

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001046-01

수박의 종자크기와 흰가루병 저항성관련
분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성

(Development of molecular markers for seed size and
powdery mildew resistance and construction of
genetic linkage map)

중앙대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수박의 종자크기와 흰가루병저항성관련 분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 8일

주관연구기관명 : 중앙대학교

주관연구책임자 : 이 공 표

세부연구책임자 : 이 공 표

연 구 원 : 이 선 주

연 구 원 : 한 밝 음

연 구 원 : 장 윤 정

연 구 원 : 고 연 주

연 구 원 : 심 태 용

협동연구기관명 : 파트너종묘

협동연구책임자 : 김 용 재

요 약 문

I. 제 목

수박의 종자크기와 흰가루병저항성관련 분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성에 관한 연구

II. 연구성과 목표 대비 실적

- 수박의 생산량에 큰 피해를 주는 흰가루병에 대한 저항성 분자마커 개발
 - 수박 흰가루병 저항성 분자마커 특허출원 (10-2015-0145359)
 - 특허출원한 SNP 기반 분자마커에 대한 기술이전이 이루어짐

- 수박 종자크기 선발용 분자마커 개발
 - 수박 4가지 종자크기 선발이 가능한 분자마커 특허출원 (10-2015-0145360, 10-2015-0145853)
 - 수박의 4가지 종자크기인 NS(Normal-seed Size), SS(Small-seed Size), MS(Micro-seed Size), TS(Tomato-seed Size)의 판별이 가능한 분자마커를 개발하여 특허출원 및 종자의 특허기탁을 하였고, 마커의 기술이전이 이루어짐.
 - 씨앗째 섭취가 가능한 ‘씨자근’ 수박 품종을 품종보호출원 하였음
 - 분자마커 개발과 ‘씨자근’ 수박품종에 대하여 2건을 언론홍보 하였음

- 수박에서 공우성 마커로 표지된 연관유전자 지도 작성
 - 모부본과 F2에 대한 GBS (genotyping by sequencing) 및 whole genome sequencing을 통하여 SNP를 발굴하고, 이를 이용한 고밀도 연관유전자지도를 작성하였음.
 - Frame marker를 이용한 유전자지도에 대한 논문게재함

- 수박 특이형질 계통의 특허출원
 - 수박의 4가지 종자크기 형질이 고정된 NIL (near-isogenic line)을 완성하고, 종자크기 특허출원시 각 계통을 한국생명공학연구원에 특허기탁을 완료함
 - 분리유전자형이 고정된 2가지 RIL (recombinant inbred line)집단을 양성하였고, 향후 수박 유전체 및 육종연구에 기초집단으로 활용할 수 있는 기반을 구축함

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 개발 목적

- 국내 수박품종들에 심각한 피해를 주고 있는 흰가루병에 대한 저항성 육종을 위하여 유전분석, QTL 분석 및 관련 저항성 분자마커를 개발하고자 함
- 수박을 씨앗째 섭취할 수 있는 종자크기와 씨없는 수박생산시 4배체 종자생산량에 관련된 종자크기 등의 선발이 가능한 분자마커를 개발하고자 함
- 수박의 공우성 마커로 표지된 기준 연관유전자 지도 작성
- 수박 특이형질 계통의 특허출원

2. 연구의 필요성

- 수박은 전 세계 채소 재배면적 17,534,940ha 중 3,810,535ha로 21.7%를 차지 (FAO, 2009). 토마토(28.4%) 다음으로 중요한 작물로 인식
- 전세계 재배면적의 지속적 확대
 - 2004년 3,200,257ha 대비 2009년 20% 확대
 - 중국에서 특히 급속 확대 ; 2004년 대비하여 32% 증가
- 시설재배 증가, 지구온난화로 인한 흰가루병, 온실가루이 등의 발생이 많아지는 추세로 이러한 기후변화에 대응하기 위한 내병성, 내충성 육종에 대한 투자가 많아짐.
- 신품종의 life-cycle이 과거 10년에서 3~4년으로 크게 짧아짐에 따라 다국적기업을 중심으로 육종의 효율성을 높이고 품종개발 소요기간을 단축하기 위한 분자마커개발, 유전자 지도 작성 등에 대한 투자를 시작하였지만, 타 작물에 비해 매우 뒤쳐진 상황
- 육종의 효율성을 높이기 위한 방법으로 열대지역을 활용한 shuttle breeding에 대한 투자가 점차 확산되고 있음. Syngenta의 경우 태국, Monsanto의 경우에 중국남부 등에 육종포장을 운영하여 세대진전, 증식, 조합작성 등의 육종업무를 동절기에 수행
- 중국 베이징계놈연구소(BGI)는 2010년말 수박의 전체 계놈염기서열을 결정하였다고 비공개 발표한 이후로, 미국과 중국을 중심으로 전 계놈서열을 결정함.
 - BGI는 염기서열에 대한 독점적 지위를 확보하여 빠른 속도로 분자마커를 개발할 수 있는 상황이며, 수박의 경우 국내에서 유전자지도 및 분자마커 연구개발투자가 거의 이루어지지 않아, 적극적인 투자로 연구기반 조성이 필요함.
 - BGI의 계놈염기서열이 공개되는 순간부터 적극적인 계놈분석연구를 수행할 필요가 있음.
- 국내에서 수박 유전체 연구에 기본 자료로 활용될 기준유전자지도 (reference map)가 필요하며, 이를 위하여 염기서열 변이가 매우 적은 것으로 파악되고 있는 수박의 다형성 마커 개발이 요구됨.

- 현재, 수출용 품종 종자개발의 경쟁력 있는 목표는 기능성, 내병성 (특히, 중국 시설재배용) 등으로 파악되며, 시장의 변화에 신속히 대응할 수 있는 분자유종 마커개발 체계를 확립하여야 하고, 다국적 종자기업이 현재 적극 활용하는 방법인, 빠른 세대진전이 가능한 동남아(태국 등)에서의 shuttle breeding 방법을 적극 활용하여야 함.
- 현대적 분자유종기술 적용으로 신속한 수출용 품종개발 기반구축이 절실함
 - 국내 고유 계통을 중심으로 한 수박 유전체 기초연구 활성화
 - 기능성, 내병성 등 주요 형질에 대한 분자마커 개발 및 실용화
 - 형질 특이적 분자마커를 활용한 품종(지적재산권) 보호

IV. 연구개발 내용 및 범위

- SSR마커 개발 및 전체 계놈 서열을 활용한 수박의 기준 연관유전자 지도 작성
 - 수박은 타 박과작물과 달리 유전적 배경이 협소하여 분자적 다양성이 부족하므로, 최대한 원연관계의 mapping population을 결정 (PI189255 x Ts)
 - 1년 3회 이상의 세대진전이 가능한 (seed to seed) 태국에서 집단육성 (shuttle breeding)하여 F2를 이용한 genetic linkage map draft 작성
 - 다양한 EST-SSR 및 gSSR 마커 개발 (ICUGI의 EST-SSR, 수박 BAC-end sequencing에서 확보한 SSR, 오이 전체계놈서열에서 확보한 transferable SSR, GenBank에서 새롭게 분석할 예정인 SSR 등) 및 베이징계놈연구소 (BGI)에서 전체 계놈 염기서열 확보를 통한 연관유전자 지도 작성
- Map 작성관련 집단의 RIL(recombinant inbred line) 개발을 통한 주요 형질 관련 mapping
 - 주요 형질에 대한 mapping을 위하여 4년차까지 2가지 RIL 집단을 개발
 - 다양한 대비형질들 (종자크기, 과육색, 경도, 과형, 당도, 내병성, 종피, 과크기, 초세, 초형 등)을 보이는 PI189225 (*C. lanatus* var. *citroides*) x Ts (*C. lanatus* var. *lanatus*)에 대한 mapping을 위하여 RIL을 육성하고 candidate marker 결정
- 흰가루병저항성 분자마커 개발
 - 기 확보한 흰가루병(PMR1) 저항성 계통인 PI254744를 활용한 NIL의 작성 .
 - NIL을 대상으로 RAPD 또는 AFLP, SSR, SNP 등을 활용하여 계통선발용 분자마커를 개발하고, 이를 포장시험하고 선발력을 확인
 - PI254744 x TS 의 F2 집단을 양성하고, QTL 분석
 - 분석한 QTL을 중심으로 연관 분자마커의 탐색 및 표현형 검정
- NIL을 활용한 종자크기 선발관련 분자마커 개발
 - 종자크기는 생과일 식용시 씨앗에 대한 식감을 거의 느낄 수 없는 씨앗째 먹는 수박으로의 기능성화 및 씨없는 수박의 종자 생산성 증대에 필요한 선발 형질임.
 - 수박 종자크기를 결정하는 분자마커를 개발하기 위하여, NS(Normal-seed Size),

SS(Small-seed Size), MS(Micro-seed Size), TS(Tomato-seed Size) 종자 크기별로 구분이 가능한 분자적 선발마커를 개발.

V. 연구개발결과

1. 수박 고밀도 연관유전자 지도 개발

○ EST-SSR primer 세트 탐색 및 도출

- ICuGI (International Cucurbit Genomics Initiative)에서 수박의 유전자은행 (GenBank)에 등록된 ESTs (expressed sequence tags)을 활용하였으며, 동시에 신규 EST-SSR primer set을 MISA 프로그램을 이용하여 도출하였음

○ BGI 수박 게놈 서열 활용을 위한 G-browser 적용

- 2012년 1월 발표된 수박게놈서열을 ICuGI를 통하여 분양받았고, 이 서열을 다시 genome browser에 업로드 map viewer를 통하여 가지적으로 염기서열을 볼 수 있도록 제작 (<http://165.194.133.131>)

○ EST-SSR을 활용하기 위한 마커 탐색 및 개발

- 유전자 연관지도는 PI189225(P1; *C. lanatus* var. *citroides*), Ts(P2; *C. lanatus* var. *lanatus*)를 대상으로 RIL (recombinant inbred line) 집단을 전개하여 작성하고자 하였다. 기존 연구에서는 재배종 내에서의 유전적 배경이 너무 좁아 다양한 연관마커의 개발이 매우 어렵다는 보고가 많았기 때문에 본 연구에서는 상대적으로 유전적 거리가 멀고 야생형으로 여겨지는 아종(subspecies)을 대상으로 유전자지도 집단을 양성하고자 하였다. 수박의 유전자지도 작성을 위한 마커를 탐색하고자, 연구실에서 생물정보학적 방법을 기반으로 하여 도출된 다양한 EST-SSR과 ICuGI에서 분양받은 EST-SSR을 대상으로, 약 1000여개의 primer set을 활용하였음
- 그 결과, mapping에 이용할 수 있는 135개의 EST-SSR marker를 확보하였으나, 최종적으로 segregation distortion 문제로 인하여 33개의 EST-SSR marker로 만들어진 12개의 연관군을 얻어 더 많은 분자적 다형성을 보이는 SNP 기반의 유전자지도 작성을 목표로 설정하였음.

○ EST-SSR 및 HRM 마커를 frame marker set으로 활용한 연관유전자 지도 작성

- 최종적으로 252개의 F2 분리 세대에 대하여, segregation distortion이 최대한 필터링된 frame marker들인 33개의 EST-SSR 마커와 103개의 HRM 마커가 grouping 및 ordering 된 연관유전자지도를 작성하였음 (논문발표: Rhee et al., HEB, 2015.10)

○ Genotyping-by-sequencing(GBS) 방법을 통한 SNP 개발 및 분리세대 연관군 분석

- GBS를 통해 얻어진 유전자형을 토대로 작성된 유전자지도는 1,922개의 공우성 마커로 활용할 수 있었으며, 545의 genetic bin으로 구성된 총 1,431.3cM의 11개의 연관그룹을 형성하였다 (Haldane mapping function; LOD>10, Chr05, 10은 LOD>3.0)
- 유전자지도의 마커간 거리는 평균 1.2cM으로 나타났으며, genetic bin용 마커 사이의 평균거리는 약 2.5cM으로 계산되었음

2. 수박 흰가루병 저항성 연관 분자마커 개발

- 흰가루병 race1W 특성 조사 및 접종법 확립
 - 수박 흰가루병원균 (Powdery Mildew; *Podosphaera xanthii*, formerly *Sphaerotheca fuliginea*)은 2가지의 race가 우점하여 분포하고 있다고 알려져 있으며, 국내에는 주로 race 1W가 발견되고 있음
 - 현미경 검정, rRNA-ITS 분석 및 판별식물을 이용하여 종의 동정 및 race 판별 방법을 확립하고, PM-1W에 대한 저항성 육종을 위한 접종법을 확립함
- 흰가루병 race1W 저항성 NIL 육성, 저항성 분석, SCAR 및 CAPS 마커 개발
 - ‘SBB’와 ‘SBB BC’, F₁인 ‘SBB x SBB BC’, 여교잡한 ‘SBB x SBB BC x SBB’와 ‘SBB x SBB BC x SBB BC’, 그리고 F₂인 ‘SBB x SBB BC’ F₂들과 SBB x PI254744, 45nc x PI254744 유래한 NIL 집단을 이용하여 저항성 표현형의 index를 확립하고 우성유전성을 밝힘
 - NIL 집단에 대한 RAPD, SRAP 및 AFLP의 적용을 통하여 저항성 연관유전자좌에 대한 SCAR 마커를 개발하였음
 - SCAR 마커의 주변 염기서열을 파악하여 공우성인 CAPS 마커로 신규 개발하고, 다른 계통들과의 교배로 얻어진 F₂에서 유전자형/표현형 일치도를 확인함
- 흰가루병 race1W 저항성 QTL 분석 및 HRM 마커 개발
 - PI 254744의 흰가루병 저항성 유전양상은 우성발현으로 나타났으며, TS와의 교배로 F₂:3 분리세대에서 QTL 분석을 수행한 결과, 염색체 2번의 위치에서 major QTL을 탐지할 수 있었음.
 - 저항성 연관 분자마커로 3개의 HRM용 primer set (254Pmr04, 254Pmr05, 254Pmr06)를 개발하고 특허출원함(10-2015-0145359). 일치도는 99%로 나타남.
- 본 내용으로 ‘한국농업신문’에 홍보기사 1건을 달성함.

3. 수박 종자크기별 연관 분자마커 개발

- 종자크기 QTL 분석
 - PI189225와 TS를 양친으로 하는 F₂ 후대분리집단에서 다시 자가수분한 F₃세대에 해당하는 종자를 수확하여 100립중, 종자길이, 종자폭에 대한 데이터를 작성하였고, F₂ 세대에서 GBS를 활용한 유전자지도를 작성하여 QTL 분석에 활용하였음.
 - 염색체 2번과 6번에서 major QTL이 탐지되었음
- 4가지 종자크기 범위 고정계통 작성 및 HRM 마커 개발
 - 종자크기 연관 마커의 개발을 위하여, 4가지 종자크기인 NS(medium-seed size), SS(small-seed size), MS(micro-seed size), TS(tamato-seed size)의 크기를 갖는 계통들을 제작 (NT-BC4F9, SS-BC4F9, MS-BC4F9, TS-BC4F9)
 - 각 종자크기별 고정계통들의 서열변이 탐색을 통해 확보한 SNP 들을 기초로 프라이머 세트를 제작하였고, 그 결과를 표현형과 비교함
 - 최종적으로 4가지 HRM용 primer set을 확인하였으며 (WSize-Ch2-1a,

WSize-Ch6-1, WSize-Ch6-2a, WSize-Ch6-4), NIL에서 99% 일치도를 나타내어 특허출원(10-2015-0145360, 10-2015-0145853)하였음

- 개발된 4가지 종자크기 고정계통은 상기 특허와 같이 특허기탁 하였음.

4. ‘씨저근’ 수박품종 개발

- 본 과제를 통하여 수박의 씨앗을 MS크기로 줄여서 씨앗 채 먹어도 전혀 부담이 없는 일명 micro-seeded watermelon이 유럽 등에서 재배가 확산되고 있으며. 국내에서도 소과종에 대한 요구도가 높아지면서 씨앗이 작은 수박의 개발필요성이 인식되고 있음.
- 본 연구과정에서 씨작은 수박에 대한 개발의 필요성을 인식하여 종자의 크기가 MS인 “씨자근”수박을 개발하여 품종보호출원하여 국내외에 보급하고 있으며 2014년부터 스페인에 kg당 4,444불의 고단가로 수출을 하고 있으며 2015년 10월 현재 4kg의 수출요청을 받아 (5,000불/kg) 약 2천342만원의 수출계약을 확보하였음.
- 본 내용으로 ‘한국농업신문’에 홍보기사 1건을 달성함.

5. 수박 RIL 집단의 개발

- 본 과제를 통하여 F2세대에서 재조합된 유전자형이 고정된 계통을 양성한 recombinant inbred line (RIL) 집단을 양성하여 향후의 유전분석, 표현형 분석, QTL 분석, 마커개발 등에 활용할 수 있는 기초 재료집단을 양성함
 - 양성된 RIL 집단 : TS3344 x PI254744, SBA x DRD

6. 수박 바이러스백터의 제작

- 수박에서 유전자 마커를 확보하게 되면 유전자의 기능검정을 수행하기 위하여, 본 과제의 목표 외로 바이러스 백터를 제작하여 특허출원 및 논문을 발표함.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구과제를 통하여 확보한 기술인 수박 흰가루병 저항성 연관 분자마커 및 수박 종자크기 연관 분자마커는 품종개발에 직접적인 활용이 가능한 마커들로 협동 육종회사에 기술이전을 실사하였으므로, 향후 지속적인 신품종 개발에 활용될 예정임.

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

본 연구과제의 수박 흰가루병 저항성 연관 분자마커 및 수박 종자크기 연관 분자마커 개발 성과를 통하여 향후 지속적인 신품종 개발을 이루고 그 실적을 언론기관(신문사 등)에 배포하여 성과를 홍보하고자 함

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 과제를 통하여 특허 4건, 품종보호출원 1건이 이루어졌고, SCI급 논문 3편이 달성되어 연구목표는 충실히 달성하였음. 한편 개발된 마커의 특허출원이 이루어졌으므로, 이에 대한 추가적인 논문이 발표될 예정임.

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

본 연구를 통하여 확보한 흰가루병 저항성 연관 분자마커 및 종자크기 연관 분자마커는 향후 해당 유전자 클로닝을 위한 기초자료로 사용될 계획이며, 작성된 고밀도 연관유전자지도 및 RIL 집단들은 수박의 다양한 타 형질연관 분자마커 개발에 사용될 예정임. 또한 개발된 분자마커는 추후 MABC 등 여교잡을 통한 계통양성에서 MAS 마커로 활용될 예정임.

SUMMARY

(영문요약문)

Title: Development of molecular markers for seed size and powdery mildew resistance and construction of genetic linkage map

Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] is one of the most important fruit vegetables in the world and largely cultivated crop. Watermelon provides phytochemicals such as lycopene, citrulline, arginine, and glutathione, as well as water and minerals essential for human health (Inthichack et al., 2014; Ren et al., 2012; Soteriou et al., 2014). Watermelon production worldwide contributes to approximately 9.5% of the overall vegetable production (<http://faostat.fao.org>).

Watermelon is a specialty crop that belongs to the xerophyte genus *Citrullus* with a genome size of 425 Mb ($2n = 2x = 22$) (Levi et al., 2013; Xu et al., 2013). Prior to genome sequencing of watermelon, a genetic linkage map was constructed using molecular markers derived from isozymes (Navot and Zamir, 1987; Zamir et al., 1984), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism (AFLP), and sequence-related amplified polymorphism (Levi et al., 2006). In addition, high-frequency oligonucleotide-targeting active genes (HFO-TAGs), which are recently developed markers, have been reproducible and useful in the genetic mapping of watermelon (Levi et al., 2013). Similar to other major crops, known sequence-based markers retrieved from GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), expressed sequence tag (EST)-based simple sequence repeats (SSRs), were used for genetic linkage mapping of watermelon, but only few SSRs were anchored to the map. After initiating watermelon genome sequencing at the end of 2008, as a part of the International Watermelon Genome Initiative, the draft genome sequence yielded large numbers of SSR, insertion and deletion (InDel), and structure variation (SV) markers (Ren et al., 2012).

Using these markers, which are sequence-based and codominant markers, a high-density genetic map was successfully constructed, providing anchors and orientation of assembled scaffolds. The genetic map was constructed using recombinant inbred lines (RIL) generated from line 97103 (Chinese elite line) \times PI296341-FR (wild-type, *Fusarium* wilt-resistant line) and consisted of 953 markers that covered 798-cM genetic distance and 330.4-Mb scaffold size. Overall, 234 scaffolds were anchored on the map, and the coverage of the 97103 genome was approximately 93.5%.

In this study, we had three major objectives such as construction of high dense genetic linkage map, development of molecular markers linked to powdery mildew resistant gene, and development of molecular markers linked to the seed sizes of fruits.

First, we developed frame marker sets of EST-SSRs and HRM for genetic linkage map of watermelon. We resequenced each parent plant genome using Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., USA) and examined candidate markers of HRM SNPs from NGS data. A genetic linkage map of the F2 population for watermelon was constructed using selected reliable HRM markers. EST-SSR markers that escaped segregation distortion in the F2 progeny were also anchored to consolidate the genetic map. In addition, we used GBS approach for obtaining larger sets of SNP-based markers and developed high dense genetic linkage map.

Second, we developed molecular markers linked to powdery mildew resistant gene of PI254744. First of all, the fungus of powdery mildew was characterized and identified to *Podosphaera xanthii* race 1W using microscopy, PCR detection of rRNA-ITS, and physiological response of differential host plants. Using near isogenic lines (NIL) we generated SCAR and CAPS markers with the molecular approaches of RAPD, AFLP, and SRAP. In addition, we developed F2:3 population derived from PI254744 x TS3344 and performed QTL analysis. Major QTL of chromosome 2 was detected and HRM markers was developed within the QTL region. Three HRM primer sets (254Pmr04, 254Pmr05, 254Pmr06) were selected and applied to a patent.

Third, we developed molecular markers linked to seed sizes of watermelon fruit. Generally, the range of the seed size is discrete and consisted six sizes. With the F2:3 segregated population of TS3344 x PI189225, the candidate genomic region for seed sizes was determined by QTL analysis. Two QTLs of chromosome 2 and 6 were detected. Also, NILs representing each of NS(medium-seed size), SS(small-seed size), MS(micro-seed size), TS(tamato-seed size) were developed and sequenced using Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., USA) and examined candidate markers of HRM SNPs from NGS data. SNPs within the QTL region was searched in each of NILs and 4 kinds of HRM markers were developed and validated in the NILs and segregated progeny. Four HRM primer sets (WSize-Ch2-1a, WSize-Ch6-1, WSize-Ch6-2a, WSize-Ch6-4) were selected and applied to a patent. Also, the NILs were included to the patent as deposited lines. The cultivar of “Small Seed” watermelon was developed and applied for protection of new cultivar of plants.

Additionally, we provided two recombinant inbred lines (RILs) derived from “TS3344 x PI254744” and “SBA x DRD”, which can contribute to analyze genetic traits and marker development in future. If the gene responsible for a specific trait would be cloned or characterized, the gene function should be analyzed in vivo. To analyze phenotypic changes by loss of the gene function, we developed a virus vector, CFMMV-based vector for future analysis.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of the project13

Chapter 2. Domestic and worldwide trends in technology development21

Chapter 3. Major results24

Chapter 4. Level of achievement and contribution to industry289

Chapter 5. Major products and schedule of application295

Chapter 6. Collected technology and information300

Chapter 7. Introduced facilities and equipments304

Chapter 8. Laboratory safety management and implementation performance304

Chapter 9. References308

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	24
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	289
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	295
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	300
제 7 장	연구시설·장비 현황	304
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적	304
제 9 장	참고문헌	308

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적

본 과제의 최종 목적은 수박의 종자크기 및 흰가루병 저항성 관련 분자마커를 개발하는데 있으며, 이들 형질의 QTL을 수행하기 위한 수박의 연관 유전자지도를 작성하는데 있다. 본 과제의 성공적 수행을 위하여 다각도의 육종 기반기술 개발, 종자크기 및 흰가루병 저항성 계통 육성, EST-SSR, SNP를 기반으로 하는 고밀도 유전자지도 작성 등을 목적으로 수행되었다.

수박의 종자크기는 채종시 수박종자 생산량과 밀접한 관계를 갖고 있으며, 최근 종자의 크기가 작아 섭취시 종자와 과육을 같이 섭취하여도 거부감이 들지 않는 씨작은 수박 등이 유럽을 중심으로 선호되고 있어 종자크기를 일정하게 유지하는 계통을 개발하고, 이에 대한 분자마커 개발을 수행하고자 하였다.

수박의 흰가루병은 시설재배에서 특히 빈발하며, 광범위한 노지재배를 하고 있는 미국의 경우에도 생육 중-후기에서 흰가루병 발생으로 인한 과실의 당도감소 등이 문제가 되어왔다. 본 과제에서는 흰가루병 저항성 유전자원을 이용하여 흰가루병 저항성 상업용 계통을 육성하고자 하였고, 이에 대한 분자마커를 개발하고자 하였다.

수박은 재배종 내에서 유전적 다양성이 매우 적으며 (약 5%의 유전적 다형성을 보임), 이에 따라 품종구분을 위한 마커 개발에도 어려움을 겪어 왔다. 본 연구과제에서는 많은 수의 다형성 마커로 사용할 수 있는 SNP들을 개발하고, 이를 이용한 F2 분리세대에서의 고밀도 유전자지도 작성을 목표로 하였으며, 과제에서 개발한 고밀도 유전자지도를 활용한 QTL을 수행하여 목표 형질인 종자크기 및 흰가루병 저항성 QTL을 결정하고자 하였다.

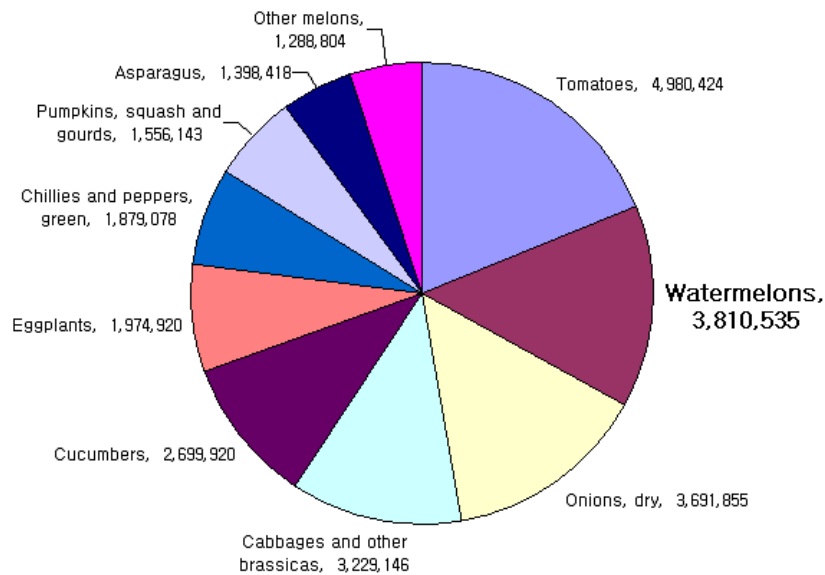
본 과제를 통하여 개발되는 종자크기 연관 분자마커, 흰가루병 저항성 연관 분자마커 등의 개발과 고밀도 유전자지도 작성의 확립은 향후 수박 육종의 다양한 병 저항성 목표형질의 고정을 위한 계통육성과 연관 분자마커 개발에 큰 자산과 경험이 될 것으로 확신하며, 전세계적인 품종개발 주기가 갈수록 빨라지고 있는 현 시점에서, 태국 등지에서 1년 3기작 (seed to seed)으로 계통을 최단기간 내에 육성할 수 있는 shuttle breeding의 성공적 적용이 가능함을 제시하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 수박의 중요성

○ 수박은 대표적인 global crop

- 전 세계 채소 재배면적 17,534,940ha 중 3,810,535ha로 21.7%를 차지
- 토마토(28.4%) 다음으로 중요한 작물로 인식



○ 전세계 재배면적의 지속적 확대

- 2004년 3,200,257ha 대비 2009년 20% 확대됨
- 중국에서 특히 급속 확대 ; 2004년 대비하여 32% 증가됨

○ 아시아 시장의 중요성 부각 (그림 2)

- 중국시장(2,212,456ha)이 전 세계 재배면적의 58.1%를 점유함
- 중국, 동남아, 인도 및 기타 아시아 시장에서 부가가치가 높은 F1종자시장으로 급격히 확대되고 있으며 특히 고품질 기능성 수박에 대한 인식과 요구도가 확대될 것으로 예상됨.

2. 수박의 국내외 재배현황

○ 국내 수박재배면적은 1995년을 정점으로 급격히 감소하여 2000년 이후 연평균 6% 감소하여 2010년 16,396ha이고, 특히 노지시장이 매우 줄었고 시설수박은 조금씩 증가하는 추세

○ 시설재배 증가, 지구온난화로 인한 흰가루병, 온실가루이 등의 발생이 많아지는 추세로 이러한 기후변화에 대응하기 위한 내병성, 내충성 육종에 대한 투자가 많아짐.

- 국내 수박은 고품질수박 품종개발을 통하여 매우 수준 높은 품종들이 다수 개발되어 왔고 무가온 시설재배 특성으로 인하여 동절기부터 하절기까지 재배 가능한 독특한 품종군이 있으나 유전적 배경은 매우 협소

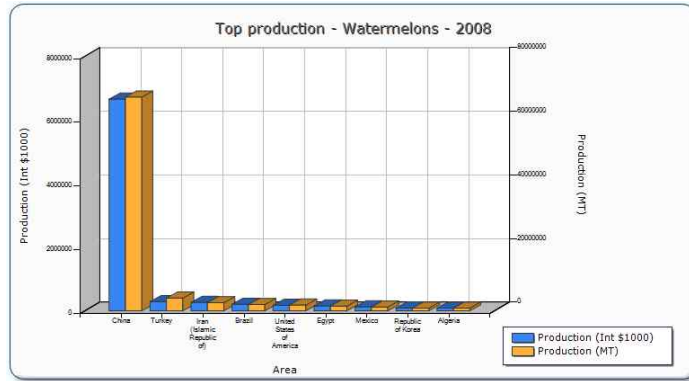


그림 2. 주요 국가별 수박생산 현황

3. 수박의 소비시장 변화

- 고부가치 수박시장의 확대
 - 최근 씨없는 수박, 고품량 라이코핀 수박, 다양한 과육색, 종자관련 기능성 수박 등 고부가가치 시장으로 급속히 변화
 - 미국 등 선진국에서 수박의 라이코핀에 대한 연구 및 품종개발에 대한 투자가 확대되고 미국수박생산자협회에서 수박에서 라이코핀함량이 다른 작물보다 높다는 것을 적극 홍보하여 재배와 소비를 확산시킴.
- 수박 종자수출을 위한 전략적 연구추진 및 투자방향 설정이 필요한 시점

4. 수박의 분자유종 필요성

- 신품종의 life-cycle이 과거 10년에서 3~4년으로 크게 짧아짐에 따라 다국적기업을 중심으로 육종의 효율성을 높이고 품종개발 소요기간을 단축하기 위한 분자마커개발, 유전자지도 작성 등에 대한 투자를 시작하였지만, 타 작물에 비해 매우 뒤쳐진 상황
- 육종의 효율성을 높이기 위한 방법으로 열대지역을 활용한 shuttle breeding에 대한 투자가 점차 확산되고 있음. Syngenta의 경우 태국, Monsanto의 경우에 중국남부 등에 육종포장을 운영하여 세대진전, 증식, 조합작성 등의 육종업무를 동절기에 수행
- 중국 베이징게놈연구소(BGI)는 2010년말 수박의 전체 게놈염기서열을 결정하였다고 비공개 발표함.

- BGI는 염기서열에 대한 독점적 지위를 확보하여 빠른 속도로 분자마커를 개발할 수 있는 상황이며, 수박의 경우 국내에서 유전자지도 및 분자마커 연구개발투자가 거의 이루어지지 않아, 적극적인 투자로 연구기반 조성이 필요함.
 - BGI의 게놈염기서열이 공개되는 순간부터 적극적인 게놈분석연구를 수행할 필요가 있음.
- 국내에서 수박 유전체 연구에 기본 자료로 활용될 기준유전자지도 (reference map)가 필요하며, 이를 위하여 염기서열 변이가 매우 적은 것으로 파악되고 있는 수박의 다형성 마커 개발이 요구됨.
 - 현재, 수출용품종 종자개발의 경쟁력 있는 목표는 기능성, 내병성 (특히, 중국 시설재배용) 등으로 파악되며, 시장의 변화에 신속히 대응할 수 있는 분자유종 마커개발 체계를 확립하여야 하고, 다국적 종자기업이 현재 적극 활용하는 방법인, 빠른 세대진전이 가능한 동남아 (태국 등)에서의 shuttle breeding 방법을 적극 활용하여야 함.
 - 현대적 분자유종기술 적용으로 신속한 수출용 품종개발 기반구축이 절실함
 - 국내 고유 계통을 중심으로 한 수박 유전체 기초연구 활성화
 - 기능성, 내병성 등 주요 형질에 대한 분자마커 개발 및 실용화
 - 형질 특이적 분자마커를 활용한 품종(지적재산권) 보호

제 3 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

가. 연구개발의 최종목표

- 수박의 기준 연관유전자지도 작성
- 흰가루병 저항성 분자마커 개발 (1종)
- 종자크기관련 분자마커 개발 (3종)
- RIL집단 유래 특이형질 계통의 특허출원 (3종)

나. 주요 내용

- SSR마커 개발 및 전체 게놈 서열을 활용한 수박의 기준 연관유전자 지도 작성
 - 수박은 타 박과작물과 달리 유전적 배경이 협소하여 분자적 다양성이 부족하므로, 최대한 원연관계의 mapping population을 결정 (PI189255 x Ts)
 - 1년 3회 이상의 세대진전이 가능한 (seed to seed) 태국에서 집단육성 (shuttle breeding)하여 F2를 이용한 genetic linkage map draft 작성
 - 다양한 EST-SSR 및 gSSR 마커 개발 (ICUGI의 EST-SSR, 수박 BAC-end sequencing에서 확보한 SSR, 오이 전체게놈서열에서 확보한 transferable SSR, GenBank에서 새롭게 분석할 예정인 SSR 등) 및 베이징게놈연구소 (BGI)에서 전체 게놈 염기서열 확보를 통한 연관유전자 지도 작성
- Map 작성관련 집단의 RIL(recombinant inbred line) 개발을 통한 주요 형질 관련 mapping
 - 주요 형질에 대한 mapping을 위하여 4년차까지 RIL (F2S8세대) 100계통을 개발할 예정.
 - 다양한 대비형질들 (종자크기, 과육색, 경도, 과형, 당도, 내병성, 종피, 과크기, 초세, 초형 등)을 보이는 PI189225 (*C. lanatus* var. *citroides*) x Ts (*C. lanatus* var. *lanatus*)에 대한 mapping을 위하여 RIL을 육성하고 candidate marker 결정
- NIL(near isogenic line)을 활용한 흰가루병저항성 분자마커 개발
 - 기 확보한 흰가루병(PMR1) 저항성 계통인 PI254744를 활용한 NIL이 현재BC4F2 세대로 육성되어 있음.
 - NIL을 대상으로 RAPD 또는 AFLP, SSR, SNP 등을 활용하여 계통선발용 분자마커를 개발하고, 이를 포장시험하고 선발력을 확인
- NIL을 활용한 종자크기 선발관련 분자마커 개발 (씨앗째 먹는 수박, 씨없는 수박 생산용)
 - 종자크기는 생과일 식용시 씨앗에 대한 식감을 거의 느낄 수 없는 씨앗째 먹는 수박으로의 기능성화 및 씨없는 수박의 종자 생산성 증대에 필요한 선발 형질임.
 - 종자크기를 결정하는 마커를 개발하기 위하여, NIL (현재 BC3F4)을 활용하여 종자 크

기별 3개의 분자적 선발마커를 개발하고자 함.

