韓資植誌 Korean J.Plant.Res. 13(1) 1~10(2000)

RAPD를 이용한 Pecan 품종의 유전적 관계 분석

신동영, 김회택[1], 박종인[1], 노일섭[1]
순천대학교 자원식물개발학과, [1]순천대학교 원예학과

Analysis of Genetic Relatedness by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Pecan Taxa

Dong-Young Shin, Hoy-Taek Kim[1], Jong-In Park[1], Ill-Sup Nou[1]
Department of Resources Plant Exploration
[1]Department of Horticulture, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

ABSTRACT

Pecan is deciduous tree and belongs to the Julandaceae family. Pecan is an economically important as a nut and timber crop. Heterozygosity is expected to be high for typically cross-pollinated. Yet little is known about the nature of genetic variation within this species. In addition, the pedigree of many pecan cultivars remains unknown or is questionable. In this study, the phylogenetic relationships between 22 pecan cultivars and its analyzed by RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). PCR Amplification used 40 randomly selected oligoes as primers. Based on their genetic similarities derived from the RAPD data, the 22 pecan cultivars were classified into different five groups in agarose gel. The 22 pecan cultivars were classified into five sectional groups by UPGMA clustering analysis, too. *C. flacra* and Black walnut showed the 0.9 of similarity index and Farley, Pawnee showed the 0.85 of similarity index. The 22 pecan cultivars were classified into different five groups by analysis of the 4% polyacrylamide gel fraction. (Group Ⅰ : 1, 2, 3, 4, 13, 16, 17, 20, 21 Group Ⅱ : 14,18 Group Ⅲ : 6, 12 Group Ⅳ : 5, 11, 15, 19, 22 Group Ⅴ : 7, 8, 9, 10) Group Ⅴ show the 1.0 of similarity index and Farley, Sturya, Clarke, Pawnee show the 0.98 of similarity index and Kiowa, Schley show the 0.92 of similarity index. Results from this study indicated that RAPD can be used to establish the genetic relationships among the 22 pecan cultivars. Similarity coefficients generally agreed with what would be predicted in cultivars with known pedigrees, and we could accurately construct relationships among cultivars. In addition, we have shown that RAPD provides useful information on the origin of unknown cultivars.

Key words : RAPD, Genetic polymorphism, UPGMA, Pecan cultivars

Corresponding author: 신 동 영, 우.540-742, 순천대학교 자원식물개발학과, Fax : 0661-750-3208
E-mail: sdy@sunchon.ac.kr

서 론

페칸(*Carya illinoinensis* C. Koch)은 북미의 낙엽성 과수이며 히코리와 호두나무와 함께 Juglandaceae에 속한다. 페칸은 열매와 목재를 동시에 이용할 수 있는 장점이 있고 아몬드, 호두와 더불어 견과류에서는 열매의 활용도가 매우 높다. 또한 페칸은 전형적인 이화수분 작물로서 자연계에는 이형 접합체율이 높다.(Madden and Malmalstorm 1975; Romberg 1946).

페칸 유묘육성은 New Orleans에서 Nelsonrhk와 Frescher에 의해 시작되어 1874년에 실생을 판매하기 시작했다. 그 후 Emil Bourgeois는 "Van Demand"를 실생에 접목하여 판매하였으며, 현재는 주로 영양기관을 이용하여 번식하고 있다. 미국에서 페칸은 남동부(South Carolina and North Carolina)로부터 남서부 지역(California)에까지 재배되고 있다(Madden 1979). 그 외의 상업적 생산지역은 멕시코, 이스라엘, 오스트레일리아, 남아공 그리고 브라질 지역 등이 있다(Wetzstein and Sparks 1986). 일반적으로 페칸 품종은 폭넓은 기후조건의 지역에 분포되어 있으며, 생육기간과 기온 적응성의 확대에 의해 품종이 다양하게 육성되었다.

재배되고 있는 모든 페칸 품종은 우연 실생, 가정에 심어진 종자나 과수원 실생으로 부터 선발된 품종과 육종에 의해 선발된 품종으로 나누어진다(Sparks 1992). 페칸의 형질을 향상시키기 위한 최초의 육종 프로그램은 1931년 텍사스의 USDA 육종연구소에 의하여 확립되었다(Marquard 1987). 지금까지의 페칸 품종육성은 정확하고 적극적인 교배에 의한 결과 보다는 방임수분에 의한 실생으로 부터의 결과가 많아 유전적 배경의 연구가 없다.

