

참다래 유전체 연구 동향

김성철 · 김호방 · 좌재호 · 송관정

Current status and prospects of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) genomics

Seong-Cheol Kim · Ho Bang Kim · Jae-Ho Joa · Kwan Jeong Song

Received: 23 December 2015 / Revised: 30 December 2015 / Accepted: 30 December 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Kiwifruit is a new fruit crop that was commercialized in the late 1970s. Recently, its cultivation and consumption have increased rapidly worldwide. Kiwifruit is a dioecious, deciduous, and climbing plant having fruit with hairs and various flesh colors and a variation in ploidy level; however, the industry consists of very simple cultivars or genotypes. The need for efficient cultivar improvement together with the evolutionary and biological perspectives based on unique plant characteristics, have recently encouraged genome analysis and bioinformatics application. The draft genome sequence and chloroplast genome sequence of

kiwifruit were released in 2013 and 2015, respectively; and gene annotation has been in progress. Recently, transcriptome analysis has shifted from previous ESTs analysis to the RNA-seq platform for intensive exploration of controlled genetic expression and gene discovery involved in fruit ascorbic acid biosynthesis, flesh coloration, maturation, and vine bacterial canker tolerance. For improving conventional breeding efficiency, molecular marker development and genetic linkage map construction have advanced from basic approaches using RFLP, RAPD, and AFLP to the development of NGS-based SSR and SNP markers linked to agronomically important traits and the construction of highly saturated linkage maps. However, genome and transcriptome studies have been limited in Korea. In the near future, kiwifruit genome and transcriptome studies are expected to translate to the practical application of molecular breeding.

[†]These authors contributed equally to this work.

S.-C. Kim[†]
농촌진흥청 국립원예특작과학원 남해출장소
(Namhae Sub-Station, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Namhae 52430, Korea)

H. B. Kim[†]
㈜바이오메딕 생명과학연구소
(Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 145482, Korea)
제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부 바이오소재 전공
(Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju 63243, Korea)

J.-H. Joa
농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소
(Research Institute of Climate Change and Agriculture, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Jeju 63240, Korea)

K. J. Song (✉)
제주대학교 생물산업학부 원예환경전공
(Faculty of Bioscience and Industry, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
제주대학교 아열대농업연구소
(Research Institute for Subtropical Agriculture & Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: kwansong@jeju.ac.kr

Keywords Kiwifruit, Genome, Transcriptome, Molecular Markers, Genetic Map, Molecular Breeding

서론

키위프루트(Kiwifruit, 이하 키위)는 다래나무과(Actinidiaceae), 다래나무속(*Actinidia*)에 속하는 다년생 덩굴성 식물이다. 이 속은 북위 50도에서 적도까지, 한대에서 열대지방까지 널리 분포하고 있다. 그러나 지리학적 중심부는 북위 25도에서 30도 사이의 양쯔강 유역과 서강(Xi Jang) 유역 사이의 중국 남부에 있는 산맥과 언덕이다. 경제적으로 중요한 *A. chinensis* var. *chinensis*, *A. chinensis* var. *deliciosa*, *A. arguta*, *A. eriantha*를 포함하여 약 54종, 75개 분류군이

존재한다. 키위의 기본 염색체 수는 $x=29$ 이며, 종 또는 품종에 따라 2배체에서 8배체에 이르기까지 다양한 배수성을 갖는다(Huang 2014; Watanabe et al. 1990; Yan et al. 1997). 우리나라에는 다래(*A. arguta* Planch.), 개다래(*A. polygama* Maxim.), 쥐다래(*A. kolomikta* Maxim.), 섬다래(*A. rufa* Planch.) 등 4종이 분포하고 있다(Cui et al. 2002; Huang 2014; Watanabe et al. 1990; Yan et al. 1997).

키위는 전년도에 성장한 액아로부터 새로운 줄기가 나오며 1년에 6m까지 자란다. 잎은 보통 긴 엽병을 갖고 있으며, 한 개체에서도 형태와 크기가 매우 다양하다. 또한 기본적으로 자웅이주식물로서 암꽃과 수꽃이 아주 다른 특징을 갖고 있다(Ferguson 1984; Schmid 1978). 암꽃은 양성화의 외형을 갖지만 속이 비어있는 꽃가루를 생산한다. 꽃은 컵모양으로 엽액(leaf axil)에서 발생하지만 가끔 소화사에서 발생하기도 하며, 다섯개 내외의 얇은 꽃잎이 흰색, 노란색, 또는 핑크색으로 핀다. 수꽃은 보통 수술에 짧은 화사와 작은 화분들을 갖고 있으며 자방은 퇴화된 형태로 남아있다(Li 1952; Pei and Law 1948). 과실은 부드럽고 즙이 많으며 400~1,200개의 종자가 들어있다. 과육색은 *A. chinensis* var. *deliciosa* 계통은 녹색이나 *A. chinensis* var. *chinensis*의 경우 노란색에서 녹색, 암녹색 및 적황색으로 다양하다. 과실의 크기, 형태, 과피 털의 유무, 맛, 그리고 화학적인 조성은 종에 따라서도 다양하다(Huang 2014; Liang 1984).

키위의 이용에 대한 역사는 1,000년 이상에 이른다. 그러나 본격적으로 전 세계에 널리 알려진 것은 1970년대 이후로써 산업화 역사는 매우 짧은 과수이다. 최근에는 미국 식품의약국(FDA)이 규정한 20대 영양소를 골고루 함유하고 있고 특히, 암 예방과 변비해소 등에 대한 기능성이 알려지면서 소비량이 계속 증가하고 있다(Collins et al. 2001; Collins et al. 2003; Ferguson and Bollard 1990; Kim et al. 2011). 우리나라에는 1977년 처음 도입되어 양다래 또는 키위라는 이름으로 재배되었으며 2002년 19천톤에서 2004년 36천톤, 2009년에는 47천톤, 그리고 2012년에는 49천톤으로 소비량이 꾸준히 증가하고 있다. 그러나 국내 생산량은 충분치 않아 60% 정도를 수입에 의존하고 있다(KAMIS 2014).

