

최 종
연구보고서

수박, 멜론의 품종 지문화 연구 및 순도검정
마커 개발

DNA Fingerprinting for Watermelons and Melons
and Development of Hybrid Purity Test Markers

국립종자원
고려대학교
(주)농우바이오

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “수박, 멜론의 품종 지문화 연구 및 순도검정 마커 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 국립종자원

총괄연구책임자 : 이 승 인

세부연구책임자 : 이 승 인

연 구 원 : 송 민 식

연 구 원 : 차 소 영

세부연구책임자 : 권 용 삼

연 구 원 : 오 유 환

연 구 원 : 김 태 은

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 신 정 섭

선 임 연 구 원 : 옥 승 한

협동연구기관명 : (주)농우바이오

협동연구책임자 : 안 중 문

요 약 문

I. 제 목

수박, 멜론의 품종 지문화 연구 및 순도검정 마커 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제에서는 우리나라 과채류 작물 중 육종 경쟁력과 시장성 그리고 미래 잠재가치 측면에서 가장 중요하다고 판단되는 박과류 작물, 그 중에서도 수박과 멜론에 대하여 국내에서 육성된 주요 유통품종(elite breeding line)을 대상으로 우선 DNA 분자마커 수준에서 구별성 확보가 가능한 품종식별 마커를 다수 확보하고, 이를 바탕으로 품종간 유전적 유연관계 설정, 형태적 특성과 상관관계 분석, 마커를 이용한 품종 지문화 및 이를 통한 품종식별 체계 개발, 그리고 순도검정 마커의 개발을 목적으로 본 과제를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 수박과 멜론의 국내 주요 유통품종의 분자유전학적 기초연구를 통하여 국가 차원의 DNA 마커를 활용한 품종보호 적용 모델 설정과 이를 바탕으로 한 관련분야 분자육종 지원 등 마커의 실용화 연구를 최종 목적으로 과제를 진행하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 우선 변이의 폭이 적어서 기존의 품종 분류에 분자표지 인자를 적용하여 구분하는 것에 어려움이 많았던 수박에서 품종식별에 효과적인 분자표지 인자들을 새로이 개발하고자 하였다.

그리고 수박과 멜론에서 개발된 분자표지 인자들을 이용하여 품종간 최소거리가 매우 짧은 이들 작물의 유통 품종들의 다형성 판정을 가능케 하고 품종 특이적인 분자표지 인자를 개발·확보함으로써, 이 정보들을 축적 D/B화하여 금후 관련 분야 및 분자육종의 기초연구로 삼고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 멜론의 품종지문화 연구 및 순도검정 마커 개발

우리나라에서는 일반 멜론과 동양계 멜론인 참외로 계통이 나뉘어 유통과 소비, 재배가 구분되어 이루어지고 있는 실정이며, 참외에 비하여 상대적으로 경제적 가치와 대중성은 떨어지나, 고급 과일로서 인식은 높은 편이며, 수출 비중 또한 과채류 작물 중에서 가장 높은 편으로 미래 새로운 소비와 시장 창출 측면에서 가장 가능성 있는 작물로 꼽힌다. 본 과제에서는 이와 같은 멜론에 대하여 국내에서 육성된 주요 유통품종(elite breeding line)을 대상으로 SSR 분자표지를 이용한 품종 지문화 및 F₁ 종자 순도검정 마커 개발을 목적으로 연구를 수행하였다.

전체 351개 박과류 유래 SSR 마커에 대하여 cross amplification 방법으로 다형성 선별을 실시한 결과 품종 지문화에 유용할 것으로 판단되는 75개의 분자표지를 전체 멜론 공시품종의 DNA 지문화 검정에 사용하였다. 그 결과 최종적으로 56개가 48 품종 전체 공시품종 집단에 대하여 정상적이고 유용한 다형성 패턴이 있는 것으로 분석되었다. 검정된 총 alleles 수는 215개이고 전체 56개 분자표지의 평균 PIC 값은 0.632이고, PIC 값 0.9 이상으로 다형성 정도가 매우 높은 분자표지는 WM68, CMGAN12, CMSSR12로 각각 0.905, 0.909, 0.940인 것으로 분석되었다. 멜론 48 공시품종에 대한 유연관계 분석 결과 덴드로그램 상에서 유전적으로 크게 3개의 품종군으로 분리됨을 알 수 있었다. 그룹 A와 그룹 B에는 각각 네트가 형성되는 엘스 계통과 Galia 계통으로 구분되어 졌다. 그룹 C에는 Honeydew와 Piel de Sapó 등 모두 코르크 형성이 없는 무네트 멜론 품종군들이 포함되었다. 본 과제의 공시품종에 대하여 식별이 가능한 최대 효율의 최소 마커 세트로는 PIC 값 0.8 이상 7개 마커가 가장 기본적인 마커 세트로서 이용될 수 있을 것으로 사료되었다. 재배시험 결과를 바탕으로 멜론 공시품종의 표현성 특성과 본 과제에서 수행 SSR 마커에 의한 멜론 genotype의 연관관계를 검정한 결과 $r=0.526$ 으로 비교적 낮은 상관관계(matrix correlation)를 보였다. 따라서 본 과제에서 56개 SSR 마커를 사용하여 검정된 멜론 공시품종의 유전적 유연관계를 바탕으로 품종보호의 요건인 구별성 판단의 근거로 삼거나 품종간 최소거리를 설정하는 기준으로 준용하는 것은 타당하지 않는 것으로 판단되었다.

멜론 F₁ 유통품종인 '발렌타인 춘추'와 '달마시안'에 대하여 각각 선별된 분자표지 WM124와 WM50을 이용한 순도검정을 실시하였다. 본 분자표지는 포장순도 검정을 대체하여 실내검정에 활용할 수 있을 것으로 보여지며, 특히 SSR 마커임에도 일반 아가로스 젤 (2.5%)에서 분석이 가능하여 육종 현장에서 실용적인 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

Polyacrylamide big gel 분석에서 다형성이 인정되지만 특이성이 떨어져 활용이 어려운 것으로 분석된 33개의 SSR loci에 대해서는 특별히 genome walking을 통한 마커 특이화 과정을 진행하여 다형성 마커로 선발하고자 하였다. 염기서열 분석 결과 당초 예상했던 것과 달리 priming region의 염기 변이가 많지 않아 품종간 돌연변이 요소가 마커의 특이성 저하에 직접적인 원인을 제공하는 가장 큰 요인이라고 보기는 어려웠다. 결론적으로 'weak allele'의 특이성 저하가 priming region의 mismatch와 관련되기 보다는 primer의 design 자체가 적절하지 못하다는 결론을 얻을 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 genome walking이 완성된 17개 SSR loci에서 유래한 18개 마커에 대하여 새로운 프라이머를 제작함으로써 프라이머 특이화를 마무리하고 48개 멜론 공시품종의 다형성 분석에 성공적으로 활용할 수 있었다.

2. 수박의 품종지문화 연구 및 순도검정 마커 개발

수박 유통품종을 식별할 수 있는 분자생물학적 기술을 개발하기 위하여, 박과작물에서 개발된 SSR marker의 활용 가능성 탐색, 분자표지에 의한 국내유통품종의 유전적 유연관계 분석, DNA marker와 형태적 특성과의 상관관계 분석, F1 순도검정에 SSR marker의 활용 등에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

수박 유통품종 식별에 적합한 SSR marker를 선발하기 위하여 멜론에서 유래된 231개와 오이 유래된 96개를 수박에 적용하였을 때 멜론의 경우 총 231개의 분석 마커중 60개만이 수박에 안정적으로 유전자 증폭이 이루어졌으며, 이들 마커중에서 10개가 다형성을 보이는 것으로 나타났다. 오이 유래의 SSR marker 96개중 21개가 수박에 이용할 수 있었으나 다형성을 보이는 것은 4개에 불과 하였다. 그리고 수박에서 기 개발된 SSR marker 88개를 공시품종에 적용하였을 때 총 37개의 마커가 다형성을 보이는 것으로 분석되었다. 그리고 협동연구기관에서 개발된 SSR marker 91개를 분석하여 19개의 마커에서 다형성을 나타내어, 본 연구기간 동안 수박 DNA 분석에 적합한 총 70개의 marker를 선발하였다. 이들 마커의 평균 대립유전자의 수는 3.74개로 나타났고, PIC 값은 0.078~0.800 범위에 분포하였다. 이 결과를 근거로 하여 UPGMA 분석을 통한 덴드로그램을 작성한 바 전체 유사도 지수는 0.18~0.99로 나타났고, 유사도 값 0.70을 기준으로 할 때 수박 49품종은 총 5개의 품종군으로 분류되었다. 품종식별에 필요한 최소 SSR marker 선정하기 위하여 PIC 값이 0.30이상이면 서 밴드패턴이 깨끗한 29개의 SSR를 선정하여 이를 코드화한 다음 덴드로그램을 작성한 바

공시품종 모두 식별이 가능한 것으로 조사되었다. 품종식별용 수박 29개의 SSR marker와 70개의 SSR marker에 의해 작성된 덴드로그램의 상관정도는 아주 높게 나타나 29개 SSR marker만으로 품종식별이나 유전적 유사도 검정에 활용 가능한 것으로 분석되었다. 또한 협동연구과제에서 조사된 수박 29품종의 형태적 특성과 SSR marker의 genotype과의 상관관계를 분석한바 상관계수가 $r=0.523$ 으로 낮게 나타났다.

수박 F1 순도검정에 분자표지인자의 활용 가능성을 분석하기 위하여, ‘금천’의 4품종의 양친에 대해 다형성을 보이는 13개의 마커를 선발한 다음 ‘스피드’ 112 개체, ‘꿀보단’ 116 개체를 분석하였을 때 F1에서는 양친의 대립유전자가 나타나는 heterozygous한 밴드 패턴을 보여 100% 교배가 됨을 확인할 수 있었으며 이 마커는 금후 수박 F1 품종에 순도 검정에 직접 활용이 가능할 것으로 나타났다. 그리고 수박 SSR marker의 유전양상을 조사하기 위하여 SSR marker WM139, WM392를 이용하여 ‘금천’, ‘스피드’ 품종의 F2 집단에 대해 분석한 바 마커의 분리양상이 멘델의 이론적 분리비에 적합한 것으로 나타났다.

향후 이러한 연구결과 중에서 수박품종식별용 마커 29개는 자동염기서열분석기와 모세관 전기영동장치를 활용하여 분석 마커별로 대립유전자의 크기를 정확하게 판단하여 국내 통품종의 DNA profile data base 구축에 활용할 것이며 이 결과는 품종보호출원시 출원품종의 대조품종의 선정 가능성 탐색, 품종보호권 침해 조사, 분쟁종자대비시험과 종자유통 조사시 품종의 진위성 분석 등에 직접 이용이 가능할 것으로 사료된다. 그리고 본 연구과제에서 개발된 수박 순도검정용 마커 13개의 경우 실험실내에서 F1 순도검정이 직접 가능하기 때문에 종자생산에 소요되는 시간, 노력, 경비를 크게 줄일 수 있어 종자생산 비용 절감에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

3. 수박 유래 고유 마커의 개발과 활용

본 연구개발 과제에서는 식물 품종 심사기준의 방법을 제공하고, 형질변형 때문에 발생하게 되는 품종의 균일성이나 우수성의 훼손 정도를 유묘기 상태에서도 확인이 가능하도록 하는 기술적 기반을 핵산 표식인자의 개발을 수행하여 제공하는 것을 연구의 내용 및 범위로 설정하였다. 과채류 중 수박을 연구재료로 선정하였고, 핵산 표식인자 개발 방법 중 정확도면에서 뛰어난 방법으로 알려져 있는 simple sequence repeats (SSR)과 gene-specific marker 기법을 적용하여 그 효율성을 검정하고, 이 방법들을 통하여 개발된 표식인자들을 안정적으로 사용할 수 있는 최적의 조건과 분석체계를 확립하고자 하였다. 본 연구과제에서 개발되어 확보된 핵산 표식인자들은 F1 선별 및 품종변이 판정 등에 사용될 수 있으며, 종내 및 종간 품종간의 변이 추정 및 수박의 유전적 다양성

의 측정에 이용될 수 있도록 하였다. 그리고 본 연구과제의 결과물들을 모두 가시화, 계량화하여 공개함으로써, 연구자와 농업관련 종사자들이 연구에 의하여 개발된 정보를 쉽게 접할 수 있도록 하고, 차후 계속 개발되어질 핵심 표식인자들의 체계적인 데이터뱅크 구축의 원형을 제시하는 것이 본 연구과제에서 설정한 연구범위이다.

4. 멜론, 수박의 재배시험 특성검정 및 포장 순도검정

국내에서 시판되는 네트멜론 23품종과 유럽종 11품종, 국내시판 무네트멜론 12품종, 유럽종 2품종 등 48품종을 대상으로 재배시험 및 특성을 조사한 결과 초형, 유과의 모양, 과형, 네트의 밀도와 솟음, 과피색, 과육색, 숙기등에서 국내품종들간의 차이가 있었고 유럽에서 재배되는 품종과의 차이는 확연히 다른 구별성이 있었다.

수박의 경우 타원형 호피 수박계 스피드꿀 수박 외 12품종, 소과종 수박 꼬마 수박 외 5품종, 원형계 금천수박, 3배체 수박 씨제로, 씨제로꿀, Tropical type Champion외 6품종 등 30 품종에 대한 재배시험 및 특성조사를 실시하였다. 타원형계수박의 초형은 큰 차이가 없었고 단지 잎의 형태에서 결각의 정도와 크기 그리고 엽색에서 약간의 차이를 발견할 수 있었지만 황피를 가진 타원형 수박은 줄기나 잎에서도 노란색이 나타나 확실하게 구분 될 수 있었다. 과의 모양에서는 원형계, 타원형계로 구분되며 과의 크기는 소과종, 중과종, 대과종으로 다양하게 개발되고 있다. Tropical type은 국내 시판종과는 외형적으로 과형, 바탕색, 호피무늬에서 많은 차이를 나타내었다. 과육색은 주로 선홍색을 띠고 있었지만 일부 황육색을 가진 것도 개발되고 있다. 아울러 본 과제를 통하여 마커를 이용한 순도검정 기술이 개발됨으로 인하여 생산시기와 안정성을 가질 수 있어 비용을 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

1. Development of molecular markers and DNA fingerprinting for melons

A melon (*Cucumis melo* L.) is classified into two groups of Western cultivar type (general melons) and Oriental melon in Korea, according to which marketing, consumption, and cultivation are distinguished. Melon, even less important in economic value and popularity, is recognized as high-class fruits compared with Oriental melon. Moreover, the melon is the top exporting item among vegetable fruit crops. So, it is expected that new consumption and market is generated in near future. At this study, we developed SSR markers and carried out DNA fingerprinting to cover main elite breeding lines of melon .

The primary marker selection was carried out in cross amplification ways about total 351 *Cucumis*-species derived SSR markers. Finally 75 markers were selected for a DNA fingerprinting of a total 48 melon accessions, and 56 finally gave an useful polymorphic patterns. An average PIC value of the 56 markers was 0.632, which cover a total alleles of 215. WM68, CMGAN12, and CMSSR12 gave the highest PIC value of 0.905, 0.909, and 0.940, respectively. Genetic association analysis based on genetic similarities resulted a dendrogram regarding 48 melon accessions. The dendrogram discriminated Earl's and Galia type, both of all are cork formation type, and categorized into different group, A and B. Melons without cork such as Honeydew and Piel de Sapo were included to another group C. Seven SSRs of more than 0.8 PIC value considered a basic marker set of maximum efficiency in identification of the accessions. The correlation between morphological characteristics of melon accessions and genotype by SSR markers was not high to 0.526. It was judged, therefore, that the genetic distances based on 56 SSR markers among the melon accessions were not proper to apply to judge distinctness that is a requirement for variety protection, or to set up minimum distances between varieties. WM124 and WM50 were selected specifically as seed purity certification markers for melon F₁ hybrids of 'Valentine ChunChu' and 'Dalmatian', respectively. The

F₁ hybrids were targeted to test seed purity and the results assured that the indoor certification method using molecular marker is stable as to substitute conventional field testing. Especially the analysis adopting agarose gel system made it be possible for practical utilization on-breeding site.

In order to proceed marker specification, thirty-three SSR markers were initially chosen because they showed polymorphic pattern lacking sufficient specificity in polyacrylamid gel analysis. The primary results suggested that the insufficient specificity is derived from the low specificity of the primer and there may be some mismatches in the priming region, which is usually expected from the cases of cross-species amplification. We reached to the conclusion, therefore, that the markers could be refined if the problem of low specificity is made up, that mismatches of the primers are corrected. For the purpose, the markers were targeted to isolate corresponding alleles from related Oriental melon "cv. Gganchi". DNA walking method was adopted to produce extended allele sequence, which is necessary to get a new primer sequence. Finally, 16 alleles of 33 SSR markers chosen were defining using DNA walking method. Original oligonucleotide sequences of marker primers were compared and optimized based on the sequence information. Half of the primers showed 1–3 SNPs, while others have perfect match with original primer sequence. Even the SNPs were mostly single and identified in the middle of the primer sequence, suggesting the 'weakness of the allele' is not so closely related with primer mismatches as expected. Actually, correction of the mismatches had no critical effect on refining on the polymorphic patterns, which means, in turn, the nature of the allele is rather 'weak', so the priming site should be re-located. In this study, most of the primers were optimized as new one and successfully applied to the description of 48 melon (*Cucumis melo* L.) varieties. 13 out of 16 SSR markers refined produced improved polymorphic pattern which is sufficient to score.

2. Development of molecular markers and DNA fingerprinting for watermelons

This study was carried out to assess the potential of variety identification and to

establish assessing of the genetic purity of F1 hybrid seeds using DNA markers in watermelon.

SSR markers originally developed in melon and cucumber were applied cross-species to the watermelon (*Citrullus lanatus*) in an attempt to characterize genetic diversity. 81 SSR loci out of 231 SSRs from melons and 96 SSRs from the cucumber were detected in the watermelon varieties. Among the 81 primers, 14 evidenced polymorphisms in 24 watermelon varieties. Thirty seven polymorphic primer sets were selected from 88 of the SSRs derived from the watermelon developed by several researcher in USA and Spain. In addition, 19 polymorphic markers were selected from 91 SSR primer pairs developed from Korea university. A total of 70 polymorphic SSR markers were employed for variety discrimination of 49 watermelon varieties. Twenty-seven SSR markers were polymorphic in 49 watermelon varieties, revealing a total of 262 alleles. The average polymorphism information content (PIC) was 0.382 ranging from 0.078 to 0.800. Two hundred sixty two SSR loci were used to calculate Jaccard's distance coefficients for cluster analysis. A clustering group was categorized into 5 major groups corresponding to varietal types. Almost all of the varieties were differentiated by SSR marker genotypes. Twenty nine SSR marker with high PIC value (>0.3) was selected to establish minimum marker sets of variety identification from 70 polymorphic SSR markers. These markers can be discriminated 49 watermelon varieties by marker genotypes. The dendrogram generated after the UPGMA using 29 SSR-based genetic distances was similar to the dendrogram constructed with the 70 SSR data. The Mantel matrix correspondence test was used to compare the similarity of the matrices and the correlation coefficient value was 0.921. The correspondence between the morphological traits and the SSR-based similarity coefficient matrices was tested in a correlation analysis. no significance correlation was found between the SSR and morphological data.

These markers should be of value in other areas such as variety identification for consumer protection and resolving disputes concerning circulating seeds.

Microsatellite markers were used for assessing variation within parental lines and testing the genetic purity of hybrid seeds in watermelon. Twenty nine microsatellite markers were employed for fingerprinting 5 watermelon hybrids and their parental lines.

These markers were discriminated across 5 hybrid varieties and parental lines. To test genetic purity of F1 varieties such as 'Ggulbodan' and 'Speed', 13 sets of markers were screened for P1, P2 and F1 varieties. These markers were found to be heterozygous in F1 plants of two crosses, respectively. In addition, we are analyzed to segregation mode and chi-square goodness-of-fit tests for microsatellite markers in the F2 population derived from two F1 hybrids, 'Geumcheon' and 'Speed'. The segregation ratio of the DNA markers was fitted to theoretical segregation mode of 1:2:1. Interestingly, a segregation distortion was detected by WM392 in F2 plants derived from 'Geumcheon'. These markers could be an efficient implement in the process of quality testing of hybrid seeds in watermelon varieties.

3. Development of new molecular markers in watermelon

Crop breeders have developed new cultivars through combination of genes affecting agronomic performance and market values, and every breeding program needs enormous time and labor. After releasing newly developed cultivars to farmers, maintenance of the superior genetic characters against unexpected mutations as well as plagiarism from other seed company are very important things to protect. Until recently, the identification of newly developed characters and plagiarism are mainly checked by phenotypically and physiologically distinguished characters. However, the recent years a lot of DNA marker techniques and markers to classify the genetic variations were actively developed. DNA markers, which are abundant and physiologically neutral, have been successfully used to classify species or families and estimate genetic divergence among families tested. Development of DNA markers for genotyping and studies of genetic diversity are commonly started from the findings of polymorphisms from undefined elements. In the study present here, specific primer sets were developed from SNP, URP, URP-derived SNP and cleaved URP-derived SNP. And also SSR markers were developed.

4. Growing test for melons and watermelons

In order to investigate cultivation test and traits of melon, we compared with 23 net melon species selling in domestic market, 11 net melons of Europe species, 12 no net melon species selling in domestic market and 2 no net melons of Europe species, respectively. As a result, some different among melon species selling in domestic market were showed in plant type, hair of young fruit, pericarp color, flesh color, ripening time, net density, and cork formation. But, melon species cultivated in Europe have not difference.

Plant type of watermelon of oval type was not significant different except that leaf has some difference in lobation size, lobation degree and color. However, yellow skin watermelon of oval type was clearly distinguished because of yellow color of leaf and stem. The shape of watermelon is divided into oval type and circle type. The size of fruits has been variously improving small, medium, and large fruit. The tropical type was different in appearance such as fruit shape, ground color, and tiger skin pattern when compared with species selling in domestic market. Although flesh color is scarlet generally, at present yellow color is developing.

CONTENTS

Unit 1. Research Overview.....	18
Chapter 1. Objectives	18
Chapter 2. Research necessities.....	8
Chapter 3. Research organization and contents.....	23
Unit 2. Current Status on Technical Advances.....	24
Chapter 1. Overseas researches.....	24
Chapter 2. Domestic researches.....	25
Unit 3. Development of Molecular Markers and DNA Fingerprinting for Melons.....	28
Chapter 1. World market classes of melon.....	28
1. Origin and grouping of Cucurbitaceae	
2. Nomenclature of melon cultivar group	
3. Grouping of melon	
Chapter 2. Development of molecular markers and DNA fingerprinting of melon.....	33
1. Introduction	
2. Materials and methods	
3. Development and selection of markers	
4. Genetic analysis of melons	
5. Marker set for DNA fingerprinting	
6. Genotype–phenotype relationships	
Chapter 3. Development of molecular markers for hybrid purity.....	47
1. Selection of molecular markers	
2. Practical application	
3. Inheritance of markers	
Chapter 4. Specification of molecular markers.....	60
1. Introduction	
2. Methodology	

3. Results and discussion	
Unit 4. Development of Molecular Markers and DNA Fingerprinting for Watermelons	5
Chapter 1. Variety identification of watermelon using DNA markers	5
1. Introduction	
2. Materials and Methods	
3. Results and Discussion	
Chapter 2. Assessment of seed purity and inheritance mode of SSR markers in F ₁ seed and F ₂ population of watermelon varieties	8
1. Introduction	
2. Materials and methods	
3. Results and discussion	
Unit 5. Development of New Markers in Watermelons	9
1. Plant materials	
2. DNA isolation	
3. Development of gene-specific STS and STS-PCR-derived SNP markers	
4. Development of URP-derived SNP markers	
5. Development of SNP-CAPS markers	
6. Development of SSR markers	
1) Construction of SSR-enriched library	
2) Development of SSR primers using SSR-enriched library	
7. Databank construction for genotyping of watermelon and melon	
Unit 6. Growing Tests: Melons and Watermelons	124
Chapter 1. Growing tests: melons	124
Chapter 2. Growing tests: watermelons	126
Chapter 3. Growing trials for F ₁ seeds hybrid purity	128

Unit 7. Accomplishment and Contribution to the Related Research Fields.....	11
Unit 8. Application Plans of The Results.....	12
Unit 9. Overseas Information Collected During The Research.....	14
Unit 10. References.....	16

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	7
CONTENTS	12
목 차	15
제 1 장 연구개발과제의 개요	18
제 1 절 연구개발의 목적	18
제 2 절 연구개발의 필요성	18
1. 분자생물학 기술을 이용한 국가 품종보호 모델의 개발	18
2. 분자유종 기반 기술	19
3. 순도검정 마커의 개발	20
4. 경제·산업적 관점	20
제 3 절 과제의 구성 및 내용	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 1 절 국외 연구현황	24
제 2 절 국내 연구현황	25
제 3 장 멜론의 품종지문화 연구 및 순도검정 마커 개발	26
제 1 절 세계 유통품종으로 본 멜론의 계통분류	26
1. 박과작물의 기원과 분류	26
2. 멜론의 명명법과 분류체계	27
3. 멜론의 계통분류	28
제 2 절 멜론 분자표지의 선발 및 품종 지문화	31
1. 서론	31
2. 재료 및 방법	32

3. 마커의 선발 결과	34
4. 공시품종 집단의 유전적 유연관계 분석	36
5. DNA 지문화 분자표지 세트의 선정	42
6. 표현형 연관도 검정	45
제 3 절 순도검정 분자표지의 개발	47
1. 순도검정 분자표지 개발	48
2. 분자표지를 이용한 순도검정: 실용성 평가	48
3. 순도검정 마커의 F2 세대 유전양상 검정	48
제 4 절 분자표지의 특이화	50
1. 서론	50
2. 연구 방법	51
3. 결과 및 고찰	53
제 4 장 수박 품종지문화 연구 및 순도검정 마커 개발	58
제 1 절 DNA 기법을 이용한 수박의 품종 식별	58
1. 서 론	58
2. 재료 및 방법	59
3. 결과 및 고찰	62
제 2 절 수박 F1 종자 순도검정 이용과 유전분석	82
1. 서언	82
2. 재료 및 방법	83
3. 결과 및 고찰	84
제 5 장 수박 유래 고유 마커의 개발과 활용	90
제 1 절 수박 연구재료의 선정	90
제 2 절 수박 genomic DNA 추출	91
제 3 절 유전자 특이적 STS 표식인자 개발 및 STS-PCR 유래 SNP 표식인자 개발	91
제 4 절 URP 유래 SNP 표식인자 개발	105
제 5 절 SNP 유래 CAPS 표식인자 개발	107
제 6 절 SSR 표식인자 개발	110

1. SSR-enriched library 제작.....	110
2. SSR primer 제작.....	111
제 7 절 수박과 멜론 품종구분을 위한 표식인자은행 모형 구축.....	122
제 6 장 멜론, 수박의 재배시험 특성조사 및 포장 순도검정.....	123
제 1 절 멜론 재배시험 특성조사	123
1. 재료 및 방법.....	123
2. 멜론의 형태적 특성조사 결과.....	123
제 2 절 수박 재배시험 특성조사	125
1. 재료 및 방법.....	125
2. 수박의 형태적 특성조사 결과.....	125
제3절 수박·멜론의 순도검정 재배시험.....	127
1. 재료 및 방법.....	127
2. 수박 및 멜론의 포장 순도검정 결과.....	128
□ 별첨자료 1: 멜론 특성조사표.....	129
□ 별첨자료 2: 수박 특성조사표.....	134
제 7 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도.....	140
제 8 장 연구개발 결과의 활용계획.....	141
제 9 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보.....	143
제 10 장 참 고 문 헌.....	145

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 과제에서는 우리나라 과채류 작물 중 육종 경쟁력과 시장성 그리고 미래 잠재가치 측면에서 가장 중요하다고 판단되는 박과류 작물, 그 중에서도 수박과 멜론에 대하여 국내에서 육성된 주요 유통품종(elite breeding line)을 대상으로 우선 DNA 분자마커 수준에서 구별성 확보가 가능한 품종식별 마커를 다수 확보하고, 이를 바탕으로 품종간 유전적 유연관계 설정, 형태적 특성과 상관관계 분석, 마커를 이용한 품종 지문화 및 이를 통한 품종식별 체계 개발, 그리고 순도검정 마커의 개발을 목적으로 본 과제를 수행하였다.

본 연구과제는 그 연장선상에서 국내 주요 유통품종의 분자유전학적 기초연구를 통하여 국가 차원의 DNA 마커를 활용한 품종보호 적용 모델 설정과 이를 바탕으로 한 관련분야 분자유종 지원 등 마커의 실용화 연구를 진행하고자 하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 우선 변이의 폭이 적어서 기존의 품종 분류에 주로 사용되던 형태학적 형질, 동위효소 변위 등과 같은 인자뿐만 아니라, 분자표지 인자를 적용하여 구분하는 것에도 어려움이 많았던 고소득 작물인 수박에서 품종식별에 효과적인 분자표지 인자들을 새로이 개발하고자 하였다.

그리고 수박과 멜론에서 개발된 분자표지 인자들을 이용하여 품종간 최소거리가 매우 짧은 이들 작물의 유통 품종들의 다형성 판정을 가능하게 하려는 목적과 품종 특이적인 분자표지 인자를 개발·확보하고 이 정보들을 축적 D/B화하여 금후 관련 분야 및 분자유종의 기초 연구로 삼고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 분자생물학 기술을 이용한 국가 품종보호 모델의 개발

품종을 정의함에 있어 기본이 되는 구별성(distinctness), 균일성(uniformity), 안정성

(stability) 검정은 전통적으로 표현형 차원에서 수행되어지는 형태적 형질에 관한 특성검정을 위주로 진행되어져 왔다 (UPOV, 1994). 최근 국제식물신품종보호연맹 (UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants)에서도 DNA 마커를 신 품종의 특성조사와 식물 신품종보호권 부여에 활용하기 위한 논의를 진행 중이다 (UPOV, 2001). 분자생물학적 특성 기술은 환경, 작물의 성장단계, 재배방법 등의 영향을 받지 않을 뿐만 아니라 객관적이고 재현성 또한 높다는 장점이 있다. DNA 분석방법에는 RAPD, AFLP, SSR, 그리고 SNP 등 다양한 방법이 제시되고 있으나, 품종간 다형성 정도, 분석의 재현성, 염색체상의 분포 정도, 마커의 유전양상 등을 고려할 때 SSR과 SNP 방법이 분자유전학적인 측면에서 가장 효율적인 방법으로 알려져 있다. 실제로 UPOV 산하 생화학 분자생물학 실무작업반(BMT) 회의에서도 이 두 가지 마커의 이용을 제안하고 있다.

품종보호 분야에서 분자생물학적 기술의 활용에 있어서 UPOV에서는 아직까지 유전자 수준에서 단순한 염기서열 차이를 품종의 구별성으로 인정하고 있지는 않고 있으나, 기존 품종의 관리를 위한 집단유전학적인 접근 그리고 표현형과 연관된 marker의 이용 등에 대하여 그 활용 가능성을 제안하고 있다. 또한 UPOV 내에서 품종식별(판별)에 분자표지인자의 활용에 대한 연구가 장미, 포도 등의 작물에 대하여 보고되고 있는 가운데, 이러한 연구결과를 품종보호 침해나 분쟁의 조정수단으로 활용할 수 있도록 하는 방안들이 국제종자연맹 (ISF)과 국제무성생식관상작물육종가연합회(CIOPORA) 등을 중심으로 강력하게 제기되고 있다 (BMT/10/19, 2006).

본 연구과제는 그 연장선상에서 국내에서 경제적 가치가 인정되는 박과류 작물 중 수박과 멜론에 대하여 주요 유통품종의 분자유전학적 기초연구를 통하여 국가 차원의 DNA 마커를 활용한 품종보호 적용 모델 설정과 이를 바탕으로 한 마커의 실용화 연구에 대하여 체계적 접근을 하고자 하였다.

2. 분자유전학의 기반 기술

분자표지인자는 유전자원의 특성 평가, 유전자 지도 작성, 양적형질 유전자 좌의 분석 등 다양한 분야에 활용되고 있으며, 분자유전학 분야에서 고전 육종에 있어 다른 기술보다 실용적 활용 가능성이 높은 분야로 평가받고 있다. 그 동안 우리나라 경우는 식량작물 위주의 마커 개발과 적용에 관한 연구가 주류를 이룬 가운데, 채소 작물의 분자마커의 개발과 적용에 관한 연구는 많지 않았으나, 최근 분자유전학을 지원하는 국가 프로그램의 진행으로 배추 고추 등 주요 채소작

물에 대한 대형 연구과제들이 진행 중이다. 그러나 여전히 박과작물에 대한 국내 연구는 현장에서 실용적으로 이용하기에는 분자유전학적인 기초 자료가 매우 부족한 실정이다. 특히 멜론의 경우 박과류 중 오이와 함께 *Cucumis* 속에서 세계적으로 매우 중요한 과채류 작물임에도 불구하고 우리나라에서는 소비와 경제적 가치가 크지 못하여 연구에서 주목받지 못하고 있는 실정이다. 또한 수박은 재배와 생리, 유통, 가공, 품종육성 등에 대한 기초 연구와 함께 최근 생명공학 분야 연구로서는 형질전환 작물의 개발에 집중되고 있으나, 분자유전학적인 분야에서 국내 연구는 극히 빈약한 실정으로 이에 대한 체계적인 연구가 필요한 실정이다.

3. 순도검정 마커의 개발

멜론은 양전화로서 채종시 수술을 제거해야하는 어려움과 이 작업은 암꽃의 생육상황에 따라 화분의 발아로 자식종자의 우려가 매우 크기 때문에 생산을 위한 고도의 기술을 요구하고 있다. 그러므로 생산된 종자는 반드시 순도 검정을 해야 하지만 포장순도검정을 하는 것은 시간과 비용이 많이 들어 어려움이 많이 있다. 마커를 이용한 순도검정이 이루어 진다면 생산시기와 안정성을 가질 수 있어 비용을 줄일 수 있다.

수박의 경우는 단성화이므로 제웅을 하지 않고 채종을 하지만 교배기의 환경에 따라 양전화가 발생하여 자식주가 나타날 수 있다. 현재 판매되고 있는 수박의 경우 국내보다는 주로 외국에서 생산되어 많은 양이 수입되고 있으며 생산의 안정성이 불안한 실정이어서 이를 위한 순도검정이 반드시 필요하다. 수박의 경우에도 포장 순도검정을 하기 위해서는 오랜 재배기간과 많은 면적이 필요로 하므로 그 만큼 비용이 증가하기 때문에 마커를 이용한 순도검정은 많은 비용과 시간을 절약할 수 있다.

4. 경제·산업적 관점

이러한 국제적인 환경변화에 적극 대처하면서 우리나라에서 과채류 중에서 경제적 가치가 가장 높은 수박과 멜론을 선정하여 품종식별 방법 개발과 F1 순도 검정 방법의 제시 등에 대한 일련의 연구를 수행하였다. 수박과 멜론은 상추, 토마토와 함께 생산과 소비 측면에서 세계적으로 가장 비중 있는 채소 작물로서 인정되고 있으며, 공히 박과류(the family Cucurbitaceae) 작물에 속한다. 그에 따라 세계적으로 수많은 F₁ 품종들이 개발되어 있으며,

지역과 소비 선호도에 따라 다양한 계통의 품종들이 재배되고 있다. 그럼에도 전 세계적인 육종의 병목현상으로 분자유전학적인 측면에서는 품종 및 계통 간 변이의 폭이 매우 적어서 기존의 표지인자뿐만 아니라 핵산 표지인자를 적용하여 구분하는 데에도 어려움이 많았다. 따라서 효과적인 분자표지 인자의 개발과 이를 이용한 품종의 가계 정보에 관한 기초연구가 필요한 상황이라고 할 수 있다. 이러한 연구결과는 금후 종자 분쟁 시 품종의 진위성 확인뿐만 아니라 박과류 작물의 분자유육종에도 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

수박은 국내외적으로 매우 중요한 작물로서 우리나라 전체 생산액 기준 시장 규모로 보아 약 8,300억 수준(2006년)으로 과채류 작물 중에서 가장 높은 시장 가치를 가지고 있으며, 채소류 작물 중에서도 고추 다음으로 큰 경제적 가치를 가진 작물이다 (Table 1-1). 특히 수박은 최근 심장질환 예방과 항암효과가 탁월한 것으로 알려진 항산화물질로 가장 각광 받고 있는 lycopene을 토마토보다 60%나 더 많이 가지고 있음이 알려져 그 수요가 우리나라에서 뿐만 아니라 전 세계적으로 증대되고 있는 상황이다. 세계적으로는 전체 채소 재배 면적 중 약 6.8%를 차지하는 것으로 알려져 있다 (FAO, 2002). 이 작물에 대한 육종 여건은 우리나라가 비교적 우수하여 세계적으로도 경쟁력을 갖는 편이나, 역시 타 채소작물과 마찬가지로 신품종에 대한 품종보호 측면에서는 매우 짧은 역사를 가지고 있다. 그 결과 최근 유통품종의 품종간 최소거리가 극히 좁아지는 한 요인이 되었으며, 우수한 형질을 갖는 신품종들에 대한 시장의 평가가 정당하게 이루어지고 있지 못한 실정으로, 이 작물에 대한 기본적인 분자유전학적인 연구와 나아가 육종가 권리보호를 극대화 하는 방향으로 분자마커 수준에서 품종간 최소거리 설정 및 효과적인 품종식별 체계의 개발이 절실히 요청되고 있다.

Table 1-1. 수박, 멜론의 연도별 재배 및 생산 현황*

연도	수박			(단위: ha, kg, 백만 원) 멜론		
	면적	생산량	생산액 ^a	면적	생산량	생산액
2001	28,451	948,953	617,621	792	23,068	67,151
2002	25,873	839,644	573,241	896	25,625	45,408
2003	23,508	783,263	541,622	1,082	31,027	50,562
2004	21,654	823,672	820,045	1,303	39,037	54,308
2005	23,179	904,895	891,973	1,235	35,592	27,434
2006	20,553	778,374	829,424	1,410	40,893	43,885

*농림통계연보 2007, 농림수산물부

^a노지재배 + 시설재배

우리나라에서 **멜론**의 재배역사는 오래되지 않았고 초기에 멜론이 도입되어 재배되기 시작한 것도 대부분 일본에서 수입된 것을 재배하였다. 국내 종자회사에서 육성된 종자가 농가에 공급되기 시작 한 것은 불과 십여 년이 조금 넘었으나 최근에는 대부분의 종자가 국내 종자회사에서 육성된 품종이 차지하고 있다. 이것은 국내종자회사에서 멜론 육종에 대한 많은 관심과 투자가 이루어진 결과로 보여 진다. 우리나라에서는 전통적으로 같은 *Cucumis melo* 종인 참외에 소비가 집중되고 있지만, 멜론은 전 세계적인 규모에서 보면 토마토와 함께 과채류 중에서 가장 큰 시장을 이루고 있다. 2006년도 수출량은 310만불(1,018톤)로 원예 생산물 가운데 파프리카(4,570 만불), 딸기(590 만불)와 토마토(580 만불)와 함께 4대 수출 작목으로, 수박(17.3만불)과 오이(250만불) 보다 많은 수출실적을 기록하였다 (Table 1-2). 따라서 멜론은 가까운 일본에 큰 수출시장을 배경으로, 우리나라 특산종이라 할 수 있는 참외의 국내 육종경쟁력을 살려 품종의 지평을 넓히고 세계화를 지향할 수 있는 작물로서 주목된다. 국내에서도 최근 이 작물에 대한 생산과 소비에 있어 괄목할 만한 성장이 이루어지고 있는 것이 사실이다 (표 1). 이는 과거와 달리 생산자 단체의 규모화와 재배기술의 평균화가 이루어지면서 가격 측면에서도 경쟁력을 갖게 되었고, 대형 도매시장 형태로 유통과 소비가 집중되면서, 또 고급 농산물에 대한 인식의 변화에 수반되어 소비자의 지불의지가 확인되고 있는 등 생산과 소비 환경의 변화와 관련된다. 결론적으로 멜론은 국내외적으로 성장 잠재력이 큰 작물로서 이 분야에 대한 분자유전학적인 연구 역량을 집중할 필요가 있다.

Table 1-2. 멜론 연도별 수출 동향

(단위: M/T, 천\$)

연도	물량	금액	주요 수출국
2000	355	931	일본
2001	500	1,007	일본
2002	556	1,129	일본
2003	726	2,175	일본, 홍콩, 괌, 중국
2004	1,425	4,598	일본, 대만, 홍콩
2005	1,703	4,599	일본, 대만, 홍콩, 말레이시아
2006	1,018	3,083	홍콩, 일본, 괌, 싸이판

*농림축수산물 수출입 통계(농림수산물식품부),

제 3 절 과제의 구성 및 내용

본 과제는 2개 세부과제와 2개 협동과제로 이루어져 있으며, 박과작물인 수박과 멜론을 대상으로 과제를 수행하였다. 제 1, 2 세부과제는 각각 멜론과 수박의 ‘품종지문화 연구 및 F1 순도 검정용 마커 개발’로서 기 개발된 분자표지와 제 1 협동과제에서 개발된 수박 분자표지인자를 대상으로 우리나라 유통 품종을 중심으로 한 공시품종에 대하여 분자표지 이용체계를 구축하였다. 제 1 협동과제에서는 수박에 대한 SSR 마커 등 분자표지 개발을 수행하였으며, 제 2 세부과제에 그 결과를 제공하여 공시품종 검정에 활용할 수 있도록 하였다. 제 2 협동과제에서는 멜론과 수박의 형태적 특성조사와 순도검정에 대하여 포장시험을 수행하였다. 조사된 멜론과 수박 형태적 특성 조사결과를 활용하여 국내 유통품종 식별 체계를 구축하였다. 그리고 제 2 협동과제에서 분양받은 멜론과 수박의 F1 품종 양친과 F1 식물체를 이용하여 분자표지를 이용한 F1 종자의 순도 검정체계 확립에 활용하였다.

본 연구개발 과제에서는 식물 신품종 심사와 품종보호 분야에서 활용이 가능하도록 하는 기술적 기반을 확립하고 아울러 기본적으로 작물의 분자유종 분야에서도 활용이 가능한 분자표지 인자를 개발하는 것을 연구의 내용 및 범위로 설정하였다. 과채류 중 수박과 멜론을 연구재료로 선정하였고, 핵산 표식인자 개발 방법 중 정확도면에서 뛰어난 방법으로 알려져 있는 simple sequence repeats (SSR)과 gene-specific marker 기법을 적용하여 그 효율성을 검정하고, 이 방법들을 통하여 개발된 표지인자들을 안정적으로 사용할 수 있는 최적의 조건과 분석체계를 확립하려 한다. 본 연구과제에서 개발되어 확보된 분자표지 인자들은 종내 및 종간 품종간의 변이 추정 및 수박과 멜론의 유전적 다양성의 측정과 F₁ 종자 선별 및 품종변이 판정 등에 사용될 수 있도록 하였다. 그리고 본 연구과제의 결과물들을 모두 가시화, 계량화하여 공개함으로써, 연구자와 농업관련 종사자들이 연구에 의하여 개발된 정보를 쉽게 접할 수 있도록 하고, 차후 계속 개발되어질 분자표지 인자들의 체계적인 데이터뱅크 구축의 원형을 제시하는 것이 본 연구과제에서 설정한 연구범위이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 연구현황

멜론, 수박을 비롯한 박과류 작물에 대한 SSR을 비롯한 RFLP, AFLP, RAPD 등 다양한 마커가 개발되었고 이를 이용한 분자유전학적 연구가 이루어져 왔다 (Ritschel et al., 2004; Che et al., 2003; Danin-Poleg et al., 2001; Jarret et al, 1997). 두 작물 모두 다양한 집단에서 여러 가지 마커를 사용한 분자유전자 연관지도가 만들어진 상태다 (Silverstein et al., 2003; Hashizume et al., 2003; Perin et al., 2002; Levi et al., 2001; Oliver et al., 2001). 또한 최근에 유럽의 품종보호 기관을 중심으로 오이 (Bernet 등, 2003), 밀과 토마토 (Cooke 등, 2003), 유채 (Tommasini 등, 2003), 고추 (Lefebvre 등, 2001), 밀 (Law 등, 1998), 보리 (Schut 등, 1997) 등 국가별 주요 관심 작물에 대하여 다양한 DNA 마커를 품종의 구별성 및 안정성 검정과 품종보호 분야에 적용한 결과들이 발표된 바 있다.

수박의 경우 다른 작물에 비해 분자표지에 대한 유전적 다형성이 아주 낮게 나타나는 작물로 알려져 있어 이를 실제적으로 적용하기 상당히 어려운 것으로 알려져 왔다. 최근 분자 마커의 개발에 대한 기술이 발달하면서 RAPD, AFLP, SSR 등과 같은 기법을 수박의 유전자 분석에 이용한 예가 미국, 중국, 스페인 등의 국가에서 보고되고 있다. 미국에서는 2000년부터 Levi 등이 RAPD, ISSR(Inter-simple sequence repeat) marker를 이용하여 수박 재조합 자식성 집단과 F2 집단을 이용하여 유전자 지도 작성과 유전자원 특성 평가에 활용한 예가 알려져 있고 최근에는 이들 마커를 이용하여 유전적으로 가까운 수박 24품종의 식별에 활용한 바 있으며 중국에서도 2003년에 AFLP 분석 기법을 활용하여 수박 유전자원의 특성 평가에 활용한 바 있다. 그러나 수박에 대한 SSR marker 개발에 대한 연구는 미국과 스페인에서 단지 64개만이 개발되어 그 정보가 공개되고 있는 실정이다.

최근 UPOV내 BMT에서는 분자표지 기술의 이용에 관한 내용을 정리하여 BMT Guideline 초안을 작성 중에 있는데, 제 9차 UPOV/BMT 회의(미국, 2005. 6.)에서는 품종보호 및 품종식별에 여러 종류의 분자 마커중에서 SSR, SNP, STS/CAPS marker의 이용을 제안하고 있다.

분자표지를 활용한 F1 순도 검정 방법 개발의 경우 벼의 1대 잡종 분석에 SSR marker의 활용에 대한 연구가 인도에서 보고된 바 있으며, 최근에는 인도와 중국에서 목화와 양배추에 대한 F1 순도

검정을 분자표지 수준에서 분석함과 동시에 형태적 특성과 상호 비교하였을 때 그 일치도가 높게 나타나 실용적 이용이 가능함을 보고하였다. 그러나 분자표지에 의한 수박의 F1 순도검정 방법의 경우 양친간에 유전적 거리가 가까울 뿐만 아니라 이용 가능한 분석 마커의 수가 적기 때문에 이에 대한 실용화 연구는 아직 충분하지 못한 상태라고 할 수 있다.