페칸의 육종목적은 현재의 재배 품종 보다도 열매가 크고 다수성이며, 최대의 수요가치를 갖는 품종을 개발하고, 페칸의 생장습성을 개선하는데 있다(Spark 1992). 품종동정을 위한 동위효소 분석법은 페칸을 비롯한 많은 작물에서 광범위하게 연구되어 졌다(Marquard 1987; Manganaris and Alston 1989; Landry 1994). 그러나 개체군 분화를 위한 육종계획을 세우거나 보다 정밀한 품종간의 유전적 관계를 파악하기에는 분자 마커의 수가 부족하다. 지난 10년간 DNA분자 마커를 이용한 예가 많은 작물에서 있었다. 예를 들면, RFLP분석법은 유전 또는 분자육종의 주된 방법으로 발전되었을 뿐만 아니라 맨델법칙의 유전적 정보분석을 충분히 뒷받침하여 주었다(Lander and Bostein 1989). 견과류에서 RFLP분석은 호두나무(Juglandas spp.)에서 수행된 예가 있다(Fjellstrom and Parfitt 1994). Willams 등(1990)에 의하여 개발된 RAPD분석 기술은 RFLP에 비하여 시간이 적게 들고, 비용이 저렴하고, DNA의 양이 적게 드는 잇점을 가지고 있다. RAPD분석은 유전적 거리 측정, 품종의 다양성 검토, 유전질 동정 및 분류를 하는데 유용한 방법임이 입증되었다.(Echt et al. 1992; Yang and Quiros 1993; Yu and Palus 1993). 견과류에서는 아먼드(Bartolozzi et al. 1994), 사과(Koller et al. 1993; Landry et al. 1994), 복숭아(Lu et al. 1996; Warburton and Bliss 1996), 딸기나무(Graham et al. 1996)에서 유전적 변이를 분석하는데 사용되었다. 또한 육종상 모본의 선발을 위해 적용되어진 예도 있다(Grahma et al. 1996; Iqbal 1997; Nagaoka and Ogihara 1997).

본 연구는 22의 페칸계통 및 품종의 유전적 관계를 검토하고자 시판의 random primer를 이용하여 RAPD 분석을 하였다. 증폭된 DNA단편의 종류와 크기를 유전적 거리값으로 환산하여 유전적 근연 관계를 파악 할 것이며, 페칸 계통 및 품종의 근원과 양친에 관한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

재료 및 방법

공시재료

미국 조지아대학 원예학과 부속 농장에 식재되어 있는 성목 페칸 나무로 부터 엽 조직을 채취하여 RAPD 분석을 위한 DNA추출에 이용하였다. 공시한 22 페칸 taxa(Acc. no 1~22)의 일반적 특징(leaf size, nut shape, nut ridges, shell topography, nut length/width, source nuts/lb, dichrogamy, kernel %, origin)을 Table 1에 나타냈다.

Table 1. General characteristics of used 22 pecan taxa.

Acc. no.	Allies	Leaf size	Nut shape	Nut ridges	Shell topography	Nut length /width	Source nuts/lb (no)	Dichro -gamy	kernel (%)	Source
1	Farley	M*	Oblong to obovate	Yes	Smooth	1.4	60	Ⅱ **	53	Seedling
2	Pawnee	L	Oval	Yes	Rough	1.9	49	Ⅰ	57	Mohawk × Starking hard giant
3	Sioux	S	Ovlong	No	Smooth	2.1	78	Ⅰ	60	Schley × Carmichael
4	USDA 139	S	Ovlong	-	-	1.8	-	-	-	-***
5	KOPF	L	Obovate	-	-	1.2	-	-	-	-
6	Candy	S	Obovate	No	Smooth	1.6	-	-	-	-
7	Red hickory	L	Obovate	Yes	Smooth	1.1	-	-	-	-
8	*C. tomentosa*	L	Obovate	Yes	Rough	1.0	-	-	-	-
9	*C. flacra*	L	-	No	Smooth	1.2	-	-	-	-
10	Black walnut	L	Obovate	No	Rough	1.0	-	-	-	-
11	Cheuenne	M	Oval	Yes	Smooth	1.7	53	Ⅰ		Clark × Odom
12	Chickasaw	M	Obovate	Yes	Smooth	1.7	66	Ⅱ	54	Brooks × Evers
13	Shawnee	S	Ovlong	Yes	Smooth	2.1	57	Ⅱ	56	Schley × Barton
14	Kiowa	M	Ovlong	Yes	Smooth	1.7	48	Ⅱ	58	Mahan × Desirable
15	Osage	M	Oval	Yes	Smooth	1.5	81	Ⅰ	55	Major × Evers
16	Wichita	L	Ovlong	No	Smooth	2.1	57	Ⅱ	60	Halbert × Mahan
17	Desirable	M	Ovlong	Yes	Rough	1.7	47	Ⅰ	52	Sucess × Jewett
18	Schley	L	Oblong to obovate	No	Rough	2.0	65	Ⅱ	58	Stuart seedling
19	Elliot	L	Oval	No	Smooth	1.4	74	Ⅱ	53	Seedling
20	Clarke	M	Oval	No	Smooth	-	-	-	-	-
21	Sturya	M	Ovlong	Yes	Smooth	1.7	52	Ⅱ	47	Seedling
22	*C. corpiformis*	M	Round	No	Rough	-	-	-	-	-

*: S: Small, M: Medium, L: Large. **: Ⅰ : protanddrous catins, Ⅱ : protogynous catkins. ***: -: unknown.

