

대추나무 품종 식별을 위한 ISSR 유래 SCAR 표지 개발

남재익[✉] · 김철우 · 김세현
국립산림과학원 산림소득자원연구과

Development of ISSR-Derived SCAR Markers for Identification of Jujube Cultivars

Jae-Ik Nam[✉], Chul-Woo Kim and Sea-Hyun Kim

Division of Forest Special Products, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

요약: 정확하고 신속한 품종식별은 효율적인 육종과 육종가의 권리 보호를 위하여 필수적이다. 대추나무 품종을 구분하는 전통적인 방법은 형태적 특성을 근거로 하지만, 시기적 제약과 환경의 영향으로 형태적 형질만을 이용하여 구별하기에는 어려움이 있다. 이에 본 연구에서는 ISSR 분석으로 얻어진 단편을 복제하여 안정적인 식별을 위한 SCAR 표지를 개발하였다. 대리조와 보은대추 품종에서 특이성을 보이는 ISSR 밴드를 대상으로 정제, 복제, 염기서열 분석을 수행함으로써 827Dalizao550, 827Boeun750, 846Boeun700, 847Dalizao850로 명명된 4개의 클론을 확인하였다. 대추나무 품종 특이성 분석을 위한 4쌍의 SCAR 프라이머를 제작하였으며, 대추나무와 뫇대추나무를 포함하는 32개체에 대하여 PCR 분석을 수행하였다. 827Dalizao550 SCAR 표지의 PCR 결과 6개체(대리조, 산동이조, 동조, 원령 신 2호, 뫇대추나무 2, 뫇대추나무 4)에서 550 bp의 특이적인 밴드가 증폭되었고, 나머지 개체에서는 예기치 않은 밴드(490 bp)가 증폭되었다. 또한 847Dalizao850 SCAR 표지의 PCR 결과 대리조, 산동이조, 동조에서 850 bp의 밴드가 나타났고 예기치 않은 900 bp의 밴드가 5개체(파조, 뫇대추나무 1, 뫇대추나무 2, 뫇대추나무 3, 뫇대추나무 4)에서 증폭되었다. 이상의 결과로 보아 새롭게 개발된 표지들은 대추나무 품종식별을 위한 빠르고 신뢰성 있는 수단으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 보다 다양한 품종들의 식별을 위해서는 다형성 정보의 추가와 SCAR 표지의 개발이 필요하다.

Abstract: Precise and fast identification of crop cultivars is essential for efficient breeding and plant breeders' rights. Traditional methods for identification of jujube cultivars are based on the evaluation of morphological characteristics. However, due to time constraints and environmental influences, it is difficult to distinguish cultivars using only morphological traits. In this study, we cloned fragments from improved inter simple sequence repeats (ISSR) analysis, and developed stably diagnostic sequence-characterized amplified region (SCAR) markers. The specific ISSR bands of jujube cultivars from Dalizao and Boeundaechu were purified, cloned, and sequenced. As a result, four clones labeled 827Dalizao550, 827Boeun750, 846Boeun700, and 847Dalizao850 were identified. In order to investigate whether they were specific for the jujube cultivar, four pairs of SCAR primers were then designed and polymerase chain reaction (PCR) amplifications were conducted to analyze 32 samples, including jujube and sour jujube. In the PCR amplification of the 827Dalizao550 SCAR marker, the specific bands with 550 bp were amplified in six samples (Dalizao, Sandonglizao, Dongzao, Yuanlin No. 2, Suanzao 2, Suanzao 4), but unexpected bands (490 bp) were amplified in the others. Moreover, in the PCR amplification of the 847Dalizao850 SCAR marker, the specific bands with 850 bp were found in three samples (Dalizao, Sandonglizao, and Dongzao) and 900 bp unexpected bands were amplified in five samples (Pozao, Suanzao 1, Suanzao 2, Suanzao 3, Suanzao 4). These results showed that newly developed markers could be useful as a fast and reliable tool to identify jujube cultivars. However, further identification of polymorphic information and the development of SCAR markers are required for the identification of more diverse cultivars.

Key words: Ziziphus jujuba, jujube cultivar, ISSR derived SCAR marker, cultivar identification

* Corresponding author

E-mail: minesilhouette@gmail.com

ORCID

Jae-Ik Nam [✉] <https://orcid.org/0000-0002-9800-563X>

서 론

대추나무(*Ziziphus jujuba* Mill.)는 갈매나무과(Rhamnaceae)의 낙엽활엽교목으로 환경스트레스에 강하고 비배관리가 용이하여 중국, 한국, 몽골 등에서 재배되고 있다(Liu and Cheng, 1995; Azam-ali et al., 2006). 과실은 간 기능 회복과 항암·항산화 작용 등의 효과가 뛰어나 한약재와 식용으로 이용되어 왔으며, 다양한 비타민과 무기질을 함유하고 있는 것으로 알려져 다이어트 식품으로도 각광을 받고 있다(Huang et al., 2007; Plastina et al., 2012; Choi et al., 2016). 대추나무의 이용가치가 증가함에 따라 자생지인 중국을 중심으로 신품종육성을 위한 다양한 연구들이 수행되고 있으며, 그 결과 과실의 품질향상은 물론 내병성, 내건성 등이 향상된 품종들이 개발되고 있다(Ma et al., 2000; Dagar et al., 2001; Ji et al., 2001; Hebbara et al., 2002; Li et al., 2004; Liu et al., 2012).

