



국내 대추 품종의 구분을 위한 InDel 마커의 개발

김문교¹ · 김주혁² · 이미선³ · 조남수⁴ · 박상익⁵ · 길진수⁶ · Enkhtsetseg Yeruult⁷ ·
오하경⁸ · 이경희⁹ · 김호방¹⁰ · 이문순¹¹ · 이이^{12†}

Development of Insertion or Deletion Markers to Distinguish Korean Jujube Cultivars

Moon Kyo Kim¹, Ju Hyeok Kim², Mi Sun Lee³, Nam Su Jo⁴, Sang Ik Park⁵, Jin Su Gil⁶,
Enkhtsetseg Yeruult⁷, Ha Kyung Oh⁸, Kyeong Hee Lee⁹, Ho Bang Kim¹⁰, Moon Soon Lee¹¹ and Yi Lee^{12†}

ABSTRACT

Received: 2021 March 24
1st Revised: 2021 May 18
2nd Revised: 2021 July 8
3rd Revised: 2021 August 2
Accepted: 2021 August 2

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruits are rich in nutrients and an economically and ecologically important medicinal plant in Korea. However, as it is difficult to distinguish jujube cultivars using morphological characters, the development of molecular markers is necessary to protect and distinguish Korean jujube cultivars.

Methods and Results: Next-generation sequencing analysis was performed on six major Korean cultivars; Bokjo, Boeun, Chuseok, Mudeung, Geumseong, and Wolchul. Sites with an insertion or deletion (InDel) were identified by comparison from the sequence information of the six Korean cultivars using the CLC Genomics Workbench. Among the identified InDels, we developed Zj-InDel-1 and Zj-InDel-2 markers, which could distinguish Bokjo, Chuseok, and Boeun from the other Korean cultivars.

Conclusions: The InDel markers developed in this study could be used for classification of domestic jujube cultivars and protection of the elite ones.

Key Words: *Ziziphus jujuba*, Cultivar, Insertion or Deletion, Molecular Marker, Next-generation Sequencing

서 언

대추 (*Ziziphus jujuba* Mill.)는 갈매나무과 대추나무속에 속하는 식물로 아열대 및 열대 건조 지역에 주로 분포하지만 일부 좋은 대륙성 기후의 온대 및 건조 지역에서 발견된다 (Evreinoff, 1964; Liu and Cheng, 1994).

대추 열매는 핵과류이며 타원형에 광택이 나는 적갈색으로

국내에서 식용 또는 약용으로 쓰이고 있다 (Park and Kim, 2016; Bang *et al.*, 2020). 대추 열매에는 수용성 당과 칼륨, 인, 칼슘 및 망간과 같은 미네랄이 포함되어 있으며 비타민 C, 티아민, 리보플라빈 등이 풍부하여 영양학적으로도 우수하다 (Li *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2013). 대추의 약용성분으로는 glycosides, alkaloids, triterpenoids, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate

†Corresponding author: (Phone) +82-43-261-3373 (E-mail) leeyi22@cbnu.ac.kr

¹충북대학교 특용식물학과 석사과정 / Master's student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
²충북대학교 특용식물학과 학부생 / Undergraduate student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
³충북대학교 특용식물학과 석사과정 / Master's student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
⁴충북대학교 특용식물학과 박사과정 / Ph. D. student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
⁵충북대학교 특용식물학과 석사 / Mater's degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
⁶충북대학교 특용식물학과 박사 / Ph. D. degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
⁷충북대학교 특용식물학과 석사과정 / Mater's student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
⁸충청북도농업기술원 대추연구소 연구사 / Researcher, Jujube Research Institute, Chungcheongbuk-do ARES, Boeun 28130, Korea.
⁹충청북도농업기술원 대추연구소 연구관 / Researcher, Jujube Research Institute, Chungcheongbuk-do ARES, Boeun 28130, Korea.
¹⁰(주)바이오메딕 생명과학연구소 연구소장 / Chief Technology Officer, Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 14548, Korea.
¹¹충북대학교 특용식물학과 교수 / Professor, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.
¹²충북대학교 특용식물학과 교수 / Professor, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

(cGMP) 및 saponins 등이 알려져 있다 (Yagi *et al.*, 1978; Cyong and Hanabusa, 1980; Okamura *et al.*, 1981; Yagi *et al.*, 1981; Cyong and Takahashi, 1982; Han and Park, 1987).

대추의 효능으로는 면역기능, 항암, 항산화, 항알레르기과 같은 효과에 대한 연구가 보고되어 있으며, 특히 lysicamine과 normuciferine 성분은 진정 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Yagi *et al.*, 1981; Han and Park, 1987; Na *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2008).

대추는 아시아에서 인기 있는 과수로써 경제적, 생태학적으로 중요하며 최근 남서 유럽, 중동, 인도와 같은 다른 지역에서도 재배 및 수요가 증가하고 있다 (Qu and Wang, 1993; Outlaw *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2014). International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)는 육종가의 권리를 보호하고 품종의 지적 재산권을 보호하기 위해 재배 품종에 대한 체계적인 관리를 하고 있다 (Choi, 2002).

따라서 국내 품종을 보호하고 과실 작물로서의 가치를 높이기 위해 국내에서 재배, 유통되는 대추의 품종을 구분하여 정확하게 파악할 필요가 있다 (Nam *et al.*, 2013).

과거에 주로 사용한 형태학적 특성에 따른 품종 구분은 낮은 다형성, 낮은 유전성, 후기 발현 및 환경 영향에 대한 취약성을 포함하여 많은 한계가 있었으나, 최근 next-generation sequencing (NGS) 기술의 발달로 생물의 유전체 정보를 획득하는 것이 용이해짐에 따라 분자마커를 이용한 분류가 가능해졌으며 분자마커는 유전적 변이를 평가하고 종내 및 종간의 유전적 관계를 밝히는 중요 도구임이 입증되었다 (Smith and Smith, 1992; Chakravarthi and Naravaneni, 2006; Wang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017b). 분자마커는 생물이 가지고 있는 DNA의 염기서열 정보를 기반으로 염기서열의 차이를 이용하여 종 혹은 집단을 비교 분석하는 방법으로 높은 다형성을 가지고 있으며 공유성적으로 검출할 수 있고, 대상으로 하는 식물의 유전체 전체에 고르게 분포하며 변이 탐색에 있어 저렴한 비용으로 짧은 시간에 분석이 가능할 뿐 아니라 재현성이 높게 나타나는 것이 좋다 (Park *et al.*, 2017a).