Total DNA를 추출 및 정제

DNA추출은 Dellaporta 등(Dellaporta et al. 1983)의 방법을 변형하였다. 신선한 성엽으로 부터 엽맥을 제거한 후, 약 100mg을 정량하여 액체질소로 분쇄하였다. 분쇄된 엽조직을 1.5㎖용의 microtube에 옮기고 100㎕의 추출용액(10mM Tris-HCl, 0.5M EDTA, 0.1mg proteinase K, 1% lauroyl sarkosyl)을 첨가한 후 50℃에서 1시간 방치하였다. 1시간 방치후 멸균수 550㎕를 첨가하고 12,000 x g, 10분간 원심한 후, 상등액을 새로운 microtube에 옮겼다. 동량의 Tris로 포화된 phenol로 1회 추출 후, 다시금 chloroform-isoamylalcohol(24 : 1)추출을 2회 실시하였다(원액추출물). 원액 추출물로부터 50ul를 새로운 microtube에 옮기고 각 tube마다 10ug의 RNase A를 첨가하여 37℃, 30분간 처리후, proteinase K의 활성을 없애기 위하여 5분간 열탕처리하였고 실온에 5분간 방치하였다(A 추출물). RNase가 처리된 20㎕의 A 추출물에 멸균수 80㎕를 첨가하여 최종 추출용액(B 추출물)으로 한 후, B 추출물로 부터 5㎕씩을 이용하여 PCR실험에 공시하였다.

RAPD분석

PCR 반응물의 준비는 200㎕용의 microtube (Perkin-elmer cetus, Sweden)에 10x reaction buffer (50mM KCl; 10mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.01% Triton X-100), 5㎕의 template DNA, 150uM의 dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 0.25uM의 primer를 각각 혼합한 후, 얼음 속에서 0.2 unit의 Taq DNA polymerase(ID-Pol, Canada)를 첨가하였으며, 멸균수로 최종량을 10㎕로 하였다. DNA 증폭조건은 predenaturation 94℃, 2min, 1 cycle 후, denaturation 94℃, 30 sec; annealing 36℃, 1min; extension 72℃ 2 min, 40 cycle 시행하며, postextension 72℃, 5 min; soaking 4℃로 하였다. 사용한 PCR장치는 Perkin-elmer cetus(Sweden)사의 GeneAmp PCR System 9600이었으며, mineral oil은 사용하지 않았다. 증폭된 산물은 0.5ug/㎖의 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 적정시간 영동 후, photoman(Hoefer, USA)을 이용하여 UV촬영하였다.

각각의 품종간의 다형성을 자세히 살펴 보기 위하여 은염(silver nitrate staining)을 실시하였다. 은염은 4% Polyacrylamide gel을 사용하여 1300V로 1시간 30분동안 전기영동 후 silver nitrate 염색을 하는데, 먼저 전기 영동한 gel판을 탈이온수로 3회 5분간 세척 후 staining solution에 30분간 염색시킨다. 그리고 나서 10초동안 탈이온수로 세척 후 develope solution에 넣고 반응 시키는 데 band가 보일 때 stop solution을 가하여 반응을 정지시킨 후 탈이온수로 10분간 세척 후 건조시킨 다음 다형성을 분석하였다.

유전적 거리값에 의한 유연관계 분석

증폭된 DNA 단편의 유무에 따라 유는 1, 무는 0으로 평가하였으며, 각 품종간의 유전적 거리(1-F)를 Nei and Li의 방법(Ne and Li 1979)에 준하여 계산하였다(F = 2Mxy/(Mx+My); Mx, My: X와 Y는 각 품종에서 증폭된 단편의 총수, MXY: 같은 크기로 증폭된 단편). 유연관계를 조사하기 위하여 품종간의 유전적 거리를 NTSYS Complete Program으로 처리한 후, 이 수치를 UPGMA clustering법에 의하여 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

재배되고 있는 페칸 22종으로부터 total DNA를 추출, 정제하여 RAPD분석을 하였다. 시판의 random primer 40종(OPA 20종, OPB 20종, Operon Co, USA)을 사용하였으며, oligonucleotide의 염기서열과 G+C 함량을 Table 2에 나타냈다.

각각의 primer에 있어서 1.5% Agarose gel상에서 분획된 DNA단편 수는 2개에서 13개로 다양하게 나타났으며, 평균 6개의 단편이 증폭되었다(Table 2). 증폭된 DNA 단편의 크기는 100bp에서 1500bp의 범위에 위치하였다. 증폭된 단편의 수는 oligonucleotide의 염기수에 따라 달라진다. 본 실험에 사용한 primer 40종은 모두 10 mer로써 평균 단편수는 벼, 배추, Allium, 수박, 차나무 등에서와 유사하였다.

페칸종간의 양적형질(성목)과 관련하여 유연관계를 분석하기에 적합한 primer를 선발한 결과 OPA-02, OPA-10, OPA-12, OPB-01의 4종의 primer가 최적이었다. 이 4종의 primer를 이용하여 증폭한 PCR산물을 1.5% Agarose gel상에 분획한 것을 Fig. 1에 나타냈다. 분획 단편의 종류(크기, 수)를 분석한 결과 22의 페칸종은 5개의 그룹으로 구분 할 수 있었다. 그룹 Ⅰ은 Acc. no. 1, 2, 3, 6; 그룹 Ⅱ는 Acc. no. 11, 12, 13, 14, 15, 16; 그룹 Ⅲ은 Acc. no. 17, 18, 19, 20, 21; 그룹 Ⅳ는 Acc. no. 4, 5, 22; 그룹 Ⅴ는 Acc. no. 7, 8, 9, 10으로 그룹지어졌다. 그러나 그룹된 페칸종은 Table 1의 일반적인 특징과 연관하여 설명 할 수 없었으며, 양친의 유전적 배경을 검토하여야 더 정확한 분류가 가능할 것이다.