운송수단의 발달과 자유무역협정의 체결 등으로 국가 간의 유전자원 교류가 수월해짐에 따라 품종의 개발과 보급이 활성화되었으며 품종보호와 유전자원 관리의 중요성이 한층 부각되고 있다(Choi and Kim, 2010; Xu, 2010). 대추나무의 경우 영양변식체를 이용한 증식과 이동이 수월하여 동일한 품종이 다른 이름으로 재배되는 등 유전자원 관리에 애로사항이 있으므로(Liu and Cheng, 1995; Wang et al., 2014), 출처가 불명확한 개체가 과학적 입증 없이 수입·유통된다면 품종보호권 침해 등의 문제로 이어질 수 있기에 관리를 위한 유용한 식별방법이 필요하다(Choi and Kim 2010).

품종식별과 유연관계를 분석을 위하여 다양한 표지들이 이용되고 있으며, 통상적으로는 특별한 장비나 기술의 도움이 없이도 간단하게 차이점을 구분할 수 있는 표현형을 이용한 방법이 활용되어왔다. 그러나 이러한 방법은 측정 부위에 따라서 다른 값을 나타내거나 외부요인에 의하여 차이가 발생하는 등의 단점이 있으며(Sneath, 1995; Hedren, 2002), 때로는 측정까지 오랜 시간이 소요되는 등 이용에 어려움이 있어 이를 보완할 수 있는 표지의 필요성이 대두되고 있다(Smith and Smith, 1992; Cooke et al., 1999; Pratt and Clark, 2004). DNA를 이용한 방법은 시기에 제약 없이 많은 다형성정보를 얻을 수 있어 종 또는 개체 간의 차이를 구분하기에 적합하며, 이 중 ISSR (Inter simple sequence repeat) 분석은 미소부수체에 결합하는 다형성정보를 이용하는 방법으로 유전자원의 정보가 없이도 적용할 수 있기에 신속하고 저렴하게 다형성을 찾아낼 수 있는 장점이 있다(Peterson et al., 1991; Zietkiwicz et al., 1994; Powell et al., 1996; Nagaoka et al., 1997). 그러나 ISSR 분석은 10mer 정도의 짧은 프라

머가 미소부수체에 결합하는 특성상 MgCl₂와 dNTP Mix의 농도는 물론 결합온도와 같은 PCR 조건에 따라서 변이가 발생하거나(Kumar et al., 2009), 아가로스 젤에서는 단형성으로 관찰된 밴드가 폴리아크릴아마이드 젤 또는 메타포아가로스 젤(Lonza, Swiss)과 같은 고해상도 젤에서는 다형성증폭산물로 분리되는 등 실험방법에 따라서 다형성정보를 충분히 설명하지 못하는 문제가 나타나기도 한다(Asif et al., 2008).

SCAR (Sequence characterized amplified region) 표지는 ISSR, RAPD (Random amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 와 같은 랜덤표지에서 관찰된 다형성증폭산물의 염기서열 정보를 토대로 재설계된 15~30 bp의 프라이머를 이용하는 분석기술로 반응조건이 덜 민감하고 재현성이 매우 높다는 장점이 있다(Martin et al., 1991; Michelmore et al., 1991; Kumar et al., 2009). 이에 품종식별은 물론 병저항성, 종자 크기, 개화시기 등 특정 유전자와 관련된 선발 표지로도 이용되고 있어 잠재적인 활용가능성이 높은 특징이 있다(Paran and Michelmore, 1993; Gu et al., 1995; Ratnaparkhe et al., 1998; Kasai et al., 2000; Ammiraju et al., 2001; Albami, 2004). 따라서 본 연구는 형태적 특성을 이용한 식별방법의 단점을 보완하기 위하여 ISSR 분석과 SCAR 분석을 이용하여 한국과 중국의 대추나무 품종들 간의 식별가능성을 밝히고, 품종 간 다형성을 나타내는 표지를 선발하여 재현성이 높은 SCAR 표지로 전환함으로써 보다 신속하고 정확하게 대추 품종식별에 활용할 수 있는 DNA 표지를 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

대추나무 품종식별용 DNA 표지 개발을 위하여 국립 산림과학원 산림생명자원연구부 품종보존원에 조성되어 있는 대추나무들을 대상으로 실험을 수행하였다. ISSR 분석은 한국품종(금성, 무등, 월출), 중국품종(대리조), 재래종(복조, 보은대추)으로 구성된 6품종을 대상으로 하였으며, 재현성과 균일성 확인을 위하여 품종별로 7~12개체 총 55개체에 대하여 사전 실험을 수행하였다 (Table 1). 개발된 SCAR 표지의 적용은 ISSR 분석에 이용한 6품종 이외에도 중국품종 16품종, 재래종 6개체, 뫄대추나무(*Z. acidojujuba* C.Y. Cheng & M.J. Liu) 4개체를 추가하였다(Table 2).

2. DNA 추출

공시재료의 어린잎 100 mg을 막자와 막자사발을 이용

Table 1. The list of cultivars used in ISSR PCR including their source and number.

