'Fuji', 'Nijisseki'×'Fuji', 'Whangkeumbae'×'Tsugaru', 'Yakumo'×'Tsugaru', 'Tsugaru'×'Chuhwangbae', 'Tsugaru'×'Nijisseki')으로부터 전통적인 수분에 의해 속간교배를 실시하여 F1종자를 얻었다. 실생 속간잡종들에 있어서 OPA 8 primer를 이용한 RAPD결과는 속간 교배의 양친과 속간잡종을 신속하고 확실하게 구별할 수 있었다. 그러나 속간잡종의 S-genotype을 확실하게 동정할 수 없었으며, 재현성의 유무가 확실하지 않았다.

그러나 자가불화합성 유전자를 이용한 PCR-RFLP법에 의해 속간잡종의 여부와 자가불화합성 유전자형을 결정할 수 있었다. 즉, 배를 모수로 하여 사과를 교배한 경우 속간 실생에서 사과의 S-allele 특이적 primer로 증폭 후 증폭산물의 유무를 통해 속간잡종을 동정하였고, 동정된 속간잡종은 배의 S-RNase를 증폭시킨 후 S-allele 특이적 제한효소로 소화하여 S-genotype을 정확히 동정할 수 있었다. 또한 사과를 모수로 하고 배 화분을 교배한 경우는 속간 실생에서 모수의 S-allele 특이적 primer로 증폭 후 모수의 한 S-allele에서만 증폭된 개체를 다시 배 S-RNase로 증폭시켜 S-RNase 특이적 제한효소로 소화하여 S-genotype를 결정하였다.

F1 종자로부터 실생 전체가 성숙기까지 자라지 못하는 이유 중 하나는 교잡 치사성의 영향으로 볼 수 있다(Inoue et al., in press). 교잡 치사성은 접합체 이전에 수정이 이루어지지 않는 교배불화합의 형태로부터 확실하게 구별할 수 있었다(Ślusarkiewicz-Jarzina와 Zenkteler, 1983; Marubashi와 Nakajima, 1985). 일본 배와 사과의 속간교배에 관하여 Shimura 등(1980), Banno 등(1994), Sakurai와 Shimura(1994) 및 Sakuma(2000) 등이 연구 보고하였다. 그들은 속간교배에 의해 잡종의 많은 F1종자와 실생 및 신초를 얻었으며, 이것은 품종이 아닌 잡종이었다. Sakuma 등(2000)은 3년 동안 많은 배 품종('Kosui', 'Nijisseiki', 'Hosui', 'Chojyuro', 'Shinsei', 'Shinko', 'Nansui')과 사과 품종('Tsugaru', 'Sansa', 'Starking Delicious', 'Kinsei', 'Orin', 'Fuji')을 이용하여 상호간에 교배를 수행하

였다. 그 결과, 성공적으로 속간잡종을 얻을 수 있는 6개의 교배조합 ('Hosui'×'Tsugaru', 'Chojyuro'×'Fuji', 'Shinsei'×'Fuji', 'Shinko' ×'Fuji', 'Sansa'×'Kosui' and 'Sansa'×'Hosui')을 알 수 있었다.

대부분의 연구자는 속간잡종을 얻는 데는 성공하였지만, 분자적 방법을 이용한 속간잡종을 선별하는 연구는 이루어지지 않고 있었다. 그래서 본 연구에서는 RAPD 마커나 자가불화합성의 PCR-RFLP법을 이용하여 속간잡종에 있어서 유묘기에 신속, 정확하게 속간잡종과 S-genotype을 동정하였다. 동정된 배×사과 잡종 3계통과 사과×배 2계통은 결실기에 도달하면 과실의 특성을 조사하여 신 작물로서의 가능성과 육종재료로서의 이용성 등을 조사할 예정이다.

여 백

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구분	연구목표 및 평가의 착안점	달성도 (%)	기여도
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내육성 사과, 배 품종의 공시시료 수집 ○ 이면교배 후 교배친에 따른 화분관 행동 조사 ○ 공시 품종별 교배조합에 따른 착과율 조사 ○ 수분수에 따른 품종의 형질조사 ○ S-RNase 유전자 관련 primer 선발, 합성 ○ PCR-RFLP 분석 ○ DNA 분획단편 분석에 의한 S-genotype결정 ○ S-RNase의 cloning 및 S-RNase의 염기서열 결정 ○ S-RNase의 intron 분석에 의한 S-genotype 결정 	100 0 50 80 100 100 100 100 100	대 소 중 중 대 대 대 대 대
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국외육성 사과, 배 품종 및 계통의 공시시료 수집 ○ 이면교배 후 교배친에 따른 화분관 행동 관찰 ○ 공시 품종별 교배조합에 따른 착과율 조사 ○ 수분수에 따른 품종의 형질조사 ○ 수집시료로부터 DNA 추출 및 정제 ○ S-RNase 유전자 관련 primer 선발, 합성 ○ PCR-RFLP 분석 ○ DNA 분획단편 분석에 의한 S-genotype결정 ○ S-RNase의 cloning 및 S-RNase의 염기서열 결정 ○ 자식에 의한 자식종자 획득 	100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 50	대 대 대 대 대 대 대 대 대 대 중
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 품종간의 이면교배 및 화분관 검경 ○ 품종별 교배 후 결실을 조사 ○ 교배친에 따른 과실의 양적, 질적 형질 조사 ○ 수집시료로부터 DNA 추출, 정제 ○ S-RNase 유전자 관련 primer 선발, 합성 ○ PCR-RFLP 분석 및 Southern blotting ○ S-RNase의 cloning 및 S-RNase의 염기서열 결정 ○ 이면교배와 결실을 조사 결과와 PCR-RFLP분석 및 sequencing 결과에 의한 S-genotype결정 ○ 수분수 적합성검토(수분수 선정) 	100 100 100 100 100 100 100 100 100 90	대 대 대 대 대 대 대 대 대 중~대