제 2 절 국내 연구현황

처음 일본에서 멜론이 도입된 이후 국내 육성된 멜론 종자가 농가에 공급되기 시작 한 것은 불과 십여 년이 조금 넘었으나, 최근에는 대부분의 종자가 국내 종자회사에서 육성된 품종이 차지하고 있다. 이것은 국내종자회사에서 멜론 육종에 대한 많은 관심과 투자가 이루어진 결과로 보여 진다.

수박에 대한 기초 연구는 재배와 생리, 유통, 가공, 품종육성과 함께 최근 생명공학 분야 연구로서는 형질전환 작물의 개발에 집중되고 있다. 그러나 분자유전학적인 분야에서 국내 연구는 극히 빈약한 실정이며, 최근 농림기술과제로 이루어진 핵산표식 인자의 활용 연구가 유일한 것으로 보여 진다. 본 협동연구책임자의 홈페이지 (<http://biotech.korea.ac.kr/member/jsshin>)에는 그간 국내에서 독보적으로 진행되어져 온 수박과 호박의 핵산 표식인자의 개발과 활용에 관한 결과가 DB로 구축되어 공개되어 있다 (수박 EST 693개, 수박 품종 구분용 DNA 표식인자 123개, 호박 품종 구분용 DNA 표식인자 48개 자체 개발하여 보유).

우리나라 경우 농촌진흥청과 농산물품질관리원에서 벼 품종식별 마커의 개발이 이루어져 이를 종자순도 및 원산지 관리에 활용하고 있으며, 최근 국립종자원에서 고추, 토마토, 무, 배추 등의 작물에 품종 식별 체계 확립에 주력하고 있다. 수박의 경우는 1996년에 고려대학교에서 RAPD 분석법을 이용하여 유전자원의 특성 평가에 활용한 바 있고, 최근에 농우바이오에서 SSR, SCAR, CAPS marker를 28개를 조합하여 우리나라 유통품종 26품종에 대한 식별 방법을 개발한 바 있으며 (Lee et al. 2007), 국립종자원에서도 박과작물에서 유래된 SSR marker를 이용하여 수박 유통품종 및 유전자원에 활용하여 유전적 유연관계를 분석하여 보고한 바 있다 (Kwon et al. 2007). 그러나 분자표지인자에 의한 국내 수박 유통품종의 식별 및 F1 순도검정 체계 구축은 상당히 어렵다는 것이 연구자들의 공통된 견해이다.

제 3 장 멜론의 품종지문화 연구 및 순도검정 마커 개발

제 1절 세계 유통품종으로 본 멜론의 계통분류

1. 박과작물의 기원과 분류

박과작물은 아프리카 대륙에 기원을 두고 있으며 중근동지방(the Fertile Crescent)을 거쳐 아시아 지역에 전래되어졌을 것으로 추정되고 있다. 박과작물 (the family Cucurbitaceae)에는 수박(*Citrus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai)과 호박 (*Cucurbita* spp.), 오이 (*Cucumis sativus* L.), 멜론(*Cucumis melo* L.) 등 경제적으로 중요한 작물들뿐만 아니라 박(*Lagenaria siceraria* L.; bottle gourd), 여주(*Momordica charantia* L.; bitter gourd 또는 bitter melon)와 동아(*Benincasa hispida* L.; wax gourd), 수세미(*Luffa cylindrica* L.; loofha) 등이 박과에서 알려진 작물들이다. 박과작물은 전 세계적으로도 매우 중요한 작물로서 전체 채소작물 중에서도 토마토 다음으로 가장 많은 재배면적을 갖는 것으로 알려져 있다 (www.fao.org). 박과는 크게 Zanonioideae와 Cucurbitoidae 등 2개의 아과 (subfamily)로 나누어지며, 그 속에 119 속 약 825 종 식물을 포함 한다 (http://www.cucurbit.org/family.html). 2개의 아과는 화기 구조의 차이에 따라 분류된다. Zanonioideae는 여러 개 (보통 2 ~ 3개)의 화주를 가지고 있으며, 1 족(tribe) 18 속의 약 80여 종 식물을 포함한다. Cucurbitoidae는 꽃 속에 한 개의 화주를 가지고 있으며, 7 족 (tribe) 100 속 약 745 종의 식물로 이루어져 있으며, 대부분의 재배종 작물은 여기에 속한다.

Cucumis 속은 다시 *Cucumis* ($2n=2x=24$)와 *Melo* ($2n=2x=14$)의 2개 아속으로 나뉘며, 상호 교배가 불가능한 5개 종 집단으로 되어 있다 (Jeffery 1980). *Cucumis* 아속에는 대표적으로 작물인 오이 (*C. sativus* L.)와 오이의 원형 식물로 인정되어지는 *C. hystrix* Charkr. ($2n=2x=24$) 등이 포함된다. 특히 *C. hystrix* Charkr.는 중국 남부 운남성에서만 발견되는 특산 식물로 오이와 형태적 유사성에도 불구하고 염색체 수가 달라 발견 당시 분류 상 *Melo* 아속 식물과 유연관계가 있는 것으로 혼란이 있었지만, 지금은 일반적으로 *Cucumis* 아속에서 오이의 야생 조상식물인 것으로 학계에서 인정되고 있다 (Chung et al., 2006). 멜론 (*C. melo* L.)이 속한 *Melo* 아속은 다시 자방의 모용의 길이에 따라 길이가 짧은 *C. melo* L. subsp. *agrestis* (Naudin) Pangalo와 모용의 길이가 긴 *C. melo* L. subsp. *melo* 등 2개의 아종으로 나뉜다 (Jeffery 1980). 그러나 구체적인 아종의 구분과 종별 명명은 학자에 따라

이견을 보이고 있어 박과작물에서 가장 중요한 *C. melo* L. 종의 분류와 연구에 있어서 혼란을 초래하는 원인이 되고 있다.

2. 멜론의 명명법과 분류체계

멜론이 분류체계상 난맥상을 보이는 것은 무엇보다 형태적 지리적 분포의 다양성에서 큰 원인을 찾을 수 있다. 우리나라와 일본 중국 인도를 비롯한 아시아 전역과 유럽은 물론이고 태평양제도과 남미·북미, 오스트레일리아 등 거의 세계 전 대륙에 걸쳐 멜론이 재배되거나 관련 야생종들이 발견되는 등 지리적 분포와 기원이 다양한 종들이 알려져 있으며 (Kerje와 Grum, 2000), 다시 각 권역별로 재래종과 도입종, 교배종 품종들이 혼재되어 있는 상황이다. 또한, 타식성 작물로서 자연 상태에서 혼종의 가능성이 높을 뿐만 아니라, 종 및 아종간 중간형 변종들이 등장함으로써 형태적으로도 매우 다양한 변이를 보이고 있다. 그리고 생물학적 명명법(botanical nomenclature)과 육종가들이 선호하는 품종 계통 명칭(cultivar group), 유통 중에 시장에서 사용되는 명칭(market type)이 혼용되는 것도 품종 정의에 복잡한 양상을 더하는 요인의 하나가 되고 있다. 이와 관련하여, 오랜 기간 동안 연구자들은 잎과 줄기, 꽃과 과실 등 형태적 다양성과 생리·생태적 특성을 기준으로 이 식물 집단의 다양한 변이를 반영하는 분류 체계를 만들기 위하여 노력하여 왔으며, 최근까지 여러 가지 분류 기준과 명칭이 제시되었다 (Pitrat et al., 2000). 그러나 우리나라에서 오랫동안 사용되고 있는 *C. melo* 작물의 분류체계는 이 분야의 최근 논의동향을 실질적으로 반영하고 있지 못하며, 국내 육종가와 연구자들 사이에서도 이 점에 있어 단순히 관행을 반복하고 있는 실정이다.

앞서 언급한 바와 같이, 멜론을 subsp. *agrestis*와 subsp. *melo* 등 2개의 아종으로 분류하는 것은 Jeffery (1980)가 당초에 제안 한 바 분류의 유용성에 근거하고 있다. 그러나 당초에 제안된 원칙과 같이 자방의 모용 특성에 따라 정확한 분류기준을 따르고 있는 지는 의문시 된다. 왜냐하면 현행 주류를 이루고 있는 미국식 분류체계에서는 재배형태의 *C. melo* 작물종 전체를 subsp. *melo* 내에서 *Cantalupensis*, *Inodorus*, *Flexuosus*, *Conomon*, *Chito/Dudaim*, *Momordica*의 변종 또는 분류집단으로 인정하고 있지만, 이와 같은 집단 분류에는 자방의 모용을 길이에 대한 기준의 준수 여부가 애매한 부분이 있기 때문이다. 특히 우리나라 참외 등 Makuwa 계통 동양계 멜론은 일반적으로 서양계 멜론과 달리 모용의 길이가 짧은 것으로 알려져 있다.

이와 같이 미국식 분류체계에서는 아프리카와 함께 종 다양성의 2대 중심이 되는 아시아 지역의 품종에 대한 특성이 제대로 반영되지 않았으며(Pitrat et al., 2000; Munger와 Robinson, 1991), 이

는 지구상에 분포하는 재배종, 야생종 등 이 종 전체에 대한 올바른 이해에 도움이 되지 못함이 분명하다. 이와 같은 모순이 인정되면서, 앞서 살펴본 바와 같이 Pitrat et al. (2000)은 자방의 털 길이에 따라 *C. melo*를 두 아종 subsp. *melo*/subsp. *agrestis*로 분리하고, 그 하위에서 다수의 품종으로 분류를 시도하였다. Pitrat 방식은 형태적·지역적 분포 차이를 반영한 아종 구분의 유용성을 인정한 결과로서, 두 아종 내에서 각각 5품종과 11품종 등 총 16품종으로 분류하였고, 동시에 동양계 품종의 다양성을 가장 잘 반영하고 있는 유럽식 분류체계라고 말할 수 있다. 이와 같은 아종 구분(subspecies 내에서의 이분 구조)은 분자유전학적으로도 매우 타당하다는 사실이 최근 SSR 마커에 의한 품종 다형성 연구에서도 밝혀진 바가 있으며 (Monforte et al., 2003), 더욱이 *makuwa*, *reticulatus* 등 현행 우리나라 방식과 유사한 분류 기준이 나와 있어, 세계적 기준으로 보아 우리와 같이 지역적으로 유전적 격리가 심한 입장에서는 멜론의 분류체계에 매우 유용한 기준을 제시해 주고 있다 (Yi et al., 2004).

3. 멜론의 계통분류

앞서 살펴본 바와 같이 멜론은 전 세계적으로 과피색과 과형, 크기, 과육색과 당도 등 표현형적인 변이가 매우 클 뿐만 아니라, 세계적으로 지역 특산종인 많은 재래종들이 알려져 있다. 멜론의 계통분류는 작물의 재배목적이자 가식부인 과실의 특성에 근거하여 이루어지는데 주로 유통 단계 등 비 과학적인 차원에서 비전문가 집단에 의하여 이루어지는 분류이지만, 육종가들과 같이 전문가 집단에서도 시장과 눈높이를 맞추는 차원에서 유용하게 사용되어지는 분류체계이다. 아울러 다양한 품종 계통의 특성을 알고 있어야 하는 품종 지문화 등의 연구에서는 이에 대한 이해가 선행되어야만 표현형 특성과 유전자형 특성을 아울러 품종식별 등의 목적에 활용할 수 있다. 또한 우리나라 품종이 세계적인 품종집단 내에서 보여주는 유전적 거리나 위치가 어떻게 되는지에 대한 작업에서도 유통품종을 중심으로 한 이러한 작업이 필수적이다. 세계적으로 유통되는 멜론의 계통 분류는 정확한 과학적 기준을 근거로 이루어지는 작업이 아닌 만큼 명확하고 일관된 분류체계를 제시할 수는 없지만 일반적으로 다음과 같은 계통명과 특성들이 논의되어 지고 있다.

- Ananas type: 단타원형, 노란색 과피, 네트 발달, 골 없음, 백육
- Galia: 노란색 과피, 네트, 녹육/백육
- Cantaloupe (Western Shipper): 네트 발달, 황육

- Eastern Shipper: 골, 황육, 네트
- Athena type: Eastern shipper subgroup, 단타원형
- Charentais: 회록색 과피, 골, 황육
- Honeydew: no-net
- Jaune des Canaries types: 황피, 백육/녹육
- Piel de Sapo: 녹색 과피, 얼룩무늬, 백육, 중형과(0.5~1 kg), 원통형~장타원형
- Casaba type: 황색 주름진 과피
- Rochet type

우리나라 유통품종의 멜론은 일반적으로 다음과 같은 계통으로 구분된다.

- Net계
 - 얼스계: 회록색 과피, 녹황육, 네트가 굵고, 안정되며, 뚜렷하게 융기되어 조각품처럼 고
급스러운 느낌
 - 잡네트계: 회록색 과피, 녹황육, 네트 발현이 뚜렷하지 않거나, 가늘고 거칠다.
- No-net 계
 - 백피계 : 백피, 백육
 - 황피계 : 황피, 백육
 - 얼룩계 (과과야) : 얼룩무늬, 백육
- 금싸라기계 : 황피, 은색골, 백육, 소형과(< 500g), 원통형 또는 장타원형

Table 3-1은 유럽 계통을 중심으로 grouping 특성에 따른 계통별 특성표의 일부를 나타낸다.

제 2 절 멜론 분자표지의 선발 및 품종 지문화

1. 서론

멜론(*Cucumis melo* L.)은 상추, 토마토와 함께 세계 3대 채소 작물의 하나로 꼽힌다. 멜론은 형태적·지리적으로 특성과 분포가 매우 다양할 뿐만 아니라 전 세계적으로 재래종들이 분포할 만큼 재배 역사도 길다. 또한 멜론이 속한 박과류는 채소 작물 중에서 당분 함량이 가장 높은 작물로서 독보적인 위치를 점한다고 말할 수 있다. 이와 같은 멜론은 전 세계적으로 소비와 재배·생산이 이루어지는 중요한 채소작물로서 여러 품종 계통을 대상으로 개발된 많은 SSR 마커들이 알려져 있다 (Danin-Poleg et al., 2001; Fazio et al., 2002; Chiba et al., 2003; Ritschel et al., 2004; Gonzalo et al., 2005; Yi et al., 2006).

Microsatellite, 일명 simple sequence repeat (SSR) 마커는 작물의 종에 불문하고 population genetics, genotyping과 variety description에 있어서 그 실용성을 가장 인정받고 있는 마커 시스템의 하나이다 (Weising et al., 2005; Holton, 2001). 그러나, SSR 마커의 높은 실용성에도 불구하고, single locus microsatellite는 개발에 많은 비용과 시간을 요하는 것이 가장 큰 단점으로 꼽힌다 (Zane et al., 2002). 또한 SSR 마커의 중요한 특성 중의 하나는 유전적인 연관관계가 먼 종간일지라도 마커의 통용성(transferability)이 어느 정도 인정된다는 사실이다. 따라서 유전적인 연관관계가 있는 종속 간에는 기존에 개발된 마커들 중에서 적당한 마커를 선발하여(cross-species amplification) 이용하는 예가 많다 (Varshney et al., 2005a; Rossetto, 2001). 이와 같은 SSR 마커의 cross transferability는 comparative mapping을 통해서 (Varshney et al., 2005a; Varshney et al., 2005b) 또는 동일 종속 간 마커의 교차 선발을 통하여 여러 작물에서 증명된 바 있다 (Suwabe et al., 2002; Joobeur, et al., 2006; Kwon et al., 2007).

본 과제에서는 멜론의 SSR 마커를 선발함에 있어 멜론을 포함한 기존에 다른 박과류 작물에서 개발된 SSR 마커를 대상으로 cross amplification 방법을 적용하였다. 이와 같은 작물 또는 품종 간 마커의 교차 이용(cross amplification)에서 가장 중요한 점은 주어진 마커 세트가 새로운 작물의 대응 locus에서 증폭될 수 있는가 여부이다. 본 과제에서는 이와 같은 문제점 때문에 cross amplification 방법을 적용하여 마커를 도입함에 있어, 주어진 마커 DB 내에서 새로운 공시 품종 시스템에 대한 마커의 적용성 평가와 PCR 반응 조건의 최적화 등 추가적인 선발 과정을 수행하였다. 나아가 선발 효과를 극대화하기 위한 목적으로 특

이성이 떨어지는 분자표지, 이른바 ‘weak allele’에 대해서는 특별히 genome walking 법을 응용한 마커 특이화 과정을 통하여 이른바 다형성이 유망한 ‘weak allele’을 새로운 작물에서 ‘strong allele’로 재활용 할 수 방법론을 제시하였다.

2. 재료 및 방법

1) 공시품종 및 genomic DNA 분리

다양한 박과작물에서 개발된 SSR 마커의 1차 선발을 위한 공시품종은 참외,멜론 각 5품종 총 10 품종을 사용하였다. 참외 5 품종은 금보라, 슈퍼금싸라기, 금지계, 개구리, 가야꽃이며, 멜론 5 품종은 백화, 해피니스, 베스트, 올림픽, 슈퍼VIP (일부는 감천, 설향, VIP가 포함됨)를 사용하였다. 초기 선발에서 다형성을 보이는 마커를 전체 공시품종의 DNA 지문화에 사용하였다. 멜론 전체 공시품종은 48품종으로 Table 3-2와 같다. 1대잡종(F_1)의 순도검정을 위한 시료로는 협동연구기관인 농우바이오에서 제공한 발렌타인춘추, 얼스엑스포, 달마시안, 얼스원저, SKR×ETS6(교배라인 시교)를 사용하였다. 공시 품종은 종자를 파종하여 받아낸 유식물체 또는 성숙한 개체의 잎조직 등에서 시료를 채취하여 액체질소에 동결된 상태에서 마쇄 후 genomic DNA를 추출하였다 (NucleoSpin[®] Plant, Macherey Nagel).

2) 프라이머의 확보

본 세부과제 수행 과정에서는 새로운 마커를 개발하지 않고 멜론 등 기존에 이용 가능한 박과류 유래의 다양한 마커를 사용 국내 품종집단에 대한 적용성을 평가하여 선발하는 것으로 되어 있다 (cross-species amplification). 멜론은 다른 작물에 비하여 유럽과 미국, 일본을 중심으로 여러 연구집단에서 비교적 많은 수의 SSR 마커가 개발되어 공개되어 있다. 선발에 사용된 마커는 Table 3-3과 같다. Danin-Poleg et al. (2001)와 Fazio et al. (2004) 개발 분자표지는 선행연구 과정에서 일차 검정된 분자표지 집단으로서 여기서는 누락된 것들을 추가적으로 선발하였으며, Ritschel et al. (2004)와 Gonzalo et al. (2005) 마커 집단은 본 과제를 통하여 새로 확보되어 집중적으로 검정 선발하게 되었다. Yi et al.(2006) 등의 분자표지는 우리나라 재래종 참외에서 개발된 고유 마커로 선행연구 결과를 반영하여 선발한 내용이다.

3) 분자표지의 특이화

멜론에서 SSR 분자표지의 특이화는 이미 알려진 해당 분자표지의 프라이머를 바탕으로 genome walking 과정을 통하여 해당 유전자 좌 염기서열을 확보하고, 다시 얻어진 염기서열 정보를 바탕으로 프라이머를 재제작 또는 기존 프라이머 염기서열의 base pairing을 최적화함으로써 수행하였다. Genome walking은 Universal GenomeWalker Kit (BD Biosciences Clontech, CA, US)를 사용하여 수행하였다. 먼저 대상 분자표지의 프라이머 (GSP1 F, R)를 이용하여 분자표지 DNA 단편에 해당하는 amplicon을 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 얻어진 염기서열 정보를 바탕으로 2차 nested PCR 용 프라이머(GSP2 F, R)를 제작하였다. Kit를 사용하여 만들어진 adaptor(AP)-ligated semi-genomic library를 주형으로 GSP 및 AP 프라이머를 이용하여 1, 2차 PCR을 수행하였다. 2차 PCR 결과 얻어진 특이 DNA 밴드를 분리하여 염기서열 분석을 실시하였다. 이 과정을 분자표지 양 말단 바깥쪽 genomic DNA sequence에 대하여 각각 실시하고 얻어진 양단의 염기서열 정보를 바탕으로 해당 유전자 좌에 해당하는 전체 contig를 완성하였다. 최종적으로 해당 contig 클론을 바탕으로 분자표지 프라이머를 재 제작하거나 기존 프라이머 염기서열의 mismatch 부분을 확인하여 수정하였다.

4) PCR

PCR 반응은 genomic DNA (50 µg), 1 µl의 3'과 5'-primers (10 µM), 2 µl의 dNTPs (2.5 mM), 10 × PCR buffer (2.5 µl), *Taq* DNA polymerase에 멸균수를 첨가하고 25 µl로 용량을 맞추어 수행하였다. 표준조건에서 증폭반응 사이클은 94°C 2 분 처리 후, 94°C 30초, 55~60 °C 30초, 72°C 30초로 35 cycle을 수행 한 후, 최종적으로 72°C 3분간 반응시켰다. 일부 분자표지에 대해서는 사전에 최적 annealing 온도를 별도로 설정하고 이에 대하여 반응을 수행하였다. Yi et al. (2006)에서 선발 도입된 분자표지는 two-step 방식으로 94°C 25초, 72°C 1분에서 7 cycle 반응 후, 94°C 25 초, 67°C 1 분에서 30 cycle, 이후 67°C, 7 분으로 수행하였다. 반응 산물은 agarose gel에서 확인하고 특이 amplicon이 생성된 PCR 산물은 다시 polyacrylamide gel 분석을 통하여 공시 품종 내에서 다형성 형성여부를 검정하였다.

5) 젤분석 및 유연관계 분석

품종별 SSR 다형성 분석은 6% polyacrylamide gel (Big gel: 35 × 45 cm)에서 실시하였다. PCR 반응액을 98%의 formamide loading buffer를 혼합하여 95°C에서 180초 동안 denature 시킨 후 3µl씩 loading하여 60W에서 150분 전기영동 하였다. Gel 염색은 Silver

sequenceTM staining reagents (Promega)를 이용하였다. 염색된 gel에서 얻어진 품종별 다형성 패턴을 기초로 SSR 마커의 다형성 양상을 밴드 있음(1)과 없음(0)으로 수치화 하여 기초자료행렬 (data matrix)을 작성하였다. 이 자료를 근거로 SSR 마커의 PIC (Polymorphism Information Contents) = $1 - \sum P_{ij}^2$ 값을 산출하여 각 마커의 다양성 (genetic diversity) 정도를 조사하였다. 공시 품종의 유전적 유사도는 NTSYSpc 2.1 프로그램 (Rohlf, 2000)을 이용하여 Jaccard's coefficient [$a/(n-d)$, $m = a(+,+) + d(-, -)$, number of matches; $n = u+m$, total sample size]로 산출하였다. Phylogenetics 분석은 산출된 유전적 유사도 값을 기초로 비가중산술방식 (UPGMA: unweighted pair group method using arithmetic averages)으로 집괴분석하여 덴드로그램을 작성하였다.

3. 마커의 선발 결과

오이와 멜론 등 박과류 작물에서 유래한 SSR 마커 중에서 참외 멜론 각 5품종 선발 품종 집단에 대하여 특이 DNA 밴드를 확인함으로써 마커의 일차 선발을 수행하였다. DNA 밴드의 특이적인 증폭이 확인된 분자표지는 Big gel에서 일차 선발 공시품종 집단에 대한 품종별 다형성을 분석하였다. 전체 351개 박과류 유래 SSR 마커에 대하여 cross amplification 방법으로 다형성 선발을 실시한 결과 일차 선발에서 모두 153개의 마커에서 품종식별에 유용할 것으로 사료되는 다형성을 확인하였다 (Table 3-3). Ritschel et al. (2004)에서 유래된 CMBR100 외 117 SSR 마커 중 67개 마커에서 품종집단의 다형성이 확인되었으며, Gonzalo et al. (2005)에서 유래된 CMTCN01 외 57 SSR 마커 중 42개에 대하여 품종별 다형성 확인되었다. 추가로 마커 선발이 진행된 Danin-Poleg et al. (2001)의 11개 SSR 마커와 Fazio et al.(2004)의 29개 오이 유래 SSR 마커 중 참외, 멜론 공시 선발 품종에 대하여 다형성이 확인되어 선발된 분자표지는 없었다. 이를 포함하여 Chiba et al. (2003) 유래의 분자표지 등 선행연구 결과 다형성이 확인된 분자표지는 본 개발과제의 멜론 DNA 지문화에 포함하여 수행하였다.

일차 선발의 효율성은 Gonzalo et al. (2005) 분자표지 집단에서 73.7%로 가장 높은 것으로 나타났다. 다음은 Ritschel et al. (2004)의 분자표지 집단이 57.3%로 높은 편에 속했다. 그러나 Big gel 상에서 검정된 증폭 DNA 밴드의 품종별 특이성 또는 다형성 패턴의 유용성 등은 Ritschel et al. (2004)이 개발한 분자표지 집단에서 양호한 것으로 나타났다 (Table 3-3). 그 이유는 Ritschel et al. (2004)의 경우 분자표지가 유래된 라이브러리가 본 과제의

Table 3-2. Varieties of *C. melo* examined for DNA fingerprinting by SSR markers

Variety code	variety name	origin	type	<i>C. melo</i> var. ¹⁾
T1	올림픽	농우	Earl's	<i>reticulatus</i>
T2	슈퍼VIP	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T3	하모니	愛三(일본)	Earl's	<i>reticulatus</i>
T4	네띠앙-E	동부한농	Earl's	<i>reticulatus</i>
T5	로멘스	동부한농	Earl's	<i>reticulatus</i>
T6	에메랄드하계1호	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T7	로즈메리춘계1호	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T8	얼스크루즈 순주	사까다	Earl's	<i>reticulatus</i>
T9	얼스나이트 소순반수	사까다	Earl's	<i>reticulatus</i>
T10	얼스나이트 나즈No1	사까다	Earl's	<i>reticulatus</i>
T11	얼스 엘리트	신젠타	Earl's	<i>reticulatus</i>
T12	얼스 123	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T13	발렌타인 춘추	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T14	얼스원저	농우	Earl's	<i>reticulatus</i>
T15	얼스스고이	농우	Earl's	<i>reticulatus</i>
T16	엘도라도	농우	Earl's	<i>reticulatus</i>
T17	KMA-009	Takii	Galia	<i>reticulatus</i>
T18	KN-얼스 5	고농	Earl's	<i>reticulatus</i>
T19	얼스 폴딩킹	코레곤	Earl's	<i>reticulatus</i>
T20	대목 Ts-4144	Takii	Galia	<i>reticulatus</i>
T21	얼스타이탄 (SVR 15135063)	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T22	SVR 15145032	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T23	SVR 15124033	세미니스	Earl's	<i>reticulatus</i>
T24	NUM 3571	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T25	NUM 3574	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T26	NUM 5410	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T27	NUM 5553	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T28	Solaking	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T29	Magenta	Nunhem	Cantaloupe	<i>cantalupensis</i>
T30	Bista	Nunhem	Charentaise	<i>cantalupensis</i>
T31	Ulysee	Nunhem	Yellow Canary	<i>cantalupensis</i>
T32	Elba	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T33	Capri	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T34	Galia	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T35	Caruso	Nunhem	Galia	<i>reticulatus</i>
T36	Trujillo	Nunhem	Piel de Sapo	<i>inodorus</i>
T37	카멜레온	신젠타	Piel de Sapo	<i>inodorus</i>
T38	해피니스	농우바이오	Piel de Sapo	<i>inodorus</i>
T39	실향	농우바이오	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T40	참왕	농진청	Honeydew	<i>inodorus</i>
T41	금향아리	농진청	Honeydew	<i>inodorus</i>
T42	은설	세미니스(홍농)	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T43	백화	세미니스(홍농)	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T44	슈퍼스타	동부한농	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T45	홈스타	신젠타	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T46	생큐	小林(일본)	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T47	베스트	농우바이오	Honeydew	<i>cantalupensis</i>
T48	넘버원	신젠타	Honeydew	<i>cantalupensis</i>

1) based on Pitrat et al. (2000)

Table 3-3. Selection of informative SSR markers from *Cucumis* species

<i>Cucumis</i> species	No. of markers tested	Selected markers (Polymorphic)	Markers for DNA fingerprinting	Selection efficiency (%)	References
<i>melo</i> (melon) ¹⁾	33(11)	15(0)	9	45.5	Danin-Poleg et al. (2001)
<i>sativus</i> (cucumber) ¹⁾	113(29)	13(0)	9	11.5	Fazio et al. (2002)
<i>melo</i> (melon) ¹⁾	31	9	2	29.0	Chiba et al. (2003)
<i>melo</i> (melon)	117	67	45	57.3	Ritschel et al. (2004)
<i>melo</i> (melon)	57	42	6	73.7	Gonzalo et al. (2005)
<i>melo</i> (Oriental melon) ¹⁾	-	7	4	-	Yi et al. (2006)
Total	351	153	75		

¹⁾선행 연구를 포함한 결과이며, 괄호 안은 본 과제 범위에서만 수행한 결과만을 나타냄.

공시품종 집단과 유전적으로 더 가까운 *catalupensis* 또는 *reticulatus* 계통 품종에서 개발되어 마커의 교차 선발(cross amplification)에서 문제시 되는 weak allele 또는 null allele 등의 문제점이 상대적으로 적었을 것으로 추정되었다.

4. 공시품종 집단의 유전적 유연관계 분석

일차 선발된 마커의 다형성 패턴을 분석하여 그 중에서 품종 지문화에 유용할 것으로 판단되는 75개의 분자표지를 전체 멜론 공시품종의 DNA 지문화 검정에 사용하였다. 그 결과 최종적으로 56개가 48 품종 전체 공시품종 집단에 대하여 정상적이고 유용한 다형성 패턴이 있는 것으로 분석 되었다 (Fig. 3-1). 검정된 총 alleles 수는 215개이고, 각 분자표지 별로는 2개에서 8개 까지 allelic bands 수가 분포되었으며, 이중 8 allelic bands의 분자표지 2개, 7 allelic bands의 분자표지 2개 등으로 가장 많이 형성된 분자표지들이었다. 전체 56개 분자표지의 평균 PIC 값은 0.632이고, PIC 값 0.9 이상으로 다형성 정도가 매우 높은 분자표지는 WM68, CMGAN12, CMSSR12로 각각 0.905, 0.909, 0.940인 것으로 분석되었다. 이것들의 alleles 수는 각각 8개, 7개, 8개로, 8 allelic bands의 분자표지 2개 모두와 7 allelic bands의 분자표지 2개 중 1개가 포함되어, PIC 값과 alleles 수 사이에는 높은 상관관계가 있는 것으

로 인정되었다 (Table 3-4).

이와 같이 멜론 48 공시품종에 대한 56개 분자표지의 DNA 지문화 검정 결과 도출된 215개 alleles을 바탕으로 유전적 유연관계를 Jaccard 상관계수를 이용 산출하고, 집괴분석하여 덴드로그램을 작성하였다. Fig. 3-2에서 보는 바와 같이 ‘슈퍼VIP’와 ‘하모니’는 전체 마커의 모든 alleles에 대하여 동일한 패턴을 보여 구분되지 않았다. 이 두 품종을 제외한 그 외 전체 공시품종은 56개 분자표지의 최소한 1개 이상의 allele에 의하여 구분되는 것으로 나타났다. ‘Elba’와 ‘Capri’, 그리고 ‘백화’와 ‘홈런스타’ 등 두 집단 4 품종이 215개 allele 중 한 개의 allele만이 다른 매우 유사한 품종 그룹으로 구분되었다.

전체적으로 공시품종 간 유사도 분포는 0.32 - 1.0 사이로 나타났고, 유사도 지수 0.4 수준에서 덴드로그램 상에서 A, B, C 3개의 절에 의하여 유전적으로 크게 3개의 품종군으로 분리됨을 알 수 있었다 (Fig. 3-2). 그룹 A에는 얼스 계통, 그룹 B에는 Galia 계통이 포함되어 구분되었으며 모두 네트가 형성되는 품종 계통이다. 그룹 C에는 Honeydew와 Piel de Sapo 등 모두 코르크 형성이 없는 무네트 멜론 품종군들이 포함되었다. 그룹 A에 예외적으로 포함된 ‘엘도라도’와 ‘Solaking’ 등 2개의 Galia type 품종들은 형태적 특성에 따른 계통 구분과 달리 유전적으로는 얼스 계통에 근친인 것으로 사료된다. 그룹 C의 하위 그룹인 C3에는 무네트 백피계 품종 중 ‘설향’과 ‘베스트’를 제외한 ‘은설’ 등 5품종이 독립된 집단을 이루어 이 계통이 무네트 멜론 중에서도 어느 정도의 유전적인 구별성이 있음을 알 수 있었다. C2에 그룹에 포함된 ‘설향’과 ‘베스트’ 경우는 과피색 외에는 Canary 또는 Sapo 계통의 유전적 요소가 상당 부분 포함되어 있음을 알 수 있었다.

전체적으로 보면 네트 멜론 그룹인 B와 무네트 멜론 그룹인 C 간의 유전적인 유연관계가 같은 네트 그룹인 A에 대한 유연관계에 보다 더 큰 것으로 나타났다. 따라서 우리나라와 일본 등에서 주로 재배되는 얼스(Earl's) 계통과 유럽을 중심으로 유통이 집중되는 Galia 계통 사이에는 멜론에서 가장 뚜렷한 계통 분류 요소인 코르크 층(네트) 형성 유무 특성보다 더 큰 유전적인 장벽이 존재함을 알 수 있다. 다시 말하면 이것은 네트 형성 유무가 가지는 가시적인 특성 가치와는 달리 그 특성을 지배하는 유전자의 수는 상대적으로 많지 않다는 사실을 의미한다고 말할 수 있을 것이다 (Staub et al., 2000). 이는 또한 Charentaise나 Cantaloupe 등 동일 품종 계통 내에서도 네트 유무 특성이 나타나는 경우에서도 알 수 있다. 그러나 그룹 B와 그룹 C 간의 계통 구분에는 코르크 층(네트) 형성 유무 특성이 계통 구분을 설명할 수 있는 유일한 단일 특성 요소임을 알 수 있다.

본 과제에서 제기된 바, 서양계 멜론 품종 계통 중에서도 Galia 계통의 품종들이

Honeydew나 Sapo 등 다른 품종 계통들과 유전적인 구별성이 비교적 뚜렷하다는 사실은 기존의 다른 연구 결과들에서 제기된 결과들과도 일치 한다 (Staub et al., 2000; Staub et al., 2004). 그러나 기존의 연구들이 서양계 품종 계통이 아닌 얼스(Earl's) 계통을 대상으로 한 전반의 유전적인 유연관계를 제시하고 있지 못하는데 반하여, 본 과제에서 도출된 계통 간 유전적 거리들이 이에 대한 상대적인 유사성과 유연관계의 척도를 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 다만, 이와 같은 계통 간 유연관계가 No net 계 품종 계통이 net 계 품종(Galia)에서 유래되었다는 진화론적으로 관점과도 부합하는 사실인지, 아니면 단지 육종 과정에서 계통 육성을 위한 소재의 이용 한계와 선발 압력에 의한 인위적인 결과인지는 현재로서는 분명하지 않다.

Table 3-4. Selection and application of SSR markers for the description of 48 varieties of *Cucumis melo* L.

No.	SSR ID	SSR motif	PIC	Na	References
1	WM20 ^a	(TC)20N14(TC)3(TA)4N2(TC)2	0.632	4	
2	WM24	(GA)18N4(GA)N2(GA)N8(TA)2	0.736	5	
3	WM28	(CT)2N11(CT)2G2(CT)T(CT)N7(TC)15	0.562	3	
4	WM33	(TC) ₂ (CT)A(CT) ₁₈ C ₄ N ₈ (CT) ₄ (TC)N ₇ (TC)C(CT) ₂ N ₁₄ (CCCT) ₂ T ₄	0.417	7	
5	WM41	(CT)2T(TC)(GAA)2(CT)N5T5(CT)T4G(CT)T3N9(CT) 2T(TC)2(CT)14	0.674	4	
6	WM42	(CT)AC(CT)N ₇ (CT) ₉ N ₈ (CT) ₂ N ₈ (GTGA) ₂	0.403	2	
7	WM50	(CTT)3C(CT)N4(CTT)(CT)3C(CT)N4(CT)(TC)4T2(C TT)(CT)2(CCT)T3(CCT)CAT3(CT)2C(CT)GT7(TC)	0.539	2	
8	WM52	(CT) ₃ AT(CT) ₄ (TC) ₂ N ₅ (CT) ₄ N ₁₄ (CT) ₂	0.648	2	
9	WM53	(CT) ₁₅ T ₃ CT ₂ (CT) ₂	0.656	5	Ritschel et al. (2004)
10	WM54	(CT)T4(CT)5(TTCA)(CT)2(TTCA)(CT)3(GTT)T4(CT C)(GTT)T8(CT)T4(CT)T3	0.398	2	
11	WM58	(GA)7A2(GA)2	0.633	2	
12	WM59	(TC)4T2(TC)10T3(TC)(CT)3T	0.664	4	
13	WM65 ^a	(TC)15N4(AC)3	0.785	5	
14	WM68 ^a	(GA)(AG)(GA)24	0.905	8	
15	WM71 ^a	(GA)21(CA)(GA)2	0.663	2	
16	WM75 ^a	(GA)8N2(GA)2	0.633	2	
17	WM76 ^a	(TA)2(TAA)2A2(GA)2A2(AT)2CA7(GA)A2(GA)13T (GA)(AG)N2A3(CA)2A(CA)	0.622	4	
18	WM77	(CA)2N2(CT)N(GA)N3(CT)N3(GA)N5(CAA)2N4(C T)	0.661	5	

19	WM79	(GA)N3(GAAA)2GA(GAAA)N5(GA)7A2(GA)4G5(GA)2	0.802	6	
20	WM84	(TC)(CT)17C2(CT)C3(CT)	0.452	4	
21	WM94	(GA)27	0.859	5	
22	WM97	(CT)14	0.602	3	
23	WM101	(CT)18	0.632	4	
24	WM102 ^a	(TC)10	0.727	4	
25	WM115	(GA)23	0.717	6	
26	WM120	(CT)20	0.720	4	
27	WM122	(TC)18	0.536	3	
28	WM124	(GA)17	0.796	5	
29	WMN127 ^a	(TTA)13	0.348	3	
30	N3	(GA)10	0.796	3	
31	N12	(GA)21	0.909	7	
32	N25	(GA)9	0.551	3	
33	N30 ^a	(TC)13	0.799	3	Gonzalo et al. (2005)
34	N33	(AG)2AA(AG)8TT(GA)3	0.559	2	
35	TJ2	(CAT)8	0.698	3	
36	CMSSR2	(GA)14AA(GA)3	0.795	5	
37	CMSSR6	(TC)14	0.558	4	
38	CMSSR7	(TC)9(TTTC)2	0.223	2	
39	CMSSR8	(GT)9N65(CT)7	0.544	3	Danin-Poleg et al. (2001)
40	CMSSR11 ^a	(TA)12	0.812	6	
41	CMSSR12	(TA)2(CT)8(AT)7	0.940	8	
42	CMSSR20	(GT)13	0.551	2	
43	CMSSR21	(GA)13	0.413	2	Chiba et al. (2003)
44	CMSSR21	(GA)14	0.598	2	
45	CMSSR25	(CT)9(CT)8	0.855	4	
46	CMSSR26	(CT)21(TG)8	0.649	4	
47	CMSSR27	(CT)9CTTTTCT	0.609	5	
48	CMSSR28	(CT)7(CT)11(CT)7(A)8	0.663	2	Fazio et al.(2002)
49	CMSSR29	(CT)6(TATTC)2	0.792	4	
50	CMSSR30	(CT)14(TA)7(CA)5	0.515	4	
51	CMSSR36 ^a	(TA)12	0.584	3	
52	CMSSR37	(TA)6(CTT)3(TA)6(T)11	0.670	3	
53	CMSSR38	(CT)14	0.740	6	
54	CMSSR41	(CT)28	0.568	6	Yi et al. (2006)
55	CMSSR42	(CT)13	0.456	2	
56	CMSSR43	(AT)5(A)7(GA)19(CTT)11	0.117	2	
			0.632	215	

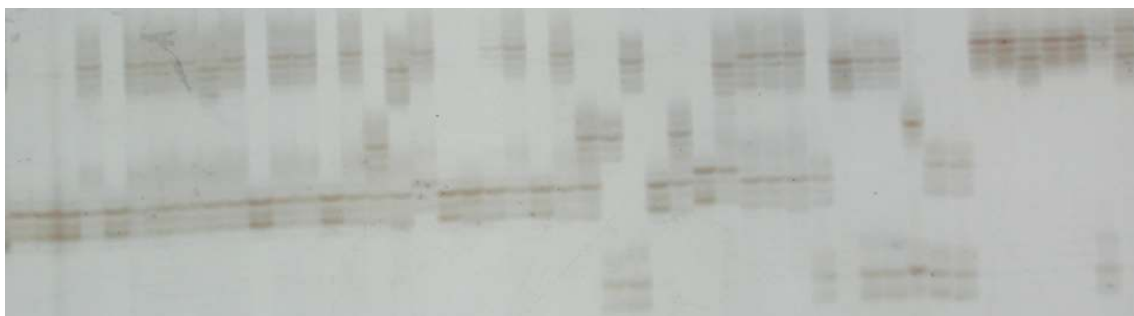
N_a, number of alleles

^aadopted from and/or calibrated based on the marker specification

CMSSR11



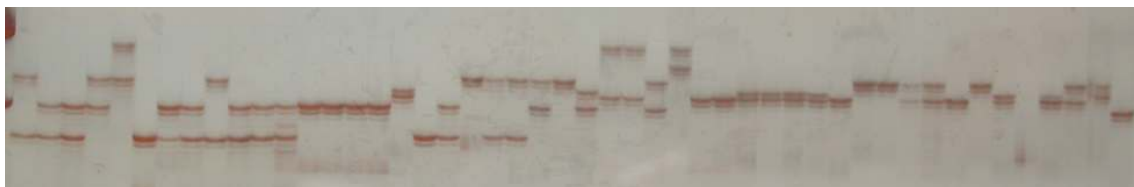
CMSSR12



CMSSR25



CMGAN12



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48				
				●																					●	●		●																							
●			●	●				●												●	●	●	●	●			●																			●	●				
																	●								●							●	●	●	●	●															
	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●						●	●				●	●	●	●	●	●																●

Figure 3–1. Representative images of polymorphic amplification for 48 *C. melo* accessions with selected SSR markers. The schematic diagram represents the method of allele scoring for DNA fingerprinting among the varieties as indicated by presence (●) or absence of allele.

5. DNA 지문화 분자표지 세트의 선정 및 품종 지문화

공시품종 간 식별이 가능한 최대 효율의 최소 마커 세트를 결정하기 위하여 전체 56개 SSR 마커를 PIC 값을 기준으로 0.70, 0.79, 그리고 0.80 이상으로 각각 구분하였으며, 이것들은 각각 18개 마커 94 alleles, 13개 마커 69 alleles, 그리고 7개 마커 44 alleles에 해당하였다 (Table 3-5). 이와 같이 PIC 값이 큰 마커의 부분 세트들을 이용하여 다시 동일한 방법으로 Jaccard's 지수에 의한 품종간 유사도를 산출하고 집괴분석하여 덴드로그램을 작성하였다. 그 결과 전체 마커 세트를 이용한 품종 구분과 고 PIC 값의 부분 마커 세트를 이용한 품종 구분에 있어 마커 수의 감소에도 불구하고 식별력에는 상대적으로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 전체 56개 SSR 마커 세트의 공시품종 간 유사도(similarities = genetic distances)에 대한 각 부분 마커 집단의 유사도 상관관계(Mantel test, r)는 다음과 같이 분석되었다. 즉, PIC 값 0.70 이상 18개 마커 (94 alleles)에 대하여 $r=0.97318$, 0.79 이상 13개 마커 (69 alleles)에 대해서는 $r=0.95864$ 로 큰 차이가 없었다. 그리고 PIC 값 0.80 이상 7개 마커의 44 alleles에 대해서는 $r=0.91871$ 로 나타났으며 (Fig. 3-5), 이는 전체 7개 12.5%의 마커가 약 85%(r^2)의 품종 식별력을 제공한다고 말할 수 있다 (Table 3-5). 실제로 PIC 값 0.80 이상 7개 마커 집단의 경우 두 품종간 구별되지 않는 집단의 수가 5개였으나 (Fig 3-4), WM53, WM65, 그리고 CMSSR36 등 10개의 마커를 사용할 경우에는 전체 56개 마커 집단과 동일한 수준의 품종 식별력을 제공하였다. 이는 대부분의 품종 식별력은 PIC 값이 높은 소수의 마커 세트에 의하여 결정된다는 사실을 의미한다.

여기서 선발된 고효율·고성능 7개 마커는 본 과제외 48 공시품종에 대하여 품종별 43개 DNA 지문화 패턴 나타내며, 이 중 두 품종 간 구별되지 않는 5개는 중복 패턴을 보여 준다 (Fig. 3-3). 이 7개 마커는 가장 기본적인 마커 세트로서, 금후 멜론의 분자표지를 이용한 품종 지문화에 있어서 최소 검정으로 최대 식별 효율을 기대할 수 있는 것으로 판단된다. 또한 필요시 추가적으로 13개 마커 세트와 18개 마커 세트에 대하여 마커 core set를 확대하여 검정할 경우 비용과 시간 측면에서 가장 효율적인 검정이 이루어질 수 있을 것으로 판단되었다 (Table 3-5). 다만, 금후 지속적인 보완을 통하여 전체 alleles의 정확한 크기 (bp)를 결정하고 reference alleles과 표준품종 세트를 결정하며, 공시품종 집단을 확대하여 DNA fingerprinting 정보를 D/B화하는 것이 필요할 것으로 판단되었다. 이 경우 7개 최소 마커 세트는 표준품종 세트로서 유용할 것이다.