Table 2의 40종 primer로부터 증폭된 466 DNA단편을 기초로하여 유전적 근연계수를 계산하였다(Table 3). 또한 계산된 근연계수로 22 페칸종간의 근연관계를 NTSYS computer program을 사용하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 그 결과, 22 페칸종은 위에서와 같이 5 그룹으로 구분되었다. 유사도 값이 가장큰 것은 *C. flacra*(Acc. no. 9)와 Black walnut(Acc. no. 10)로 0.90를 나타났으며, Kiowa (Acc. no. 14)와 Red hickory(Acc. no. 7), *C. tome-*

Table 2. Primer sequences and number of amplified fragments

Primer		Oligonucleotide sequence (5' to 3')	G+C contents (%)	No. of amplified fragments
OPA	01	CAGGCCCTTC	70	113
	02	TGCCGAGCTG	70	11
	03	AGTCAGCCAC	60	11
	04	AATCGGGCTG	60	14
	05	AGGGGTCTTG	60	14
	06	GGTCCCTGAC	70	13
	09	GGGTAACGCC	70	15
	10	GTGATCGCAG	60	13
	11	CAATCGCCGT	60	9
	12	TCGGCGATAG	60	13
	13	CAGCACCCAC	70	12
	14	TCTGTGCTGG	60	13
	15	TTCCGAACCC	60	11
	16	AGCCAGCGAA	60	15
	17	GACCGCTTGT	60	13
	18	AGGTGACCGT	60	20
	19	CAAACGTCGG	60	17
	20	GTTGCGATCC	60	10
OPB	01	GTTTCGCTCC	60	14
	02	TGATCCCTGG	60	9
	03	CATCCCCCTG	70	12
	04	GGACTGGAGT	60	9
	06	TGCTCTGCCC	70	9
	07	GGTGACGCAG	70	10
	08	GTCCACACGG	70	27
	09	TGGGGGACTC	70	15
	11	GTAGACCCGT	60	10
	12	CCTTGACGCA	60	17
	13	TTCCCCCGCT	70	11
	15	GGAGGGTGTT	60	14
	16	TTTGCCCGGA	60	7
	17	AGGGAACGAG	60	14
	18	CCACAGCAGT	60	14
	19	ACCCCCGAAG	70	12
	20	GGACCCTTAC	70	12
Total				466

ntosa(Acc. no. 8), *C. flacra*(Acc. no. 9), Black walnut(Acc. no. 10)간에는 유사도값이 0.31로 가장 작았다. 미국에서 재배면적이 넓은 Farley(Acc. no. 1)와 Pawnee(Acc. no. 2)의 유사도 값은 0.85를 나타내었다.

Agarose gel상에서는 저분자 단편(300bp 이하)의 PCR산물이 정확히 분획되지 않는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 선발된 4종(OPA-02, OPA-10, OPA-12, OPB-01)의 primer를 이용하여 증폭시킨 PCR산물을 4% Polyacrylamide gel상에 분획한 후 DNA단편을 분석하여 근연계수를 구하였다(Table 4). 또한 근연계수를 기초로 NTSYS computer

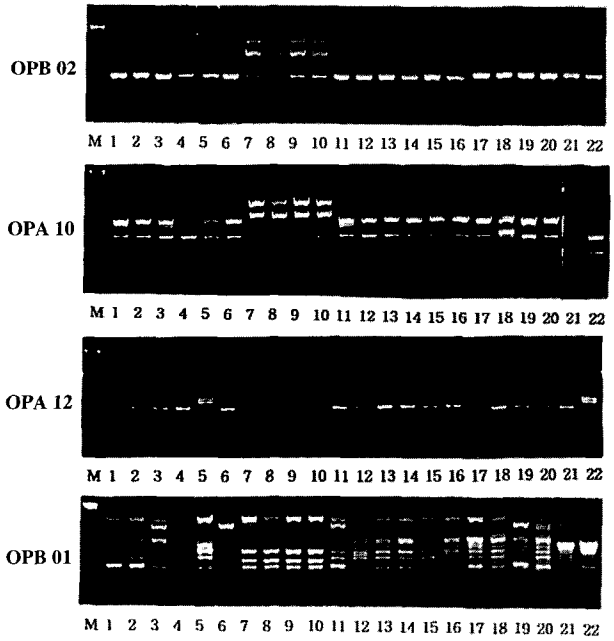

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of randomly amplified pecan tDNA. The tDNA from 22 pecan taxa was amplified using the primer OPA02, OPA10, OPA12, OPB01 and separated on a 1.5% agarose gel. The number of the lane indicates the accession number as in Table 1.

program을 사용하여 dendrogram을 작성 하였다(Fig. 3). 그 결과로부터 5개의 그룹으로 나누어보면 그룹 Ⅰ은 Acc. no. 1, 2, 3, 4, 13, 16, 17, 20, 21; 그룹 Ⅱ는 Acc. no. 14, 18; 그룹 Ⅲ은 Acc. no. 6, 12; 그룹 Ⅳ는 Acc. no. 5, 11, 15, 19, 22; 그룹 Ⅴ는 Acc. no. 7, 8, 9, 10 이었다. 유사도 값이 가장 큰 것은 그룹 Ⅴ의 Red hickory, *C. tomentosa, C. flacra*, Black walnut간으로 1.0이었고, Farley와 Pawnee간과 Sturya와 Clarke간은 공히 0.98를 나타내었으며, Kiowa와 Schley는 0.92를 나타내었다. 즉, Agarose gel과 비교하여 Polyacrylamide gel 분획은 저분자 단편이 다수 검출되어 유사도를 높이는데 관여된다고 생각되었다. Polyacrylamide gel분획 후 은염색하여 단편을 검출하는 것은 Agarose gel에 비하여 시간, 기술, 경비가 요구되지만 보다 정확한 유전적 배경을 설명할 수 있다고 생각되었다.