지금까지 대추에 대한 분자 생물학적 정보가 많지 않았으며 유전자 마커 시스템이 체계적으로 확립되지 않았다 (Ma *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014). 대추는 주로 영양번식을 하는 특성을 가지고 있어서 품종 간 차이가 적으며 수백 개의 대추 품종 및 국내 주요 생산 품종을 구별하기에는 어려움이 있고 이를 해결하기 위해서는 변별력이 좋고 효율적인 분자마커의 개발이 필요하다. 대추에 대한 분자마커 개발에 대한 연구는 지속적으로 진행되어 왔으며 선행연구로 이란 대추 유전자형의 유전적 다양성을 평가하기 위한 amplified fragment length polymorphism (AFLP) 마커와 중국 대추 품종 간의 유전적

관계를 분석하기 위한 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 마커의 개발이 이루어졌다. 또한 중국대추 품종 판별을 위한 inter simple sequence repeat (ISSR) PCR 시스템이 구축된 바 있고, 대추 유전자 연구 및 식물 육종 연구를 위한 simple sequence repeat (SSR) 분자 마커도 개발되고 있다 (Liu and Zhao, 2002; Qi *et al.*, 2008; Shahhoseini *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

삽입 또는 결실 (insertion or deletion, InDel) 마커는 DNA 염기서열을 서로 비교하여 삽입 또는 결실로 인한 염기서열 사이의 차이를 보여주는 마커이다. InDel 마커는 다형성, 공유성 마커, 효율적인 비용 및 쉬운 분석 등으로 널리 이용되고 있다 (Chen *et al.*, 2021). InDel 마커는 다양한 작물에서 이용되고 있으며 9 개의 벼 도열병 저항성 유전자에 대하여 InDel 마커의 개발, 116 개의 InDel 마커를 이용한 오이의 생식질 구별, *Brassica rapa*에서 짧은 InDel의 식별 및 639 개의 InDel 마커의 다형성 검증 등의 연구가 진행되었다 (Hayashi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2021). 최근 SSR 마커를 이용하여 24 개의 *Ziziphus mauritiana* Lam. 품종 간의 유전적 관계를 분석하였으며, ISSR 마커를 이용하여 *Z. jujuba*와 *Z. acidojujuba* 간의 유전적 관계를 추정하는 연구가 진행되었다 (Chiou *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021). 그러나 다양한 선행연구에도 불구하고 아직은 많은 수의 대추 품종을 구별하기에는 충분하지 않은 실정이다.

국내 대추 품종을 구분하기 위한 InDel 마커에 관한 연구는 아직 보고되지 않았으며 본 연구에서는 국내 품종을 쉽고 간단하게 구분하기 위한 InDel 마커를 개발하고자 하였다.

NGS를 통해 복조 (Bokjo), 보은 (Boeun), 추석 (Chuseok), 무등 (Mudeung), 금성 (Geumseong), 월출 (Wolchul) 등 6 개의 대추 품종에 대한 DNA 정보를 획득하여 InDel 마커를 개발하였고 PCR 및 genotyping을 실시하여 대추 품종 간 다형성을 분석하였다. InDel 마커를 사용하여 복조 품종을 포함한 국내 주요 품종들을 구별할 수 있었으며, 해당 구간의 염기서열을 분석하여 서로 다른 유전자형의 염기서열들을 밝혀냈다. 개발된 InDel 마커를 기반으로 복조와 같은 국내 주요 대추 품종을 구별함으로써 국내 대추 산업에 기여할 수 있을 것이라 기대한다.

재료 및 방법

1. 샘플수집 및 genomic DNA 추출

총 60 개의 대추 품종에 대하여 어린잎을 수집하였으며 충청북도 농업기술원 (36°34'38.7"N, 127°44'52.9"E)에서 42 개, 국립산림품종관리센터 (36°87'70.1"N, 127°97'35.9"E)에서 16 개, 보은군 대추 농가로부터 알려지지 않은 품종의 대추 유전

자원 2 개를 수집하였다 (Table 1). 샘플 수집은 질병이나 해충 피해가 없는 건강한 잎으로 채집되었고 수집된 잎은 -70°C의 초저온 냉동고에 보관하였다.

NGS 분석을 위한 genomic DNA (이하 gDNA)는 DNeasy

Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였으며 PCR 분석용 gDNA는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 방법을 사용하여 추출하였다 (Doyle and Doyle, 1990). 추출한 DNA는 DeNovix® DS-11+ spec-

Table 1. List of 60 jujube samples used in this study.

No	Variety	Collection place	IT number	Origin
1	6-Wolseonjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317245	China
2	Boeun	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317265	Korea
3	Bokjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	233616	Korea
4	Bolohojo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317222	China
5	Bongsanchwijo	National Forest Seed and Variety Center	10449	-
6	Chainabeulaun	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317230	Japan
7	Chajeonjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317220	China
8	Cheomhwadongjo	National Forest Seed and Variety Center	10436	-
9	Cheonsang	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317182	Korea
10	Chunhyang-17-ho	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317214	Korea
11	Chuseok	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	233622	Korea
12	Chwijowang	National Forest Seed and Variety Center	10414	-
13	Daebaegjo	National Forest Seed and Variety Center	10428	-
14	Daelibjong	National Forest Seed and Variety Center	10381	-
15	Daeseoljo	National Forest Seed and Variety Center	10440	-
16	Dongjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317224	China
17	Geumchang-1-ho	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317248	China
18	Geumsa	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317239	China
19	Geumsa-1-ho	National Forest Seed and Variety Center	10468	-
20	Geumseong	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	233612	Korea
21	Hodaechu	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	233623	China
22	Hongan	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
23	Hongjo	National Forest Seed and Variety Center	10396	-
24	Hwajeondaechu	National Forest Seed and Variety Center	10367	-
25	Hwajeonogjo	National Forest Seed and Variety Center	10392	-
26	Ibu	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317241	China
27	Ilbon	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317242	Japan
28	Jd-12	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317166	Korea
29	Je-1	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
30	Jenamgodaesiljo	National Forest Seed and Variety Center	10408	-
31	Jg-10	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
32	Jh-9	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
33	Jj-1	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
34	Jk-4	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
35	Jochwiwangjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317232	China
36	Jungdaelibjong	National Forest Seed and Variety Center	10373	-
37	Kukwang	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317260	China
38	Lyeongjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317237	China

Table 1. List of 60 jujube samples used in this study.