세계적으로 다래나무속 식물의 육종에 대한 본격적인 연구는 1980년대 이후에 이루어졌다고 할 수 있다. 1980년대 말까지는 야생에서 *A. chinensis* var. *chinensis*와 *A. chinensis* var. *deliciosa*를 대상으로 대과형(>80 g), 고비타민(>120 mg/100 g) 및 고당도(>14°Brix 이상)의 우량계통을 선발하였고 1990년대 이후에야 *Actinidia* 종들간 교배육종을 통한 신품종 육성이 이루어지고 있다(Kim et al. 2007a, 2007b; Kim et al. 2009). 또한 자연상태에서도 2배체($2n=2x=58$), 4배체($2n=4x=116$), 6배체($2n=6x=174$) 등 배수성이 다양하게 분포하고 있다. 종자의 발아율은 90% 이상으로 높은 편이

나 어린 개체는 외형적으로 암수 및 여러 가지 과실특성 판별이 불가능하기 때문에 육종 프로그램에서 조기선발에는 많은 한계가 있다(Frédérique et al. 1994; Kim et al. 2003; Zhang et al. 1983). 따라서 이를 극복하기 위한 유전체 및 전사체 분석, 유전자지도 작성 등 분자생물학적 연구가 다양하게 시도되고 있고, 본 논문에서는 이러한 최근 연구동향 및 전망에 대해 소개하고자 한다.

키위 유전체 연구 현황

키위 유전체 특성 및 분석 동향

최초의 키위 유전체 draft 서열은 중국 화북기술대학교(Hefei Univ. of Technol.) 및 사천대학교(Sichuan Univ.) 연구 그룹에 의해 2013년에 보고되었다. 중국 그룹은 중국 중부 지역의 야생 유전자원으로부터 클론 선발된 이형접합성(heterozygous) 이배체($2n=2x=58$)인 적색 과육 형질을 갖는 'Hongyang' 품종(*A. chinensis* var. *chinensis*)에 대한 유전체 해독을 수행하였다(Huang et al. 2013). 키위 게놈 크기는 약 758 Mb로 예측되었는데(Hopping 1994), Illumina HiSeq 플랫폼을 이용하여 예측된 게놈 크기의 약 140배(105.8 Gb)를 커버할 수 있도록 whole-genome-sequencing (WGS)을 수행하였다. *De novo* 어셈블리를 통해 예측된 게놈 크기의 약 81.3%를 대표하는 616.1 Mb의 키위 유전체 draft 서열을 완성하였다. 또한 이전에 보고된 키위 ESTs (expressed sequence tags) 서열을 이용하여(Crowhurst et al. 2008) *de novo* 어셈블리의 완성도를 검정하였다. 키위 유전체 분석 결과, 36% (약 222 Mb)는 repetitive element로 구성되었는데, 이는 감귤 유전체(약 20.5%)에 비해서는 높은 비율이나 토마토(약 63.2%)에 비해서는 훨씬 낮은 비율이다(The Tomato Genome Consortium 2012; Xu et al. 2013). *A. chinensis*에 대한 ESTs 서열(Crowhurst et al. 2008) 및 *A. chinensis* 잎과 열매에 대한 RNA-seq 데이터를 사용하여 분석한 결과(Huang et al. 2013), 키위 유전체 상에는 39,040개의 단백질 암호화 유전자가 존재할 것으로 예측되었다. 단백질 암호화 유전자 외에도 293개 rRNA, 511개 tRNA, 236개 miRNA, 91개 snRNA, 307개 snoRNA가 예측되었다. 애기장대, 벼, 포도, 토마토 유전체와 비교유전체 분석을 수행한 결과, 1,455개 클러스터에 속하는 유전자들이 키위 특이적임이 밝혀졌다. 토마토, 감자, 포도 유전체와의 비교를 통해 유전체 진화를 분석한 결과, 3번의 whole genome duplication (WGD)이 일어났음이 예측되었으며, 이러한 결과는 ESTs 분석을 통해 도출된 결과와도 일치하였다(Shi et al. 2010). 키위는 비타민 C (아스코르브산) 함량이 매우 높은 과일로 알려져 있다(Vissers et al. 2013). 키위, 애기장대, 포도, 스위트 오렌지, 토마토에서 아스코

르브산 생합성 및 재생 경로에 관여하는 유전자들에 대해 비교 분석한 결과, 최근에 일어난 2번의 WGD에 의해 아스코르브산 생합성 및 재생 관련 유전자들에 확장 (gene expansion)이 일어났고, 이로 인해 비타민 C 함량이 증가하였음을 제시하였다. 또한 카로티노이드, 플라보노이드와 같이 영양학적으로 중요한 2차대사산물 생합성 유전자에도 유전체 진화 과정에서 확장이 일어났음을 제시하였다. 선천적 면역체계를 통해 병 저항성에 관여하는 중요 유전자인 NBS-LRR (nucleotide-binding site and leucine-rich repeat)과 RLK-LRR (receptor-like kinases with an LRR domain) 유사 유전자들도 각각 96개, 261개 존재함이 밝혀졌다.

최근 Illumina 플랫폼을 이용한 WGS을 통해 *A. chinensis* var. *chinensis* (2x, 4x)와 *A. chinensis* var. *deliciosa* (4x, 6x)에 대한 염색체 유전체가 해독되었다. 분석된 키위 염색체 유전체의 크기는 155,446-157,557 bp였으며, 113개 유전자 중에서 Clp-protease 유전자가 염색체 진화과정에서 소실되었으며 핵으로 이동했을 가능성이 제시되었다(Yao et al. 2015).

