S-allele Specific PCR 분석에 의한 사과와 꽃사과 품종의 자가불화합성 유전자형 동정

조강희^{1†*} · 김정희^{2†} · 이정우² · 권순일² · 박종택² · 신일섭¹ · 김세희¹ · 김대현¹ · 최인명¹

¹국립원예특작과학원 과수과, ²국립원예특작과학원 사과시험장

Identification of Self-Incompatibility Genotypes in Apple and Crabapple Cultivars by S-allele Specific PCR Analysis

Kang Hee Cho^{1†*}, Jeong-Hee Kim^{2†}, Jung Woo Lee², Soon-Il Kwon², Jong Taek Park², Il Sheob Shin¹,
Se Hee Kim¹, Dae-Hyun Kim¹, and In Myeong Choi¹

¹Fruit Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science,
Rural Development Administration, Suwon 440-706, Korea

²Apple Research Station, National Institute of Horticultural and Herbal Science,
Rural Development Administration, Gunwi 716-812, Korea

Abstract : Apple (*Malus × domestica* Borkh.) has gametophytic self-incompatibility (S) controlled by the multi-allelic S-locus. In the present study, S-genotypes of 24 apple cultivars including newly released Korean cultivars and seven crabapple cultivars were identified using S-allele specific polymerase chain reaction analysis. Twelve different S-alleles (S₁, S₂, S₃, S₅, S₇, S₉, S₁₀, S₁₆, S₂₁, S₂₃, S₂₆, and S₂₉) from 31 apple and crabapple cultivars were identified using 23 S-allele specific primers. Among them, S₁ (41.7%), S₃ (58.3%), S₇ (29.2%), and S₉ (54.2%) S-alleles were found to be common in 24 apple cultivars. The newly released Korean cultivars 'Arisoo' and 'Hwangok' were genotyped as S₃S₇ and S₃S₉, respectively. S-genotypes information obtained from the present study will be useful to select proper pollinizers for stable production of apple fruit and to design cross of breeding programs.

Keywords : *Malus × domestica* Borkh., Self-incompatibility, S-genotype, PCR

서 언

사과는 배우체형 자가불화합성(gametophytic self-incompatibility) 작물로, 자가불화합성은 단일유전자 좌인 S-locus의 복대립유전자에 의해 조절된다(Kobel et al. 1939). S-locus의 주두측 산물은 ribonuclease의 활성을 갖는 당단백질(glycoprotein)인 S-RNase로 화분측의 자가불화합성 유전자인 F-box와의 상호작용에 의해 자가수분을 억제하는 것으로 알려져 있다(Hegedüs 2006). 따라서 안정적인 결실을 위해서

는 다른 품종의 꽃가루로 인공수분을 시키거나, 수분수 전용 꽃사과 품종 혹은 자가불화합성 유전자형(S-genotype)이 다른 재배품종을 혼식해야 한다. 기존의 과수원은 대부분 재배 품종을 수분수로 이용하고 있으나 과실 수확시기, 병해충 발생 정도 등이 서로 달라 관리상 어려운 점이 많다. 따라서 사과 품종의 S-genotype 정보는 새로운 품종의 육종과 과실 생산을 위한 수분수 선발에 매우 중요하다(Kim et al. 2008).

사과의 S-genotype을 동정하기 위한 다양한 연구들이 진행되어 왔다. Kobel et al. (1939)은 26품종을 이용하여 다양한 교배 후 화분관 신장 및 결실율을 조사하여 11개의 S-allele (S₁-S₁₁)을 동정하였다. 그러나 교배를 통해 자가불화합성을 결정하는 방법은 시간과 노력이 많이 소요되고, 화분관 신장이 환경과 생리적 조건에 영향을 받아 결과가 명확하지 않은

*Corresponding author (E-mail: khc7027@korea.kr, Tel: +82-31-240-3676, Fax: +82-31-240-3709)

[†]The first two authors contributed equally to this work.

(Received on September 19, 2014. Revised on October 16, 2014.
Accepted on October 17, 2014.)