No	Variety	Collection place	IT number	Origin
39	Mabanjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317223	China
40	Maechu	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317228	China
41	Mijo	National Forest Seed and Variety Center	10386	-
42	Mudeung	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	233614	Korea
43	Muhaehongjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317247	China
44	Sandongbokjo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317263	China
45	Sangwang	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317261	China
46	Sanjo	National Forest Seed and Variety Center	10498	-
47	Senteomi	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317235	USA
48	Seoljo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317227	China
49	Taasangwang	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317225	China
50	Tibetdaegwajong	National Forest Seed and Variety Center	10361	-
51	Tibetwang	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317262	China
52	Uiseong-C	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317234	China
53	Wangdaechu	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317226	China
54	Wolchul	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	-	Korea
55	Wolgwang	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317246	China
56	Wolgwangjo	National Forest Seed and Variety Center	10401	-
57	Wollyeong	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317240	China
58	Yangnaejo	Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services	317221	China
59	Market-1	Boeun-gun	-	-
60	Market-2	Boeun-gun	-	-

trophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA)를 사용하여 측정하고 polymerase chain reaction (PCR)에 사용할 DNA 농도를 정량하였다.

2. 차세대 염기서열 분석

국내 대추 품종 6 종에 대한 NGS 분석을 Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA)의 151 bp paired-end sequencing을 사용하여 Macrogen사 (Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

복조 (Bokjo), 보은 (Boeun), 추석 (Chuseok), 무등 (Mudeung), 금성 (Geumseong), 월출 (Wolchul) 등 6 개의 대추 품종에 대한 NGS data는 National Agricultural Biotechnology Information Center (NABIC) Sequence Read Archive (BioProject ID: NN-7295, NN-7296, NN-7297, NN-7298, NN-7299, NN-7300)에 등록하였고, InDel 구간 탐색은 CLC Genomics Workbench (ver. 11.0, Qiagen, Aarhus, Denmark)을 이용하였다. NGS 분석 결과로 얻은 read들을 trimming 과정을 통해 유전체의 품질을 높인 후 assembly 과정을 통하여 contig를 작성하였다. 각 6 종의 품종의 contig들을 상호 비교 하여 InDel이 예상되는 구간을 탐색하였다.

3. 프라이머 제작

프라이머는 CLC Main Workbench (ver. 8, Qiagen, Aarhus, Denmark)를 사용하여 설계하였으며 InDel 부위를 포함하도록 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 디자인 하였다.

프라이머 디자인의 매개 변수는 프라이머 길이를 18 bp - 28 bp, G+C 함량은 0.4 - 0.6, annealing 온도는 48°C - 58°C, 프라이머 쌍 사이의 annealing 온도 차이 5°C 이하, 증폭 산물 길이 500 bp 이하로 하였다.

4. PCR (polymerase chain reaction)

PCR은 T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하였고 PCR 반응은 10 ng/μl 농도의 gDNA 2 μl, Taq mix (0.25 U/μl Taq DNA polymerase, 2×PCR buffer, 0.4 mM dNTPs, 3.2 mM MgCl₂, 0.02% bromophenol blue) 10 μl, 정방향 프라이머 (5 μM) 2 μl, 역방향 프라이머 (5 μM) 2 μl, 3 차 증류수 4 μl 로 총 용량 20 μl 으로 PCR 증폭을 수행하였다.

PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation 3 분, 95°C에서 denaturation 30 초, 51°C에서 annealing 30 초, 72°C에서

extension 1 분으로 총 35 회 반복하였으며, 72°C에서 final extension 10 분을 실시하였고, PCR 산물은 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

5. 전기영동 및 fragment analysis

분석된 유전자원간 염기서열 크기의 차이가 10 bp 이상으로 큰 경우 전기영동을 이용하여 다형성을 관찰하였고 10 bp 이하의 작은 사이즈 경우에는 fragment analyzer로 분석하였다.

전기영동에 사용된 gel은 3% 아가로스로 만들었으며 EtBr (ethidium bromide)를 사용하여 DNA를 염색하였다. Gel은 1 × TAE 용액에 넣고 PCR product를 분주하였으며 밴드의 크기를 비교하기 위하여 1 kb ladder plus (Dongshengbio Company Ltd., Guangdong, China)를 함께 분주하였다. 전기영동은 120 V에서 30 분 동안 수행하였고 Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 밴드를 시각화하였다.

전기영동으로 구별이 어려운 작은 사이즈의 다형성을 분석하기 위해서는 DNA Fragment Analyzer™ Automated CE System (Advanced Analytical Technologies, Ames, IA, USA)를 사용하였다. Fragment 분석에는 PCR product, TE buffer, 930 dsDNA Inlet buffer, dsDNA 905 gel, capillary conditioning soln, intercalating dye, 35 - 400 bp DNA ladder, 1 bp lower and 500 bp upper markers가 사용되었다.

6. T-vector 클로닝 및 sequencing

클로닝을 위하여 정제된 PCR product를 TOPcloner™ TA Kit (Enzymomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 pTOP TA V2 vector와 ligation 반응을 수행하였다. Ligation 산물을 *Escherichia coli* DH5α competent cells에 형질전환 시킨 후 ampicillin 함유 (50 µg/ml) LB 고체 배지에 도말하였다. 형성된 콜로니를 ampicillin 함유 (50 µg/ml) LB 액체 배지에 접종한 후 하룻밤 동안 진탕배양한 후 Biomedic® Plasmid DNA Miniprep Kit (Medico Co., Ltd., Ansan, Korea)를 사용하여 plasmid DNA를 정제하였다. 정제한 plasmid DNA의 염기서열분석은 벡터의 프라이머 (M13-F, M13-R)를 사용하여 수행하였다.

염기서열 분석은 Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기서열 분석용 PCR 반응을 수행한 후, ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정 결과는 Lasergene SeqMan (ver. 7.0.0, DNASTAR, Madison, WI, USA) 프로그램을 이용하여 정리하였다.

결 과

1. NGS 분석을 통한 국내 대추 구별 InDel 마커의 개발

CLC Genomics Workbench와 CLC Main Workbench를 이용하여 NGS 데이터로부터 얻은 품종별로 조립된 contig들을 비교하여 InDel locus를 탐색하였고 (Fig. 1), 해당 locus를 증폭하기 위한 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 디자인하였다 (Table 2).

*In silico*에서 발견한 InDel locus가 실제 실험결과와 일치하는지 여부와 디자인된 프라이머가 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해 PCR 분석을 수행하였고 전기영동과 fragment analyzer를 이용하여 다형성을 분석하였다. 그 결과 두 개의 프라이머 세트가 모두 성공적으로 증폭되었으며 무등, 금성, 월출, 천상 품종으로부터 복조, 보은, 추석을 구분하는 Zj-InDel-1 마커와 무등, 금성, 월출, 천상, 복조 품종으로부터 추석, 보은 품종을 구분하는 Zj-InDel-2 두 개의 InDel 마커가 개발되었다.

2. 개발된 InDel 마커를 이용한 대추 품종의 genotyping

개발된 Zj-InDel-1 마커와 Zj-InDel-2 마커를 이용하여 58 개의 품종과 보은군에서 수집한 2 개의 대추자원을 대상으로 genotyping을 실시하였다. 전기영동을 실시하여 다형성을 분석하였고 fragment analyzer를 이용하여 10 bp 이하의 작은 염기서열의 차이를 분석하였다.