또한 Agarose gel 분석, Polyacrylamide gel 분석 및 주성분 분석(투고중) 결과를 기초로 22 페칸종의 근연관계를 비교하였다(Table. 5). 위의 3가지 분석법에서 5종; Acc. no. 1(Farley), 8(*C. tomentosa*), 9(*C. flacra*), 10(Black walnut), 22(*C. corpiformis*)만이 동일

Table 3. Pairwise differences among the 22 Pecan taxa. The binomical data was based on results from agarose gel fracition of PCR products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. Farley	1.000																					
2. Pawnee	0.983	1.000																				
3. Sioux	0.931	0.948	1.000																			
4. USDA 139	0.914	0.931	0.948	1.000																		
5. KOPF	0.793	0.776	0.759	0.810	1.000																	
6. Candy	0.862	0.845	0.828	0.810	0.793	1.000																
7. Red hickory	0.397	0.379	0.397	0.414	0.466	0.466	1.000															
8. *C.tomentosa*	0.397	0.379	0.397	0.414	0.466	0.466	1.000	1.000														
9. *C.flacra*	0.397	0.379	0.397	0.414	0.466	0.466	1.000	1.000	1.000													
10. Black walnut	0.397	0.379	0.397	0.414	0.466	0.466	1.000	1.000	1.000	1.000												
11. Cheuenne	0.845	0.828	0.776	0.793	0.776	0.810	0.414	0.413	0.414	0.414	1.000											
12. Chickasaw	0.845	0.828	0.810	0.793	0.776	0.914	0.517	0.517	0.517	0.517	0.862	1.000										
13. Shawnee	0.948	0.966	0.948	0.931	0.741	0.845	0.379	0.379	0.379	0.379	0.828	0.862	1.0000									
14. Kiowa	0.879	0.897	0.914	0.897	0.741	0.810	0.310	0.310	0.310	0.310	0.862	0.793	0.9310	1.0000								
15. Osage	0.793	0.776	0.759	0.741	0.759	0.793	0.431	0.431	0.431	0.431	0.810	0.845	0.8103	0.7758	1.0000							
16. Wichita	0.948	0.966	0.914	0.897	0.810	0.879	0.414	0.414	0.414	0.414	0.793	0.862	0.9310	0.8620	0.7758	1.0000						
17. Desirable	0.897	0.914	0.862	0.845	0.828	0.897	0.466	0.466	0.466	0.466	0.845	0.914	0.8793	0.8103	0.8275	0.9482	1.0000					
18. Schley	0.879	0.897	0.948	0.897	0.741	0.810	0.345	0.345	0.345	0.345	0.828	0.759	0.8965	0.9655	0.7413	0.8620	0.8103	1.0000				
19. Elliot	0.845	0.862	0.845	0.793	0.741	0.810	0.414	0.414	0.414	0.414	0.793	0.828	0.8275	0.7586	0.8103	0.8620	0.9137	0.7931	1.0000			
20. Clarke	0.897	0.914	0.897	0.879	0.862	0.862	0.397	0.397	0.397	0.397	0.810	0.845	0.8793	0.8793	0.7586	0.9482	0.9310	0.8793	0.84481.0000			
21. Sturya	0.914	0.931	0.914	0.897	0.845	0.880	0.379	0.397	0.397	0.397	0.793	0.828	0.8965	0.8965	0.7413	0.7655	0.9137	0.8965	0.82750.98271.0000			
22. *C.Corpiformis*	0.621	0.638	0.655	0.672	0.655	0.690	0.500	0.500	0.500	0.500	0.638	0.672	0.6379	0.6034	0.5862	0.6724	0.7241	0.6379	0.67240.68960.6724	1.0000		

The binomecal data matrix was analyzed according to the NTSYS computer program.