경우가 있다(Van Nerum et al. 2001). Broothaerts et al. (1995)과 Sassa et al. (1996)은 S-RNase에 암호화하는 cDNA를 분리하였고, 장미과 S-RNase의 염기서열에는 5개의 보존영역(conserved region: C1-C5)과 C2와 C3사이에 하나의 변이영역(hypervariable region)이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 변이영역 내에 포함된 인트론은 다형성을 나타낸다(Wu et al. 2013). 이러한 S-RNase의 염기서열 정보를 기초로 하여 S-allele을 동정할 수 있는 분자생물학적 기술이 개발되었다. S-genotype 결정하는 방법에는 S-allele specific primer를 이용한 polymerase chain reaction (PCR) 분석과 제한효소를 이용하는 restriction fragment length polymorphism 분석이 있다(Broothaerts 2003, Janssens et al. 1995, Kim et al. 2008, Kitahara & Matsumoto 2002, Long et al. 2010). Van Nerum et al. (2001)은 Boskovic & Tobutt (1999)이 단백질 분석에 의해 동정된 사과 56품종의 S-genotype을 S-allele specific PCR과 염기서열 분석을 통하여 14품종의 S-genotype을 재정립하였고, Broothaerts (2003)은 사과의 자가불화합성 유전자들을 새롭게 15 S-allele (S₁, S₂, S₃, S₄, S₅, S₇, S₉, S₁₀, S₁₆, S₁₉, S₂₀, S₂₂, S₂₃, S₂₄, S₂₆)로 정립하였다. Kim et al. (2008)은 ‘York Imperial’과 ‘Burgundy’ 품종으로부터 각각

S₃₁과 S₃₂의 S-allele을 동정하였고, Long et al. (2010)은 S₄₄, S₄₅, S₄₆의 새로운 S-allele을 보고하였다.

국내에서 교배를 통한 사과 품종 육종은 1988년 국립원예특작과학원에서 육성한 ‘홍로’ 품종을 시작으로 현재까지 꽃사과 3종을 포함하여 27품종이 육성되었다. ‘후지’ 등 기존 품종들의 S-genotype은 밝혀져 있지만 ‘아리수’, ‘썸머킹’ 등 국내에서 육성한 신품종은 S-genotype에 대한 정보가 잘 알려져 있지 않다. 새로 육성된 사과 품종들의 정확한 S-allele의 구명은 기존 주요 품종과 신품종과의 수분 가능 여부 등을 판단하는데 매우 중요하다.

따라서 본 연구는 S-allele specific PCR분석을 통해 신품종을 포함한 사과 주요 재배품종과 꽃사과 품종의 S-genotype을 결정하여 육종프로그램에서 교배조합 작성, 품종재배 시 최적 수분수 선정 등의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 Genomic DNA 추출

국립원예특작과학원 사과시험장에 재식되어 보존중인 사과 국내육성 품종 17종, 도입품종 7종의 재배품종과 최근 개

Table 1. List of apple and crabapple cultivars used in this study.

No.	Cultivar	Parentage (S-genotype)	Reference ^z	Origin
<i>Apple</i>				
1	Alps Otome (S ₁ S ₉)	Unknown	-	Japan
2	Arisoo (S ₃ S ₇)	Yoko (S ₃ S ₉) × Senshu (S ₁ S ₇)	1, 5	Korea
3	Chukwang (S ₃ S ₉)	Fuji (S ₁ S ₉) × Mollie's Delicious (S ₃ S ₇)	1, 2, 3, 4, 5	Korea
4	Fuji (S ₁ S ₉)	Ralls Janet (S ₁ S ₂) × Delicious (S ₉ S ₁₉)	1, 2, 5	Japan
5	Gala (S ₂ S ₅)	Kidd's Orange Red (S ₅ S ₉) × Golden Delicious (S ₂ S ₃)	1, 2, 5	USA
6	Gamhong (S ₁ S ₉)	Spur Earliblaze (S ₁ S ₁₉) × Spur Golden Delicious (S ₂ S ₃)	4	Korea
7	Green Ball (S ₃ S ₇)	Golden Delicious (S ₂ S ₃) × Fuji (S ₁ S ₉)	1, 2, 5	Korea
8	Hongan (S ₁ S ₃)	Fuji (S ₁ S ₉) × Jonathan (S ₇ S ₉)	1, 2, 5	Korea
9	Honggeum (S ₃ S ₇)	Senshu (S ₁ S ₇) × Hongro (S ₁ S ₃)	1, 2, 4, 5	Korea
10	Hongro (S ₁ S ₃)	Spur Earliblaze (S ₁ S ₁₉) × Spur Golden Delicious (S ₂ S ₃)	4	Korea
11	Hongso (S ₁ S ₃)	Yoko (S ₃ S ₉) × Hongro (S ₁ S ₃)	3, 4, 5	Korea
12	Hwahong (S ₃ S ₉)	Fuji (S ₁ S ₉) × Sekaiichi (S ₃ S ₉)	1, 5	Korea
13	Hwangok (S ₃ S ₉)	Kogetsu (S ₃ S ₇) × Yataka Fuji (S ₁ S ₉)	1	Korea
14	Manbok (S ₁ S ₉)	Earliblaze (S ₁ S ₁₉) × Fuji (S ₁ S ₉)	1, 4, 5	Korea
15	Picnic (S ₁ S ₅)	Fuji (S ₁ S ₉) × Sansa (S ₅ S ₇)	1, 4, 5	Korea
16	Sansa (S ₅ S ₇)	Gala (S ₂ S ₅) × Akane (S ₇ S ₂₄)	1, 4, 5	Japan
17	Seohong (S ₃ S ₉)	Tsugaru (S ₃ S ₇) × Chukwang (S ₃ S ₉)	1, 2, 3, 4, 5	Korea
18	Sinano Sweet (S ₁ S ₇)	Fuji (S ₁ S ₉) × Tsugaru (S ₃ S ₇)	1, 2, 3, 5	Japan
19	Summer Dream (S ₇ S ₉)	Tsugaru (S ₃ S ₇) × Natsumidori (S ₃ S ₉)	1, 2, 3, 5	Korea