키위 전사체 분석 동향

키위에서 전사체 정보를 대규모로 확보하기 위하여 뉴질랜드 그룹에 의해 4개 종(*A. chinensis* var. *chinensis*, *A. chinensis* var. *deliciosa*, *A. arguta*, *A. eriantha*)에 대한 132,577개의 ESTs 정보가 최초로 확보되었다(Crowhurst et al. 2008). 대규모 ESTs 서열로부터 향기(에스테르, 테르펜), 알레르기 유발 항원, 기능성(아스코르브산, 퀴닌산), 색소(엽록소, 카로티노이드, 플라보노이드, 안토시아닌) 및 후숙 관련 유전자들이 발굴되었다.

최근에는 차세대 유전체 분석 기술의 발달로 ESTs 확보와 분석보다는 주로 RNA-seq 기술을 이용한 전사체 분석이 이루어지고 있다. RNA-Seq을 이용하여 과육 발달에 따른 전사체 분석, 대조 품종과 특정 색소(카로티노이드, 안토시아닌) 축적 품종과의 전사체 비교 분석, 병원균 침입 등의 환경 스트레스 하에서의 전사체 분석 등에 관한 연구가 주로 이루어지고 있다.

Gao 등(2013)은 골드 키위(*A. chinensis* var. *chinensis*) 'Jinfeng' 품종을 사용하여 착색 전 단계(color-turning pre-phase), 착색 단계(color-turning phase), 성숙 단계(mature phase)에 대한 전사체 분석을 수행하였다. DGE (digital gene expression) 분석 결과, 착색 전 단계와 착색 단계 사이에는 2,641개 유전자, 착색 전 단계와 성숙 단계 사이에는 2,671개 유전자, 착색 단계와 성숙 단계 사이에는 1,457개 유전자가 차등 발현되었다. GO (gene ontology)와 pathway function 분석 결과, 3가지 발달 단계간에 엽록소 합성 관련 102개 unigene 중에서 12개, 카로티노이드 생합성 관련 111개

unigene 중에서 14개 유전자가 현저한 발현 차이를 보였다. 이상의 결과로부터 엽록소와 카로티노이드 생합성 관련 25개 유전자가 골드 키위의 과육 색을 조절하는 핵심 유전자임을 제시하였다. Zhang 등(2015c)은 상기 결과를 바탕으로 카로티노이드 생합성 관련 유전자들에 대한 qRT-PCR 분석을 수행하여 핵심 unigene을 발굴하였다.

레드 키위 품종인 'Hongyang' (*A. chinensis* var. *chinensis*)은 영양학적으로 중요한 비타민 C와 독특한 과육색을 부여하는 안토시아닌 함량이 풍부한 품종이다. Li 등(2015)은 'Hongyang' 품종의 열매 발달 단계를 7개로 나누어 전사체 분석을 수행하고, 유전자 구조와 alternative splicing 분석 및 열매 발달 단계간 전사체 비교 분석 등을 위해 유전체 draft 서열(Huang et al. 2013) 등에 reads-mapping을 수행하였다. MapMan과 계통수 분석 등을 통하여 식물 호르몬, 당, 전분, 아스코르브산과 같은 중요 대사물질의 생합성 및 대사에 관여하는 유전자들을 발굴하였다. 당 및 전분 생합성 관련 유전자의 발현이 키위 열매 발달 과정에서의 당 및 전분 함량과 일치하였다. 아스코르브산 대사경로가 매우 활성화되어 있음을 제시하였고, 또한 안토시아닌 축적에 관여하는 유전자들을 발굴하여 열매 발달에 따른 발현 분석을 수행하였다.

환경 스트레스는 작물의 생산량, 품질 등에 영향을 미치는 주요 제한요인 중의 하나이다. 고온은 적육 키위에서 안토시아닌 축적을 저해해서 과육의 색을 불량하게 만든다. Man 등(2015)은 고온 조건에 의한 적육 키위 품종에서의 과육 착색 억제의 분자기작을 규명하기 위하여 전사체 분석과 DGE 분석을 수행하였다. 안토시아닌 생합성, 수송 및 조절에 관여하는 후보 유전자들을 발굴하여 분석한 결과, 고온은 안토시아닌 색소의 생합성을 현저히 억제할 뿐만 아니라 색소의 수송을 지연시키는 것으로 나타났다. 적육 키위 열매에 미치는 고온의 효과는 cell rescue (항산화 효소 등), 열충격 인자, 안토시아닌 경로, 안토시아닌 관련 전사인자, 신호전달 및 발달 등 많은 중요 형질 및 생물학적 경로와 밀접하게 연관되는 것으로 밝혀졌다.

키위는 토양 침수에 특히 민감한 식물로 알려져 있다 (Savé and Serrano 1986). Zhang 등(2015a)은 4일간 침수 처리한 키위 뿌리와 대조구에 대한 RNA-seq을 수행하여 *de novo* assembly와 gene annotation을 통해 전사체를 분석하였다. *De novo* assembly 결과, 140,187개의 unigene을 확보하였으며, non-redundant (nr) protein DB 검색 결과, 56,912개 unigene (40.6%)에서 기능이 알려진 단백질들과 유사도 (cutoff E-value 10^{-5})를 보였다. DEG (differentially expressed unigenes) 분석 결과, 14,843개 전사체가 비처리구와 처리구 간에 차등 발현을 보였는데, 5,697개 DEG는 침수에 의해 발현이 증가하였으며, 9,146개는 발현이 감소하였다. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) DB와의

비교 검색 결과, 리보솜, 식물호르몬 신호전달, 전분 및 당 대사 경로 관련 유전자가 DEG의 대부분을 차지하였으며, 많은 전사 조절인자(AP2/ERF, WRKY, TGA, MYB, bZIP 등)도 확인되었다.