구분	연구목표 및 평가의 착안점	달성도 (%)	기여도
최종 평가	○ 사과, 배품종의 S-genotype 결정을 위한 PCR-RFLP 및 PCR-CAPS 시스템 확립	100	대
	○ PCR-RFLP법에 의한 자가화합성 선발법 개발	100	대
	○ 화분관검경 및 이면교배에 의한 교배친화성과 양친의 S-genotype에 따른 형질분석	90	중~대
	○ PCR-RFLP법에 의한 자가결실성 계통 선발법 개발	100	대
	○ PCR-RFLP법에 의한 속간 잡종 선발법 개발	80	중~대
	○ 사과, 배품종의 S-genotype 결정과 적합 수분수 결정	80	중~대
	○ 배 S-호모접합체 선발 및 육성	90	중~대
	○ 배 및 사과간의 속간 잡종 선발 및 육성	90	중~대

제 2 절 관련 분야의 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 배, 사과 품종의 자가불화합성 기구해석의 기초정보를 제공하였음.
- 나. PCR산물을 이용하여 특정유전자의 표현형을 판별하는 기술이 습득되었음.
- 다. 양, 질적 형질과 관련된 분자지표의 탐색법이 터득되었음.
- 라. Cloning 및 sequencing된 S유전자는 아미노산의 비교 분석으로부터 S유전자 특이성을 검토하는데 이용되었음.
- 마. 자가불화합성 유전자 분자지표는 계통, 품종 및 종간의 유연관계를 파악하는데 이용됨.
- 바. S-RNase 유전자 정보는 중 및 품종 특이적 유용 marker gene개발에 의해 유전분석이 가능함.
- 사. PCR-RFLP 및 PCR-CAPS법은 타작물의 자가불화합성 연구에 응용할 수 있음.

2. 경제 · 산업적 측면

- 가. S-RNase 유전자 정보는 우량 신품종육성시의 선발지표로 활용됨.
- 나. S-genotype의 정보에 의해 유묘기에 수분수의 적합성을 판결할 수 있음.
- 다. 품종의 S-genotype 정보는 품종별 꽃가루 은행의 설립을 가능케 함.
- 라. 품종의 S-genotype 정보는 육종연한을 단축시킬 수 있음.

- 마. 품종의 S-genotype 정보는 균일 양질의 배, 사과 생산을 가능케 함
- 바. S-호모접합체는 과실의 브랜드화를 도모함.
- 사. 속간 잡종은 신규과일의 생산 및 보급을 가능케함.

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 가. 수분수별 과실형질의 분석은 재배법 등 환경요인의 영향이 크므로 장년의 반복연구가 요구됨.
- 나. 선발된 S-호모접합체는 수분수로 활용하여 균질한 과실의 생산여부를 검토할 필요가 있음.
- 다. 화분측 자가불화합성 유전자(F-box)를 이용한 PCR-RFLP방법에 의해 S-genotype을 결정하는 기술을 개발할 필요성이 있음.

2. 타 연구에의 응용

- 가. S-RNase 및 F-box 유전자를 이용하여 Prunus속 작물(자두, 앵두, 매실, 아몬드, 살구 및 복숭아 등)의 S-genotype 분석 연구에 응용 됨.
- 나. S-RNase 및 F-box 유전자의 PCR-RFLP 및 PCR-CAPS법은 배우체형 자가불화합성 작물의 유전자원 동정, 평가 및 활용에 응용됨.