Table 1. Continued.

No.	Cultivar	Parentage (S-genotype)	Reference ^z	Origin
20	Summer King (S ₃ S ₉)	Fuji (S ₁ S ₉) × Golden Delicious (S ₂ S ₃)	1, 2, 5	Korea
21	Sunhong (S ₃ S ₉)	Hongro (S ₁ S ₃) × Chukwang (S ₃ S ₉)	3, 4	Korea
22	Tsugaru (S ₃ S ₇)	Golden Delicious (S ₂ S ₃) × Unknown	1, 2, 5	Japan
23	Yeohong (S ₁ S ₉)	Jonathan (S ₇ S ₉) × Fuji (S ₁ S ₉)	1, 2, 5	Korea
24	Yoko (S ₃ S ₉)	Golden Delicious (S ₂ S ₃) × Unknown	1, 2, 5	Japan
<i>Crabapple</i>				
25	Golden Bell (S ₂ S ₂₃)	Gala (S ₂ S ₅) × Mo.84 (S ₄ S ₂₆)	1, 2, 5	Korea
26	<i>Malus prunifolia</i> (S ₇ S ₂₉)	Wild species		China
27	Maypole (S ₁₀ S ₁₆)	McIntosh Wijcik (S ₁₀ S ₂₅) × <i>Malus Baskatong</i> (S ₁₆ S ₂₆)	1, 2	France
28	Purple Lemoine (S ₇ S ₉)	<i>Malus</i> × <i>atrosanguinea</i> × <i>Malus niedzwetskyana</i>	-	France
29	Rose Bell (S ₂₁ S ₂₆)	Gala (S ₂ S ₅) × Mo.84 (S ₄ S ₂₆)	1, 2, 5	Korea
30	Sentinel (S ₂₁ S ₂₆)	Unknown	-	New Zealand
31	Yantaishagou (S ₉ S ₂₁)	Unknown	-	-

^zParentage's S-genotypes were reported by references. 1, Broothaerts (2004); 2, Hegedüs (2006); 3, Heo et al. (2011); 4, Kim et al. (2006); 5, Yamane & Tao (2009)

발된 ‘골든벨’과 ‘로즈벨’ 품종이 포함된 7종의 꽃사과 품종을 실험재료로 사용하였다(Table 1). 사과나무의 어린 잎을 채취하고 액체질소로 곱게 마쇄한 후 DNeasy plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA의 순도는 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고 DNA 양은 분광광도계(NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 정량분석하였다. PCR분석에는 DNA를 5 ng·μL⁻¹의 농도로 희석하여 이용하였다.

S-allele specific primer를 이용한 PCR분석

사과 재배품종과 꽃사과 품종의 S-genotype을 동정하기 위하여 기존에 보고된 Broothaerts (2003), Long et al. (2010)과 Son et al. (2013)의 21종의 S-allele specific primer를 본 실험에 사용하였다(Table 2). PCR 반응은 총 15 μL 반응액에 genomic DNA 40 ng, 200 μM dNTP, 5 pmol S-allele specific primer, 1 × PCR buffer (Genetbio, Daejeon, Korea) 및 PCR 반응 시 비특이적 DNA 증폭을 최소화하기 위하여 0.5 unit의 Hot-start Taq DNA polymerase를 첨가하여 수행하였다. PCR 기기는 C-1000 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여, 95°C에서 10분간 초기변성 후 95°C에서 30초, 55-66°C에서 30초, 72°C에서 1분간 총 30회 반복하고 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 종료하였

다. PCR 산물은 1.4% agarose gel에서 전기영동하여 S-genotype을 확인하였다. S-allele S₁₆과 S₂₂의 동정은 FTC5, OWB249 primer를 이용하여 PCR 수행 후 증폭산물을 TaqI 제한효소로 65°C에서 2시간 처리하였고, 3% agarose gel에 전기영동하여 절단된 단편 수와 크기에 따라 S-genotype을 결정하였다.