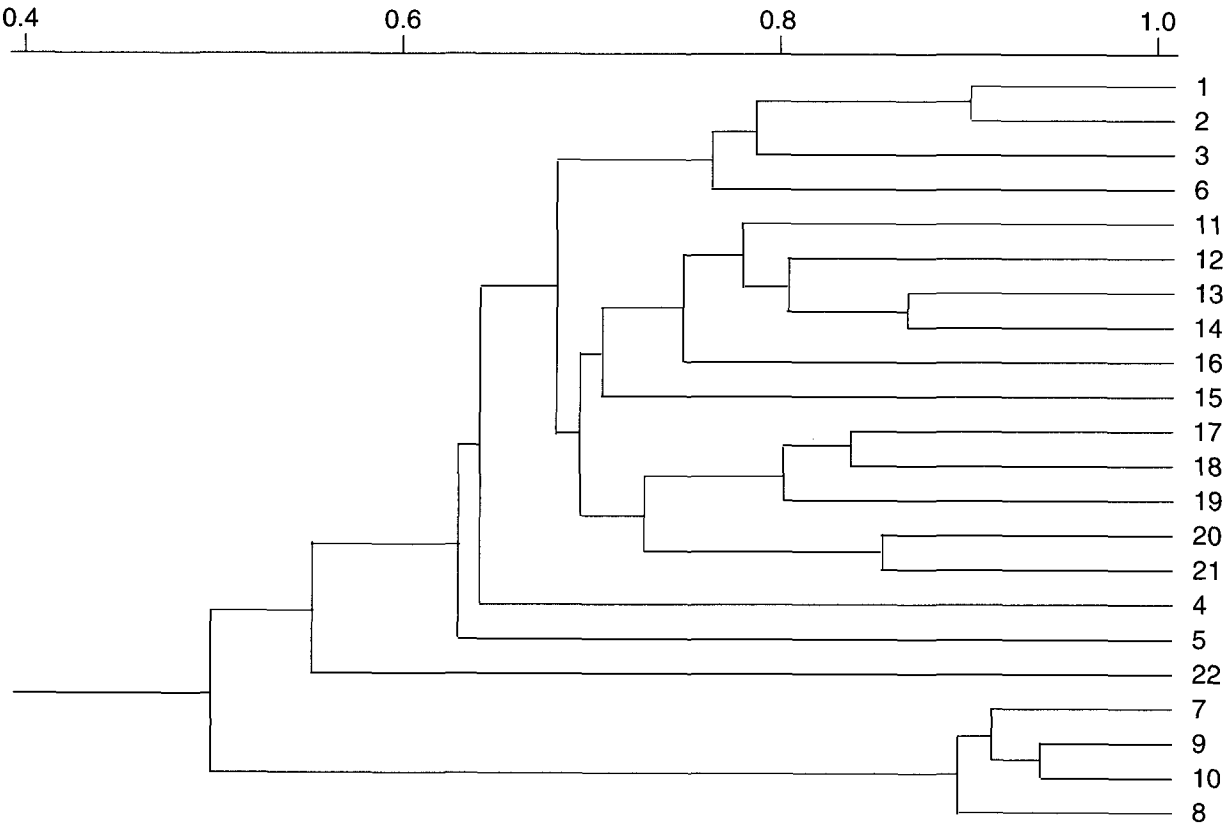

Fig. 2. Dendrogram generated using the NTSYS computer program of phytogenetic analysis illustrating the genetic relationships among 22 pecan taxa evaluated using random primer amplication of genomic DNA(1.5% agarose gel). Relative branch lengths indicate relative genetic distance among taxa.

Table 4. Pairwise differences among the 22 Pecan taxa. The binomical data was based on results from polyacrylamide gel fracition of PCR products.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. Farley	1.000																					
2. Pawnee	0.862	1.000																				
3. Sioux	0.794	0.800	1.000																			
4. USDA 139	0.680	0.683	0.692	1.000																		
5. KOPF	0.633	0.644	0.676	0.644	1.000																	
6. Candy	0.766	0.769	0.787	0.664	0.685	1.000																
7. Red hickory	0.524	0.517	0.508	0.549	0.528	0.571	1.000															
8. *C.tomentosa*	0.519	0.490	0.476	0.499	0.515	0.549	0.887	1.000														
9. *C.flacra*	0.524	0.490	0.490	0.522	0.501	0.571	0.941	0.905	1.000													
10. Black walnut	0.535	0.497	0.497	0.528	0.522	0.551	0.925	0.880	0.975	1.000												
11. Cheuenne	0.723	0.698	0.694	0.635	0.628	0.766	0.556	0.528	0.551	0.558	1.000											
12. Chickasaw	0.726	0.701	0.687	0.646	0.612	0.732	0.531	0.508	0.517	0.519	0.789	1.000										
13. Shawnee	0.737	0.744	0.730	0.667	0.655	0.739	0.560	0.519	0.542	0.553	0.791	0.807	1.000									
14. Kiowa	0.719	0.703	0.712	0.630	0.637	0.717	0.533	0.528	0.524	0.531	0.782	0.794	0.850	1.0000								
15. Osage	0.676	0.678	0.655	0.642	0.667	0.669	0.522	0.508	0.508	0.506	0.685	0.741	0.748	0.7256	1.0000							
16. Wichita	0.707	0.705	0.692	0.633	0.649	0.701	0.526	0.503	0.522	0.519	0.730	0.755	0.780	0.7800	0.7596	1.000						
17. Desirable	0.723	0.689	0.726	0.621	0.628	0.689	0.537	0.501	0.524	0.526	0.755	0.739	0.791	0.7823	0.7301	0.771	1.000					
18. Schley	0.692	0.676	0.717	0.621	0.624	0.694	0.501	0.465	0.501	0.499	0.714	0.717	0.773	0.7596	0.7029	0.757	0.819	1.000				
19. Elliot	0.717	0.714	0.746	0.642	0.626	0.705	0.512	0.472	0.499	0.497	0.712	0.719	0.762	0.7619	0.7097	0.737	0.798	0.794	1.000			
20. Clarke	0.667	0.664	0.692	0.642	0.639	0.673	0.490	0.485	0.481	0.483	0.703	0.687	0.748	0.7397	0.7687	0.723	0.766	0.780	0.746	1.000		
21. Sturya	0.662	0.655	0.660	0.642	0.644	0.655	0.508	0.503	0.490	0.492	0.680	0.651	0.694	0.7120	0.7142	0.705	0.735	0.753	0.741	0.828	1.000	
22. *C.Corpiformis*	0.603	0.599	0.590	0.608	0.610	0.585	0.524	0.501	0.517	0.519	0.549	0.569	0.624	0.5691	0.5804	0.569	0.594	0.549	0.610	0.546	0.580	1.000

The binomecal data matrix was analyzed according to the NTSYS computer program.