3. 기업화 추진방향 및 금후의 활용

- 가. 선발된 S-호모접합체는 화분은행의 소재로 활용될 수 있음.
- 나. 유묘기시에 자가불화합성 유전자형을 조기에 검정하는 S-RNase RFLP기술은 육종현장에 활용할 것임.
- 다. PCR-RFLP에 의한 S-genotype 결정 기술은 자가화합종 선발 및 육성에 활용할 것임.
- 라. PCR-RFLP분석, 염기서열의 결과는 BAC library 작제 및 Microarray 기술을 이용한 자가불화합성 유전자 좌 해석에 활용할 것임.
- 마. S-RNase marker는 배, 사과와 교잡육종시에 후대선발의 지표로 활용할 것임.
- 바. S-genotype 정보는 배, 사과와 수분수 선정에 활용할 것임.
- 사. S-genotype 정보는 품종 및 개체에 분자지표를 특징화시켜 교배를 위한 양친을 작출하거나, 순계를 보전, 유지하는데 활용할 것임.
- 아. S-allele는 형질전환 실험의 donor gene으로서 활용할 것임.

여 백

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 배 및 사과의 자가불화합성 관련 논문 정보 (2001년 이후)

1. Norioka, N., H. Katayama, T. Matsuki, T. Ishimizu, T. Takasaki, T. Nakanishi, and S. Norioka. 2001. Sequence comparison of the 5' flanking regions of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Sex Plant Reprod.* 13: 289-291. Osaka University, Japan.
 - 배에서 S2-, S3-, S5-RNase의 2.8 kp, 4.3 kp, 6.5kp의 Genomic 클론을 염기서열 분석하였다. 이미 5'-말단 영역의 염기서열이 밝혀진 S4-RNase와 비교, 분석한 결과 200 bp 정도의 상동성이 매우 높은 영역이 존재하였으며, 4개의 S-RNase는 cis-조절 요소인 TATA 박스를 모두 가지고 있음을 밝혔다.
2. Castillo, C., T. Takasaki, T. Saito, Y. Yoshimura, S. Norioka, and T. Nakanishi. 2001. Reconsideration of S-genotype assignments, and discovery of a new allele based on S-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars. *Breeding Science.* 51: 5-11. Kobe University, Japan.
 - 일본 배 품종 'Meigetsu'와 'Heiwa'로부터 새로운 자가불화합성 유전자 S₈-RNase를 발견하였으며, PCR-RFLP 분석에 의해 new allele임을 검정하였다. 그리고 S₈-RNase의 아미노산 서열을 결정하여 이미 결정된 7개의 S-RNase들과 비교하였다.
3. Kiyozumi, D., T. Ishimizu, T. Nakanishi, and S. Norioka. 2002. Pollen UDP-glucose pyrophosphorylase showing polymorphism well-correlated to the S genotype of *Pyrus pyrifolia*. *Sex. Plant Reprod.* 14: 315-323. Osaka University, Japan.
 - 배 품종 'Nijisseiki'(S₂S₄)의 화분에서 자가불화합성 유전자와 관련 있는 두 개의 단백질을 발견하였다. 분자량은 약 50 kDa이였으며, 아미노산 서열을 분석한 결과 UDP-glucose pyrophosphorylases(UGPases)와 매우 상동성이 높은 것을

알아냈다. 두 개의 단백질을 UGPases PA와 PC로 명명하였다.

4. Hiratsuka, S., and S. L. Zhang. 2002. Relationships between fruit set, pollen-tube growth, and S-RNase concentration in the self-incompatible Japanese pear. *Scientia Horticulturae*. 95: 309-318. Mie University, Japan.
 - 일본 배 품종을 여러 지역의 연구소에서 자식 후 결실율을 조사한 결과 0.6~15.2%를 나타냈으며, 화분관 신장은 0~39%를 나타냈다. 또한 주두에서 두 개의 S-RNase의 농도를 측정하여 S-RNase 농도와 결실율, 화분관 신장과의 관계를 조사하였다. 각 품종은 S-RNase 농도에 따라 자가불화합성 발현의 차이를 보였다.
5. Sawamura, Y., T. Saito, M. Shoda, T. Yamamoto, Y. Sato, T. Hayashi, and K. Kotobuki. 2002. A new self-incompatible allele in Japanese pear 'Shinse' and 'Shinkou'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 71(3): 342-347. National Institute of Fruit Tree Science, Tsukuba, Japan.
 - 일본 배에서 새로운 primer 조합을 디자인하여 PCR 증폭시킴으로써 새로운 자가불화합성 유전자 S₉-RNase를 'Shinse'와 'Shinkou'에서 발견하였다. S₉-RNase의 염기서열을 결정하였으며, 다른 S-RNase와 비교, 분석하였다.
6. Zuccherelli, S., P. Tassinari, W. Broothaerts, S. Tartarini, L. Dondini, and S. Sansavini. 2002. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sex. Plant Reprod.* 15: 153-158. Universita degli Studi Bologna, Italy.
 - 상업적으로 매우 중요한 10개의 유럽 배 품종과 3개의 일본 배 품종의 자가불화합성 유전자를 cloning, 염기서열을 결정하여 자가불화합성 유전자형을 결정하였다. 또한 교배에 의한 화분관 검경 및 결실율을 분석하여 자가불화합성 유전자형을 검정하였다.
7. Broothaerts, W. 2002. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the renumbering of some S-alleles. *Theor.*