전기영동 분석 결과 Zj-InDel-1 마커에서는 천상, 취조왕, 금성, 호대추, 화전대추, 이부, Jd-12, Jh-9, 령조, 매추, 무등, 설조, 의성-C, 월출, 월광 품종이 444 bp 크기의 밴드를 형성하였고, 6월선조, 보은, 복조, 보로호조, 봉산취조, 차이나브라운, 차전조, 첨화동조, 춘향17호, 추석, 대백조, 대립중, 대설조, 금창1호, 금사, 금사1호, 흥안, 흥조, 화전옥조, 일본, Je-1, 제남고대실조, Jg-10, Jj-1, Jk-4, 조취왕조, 중대립중, 국광, 마반조, 미조, 무핵홍조, 산동복조, 상왕, 센터미, 태상왕, 티벳대과중, 티벳왕, 왕대추, 월광조, 월령, 양내조 품종은 341 bp 크기의 밴드를 형성하였다. 또한 Market-1, Market-2는 545 bp 크기의 밴드를 형성하였으며 동조, 산조 품종은 349 bp 크기의 밴드를 형성하여 Zj-InDel-1 마커에서 총 4 개의 유전자형을 나타냈다 (Fig. 2-A).

Zj-InDel-2 마커에서는 보은, 취조왕, 화전대추, 이부, Jk-4, 령조, 매추, 산조, 월광 품종이 188 bp 크기의 밴드를 형성하였고 복조, 봉산취조, 차전조, 금성, 호대추, 흥안, Jd-12, Jg-10, 조취왕조, 마반조, 무등, 설조, 티벳대과중, 의성-C, 월출, Market-1, Market-2 품종이 222 bp 크기의 밴드를 형성하였으며 보로호조, 차이나브라운, 첨화동조, 춘향17호, 추석, 대백조, 대립중, 대설조, 동조, 금사, 금사1호, 흥조, 화전옥조, Je-1, 제남고대실조, Jh-9, Jj-1, 중대립중, 국광, 미조, 무핵홍조,

대추 품종 구별마커 개발

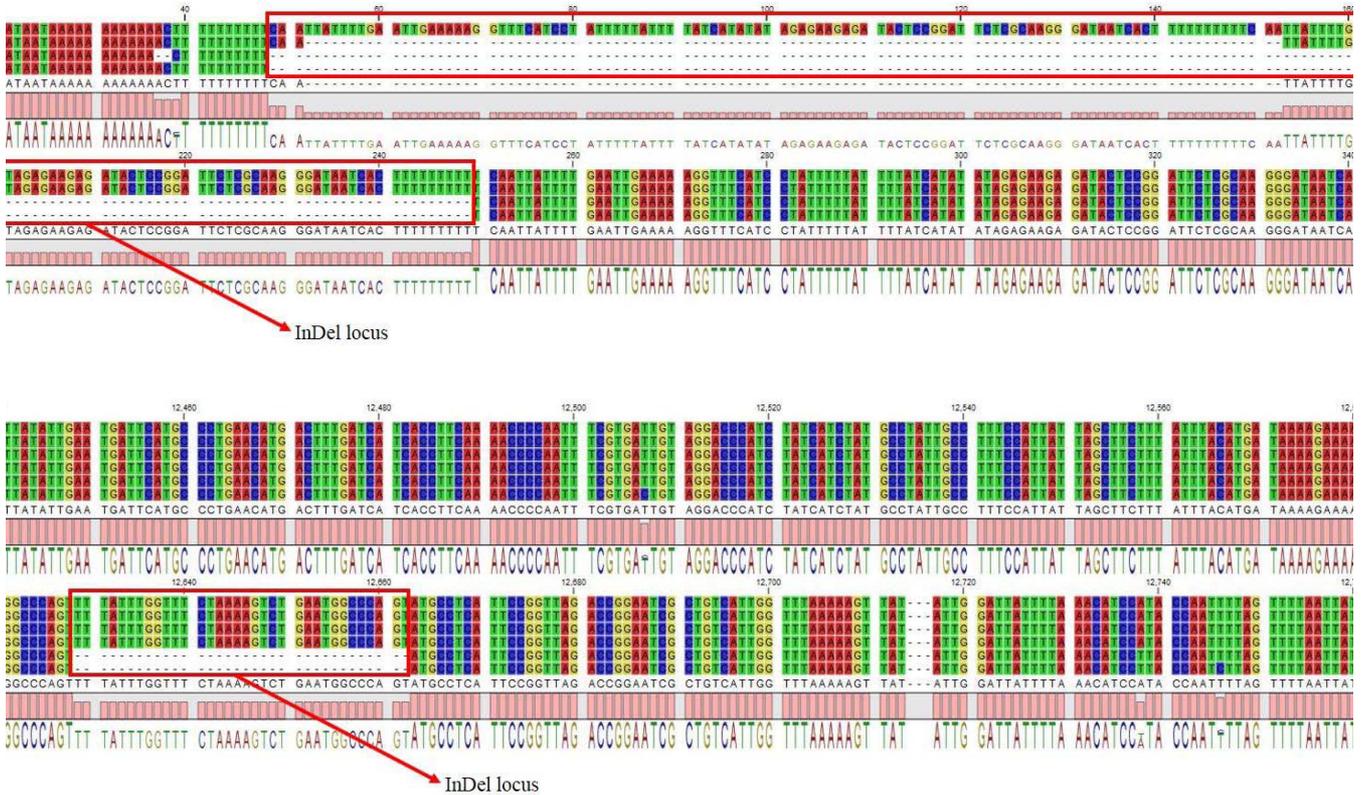


Fig. 1. InDel locus sequence of the developed markers. A; Zj-InDel-1, B; Zj-InDel-2.

Table 2. Primer information of *Z. jujuba* InDel markers.

Marker	Amplicon size (bp)	Primer sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)
Zj-InDel-1	341, 349, 444, 545	F: GAACCCGCTATTTGCTAT	52
		R: TAACCCCTCCTAAACAAC	
Zj-InDel-2	188, 222, 188/213, 188/222	F: CATCACCTCAAACCCC	52
		R: CCAATGACAGCGATTCCG	

산동복조, 상왕, 센터미, 태상왕, 티벳왕, 월광조, 월령, 양내조 품종은 188 bp와 222 bp 두 개의 밴드를 모두 갖는 유전자형을 나타냈다. 6월선조, 금창1호, 일본, 왕대추 품종은 fragment analyzer 분석 결과 188 bp와 213 bp 사이즈의 밴드를 나타내어 앞서 나타난 유전자형과는 다른 유형을 나타냈다 (Fig. 2B).