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제1세부과제:

수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성

(1) 연구목표

- SSR마커 개발 및 전체 게놈 서열을 활용한 수박의 기준 연관유전자 지도 작성
- NIL(near isogenic line)을 활용한 흰가루병저항성 분자마커 개발
- NIL을 활용한 종자크기 선발관련 분자마커 개발 (씨앗째 먹는 수박, 씨없는 수박 생산용)

(2) 연구내용

- SSR마커 개발 및 전체 게놈 서열을 활용한 수박의 기준 연관유전자 지도 작성
 - 수박은 타 박과작물과 달리 유전적 배경이 협소하여 분자적 다양성이 부족하므로, 최대한 원연관계의 mapping population을 결정 (PI189255 x Ts)
 - 1년 3회 이상의 세대진전이 가능한 (seed to seed) 태국에서 집단육성 (shuttle breeding)
 - 다양한 EST-SSR 및 gSSR 마커 개발 (ICUGI의 EST-SSR, 수박 BAC-end sequencing 에서 확보한 SSR, 오이 전체게놈서열에서 확보한 transferable SSR, GenBank에서 새롭게 분석할 예정인 SSR 등) 및 베이징게놈연구소 (BGI)에서 전체 게놈 염기서열 확보를 통한 연관유전자 지도 작성
- Map 작성관련 집단의 RIL(recombinant inbred line) 개발을 통한 주요 형질 관련 mapping
 - 주요 형질에 대한 mapping을 위하여 4년차까지 RIL (F8세대) 100계통을 개발할 예정.
 - 다양한 대비형질들 (종자크기, 과육색, 경도, 과형, 당도, 내병성, 종피, 과크기, 초세, 초형 등)을 보이는 PI189225 (*C. lanatus* var. *lanatus*) x Ts (*C. lanatus* var. *citroides*) 에 대한 mapping을 위하여 RIL을 육성하고 candidate marker 탐색
 - 선발된 특이형질 계통중 3종 특허출원
- NIL(near isogenic line)을 활용한 흰가루병저항성 분자마커 개발
 - 기 확보한 흰가루병(PMR1) 저항성 계통인 PI254744를 활용한 NIL이 현재BC4F2 세대로 육성되어 있음.
 - NIL을 대상으로 RAPD 또는 AFLP, SSR, SNP 등을 활용하여 계통선발용 분자마커를 개발하고, 이를 포장시험하고 선발력을 확인
- NIL을 활용한 종자크기 선발관련 분자마커 개발 (씨앗째 먹는 수박, 씨없는 수박 생산

용)

- 종자크기는 생과일 식용시 씨앗에 대한 식감을 거의 느낄 수 없는 씨앗째 먹는 수박으로의 기능성화 및 씨없는 수박의 종자 생산성 증대에 필요한 선발 형질임.
- 종자크기를 결정하는 마커를 개발하기 위하여, NIL (현재 BC3F4)을 활용하여 종자 크기별 3개의 분자적 선발마커를 개발하고자 함.

나. 제1협동과제

수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 계통육성 및 유전자지도 작성용 집단양성

(1) 연구목표

- 연관유전자 지도 작성을 위한 F2 분리집단 육성
- 유전자지도 및 주요 형질관련 지도작성을 위한 RIL계통 (F8세대) 육성
- 흰가루병저항성 (PMR1) 분자마커 개발 NIL(BC4F5)의 육성 및 이병성 검정
- 종자크기 선발관련 분자마커 개발 (씨앗째 먹는 수박, 씨없는 수박 생산용)을 위한 NIL(BC4F5)의 육성 및 특성 검정
- 개발된 분자마커들의 유용성 확인 및 계통육성

(2) 연구내용

- 연관유전자 지도 작성을 위한 F2 분리집단 육성
 - 유전자지도 작성에 이용되는 P1(P1189255), P2(TS), F1, F2를 태국에서 육성하여 1세부에 전달
- 유전자지도 및 주요 형질관련 지도작성을 위한 RIL계통 (F8세대) 육성
 - 유전자지도 작성관련 RIL (recombinant inbred line) 집단의 확보를 위하여 4년간 F8세대 100계통 육성
 - 특허등록을 위한 RIL집단 유래 특이형질 계통의 특성 검정 및 선발
- 흰가루병저항성 (PMR1) 분자마커 개발 NIL(BC4F5)의 육성 및 이병성 검정
 - PMR1 분자마커 개발을 위한 NIL (near isogenic line)을 BC4F5 세대로 육성하여 1세부에 제공하고, 개발된 마커 및 내병성/이병성 검정
- 종자크기 선발관련 분자마커 개발 (씨앗째 먹는 수박, 씨없는 수박 생산용)을 위한 NIL(BC4F5)의 육성 및 특성 검정
 - 종자크기관련 분자마커 개발을 위한 NIL을 BC4F5세대로 육성하여 1세부에 제공하고, 이에 대한 포장 특성 검정 및 확인
- 개발된 분자마커들의 유용성 확인 및 계통육성
 - 최종적으로 개발되는 4종의 분자마커에 대한 유용성을 포장에서 확인하고, 마커를 활용한 계통들의 육성

3. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책·홍보		기타 (타연구용등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책·활용	홍보·전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	3	-	1	-	-	-	-	-	3	4	-	-	-	-	1	-	
연구기간 내 달성실적	5	-	3	1	1	-	-	-	3	-	3	-	4	-	2	-	
달성율(%)	167	-	300	200	100	-	-	-	100	-	300	-	400	-	200	-	

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 본 연구과제와 관련된 국내외 기술수준 비교

1. 수박의 고밀도 연관유전자지도 작성

수박의 고밀도 연관유전자지도의 작성은 그 학술적 의미 외에도 수박 육종분야에서 다양한 대립유전자의 집적시 반드시 필요한 형질연관 분자마커의 개발에 핵심적인 부분이다.

현재 전 세계의 수박 유전체기반 연구 그룹은 크게 중국의 베이징 농림과학연구소의 Xu Yong박사 연구팀과 미국의 USDA-ARS (Levi 박사) 및 코넬대학 Boyce Thomson Institute (Zhang 박사) 연구팀으로 나누어 볼 수 있다. 중국 Xu 박사팀은 2011년 중국의 엘리트 계통인 97103과 만할병 저항성 계통인 PI 296341-FR에서 만들어진 RIL (recombinant inbred line)을 이용하여 SNP, In/Del을 포함한 다양한 마커를 기반으로 연관유전자 지도를 작성하였고, 전체 게놈서열분석 결과를 토대로 물리지도 초안을 작성하고자 하였다 (Plos One, 2012). 한편 2012년에는 BTI의 Zhang Jun Fei 박사를 중심으로 전 세계 수박연구팀이 합류하여 Nature Genetics (2013)에 20개 유전자원의 전사체 분석결과 및 수박 물리지도 draft (초안)을 발표하여 박과식물에서의 수박의 진화, 구체적인 물리지도 및 유전자 분석(annotation)을 제공하고 현재까지 국제적인 참조 유전체 (reference genome)으로서의 기능을 하고 있다. 이 수박유전체 분석결과 및 참조유전체는 www.icugi.org 에 등록되어 있으며, 이후 현재까지 세계 여러 연구팀에서 97103의 참조유전체 서열을 기반으로 염기서열 재분석 (resequencing)을 진행하고 SNP를 확보하고 있다.

본 연구과제는 2011년 9월에 시작하여 초기 연구는 수박의 참조염기서열 없이 수박 야생종과 재배종의 다양한 SSR 변이를 탐색하여 연관유전자지도를 작성하고자 하였으나, 수박 야생종의 극심한 segregation distortion으로 인하여 활용도 있는 연관유전자지도 작성이 어려웠다. 한편 본 연구팀은 2013년 초에 배포되기 시작한 97103의 참조염기서열을 바탕으로 수박 유전체의 SNP를 획득하는 연구로 방향을 선회하여 사용한 야생종 및 재배종의 resequencing을 수행하였고, 이들 SNP를 바탕으로 F2 분리집단을 대상으로 한 SNP 기반 연관유전자지도를 작성하고자 하였다. 또한, 2013년 가을 코넬대학에서 GBS (Genotyping By Sequencing) 기술을 발표하여 적은 sequencing 분량으로 genotyping이 가능한 연구환경을 제공하였다. 본 연구팀은 코넬대학과 협력하여 수박에서 GBS 방법에 기반한 연관유전자지도 작성을 시작한 바 있다.

본 연구과제에서는 수박 EST-SSR 및 SNP 기반의 HRM 마커들을 기반으로 segregation distortion이 적은 유전체 지역을 대상으로 frame marker를 위치시킨 수박 유전자지도를 발표하였고 (Rhee et al., 2015), GBS 방법으로 작성된 유전자지도 및 흰가루병저항성 QTL 분석을 완료하고 연관마커를 개발하였다 (특허출원완료, 논문투고 중).

수박 유전체 및 고밀도 연관유전자지도에 대한 전 세계적 연구는 SNP를 원활히 사용할 수 없었던 2013년 이전과 이후로 나눌 수 있으며, 2013년 유전체 draft가 발표된 이후 연구결과가 급속히 증가하고 있는 상황이다. 본 연구과제에서도 이러한 세계적 수박 연구동향에 뒤지지 않는 연구방법과 결과를 확보하였으며, 완성된 고밀도 연관유전자지도를 바탕으로 향후의 다양한 형질연관 마커 개발에 경쟁력을 확보하고 있다.

또한, 협동연구를 통하여, 수박의 다양한 대립유전자 및 형질을 비교할 수 있어 유전체 및 육종연구에 필수적인 2가지 RIL을 국내에서 처음으로 개발하였고 이 RIL은 유전자형이 고정되어 있으므로 유전자지도 및 QTL 분석 등에 적극적으로 활용될 수 있어 향후 국내 수박 유전 및 육종 연구의 기반 자원으로서의 핵심적인 역할을 할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

2. 수박의 흰가루병 저항성 분자마커 개발

수박의 흰가루병은 전 세계적으로 과실의 수확량 및 품질에 피해를 주는 절대활물기생 진균병으로 육종분야에서는 현재까지 다양한 흰가루병 저항성 자원 및 그 유전분석이 이루어져 왔다. 특히 미국 USDA-ARS의 Levi 박사팀은 흰가루병 1W, 2W의 race에 대한 자원소개 및 유전 분석 논문을 발표해왔으며, 미국 North Carolina 대학의 Wehner 박사팀은 2W 및 새로운 race에 대한 저항성 자원 (약 1,400여개의 PI를 대상)에 대한 저항성/감수성 스크리닝 결과를 발표한 바 있다.

그러나, 현재까지 세계적으로 흰가루병 저항성에 대한 QTL 분석은 이루어진 바 없으며, QTL 분석을 통한 SNP에 기반한 분자마커도 공식적으로 발표된 바 없다.

본 연구팀은 국내에서 발생하는 PM-1W에 대한 연구를 통하여 현재 국내에 만연한 흰가루병의 속이 *Podospaera* 이며, 박과식물에 빈발하고 있는 타 속인 *Golovinomyces*와 구분할 수 있는 방법을 확립하였고, race 판별을 제시하였다. 또한, PM-1W 저항성 자원 탐색으로 PI 254744를 공시하고 이에 대한 SCAR 및 CAPS 마커를 개발하였고, QTL 분석을 통하여 연관군들에서의 저항성 형질 유전자좌의 범위를 결정하였으며 (0.8 cM이내의 분자마커 범위), SNP 기반 근접 분자마커를 개발하여 F2:3세대에서 매우 높은 연관도(0.1 cM 이내)를 보이는 결과를 얻었다.

이 연구결과는 현재 특허출원하였으며 세계적인 경쟁력을 갖고 있는 것으로 판단되며, 국내 타 연구팀이 개발한 Arka Manic 자원의 저항성 대립유전자 연관마커와 함께, 육종회사들의 흰가루병 저항성 MAS용 마커로서 활용이 가능할 것으로 생각된다.

3. 수박 종자크기 관련 분자마커 개발

수박의 종자크기는 수박 유전자원별로 크기가 다양한데, 특징적인 것은 계통별로 한 과실 내에서 만들어지는 종자의 크기는 매우 일정하며, 전체 유전자원을 대상으로 할 때, GS (giant seed), BS (big seed), NS (medium seed), SS (small seed), MS (micro seed), TS (tomato seed)의 순서로 크기에 따른 분류가 보고되어 있다. 수박 종자의 크기는 종자의 생산성과도 관련이 커서 크기가 작을수록 과실당 종자생산량은 증가하는 경향을 뚜렷하게 나타낸다. 특히, TS (가장 작은 크기의 종자크기 범위) 크기는 수박의 섭취시 과육과 같이 섭취하여도 섭취 거부감이 매우 적어 동남아 등지에서 각광받고 있으며, SS 크기의 수박종자를 생산할 수 있으면, 3배체 수박 (씨없는 수박)의 종자생산성도 향상시킬 수 있다. 따라서, 수박 육종 및 채종에 있어 종자의 크기에 대한 유전분석은 매우 중요하며, 종자크기에 연관된 분자마커를 확보할 경우, 수박의 과실을 획득할 때까지의 재배기간 없이, 어린 식물생장시기에 분자마커로 미리 종자크기를 판별할 수 있는 장점이 있다.

본 연구과제에서는 수박 종자크기가 가장 작은 자원인 TS3344와 가장 큰 종자크기를 보여주는 PI 189225를 대상으로 QTL 분석을 수행하였고, 염색체 2번과 6번에서 major QTL을 얻을 수 있었다. 또한, 4가지 종자크기(NS, SS, MS, TS)가 고정된 계통들에 대한 whole genome resequencing을 통하여 각 크기별로 SNP기반의 분자마커를 개발하고 특허출원하였다. 종자크기가 가장 작은 TS 크기의 계통은 협동과제의 상업용 품종특허출원에 사용되어 시판품종(‘씨자근’ 수박)의 출원에 기여한 바 있다.

현재 유럽을 중심으로 섭취시 거부감이 없는 씨작은 수박품종들이 출시되고 있으며, 소비자들은 매우 높은 선호도를 보이고 있으나, 아직 분자마커에 대한 발표는 없는 실정이다. 향후, 본 연구과제에서 개발된 종자크기별 분자마커는 세계적인 경쟁력을 갖는 품종개발에 일익을 담당할 것으로 판단하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 수박의 고밀도 연관유전자 지도 작성 (제1세부)

1. 유전자 지도작성 및 형질연관 마커 개발을 위한 생물정보학적 탐색

가. ICuGI의 EST-SSR primer sets 분양

ICuGI (International Cucurbit Genomics Initiative)에서는 수박의 유전자은행 (GenBank)에 등록된 ESTs (expressed sequence tags) 및 mRNA 서열들에서 단순반복염기서열들 만을 찾아 PCR로 확인할 수 있도록 약 1000개 가량의 primer set을 제공하고 있으며, 전체 게놈 염기서열을 찾아볼 수 있도록 하고 있으며, 연구자는 이를 토대로 primer를 합성하여 실제 PCR과 전기영동으로 자신의 집단에 맞는 marker들을 선별하게 된다.

나. 신규 EST-SSR primer set의 도출

- ICuGI에서 제공하는 EST-SSR list 외에, 본 과제에서는 신규로 약 4,000여개의 EST-SST을 생물정보학적 방법으로 도출하고, primer3 program을 통한 primer 정보, Tm 값 제시, e-PCR결과 및 결과산물 blasting을 할 수 있는 pipeline을 설계하였다.

○ Watermelon EST sequence retrieve from Public Database & Sequencing projects

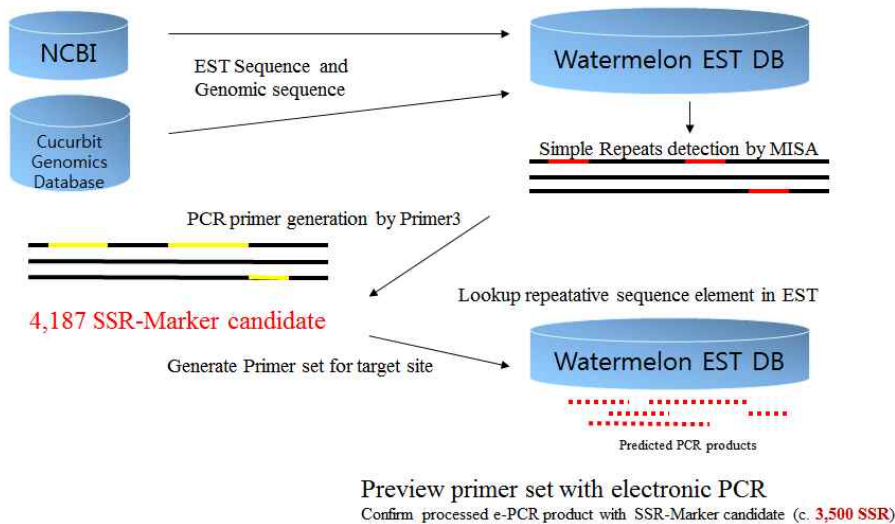


그림 1-1-1. 신규 수박용 EST-SSR primer의 도출과 e-PCR 설계

○ SSR Marker based annotation and function prediction

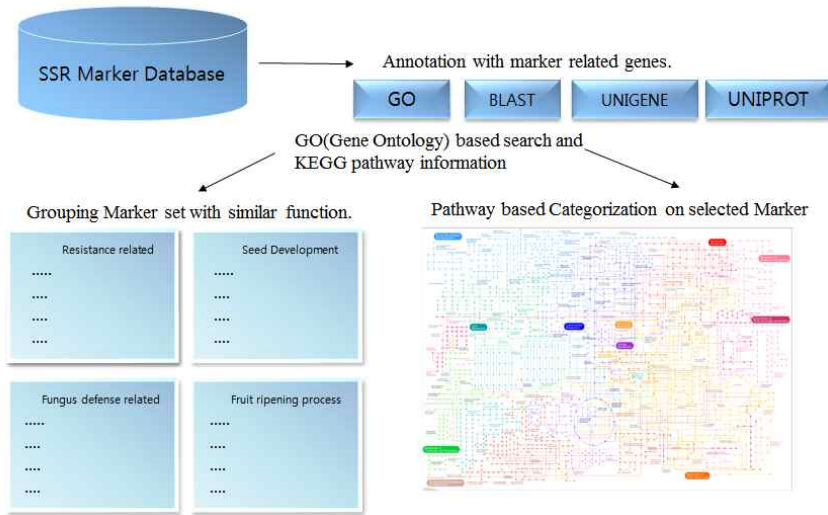


그림 1-1-2. 수박 SSR marker 도출 및 GO based search 설계 개념도

```

gi|198406938|gb|GD180232.1|GD180232_EST06441_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
75G10_mRNA_sequence 1 c* (A)10(AG)6* 21 6 26

gi|198406990|gb|GD180242.1|GD180242_EST06451_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
75H08_mRNA_sequence 1 p1 (A)10 10 81 90

gi|198406998|gb|GD180250.1|GD180250_EST06459_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
76A04_mRNA_sequence 1 p1 (A)10 10 420 429

gi|198407003|gb|GD175593.1|GD175593_EST01802_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
20G08_mRNA_sequence 1 c (T)11cttttttcatttcagaagttagaatttagtttctcttcttagggtaaatgtagattttcccta(T)10 98 378 475

gi|198407046|gb|GD175636.1|GD175636_EST01845_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
21C06_mRNA_sequence 2 c (T)13ctcaaatccaataccaataaaagcttttcttttctttgg(A)12 68 195 262

gi|198407048|gb|GD175638.1|GD175638_EST01847_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
21C08_mRNA_sequence 1 p2 (TA)12 24 471 494

gi|198407056|gb|GD175646.1|GD175646_EST01855_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
21D04_mRNA_sequence 1 c (A)12gataaagaagatttcctttttcttttctatgttttccactctagattactatttcttagcaa(T)11 96 172 267

gi|198407068|gb|GD175658.1|GD175658_EST01867_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
21E06_mRNA_sequence 1 c* (A)23(AG)6* 34 8 41

gi|198407089|gb|GD175679.1|GD175679_EST01888_Watermelon_fruit_normalization_and_subtraction_library_Citrullus_lanatus_cDNA_clone_WMN
21G07_mRNA_sequence 1 c* (A)21gaaaagataaagag(A)12(AAAAG)5* 70 10 79
    
```

그림 1-1-3. MISA 프로그램을 이용한 수박의 GenBank EST-SSR의 탐색

	start	length	Tm	GC%	any	3'	Sequence
	bp	bp					
LEFT PRIMER	34	21	59.56	42.86	7.00	0.00	GCCAAITTTGACAGATCC AAG
RIGHT PRIMER	201	23	57.50	34.78	6.00	0.00	TCAAACGAATCTACACTCACAA
LEFT PRIMER	3	20	59.57	50.00	3.00	0.00	ATGGCAGAGAAAGAGCAAGG
RIGHT PRIMER	177	20	60.58	50.00	6.00	2.00	TCTCATCGAGACATAGSCA
LEFT PRIMER	8	19	60.05	47.37	4.00	2.00	CAATCCCGGACGATTAAT
RIGHT PRIMER	206	20	59.07	45.00	3.00	2.00	TTCTGCCACTCTGCTTGG
LEFT PRIMER	70	20	60.17	45.00	4.00	2.00	TTCCATCCATCCAACCTGGT
RIGHT PRIMER	262	20	60.00	55.00	2.00	0.00	AAGGTGGTTGGAGGTGAGTG
LEFT PRIMER	92	19	60.71	42.11	5.00	0.00	TTTCTCTTGGCGGATTT
RIGHT PRIMER	290	20	61.35	50.00	4.00	2.00	ATTTTCATGCAACTCCCGAGG
LEFT PRIMER	12	22	60.05	36.36	4.00	0.00	TCCAATTTCTCTCCCTCAAAA
RIGHT PRIMER	140	20	59.80	55.00	2.00	0.00	GGGAATGGAGCAGAGTGAAG
LEFT PRIMER	8	20	58.26	55.00	3.00	3.00	CGGTGGTTAGTCTCATAC
RIGHT PRIMER	207	23	58.00	30.43	4.00	0.00	TGATTTGAGCGAAAAGTAAAGAA
LEFT PRIMER	33	21	59.87	42.86	4.00	0.00	TGGCTTCTTAAACCCTCAACA
RIGHT PRIMER	196	20	60.54	50.00	4.00	2.00	CTTCTCGGGGCTTCATCT
LEFT PRIMER	3	20	59.57	50.00	3.00	0.00	ATGGCAGAAAGAGAGCAAGG
RIGHT PRIMER	186	20	59.76	50.00	4.00	2.00	ACTTGTGTTTCATGGCTGTGC
LEFT PRIMER	20	20	59.57	50.00	8.00	0.00	AAGCCATGGCAGAAAGAGAG
RIGHT PRIMER	144	20	59.91	50.00	3.00	0.00	AAGGTGCTGTGGGTGCTTCT
LEFT PRIMER	83	22	60.11	45.45	6.00	0.00	CGGATCCAACTCACTCTTCT
RIGHT PRIMER	268	22	58.39	31.82	8.00	0.00	CAAAAAGCTTTGTTTGTGTT
LEFT PRIMER	1	20	59.65	45.00	6.00	2.00	CCAATGATCTTGACGACGAA
RIGHT PRIMER	101	20	60.01	50.00	3.00	1.00	AARCCCTCTTCTGTGCAG
LEFT PRIMER	18	20	59.57	50.00	8.00	0.00	AAGCCATGGCAGAAAGAGAG
RIGHT PRIMER	142	20	59.91	50.00	3.00	0.00	AAGGTGCTGTGGGTGCTTCT
LEFT PRIMER	18	20	59.57	50.00	8.00	0.00	AAGCCATGGCAGAAAGAGAG
RIGHT PRIMER	142	20	59.91	50.00	3.00	0.00	AAGGTGCTGTGGGTGCTTCT
LEFT PRIMER	45	20	59.91	35.00	6.00	1.00	TGGCCATCAAAATTCACA
RIGHT PRIMER	231	20	60.12	55.00	4.00	1.00	GTTGGCTCATGACTGAGG...

그림 1-1-4. MISA로 생산된 SSR마커 후보 및 Primer3를 적용한 최적 primer set의 도출

다. 수박에 적용 가능한 SSR의 e-PCR 확인용 자체 web-DB 제작

본 연구에서는, 수박에서 SSR을 타겟으로 하는 PCR 및 primer 선별과정에서 ICuGI에서 나온 SSR primer sets 정보 만으로는 실제 목표로 하는 유전자 부위를 찾기에는 매우 많은 시간과 노력이 소요되며, PCR을 수행할 경우 예측되는 PCR 밴드의 개수를 파악하기 어려운 점을 해결하고자, 컴퓨터에서 파라미터 값을 적절히 조절하여, 컴퓨터가 e-PCR을 수행할 수 있도록 하였으며, 컴퓨터가 수행하는 e-PCR 결과물을 이용하여 기존에 게놈서열이 밝혀진 토마토, 오이, 수박 등에 BLAST를 수행하고 결과를 출력할 수 있는 web-browser를 아래 그림 과 같이 제작하였다.



그림 1-1-5. 수박의 SSR 분석을 위하여 SSR e-PCR 및 결과물의 BLAST를 수행할 수 있는 web-DB의 제작

name	forward primer	tm	reverse primer	tm	epcr result	blast result
WMU0003	AAAGCCATGGCAGAAGAAGA	59.955	CTTGTGTTCATGGCTGTGCT	59.905	5	✓
WMU0007	TTTTGCTGGTGCACTTTGC	59.888	TTGGTCCATTTTATACTCACA	58.48	1	✓
WMU0025	TTTCCCTTCAAAAATGGCAG	60.046	AGTTGCCGTAATCTGGGTTG	59.993	1	✓
WMU0029	TACCGGTGATTCATTAGGC	59.784	TTAATTTCTCCCGTGGGTTG	59.795	1	✓
WMU0040	AGACGACCTTGTGGTGGAAC	60.009	TTCAAGTCCGCCAGGTAAC	60.11	1	✓
WMU0056	TGTTTGAACGTTTGCTCAG	59.881	AAAACACAAAATATAGGGACTAAAACG	59.311	1	✓
WMU0057	AGTGCTTTGCCAGATGCTTT	60.022	CATCAAATACTTCGCCAAATACA	59.057	1	✓
WMU0058	TGTCGGAATCAAATGGGTT	60.17	CCCACCAITCTTCTCTCGAA	60.187	2	✓
WMU0071	GTTGCCGTAATGCTCATCT	60.285	TGCAAAGGAAGCATCATCA	60.343	1	✓
WMU0097	TAAAATGTGGGACGTGCTG	59.585	TTGAAATGCCAAACGCT	60.197	1	✓
WMU0102	AAGCAGCAGCAGTAACAGCA	59.958	TCCACCAAGTTAGGCAAACC	59.971	4	✓
WMU0113	CCTTTTCTGTTTCCCATCA	59.903	CCCTTCTTCTCCCATCTC	60.008	1	✓
WMU0129	TGCTTCCATTTTGGAGACC	60.051	CAAGCACCTAGCTCTGACTCAA	59.819	1	✓
WMU0134	CCTGGAATTCATTTGCCAT	59.762	TGATACCCCACTCCACAAT	60.05	1	✓
WMU0149	GCATCTGTTTGGTATCCCT	59.934	CAGCCTCCATTACAAGACGA	58.874	2	✓
WMU0155	GCTTCCGTGCTACTTCTGG	60.015	GCACGCCACAATTACTTCTCT	60.14	2	✓
WMU0155	TCGCTTCTTAAACCCTCAACA	59.869	CCACGACGAAGAAGGAAG	59.982	2	✓

그림 1-1-6. 수박에서의 SSR primer정보, e-PCR 결과물, 목표부위의 BLAST결과 출력

Watermelon SSR analysis
Watermelon SSR markers epcr

- [CTTTGGGCTTTTGCTCTTTGTTGGGCTACATGGTAGTTGATACTCAAGAAATAATTGAGAGGGCACATCTTTGGTGATATGGACTAT](#)
- blast result with seq : have blast result [remove result](#)
- [CTTTGGGCTTTTGCTCTTTGTTGGGCTTCATGGTAGTTGATACTCAAGAAATAATTGAGAGGGCACATCTTTGGTGATATGGACTAT](#)
- blast result with seq : have blast result [remove result](#)
- [CTTTGGGCTTTTGCTCTTTGTTGGGCTACATGGTAGTTGATACTCAAGAAATAATTGAGAGGGCACATCTTTGGTGATATGGACTAT](#)
- blast result with seq : have blast result [remove result](#)

Plant Genetics & Breeding Lab.
456-756 경기도 안성시 대덕면 내리 72-1 중앙대학교 산업과학대학 식물시스템과학 전공

그림 1-1-7. 수박 SSR e-PCR의 증폭산물의 예상 염기서열

Watermelon SSR analysis
Watermelon SSR markers epcr

- forward primer:
- reverse primer:
- target db:
 - cucurbit
 - tomato v2.3
 - tomato v2.4
- Gap:
- Mismatch:
- Max size:
-

Plant Genetics & Breeding Lab.
456-756 경기도 안성시 대덕면 내리 72-1 중앙대학교 산업과학대학 식물시스템과학 전공

그림 1-1-8. 수박의 SSR 외에 임의의 primer 서열 입력을 통한 genome blasting 입력화면

Distance tree of resultsNew

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
embL1312773.1 Cucumis sativus mRNA for MAD51 protein (ml gene)	147	3e-32
reflNM_638433.1 Dicotyledonidae dicoudeum AX4 hypothetical pr...	69.8	7e-09
embL113758.5 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp434L1020 (from C...	69.8	7e-09
embL640845.1 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp686E04229 (from ...	68.0	2e-08
reflNM_024400.1 Homo sapiens vang-like 2 (van gogh, Drosophi...	66.2	8e-08
reflNM_020335.2 Homo sapiens vang-like 2 (van gogh, Drosophi...	66.2	8e-08
embL0570971.4 Zebrafish DNA sequence from clone CH211-126G1...	66.2	8e-08
gblAC190038.6 Rhesus Macaque BAC CH250-61F15 () complete seq...	66.2	8e-08
gblAL445230.1 Human DNA sequence from clone RP11-517F10 on...	66.2	8e-08
gblI4803304.1 Homo sapiens mRNA for KIAA1215 protein, parti...	66.2	8e-08
reflNM_633250.2 Dicotyledonidae dicoudeum AX4 SNF2-related do...	64.4	3e-07
embL481657.1 Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence...	64.4	3e-07
reflNM_633860.1 Dicotyledonidae dicoudeum AX4 hypothetical pr...	64.4	3e-07
gblAC117491.8 Homo sapiens 3 BAC RP11-64204 (Roswell Park C...	64.4	3e-07
reflNM_674239.1 Plasmodium berghoi strain ANKA hypothetical...	64.4	3e-07
gblI4804794.1 Macaca fascicularis brain cDNA, clone:OnpA-11683	64.4	3e-07
gblH9392512.1 Carposina sasakii heat shock protein 90 (hsp90)...	62.6	1e-06
embLFF95626.1 Pig DNA sequence from clone CH242-179F15 on...	62.6	1e-06
reflNG_006928.2 Homo sapiens endogenous retroviral sequence...	62.6	1e-06
gblAE014188.3 Plasmodium falciparum 307 chromosome 12, compl...	62.6	1e-06
gblAC189298.1 Macaca mulatta chromosome UNK clone CH250-45H1...	62.6	1e-06
reflNM_631590.1 Dicotyledonidae dicoudeum AX4 hypothetical pr...	62.6	1e-06
reflNM_023173.2 Mus musculus dual specificity phosphatase 12...	62.6	1e-06
embL645944.1 Human DNA sequence from clone RP11-179G8 on...	62.6	1e-06
gblAC073210.8 Homo sapiens BAC clone RP11-460N20 from 7, com...	62.6	1e-06
gblBC094605.1 Mus musculus cDNA clone IMAGE-6822368	62.6	1e-06
gblAC130896.1 Homo sapiens clone FLOC975 PR02870 mRNA...	62.6	1e-06
embLAL929084.1 Mouse DNA sequence from clone RP23-66M24 on...	62.6	1e-06
embLBC005445.1 Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-72A4...	62.6	1e-06
embLAL928591.7 Zebrafish DNA sequence from clone CH211-51H20...	62.6	1e-06
embLAL845944.1 Plasmodium falciparum 307 chromosome 5	60.8	4e-06
gblAC210125.6 Macaca mulatta BAC CH250-206B6 (Children's Hos...	60.8	4e-06
gblAC100786.2 Homo sapiens chromosome 17, clone CTD-2514K5...	60.8	4e-06
gblAC103809.2 Homo sapiens chromosome 17, clone RP11-647F2...	60.8	4e-06
embL113701.9 Human DNA sequence from clone RP4-662A9 on ch...	60.8	4e-06
reflNM_212554.2 Homo sapiens methyltransferase like 10 (METT...	60.8	4e-06
gblBC06261.1 Homo sapiens tectonic family member 1, mRNA (c...	60.8	4e-06
gblBC040113.1 Homo sapiens tectonic family member 1, mRNA (c...	60.8	4e-06
embLAL832252.1 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp667O2019 (from C...	59.0	1e-05
embLAL808118.1 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp564F1123 (from C...	59.0	1e-05
gblAE014187.2 Plasmodium falciparum 307 chromosome 14, compl...	59.0	1e-05
gblAY180206.1 Odontophorus leucoleaeus microsatellite OLAAT3...	59.0	1e-05
embLBC323075.13 Zebrafish DNA sequence from clone CH211-230C...	59.0	1e-05
embLAL833218.1 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp667E137 (from C...	59.0	1e-05
embLAL69928.8 Mouse DNA sequence from clone RP23-76F22 on C...	59.0	1e-05
raflNR_120342.1 PREDICTED: Apis mellifera hypothetical LOC10...	57.2	4e-05
embLBC094259.1 Pig DNA sequence from clone CH242-273G11 on...	57.2	4e-05
embLBC572192.1 Schistosoma mansoni genome sequence supercont...	57.2	4e-05
gblEF677181.1 Picea sitchensis clone WS02763_D10 unknown mRNA	57.2	4e-05
embLMA451103.2 Vitis vinifera contig VV78X071145.5, whole ge...	55.4	2e-04

그림 1-1-9. 수박 SSR에 대한 e-PCR 결과물의 GenBank BLAST결과 출력

라. 수박 EST-SSR의 계놈 match rate과 transferable marker

- 다음의 표는 수박의 EST-SSR 서열들이 (아래 표의 왼쪽 열), 수박의 coding region들 (watermelon cds) 및 계놈 서열(watermelon genome)에 어느 정도의 비율로 match되는 지를 확

인해 본 결과이다. ICuGI에서 제공되는 수박, 오이, 멜론, 호박의 EST-SSR primer로 수박과 오이에 PCR을 할 경우, 자신의 게놈에 대하여 대략 50-60%의 성공률이 예상되나, 같은 박과 식물이라도 타 종에 대하여는 매우 낮은 0.7-5.2% 정도의 성공률이 예측된다. 이것은 같은 박과 작물이라 하여도 한 종에서 개발된 SSR이 다른 종에 적용될 수 있는 transferable marker의 개발이 매우 제한적일 것이라는 점을 시사한다. 또한 PCR product size를 400-500bps까지로 제한할 경우에도 비슷한 수준의 e-PCR결과가 나타났다. 반면에, 멜론과 오이 사이에서는 약 33%의 성공률이 예상되어 동일한 *Cucumis* 속에서의 상대적으로 높은 염기서열 상동성을 나타내주고 있다.