- Appl. Genet. 106: 703-714. K. U. Leuven, Belgium.
- 사과와 자가불화합성 유전자들의 번호를 새롭게 재정립하였으며, 15개의 S-allele의 특이적인 primer도 제시하였다. 또한 새로운 S-RNase(S_{27a}, S_{27b})를 동정하였다.
8. Kitahar, K., and S. Matsumoto. 2002. Sequence of the S₁₀ cDNA from 'McIntosh' apple and a PCR-digestion identification method. HortScience. 37(1): 187-190. Gifu University, Japan.
- 화분관 검경에 의해 'McIntosh'의 자가불화합성 유전자형이 S₁S₂로 동정된 것을 (Komori et al., 1999), PCR법에 의해서 S₁₀S₂₅로 동정하였다(Boskovic and Tobutt, 1999). 본 연구에서는 등은 S₁와 S₁₀유전자의 cDNA 염기서열을 결정하여 비교하였던 바, 서로 같은 동일한 allele임을 확인하였으며, S₁₀-allele 동정용 특이적 제한효소를 제시하였다.
9. Katoh, N., K. Goto, J. Asano, K. Fukushima, K. Yamada, A. Kasai, T. Z. Li, M. Takanoha, K. Miyairi, and T. Okuno. 2002. S-RNase from self-incompatible and -compatible apple cultivars: purification, cloning, enzymic properties, and pollen tube growth inhibitory activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(6): 1185-1195. Hirosaki University, Japan.
- 사과와 자가불화합성 품종 'Staking Delicious'(S_cS_c)와 자가화합성 품종 'Megumi'(S_aS_c)의 주두측으로부터 4개의 S-RNase를 추출하였다. SDS-PAGE와 IEF를 이용하여 RNase의 활성을 조사하였으며, cloning 후 염기서열을 결정하였다. 화분관 신장을 조사하였지만 자가불화합성과 자가화합성 화분을 구별할 수는 없었다.
10. Hofer, M., A. Gomez, E. Aguiriano, J. A. Manzanera, and M. A. Bueno. 2002. Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple. Plant Breeding. 121: 159-162. Institute of Fruit Breeding, Pillnitzer Platz, Germany.
- 사과를 약 배양과 단위생식체를 이용한 조직배양을 통하여 S-동형접합체를 만

들었으며, simple sequence repeats(SSRs)의 방법을 이용하여 특이적인 SSR 마커 23g4, 04h11를 개발하였다.

11. Inoue, E., F. Sakuma, M. Kasumi, H. Hara, and T. Tsukihashi. 2003. Effect of high-temperature on suppression of the lethality exhibited in the intergeneric hybrid between Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) and apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*. Article in press. Ibaraki University, Japan.

- 사과와 배의 속간교잡으로부터 얻어진 속간잡종의 교잡치사성과 온도와의 관계를 분석하였다. 벼, 담배, 목화 등에서는 높은 온도에 의해 교잡치사성을 억제하는 효과를 보였다. 미성숙한 배로부터 얻어진 신초에 고온(34℃)처리결과 치사현상을 나타내지 않았다. 또한 교배에 의한 F1 실생은 고온처리에 의해 80%이상 치사현상을 나타내지 않았다. 사과, 배의 속간잡종의 교잡치사성은 고온처리에 의해 억제된다는 것을 제시하였다.

제 2 절 해외기관의 연구과제 관련 과학기술정보

1. 일본

가. 교토대학

1) Tao 등의 연구그룹

가) 매실의 자가결실성 유전자 S_r -RNase의 유전성 및 자가불화합성과의 관련성 분석

나) 복숭아 S-RNase 유전자(S_1 , S_2 , S_3) 동정 및 다양성 분석

2) Ushijima 등의 연구그룹

가) 아몬드로부터 화분측 자가불화합성 유전자 F-box의 분자구조 및 전사 수준 검토

나) 매실로부터 화분측 자가불화합성 유전자 SFB(=F-box)의 동정

다) 앵두류의 화분측 자가불화합성 유전자 동정

나. 나라선단과학기술대학원대학

1) Isogai 등의 연구그룹

가) 매실 F-box 유전자의 다양성 분석

나) 매실 자가불화합성 유전자좌 분석

다. 요코하마 시립대학

1) 배의 F-box 유전자 동정

2) 배의 주두 특이적 thaumatin/PR5-like 단백질의 cloning, promoter 활성 분석 및 형질전환에 의한 기능분석

라. 동북중요(주)

1) 배추과 작물의 자가불화합성 유전분석 및 PCR-RFLP법에 의한 F1 순도 검정법 개발

2) 무의 S-allele 37종 확보

마. NCSS(중요관리센터)