No.	Common name	Source	Number of samples
1	Wolchul	Korea	8
2	Geumseong	Korea	11
3	Bokjo	Korea	9
4	Mudeung	Korea	7
5	Boeundaechu	Korea	12
6	Dalizao	China	8

Table 2. The list of samples used in SCAR analysis including their source.

No.	Common name	Chinese character	Source	No.	Common name	Chinese character	Source
1	Bokjo	福棗	Korea	17	Yuanling No. 2	圓鈴新 2	China
2	Wolchul	月出	Korea	18	Pozao	婆棗	China
3	Geumseong	錦城	Korea	19	Huizao	灰棗	China
4	Mudeung	無等	Korea	20	Jinsi No. 3	金絲新 3	China
5	Dalizao	大梨棗	China	21	Jinsi No. 4	金絲新 4	China
6	Daguazao	大瓜棗	China	22	Jinsixiaozao	金絲小棗	China
7	Dabailing	大白鈴	China	23	Chuncheon No. 4	-	Korean native
8	Damaya	大馬牙	China	24	Chuncheon No. 7	-	Korean native
9	Panzao	板棗	China	25	Chuncheon No. 8	-	Korean native
10	Zhongyang muzao	柳林木棗	China	26	Chuncheon No. 6	-	Korean native
11	Sandong lizao	山東梨棗	China	27	Boeun daechu	-	Korea
12	Dongzao	冬棗	China	28	Suwon	-	Korean native
13	Yuanling No. 1	圓鈴新 1	China	29	Suanzao No. 1	酸棗 1	Korea
14	Xiaolizao	小梨棗	China	30	Suanzao No. 2	酸棗 2	Korea
15	Zanhuang dazao	贊皇大棗	China	31	Suanzao No. 3	酸棗 3	Korea
16	Gochang	-	Korean native	32	Suanzao No. 4	酸棗 4	Korea

하여 분쇄한 후 GENE ALL plant SV DNA purification Kit (Gene all, Korea)로 genomic DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA는 Nano Drop (Thermo Scientific, USA)으로 정량하여 농도가 5 ng/μl가 되도록 희석한 후 PCR 분석에 사용하였다.

3. ISSR 표지 분석

대추나무 ISSR 분석은 UBC (University of british columbia) SSR primer set #9 중에서 재현성이 우수하고 증폭산물이 선명하게 구분되는 프라이머를 선발하여 이용하였다 (Table 3). PCR 반응액의 조성은 반응액 20 μl당 template DNA 5 ng, primer 0.4 μM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP Mix

Table 3. ISSR primers used in this study and summary of primers from six jujube cultivars.

Primer name	Primer sequence ^z (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Total number of amplified bands	Number of polymorphic bands
UBC811	(GA) ₈ C	50	11	-
UBC818	(CA) ₈ G	50	8	5
UBC822	(TC) ₈ A	52	9	2
UBC825	(AC) ₈ T	55	6	1
UBC827	(AC) ₈ G	55	9	3
UBC828	(TG) ₈ A	52	4	1
UBC830	(TG) ₈ C	52	7	5
UBC846	(CA) ₈ RT	56	3	1
UBC847	(CA) ₈ RC	56	8	2
UBC857	(AC) ₈ YG	55	5	1
UBC860	(TG) ₈ RA	55	5	1
Total (%)			75 (100%)	22 (29.3%)
Mean per primer			6.8	2

^z: Single letter abbreviations for mixed-base positions: Y=(C, T), R=(A, G).

250µM, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 30 mM, Tag DNA Polymerase (Bioneer, Korea) 1.5 U를 첨가하였다. PCR은 94°C에서 5분간 전처리 후 94°C에서 30초, 프라이머에 따라서 50°C~56°C에서 30초, 72°C에서 60초의 과정을 35회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 ethidium bromide로 염색한 2% 아가로스 젤에서 전기영동을 하여 다형성 밴드를 탐색하였다.

4. ISSR 표지 클로닝 및 염기서열 분석

품종별로 특이성이 나타나는 Locus를 선별 후 UltraClean™ 15 DNA Purification kit (Mobio, Korea)를 이용하여 정제된 PCR 산물을 얻었다. 정제된 DNA는 pMD20 T-vector (Takara Bio, Japan)에 결합한 후 클로닝을 위하여 JM109 (*Escherichia coli* competent cell)에 형질전환시킨 후 DNA가 삽입된 균주를 선발하였다. 염기서열을 확인하기 위하여 AccuPrep® Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Korea)으로 plasmid DNA를 분리하였고 삽입된 DNA의 전 염기서열 정보를 자동 DNA 분석기(ABI 3730xl, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다.