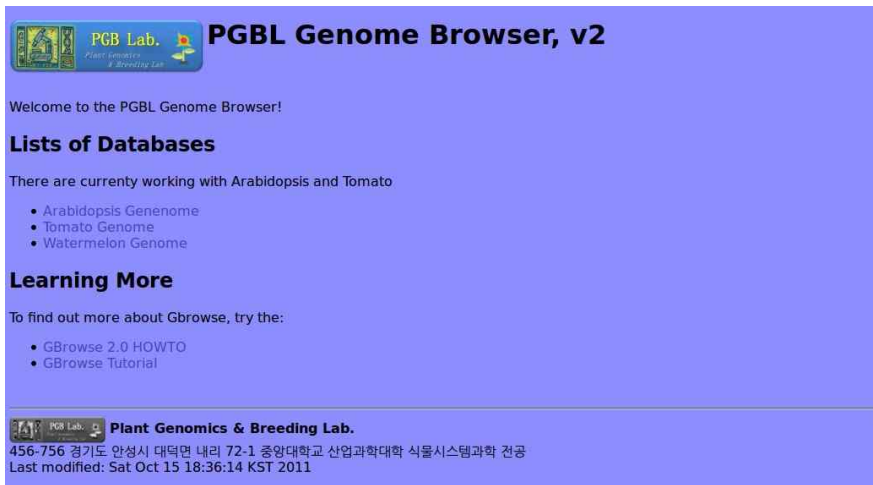
한편, 실제 marker로서의 개발을 위해서는 다형성을 갖는 공우성적 phenogram을 보여주어야 하므로 매우 낮은 확률로 나타날 것이며 본 과제에서의 PCR 실험결과, 약 8% 정도의 확률로 수박 EST-SSR 적용가능성을 나타내어 gSSR 또는 SNP marker의 개발이 필요함을 시사하였다.

표 1-1-1. 수박, 오이, 멜론, 호박의 SSR marker들의 수박과 오이의 유전자 및 게놈에 대한 e-PCR 성공률

	watermelon cds	watermelon genome	cucumber cds	cucumber genome
watermelon	total : 10241hitting : 984 hitting rate : 9.60843667611	total : 10241hitting : 5209 hitting rate : : 50.8641734206	total : 10241hitting : 170 hitting rate : 1.6599941412	total : 10241hitting : 466 hitting rate : 4.55033688116
cucumber	total : 13171hitting : 303 hitting rate : 2.30050869334	total : 13171hitting : 696 hitting rate : 5.28433680055	total : 13171hitting : 2021 hitting rate : 15.3443170602	total : 13171hitting : 7962 hitting rate : : 60.4509908132
melon	total : 22368hitting : 822 hitting rate : 3.67489270386	total : 22368hitting : 1847 hitting rate : : 8.25733190272	total : 22368hitting : 2655 hitting rate : 11.8696351931	total : 22368hitting : 7433 hitting rate : : 33.2305078684
cucurbita_pepo	total : 18965hitting : 279 hitting rate : 1.47113103085	total : 18965hitting : 407 hitting rate : 2.14605852887	total : 18965hitting : 140 hitting rate : 0.738201950962	total : 18965hitting : 224 hitting rate : 1.18112312154

마. BGI 수박 게놈 서열 활용을 위한 G-browser 적용

- 2012년 1월 발표된 수박게놈서열을 ICuGI를 통하여 분양받았고, 이 서열을 다시 genome browser에 입혀 map viewer를 통하여 가시적으로 염기서열을 볼 수 있도록 제작하였다 (<http://165.194.133.131>).



File - Help - Log in / create account

Watermelon: 4.897 kbp from Chr1:31,168,212..31,173,109

VISTA TIP - if you turn on the Vista track and everything below this band disappears, click "configure" next to "Report & Analysis - Annotate Vista Plot", then click "configure" on the new page to display the tracks.

Browser Select Tracks Community Tracks Custom Tracks Preferences

Search
 Landmark or Region: Search

Examples: [Cla000002](#), [Cla000003](#)

Data Source: Flip

Overview

Region

Details

Select Tracks Clear highlighting

For questions, send mail to cypipi@pgbl.kr

그림 1-1-10. 수박 유전체 염기서열 활용을 위한 genome browser

2. 유전자지도 작성을 위한 집단육성 및 마커 탐색

가. EST-SSR을 활용하기 위한 마커 선별

- 유전자 연관지도는 P189225(P1; *C. lanatus* var. *citroides*), Ts(P2; *C. lanatus* var. *lanatus*) 를 대상으로 RIL (recombinant inbred line) 집단을 전개하여 작성하고자 하였으며, 다음 그림 11에서와 같이 다양한 원예적 형질을 대상으로 하였다. 기존 연구에서는 재배종 내에서의 유전적 배경이 너무 좁아 다양한 연관마커의 개발이 매우 어렵다는 보고가 많았기 때문에 본 연구에서는 상대적으로 유전적 거리가 멀고 야생형으로 여겨지는 아종(subspecies)을 대상으로 유전자지도 집단을 양성하고자 하였다.

모부분의 특성 비교 (mapping population)

	TS4433	PI189225
종자크기	극소 (TS)	극대 (GS)
과육색	적색	백색
경도	보통	극경
과형	타원	원형
당도	12-13Brix	1-2Brix
종피	흑색	적색
과크기	6kg	2-3kg
초세	약	강
초형	보통	야생
내병성	-	만고, 탄저2, PMR2
과피형	호피	무지

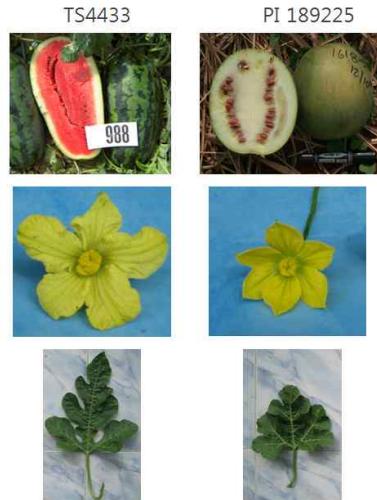


그림 1-2-1. 유전자 지도 작성을 위한 모부분 계통 육성 및 특성비교

- 수박의 유전자지도 작성을 위한 마커를 탐색하고자, 연구실에서 생물정보학적 방법을 기반으로 하여 도출된 다양한 EST-SSR과 ICuGI에서 분양받은 EST-SSR을 대상으로, 약 1000여 개의 primer set을 활용하여 P1, P2, F1 (PI189225 x Ts)에 대한 PCR을 수행하였다.

수박의 total DNA는 CTAB과 chloroform 추출법을 기본으로 변형하여 추출하였으며, A230/A260과 A260/A280 값 모두 약 2.0에 가까운 순도높은 DNA만을 분석에 사용하였다. EST-SSR 합성을 위한 DNA의 농도는 80~100ng을 template으로 이용하였으며, 이는 예비실험을 통하여 agarose gel에 로딩한 후 EtBr 염색법으로 쉽게 확인할 수 있도록 한 DNA 농도조건이었다.

SSR 마커의 합성을 위한 PCR 조건은 초기 95°C에서 5분간 denaturation을 실시한 후, 94°C 30초, 60°C에서 52°C의 범위까지 1°C씩 decreasing PCR, 72°C 1분을 수행하였으며, 다시 94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분을 35 사이클 실시하였다. PCR 반응물들은 3% agarose gel에 로딩한 후 결과를 확인하였다.

그 결과, mapping에 이용할 수 있는 135개의 EST-SSR marker를 확보하였다.

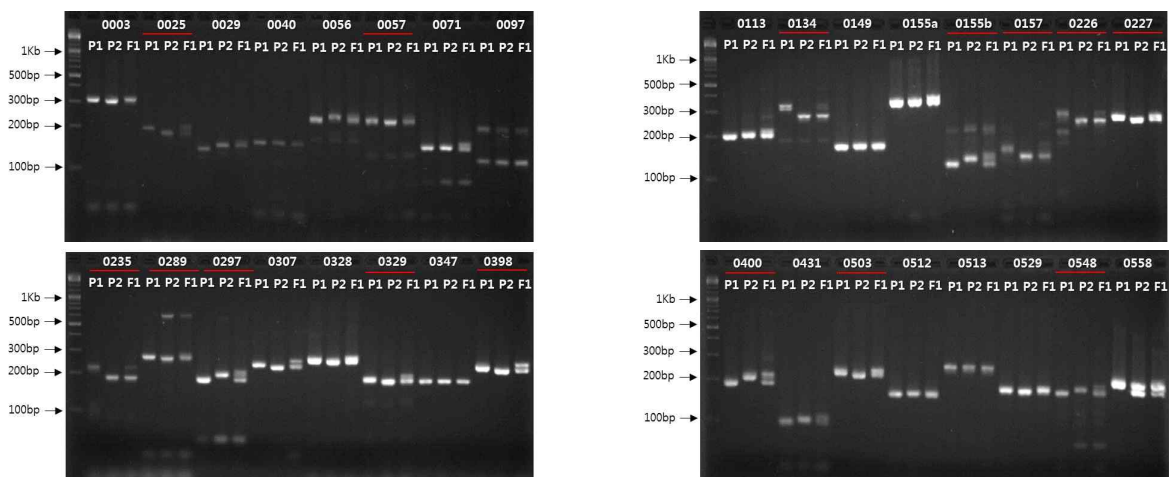


그림 1-2-2. 유전자 지도 작성을 위한 EST-SSRs의 선별 결과

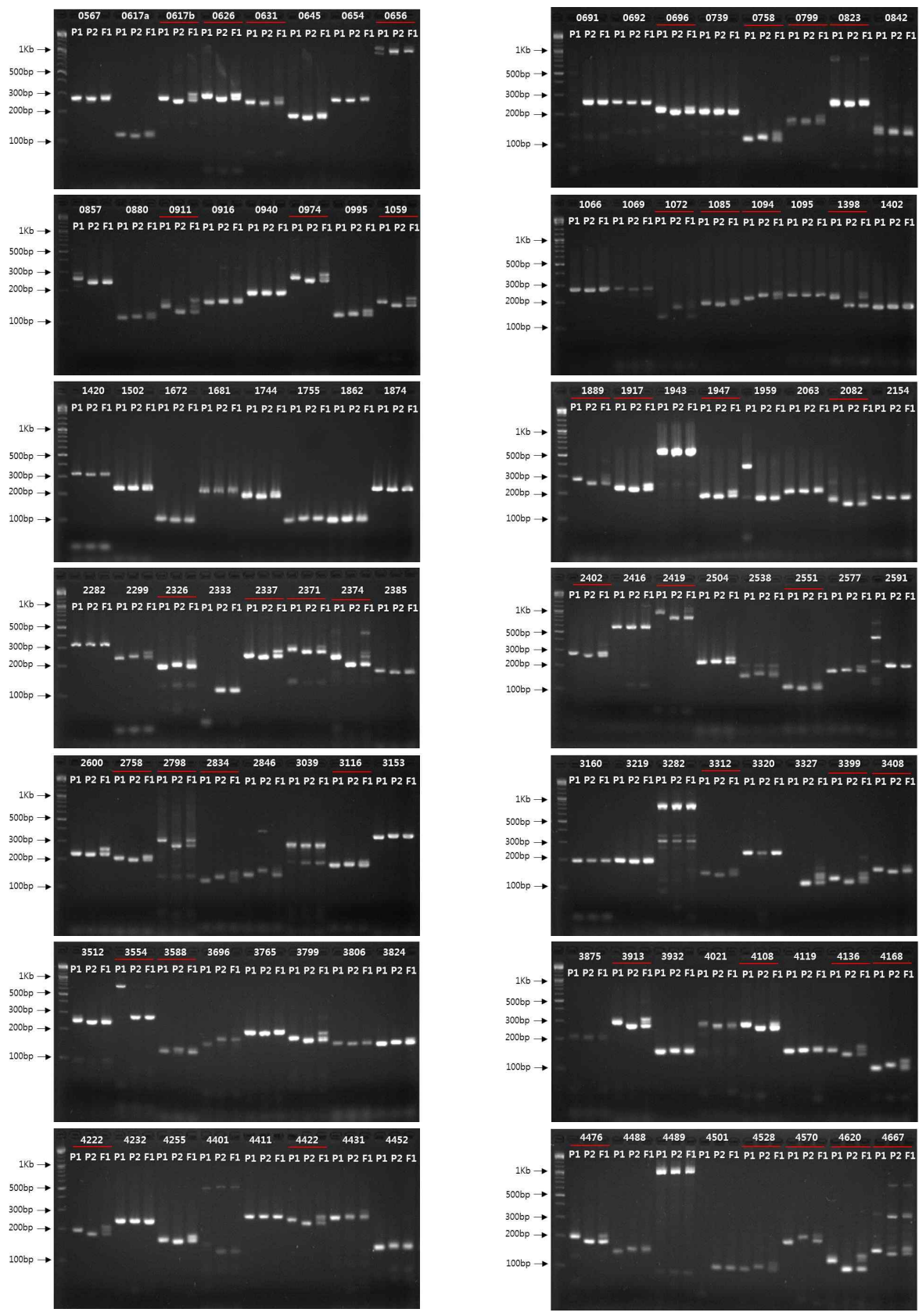


그림 1-2-2. (계속)

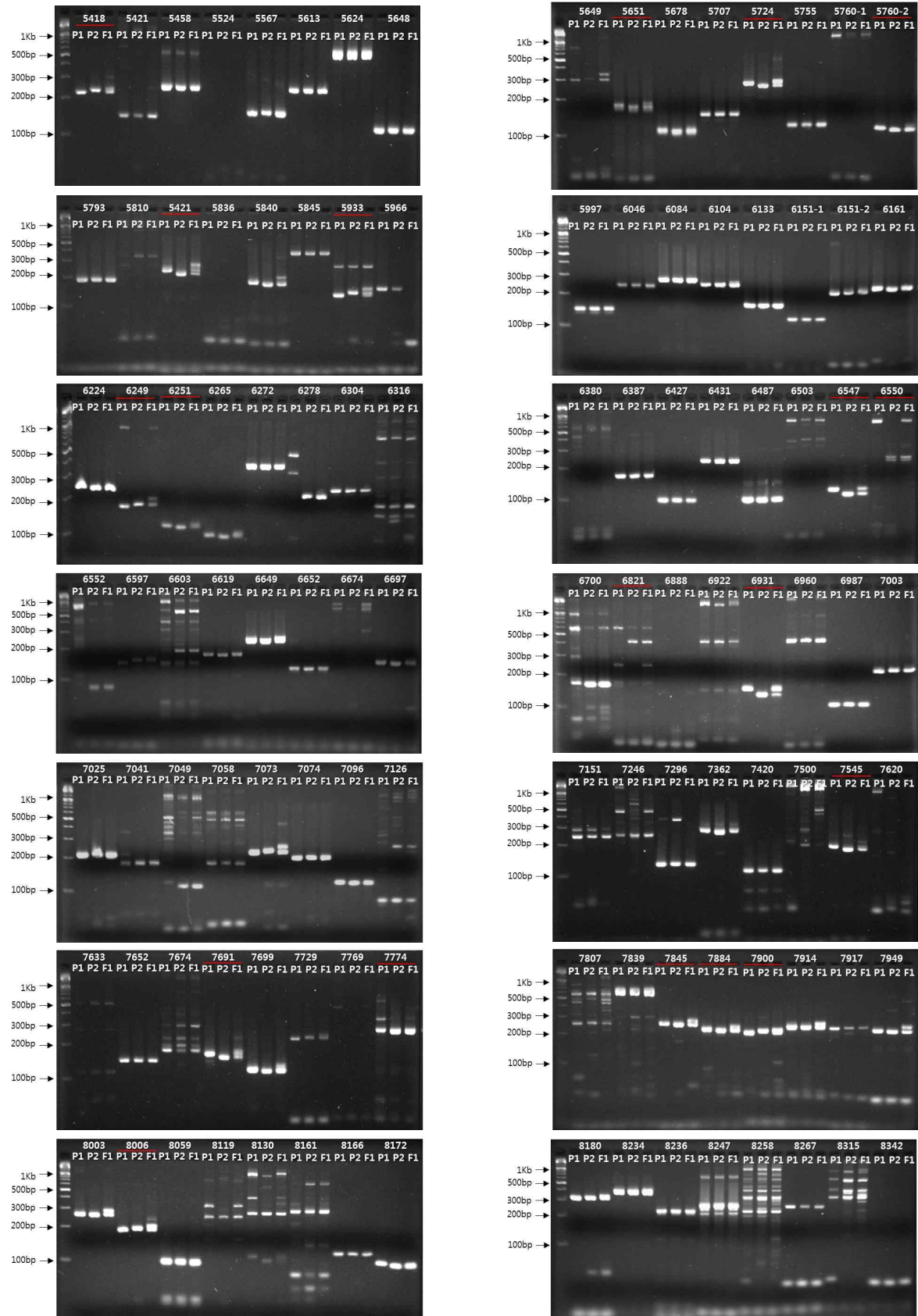


그림 1-2-2. (계속)

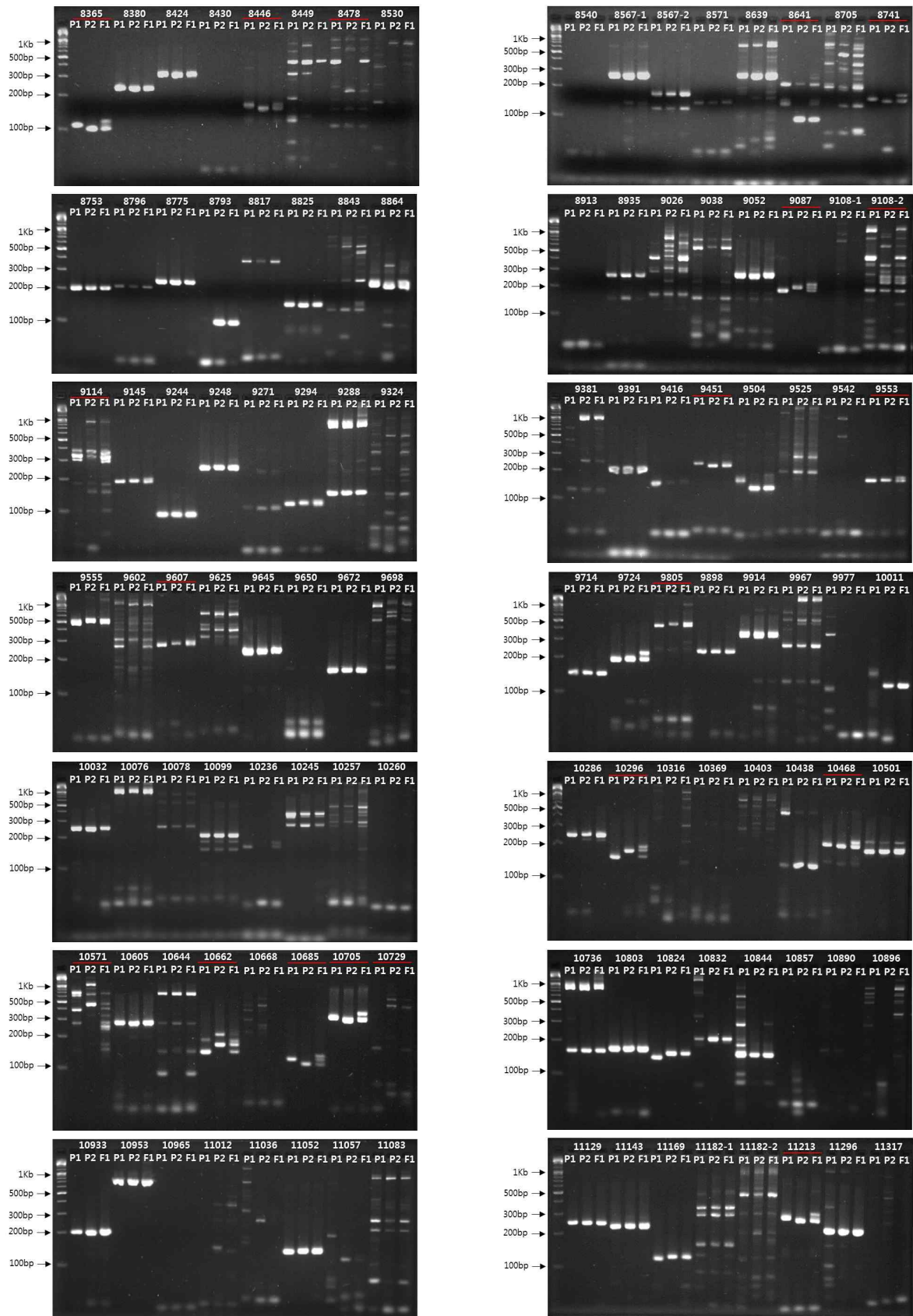


그림 1-2-2. (계속)

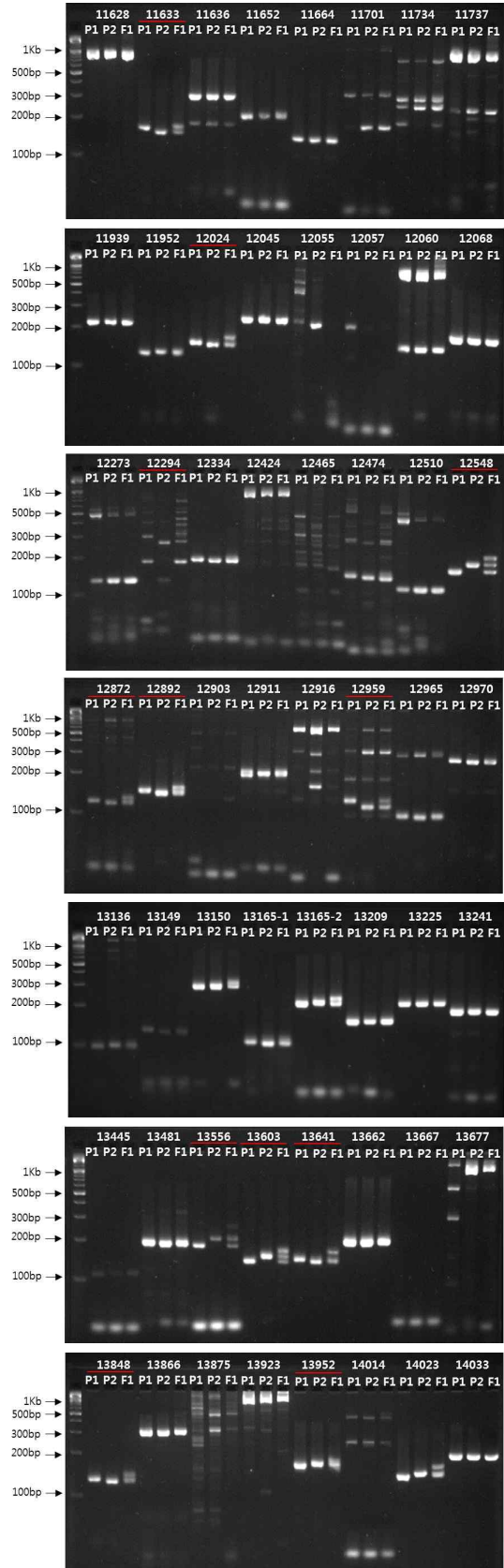
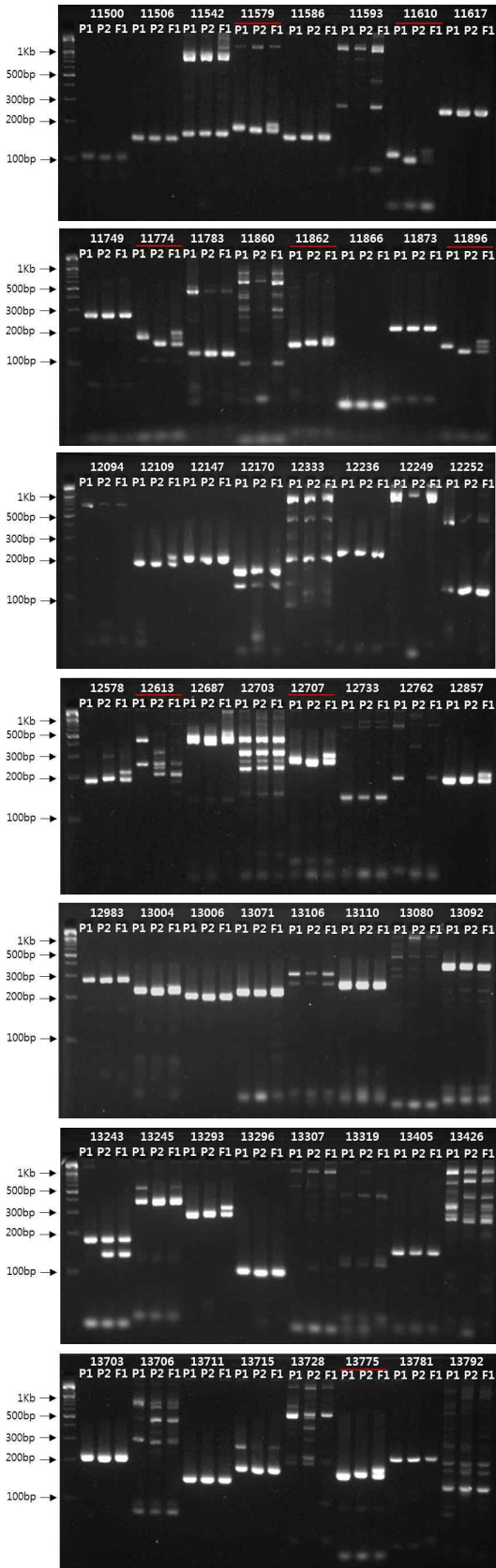


그림 1-2-2. (계속)

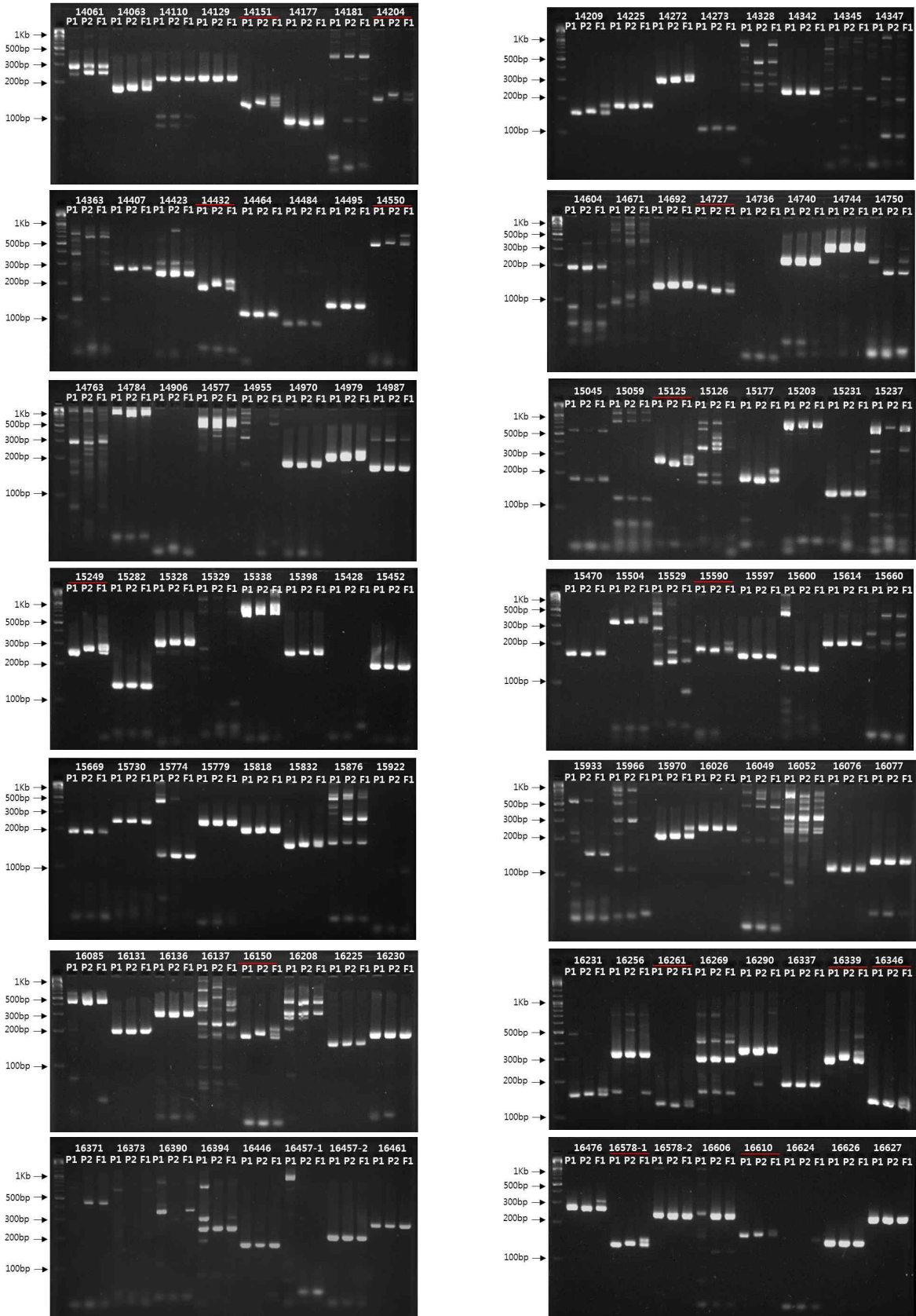
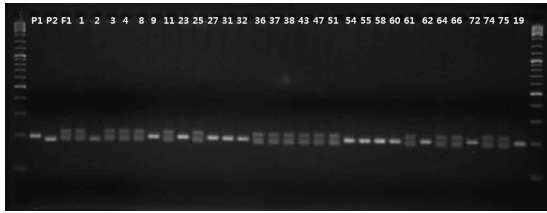


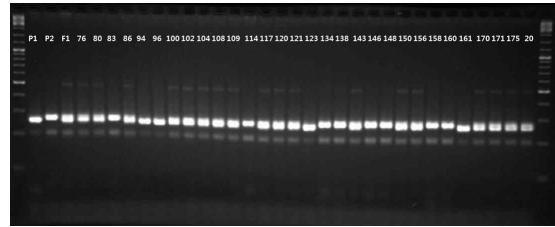
그림 1-2-2. (계속)

나. Mapping을 위한 F2 집단으로의 적용

선별한 EST-SSR primer sets이 실제로 모본과, 부분, F1, 그리고 F2의 mapping에 이용가능한가를 확인한 결과, F2에서도 유용하게 이용할 수 있었다.



WMU 0025 primer sets



WMU 0056 primer sets

F2 264개체를 분석하여 mapping의 기초자료로 이용하였다.