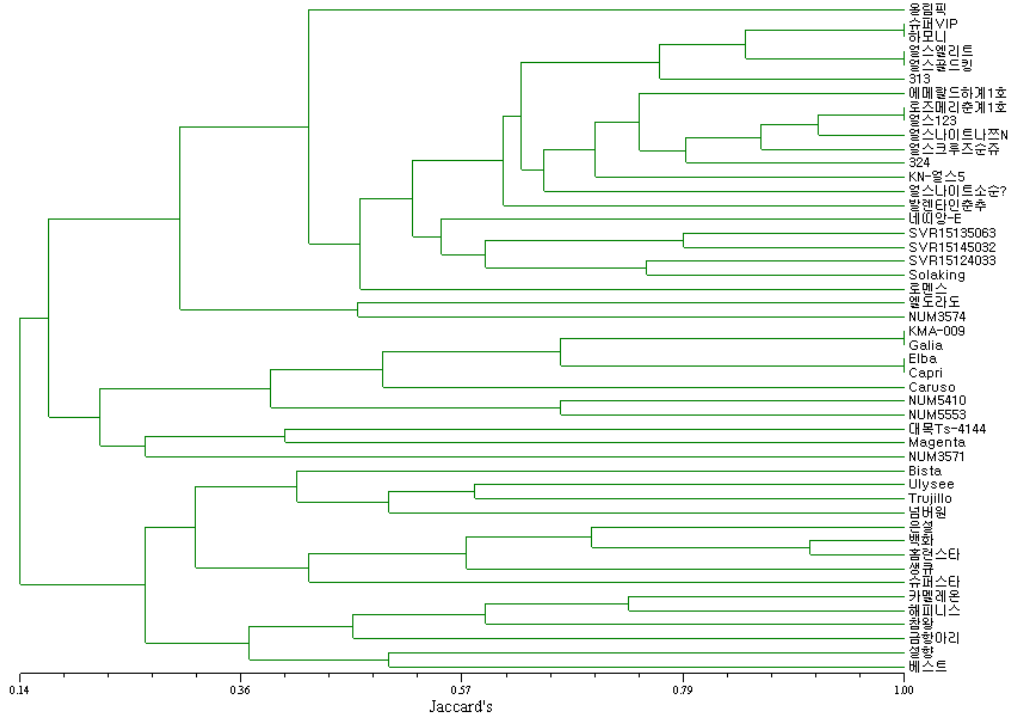


Figure 3-4. Cluster analysis and association of 48 melon accessions by 44 allelic bands of a minimum marker set of 7 SSRs. Genetic distances are estimated by Jaccard's coefficient using NTSYS pc 2.1.

Table 3-5. Selection of core marker set and discrimination efficiency

PIC	>0.10 (whole set)	>0.70	>0.79	>0.80 (core set)
$N_m(N_a)$	56(215)	18(94)	13(69)	7(44)
$\%N_m(\%N_a)$	100(100)	32(44)	23(32)	13(20)
r	1	0.973	0.958	0.919
r^2	1	0.947	0.918	0.845
match point	1	3	3	5

N_m number of markers; N_a number of alleles; r coefficient of correlation; r^2 coefficient of determination
 match point; variety groups not discriminated on the dendrogram

6. 표현형 연관도 검정

신품종 보호 분야에서 DNA 분자표지를 이용할 수 있는 방안에 대하여 두 가지 사항을 고려할 수 있다. 먼저, 다수 마커에 의하여 정의되는 품종의 genotype과 형태적 특성 간의 연관도에 근거한 품종의 관리이다. 또 하나는, 특정 형질에 대한 연관 마커의 이용이다. 품종의 genotype과 phenotype은 궁극적으로는 차원을 같이한다고 말할 수 있으나, 소수의 특정 마커에 의하여 정의되는 품종의 genotype과 육종과정에서 인위적인 선발 과정을 거치고 정되는 표현형의 연관관계는 불가피하게 왜곡을 수반하여 나타나게 된다. 따라서 신품종 심사를 위한 구별성(Distinctness), 균일성(Uniformity), 그리고 안정성(Stability) 검정 및 품종 간 최소거리 설정에 있어서는 마커가 표현형을 기술하기에 적절하며, 마커를 기준으로 표현형의 구별성을 정의할 수 있는 지에 대한 적합성이 우선 전제되어야 한다.

본 과제에서는 제 2 협동과제에서 수행한 멜론 재배시험 결과를 바탕으로 멜론 공시품종의 표현성 특성과 본 과제에서 수행 SSR 마커에 의한 멜론 genotype의 연관관계를 검정하였다. 검정의 효율성과 정확성을 위하여 '꽃의 성표현' 등 18개 질적형질을 대상으로 연관관계 분석을 실시하였다 (제 2 협동과제 첨부자료 1 멜론 특성조사표 참조). 표현형 특성을 이용한 품종간 유사도를 simple matching 연산자(m/n ; m , number of matches; n , total sample sizes)를 이용하여 구하고, 56 SSR 마커의 Jaccard 연산자에 의한 품종 간 유사도와 Mantel test에 의한 상관관계 분석을 실시하였다. 그 결과 $r=0.526$ 으로 비교적 낮은 상관관계(matrix correlation)를 보였다 (Fig. 3-6). 이는 Fig. 3-2의 마커에 의한 집괴분석에서 보여준 계통 구분이 비교적 명확하게 이루어진 것과는 서로 상응하지 않는 결과로서, 제 2 협동과제의 멜론 특성조사표에서 볼 수 있듯이 공시품종의 동일 계통 내에서도 형태적(질적형질) 특성 변이가 일정하지 않아 마커에 의한 genotype의 변이와 서로 상응하지 않는다는 사실을 나타내는 것으로 풀이된다. 이와 같은 결과는 특히 *Cucumis melo* 종에서 여러 차례 보고되었으며, 박과류와 같이 상대적으로 소수의 유전자에 의하여 형태적 특성 변이가 큰 경우에 관찰되는 것으로 추정되었다 (Lopez-Sese et al., 2003; Staub et al., 2004). 더욱이 본 과제와 같이 다수의 품종 계통을 동일한 마커 세트에 검정하고자 할 때, 계통 간 유전적 변이의 폭과 내용이 서로 다르게 나타날 가능성이 큰 결과의 반영으로 추론되었다. 결론적으로, 본 과제에서 56개 SSR 마커를 사용하여 검정된 멜론 공시품종의 유전적 유연관계는 형태적 특성을 바탕으로 정의되는 품종 간 유전적 거리와 비례하지 않은 것으로 검정되었으며, 따라서 이를 바탕으로 품종보호의 요건인 구별성 판단의 근거로 삼거나 품종간 최소거리를 설정하는 기준으로 준용하는 것은 타당하지 않는 것으로 사료되었다.

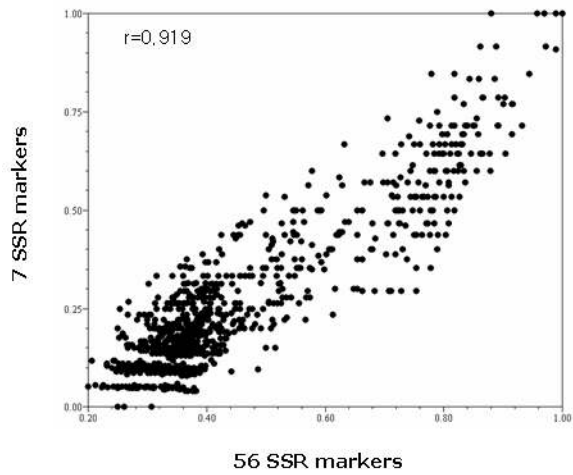


Figure 3–5. Comparison and correspondency of minimal marker set of 7 SSRs with the whole 56 SSR marker set for the discrimination of 48 melon accessions.

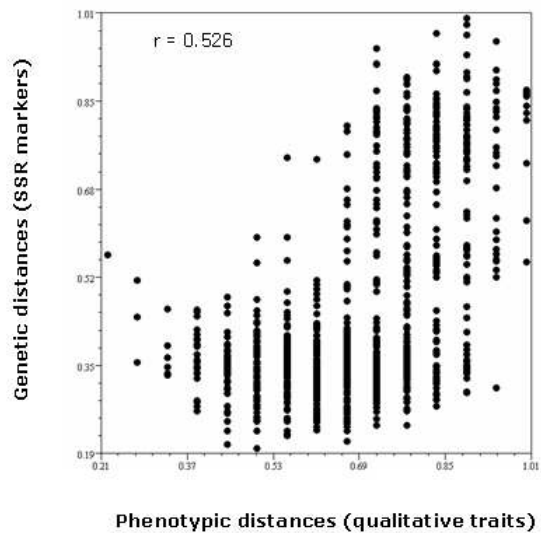


Figure 3–6. Correlation between phenotypic distances in 18 qualitative traits and genetic distances based on 56 SSR markers by Mantel test.

제 3 절 순도검정 분자표지의 개발

1. 순도검정 분자표지 개발

멜론 F₁ 품종의 유전적 순도검정은 통상 양친 교배를 통한 정상적인 일대잡종의 성립여부를 검정하는 heterozygosity 검정을 기본으로 한다. 본 과제에서는 재배를 통한 포장 검정으로 수행되고 있는 멜론의 순도검정을 분자표지를 이용한 실내 검정으로 전환하기 위하여 양친에 대하여 적절한 다형성을 가진 분자표지의 선발을 수행하였다. 실내 순도검정은 시간, 노동력, 투입 비용 면에서 포장검정에 비하여 종자 생산자에게 많은 이점을 제공하여 준다.

본 과제의 공시품종으로는 협동연구과제에서 제공된 ‘얼스발렌타인 춘추’, ‘얼스엑스포’, ‘달마시안’(시교명: 5205), ‘얼스원저’, ‘SKR×ETS6’(교배계통) 등 5개 F₁ 품종의 양친을 사용하였고, 이들에 대하여 이미 개발된 분자표지를 적용하여 순도검정에 유용할 것으로 생각되는 양친 다형성 분자표지를 재선발 하였다. 선발 분자표지는 양친간 다형성뿐만 아니라 대립 유전자 사이의 DNA band 크기 차이도가 커서 통상 agarose gel에서도 검정이 가능한 수준에서 분자표지 선발을 진행하였다. 그 결과 ‘발렌타인 춘추’ 품종에서는 WM124 마커가

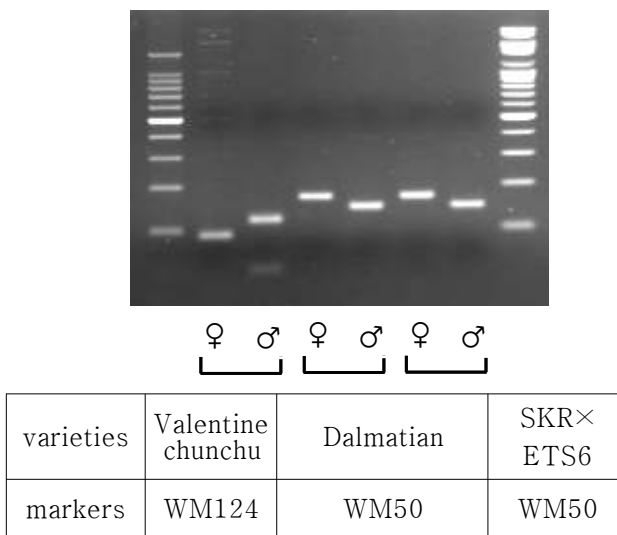


Figure 3-7. Assessment of parental lines of 3 F₁ hybrids by SSR marker. Polymorphism between parental lines represent usefulness of the markers for seed purity test.

선발되었고, ‘달마시안(5205)’과 ‘SKR×ETS6’ 교배계통 품종에 대해서는 WM50 마커가 최종적으로 선발되어 agarose gel에서 분석되었다. 그러나 얼스엑스포와 얼스원저 품종에서는 양친간 다형성이 없거나 heterozygotic bands의 크기 차이가 작아 agarose gel 분석에 적절한 마커를 찾을 수 없었다. Fig. 3-7에서 보는 바와 같이 2.5% agarose gel에서 3 품종의 양친 간 다형성을 확인할 수 있어 F₁ 개체들의 순도검정에 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

2. 분자표지를 이용한 순도검정: 실용성 평가

멜론 F₁ 유통품종인 ‘발렌타인 춘추’와 ‘달마시안’에 대하여 각각 선발된 분자표지 WM124와 WM50을 이용한 순도검정을 실시하였다. 분자표지를 이용한 실내 순도검정은 실제 포장검정을 대체할 수준에서 이용 가능한지에 대한 실용성 검토 차원에서 포장검정과 동시에 동일한 포장 순도검정 공시재료에 대하여 수행되었다.

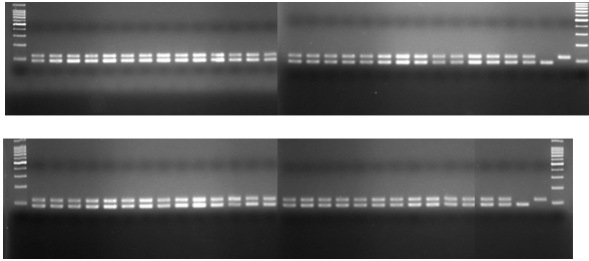
포장검정 공시 시료로부터 DNA를 분리하고 이를 이용하여 분자표지를 이용한 실내 순도검정을 수행하였다. DNA 분리 후 검정된 시료는 ‘발렌타인 춘추’와 ‘달마시안’ 각각 55개체와 73개체였다. 분석된 전체 개체에서 양친 type을 반영한 이형접합체(heterozygote) 형식을 보여, 이것들이 정상적으로 교배되어 양친의 특성을 반영하는 hybrid type 종자임을 증명할 수 있었으며, 포장검사 결과와 일치된 결과를 보였다 (Fig. 3-8). 따라서 본 분자표지는 포장순도 검정을 대체하여 실내검정에 활용할 수 있을 것으로 보여지며, 특히 SSR 마커임에도 일반 아가로스 젤(2.5%)에서 분석이 가능하여 육종 현장에서 실용적인 활용이 가능할 것으로 사료된다.

3. 순도검정 마커의 F₂ 세대 유전양상 검정

순도 검정 마커의 유전적 안정성과 유전 양상을 검정하기 위하여 멜론 발렌타인춘추 F₂ 집단 76 개체에 대하여 F₁ 종자 순도검정에 사용되었던 것과 동일한 마커와 방법으로 개체별로 DNA를 분리하고 PCR 증폭하여 아가로스 젤에서 분리 양상을 검정하였다 (그림 생략). Table 3-6에서 보는 바와 같이 양친 type과 hybrid type으로 분리하였으며, 분리비는 χ^2 검정 결과 1 : 2 : 1의 멘델 유전법칙에 부합하는 것으로 분석되었다. 이로부터 본 과제에서 개발되어 순도검정 용으로 사용된 SSR 마커가 일반적인 표현형과 마찬가지로 F₂ 세대에서

도 유전적으로 안정하게 유지되는 locus임을 확인할 수 있었다.

A. Valentine chunchu



B. Dalmatian

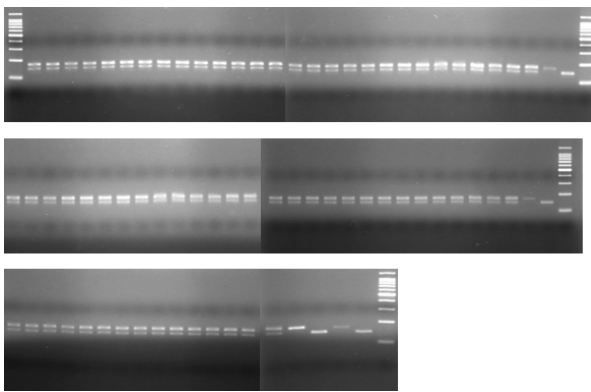


Figure 3-8. Assessment of seed purity for melon F₁ hybrids of 'Valentine chunchu' and 'Dalmatian' by using WM124 and WM50 SSR markers, respectively.

Table 3-6. Inheritance and segregation of SSR markers in the F₂ population derived from F₁ hybrid 'Valentine chunchu'.

F ₁ hybrid	SSR markers	Segregation mode	No. of plants	χ^2	Types
		P ₁ : H : P ₂			
Valentine chunchu	WM124 (CMBR57)	19 : 31 : 26 (1.0 : 1.63 : 1.37)	76	3.868	Co-dominant

제 4 절 분자표지의 특이화

1. 서론

새로운 종 또는 작물에서 이와 같은 과정을 통하여 새로이 선발된 마커들이라 할지라도, 많은 경우에는 새로운 작물에서 다형성을 형성하지 못하거나, 다형성을 형성한다 할지라도 해당 locus에서 PCR 반응 특이성이 낮은 'weak allele' 현상을 보여 최종적으로 유용 마커로서 선발되지 못하는 경우가 많다. 'Weak allele'과 'null allele (PCR 무반응 allele)'은 '마커의 교차 이용'에서 마커의 선발 효율(transferability)을 낮추는 가장 큰 원인으로 알려져 있다 (Varshney et al., 2005a; Weising et al., 2005; Rossetto, 2001). 그러나 대부분의 경우 'null allele'은 마커의 선발 대상에서 제외되므로, 본 과제와 같이 동종의 작물에서 품종 계통 간 마커의 transferability 문제는 대부분 선발된 마커들의 특이성이 떨어지는 'weak allele'에서 기인한다고 할 수 있다.

앞서 살펴본 바와 같이 다수의 멜론 유래의 분자표지라 할지라도 적지 않은 경우에 본 과제의 멜론 공시품종 집단 내에서 마커로서 특이성이 떨어지는 것으로 나타났다. 즉, PCR amplicon은 만들어지나 실제 Big gel 상에서 분석 시 특정 크기의 allele을 형성하지 못하거나, 또는 allelic bands의 끌림 현상 등으로 다형성 분석이 어려운 경우가 나타났다. 이 경우 분자표지에 해당하는 유전자 좌는 존재하지만 프라이머의 특이성이 낮아 효과적인 PCR 증폭이 일어나지 않았기 때문으로 추정할 수 있다. 일반적으로 프라이머의 특이성 저하는 primer binding site에서 관찰되는 insertions-deletions(Indels)나 base substitutions와 같은 single nucleotide polymorphisms(SNPs) 수준의 돌연변이 요소와 역위(inversion)와 중복(duplication) 등의 염색체 구조변이에서 주로 기인하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 문제점은 종간 PCR 프라이머의 교차 이용에서 일반적으로 예상되는 문제점으로 유전적 유연관계가 먼 종일 경우에 염기서열 상 상동성(homology)이 떨어지게 됨으로 그 유전적 거리에 비례하여 corss-species amplification의 효율성은 저하될 것이다.

다형성은 있으나 증폭의 특이성이 없는 'weak allele' 경우라면 다음과 같은 두 가지 측면에서 이런 문제점을 해결할 수 있는 기술적 대안을 제시할 수 있다. 그 하나는 2개 이상의 연관 종의 염기서열 정보를 바탕으로 conserved regions를 결정하고 consensus sequences로부터 프라이머를 제작하는 것이 종 특이적인 프라이머일 경우보다 교차 이용에

효과적인 사실이 알려져 있다 (Yu et al., 2004). 두 번째는 반대로 새로 적용되는 종에 대하여 프라이머의 종 특이성을 강화하는 방법이다. 새로운 종의 primer binding site에서 관찰되는 돌연변이 요소들을 확인하고 제거함으로써 종 특이성을 높여 주는 방법이다. 두 과정 모두 기본적으로 추가적인 염기서열 정보를 필요로 한다. 따라서 본 과제에서는 이와 같은 목적으로 먼저 ‘weak allele’ 유전자 좌에 해당하는 genomic DNA 부위를 분리하여 염기서열을 분석하고, 프라이머를 다시 제작함으로써 작물의 DNA fingerprinting 효용성을 극대화하는 분자표지의 최적화 즉, 특이화 과정을 진행하였다. 본 과제에서는 그러나 분자표지 locus에 해당하는 다수 연관종의 염기서열을 확보하기 어려운 관계로, 유전적인 유연관계가 먼 것으로 인정되는 우리나라 재래종 참외에서 대응 locus를 분리하여 priming region의 염기서열 상의 consensus 여부를 비교하여, 확인되는 돌연변이 요소들을 제거함으로써 프라이머의 특이성을 제고하고자 하는 다소 절충적인 방법을 사용하여 추진하였다. 그 결과, 멜론에서 다형성이 보장된 새로운 SSR 마커를 추가로 확보하여 품종의 DNA 지문화에 성공적으로 적용할 수 있었으며, 다른 작물의 유사한 시스템에도 적용할 수 있는 모델로 제안하는 바이다.

2. 연구 방법

기존의 SSR 분자표지의 프라이머를 바탕으로 우리나라 재래종 참외 ‘간치’를 재료로 genome walking을 수행하여 해당 유전자 좌를 분리하고, 얻어진 locus의 염기서열 정보를 바탕으로 프라이머를 재제작 또는 기존 프라이머 염기서열의 base pairing을 최적화함으로써 수행하였다 (Fig. 3-9). 먼저, ‘간치’ 참외의 genomic DNA를 4개의 제한효소로 절단하고 이를 재료로 genome walking을 수행하기 위한 적용 제한효소 별 4개 세트의 adaptor-ligated semi-genomic library를 제작하였다. 그리고 간치 참외에서 기존 SSR 분자표지의 프라이머를 이용하여 해당 분자표지 locus를 PCR 증폭하고 분리하여 염기서열을 분석하였다 (backbone cloning and 1st sequencing). 밝혀진 염기서열을 바탕으로 nested primer를 제작하고 locus 양단으로 각각 두 차례의 PCR 반응을 통한 genome walking을 수행하여 추가적인 염기서열을 확보하였다(2nd and 3rd sequencing) (Fig 3-10). 중복 서열을 기준으로 전체 염기서열을 조합하여 완성하였다. 이와 같이 분리된 유전자좌와 그 염기서열로부터 기존 분자표지와 SSR 반복염기서열(core motif)을 확인하고, 기존 프라이머의 염기서열과 다른 돌연변이 염기가 있는 가 여부 등을 확인하였다. 새로운 염기서열을 바탕으로

프라이머를 특이화 내지 재제작하고 전체 공시품종에 대하여 big gel 분석을 실시함으로써 새로 제작된 분자표지의 특이성과 품종식별의 유용성을 확인하였다.

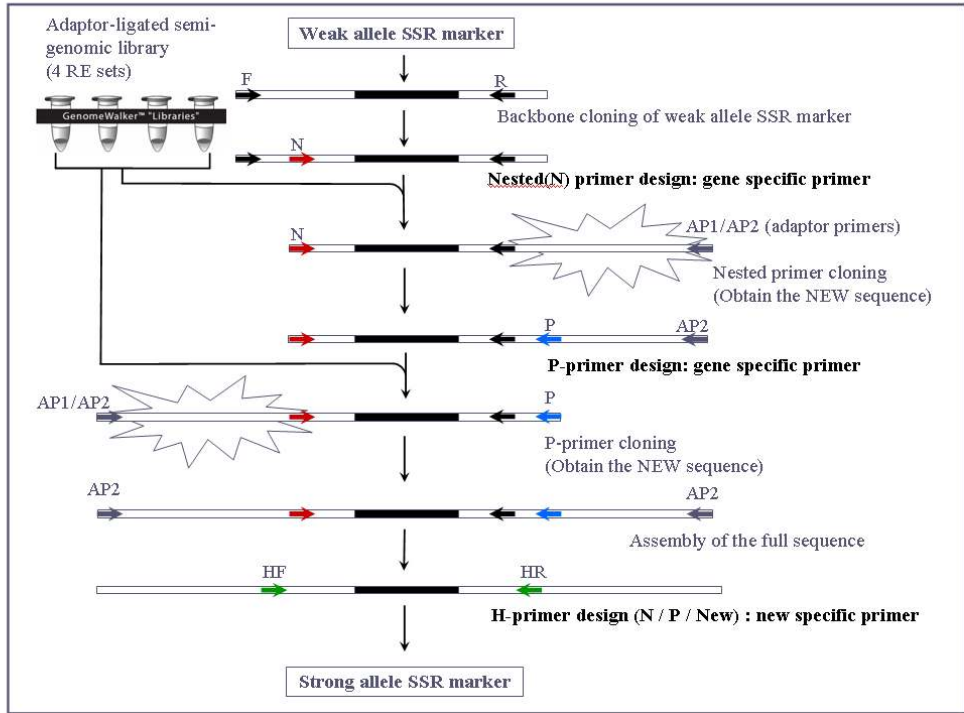


Figure 3-9. Overview of the SSR allele isolation procedure: chromosome walking technique. Prior to the DNA walking PCR, backbone fragment of the weak allele markers were amplified with the given original primer set (GSP1: F and R) from the 'Gganchi'. The cloned DNA was sequenced (First sequencing) and a gene-specific primer (GSP2: NF or NR) was designed for nested PCR on an advantageous direction. Primary PCR is performed on one of the both directions with GSP1 and an adaptor primer (AP) 1. 4 sets of adaptor-ligated semi-genomic library are separately used as template for the 4 PCR reactions. Secondary PCR is performed using a nested gene specific primer and AP2. For cases, GSP1 was paired with AP2 for secondary PCR if the nested primer is not affordable. The products is cloned and sequenced (Second sequencing), followed by confirmation of SSR motif. Likewise, the other nested gene specific primer, GSP2, was designed based on the sequence information. And, DNA walking procedure of secondary PCR is performed for the opposite direction (Third sequencing). Both sequence information were assemble to make a contig for the allele. New specific primer set is designed based on the complete sequence information and tested to detect the polymorphic amplification of varieties.

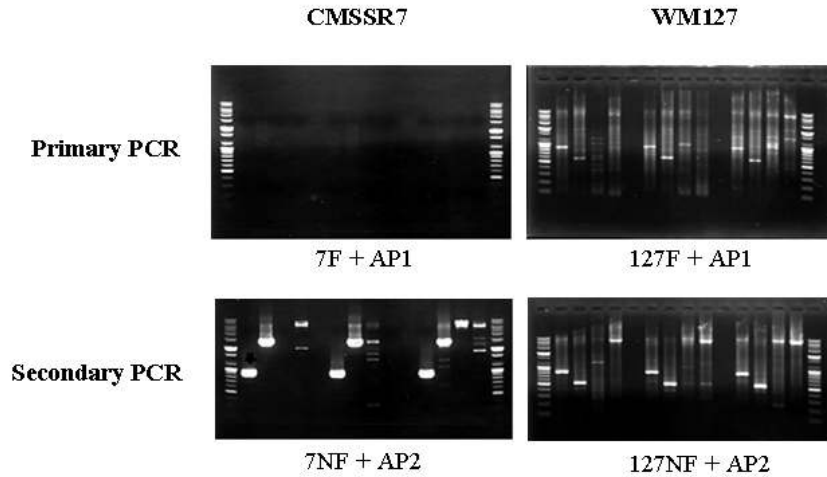


Figure 3-10. Results of primary and secondary PCR for DNA walking on CMSSR7 and WM127. Adaptor(AP)- ligated semi-genomic library was selectively amplified by two rounds of PCR with gene specific primer (F), nested primer (NF), and adaptor primers (AP1 and AP2). PCR products were isolated, cloned and sequenced.

3. 결과 및 고찰

Polyacrylamide big gel 분석에서 다형성이 보이지만 특이성이 떨어지는 것으로 분석된 33개의 SSR loci를 특이화 대상으로 선정하고, genome walking을 진행하였다 (Fig. 3-10). 각 분자표지 locus에 대한 SSR fragment의 분리와 염기서열 분석, 그리고 fragment의 양단간에 걸친 genome walking을 거쳐 추가적인 염기서열 정보가 확보된 locus는 최종적으로 17개로 분석되었다 (Table 3-7). 이들에 대하여 원래 마커 프라이머의 oligonucleotide sequence와 염기서열 정보와 비교하여 priming region에서 돌연변이를 확인하였다. 17개 중 8개에서 1-3 개의 염기 치환, 결실 또는 첨가 등의 염기서열 상 SNPs이 확인되었으며, 나머지 9개에서는 염기서열에 차이가 없었다 (Table 3-8). 특이성이 떨어지는 마커만을 선발하여 분석대상으로 한 것을 고려하면 primer binding site에서 염기서열 차이가 크지 않는 것을 알 수 있었다. 전체의 절반은 priming site에서 변이가 전혀 없는 완전일치(perfect match) 상태였고, 변이가 확인된 SNPs 또한 양쪽의 프라이머에서 모두 6개의 염기 치환을 돌연변이를 보이는 CMSSR36 SSR locus를 제외한 대부분의 경우가 양쪽 프라이머를 합쳐 1 - 2 bp 정도의 단일 염기 수준의 변이(point mutation)였으며, 더욱이 프라이머의 5'-end 쪽에 치우쳐 있는 경우가 많았다. 따라서 당초 예상했던 것처럼 priming region의 염기 변

이가 마커의 특이성 저하에 직접적인 원인을 제공하는 가장 큰 요인이라고 보기는 어려웠다. 실제 몇 개의 마커에서 변이된 염기를 바꿔서 priming region의 mismatch를 제거하고 PCR 증폭 반응을 반복하여도 마커의 특이성이 개선된 결과를 얻을 수 없었다.

결론적으로 ‘weak allele’의 특이성 저하가 priming region의 mismatch와 관련되기 보다는 primer의 design 자체가 적절하지 못하다는 결론을 얻을 수 있었다. 따라서 ‘weak allele’을 갖는 SSR 마커의 priming region의 mismatch를 수정하여 특이화 하는 방법이 아니라, 프라이머 자체를 다른 위치에서 새로 제작하여야 할 것으로 판단되었다. 그 외에 CMBR61 마커 locus에서 원래 마커의 SSR motif (CT)₂₇와 다른 SSR motif (TTA)₁₃가 발견되어 새로운 마커로 추가 하였다. 또한 CMBR115 마커에서는 분리한 locus의 염기서열에서 품종 계통 간에 약 280 - 290 bp 크기의 결실이 있음이 확인되어 동일한 프라이머를 이용하여 아가로스 젤에서 분석할 수 있도록 STS 마커로 전환하였다.

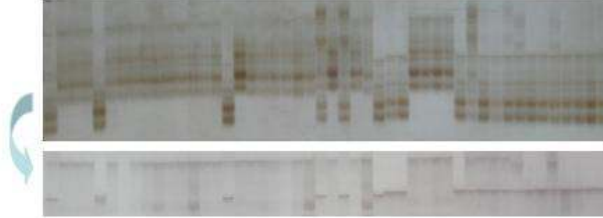
이와 같은 결과를 바탕으로 genome walking이 완성된 17개 SSR loci에서 유래한 18개 마커에 대하여 프라이머를 특이화 하고 48개 맬론 공시품종의 다형성 분석에 적용하였다 (Table 3-7). 그 결과 13개 마커에서는 다형성 패턴의 특이성이 개선된 결과를 보여주었으며, 특히 그 중 7개는 완전히 새로운 마커로서 선발 목록에 삽입되고 품종 지문화에 성공적으로 적용할 수 있었다 (Fig. 3-11). STS 마커로 전환된 CMBR115는 SSR이 포함된 463bp, 159bp, 147bp의 최소 3개의 allele이 동형접합과 이형접합 형태로 붙어, 아가로스 젤 상에서 최소 5개 이상의 다형성 패턴을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-12). 일부 품종의 경우는 null allele로 확인되어 염색체 구조에 추가적인 결실이 있을 가능성을 보여 주었다. 나머지 5개 마커는 개선된 특이성 결과를 보여주지 못하여 품종 지문화에 활용되지 못하였다.

Table 3-7. Overall results on the primer specification.

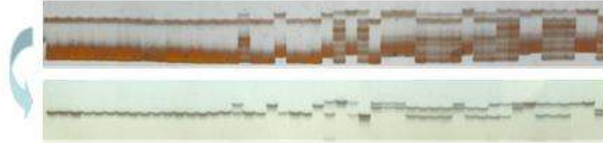
Procedure	No. of clones	%	Procedure	No. of clones	%
Initial allele	33	100	Primer optimization*	18	55
SSR backbone cloning	32	97	polymorphic	13	39
Sequence extension by DNA walking (both sides)	17	52	Gel analysis non-specific	5	15

*Primer optimization: including an new motif

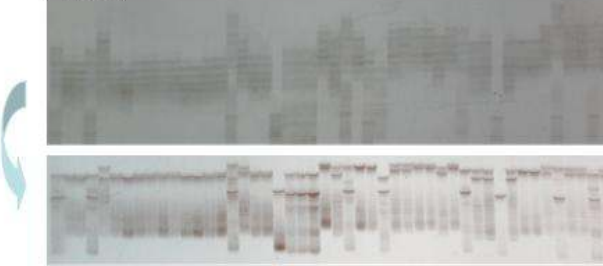
WM20



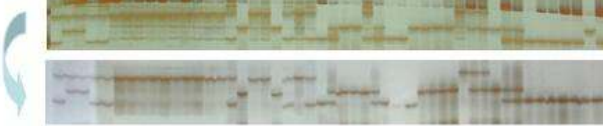
WM102



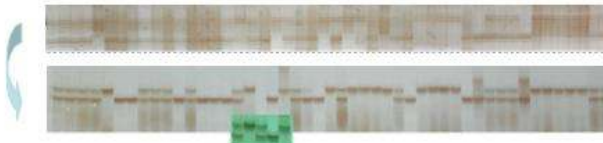
WM68



N30



WM71



CMSSR36



Figure 3–11. Comparison of polymorphic amplification patterns of SSR loci in 48 accessions of melon (Western cultivar types) before and after primer specification. Marker specification was carried out through allele isolation, sequencing, and primer optimization. PCR products were analyzed on polyacrylamide gel and visualized by silver staining. Gel images of polymorphism were compared between before (c) and after (d) the primer optimization. Each lane, 1(left) to 48, corresponds to the varieties.

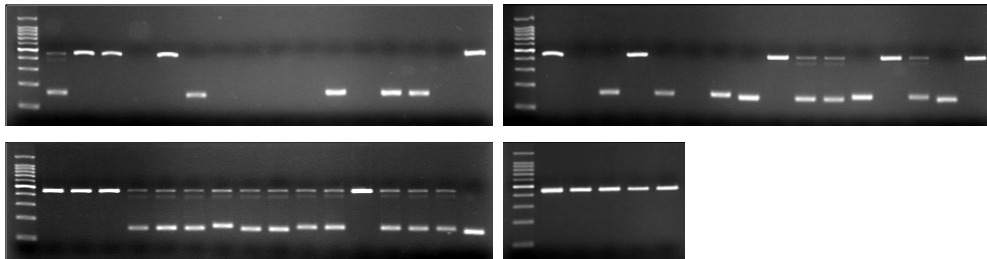


Figure 3–12. Conversion to STS marker and polymorphic amplification of CMBR115 marker. Three allelic bands of 463bp, 159bp, and 147bp are identified as 5 patterns of homozygote or heterozygote types. Blank lanes represents null allele. Each lane corresponds to the variety code T1 – T48 in Table 3–2.

Table 3–8. Primer specification of SSR markers through allele isolation and sequences comparison of the corresponding SSR markers between *Cucubita* species and Oriental melon

SSR	SNPs in primer sequence	Allele isolation (bp)	Gel analysis
	Primer optimization	New allele (bp)	
CMSSR36	F: G→T, G→A, G→C R: T→C, G→C, G→T	270	Polymorphic
	Base change	270	
WM68	Perfect match	93	Polymorphic
	Re-design	190	
CMSSR7	F: G, G indels, R: match	100	Polymorphic
	Re-design	178	
CMSSR11	F: C→A, R: match	153	Polymorphic
	Re-design	164	
WM65	F: match, R: A indel	108	Polymorphic
	Re-design	209	
WM127	Perfect match	131	Non-specific
	Re-design	156	Polymorphic
	additional motif	210	
N30	Perfect match	190	Polymorphic
	Re-design	152	
WM71	Perfect match	164	Polymorphic
	Re-design	227	
WM75	F: C indel, R: match	98	Polymorphic
	Re-design	178	
WM76	Perfect match	164	Polymorphic
	Re-design	156	
WM102	F: A indel, R: T indel	153	Polymorphic
	Re-design	186	
WM111	Perfect match	192	Polymorphic
	Re-design	164	
WM124	F: A→C, R: A indel	90	Non-specific
	Re-design	195	
WM131	Perfect match	139	Non-specific
	Re-design	152	
WM20	F: G→T, R: match	126	Polymorphic
	Re-design	184	
WM73	Perfect match	134	Non-specific
	Re-design	158	
WM100	Conversion to STS marker	463, 159, 147	Polymorphic

제 4 장 수박 품종지문화 연구 및 순도검정 마커 개발

제 1 절 DNA 기법을 이용한 수박의 품종 식별

1. 서 론

박과식물 (Cucurbitaceae) 중 수박속 (*Citrullus*) 식물은 남아프리카가 원산인 *Citrullus lanatus*, 북아프리카와 중동 원산인 *Citrullus colocynthis*, 서남 아프리카 원산인 *Citrullus ecirrhosus*와 *Citrullus naudinianus*, 인도원산인 *Citrullus fistulosus* 5종으로 분류되며, *Citrullus lanatus*는 var. *lanatus*와 var. *citroides* 2종의 변종군으로 나누어지며, 우리가 식용으로 먹는 수박은 *C. lanatus* var. *lanatus*에 포함된다. 우리나라의 수박의 재배면적은 2006년 기준 20,553ha(노지:3718, 시설:16,835ha)이며, 생산량의 경우 778,374톤이다. 수박은 과형에 따라 타원형계, 원형계, 생장형에 따라 왜성과 포복형으로 구분하고 있다. 우리나라에서 육성된 수박 품종은 2007년 기준 수입생산판매건수는 471건, 품종보호출원 건수는 63 품종, 등록설정된 품종은 28품종이 유통되고 있을 정도 박과작물에서 차지하는 비중이 아주 크다고 할 수 있다.

수박은 품종 육성 방법은 잡종강세를 이용한 F1 품종이 주류를 이루고 있다. 품종 육성방향의 경우 당도, 내병성 정도, 과형의 개선에 주력하고 있으며, 최근에는 소비자의 기호도가 다양해짐에 따라 씨없는 3배체 수박, 과피와 과육의 색깔이 노란 수박 등 다양한 품종이 육성되어 농가에 판매되고 있다. 그러나 소비자가 단타원형계 고당도 수박에 대한 선호도가 높아지면서 육종방향도 이와 유사한 방향으로 이루어져 왔기 때문에 종자회사에서 판매되고 있는 품종의 유전적 다양성 정도가 크지 않은 것으로 알려져 있다.

분자생물학이 발달하면서 DNA 마커를 이용한 분자 육종방법에 대한 연구가 진행되고 있는데 수박의 경우 유전자 지도 작성(Levi et al. 2001), 주요 농업형질에 대한 QTL의 mapping (Hashizume et al. 2003), 유전자원의 특성평가(Levi et al. 2001) 등에 대한 연구 결과가 보고되고 있다. DNA 마커에 의한 수박 품종식별 및 유전적 유연관계 분석에 대한 연구는 우리나라에서 RAPD 마커를 이용한 유통품종에 대한 유전적 다양성 분석(Lee et al. 1996), 미국과 중국에서는 RAPD, AFLP, SSR 기법을 이용한 유전자원 특성평가(Jarret et al. 1996; Levi et al. 2001; Xu et al. 2003)에 대한 연구결과가 보고되고 있으며, 최근, 스페인과 미국에서는 수박의 SSR 마커를 개발하여 그 정보를 공개하고 있다(Guerra-sanz, 2002; Joobeur et al, 2006). 그러나

RAPD와 AFLP 분석방법은 마커의 유전이 dominant 양상을 보이기 때문에 F1 품종의 식별에 적합하지 않을 뿐만 아니라 분석의 반복 재현성에 약간의 문제점이 제시되고 있다. 이러한 단점을 해결할 수 있는 분석방법이 SSR 마커를 이용하는 것인데 이는 반복재현성이 우수하고 대립 유전자 수가 다양할 뿐만 아니라 마커의 유전양상이 공우성을 나타내기 때문에 F1 품종의 식별에 적합한 것으로 알려져 있다. 실제로 UPOV에서도 다른 마커보다 SSR 분석 기법을 SNP와 더불어 가장 효과적인 분석 마커로 인정하고 있으나 지금까지 개발된 수박 SSR 마커는 64개에 불과한 실정이다.

최근에 이종에서 개발된 SSR 마커의 활용 가능성이 Arabidopsis와 Brassica속 작물 (Swabe et al, 2002), 모과와 사과 및 배(Yamamoto et al, 2004), 화본과 작물(Varsheney, 2005)에서 보고되고 있는데 수박의 경우 품종식별에 활용될 분자표지가 제한되어 있기 때문에 멜론과 오이에서 개발된 분자표지를 활용한다면 수박의 품종식별 방법 개발에 분석 마커의 수가 부족한 것을 해결하는 한 가지 방안이 될 것으로 생각된다.

따라서 본 세부과제에서는 SSR 마커를 이용한 수박의 품종 식별 체계를 구축하고자, 박과작물에서 유래된 SSR 마커와 협동연구기관에서 개발된 SSR 마커 등을 이용하여 수박 49품종에 대한 유전적 유연관계 분석 및 품종식별 최소 마커의 선정, 형태적 특성과 SSR 마커와 상관 분석 등에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

1) 공시품종 및 DNA 분리

본 연구에서는 고창 수박 시험장에서 분양받은 수박 내병성계 유전자원 9품종과 국내종묘에서 육성된 40품종을 공시하였다(Table 4-1). 공시품종의 종자를 2005, 2006년 4월 20일에 50공 프러그 육묘판에 파종하여 본엽이 3~4매 완전히 전개되었을 때 각 품종당 5개의 성장점 부위 있을 채취하고 액체질소를 이용하여 마쇄하고, Nucleospin[®] Plant Kit (Macherey-Nagel Cat no. 740.270.540.)의 방법에 준하여 DNA를 분리하였다. DNA양은 μ 당 5 ng 수준으로 농도를 맞추고 PCR에 이용하였다.

Table 4-1. Watermelon varieties surveyed with SSR markers

No. Varieties	Sources	No. Varieties	Sources
1 Speed(스피드)	Nongwoobio(농우)	16 03130	Nongwoobio(농우)
2 Ggulbodan(꿀보단)	Nongwoobio(농우)	17 04279	Nongwoobio(농우)
3 Starggul(스타꿀)	Nongwoobio(농우)	18 04280	Nongwoobio(농우)
4 Joeunggul(조은꿀)*	Seminis(세미니스)	19 Bok(복)	Syngenta (신젠타)
5 Sambokggul(삼복꿀)*	Seminis(세미니스)	20 Geumcheon(금천)	Nongwoobio(농우)
6 Festival(페스티발)*	Syngenta(신젠타)	21 Ssizer0(씨제로)	Syngenta(신젠타)
7 Tojongggul(토종꿀)*	Dongbu Hannong(동부)	22 Ssizerokkul(씨제로꿀)	Syngenta(신젠타)
8 Semiggul(세미꿀)	Sakata Korea(사카타)	23 Champion	Seminis(세미니스)
9 Baekmagang(백마강)	Koregon(코레곤)	24 Black-Boy	Seminis(세미니스)
10 Miraeggul(미래꿀)	Koregon(코레곤)	25 Mediteria	Seminis(세미니스)
11 Obokggul(오복꿀)	Daenong Seed(대농)	26 Crimpia	Seminis(세미니스)
12 Haedongggul(해동꿀)	Nonghyup Seed(농협)	27 Aquila	Nongwoobio(농우)
13 Saecheonnyeon(새천년)	Hyundae Seed	28 Sugar-Plus	Nongwoobio(농우)
14 Kkoma(꼬마)	Nongwoobio(농우)	29 Torpedo	Nongwoobio(농우)
15 03118	Nongwoobio(농우)	30 Black-Diamond*	-
31 Calhoun-Gray*	-	41 Soseulsaem(소슬쌈)*	Soseul (소슬)
32 Au-Producer*	-	42 Dalgona(달고나)*	Syngenta(신젠타)
33 Congo*	-	43 Jiguchon(지구촌)*	Jeil(제일)
34 Jubilee*	-	44 Habokkkul(하복꿀)*	Nongwoobio(농우)
35 Charleston-Gray*	-	45 Onsesang(온세상)*	Seminis(세미니스)
36 PI189225*	-	46 Chilbokggul(칠복꿀)*	Jeil(제일)
37 Sugar-Baby*	-	47 Sacheolggul(사철꿀)*	Nongwoobio(농우)
38 PI296341-FR*	-	48 Chanchan(찬찬)*	Nongwoobio(농우)
39 Heungnongggul(흥농꿀)*	Seminis(세미니스)	49 Bitna(빛나) *	Seminis(세미니스)
40 Geumbo(금보)*	Nongwoobio(농우)		

* 박과작물에서 유래된 SSR 및 STS 마커 선발에 이용된 품종

2) 품종식별용 분자표지의 선발

① 박과작물 및 협동연구기관에서 개발된 SSR 마커의 선발

멜론과 오이에서 개발된 SSR 마커의 수박에 활용 가능성을 탐색하기 위하여 멜론에서 개발된 SSR 마커 231개와 오이에서 개발된 SSR 마커 96개를 수박 '조은꿀'의 24품종에 적용하여 SSR 마커의 활용 가능성을 탐색하였다. 그리고 수박에서 개발되어 그 정보가 공개된 SSR 마커 64개와 염기서열 정보가 미공개된 24개의 SSR 마커를 이용하여 공시품종에 대한 다형성 여부를 분석하였다. 또한, 협동연구기관에서 자체 개발한 91개의 SSR primer의 염기서열을 분양받아 '삼복꿀'과 '페스티발' 품종에 특이적으로 증폭되는 38개를 본 연구에 활용하였다. PCR의 반응액 조성은 수박 genomic DNA 25 ng을 template DNA로 이용하여, 10×buffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 15 mM MgCl₂), 2.5 mM의 dNTP mixture, 20 pmol의 SSR 프라이머, 1 units의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 실시하였다. PCR은 UNOII Thermocycler (Biometra, Germany)에서 45 cycle을 실시하며, denaturation은 94°C에서 30초분, annealing은 45~60°C에서 35초, 그리고 extension을 72°C에서 45초로 수행하였다. 증폭된 DNA 산물은 6% polyacrylamide sequencing gel에 2시간 전기영동한 다음 Silver sequenceTM staining reagents (Promega, USA)로 염색하여 band를 확인하고 다형성 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 수치화하여 기록하였다.

② STS 마커의 선발

협동연구기관에서 개발된 STS 프라이머의 적용가능성을 탐색하기 위하여 '조은꿀'의 24품종을 이용하여, 수박의 품종 식별에 적용 가능성이 높을 것으로 추정된 AFLP fragment 유래의 STS-PCR 프라이머 및 EST분석에서 확보된 STS-PCR 프라이머 조합 50개를 이용하였다. PCR은 반응액의 조성은 수박 genomic DNA 25 ng을 template DNA로 이용하여, 10×buffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 15 mM MgCl₂), 2.5 mM의 dNTP mixture, 50 pmol의 SSR 프라이머, 1 units의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 실시하였다. PCR은 UNOII Thermocycler (Biometra, Germany)에서 touch-down PCR로 10 cycles [95°C 10초, 55°C → 50°C ($\Delta = -0.5^\circ\text{C}/\text{cycle}$) 30초, 72°C 40초]을 실시하고, normal PCR로 20 cycles [95°C 10초, 50°C 20초, 72°C 40초]과 final extension 은 72°C 10분간 수행하였다.