5. SCAR 프라이머 제작 및 SCAR 표지 분석

SCAR 분석용 프라이머는 Primer3 프로그램(Whitehead institute/MIT center)을 사용하여 ISSR 분석용 프라이머의 염기서열을 포함하는 20~23 bp의 프라이머 쌍을 제작하였다. 제작된 프라이머가 SCAR 표지로 이용 가능한지 확인하기 위하여 10 ng template DNA, 0.2 µM SCAR

프라이머(Forward/Revers), 2×PCR master mix (Bioneer, Korea)로 구성된 PCR 반응액을 조성하였다. PCR은 95°C에서 5분간 전처리 후 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분의 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 처리하였으며, 증폭된 PCR 산물은 ethidium bromide로 염색한 2% 아가로스 젤에서 전기영동을 하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. ISSR 분석을 통한 다형성 표지 선발

다형성 밴드가 선명하게 구분되어 대추나무 ISSR 분석에 적합한 프라이머 11개를 선발하였으며, 대추나무 6품종을 대상으로 ISSR 분석을 수행한 결과 총 75개의 증폭 산물을 얻을 수 있었다. 다형성증폭산물은 22개로 전체의 29.3%였으며, 다형성정보를 바탕으로 중국품종인 대리조와 재래종인 보은대추를 구분할 수 있음을 확인하였다(Table 3). 랜덤표지를 이용한 분석은 품종식별 이외에도 MAS (Marker assisted selection) 등 여러 분야에서 이용되고 있으나 실험조건이나 장비에 따라 민감하게 반응하여 증폭산물의 밴드양상이 달라질 수 있는 단점이 있다(Ellsworth et al., 1993; Muralidharan and Wakeland, 1993). 따라서 다형성이 탐색되면 반복 실험을 통하여 재현성을 검증해야 할 필요성이 있으며, 본 실험에서는 프라이머별로 ISSR 분석을 3회 이상 반복하여 재현성이 보장되는 표지만을 선발하였다. 그 결과 대리조 특이적 증폭산물로 UBC primer 827의 550 bp와 UBC primer 847의 850 bp 밴드를 보은대추 특이적 증폭산물로는 UBC

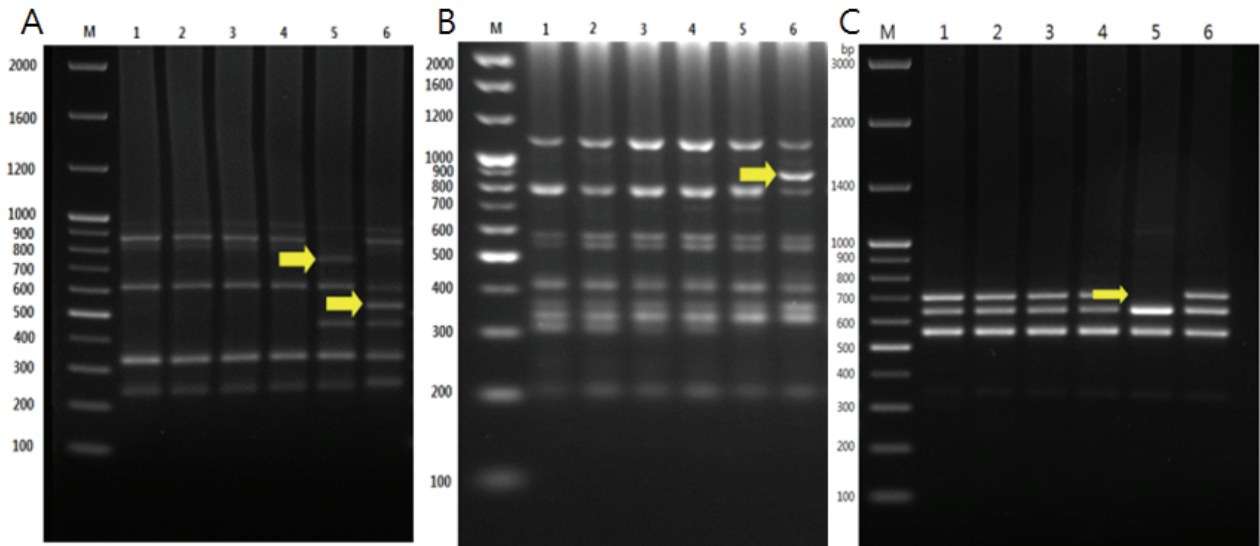


Figure 1. The ISSR profiles of different genotype of jujube cultivars obtained with UBC primer 827 (A), UBC primer 846 (B), and UBC primer 847 (C). The bands marked with arrows are the specific bands. M: Size standard marker, 1: Wolchul, 2: Geumseong, 3: Bokjo 4: Mudeung, 5: Boeundaechu, 6: Dalizao.