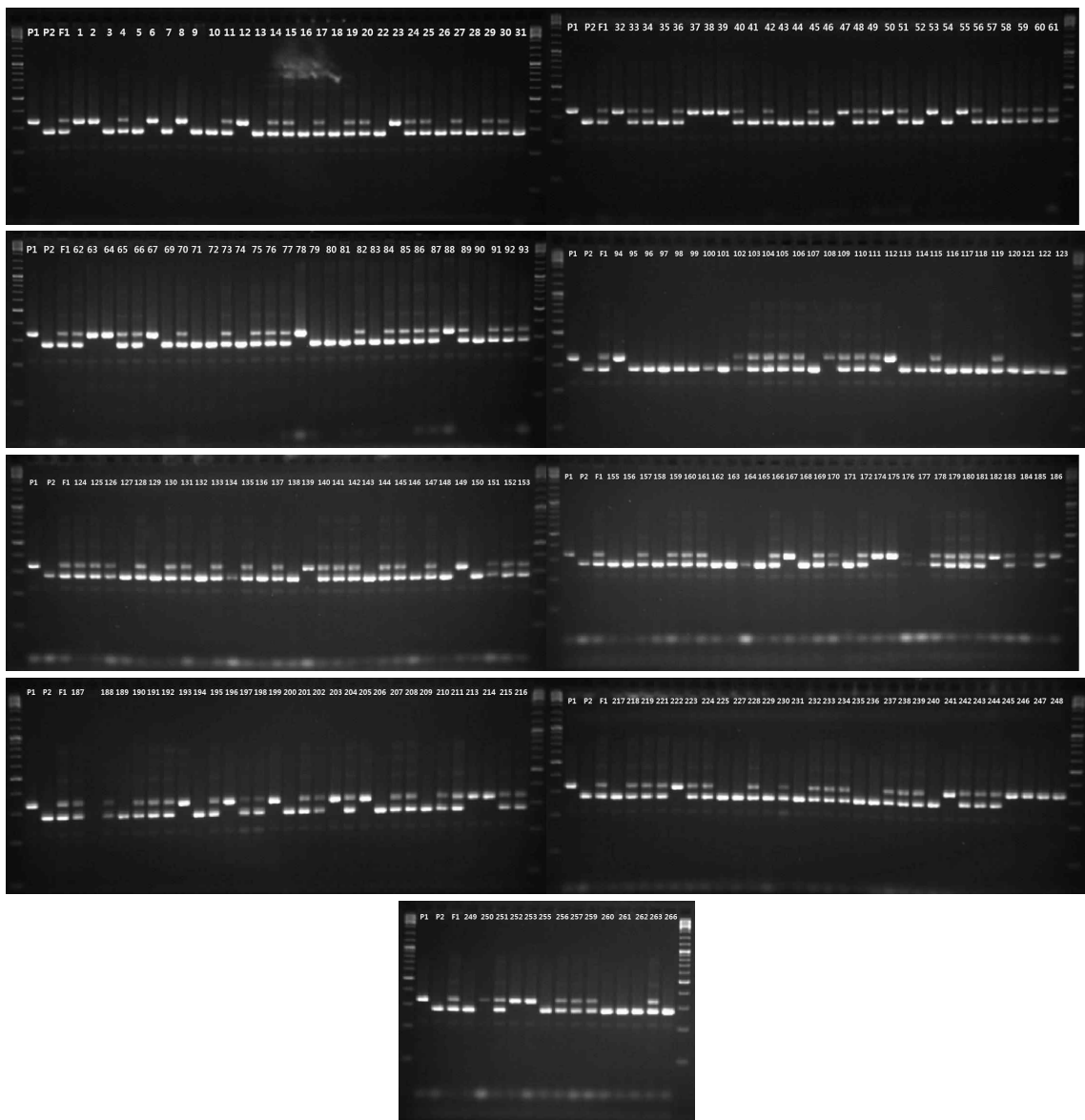


그림 1-2-3. WMU 0134 primer set으로 F2 분석한 사례

3. 유전자지도 작성을 위한 마커 탐색

가. EST-SSR을 활용한 F2 적용성 검정

○ EST-SSR용 primer set 작성방법 확립

- ICuGI에서 제공하는 EST-SSR list 외에, 본 과제에서는 1차년도에 작성한 신규 약 4,000여 개의 EST-SST을 생물정보학적 방법으로 도출하였고, primer3 program을 통한 primer 정보, Tm 값 제시, e-PCR결과 및 결과산물을 수박 표준염기서열(BGI 발표, 2012)에 blasting을 할 수 있는 pipeline을 설계하였다.

○ 실험방법 및 내용

- PI189225 x Ts 집단의 유전자지도 초안을 작성하기 위하여 F2 252개체에 1차년도에 선발한 EST-SSR primer 중 총 121개의 primer pairs를 사용하였다. 수박의 total DNA는 CTAB과 chloroform 추출법을 기본으로 변형하여 추출하였으며, A230/A260과 A260/A280 값 모두 약 2.0에 가까운 순도 높은 DNA만을 분석에 사용하였다.
- EST-SSR 합성을 위한 DNA의 농도는 80~100ng을 template으로 이용하였으며, SSR 마커의 합성을 위한 PCR 조건은 초기 95°C에서 5분간 denaturation을 실시한 후, 94°C 30초, 60°C에서 53°C의 범위까지 1°C씩 decreasing PCR, 72°C 1분을 수행하였으며, 다시 94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분을 35 사이클 실시하였다. PCR 반응물들은 3% agarose gel에 로딩한 후 결과를 확인하였다.

표 1-3-1. PI189225 x Ts 집단 F2분석에 사용된 EST-SSR primer pairs.

No.	Unigene ID	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')
1	WMU0025	TTTCCCTTCAAAAATGGCAG	AGTTGCCGTAATCTGGGTTG
2	WMU0056	TGTTTGGAACGTTTGCTCAG	AAAACACAAAATATAGGGACTAAAACG
3	WMU0057	AGTGCTTTGCCAGATGCTTT	CATCAAATACTTCGCCAAATACA
4	WMU0134	CCTGGAATTTCAATTTGCCAT	TGATACCCCACTCCCAACAAT
5	WMU0155	TCGCTTCTTAAACCCTCAACA	CCACGACGAAGAAGAGGAAG
6	WMU0157	ATGGAATGCTTTGGGACTTG	TCCACAGTTCATTGAAGACACA
7	WMU0226	TGACACAAAATACGTAATAATGCAA	TGGGGAATTGAGATCCTGAG
8	WMU0227	TAGCCTCAGCCTCAGGGAAT	CTTGGAGCGAGAAGGATGAG
9	WMU0235	TGGGTTTCATTGACCAACAA	CATCAGCTAGGGGATTTGGA
10	WMU0289	CTTTGGGCTTTTGCTCTTTG	CGGGTCAACACGAAATCATA
11	WMU0297	AAACCGACCTCAACCACTTG	CGAAACAAATAAGAAAATTGAAGAG
12	WMU0307	AAGCCTTTTCTCCTCCTGC	TCCAAAGCAAAGCAAAGC
13	WMU0329	GAACGATGACGATCAGAGCA	CCATATTCTGGAAGCCAACAA
14	WMU0398	TGAATTGCAGCACAGTCCTC	GGATGGGAGTAGAGCCCATT
15	WMU0400	GCGAAGCTTGAAGTTGATCC	AAGCTTATTGCAACCATCCG
16	WMU0503	AGACCCCGCCATTACAGACT	CACTCCTTCTCCACCAAAA
17	WMU0548	GTCAAGTGATTTGGGCATCC	TTGATGTACATGATCGCCAAT
18	WMU0617	TCAATGGTGGTGAGAGCTGA	AGAAAATGGAGGGGTTGAGG
19	WMU0626	AAAGGCCTTGCCACACATC	AGCAGCTCGAAAACAAGAGTG
20	WMU0696	ACAGAAAGCTTTGGGGGTTT	GGGCATGCCATTTATTCAAC
21	WMU0799	CTAGCATGGCGACGACTGTA	TTTTACAAGGAAACCCATCTTCA

표 1-3-1. (계속)

No.	Unigene ID	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')
22	WMU0911	CGCCCTTCAATTCGATTTA	CATGGAAACAAACAGACGGA
23	WMU0974	GCTTAACCCATCAGCCATGT	TAAGCCAAGACCCCTTGATG
24	WMU1059	AATTCTTCCATTTCCAGCCA	AGTTGCCGTAATCTGGGTTG
25	WMU1072	TCAAGGATGCTTTGATTCCC	TGAGCTTGAAGGCAGAAACA
26	WMU1085	TGAGTTCATCAAAGCTTGCC	TCCTCCAAACTCATCATTACC
27	WMU1094	CAGCTTCCAAACCACATTCA	TTCCTTCCAATTTATCATTCA
28	WMU1398	GGTGAGTTCCTTTGGCAAGA	AACCAAAATTTGTGCAAGGG
29	WMU1889	TTTGAAAGGTTGGTCGGTTC	TTTACTGCTGCTGGATGCTG
30	WMU2082	GCCACCACACACAATCACTC	AATGTCACGTGAGGAGGAGG
31	WMU2326	ATCCAAACCCGTGTGAGAAG	AACCAAACACACGTGAAGCA
32	WMU2333	CTCTCCATTTCCACTTTCCA	TGAGCTTGAGAGAGGTGTCG
33	WMU2337	ATTGCTCGTTTGTTCCTGG	TGAGTGGTAGTGGTGGTGGGA
34	WMU2371	TCGCACTCTTATGTGCAGG	AAGTCCCAAAGAACCCACC
35	WMU2402	TGGTTTTGGACAAGAGGAGG	TAAATGAAAGCCCCAAGTCG
36	WMU2551	GCTTTTTCAGGCAGGTGAAG	TTGAAACATTGGTTCTCTGTGC
37	WMU2591	AATTGCTCTTGCAAGAGGTG	CATGGCCTACTTTTCTTTCTTTT
38	WMU2758	CAACCCCTTCAAGTGAAGAA	TCGAATACCACAACCTGGGA
39	WMU2798	AGCTGCAACAGCAACATCAG	GCTGGCTTTGAAGCTGTGAC
40	WMU2846	ACACACACCGGAATACATGC	TGATTGTTCAATGGAGTAAATCACA
41	WMU3312	TTTGGTCAACCCACAACAGA	TCCCACTTAAGATCATGGGAA
42	WMU3408	CCCTCAGTGATGGTGATGAA	CTTCCCTTTCCCTTGCAATTT
43	WMU3554	TGTAGTAATATTATTGTCCAGATTTGC	GTGTTTGGCCTTTGGGTTTT
44	WMU3913	CATTTTGAAAGCTTAGGGACTTG	CGTTTCAGAACCGTCTGATG
45	WMU4108	GATGTTCTGCCTTTTGGA	CACCTTTGAATTTTAACCCCC
46	WMU4136	CGCAATCTCGTGTGACATCT	TTACAAACAAGGTCCCAGGC
47	WMU4168	AGTCGATGACCCTGTTACCG	GGTTCCTCGTCTTCATCGGA
48	WMU4222	TCCAAGTGGCTTGCTTTTT	TCTCAACCTCAAATTCCGAGA
49	WMU4422	TAAGGCTGCGGAAATGAAAC	TTTTTAACACGATAAGCAACCTCA
50	WMU4476	CGACCTTCCCCATTCTATT	CATGGAAGTCCACTGCATTTAA
51	WMU4570	TGGGTTCAAGTACTTTGGGG	TCTTCTCCATTGCCGTTAC
52	WMU4620	GAAGTGCATCCTTCTGAGC	CACAGCTTTATTGAACCGCA
53	WMU4667	CACAGAGATACAGTGCAGACCA	TGACATGCACTGACCACAAA
54	WMU5418	TTCCAGGGTAATTTGCGAAG	ATCATGAAGTCCATTCCCCA
55	WMU5651	CAGCGTTTTGATATGAGCGA	CAGATGTTTCCACGCACACT
56	WMU5724	CGGTGACAGATCTCGAGTGA	TATCCAAGCTGAGAGCCCAT
57	WMU5760_2	ACACCTTGGTAGGGCATGAG	GGGGCTCTGTTCAAATCAA
58	WMU5821	CATGCTCATGGGATGAGAGA	CAGTTGAAAAGAAATCAAATGCC
59	WMU5840	CGTACGGATGTGCACTGAGA	ACGAATTAGGGCACACGTTT
60	WMU5933	CAATAAACTCCCATGGCTGC	GGGGTGAGGATGTAGGGATT
61	WMU6249	TTGAGGCTCAGTTTGGAGAA	GCACCTCTTTTTCAGGGGTTT
62	WMU6251	TTTGCCACGACATTTTGGTA	AAAGAACGAACCCAGCTTCA
63	WMU6547	GGGGGAAACTAAAATGGTGAA	CATTCCCTCAAATCGATGA
64	WMU6550	TCATGAGCATTGCGCTACAG	ACTTGCGGAAAGATGATTGG
65	WMU6821	CGTACCAGAGACCTTCTCGC	CGCAACAGATCAAGAGGAAAG

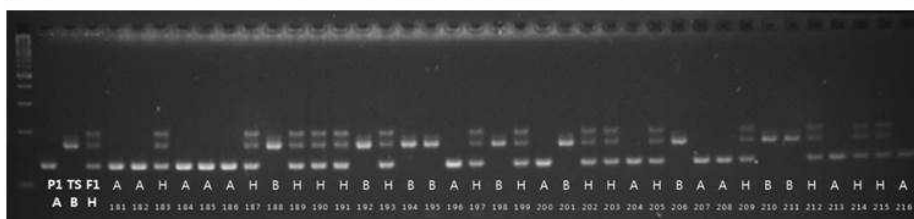
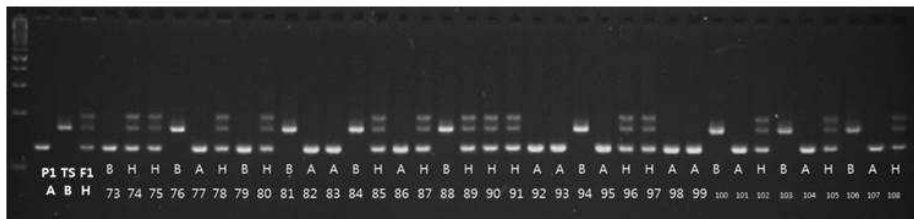
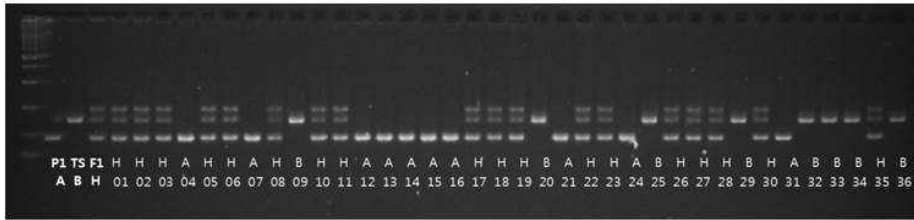
표 1-3-1. (계속)

No.	Unigene ID	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')
66	WMU6931	TGGGTGCTTGTGCATAGAAA	AAGGTCTCTCTGTCTCGTCTC
67	WMU7545	AACAGGAGCTCCAGGCATTA	TCGTTTTGTAACCTCTGCCTC
68	WMU7691	GCAAAATCACCTTTGGCAAT	GGAAATAAAGAAACGAAAAGAAGG
69	WMU7774	AACAGAGAGGAATGAGGCGA	GGCCATAGTAACGGTAGCCA
70	WMU7845	AACAGGGCGAAGAAATCTCA	GGGTTTCGAAAACACGGTTA
71	WMU7884	GACGAAGACCTCGAACAGGA	CCTCATTTCTCCCCATTACTTG
72	WMU8365	AACATGGGAGTTGCTGCTTT	AAACCACGTGAGGGTACACA
73	WMU8446	AGGAGAGTGTGCCAAGTCC	GAAGCCCCAAAATTGCATAA
74	WMU8641	AGGCTATGGGGATGAGTTCC	CAAATACTCTGGGCAGCAAA
75	WMU8741	ACAGCGTTTGAATCTGACCC	TCCACTCCCCAGAAACAAAC
76	WMU9087	GAAGAAGAGTGTCCGCCTTG	TTTTCGTTTCAATCGCACTG
77	WMU9114	ACGGAATCATCAGCCTCATC	CCGACGAGTGGTCTTATTA
78	WMU9451	AAAACCTCACGCACCAAAAC	CATGCACCTTGCTCTCAAAA
79	WMU9607	TCTCTTCTTTTGTCTTTTGTG	GCCAGGGATGTATCCAAAGA
80	WMU9805	AGTGGAGTGGTGTGGGTTTC	TCAAAATGCCATCCACTCAA
81	WMU10296	TGACGGACATATACTCAGAGCC	TCCCGACCATGGAAATGTAT
82	WMU10468	CACGCGAAGTGAGAGAGTTG	TCAAGTCCCTTGCTCTTTC
83	WMU10662	TCCCGACCATGGAAATGTAT	TCAGAGCCTAATTTCTTCTCTT
84	WMU10685	CGGATTTTTGGGAGATTTT	TTCCACCTTTCCTTTCTCT
85	WMU10705	CCCCACTCTCAATTCTCAA	GGTCGCTGTTCTTGTTCAT
86	WMU11213	CCAACTCTCCAGCTATGGGA	CCTTTGCTCTGGTTCTGCAT
87	WMU11579	CTAGCATGGCGACGACTGTA	GGGAAAACCCCATCTTCATT
88	WMU11610	ATCGCCATTTTGTCTCTGG	CCCGGATCTCTCAAACCTCTC
89	WMU11633	TTCTTCCATTTTCCAGCCAC	AGTTGCCGTAATCTGGGTTG
90	WMU11774	AGGCAACCATTCTCAGTGG	ACGACGAAATAACAGCGGAA
91	WMU11862	CTATTTCCACCGCCCTCTTC	AACGTGCTAGCAGATCGACA
92	WMU11896	TCGTGGTTGCTTACAAAACG	CAATATCACCACCGCAAATG
93	WMU12024	CACCGAGAAAGCCAAAGAAG	GGGTATCTGAAGAAAACGCA
94	WMU12548	TTCACACTCCCTATCCCGAC	CATTCATTACATGGACGGACA
95	WMU12613	GTCAAGTGATTTGGGCATCC	TCAACCCTCCAACCTTATTGATG
96	WMU12707	GATTGTGGGATGCAGGTTGT	AGCCCTTGAGCAGAACTTCA
97	WMU12872	CCTCCATCCTCCATCCTTTT	ACACAACCCAAAGCTTCACC
98	WMU12892	GCTGCTGCTAGGGCTTCTAA	GCCTCGCTTTCGTCAATC
99	WMU12959	TCAGGAGGCCAAGATTCTTA	AAAAGGAAAAGGGAAAGGGG
100	WMU13556	GCAAAATTCCTCTCTGTTTTCTC	GCAAAAAGAGAGGCCAAAAGA
101	WMU13603	AGAGCCATTCTTGCTGCTGT	TTTTCGTTTCAATCGCACTG
102	WMU13848	TCGGATTTGGATCCATTGTT	CCATTTGGCTTTGTGTAGCC
103	WMU14151	ATCCCTAAGCTTTGCCACAC	TAAGAGAGGCCGCACTGAAT
104	WMU14204	TTTTCCCCAAAATTTTCAACC	TTGGAAGAAATCGGCAAAAC
105	WMU14432	CGGACATGGTGGAGAAGACT	ACGACAACAAACCACTGCAC
106	WMU14727	TCACAAAGATTGAAACTGGAA	CATTGCTACGCGTATTTGA
107	WMU14750	CATGCGAACAGAAGGACTAGG	CAGAATAACGCCCCCAAGTA
108	WMU15125	AAAGCCCTACAAAACAGCGA	CTCTCCCTTCTCCCAATCC
109	WMU15249	AAAGCCATGGCAGAAGAAGA	AAATTCAACTTGGCACCAGC
110	WMU15590	CTAGCATGGCGACGACTGTA	TTTTACTAGGAAACCCATCTTCA

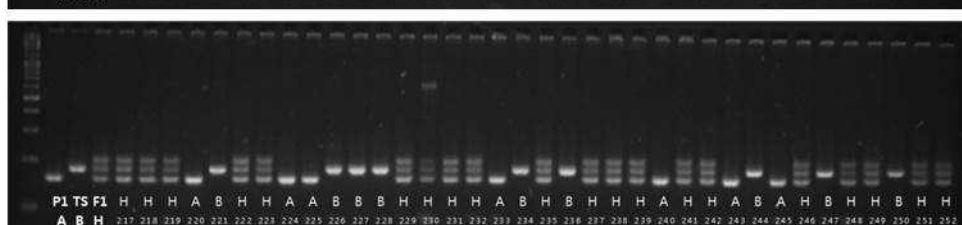
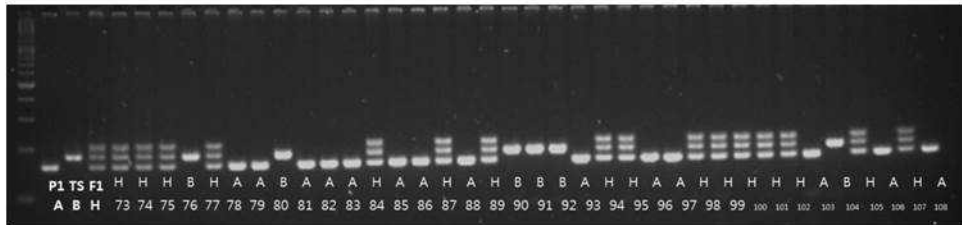
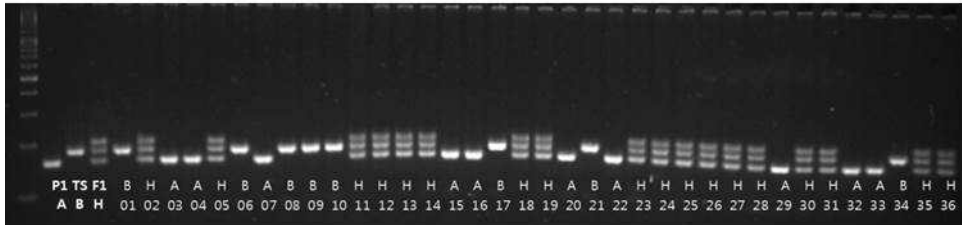
○ EST-SSR 마커의 F2세대 검정

- 유전자 지도용 PI189225(P1), TS(P2) 및 F1에서 공우성 표현형을 보였던 마커 set들을 선별하였다. 선별된 primer set들을 1차년도와 2차년도에 걸쳐 확보한 F2 집단 251개체들에 대해 유전자형 검정을 실시하였다.
- 약 800여개의 primer set을 활용하여 P1, P2, F1 (PI189225 x TS)에 대한 PCR을 수행하여 공우성 primer set을 다량 선별한 바 있으나, 대부분의 primer set들이 F2에서 정상적인 공우성을 보여주지 못하였으며, 이에 따라 최종적으로 121개의 공우성 primer set을 선별하였다.
- F2세대에서의 마커 선별 문제는 모본인 PI189225가 재배종과 근연관계가 매우 먼 상태로 정상적인 대합과 후대에서의 재조합이 이루어지지 않는 것으로 추측되며, 이는 세대분리가 이루어진 재배포장에서도 F2 과실의 결실율이 낮았던 점에서도 원년간 교잡의 문제가 있음을 반증하였다.
- 본 과제에서는 수박의 유전자원들 사이에서 매우 적은 유전적 다형성 때문에 종내의 교잡 후세대 보다는 아종간의 교잡으로 유전자지도를 작성하고자 하였으나, 재배포장에서 야생종인 PI189225와의 교잡에서 기대했던 잡종강세 현상이 기대보다 낮았으며, EST-SSR 마커의 적용은 한계가 있다는 결론을 내렸다.
- 한편, PI189225는 재배종에 대하여 유용한 병저항성 유전자를 갖고 있으며, 다양한 표현형 차이를 보여주기 때문에 집단양성은 필요한 부분이었다.
- 따라서, PI189225에 대한 분자마커 적용은 유전체 대량염기서열 분석을 통하여 보다 다양한 SNP, InDel을 찾아내고, 이를 통하여 F2세대에서 유전자지도 초안을 작성하는 것으로 결론지었다.

WMU1072 Forward : 5'-TCAAGGATGCTTTGATTCCC-3'
 Reverse : 5'-TGAGCTTGAAGGCAGAAACA-3'



WMU10296 Forward : 5'-TGACGGACATATACTCAGAGCC-3'
 Reverse : 5'-TCCCGACCATGGAAATGTAT-3'



WMU14204 Forward : 5'-TTTTCCCAAATTTTCAACC-3'
 Reverse : 5'-TTGGAAGAAATCGGCAAAAC-3'

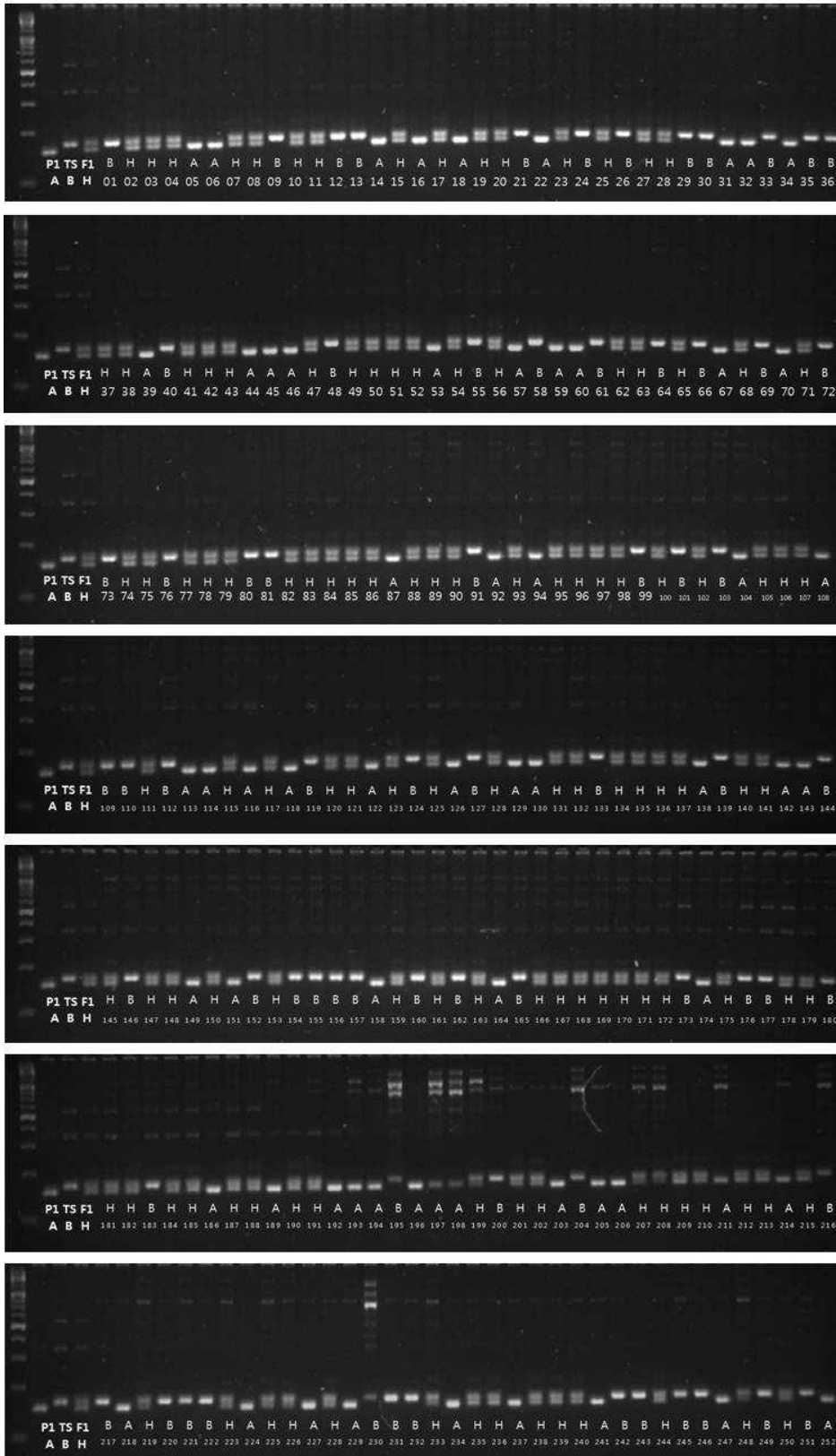


그림 1-3-1. F2세대에서의 EST-SSR 마커 선별

4. 유전자지도 작성을 위한 모본과 부분개체의 염기서열 재분석 및 SNP 정보 획득

가. 실험방법

○ 표준염기서열에 대한 기본 SNP의 확보

- PI189225(P1: *C. lanatus* var. *citroides*), TS(P2: *C. lanatus* var. *lanatus*)의 앞에서 genomic DNA 추출, 각 sample당 50ug의 dsDNA를 준비하였다.
- 테라젠사에 의뢰하여 Bioanalyzer를 이용 각 DNA의 QC를 진행하였고, Illumina Hiseq 2000 으로 mate DNA와 같이 30X depth로 paired-end sequencing을 수행하였다.
- 얻어진 서열은 trimming과 filtering과정을 통해 FASTQ 및 FASTA data를 도출하였으며, watermelon genome database www.iwgi.org 에서 제공하는 reference sequence(표준염기서열)와 비교하여 SNP를 calling (vcf) 하였다.
- 각 염색체별로 확보된 SNP를 분석에 활용하였다.

○ SOAPDenovo를 활용한 SNP 분석 비교

- 본 연구팀에서 직접 상기의 수박 게놈 재분석염기서열을 직접적으로 표준염기서열에 배치 (align) 분석한 결과, gap이 많이 존재하여 재분석염기서열 자체에서 SOAPDenovo로 assembly하여 contig와 scaffold를 확보하였다.
- scaffold 확보 절차는 다음과 같다.
 - (1) de novo assembly 프로그램으로는 여러가지가 있으며 그중 많이 알려지고 검증된 SOAPDenovo 프로그램을 사용함.
 - (2) 프로그램은 config 파일에 NGS 시퀀싱으로 부터 만들어진 fastq파일정보를 포함해서 필요한 정보를 입력하고, 모든 조건을 한번에 실행 할 수 있음.
 - (3) 추가적인 서열정보가 있거나 assembly를 조절할 필요가 있으면, 단계적으로 de novo assembly를 실행할 수 있음.
 - (4) 단계적으로 수행할 경우 contig명령을 통해서 contig를 생성하고, map명령으로 각 contig들을 정리한후에 scaff 명령으로 scaffold를 생성하게 됨

- Denovo assembly script 실행 명령어 :

```
SOAPdenovo-63mer all -s soapdenovo.config -K 63 -R -o ts_g 1>ass.log 2>ass.err
```

- Denovo assembly script 단계적으로 실행 :

```
pregraph_sparse_63mer.v1.0.3 -s soapdenovo.config -K 63 -z 450000000 -R -o 189225_g 1>pregraph.log 2>pregraph.err
```

```
SOAPdenovo-63mer contig -g 189225_g -R 1>contig.log 2>contig.err
```

```
SOAPdenovo-63mer map -s soapdenovo.config -g 189225_g 1>map.log 2>map.err
```

```
SOAPdenovo-63mer scaff -g 189225_g -F 1>scaff.log 2>scaff.err
```

- VCF 파일생성절차 (SNP 검색)

- (1) SNP calling을 통해서 VCF를 만들려면 우선 reference genome information이 필요함. 수박의 경우는 <http://www.iwgi.org>에서 ftp를 이용해 얻을 수 있음.
- (2) SNP 확인을 위해 필요한 sam 파일을 만드는 데는 bwa 툴을 이용하고, sam파일을 이용

해서 SNP를 확인하는데는 samtools를 이용함.

- (3) 먼저 bwa를 이용해서 fastq파일과 reference genome을 통해 .sai파일을 만들고 paired end 각각에 대해 만들어진 .sai파일은 합쳐서 bam파일을 만든다.
- (4) 만들어진 bam파일은 sam파일로 변환가능하며, 바로 SNP정보를 가지고 있는 VCF파일을 만들어서 기본적인 Marker candidate로 활용한다.

- SNP calling script

```
bwa aln -t 8 watermelon_v1.genome 189225_1.fq > 189225_1.sai
bwa aln -t 8 watermelon_v1.genome 189225_2.fq > 189225_2.sai
bwa sampe watermelon_v1.genome 189225_1.sai 189225_2.sai 189225_1.fq 189225_2.fq |
samtools view -bS -o 189225.bam -
samtools sort 189225.bam 189225_sorted
samtools index 189225_sorted.bam
samtools mpileup -uf watermelon_v1.genome 189225_sorted.bam |bcftools view -cg - >
189225.vcf
```

-최종적으로 만들어진 bam 파일을 이용하여 TABLET 프로그램으로 표준염기서열과 비교 분석 하였으며, 각 scaffold를 표준염기서열에 blasting하여 최종적인 mapping data를 확보하였다.

나. 결과

○ 유전자지도 작성용 PI189225 및 TS의 게놈 resequencing

전체적인 PI189225와 TS에 대한 FASTQC후의 전체적인 서열에 대한 통계적 분석결과는 다음 그림 1-4-1와 같다.