3) SSR 마커의 다형성 검정 및 품종간 유연관계 분석

수박 품종식별을 위하여 SSR 마커 선발에서 다형성을 보인 70개를 49품종(Table 4-1)에 확대하여 DNA 분석을 실시하였다. SSR 마커의 다양성을 조사하기 위하여 대립유전자의 수와 아래의 공식을 이용하여 PIC (polymorphism information content) 값을 산출하였다. 여기에서 P_{ij} 는 마커 i 의 밴드들 중에서 j 번째 공통 밴드 패턴의 빈도수이다 (Anderson et al. 1993).

$$PIC^i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^r p_j^2$$

공시품종별로 유전적 유사도는 NTSYSpc program (Rohlf 1993)을 이용하여 Jaccard (Sneath and Sokal, 1973) 방법에 의해 산출하였고, 이 값을 근거로 하여 비가중산술방식 (UPGMA : unweighted pair group method using arithmetic averages)에 의해 집괴분석한 다음 dendrogram을 작성하고 품종간 유전적 유연관계를 비교 분석 하였다.

4) 품종식별용 최소 마커의 선정

수박 품종식별에 적합한 분자표지의 최소 SSR 마커 세트를 확정하기 위하여 SSR 마커의 대립유전자의 패턴이 선명하고 반복 재현성이 우수한 29개를 선정하여 각 품종별로 코드화한 다음 dendrogram을 작성하여 품종 식별 여부를 판단하였다. 그리고 전체 70개 SSR 마커에 의해 작성된 dendrogram과 품종식별용 분자표지 29세트에 의해 작성된 dendrogram의 일치도 정도를 Mantel matrix test 방법(Mantel, 1967)에 의해 상관계수를 구하고 적합성 여부를 분석하였다.

5) 수박 형태적 특성과 SSR 마커와의 상관 분석 및 품종간 최소거리설정

협동연구기관에서 조사된 수박 29품종에 대한 형태적 특성중 계급화가 가능한 배수성의 33형질과 70개의 SSR 마커에 의해 작성된 덴드로그램의 상관정도를 Bernet et al. (2003)의 방법에 의해 분석하였다. 그리고 품종간 최소거리를 설정하기 위하여 유전적 유사도가 높은 ‘삼복꿀’과 ‘페스티발’ 두 품종을 선정하여 수박 특성조사 결과와 형질별 차이를 비교분석하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 품종식별용 분자표지의 선발

① 박과작물에서 유래된 SSR 마커의 선발

멜론과 참외에서 유래된 SSR 마커를 이용하여 수박에 이용 가능성을 조사한바(Table 4-2), 멜론에서 유래된 SSR 마커 231개중 70% 이상은 유전자 증폭이 일어나지 않았거나 비특이적인 증폭을 나타내었고, 특이적인 증폭이 된 마커 가운데서 대부분이 monomorphic 한 밴드 양상을 나타내었으며, 분석 개체수의 4.3%인 10개만이 24품종 내에서 다형성 반응을 나타내었다. 오이에서 유래된 SSR 마커의 경우도 수박에 이용하였을 때 멜론 유래의 SSR 마커와 유사한 경향을 나타내었다. 한편, 멜론과 오이의 SSR primer를 수박에 적용하였을 때 특이적인 유전자 증폭을 보인 마커의 경우 증폭되는 산물의 크기가 다르게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 4-1). 수박에서 유래된 SSR 마커의 경우는 검정된 88개의 마커중에서 37개가 다형성을 나타내었다. 따라서 수박, 멜론, 오이에서 개발된 SSR 마커로부터 다형성을 보이는 51개의 마커를 선발할 수 있었다.

Table 4-2. Transferability of SSR markers developed from *Cucurbit* varieties in watermelon

SSR origin	No. of tested markers	Type of amplified SSR markers		
		Poly	Mono	Total
Melon	231	10 (4.3)	50 (21.6)	60 (26.0)
Cucumber	96	4 (4.2)	17 (17.7)	21 (21.9)
Watermelon	88	37 (42.1)	51 (57.9)	88 (100.0)
Total	415	51 (12.3)	118 (28.4)	169 (40.7)

박과 작물의 경우 멜론이나 오이의 genomic library에서 개발된 SSR 마커가 수박, 호박 등의 작물에 이용할 수 있는 가능성에 대해 Chiba et al. (2003)과 Ritschel et al. (2004)이 보고한 있으나 이를 수박의 품종간 유사도 검정에 실용적으로 활용한 예는 거의 없는 실정이다. 최근에 다른 종에서 개발된 SSR 마커를 이용하는 방안이 몇몇 연구자에 의해 보고되

고 있는데, Yamamoto et al. (2004)은 복숭아와 사과에서 유래된 SSR 마커를 모과의 품종 식별에 활용한 바 있다. 본 연구에서도 멜론, 오이에서 개발된 SSR 마커를 이용하여 수박에 적용이 가능한 것으로 나타나 이종에서 개발된 SSR 마커를 품종식별에 활용한다는 측면에서 Yamamoto et al. (2004)의 연구결과와 유사한 양상을 나타내었다. 한편 오이와 멜론의 SSR 마커를 수박에 이용하였을 때 PCR 산물 크기의 차이가 나타나는 allelic difference 현상의 경우 Danin-Poleg et al. (2001)과 Chiba et al. (2003)에 의해 보고된 바 있다.

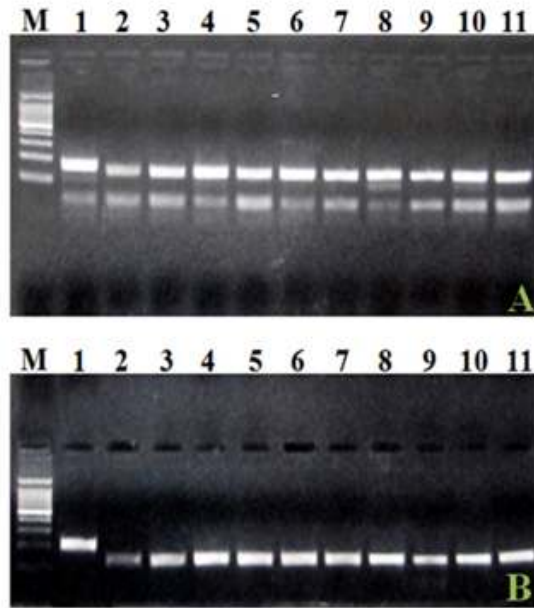


Figure 4-1. PCR amplification patterns and transferability of cucumber SSR (CSGTT15b) (A) and melon SSR markers (CMTC168)(B) in watermelon. The amplified products were separated on 2.5% agarose. A: polymorphism among cucumber and watermelon varieties, Lane M, 100 bp ladder, 1. Cucumber; 2-11. Watermelon. Lane 1. Euncheonbaekdadagi, 2. Black-Diamond, 3. Calhoun-Gray, 4. Au-Producer, 5. Congo, 6. Jubilee, 7. Charleston-Gray, 8. PI189225, 9. Sugar-Baby 10. Heungnonggul, 11. Geumbo. B: polymorphism among the melon and watermelon varieties of melon SSR. 1. VIP(melon); 2-11. Watermelon varieties are referred to in Fig 1A.

② 협동연구기관에서 개발된 DNA 마커의 선발

i) SSR 마커 선발

협동연구기관에서 분양받은 총 91개의 SSR 염기서열을 근거로 하여 프라이머를 작성한 다음 품종 중에서 ‘삼복꿀’과 ‘페스티발’에 PCR을 수행한 바 38개가 안정적으로 증폭되었고, 이들 프라이머중에서 19개가 다형성을 나타내었다. 그러나 나머지 53개의 프라이머는 PCR 반응이 일어나지 않거나 비특이적으로 증폭되는 경향을 보였다(Table 4-3). 이러한 연구 결과는 Jarret et al. (1997)과 Hu et al. (2004)이 수박과 고구마의 SSR 마커의 개발시 특이적인 PCR 산물을 얻을 수 마커의 비율이 낮다는 것을 보고한 바 있는데 본 연구에서도 이를 확인할 수 있었다.

Table 4-3. Polymorphism of SSR markers developed by Korea University

No	No. of SSR 마커s	Type of amplified SSR 마커s		Poly	Mono
		Non-specific	Specific		
1	WS01-16(16)	5	11	7	4
2	WS17-49(33)	20	13	10	3
3	WS50-64(15)	8	7	1	6
4	WS65-91(27)	20	7	1	6
Total	91	53	38	19	19

ii) STS 마커 선발

수박 AFLP fragment 유래의 STS-PCR 프라이머 조합 35개와 및 EST 분석에서 확보된 STS-PCR 프라이머 조합 51개를 이용하여 1년차 연구에서 분석되었던 ‘삼복꿀’의 23 품종간 다형성 정도를 분석 한 바, 대부분의 프라이머는 수박 유통품종내에서는 다형성을 보이지 않고 수박 유전자원 9품종 (Black-Diamond, Calhoun-Gray, Au-Producer, Congo, Jubilee, Charleston-Gray, PI189225, Sugar-Baby, PI296341-FR) 내에서만 다형성을 나타내었다(Fig. 4-2). 따라서 수박의 경우 STS보다는 SSR 분석 방법이 품종식별 마커의 개발에 효율적인 것으로 사료되어 연구 2, 3년차부터는 SSR 분석 기법에 의한 품종식별 체계를 구축하는데 초점을 맞추어 수행하였다.

2) SSR 마커의 다형성 검정

수박 49품종의 genomic DNA와 본 연구기간 동안 선발된 70개 SSR primer를 이용하여 PCR을 수행한 바, 총 262개의 밴드가 증폭되었으며, 프라이머당 평균 밴드의 수는 3.74개로 나타났다. 그리고 각각의 프라이머에 의해 증폭된 대립유전자의 수는 2~8개로 비교적 다양한 분포를 보였고, PIC 값은 0.078~0.800 범위에 분포하였으며, 평균치는 0.382였다(Table 4-4).

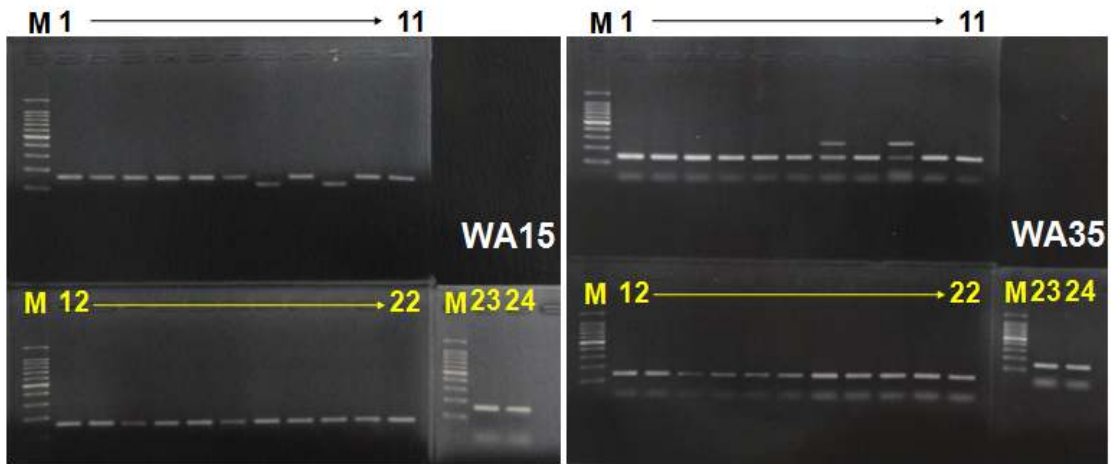


Figure 4-2. Polymorphism for STS markers, WA15 and WA35 (B). The amplified products were separated on 2.0% agarose gel.

1. Black Diamond, 2. Calhoun Gray, 3. Au-Producer, 4. Congo, 5. Jubilee, 6. Charleston Gray, 7. PI189225, 8. Sugar Baby, 9. PI296341-FR, 10. Heungnonggul, 11. Geumbo, 12. Soseulsaem, 13. Dalgona, 14. Choeunggul, 15. Jiguchon, 16. Habokggul, 17. Onsesang, 18. Chilbokggul, 19. Festival, 20. Tojonggul, 21. Sacheolggul, 22. Sambokggul, 23. Chanchan, 24. Bitna

일반적으로 수박을 RAPD, AFLP 분석 등과 같이 DNA 마커로 분석하였을 때 다형성을 나타내는 밴드의 검출이 상당히 어려운 것으로 알려져 있다. 실제로 Jarret et al. (1997)은 수박을 SSR 분석하였을 때 야생형 수박과 재배종간에는 효과적으로 유전적 유연관계를 설정할 수 있으나 이용 가능한 마커의 수가 극히 제한되어 있을 뿐만 아니라 평균 대립유전자의 수도 다른 작물에 비해 낮게 나는 것으로 보고되고 있다. 그러나 벼의 경우 65개의 SSR 마커에 의해 발생된 대립유전자의 수는 2~18개로 다양한 분포를 보이는 것으로 보고한 바 있고 (Kwon et al. 2002), 고구마에서는 SSR 마커의 분석 결과 2~9개의 대립유전자가 증

폭되며 평균 대립유전자의 수는 4.7개라고 하였으며 (Hu et al. 2004), 토마토에서 158개의 SSR 마커를 이용하여 19품종을 분석하였을 때 2~6개의 SSR allele이 증폭되고 PIC 값은 0.09~0.67의 범위 안에 분포함을 보고하였다 (He et al. 2003). 본 연구에서도 수박 49품종을 SSR 분석하였을 때 발생하는 평균 대립유전자의 수가 벼 보다 낮게 나타나 Jarret et al. (1997)의 연구결과를 확인할 수 있었으며, He et al. (2003)이 연구한 토마토와 Hu et al. (2004)이 고구마에서 보고한 SSR allele의 수와 유사한 경향을 보였으나, PIC 값의 경우 토마토의 연구결과 보다 높게 나타났는데 이는 본 연구에 이용된 품종들의 유전적 조성이 다양하기 때문에 나타난 결과라고 사료된다.

3) SSR 마커에 의한 품종간 유연관계 분석

70개의 SSR 마커를 이용한 수박 49품종의 유전적 유사도를 분석한 바 (Fig. 4-3), 전체 유사도 지수는 0.18~0.99의 범위로 나타났으며, 유전적 유사도 값 0.70을 기준으로 할 때 49 품종을 5개의 품종군으로 분류할 수 있었다. 제 I 그룹은 ‘스피드’의 33품종이 속하였으며, 이들 품종들의 유전적 유사도가 아주 높은 것으로 조사되었다. 특히 ‘스피드’와 ‘해동꿀’, ‘삼복꿀’, ‘칠복꿀’, ‘하복꿀’, ‘찬찬’, ‘페스티발’, ‘오복꿀’, ‘조은꿀’과 ‘온세상’, ‘소슬샘’과 ‘달고나’는 95%이상의 유전적 유사도를 나타내었다. I 그룹내에서도 과의 크기가 작은 ‘꼬마’와 ‘복’, 과육과 과피가 노란색인 ‘03118’, ‘03130’, ‘04279’, ‘04280’, 3배체 수박인 ‘씨제로’와 ‘씨제로꿀’이 하나의 소그룹을 형성하는 것으로 나타났다. II 그룹은 ‘Champion’의 7품종이 속하였으며, III 그룹은 ‘Calhoun-gray’, ‘Jubilee’, ‘Charleston-gray’가 분류되었고, IV 그룹은 ‘Black-Diamond’, ‘Au-producer’, ‘Congo’가 하나의 품종군으로 분류되었다. 그리고 V 군에서 야생형 수박인 ‘PI189225’와 ‘PI296341-FR’이 속하였는데 이들 품종간에는 유전적 유사도 지수가 낮게 나타나 유전적 거리가 비교적 먼 것으로 분석되었다.

식물의 품종간 유연관계 분석에는 형태적 특성이나 세포학적 연구 및 동위효소가 연구초기에 이용되어 왔으나, 최근에는 RFLP, RAPD, AFLP, SSR 등의 DNA 마커가 활용되고 있다 (Staub et al. 1996). 수박의 경우 분석방법에 따라 그 효율성이 다른 것으로 보고되고 있는데, RAPD 분석은 다형성을 나타내는 밴드가 적게 나타나기 때문에 품종의 유전적 유연관계 분석에 한계가 있는 것으로 보고되고 있고 (Lee et al. 1996), AFLP 분석법을 이용한 수박의 품종간 유연관계 분석의 경우 RAPD 방법보다 많은 다형성 밴드를 얻을 수 있어 효율적이라고 보고되고 있으나 (Che et al. 2003), dominant 마커기 때문에 F₁ 품종의 근연관계 분석에는 적합하지 않다고 하였다 (UPOV, 2002).

Table 4-4. No. of alleles and PIC values of the SSR markers selected for genetic characterization of watermelon varieties

Primer designation	Repeat motif	Annealing Temp.	No. of alleles	PIC value	Product size
WM03*	Not identified	53	3	0.340	250
WM07	(AAAG)3	53	2	0.190	118
WM13*	(TG)5(TTCC)5	53	3	0.433	232
WM40*	(CT)2T(TC)(GA)2A(CT)T2 N4T5CT5G(CT)T4N8(CT)2 T(TC)2C(CT)14	55	3	0.594	232
WM52	(CT)3AT(CT)4(TC)2N5(CT)4 N14(CT)2	50	2	0.150	185
WM85	T(TC)7T2(TC)(CT)T10?	45	2	0.150	300
WM137	(CT)10	55	3	0.190	162
WM139*	(CT)18	55	6	0.800	190
WM141	(CT)15	55	6	0.534	200
WM142	(CT)18	55	2	0.190	283
WM151	(GA)7, (GA)5	55	2	0.078	163
WM154	[(CT)4TC]2(CT)4	48	3	0.192	100
WM168	(CTT)13	54	5	0.553	130
WM184	(CT)21(TG)8	45	5	0.184	195
WM193	(CT)11	42	5	0.190	594
WM322	(TC)14	48	2	0.190	120
WM336	(TC)2(TCC)2(CT)8N122(TC)8	49	3	0.254	160
WM339	(GTT)6	52	2	0.190	145
WM343	(CT)3GA(TC)9(CT)5	52	3	0.183	311
WM392*	(CTT)5(CT)3	52	6	0.777	120
WM701*	(TG)8	50	2	0.448	218
WM702*	(AC)36	50	5	0.730	237
WM703*	(TA)9N36(GT)8	50	6	0.473	188
WM704*	(AAG)9	55	4	0.677	249
WM705	(AAT)11	50	3	0.223	208
WM706*	(AAAT)8	55	3	0.350	291
WM707	(AG)20	50	5	0.227	241
WM708*	(AAG)7N69(AT)26	58	4	0.751	246
WM709*	(AG)25	50	5	0.545	211
WM710*	(AAT)15	50	6	0.741	240
WM711	(AAT)14	50	3	0.080	241
WM712*	(AG)11(AAG)5	50	4	0.401	218
WM713	(CA)10N14(AAGG)4	50	2	0.273	244
WM715	(AAG)5N191(AAG)4	50	4	0.190	273
WM716	(AG)11	50	3	0.327	193

(Table 4-4 continued)

Primer designation	Repeat motif	Annealing Temp.	No. of alleles	PIC value	Product size
WM718	(AAT)10	50	4	0.155	250
WM719	(AG)13	50	3	0.190	180
WM720	(AAT)12	58, 35cycle	4	0.226	223
WM721	(AAT)13(AAAAT)4	50	2	0.078	184
WM722*	(AAG)9	50	3	0.494	285
WM723	(AG)13	50	2	0.190	233
WM724*	(AAG)10	50	3	0.703	266
WM725*	(AAG)6A22	50	3	0.475	252
WM726*	(AAG)5A(ATC)8	50	3	0.606	264
WM727*	(AG)8N173(TA)8	50	6	0.707	271
WM728	(AG)11	50	2	0.078	300
WM729	(AAT)9	50	4	0.118	166
WM730*	(TA)8N27(AAG)5	50	4	0.574	290
WM731	(AAT)9	50	2	0.078	285
WM733	(AAG)11	50	4	0.294	127
WM736*	(AAAT)5	50	4	0.515	249
WS001	(CT)19	50	5	0.359	147
WS005*	(CT)37	50	6	0.747	276
WS009*	(GA)24	45	7	0.781	153
WS011	(GA)26	50	4	0.359	122
WS014	(GA)26	49	5	0.489	239
WS015	(CT)11	47	2	0.403	96
WS016	(GA)17	47	3	0.401	81
WS022	(CT)3CTTT(CT)19	55	3	0.223	285
WS024	(GA)23	55	3	0.327	201
WS026	(GA)7GAAA(GA)7	55	2	0.190	260
WS027	(GA)8AA(GA)7	47	2	0.078	236
WS030*	(CT)14	47	7	0.624	203
WS031	(GA)23	47	5	0.326	209
WS032*	(CT)14	47	4	0.734	208
WS037*	(CT)23	47	4	0.640	178
WS038	(CT)19	47	2	0.223	196
WS044*	(CT)12	54	7	0.657	120
WS062*	(CT)23	55	3	0.503	256
WS079*	(GA)48	55	5	0.228	318
Mean			3.74	0.382	

* 품종식별을 위해 선정된 최소 마커

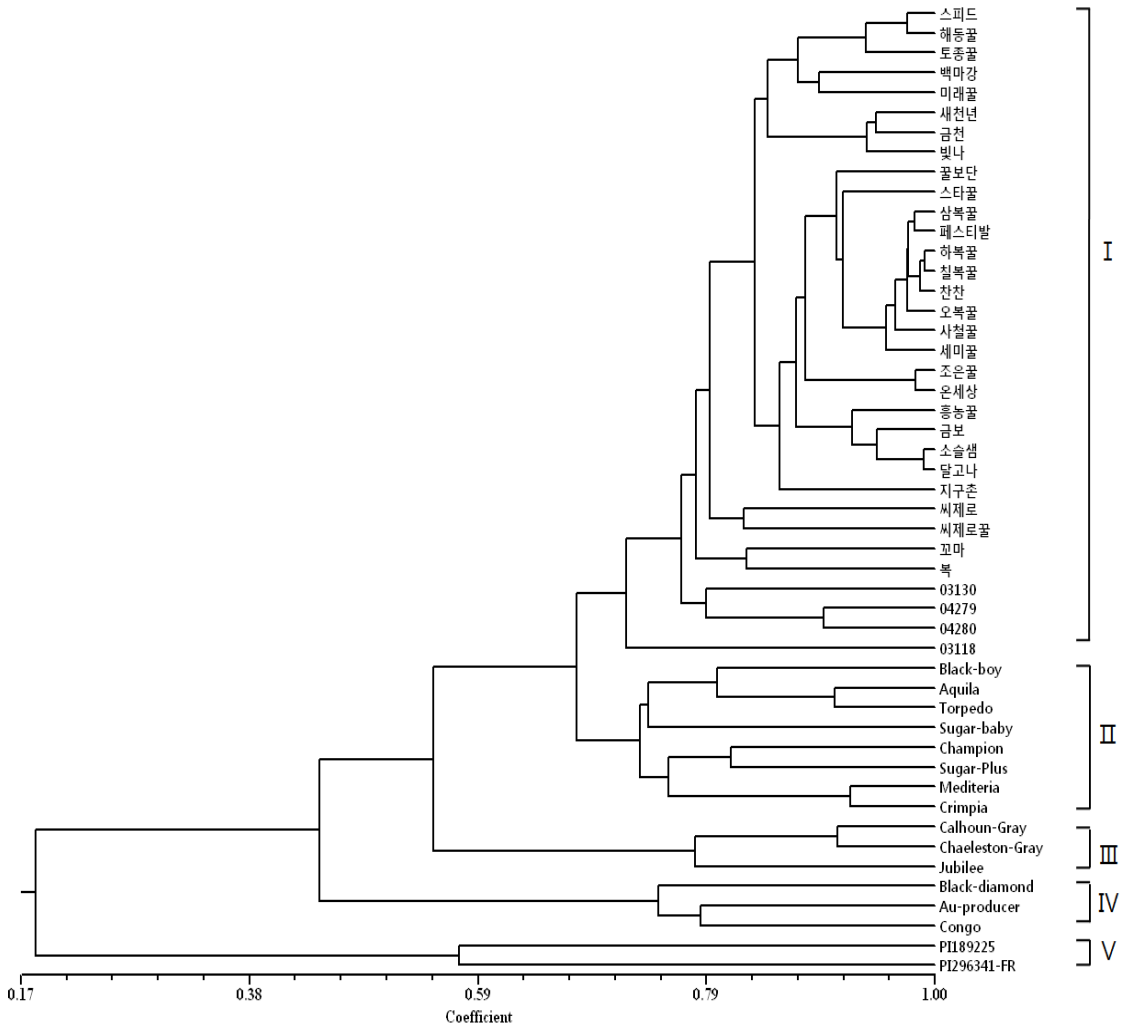


Figure 4-3. Dendrogram depicting the classification of 49 watermelon varieties constructed using UPGMA and based on 70 SSR markers. The major clusters are marked on the right side of the dendrogram. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

SSR 분석법의 경우 수박의 유전자원의 평가에 효율적이라고 Jarret et al. (1996)이 보고한 바 있고, Guerra-Sanz (2002)는 F1 품종의 품종 식별에 적용 가능성을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 SSR 분석법을 활용하여 수박 49품종은 유전적 유사도에 따라 5개의 품종군으로

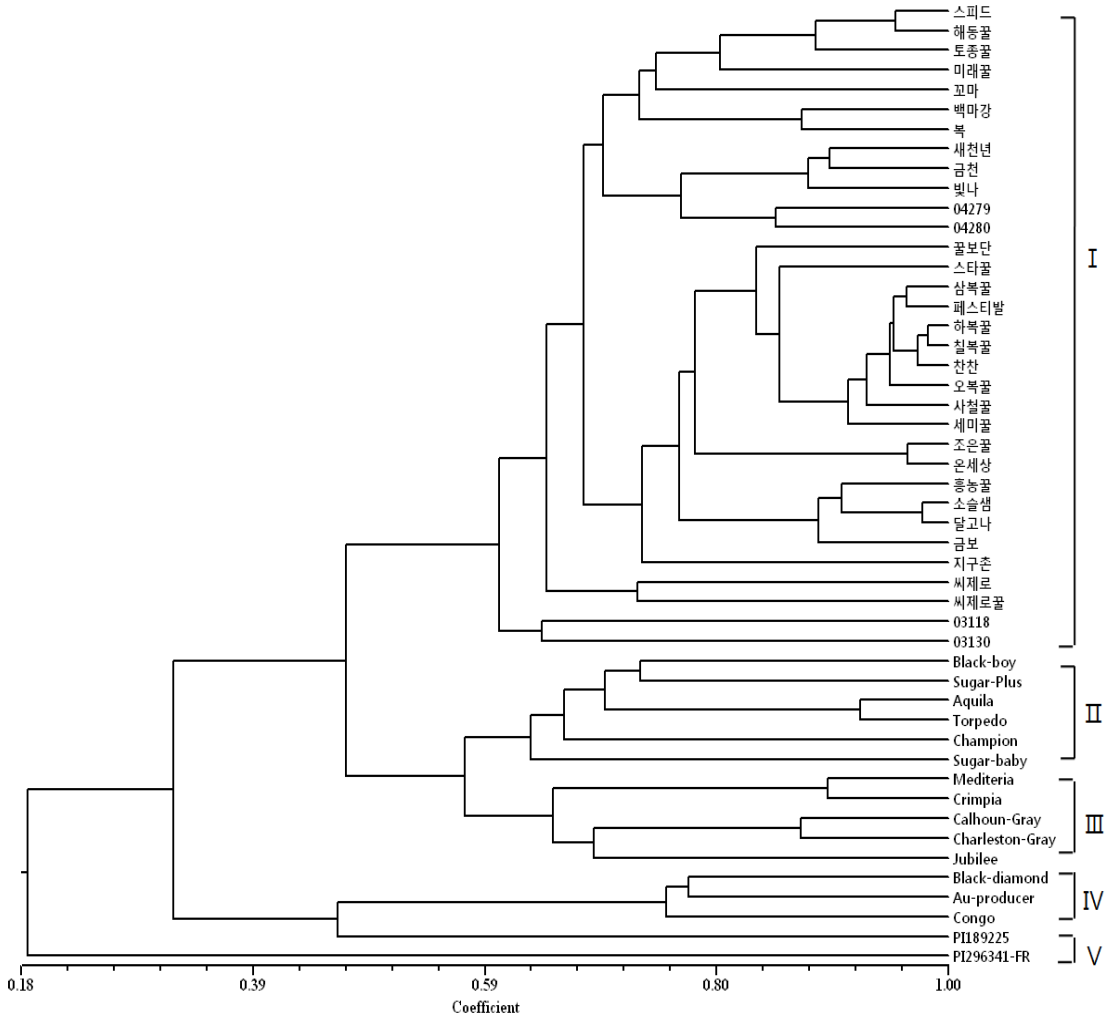


Figure 4-5. Dendrogram depicting the classification of 49 watermelon varieties constructed using UPGMA and based on 29 SSR markers. The major clusters are marked on the right side of the dendrogram. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

한편 70개의 SSR 마커와 29개의 SSR 마커에 의해 작성된 덴드로그램의 상관관계를 Matel Matrix 분석방법에 의한 상관정도를 분석한바(Fig. 4-6), 상관계수가 0.92로 높게 나타나 29개의 SSR 마커로 분석하면 수박의 품종간 유연관계 분석 뿐만 아니라 품종식별에 아주 유용하게 이용될 수 있는 것으로 나타났다.

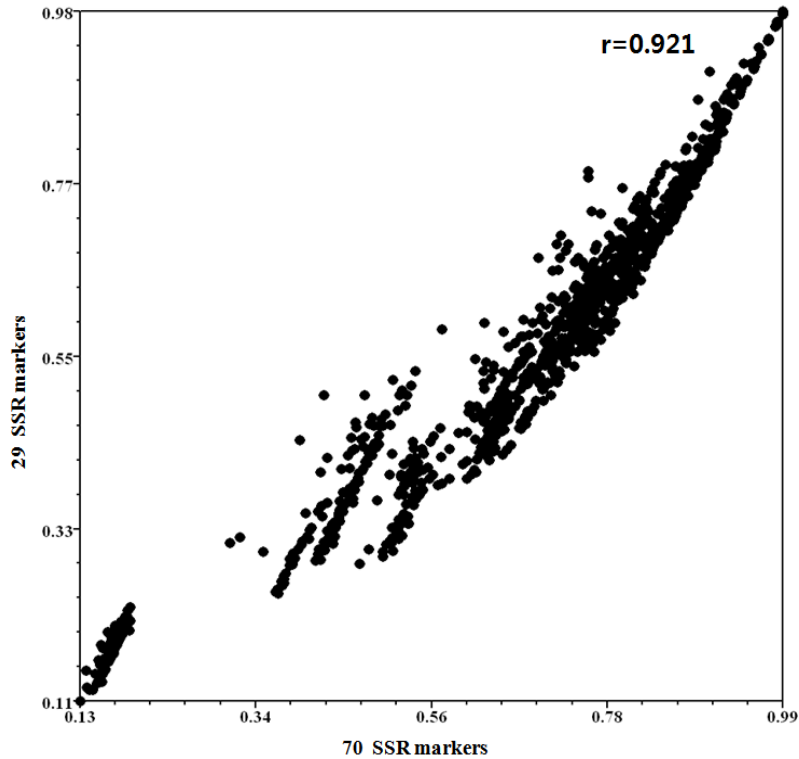


Figure 4-6. Comparison between 70 SSR markers and 29 SSR markers using the Mantel test. Correlation coefficient is 0.921.

분자표지에 의한 품종식별 마커의 개발에 대한 연구가 네덜란드, 미국, 일본 등의 국가에서 보고되고 있다. 네덜란드의 경우 토마토, 장미 등의 품종을 식별할 수 있는 SSR 마커를 개발하고 이를 D/B화 하여 품종보호에 활용하고 있으며, 일본에서는 딸기, 복숭아, 벼 품종을 식별할 수 있는 분자 마커를 개발하여 자국 농산물의 국경검색 및 유통품종의 관리에 활용하고 있다. 아르헨티나의 경우도 콩 품종식별 SSR 마커를 이용하여 출원품종의 대조품종 선정의 활용 가능성 등에 대해 보고한 바 있다. 미국의 경우 벼, 박과작물, 가지과 작물의 유전체 연구를 수행하여 다양한 분자표지의 정보를 공개하고 있는 실정이다. 우리나라에서도 벼, 콩 등의 품종 식별 마커가 개발되어 품종의 순도검정, 원산지 규명 등에 활용하고 있고, 최근에 채소 작물의 품종의 진위성 구명에 대한 요구도 또한 증가하고 있는 추세이다. 따라서 본 연구에서 개발된 수박 품종의 식별 검정 방법은 국내외 연구 활용 동향에 비추어 볼 때 유통품종에 대한 품종 진위성 구명, 분쟁증자 대비시험, 품종보호권 침해 등과 같은 분야에 매우 유용하게 이용될 수 있으리라 사료된다.

5) SSR 마커의 genotype과 형태적 특성과의 상관분석 및 품종간 최소거리설정

연구 2년차에 협동연구기관에서 조사된 수박 29품종 중에서 계급화가 가능한 배수성의 32형질의 형태적 특성과 70개 SSR 마커의 genotype과 상관관계를 분석한바 상관계수가 $r=0.523$ 으로 낮게 나타났다 (Fig. 4-7).

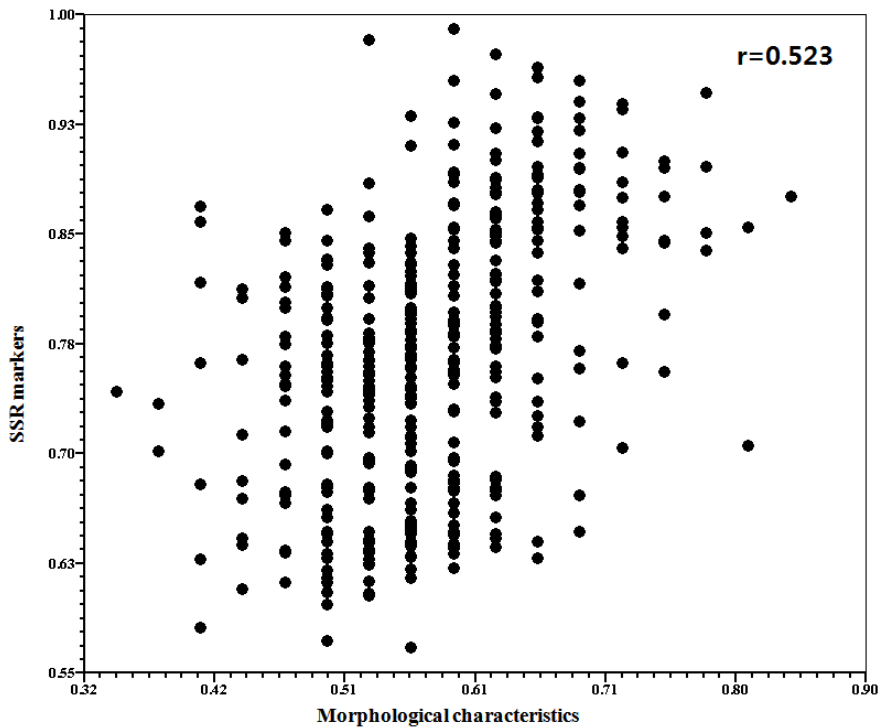


Figure 4-7. Comparison between SSR markers and morphological traits using the Mantel test. Correlation coefficient is 0.523.

한편, 수박품종에 대한 품종간 최소거리를 설정하기 위하여 SSR 마커에 의한 유전적 유사도 정도가 95%이상인 ‘삼복꿀’과 ‘페스티발’을 선정하여 협동연구기관에서 연구 2년차에 특성 조사와 비교 분석한 바 잎몸색, 암꽃의 꽃잎 끝부분의 모양, 과실 세로로 자른면의 모양, 과실꼭지부위의 모양 등의 형질에서 차이를 나타내었다. 이러한 이유는 연구 2년차에 수박 재배시 잦은 강우와 일조량 부족으로 이해 제반 형질이 충분히 발현되지 못했기 때문이거나 본 연구에 선발된 DNA 마커가 형태적 특성과 관련 정도가 낮기 때문에 나타난 결과라고 추정된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 재배시험의 연차간 수행에 의한 공시품종의 특성을 정형화한다음 보다 정밀한 DNA 마커를 추가적으로 활용한다면 국내유통품종

에 대한 품종간 최소거리의 설정이 가능하리라 생각된다.

품종보호에 분자표지의 활용에 대해 Bernet et al. (2003)은 오이에서 RAPD 마커와 형태적 특성과의 상관정도가 0.650으로 낮게 나타남을 보고하였으며, Kwon et al. (2005)도 고추 SSR 마커와 형태적 특성의 관계를 분석하여 상관 정도($r=0.683$)가 낮게 나타남을 지적한 바 있다. 본 연구에서도 수박 형태적 특성과 분자 마커간의 상관정도가 낮게 나타나 Bernet et al. (2003)과 Kwon et al. (2005)의 연구결과를 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과는 DNA 분석 결과 만으로는 품종의 구별성에 활용할 수 없음을 제시하고 있으며, 금후 유전자지도 작성을 통한 양적형질 유전자좌 분석 수준에서 보다 면밀한 검토가 이루어진다면 분자표지와 형태적 특성과의 상관정도가 높게 나타날 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 SSR 마커 분석 결과는 우리나라 유통품종의 근연관계를 잘 나타내고 있기 때문에 이를 이용하여 국내 유통품종의 DNA profile을 D/B화하여 향후, 출원품종의 대조품종의 활용 가능성 등에 대한 좀 더 깊이 있는 연구가 수행되어야 될 것으로 사료된다.

제 2 절 수박 F₁ 종자 순도검정 이용과 유전분석

1. 서언

수박은 양친을 고정시키고 이를 교배하여 양성된 일대 잡종(F₁) 품종이 대부분이다. 잡종강세육종법을 이용하는 것은 생산력의 증대가 확실하고 균일한 생산물을 얻을 수 있는 장점이 있다. 그러나 양친 교배시 타 화분의 오염, 모본(♀)만의 수정, 다른 종자의 단순 혼입 등으로 인하여 순도가 떨어질 수 있다. 이러한 이유 때문에 종자 순도와 관련하여 농가와 종자 회사간에 분쟁이 종종 발생하기도 한다.

종자의 순도검정은 형태적 검정, 화학적 검정, 전기영동에 의한 단백질 검정, 분자표지에 의한 방법을 주로 이용하고 있다. 수박과 같이 양친 간에 유전적 유사도가 높거나 계놈의 크기가 큰 작물의 경우에는 단백질 검정이나 분자생물학적 기법을 이용하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다. 따라서 육종업체의 경우 수박 F₁ 종자 순도검정은 양친을 교배한 다음 F₁의 형태적 관찰에 의한 포장검정을 수행하고 있는 실정이다. 이러한 방법은 재배면적과 인력이 많이 소요될 뿐만 아니라, 수박을 수확하여 양친과의 형태적 특성을 비교하기까지는 상당한 시간이 걸리기 때문에 실효성이 떨어지는 문제점이 있을 뿐만 아니라 검정자의 주관적인 판단에 의하기 때문에 순도검정의 정확도에 문제가 발생할 수 있다.

최근에는 이러한 형태적 검정의 관행에서 벗어나 분자생물학적 기술에 의해 F₁ 종자의 순도검정을 실시하는 예가 벼, 고추 목화, 양배추 등에서 보고되고 있다. 지금까지 개발된 분석 방법중에서 RAPD, ISSR, AFLP 마커의 경우 마커의 유전양상이 dominant 패턴을 나타내기 때문에 화분친에 특이적인 마커를 선발해야 된다는 단점이 있다. 그러나 SSR 방법은 DNA 반복 서열을 근거로 PCR 프라이머를 제작하여 이용하기 때문에 재현성이 높고 마커의 유전양상이 co-dominant 패턴을 보이기 때문에 양친의 유전자형이 모두 나타난다는 장점이 있으나 수박의 경우 아직까지 SSR 분석을 이용한 F₁ 순도검정 방법에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 과제에서는 협동연구기관에서 제공된 수박 5품종의 양친과 ‘스피드’와 ‘꿀보단’의 F₁ 및 F₂ 집단과 품종식별 마커의 개발에서 밴드의 패턴이 깨끗하고 재현성이 우수한 SSR 마커를 이용하여 F₁의 순도검정 가능성 및 F₂ 집단에서 SSR 마커의 유전양상을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

수박 F1 순도 검정에 적합한 SSR 마커를 선별하기 위하여 협동연구기관에서 분양받은 ‘금천’, ‘스피드’, ‘스타꿀’, ‘꿀보단’, ‘꼬마’의 양친에 대한 genomic DNA를 분리한 다음 수박의 품종간 유연관계 분석에서 PIC 값이 높으면서 밴드의 패턴이 깨끗한 29개의 SSR 마커를 활용하여 양친의 다형성 여부를 분석하였다. 공시품종의 식별 정도를 분석하고자, 양친 및 F1 품종에 대한 유전적 유사도를 NTSYSpc program(Rohlf. 1993)을 이용하여 Jaccard (Sneath and Sokal. 1973) 방법에 의해 산출한 다음, 비가중산술방식(UPGMA : unweighted pair group method using arithmetic averages)에 의해 집괴 분석하여 dendrogram을 작성하였다.

그리고 SSR 마커를 이용한 ‘스피드’와 ‘꿀보단’ 품종의 F1의 순도검정 가능성을 조사하기 위하여 연구 2년차에 스피드 F1 3개체, 연구 3년차에 112개체, 꿀보단 F1의 경우 연구 2년차에 1개체, 3년차에 116개를 분석하였다.

SSR 마커의 유전양상을 조사하고자, ‘금천’ 품종의 F1 3개체, F2 78개체, ‘스피드’ 품종의 F1 3개체, F2 60개체를 이용하여 SSR 마커 WM139, WM392에 대한 유전양상을 조사하였다.

Table 4-5. Watermelon varieties and parental lines surveyed in this studies

Varieties	No. of parental lines	No. of F1 plants	No. of F2 plants	Total
Geumcheon	♀ ; 2	3	78	85
Speed	♂ ; 2	2006년 ; 3	60	189
	♀ ; 2			
Starggul	♂ ; 2	2007년 ; 112	-	5
	♀ ; 2			
Ggulbodan	♂ ; 2	2006년 ; 1	-	121
	♀ ; 2			
Kkoma	♂ ; 2	2007년 ; 116	-	5
	♀ ; 2			
	♂ ; 2			

3. 결과 및 고찰

1) 수박 F1 종자 순도검정용 분자표지의 개발

분자표지인자를 이용한 F1 순도 검정 가능성을 검토하기 위하여 연구 2년차에 SSR 마커 WM3, WM139, WM392, WS05에 대해 분석 하였으며, 3년차에서는 양친에 대해 다형성을 보이는 마커를 추가적으로 확보하기 위하여 29개의 SSR 마커에 대해 분석을 실시한 다음 양친에 다형성을 보이는 13개의 순도검정용 마커를 최종 선정하였다 (Fig. 4-8).

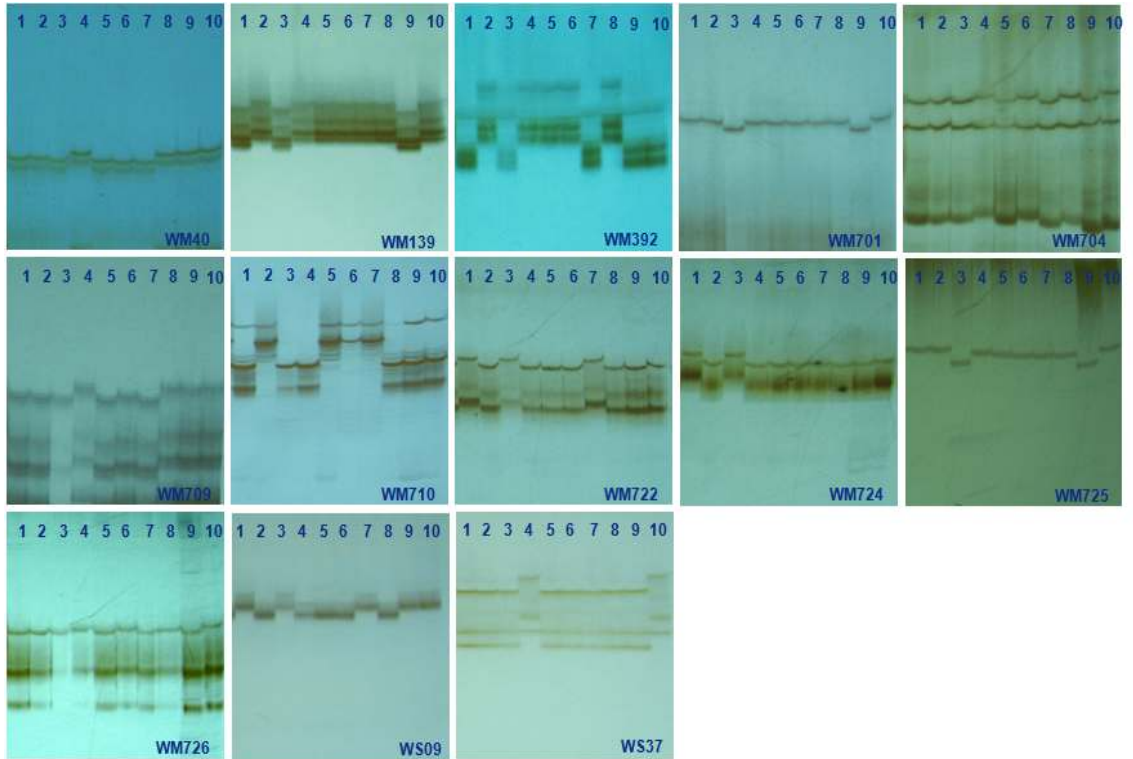


Figure 4-8. Polymorphic test of parent line for genetic purity of watermelon F1 seed of 5 combinations using the 13 SSR markers.