1) 배 품종의 chloroplast DNA의 유전성 분석

2) *trnL-trnF* 영역 분석에 의한 배 품종의 계통분류

바. 기후대학

1) 사과와 수분수, 계통 및 품종의 S 유전자형 분석

2) 사과 자가불화합성 유전자 S₆⁻, S₁₄⁻, S₁₉⁻ 및 S₂₀-allele의 염기서열분석
사. 아오모리 사과시험장

1) 교배에 의한 사과 품종의 S 유전자형 분석

2) 사과의 과실형질과 Md-ACS1 대립유전자형간의 상관성 분석

아. 히로사끼대학

1) 사과 '후지'의 과실연화 및 관련 유전자의 관련성 검토

자. 동북대학

1) 배추 및 양배추류의 자가불화합성 인식 기구 분석

2) *Raphanus*속과 *Brassica*속간의 자가불화합성 유전자 SRK 및 SP11 비교
분석

차. 과수연구센터

1) 복숭아의 genome mapping

2) 복숭아 AFLP 분석 및 형질관련 분자 마커 탐색

2. 미국

가. California 대학

1) *Sorbus aucuparia* 및 *Crataegus monogyna*의 S-allele 다양성 분석

2) 고등식물의 수분 및 수정 기구

나. Cornell 대학

1) 배추과 작물의 자가불화합성 기구 분석(receptor-ligand signaling 및
cell-to-cell communication)

2) 식물생식에 있어서 자가인식 및 거절반응의 기구 분석

다. Pennsylvania 주립대학

1) *Campanula rapunculoides*(초롱꽃과)로부터 자가 음성 관련 변형유전자의
유전성 분석

라. Duke 대학

1) *Physalis longifolia*(가지과)의 자가불화합성 유전자 좌의 분자적 진화분
석

마. Colby 대학

1) 배우체형 자가불화합성 타과를 위한 분자기구 분석

3. 유럽

가. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Spain.

- 1) SSR 및 AFLP 마커에 의한 살구(*Prunus armeniaca* L.) F2 후대의 linkage map 작성
- 2) Mapping에 의한 자가불화합성 특징과 자두 pox 바이러스 저항성간의 관련성 분석
- 3) 살구 자가불화합성 유전자 좌에 연쇄된 clone 동정을 위한 BAC library 구축

나. Birmingham 대학

- 1) 자가불화합성 반응에 의해 화분에서 발현되는 MAP kinase의 활성 분석

다. Institute of Grassland and Environmental Research(UK)

- 1) 퍼레니얼라이그래스(*Lolium perenne* L.)의 S 유전자형 분석 및 유전자 좌(S 및 Z)의 mapping

라. Hamburg University

- 1) 양앵두(*Prunus avium* L.)의 생식 및 DNA-fingerprinting 관련 microsatellite의 탐색

여 백

제 7 장 참고문헌

- Aldrich, J. and C.A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax : optimisation of yield and reproducibility using Klen *Taq* I DNA polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 128-141.
- Banno, K., K. Kumashiro, S. Tateishi, M. Takamizawa, Y. Kimura, T. Tokuhisa, F. Tamura, and K. Tanabe. 1993. Breeding of inter-genetic hybrids between Japanese pear and the apple(in Japanese). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 62(Suppl. 1): 138-139
- Battle, I., F.H. Alston, and K. M. Evans. 1995. The use of the isozymic marker gene *Got-1* in the recognition of incompatibility S alleles in apple. *Theor. Appl. genet.* 90: 303-306.
- Boskovic, R., and K.R. Tobutt. 1999. Correlation of stylar rybonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. *Euphytica* 107: 29-43.
- Brace, J., G.J. King, and D.J. Ockendon. 1994. A molecular approach to the identification of S alleles in *Barassica oleracea*. *Sex Plant Reprod.* 7: 203-208.
- Broothaerts, W. 2002. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. *Theor. Appl. Genet.* 106: 703-714.
- Broothaerts, W., G.A. Janssens, P. Proost, and W.F. Broekaert. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27: 499-511.
- Castillo, C., T. Takasaki, T. Saito, Y. Yoshimura, S. Norioka, and T. Nakanishi. 2001. Reconsideration of S-genotype assignments, and discovery of a new allele based on S-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars. *Breed. Sci.* 51: 5-11.
- Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.