결과 및 고찰

사과 신품종의 S-genotype에 대한 정보는 신육성 품종의 재식 시 주요 품종과의 교배 친화성 여부를 사전에 판단할 수 있는 정보를 제공하기 때문에 이를 바탕으로 품종 구성을 선택하면 사전에 결실 불량 요인을 차단할 수 있다. 이는 신육성 품종 보급률을 높이고 안정적인 결실 및 정형과 생산에 매우 중요하다. 본 실험에서는 새로 육성한 품종 ‘아리수’, ‘황옥’ 등을 포함한 주요 재배품종과 꽃사과 품종의 S-genotype을 구명하고자 하였다.

사과 재배품종 24종과 꽃사과 7종의 총 31품종의 유엽에서 추출한 DNA와 S-allele specific primer를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 그 결과 S₁, S₂, S₃, S₅, S₇, S₉, S₁₀, S₁₆ (S₂₂), S₂₁, S₂₃, S₂₆, S₂₉의 12개 S-allele이 증폭되었고(Fig. 1), S₄, S₁₁, S₁₉, S₂₀, S₂₄, S₃₁, S₄₄, S₄₅, S₄₆은 증폭되지 않았다. MdS₁Sp primer를 이용한 PCR 분석에서는 31품종 중에서 ‘알프스오프메’, ‘후지’, ‘감홍’, ‘홍안’ 등 10종의 재배품종에

Table 2. S-allele specific primers used for PCR amplification.

S-allele	Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing temp. (°C)	Reference
S ₁	MdS ₁ SpF MdS ₁ SpR	TGTAAGGCACCGCCATATCATAC CAACCTCAACCAATTCAGTCAATGA	734	62	Long et al. (2010)
S ₂	MdS ₂ SpF MdS ₂ SpR	AACATGAATCGAAGTGAATTATTTA TTGAGGTTTGGTTCCTTACCATG	489	55	”
S ₃	MdS ₃ SpF MdS ₃ SpR	GGCGAAAATTAAACCGGAGAAGAA CCTCTCGTCCTATATATGGAAATCAC	292	58	”
S ₄	MdS ₄ SpF MdS ₄ SpR	ATTGCAAGACAAGGAATCGTCGGAA AGAAATGTGCTCTGTTTTATCG	533	63	”
S ₅	FTC10 FTC11	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC TAATAATGGATATCATTGGTAGG	346	60	Broothaerts (2003)
S ₇	MdS ₇ SpF MdS ₇ SpR	AGTAAATCAACCGTGGATGCTCAG TTACAATATCTACCTGTTTCCTGGG	397	63	Long et al. (2010)
S ₉	MdS ₉ SpF MdS ₉ SpR	CCACTTTAATCCTACTCCTTGTAGA TCAATTTCTTCTGTGTCCTGAATT	522	63	”
S ₁₀	FTC12 FTC228	CCAAACGTACTCAATCGAAG ATGTCGTCCCGTGTCTGAATC	209	66	Broothaerts (2003)
S ₁₁	MdS ₁₁ SpF MdS ₁₁ SpR	AAATATTGCAAGGCGCCGC TTTCAATATCTACCAGTCTCCGGC	678	63	Long et al. (2010)
S ₁₆	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	274, 243+31 (<i>TaqI</i>)	60	Broothaerts (2003)
S ₁₉	MdS ₁₉ SpF MdS ₁₉ SpR	GCCTTCAAACAAGAATGGACC TCAATATCCACCAATGACCTGTT	481	63	Long et al. (2010)
S ₂₀	MdS ₂₀ SpF MdS ₂₀ SpR	GTTGTGGCCTTCAGACTCG GGCCAACACTTTTATTTTTCATC	882	64	Long et al. (2010)
S ₂₁	MdS ₂₁ SpF MdS ₂₁ SpR	AAGTAATTGCCCGATAAGGAACATA AGTTTATGAAATGTTCTCCGCTGTA	584	63	Long et al. (2010)
S ₂₃	FTC222 FTC224	CAATCGAACCAATCATTTGGT GGTGCATATTGTTGGTACTAATG	237	60	Broothaerts (2003)
S ₂₄	MdS ₂₄ SpF MdS ₂₄ SpR	ATGGCTCCTGTGCGTCTTCCC CGTCATCCGTGTATAGGGCAACT	421	61	Long et al. (2010)
S ₂₆	MdS ₂₆ SpF MdS ₂₆ SpR	TCCATCAAACGTGACTTCTCAT ATCCTTCAGCATCCTGATTCTG	423	55	”
S ₂₉	A29PL A29PR	TATAAACATGGCTCCTGTGCG TCGTTTGGCACTTGAGTTTTG	217	60	Son et al. (2013)
S ₃₁	MdS ₃₁ SpF MdS ₃₁ SpR	TGACCCAAAATATTGCAAGGCGC TTTCAATATCTACCAGTCTCCGGC	556	63	Long et al. (2010)
S ₄₄	MdS ₄₄ SpF MdS ₄₄ SpR	GCATGGTAGGACCTGACCCAAAGTA TCTCAACCAATTGAGTCGTCGTACC	561	63	”
S ₄₅	MdS ₄₅ SpF MdS ₄₅ SpR	CCAGAAGGTTGCAAGACACAGAAAT AGTTTTGGTGCCTTATTGTTGGTAC	641	63	”
S ₄₆	MdS ₄₆ SpF MdS ₄₆ SpR	CCCAACGTGCTCGATCGAACA TCAATTTCTTCTGTGTCCAGAATC	212	61	”