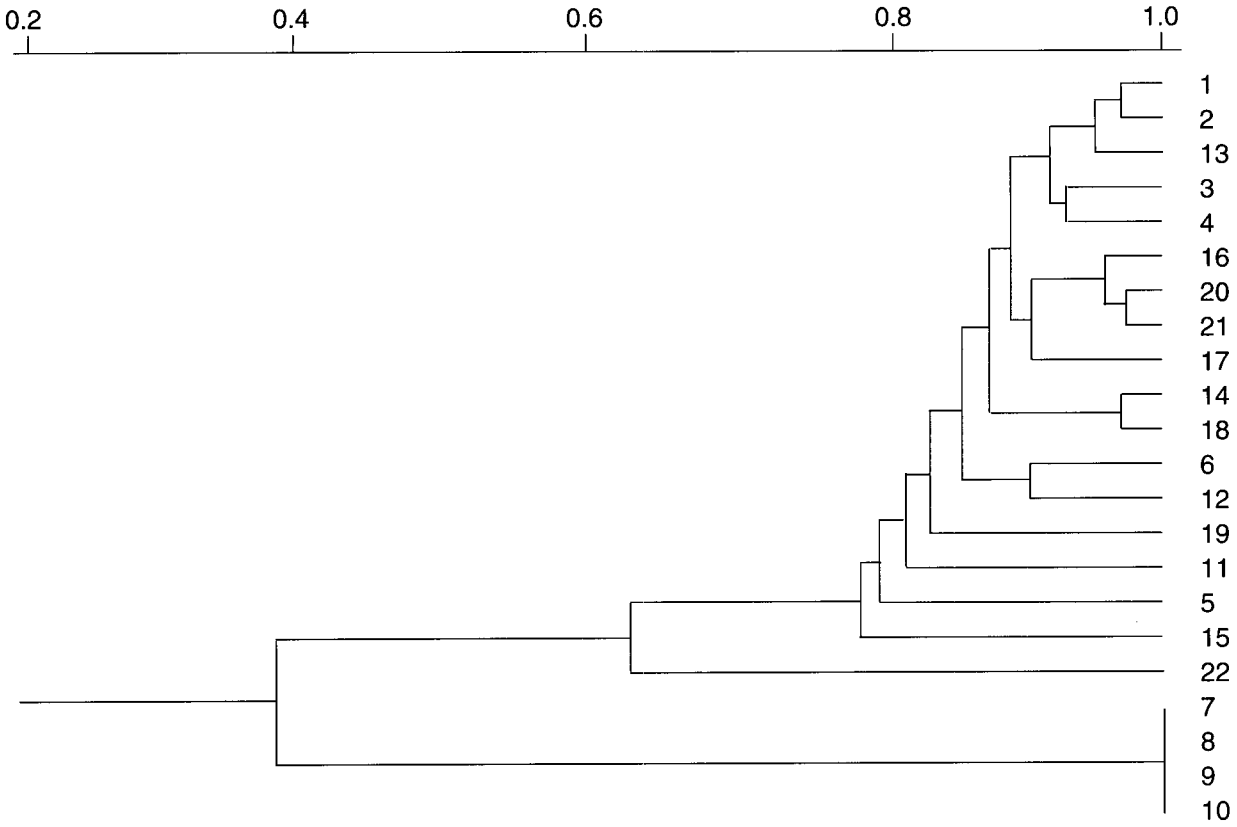

Fig. 3. Dendrogram generated using the NTSYS computer program of phytogenetic analysis illustrating the genetic relationships among 22 pecan taxa evaluated using random primer amplication of genomic DNA(4% polyacrylamide gel). Relative branch lengths indicate relative genetic distance among taxa.

Table 5. Composition of each group classified by the three methods.

Group	PCA score	Agarose gel fraction of PCR products	Polyacrylamide gel fraction of PCR products
Ⅰ	1, 5, 11, 12, 14, 15, 19	1, 2, 3, 6	1, 2, 3, 4, 13, 16, 17, 20, 21
Ⅱ	3, 4, 13, 18, 21	11, 12, 13, 14, 15, 16	14, 18
Ⅲ	2, 16, 17	17, 18, 19, 20, 21	6, 12
Ⅳ	6, 7, 22	4, 5, 22	5, 11, 15, 19, 22
Ⅴ	8, 9, 10	7, 8, 9, 10	7, 8, 9, 10

그룹에서 이탈되지 않았다.

Marquard(1987)은 페칸의 동위효소 분석결과 계통의 근연성과 수형문제의 불일치 원인은 화분오염 또는 표식의 실수라고 하였다. Schley는 Sioux와 Shawnee의 모본이지만 이 3종은 주성분 분석에서는 동일 그룹내에 있었지만 RAPD분석에서는 동일 그룹화에 실패했다. 그러나 3종간의 유사도 값은 0.7이상으로 높았다.