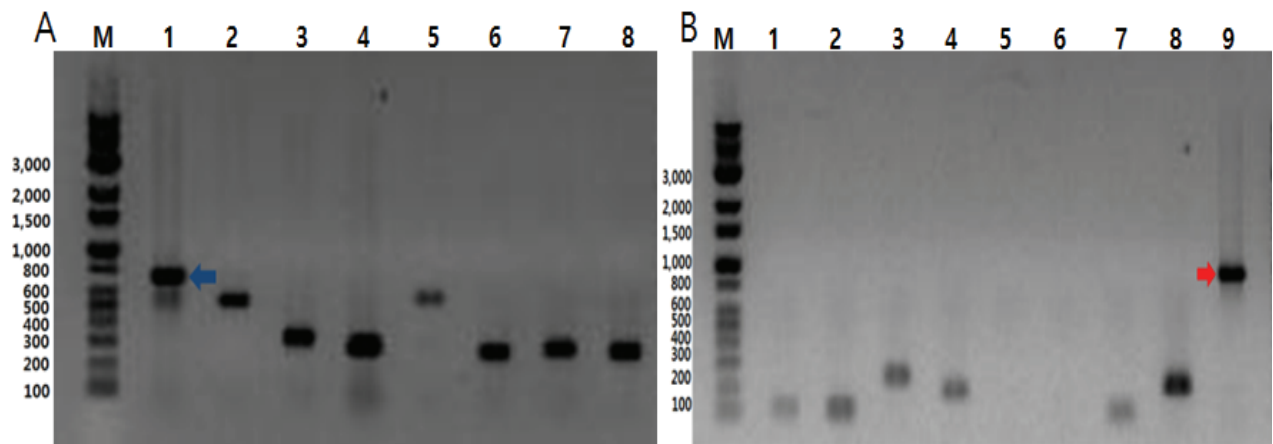


Figure 2. Cloning and identification of positive clone from UBC primer 827 (A) with Boeundaechu specific 750 bp DNA fragment and UBC primer 847 (B) with Dalizao specific 850bp DNA fragment. The arrow indicates the inserted band.

primer 827의 750 bp와 UBC primer 846의 700 bp 밴드를 표지로 선발하였다(Figure 1).

2. 염기서열 분석 및 SCAR 표지 전환

프라이머 결합부위의 미스매치가 원인이 되어 변이가 발생하는 랜덤표지 분석의 단점을 극복하기 위해서는 특이적인 프라이머의 제작이 필요하며, 고해상도의 전기영동을 이용한 클로닝과 염기서열 분석을 통하여 이러한 사항을 보완할 수 있는 것으로 알려져 있다(Paran and Michelmore, 1993; Bernet et al., 2003). 이에 본 연구에서는 선발된 다형성증폭산물을 SCAR 표지로 전환하기 위하여 고해상도의 전기영동과 클로닝을 수행하였으며

(Figure 2), 이를 통하여 특이적인 증폭산물의 염기서열을 확인하고(Table 4), 얻어진 정보를 바탕으로 SCAR 분석을 위한 4쌍의 프라이머를 제작하였다(Table 5).

3. SCAR 표지 적용

SCAR 표지의 적용 가능성을 파악하기 위하여 제작된 프라이머로 PCR 분석을 수행한 결과 대리조와 보은대추는 ISSR 분석에서와 같은 크기의 증폭산물이 관찰되었다. 이에 Table 2에 해당하는 32개체를 대상으로 SCAR 표지 827Dalizao550과 847Dalizao850을 적용하였다. 그 결과 827Dalizao550은 모든 개체에서 PCR 증폭산물이 나타났으며 대리조, 산동이조, 동조, 원령신 2호, 뿔대추

Table 4. Nucleotide sequences of specific DNA fragment produced by ISSR PCR. Highlighted underlines show the sequence of ISSR primer used for initial amplification of fragment. Highlighted boldfaced italicized nucleotide sequences define the forward and reverse SCAR primers.