서만 734 bp 크기의 S₁ allele이 증폭되었고, MdS₃Sp primer를 이용한 분석에서는 ‘아리수’, ‘추광’, ‘그린볼’, ‘썸머킹’ 등 14종의 재배품종에서만 292 bp 크기의 S₃ allele이 증폭되었다(Fig. 2). 본 실험에서 증폭된 S-allele의 크기는 염기서열 분석을 통하여 정확히 확인하지 않았기 때문에 기존에 논문에서 보고된 크기를 인용하여 나타내었다. S₂ allele은 ‘갈라’와 ‘골든벨’ 품종에서만 489 bp 크기의 밴드로 동정되었고, S₅ allele은 ‘피크닉’, ‘갈라’, ‘산사’ 품종에서만 346 bp 크기의 밴드로 동정되었다. S₅ allele은 Long et al. (2010)이 보고한 MdS₅Sp primer를 이용하여 분석하였을 때는 Heo et al. (2011)의 결과와 동일하게 증폭되지 않았다. 55~64°C의 다양한 annealing 온도조건에서도 증폭이 되지 않았는데 이는 S₁₀ 과 S₂₃ allele을 증폭하는 primer도 동일하였다. 이러한 결과는 S-allele을 가진 품종의 염기서열에 single nucleotide

polymorphism이 존재하는데 기인하는 것으로 추정하였다(Heo et al. 2011). 따라서 이들 S-allele의 다형성을 회복하기 위하여 많은 노력이 필요하므로 본 실험에서는 Broothaerts (2003)이 보고한 primer를 이용하여 S₅, S₁₀, S₂₃ allele을 동정하였다(Table 2).

S-allele specific primer를 이용한 사과 31품종의 S-genotype 분석 결과는 Table 3에 나타내었고, ‘썸머킹’, ‘황옥’ 등 신육성 품종을 포함한 24종 재배품종의 S-genotype 분석 결과는 Fig. 3과 같다. S₁S₃의 S-allele을 가진 품종은 ‘홍안’, ‘홍로’, ‘홍소’로, ‘홍로’ 품종의 S-genotype은 모본의 ‘스퍼어리 브레이즈’(S₁S₁₉)와 부분의 ‘스퍼 골든 데리셔스’(S₂S₃)로부터 유래되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 ‘홍안’ 품종은 ‘후지’(S₁S₉)와 ‘홍옥’(S₇S₉)을 교배하여 육성된 품종이나 S-genotype은 S₁S₃로 나타났으며, ‘골든 데리셔스’(S₂S₃)와 ‘후지’(S₁S₉)

Fig. 1. Genomic PCR amplification products using specific primers for each of the S-alleles in apple. M, 100 bp plus DNA ladder (Bioneer); S₁, ‘Hongan’; S₂, ‘Gala’; S₃, ‘Arisoo’; S₅, ‘Sansa’; S₇, ‘Honggeum’; S₉, ‘Summer King’; S₁₀, ‘Maypole’; S₁₆ (S₂₀), ‘Maypole’; S₂₁, ‘Rose Bell’; S₂₃, ‘Golden Bell’; S₂₆, ‘Sentinel’; S₂₉, *Malus prunifolia*.