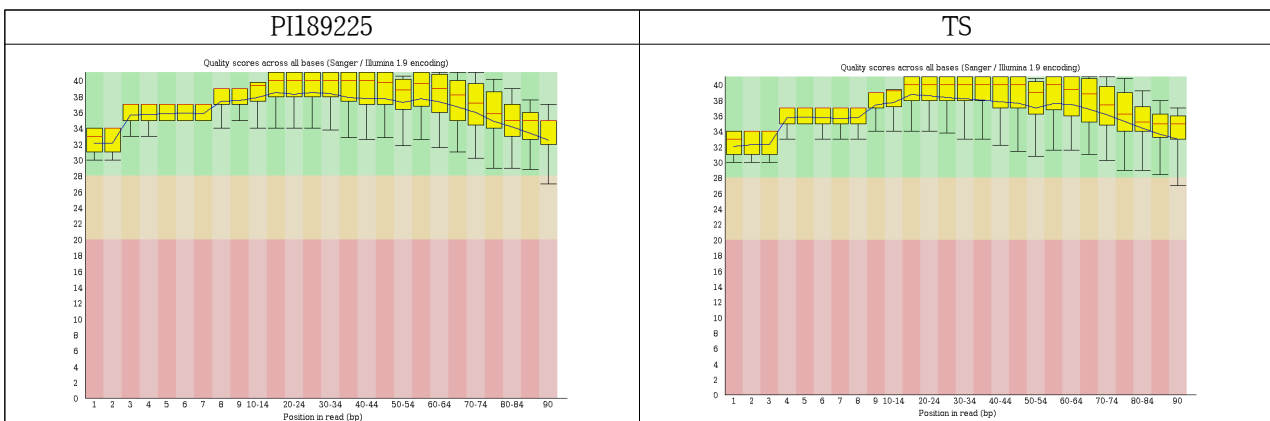


그림 1-4-1. PI189225 및 TS의 resequencing후 Fastqc 결과

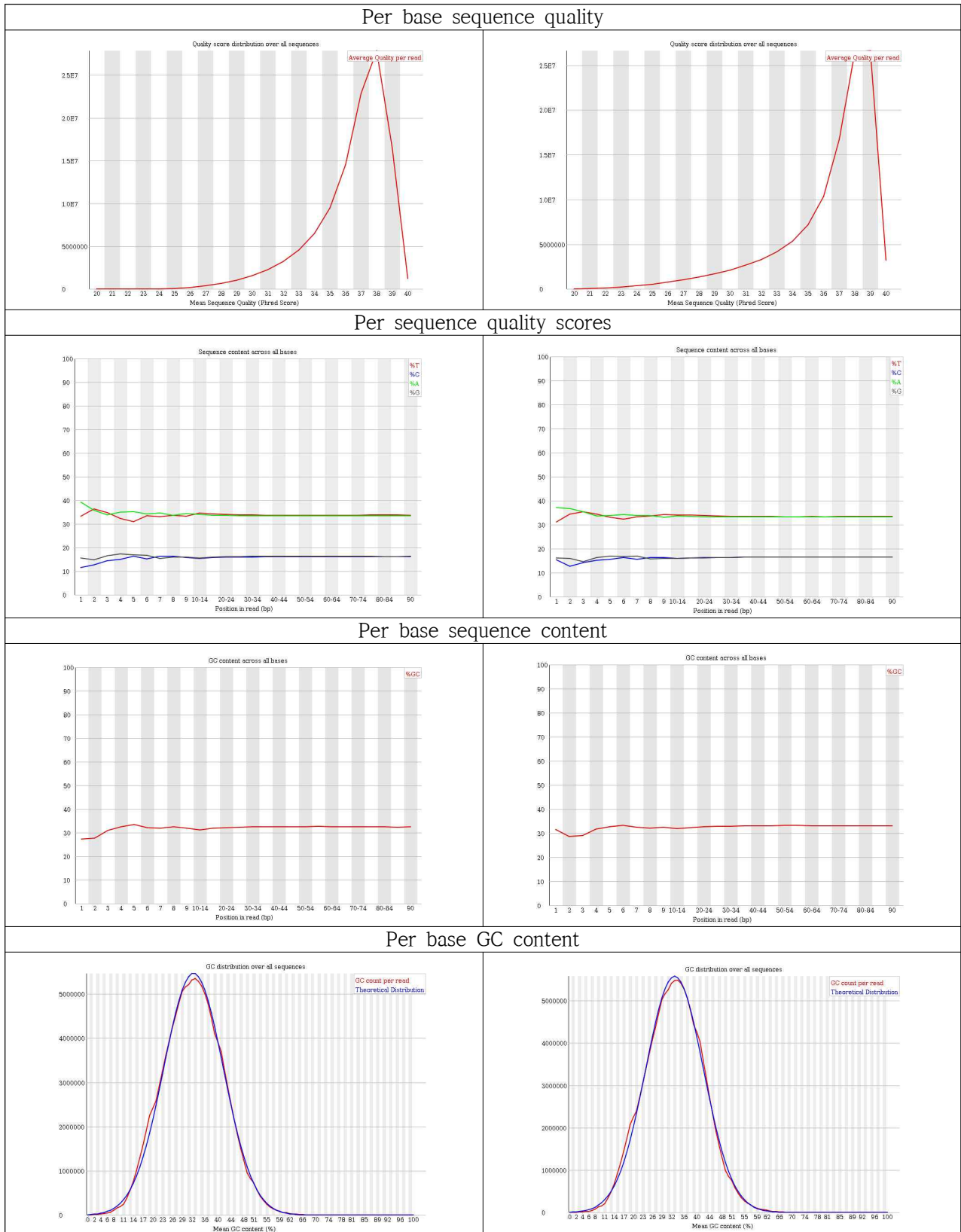


그림 1-4-1. (계속)

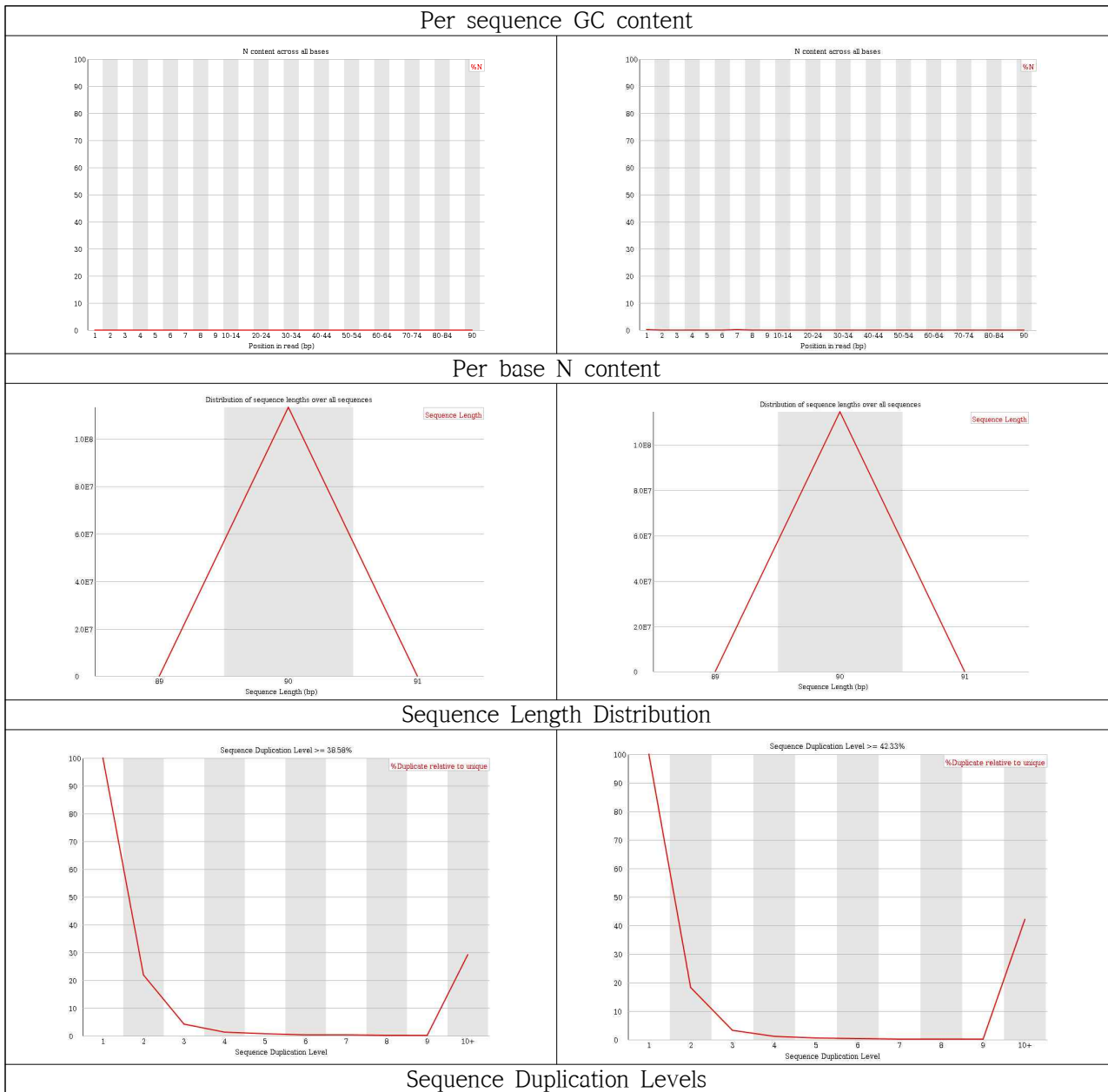


그림 1-4-1. (계속)

분석집단 대부분인 PI189225(야생종)와 TS(재배종)의 유전체 염기서열 분석시 filtering 결과는 표와 같다. 전체 read 수는 각각 약 211Mb와 163Mb이었으며, 분석된 서열을 표준염기서열에 align하여 mapping 분석한 결과 각각 81% 및 89%로 mapped read수(140Mb, 122Mb)를 얻었다. 또한 mate를 사용하여 scaffold를 만든 read수는 159Mb, 137Mb로 나타났다.

표 1-4-1. 모부분의 총 read수와 filtering후 mapping 결과

Sample	PI189225	TS
Total Reads	211,377,532	162,922,891
Mapped Reads	171,115,481	145,061,895
Mapped Rate	0.8095	0.8904
Properly Paired Reads	140,256,789	122,434,489
Properly Paired Rate	0.6635	0.7515
With Itself And Mate Mapped Reads	158,759,159	137,496,714
With Itself And Mate Mapped Rate	0.7511	0.8439
Singleton Reads	12,356,322	7,565,181
Singleton Rate	0.0585	0.0464
With Mate Mapped To A Different Chrom Reads	16,112,163	13,350,606
With Mate Mapped To A Different Chrom Rate	0.0762	0.0819

○ 표준염기서열에 대한 기본 SNP 및 In/Del의 확보

- PI189225와 TS에서의 sequence variants (SNP 및 In/Del) 탐색

표 1-3과 같이 Illumina Hiseq 2000을 통하여 대량분석된 염기서열을 filtering한 후 PI189225 및 TS에서 International Watermelon Genome Initiative (IWGI)에서 발표한 수박 유전체 표준염기서열 (reference genome sequence)에 비교하여 염기서열변이(variants)를 분석하였다. 재배종인 TS는 발견된 SNP 및 in/del이 약 590,898개의 위치에서 나타났으며, 이중 SNP는 filtering후 376,918개 (80.8%)이었고, 나머지 in/del은 89,197부위 (19.1%)로 발견되었다.

표 1-4-2. 모부분의 총 read수와 filtering후 mapping 결과

TS (var. lanatus)	Variants	SNP	IN	DEL	IN/DEL
variants	590,898	494,798	49,042	47,058	96,100
per total variant	1	0.8374	0.0830	0.0796	0.1626
pass	466,115	376,918	46,007	43,190	89,197
pass ratio	0.7888	0.8086	0.0987	0.0926	0.1913
per pass variant	-	0.7617	0.9381	0.9178	0.9281

PI189225에서는 IWGI의 서열과 비교한 결과, 표준염색체 발견된 SNP수는 약 30만개로 염색체별 SNP 수는 다음 표 1-4와 같이 정리하였다. 또한, 각 염색체별로 염색체 내 위치별로 intron, exon(CDS)부위의 SNP수를 도식화 하였다 (그림 1-4-3). 대부분의 SNP는 non-coding지역인 intron에 분포하고 있음을 보여준다.

표 1-4-3. PI189225에서 나타난 exon과 intron부위에서의 SNP

Chr	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Total cnt	167,071	531,540	460,660	377,851	261,636	515,801	360,191	350,737	291,475	457,123	387,568	378,509
exon	3,712	12,591	9,308	6,874	4,583	12,553	6,964	6,735	6,389	9,090	7,797	7,788
intron	163,359	518,949	451,352	370,977	257,053	503,248	353,227	344,002	285,086	448,033	379,771	370,721

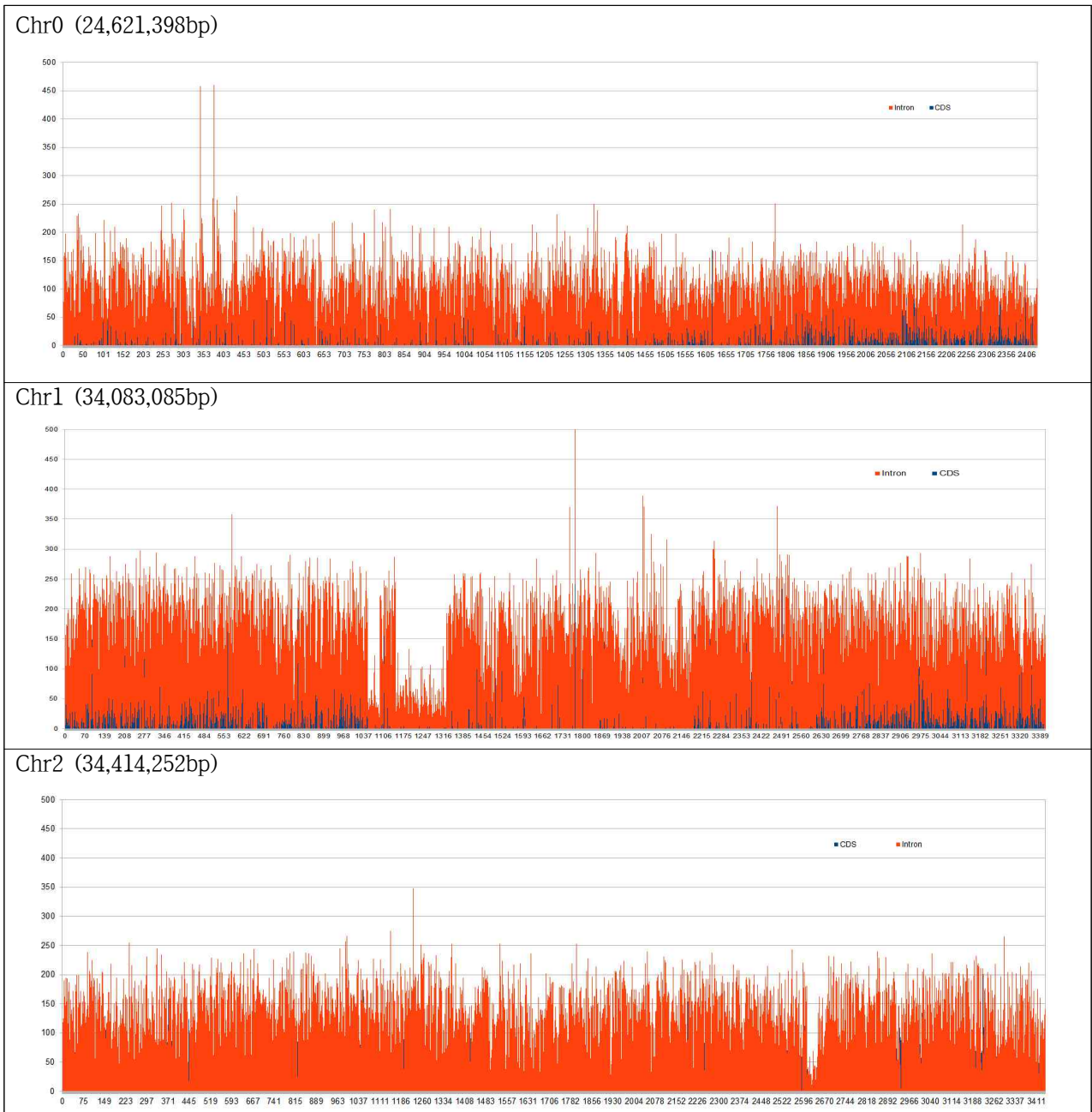
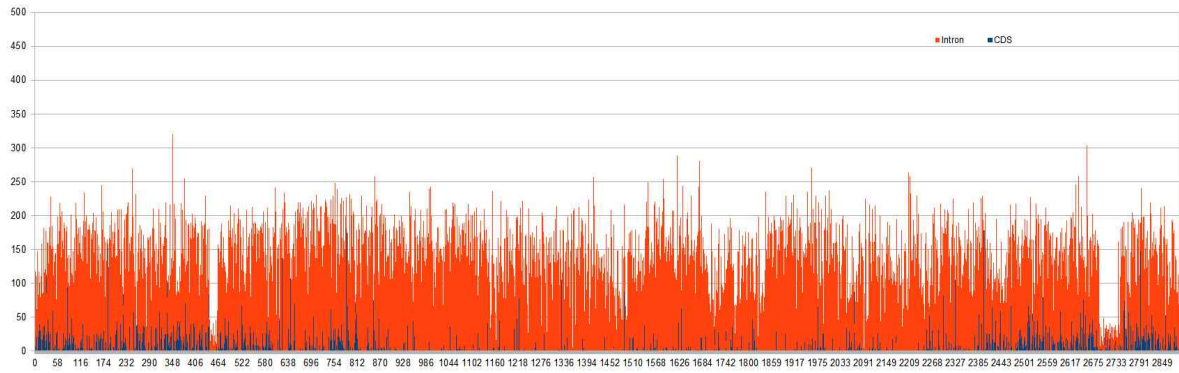
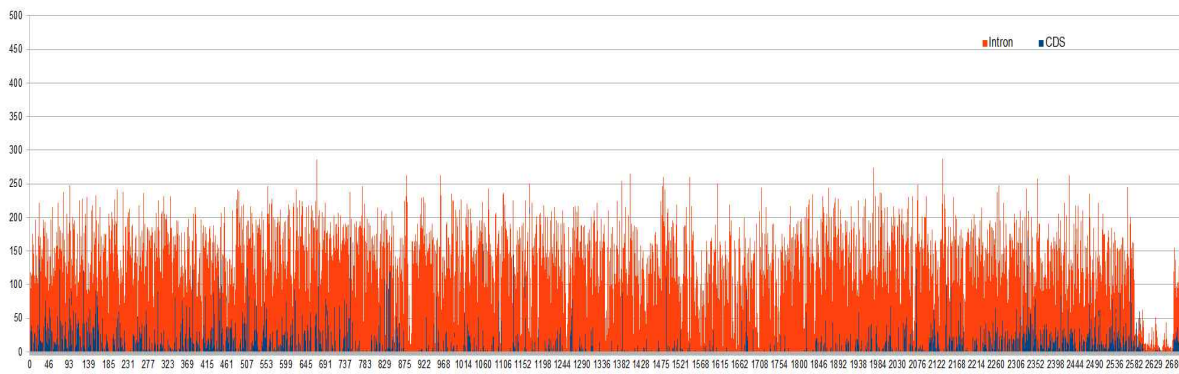


그림 1-4-2. PI189225에서 나타난 염색체별 exon과 intron부위에서의 SNP

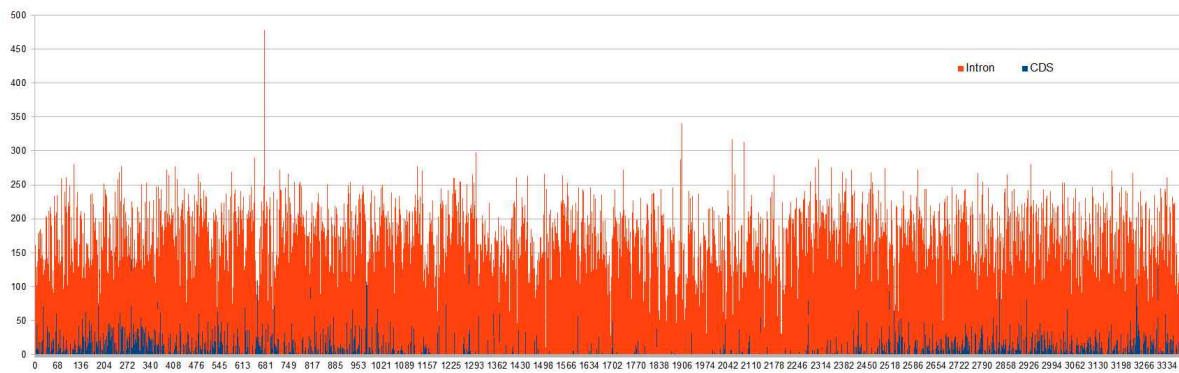
Chr3 (28,939,167bp)



Chr4 (24,315,960bp)



Chr5 (33,714,806bp)



Chr6 (27,018,480bp)

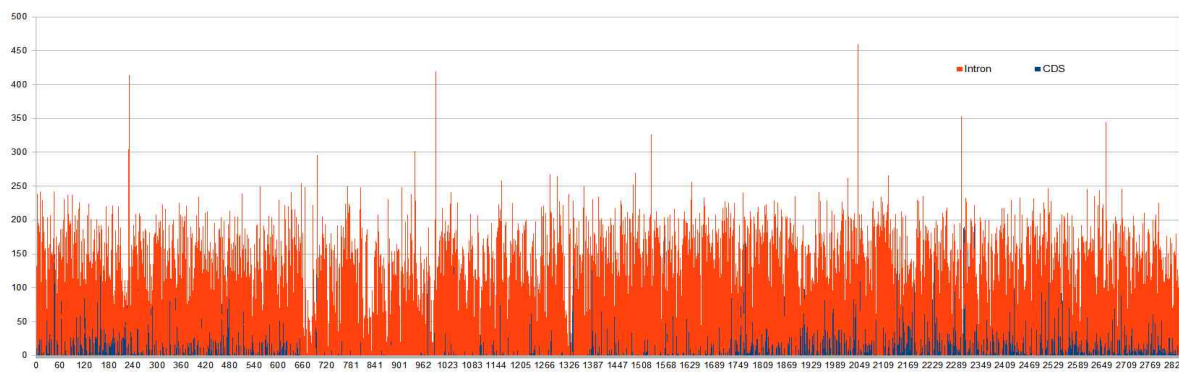
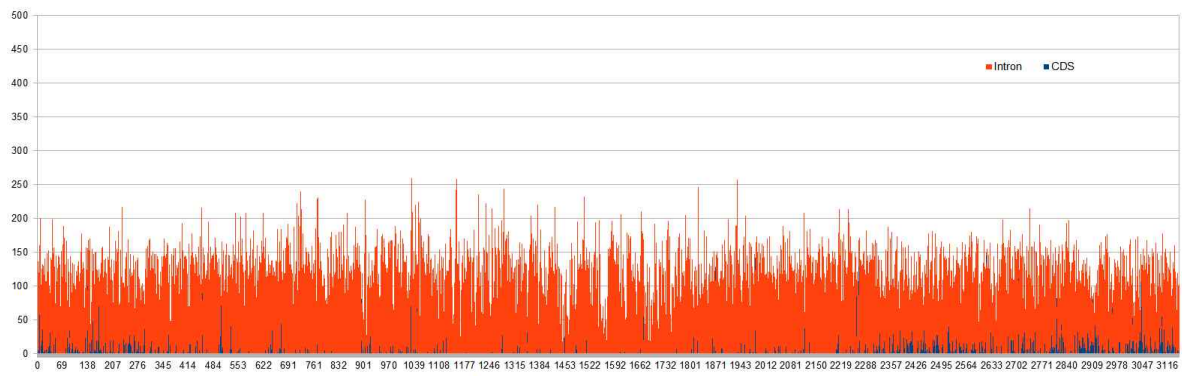
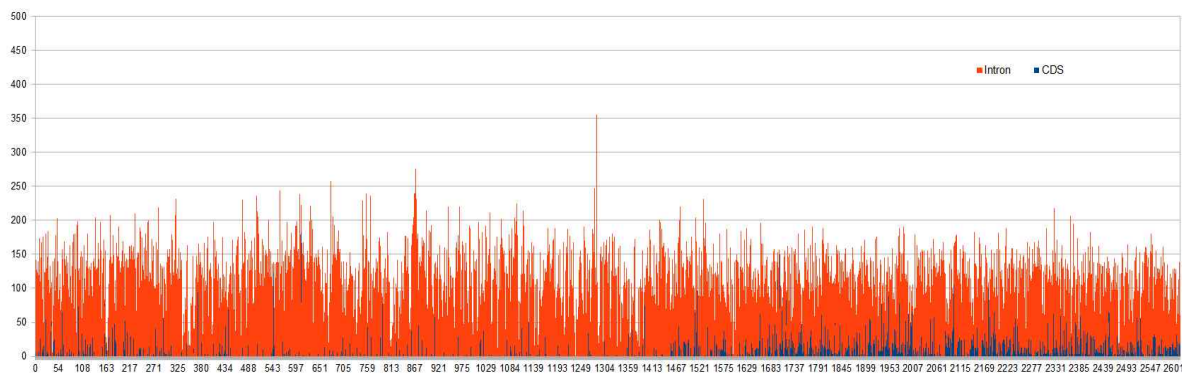


그림 1-4-2. (계속)

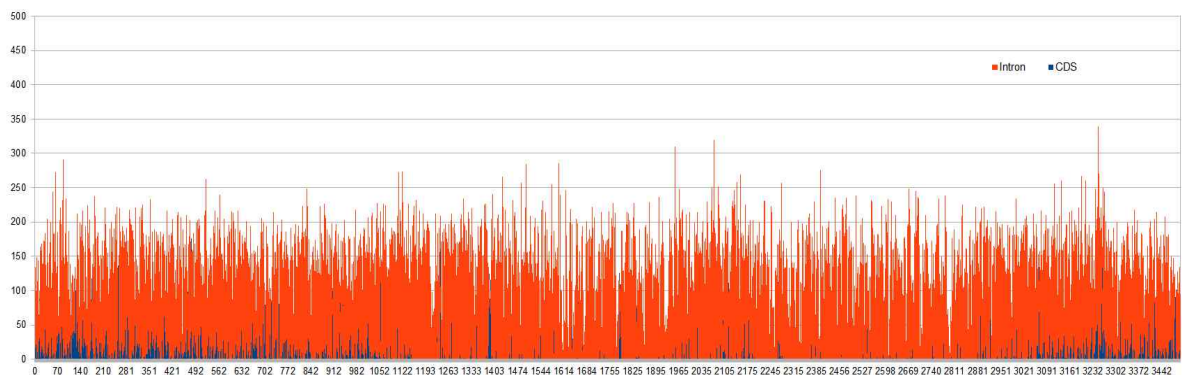
Chr7 (31,477,646bp)



Chr8 (26,149,438bp)



Chr9 (34,986,854bp)



Chr10 (28,419,553bp)

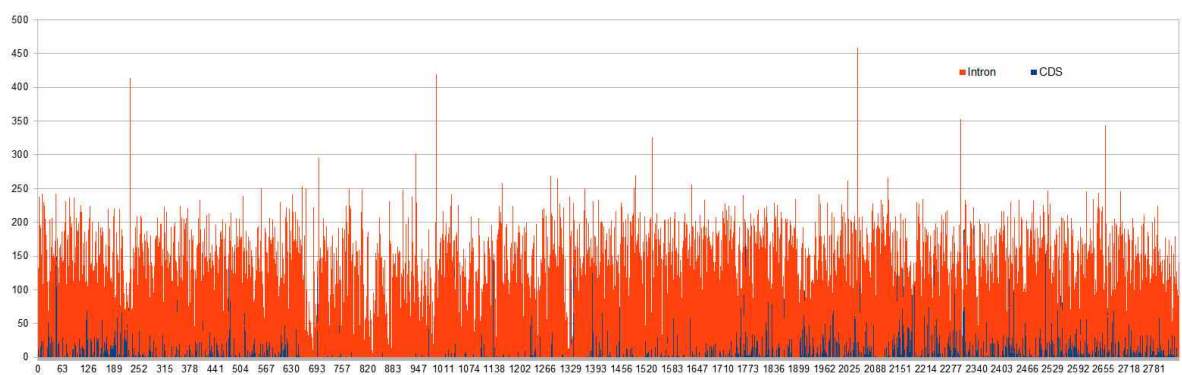


그림 1-4-2. (계속)

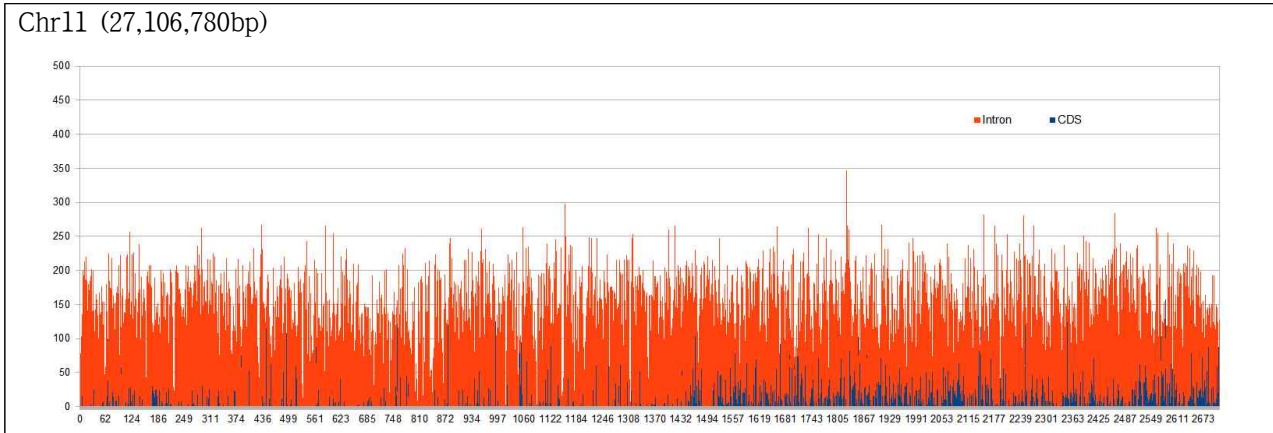


그림 1-4-2. (계속)

-PI189225와 TS에서 발견된 nonsynonymous SNP 정보 분석

IWGI의 표준염기서열에서 computational annotation으로 분석된 promoter, intergenic region, CDS, Intron을 대상으로 분석한 PI189225와 TS에서의 SNP 정보 중에서 변경된 SNP가 유전자 발현에 의미가 있을 것으로 추정되는 nonsynonymous SNP만을 따로 모아 정리하였다. 이것을 통하여 아미노산 서열이 변경되었을 것으로 추정되는 유전자의 정보를 확보하였다.

PI189225의 경우, 약 55,623개의 nonsynonymous SNP가 발견되었으며, 이 정보는 추후 SNP 마커제작 및 genetic mapping에 활용될 수 있으며, RNA-seq 등을 통한 발현 유전자분석을 통한 SNP typing에도 활용되었다.