1. Geumcheon(♀), 2 Geumcheon(♂), 3. Speed(♀), 4. Speed(♂), 5. Starggul(♀), 6. Starggul(♂), 7. Ggulbodan(♀), 8. Ggulbodan(♂), 9. Kkoma(♀), 10. Kkoma(♂)

WM40는 ‘스피드’와 ‘꿀보단’ 품종, WM139는 ‘금천’, ‘스피드’, ‘꼬마’ 품종, WM392는 ‘금천’, ‘스피드’, ‘꿀보단’ 품종, WM701은 ‘스피드’, ‘꼬마’ 품종, WM704는 ‘스타꿀’, ‘꿀보단’, ‘꼬

마' 품종, WM709는 '스피드', '스타꿀', '꿀보단' 품종, WM710은 '금천', '꿀보단' 품종, WM722는 '금천', '스피드', '꿀보단' 품종, WM723는 '금천', '스피드' 품종, WM724는 '스피드', '꼬마' 품종, WM725는 '스피드', '스타꿀', '꿀보단', '꼬마' 품종, WS09는 '금천', '스피드', '꿀보단' 품종, WS37는 '스피드'와 '꼬마' 품종의 양친에서 다형성을 나타내어, 공시된 모든 품종의 순도 검정에 활용할 수 있는 것으로 판단하였다. 이러한 SSR 마커에 의한 분석결과를 근거로 하여 덴드로그램을 작성하였을 때 모든 품종의 양친 및 F1이 13개의 마커에 의해 구분됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-9).

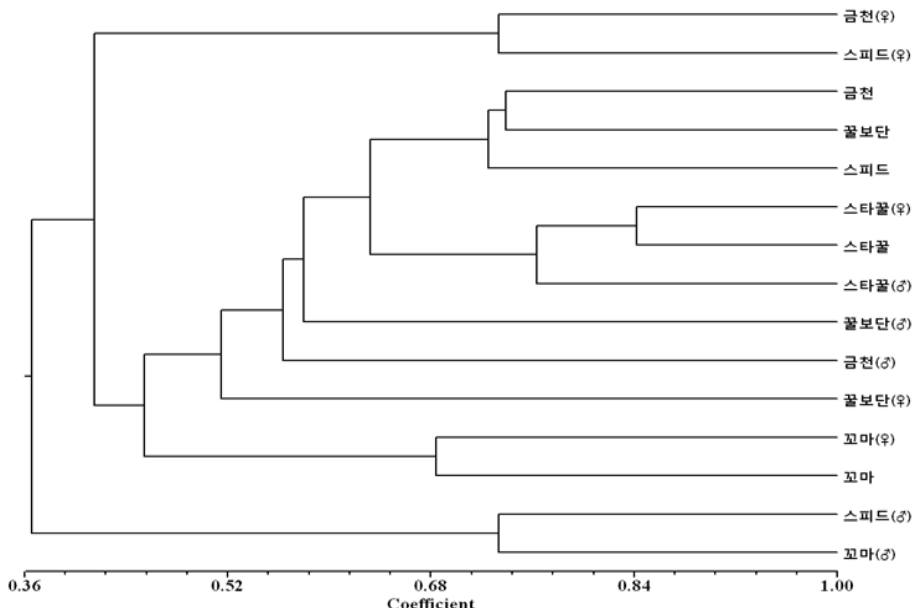


Figure 4-9. Dendrogram of the 5 watermelon varieties and parental lines based on SSR markers. The major clusters are marked on the right side of the dendrogram. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

'스피드'와 '꿀보단'의 F1 각각 112개체와 116개체를 이용하여 13개의 마커에 대해 순도검정 활용 가능성을 조사한바 분석개체 모두 양친의 대립유전자가 나타나는 이형접합성의 상태를 나타내어 종자순도에 어떠한 문제점이 없는 것으로 조사되었으며, 협동연구기관의 형태적 특성조사에서도 100% 교배됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-10, Fig 4-11).

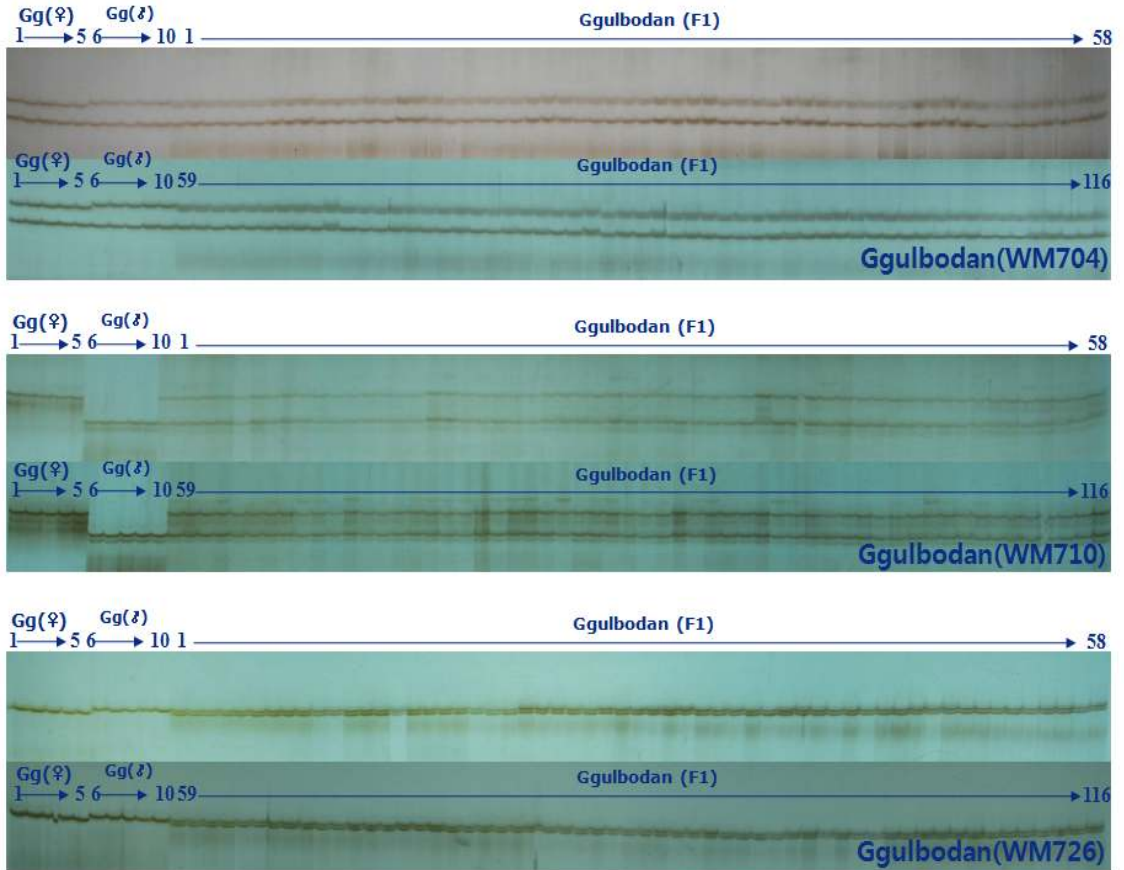


Figure 4-10. Testing genetic purity of F1 seeds of Ggulbodaan(♀)/Ggulbodaan(♂) using the SSR markers, WM704, WM710 and WM726.

최근에 F1 종자의 순도 검정에 대한 분자표지인자의 활용에 대한 연구가 인도, 중국, 스페인, 우리나라 등에서 보고되고 있다. 인도에서는 Rana et al. (2006) 목화의 종자 순도 검정을 위하여 RAPD, STMS, ISSR 마커를 활용하여 순도를 조사하였을 때 마커의 분리양상이 co-dominant를 나타내는 STMS 마커가 효율적이라고 제시하였으며, Nandakumar et al. (2004)도 벼 F1 종자 순도 검정에 이와 유사한 연구결과를 보고한 있다. 중국에서는 양배추의 종자 순도검정에 RAPD, ISSR, SSR 분석 기법을 이용하여 228개체의 F1에 대해 검정함과 동시에 형태적 특성을 조사 분석하여 분자 마커에 의한 순도검정 방법이 매우 유용하게 활용될 수 있음을 제시하였으며, 우리나라와 스페인에서는 고추 F1 순도 검정에 RAPD와 SCAR 마커를 활용하여 양친의 교배여부를 판단할 수 있는 연구결과를 보고한 바 있다 (Ballester and de

Vicente 1998; Jang et al. 2004).

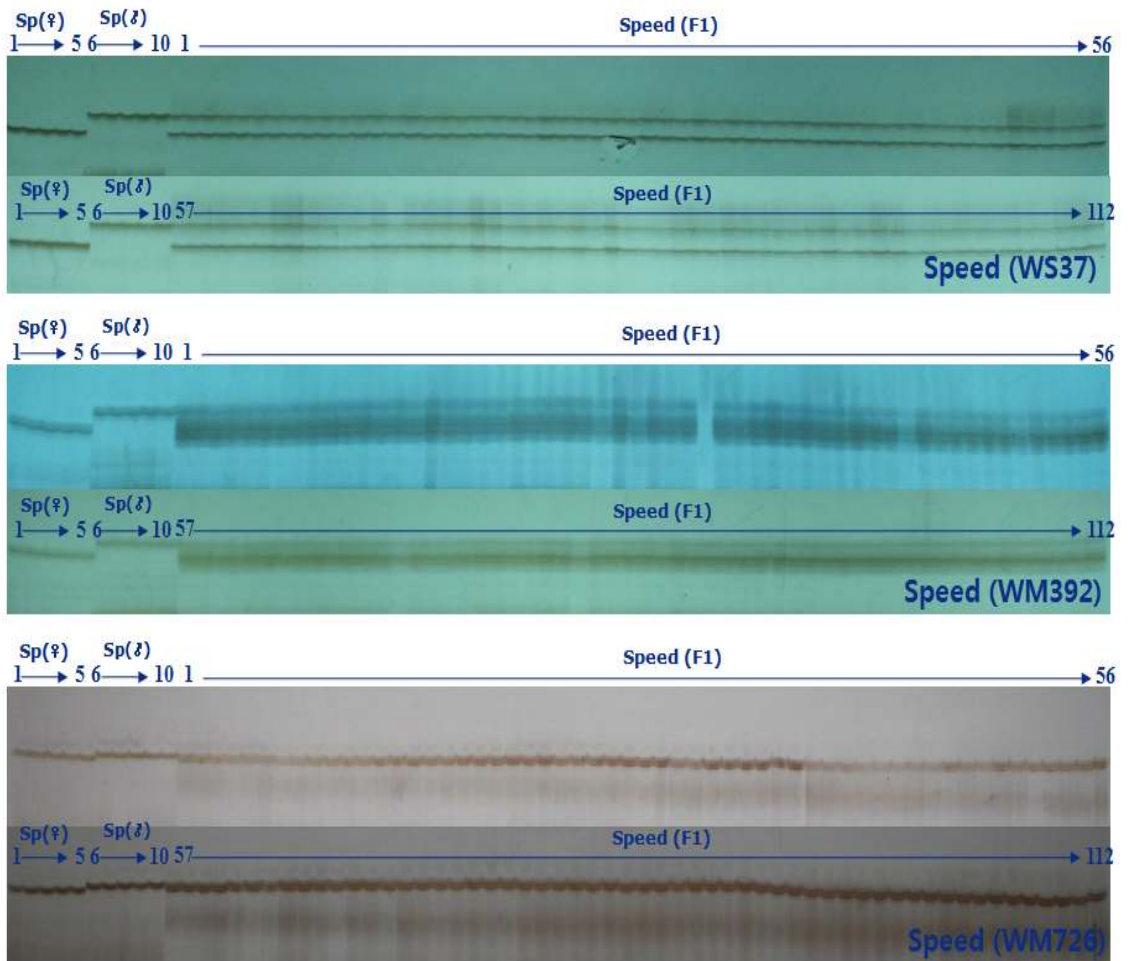


Figure 4-11. Testing genetic purity of F1 seeds of Speed(♀)/Speed(♂) using the SSR markers, WS37, WM392 and WM726.

이러한 연구결과는 종자의 F1 순도검정에 있어서 분자표지인자에 의해 화분의 오염, 모친의 자가수분 등과 같은 이형주를 판단하는데 직접적 활용이 가능하다는 것이 공통된 의견이나 RAPD나 ISSR 분석의 경우에는 마커의 유전양상이 dominant 형태를 나타내고 반복 재현성에 대한 문제 때문에 실용적 이용에는 어느 정도 한계가 있을 것으로 사료된다. 그러나 SSR 마커의 경우 양친의 대립유전자가 동시에 나타나는 co-dominant 양상을 보일 뿐만 아니라 대립유전자의 수가 많아 화분이 오염된 개체를 선별하는 장점이 있어 육종현장에서 실

용적 활용이 가능하리라고 생각된다.

2) F₂ 집단에서 SSR 마커의 유전양상

수박 F₂ 집단에서 SSR 마커의 유전양상을 조사하고자, ‘금천’ 품종의 양친, F₁ 3개체, F₂ 78개체와 ‘스피드’ 품종의 양친, F₁ 3개체, F₂ 60개체를 대상으로 하여 SSR 마커 WM139와 WM392로 분석한바 (Table 4-6, Fig 4-12, Fig 4-13), F₁의 경우 두 개의 SSR 마커 모두에서 양친의 대립유전자가 나타나는 heterozygous한 상태를 나타내었으며, F₂ 집단에서는 WM139의 경우 두 조합 모두에서 1:2:1의 이론적 분리비에 적합한 것으로 분석되었다. 그러나 WM392의 경우 ‘스피드’ 품종에서는 유전자형이 1:2:1로 분리되었으나, ‘금천’ 품종에서는 distorted segregation을 나타내었는데 이와 유사한 보고가 벼, 옥수수 등의 작물에서 이미 보고된 바 있다.

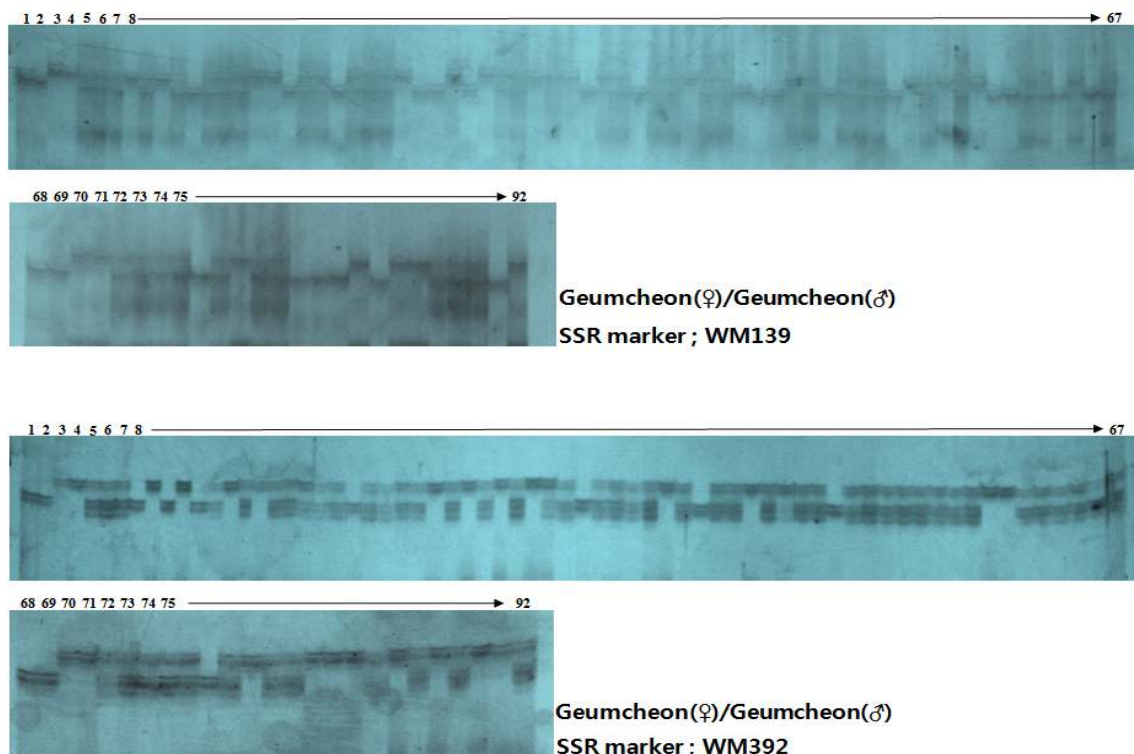


Figure 4-12. Segregation mode of SSR markers in F₂ plants derived from ‘Geuncheon (♀)/Geuncheon(♂)’. 1,2;Geuncheon(♀), 3,4;Geuncheon, 5-7;F₁ plants, 8-92; F₂ plants

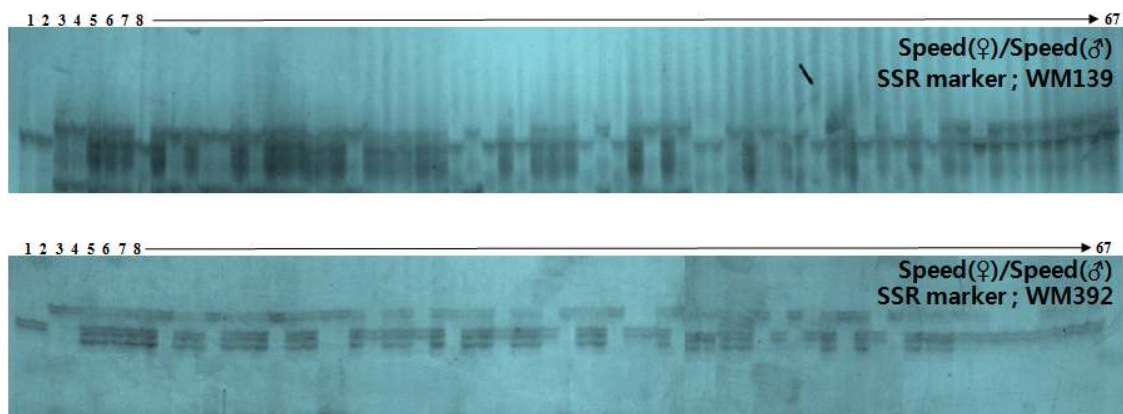


Figure 4-13. Segregation mode of SSR markers in F2 plants derived from 'Speed(♀)/Speed(♂)'. 1,2:Speed(♀), 3,4:Speed, 5-7:F1 plants, 8-67; F2 plants.

Table 4-6. Segregation mode and Chi-square goodness-of-fit tests for SSR markers in the F2 population derived from two F1 hybrids, 'Geumcheon' and 'Speed'.

Cross combinations	SSR 마커s	Segregation mode			No. of plants tested	χ^2	Types
		A	AB	B			
Geumcheon(A)/	WM139	23	36	19	78	0.09	Codominant
Geumcheon(B)	WM392	8	52	18	78	11.23	Codominant
Speed(A)/	WM139	13	36	11	60	0.39	Codominant
Speed (B)	WM392	12	30	18	60	1.20	Codominant

제 5 장 수박 유래 고유 마커의 개발과 활용

제 1 절 수박 연구재료의 선정

재료 식물은 협동연구 기관인 (주)농우바이오로부터 분양받은 수박 고정종을 사용하였으며 (Table 5-1), SSR 표식인자 확보를 위한 SSR-enriched library 제작을 위해서는 분양받은 고정종 중 “참빠른” 품종을 사용하였다.

Table 5-1. 실험에 사용한 수박 품종

No.	Cultivars	Type	
4001	03-118	F1	
4002		♀	
4003		♂	
4004	04-280	F1	
4005		♀	
4006		♂	
4007	태양	F1	
4008		♀	
4009		♂	
4010	스피드	F1	
4011		♀	
4012		♂	4009와 동일
4013	스타꿀	F1	
4014		♀	
4015		♂	
4016	우리꿀	F1	
4017		♀	
4018		♂	
4019	꿀보단	F1	
4020		♀	
4021		♂	
4022	참빠른	F1	

제 2 절 수박 genomic DNA 추출

Genomic DNA는 CTAB 방법을 변형하여 추출하였다. 적절한 양의 잎을 액체질소에서 마쇄한 다음, 2 ml tube에 500 μ l 정도를 넣고 extraction buffer 500 μ l와 β -mercaptoethanol 5 μ l를 넣어서 잘 섞어주었다. 그 다음 10% sarcosyl 50 μ l를 넣고 섞은 후 37°C incubator에서 간간히 inverting을 하며 10분간 처리하였다. 5 M의 NaCl 100 μ l와 8.6%의 CTAB 70 μ l를 넣고 잘 섞어준 후 RNase A 7 μ l (10 μ g/ μ l stock)를 넣고 inverting한 후 65°C water bath에서 가끔씩 꺼내어 inverting하면서 15분간 처리하였다. 700 μ l (2/3 volume)의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 넣고 충분히 섞어준 후 12°C, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 다시 700 μ l (2/3 volume)의 chloroform을 넣고 충분히 섞어준 후 12°C, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 0.1 volume의 NaOAc와 2.5 volume의 EtOH을 넣고 -70°C에서 20분 이상 침전하였다. 70%로 washing한 후 pellet를 30-50 μ l의 DW로 re-suspension 하였다. DNA의 양은 260 nm 파장으로 O.D값을 측정하여 결정하였다. 정량된 DNA는 PCR을 위해 5 ng/ μ l로 희석하여 사용하였다.

제 3 절 유전자 특이적 STS 표식인자 개발 및 STS-PCR 유래 SNP 표식인자 개발

염색체의 90% 정도를 차지하고 있는 non-coding region은 점돌연변이뿐만 아니라 삼입, 결실, 전좌 등의 염색체이상에도 유전자에 비해 자연선택로부터 비교적 자유롭다고 할 수 있으나, 이 부위에서 개발된 DNA 표지인자들이 실질적으로 품종의 형질특성을 지배하는 중요 유전자들과 연관되어있을 경우는 고도의 linkage analysis를 통하지 않고는 규명하기가 어렵다. 그렇기 때문에, 지금까지 사용하여온 RAPD-SCAR 전환을 통한 DNA 표지인자 개발보다는 유전자를 포함하는 염색체부위에서 선택적으로 개발하는 것이 더욱 유리하다고 판단된다. 그 이유는 첫째, 유전자는 non-coding region에 비해서 low copy 혹은 single copy로 존재하기 때문에, PCR조건이 달라진다 하더라도 상당히 안정적인 PCR 산물을 얻을 수 있으며 품종구분의 표지인자로 활용하기에 최적의 재료가 될 수 있다. 둘째로는 일단 polymorphism이 발견되면 그 표지인자 자체가 유전자이거나, 유전자와 극도로 가깝게 연관

되어있기 때문에 차후 육종과제 실행에서의 DNA 표지인자의 실용성을 극대화 할 수 있기 때문이다.

따라서 본 절에서는 유전자를 coding 하고 있는 'active DNA'를 선택적으로 STS-PCR primer set들로 전환하여 이를 품종구분에 적용하는 방안에 대하여 연구를 수행하였다. 과제의 성공적 수행을 위해, 첫째, 각 primer 조합이 특정 유전자좌의 대립유전자를 정확히 표지하여 (specific allele tagging) 증폭산물을 생산하도록 하고 둘째, 모든 가용 방법들로 분석하여 비교하고 셋째 재현성이 강조된 신뢰성 높은 자료의 규합을 통하여 각 품종을 구분할 수 있는 기법을 확립하는데 중점을 두었다.

2000년도 농림기술개발사업에 의해서 확보하였던 수박 EST 정보를 활용하여 STS-PCR primer 조합을 추가로 작성하였다. EST는 대부분 5' 말단 부위의 염기서열을 한 번의 분석으로 확인한 것이기 때문에 길이가 길지 않다. 수박 EST는 F1 품종인 '럭키'의 유묘에서 total RNA를 추출하고 mRNA를 정선했 후 합성한 cDNA library를 random sequencing한 것이다.

수박 EST 분석에서 확보된 primer 조합 중 STS-PCR에서 polymorphic band를 나타내었던 9가지의 primer sets로 PCR을 했으며, 사용한 primer sets의 sequences는 아래와 같다 (Table 5- 2). PCR 반응은 1 M의 primer와 20 ng의 genomic DNA를 1X PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂]와 200 M dNTP mix, 그리고 1 unit의 Pyrobest DNA polymerase (Takara, Japan)로 증폭하였다. 95°C에서 3분간 초기 변성 후, 95°C에서 15초, 55°C (WE020와 WE027은 50°C)에서 30초, 72°C에서 30초 (size에 따라서 시간을 조절)로 30회 반복했다. 반응이 끝난 시료는 5 µl 씩 각각 취하여 1% agarose gel에서 90 volt로 전기영동 후 EtBr로 염색하였다. band 확인 후 PCR-product들을 purify해서 TA-cloning하였다.

염기서열 분석을 위해 pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 TA-cloning하였고, DH5a cell에 transformation하였다. Plasmid Miniprep Kit I을 이용하여 plasmid를 추출하였고 염기서열을 양방향으로 분석하였다. 우선 약 3가지의 품종으로 실험을 수행한 결과, WE020, WE027, WE031, WE050에서는 sequences가 모두 일치하였다. WE036은 size가 커서 sequences의 일치 여부를 파악할 수 없어서 gene specific primer를 추가로 제작해서 염기서열을 정확하게 확인해야 할 필요가 있을 것으로 생각된다.

실험에 사용한 공통된 품종들은 4008, 4009, 4011이며, WE031과 WE036에는 4010이, WE050

에는 4017과 4018이 같이 사용되었다. 그러나 WE031과 WE036은 품종별로 하나씩의 colony만 염기서열을 확인했고 특히 size가 크므로 좀 더 개수를 늘여서 확인해 볼 필요가 있을 것으로 판단된다. WE028과 WE048은 한 군데에서 SNP가 있는 것으로 추정되며, WE044에서는 네 군데, WE046에서는 두 군데의 SNP가 관찰되었다.

Table 5-2. SNP 개발에 이용한 유전자 특이적 primer 조합

	Primer 이름	Primer 염기서열
1	WE020(SN)	GACATTGATGCTAATGGC
	WE020(AN)	TTCAACACCAAGTGATTC
2	WE027(SN)	CAACATGTCTGAAGAATCTGC
	WE027(AN)	GAGTTGCAAATGTAGAAATGC
3	WE028(SN)	GACAGAATCGAGGCAATGCCG
	WE028(AN)	ACCAAATTATTAACGAACAAG
4	WE031(SN)	CTGCCGGTCTCGAGCTTAATG
	WE031(AN)	CTTTAAAGAGACCAATGGCCC
5	WE036(SN)	CTTCTCCTGTATGGGAGCTGC
	WE036(AN)	GATCCGTGTGGTACAGCAATC
6	WE044(SN)	CTCGGTGGGGTCTTGCATTCC
	WE044(AN)	GAATTCACAATGAGAGGAGTC
7	WE046(SN)	GGCCTCCAACCTCCTGAAGGAC
	WE046(AN)	TACATTACATATCAATCCCTC
8	WE048(SN)	ACATGTAGTGGTGATGATTAC
	WE048(AN)	GATTATCATTACATCTTACC
9	WE050(SN)	TCCTCTCTTTCTGTCCACGCC
	WE050(AN)	CCAATCTCCACACATAAACCC

우선 WE028에서는 3그룹으로 나누어 각 그룹 당 3가지 품종의 2개씩의 무작위로 선정된 colony로 염기서열을 확인한 결과 4007, 4008, 4009 그룹에서는 4007-14와 4008-22의 두 군데에서 SNP가 발견되었고 (Fig. 5-1), 4010, 4011, 4012 그룹에서도 4010-2와 4011-16에서는 4008-22와 같은 위치에서 SNP가 발견되었다 (Fig. 5-2). 또한 4016, 4017, 4018 그룹에서도 4018-8에서 SNP가 나타났으나 (Fig. 5-3) colony간의 차이로 추정되어지기에 더 많은 수의 colony를 확인할 필요가 있다고 생각된다.

WE031에서는 3그룹으로 나누어 각 그룹 당 3가지 품종의 2개씩의 무작위로 선발된 colony로 염기서열을 확인한 결과 4016,17,18 그룹에서 4018-1에서 SNP가 발견되었다 (Fig. 5-4). WE031의 경우에는 PCR-product의 size가 1kb 넘기 때문에 sequence를 끝부분까지 다 확인할 수 없어 가능한 부분 까지만 비교·확인하였다.

WE044에서도 3그룹으로 나누어 각 그룹 당 3가지 품종의 2개씩의 무작위로 선발된 colony의 염기서열을 확인한 결과 4007, 4008, 4009 그룹에서는 4009-5에서 두 군데, 4009-17의 한 군데에서 SNP가 나타났으며 (Fig. 5-5), 4009, 4010, 4011 그룹에서는 4007, 4008, 4009 그룹과 마찬가지로 4009-5에서 두 군데, 4009-17에서 한 군데, 또한 4010-14에서 한 군데, 4011-9에서 한 군데로 모두 다섯 군데에서 SNP가 나타났다 (Fig. 5-6). 그리고 4016, 4017, 4018 그룹에서는 더 많은 colony를 확인한 결과 4017-1과 4017-3이 같은 부분에서 SNP를 나타내며 하나의 염기서열 뒤에서 4016-4의 SNP가 나타났다 (Fig. 5-7).

WE046에서는 3그룹으로 나누어 각 그룹 당 3가지 품종의 2개씩의 무작위로 선발된 colony의 염기서열을 확인한 결과 4007, 4008, 4009 그룹에서는 4008-1에서 한 군데에서는 SNP가 (Fig. 5-8), 또 다른 한 군데에서는 세 개 염기 TTA가 한꺼번에 소실되어 있었다. 4010, 4011, 4012 그룹과 4016, 4017, 4018 그룹에서는 나타나지 않았다.

WE048에서도 3그룹으로 나누어 각 그룹당 3가지 품종의 2개씩의 임의로 선정된 colony의 염기서열을 확인한 결과 4007, 4008, 4009 그룹에서는 4009-10에서 SNP가 존재하였고 (Fig. 5-9), 4010, 4011, 4012 그룹에서는 한 염기차이로 4009-10과 4010-2에서 SNP가 나타났으며 (Fig. 5-10), 4016, 4017, 4018 그룹에서는 나타나지 않았다.

```

*           20           *           40           *           60           *           80
028-7-13-M : ACCAAATATTAACGAACAAGGCTTAAATATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-7-14-M : ACCAAATATTAACGAACAAGGCTTAAATATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-8-18-T : ACCAAATATTAACGAACAAGGCTTAAATATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-8-22-T : ACCAAATATTAACGAACAAGGCTTAAATATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-9-10-T : ACCAAATATTAACGAACAAGGCTTAAATATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-9-15-T : ACCAAATATTAACGAACAAGGCTTAAATATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA

*           100          *           120          *           140          *           160
028-7-13-M : AAATGTGTTAATTTGAATATTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTAGGCTTGCTTAAATATTT
028-7-14-M : AAATGTGTTAATTTGAATATTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTAGGCTTGCTTAAATATTT
028-8-18-T : AAATGTGTTAATTTGAATATTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTAGGCTTGCTTAAATATTT
028-8-22-T : AAATGTGTTAATTTGAATATTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTAGGCTTGCTTAAATATTT
028-9-10-T : AAATGTGTTAATTTGAATATTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTAGGCTTGCTTAAATATTT
028-9-15-T : AAATGTGTTAATTTGAATATTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTAGGCTTGCTTAAATATTT

*           180          *           200          *           220          *           240
028-7-13-M : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-7-14-M : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-8-18-T : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-8-22-T : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-9-10-T : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-9-15-T : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG

*           260          *           280          *           300          *           320
028-7-13-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCCTCCTTTTCTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-7-14-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCCTCCTTTTCTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-8-18-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCCTCCTTTTCTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-8-22-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCCTCCTTTTCTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-9-10-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCCTCCTTTTCTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-9-15-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCCTCCTTTTCTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT

*           340          *           360          *           380          *           400
028-7-13-M : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTCGTGATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-7-14-M : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTCGTGATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-8-18-T : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTCGTGATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-8-22-T : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTCGTGATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-9-10-T : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTCGTGATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-9-15-T : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTCGTGATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT

*           420          *           440          *           460          *           480
028-7-13-M : TCATGCTATTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTG
028-7-14-M : TCATGCTATTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTG
028-8-18-T : TCATGCTATTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTG
028-8-22-T : TCATGCTATTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTG
028-9-10-T : TCATGCTATTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTG
028-9-15-T : TCATGCTATTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTG

*           500          *           520          *           540          *           560
028-7-13-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATGTCCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCATATGGTTGTCGCTTCG
028-7-14-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATGTCCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCATATGGTTGTCGCTTCG
028-8-18-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGTCCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCATATGGTTGTCGCTTCG
028-8-22-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGTCCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCATATGGTTGTCGCTTCG
028-9-10-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGTCCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCATATGGTTGTCGCTTCG
028-9-15-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGTCCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCATATGGTTGTCGCTTCG

*           580          *           600          *           620          *           640
028-7-13-M : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAAAGAGAGAAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-7-14-M : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAAAGAGAGAAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-8-18-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAAAGAGAGAAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-8-22-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAAAGAGAGAAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-9-10-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAAAGAGAGAAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-9-15-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAAAGAGAGAAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC

*
028-7-13-M : TCGATTCTGTC
028-7-14-M : TCGATTCTGTC
028-8-18-T : TCGATTCTGTC
028-8-22-T : TCGATTCTGTC
028-9-10-T : TCGATTCTGTC
028-9-15-T : TCGATTCTGTC

```

Figure 5-1. WE028을 4007, 4008, 4009의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인


```

      *           20           *           40           *           60           *           80
028-9-10-T : ACCAAATATTAAACGAACAAGGCTTTAATTATGTTTTTGCCTTGAAGCAGCTATATAATGTGTAGAAAAAGAAAAAA
028-9-15-T : ACCAAATATTAAACGAACAAGGCTTTAATTATGTTTTTGCCTTGAAGCAGCTATATAATGTGTAGAAAAAGAAAAAA
028-10-1-M : ACCAAATATTAAACGAACAAGGCTTTAATTATGTTTTTGCCTTGAAGCAGCTATATAATGTGTAGAAAAAGAAAAAA
028-10-2-M : ACCAAATATTAAACGAACAAGGCTTTAATTATGTTTTTGCCTTGAAGCAGCTATATAATGTGTAGAAAAAGAAAAAA
028-11-9-T : ACCAAATATTAAACGAACAAGGCTTTAATTATGTTTTTGCCTTGAAGCAGCTATATAATGTGTAGAAAAAGAAAAAA
028-11-16- : ACCAAATATTAAACGAACAAGGCTTTAATTATGTTTTTGCCTTGAAGCAGCTATATAATGTGTAGAAAAAGAAAAAA

      *           100          *           120          *           140          *           160
028-9-10-T : AAATGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCTTTAATATTTT
028-9-15-T : AAATGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCTTTAATATTTT
028-10-1-M : AAATGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCTTTAATATTTT
028-10-2-M : AAATGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCTTTAATATTTT
028-11-9-T : AAATGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCTTTAATATTTT
028-11-16- : AAATGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCTTTAATATTTT

      *           180          *           200          *           220          *           240
028-9-10-T : CTAATGTATGTGATATAATATTGTTAACATAAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-9-15-T : CTAATGTATGTGATATAATATTGTTAACATAAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-10-1-M : CTAATGTATGTGATATAATATTGTTAACATAAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-10-2-M : CTAATGTATGTGATATAATATTGTTAACATAAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-11-9-T : CTAATGTATGTGATATAATATTGTTAACATAAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG
028-11-16- : CTAATGTATGTGATATAATATTGTTAACATAAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGGAGGGACTAACAAGG

      *           260          *           280          *           300          *           320
028-9-10-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-9-15-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-10-1-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-10-2-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-11-9-T : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT
028-11-16- : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAACTGATAACCAATGGCCTTGT

      *           340          *           360          *           380          *           400
028-9-10-T : GGGGTGTCCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCCGTAACGTCGTGATATGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-9-15-T : GGGGTGTCCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCCGTAACGTCGTGATATGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-10-1-M : GGGGTGTCCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCCGTAACGTCGTGATATGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-10-2-M : GGGGTGTCCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCCGTAACGTCGTGATATGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-11-9-T : GGGGTGTCCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCCGTAACGTCGTGATATGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-11-16- : GGGGTGTCCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCCGTAACGTCGTGATATGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT

      *           420          *           440          *           460          *           480
028-9-10-T : TCATGCTATTGATGCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTATTCATTCGTTAGACTATCTGTAGAATCCACGTG
028-9-15-T : TCATGCTATTGATGCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTATTCATTCGTTAGACTATCTGTAGAATCCACGTG
028-10-1-M : TCATGCTATTGATGCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTATTCATTCGTTAGACTATCTGTAGAATCCACGTG
028-10-2-M : TCATGCTATTGATGCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTATTCATTCGTTAGACTATCTGTAGAATCCACGTG
028-11-9-T : TCATGCTATTGATGCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTATTCATTCGTTAGACTATCTGTAGAATCCACGTG
028-11-16- : TCATGCTATTGATGCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTATTCATTCGTTAGACTATCTGTAGAATCCACGTG

      *           500          *           520          *           540          *           560
028-9-10-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTACATTCATTTGGTTGTCGCTTCG
028-9-15-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTACATTCATTTGGTTGTCGCTTCG
028-10-1-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATGCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTACATTCATTTGGTTGTCGCTTCG
028-10-2-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATGCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTACATTCATTTGGTTGTCGCTTCG
028-11-9-T : TTGGTTTCGTCGATTTTATGCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTACATTCATTTGGTTGTCGCTTCG
028-11-16- : TTGGTTTCGTCGATTTTATGCTACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTACATTCATTTGGTTGTCGCTTCG

      *           580          *           600          *           620          *           640
028-9-10-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTAAAAGAGAGGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-9-15-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTAAAAGAGAGGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-10-1-M : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTAAAAGAGAGGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-10-2-M : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTAAAAGAGAGGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-11-9-T : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTAAAAGAGAGGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-11-16- : CGTCGTCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTAAAAGAGAGGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC

      *
028-9-10-T : TCGATTCTGTC
028-9-15-T : TCGATTCTGTC
028-10-1-M : TCGATTCTGTC
028-10-2-M : TCGATTCTGTC
028-11-9-T : TCGATTCTGTC
028-11-16- : TCGATTCTGTC

```

Figure 5-2. WE028를 4010, 4011, 4012의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
028-16-7-M : ACCAAATATT AACGAACAAGGCTTAAATTATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-16-10- : ACCAAATATT AACGAACAAGGCTTAAATTATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-17-5-M : ACCAAATATT AACGAACAAGGCTTAAATTATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-17-12- : ACCAAATATT AACGAACAAGGCTTAAATTATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-18-3-M : ACCAAATATT AACGAACAAGGCTTAAATTATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
028-18-8-M : ACCAAATATT AACGAACAAGGCTTAAATTATGTTTTGCCTGAAAGCAGCTATATAATGTGTTAGAAAAAGAAAAAA
      *
028-16-7-M : AAATGTGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCCTTAATATTTT
028-16-10- : AAATGTGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCCTTAATATTTT
028-17-5-M : AAATGTGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCCTTAATATTTT
028-17-12- : AAATGTGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCCTTAATATTTT
028-18-3-M : AAATGTGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCCTTAATATTTT
028-18-8-M : AAATGTGTTAATTTGAATATTTTAAAATAAAAATGTTGATACTCAATCATCCTCACCTTTTAGGCTTGCCTTAATATTTT
      *
028-16-7-M : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGAGGGACTAACAAGG
028-16-10- : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGAGGGACTAACAAGG
028-17-5-M : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGAGGGACTAACAAGG
028-17-12- : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGAGGGACTAACAAGG
028-18-3-M : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGAGGGACTAACAAGG
028-18-8-M : CTAATGTATGTGATATAATATTTGTTAACATAATCAACTGACTGCGACGTCGTTTCGGCTGTTGGGAGGGACTAACAAGG
      *
028-16-7-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAAGTATAACCAATGGCCTTGT
028-16-10- : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAAGTATAACCAATGGCCTTGT
028-17-5-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAAGTATAACCAATGGCCTTGT
028-17-12- : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAAGTATAACCAATGGCCTTGT
028-18-3-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAAGTATAACCAATGGCCTTGT
028-18-8-M : ATTTGAGATGCTATTGTTAGCAATGAGCCTCCTTCTGTCTCCCTCTCCTCTTTGCTAGAAGTATAACCAATGGCCTTGT
      *
028-16-7-M : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTGCGTATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-16-10- : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTGCGTATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-17-5-M : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTGCGTATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-17-12- : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTGCGTATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-18-3-M : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTGCGTATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
028-18-8-M : GGGGTGTCATCTGGAAGGATCGAGAAGCCTGTCGGTAAACGTGCGTATATTGCTCGGGTCGAACCCGGCCATCACAGATT
      *
028-16-7-M : TCATGCTATTTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTAATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTC
028-16-10- : TCATGCTATTTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTAATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTC
028-17-5-M : TCATGCTATTTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTAATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTC
028-17-12- : TCATGCTATTTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTAATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTC
028-18-3-M : TCATGCTATTTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTAATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTC
028-18-8-M : TCATGCTATTTCATGTCAACTTGAGCATAGACGACCGTTGATTCGTAATTCATTTCGTTAGACTATCTTGTAGAATCCACGTC
      *
028-16-7-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATTGCCACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCTATTGGTTGTCGCTTCG
028-16-10- : TTGGTTTCGTCGATTTTATTGCCACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCTATTGGTTGTCGCTTCG
028-17-5-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATTGCCACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCTATTGGTTGTCGCTTCG
028-17-12- : TTGGTTTCGTCGATTTTATTGCCACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCTATTGGTTGTCGCTTCG
028-18-3-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATTGCCACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCTATTGGTTGTCGCTTCG
028-18-8-M : TTGGTTTCGTCGATTTTATTGCCACAACAATCATTGTAATTGAATTATATCTCTACATTCTATTGGTTGTCGCTTCG
      *
028-16-7-M : CGTCGTCCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAGAGAGAGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-16-10- : CGTCGTCCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAGAGAGAGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-17-5-M : CGTCGTCCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAGAGAGAGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-17-12- : CGTCGTCCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAGAGAGAGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-18-3-M : CGTCGTCCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAGAGAGAGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
028-18-8-M : CGTCGTCCTAAGGCATGTGGCAACAACCTTGCATAGTGAAGAGAGAGAAAGGATACTCACTTGGATAGTTACGGCATTGCC
      *
028-16-7-M : TCGATTCT ETC
028-16-10- : TCGATTCT --
028-17-5-M : TCGATTCT ET-
028-17-12- : TCGATTCT ETC
028-18-3-M : TCGATTCT ETC
028-18-8-M : TCGATTCT ETC

```

Figure 5-3. WE028를 4016, 4017, 4018의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