키위 궤양병은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)에 의해 발병하며, 세계적으로 키위 생산을 위협하는 가장 중요한 질병이며, 최근 급속도로 확산되고 있다(Scortichini et al. 2012). Psa와 숙주식물인 키위와의 상호작용에 관한 분자생물학적 기작을 이해하기 위하여 Michelotti 등(2015a, 2015b)은 비감염 식물과 감염 식물(감염 후 3, 24, 48시간)에 대한 전사체 분석을 수행하였다. 또한 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)을 유도하는 acibenzolar-S-methyl (ASM) 처리시 관찰되는 저항성 증가의 분자 기작을 규명하기 위하여 비처리구와 ASM 사전 처리 후 감염시킨 식물체에 대한 전사체 분석을 수행하였다. DEG 분석 결과, ASM을 사전 처리하지 않은 식물에 비해 ASM을 처리한 식물체에서 훨씬 많은 DEG가 확인되었다. 349개의 DEG가 ASM 미처리 후 병원균 감염시킨 식물체에서 확인된 반면, ASM 사전 처리 후 감염시킨 식물체에서는 637개 DEG가 확인되었다. 이들 중 213개는 앞의 349개 DEG와 중복되었다. ASM 자체 만을 처리한 경우에 974개의 DEG가 확인되었으며, 이들 중 70개는 ASM 사전 처리 후 감염시킨 식물체의 DEG (637개)와 중복되었다. 전반적으로 ASM을 처리하지 않은 식물체에서의 초기 반응은 병원균 감염에 대한 전형적인 방어기작을 수반하였으나, 감염에 대응할 정도의 수준은 아니었다. 반면, ASM 사전 처리 식물체에서, SAR 반응을 수반하는 분자기작이 활성화되었으며, 식물체는 저항성을 보였다. 골드 키위 품종인 ‘Hort16A’ (*A. chinensis* var. *chinensis*)는 해충인 *Hemiberlesia lataniae* (노린재목: 깍지벌레과) 저항성을 갖는 것으로 알려져 있다(Hill et al. 2011). Hill 등(2015)은 cDNA microarray 기법을 이용하여 ‘Hort16A’에 *H. lataniae* 감염시킨 후 2일, 7일 식물체에 대한 전사체 분석을 수행하였다. 감염 2일 후 17,512개의 unigene 중에서 272개의 DEG가 확인되었고, 7일 후에는 5,284개(30%)가 확인되었다. 광합성(광계 II) 관련 유전자 발현이 감소한 반면, 2차대사와 관련된 유전자의 발현이 현저히 증가하였다. 식물병발생관련단백질(PR단백질), 페닐프로파노이드 경로, NBS-LRR, receptor-like kinase-leucine rich repeat signaling 단백질과 같이 생물학적 스트레스 관련 DEG가 많이 확인되었다. Microarray를 이용한 전사체 분석 결과는 살리실산(SA) 경로의 활성화와 더불어 PTI (pattern-triggered immunity)와 ETI (effector-triggered immunity)를 수반하는 방어 반응의 관여도 제시하였다. 전사체 결과를 바탕으로 SA를 외부에서 처리한 결과, ‘Hort16A’ 식물체 상에서 *H. lataniae*의 생장이 감소하였다.

마이크로 RNA (miRNA)는 식물의 일생 동안 성장과 발

달 및 환경에 대한 적응성 등의 다양한 측면을 조절하는 것으로 알려져 있다(Li and Zhang 2016). Avsar와 Aliabadi (2015)는 키위 ‘Hongyang’의 유전체와 전사체 DB로부터 *in silico* 방법을 통해 58개의 후보 miRNA 정보를 확보하고, 각 miRNA에 대한 표적 유전자 정보도 확보하였다. 국내에서 차세대유전체 분석기술을 활용한 키위 전사체 분석은 아직 이루어지고 있지 않은 상황이다. 다만, Kim 등(2010a)은 자웅이주 식물인 키위에서 성 결정 및 분화의 분자생물학적 기작을 이해하기 위하여 GeneFishing 방법(Kim et al. 2004a)을 통해 수그루인 ‘Songongu’ 품종(*A. chinensis* var. *chinensis*)와 암그루인 ‘Jecy Gold’ 품종(*A. chinensis* var. *chinensis*)의 화서(floral buds)에서 수꽃 혹은 암꽃에서 차등 발현되는 유전자들을 분리하고 그들의 분자생물학적 특성을 보고한 바 있다. 차등 발현되는 유전자들 중에서 화분 특이적으로 발현되었으며, 세포벽 변형에 관여하는 것으로 알려진 *pectin methylesterase* 유전자에 대한 분자생물학적 특성을 상세 분석한 보고만 있을 뿐이다(Kim et al. 2015).

분자마커 개발과 유전자지도 작성 동향

Actinidia 속에서의 분자마커는 종내 혹은 종간 계통적 유연관계, 유전 다양성 등 유전적 특성 분석을 수행하기 위하여 주로 사용되어 왔다. 또한 F₁ 잡종 선발, 계통도(pedigree) 작성, 유용 대립 유전자를 가진 모본 선발 등 효율적인 키위 육종 프로그램 확립을 위하여 적용이 시도되고 있다(Wang and Gleave 2012). Restriction fragment polymorphisms (RFLPs)를 이용한 최초의 키위 분자마커가 보고된 이래(Crowhurst et al. 1990), amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) (Novo et al. 2010; Testolin et al. 2001; Xiao et al. 1999), randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs) (Gill et al. 1998; Huang et al. 2002; Shirkot et al. 2002), simple sequence repeats (SSRs) (Fraser et al. 2004; Huang et al. 1998; Korkovelos et al. 2008; Man et al. 2011), single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Zhou et al. 2011) 마커가 개발되어 왔다. 자웅이주(dioecy)인 *Actinidia*에서 성결정 유전자는 포유동물과 마찬가지로 XX/XY 시스템으로 작용하는 한 쌍의 염색체상에 위치하는 것으로 여겨지고 있다(Harvey et al. 1997; Testolin et al. 1995). 교배 후대에서는 암나무와 수나무가 1:1로 분리되기 때문에 유식물 단계에서 암수를 효과적으로 판별하여 품종 선발 효율을 높이기 위한 RAPD 및 SCAR (sequence characterized amplified regions) 마커가 발굴되었다(Gill et al. 1998; Shirkot et al. 2002). 키위는 과피에 털이 있어 소비자들이 생과를 소비하는데 불편을 느끼고 있다. 과피에 털이 없는 키위 품종의 개발을 목적으로 조기 선발을 위한 SCAR 마커가 국내 연구진에 의해 개발되기도 하였다(Kim et al. 2004b).