Fig. 2. Results of PCR amplification with MdS₃SpF and MdS₃SpR primers in 31 apple cultivars. Cultivars correspond to the 31 genotypes listed in Table 1. M, 100 bp plus DNA ladder.

를 교배하여 육성된 품종인 ‘그린볼’은 S₃S₇ 로 확인되었다. ‘감홍’(S₁S₉) 품종도 양친인 ‘스퍼어리 브레이즈’(S₁S₁₉)와 ‘스퍼 골든 데리셔스’(S₂S₃) 품종에는 S₉ allele이 존재하지 않았다. 이들 품종들은 교배 시 다른 품종의 화분이 이용되었거나 방임수분 등에 기인한 것으로 추정되며 추후 양친에 대한 재검토가 필요하다(Heo et al. 2011). 중과종으로 육성된 ‘피크닉’의 S-genotype은 S₁S₅로 확인되어 ‘후지’와 ‘홍로’를 포함한 대부분의 재배품종과 교배친화성이 높아 수분수로 이용이 가능하다. ‘시나노 스위트’와 ‘산사’ 품종의 S-genotype은 각각 S₁S₇과 S₅S₇로 확인되었다. S₃S₇의 S-genotype은 ‘그린볼’을 포함하여 국내육성 품종인 ‘아리수’, ‘홍금’과 도입품종인 ‘쓰가루’에서 확인되었다. ‘아리수’는 ‘양광’(S₃S₉)과 ‘천추’(S₁S₇)를 교배하여 2010년에 육성된 품종으로 착색기에 기온이 높은 지역에서도 착색이 잘 되는 장점이 있다. S₃S₉의 S-genotype은 신육성 품종인 ‘황옥’과 ‘썸머킹’ 등 6종의 국내육성 품종과 도입품종인 ‘양광’에서 확인되었고, ‘쓰가루’(S₃S₇)와 ‘하록’(S₃S₉) 품종을 교배하여 육성된 ‘썸머드림’ 품종은 S₇S₉의 S-genotype을 나타내었다. 이와 같이 국내 육성 품종에서는 주로 S₁(41.7%), S₃(58.3%), S₇(29.2%), S₉(54.2%)의 S-genotype이 확인되었는데 이는 국내 사과 육종프로그램에서 양친으로 대부분 ‘후지’(S₁S₉), ‘쓰가루’(S₃S₇), ‘홍옥’(S₇S₉), ‘스퍼 골든 데리셔스’(S₂S₃)와 같은 소수의 외국품종이 사용되었기 때문으로 추정된다. 따라서 국내에서 육성된 사과 품종의 유전적 변이의 폭은 좁은 것으로 판단되므로 새

로운 품종을 육성하기 위해서는 다양한 유전자원을 육종프로그램에 도입하여 변이의 폭을 확대할 필요가 있다.

꽃사과는 해에 따라 개화기 차이가 있으므로 수분수로 사용 시 3~4품종을 혼식하는 것이 안전하다. 재배품종의 수분수로 활용하기 위하여 7종의 꽃사과 품종의 S-genotype을 분석 결과는 Fig. 4와 같다. ‘Purple Lemoine’ 품종은 ‘썸머드림’과 동일한 S₇S₉로, *Malus prunifolia*는 S₇S₂₉의 S-allele이 확인되었다. ‘Purple Lemoine’와 *Malus prunifolia*는 기존의 보고에서는 S-genotype을 동정할 수 없었으나(Son et al. 2013), 본 실험을 통하여 이들의 S-genotype이 밝혀졌다. 또한 기존 보고에서 S₂₆의 S-allele 한가지 유전자형만 동정되었던 ‘Sentinel’ 품종은 S₂₁S₂₆으로, S₉ S-allele만 동정되었던 ‘Yantaishagou’ 품종은 S₉S₂₁로 확인되었다. S₁₆과 S₂₂ S-allele의 염기서열은 99%가 동일하여 각각의 allele을 증폭할 수 있는 특이적인 primer를 제작하기 어렵지만, 이들의 allele은 제한효소 *TaqI*이 인지하는 염기서열 부위에 의해 구분할 수 있다(Broothaerts 2003, Long et al. 2010). S₁₆과 S₂₂ S-allele을 증폭할 수 있는 특이적인 FTC5와 WB249 primer를 이용하여 PCR분석 후 증폭된 274 bp크기의 PCR산물을 *TaqI*으로 처리하여 전기영동으로 확인하면 S₁₆ allele은 243 bp와 31 bp크기의 밴드를, S₂₂ allele은 199 bp, 44 bp, 31 bp 크기의 밴드를 갖는다(Broothaerts 2003). 본 실험에서는 FTC5와 WB249 primer를 이용한 PCR분석에서 31품종 중 ‘Maypole’ 품종만이 증폭되었고 PCR산물의 *TaqI* 제한효소 처리를 통하

Table 3. S-allele genotypes of apple and crabapple cultivars by S-allele-specific PCR.