Locus name	Nucleotide sequences (5'-3')
UBC primer 827 750 bp in Boeundaechu	<u>ACACACACACACACACGCTAAAAATTGAAGACCAACATTTGCCAGCACCTTTTGCTTTTTATTGCTCTTTCTCTCTCTTCTGTT</u> CATAAAAAAATGAAATAAAAAATAAAAAATAACAAAAGTCTGATTCTCTCTCTGCTCTGTCTCTCTATTACTCTCTCTCTT TCTTTCCCTTTTTGCTTTTCTGAAAATCGTGTCTCTTTTCTTTCTCTTTCTCTCTCTGCTTTTACTCTCAAAGAGACAGA AGTTACGTATGCAGAATAATGATATGGGATGAGATGGCCCTTCTCTGATAATGGCTCAGCAAAAGTATACCAACAATGCCA GCAATAATGCTTCCCAACAACACCATGAACACAAAAGTGTGAAGCCCATTTTCCATGACTTTTTGGGCATGAAGCCCACTGATT CCCCTACGGTTTTGGCCCCAAGACCACCAACACCAGCAGCAGCAGCCGAGATGTCAGGCTTTCTGAGGTCTCCCCTTCTACC TCTGCCTCACTTGGGGTTCCTCTGGCGGTGGCCGTGGTCTATCTCCGCTACCTCCGATCCTGCCTCCGGTCAGTCACTTAAC CCCCTTCCCTCGTTTCTCACTTGGGCTACTTTAATCCCAAGCTATAAATATCTTAATAGTTTTTCTTTTACTTTCTGAAATTTCC ATTATGTTGGGTGATGCTGTTTTCTATTTCATTTCTTTGGGATTGATTTTGCTTTATGCTTCTCAGAGATTGGTTTTGGTGATCGCGT GAGGACGTAGA <i>ACTCACTTCTGTGCGTGTGTGTGTGTGT</i>
UBC primer 847 850 bp in Dalizao	<u>CACACACACACACACAGCATTACCGTGA</u> CTCATTGTTATATGTTTTGTTCAACAAGTTATATAGTCATGTTATCAATATTGAT CATTCTTGTCTACCATTTCTACTAAGGAAGCTTAAATTCATAAGTTCATGGATTTTCTTCGATCTAAAACTTATCAATTTCTAT TATACATTTACCCCTTTACCAATGTGGATTTGGGGTTATAGATAGTAAGCGTATATGGCTTCTTCTCTCGTCTTCAGCAATC TCTCCTAAAGAAAAGCATGAGATTCAAGAAAAGTTCGATGTTTTTGGATTTTCAGAGGTGAAGCCACCCACAATCAATTTGCT AGCTATCTTTATGTTGTTTTATCTGCAATGCATATCTCAACTTTCATGGACGATCATCAACTTGAGAGAGGGATGAAATTTCTC CACACTCCGAAAAACAATCGATGAATCAAAGATTGAGTAATAATTTCTTAGAAAACCTTTGCATCTCCACGTGTTGTTTGAA TGATCTTTGCAATCTTGAATGCAAGAAAACAATGAGATGGTGTACAAAAATAGAATGAAACAATGCAATAGAAGAAT AAAAATAGAACATACAGATTTACGTGGAAAAATCCTTTAAGGGAAAAAGCCACAAGCAAAGAGAGACAAAATTTTATTAATGAAG ATTGTTACAAAAGTGAGCAAAACAGAGCGATTAACCCCTCAAAAATAAAAATAATACAACCGAAAATGAAAATCCCCAAAA TATATATATTGTACGACGGAATTTGGGGTGAGAAAGTTATGACCAAGAGCAAGCTAGCTTGAAGTGTAGCAACAAGCA AGCTTTGGTG <i>ATGCTCTTGGGAATGGCTGTGTGTGTGTGTGT</i>
UBC primer 827 550 bp in Dalizao	<u>ACACACACACACACAGTATACAACATATGTATATATACACATATACAACATATGTATGGGTAGTGTTCACATACCAATGG</u> ACTTGACAAAACATTTTGGACAACTATCTAACAATCTAACGAGGTTAATCCAGAAAGCGGATTGAAGCTTATACTCGATTAA AAAGCTATTAATTTATTCATTTTGGAACTTACAATTCATTAATAAAACACTAATGCACCGTTAGATTAACTTCATTCAA TGGTTAGGATTATGTTAAAAATATTTGCAAAATACATTGTATGAGACCCCTCCATTTAACGAGATTTGGGTCCATTGCA GTTAAAGAAATCCCAAAGCAAATACAAAAATGTAATCAGATTACTGTGAAAAAGTCCATGTGCAGATAATTAACATCTAAT GCATCCGCTCTAATAAAACACAATTTCTTTTAGCTGATGCCTTAGATTCCAGAGGAACCGGAAACAAGAAAAATAAAAA AAATA <i>ATTCACCTAATGTGTGCGTGTGTGTGTGTGT</i>
UBC primer 846 700 bp without Boeundaechu	<u>CACACACACACACAGTATTAGATGAAACT</u> AACCTTATTAACAATGTATAATTTTCAAAGATTACATACCCAAAAAGAAAT CTTCACTTGTGAGAGAGTATTTTGTCTCGGACATCCCATTTATGCTTCCCTTGAACATCTCATAAAAGAAACTGAAAAAAT AAAAATAAATAAAAAAGGAAAAAATAAGGTAGCACCATATACTTACAACGAAGGAATCAAAAATGTCTTCTGTAGAA TGATTGATTTAGCATGCACGCCACAAAAGATGTTAAGAAGAAAAACAAAATAAATTTCTTAGCAAAAATAGATAGCAT ATTCAGAAAAGGAAAAGGCTCACCCACCCCTCAATGCCACCCACACACACCCTAAAAAACGAAAAAGGATTGCACATGTA GAAAAAATTTGAATTTCCCTTAAGCAAAAGACAGTTTTATCCTTCAAAATGGTTTATCACTGCTAAAGTATTAAAAAAGTTT AGACCAATAATTAATATATACTTGCAAAACAGGACATCTTCTAGATTTCCCTTCTCCTTGGGTGAGATTAGGACGCAT TGTATCTGCAAGAGAAATCAAAATATACATATTCAGCATCAAAACAAAAAATAAATGACAAAAACCAAAAATCAATATAGC ATGGTGCCATCAATTTCCAGACAACAAT <i>TACTGTGTGTGTGTGTGTGT</i>

Table 5. Nucleotide sequences and information of the designed SCAR primer sets.

Primer name	Sequence (5'-3')	Bases	Tm value
827boeun750F	CACACGCTAAAAAATTGAAGAC	22	58
827boeun750R	CACAGCACAGAAGAGTGAGTT	21	62
827Dalizao550F	CACACGTATACAAACATATGTAT	23	60
827Dalizao550R	CACGCACACATTAGGTGAAT	20	58
847Dalizao850F	CACACAGCATTACCGTGA	20	60
847Dalizao850R	ACAGCCATCCCAAGAGCAT	20	60
846boeun700F	ACACAGTAAATTGTTGTCTGG	21	58
846boeun700R	CACACACAGTATTTAGATGAAAC	23	60

나무 2, 뫇대추나무 4에서는 본래 예상한 550 bp의 증폭 산물이, 이외의 개체들에서는 약 490 bp의 증폭산물이 관찰되었다(Figure 3). 847Dalizao850를 적용한 결과 대리조 이외에도 산동이조, 동조, 파조, 뫇대추나무 1, 뫇대

추나무 2, 뫇대추나무 3, 뫇대추나무 4에서 증폭산물이 확인되었으며 대리조, 산동이조, 동조는 예상한 850 bp의 증폭산물이 나타난 반면 파조와 4개의 뫇대추나무는 약 900 bp의 산물이 증폭되었다(Figure 4).