2000년대 초반 이전에는 주로 RFLP, RAPD, AFLP 마커 등이 사용되어 왔으나 집단 특이성으로 인한 범용성 문제나 개발의 어려움 등으로 인해 marker-assisted selection (MAS)을 수행하기에는 부적절한 것으로 평가되고 있다. 그러므로 데이터베이스 상에 유전자 서열 정보의 집적, 대규모 ESTs 또는 next generation sequencing (NGS) 기술을 이용한 유전체 및 전사체 정보 해독 등으로 대규모 서열 기반의 SSR (Fraser et al. 2004; Fraser et al. 2005; Fraser et al. 2009; Man et al. 2011; Testolin et al. 2001) 또는 SNP 마커(Huang et al. 2013; Zhang et al. 2015b) 등이 발굴되고 있다. 또한 Fraser 등(2005)은 20개 EST-유래 SSR 마커를 선별하여 21종, 120개 유전자형(genotype)에서 침투도(marker transferability)를 분석하여 활용성을 평가한 바 있다.

키위에 대한 최초의 유전자지도가 *A. chinensis* x *A. callosa* 교배 조합에서 pseudo-test cross mapping 전략으로 SSR 마커와 AFLP 마커를 이용하여 작성되었다(Testolin et al. 2001). 모본 유전자도는 160개 마커(SSR 71개, AFLP 89개)에 대해 38개 연관그룹을 생성하고, 부본 유전자도는 116개 마커(SSR 28개, AFLP 87개)에 대해 성결정 연관그룹 포함 31개 연관그룹을 생성하였으며, 성 결정인자는 *A. callosa*에 맵핑되었다. 유전자지도의 길이는 각각 1,758.5 cM과 1,104.1 cM (예상 계놈 길이의 약 46%와 34%)이었다(Testolin et al. 2001). Fraser 등(2009)은 이배체인 *A. chinensis*의 종내 교배집단을 재료로 644개의 EST-유래 SSR 마커를 이용한 유전자도를 작성하였다. 유전자도는 반수체 염색체 수(n=29)와 일치하는 29개 연관그룹으로 구성되었다. Gill et al (1998)에 의해 발굴된 성 연관 SCAR 마커는 flower-sex 표현형과 일관되게 아종말체 영역(subtelomeric region)의 단일 연관 그룹에 맵핑되었다.

키위 유전체 해독이 이루어짐으로써 대규모 SNP 마커가 발굴되고 있는데, Huang 등(2013)은 *A. chinensis* x *A. eriantha*의 F₁ 교배집단에 대해 3,379개 SNP 마커를 활용하여 29개 연관그룹, 5,504.5 cM의 유전자도를 작성하였다. 최근, Zhang 등(2015b)은 restriction site-associated DNA (RAD) sequencing 기법을 통해 발굴한 SNP 마커를 *A. rufa* x *A. chinensis*의 F₁ 교배집단에 적용하여 고밀도 유전자도를 작성하였다. 섬다래와 키위는 29개 연관그룹에 각각 2,651 cM 길이를 가진 2,426개 SNP 마커와 3,142 cM 길이에 4,214개 SNP 마커로 구성되었다. Zhang 등(2015b)은 또한 3개의 성 특이 SSR 마커를 발굴하고, 이들의 물리적 위치가 25번 염색체의 아종말체 영역 1 Mb 구역에 존재할 수 있음을 제시하였다.

Cysteine protease (Cp)는 키위 열매에 고농도로 축적되며, 비정상 혹은 잘못 접힌 단백질의 제거 외에도 곰팡이 및 해충에 대한 저항성을 부여하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Krüger et al. 2002; Van der Hoorn 2008). Nieuwenhuizen 등(2012)은 이배체인 *A. chinensis* 종내 교배

집단에 대한 quantitative trait loci (QTL) 맵핑을 통해 CP 활성에 대한 주요 QTL 좌위가 16번 연관그룹에 속함을 확인하였다. CP QTL 좌위가 actinidin 유전자와 동일한 부위에 위치함을 확인하고, 교배 분리집단 및 다른 품종에 적용하여 틀변경 돌연변이나 삽입에 의한 불활성의 대립 유전자들이 발굴되었다.

키위 유전체 연구 향후 전망

현재까지 2배체인 *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Hongyang을 재료로 draft 유전체만 완성된 상태이다. 향후 'Hongyang' 유전체 서열의 품질을 높이기 위하여 반수체 혹은 DH (double haploid) 계통에 대한 유전체 해독을 비롯하여 경제적으로 중요한 *A. chinensis* var. *deliciosa*, *A. arguta*, *A. rufa*, *A. eriantha* 등에 대한 표준 유전체 해독, gene annotation, 비교 유전체 분석 등이 진행되어야 할 것으로 판단된다. 유용 핵심자원, 교배 분리집단 등에 대해 표준 유전체 기반 re-sequencing 및 전사체 분석, 비교 유전체 분석, GBS (genotyping-by-sequencing) 등을 통해 유용 유전자, 변이 유전자, 형질연관 분자마커 발굴 등에 관한 연구가 가속화될 것으로 전망된다. RNA-seq을 이용한 전사체 분석을 통해 조직 및 발달단계, 다양한 내·외부 환경 변화 등에 따른 유전자 발현에 대한 정보를 확보하고, 이를 바탕으로 감귤에서와 같이 co-expression 네트워크 분석을 수행함으로써 유전자 발현 조절과 유전자 기능 연구 등도 활발히 이루어질 것이다(Wong et al. 2014; Du et al. 2015).