많은 페칸종은 기원이 알려지지 않은 채 재배되어 왔는데, 이번 연구에서 재배면적이 많은 Farley, Pawnee, Sioux가 같은 그룹으로 형성된것을 발견했다. 그리고 보다 정확한 결과를 얻기 위해서는 더욱 많은 primer를 이용하여 Polyacrylamide gel 분획을 할 필요성이 있다고 생각되었다.

적 요

재배되고 있는 22 페칸종간의 RAPD분석을 한 결과, Agarose gel상에서 primer당 평균 6개의 DNA단편이 증폭되었다. 증폭된 DNA 단편의 크기는 100bp에서 1500bp의 범위에 위치하였다. 페칸종간의 유연관계를 분석하기에 적합한 primer를 선발한 결과 OPA-02, OPA-10, OPA-12, OPB-01이 최적이었다. 4종의 primer를 이용하여 증폭한 PCR산물을 1.5% Agarose gel상에 분획하여 단편의 종류를 분석한 결과 22의 페칸종은 5개의 그룹으로 구분 할 수 있었다. 40종 primer로부터 증폭된 466 DNA단편을 기초로하여 유전적 근연계수를 계산하였던 결과 유사도 값이 가장큰 것은 *C. flacra*와 Black walnut로 0.90를 나타났으며, Kiowa와 Red hickory, *C. tomentosa, C. flacra*, Black walnut간에는 유사도 값이 0.31로 가장 작았다. 선발된 4종의 primer를 이용하여 증폭시킨 PCR산물을 Polyacrylamide gel상에 분획한 후 검출된 DNA단편을 분석하였다. 유사도 값이 가장 큰 것은 그룹 Ⅴ의 Red hickory, *C. tomentosa*, *C. flacra*, Black walnut간으로 1.0이었고, Farley와 Pawnee간과 Sturya와 Clarke간은 공히 0.98를 나타내었다. Polyacrylamide gel분획 후 은염색하여 단편을 검출하는 것은 Agarose gel에 비하여 시간, 기술, 경비가 요구되지만 보다 정확한 유전적 배경을 설명할 수 있다고 생각되었다. 또한 Agarose gel 분석, Polyacrylamide gel 분석 및 주성분 분석법에서 Farley, *C. tomentosa*, *C. flacra*, Black walnut, *C. corpiformis*만이 동일 그룹에서 이탈되지 않았다.

사 사

본 논문의 일부는 1995년도 순천대학교 공모과제 학술연구비에 의하여 수행되었음.

인용문헌

Bartolozzi F, Warburton ML, Arulsekar S, Gradziel TM. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123 : 381-387.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB 1938. A plant DNA minipreparation version Ⅱ. Plant Mol. Biol. Rep. 1 : 19-21

Echt CS, Erdhal LA, McCoy TJ. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. Genome 35 : 84-87.

Fjellstrom RG, Parfitt DE. 1994. Walnut (Juglans spp.) Genetic diversity determined by restriction fragment length polymorphism. Genome 37 : 690-700.

Graham J, McNicol RJ, McNicol JW. 1996. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. Theor. Appl. Genet. 93 : 402-406.

Iqbal ME, Aziz N, Saeed NA, Zafar Y, Malik KA. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 94 : 139-144.

Koller B, Lehamann A, McDermont JM, Gessler CCC. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85 : 901-904.

Lu Z, Reighard GL, Baird WV. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. HortScience 31(1) : 127-129.

Lander ES, Bostein D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP

linkage maps. Genetic 121 : 185-199.

Landry BS, Li RQ, Cheng WY, Granger RL. 1994. phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. Theor. Appl. Genet. 89 : 8 47-852.

Marganaris AG, Alston FH. 1989. Glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in apple cultivars and rootstocks. J. Hort. Sci. 64 : 9-15.

Marquard RD. 1987. Isozyme inheritance, polymorphism, and stability of malate dehydrogenase and phosphglucose isomerase in pecan. J Amer. Soc. Hort. Sci. 112 (4) : 717-721.

Nagaoka T, Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphi는 in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94 : 597-602.

Nei M, Li W 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. Pros. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 5269-5273

Sparks D. 1992. Pecan Cultivars: The Orchard' s Foundation. Pecan Production Innovation. Watkinsiville, GA.

Sparks D and Madden GD. 1985. Pisillate flower and fruit abortion in pecan as a function of cultivar, time and pollination. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 219-223.

Warburton ML, Bliss FA. 1996. Genetic diversity in peach (prunus persica L.Batch)revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121 : 1012-1019.

Wetzstein HY, Sparks D. 1986. Flowering in pecan. In: Janick, J. (ed) Horticultural reviews, Avi Pub Co., Westport, CT, Vol 8, pp217-255.

Williams JGK, Kubelil AR, Livk H J, Rafalski J A, Tingey SV. 1990. DNA polymorphi는 amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18 : 6531-6535.

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

Yu K, Pauls KP. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among hetergenous population of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor. Appl. Genet. 86 : 788-794.

(접수일 1999. 11. 20)
(수리일 2000. 1. 20)