- Chung, I.K. 1997. Characterization of S glycoprotein associated with gametophytic self-incompatibility of *Lycopersicon peruvianum*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38: 205-210.
- Clarke, A.E., and E. Newbigin 1993. Molecular aspect of self- incompatibility in flowering plants. Annu. Rev. Genet. 27: 257-279.
- Darwin, C. 1876. Effects of cross-and self-fertilization in the vegetable Kingdom. D. Appleton, New York.
- Darwin, C. 1877. Different forms of Flowers on plants of the same Species. John Murry, London.
- Golz, J.F., A.E. Clarke, and E. Newbigin. 1995. Self-incompatibility flowering plant. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 640-645.
- Hinata, K., M. Watanabe, S. Yamakawa, Y. Satta, and A. Isogai. 1995. Evolutionary aspects of the S-related genes of the Brassica self-incompatibility system: synonymous and nonsynonymous base substitutions. *Genetics* 140: 1099-1104.
- Hiratsuka, S., Y. Kitoh and J. Matsushima. 1991. Induction of deformed pollen tube tips and their morphological characteristics in self-incompatible Japanese pear. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60: 257-265.
- Hiratsuka, S., T. Kubo, and Y. Okada. 1998. Estimation of self-incompatibility genotype in Japanese pear cultivars by stylar protein analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67: 491-496.
- Hiratsuka, S., M. Nakashima, A. Yagami, Y. Koyama, and Y. Kawai. 2001. Reexamination of self-incompatibility genotypes in the Japanese pears: 'Choju', 'Kimizukawase', 'Meigetsu', and 'Ichiharawase'. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70(3): 328-332.
- Hiratsuka, S., Y. Okada, Y. Kawai, F. Tamura, and K. Tanabe. 1995. Expression and inheritance of S-proteins in self-compatible and S-incompatible Japanese pears. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 64: 479-484.
- Hiratsuka, S., Y. Okada, Y. Kawai, F. Tamura, and K. Tanabe. 1995. Stylar basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of Japanese

- pears. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 471-478.
- Hiratsuka, S., Y. Okada, Y. Kawai, F. Tamura, and K. Tanabe. 1995. Expression and inheritances of S-proteins in self-compatible and -incompatible Japanese pears. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 64: 479-484.
- Hiratsuka, S., E. Takahashi, and N. Hirata. 1987. Pollen tube growth inhibitors involved in the ovary of self-incompatible Japanese pear. Plant Cell and Physiol. 28: 293-299.
- Hofer, M. 1997. *In vitro* androgenesis in apple: Optimization of the anther culture. Acta. 447: 341-344.
- Hofer, M., A. Gomez, E. Aguiriano, J. A. Manzanera, and M. A. Bueno. 2002. Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple. Plant Breeding: 121: 159-162.
- Hofer, M., and Y. Lespinasse. 1996. Haploidy in apple. In: S. Mohan Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux (eds), *In vitro* Haploid production in higher plants. 3: 259-274. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- Ishikawa, S., S. Kato, S. Imakawa, T. Mikami, and Y. Shimamoto. 1992. Organelle DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. Theor. Appl. Genet. 83: 963-967.
- Ishimizu, T., K. Inoue, M. Shimonaka, T. Saito, O. Terai, and S. Norioka. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. Theor. Appl. Genet. 98: 961-967.
- Ishimizu T, S. Norika, T. Nakanishi, F. Sakiyama. 1998a. S-genotype of Japanese pear 'Hosui' J. Japan Soc. Hort. Sci. 66: 35-38
- Ishimizu, T., Y. Sato, T. Saito, Y. Yoshimura, S. Norioka, T. Nakanishi, and F. Sakiyama. 1996. Identification and partial amino-acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of the Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. J. Biochem. 120: 326-334.
- Ishimizu, T., T. Shinkawa, H. Sakiyama, and S. Norioka. 1998b. Primary structural features of Rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. Plant Mol. Biol. 37: 931-941.

- Ishiyama, M., H. Kitayama, T. Sato, K. Ishizawa, Y. Nakamura, C. Suzuki and M. Yamada. 1995. Field pollination tests in apple. Aomori apple Exp. Stn. bull. 28: 1-21.
- Itai, A., K. Tanabe, and F. Tamura. 1996. PCR cloning of a cDNA for ETR1 homologue from Japanese pear fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65(Suppl. 2): 748-749.
- Itai, A., N. Shiraiwa, T. Kawata, K. Tanabe, and F. Tamura. (1994) Molecular cloning of a full length cDNA for ACC oxidase from Japanese pear fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65(Suppl. 1): 530-531.
- Janssens, G.A., I.J. Goderis, and W.F. Broekaert. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theor. Appl. Genet. 91: 691-698.
- Kao, T.-H. and A.G. McCubbin. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12059-12065.
- Kao, T.-H. and S. Hung. 1994. Gametophytic self-incompatibility: a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. Plant Physiol. 105: 461-466.
- Kawata, K., A. Itae, K. Tanabe, and F. Tamura. 1995. Genetic variation in *Pyrus* species by RFLP analysis of genomic DNA. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64(Suppl. 2): 148-149.
- Kawata, Y., F. Sakiyama, F. Hayashi, and Y. Kyogoku. 1989. Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem. 187: 244-262.
- Kikuchi, A. 1929. Investigations in 1927 and 1928. 1. Paterclinical incompatibility in the Japanese pear. J. Okitsu, Hort. Soc. 24: 1(In Japanese).
- Kim, H.T., H. Yutaka, and I. S. Nou. 2002a. Determination of S-genotype of pear (*Pyrus pyrifolia*) cultivars by S-RNase sequencing and PCR-RFLP analyses. Mol. Cells 13: 444-451.
- Kim, H.T., D.Y. Shin, H.S. Hwang, J. H. Hwang, Y.U. Shin, Y. Hirata, and I.S.