키위 draft 유전체 서열과의 비교 유전체 분석이나 RAD-seq을 통해 염기서열 기반의 다양한 다형성 분자마커(SSR, SNP, InDel 등)들이 대규모로 발굴되고 있다. 이들 마커를 종내 혹은 중간 F₁ 교배 집단들에 적용하여 포화도가 상당한 유전자지도가 일부 작성되었거나 작성될 것이며, 또한 빠른 시일 내에 분자마커 기반의 고밀도 유전자지도가 작성되고 서열 기반의 물리지도와 통합될 것이다. 통합 유전자도를 통해 병해충 저항성, 성 결정 및 분화 관련 유전자, 과실 품질관련 유전자들에 대한 상세 연관 분석, 유전자 클로닝 및 유전자 기능 검증 등이 비교적 용이하게 이루어질 것이다.

유전체 편집 및 유전자 변형 기술이 작물의 수량성, 품질, 병저항성 등 다양한 형질을 개선시키기 위하여 광범위하게 연구되고 있다. Nature 지에 의해 10대 미래 기술의 하나로 선정된 Cas9/single guide RNA (sgRNA)와 같은 표적 유전체 교정(targeted genome editing) 기술이 식물에 성공적으로 적용되고 있다(Gaj et al. 2013; Woo et al. 2015). 유전체 교정 기술은 향후 키위 형질 개선이나 유전자 기능 연구뿐만 아니라 형질연관 분자마커의 검증을 위한 연구에도 중요하게 활용될 것으로 전망된다. 키위의 경우, 다양한 방법을 이용하여 다양한 유전자들에 대한 여

러 종 또는 품종에서 형질전환이 효율적으로 이루어지고 있어서(Kim et al. 2010b; Wang and Gleave 2012), 향후 유전체 교정 기술의 적용을 통한 키위 분자육종이 매우 효율적으로 이루어질 수 있을 것으로 전망된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ01090402 및 과제번호: PJ009441)의 지원에 의해 이루어진 것임.

적 요

키위는 세계적으로 1970년대 이후 상업화되어 최근 재배가 급속히 확대되고 있는 신종 과수이며, 국내에서도 재배와 소비량이 급격히 증가하고 있다. 키위는 자웅이주 낙엽성 덩굴 식물로 과피에 털이 있고 과육색이 다양한 특성을 가지고 있으며 배수성도 다양하나, 산업적인 품종 구성은 매우 단순하다. 독특한 식물적 특성에 기인한 진화 및 생물학적 관점은 물론 다양한 품종의 효율적 개발의 요구에 따라 최근 유전체 해석 및 활용 연구가 활발히 진행되고 있다. 키위 유전체 draft 서열과 염색체 서열이 Illumina HiSeq 기반으로 각각 2013년과 2015년에 해독되었으며 gene annotation 연구가 계속적으로 진행되고 있다. 과거 ESTs 기반의 전사체 분석에서 최근 RNA-seq 기반의 전사체 분석으로 전환되어 과일의 아스코르브산 생합성, 과육색 발현 및 성숙, 그리고 나무의 궤양병 저항성 관련 유전적 발현조절과 유전자 발굴 연구가 중점적으로 진행되고 있다. 전통육종의 효율을 증대하기 위한 분자표지 개발 및 유전자지도 작성에 있어서는 이전의 RFLP, RAPD, AFLP 기반의 연구에서 벗어나 NGS 기반의 유전체 및 전사체 정보의 해독에 의한 SSR 및 SNP 기반의 농업적으로 중요한 형질연관 분자마커 개발 및 고밀도 유전자지도 작성이 연구되고 있다. 그러나 국내 연구는 아직 제한적인 수준에서 진행되고 있다. 향후 키위 유전체 및 전사체 분석 연구는 가까운 장래에 실질적으로 분자육종에 적용될 것으로 전망된다.