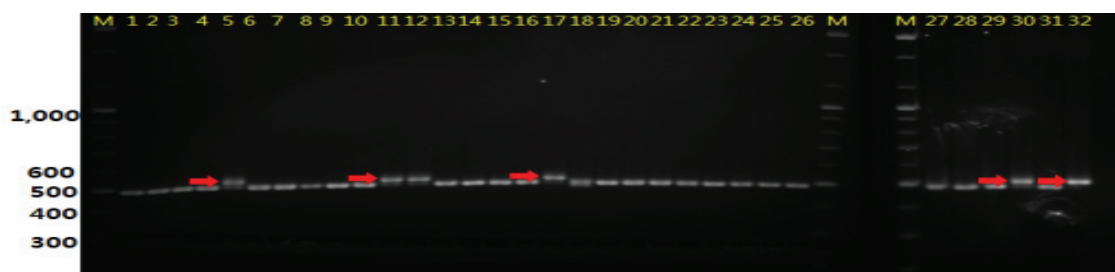


Figure 3. Result obtained with the 32 jujube germplasms using the SCAR marker 827Dalizao550. The arrows are expected specific band and the others are unexpected band. Cultivar names were substituted with lane numbers. See table 2 for the lane numbers. M: Size standard marker.



Figure 4. Result obtained with the 32 jujube germplasms using the SCAR marker 847Dalizao850. The blue arrows are 850 bp expected specific band and the red arrows are 900 bp unexpected band. Cultivar names were substituted with lane numbers. See table 2 for the lane numbers. M: Size standard marker.

예상치 못한 증폭산물의 출현은 우성표지를 공우성표지로 전환하는 과정에서 빈번하게 관찰된다. Paran과 Michelmore(1993)는 RAPD 반응으로 많은 단편들이 증폭되어 아가로스 젤에는 증폭산물이 혼재될 수 있으므로 확실한 SCAR 표지는 프라이머 결합부위의 차이로 발생한 밴드를 대상으로 하는 것이 효율적이라고 제시하였다. 본 실험의 경우 ISSR 분석 과정에서 한국과 중국의 대추나무 6품종만을 대상으로 다형성을 확인하고 표지를 제작하였기에 32개체에 대하여 SCAR 분석을 수행한 결과 증폭산물이 이외의 품종들에서도 관찰되었다. 또한 선발된 다형성밴드가 프라이머 결합부위의 뚜렷한 염기서열 차이가 아닌 증폭산물 내부의 INDEL에 기인하였기에 827Dalizao550 표지에서는 ISSR 분석 중 재현성이 떨어져 제외한 약 490 bp의 증폭산물이 이외의 개체들에서도 나타났다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 증폭산물의 크기를 비교하는 방안이 보고되어 있으며(Vidal et al., 2000), 827Dalizao550과 847Dalizao850 표지 모두 증폭산물의 크기를 비교함으로써 효율을 높일 수 있었다. 이에 증폭산물의 크기 차이를 비교하는 방법은 SCAR 표지를 이용한 품종식별에 유용한 방안으로 생각된다. 그러나 Vidal 등(2000)의 의견과 같이 본 연구에 이용된 재료들이 모든 대추나무의 유전정보를 반영하지 않기에 새로운 품종이 추가될 경우 효율이 떨어지는 문제가 발생할 수 있으므로 다형성정보를 지속적으로 추가하는 한편, 제

한효소 등을 이용하는 실험기법을 적용하게 된다면 SCAR 표지에서 다형성이 나타나지 않았더라도 SNP (Single nucleotide polymorphism) 영역이 존재할 경우 다형성 정보를 얻을 수 있는 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) 표지로 전환이 가능할 것으로 판단된다(Zhang and Stommel, 2001). 본 실험에서 ISSR 표지는 SCAR 표지로의 전환을 통하여 보다 유용한 정보를 제공할 수 있음을 확인하였다. 그러나 개발된 SCAR 표지가 소수의 품종과 재래종만을 대상으로 하였기에 향후 다양한 품종들의 다형성 정보를 추가 보완할 필요가 있으며, 국내·외 대추나무 품종식별에 유용한 정보를 SCAR 표지로 전환하게 된다면 대추나무의 생육시기와 상관없이 간단한 PCR 장비와 아가로스 젤 전기영동만으로도 대량의 시료를 쉽고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Albami, M.C., Battey, N.H. and Wilkinson, M.J. 2004. The development of ISSR-derived SCAR markers around the seasonal flowering locus (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 571-579.
- Ammiraju, J.S.S., Dholakia, B.B., Santra, D.K., Singh, H., Langu, M. D., Tamahakar, S.A., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupta, V.S. and Ranjekar, P.K. 2001. Identification of inter

- simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 726-732.
- Asif, M., Mehboob-ur-Rahman, J., Mirza, I. and Zafar, Y. 2008. High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 45: 75-79.
- Azam-ali, S., Bonkougou, E., Bow, C., deKock, C., Godara, A. and Williams, J.T. 2006. Ber and other jujubes. International Centre for Underutilised Crops University of Southampton, Southampton, SO17 1BJ, UK. pp. 289.
- Bernet, G.P., Bramardi, S., Calvache, D., Carbonell, E.A. and Asins, M.J. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122: 146-152.
- Choi, S.Y., Yoon, B.R. and Kim, S.S. 2016. Characteristics and nutritional compositions of two jujube varieties cultivated in Korea. *Korean Journal of Food Preservation* 23(1): 127-130.
- Choi, K.J. and Kim C.H. 2010. Impact of introduction of plant breeders' right. *The Journal of Intellectual Property* 5(3): 121-167.
- Cooke, R.J. 1999. Modern methods for the cultivar identification and the transgenic plant challenge. *Seed Science and Technology* 27: 669-680.
- Dagar, J.C., Singh, G. and Singh, N.T. 2001. Evaluating forest and fruit trees for rehabilitation of semiarid alkali-sodic soils in India. *Arid Land Research and Management* 15: 115-133.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. and Honeycutt, R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14: 214-217.
- Gu, W.K., Weeden, N.F., Wu, J. and Wallace, D.H. 1995. Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker assisted selection applications. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 465-470.
- Hebbara, M., Manjunatha, M.V., Patil, S.G. and Patil, D.R. 2002. Performance of fruit species in saline-waterlogged soils. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 15: 94-98.
- Hedren M. 2002. Patterns of allozyme and morphological differentiation in the *Carex flava* complex (*Cyperaceae*) in Fennoscandia. *Nordic Journal of Botany* 22: 257-301.
- Huang, X., Yuasa, A.K., Norikura, T., Kennedy, D.O., Hasuma, T. and Isao, M.Y. 2007. Mechanism of the anti cancer activity of *Zizyphus jujuba* in HepG2 cells. *The American Journal of Chinese Medicine* 35(3): 517-532.
- Ji, Q.C., Zhang, X.M., Ren, S.P., Hu, F.X., Du, Y.X. and Yan, J.F. 2001. New jujube varieties Cangwu 1 and Cangwu 3. *China Fruits* 6: 2-4.
- Kasai, K., Morikawa, Y., Sorri, V.A., Valkonen, J.P.T., Gebhardt, C. and Watanabe, K.N. 2000. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome* 43: 1-8.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R. and Pandey, B.K. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal* 2(4): 141-162.
- Li, X.G., Huang, J., Gao, W.H., Zhang, K.Z. and Tong, J.X. 2004. Yanliang Xiangzao a new drying variety with anti-crack of *Zizyphus jujuba* Mill. *Acta Horticulturae Sinica* 31(3): 418.
- Liu, M.J. and Cheng, C.Y. 1995. A taxonomic study of the genus *Zizyphus*. *Acta Horticulturae* 390: 161-165.
- Liu, P., Dai, L., Liu, M.J., Jiang, H.E., Zhao, Z.H. and Wang, J.R. 2012. 'Chenguang', a new tetraploid chinese jujube cultivar. *Fruits* 67(4): 293-296.
- Ma, Y.K., Want, S.Y., An, B.G., Sun, J.J., Yao, F.J., Ma, Y.K., Wang, S.Y., An, B.G., Sun, J.J. and Yao, F.J. 2000. 'Juzhou Gongzao' a promising late jujube variety. *China-Fruits* 22(1): 38.
- Martin, G.B., Williams, J.G.K. and Tanksley, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 2336-2340.
- Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 9828-9832.
- Muralidharan, K. and Wakeland, E.K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* 14: 362-364.
- Nagaoka, T. and Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- Paran, I. and Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in *lettuce*. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- Plastina, P., Bonofiglio, D., Vizza, D., Fazio, A., Rovito, D., Giordano, C., Barone, I., Catalano, S. and Gabriele, B. 2012. Identification of bioactive constituents of *Zizyphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *Journal of*

- Ethnopharmacology 140(2): 325-332.
- Peterson, A.H., Tanksley, S.D. and Sorrels, M.E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Advance in Agronomy* 46: 39-90.
- Powell, W., Machray, G.C. and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science* 1: 215-222.
- Pratt, D.B. and Clark, L.G. 2004. *Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus*, one species or two? *The Journal of the Torrey Botanical Society* 128: 282-296.
- Ratnaparkhe, M.B., Santra, D.K., Tullu, A. and Muehlbauer, F.J. 1998. Inheritance of inter simple sequence repeat polymorphism and linkage with fusarium wilt resistance gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 348-353.
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 47: 85-140.
- Sneath, P.H.A. 1995. Thirty years of numerical taxonomy. *Systematic Biology*. 44(3): 281-298.
- Vidal, J.R., Delavaunt, P., Coarer, M. and Defontaine, A. 2000. Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theoretical and applied Genetics* 101: 1194-1201.
- Wang, S., Liu, Y., Ma, L., Liu, H., Tang, Y., Wu, L., Wang, Z., Li, Y., Wu, R. and Pang, X. 2014. Isolation and characterization of microsatellite markers and analysis of genetic diversity in chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Plos One* 9: e99842.
- Xu, Y. 2010. *Molecular plant breeding*. CAB International publishing, Wallingford, Oxfordshire, England. p. 535-549.
- Zhang, Y. and Stommel, J.R. 2001. Development of SCAR and CAPS markers linked to the gene in tomato. *Crop Science* 41: 1602-1608.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 15; 20(2): 176-183.

Manuscript Received : May 28, 2019

First Revision : August 20, 2019

Second Revision : August 26, 2019

Accepted : August 27, 2019