본 연구에서 개발한 두 마커 Zj-InDel-1, Zj-InDel-2를 60 개의 대추 유전자원에 적용하여 분석한 결과를 바탕으로 각 마커의 통계적 분석을 실시하였다. 분석은 PowerMarker version 3.25를 사용하여 major alleles frequency (MAF), genotype number (GN), allele number (AN), gene diversity (GD), heterozygosity (H), polymorphism information content (PIC)를 분석하였다 (Liu and Muse, 2005).

MAF 값은 Zj-InDel-1에서 0.683, Zj-InDel-2에서 0.542, 평균 0.613의 값을 나타냈다. GN값은 Zj-InDel-1과 Zj-InDel-2 모두 4 개로 나타났다. GD는 Zj-InDel-1에서 0.468, Zj-InDel-2에서 0.525, 평균 0.497의 값을 나타냈다. H는 Zj-InDel-1는 0, Zj-InDel-2는 0.55값을 나타냈으며 PIC는 Zj-InDel-1가 0.408, Zj-InDel-2가 0.418, 평균이 0.413값을 나타냈다 (Table 3).

3. Zj-InDel-1 마커 PCR product의 DNA 염기서열 분석

Zj-InDel-1 마커로 genotyping한 결과 *in silico*에서 발견되지 않은 유전자형이 나타남에 따라 유전자형 분석에서 발견된 서로 다른 4 가지 크기의 밴드의 염기서열을 확인하기 위하여 무등, 동조, 추석, Market-1에 대하여 PCR product를

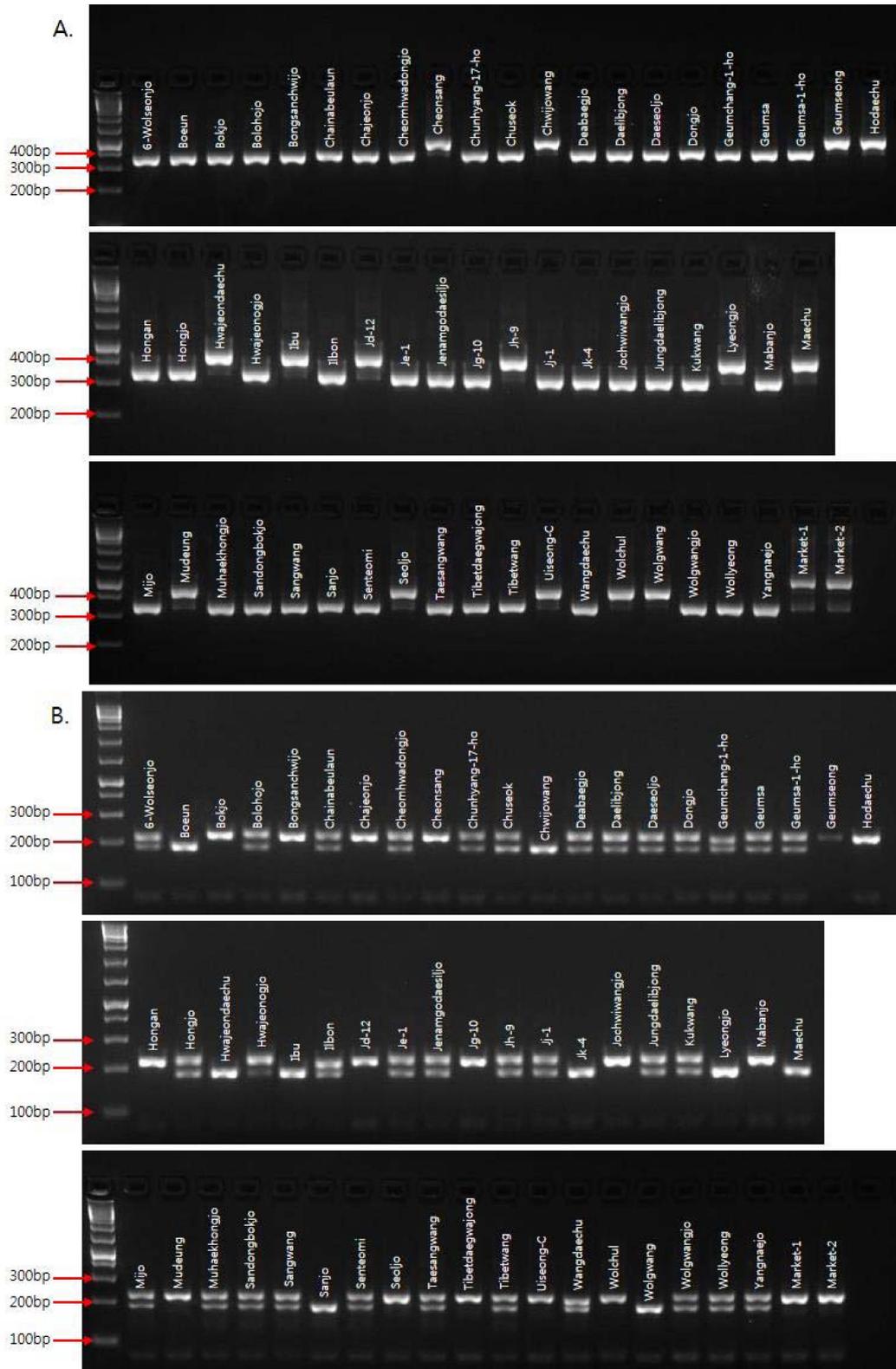


Fig. 2. Results of electrophoresis performed on 60 *Z. jujuba* genetic resources using two *Z. jujuba* InDel markers. A; Zj-InDel-1, B; Zj-InDel-2.

Table 3. Diversity statistics of 60 *Z. jujuba* genetic resources analyzed by 2 InDel markers.

Marker	MAF ¹⁾	GN ²⁾	SS ³⁾	AN ⁴⁾	GD ⁵⁾	H ⁶⁾	PIC ⁷⁾
Zj-InDel-1	0.683	4	60	4	0.468	0	0.408
Zj-InDel-2	0.542	4	60	3	0.525	0.55	0.418

¹⁾MAF; major allele frequency, ²⁾GN; genotype number, ³⁾SS; sample size, ⁴⁾AN; allele number, ⁵⁾GD; gene diversity, ⁶⁾H; heterozygosity, ⁷⁾PIC; polymorphism information content.

클로닝 하여 염기서열 분석을 수행하였다. 무등과 동조는 13 개의 클론, 추석은 14 개의 클론, Market-1은 10 개의 클론에 대하여 성공적으로 염기서열 분석을 수행하였다. 품종별로 분석한 염기서열 결과는 CLC Main Workbench를 이용하여 assembly 작업을 거친 뒤 consensus를 형성하였으며 alignment 틀을 사용하여 비교하였다.