S-allele genotype	Cultivar
S ₁ S ₃	Hongan, Hongro, Hongso
S ₁ S ₅	Picnic
S ₁ S ₇	Sinano Sweet
S ₁ S ₉	Alps Otome, Fuji, Gamhong, Manbok, Yeohong
S ₂ S ₅	Gala
S ₂ S ₂₃	Golden Bell
S ₃ S ₇	Arisoo, Green Ball, Honggeum, Tsugaru
S ₃ S ₉	Chukwang, Hwahong, Hwangok, Seohong, Summer King, Sunhong, Yoko
S ₅ S ₇	Sansa
S ₇ S ₉	Summer Dream, Purple Lemoine
S ₇ S ₂₉	<i>Malus prunifolia</i>
S ₉ S ₂₁	Yantaishagou
S ₁₀ S ₁₆	Maypole
S ₂₁ S ₂₆	Rose Bell, Sentinel

여 243 bp와 31 bp 크기의 밴드를 확인하였다. 따라서 ‘McIntosh’ ($S_{10}S_{25}$)의 무측지성 변이품종인 ‘McIntosh Wijcik’과 꽃사과 품종인 ‘Baskatong’의 교배를 통해 육성된 ‘Maypole’ 품종의 S -genotype은 $S_{10}S_{16}$ 으로 확인되어 Van Nerum et al. (2001)의 결과와 일치하였다. ‘Baskatong’ 품종의 S -genotype은 $S_{16}S_{26}$ 으로 알려져 있다(Broothaerts 2003, Verdoodt et al. 1998). ‘골든벨’과 ‘로즈벨’은 국립원예특작과학원 사과시험장에서 육성한 꽃사과 품종으로 본 실험 결과 S -genotype은 각각 S_2S_{23} 과 $S_{21}S_{26}$ 으로 확인되었다(Table 3, Fig. 4). 이 두 품종은 ‘갈라’ 품종과 대목인 Mo.84를 교배하여 육성된 품종으로 양친이 동일하다. ‘갈라’ 품종의 S -genotype은 S_2S_5 이나 부분으로 이용된 Mo.84의 S -genotype은 알려진 바 없다. Mo.84의 S -genotype을 확인하기 위하여 21종의 primer를 분석한 결과 S_4S_{26} 인 것으로 확인되어(자료 미제시), 추후 ‘골

든벨’과 ‘로즈벨’ 품종의 양친에 대한 검토가 필요할 것으로 판단된다. 본 실험에서는 S -allele specific PCR 분석을 통하여 사과 31 품종 모두에서 자가불화합성 두 개의 대립유전자에 해당되는 프라이머 조합에서만 증폭이 되었는데 이는 분석 방법의 타당성을 간접적으로 나타낸 것이다. S -allele specific primer를 이용한 분석은 S -genotype의 동정뿐 만 아니라 계통분석 및 품종간의 유전적 변이 등을 구명하는 데에도 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

현재까지 보고된 S -allele specific primer를 이용하여 분석한 결과 다수의 꽃사과 품종의 S -genotype을 동정하기는 어려웠다. 꽃사과 ‘Manchurian’과 ‘Spectabilis’ 품종은 각각 S_{24} 와 S_{45} 의 하나의 S -allele만 동정되었다. 따라서 추가적인 S -allele specific primer의 검토와 새로운 S -genotype의 동정이 가능하도록 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Fig. 3. Genotyping of S -allele by PCR with specific primers in 24 apple cultivars. The PCR product sizes were reported by Broothaerts (2003) and Long et al. (2010). Cultivars correspond to the 24 genotypes listed in Table 1. M, 100 bp plus DNA ladder.

Fig. 4. Genotyping of S -allele by PCR with specific primers in 7 crabapple cultivars. The PCR product sizes were reported by Broothaerts (2003) and Long et al. (2010). M, 100 bp plus DNA ladder. 1, Golden Bell (S_2S_{23}); 2, *Malus prunifolia* (S_7S_{29}); 3, Maypole ($S_{10}S_{16}$); 4, Purple Lemoine (S_7S_9); 5, Rose Bell ($S_{21}S_{26}$); 6, Sentinel ($S_{21}S_{26}$); 7, Yantaishagou (S_9S_{21}).