이 외에도, promoter, intergenic region, intron 등에 분포하는 SNP를 분석하여 확보하였다.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13												
chrom	type	chrom	chromEnd	ref	alt	variantQ	genotype	filter	refDepth	altDepth	totalDepth	genotype	homo	HetersNum	rsStrand	1000Geno	strand	gene	geneID	RNA	Nucle	protein	Accession	region
Chr0	SNV	259136	259137	C	T	783.68	99	PASS	0	50	50	TT	homo	.	.	.	+	POPTRDR	0.	XP_002322675			CDS	
Chr0	SNV	259177	259178	G	T	1357.9	99	PASS	0	66	66	TT	homo	.	.	.	+	POPTRDR	0.	XP_002322675			CDS	
Chr0	SNV	259316	259317	G	A	313.85	44.75	HARD_TO	19	21	40	AA	homo	.	.	.	+	POPTRDR	0.	XP_002322675			CDS	
Chr0	SNV	259414	259415	A	T	45.53	75.52	HARD_TO	9	19	28	AT	hetero	.	.	.	+	POPTRDR	0.	XP_002322675			CDS	
Chr0	SNV	548336	548337	G	A	32.97	8.94	HARD_TO	0	20	20	AA	homo	.	.	.	-	.	0.	AAS93686			CDS	
Chr0	SNV	548342	548343	C	A	34.99	8.95	HARD_TO	0	20	20	AA	homo	.	.	.	-	.	0.	AAS93686			CDS	
Chr0	SNV	578884	578885	A	G	32.97	8.94	PASS	0	37	37	GG	homo	.	.	.	-	.	0.	AFK45504			CDS	
Chr0	SNV	584997	584998	A	T	1077.44	99	PASS	0	64	64	TT	homo	.	.	.	+	LOC10078	0.	XP_003518728			CDS	
Chr0	SNV	586332	586333	C	A	669.3	79.74	PASS	20	35	55	AA	homo	.	.	.	+	LOC10078	0.	XP_003518728			CDS	
Chr0	SNV	586544	586545	A	T	335.25	50.67	PASS	0	25	25	TT	homo	.	.	.	+	LOC10078	0.	XP_003518728			CDS	
Chr0	SNV	586636	586637	G	A	335.25	50.67	PASS	0	34	34	AA	homo	.	.	.	+	LOC10078	0.	XP_003518728			CDS	
Chr0	SNV	586837	586838	C	T	1093.5	99	PASS	0	51	51	TT	homo	.	.	.	+	LOC10078	0.	XP_003518728			CDS	

Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
exonNumber	refCodon	refAminoAcid	refCodonIndex	altCodon	altAminoAcid	genePosition	cdsPosition	aminoAcidPosition	frameshift	ccdsID	blosum62
1	CTC	L		0 TTC	F	325	325	109	.	.	0
1	GTG	V		2 GTT	V	366	366	122	.	.	4
1	GCT	A		0 ACT	T	505	505	169	.	.	0
1	TCA	S		2 TCT	S	603	603	201	.	.	4
2	TAC	Y		2 TAT	Y	897	822	274	.	.	7
2	CTG	L		2 CTT	L	891	816	272	.	.	4
2	GAT	D		2 GAC	D	785	204	68	.	.	6
1	CTA	L		2 CTT	L	126	126	42	.	.	4
2	ACC	T		1 AAC	N	1461	329	110	.	.	0
2	AAC	N		0 TAC	Y	1673	541	181	.	.	-2
2	GCG	A		2 GCA	A	1765	633	211	.	.	4
2	GTC	V		2 GTT	V	1966	834	278	.	.	4
3	GCA	A		0 ACA	T	2183	874	292	.	.	0

그림 1-4-3. coding sequence에서 발견된 SNP 분석 결과

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA					
1	#index	chrom	type	chromStar	chromEnd	ref	alt	variantQ	genotypeQ	filter	refDepth	altDepth	totalDepth	genotype	homo	Hetero	rsNum	rsStr	1000Cstrand	gene	geneID	RNAI	proteinAccession	region	exonNum	refCodon	refAmino					
2	1 Chr0	SNV	3236545	3236546	G	T	2091.91	99 PASS	129	118	247 TT	homo					+	+		LOC10078	0.	CAH18935	SPLICING									
3	2 Chr0	SNV	4942314	4942315	G	A	1010.83	99 PASS	0	59	59 AA	homo											0.	ABK94958	SPLICING							
4	3 Chr0	SNV	4949047	4949048	G	T	54.17	11.92 HARD	8	9	19 TT	homo											0.	ABK94958	SPLICING							
5	4 Chr0	SNV	11173236	11173237	G	T	1098.49	99 PASS	0	58	58 TT	homo								RCOM_12	0.	XP_002523852	SPLICING									
6	5 Chr0	SNV	17140233	17140234	G	T	164.6	11.14 PASS	45	11	56 TT	homo											+	+								
7	6 Chr0	SNV	18521469	18521470	G	A	833.08	84.98 PASS	139	41	180 AA	homo										+	+	POPTRDR	0.	XP_002328259	SPLICING					
8	7 chr1	SNV	5081695	5081696	G	A	1060.34	99 PASS	0	47	47 AA	homo													LOC10079	0.	XP_003535184	SPLICING				
9	8 chr1	SNV	5343577	5343578	T	C	57.2	11.94 PASS	0	44	44 CC	homo											+	+	LOC13080	0.	XP_002520087	SPLICING				
10	9 chr1	SNV	5875227	5875228	C	T	1413.42	99 PASS	0	61	61 TT	homo														ARALYDR	0.	XP_002870107	SPLICING			
11	10 chr1	SNV	8946474	8946475	G	A	1139.44	99 PASS	0	49	49 AA	homo												+	+	LOC10080	0.	XP_003526845	SPLICING			
12	11 chr1	SNV	9374283	9374284	T	C	161.97	26.83 PASS	0	49	49 CC	homo															0.	CB137545	SPLICING			
13	12 chr1	SNV	13757826	13757827	G	A	52.13	7.71 PASS	32	6	38 AG	hetero												+	+		0.	EEC70602	SPLICING			
14	13 chr1	SNV	16402527	16402528	C	T	404.27	38.19 PASS	48	24	72 TT	homo															0.	ADN34114	SPLICING			

그림 1-4-4. Intron부위에서 발견된 SNP의 분석 결과

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA					
1	#index	chrom	type	chromStar	chromEnd	ref	alt	variantQ	genotypeQ	filter	refDepth	altDepth	totalDepth	genotype	homo	Hetero	rsNum	rsStr	1000Cstrand	gene	geneID	RNAI	proteinAccession	region	exonNum	refCodon	refAmino					
2	1 Chr0	SNV	5846319	5846320	G	A	55.18	11.93 PASS	0	5	5 AA	homo											+	+	LOC10078	0.	XP_003518728	PROMOTER				
3	2 Chr0	SNV	5846985	5846986	G	T	878.83	99 PASS	1	49	50 TT	homo												+	+	LOC10078	0.	XP_003518728	PROMOTER			
4	3 Chr0	SNV	584718	584719	C	T	879.84	99 PASS	0	48	48 TT	homo												+	+	LOC10078	0.	XP_003518728	PROMOTER			
5	4 Chr0	SNV	584737	584738	C	A	578.6	83.49 PASS	0	39	39 AA	homo												+	+	LOC10078	0.	XP_003518728	PROMOTER			
6	5 Chr0	SNV	584786	584787	C	T	564.02	80.55 PASS	0	32	32 TT	homo												+	+	LOC10078	0.	XP_003518728	PROMOTER			
7	6 Chr0	SNV	584811	584812	G	T	731.25	99 PASS	1	44	45 TT	homo												+	+	LOC10078	0.	XP_003518728	PROMOTER			
8	7 Chr0	SNV	604435	604436	G	A	339.3	50.7 PASS	0	18	18 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
9	8 Chr0	SNV	604440	604441	G	A	291.93	44.71 PASS	0	17	17 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
10	9 Chr0	SNV	604451	604452	A	T	130.78	99 PASS	16	11	27 AT	hetero														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
11	10 Chr0	SNV	604704	604705	C	A	76.59	14.91 PASS	0	5	5 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
12	11 Chr0	SNV	604729	604730	G	A	75.58	14.9 PASS	0	5	5 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
13	12 Chr0	SNV	604791	604792	T	A	275.33	41.76 PASS	0	14	14 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
14	13 Chr0	SNV	604792	604793	T	A	226.94	35.77 PASS	0	14	14 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
15	14 Chr0	SNV	604801	604802	C	A	226.94	35.77 PASS	0	14	14 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			
16	15 Chr0	SNV	604828	604829	T	A	349.59	2.64 PASS	3	20	24 AA	homo														LOC10079	0.	XP_003556363	PROMOTER			

그림 1-4-5. promoter지역에서 발견된 SNP의 분석 결과

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA							
1	#index	chrom	type	chromStar	chromEnd	ref	alt	variantQ	genotypeQ	filter	refDepth	altDepth	totalDepth	genotype	homo	Hetero	rsNum	rsStr	1000Cstrand	gene	geneID	RNAI	proteinAccession	region	exonNum	refCodon	refAmino							
2	4 Chr0	SNV	22932	22933	G	A	32.97	8.94 PASS	11	3	14 AA	homo																						
3	5 Chr0	SNV	25667	25668	G	A	356.91	53.65 PASS	0	32	32 AA	homo																						
4	6 Chr0	SNV	25768	25769	C	T	1868.4	99 PASS	0	109	110 TT	homo																						
5	7 Chr0	SNV	25833	25834	G	A	611.4	86.54 PASS	0	59	59 AA	homo																						
6	8 Chr0	SNV	25997	25998	G	A	1159.43	99 PASS	0	70	70 AA	homo																						
7	9 Chr0	SNV	25999	26000	C	T	1171.28	99 PASS	0	71	71 TT	homo																						
8	10 Chr0	SNV	26009	26010	C	A	147.88	26.24 PASS	64	13	77 AC	hetero																						
9	11 Chr0	SNV	26105	26106	C	T	2071.18	99 PASS	0	99	99 TT	homo																						
10	12 Chr0	SNV	26106	26107	G	T	2116.38	99 PASS	0	97	97 TT	homo																						
11	13 Chr0	SNV	26146	26147	A	T	819.52	99 PASS	0	44	44 TT	homo																						
12	14 Chr0	SNV	26147	26148	C	T	394.77	56.73 PASS	25	19	44 TT	homo																						
13	15 Chr0	SNV	27198	27199	C	T	140.33	23.85 PASS	0	10	10 TT	homo																						

그림 1-4-6. intergenic region에서 발견된 SNP의 분석 결과

- Gene Ontology(GO) 분석

PI189225와 TS에서 발견된 SNP는 해당 SNP가 존재하는 유전자의 경우, 유전자의 역할을 밝혀야 하므로, GO분석을 수행하였다. SNP가 존재하는 유전자의 서열을 BLAST 검색 후 매치하는 유전자의 GO를 확인하고 이를 이용하게 된다. 따라서, BLAST의 검색 결과가 중요한데, E-value를 정하여 exact match와 불확실한 GO_others로 분류하여 정리하였다.

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA					
1	#chrom	type	chromStar	chromEnd	ref	alt	variantQ	genotypeQ	filter	refDepth	altDepth	totalDepth	genotype	homo	Hetero	rsNum	rsStr	1000strand	gene	geneID	RNAI	proteinAccession	region	exonNum	refCodon	refAmino	refCodon	refAmino				
20017	chr2	SNV	29241462	29241463	G	T	591.25	63.99 PASS	12	28	40 TT	homo							LOC100265689	0.	XP_002623263	INTRON										
20018	chr2	SNV	29266934	29266935	T	A	964.4	99 PASS	0	44	44 AA	homo							SSADH	0.	NP_001233841	CDS			1 GCT	A					2	
20019	chr2	INSERT	29267142	29267142			75.77	8.36 PASS	0	21	21.	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20020	chr2	SNV	29267664	29267665	G	T	1136.4	99 PASS	0	49	49 TT	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20021	chr2	INSERT	29267784	29267784			1969.74	48.95 PASS	13	19	34.	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20022	chr2	SNV	29267867	29267868	T	A	741.44	98.69 PASS	0	34	34 AA	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20023	chr2	INSERT	29268195	29268195			426.88	35.82 PASS	2	40	42.	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20024	chr2	SNV	29268233	29268234	T	A	694.08	92.71 PASS	0	31	31 AA	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20025	chr2	SNV	29269003	29269004	G	A	987.07	99 PASS	0	45	45 AA	homo							SSADH	0.	NP_001233841	CDS			6 ATG	M					2	
20026	chr2	DELETT	29269050	29269052	T	A	153.01	28.96 PASS	32	5	37.	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										
20027	chr2	DELETT	29269051	29269052	A	T	276.06	32.34 PASS	6	28	34.	homo							SSADH	0.	NP_001233841	INTRON										

#	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF
---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----

본 결과로 IWGI에서 얻을 수 있는 genome sequence 정보를 통하여, PI189225 및 TS의 SNP 정보를 얻어서 이를 분류하고, 변경될 수 있을 것으로 추정되는 유전자 정보나 이에 대한 기능 변화 예측정보를 획득하였다.

전체적으로는 PI189225에서 많은 SNP 및 GO변화가 관측되었고, 재배종인 TS에서는 특이적인 변이가 매우 적게 발견되었다. 다양한 표현형 변이를 갖고 있는 PI189225를 모본으로 하는 유전자 지도 및 집단분석에 매우 유용한 SNP 마커 개발이 가능하였다.

○ De novo assembly를 통한 SNP 탐색 및 분석

- PI189225와 TS에서 획득된 NGS 기반의 유전체 서열은 분석에 사용된 Hiseq 2000의 paired-end sequence가 한쪽에서 약 100bp 정도가 읽혀진다. 일반적으로 reference가 있는 경우, 이에 대한 reference align으로 SNP를 찾게 되는데, 본 연구에서는 reference가 없는 genome에서 많이 쓰이는 방법을 적용하고자 하였다. 즉, 수박 게놈크기 (450Mb)에 대해 약 30X depth로 읽혀진 서열들을 de novo로 assemble하고, contig 및 scaffold를 제작하고, 이를 reference genome에 blast하는 방법으로 좀더 높은 depth의 SNP과 InDel을 찾고자 하였다.

-SOAPDenovo 프로그램으로 최종적으로 bam file을 만들어 reference 서열과 비교하였는데, 먼저 TS를 기준으로 PI189225를 sorting한 경우 만들어진 contig 및 scaffold는 0.100~46.162Mb의 범위로 593,669개가 mapping되었고, 총 read수는 195,901,978 이었다.

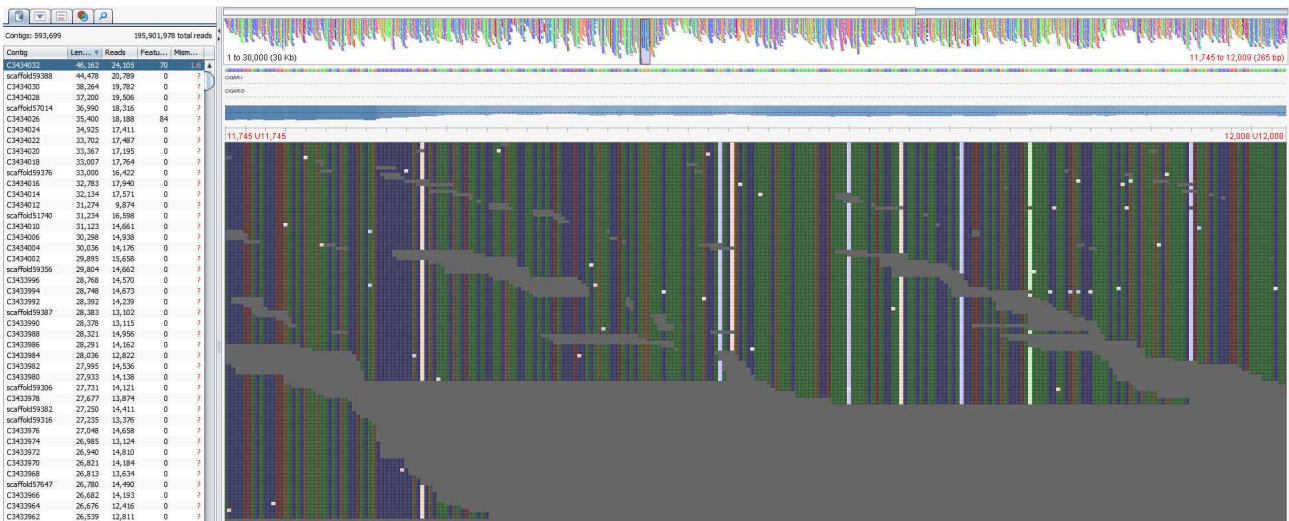


그림 1-4-8. SOPADenovo로 만들어진 contig 및 각 contig에서의 PI189225의 SNP

- 한편, PI189225를 기준으로 TS 서열을 SOPADenovo로 분석한 결과, contig 및 scaffold는 0.100~37.342Mb의 범위로 총 Contig 수는 484,544 였으며, 총 read수는 198,325,212이었다. TS서열을 기준으로 하였을 때보다 상대적으로 적은 수의 contig가 얻어졌으나, 전체적으로 신뢰도 높은 SNP를 획득할 수 있었다.

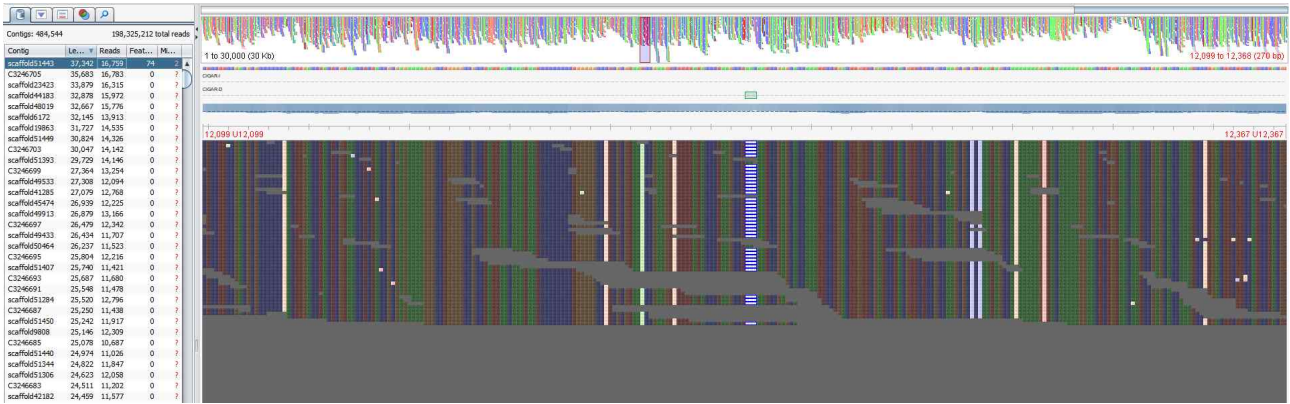


그림 1-4-9. SOPADenovo로 만들어진 contig 및 각 contig에서의 TS의 SNP 및 deletion 예시

- 상기의 De novo assemble을 이용하여 IWGI의 reference 서열에 전체 contig를 blast하였고, 이중에서 query가 12kb이상의 서열은 99%이상 단일 염색체에 align되었으며, align length를 8kb에서 cut할 경우 매우 높은 신뢰도의 exact match값을 확보하였다.
- 특히, PI189225에서 특이적으로 나타나는 SNP 도출을 위하여, R-script를 이용하여 blast한 결과, 다음의 그림 1-4-10과 같이 신뢰도 높은 SNP 및 InDel을 확인할 수 있었으며, 각 염색체별로 contig들을 그림 1-4-11와 같이 visualization시킬 수 있었다.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	
41	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742
42	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742	C1431742

그림 1-4-10. PI189225 contig를 reference 서열에 blast한 결과

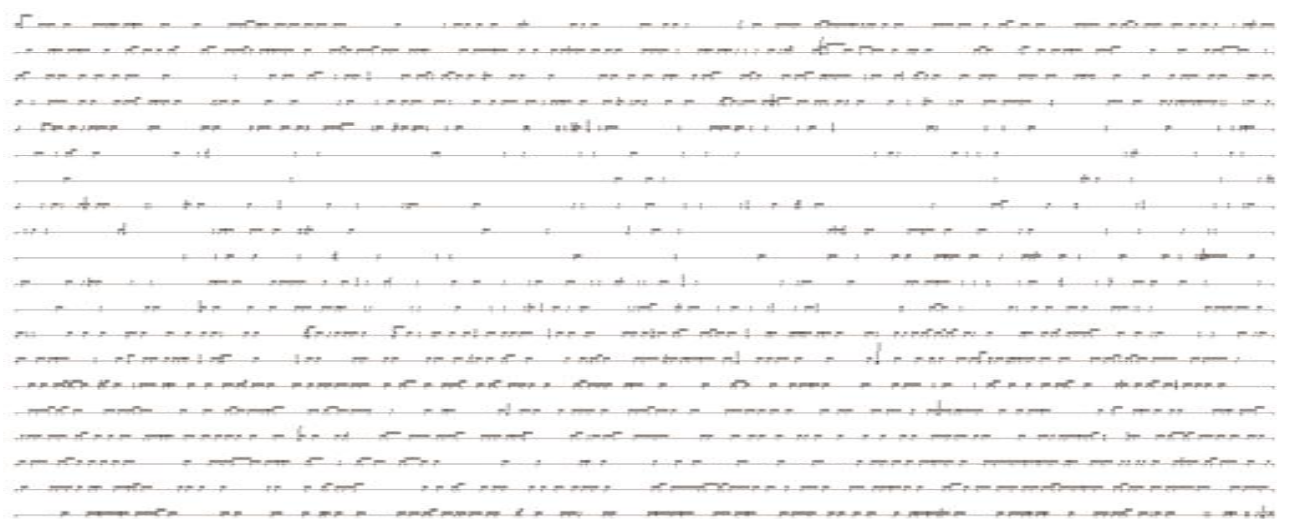


그림 1-4-11. 수박 1번 염색체에 align된 contig의 예시

- 상기의 과정을 통하여 align length가 8kb이상인 contig들이 각 염색체별로 분포하는 위치를 아래 그림 1-4-12과 같이 그래프로 작성하였고, 각 contig 내의 SNP, InDel 부위를 가시적

로 확인할 수 있다.

-각 contig들은 e-value가 0이며, reference에 blast를 수행하였을 경우, 전체 contig이 단일 염색체로 나타난다.

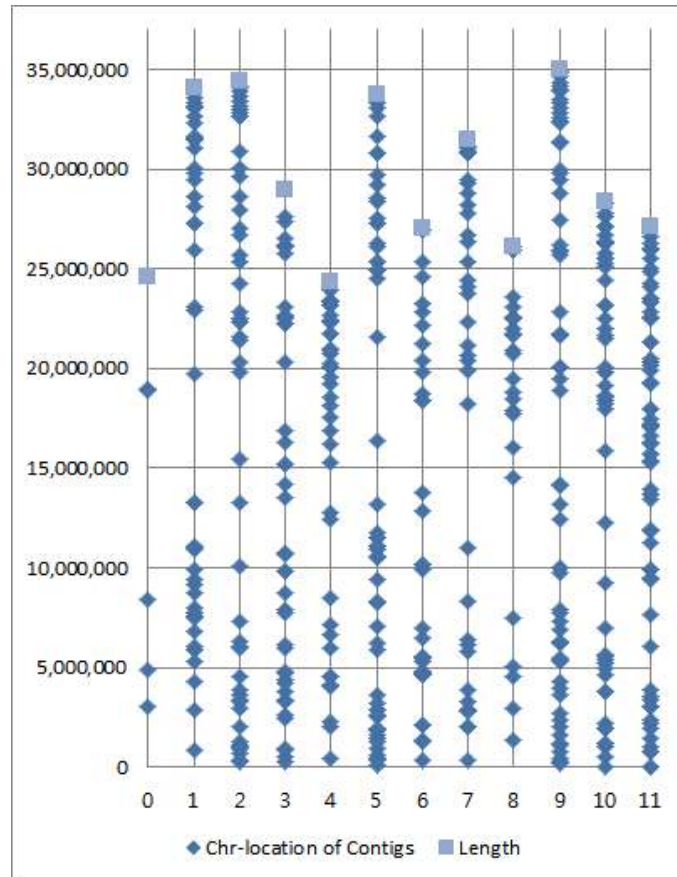


그림 1-4-12. SNP, InDel의 선정을 위한 수박 염색체별 PI189225 및 TS의 Contigs 위치

5. 유전체 분석을 통한 SNP 기반의 마커도출, HRM 분석

○ 염색체별 SNP 마커의 개발

- 앞서 도출한 각 염색체별로 align된 contig들에서 일정한 간격 (평균 2.7Mb)으로 각 염색체별로 9~10개의 SNP를 선정하였다.
- primer들의 annealing temperature는 60°C로 설정하여 디자인 하였으며 예상 증폭산물의 크기는 100~150bp로 하였다.
- 각 primer로 ePCR을 수행하여 표준염기서열에서 단일 증폭산물을 만들어 낼 수 있는지 여부를 확인하여 최종적으로 96개의 야생종 특이적인 HRM용 primer를 합성하였다.

○ SNP 마커의 HRM 적용을 통한 genotyping

- 제작한 96개의 primer set을 이용하여 PI189225, TS 및 F1에 PCR후 end-time point에서 high resolution melt (HRM)을 수행하였다.
- HRM은 55-97°C까지로 설정하였고, LC96(Roche사)를 이용하여 genotyping하였다.

- 다음 결과그림 1-5-1에서 보여지 듯 genotype이 homo의 서열을 갖는 각 모부분의 genotype 과 hetero의 서열을 갖는 F1이 세가지의 group으로 성공적인 genotype 구분이 가능하였다.
- 전체적으로 약 95%의 primer가 세가지 genotype으로 grouping되었으며, 개발된 SNP 마커들은 PI189225 x TS 집단의 F2:3에 적용하여 유전자지도 작성에 활용되었다.

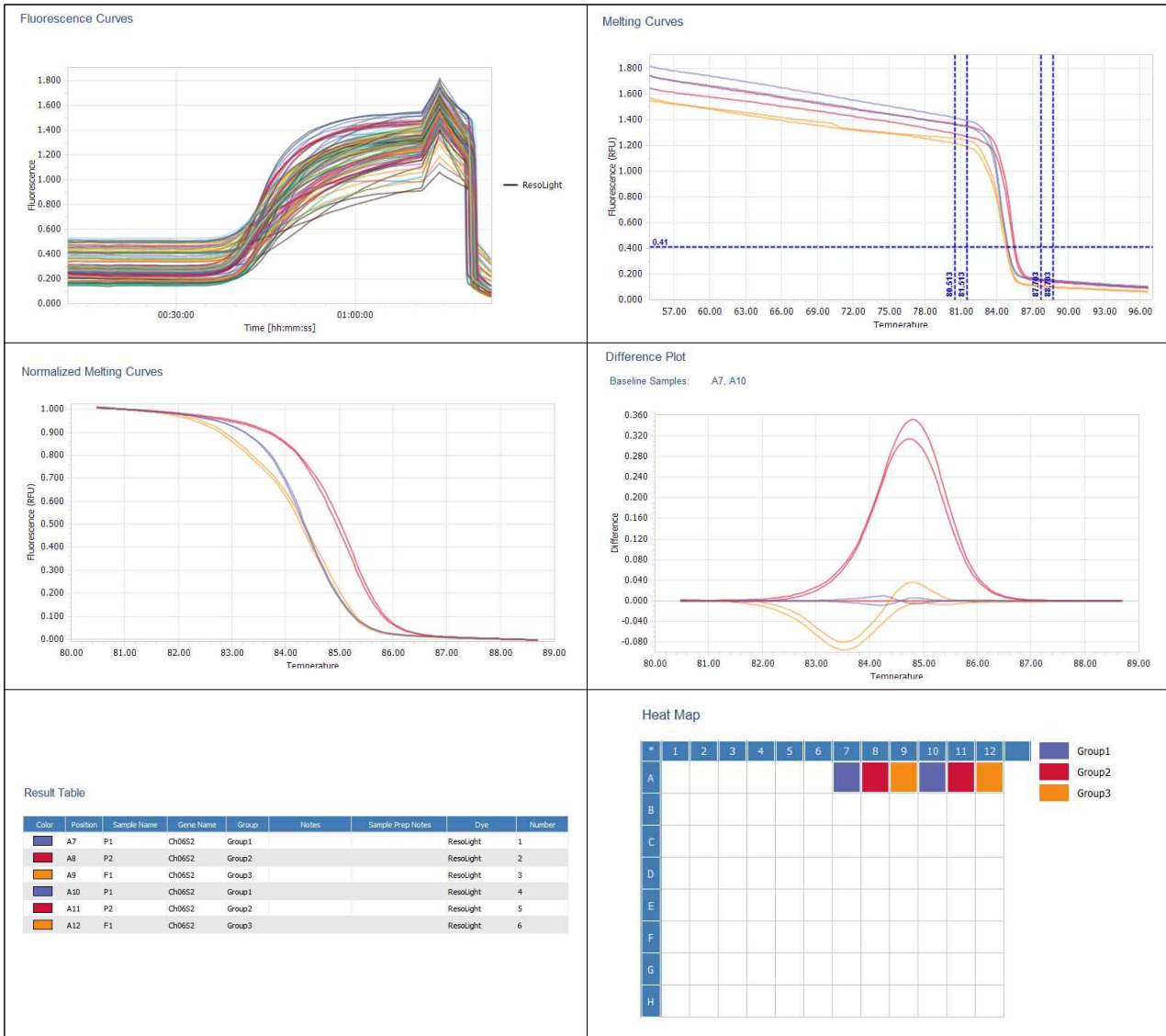


그림 1-5-1. PI189225특이적 primer set을 이용한 HRM 분석 결과 예시

6. 유전자지도 초안 작성

가. EST-SSR 마커를 활용한 연관군 분석

○ EST-SSR 마커의 F2세대 적용을 통한 연관군 작성

- 유전자 연관지도는 PI189225(P1; *C. lanatus* var. *citroides*), Ts(P2; *C. lanatus* var. *lanatus*)를 대상으로 RIL (recombinant inbred line) 집단을 전개하여 작성하고자 하였으며, 다음 그

림 2-1에서와 같이 다양한 원예적 형질을 대상으로 하였다. 기존 연구에서는 재배종 내에서의 유전적 배경이 너무 좁아 다양한 연관마커의 개발이 매우 어렵다는 보고가 많았기 때문에, 본 연구에서는 상대적으로 유전적 거리가 멀고 야생형으로 여겨지는 아종(subspecies)을 대상으로 유전자지도 집단을 양성하고자 하였다.

원예적 형질	TS	PI189225
종자크기	극소(TS)	극대(GS)
과육색	적색	백색
경도	보통	극경
과형	타원	원형
당도	12-13brix	1-2brix
종피	흑색	적색
과크기	6kg	2-3kg
초세	약	강
초형	보통	야생
내병성	-	만고, 탄저2, 흰가루2
과피형	호피	무지

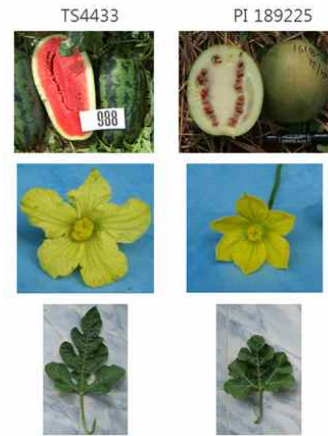


그림 1-6-1. 유전자 지도 작성을 위한 모부분 계통 육성 및 특성비교

- 최종적으로 선별한 EST-SSR 마커 121개를 적용한 결과, F2에서 극심한 distortion이 나타났으며, 이에 따라 공우성 다형성을 잘 보여주는 55개의 마커를 사용하여 F2 251개체를 대상으로 JoinMap4.0 프로그램으로 연관군 분석을 수행하였다.
- Maximum Likelihood mapping방법으로 Haldane mapping function이 사용되었고, 전체 13개의 mapping node가 만들어졌다(LOD 3.0). 전체 coverage는 310.7Mb로 나타났으며, 33개의 마커가 12개의 연관군을 형성하였다. 55개의 마커에서 6개는 동일한 유전자좌로 나타나 제외하였으며, 16개는 연관군을 형성하지 못하였다.
- 다음 그림은 각 마커별로 251개체의 F2에서 보여지는 유전자형을 정리한 그래프이다.

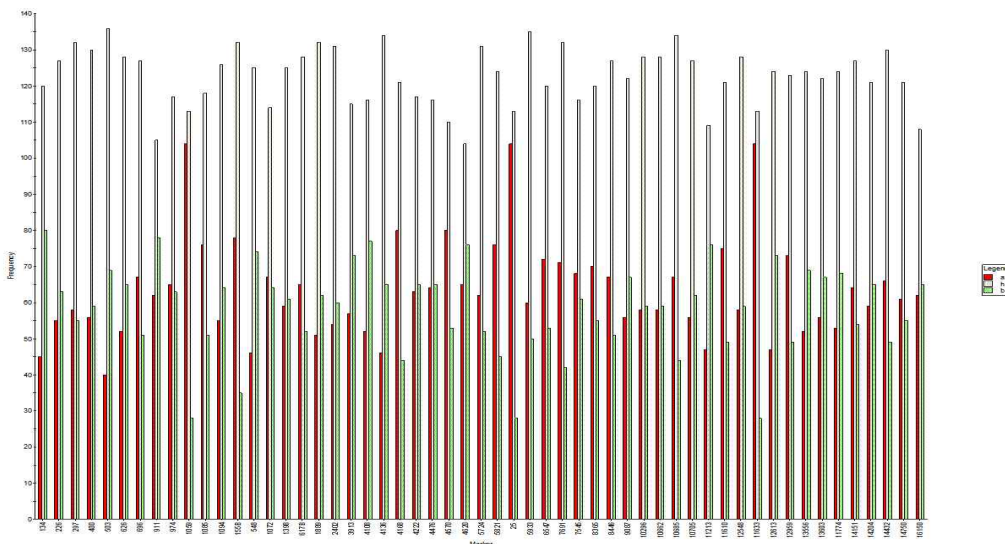


그림 1-6-2. EST-SSR 마커별로 251개체의 F2에서 나타난 유전자형 빈도

- JoinMap의 map calculation을 통하여 mapping된 12개의 연관군은 다음 그림 2-3과 같으며, EST-SSR 33개의 마커로 형성된 PI189225 x TS의 연관유전자지도이다.

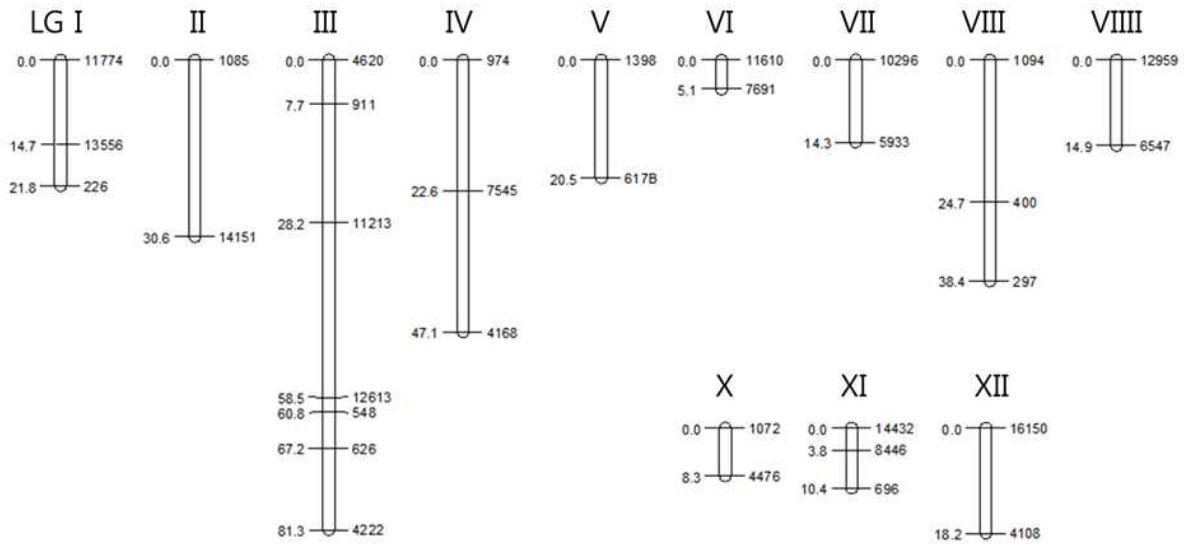


그림 1-6-3. EST-SSR 마커로 작성된 PI189225 x TS의 연관유전자지도

- 본 결과를 통하여 EST-SSR 마커를 이용한 연관유전자지도 작성의 세밀화는 현실적으로 매우 어려운 상황이었으며, 이에 따라 PI189225 x TS 집단의 F2:3세대에 대해 더 많은 분자적 다형성을 보이는 SNP 기반의 유전자지도 작성을 목표로 설정하였으며, 과제의 최종 목표인 RIL 집단을 이용한 유전자지도 완성을 위하여, 종내에서 새로운 2개의 집단을 새로이 양성하는 것으로 계획을 변경하였다.

7. 유전체 대량 염기서열분석을 통한 SNP 개발 및 분리세대 연관군 분석

가. 유전자지도 작성을 위한 SNP 마커의 적용

- 당해연도 연구에서 개발된 SNP 기반 마커의 전체적인 개략도는 다음 그림 1-7-1와 같다. 대량염기서열 분석을 통하여 수박 염색체별 contig을 align하였으며, 각 contig에 대한 SNP 마커를 개발하였다.