- Nou. 2002b. Determination of S-genotype of Korean-bred *Pyrus pyrifolia* strains based on PCR-CAPS. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43: 113-119.
- Kitahara, K., and S. Matsumoto. 2002. Sequence of the S10 cDNA from McIntosh apple and a PCR-digestion identification method. HortScience 37: 187-190.
- Kitahara, K., J. Soejima, H. Komatsu, H. Fukui, and S. Matsumoto. 2000. Complete sequences of the S-genes 'Sd-' and 'Sh-RNase' cDNA in apple. HortScience 35: 712-715.
- Kobel, F., P. Steinegger, and J. Anliker. 1939. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. Landw Jb Schweiz 53: 160-191.
- Komori, S., J. Soejima, K. Abe, N. Kotoda, and H. Kato. 2000. Analysis of S-allele genotypes and genetic diversity in the apple. Acta Hort 538: 83-86.
- Komri, S., J. Soejima, S. Tsuchiya, T. Mausda, H. Bessho and Y. Ito. 1997. Two types of sterility found in a series of artificial pollination experiments in apple. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 66: 289-295.
- Kusaba, M., T. Nishio, Y. Satta, K. Hinata, and D. Ockendon. 1997. Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: implications for the evolution and recognition mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7673-7678.
- Lee, S.S., H.K. Pyo, and J.Y. Yoon. 1981. Studies on classification, interaction and activity of S-alleles in Chinese cabbage, *Brassica campestris* var. *pekinensis*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29: 109-113.
- Lundqvist, A. 1962. The nature of the two loci incompatibility system in glasses. 1. The hypothesis of a duplicative origin. Hereditas 48: 153-168.
- Lundqvist, A. 1964. The nature of the two loci incompatibility system in glasses. 4. Interaction between the loci in relation to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. 52: 221-234.
- Matsumoto, S. and K. Kitahara. 2000. Discovery of a new self-incompatibility

- allele in apple. HortScience 35: 1329-2-1332.
- Matsumoto, S., K. Kitahara, S. Komori, and J. Soejima. 1999. A new S-allele in apple, Sg, and its similarity to the Sf allele from Fuji. HortScience. 34: 708-710.
- Matsumoto, S., S. Komori, K. Kitahara, S. Imazu, and J. Soejima. 1999. S-genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of 'Megumi'. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68(2): 236-242.
- Matton, D.P., N. Nass, A.E. Clarke, and E. Newbiggin. 1994. Self-incompatibility: How plants avoid illegitimate offspring. Proc. Natl Acad. Sci. USA 91: 1992-1997.
- Matton, D., O. Mase, G. Laublin, Q. Xike, C. Bertrand, D. Morse, and M. Cappadocis. 1997. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. Plant Cell 9: 1757-1766.
- McClure, B.A., V. Haring, P.R. Ebert, M.A. Anderson, R.J. Simpson, F. Sakiyama, and A.E. Clarke. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. Nature 342: 955-957.
- Morimoto, T., T. Ishimizu, S. Norioka, and M. Shimonaka. 2001. PCR-based method for screening self-compatible varieties of Japanese pear. The International Symposium on Asian Pears. Abstracts and Program. Page 88.
- Murfett, J., T.L. Atherton, B. Mou, C.S. Bassler, and B.A. McClure. 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. Nature 367: 563-566.
- Murfett, J., J.E. Bourque, and B.A. McClure. 1995. Antisense suppression of S-RNase expression in *Nicotiana* using RNA polymerase II- and III-transcribed gene constructs. Plant Mol. Biol. 29: 201-212.
- Nettancourt, D. de 1997. Incompatibility in angiosperms. Sex Plant Reprod. 10: 185-199.
- Newbiggin, E., M.A. Anderson, and A.E. Clarke. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. Plant Cell 5: 1315-1324.
- Norioka, N., S. Norioka, Y. Ohnishi, T. Ishimizu, C. Oneyama, T. Nakanishi,