```

031-16-6-M :      *          20          *          40          *          60          *          80
031-16-6-M : CTGCCGCTCGAGCTTAATGATATTGACCCCTTTTGAATAAACGAGGTATTTCTGAGAGGATTTTGGATTCTA
031-16-12-M : CTGCCGCTCGAGCTTAATGATATTGACCCCTTTTGAATAAACGAGGTATTTCTGAGAGGATTTTGGATTCTA
031-17-5-M : --GCCGCTCGAGCTTAATGATATTGACCCCTTTTGAATAAACGAGGTATTTCTGAGAGGATTTTGGATTCTA
031-17-8-M : CTGCCGCTCGAGCTTAATGATATTGACCCCTTTTGAATAAACGAGGTATTTCTGAGAGGATTTTGGATTCTA
031-18-1-M : CTGCCGCTCGAGCTTAATGATATTGACCCCTTTTGAATAAACGAGGTATTTCTGAGAGGATTTTGGATTCTA
031-18-5-M : CTGCCGCTCGAGCTTAATGATATTGACCCCTTTTGAATAAACGAGGTATTTCTGAGAGGATTTTGGATTCTA
      *          100         *          120         *          140         *          160
031-16-6-M : AACAAATTGAATACTCATTAACCTTGTAAATGAACTACTGTGCAGGCATTTGCATCACAATTTGTGTACTGCCGTAAT AAG
031-16-12-M : AACAAATTGAATACTCATTAACCTTGTAAATGAACTACTGTGCAGGCATTTGCATCACAATTTGTGTACTGCCGTAAT AAG
031-17-5-M : AACAAATTGAATACTCATTAACCTTGTAAATGAACTACTGTGCAGGCATTTGCATCACAATTTGTGTACTGCCGTAAT AAG
031-17-8-M : AACAAATTGAATACTCATTAACCTTGTAAATGAACTACTGTGCAGGCATTTGCATCACAATTTGTGTACTGCCGTAAT AAG
031-18-1-M : AACAAATTGAATACTCATTAACCTTGTAAATGAACTACTGTGCAGGCATTTGCATCACAATTTGTGTACTGCCGTAAT AAG
031-18-5-M : AACAAATTGAATACTCATTAACCTTGTAAATGAACTACTGTGCAGGCATTTGCATCACAATTTGTGTACTGCCGTAAT AAG
      *          180         *          200         *          220         *          240
031-16-6-M : TTGGAACCTTGACCCAGAAAAGATTAAATGTTAATGGAGGTGCAATGGCCATTGGCATCCATTGGGTGCAACAGGTATGAA
031-16-12-M : TTGGAACCTTGACCCAGAAAAGATTAAATGTTAATGGAGGTGCAATGGCCATTGGCATCCATTGGGTGCAACAGGTATGAA
031-17-5-M : TTGGAACCTTGACCCAGAAAAGATTAAATGTTAATGGAGGTGCAATGGCCATTGGCATCCATTGGGTGCAACAGGTATGAA
031-17-8-M : TTGGAACCTTGACCCAGAAAAGATTAAATGTTAATGGAGGTGCAATGGCCATTGGCATCCATTGGGTGCAACAGGTATGAA
031-18-1-M : TTGGAACCTTGACCCAGAAAAGATTAAATGTTAATGGAGGTGCAATGGCCATTGGCATCCATTGGGTGCAACAGGTATGAA
031-18-5-M : TTGGAACCTTGACCCAGAAAAGATTAAATGTTAATGGAGGTGCAATGGCCATTGGCATCCATTGGGTGCAACAGGTATGAA
      *          260         *          280         *          300         *          320
031-16-6-M : CGATTTCTAACAAACAGTAAATACCTATTACTTTATACAGATCCACTAAATGATTCAGATGGGGCTCTATTCTAATGGA
031-16-12-M : CGATTTCTAACAAACAGTAAATACCTATTACTTTATACAGATCCACTAAATGATTCAGATGGGGCTCTATTCTAATGGA
031-17-5-M : CGATTTCTAACAAACAGTAAATACCTATTACTTTATACAGATCCACTAAATGATTCAGATGGGGCTCTATTCTAATGGA
031-17-8-M : CGATTTCTAACAAACAGTAAATACCTATTACTTTATACAGATCCACTAAATGATTCAGATGGGGCTCTATTCTAATGGA
031-18-1-M : CGATTTCTAACAAACAGTAAATACCTATTACTTTATACAGATCCACTAAATGATTCAGATGGGGCTCTATTCTAATGGA
031-18-5-M : CGATTTCTAACAAACAGTAAATACCTATTACTTTATACAGATCCACTAAATGATTCAGATGGGGCTCTATTCTAATGGA
      *          340         *          360         *          380         *          400
031-16-6-M : GAATTTTAAATCTAGTTGGTAAAAATTTCTCTTCATTTTCATTTGGCCGTCATGGATTTACAACCACATATACACACACACA
031-16-12-M : GAATTTTAAATCTAGTTGGTAAAAATTTCTCTTCATTTTCATTTGGCCGTCATGGATTTACAACCACATATACACACACACA
031-17-5-M : GAATTTTAAATCTAGTTGGTAAAAATTTCTCTTCATTTTCATTTGGCCGTCATGGATTTACAACCACATATACACACACACA
031-17-8-M : GAATTTTAAATCTAGTTGGTAAAAATTTCTCTTCATTTTCATTTGGCCGTCATGGATTTACAACCACATATACACACACACA
031-18-1-M : GAATTTTAAATCTAGTTGGTAAAAATTTCTCTTCATTTTCATTTGGCCGTCATGGATTTACAACCACATATACACACACACA
031-18-5-M : GAATTTTAAATCTAGTTGGTAAAAATTTCTCTTCATTTTCATTTGGCCGTCATGGATTTACAACCACATATACACACACACA
      *          420         *          440         *          460         *          480
031-16-6-M : CATATATACACACACATGTTAACATATTGTGTGTATCTGTACACGTGTGTACATCCCTCACTTACGAATGTTGGCTCTGA
031-16-12-M : CATATATACACACACATGTTAACATATTGTGTGTATCTGTACACGTGTGTACATCCCTCACTTACGAATGTTGGCTCTGA
031-17-5-M : CATATATACACACACATGTTAACATATTGTGTGTATCTGTACACGTGTGTACATCCCTCACTTACGAATGTTGGCTCTGA
031-17-8-M : CATATATACACACACATGTTAACATATTGTGTGTATCTGTACACGTGTGTACATCCCTCACTTACGAATGTTGGCTCTGA
031-18-1-M : CATATATACACACACATGTTAACATATTGTGTGTATCTGTACACGTGTGTACATCCCTCACTTACGAATGTTGGCTCTGA
031-18-5-M : CATATATACACACACATGTTAACATATTGTGTGTATCTGTACACGTGTGTACATCCCTCACTTACGAATGTTGGCTCTGA
      *          500         *          520         *          540         *          560
031-16-6-M : CTGCCTTTCATCGGGATCTCAACCAGAACATATTGCAATGGACTAGGAATTCATCAACTCTGATGATCAACAAATTTTG
031-16-12-M : CTGCCTTTCATCGGGATCTCAACCAGAACATATTGCAATGGACTAGGAATTCATCAACTCTGATGATCAACAAATTTTG
031-17-5-M : CTGCCTTTCATCGGGATCTCAACCAGAACATATTGCAATGGACTAGGAATTCATCAACTCTGATGATCAACAAATTTTG
031-17-8-M : CTGCCTTTCATCGGGATCTCAACCAGAACATATTGCAATGGACTAGGAATTCATCAACTCTGATGATCAACAAATTTTG
031-18-1-M : CTGCCTTTCATCGGGATCTCAACCAGAACATATTGCAATGGACTAGGAATTCATCAACTCTGATGATCAACAAATTTTG
031-18-5-M : CTGCCTTTCATCGGGATCTCAACCAGAACATATTGCAATGGACTAGGAATTCATCAACTCTGATGATCAACAAATTTTG
      *          580         *          600         *          620         *          640
031-16-6-M : GGTGTCTATCAATAGCTTAAGCTTCATCTTTGTTTTGCCAATTTGTTGGTTATTTTTTCAGGTGCCCGTGTGTGTG
031-16-12-M : GGTGTCTATCAATAGCTTAAGCTTCATCTTTGTTTTGCCAATTTGTTGGTTATTTTTTCAGGTGCCCGTGTGTGTG
031-17-5-M : GGTGTCTATCAATAGCTTAAGCTTCATCTTTGTTTTGCCAATTTGTTGGTTATTTTTTCAGGTGCCCGTGTGTGTG
031-17-8-M : GGTGTCTATCAATAGCTTAAGCTTCATCTTTGTTTTGCCAATTTGTTGGTTATTTTTTCAGGTGCCCGTGTGTGTG
031-18-1-M : GGTGTCTATCAATAGCTTAAGCTTCATCTTTGTTTTGCCAATTTGTTGGTTATTTTTTCAGGTGCCCGTGTGTGTG
031-18-5-M : GGTGTCTATCAATAGCTTAAGCTTCATCTTTGTTTTGCCAATTTGTTGGTTATTTTTTCAGGTGCCCGTGTGTGTG
      *          660         *          680         *          700         *          720
031-16-6-M : CTACTCTGTTGCACGAGATGAAGCGTCGTGGCAAAGACTGTTCGTTTTGGAGTTATTTCAATGTGCATAGGTACTTTACAT
031-16-12-M : CTACTCTGTTGCACGAGATGAAGCGTCGTGGCAAAGACTGTTCGTTTTGGAGTTATTTCAATGTGCATAGGTACTTTACAT
031-17-5-M : CTACTCTGTTGCACGAGATGAAGCGTCGTGGCAAAGACTGTTCGTTTTGGAGTTATTTCAATGTGCATAGGTACTTTACAT
031-17-8-M : CTACTCTGTTGCACGAGATGAAGCGTCGTGGCAAAGACTGTTCGTTTTGGAGTTATTTCAATGTGCATAGGTACTTTACAT
031-18-1-M : CTACTCTGTTGCACGAGATGAAGCGTCGTGGCAAAGACTGTTCGTTTTGGAGTTATTTCAATGTGCATAGGTACTTTACAT
031-18-5-M : CTACTCTGTTGCACGAGATGAAGCGTCGTGGCAAAGACTGTTCGTTTTGGAGTTATTTCAATGTGCATAGGTACTTTACAT
      *          740         *          760         *          780         *          800
031-16-6-M : GTTTTTTTTGGTTAAAAACAATTGGTTTGGCTTGC*PAGGCTGACAAGATATTGTATCAACCCAAATGCAAGG-----
031-16-12-M : GTTTTTTTTGGTTAAAAACAATTGGTTTGGCTTGC*PAGGCTGACAAGATATTGTATCAACCCAAATGCAAGG-----
031-17-5-M : GTTTTTTTTGGTTAAAAACAATTGGTTTGGCTTGC*PAGGCTGACAAGATATTGTATCAACCCAAATGCAAGG-----
031-17-8-M : GTTTTTTTTGGTTAAAAACAATTGGTTTGGCTTGC*PAGGCTGACAAGATATTGTATCAACCCAAATGCAAGG-----
031-18-1-M : GTTTTTTTTGGTTAAAAACAATTGGTTTGGCTTGC*PAGGCTGACAAGATATTGTATCAACCCAAATGCAAGG-----
031-18-5-M : GTTTTTTTTGGTTAAAAACAATTGGTTTGGCTTGC*PAGGCTGACAAGATATTGTATCAACCCAAATGCAAGG-----
      *
031-16-6-M : -----
031-16-12-M : ATGGGCGCAGCGG
031-17-5-M : -----
031-17-8-M : -----
031-18-1-M : -----
031-18-5-M : ATGGG

```

Figure 5-4. WE031을 4016, 4017, 4018의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

```

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-7-14-T : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-7-16-T : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-8-2-T7 : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-8-4-T7 : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-9-5-T7 : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-9-17-T : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAATAAAAGAAGAAGAAGA

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-7-14-T : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-7-16-T : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-8-2-T7 : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-8-4-T7 : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-9-5-T7 : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-9-17-T : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGCTTTTTTATTCATTTCAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-7-14-T : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-7-16-T : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-8-2-T7 : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-8-4-T7 : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-9-5-T7 : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-9-17-T : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTTATTTATTTATAGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG
044-7-14-T : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG
044-7-16-T : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG
044-8-2-T7 : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG
044-8-4-T7 : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG
044-9-5-T7 : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG
044-9-17-T : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTTAAAAGTAGTAGAAGAG

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-7-14-T : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-7-16-T : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-8-2-T7 : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-8-4-T7 : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-9-5-T7 : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-9-17-T : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-7-14-T : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-7-16-T : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-8-2-T7 : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-8-4-T7 : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-9-5-T7 : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-9-17-T : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG

*           *           *           *           *
044-7-1-T7 : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-7-14-T : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-7-16-T : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-8-2-T7 : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-8-4-T7 : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-9-5-T7 : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-9-17-T : GAGGCTTGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGTATGAGCCTTTCAAATATGGAAT

*
044-7-1-T7 : GCAAGACCCACCCGAG-
044-7-14-T : GCAAGACCCACCCGAG-
044-7-16-T : GCAAGACCCACCCGAG-
044-8-2-T7 : GCAAGACCCACCCGAG-
044-8-4-T7 : GCAAGACCCACCCGAG-
044-9-5-T7 : GCAAGACCCACCCGAG-
044-9-17-T : GCAAGACCCACCCGAG-

```

Figure 5-5. WE044를 4007, 4008, 4009의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
044-9-5-T7 : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-9-17-T : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-10-6-M : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-10-14- : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-11-9-T : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAAATAAAAGAAGAAGAAGA
044-11-12- : GAATTACAATGAGAGGAGTCATTGGAATCTCATACACACAACAGTACTACAAAGTAGAAAATAAAAGAAGAAGAAGA

      *           100          *           120          *           140          *           160
044-9-5-T7 : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGTTTTTTTATTCATTTTCATAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-9-17-T : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGTTTTTTTATTCATTTTCATAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-10-6-M : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGTTTTTTTATTCATTTTCATAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-10-14- : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGTTTTTTTATTCATTTTCATAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-11-9-T : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGTTTTTTTATTCATTTTCATAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG
044-11-12- : TATAAGGCATGGGAATTAATTATGAAGAAACCCATGTTTTTTTATTCATTTTCATAACATGGTATTTAATTTAAAGCAAGG

      *           180          *           200          *           220          *           240
044-9-5-T7 : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTATTATTATTATGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-9-17-T : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTATTATTATTATGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-10-6-M : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTATTATTATTATGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-10-14- : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTATTATTATTATGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-11-9-T : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTATTATTATTATGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT
044-11-12- : ACAGGCTAAAGCTACCGCTACAAATATGATATTATTATTATTATGAAGCAGATGGCTGAGGGGGAGGTGGATCCTTCCT

      *           260          *           280          *           300          *           320
044-9-5-T7 : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTAAGTAGTAGAAGAG
044-9-17-T : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTAAGTAGTAGAAGAG
044-10-6-M : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTAAGTAGTAGAAGAG
044-10-14- : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTAAGTAGTAGAAGAG
044-11-9-T : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTAAGTAGTAGAAGAG
044-11-12- : TAGTTCACCTGCAAATTAACAAGAATTAGTAAAAAGCGATGGATGGATAACAAATTAATTAAGTAGTAGAAGAG

      *           340          *           360          *           380          *           400
044-9-5-T7 : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-9-17-T : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-10-6-M : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-10-14- : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-11-9-T : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG
044-11-12- : AACACATTACTTGGAGCAGTCGGTGCTGGGGCTGATCTTGTAAAGAAATGCTGACGCCACACTTGCTGGGAAGACCAGCGG

      *           420          *           440          *           460          *           480
044-9-5-T7 : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-9-17-T : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-10-6-M : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-10-14- : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-11-9-T : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG
044-11-12- : CTAAGCCATAGTTGATGCCAGAGATGCTGCTGGCAGCAGACTTCAAACAGTTGCAAGCGGTGCGGGCATCGTCAGGGGTG

      *           500          *           520          *           540          *           560
044-9-5-T7 : GAGGCTTGGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-9-17-T : GAGGCTTGGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-10-6-M : GAGGCTTGGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-10-14- : GAGGCTTGGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-11-9-T : GAGGCTTGGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGATGAGCCTTTCAAATATGGAAT
044-11-12- : GAGGCTTGGCTGTTGAGAGACTTAATCCCACCGCAACATGCTGCTGGGATACCTGGTGGATGAGCCTTTCAAATATGGAAT

      *
044-9-5-T7 : GCAAGACCCACCGAG
044-9-17-T : GCAAGACCCACCGAG
044-10-6-M : GCAAGACCCACCGAG
044-10-14- : GCAAGACCCACCGAG
044-11-9-T : GCAAGACCCACCGAG
044-11-12- : GCAAGACCCACCGAG

```

Figure 5-6. WE044를 4009, 4010, 4011의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인


```

*      20      *      40      *      60      *      80
046-7-1-T7 : GGCCTCCAACCTCCTGAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCGCTCCGCCACTCAATCGTGGTGAACATCGGCGATCA
046-7-5-T7 : GGCCTCCAACCTCCTGAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCGCTCCGCCACTCAATCGTGGTGAACATCGGCGATCA
046-8-1-T7 : GGCCTCCAACCTCCTGAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCGCTCCGCCACTCAATCGTGGTGAACATCGGCGATCA
046-8-3-T7 : GGCCTCCAACCTCCTGAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCGCTCCGCCACTCAATCGTGGTGAACATCGGCGATCA
046-9-3-T7 : GGCCTCCAACCTCCTGAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCGCTCCGCCACTCAATCGTGGTGAACATCGGCGATCA
046-9-7-T7 : GGCCTCCAACCTCCTGAAGGACGGCGCGTGGGTGGACGTGCCGCCGCTCCGCCACTCAATCGTGGTGAACATCGGCGATCA
      ↓

*      100     *      120     *      140     *      160
046-7-1-T7 : ATTGGAAGTAATTACAAATGGGAAATACAAAAGTGTTTTGACACAGAGTAGCTGCTCAGCCGGAAGGAGAAGGGAGAATGT
046-7-5-T7 : ATTGGAAGTAATTACAAATGGGAAATACAAAAGTGTTTTGACACAGAGTAGCTGCTCAGCCGGAAGGAGAAGGGAGAATGT
046-8-1-T7 : ATTGGAAGTAATTACAAATGGGAAATACAAAAGTGTTTTGACACAGAGTAGCTGCTCAGCCGGAAGGAGAAGGGAGAATGT
046-8-3-T7 : ATTGGAAGTAATTACAAATGGGAAATACAAAAGTGTTTTGACACAGAGTAGCTGCTCAGCCGGAAGGAGAAGGGAGAATGT
046-9-3-T7 : ATTGGAAGTAATTACAAATGGGAAATACAAAAGTGTTTTGACACAGAGTAGCTGCTCAGCCGGAAGGAGAAGGGAGAATGT
046-9-7-T7 : ATTGGAAGTAATTACAAATGGGAAATACAAAAGTGTTTTGACACAGAGTAGCTGCTCAGCCGGAAGGAGAAGGGAGAATGT

*      180     *      200     *      220     *      240
046-7-1-T7 : CATTAGCGTCATTTTACAATCCGGGGAGTGACGCCGTGATTTTTCCGGCGCCAAGTTTGGTGGAGAAAGAGGGCGGGAG
046-7-5-T7 : CATTAGCGTCATTTTACAATCCGGGGAGTGACGCCGTGATTTTTCCGGCGCCAAGTTTGGTGGAGAAAGAGGGCGGGAG
046-8-1-T7 : CATTAGCGTCATTTTACAATCCGGGGAGTGACGCCGTGATTTTTCCGGCGCCAAGTTTGGTGGAGAAAGAGGGCGGGAG
046-8-3-T7 : CATTAGCGTCATTTTACAATCCGGGGAGTGACGCCGTGATTTTTCCGGCGCCAAGTTTGGTGGAGAAAGAGGGCGGGAG
046-9-3-T7 : CATTAGCGTCATTTTACAATCCGGGGAGTGACGCCGTGATTTTTCCGGCGCCAAGTTTGGTGGAGAAAGAGGGCGGGAG
046-9-7-T7 : CATTAGCGTCATTTTACAATCCGGGGAGTGACGCCGTGATTTTTCCGGCGCCAAGTTTGGTGGAGAAAGAGGGCGGGAG

*      260     *      280     *      300     *      320
046-7-1-T7 : AAAAAATCAAATTTACCCAAAATTTGTATTTGAGGATTACATGAAGCTTTATGCAGGCCTGAAGTTTCAAGCAAAGGAGCC
046-7-5-T7 : AAAAAATCAAATTTACCCAAAATTTGTATTTGAGGATTACATGAAGCTTTATGCAGGCCTGAAGTTTCAAGCAAAGGAGCC
046-8-1-T7 : AAAAAATCAAATTTACCCAAAATTTGTATTTGAGGATTACATGAAGCTTTATGCAGGCCTGAAGTTTCAAGCAAAGGAGCC
046-8-3-T7 : AAAAAATCAAATTTACCCAAAATTTGTATTTGAGGATTACATGAAGCTTTATGCAGGCCTGAAGTTTCAAGCAAAGGAGCC
046-9-3-T7 : AAAAAATCAAATTTACCCAAAATTTGTATTTGAGGATTACATGAAGCTTTATGCAGGCCTGAAGTTTCAAGCAAAGGAGCC
046-9-7-T7 : AAAAAATCAAATTTACCCAAAATTTGTATTTGAGGATTACATGAAGCTTTATGCAGGCCTGAAGTTTCAAGCAAAGGAGCC

*      340     *      360     *      380     *      400
046-7-1-T7 : AAGGTTTGAAGCTATGAAAGCTAATGATAATGATGTCAAATGGGTCCAATTGCAACCGTTTGAATTCCTTATTATTAT
046-7-5-T7 : AAGGTTTGAAGCTATGAAAGCTAATGATAATGATGTCAAATGGGTCCAATTGCAACCGTTTGAATTCCTTATTATTAT
046-8-1-T7 : AAGGTTTGAAGCTATGAAAGCTAATGATAATGATGTCAAATGGGTCCAATTGCAACCGTTTGAATTCCTTATTATTAT
046-8-3-T7 : AAGGTTTGAAGCTATGAAAGCTAATGATAATGATGTCAAATGGGTCCAATTGCAACCGTTTGAATTCCTTATTATTAT
046-9-3-T7 : AAGGTTTGAAGCTATGAAAGCTAATGATAATGATGTCAAATGGGTCCAATTGCAACCGTTTGAATTCCTTATTATTAT
046-9-7-T7 : AAGGTTTGAAGCTATGAAAGCTAATGATAATGATGTCAAATGGGTCCAATTGCAACCGTTTGAATTCCTTATTATTAT

*      420     *      440     *      460     *      480
046-7-1-T7 : CCATCATTATTATTATTATTATTATTATTATCCACGGCGTTTTATTTTGTATGTGTTTTGTGTTTTATATGTATCCA
046-7-5-T7 : CCATCATTATTATTATTATTATTATTATTATCCACGGCGTTTTATTTTGTATGTGTTTTGTGTTTTATATGTATCCA
046-8-1-T7 : CCATCATTATTATTATTATTATTATTAT---TCCACGGCGTTTTATTTTGTATGTGTTTTGTGTTTTATATGTATCCA
046-8-3-T7 : CCATCATTATTATTATTATTATTATTATTATCCACGGCGTTTTATTTTGTATGTGTTTTGTGTTTTATATGTATCCA
046-9-3-T7 : CCATCATTATTATTATTATTATTATTATTATCCACGGCGTTTTATTTTGTATGTGTTTTGTGTTTTATATGTATCCA
046-9-7-T7 : CCATCATTATTATTATTATTATTATTATTATCCACGGCGTTTTATTTTGTATGTGTTTTGTGTTTTATATGTATCCA

*      500     *      520
046-7-1-T7 : TATTTGTGGGGTTTCAATATGAAATGAGGGATTGATATGTAATGT-
046-7-5-T7 : TATTTGTGGGGTTTCAATATGAAATGAGGGATTGATATGTAATGT-
046-8-1-T7 : TATTTGTGGGGTTTCAATATGAAATGAGGGATTGATATGTAATGTA
046-8-3-T7 : TATTTGTGGGGTTTCAATATGAAATGAGGGATTGATATGTAATGTA
046-9-3-T7 : TATTTGTGGGGTTTCAATATGAAATGAGGGATTGATATGTAATGTA
046-9-7-T7 : TATTTGTGGGGTTTCAATATGAAATGAGGGATTGATATGTAATGTA
      ↓

```

Figure 5-8. WE046를 4007, 4008, 4009의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

```

*          20          *          40          *          60          *          80
048-7-11-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTTGCAGAGCTGGGGC
048-7-12-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTTGCAGAGCTGGGGC
048-8-10-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTTGCAGAGCTGGGGC
048-8-12-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTTGCAGAGCTGGGGC
048-9-7-T7 : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTTGCAGAGCTGGGGC
048-9-10-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTTGCAGAGCTGGGGC
                ↓

*          100         *          120         *          140         *          160
048-7-11-T : TTGTTCTTCTTGTATTGGGAAAGTAAAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-7-12-T : TTGTTCTTCTTGTATTGGGAAAGTAAAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-8-10-T : TTGTTCTTCTTGTATTGGGAAAGTAAAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-8-12-T : TTGTTCTTCTTGTATTGGGAAAGTAAAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-9-7-T7 : TTGTTCTTCTTGTATTGGGAAAGTAAAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-9-10-T : TTGTTCTTCTTGTATTGGGAAAGTAAAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG

*          180         *          200         *          220         *          240
048-7-11-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTATTGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTTTGCT
048-7-12-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTATTGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTTTGCT
048-8-10-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTATTGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTTTGCT
048-8-12-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTATTGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTTTGCT
048-9-7-T7 : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTATTGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTTTGCT
048-9-10-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTATTGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTTTGCT

*          260         *          280         *          300         *          320
048-7-11-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-7-12-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-8-10-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-8-12-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-9-7-T7 : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-9-10-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA

*          340         *          360         *          380         *          400
048-7-11-T : GC AAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTTGGTGAATGTTGATTGTTTCAT
048-7-12-T : GC AAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTTGGTGAATGTTGATTGTTTCAT
048-8-10-T : GC AAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTTGGTGAATGTTGATTGTTTCAT
048-8-12-T : GC AAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTTGGTGAATGTTGATTGTTTCAT
048-9-7-T7 : GC AAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTTGGTGAATGTTGATTGTTTCAT
048-9-10-T : GC AAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTTGGTGAATGTTGATTGTTTCAT

*          420         *          440         *          460         *          480
048-7-11-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTGTTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAG
048-7-12-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTGTTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAG
048-8-10-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTGTTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAG
048-8-12-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTGTTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAG
048-9-7-T7 : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTGTTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAG
048-9-10-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTGTTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAG
                ←

*
048-7-11-T : ATGTGAATGATAATC
048-7-12-T : ATGTGAATGATAATC
048-8-10-T : ATGTGAATGATAATC
048-8-12-T : ATGTGAATGATAATC
048-9-7-T7 : ATGTGAATGATAATC
048-9-10-T : ATGTGAATGATAATC

```

Figure 5-9. WE048를 4007, 4008, 4009의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인


```

*           20           *           40           *           60           *           80
048-9-7-T7 : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
048-9-10-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
048-10-2-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
048-10-6-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
048-11-3-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
048-11-5-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
048-11-7-T : ACATGTAGTGGTGATGATTACATTTTAGATGCGGCTGAGGAAAGCGGGATTGATCTTCCTTACTCTGCAGAGCTGGGGC
                |
*           100          *           120          *           140          *           160
048-9-7-T7 : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-9-10-T : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-10-2-T : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-10-6-T : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-11-3-T : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-11-5-T : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG
048-11-7-T : TTGTTCTTCTTGATTTGGGAAAGTGAATCAGGAAATTAGATCAATCTGATAATAGCTTTCTTGATGATGAACAGATGG

*           180          *           200          *           220          *           240
048-9-7-T7 : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT
048-9-10-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT
048-10-2-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT
048-10-6-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT
048-11-3-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT
048-11-5-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT
048-11-7-T : CTGAAGGTTGGGTTTTAACTTGTGTTGCTAGGCCTGAATCTGATCTTGTTATTPGAGACTCACAAAGGAGGAAGTGTGTTGCT

*           260          *           280          *           300          *           320
048-9-7-T7 : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-9-10-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-10-2-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-10-6-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-11-3-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-11-5-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA
048-11-7-T : GGTAAAAACAGAGGAACAAGAAGGGGGAAGGAGGATTAACCTTTTTTTTTTTT-CCTTTTCAATCTTTGTTGATGAAAGTAA

*           340          *           360          *           380          *           400
048-9-7-T7 : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT
048-9-10-T : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT
048-10-2-T : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT
048-10-6-T : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT
048-11-3-T : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT
048-11-5-T : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT
048-11-7-T : GCAAATGGACACTGTTTTCTTCGCTTGATGATGATGATGATATCTCTCTTTCTAAGTGTTGTTGAATGTTGATGTTTTCAT

*           420          *           440          *           460          *           480
048-9-7-T7 : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
048-9-10-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
048-10-2-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
048-10-6-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
048-11-3-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
048-11-5-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
048-11-7-T : CACTGGTTTAAAGTTGATTTTCATAACTTGGGTTTTGTTTCATCTCTTGTGGGTTGTCCATTTTCTTTTCTTTTGGTAAAG
                |
*
048-9-7-T7 : ATGTGAATGATAATC
048-9-10-T : ATGTGAATGATAATC
048-10-2-T : ATGTGAATGATAATC
048-10-6-T : ATGTGAATGATAATC
048-11-3-T : ATGTGAATGATAATC
048-11-5-T : ATGTGAATGATAATC
048-11-7-T : ATGTGAATGATAATC

```

Figure 5-10. WE048를 4009, 4010, 4011의 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

제 4 절 URP 유래 SNP 표식인자 개발

3절에서 언급된 유전자 특이적 STS-PCR로부터 얻어진 SNP는 품종간 구분으로 인한 부, 모, 자식임을 입증할 수 있는 관계가 성립되지 않고 colony간 차이 혹은 기타 실험상의 오류일 가능성이 존재한다. 그러므로 유전자 염기서열 내에서가 아닌 비유전자 서열부분에서 어떠한 차이를 발견할 수 있는지 실험을 수행 하였다. 우선 SRILS UniPrimer™ Kit I (서린과학)을 이용해서 PCR로 primer screening을 실시했다. URP Primer는 다양한 size의 증폭산물들 여러 개가 동시에 나타나므로 sequence를 한 번에 염기서열 결정을 통하여 확인하기에 좋은 size인 600-800bp에서 나타난 증폭산물을 gel-elution 실험법을 통하여 TA-cloning 하였다. 원하는 크기의 증폭결과를 보인 URP Primer 6를 이용해서 F₁ 품종인 4007, 4010, 4016을 대상으로 PCR을 실시하였다 (Fig. 5-11).

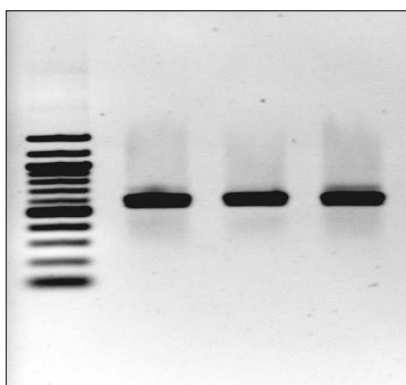


Figure 5-11. URP primer 6에 의하여 생성된 PCR 산물

PCR 반응은 150ng 의 primer와 50-200ng의 genomic DNA를 10X Taq buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂]와 10nM의 dNTPs mixture, 그리고 1 unit의 Ex-Taq (Takara, Japan)을 사용하여 증폭하였다. 94℃에서 5분간 초기 변성 후, 94℃에서 1분, 50℃ 에서 1분, 72℃에서 1분으로 40 cycle 반복한 후 다시 72℃에서 7분간 extension 하였다. 반응이 끝난 시료는 5μl 씩 각각 취하여 1% agarose gel 에서 90 volt로 전기영동 후 EtBr로 염색하였으며 band 확인 후 3가지 품종을 gel-extraction해서 purification하였다. 염기서열 분석을 위해 T&A Cloning Vector Kit (RBC, USA)을 이용하여 TA-cloning하였고 DH5α cell에 transformation하였다. Plasmid Miniprep Kit I을 이용하여 plasmid를 추출하였으며, 염기서열을 양방향으로 분석하였다.

4010에서 각 4개의 colony중 1개가 한군데에서 SNP를, 4016에서 각 4개의 colony중 1개 가 두군데에서 SNP를 나타내었으나 이 역시 colony간 차이로 추정되었다. 공통적인 염기서 열을 보이는 colony들로 4007, 4010, 4016의 세가지 품종을 분석한 결과 아래 그림과 같이 네 군데에서 SNP가 나타났다 (Fig. 5-12).

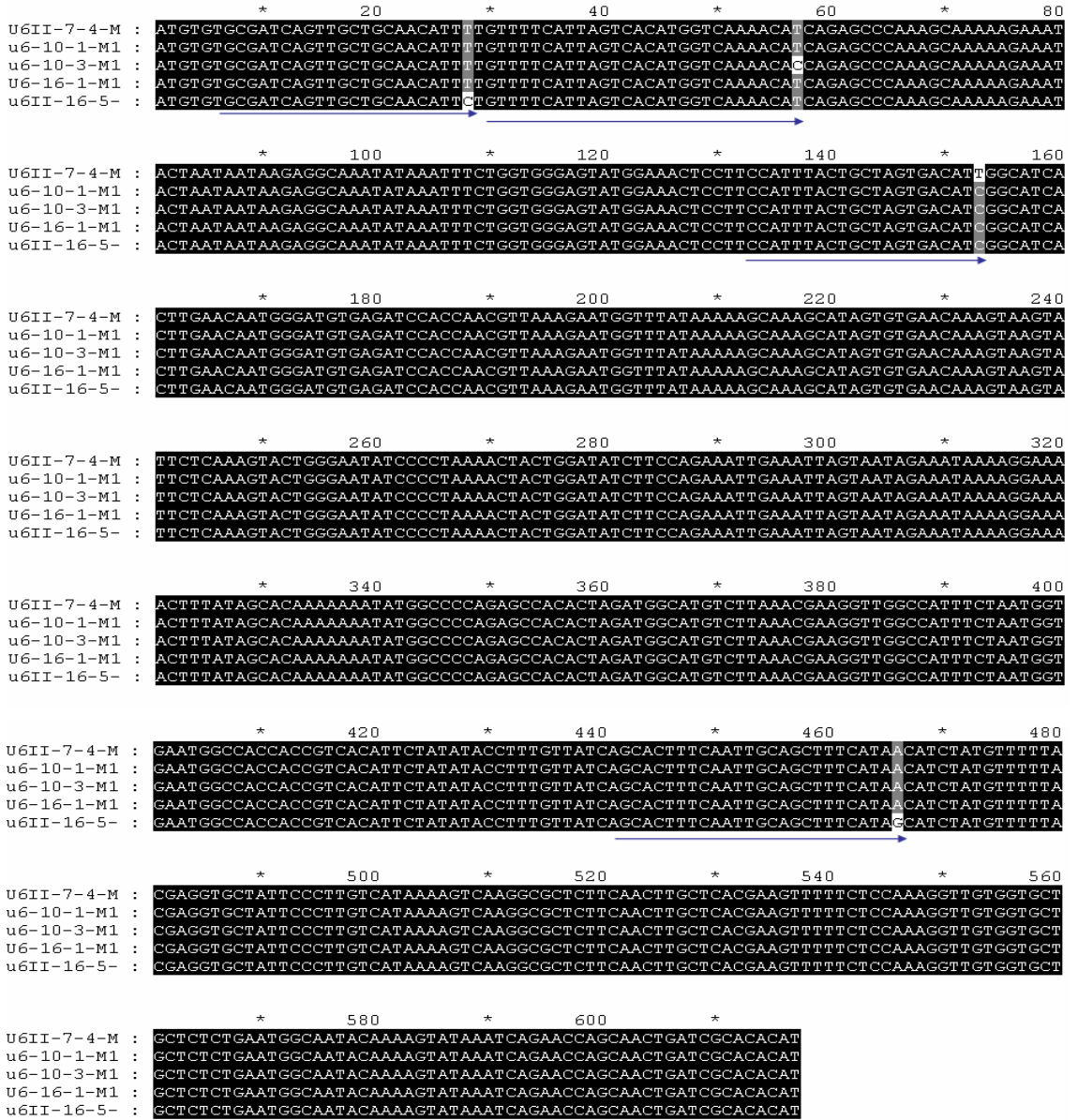


Figure 5-12. URP primer 6를 4007, 4010, 4016 3가지 수박 품종에 적용하여 SNP 확인

제 5 절 SNP 유래 CAPS 표식인자 개발

Fig. 5-12 에서 발견된 SNP 부분을 이용하여 아래와 같이 네 종류의 primer를 합성하였다 (Table 5-3).

Table 5-3. SNP를 이용한 primer 조합

	Primer 이름	Primer 염기서열
1	UR601(SN)	GCGATCAGTTGCTGCAACATTC
2	UR602(SN)	GTTTTTCATTAGTCACATGGTCAAACAC
3	UR603(SN)	CCTTCCATTTACTGCTAGTGACATC
4	UR604(SN)	GCACTTTCAATTGCAGCTTTCATAG
5	UR60AS(AN)	CTGGTTCTGATTTATACTTTTGTATTGCC

위의 primer들 중 UR60AS를 anti sense로 하고 나머지 네 가지 primer들을 sense로 해서 95℃에서 5분간 초기 변성 후, 95℃에서 20초, 54℃에서 30초, 72℃에서는 예상되는 bp size에 맞추어서 20초에서 40초까지로 35 cycle 반복한 후 다시 72℃에서 5분간 extension 하였다. PCR은 Table 5-1의 9가지 품종 중 4012는 4009와 같으므로 생략하고 4007, 4008, 4009, 4010, 4011, 4016, 4017, 4018의 8개 품종에 대하여 실시하였다 (Fig. 5-13).

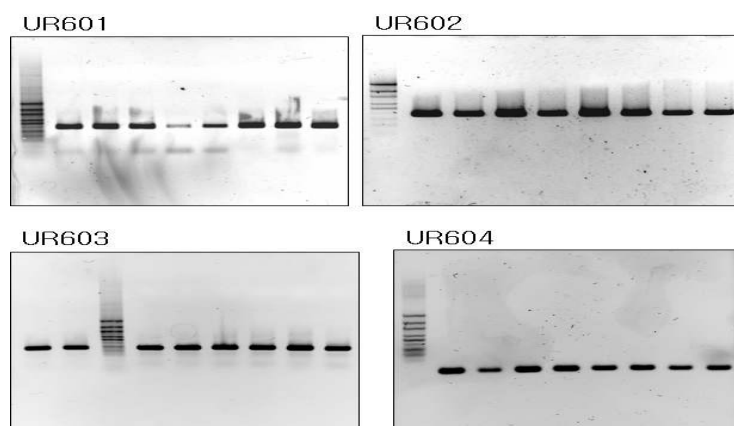


Figure 5-13. SNP 부분을 이용하여 합성된 시발체의 PCR 산물

SNP 부분에서 확보한 시발체를 이용하여 4007, 4008, 4009, 4010, 4011, 4016, 4017, 4018의 8개 품종으로부터 증폭된 PCR-product들을 4 가지 제한효소 (*Alu I*, *EcoR V*, *Hae III*, *Rsa I*)로 절단하여 6% polyacrylamide-gel 에서 전기영동하였으나 CAPS를 확인할 수가 없었다 (Fig. 5-14 ~ 5-17).

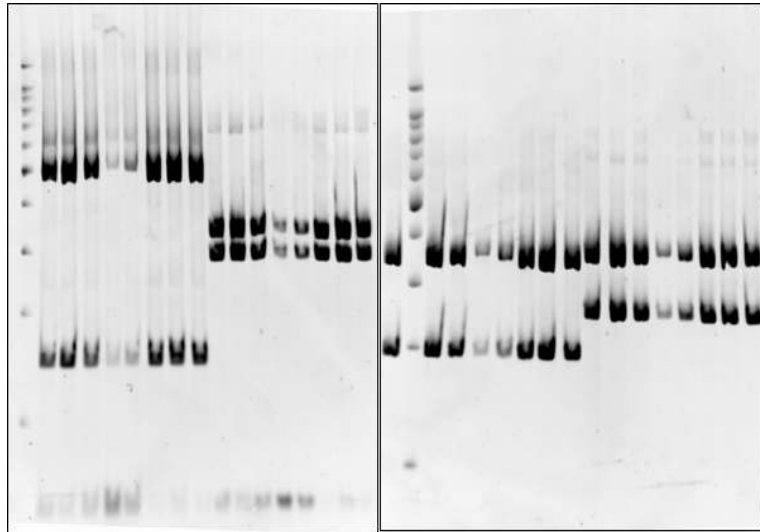


Figure 5-14. UR601 (*Alu I*, *EcoR V*, *Hae III*, *Rsa I*) digestion

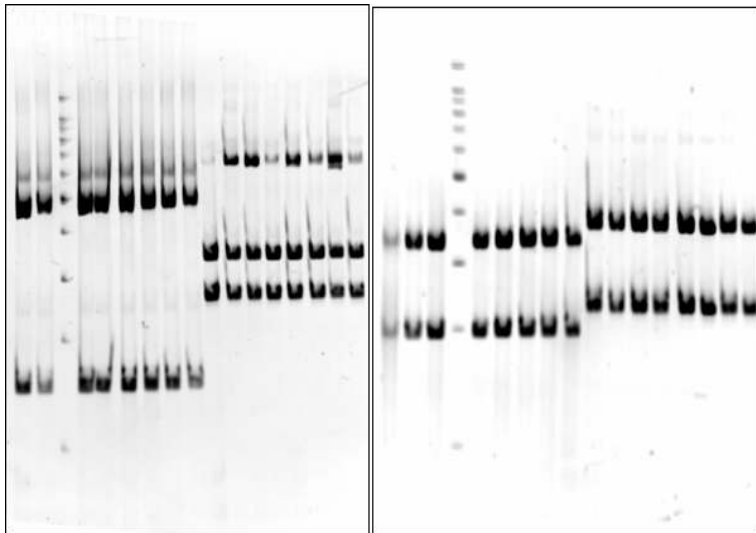


Figure 5-15. UR602 (*Alu I*, *EcoR V*, *Hae III*, *Rsa I*) digestion

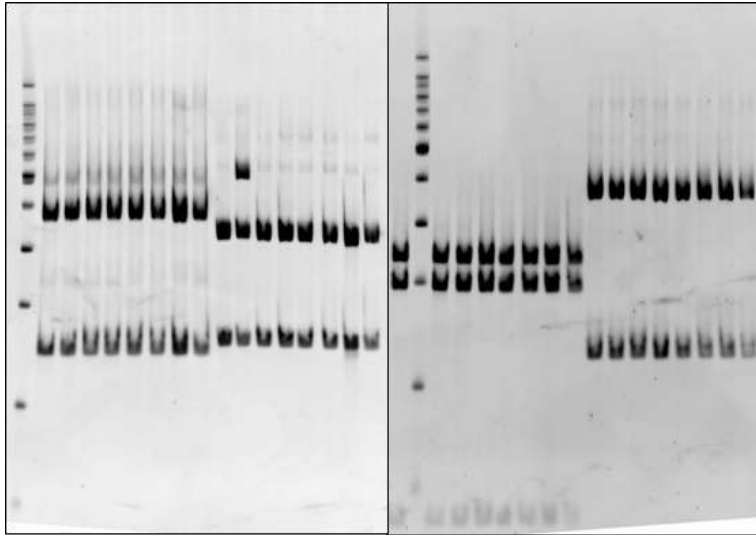


Figure 5-16. UR603 (*Alu I*, *EcoR V*, *Hae III*, *Rsa I*) digestion

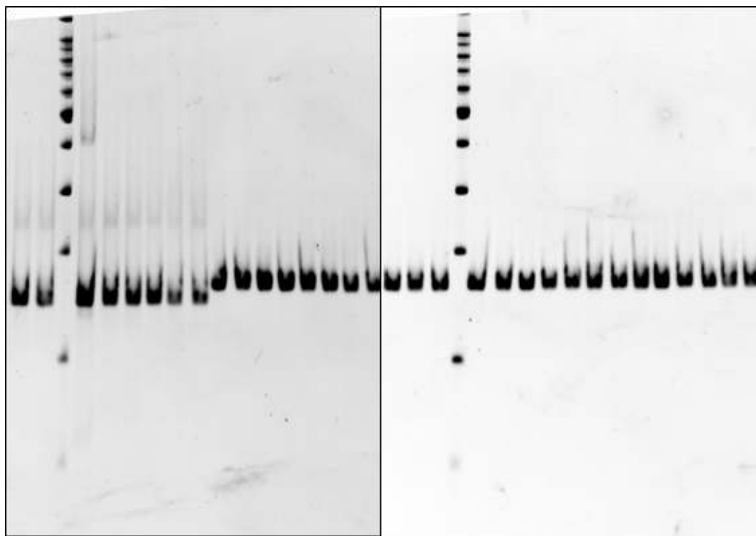


Figure 5-17. UR604 (*Alu I*, *EcoR V*, *Hae III*, *Rsa I*) digestion

제 6 절 SSR 표식인자 개발

1. SSR-enriched library 제작

SSR 마커 개발을 위한 genomic DNA는 공시품종인 ‘참빠른’ 으로부터 CTAB 방법을 변형하여 추출하였다. 적절한 양의 녹체를 액체질소에서 마쇄한 다음, 2 ml tube에 500 μ l 정도를 넣고 extraction buffer 500 μ l와 β -mercaptoethanol 5 μ l를 넣어서 잘 섞어주었다. 그 다음 10% sarcosyl 50 μ l를 넣고 섞은 후 37°C incubator에서 간간히 inverting을 하며 10분간 처리하였다. 5 M의 NaCl 100 μ l와 8.6%의 CTAB 70 μ l를 넣고 잘 섞어준 후 RNaseA 7 μ l (10 μ g/ μ l stock) 를 넣고 inverting한 후 65°C water bath에서 가끔씩 꺼내어 inverting 하며 15분간 처리하였다. 700 μ l (2/3 volume)의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 넣고 충분히 섞어준 후 12°C, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 700 μ l (2/3 volume)의 chloroform을 넣고 충분히 섞어준 후 12°C, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 0.1 volume의 NaOAc와 2.5 volume의 EtOH을 넣고 -70°C에서 20분 이상 침전하였다. 70%로 washing한 후 pellet를 30~50 μ l의 D.W로 re-suspension 하였다. 추출된 DNA는 2251 ng/ μ l 의 농도를 가지고 있었다.

추출된 genomic DNA 10 μ g 을 *AluI* 과 *XmnI* 을 이용하여 4시간 동안 37°C에서 digestion 하였다. 절단된 DNA에 아래 Fig. 5-18과 같은 염기서열을 가진 adaptor를 16°C 30분, 37°C 10분 씩 15 cycle로 PCR machine을 이용하여 ligation 시켰다.

```
SNX forward 5' CTAAGGCCTTGCTAGCA GAAGC
SNX reverse 3' AAAAGATTCCGGAACGATCGT CTCGp
```

Figure 5-18. Adaptor의 염기서열

Adaptor가 ligation된 DNA는 biotin-labelled된 oligo repeat들과 hybridization 반응을 수행하였다. Hybridization을 통하여 형성된 DNA와 biotin-labelled oligo 복합체는 streptavidin이 결합되어 있는 magnetic beads와 혼합하여 biotin-streptavidin 결합이 생성

되도록 반응을 수행하였다. 이 방법을 통하여 repeat를 소유하는 DNA-oligo 복합체를 순수 분리 하였다. 그리고 이 분리된 복합체는 아래의 조건과 같은 PCR 반응을 거쳐 DNA의 양이 증폭되었다 (Fig. 5-19). 증폭된 repeat를 가지는 DNA는 TA-cloning vector에 cloning되어 MRF' E. coli cell에 transformation되었다. 항생제를 함유한 LB배지에서 자란 colony들은 adaptor 서열과 일치하는 primer를 이용한 PCR반응을 통하여 insert를 소유하는지와 그 크기를 확인하였다. 이 들중 0.4 kb 보다 큰 insert를 가지는 colony들은 LB-amp 액체 배지에 배양한 후, plasmid mini-prep kit (Qiagen, USA)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 이것을 Perkin-Elmer사의 PCR sequencing kit을 이용하여 reaction한 후, ABI310 Genetic Analyzer를 이용하여 sequencing하여 반복서열을 가진 sequence를 확보하였다.

Eluted DNA :	10 μ l		
10X Buffer :	5 μ l	95 $^{\circ}$ C :	5 min
2.5mM dNTP :	5 μ l	59 $^{\circ}$ C :	1 min
10 pmole SNX forward :	4 μ l	72 $^{\circ}$ C :	2 min
EX-Taq :	0.4 μ l	95 $^{\circ}$ C :	45 sec
D.W. :	25.6 μ l	72 $^{\circ}$ C :	10 min
<hr/>			
Total :	50 μ l		

40-45 cycles

Figure 5-19. PCR 반응 조건

2. SSR primer 제작

(CT)₁₅ repeat를 사용하여 총 540개의 colony를 확보하였고, colony PCR을 통하여 164개의 colony가 400bp 이상의 insert를 가지는 것을 확인하였다. 이들 164개를 sequencing을 통하여 염기서열을 결정한 결과 총 109개에서 (CT)_n로 이루어진 SSR을 확인할 수 있었다. 이들 109개의 SSR을 소유한 clone들 중 primer의 제작이 가능한 clone은 총 91개 였다. 91개의 SSR을 소유하는 clone으로부터 제작된 primer의 정보는 Table 5-4에 제시하였다.