적 요

사과는 배우체형 자가불화합성을 나타내는데 이는 *S*-locus의 복대립유전자에 의해 조절된다. 본 연구는 *S*-allele specific PCR분석을 통해 신품종을 포함한 24종의 사과 주요 재배품종과 7종의 꽃사과 품종의 자가불화합성 유전자형(*S*-genotype)을 결정하고자 수행하였다. 31종의 재배품종과 꽃사과 품종을 23종의 *S*-allele specific primer을 이용하여 분석한 결과 12개의 *S*-allele (*S*₁, *S*₂, *S*₃, *S*₅, *S*₇, *S*₉, *S*₁₀, *S*₁₆, *S*₂₁, *S*₂₃, *S*₂₆, *S*₂₉)이 동정되었다. 그 중에서 24종의 재배품종에는 *S*₁(41.7%), *S*₃(58.3%), *S*₇(29.2%), *S*₉(54.2%)의 *S*-allele이 흔히 존재하는 것으로 확인되었다. 국내육성 신품종인 ‘아리수’와 ‘황옥’의 *S*-genotype은 각각 *S*₃*S*₇과 *S*₃*S*₉으로 동정되었다. 본 실험에서 얻은 *S*-genotype 정보는 안정적인 사과 과실생산에 적합한 수분수 선발과 육종프로그램에서 교배조합 작성에 유용하게 활용될 것이다.

REFERENCES

1. Boskovic R, Tobutt KR. 1999. Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. *Euphytica* 107: 29-43.
2. Broothaerts W. 2003. New findings in apple *S*-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some *S*-allele. *Theor. Appl. Genet.* 106: 703-714.
3. Broothaerts W, Hanssens GA, Proost P, Broekaert WF. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27: 499-511.
4. Hegedüs A. 2006. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus × domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.). *Intl. J. Hort. Sci.* 12: 31-36.
5. Heo S, Han SE, Kwon SI, Jun JH, Kim MJ, Lee HJ. 2011. Identification of *S*-allele genotypes of Korean apple cultivars by using allele-specific polymerase chain reaction. *Hort. Environ. Biotechnol.* 52: 158-162.
6. Janssens GA, Goderis IJ, Broekaert WF, Broothaerts W. 1995. A molecular method for *S*-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor. Appl. Genet.* 91: 691-698.
7. Kim H, Park J, Hirata Y, Nou I. 2008. Molecular characterization of new *S*-RNases (*S*₃₁ and *S*₃₂) in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *J. Plant Biol.* 51: 202-208.
8. Kim HT, Hattori G, Hirata Y, Kim DI, Hwang JH, Shin UK, Nou IS. 2006. Determination of self-incompatibility genotypes of Korean apple cultivars based on *S*-RNase PCR. *J. Plant Biol.* 49: 448-454.
9. Kitahara K, Matsumoto S. 2002. Sequence of the *S*₁₀ cDNA from ‘McIntosh’ apple and a PCR-digestion identification method. *HortScience* 37: 187-190.
10. Kobel F, Steinegger P, Anliker J. 1939. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. *Landw. j. Schweiz.* 53: 160-191.
11. Long S, Li M, Han Z, Wang K, Li T. 2010. Characterization of three new *S*-alleles and development of an *S*-allele-specific PCR system for rapidly identifying the *S*-genotype in apple cultivars. *Tree Genet. Genom.* 6: 161-168.
12. Sassa H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano T, Koba T, Ikehashi H. 1996. Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547-557.
13. Son KM, Choi DG, Kwon SI, Kim BO, Choi C, Kang IK. 2013. Selection of crabapple pollinizers for ‘Fuji’ apple through physiological and genetic analysis. *Protected Hort. Plant Fac.* 22: 116-122.
14. Van Nerum I, Geerts M, Van Haute A, Keulemans J, Broothaerts. 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative ‘new’ *S*-alleles. *Theor. Appl. Genet.* 103: 584-591.
15. Verdoodt L, Van Haute A, Goderis IJ, De Witte K, Keulemans J, Broothaerts W. 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.
16. Wu J, Gu C, Khan MA, Wu J, Gao Y, Wang C, Korban SS, Zhang S. 2013. Molecular determinants and mechanisms of gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32: 53-68.
17. Yamane H, Tao R. 2009. Molecular basis of self-(in) compatibility and current status of *S*-genotyping in Rosaceous fruit trees. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 78: 137-157.