그 결과 해당 InDel locus에서 CAATTATTTGAATTGAAAAAGGTTTCATCCTATTTTTATTTTATCATATATAGA GAAGAGATACTCCGGATTCTCGCAAGGGATAATCACTTTTTTTTTT의 서열을 가지는 101 bp 길이의 반복구간을 확인할 수 있었다. 341 bp를 형성하였던 추석은 InDel locus에서 101 bp 크기의 반복 염기서열이 1 회 반복되어 있었으며, 444 bp를 형성하던 무등은 101 bp 크기의 반복 염기서열이 2 회 반복되어 있었고, 545 bp 크기의 서열이 나타난 Market-1의 경우 101 bp 크기의 반복 염기서열이 3 회 반복되어 있는 것을 알 수 있었다. 349 bp를 형성하였던 동조의 경우 추석과 비교하였을 때 증폭 부위에 A, T, T, TAAAT 등의 InDel 부위가 추가로 있는 것이 확인되었다.

4. *Z. jujuba* 품종의 유전적 관계 분석

본 연구에서 개발된 Zj-InDel-1과 Zj-InDel-2 마커를 이용하여 60 개의 대추 유전자원을 분석한 결과를 이용하여 계통수 분석을 수행했다. 유전적 유사성 계수는 분자 진화 유전분석 프로그램인 MEGA version 7을 사용하여 계산되었고 유전적 거리는 PowerMarker version 3.25를 이용하여 shared allele distance 방법으로 계산되었다 (Liu and Muse, 2005; Kumar *et al.*, 2016).

계통수는 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 방식으로 작성하였으며 분석 결과 60 개의 품종에 Zj-InDel-1, Zj-InDel-2 두 개의 마커를 적용해 보면 총 10 개의 그룹으로 나누어짐을 볼 수 있었다. 동조, 산조, Jh-9는 두 개의 마커로 나머지 품종들로부터 각각의 품종이 구분되었으며 나머지 57 개의 품종은 7 개의 그룹을 형성하였다. 첫 번째 그룹은 보은, Jk-4가 속하였다. 두 번째 그룹은 6 월선조, 금창1호, 일본, 왕대추 품종이 속하였다. 세 번째 그룹은 복조, 봉산취조, 차전조, 흥안, Jg-10, 조취왕조, 마반조, 티벳대과종 품종이 속하였다. 네 번째 그룹은 태상왕, 티벳왕, 월광조, 월령, 양내조, 보로호조, 차이나브라운, 첩화동조, 춘향17

호, 추석, 대백조, 대립종, 대설조, 금사, 금사1호, 홍조, 화전옥조, Je-1, 제남고대실조, Jj-1, 중대립종, 국광, 미조, 무핵홍조, 산동복조, 상왕, 센터미가 속하였다. 다섯 번째 그룹은 Market-1, Market-2가 속하였다. 여섯 번째 그룹은 천상, 금성, 호대추, Jd-12, 무등, 설조, 의성-C, 월출 품종이 속하였다. 일곱 번째 그룹은 매추, 월광, 취조왕, 화전대추, 이부, 령조가 속하였다 (Fig. 3).

고 찰

InDel 마커는 집단유전학, 분류학적 진단 도구, 유전자 지도 작성 등 다양한 응용 분야에 사용되고 있다 (Jain *et al.*, 2019). 유전 연구 및 육종을 위한 *B. rapa*의 InDel 마커가 이용되었으며 (Liu *et al.*, 2013), 계통수 작성과 유전자 지도를 만드는 데 활용 가능하여 강낭콩의 InDel 마커 개발 (Moghaddam *et al.*, 2014), 고추에서 개발된 InDel 마커를 사용하여 연관지도를 작성 (Li *et al.*, 2015), 토마토에서 InDel 마커를 활용하여 유전적 거리 계산과 클러스터 분석 (Yang *et al.*, 2014) 등에 이용되고 있다.

국내 대추를 구별할 수 있는 InDel 마커를 개발함으로써 대추의 유전적 연구와 분자유종 등의 기초를 마련하였으며 추가적인 연구가 이루어진다면 InDel 마커를 이용한 다양한 대추 품종의 클러스터 분석과 연관지도 작성 및 형질과 관련된 quantitative trait locus (QTL) 분석 등에 활용할 수 있을 것이라 기대한다.

엽록체 계놈은 DNA 바코드와 분자마커를 사용하여 종식별에 사용할 수 있어 형태학적으로 유사한 종을 구별할 수 있음이 밝혀져 있다 (Kim *et al.*, 2015).

본 연구에서 개발한 Zj-InDel-1 마커는 엽록체 DNA, Zj-InDel-2 마커는 핵 DNA에 기반을 둔 마커로 엽록체 DNA와 핵 DNA를 이용한 분자 마커 모두 국내 품종 구분에 이용할 수 있음을 보여주었다. 국내 주요 대추 품종으로 복조, 무등, 금성, 월출, 천상, 추석, 보은 등이 알려져 있으며 이 중 복조 품종은 국내에서 가장 많이 재배되는 매우 중요한 유전자원으로 품종 보호와 구별 방법에 관한 연구가 필요한 자원이다.

본 연구에서는 6 개의 국내 대추 품종을 이용한 NGS 분석 결과로 확보된 염기서열을 이용하여 InDel locus를 탐색하였고 그 결과 Zj-InDel-1 마커와 Zj-InDel-2 마커를 개발 할