Table 5-4. CT-repeat 포함 SSR primer list

Primer Name	Primer Sequence		T _m (°C)	Exp. Size (bp)	Repeat
WS001	Forward(5'-3')	GCAAGGTAGGATGGACGAAG	53.8	147	(CT) ₁₉
	Reverse(5'-3')	TGTTATTGATGACGGTGTGGAA	51.1		
WS002	Forward(5'-3')	CGCCGAGTACACTGAAAATCT	52.4	108	(GA) ₂₇
	Reverse(5'-3')	TCATTCTCTGCTCTGCCATTCC	54.8		
WS003	Forward(5'-3')	CTTAATAATAAAATAGTGAAAGG	46.4	125	(GA) ₃₁
	Reverse(5'-3')	CCTGTGCTTCTCAACACTTT	49.7		
WS004	Forward(5'-3')	ACCATGAGTGCCAATTATCTCT	55	216	(GA) ₃₀
	Reverse(5'-3')	TTGCTCGTGCTCTTGCTTCC	59		
WS005	Forward(5'-3')	GAGAGTAATATAAAGATGACATC	48.1	156	(CT) ₃₇
	Reverse(5'-3')	GATCATTTTTCATATGCATGCA	46.5		
WS006	Forward(5'-3')	GGTTC AATGAATGTTTACCAAG	49.2	191	(GA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	ATCCACTACACTAATCCCTCT	50.5		
WS007	Forward(5'-3')	GAATTATGATAAAGTCTGCCCAT	49.9	193	(CT) ₃₂
	Reverse(5'-3')	TATGTATTTGAGCATTAGTCTC	47.4		
WS008	Forward(5'-3')	AGGCTTCGCTGCCGGTGAG	57.6	128	(GA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	CATGTTCTACTTCCTACAAC TTT	49.9		
WS009	Forward(5'-3')	CACATCTTCTCAAAGTCTGAA	49.2	153	(GA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	ACTTCGTTTCTCTATAAATCCCA	49.9		
WS010	Forward(5'-3')	ATTGACAGCCATGCCCAATTG	52.4	163	(CT) ₂₂
	Reverse(5'-3')	CCGTCTCTGCCATTACGAGC	58.5		
WS011	Forward(5'-3')	GGATAATTGAGGAATAAAGAAGGA	50.6	122	(GA) ₂₆
	Reverse(5'-3')	CCAGAACAACAGTCCGGTAC	53.8		
WS012	Forward(5'-3')	GTAATAATGATAATACAGGG	43.6	132	(GA) ₁₈ AA (GA) ₁₆
	Reverse(5'-3')	TCTTCTATCCATTACATTAA	43.7		
WS013	Forward(5'-3')	CAATTTATAGCAGGACTAAGATA	48.1	126	(GA) ₂₃
	Reverse(5'-3')	GCCAAAGATATGAATGCATAC	48.5		
WS014	Forward(5'-3')	GGATAATTGAGGAATAAAGAAGG	49.9	122	(GA) ₂₆
	Reverse(5'-3')	CCAGAACAACAGTCCGGTAC	53.8		
WS015	Forward(5'-3')	CCTTGTCTTTCATACATCTCT	48.5	96	(CT) ₁₁
	Reverse(5'-3')	TGGAGACAGATTGGAGAGC	51.1		
WS016	Forward(5'-3')	ATTACCGCCTTAACAACAAG	47.7	81	(GA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	ACTGATGGAATGCTTGCCTA	49.7		
WS017	Forward(5'-3')	CATTAACAATGTAGCACAAG	46	195	(GA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	AATCGCGTCTTTCAGGATC	49		
WS018	Forward(5'-3')	CAAACGACGACTTTAAACAC	46	151	(GA) ₃₀
	Reverse(5'-3')	GTGGCTTAAGACTGCAAAC T	50		
WS019	Forward(5'-3')	GCAGTCATTGCTGTCCAATT	50	256	(CT) ₁₆
	Reverse(5'-3')	TTGTTGAGTGCAACAATGGC	50		
WS020	Forward(5'-3')	GGCGTATCTAAGATCTCGC	51	243	(CT) ₂₁
	Reverse(5'-3')	CATGATTACGCCAAGCTTG	49		
WS021	Forward(5'-3')	GAACGGCGGAATTGCCATC	52	235	(CT) ₁₆

	Reverse(5'-3')	TGTTGGTGAGTGGAGATATC	50		
WS022	Forward(5'-3')	CAGTTCCATAGCCGATTC	48	323	(CT) ₃ CTTT (CT) ₁₉
	Reverse(5'-3')	TGCTAATGCTTCTTCACT	44		
WS023	Forward(5'-3')	ATCTCATTGGAGTAGACA	47	223	(GA) ₂₅
	Reverse(5'-3')	TATTCCAACATCCCTGTCA	47		
WS024	Forward(5'-3')	GTAGAAGTGAAGAGTGGGA	49	311	(GA) ₂₃
	Reverse(5'-3')	CAAGATTTT CAGCCTT CACC	49		
WS025	Forward(5'-3')	GTAATTCCAATTCCAATTCC	47	216	(CT) ₁₇ (CCT) ₅
	Reverse(5'-3')	GAGGTGTCGACGGAGAGGT	51		
WS026	Forward(5'-3')	AGGACATCTTGATATTTGGAC	49	231	(GA) ₇ GA (GA) ₇
	Reverse(5'-3')	CGGGTACGAAGTGACTTCT	51		
WS027	Forward(5'-3')	AGCCCACAGAAGTGTTTCGT	51	222	(GA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	TCAAGGAAGGTT CAGCGAT	49		
WS028	Forward(5'-3')	CTTGCTTGTACTCTGCAAC	49	318	(GA) ₄₆
	Reverse(5'-3')	GATCAATTATGAGATCAGGA	46		
WS029	Forward(5'-3')	<i>TTCCTTGACATTGCATCT</i>	45	185	(CT) ₂₁
	Reverse(5'-3')	AGAGAATGAATTGAAGTTG	45		
WS030	Forward(5'-3')	TTCAAATATCCCAAAGA	52	177	(CT) ₁₄
	Reverse(5'-3')	AGACTTGCTGATTGTAGTTA	49		
WS031	Forward(5'-3')	TGGCCATTGTTGTTGTTTATT	47	245	(GA) ₂₃
	Reverse(5'-3')	TGATTCTTCTACTTCTGTCA	46		
WS032	Forward(5'-3')	CACATCCGTCTATGGAGATT	50	349	(CT) ₁₄
	Reverse(5'-3')	ATCATCACCACGCGTGTGC	53		
WS033	Forward(5'-3')	TATTGTAGTGTTGGCTTCT	48	118	(AT) ₃ (GT) ₃₂
	Reverse(5'-3')	AGATGGATAGGCGTTTGCA	49		
WS034	Forward(5'-3')	GATTATGATAAATGAGTATGG	45	181	(GT) ₃₂
	Reverse(5'-3')	GTCTTAAGTTAACCAAGCATT	49		
WS035	Forward(5'-3')	GATTGTCCAGCTATACCACTC	51.4	125	(GA) ₂₇
	Reverse(5'-3')	GGAGAATGGTGTCAAATTCAT	48.5		
WS036	Forward(5'-3')	TCTGATGTGACCAACTCCGGC	55.9	379	(GA) ₂₇
	Reverse(5'-3')	CGCCGATCTGGTTGCCGCA	57		
WS037	Forward(5'-3')	ATTCCTTCTCATGGTTTTGCAG	51.1	239	(CT) ₂₃
	Reverse(5'-3')	GAGGCTTACACTCCATCAGA	50		
WS038	Forward(5'-3')	CATTCCATTCTCAGTTTCAG	50	290	(CT) ₁₉
	Reverse(5'-3')	GTAGATGATGACTCTGGAA	47		
WS039	Forward(5'-3')	TATTATCAGTGTGAGTACCAC	50	228	(CT) ₂₄
	Reverse(5'-3')	TCGGAAACCGAAGTAAACTA	48		
WS040	Forward(5'-3')	GTTGTAACCTCACAGGTCGCA	51.8	189	(GA) ₂₃
	Reverse(5'-3')	CTGCCATTATCTTGCACTG	49		
WS041	Forward(5'-3')	ACCAGGTTAAAGATATGATCT	47.4	234	(GA) ₃₂
	Reverse(5'-3')	CATTCCAACCCATCGGTTT	51		
WS042	Forward(5'-3')	CTCAAATGCAACTACTACTAC	51	247	(CT) ₁₁
	Reverse(5'-3')	GTGGTGACACGTGTGCGATC	53		
WS043	Forward(5'-3')	TATGCAGTCATTGCTGTCCA	50	255	(CT) ₁₆
	Reverse(5'-3')	TGAGTGCAACAATGGCGTC	51		

WS044	Forward(5'-3')	ATTCCTTGTTTGTATGCTGAG	50.7	120	(CT) ₁₂
	Reverse(5'-3')	ATGAACAAATCACGGGTAAG	50.4		
WS045	Forward(5'-3')	GCAGTCAAGAGACAAGATC	50.4	108	(CT) ₁₈
	Reverse(5'-3')	AGGATGTAACTCAACTTCTG	49.2		
WS046	Forward(5'-3')	GAGGCGTATCTAAGATCT	47.4	136	(CT) ₂₁
	Reverse(5'-3')	TCCCGTTTCCGTGAGATA	52.7		
WS047	Forward(5'-3')	ACATTCAGCATTGACAAGT	49.7	159	(CT) ₁₈
	Reverse(5'-3')	TGCTAGCAGAAGCCTAGAA	53		
WS048	Forward(5'-3')	GACCTGGGCGTCATTTCA	55.2	157	(CT) ₁₂ ATT CA(CT) ₁₁
	Reverse(5'-3')	CTTGCATGCCTGCAGGTC	57.1		
WS049	Forward(5'-3')	CCAACTAAGAACCCTCCT	49.1	154	(GT) ₂₉
	Reverse(5'-3')	TTACGCCAAGCTTGCATG	53.8		
WS050	Forward(5'-3')	ACCTCGGAATCGTCGAAAGA	55.8	213	(GA) ₃₀
	Reverse(5'-3')	CTTCCATATTATCAGCATCCA	50.2		
WS051	Forward(5'-3')	CTCCAAGAACTTTGTTGCAT	51.1	179	(GA) ₂₀
	Reverse(5'-3')	G TTCACATGACCTTGAGTTG	51.4		
WS052	Forward(5'-3')	GAACATGAGTTGCAGAACC	51.5	128	(GA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	TCGGATTCTTCGACATATG	49.0		
WS053	Forward(5'-3')	GTCCAACTTTGACGCAAC	52.4	282	(GA) ₃₈
	Reverse(5'-3')	TGATAAAGTCTGCCCATAG	48.7		
WS054	Forward(5'-3')	CATGATGTCATAATGTTTGC	47.4	250	(CT) ₁₉
	Reverse(5'-3')	TACGACAGTTATGCACCAG	51.9		
WS055	Forward(5'-3')	ACTTGAATTGGAACCGATCC	53.2	245	(CTT) ₉
	Reverse(5'-3')	TAAGGATGGATGAGGCGTGA	55.6		
WS056	Forward(5'-3')	ATGTTACAGATGAATCCCAC	49.7	123	(GA) ₂₃
	Reverse(5'-3')	GTCATTTAGCACAACATGGT	50.9		
WS057	Forward(5'-3')	GTGGAAGACATAAGACCACA	51.8	159	(GAA) ₆
	Reverse(5'-3')	CAGCGAAGCCTCAAACAGT	55.7		
WS058	Forward(5'-3')	ACTGTTTGAGGCTTCGCTG	55.7	123	(GA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	CCTACAACCTTTGGTTTCAGTC	50.8		
WS059	Forward(5'-3')	GGATGAGAATGTTACAGATG	49.0	147	(GA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	ATCGAACTTGCACCTCTGTC	52.4		
WS060	Forward(5'-3')	GATTTGTTTCTATTGCAAGAG	48.1	220	(AG) ₇ (GA) ₇ (GA) ₆ (GA) ₄
	Reverse(5'-3')	CTCACTCTTAGAACATAACAA	47.2		
WS061	Forward(5'-3')	TCCCAACATTCAAATGGTTA	49.5	179	(GA) ₁₆
	Reverse(5'-3')	TGGCCATATACTGTAAATG	46.6		
WS062	Forward(5'-3')	CTCATGGTTTTGCAGTTCGA	53.4	162	(TC) ₂₄
	Reverse(5'-3')	CTCTTCAGATCCGCAATTAG	50.5		
WS063	Forward(5'-3')	TCTGATGTGACCAACTCCG	54.3	244	(GA) ₂₇
	Reverse(5'-3')	CCAATGGAATTCAGAAGGTG	51.3		

WS064	Forward(5'-3')	CCTCAAATGCAACTACTACT	49.6	235	(TC) ₁₂
	Reverse(5'-3')	TCGATCGGAAGCCATTTGT	54.4		
WS065	Forward(5'-3')	CTGAAGATCTCATAACTGATG	47.9	274	(CT) ₄₇
	Reverse(5'-3')	CCAGAAGATTAATCATCTATG	45.4		
WS066	Forward(5'-3')	GAACTTCAACAACACTGCCAG	47.4	143	(CT) ₄₄
	Reverse(5'-3')	ACCAAACACTGTTCCAACAGA	51.7		
WS067	Forward(5'-3')	CAAGAAGCCATGAACCAGA	52.5	164	(CT) ₃₄
	Reverse(5'-3')	GTTGTAGGAGTAAGTTAGAG	46.7		
WS068	Forward(5'-3')	GTGAATGATCTAGACATCTA	45.7	258	(GA) ₂₁
	Reverse(5'-3')	CAGATTACGATGGTTTGCT	50.1		
WS069	Forward(5'-3')	TCACGCCTCATCCATCCTTA	55.6	164	(CT) ₄₂
	Reverse(5'-3')	AGCACAGTGGATTTCTCCCA	56.3		
WS070	Forward(5'-3')	CTTGCTTTTCGTGGCTCAG	53.5	242	(CT) ₄₅
	Reverse(5'-3')	TGTCACCGATCGGTTTCGT	56.6		
WS071	Forward(5'-3')	TGCTCCCCTCTCGCGTT	59.4	178	(CT) ₄₄
	Reverse(5'-3')	CTTTGATTGATTGCACGATG	50.1		
WS072	Forward(5'-3')	ACTTGTATGGTCTGGAGAAG	51.3	228	(CT) ₄₆
	Reverse(5'-3')	TAGCGCGAATCCTCGAAAC	55.1		
WS073	Forward(5'-3')	GTTCAGTAAGTAGTCTTGAG	47.2	187	(CT) ₄₃
	Reverse(5'-3')	ATCACTCTATTAATGCCAGG	49.8		
WS074	Forward(5'-3')	GAACTTCGGCGTCTATCACT	54.4	196	(CT) ₃₄
	Reverse(5'-3')	GAATTCACCAGAGACCGGCA	57.3		
WS075	Forward(5'-3')	GAGACACCTGAAGATCTCAT	51.1	208	(CT) ₄₇
	Reverse(5'-3')	CAAAGTCAGGCTCTATCCA	51.4		
WS076	Forward(5'-3')	GTCGATCTATGCCTTTGCC	53.5	178	(CT) ₂₅
	Reverse(5'-3')	TAGCTATTTGGCGTGGTGAC	55		
WS077	Forward(5'-3')	CACCTGATGCCTGCATTCA	55.6	≙ 212	≙ (CT) ₃₈
	Reverse(5'-3')	CTGAATTTTGATTCCGGCGA	53.5		
WS078	Forward(5'-3')	CAGATCGTCACTGCCTTTA	51.9	≙ 224	≙ (CT) ₆₄
	Reverse(5'-3')	GCTTTTCCAATGT <i>GAGAG</i>	48.4		
WS079	Forward(5'-3')	GAACTTACCGGTATCTGTCA	51.3	≙ 253	≙ (GA) ₄₈
	Reverse(5'-3')	CTTTGAATTACAAGGCAAGCA	51.7		
WS080	Forward(5'-3')	CATTCAAGGCCTTATCAACT	50.2	200	(CT) ₆₈
	Reverse(5'-3')	TCTTGTTGCACTCATCGAC	52.6		

WS081	Forward(5'-3')	GAAGCACGAGCAACATGTTG	54.9	≒ 236	≒ (GA) ₃₅
	Reverse(5'-3')	CAGTGTGAGTACCACCTGAT	53.9		
WS082	Forward(5'-3')	TCAGCTTGACCTCTCAGCT	55.7	147	(CT) ₂₀
	Reverse(5'-3')	AGCGACACTCTAAGCGTGA	56.0		
WS083	Forward(5'-3')	ACCGACCTATCATGAACATG	52.0	172	(CT) ₃₈
	Reverse(5'-3')	CACTGCAACCAAATCCATTTTC	52.8		
WS084	Forward(5'-3')	GTCAAGCAAGGTAGGATGGA	54.3	240	(CT) ₄₉
	Reverse(5'-3')	CAGTAGCCTTAGAATTCACCA	51.9		
WS085	Forward(5'-3')	CTTCGCTGGCCAGGAAGTA	57.1	165	(CT) ₂₇
	Reverse(5'-3')	CAGTGATTGTCCAGCTATAC	50.2		
WS086	Forward(5'-3')	TGGTGGTTGCCTTGCTTCTGA	59.5	≒ 180	≒ (GA) ₃₄
	Reverse(5'-3')	GTGGCTTAAGACTGCAAACCTC	54.0		
WS087	Forward(5'-3')	TCTATGAAGCAGCATTACTG	49.7	148	(GA) ₂₉
	Reverse(5'-3')	AGGCATTAGCATAAAATGTTAC	49.1		
WS088	Forward(5'-3')	CTGATGCCTGCATTCAAAAG	52.4	289	(CT) ₄₄
	Reverse(5'-3')	TGTATGGGCGCAACAAAGAG	55.8		
WS089	Forward(5'-3')	CTCAAGTTGCTTCAGTTCCT	52.6	≒ 240	≒ (CT) ₄₀
	Reverse(5'-3')	GAAATCAAGGGCAAAGCCA	53.7		
WS090	Forward(5'-3')	GTGCAAAAGAAGCTTGAC	52.7	172	(CT) ₃₂
	Reverse(5'-3')	CGACACTCTAAGCGTGAAC	53.5		
WS091	Forward(5'-3')	ACTACATGGATGACGTGAAG	51.9	291	(CT) ₆₅
	Reverse(5'-3')	ATTATGTCACAATGCCAAACA	50.7		

(CA)₁₅ repeat를 사용하여 총 470개의 colony를 확보하였고, colony PCR을 통하여 184개의 colony가 400bp 이상의 insert를 가지는 것을 확인하였다. 이들 184개를 sequencing을 통하여 염기서열을 결정한 결과 총 126개에서 (CA)_n로 이루어진 SSR을 확인할 수 있었다. 이들 126개의 SSR을 소유한 clone들 중 primer의 제작이 가능한 clone은 총 109개였다. 109개의 SSR을 소유하는 clone으로부터 제작된 primer의 정보는 Table 5-5에 제시하였다.

Table 5-5. CA-repeat 포함 SSR primer list

Primer Name	Primer Sequence		Exp. Size (bp)	Repeat
WS092	Forward(5'-3')	GCTATAAGGTCCAACCTAGA	103	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	TCCAAACTAAGAACCTTCCT		
WS093	Forward(5'-3')	TACCGTGGGTTTGAAGTAAG	167	(CA) ₃₉
	Reverse(5'-3')	GAAGCCTCTGTGATTGGATG		
WS094	Forward(5'-3')	CTCCACCAAAAAGGTGGCAC	150	(CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	TGGGGACATTGGCATTGCT		
WS095	Forward(5'-3')	GGAATTATTTAATGACTGT	137	(CT) ₂₀ (CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	CAAACGTTTCTGCAAGC		
WS096	Forward(5'-3')	CTTTCGACCTGCTTACTTAG	107	(CA) ₅
	Reverse(5'-3')	GTTAAGCAGGTAAGCGAAG		
WS097	Forward(5'-3')	CCAAGCATTGAGTATCCCT	153	(CA) ₂₆
	Reverse(5'-3')	TAATGAAGATCCTGGTTAAC		
WS098	Forward(5'-3')	ACGGATTAAGTTGAAAACG	124	(CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	CCTTGCTAGCAGAAGCCT		
WS099	Forward(5'-3')	AATCGAGAACCATCTTCG	141	(CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	GGCCTTGCTAGCAGAAGC		
WS100	Forward(5'-3')	TCGAAATTATGCGGATGGAG	148	(CA) ₂₀
	Reverse(5'-3')	TAACCAAGCATTGAGTATC		
WS101	Forward(5'-3')	GAGGCCAAACGGGAAACCA	117	(CAA) ₄ (GAA) ₃
	Reverse(5'-3')	CTAGATGATTACTTAATCGT		
WS102	Forward(5'-3')	CATGTTATGGTCTGATCAG	168	(CT) ₆ (CA) ₂₅
	Reverse(5'-3')	CTTGCTAGGAAAGGAGCAG		
WS103	Forward(5'-3')	TCACCGCTTTTCTCTCT	137	(CT) ₁₀ (CA) ₂₀
	Reverse(5'-3')	ACTGCTTGATTTGATTAC		
WS104	Forward(5'-3')	GTAAGTTATATGGCTATAG	238	(CA) ₉₂
	Reverse(5'-3')	TCCTCCTTGGTCTTTGTC		
WS105	Forward(5'-3')	CATGCAGGTGCTTTTCCTC	91	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	GAGATAGAAATGGAGATTC		
WS106	Forward(5'-3')	CTGAGGTAAGTTATATG	81	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	GGTGACTTATCATGTGTG		
WS107	Forward(5'-3')	CACTCGTGAAATATACTAGT	143	(CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	AGTATGTCCACTAAGGTGC		
WS108	Forward(5'-3')	TGCAGGTTGCACTCACTC	156	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	CATCATCCGTTCTCAACGT		
WS109	Forward(5'-3')	GAACTTGCTAGGAAAGGAG	121	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	ATCTTCGTTCCGGTCTCAC		
WS110	Forward(5'-3')	GGAATAGAACATGTGTTG	191	(CA) ₆₈
	Reverse(5'-3')	ACAATAACAGAGGCAGAG		
WS111	Forward(5'-3')	CTCTCTAGCAACTCTTTG	176	(CA) ₄₉
	Reverse(5'-3')	CAAACCTAAGAACCTTCCTA		

WS112	Forward(5'-3')	CATGTTATGGTCTGATCA	158	(CT) ₆ (CA) ₃₅
	Reverse(5'-3')	TAATGTGTGTGTGGGCGT		
WS113	Forward(5'-3')	CTATAGCTGTAATTACAC	134	(CA) ₄₄
	Reverse(5'-3')	CTATGAAAGTTCGCCTT		
WS114	Forward(5'-3')	CTGTGTCGTTGTCTTCTG	148	(CT) ₁₉ (CA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	AATGGATAGTGAAGGAGA		
WS115	Forward(5'-3')	CATCTTCGTTCCGGTCTCA	93	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	TATTTTCTTCTCTCTCTG		
WS116	Forward(5'-3')	GTTTCTTGATGTTATGGTGT	131	(CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	GAATGTGTCATCATCTTGCTG		
WS117	Forward(5'-3')	GCTAGACCGATTCAATTGT	123	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	CTTGCTAGCAGAAGCCTAC		
WS118	Forward(5'-3')	CTAATCTTCAGGTGTG	122	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	GCATGTACTTCTCTTGA		
WS119	Forward(5'-3')	CCTATTCTCGAGGGAGC	≅ 300	(CA) _{>70}
	Reverse(5'-3')	AGTACAATCTGCTCTGAT		
WS120	Forward(5'-3')	GTTATGAAAGAGAAAGGA	103	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	ACATAATTTTCTCTCTG		
WS121	Forward(5'-3')	TTTTCTCTCACACACAAA	270	(CA) ₁₁₂
	Reverse(5'-3')	CAAATAAGAACCTTCCT		
WS122	Forward(5'-3')	CTTGATATGTGCGTGTGT	≅ 100	(CA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	TAGCCTATAAAATTATTC		
WS123	Forward(5'-3')	GAGTAATGTTGCTAGAGA	≅ 180	(CA) ₅₀
	Reverse(5'-3')	GAAGAGTAATTAAGAGAAG		
WS124	Forward(5'-3')	GATTCTCGCCCATGTGTC	≅ 300	(CA) _{≅80}
	Reverse(5'-3')	GTGGGCTTCATTGTCCTC		
WS125	Forward(5'-3')	AGGACAGTTCGGTTCAGT	82	(CA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	CATTCATCATCCGTTCTC		
WS126	Forward(5'-3')	CTAATTTGTTATGAAAGAG	85	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	AACAATCGTGTTAGATAC		
WS127	Forward(5'-3')	CTTGAGATCTGAATGTG	134	(CA) ₃₆
	Reverse(5'-3')	CTTTACCGCCCATTTTGAG		
WS128	Forward(5'-3')	GTGTCATCATCTTGCTGT	127	(CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	TTCTTGATGTTATGGTGT		
WS129	Forward(5'-3')	CTGCAACGAAGTAGTATC	116	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	CAAGGTAATCTTCTTATG		
WS130	Forward(5'-3')	GATATCCTTGGTCATTATG	≅ 130	(CT) ₉ (CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	ATTCAGTATCTAACAAAC		
WS131	Forward(5'-3')	GAGTCAGAAATACCTTTG	≅ 300	(CA) _{≅40}
	Reverse(5'-3')	GATTCCTGCACTGCAGCG		
WS132	Forward(5'-3')	CTCAACTAATTATCAGAG	134	(CA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	GGTTGAGGATGAACTATC		
WS133	Forward(5'-3')	ACAAGCCATCCTGAAAAC	105	(CA) ₂₉
	Reverse(5'-3')	GAAATTATTTAATGACTG		
WS134	Forward(5'-3')	AGTCATTCAAGGCCAAATC	96	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	GTCCACCATGAAACCAC		

WS135	Forward(5'-3')	CAATTTACTATTTCTCCGTG	93	(CA) ₂₁
	Reverse(5'-3')	CTTGCTAGCAGAAGCCTG		
WS136	Forward(5'-3')	GACATTGTTACGCTCATG	114	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	TAGTTAAATTGAACCATG		
WS137	Forward(5'-3')	CTGCAAGCAGATCATGAC	107	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	ACGAGCGTGAGCAAGGCT		
WS138	Forward(5'-3')	CTCAACAATTTCTTCATC	97	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	CTTGCTAGCAGAAGCCTAC		
WS139	Forward(5'-3')	CAATCCTGAAACATGGGT	140	(CA) ₄₀
	Reverse(5'-3')	AGTATGTCCACTAAGGTG		
WS140	Forward(5'-3')	CAATCGAGAACCATCTTC	124	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	GAAAGGAGCAGTATAAGT		
WS141	Forward(5'-3')	CTCCACAAACGGATAAAAAAC	83	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	GAAGGTTGTTTTATCCTCCT		
WS142	Forward(5'-3')	GTCTTCTCAACATTCATC	98	(CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	AGAAGCCTACGAAGTGAG		
WS143	Forward(5'-3')	CTCGCAAACAATCGTGTTAG	134	(CA) ₂₁
	Reverse(5'-3')	CACTCGTGAAATATACTAG		
WS144	Forward(5'-3')	GAACCGAGTAGACCTTGAG	≅ 180	(CA) _{≅30}
	Reverse(5'-3')	GATTACAGTGATTGATATC		
WS145	Forward(5'-3')	GTGGAGTAATGTTGCTAG	125	(CA) ₂₂
	Reverse(5'-3')	GTA CTCTCTTTGATTTCTC		
WS146	Forward(5'-3')	GTCAATCAAATAAATGCT	99	(CA) ₅ (AT) ₅ (GT) ₅ (AT) ₅
	Reverse(5'-3')	CGAGCACAAATAGTTCTTG		
WS147	Forward(5'-3')	GTCATCATCTTGCCTGTTG	106	(CA) ₂₁
	Reverse(5'-3')	TTCAAGTTCTTAAAAGGA		
WS148	Forward(5'-3')	ATCCTGAAACATGGGTTG	93	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	TCTTCTGATGCAATTAAG		
WS149	Forward(5'-3')	GTATAACACTGAACTATAG	88	(CA) ₁₂
	Reverse(5'-3')	CCTACTAGTAAGTGATAG		
WS150	Forward(5'-3')	TCCAAACTAAGAACCTTC	103	(CA) ₅ GGCGTGG (CA) ₁₀
	Reverse(5'-3')	TCTATGGCCTTCTCCTGA		
WS151	Forward(5'-3')	CAACTTAGATACTTCTTAC	131	(AC) ₉ CCACGCC (CA) ₅
	Reverse(5'-3')	CACTCGTGAAATATACTAG		
WS152	Forward(5'-3')	GTTACCCAACCCAAACCA	114	(CA) ₂₇
	Reverse(5'-3')	TATGCAGTTTGGTTACTG		
WS153	Forward(5'-3')	CTAATTATCAGAGGTAGAG	140	(CA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	ACCAACTACGAGGTTGAG		
WS154	Forward(5'-3')	CAATGTCAGTTAGTGGTTG	123	(CA) ₂₁
	Reverse(5'-3')	CATGGGTCTCTATTTTC		
WS155	Forward(5'-3')	CTCTTTGGTGATCACAGT	157	(CA) ₃₂
	Reverse(5'-3')	GGTTTAAATGTAAGCTTTTG		
WS156	Forward(5'-3')	CTAGCAACTCTTTGGGTTG	86	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	CTAAGGCCTTGCTAGCAG		

WS157	Forward(5'-3')	CGAATTGTGGAAGAAGAG	85	(CA) ₇
	Reverse(5'-3')	ATTCATATCCAAACGACC		
WS158	Forward(5'-3')	GAACCTTGCTAGGAAAGGA	128	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	GAACCATCTTCGTTCCGGTC		
WS159	Forward(5'-3')	CTAGCAAGAGCGGAATAC	119	(CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	AAGTTATATGGCTATAGC		
WS160	Forward(5'-3')	CTCTTTCTCTCTGTGT	108	(CA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	ATTAGGATCTTAAACC		
WS161	Forward(5'-3')	CAGATATAGTTCGTAAGTG	110	(CA) ₁₀
	Reverse(5'-3')	CTCTTTACTGTATGGTT		
WS162	Forward(5'-3')	AACCATACAGTAAAGAG	86	(CA) ₁₉
	Reverse(5'-3')	TCCATCAACATCATACTC		
WS163	Forward(5'-3')	CTAGGCATCCCCTAAGAC	100	(CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	GTCTTCTCAACATTCATC		
WS164	Forward(5'-3')	TGGAAATTCGGCCACAGA	125	(CA) ₂₆
	Reverse(5'-3')	CTTTTTCGACTTAAAAGGT		
WS165	Forward(5'-3')	GAAGGTATATTCATGTTG	99	(CA) ₅ (CT) ₄
	Reverse(5'-3')	ATGAACTAATTAACCAGTC		
WS166	Forward(5'-3')	CAGAAGTTTGTATGAACC	143	(CA) ₂₈
	Reverse(5'-3')	TCGCTAGTAGTTGATGAC		
WS167	Forward(5'-3')	GATTCATATTTTCTCTTG	109	(CA) ₁₂
	Reverse(5'-3')	TCAAGATGGGTGTTTTCA		
WS168	Forward(5'-3')	CAAGTTCCAACAACATTA	128	(CA) ₂₀
	Reverse(5'-3')	GGACAACCTGACAAGGTAG		
WS169	Forward(5'-3')	GTGTCTGAATATATAAATG	81	(CA) ₈
	Reverse(5'-3')	ATGTGATGTATAGGCTTC		
WS170	Forward(5'-3')	CTATTGAAGTTTGACAT	94	(CT) ₇
	Reverse(5'-3')	CTCAGCAATGGCCAATAG		
WS171	Forward(5'-3')	CAACCTGCAACGAAGTAG	113	(CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	GTCTTCTCAACATTCATC		
WS172	Forward(5'-3')	CAAACCTAAGAACCCTCCT	95	(CA) ₁₀
	Reverse(5'-3')	GTCCAACCTTAGATACTTC		
WS173	Forward(5'-3')	CTTGTTATATATATACAC	112	(CA) ₂₁
	Reverse(5'-3')	TTCATACTCACAACACA		
WS174	Forward(5'-3')	GTTCAGGACAACCAACAC	114	(CA) ₁₁
	Reverse(5'-3')	CCTTCAATATGAAAGGAG		
WS175	Forward(5'-3')	CTCAACTAATTATCAGAG	134	(CA) ₁₇
	Reverse(5'-3')	GGTTGAGGATGAACTATC		
WS176	Forward(5'-3')	GAGATAGAAATGGAGATTC	208	(CA) ₇₃
	Reverse(5'-3')	CCAAACTAAGAACCCTCCT		
WS177	Forward(5'-3')	CAATGTCAGTTAGTGGTT	≅ 250	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	GATAATCGAATGTTATCA		
WS178	Forward(5'-3')	CTTTATCCGTGTGTG	109	(CA) ₁₅
	Reverse(5'-3')	CTACCACCGAACCAAG		
WS179	Forward(5'-3')	CAACATTAGATATGAGCAG	129	(CA) ₁₀ (CT) ₁₉
	Reverse(5'-3')	GACAAAGGATCAAACGAC		

WS180	Forward(5'-3')	CAATCCTGAAACATGGGT	102	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	GCACTGTTCTTCTGATGC		
WS181	Forward(5'-3')	CTGAGGTAAGTTATATG	125	(CA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	CAATGCATCTCACTTTGC		
WS182	Forward(5'-3')	GATTCATATTTTCTCTTG	110	(CA) ₁₂
	Reverse(5'-3')	GTCAAGATGGGTGTTTTTC		
WS183	Forward(5'-3')	GAGATAGAAATGGAGATTC	109	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	GCATGTAGATTATCCAAC		
WS184	Forward(5'-3')	CTTCATGGCCGCCCTT	128	(CA) ₁₈
	Reverse(5'-3')	GGATTTTCGCAAACATCG		
WS185	Forward(5'-3')	CACAACCTGCAACGAAGT	128	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	GTATCACAAGGTAATCTTC		
WS186	Forward(5'-3')	CAGTTAGTGTTGACGTC	143	(CA) ₃₂
	Reverse(5'-3')	GCTAGCAGAAGCCTGGTG		
WS187	Forward(5'-3')	CGATGTGCATTGTGTG	80	(CA) ₁₃
	Reverse(5'-3')	CCCTATATTCAGAAAG		
WS188	Forward(5'-3')	CAAGAGCACTTTCCTGCA	173	(CA) ₃₃
	Reverse(5'-3')	CAGAAATACCTTTGATCTC		
WS189	Forward(5'-3')	TCCAATTATTAATACGCT	225	(CA) ₇₆
	Reverse(5'-3')	CTCTTTGTTTATTACAAG		
WS190	Forward(5'-3')	CTGAGGTAAGTTATATG	131	(CA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	GAAGTTCAATGCATCTCAC		
WS191	Forward(5'-3')	TAGAGATAAGTGGAAAGTG	183	(CA) ₁₈ (CT) ₇
	Reverse(5'-3')	ATCTCCTAACTTGTGCATC		
WS192	Forward(5'-3')	GTCCAACCTAGATACTTC	133	(CA) ₃₆
	Reverse(5'-3')	TCCAACCTAAGAACCCTTC		
WS193	Forward(5'-3')	CTCTAGATAGTTTCTTTT	101	(CA) ₁₀
	Reverse(5'-3')	GTTCTCAACATTCATCATC		
WS194	Forward(5'-3')	AGAAGTATAACACTGAAC	94	(CA) ₁₂
	Reverse(5'-3')	TGCCTACTAGTAAGTGAT		
WS195	Forward(5'-3')	CTGAGGTAAGTTATATG	131	(CA) ₂₄
	Reverse(5'-3')	GAAGTTCAATGCATCTCAC		
WS196	Forward(5'-3')	CGTCACCCAAACTCTCAG	133	(CA) ₉
	Reverse(5'-3')	CAAACCTAAGAACCCTTCCT		
WS197	Forward(5'-3')	GAAGATAGTACCAACAATTG	106	(CA) ₁₁
	Reverse(5'-3')	CAGACTTGAAGAGTTCCTG		
WS198	Forward(5'-3')	CTCAACATTCATCATCCG	109	(CA) ₁₄
	Reverse(5'-3')	GAGAGTCAAAGTGCAATC		
WS199	Forward(5'-3')	GAAGTTCAATGCGTCTCA	133	(CA) ₂₀
	Reverse(5'-3')	TCTTACCCGGTGTGATTC		
WS200	Forward(5'-3')	CATGGAAATTATTTAATGAC	187	(CA) ₁₆ (CT) ₂₁
	Reverse(5'-3')	GTGGCTTCGGTGTCTAC		

제 7 절 수박과 멜론 품종구분을 위한 표식인자은행 모형 구축

DNA 표식인자를 이용한 실질적이고 체계적인 품종구분 및 관리체계의 확보를 위하여 개발되어진 표식인자들은 품종간의 구별이나 근연관계의 구별에 이용하기 위하여 표식인자은행화를 수행하고 있는 중이다. 다만 개발되어진 DNA 표식인자들이 한 종류 혹은 몇 종류의 품종들에 대하여만 제한적으로 구분이 가능하기 때문에 이들을 모든 수박이나 멜론 품종의 동시 구분을 위하여 통합하기 보다는 관찰된 PCR 증폭산물이나 제한효소 처리에 의한 절단산물들을 품종별로 구분하여 이용하는 것이 타당할 것으로 생각되기 때문에 반복적으로 재확인 된 결과들의 경우 gel image와 분석표들을 web site에 등록하여 공개하기 위한 작업을 수행하였다.

제 6 장 멜론, 수박의 재배시험 특성조사 및 포장 순도검정

제 1 절 멜론 재배시험 특성조사

1. 재료 및 방법

○ 공시품종: 48품종

NET 계통: 올림픽 등 34품종 (국내시판종 23, 유럽종 11)

NO net 계통: 베스트등 14품종 (국내시판종 12, 유럽종 2)

○ 재배개요

- 파종: 2005년 4월 15일
- 정식: 2005년 5월 10일
- 수확: 2005년 7월1-15일
- 장소: 여주군 가남면 농우바이오 육종연구소
- 150×40cm (외골 10주 1반복) 지주재배
- 착과절위: 11-13절
- 주당 착과 수: 1과
- 이 밖의 시비, 관수, 병해충 방제 등은 관행적인 방법에 준하여 실시하였다.
- 조사기준: UPOV 특성조사 방법을 준용한 국립종자관리소 ‘멜론 특성조사요령’에 준하여 조사하였다.

2. 멜론의 형태적 특성조사 결과

현재 우리나라에서 재배되고 있는 멜론품종의 수는 90년대 이후 급속히 증가하고 있다. 멜론이 처음 일본에서 도입되면서 주로 일본의 품종들이 재배되어 오다가 최근에는 국내 종자회사에서 육성한 품종들이 주류를 이루고 있다 해도 과언이 아닌 만큼 국내종자회사의 멜론 육성이 활발하게 이루어지고 있고 다양한 품종들이 출시되어 농가의 소득향상 및 소비자

의 욕구에 부흥하고 있다.

이처럼 많은 멜론 품종들이 재배되고 있는 유형을 보면 네트멜론과 무네트멜론으로 구분하고 있으며 네트멜론에서는 내병성을 보유하여 재배에 까다롭지 않은 잡메론이 많이 재배되다가 네트의 솟음이 강하고 밀도가 낮아 외관이 우수한 어얼스계로 전환되고 있는 실정이다. 노네트멜론은 과피색이 백색인 것, 황색인 것, 얼룩인 것과 과육색이 백육이거나 황육인 것 등으로 다양하다. 본 시험에서 공시한 품종에서는 주로 국내에서 재배되고 있는 어얼스계 네트, 잡네트계멜론과 유럽에서 재배되고 있는 Galia, charentais, cantaupe와 노네트계에서는 허니듀, Sapo 계통 등을 시험하였다.

형태적 특성조사 결과를 보면, 네트멜론에서는 유묘기에서 착과전까지는 초형에서 큰 차이를 보이지 않으나 암꽃발생과 암꽃의 형태 그리고 암꽃에 발생하는 모용의 상태등에서 여러 가지로 구분되었고 유과에서는 유과색, 골의 유무에서 차이를 보였다. 암꽃의 형태는 모두 양전화이며 유과색은 주로 담록색을 나타내지만 일부 몇 개의 품종에서는 진한 농록색을 보이며 유과의 모용의 경우 가늘고 부풀은 상태에서부터 짧고 과면에 밀착한 정도에서 다소의 차이가 있었다.

네트발생기에는 네트발생의 시기와 발생형태에서 국내 시판종과 유럽종에서 많은 차이를 발견할 수 있었다. 국내 시판종은 유과색이 담록색으로 연하고 견부(과꼭지 부분)에만 진한 녹색을 띄며 네트의 발생은 다소 늦으나 강하였으며 유럽종에서는 네트의 발생이 빠르나 약하고 과면 전체에서 비교적 균일하게 발생한다. 이것은 국내 시판종 중 잡네트의 네트 발생 형태와 유사하다.

성숙일수는 정확하게 판단할순 없지만 대체적으로 유럽종이 5-7일정도 빨리 성숙되는 것으로 판단된다. 과의 비대력은 유럽종보다는 국내 시판종에서 비대가 우수했으며 과육의 당도에서도 유럽종 보다는 국내 시판품종에서 2-3도(일부품종 제외) 정도 높게 나타났다.

노네트멜론의 특성조사 결과 허니듀(honeydew)는 국내시판종의 네트멜론에 비해 잎이 얇고 엽맥이 연하며 엽병이 다소 긴 것으로 나타났으며 과의 형태도 구형, 고구형, 장타원형 등으로 다양하였다.

성숙일수는 국내시판종인 네트멜론에 비해 약 10일정도 빠르며 유럽종과 비슷한 정도이고 과육색은 네트멜론이 녹색이거나 백록색인데 비해 주로 백색이거나 유백색을 보이며 일부 녹육이나 적육도 있었다. 적색의 강도는 네트멜론에서 강했으며 과육의 부위, 성숙정도에 따라 강도가 다르게 나타났다. Pilelde Sapo의 경우 과피색이 황색바탕에 얼룩줄무늬가 나타나며 그 줄무늬는 다소 약하게 발현되었다. 또한 성숙일수가 다가오면서 과피표면에 열피현

상이 발생하는 것을 관찰 할 수 있었고 이는 후기 수분이나 초세가 강해질 때 더 심하게 발생하였다. 무네트의 경우 태좌부색이 백색인 것과 오렌지색을 띄는 것으로 구분되며 태좌색이 오렌지색은 소비자 선호가 떨어지는 것으로 알려져 있다.

제 2 절 수박 재배시험 특성조사

1. 재료 및 방법

○ 공시품종: 29 품종

타원형 호피 수박계 스피드꿀 수박 등 13 품종

소과종 수박 꼬마 수박 등 6 품종

원형계 금천수박

3배체 수박 씨제로, 씨제로꿀

Tropical type Champion 등 7 품종

○ 재배개요

- 파종: 2006년 4월 20일

- 정식: 2006년 5월 23일

- 수정: 2006년 6월 20-23일

- 수확: 2005년 7월25일

- 장소: 경남 밀양시 산내면 농우바이오 남부육종연구소

- 330×30cm (외골 10주 2반복) 포복재배

- 착과절위: 11-15절

- 주당 착과 수: 1과

- 이 밖의 시비, 관수, 병해충 방제 등은 관행적인 방법에 준하여 실시하였다.

조사기준: UPOV 특성조사 방법을 준용한 국립종자관리소 ‘수박 특성조사요령’에 준하여 조사하였다.(표2-1 참조)

2. 수박의 형태적 특성조사 결과

현재 우리나라에서 재배되고 있는 수박의 품종은 호피무늬의 원형계(금메달, 달고나, 금천)에서 호피 타원형계(삼복꿀, 스피드꿀)로 변화되어 왔고 육질 및 과형 또한 소비자의 기호에 맞게 개량되고 있다.

지금까지 수박 육성은 과실의 품질을 개량하기 위한 육성으로 내적으로는 당도를 높이고 육질은 아삭하고 치감을 좋게하며 과육색이 선홍색으로 선명한 수박품종을 만들기 위하여 노력하였고 외적인 품질개량에는 호피무늬가 진하고 선명하며 과형태가 안정된 수박 품종을 개발하는 데 각 종묘회사의 노력이 집중되었다. 이처럼 품질개량으로 인한 많은 수박 품종들은 소비자의 욕구를 충족시켜왔고 여전히 여름철 최고의 채소과일로 자리를 지키고 있다.

수박 재배농가의 노동력을 절감하고 재배의 안정성을 높이기 위한 노력으로 많은 수박 육종회사들은 착과를 용이하게 하고 각종 생리장애에 둔감하며 수량성이 높은 것은 물론 수송성, 저장성, 내병성 등이 우수한 수박 품종을 개발하는데 노력하고 있다. 더 나아가 수박의 기능성을 갖춘 3배체수박과 Cucurbitacin등이 많이 함유된 품종을 개발하는데 주력하고 있고 이러한 품종을 개발하는데 보다 신속하고 효과적으로 하기위해 형질과 관련된 연관marker를 개발해 이용함으로써 시간과 비용을 줄이고 효율성을 높임으로서 국가적 경쟁력을 갖추어 나가고 있다

본 시험은 국내에서 주로 재배되고 있는 호피 타원형계수박과 국내 종묘회사에서 개발하여 판매하고 있는 동남아시아용 수박 그리고 향후 육성 개발될 우수조합에 대한 특성을 파악하기 위하여 수행 되었다. 본 시험이 수행 되는 동안 기상환경의 악화로 식물체가 자라는데 최적의 조건이 아니었으며 특히 착과 후 수확까지의 기간에는 맑은 햇볕을 볼 수 있었던 날이 단지 이틀 밖에는 되지 않아 정확한 성적을 얻을 수 없었다.

국내에서 주로 재배되고 있는 타원형계수박의 초형은 수박 특성조사요령에 준하여 조사하였고 줄기나 엽색의 차이는 재배적 차이를 벗어나 구별할 수 없을 정도로 큰 차이가 없었고 단지 잎의 형태에서 결각의 정도와 크기에서 다소의 차이를 발견할 수 있었다. 그러나 최근 부각되고 있는 3배체수박의 경우 2배체 수박에 비해 잎이 두껍고 결각이 작으며 엽색이 다소 연한 녹색을 나타내어 외관상 초형의 차이를 확인 할 수 있었다. Tropical type의 수출용은 의외로 2배체 수박의 잎 모양을 띄고 있는 것이 많았으며 현재 시판되진 않지만 개발 되고 있는 조합들에 대해서 황피를 가진 타원형 수박은 줄기나 잎에서도 노란색이 나타나 확실하게 구분 될 수 있었다.

과의 모양에서는 90년대 원형계수박에서 현재는 거의 대부분 타원형계수박으로 전환되어

있고 3배체수박에서도 과형이나 호피무늬, 바탕색등에서 별다른 차이를 구분할 수 없었지만 소과종 수박은 과가 작고 호피무늬가 가늘고 연한 녹색을 보이지만 과형에서는 원형계와 타원형, 중과종등이 다양하게 개발 되고 있다. Tropical type은 국내 시판종과는 외형적으로 과형, 바탕색, 호피무늬에서 많은 차이를 나타내었다.

공시된 수박의 내적인 품질을 조사한 결과 과육색은 주로 선홍색을 띠고 있었지만 일부 품종화 되지 않은 소과종 조합에서 황육색 조사 되었다. 그리고 황육계 조합에서는 육색이 완전한 황육이 아닌 약간의 오렌지색을 나타내는 조합도 있어 향후 과육색에 대한 다양한 변화가 있을 것으로 예측 된다.