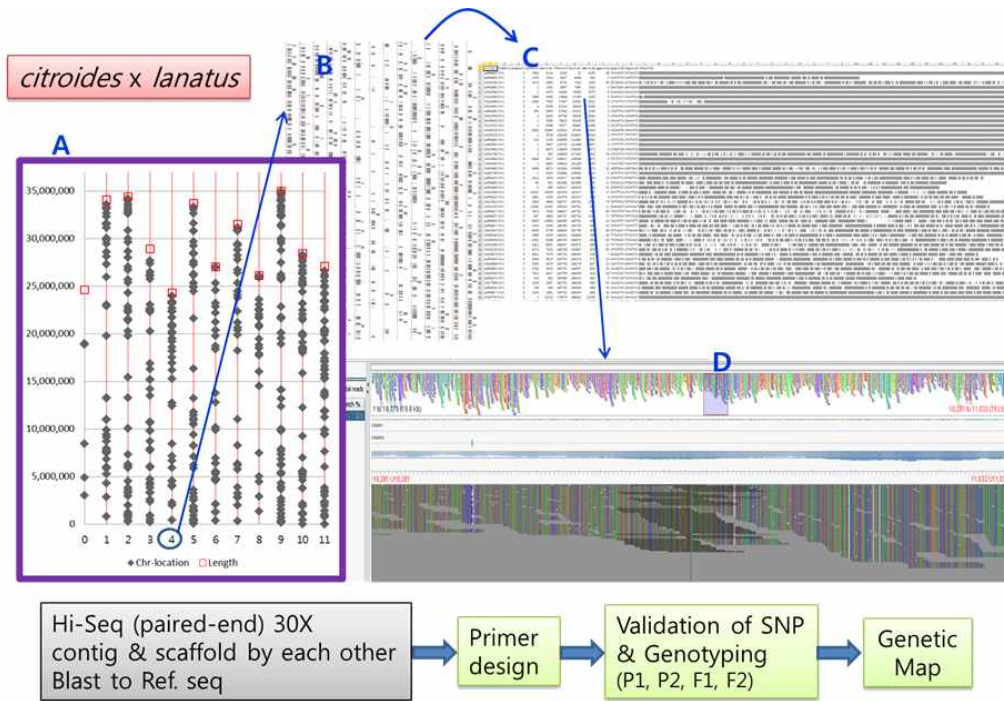


그림 1-7-1. PI189225 및 TS의 대량염기서열 분석을 통한 SNP 마커의 개발과 적용과정

- 작성된 개발된 SNP 기반의 마커들을 대상으로 3차년도에 보다 정밀한 연관 유전자지도를 작성하고자 하였으며, 전체적인 frame marker로서 활용할 수 있는 EST-SSR 및 HRM 기반 마커 세트를 확증하고자 하였다.
- 개발에 사용된 EST-SSR의 기본 사례는 그림 1-7-2와 같으며, 이를 통해 EST-SSR 유전자 지도(그림 1-6-3)를 확증하였다.
- 또한, 분석한 염색체별 SNP를 바탕으로 HRM용 마커 세트를 그림 1-7-3과 같이 개발하였다.
- 최종적으로, 수박 연관유전자 지도 작성시 frame marker로 사용된 103개의 HRM용 프라이머 세트는 표 1-7-1과 같다.

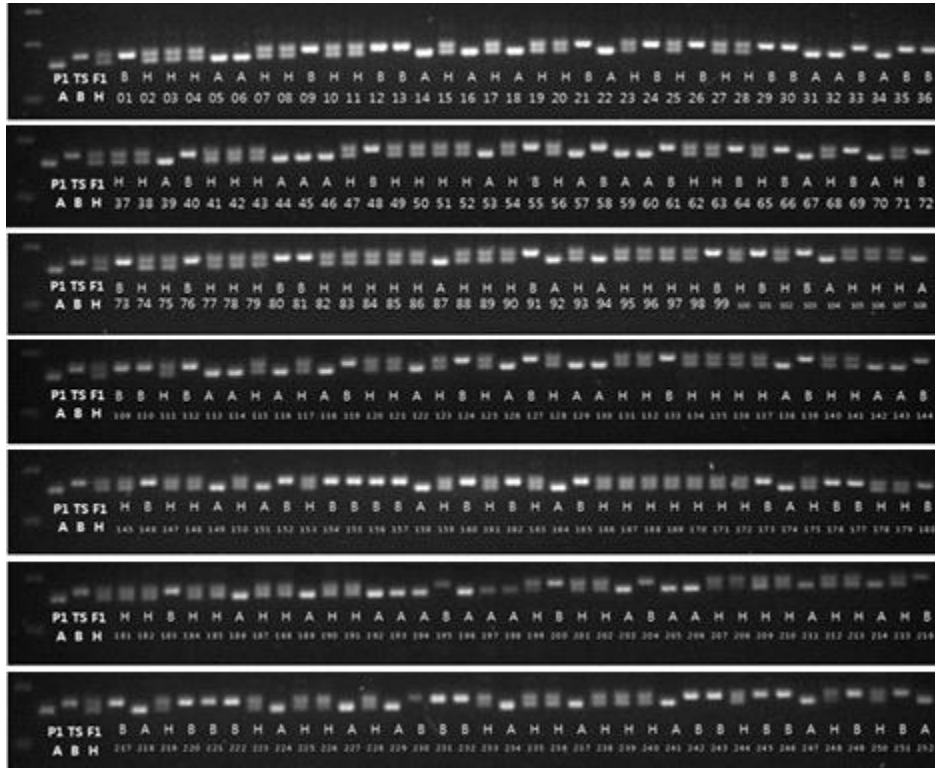


그림 1-7-2. S_14204 primer pairs (5' -TTTTCCCAAAATTTTCAACC-3' and 5' -TTGGAAGAAATCGCAAAC-3')를 사용하여 252 F2 후대를 분석한 결과

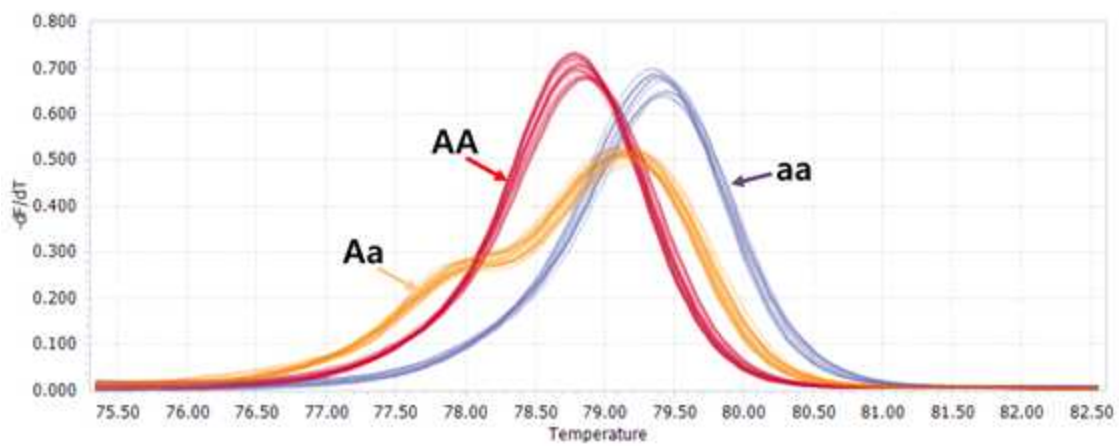


그림 1-7-3. HRM 마커로 개발된 H1_31983755의 사례. AA, PI 189225; aa, 'TS' ; Aa, heterozygous.

표 1-7-1. 수박 연관유전자 지도 작성시 frame marker로 사용된 103개의 HRM용 프라이머 세트

NO.	primer name.	Chr no.	Left primer seq.	Tm(°C)	Right primer seq.	Tm	product size(bp)
1-1	H1_1139637	1	ATCTTTAGGCTGCATGGGGT	59.07	GGCCAGAAATTTGCAACACC	58.49	115
1-2	H1_3300574	1	TCTTCGGATTTCTTCTTGGGC	58.29	TGCTGGGACCGATACAAGTT	59.02	102
1-3	H1_7295799	1	TCGCAAATTTTGGTACTGATTGT	57.55	CCGATTACAAGCTGGGAAAGA	58.01	101
1-4	H1_21990451	1	AACCAAACCAAAGTGCTGCA	59.1	CTTTTGTCAAGGCTGGCTGT	58.96	97
1-5	H1_25946361	1	GCAAGCGAGACATAGAAGCC	59.07	GTGATTTGGGGTGTGGCAT	59.02	82
1-6	H1_19777916	1	GCAAGGAGGAATACGAAGCG	59.07	GCGAAGTACCGGATTCCCTC	58.43	105
1-7	H1_14105271	1	CGAAGCGAGGATTCATGGTG	59.07	CAAACATCGTGGGGCTCTTG	59.48	94
1-8	H1_10350681	1	AGGTTCTGCATCAGTTAGAGT	58.82	GTGTTGCTGCAGTTGATGGA	59.05	86
1-9	H1_28104236	1	GCAAGATGACAGGCTCTTCC	58.62	GTTCTCCACCCGTTGCTTTT	58.97	114
1-10	H1_31983755	1	ACTCGCATGGCTTTGTTGTT	58.97	AACCCCGCTACCCAGTTTG	59.93	117
1-11	H1_33858189	1	ACAGAACTTGAAAAATTGGGCA	58.96	TCTCCCCAAGTCAAGTGAAA	58.88	80
2-1	H2_1190615	2	GCCACATGAAGTACCTGAGC	58.63	AGAGAAGGTGAAGGGTGAGA	57.3	83
2-2	H2_3582096	2	GGGATGGACGCATGGAGTTA	59.53	ACACCTTTGAAGCACTGCAG	58.97	116
2-3	H2_5715589	2	CACTCGCCAACCTGCAATT	59.04	ACTGGATCTTGGAGCTGCAA	59.31	110
2-4	H2_21506825	2	GCTGGAAGAGGCTGAGGTAG	59.54	TCAACTCCATTCTCTGCTCT	58.46	107
2-5	H2_23880009	2	GGTGGTGCAATATCTCGCTG	59.06	CAGAAAGGTGGAGGCTCAGA	59.02	107
2-6	H2_25429446	2	CCTTTGAGCTGAACCCCAAG	58.75	CCTCATGAGCTGCACTACAC	58.35	114
2-7	H2_28382210	2	ACCTAACACACAACCTCGGCA	59.53	ACCATTGAAGCAAGAAGAAGATC	57.11	117
2-8	H2_31182772	2	CGCTGTGGGTTAGGGATTCT	59.46	AACCAATAGCCTCCAAAGCC	58.15	101
2-9	H2_34138621	2	GCAGCACCAAAATGAAGGCA	59.97	AATGCCTCTGTTATGGCTGC	58.6	88

표 1-7-1. (계속)

NO.	primer name.	Chr no.	Left primer seq.	Tm(°C)	Right primer seq.	Tm	product size(bp)
3-1	H3_720274	3	CGCCGTCTGATCTCCTTGAA	59.83	GTGAAGGAGGCGTTTGCAA	58.69	104
3-2	H3_3442841	3	CAACGTCCAAAACAGAGCCA	58.98	GGGAGAAGAAAGTGTGCAGG	58.47	117
3-3	H3_7638731	3	TGCTACCCTCTTTGTCAATGG	57.93	TGGTACAGGTAATTTCAAAGCAG	57.04	102
3-4	H3_9892801	3	GGCAGCTTCGATCATTGGGA	58.62	GCAATTACCGAGCTGCTTGA	58.91	83
3-5	H3_12352543	3	GGAACAGGTATCAGAGGCAGA	58.89	TTGAGGGGAGTAAAAGGTGA	58.19	90
3-6	H3_17722437	3	TCCTTGTAAACTGGTTGCTGC	59.05	CTCCCGTACAGACCTACACC	58.9	85
3-7	H3_24068833	3	ACCATGCTGAGGTTTGTCT	57.34	CAAAGCATGACGGCCCTATC	59.05	103
3-8	H3_26015614	3	CTCCGAGCTCTCTCAAAA	60.04	CCTCAAAATGGGTGTGGCTG	59.4	118
3-9	H3_28362290	3	TCATCCCCTTCACTTCCTAGC	58.88	ACAATTTCGTACCTCAGCAGC	58.27	103
4-1	H4_973289	4	GCAACGTGACTCTTCCAAGG	59.13	ACTCACAAATGCCTCTGGT	59.23	92
4-2	H4_2672007	4	GCATTTGAAGTTCTGGAGGGT	58.48	TGATTTGTGGTGTGGTTCCA	57.56	95
4-3	H4_6869446	4	TGGAGAGCAGCTTTCATGGA	59.01	AGAGCAGCTAGACAGTCCCT	59.67	92
4-4	H4_10062792	4	CAGATCATATGCAGCACAAGGT	58.79	TGCAACCAGGTTACAATCATTCT	58.59	117
4-5	H4_14003431	4	GGTTTGGTCGAAGCTTCTCC	58.84	ATCGGCGGCAGATCTATGG	59.41	114
4-6	H4_18258684	4	TGGGAATGGTACTGATATTGGTT	57.27	CTTACAGAAGCAGCTAAATGGC	57.72	103
4-7	H4_22269948	4	TGGATGGATTCAATTCGAGGAA	57.5	CAATTGTAAGGAGGCTGAATTGT	57.35	117
4-8	H4_24210528	4	TCCTCCTTCCCCATCACAAC	59.01	GGAGGTCTTGGAGAGGTGTT	59.01	107
5-1	H5_504700	5	GGCGGTGTCTTCGTCTTCTT	60.32	CACGGGTTAATGGCCATCG	58.98	98
5-2	H5_2015268	5	ATCTTCGACACATTGCTGGC	58.91	CGGAGGAAGTGTATGCCAGA	59.18	115
5-3	H5_4130949	5	ATCCTTCTCCTGTTGCAGCT	59.01	GCGGTACTGACTCTCTGA	58.83	120
5-4	H5_7168186	5	CAAACAGCAGCAAAACAACCTCA	58.75	GCAGCCTTTGAACAATGCAT	57.91	101

표 1-7-1. (계속)

NO.	primer name.	Chr no.	Left primer seq.	Tm(°C)	Right primer seq.	Tm	product size(bp)
5-5	H5_10617096	5	GCATCACCAACATCCTCAGC	59.26	TAATGTGCTGCCCGTCAAAC	59.12	113
5-6	H5_25797036	5	ACTCAAATTAACGGCTCCACC	58.57	GAGGTCTCACATGAAGGGCA	59.38	80
5-7	H5_27020823	5	GGAATGAAGATGCCATGAATGC	58.35	AGGGTGTGTGACATTGAAAACA	58.64	97
5-8	H5_29070885	5	CCGTTGAAACTCCAAGCACA	58.98	TTTGCTGCCTCAACCTTTCC	58.96	119
5-9	H5_31248530	5	AGAATGTTGAATGGGCAAAAGG	57.72	TCCCCTTCTGCCAAACTACT	58.26	117
5-10	H5_32521174	5	GCACCTACTGTTCCAAAGGC	59.12	TCGTATTCTCGGGGTAAGT	58.97	105
6-1	H6_557806	6	CGAGCAGCAACAAGTCCAAT	59.12	CCTTCCCCTTGTACTCTGCA	59.02	109
6-2	H6_3060510	6	TGGAGTAGAAGCACTGGTGG	59.02	GAGGACCTTCTACTCCGAGC	58.97	112
6-3	H6_6144165	6	AGCAACCCAACCTTTGTCAGC	59.25	CCGTTGCATGAGACGATGAA	58.64	91
6-4	H6_8563166	6	AGCCTTCTAACCATTCAAAACCT	58.26	AGCCAGTTGATAATCTTTGGAGT	57.82	117
6-5	H6_10164474	6	GGTTCTGATGCGGTTGATATGT	58.79	TGCTTGCATATTGTTTCGTCACA	59.19	120
6-6	H6_14949828	6	AGGCCATGCAGAAGATAGCT	58.86	GCCTGAATGAGCTGTATGGC	59.05	87
6-7	H6_18818208	6	GCTTCGCCTCCACCTATAT	59.02	GGAGATCATAGCAGCCATGG	57.89	119
6-8	H6_21371216	6	GGTTGGAATCGTTTTGTGAAGG	58.36	AGTTGTAGAATCGCTTGCCT	57.23	98
6-9	H6_22354258	6	GATTAGGGATGCAGCAGAGG	57.82	CGTTTTCTCTCTGGCAGCTC	58.93	108
6-10	H6_24957937	6	TTGTGTCATTCTCGTTCCTTCT	57.66	TGTAGAAGCAGCCGAAGTGA	59.03	103
6-11	H6_26804068	6	ACAAAATCCGAATGCAGCCT	58.45	CTCATATGGTTGCTGCTGGG	58.68	98
7-1	H7_2623734	7	CCTCACAATCGATTATTCATCCC	57.13	GTGGCCAAACTTTCCCATT	58.94	116
7-2	H7_550632	7	CCAGCGGCAGAAACAAAACA	56.1	TCCGGTGGTACTAATGGGAG	58.22	80
7-3	H7_7620762	7	TCTGGCAGCATACTTGGCTA	58.8	TACGGGAAAATGCTGCATGG	58.9	118
7-4	H7_11803087	7	AGCCAGTTGTTTGTGGCCAT	58.88	TTGGGAGCAGCTAGTAACCC	59.09	114

표 1-7-1. (계속)

NO.	primer name.	Chr no.	Left primer seq.	Tm(°C)	Right primer seq.	Tm	product size(bp)
7-5	H7_14847763	7	TGCAGCGCTCTAACCCCTAAT	59.17	TGAGCAATTCCAGCAACAAGA	58.41	105
7-6	H7_18710538	7	CCTTAACAGCGCCGGAAC	58.83	TGGAGCAGAAAACGGAATGG	58.47	97
7-7	H7_22351664	7	GTCACTCGGCAATTTGAAGGA	58.85	CCCCTACAATGCCGAAAACA	58.46	118
7-8	H7_27328453	7	CGGAGTTGAAGAGTTTGTCCG	59.21	CACAAGTTCGCTGACAACA	58.99	100
7-9	H7_30561752	7	AGAACATAGCAGCAACAGAGT	57.31	CGCCTTGATGTCGATTGCAT	59.34	115
7-10	H7_28694414	7	TCTCTCAATCTCTCTGTGCA	58.31	CAAACCTTCCACCTTGCTT	58.59	118
8-1	H8_5411567	8	TCCTACTGCATAGCCGTGAG	58.97	GCAATTTCCAATTCTGCACGG	59.01	100
8-2	H8_15936453	8	AGAAGGTTGCTCTATGTTGACA	57.38	TGAGCGCTTAAACACCTCTG	58.2	119
8-3	H8_17426502	8	ACTGTTCTGATCACCGTCGA	58.76	CCGTTCTTACTTCCATGGCG	58.99	102
8-4	H8_19939558	8	CGAGGCAGCAAACCCCTAAAT	58.54	AGAGCTTTCTTGAGTTTCAGTGA	57.97	117
8-5	H8_21765342	8	CTCATACCACAAAGCCACAAGA	58.59	ACCCCTTTCTTATTTCTCCCTTT	57.38	100
8-6	H8_24250257	8	TCTGCCATAAGACACGACCC	59.46	GCCGCGATGATACAGAAGAC	58.87	99
8-7	H8_24938756	8	CGACGACCAAGAAGAAAGGG	58.57	AGATCCTGCTCTGCCACTG	59.09	98
8-8	H8_26033809	8	CTCCTAACAGTGGTGCCTCT	58.73	TGAAAGCACACAAAACACATGA	57.55	119
9-1	H9-462,169	9	ACCCTCTTTCTCTAATCCCGAC	58.97	TCAGGTCCCCTAGAAAGAGA	57.11	121
9-2	H9_3569418	9	AGCTGCTGTTATTTCTGCCAG	58.91	GGTCGAGGAGTTGTTGAGGA	59.03	87
9-3	H9_7568675	9	AGCTCCTGTTCTGATCAGT	58.05	GAAGAATCAGGCACGGTAGC	58.71	92
9-4	H9_10570920	9	TGGAGCTGTTTATGATGCTTGG	58.98	CAGAAACCATGCCGATCTCA	57.97	120
9-5	H9_14006026	9	ACGGCTGGATAAGAAAACGA	57.25	TATAGGAAACCCAGCTGCGG	59.53	98
9-6	H9_18765573	9	GGAACAACTTGGGAGAACTTTT	57.66	GAAAGGTGTCTGCCATGCTT	58.75	119
9-7	H9_22236411	9	GCATCCTCGACTGCTTCCTT	60.11	TTCTTCTGGCAGGTCAAGCT	59.23	80

표 1-7-1. (계속)

NO.	primer name.	Chr no.	Left primer seq.	Tm(°C)	Right primer seq.	Tm	product size(bp)
9-8	H9_29631324	9	TGCTAGCGTATGAAGAATGGT	57.18	CTCGCTGTGTCCCAAATTGT	58.76	94
9-9	H9_31290156	9	CCTCCTTCACTGTTGCTTCG	58.85	CGGAGCGTGAAAAATGTAAGA	58.66	120
9-10	H9_34375576	9	CTGCAAACCAACGGAAAAGC	58.79	GGTTCATTTCTTTTCCTTTCCCC	58.11	103
10-1	H10_1136405	10	CGCCGCCTTCAGAGTTCT	59.74	AGCGCATGACTCTCAGTTGA	59.39	117
10-2	H10_77781	10	TGTAGTGAAGCCAAGGAGCT	58.65	CCTGGATATTGCTGCTTCC	58.39	108
10-3	H10_3814552	10	GCAACCACCGAACGTACC	58.75	GCTCAAGAGACTGAAGCGTT	58.21	95
10-4	H10_14774503	10	TCAAGAGTTGTTGGCCCTCT	58.86	AGTGGAAAGAAGCCGAGGAA	58.94	85
10-5	H10_17031550	10	AAATGGCCGCATCAGTTTTC	59.47	TAGTGGGAATTGACCGAGCC	59.46	81
10-6	H10_20280016	10	GGTGTGAAGGGATAAGGGC	58.24	AAGGAGAATTCGAGCTGCCT	59.09	110
10-6	H10_20282200	10	TCGTCTTGATCTCACAGTTCCT	58.84	ATTGCTGCATTGTCCTCTGG	58.53	119
10-8	H10_24863583	10	CACAAAGTAAGAAGTGGAAACCCT	58.54	GCAAGGCAGAAATCAGCATC	57.79	84
10-9	H10_27230553	10	AGCTCCAAAGACGATTCCAA	57.14	ATCACACAACCTCCGAGCTCT	58.74	111
0-10	H10_28116612	10	GGAGTCTATGCCAGTTCCTCA	58.89	GCCCATCTCCCACTCAA	59.31	112
11-1	H11_1420835	11	CGAATCTTCAAGCTGCACGA	58.93	GAAGCCGAATCTCCAGTCCT	59.17	119
11-2	H11_7729920	11	ATGGTGTCTGCCTCCTTTTG	58.08	TATCACAGTGGGGCTCAAGG	59.09	85
11-3	H11_660285	11	TCTTTACTTGGACAGGGCGG	59.68	GCCCCACATGTGATAAGATCC	58.49	106
11-4	H11_11000525	11	CAAAATGGTGGCCGCCTAG	59.19	CGACCCACAAGCTCCAAAAG	59.41	120
11-5	H11_14705228	11	GGCCCTCCAATCTGAATTTTCT	58.63	AGAGACTTAATCGGCTGGTGT	58.82	100
11-6	H11_18041178	11	CGAGGTGTTCTAGGAGTTCGA	58.92	GCAGTTGGATGTGCGATTAC	57.54	109
11-7	H11_21050514	11	GAACAAAAGAATGAAACAACGCA	57.31	CCTTTGGTTGTTGACTGTTGT	57.13	101
11-8	H11_24066904	11	TGCAACCTGTGAAATTCAGA	58.06	TCCCTGTTGCTTATTTTACTTC	57.29	120
11-9	H11_27038071	11	GACAAAGTCGACAGCATTGG	57.4	GCCCTCCCTCCATCTACATC	59.02	85

나. EST-SSR 및 HRM 마커를 frame marker set으로 활용한 연관유전자 지도

- 최종적으로 252개의 F2 분리 세대에 대하여, segregation distortion이 최대한 필터링된 frame marker들인 33개의 EST-SSR 마커와 103개의 HRM 마커가 grouping 및 ordering 된 연관 유전자 지도를 작성하였다 (논문발표: Rhee et al., HEB, 2015.10)

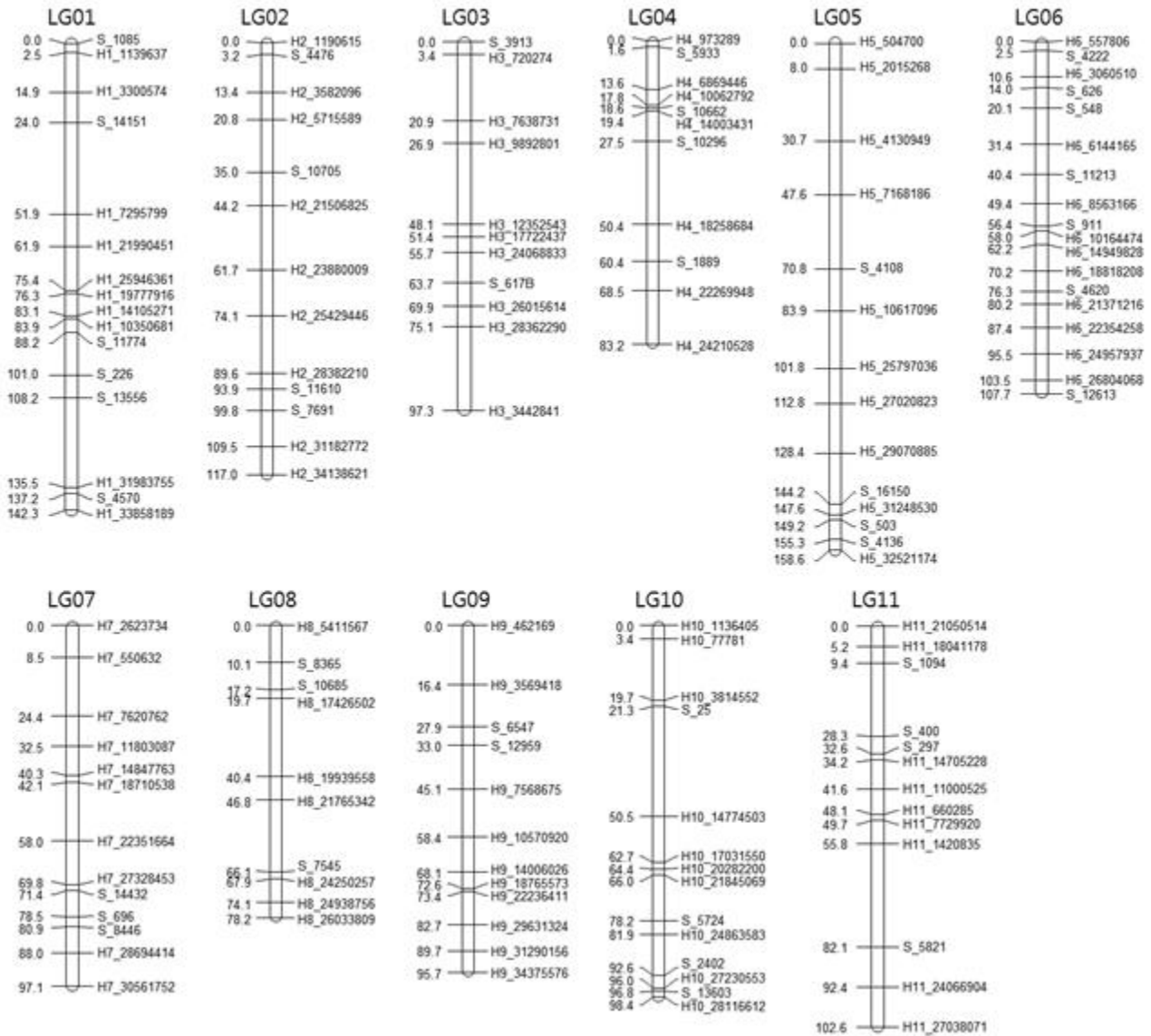


그림 1-7-4. EST-SSR 및 HRM용 마커 세트를 frame marker로 사용하여 작성된 수박의 연관 유전자 지도.

다. Genotyping-by-sequencing(GBS) 방법을 통한 SNP 개발 및 분리세대 연관군 분석

(1) GBS를 통한 유전자지도 작성 개요

○ 기존 유전자지도 작성 현황 및 문제점

- 연관유전자지도는 육종을 위한 연관마커의 개발시 매우 유용하며, 특히 QTL을 결정함에 있어서도 고밀도 연관유전자지도 작성은 필수적이다.
- 세계적인 재배면적을 보여주는 수박은 재배종에서 매우 좁은 유전적 배경을 갖는 이유로 그동안 많은 학자들이 기존의 분자마커 확보방법인 RAPD, AFLP, SSR 등을 통한 유전자지도 작성을 시도하였으나, 매우 적은 마커 다형성과 극심한 segregation distortion 등으로 인하여 만족스러운 결과를 얻지 못하였다.
- 본 과제에서도 2년차에 800여개의 EST-SSR을 활용한 연관유전자 지도 작성을 시도한 바 있으나, 12개의 연관군에 33개의 SSR 만을 올릴 수 있었다. 이는 다른 박과작물인 오이와 멜론에서 상호 transferable EST-SSRs이 활발히 활용되고 있는 상황과 비교할 때, 수박의 경우는 상대적으로 매우 어려운 상황임을 반증한다.
- 그동안 수박 연관유전자지도 및 마커개발에서 많은 시도가 있었음에도 뚜렷한 가시적 성과를 낼 수 없었던 이유는 재배종의 분자적 다형성이 좁은 것이 가장 크다고 할 수 있다.
- 이에 따라, SNP 기반의 HRM 마커를 통합하여 연관유전자 지도를 작성하였으나 (그림 1-7-4), QTL 분석을 통한 마커의 발굴에는 한계점을 드러내었다.
- 따라서, F2 각 개체별로 매우 다량의 SNP를 발굴한다면 손쉽게 high-throughput 으로 유전자지도를 작성할 수 있으나, 그 비용이 문제가 되었다. 최근 개발된 GBS의 방법은 이런 비용 측면을 어느 정도 접근가능한 수준으로 낮추었으며, 한편 고밀도 유전자지도 작성이 가능한 수준의 SNP를 제공하는 연구결과들이 전 세계적으로 제시되고 있었다.

○ SNP marker를 활용한 수박 연관유전자지도 작성

- 차세대 게놈서열분석 (NGS)의 유용성과 경제성은 날로 증가하고 있는데, 박과작물에서도 2012년 오이, 2013년 수박 및 멜론의 전체 게놈서열이 완성되어(pseudo-chromosome), 표준 게놈서열(reference genome sequence)을 이용한 염기서열재분석(resequencing)이 활발하게 이루어지고 있다.
- 본 연구에서는 매우 높은 다형성을 나타낼 수 있는 단일염기서열변이(SNP)에 기반한 고밀도 유전자지도를 작성하고자 하였다. 즉, 수박의 양친집단에서 F2 분리세대들의 염기서열 분석을 수행하고, 이를 수박 표준유전체(www.icugi.org)에 mapping하여 얻어지는 SNP들을 마커로 활용하여 연관유전자지도를 작성하는 방법이다.

○ GBS 방법을 활용한 수박 연관유전자지도 작성

- 게놈을 대상으로하는 resequencing은 아직도 적지 않은 비용이 소요되며, 특히 F2의 후대 세대를 대상으로 할 경우는 대략 120여개체를 기준으로 할 때, 상당한 분석비가 소요된다.
- 따라서, 특정 제한효소로 자른 주변 서열을 결정하여 비교하는 경제적인 Genotyping By Sequencing (GBS)이 최근 소개되었으며, 이 방법을 사용하는 경우 경제성 뿐만 아니라, 게놈의 complexity를 낮출 수 있는 장점이 있다.
- 최근에는 표준유전체가 없는 경우에도 모부분에 비교한 genotype을 결정할 수 있는 결과

들이 많이 소개되어 더욱 각광받는 연구방법이라 할 수 있다.

- 본 연구에서는 수박의 고밀도 유전자지도 작성을 위하여 F2 분리세대 개체들 각각에 대하여 multiplex sequencing을 수행할 수 있는 GBS 방법을 적용하였으며, 각 SNP를 기준으로 한 A, H, B의 genotype 변환을 수행하여 연관유전자지도를 작성하였다.

(2) 연구방법

○ 분석집단 및 개체 DNA 분석

- TS(P1: *C. lanatus* var. *lanatus*)와 PI254744(P2: *C. lanatus* var. *citroides*) 및 QTL 분석을 위한 PI189225와 TS이들의 교배 후대인 F2세대 각 309개체 및 165개체를 2회에 걸친 교배를 통하여 확보하였다.
- 앞에서 genomic DNA 추출, 각 sample당 1ug의 dsDNA를 준비하였다.
- 미국 코넬대학의 IDG 게놈분석센터에 의뢰하여 각 DNA의 QC, 제한효소 처리, 라이브러리 제작 및 Illumina GAII로 resequencing을 수행하였다.
- 기본적인 라이브러리의 제작과정은 아래와 같다.