References

- Avsar B, Aliabadi DE (2015) Putative microRNA analysis of the kiwifruit *Actinidia chinensis* through genomic data. *International J Life Sci Biotechnol Pharma Res* 4:96-99
- Collins BH, Horská A, Hotten PM, Riddoch C, Collins AR (2001) Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and *in vitro*. *Nutr Cancer* 39:148-153
- Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R (2003) Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 24:511-513
- Crowhurst RN, Lints R, Atkinson RG, Gardner RC (1990) Restriction-fragment-length-polymorphisms in the genus *Actinidia* (Actinidiaceae). *Plant Syst Evol* 172:193-203
- Crowhurst RN et al (2008) Analysis of expressed sequence tags from *Actinidia*: applications of a cross species EST database for gene discovery in the areas of flavor, health, color and ripening. *BMC Genomics* 9:351
- Cui Z, Huang H, Xiao X (2002) *Actinidia* in China. China Agri Sci Technol. Beijing
- Du D, Rawat N, Deng Z, Gmitter Jr FG (2015) Construction of citrus gene coexpression networks from microarray data using random matrix theory. *Hortic Res* 2:15026
- Ferguson AR (1984) Kiwifruit: a botanical review. *Hortic Rev* 6:1-64
- Ferguson AR, Bollard EG (1990) Domestication of the kiwifruit, p. 165-246. In: IJ Warrington, GC Weston (eds.) *Kiwifruit: science and management*. Ray Richards Publisher in association with the New Zealand, Soc Hort Sci, Auckland
- Fraser LG, Harvey CF, Crowhurst RN, De Silva HN (2004) EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theor Appl Genet* 108:1010-1016
- Fraser LG, McNeilage MA, Tsang GK, Harvey CF, De Silva HN (2005) Cross-species amplification of microsatellite loci within the dioecious, polyploid genus *Actinidia* (Actinidiaceae). *Theor Appl Genet* 112:149-157
- Fraser LG, Tsang GK, Datson PM, De Silva HN, Harvey CF, Gill GP, Crowhurst RN, McNeilage MA (2009) A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. *BMC Genomics* 10:102
- Frédérique OS, Legave JM, Nicole MF, Hirsch AM (1994) Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Sci Hort* 57:303-313
- Gao J, Huang C, Ge C, Qu X, Gu Q, Xu X (2013) Analysis of differential gene expression during color-turning stages in yellow flesh kiwifruit (*Actinidia chinensis*) using DGE. *J Fruit Sci* 2013-03
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Casbased methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31:397-405
- Gill GP, Harvey CF, Gardner RC, Fraser LG (1998) Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. *Theor Appl Genet* 97:439-445
- Harvey CF, Gill GP, Fraser LG, McNeilage MA (1997) Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sex Plant Reprod* 10:149-154
- Hill MG, Mauchline N, Jones MK, Sutherland PW (2011) The response of resistant kiwifruit (*Actinidia chinensis*) to armoured scale insect (Diaspididae) feeding. *Arthropod-Plant Interact* 5:149-161
- Hill MG, Wurms KV, Davy MW, Gould E, Allan A, Mauchline NA, Luo Z, Chee AA, Stannard K, Storey RD, Rikkerrink EH

- (2015) Transcriptome analysis of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) bark in response to armoured scale insect (*Hemiberlesia lataniae*) feeding. PLoS ONE 10:e0141664
- Hopping ME (1994) Flow cytometric analysis of *Actinidia* species. New Zealand J Bot 32:85–93
- Huang WG, Cipriani G, Morgante M, Testolin R (1998) Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species. Theor Appl Genet 97:1269–1278
- Huang HW, Li ZZ, Li JQ, Kubisiak TL, Layne DR (2002) Phylogenetic relationships in *Actinidia* as revealed by RAPD analysis. J American Soc Hort Sci 127:759–766
- Huang S et al (2013) Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis*. Nature Commun 4:2640
- Huang H (2014) The genus *Actinidia*, a world monograph. Science Press, Beijing
- Kim SC, Jung YH, Kim M, Kim CH, Koh SC, Kang SH (2003) Genetic relationships of genus *Actinidia* based on random amplified polymorphic DNA analysis. Hort Environ Biotechnol 44:340–344
- Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, Hwang IT, Chun JY (2004a) Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. BioTechniques 36:424–426, 428, 430
- Kim SC, Jung YH, Kim M, Koh SC, Song KJ, Kim HB (2004b) Characterization of a RAPD fragment unique to species with hairy fruit skin in the genus *Actinidia*. J Plant Biol 47:210–215
- Kim CH, Kim SC, Jan KC, Song EY, Kim M, Moon DY, Song KC, Lee JS, Suh HD, Song KJ (2007a) A new kiwifruit cultivar, ‘Jecy Gold’ with yellow flesh. Kor J Breed Sci 39:258–259
- Kim CH, Kim SC, Jang KC, Song EY, Ro NY, Moon DY, Lee JS, Seong KC (2007b) A new kiwifruit cultivar, ‘Jecy Green’. Kor J Breed Sci 39:508–509
- Kim CH, Kim SC, Song EY, Ro NY, Kim M, Kang KH, Jang KC, Chun SJ (2009) A new kiwifruit, ‘Jecy Sweet’ with high soluble solids content. Kor J Hort Sci Technol 39:508–509
- Kim HB, Jun SS, Choe S, Cho JY, Choi SB, Kim SC (2010a) Identification of differentially expressed genes from male and female flowers of kiwifruit. African J Biotechnol 9:6684–6694
- Kim M, Kim SC, Song KJ, Kim HB, Kim IJ, Song EY, Chun SJ (2010b) Transformation of carotenoid biosynthetic genes using a micro-cross section method in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). Plant Cell Rep 29:1339–1349
- Kim DG, Jin YG, Jin JY, Kim SC, Han CH, Lee YJ (2011) Effects of the *Actinidia chinensis* on loperamide-induced constipation in rat. Kor J Plant Res 24:61–68
- Kim SC, Uhm YK, Ko S, Oh CJ, Kwack YB, Kim HL, Lee Y, An CS, Park PB, Kim HB (2015) *KiwiPME1* encoding pectin methylesterase is specifically expressed in the pollen of a dioecious plant species, kiwifruit (*Actinidia chinensis*). Hort Environ Biotechnol 56:402–410
- Korea Agricultural Marketing Information Service (KAMIS) (2014) Korea agricultural and marine product circulation information. <http://www.kamis.co.kr/kamis/index.jsp>
- Korkovelos AE, Mavromatis AG, Huang WG, Hagidimitriou M, Giakoundis A, Goulas CK (2008) Effectiveness of SSR molecular markers in evaluating the phylogenetic relationships among eight *Actinidia* species. Sci Hortic 116:305–310
- Krüger J, Thomas CM, Golstein C, Dixon MS, Smoker M, Tang SK, Mulder L, Jones JDG (2002) A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. Science 296:744–747
- Li HL (1952) A taxonomic review of the genus *Actinidia*. J Arnold Arboretum (Harvard university) 33:1–6
- Li W, Liu Y, Zeng S, Xiao G, Wang G, Wang Y, Peng M, Huang H (2015) Gene Expression profiling of development and anthocyanin accumulation in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) based on transcriptome sequencing. PLoS ONE 10:e0136439
- Li C, Zhang B (2016) MicroRNAs in control of plant development. J Cell Physiol 231:303–313
- Liang CF (1984) *Actinidia*, p. 309–324. In: KM Feng (ed.) Flora reipublicae popularis sinicae. Science press, Beijing
- Man Y, Wang Y, Zhang L, Li Z, Qin R, Jiang Z, Sun X, Liu C (2011) Development of microsatellite markers in *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) based on the NCBI data platform. American J Bot e310–e315
- Man YP, Wang YC, Jiang ZW, Gong JJ (2015) Transcriptomic analysis of pigmented inner pericarp of red-fleshed kiwifruit in response to high temperature. Acta Hort 10.17660/ActaHortic.2015.1096.23
- Michelotti V, Lamontanara A, Buriani G, Cellini A, Donati I, Vanneste JL, Cattivelli L, Spinelli F, Orrù L, Tacconi G (2015a) Unraveling the molecular interaction between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) and the kiwifruit plant through RNAseq approach. Acta Hort 10.17660/ActaHortic.2015.1095.10
- Michelotti V, Lamontanara A, Orrù L, Cattivelli L, Tacconi G, Buriani G, Cellini A, Donati I, Spinelli F, Vanneste J (2015b) RNA-seq analysis of the molecular interaction between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) and the kiwifruit. Acta Hort 10.17660/ActaHortic.2015.1096.41
- Nieuwenhuizen NJ, Maddumage R, Tsang GK, Fraser LG, Cooney JM, De Silva HN, Green S, Richardson KA, Atkinson RG (2012) Mapping, complementation, and targets of the cysteine protease actinidin in kiwifruit. Plant Physiol 158:376–388
- Novo M, Romo S, Rey M, Prado MJ, Gonzalez MV (2010) Identification and sequence characterisation of molecular markers polymorphic between male kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.) accessions exhibiting different flowering time. Euphytica 175:109–121
- Pei C, Law YW (1948) Notes on *Actinidia* of Szechuan and Sikang. Bot Bull Acad Sinica 2:25–33
- Savé R, Serrano L (1986) Some physiological and growth responses of kiwi fruit (*Actinidia chinensis*) to flooding. Physiol Plant 66:75–78
- Schmid R (1978) Reproductive anatomy of *Actinidia chinensis* (Actinidiaceae). Bot J Syst Pfl 100:149–195
- Scortichini M, Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, Firrao G (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. Mol Plant Pathol 13:631–640
- Shi T, Huang H, Barker MS (2010) Ancient genome duplications during the evolution of kiwifruit (*Actinidia*) and related