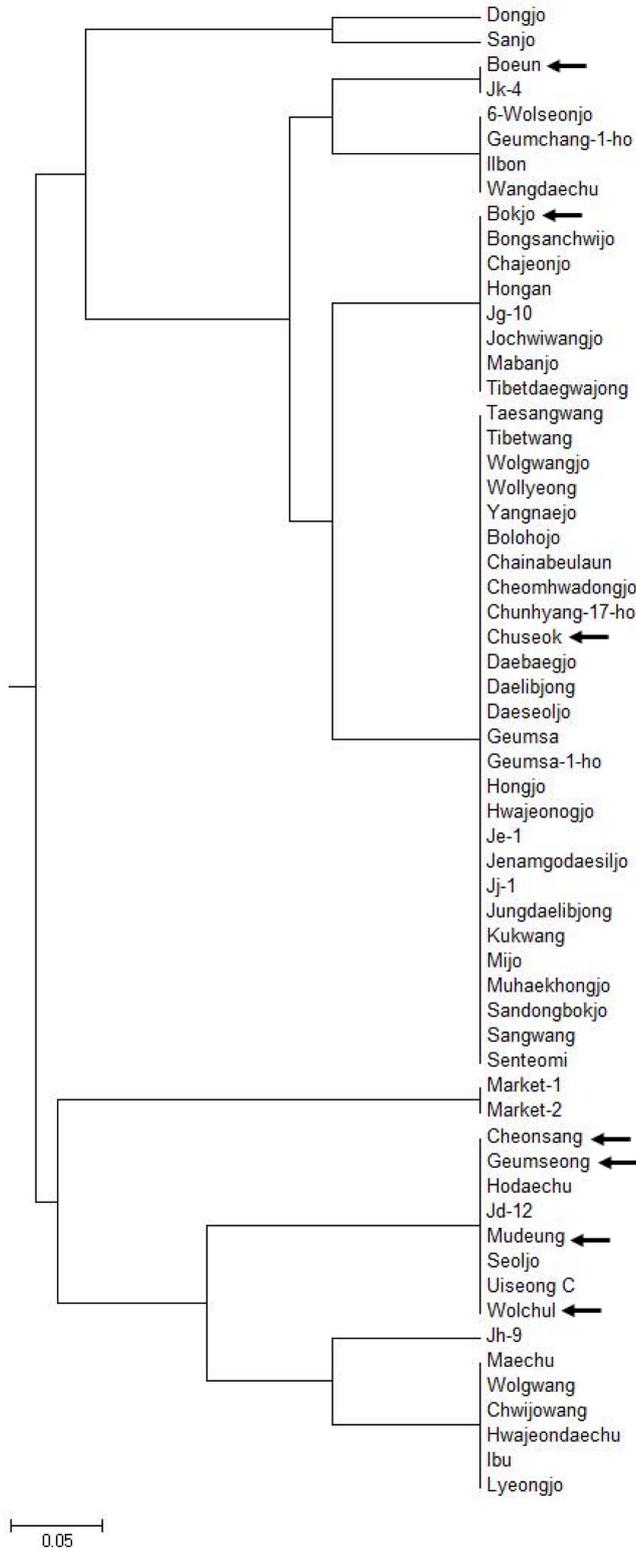


Fig. 3. Phylogenetic analysis of 60 *Z. jujuba* genetic resources analyzed using 2 InDel markers. Arrows indicate the major Korean jujube cultivars.

수 있었다. *In silico* 분석에서는 2 가지 타입의 유전자형만 발견된 Zj-InDel-1 마커는 60 개의 대추 유전자원에 대한 screening 분석에서 4 개 타입의 유전자형을 보여 이에 대한 검증을 위해 증폭된 DNA 염기서열에 대한 분석이 필요했다. 해당 InDel 구간에 대한 분석을 위해 PCR product에 대한 염기서열분석을 실시하였으며 이를 통해 101 bp 크기의 서열이 반복되는 것을 확인하였다. 특히 무등, 금성, 월출, 천상 품종에는 이 염기서열의 반복이 2 회 있는 반면 복조 품종에는 1 회 반복되었다.

Zj-InDel-1 마커를 이용한 genotyping 결과에서 복조 품종이 343 bp를 나타내고 무등, 금성, 월출, 천상 품종에서 444 bp를 나타내어 국내 품종들로부터 복조 품종을 구분할 수 있었고, Zj-InDel-2 마커는 복조, 무등, 금성, 월출, 천상으로부터 추석과 보은을 각각 구분할 수 있었다. NGS data를 이용하여 핵 및 엽록체 DNA에서 국내 주요 품종을 구별할 수 있을 것으로 예상한 대량의 InDel 부위를 대상으로 genotyping을 수행하여 복조, 추석, 보은 등의 품종을 다른 국내 품종으로부터 구별할 수 있는 마커를 개발하였으나, 무등, 금성, 월출, 천상 품종 사이에는 다형성이 관찰되지 않아 국내 대추 품종 사이에는 다양성이 낮은 것으로 생각된다. 국내 품종을 모두 구별하기는 한계가 있었고 이를 극복하기 위해서는 SSR, SNP 등 새로운 분자 마커를 개발할 필요가 있다고 생각된다.

Zj-InDel-1과 Zj-InDel-2 마커의 개발은 국내 대추 품종 판별의 기준으로 이용될 수 있을 것이며, 국내 대추품종의 보호와 대추산업의 발전에 기여할 수 있을 것이다. 국내 우수 품종의 구분을 위한 추가적인 마커를 개발한다면 대추를 육종하는데 활용할 수 있는 유전자원을 구분하는데 활용되어 고품질의 신품종을 개발하는데 기여할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 연구사업(과제번호: 2018123C10-1820-AB01)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Bang MH, Yu HY, Bae BS, Park CS and Han MW. (2020). Studies on physicochemical characteristics for quality control of *Zizyphi Fructus* by appearance grade. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 28:455-462.

Chakravarthi BK and Naravaneni R. (2006). SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L). *African Journal of Biotechnology*. 5:684-688.

Chen R, Chang L, Cai X, Wu J, Liang J, Lin R, Song Y and Wang X. (2021). Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on a high-resolution melting curve. *Horticultural*