모든 육성가의 육성목표가 당도가 높은 고당도이면서 육질이 아삭한 수박을 개발하고자 하고 있으며 수박의 변화되는 과정에서도 대체로 당도가 9-10도 이었던 원형계에서 지금은 12-13도 수준의 육질이 아삭한 타원형계로 변화된 것을 확인 할 수 있다. 향후 수박의 품종 개량은 지속적으로 다양하게 이루어 질 것으로 생각되며 특별히 수박 재배포장의 연작으로 인한 내재해성, 내병성품종육성이 활발해 질 것으로 예측된다.

제3절 수박·멜론의 순도검정 재배시험

1. 재료 및 방법

○ 공시품종

스피드꿀 수박, 꿀보단 수박

○ 재배개요

- 파종: 2007년 6월 15일
- 정식: 2007년 7월 10일
- 수정: 2007년 8월 10-13일
- 수확: 2007년 10월 5일
- 장소 농우바이오 남부연구소(경남 밀양)
- 재식거리: 330×30cm (외골)
- 착과절위: 11-15절(수박)
- 주당 착과 수: 1과

○ 공시품종

얼스발렌타인 춘추, 달마시안

○ 재배개요

- 파종: 2007년 7월 10일
- 정식: 2007년 8월 4일
- 수정: 2007년 9월 10-13일
- 수확: 2007년 10월25일(5205), 11월 11일(발렌타인 춘추)
- 장소: 농우바이오 여주연구소
- 재식거리: 220×45cm
- 착과절위: 11-13절
- 주당 착과 수: 1과
- 이 밖의 시비, 관수, 병해충 방제 등은 관행적인 방법에 준하여 실시하였다.
- 조사기준: UPOV 특성조사 방법을 준용한 국립종자관리소 ‘수박, 멜론 특성조사 요령’에 준하여 조사하였다.

2. 수박 및 멜론의 포장 순도검정 결과

재배기간 내 잦은 강우와 일조부족으로 작황이 불량하였으나 순도를 검정하는 데는 어려움이 없었다.

- 스피드 꿀수박: 이형주 0(양친 각 5주)
- 꿀보단: 이형주 0(양친 각 5주)
- 얼스발렌타인 춘추:이형주 1(자식주)
- 달마시안(시교5205): 이형주 2주(자식주)

15	3	3	4	4	3	3	3		3	3	3	3
16	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
17	16.4cm	15.9cm	16.6cm	17.0cm	15.9cm	16.0cm	16.5cm	15.8cm	15.0cm	16.5cm	16.1cm	16.5cm
18	15.4cm	15.0cm	16.0cm	15.5cm	14.9cm	15.1cm	15.0cm	15.4cm	14.7cm	15.6cm	15.2cm	16.1cm
19	0.93	0.94	0.96	0.91	0.93	0.94	0.9	0.95	0.98	0.94	0.94	0.97
20	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
21	3	2	2	4	2	3	2	2	2	3	2	2
22	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
23	5	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5	5
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25												
26												
27												
28	2cm	1.9cm	2.4cm	1.9cm	2.8cm	1.7cm	1.7cm	1.7cm	2.1cm	2.6cm	2.3cm	2.2cm
29	0.8cm	0.7cm	0.7cm	0.7cm	0.8cm	0.8cm	0.9cm	0.9cm	0.8cm	0.8cm	0.8cm	0.9cm
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NO	T13(발렌타인훈추)	T14(시교313)	T15(시교324)	T16(엘도라도)	T17(KMA-009)	T18(KN-엘스5)	T19(엘스폴드킹)	T20(TS-4144)	T21(SVR15135063)	T22(SVR15145032)	T23(SVR15124033)	T24(NUM3571)
	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치
1	2.5cm	2.3cm	2.5cm	1.9cm	2.3cm	2.5cm	2.5cm	1.9cm	2.5cm	2.5cm	2.4cm	2.1cm
2	연장:3.7cm 업폭:2.0cm	연장:3.7cm 업폭:2.0cm	연장:3.4cm 업폭:2.0cm	연장:3.1cm 업폭:1.5cm	연장:3.7cm 업폭:1.8cm	연장:3.6cm 업폭:2.0cm	연장:3.6cm 업폭:1.9cm	연장:4.0cm 업폭:2.2cm	연장:3.4cm 업폭:1.8cm	연장:3.7cm 업폭:1.9cm	연장:3.4cm 업폭:1.8cm	연장:3.2cm 업폭:1.7cm
3	5	5	5	5	7	5	5	7	5	5	5	5
4	7	5	5	5	5	3	5	3	3	5	3	5
5	연장:26.6cm 업폭:26.0cm	연장:23.9cm 업폭:26.4cm	연장:27.6cm 업폭:26.0cm	연장:25.0cm 업폭:25.7cm	연장:23.8cm 업폭:23.0cm	연장:24.5cm 업폭:24.1cm	연장:22.6cm 업폭:23.2cm	연장:24.9cm 업폭:24.7cm	연장:25.0cm 업폭:25.1cm	연장:24.2cm 업폭:24.5cm	연장:24.7cm 업폭:25.2cm	연장:23.5cm 업폭:22.5cm
6	5	7	6	5	5	5	6	5	5	5	5	5
7	3	3	3	5	7	7	5	5	5	5	7	5
8	3	3	3	5	7	7	5	5	5	5	5	5
9	3	5	3	5	5	3	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	7	3	5	7	7	7	5	5	3
11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12	5	5	5	7	3	5	5	7	5	7	3	5
13	19.4cm	14.8cm	17.5cm	17.5cm	19.8cm	16.2cm	13.3cm	13.1cm	15.3cm	14.8cm	13.7cm	18.5cm
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
16	5	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5
17	18.2cm	16.8cm	13.3cm	14.0cm	18.2cm	14.8cm	14.5cm	14.4cm	14.4cm	14.4cm	15.7cm	18.0cm
18	17.0cm	15.8cm	14.3cm	13.6cm	15.5cm	15.5cm	15.1cm	14.5cm	15.1cm	13.7cm	15.9cm	14.8cm
19	0.93	0.94	6	0.97	0.85	1.0	1.0	0.99	1.0	0.95	1.0	0.82
20	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
21	3	1	1	2	4	1	2	4	2	4	3	4
22	3	3	3	5	5	3	3	5	3	3	3	5
23	5	5	5	5	5	5	6	3	3	5	5	6
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25												
26												
27												
28	3.1cm	3.3cm	3.0cm	2.4cm	4.1cm	2.2cm	1.9cm	10.5cm	2.0cm	1.7cm	1.7cm	4.3cm
29	0.8cm	0.8cm	0.8cm	0.7cm	0.8cm	0.8cm	0.8cm	0.8cm	0.8cm	0.8cm	0.9cm	0.7cm
30	1	1	1	1	9	1	1	9	1	1	1	9
NO	T25(NUM3574)	T26(NUM5410)	T27(NUM5553)	T28(SOLAKING)	T29(MAGENTA)	T30(BISTA)	T31(ULYSSO)	T32(ELBA)	T33(CAPRI)	T34(GALIA)	T35(CARUSO)	T36(TRUILO)
	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치
1	1.7cm	1.7cm	2.0cm	2.2cm	1.6cm	3.5cm	3.3cm	2.0cm	2.1cm	2.2cm	1.2cm	3.0cm
2	연장:3.4cm 업폭:1.7cm	연장:3.1cm 업폭:1.6cm	연장:3.6cm 업폭:1.9cm	연장:3.8cm 업폭:1.9cm	연장:3.4cm 업폭:2.0cm	연장:4.5cm 업폭:2.2cm	연장:3.8cm 업폭:2.0cm	연장:3.3cm 업폭:1.9cm	연장:4.2cm 업폭:2.4cm	연장:4.2cm 업폭:2.1cm	연장:3.3cm 업폭:1.8cm	연장:5.0cm 업폭:2.0cm
3	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7	5	7
4	7	7	7	7	3	5	5	5	5	5	7	5
5	연장:22.7cm 업폭:22.7cm	연장:23.4cm 업폭:22.3cm	연장:24.6cm 업폭:22.6cm	연장:23.2cm 업폭:22.5cm	연장:22.0cm 업폭:21.5cm	연장:24.2cm 업폭:23.7cm	연장:22.5cm 업폭:22.0cm	연장:25.5cm 업폭:24.0cm	연장:25.7cm 업폭:23.7cm	연장:26.2cm 업폭:23.4cm	연장:21.7cm 업폭:19.5cm	연장:23.5cm 업폭:25.4cm
6	5	5	4	5	4	4	5	4	4	4	4	5

7	7	7	5	7	3	3	3	7	7	7	5	3
8	7	5	5	5	3	3	3	7	7	7	5	3
9	7	3	3	3	3	7	7	7	5	5	7	7
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12	7	5	7	3	3	5	3	3	5	7	7	3
13	18.0cm	18.7cm	19.3cm	15.7cm	19.8cm	15.8cm	17.6cm	21.8cm	23.8cm	20.6cm	17.4cm	17.6cm
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
16	5	5	5	5				7	7	7	7	7
17	16.8cm	16.7cm	16.3cm	15.2cm	17.0cm	19.9cm	21.5cm	16.0cm	17.0cm	15.4cm	15.8cm	20.5cm
18	14.3cm	14.5cm	14.7cm	13.0cm	15.6cm	13.5cm	13.1cm	14.9cm	16.5cm	13.6cm	14.6cm	13.5cm
19	0.85	0.86	0.9	0.85	0.91	0.67	0.6	0.93	0.97	0.88	0.92	0.65
20	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
21	3	3	4	4	2	5	5	2	2	4	5	5
22	3	5	5	5	3	2	2	5	5	5	4	4
23	3	3	3	3	5	5	5	5	5	5	7	7
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9
25											1	1
26											5	5
27												
28	3.5cm	2.4cm	3.2cm	2.7cm	4.5cm	4.3cm	4.2cm	4.3cm	3.7cm	4.5cm	3.5cm	5.3cm
29	0.8cm	0.9cm	0.8cm	1.0cm	0.9cm	0.8cm	0.7cm	0.9cm	0.9cm	0.9cm	0.9cm	0.9cm
30	9	1	1	1	1	1	1	9	9	1	9	1
NO	T37 (카펠레온)	T38 (해피니스)	T39 (설향)	T40 (참왕)	T41 (금항아리)	T42(은설)	T43(백화)	T44 (슈퍼스타)	T45 (홈런스타)	T46(생큐)	T47 (베스트)	T48(넘버원)
	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치	계급/실측치
1	2.0cm	1.7cm	1.5cm	1.5cm	1.6cm	1.7cm	1.3cm	2.3cm	1.4cm	1.7cm	1.6cm	2.6cm
2	연장:3.1cm 연폭:1.6cm	연장:3.2cm 연폭:1.9cm	연장:2.9cm 연폭:1.7cm	연장:2.4cm 연폭:1.5cm	연장:2.7cm 연폭:1.7cm	연장:3.9cm 연폭:1.9cm	연장:3.0cm 연폭:1.5cm	연장:3.5cm 연폭:1.9cm	연장:2.6cm 연폭:1.3cm	연장:3.8cm 연폭:1.9cm	연장:3.0cm 연폭:1.7cm	연장:4.3cm 연폭:2.1cm
3	7	7	5	7	5	5	7	5	7	5	5	5
4	5	5	7	3	5	7	7	5	7	7	7	5
5	연장:24.4m 연폭:23.6cm	연장:23.7cm 연폭:23.0cm	연장:25.3cm 연폭:23.7cm	연장:22.2cm 연폭:23.5cm	연장:26.5cm 연폭:22.7cm	연장:23.7cm 연폭:20.6cm	연장:21.0cm 연폭:20.6cm	연장:23.7cm 연폭:21.1cm	연장:24.5cm 연폭:21.6cm	연장:26.0cm 연폭:25.4cm	연장:26.3cm 연폭:24.0cm	연장:26.3cm 연폭:24.7cm
6	5	6	6	5	5	4	5	5	4	5	5	5
7	5	7	3	3	7	5	3	5	5	5	3	5
8	3	7	3	3	7	3	3	5	5	5	3	5
9	7	7	7	5	7	7	7	7	7	7	7	5
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5	
13	23.2cm	20.8cm	23.9cm	28.2cm	25.3cm	17.6cm	21.0cm	20.5cm	21.7cm	18.1cm	30.0cm	20.5cm
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
16	7	7	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
17	19.5cm	17.9cm	19.5cm	18.5cm	20.0cm	18.0cm	18.2cm	19.0cm	18.0cm	16.6cm	18.0cm	18.0cm
18	14.0cm	13.8cm	14.0cm	13.7cm	14.3cm	15.9cm	15.6cm	17.5cm	15.3cm	15.3cm	15.9cm	17.0cm
19	0.71	0.77	0.71	0.74	0.71	0.88	0.85	0.92	0.85	0.92	0.88	0.94
20	2	3	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2
21	5	5	5	5	5	4	4	4	1	4	4	2
22	4	3	1	2	5	1	1	1	1	1	1	5
23	3	5	5	5	7	5	5	5	5	5	5	5
24	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1	1										
26	5	6										
27												
28	4.4cm	4.4cm	3.2cm	4.2cm	3.4cm	2.4cm	2.9cm	2.9cm	3.4cm	3.4cm	4.5cm	2.9cm
29	0.8cm	0.6cm	0.6cm	0.8cm	0.6cm	0.8cm	0.8cm	0.9cm	0.8cm	0.9cm	0.7cm	0.7cm
30	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1

□ 별첨자료 2: 수박 특성조사표

No	형 질	표 현 형 태									비고
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	배수성		2배체	3배체	4배체						
2	유묘: 떡잎의 모양	좁은타원형	타원형	넓은타원형							
3	유묘: 떡잎의 크기			작다		중간		크다			
4	유묘: 떡잎의 녹색의 강도			열다		중간		질다			
5	유묘: 떡잎의 반접	없다								있다	
6	유묘: 떡잎 잎맥의 합물	없다								있다	
7	유묘: 배축길이			짧다		중간		길다			
8	식물체: 생장형	왜성	덩굴성							cm	
9	식물체: 주지의 길이			짧다		중간		길다		마디	
10	식물체: 양성화	없다								있다	
11	식물체: 암꽃을 가진 첫마디까지의 마디수적다			중간				많다		cm	
12	잎몸: 길이			짧다		중간		길다		cm	
13	잎몸: 너비			좁다		중간		넓다			
14	잎몸: 길이/너비 비율			작다		중간		크다			
15	잎몸: 색	황록색	녹색	회록색							
16	잎몸: 색의 강도			열다		중간		질다			
17	잎: 엽절정도			약하다		중간		심하다			
18	잎몸: 식물체의 중앙부위의 가장자리의 결각의 깊이얕다			중간				깊다			
19	잎몸: 요철			약하다		중간		심하다			
20	잎몸: 가장자리 물결 모양			약하다		중간		심하다			
21	잎몸: 반접	없다								있다	
22	잎자루: 길이			짧다		중간		길다		길이	
23	꽃: 암꽃의 꽃잎 크기			작다		중간		크다		두께	
24	꽃: 암꽃의 꽃잎의 끝부분의 모양		뾰족하다			둥글다		뽕뽕하다			
25	꽃: 저온에서 꽃밥이 터지는 정도		약하다			중간		강하다			
26	씨방: 크기			작다		중간		크다		cm	
27	씨방: 솟털?			성기다		중간		배다			
28	과실: 무게	매우가볍다	매우가볍거나가볍다	가볍다	가볍거나중간	중간	중간에서무겁다	무겁다	무겁거나매우무겁다	매우무겁다	g
29	과실: 세로로 자른면의 모양	원형	넓은타원형	타원형	원통형						
30	과실: 껍질의 바탕색	흰색	노랑색	녹색							

No	스피트	꿀보단	스타꿀	조은꿀	삼복꿀	페스티발	토종꿀	세미꿀	백마강	미래꿀	오복꿀	해동꿀	새천년	꼬마
1														
2														
3	엽장:2.9 엽폭:1.5	엽장:2.8 엽폭:1.6	엽장:2.8 엽폭:1.4	엽장:2.8 엽폭:1.4	엽장:2.9 엽폭:1.6	엽장:2.9 엽폭:1.4	장:2.6 엽폭:1.4	엽장:2.9 엽폭:1.6	엽장:2.7 엽폭:1.4	엽장:3.1 엽폭:1.6	엽장:2.5 엽폭:1.3	엽장:2.8 엽폭:1.5	장:2.9 엽폭:1.5	엽장:2.3 엽폭:1.3
4														
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6														
7	7	3	5	5	5		3	5	5	7	3	3	3	3
8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	220	318	319	312	388	327	352	315	324	325	330	340	300	393
10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
11	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	7	9	9	7
12	24.5	24.2	24.5	23.2	26.0	22.5	23.0	23.0	22.7	24.0	20.5	20.1	21.2	23.0

NO	형 질	형 질							형 질	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
31	과실: 껍질의 녹색의 강도	매우열다	매우열거나 열다	열다	약간열다	중간				
32	과실: 과실자루 길이			짧다		중간	약간길다	길다	질거나매우 길다	매우길다
33	과실: 과실자루 달린부위의 크기			작다		중간		길다		
34	과실: 꼭지부위의 모양	평평하다	약간둥글다	둥글다	약간뾰족하다	뾰족하다		크다		
35	과실: 꼭지함몰 정도			얕다		중간				
36	과실: 배꼽부위의 모양	평평하다	약간둥글다	둥글다	약간뾰족하다	뾰족하다		깊다		
37	과실: 끝부분의 들어간 정도			얕다		중간				
38	과실: 배꼽의 크기			작다		중간		깊다		
39	과실: 골(홈)	없다	아래반쪽에 있다	끝쪽반쪽에 있다	전체과실에 있다			크다		
40	과실: 줄무늬	없다								
41	과실: 줄무늬의 녹색의 정도	매우열다		열다		중간				있다
42	과실: 줄무늬 너비	매우좁다		좁다		중간		길다		매우길다
43	과실: 대리석 무늬	없다						넓다		매우넓다
44	과실: 대리석 무늬의 강도	매우약하다		약하다		중간				있다
45	과실: 과피 두께			얇다		중간		강하다		매우강하다
46	과실: 과육 색	흰색	노랑색	주황색	빨강색	자주색		두껍다		
47	과실: 과육색의 강도			열다		중간				
48	과실: 과육의 경도			무르다		중간		질다		
49	과실: 종자수 (ml)	없거나 거의 없다	적다			중간		단단하다		
50	종자: 크기 (길이: 두께: 폭)	매우작다		작다		중간		많다		매우많다
51	종자: 종피의 바탕색	흰색	크림색	녹색	빨강색	적갈색		크다		매우크다
52	종자: 종피의 2차색	없다					갈색	검정색		
53	종자: 종피의 2차색 분포모양	점모양	얼룩모양	점과얼룩						있다
54	종자: 바탕색의 면적 에 대한 2차색 면적		작다			중간				
55	종자: 배꼽에 있는 반점	없다						크다		
56	종자: 가장자리반점	없다								있다
57	과육의 섬유질			매우적다		중간				있다
58	암꽃의 개화시기			빠르다?		중간		많다		
59	성숙기			빠르다?		중간		늦다		

제 7 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 멜론의 품종지문화 연구 및 순도검정 마커의 개발

본 과제에서는 멜론 품종식별 체계를 구축을 목적으로 멜론, 참외, 오이 등에서 기 개발된 SSR 마커를 이용하여 멜론 품종간 다형성 분석 및 유연관계 분석에 이용이 가능한 56개의 DNA marker를 선발하였다. 전체 공시품종 48 품종에 대하여 2품종을 제외한 46 품종에 대해서는 품종식별 지문화 패턴이 가능한 품종간 구분 양상을 보여 주었다. 전체 SSR 마커 중에서 PIC 값이 0.8 이상인 7개의 마커는 고성능 품종식별 마커로서 전체 품종 식별력의 85% 이상을 제공하는 것으로 평가되어, 금후 멜론 품종식별에 사용할 수 있는 고효율 기본 마커세트로 선정하였다. 이러한 연구성과는 품종보호권 침해 분쟁 및 농업인과 회사간 유통 종자의 분쟁 발생 시 이를 해결하는 기술적 수단으로서 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 평가된다. 금후 자동염기서열분석기 등을 활용하여 본 과제 결과를 보완하고 분석체계의 정밀화 및 표준화를 구축한다면 향후 국내 유통품종에 대한 D/B 구축을 통한 품종보호 출원품종의 특성 조사 시 대조품종의 선정 및 유통 종자의 진위성 판정에 이용될 수 있을 것이다.

본 과제에서는 품종간 최소거리를 설정함에 있어 공시품종 간 SSR 마커에 의하여 도출된 유전적 유연관계를 설정할 수 있었으며, 또 형태적 특성과의 상관관계를 살펴볼 수 있었다. 다만, genetic distances와 phenotypic distances 간의 상위성이 비교적 크게 나타나 일반적인 기준에서 마커에 기준한 품종간 최소거리는 설정할 수 없었다.

순도 검정 마커로는 SSR 마커임에도 agarose gel에서 직접 분석이 가능한 멜론 F1 hybrids 2품종에 대한 마커 세트 2종을 개발함으로써 당장 종자산업 현장에서 실용화가 가능하도록 하였다.

마커 특이화 과정은 당초 과제 계획에 포함되지 않았으나, 경제적이고 효과적인 품종식별 마커의 선발을 목적으로 수행되었다. 그 결과 13개의 다형성 마커를 추가하거나 다형성 패턴의 특이성을 획기적으로 향상시킬 수 있음으로서 마커 선발에 있어 매우 효과적인 기술적 대안임을 제안할 수 있었다.

2. 수박의 품종지문화 연구 및 순도검정 마커의 개발

본 과제에서는 수박 품종식별 체계를 구축하기 위하여 멜론, 오이, 수박에서 기 개발된

마커와 협동연구기관에서 개발된 SSR marker를 이용하여 수박 품종간 유연관계 분석에 이용이 가능한 70개의 DNA marker를 선발하였다. 총 70개의 SSR marker중에서 대립유전자의 패턴이 양호한 29개의 SSR marker를 선정하고 이를 코드화하였을 때 모든 공시품종이 식별됨을 확인할 수 있었다. 이러한 연구성과는 품종보호권 침해 분쟁 및 농업인과 회사간 유통 종자의 분쟁 발생 시 이를 해결하는 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 금후 이 마커를 활용하여 자동염기서열분석기 등을 활용하여 분석체계의 정밀화 및 표준화를 구축한다면 향후 국내 유통품종에 대한 D/B 구축을 통한 품종보호 출원품종의 특성 조사 시 대조품종의 선정 및 유통 종자의 진위성 판정에 이용될 수도 있을 것이다. 그리고 본 과제동안 선발된 SSR marker의 염기서열 정보는 수박, 멜론 뿐만 아니라 오이, 박, 호박 등의 유전적 근연관계 추정이나 품종식별에 적용할 수 있을 것이다.

분자생물학적 기법에 의한 수박 F1 순도검정 체계를 확립하기 위하여 '스피드'의 4품종의 양친에 대한 다형성을 보이는 13개의 마커 세트는 모든 양친을 식별할 수 있었으며, '스피드'와 '꿀보단' F1에 이 마커를 이용하여 분석하였을 때 heterozygous한 상태를 나타내어 양친의 교배여부를 확인할 수 있었다. 이 분자표지는 지금까지 형태적 특성 검정에만 의존했던 순도검정 방법이 실험실 수준에서 이루어지기 때문에 검정에 소요되는 시간과 경비 및 노력 등을 크게 줄일 수 있을 것이다. 또한 기존에 형태적 특성 검정에 의한 종자순도 검정 시 이형 화분의 오염 등과 같은 경우 기존의 방법에 의한 양친의 교배여부를 정확하게 판단하기 어려웠으나 분자생물학적 수준에서 접근하면 이러한 문제도 해결 될 수 있을 것이다. 그리고 '스피드'와 '금천'의 F2 집단에 대한 유전양상을 조사한 바 1:2:1의 이론적 분리비에 적합하게 나타나 이 마커들은 유전자 지도 작성이나 내병성 유전자의 mapping에 아주 용용하게 활용될 수 있을 것이다.

3. 수박 유래 고유 마커의 개발과 활용

본 세부과제의 연구목표는 수박 품종간의 유전적 거리를 추정할 수 있는 DNA marker를 개발하고, 이를 적극적으로 활용하여 새로운 수박 품종의 창성을 위한 교잡육종에 필요한 기초자료를 제공하는 것이다. 이를 위하여 주로 SSR 및 Gene-specific marker 위주로 약 200개의 DNA 표식인자를 확보하고, 개발된 DNA 표식인자를 이용하여 품종 및 계통의 구별화 및 변이체와 F1 식별 작업에의 적용가능성을 검정한다.

평가의 착안점 및 목표의 달성도는 다음과 같다.

- Gene-Specific marker 및 SNP의 개발이 수행되었는가?

: 총 9개의 gene-specific marker가 EST로 부터 개발되었으며 이를 모두 SNP에 적용하였다.

- SSR marker가 개발되었는가?

: 200개의 SSR marker가 개발되었다.

- DNA 표식인자를 이용하여 품종 및 계통 구별화가 가능하게 되었는가?

: Reference 품종을 이용한 결과 정확히 구별이 가능함을 알 수 있었다.

- DNA 표식인자를 이용하여 변이체 구별화 작업을 수행하였는가?

: 개발된 표식인자를 이용하여 작업을 수행하였고, 구별이 가능함을 알 수 있었다.

재현성이 매우 높은 SSR 기반 핵산 표식인자들이 개발되었기 때문에 수박의 품종 및 계통, F1과 변이체 등을 손쉽게 구별할 수 있는 기술적 기반을 마련하였으며, 품종개량 연구의 기초자료의 제공이라는 기여를 하였다. 그리고 육종기술적인 면에서 육종연한의 단축으로 새로운 품종의 수박 생산을 위한 가격을 낮출 수 있다는 기여를 하였다. 게다가 수박과 유전적으로 매우 가까운 멜론에 수박에서 개발된 핵산 표식인자들을 적용할 수 있음을 확인하였기에 멜론의 경우도 수박과 같은 기술적 기반을 확보한 것으로 생각된다.

4. 멜론, 수박의 재배시험 특성검정 및 포장 순도검정

멜론과 수박에 대하여 전체 공시품종에 대한 재배시험 및 국립종자원 특성검정 요령에 준한 특성검정을 수행하였다.

멜론은 양전화로서 자식종자의 우려가 매우 크기 때문에 반드시 순도 검정을 해야 하지만 포장순도검정을 하는 것은 시간과 비용이 많이 들어 어려움이 많이 있다. 본 과제를 통하여 마커를 이용한 순도검정 기술이 개발됨으로 인하여 생산시기와 안정성을 가질 수 있어 비용을 줄일 수 있을 것으로 기대된다. 수박의 경우에 있어서는 국내보다는 주로 외국에서 생산되어 많은 양이 수입되고 있으며 생산의 안정성이 불안한 실정이어서 이를 위한 순도검정이 반드시 필요하다. 그러나 수박의 경우에 포장 순도검정을 하기위해서는 오랜 재배기간과 많은 면적이 필요로 하므로 그 만큼 비용이 증가하기 때문에 본 과제에서 개발된 마커를 이용한 순도검정은 많은 비용과 시간을 절약할 수 있을 것이다.

제 8 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 본 과제를 통하여 개발된 핵산 표식인자를 활용하면 품종 특성의 확인 및 검정 절차가 단순화되어 노력이나 시간, 경비 등을 절약할 수 있고, 검정결과와 일관성이 확보되며 짧은 기간 내에 원하는 형질들이 포함된 계통을 용이하게 식별할 수 있게 되어 농업적으로 유망한 품종을 개발하고 보호하는 것에 유용하게 사용될 것이다.
2. 멜론, 수박 품종식별체계를 분자생물학적 수준에서 확립할 수 있음을 제시함으로써 이 분자표지 세트는 **품종보호권 침해** 및 **품종진위성**에 대한 **분쟁** 발생시 DNA 마커에 의한 검정 결과를 제시함으로써 분쟁해결의 조정 수단으로 이용할 수 있을 것이다. 실제로 수박의 경우 본 과제를 수행하면서 농업인과 종자회사 간 품종의 진위성에 대한 분쟁이 발생하여 이를 활용하여 분석한 결과를 양측에 통보한 바 있다.
3. 본 과제에서 수행한 SSR maker의 분석 방법은 은염색에 의해 검출된 대립유전자의 패턴을 code화하여 조사 분석하였는데 이는 분석 담당자의 주관적 판단과 실험 조건에 따라 상이한 결과가 나타날 수 있는 가능성이 있기 때문에, 향후 자동염기서열분석기나 모세관 전기영동장치를 활용하여 보다 정밀한 분석 체계를 구축한 다음 국내 유통품종의 **DNA profile**을 **D/B화** 할 예정이다. 나아가 이 결과를 근거로 하여 품종보호 출원품종의 대조품종 선정 가능성도 조사 분석할 예정이며, 시중 유통 종자에 대한 진위성 판정 및 농림수산식품부 산한 **종자위원회**의 분쟁 조사 시 요청에 의하여 **유전자 분석** 등에 활용할 계획이다.
4. 본 과제에서 수박 품종 식별 분자표지 마커를 개발하기 위하여 멜론과 오이에서 유래된 SSR 마커의 활용 가능성에 대한 연구 결과는 이미 **한국유전학회지 2007년 6월호**에 게재된 바 있다. 수박 SSR 마커에 의한 품종식별세트 29개의 개발과 형태적 특성과의 상관분석 등에 대한 연구결과와 멜론 마커 특이화 결과는 우선적으로 전문 학술지에 논문을 게재할 목적으로 원고를 작성 중에 있다.
5. 수박 5품종의 양친에 다형성을 보인 F1 순도 검정용 13개의 SSR 마커 세트와 멜론 순도 검정용 마커 2개 세트는 종자회사에서 당장 순도검정에 실용적 활용이 가능할 것으로 생각되며 이들 분자표지 중에서 일부를 **특히 출원**함과 동시에 협동연구기관에 우선적으로

기술을 이전토록 추진할 예정이다 [특허 출원번호: 10-2008-0036873 (2008.4.21.)].

6. 본 과제를 통하여 개발된 멜론과 수박의 품종식별 마커 세트와 순도검정 마커 세트의 기술적 가치에 대하여는 이미 협동연구기관으로부터 분자유종 등 분야에서 그 실용적 가치에 대한 매우 긍정적인 평가를 받은 바 있으며, 이에 따라 전체 마커 세트에 대하여 협동연구기관에 우선적으로 **일괄 기술이전**을 하고자 **구두 합의**하고 구체적인 조건과 절차에 대한 논의를 진행 중에 있다.

제 9 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

UPOV 논의동향

- 최근 UPOV(국제식물신제품보호동맹) BMT(생화학 및 분자생물학 기술작업반)에서는 그간 논의되어 온 분자표지 기술의 이용에 관한 내용을 정리 **BMT Guideline** 초안을 작성하여 제 10 차 UPOV/BMT 회의(서울, 2006. 11.)에서 관련 회원국들의 논의와 검토를 거친 바 있다. 이 자료에는 여러 가지 적합한 마커에 대한 기술적 특성과 이용상의 장단점, 시료의 준비와 분석, 방법상의 세부사항에 관한 일반 기준, 결과의 획득과 해석 및 D/B 구축에 이르기 까지 비교적 광범위한 부분에 대한 내용들을 다루고 있다. 비록 이 문서가 아직은 구체적 기준의 제시 보다는 금후 검토되어야 할 전반적인 사항들을 나열하는 수준에 그치고 있지만, 그간 복잡하게 논의되었던 사항들이 정형화된 틀을 갖추었다는 측면에서 보면 UPOV/BMT 차원에서 큰 진전을 이룬 것으로 보여진다.
- 육종가 권리 강화 및 기본유래 품종의 추정을 위한 품종 확인 시 분자생물학적 방법의 이용 가능성:
 - UPOV BMT Review 그룹에서는 2006년 6월에 회의를 개최하여 육종가 권리강화와 기본유래품종 확인에 분자 생물학적 기술의 사용 가능성의 이용 가능한 모델에 대한 검토를 기술위원회와 행정법사위원회에 요청함. 이에 제51차 행정법사위원회는 BMT Review 그룹의 의견 수렴후 “육종가권리 강화를 위해 품종확인 시 분자생물학적 방법의 이용가능성 및 유래품종에 대한 기술적 확인 및 고려사항”에 대해 논의기로 함.
 - CPVO 대표는 품종동정을 위한 분자생물학적 방법의 사용에 있어 합리적인 방법으로 새로운 option으로 접근할 수 있는 기회를 가질 수 있게 되기를 피력
 - ISF 대표는 기본유래품종의 검정을 위한 분자생물학 기술의 이용에 있어 ISF의 현재 입장은 유래품종이 의심될 경우 분자마커에 의한 진위성 여부에 대한 검정이 가능하다는 점이다. 규정 위반을 판정하는 기준과 관련하여서는 threshold level 설정이 필요할 것으로 생각하고 있다. 현재 설정된 기준은, 옥수수 85%, 유채와 면화 87.5%, 상추 96% 등이다.

세계적 연구동향

- Gonzalo 등은 2005년(TAG, 110: 802-811) 멜론에서 SSR 마커를 이용한 연관지도(G1 ~ G12)를 발표하였다. 이를 위하여 genomic library와 EST 클론에서 유래한 118개의 SSR 마커를 개발하였다. 특히, 이 연관군 지도는 지도 작성을 위한 집단의 양친으로 스페인 원산의 얼룩계통 멜론인

Piel de Sapo와 우리나라가 원산으로 일명 ‘성환참외’로 알려진 PI161375를 사용함으로써 본 과제의 멜론 품종 집단에서 다형성 도출에 유용할 것으로 사료된다.

- Joobeur 등은 2006년(TAG, 112: 1553-1562) 수박의 BAC(bacterial artificial chromosome) library를 제작하여 이 유래의 SSR 마커를 37개 개발하여 이를 수박 유전자원에 대하여 분석한 바 36개가 다형성을 나타내었으며 PIC 값이 0.22~0.79의 범위에 나타남을 발표하였다. 이 marker의 염기서열을 확보하여 본 연구에 활용한다면 연구 성과가 거양될 것으로 사료된다.
- Levi 등은 2007년(HortScience, 42: 210-214) 수박의 유전자 지도 작성을 위해 146개의 분자표지(RAPD, ISSR, AFLP, SRAP)를 이용하여 유전자 지도를 작성한 다음, 이 마커를 이용하여 유전적 근연 관계가 가까운 24품종에 대해 분석하였을 때 다형성을 보인 분자마커는 염색체상에 고르게 분포되며 특히 SRAP(sequence-related amplified polymorphism) marker가 가장 효율적임을 보고한 바 있으며, 이 연구결과는 수박 품종식별 및 종자순도검정에 유용하게 활용될 수 있음을 제시하였다.
- F1 종자의 순도검정에 분자 마커의 활용 대한 연구는 2004년에 Nandakumar et al. (Euphytica 136: 257-264)이 벼에서 SSR marker를 이용한 F1 품종 순도검정 방법을 보고한 바 있고, 2006년에는 Rana et al. (Seed Sci & Technol 35: 709-721)이 목화의 순도 검정에 RAPD, STMS, ISSR marker의 활용됨을 제시하였으며 가장 최근에는 중국의 Liu et al. (Seed Sci & Technol 36: 477-486)도 양배추의 F1 순도검정에 RAPD, ISSR, SSR marker를 이용한 결과와 형태적 특성조사는 일치하는 양상을 나타냄을 보고하였다.

제 10 장 참고 문헌

- Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK, Bhat PR, Krishnakumar V, Singh L (2007) Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor. Appl. Genet.* 114: 359–372.
- Anderson NL, Anderson NG (1979) Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and α 2HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88: 258.
- Ballester J, de Vicente MC (1998) Determination of F1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica* 103: 223–226.
- Bernet GP, Bramardi S, Calvache D, Carbonel IEA and Asins MJ (2003) Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122: 146–152.
- Bredemeijer GMM, Cooke RJ, Ganal MW, Peeters R, Isaac P, Noordijk Y, Rendell S, Jackson J, Röder MS, Wendehake K, Dijcks M, Amelaine M, Wickaert V, Bertrand L, Vosman B (2002) Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1019–1026.
- Che KP, Liang CY, Wang YG, Jin DM, Wang B (2003) Genetic assesment of watermelon gerplasm using AFLP technique. *Horticultural Science* 38: 81
- Chiba N, Suwabe K, Nunome T and Hirai M (2003) Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major Cucurit crops. *Breeding Sci* 53: 21–27
- Cooke RJ (1995) Varietal identification of crop plants. In *New Diagnostics in Crop Sciences*, J. H. Skerritt and R. Appels, eds., CAB Int., Wallingford. pp. 33–63.
- Cooke RJ, Bredemeijer GMM, Ganal MW, Peeters R, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Areshchenkova, Dijcks M, Laborie D, Bertrand, L, Vosman B (2003) Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite. *Euphytica* 132(3):331–341
- Danin-Poleg Y, Reis N, Baudracco-Arnas S, Pitrat M, Staub JE, Oliver M, Arus P, deViente CM and Katzir N(2001) Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. *Genome* 43: 963–974.
- Danin-poleg Y, Reis N, Tzuri G, Katzir N (2001) Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor. Appl. Genet.* 102: 61–72.
- Esselink GD, Smulders MJM, Vosman B (2003) Identification of cut rose (*Rosa hybrida*)

- and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theor. Appl. Genet.* 106: 277–286.
- Fazio G, Staub J, Chung SM (2002) Development and characterization of PCR markers in cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 545–557.
- González–Martínez SC, Robledo–Arnuncio JJ, Collada C, Díaz A, Williams CG, Alía R, Cervera MT (2004) Cross–amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. *Theor. Appl. Genet.* 109: 103–111.
- Gonzalo MJ, Oliver M, Garcia–Mas J, Monfort A, Dolcet–Sanjuan R, Katzir N, Arus P and Monforte AJ (2005) Simple–sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet.* 110: 802–811.
- Guerra–sanz JM (2002) *Citrullus* simple sequence repeats markers from sequence databases. *Molecular Ecology Notes* 2: 223–225.
- Hashizume T, Shimamoto I, Hirai (2003) Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 106: 779–785.
- Holton TA (2001) Plant genotyping by analysis of microsatellite. In: *Plant genotyping* (Henry RJ eds), pp. 15–27, CABI publishing.
- Jang IO, Moon JH, Yoon JB, Yoo JH, Yang TJ, Kim YJ, Park HG (2004) Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of F1 hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*). *Mol. Cells* 18: 295–299.
- Jarret RL, Merrick LC, Holms T, Evans J, Aradhya MK (1996) Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai]. *Genome* 40: 433–441.
- Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. *Botanical J. of the Linnean Soc.* 81:233–287.
- Joobeur T, Gusmini G, Zhang X, Levi A, Xu Y, Wehner TC, Oliver M, Dean RA (2006) Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1553–1562.
- Katzir N, Danin–Poleg Y, Tzuri G, Karchi Z, Levi U, Cregan PB(1996) Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1282–1290.
- Kerje, T. and M. Grum. 2000. The origin of melon, *Cucumis melo* : a review of the literature. *Acta Hort.* 510:37–44.
- Kwon YS, Lee JM, Yi GB, Yi SI, Kim KM, Soh EH, Bae KM, Park EK, Song IH, Kim BD (2005) Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and Stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Mol. Cells* 19: 428–435.
- Kwon YS, Park E–K, Lee W–S, Yi S–I, Bae K–M, An J–S, Kim HY (2007) Genetic assessment of watermelon (*Citrullus lanatus*) varieties using SSR markers developed from Cucurbit species. *Kor. J. Genetics* 29: 137–146.

- Law JR, Donini P, Koebner RMD, Reeves JC, and Cooke RJ (1998) DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102:335–342.
- Lee HJ, Cho HJ, Lee KA, Lee MS, Shin YS, Harn Ch, Yang SG, Nahm SH (2007) Development of sequence-based DNA markers for evaluation of phylogenetic relationships in Korean watermelon varieties. *J. Crop Sci. Biotech.* 10: 98–105.
- Lee SJ, Shin JS, Park KW, Hong YP (1996) Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 92: 719–725.
- Lefebvre V, Goffinet B, Chauvet JC, Caromel B, Signoret P, Brand R, and Palloix A (2001) Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD, and phenotypic data. *Theor Appl Genet* 102:741–750.
- Levi A, Thomas CE, Keinath AP, Wehner TC (2001) Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48: 559–566.
- Levi A, Toma CE (2001) A genetic linkage map for watermelon based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of American Society of Horticultural Science* 126: 730
- Levi A. Thomas CE (2007) DNA markers from different linkage regions of watermelon genome useful in differentiating among closely related watermelon genotypes. *HortScience* 42, 210–214.
- Levi A. Thomas CE, Zhang X, Joobeur T, Dean RA, Wehner TC, Carle BR (2001) A genetic linkage map for watermelon based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 730–737.
- Levi A. Thomas CE, Zhang X, Joobeur T, Zhang X, Davis (2002) A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population : (*Citrullus lanatus* var. *citroides* × *C. lanatus* var. *lanatus*) × *Citrullus colocynthis*. *Theor. Appl. Genet.* 105: 555–563.
- Liu G, Liu L, Gong Y, Wang Y, Yu F, Shen H, Gui W (2007) Seed genetic purity testing of F1 hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) with molecular marker analysis. *Seed Sci. & Technol.* 35: 477–486.
- Lopez-Sese AI, Staub JE, Gomez-Guillamon ML (2003) Genetic analysis of spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theor Appl Genet* 108: 41–52.
- Mariette S, Chagné D, Decroocq S, Vendramin GG, Lalanne C, Madur D, Plomiona C (2001) Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann. For. Sci.* 58: 203–206.

- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Powel JW, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel M, Tingey SV, Rafalsky JA (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3: 127–136.
- Monforte, A.J., J. Garcia-Mas, and P. Arús. 2003. Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding.* 122:153–157.
- Munger H.M. and R.W. Robinson. 1991. Nomenclature of *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 14:43–45.
- Nandakumar N, Singh AK, Sharma RK, Mohapatra T, Prabhu, Zaman FU (2004) Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257–264.
- Nethra N, Prasad SR, Vishwanath K, Dhanraj KN, Gowda R (2007) Identification of rice hybrids and their parental lines based on seed, seedling characters, chemical tests and gel electrophoresis of total soluble seed proteins. *Seed Sci. & Technol.* 35: 176–186.
- Oliver M, Carcia-Mas J, Cardus M, Pueyo N, Lopez-Sese AI, Arroyo M, Gomez-Paniagua H, Arus P, De Vicente MC (2001) Construction of a reference linkage map for melon. *Genome* 44: 836
- Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D. (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434.
- Perin C, Hagen LS, De Conto V, Katzir N, Danin-Poleg Y, Portnoy V, Baudracco-Arnas S, Chadoeuf J, Dgimont C, Pitrat M (2002) A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theoretical Applied Genetics* 104: 1017
- Pitrat M., P. Hanelt, and K. Hammer. 2000. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. *Acta. Hort.* 510:29–36.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225–238.
- Rakoczy-Trojanowska M, Bolibok H (2004) Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9: 221–238.
- Rana MK, Singh S, Bhat KV (2006) RAPD, STMS and ISSR markers for genetic diversity and hybrid seed purity testing in cotton. *Seed Sci. & Technol.* 34: 709–721.
- Ritschel PS, De Lima Lins TC, Tristan RL, Buso GSC, Buso JA, Ferreira ME (2004) Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* 4: 1471–2229.

- Rohlf FJ (2000) NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System—Version 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Rossetto M (2001) Sourcing of SSR markers from related plant species. In Plant Genotyping ; The DNA Fingerprinting of Plants, R. J. Henry, ed., CAB Int., Wallingford. pp. 211–224.
- Rossetto, M (2001) Sourcing of SSR markers from related plant species. In: Plant genotyping (Henry RJ eds), pp. 15–27, CABI publishing.
- Scott KD (2001) Microsatellites derived from ESTs, and their comparison with those derived by other methods. In Plant Genotyping The DNA Fingerprinting Plants, R. J. Henry, ed., CABI Publ., Oxon, pp 225–237.
- Silverstein L, Kovalski I, Brotman Y, Rerin C, Dogimont C, Pitrat M, Klingler J, Thompson G, Portnoy V, Katzir N, Perl–Treves R (2003) Linkage map of *Cucumis melo* including phenotypic traits and sequence–characterized genes. *Genome* 46: 761
- Singh RK, Sharma RK, Singh AK, Singh VP, Singh NK, Tiwari SP, Mohapatra T (2004) Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135: 135–143.
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Michell SE, Kresovick S, Ziegler J (1997) An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) : Comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163–173.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy : The Principles and Practice of Numerical Classification, W. H. Freeman, San Francisco.
- Staub JE, Danin–Poleg Y, Fazio G, Horejsi T, Reis N, Katzir N (2000) Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Euphytica* 115: 225–241.
- Staub JE, Lopez–Sese AI, Fanourakis N (2004) Diversity among melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Greece and their genetic relationships with other melon germplasm of diverse origins. *Euphytica* 136: 151–166.
- Staub JE, Serquen FC (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31: 729–741.
- Suwabe K, Iketani H, Nunome T, Kage T, Hirai M (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 97: 264–272.
- Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cooke RJ, Donini P, Lee D, Law JR, Lawe C, Moule C, Trick M, Edwards KJ (2003) The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1091–1101.

- UPOV (2004) Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability watermelon [*Citrullus lanatus*(Thunb.) Matsum. Et Nakai]. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Geneva. Switzerland.
- Varshney RK, Garner A, Sorells ME (2005a) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48–63.
- Varshney RK, Sigmund R, Börner A, Korzun V, Stein N, Langridge P, Graner A (2005b) Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST–SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science* 168: 195–202.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl (2005) DNA fingerprinting in plants. pp. 41–43. CRC Press, FL, US.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski A, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 5631.
- Yamamoto T, Kimura T, Soejima J, Sanada T, Ban Y (2004) Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breeding Science* 54: 239–244.
- Yi SI, Bae KM, Kwon YS, Cho IH (2006) Development of oriental melon (*Cucumis melo* L.)–derived SSR markers using a PCR–based method and polymorphic application for the genotyping of commercial lines. *Kor J. of Genetics* 28: 317–324.
- Yi SI, Kwon YS, Bae KM, Song IH (2004) Recent Progresses for the Variety Classification and Denomination of Oriental Melon and Melon (*Cucumis melo* L.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 22(4):515–522.
- Yu JK, (2004) EST–derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Mol. Genet. Genomics* 271: 742–751.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecology* 11: 1–16.
- Zhang R, Xu Y, Yi K, Zhang H, Liu L, Gong G, Levi A (2004) A genetic linkage map for watermelon derived from recombinant inbred lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129: 237–243.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.