- and F. Sakiyama. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNase in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. J. Biochem. 120: 335-345.
- Norioka, N., Y. Ohnishi, S. Norioka, T. Ishimizu, T. Nakanishi, and F. Sakiyama. 1995. Nucleotide sequences of cDNAs encoding S2- and S4-RNase (D49527 and D49528 for EMBL) from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) (PGR95-020). Plant Physiol. 108: 1343.
- Nou, I.S., H.Y. Lee, and J.H. Kim. 1993. Research trend on Homomorphic Self-incompatibility I. Genetic analysis and molecular research on sporophytic self-incompatibility. Korea Journal of Breeding. 25(1): 65-80.
- Nou, I.S., H.Y. Lee, and J.H. Kim. 1993. Research trend on homomorphic self-incompatibility. II. Genetic analysis and molecular research on gametophytic self-incompatibility. Kor. J. Breed. 25: 81-89.
- Ortega, E., and F. Dicenta. 2003. Inheritance of self-compatibility in almond: breeding strategies to assure self-compatibility in the progeny. Theor. Appl. Genet. 106: 904-911.
- Park, J.I., I.S. Nou, S.S. Lee, K.K. Kang, and M. Watanabe. 2001. Identification of S-genotypes by PCR-RFLP in breeding lines of Brassica. Mol. Cells 12: 227-232.
- Saito, K., K. Takeda, and R. Nakayama. 1978. Fundamental studies on breeding of the apple. Fac. Hirosaki Univ. Bull. 29: 41-49.
- Sakamoto, T., S. Kusaba, Y. Kano-Murakami, M. Fukumoto, and S. Iwahori. 1996. Characterization of Kn-1 homologous gene in apple. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65(Suppl. 2): 2-3.
- Sakamoto, T., S. Kusaba, Y. Kano-M. Fukumoto, and S. Iwahori. 1997. Two different types of homeobox genes exist in apples. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 66(Suppl. 1): 126-127.
- Sampson, D.R. 1964. A on locus self-incompatibility system in *Raphanus*

- raphanistrum*. *Canad. J. Genet. Cytol.* 6: 435-445.
- Sassa, H., H. Hirano, and H. Ikehashi. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd). *Plant Cell Physiol.* 33: 811-814.
- Sassa, H., H. Hirano, and H. Ikehashi. 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Mol. Gen. Genet.* 241: 17-25.
- Sassa, H., H. Hirano, T. Nishio, and T. Koba. 1996. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *The Plant Journal.* 12: 223-227.
- Sassa, H. and H. Hirano. 1997. Nucleotide sequence of a cDNA encoding S5-RNase (Accession No. D88282) from Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Plant Physiol.* 113: 306.
- Sassa, H., N. Mase, H. Hirano, and H. Ikehashi. 1994. Identification of self-incompatibility related glycoproteins in styles of apple (*Malus domestica*). *Theor. Appl. Genet.* 89: 201-205.
- Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowayama, H. Hirano, T. Koba, and H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode member of a distinct class of the T2/S-ribonuclease super-family. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547-557.
- Sato, Y., K. Abe, T. Saito, and K. Kotobuki. 1992. Selection of S-gene homozygotes and its utilization for S-genotype analysis of 'Osa-Nijisseiki'. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 61(Suppl. 2): 16-17.
- Sawamura, Y., T. Saito, M. Shoda, T. Yamamoto, Y. Sato, T. Hayashi and K. Kotobuki. 2002. A new self-incompatible allele in Japanese pear Shinsei and Shinkou. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 71: 342-347.
- Schneider, D., R.A. Stern, D. Eisikowitch, and M. Goldway. 2001. Analysis of S-alleles by PCR for determination of compatibility in the Red Delicious apple orchard. *J Hortic Sci Biotech* 76: 596-600.
- Sophia, L.S. and R.G. Daphne. 2001. The molecular biology of self-incompatibility systems in flowering plants. *Plant cell.* 67: 93-114.

- Stone, J.L. 2002. Molecular Mechanisms Underlying the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility. *The Quarterly review of biology.* 77(1): 17-32.
- Tao, R., T. Habu, A. Namba, H. Yamane, F. Fuyuhiko, K. Iwamoto, and A. Sugiura. 2002. Inheritance of S^f -RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. *Theor. Appl. Genet.* 105: 222-228.
- Terami H., H. Torikata, and Y. Shimazu. 1946. Analysis of the sterility factors existing in varieties of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta* Rehd.). *Studies Hort. Inst. Kyoto Imp. Univ.* 3: 267-271.
- Teramoto, S., Y. Kano-Murakami, M. Hori, and K. Kamoyama. 1994. DNA fingerprinting to distinguish cultivar and parental relation of Japanese pear. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 63: 17-21.
- Thompson, K.F. 1957. Self-incompatibility in marrow stem kales, *Brassica oleracea* var. *acephala*. I. Demonstration of a sporophytic system. *J. Genet.* 55: 45-60.
- Torres, A.M., N.F. Weeden, and A. Martin. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 937-945.
- Van Nerum, I., M. Geerts, A. Van Haute, J. Keulemans, and W. Broothaerts. 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theor. Appl. Genet.* 103: 584-591.
- Verdoodt, L., A. Van Haute, U. Goderis, K. De Witte, J. Keulemans, and W. Broothaerts. 1998. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theor. Appl. Genet.* 96: 294-300.
- Yamada, K., Y. Oura, H. Mori, and S. Yamaki. 1998. Cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression. *Plant Cell Physiol.* 39: 1375-1379.
- Yamashita, K., H. Saita and N. Hashimoto. 1990. Pollen-stigma interaction which might be critical to the gametophytic incompatibility of Japanese pear. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 59: 83-89.