- Plant Journal. 7:31-37.
- Chiou CY, Shih HC, Tsai CC, Jin XL, Ko YZ, Mantiquilla JA, Weng IS and Chiang YC.** (2020). The genetic relationships of Indian jujube(*Ziziphus mauritiana* Lam.) cultivars using SSR markers. *Heliyon*. 6:e05078. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020319216> (cited by 2021 March 12).
- Choi KJ.** (2002). International union for the protection of new varieties of plants(UPOV) and its 1991 convention. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 20:151-159.
- Cyong JC and Hanabusa K.** (1980). Cyclic adenosine monophosphate in fruits of *Zizyphus jujuba*. *Phytochemistry*. 19: 2747-2748.
- Cyong JC and Takahashi M.** (1982). Identification of guanosine 3':5'-monophosphate in the fruit of *Zizyphus jujuba*. *Phytochemistry*. 21:1871-1874.
- Doyle JJ and Doyle JL.** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:39-40.
- Evreinoff VA.** (1964). Notes sur le Jujubier(*Zizyphus sativa* G.). *Journal D'agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée*. 11:177-187.
- Gao QH, Wu CS and Wang M.** (2013). The jujube(*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit: A review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:3351-3363.
- Han BH and Park MH.** (1987). Sedative activity and its active components of *Zizyphi Fructus*. *Archives of Pharmacal Research*. 10:208-211.
- Hayashi K, Yoshida H and Ashikawa I.** (2006). Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*. 113: 251-260.
- Jain A, Roorkiwal M, Kale S, Garg V, Yadala R and Varshney RK.** (2019). InDel markers: An extended marker resource for molecular breeding in chickpea. *PLoS One*. 14:e0213999. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0213999> (cited by 2021 March 21).
- Kim KH, Lee SC, Lee JK, Lee HO, Joh HJ, Kim NH, Park HS and Yang TJ.** (2015). Comprehensive survey of genetic diversity in chloroplast genomes and 45S nrDNAs within *Panax ginseng* species. *PLoS One*. 10:e0117159. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0117159> (cited by 2021 March 11).
- Kumar S, Stecher G and Tamura K.** (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33:1870-1874.
- Li JW, Fan LP, Ding SD and Ding XL.** (2007). Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chemistry*. 103:454-460.
- Li S, Guo M, Tian S, Liu H and Zhao X.** (2021). Genetic diversity and population structure of Chinese jujube(*Zizyphus jujuba* Mill.) and sour jujube(*Zizyphus acidojujuba* Mill.) using inter-simple sequence repeat(ISSR) Markers. *Molecular Plant Breeding*. 12:1-21.
- Li S, Shen D, Liu B, Qiu Y, Zhang XH, Zhang ZH, Wang H and Li X.** (2013). Development and application of cucumber InDel markers based on genome re-sequencing. *Journal of Plant Genetic Resources*. 14:278-283.
- Li W, Cheng J, Wu Z, Qin C, Tan S, Tang X, Cui J, Zhang L and Hu K.** (2015). An InDel-based linkage map of hot pepper(*Capsicum annuum*). *Molecular Breeding*. 35:1-10.
- Liu B, Wang Y, Zhai W, Deng J, Wang H, Cui Y, Cheng F, Wang X and Wu J.** (2013). Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. *Theoretical and Applied Genetics*. 126:231-239.
- Liu J, Liu H, Ma L, Wang S, Gao J, Li Y, Wu R and Pang X.** (2014). A Chinese jujube(*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit-expressed sequence tag(EST) library: Annotation and EST-SSR characterization. *Scientia Horticulturae*. 165:99-105.
- Liu K and Muse SV.** (2005). PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 21: 2128-2129.
- Liu M and Zhao J.** (2002). RAPD analysis on the cultivars, strains and related species of Chinese jujube. *Acta Horticulturae*. 622:477-484.
- Liu MJ and Cheng CY.** (1994). A taxonomic study on the genus *Zizyphus*. *Acta Horticulturae*. 390:161-166.
- Ma QH, Wang GX and Liang LS.** (2011). Development and characterization of SSR markers in Chinese jujube(*Zizyphus jujuba* Mill.) and its related species. *Scientia Horticulturae*. 129:597-602.
- Moghaddam SM, Song Q, Mamidi S, Schmutz J, Lee R, Cregan P, Osorno JM and McClean PE.** (2014). Developing market class specific InDel markers from next generation sequence data in *Phaseolus vulgaris* L. *Frontiers in Plant Science*. 5:185. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00185/full> (cited by 2021 March 11).
- Na HS, Kim KS and Lee MY.** (1996). Effect of jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl4-treated rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 25:839-845.
- Nam JI, Kim YM, Choi GE, Lee GY and Park JI.** (2013). Assessment of genetic relationship among date(*Zizyphus jujuba*) cultivars revealed by I-SSR marker. *Journal of Korean Society of Forest Science*. 102:59-65.
- Okamura N, Nohara T, Yagi A and Nishioka I.** (1981). Studies on the constituents of *Zizyphi Fructus*. III. Structures of dammarane-type saponins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 29:676-683.
- Outlaw WH Jr, Zhang S, Riddle KA, Womble AK, Anderson LC, Outlaw WM, Outlaw NN, Outlaw EC and Thistle AB.** (2002). The jujube(*Zizyphus jujuba* Mill.), a multipurpose plant. *Economic Botany*. 56:198-200.
- Park KC, Kim YG, Hwangbo K, Gil J, Chung H, Park SG, Hong CP and Lee Y.** (2017a). Development of simple sequence repeat markers from *Adenophora triphylla* var. japonica(Regel) H. Hara using next generation sequencing. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 25:411-417.
- Park SI, Hwangbo K, Gil JS, Chung H, Kim HB, Kim OT, Kim SC, Koo SC, Um YR and Lee Y.** (2017b). Determination of the origin of *Angelica* roots using *Angelica gigas* chloroplast based SSR markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 25:361-366.
- Park YG and Kim JH.** (2016). Antioxidant activity, total phenolics, vitamin C and sugar content during fruit ripening of

- five different jujube cultivars. Korean Journal of Plant Resources. 29:539-546.
- Qi J, Dong Z, Shen L, Mao Y and Chen L.** (2008). Establishment of ISSR-PCR reaction system in Chinese jujube. Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 23:209-212.
- Qu ZZ and Wang YH.** (1993). China fruit's monograph—Chinese jujube volume. China Forestry Publishing House, Beijing, China, p.229.
- Rhee YK, Kim DH and Han MJ.** (1998). Inhibitory effect of Zizyphi Fructus on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. Korean Journal of Food Science and Technology. 30:199-205.
- Shahhoseini R, Babaei A, Kazemi M and Omidbaigi R.** (2012). A study on genetic variation in Iranian jujube(*Zizyphus jujuba* Mill.) genotypes using molecular AFLP marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 20:55-68.
- Smith JSC and Smith OS.** (1992). Fingerprinting crop varieties. Advances in Agronomy. 47:85-140.
- 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(*Zizyphus jujuba* Mill.). PLoS One. 9:e99842. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099842> (cited by 2021 March 11).
- Yagi A, Koda A, Inagaki N, Haraguchi Y, Noda K, Okamura N and Nishioka I.** (1981). Studies on the constituents of Zizyphi Fructus. IV. Isolation of an anti-allergic component, ethyl alpha-D-fructofuranoside from EtOH extract of Zizyphi Fructus(author's transl). Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 101:700-707.
- Yagi A, Okamura N, Haraguchi Y, Noda K and Nishioka I.** (1978). Studies on the constituents of Zizyphi Fructus. I. structure of three new p-coumaroylates of aliphatic acid. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 26:1798-1802.
- Yang J, Wang Y, Shen H and Yang W.** (2014). *In silico* identification and experimental validation of Insertion-Deletion polymorphisms in tomato genome. DNA research. 21:429-438.
- Zhao J, Jian J, Liu G, Wang J, Lin M, Ming Y, Liu Z, Chen Y, Liu X and Liu M.** (2014). Rapid SNP discovery and a RAD-based high-density linkage map in jujube(*Zizyphus* Mill.). PLoS One. 9:e109850. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109850> (cited by 2021 March 11).
- Zhao Z, Liu M and Tu P.** (2008). Characterization of water soluble polysaccharides from organs of Chinese jujube(*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Dongzao). European Food Research and Technology. 226:985-989.