- Ericales. *Ann Bot* 106:497-504
- Shirkot P, Sharma DR, Mohapatra T (2002) Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers. *Sci Hortic* 94:33-39
- Testolin R, Cipriani G, Costa G (1995) Sex segregation ratio and gender expression in the genus *Actinidia*. *Sex Plant Reprod* 8:129-132
- Testolin R, Huang WG, Lain O, Messina R, Vecchione A, Cipriani G (2001) A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theor Appl Genet* 103:30-36
- The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-641
- Van der Hoorn RAL (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 59:191-223
- Voogd C, Wang T, Varkonyi-Gasic E (2015) Functional and expression analyses of kiwifruit *SOCI*-like genes suggest that they may not have a role in the transition to flowering but may affect the duration of dormancy. *J Exp Bot* 66:4699-4710
- Vissers MC, Carr AC, Pullar JM, Bozonet SM (2013) The bioavailability of vitamin C from kiwifruit. *Adv Food Nutr Res* 68:125-147
- Wang T, Gleave AP (2012) Applications of Biotechnology in Kiwifruit (*Actinidia*). p. 3-30. In: EC Agbo (ed.) *Innovations in Biotechnology*, InTech, Shanghai
- Watanabe K, Takahashi B, Shirato K (1990) Chromosome numbers in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) and related species. *J Japanese Soc Hort Sci* 58:835-840
- Wong DCJ, Sweetman C, Ford CM (2014) Annotation of gene function in citrus using gene expression information and co-expression networks. *BMC Plant Biol* 14:186
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33:1162-1164
- Xiao XG, Zhang LS, Li SH, Wang B, Testolin R, Cipriani G (1999) First step in the search for AFLP markers linked to sex in *Actinidia*. *Pro 4th Intl Symp* 498:99-104
- Xu Q et al. (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59-66
- Yan G, Yao J, Ferguson AR, McNeilage MA, Seal AG, Murray B (1997) New reports of chromosome numbers in *Actinidia* (Actinidiaceae). *New Zealand J Bot* 35:181-186
- Yao X, Tang P, Li Z, Li D, Liu Y, Huang H (2015) The first complete chloroplast genome sequences in Actinidiaceae: genome structure and comparative analysis. *PLoS ONE* 10:e0129347
- Zhang RM (1981) Selected varieties of kiwifruit, p. 134-141. In: ZZ. Qu (ed.). *Mihoutaode Zaipei he Liyong*. Nongye Chubanshe, Beijing
- Zhang JY, Huang SN, Mo ZH, Xuan JP, Jia XD, Wang G, Guo ZR (2015a) *De novo* transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in kiwifruit under waterlogging stress. *Mol Breed* 35:208
- Zhang Q, Liu C, Liu Y, VanBuren R, Yao X, Zhong C, Huang H (2015b) High-density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers. *DNA Res* 22:367-375
- Zhang X, Huang C, Zhong M, Chen C, Lang B, Qu X, Xu X (2015c) Analysis of expression of the related genes with carotenoids synthesis in yellow flesh kiwifruit (*Actinidia chinensis*) based on RNA-seq. *J Fruit Sci* 2015-3
- Zhou J, Liu YF, Huang HW (2011) Characterization of 15 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Actinidia chinensis* species complex (Actinidiaceae). *American J Bot* 98:E100-E102