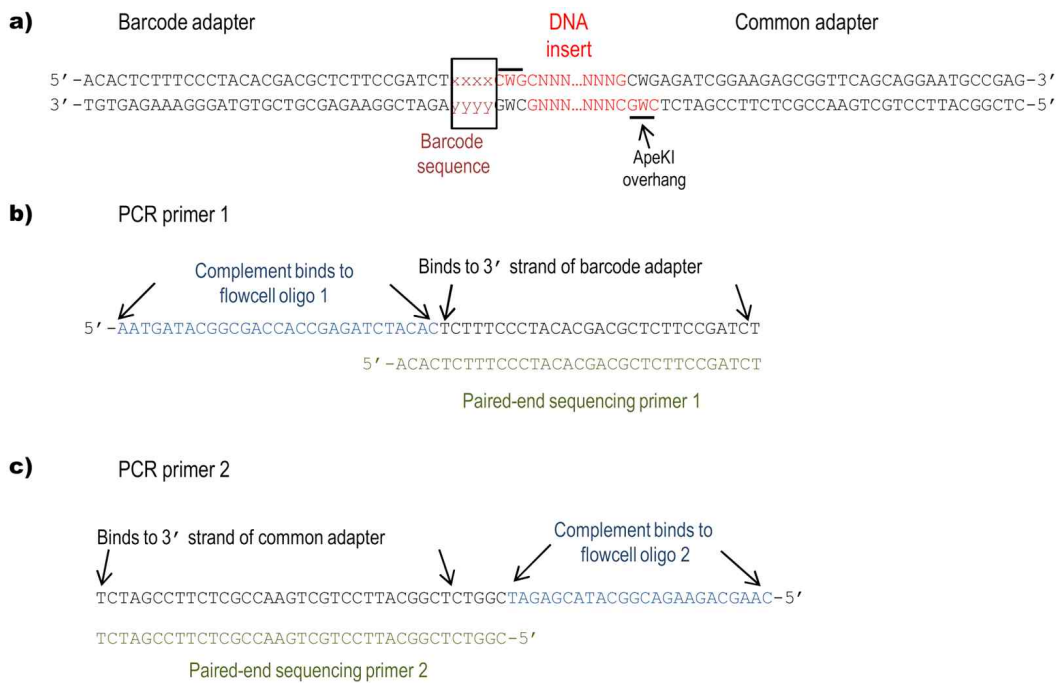


그림 1-7-5. GBS를 위하여 제작된 바코드 어댑터서열 위치 및 PCR primer 서열

CTCC	TTCTC	TCGTT	CTATTA	AATATGC	TGCAAGGA
TGCA	AGCCC	GGTTGT	GCCAGT	ACGTGTT	TGGTACGT
ACTA	GTATT	CCAGCT	GGAAGA	ATTAATT	TCTCAGTC
CAGA	CTGTA	TTCAGA	GTACTION	ATTGGAT	CCGGATAT
AACT	ACCGT	TAGGAA	GTTGAA	CATAAGT	CGCCTTAT
CCGT	GCTTA	GCTCTA	TAACGA	CGCTGAT	AACCGAGA
CGAT	GGTGT	CCACAA	TGGCTA	CGGTAGA	ACAGGGAA
GTAA	AGGAT	CTTCCA	TATTTTT	CTACGGA	ACGTGGTA
AGGC	ATTGA	GAGATA	CTTGCTT	GCGGAAT	CCATGGGT
GATC	CATCT	ATGCCT	ATGAAAC	TAGCGGA	CGCGGAGA
TCAC	CCTAC	AGTGGA	AAAAGTT	TCGAAGA	CGTGTGGT
TGCGA	GAGGA	ACCTAA	GAATTCA	TCTGTGA	GCTGTGGA
CGCTT	GGAAC	ATATGT	GAACTTC	TGCTGGA	GGATTGGT
TCACC	GTCAA	ATCGTA	GGACCTA	ACGACTAC	GTGAGGGT
CTAGC	TAATA	CATCGT	GTCGATT	TAGCATGC	TATCGGGA
ACAAA	TACAT	CGCGGT	AACGCTT	TAGGCCAT	TTCTTGGA

그림 1-7-6. GBS 분석시 96-plex 서열분석을 위하여 사용된 바코드 서열

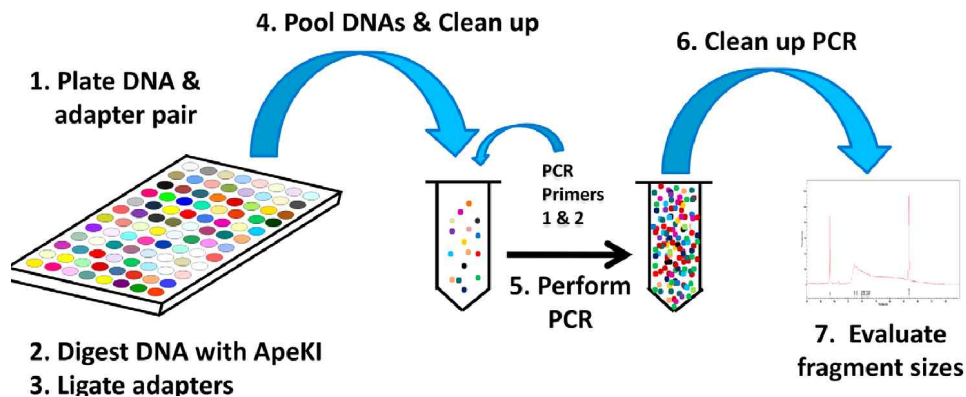


그림 1-7-7. GBS 분석을 위한 library 제작과정

- 얻어진 read taq 들은 trimming과 바코드 filtering과정을 통해 FASTQ 데이터를 도출하였으며, watermelon genome database(www.iwgi.org)에서 제공하는 reference sequence(표준염기서열)와 비교하여 BWA 알고리즘으로 mapping 한 후에 SNP를 calling (vcf) 하고, HapMap file을 작성하였다.
- HapMap file은 코넬대학의 Burkler 박사 연구실에서 개발된 TASSEL GBS pipeline에서 분석된 standard file format으로 post SNP-calling filtering이 되지 않은 파일과 missing sequence와 allele frequency에 대한 추가적인 filtering이 수행된 파일로 제공되었다.
- 작성된 VCF는 각 allele에 대한 coverage depth 정보가 들어 있는 SNP 정보에 대한 추가적인 format으로 코넬대학의 GBS pipeline에서 VCFtools를 사용하여 작성되었다. 이 파일 역시 TASSEL 4.0에서 확인이 가능하다.

○ Genotype변환 및 유전자지도 작성

- GBS는 분석 특성상 다양한 read depth를 보여 sequence의 imputation이 쉽지 않으며, 특히 분석 비교된 염기서열들을 유전자지도 작성용 genotype으로 변경하기가 난해할 수 있다.

- 본 연구에서는 minor allele frequency, read depth 등을 filtering 할 수 있는 computational analysis 분석기반을 구축하여 연구자가 원하는 형태로 신뢰할 수 있으며 간편한 유전자형 변환을 수행하였고, 이를 웹서버 서비스 형태로 제작하였다.
- 연관유전자지도 작성은 MstMAP, MadMapper, JoinMap 등을 활용하였으며, 도출된 모부분 및 F2의 genotype들을 이용하여 가장 신뢰할 수 있는 유전자지도를 작성하기 위하여 iterative frame mapping을 수행하였다.
- 유전자지도 작성시 염색체별 재조합 비율 및 각 SNP 마커의 non-distorted segregation에 대한 검증을 2-D heat map (pymatrix 사용)로 수행하였으며, 최종적으로 JoinMap4.1에서 유전자지도 chart를 작성하였다.
- 각 염색체별 누적 변이의 수를 plotting 방법으로 조사하여 SNP의 정상적인 분포 및 패턴을 조사하였다.
- 또한 최종 작성된 고밀도 연관유전자 지도의 활용을 위하여 수박의 종자크기에 대한 QTL을 수행하였다 (4절에 자세히 기술).

(3) 연구결과

○ GBS 분석결과 요약

- Illumina GAII의 각 sequencing lane에서의 read 및 taq 수에 대한 요약은 아래와 같다.

표 1-7-2. PI254744 x TS 집단 유래 F2에 대한 GBS 분석량 (Tags로 표시)

FastQ file	Barcodes found in lane	Total # of reads per lane	Total number of good barcoded reads	Resulting # of Tags
C2YUNACXX_1_fastq.gz	96	204784318	188118658	14925051
C2YUNACXX_2_fastq.gz	96	225242617	192119122	25596886
C2YUNACXX_3_fastq.gz	96	233682307	206692301	23552203

- 라이브러리 제작을 위해 사용된 Barcode 및 PI254744와 교배된 후대 집단의 대표적인 몇 가지 개체들의 DNA QC 결과는 다음과 같다

표 1-7-3. 각 F2 개체별 barcode 및 QC 결과 사례

Flowcell	lane	Barcode	ID	good barcoded reads	plate	row	col	Fail?
C2YUNACXX	1	AAGCGATA	F2_045	1162705	P2TS_WM0 1	F	7	pass
C2YUNACXX	1	AATGTCT	F2_077	1652104	P2TS_WM0 1	C	11	pass
C2YUNACXX	1	AATTCTGT	F2_012	2056978	P2TS_WM0 1	G	3	pass
C2YUNACXX	1	ACCGGTC	P254744	1054421	P2TS_WM0 1	E	1	pass
C2YUNACXX	1	ACGTC	P254744	1213563	P2TS_WM0 1	B	1	pass
C2YUNACXX	1	ACTAGGAA	F2_088	2673722	P2TS_WM0 1	F	12	pass
C2YUNACXX	1	ACTCCGC	F2_028	1598830	P2TS_WM0 1	E	5	pass
C2YUNACXX	1	ACTGCCA	F2_009	1981838	P2TS_WM0 1	D	3	pass
C2YUNACXX	1	AGACAAGT	F2_065	2121643	P2TS_WM0 1	A	10	pass
C2YUNACXX	1	AGACTGAA	F2_047	1839261	P2TS_WM0 1	H	7	pass
C2YUNACXX	1	AGATACGA	F2_072	2259291	P2TS_WM0 1	G	10	pass
C2YUNACXX	1	AGCAGATA	F2_021	2725704	P2TS_WM0 1	H	4	pass
C2YUNACXX	1	AGTCGTGT	F2_011	1790262	P2TS_WM0 1	F	3	pass
C2YUNACXX	1	AGTGGCTT	F2_073	2986661	P2TS_WM0 1	H	10	pass
C2YUNACXX	1	AGTTACT	F2_078	1486454	P2TS_WM0 1	D	11	pass
C2YUNACXX	1	ATATGTC	F2_043	685226	P2TS_WM0	D	7	pass

- 작성된 2개 집단 중 PI254744 x TS의 집단에 분석결과를 살펴보면 다음과 같다.
- Read tag들은 BWA algorithm을 이용하여 reference 서열에 align하였고, 그 결과 총 2,010,036tag이 얻어졌으며, 977,168tag이 특이위치에 align 되었고 (48.6%), 한편 103,217 tag (5.1%)은 여러 위치에 align 되었고, 46.3%는 위치를 결정하지 못하였다.
- 획득한 총 VCF SNP는 737,087개이며, filtering을 한 28,898 HapMap SNPs와 filtering이 안 되었을 때 82,304 HapMap SNPs로 나타나 대량의 SNP marker가 얻어졌다
- VCF를 참조하여 얻어진 sequencing mean depth는 13.6 ± 2.6 이었으며, missing은 0.26 ± 0.09 로 나타나 96-plex로서는 매우 높은 수준의 read depth를 보여주었다
- 모부분에 대한 SNP 개수는 filtering을 하지 않은 경우 30,725로 나타났다
- 개체별 및 전체적인 read depth는 다음과 같다.

표 1-7-4. Illumina GAI에서 분석된 read depth 및 missingness 요약

	mean	median	standard_deviation
individual depth	22.179	20.496	11.529
site depth	22.179	20.377	15.941
individual missingness	0.081	0.076	0.053
site missingness	0.081	0.003	0.207

○ 수박 SNP 마커 기반 고밀도 연관유전지도 작성

- 120,854 VCF SNP들을 filtering (mAF, 0.1)하여 9,921 SNP를 얻었으며, 이 중에서 heterotype에 대한 mAF를 결정하여 1,893개의 SNP를 얻었으며, 이들을 사용하여 연관유전지도 분석용 Genotype으로 변환하였다.
- Genotype으로의 변환은 본 연구실에서 제작한 다양한 filtering option 설정이 가능한 자동 변환 tool을 이용하여 수행하였다.

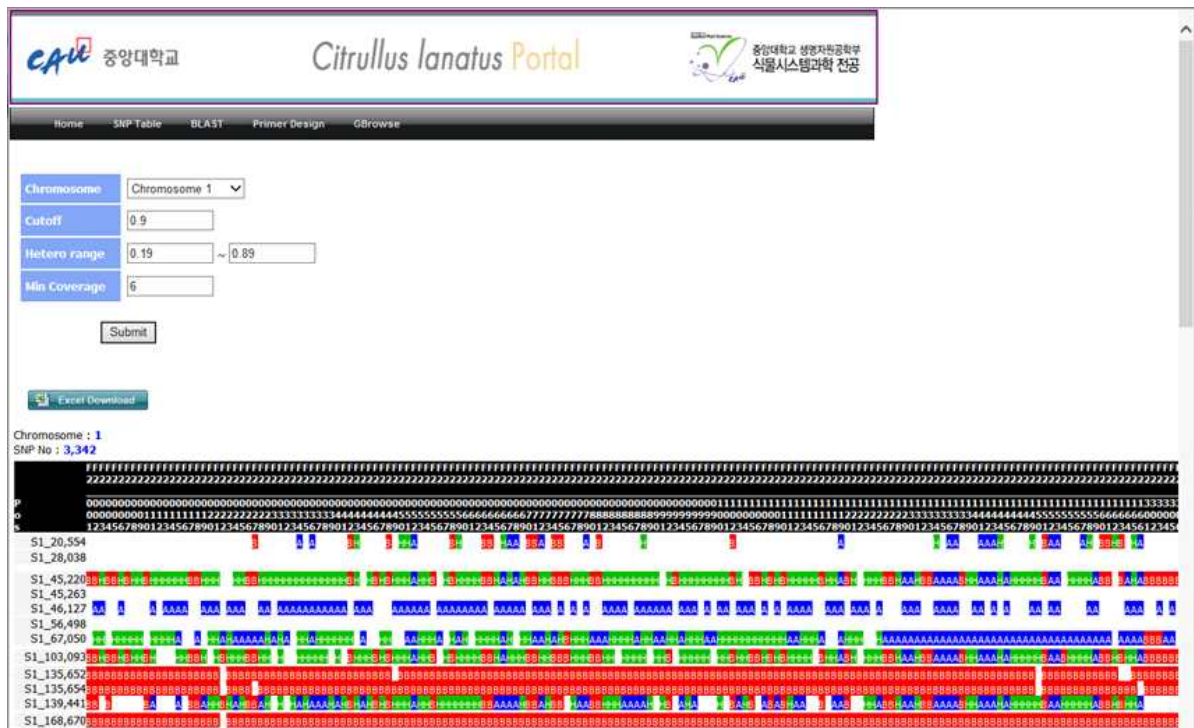


그림 1-7-8. 자체 개발한 automatic VCF to genotype analysis tool 분석 사례

- 변환된 genotype을 이용하여 MstMap 프로그램에서 연관군을 분석한 결과, 원래 염색체 수와 동일한 11개의 연관군을 형성하였으며, reference에 각 염색체별로 mapping되었던 위치와 동일한 연관군을 보여 각 SNP의 id 변동이 없어 이들을 활용한 frame mapping이 수행되었다.
- 확실한 mapping 위치를 잡기 위하여 다양한 mAF를 적용한 fixed 마커들을 선별하여 frame mapping을 수행하였으며, 각 유전자형에서 singleton들은 SMOOTH 알고리즘을 적용한 genetic imputation을 수행하였다.

- 최종적으로 JoinMap 4.1을 사용하여 연관유전자지도를 작성하였다.
- 작성된 유전자지도는 1,922개의 공우성 마커로 활용할 수 있었으며, 545의 genetic bin으로 구성된 총 1,431.3cM의 11개의 연관그룹을 형성하였다 (Haldane mapping function; LOD>10, Chr05, 10은 LOD>3.0)
- 유전자지도의 마커간 거리는 평균 1.2cM으로 나타났으며, genetic bin용 마커 사이의 평균 거리는 약 2.5cM으로 계산되었다..

표 1-7-5. 염색체별 VCF SNP 및 Genetic bin의 개수와 map length(cM).

Chr	No of VCF SNPs	No of Genetic BINs	Map Length (cM)
1	215	66	176.9
2	220	57	153.6
3	181	46	120.0
4	120	37	90.1
5	170	58	130.1
6	212	48	117.6
7	89	33	138.2
8	136	46	103.2
9	205	60	161.0
10	195	47	118.6
11	179	47	122.0
Sum	1,922	545	1,431.3

○ 작성된 연관유전자지도의 검증

- 최종적으로 위치가 결정된 SNP 마커들은 CheckMatrix(py_matrix_2D.py)로 분석하였으며, 각 염색체별로 2차원 heat plot으로 visualization 할 수 있었다 (그림 1-7-9).

○ 작성된 연관유전자지도의 SNP 분포

- 그림과 같이 최종 filtering된 SNP의 총량과 발견된 SNP의 incidence를 각 염색체의 위치별로 plot을 그려보면, SNP가 매우 적게 발견된 지역은 표준유전체에서도 동원체 지역으로 파악되는 위치와 거의 일치함을 알 수 있었다 (그림 1-7-9).

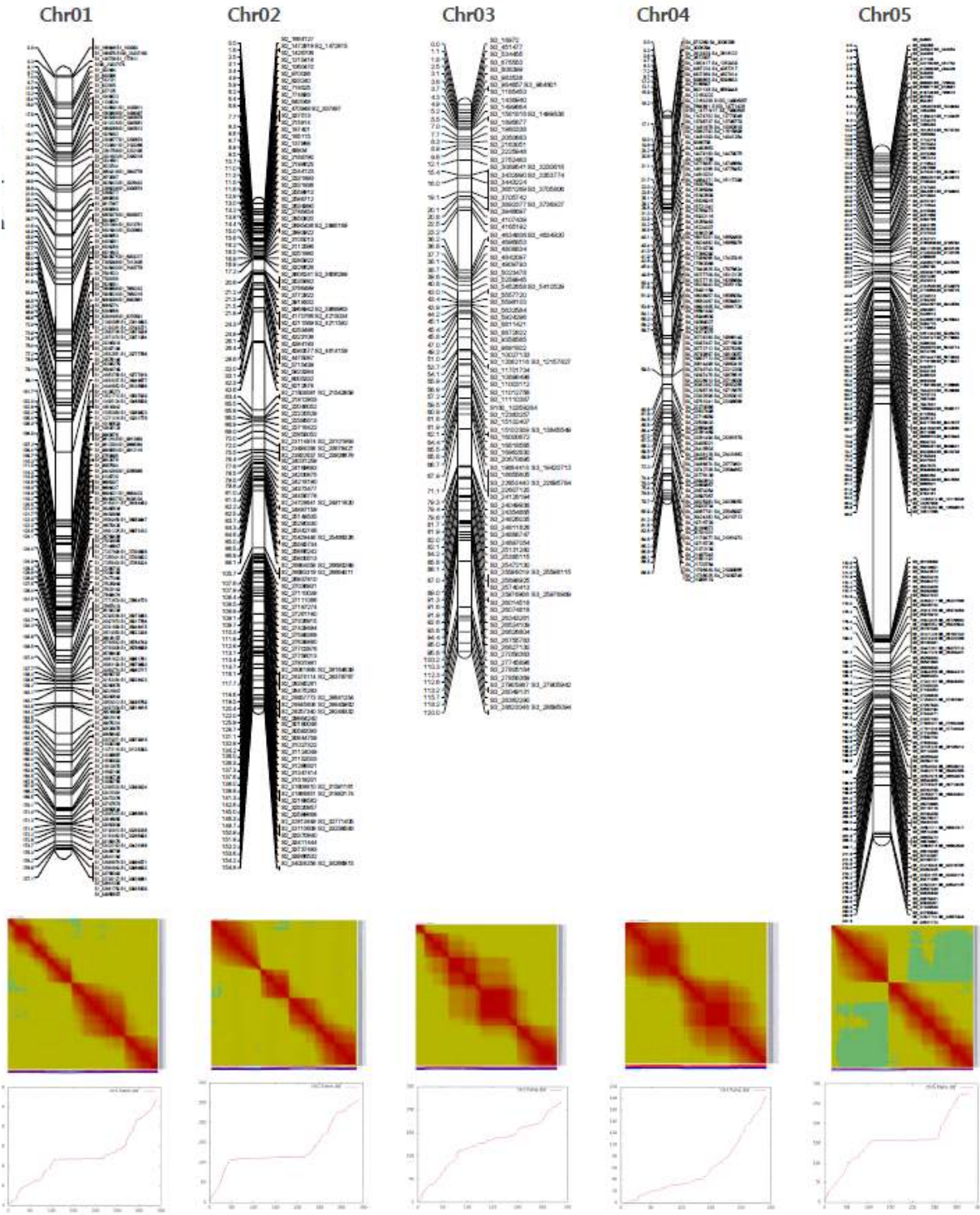


그림 1-7-9. GBS를 이용한 SNP기반의 수박 고밀도 유전자지도. 각 염색체별로 pymatrix 2D chart를 작성하여 유전자지도를 검증하였으며, 염색체별로 축적된 SNP의 위치별 개수를 plotting하였음 (계속).

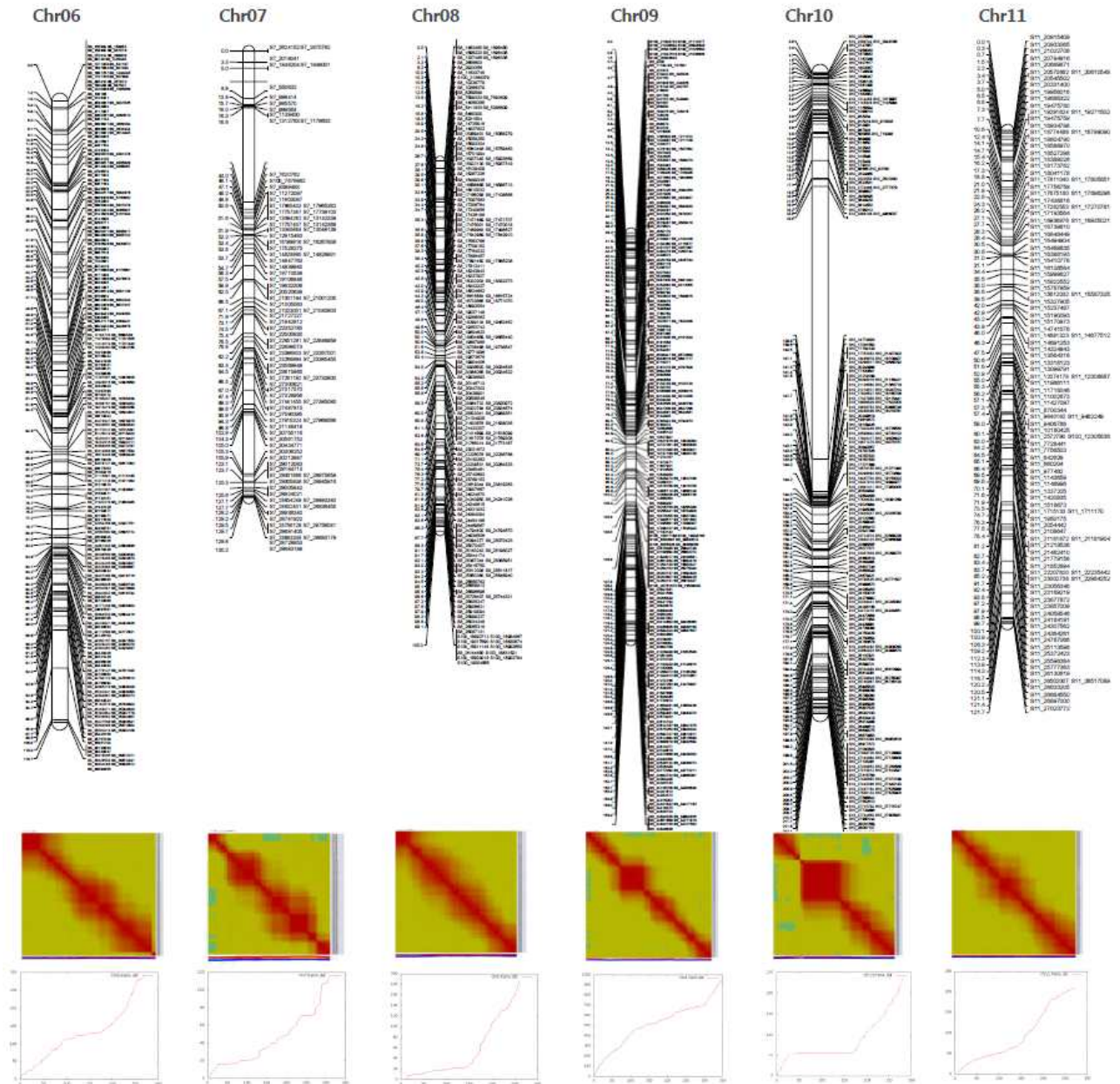


그림 1-7-9. 계속

○ 작성된 연관유전자지도의 활용

- 작성된 수박 연관유전자지도는 수박의 경우, GBS를 활용하여 처음 제작된 고밀도 유전자 지도로, 향후 다양한 표현형 검정이 이루어지면 면밀한 QTL 분석과 후보 마커들을 도출할 수 있을 것으로 기대하였다.
- 작성된 연관유전자지도를 활용한 흰가루병 저항성 및 종자크기에 관련한 QTL 분석이 가능하게 되었으며, 손쉽게 표현형과의 회귀분석을 통한 유전자좌의 분석이 가능할 것으로 판단되었다.

제 2 절 수박 흰가루병 저항성 마커 개발 및 QTL 분석(제1세부)

1. 흰가루병 race1W 특성 조사 및 접종법 확립

수박 흰가루병원균 (Powdery Mildew; *Podosphaera xanthii*, formerly *Sphaerotheca fuliginea*)은 2가지의 race가 우점하여 분포하고 있다고 알려져 있으며, 국내에는 주로 race 1W가 발견되고 있다. 흰가루병원균의 전염은 월동 후 4월 이후에 자낭각이 터져나온 자낭포자가 1차 전염원이 되며, 자낭포자가 발아하여 침입균사를 형성하고, 표피조직에 흡기가 형성된 후 균사가 자라서 균총이 형성된다. 접종 6-8일 후에 분생포자를 볼 수 있으며, 이병 앞에서 분생포자는 주로 야간에 15-35C에 형성되고 온도가 28C이고, 습도는 45-85%에서 가장 많이 형성되는 것으로 보고되었다 (한국작물보호협회). 분생포자의 비산은 주간에는 특히 10-15시 사이에 활발하며, 12-3시까지 최대가 되고 많은 날의 고온건조때 활발하며 제2차 전염원이 된다. 국내에서는 주로 장마철 하우스 재배에서 다량 발생한다.

흰가루병원균에 대한 감수성의 수박은 감염시, 생장이 억제되며 심할 경우, 과실의 수량과 품질에 극심한 영향을 줄 수 있다. 본 연구에서는 흰가루병원균 race1W에 대한 저항성인 PI254744를 공여친으로 하고, 반복친으로 재배종 계통인 SBB 및 45NC를 사용한 NIL (near isogenic line)을 대상으로 저항성 유전자의 연관마커를 개발하고자 하였다.

가. 수박 흰가루병원균의 접종 및 race 판별

수박에서 흰가루병원균의 저항성 및 감수성 계통을 확인하기 위한 포자검정, 접종밀도를 결정하였으며, race를 판별식물을 통하여 확인하는 연구를 수행하였다.



흰가루병저항성 (PI254744)

흰가루병 이병성 수박

병저항성 지표

그림 2-1-1. 흰가루병 저항성 및 이병성 표현형과 race 판별식물(멜론)

접종을 위한 접종원의 제조는 수박 잎에 발병한 흰가루병원균의 균사체를 멸균된 이쭈시개로 잘 끊어낸 후, 멸균 비이커에 멸균수 200mL를 넣고 흰가루병원균을 잘 섞어준다. 이를 현미경 하에서 혈구계수기를 이용해 포자수를 확인하고 약 2.0×10^3 개의 포자로 희석하는 방법으로 접종원을 준비한다 (그림 2-1-2).

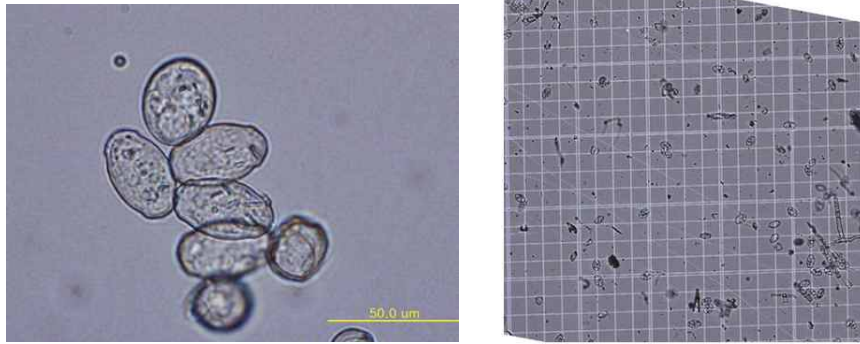


그림 2-1-2. 현미경으로 관찰된 수박 흰가루병균의 분생포자

준비된 접종원을 본엽 2매 정도의 판별식물 (Top Mark, PMR45, PMR6, PMR5)에 스프레이를 이용하여 살포하는 방법으로 접종하고 10일간 관찰하였다. Race의 판별은 다음 표 3-1에서 제시하는 바와 같이 저항성의 조합을 활용하였다. 발병의 정도는 그림과 같이 Wehner 박사가 제안한 0-9 scale의 disease index법으로 관찰하였다 (그림 3-3).

표 2-1-1. 수박 흰가루병 판별식물을 통한 Race의 판별

판별기주	Race1W	Race2W
Top Mark	Susceptible	Susceptible
PMR 45	Resistant	Susceptible
PMR 6	Resistant	Resistant
PMR 1	Resistant	Resistant



그림 2-1-3. 수박 흰가루병의 disease index (DI)

중앙대학교 내 온실에서 발병하는 흰가루병균은 race 1W에 해당하는 것으로 판단되었으며, 저항성의 범위는 DI 0-2의 수준으로 판단하였다.

나. 흰가루병균의 기내접종 확립

흰가루병균에 대한 접종시험은 대부분 6-8월로 한정되어 있는데, 이는 흰가루병균이 절대활물기생균으로 배지에서는 배양이 불가능하며, 다습과 고온건조가 발병의 최적조건으로 알려져 있어 저항성 육종 시에는 1년에 1회라는 시기적 제한이 존재한다. 따라서, 흰가루병균의 기내접종을 통한 저항성 판단 및 접종원의 장기저장은 흰가루병 저항성 육종에 매우 필수적이며, 육종기간을 가속화 시킬 수 있다.

본 연구에서는 앞서 제시한 흰가루병균 isolate를 이용하여 기내에서 증식하는 방법을 확립하고자 감수성 식물인 Top Mark(T), Early Silverline(E), Queen Anne's pocket(Q)를 증식기주로 기내접종 실험을 수행하였다 (그림 3-4). 시험범위는 접종대상 식물조직을 자엽과 본엽으로 나누었고, agar 배지를 기본으로 하고 여기에 탄소원을 첨가하거나, 식물용 MS배지를 사용하는 방법으로 3가지 처리구 (Sucrose, Sucrose+Mannitol, MS media)를 두었으며, tetracyclin을 20, 25mg/L의 2가지 처리, 그리고 접종방법으로 부드러운 붓과 상처를 야기하는 거친 붓을 사용하는 2가지 처리로 하였다. 각 처리의 반복구는 10반복 완전임의 배치하였다.

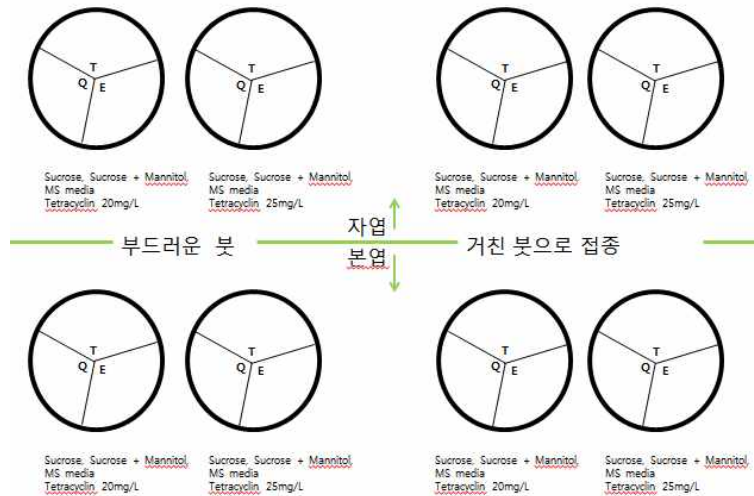


그림 2-1-4. 흰가루병균의 기내접종 실험구

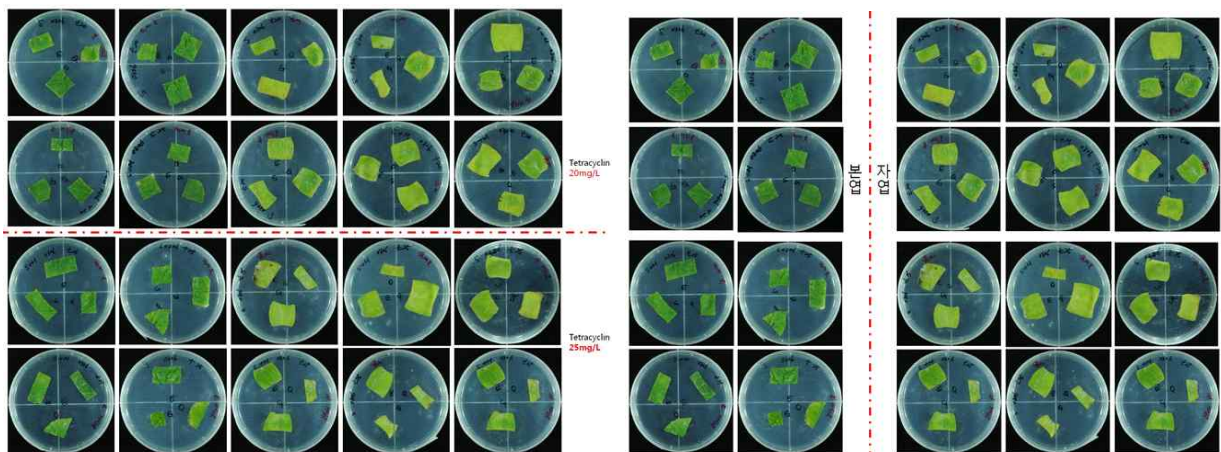


그림 2-1-5. 흰가루병균의 기내 접종 시험 예

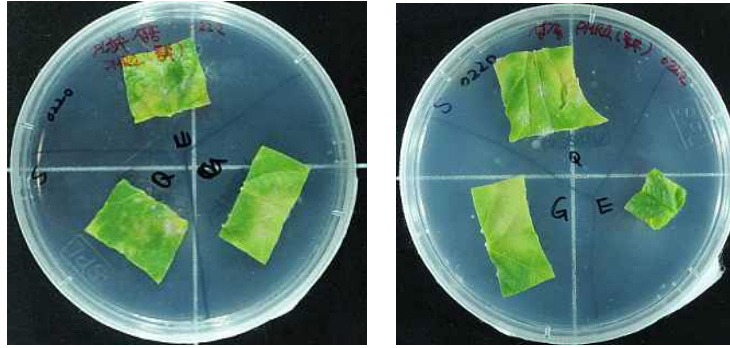


그림 2-1-5. (계속)

표 2-1-1. 흰가루병균의 기내 접종결과

배지조성	Petri-dish Number	품종	잎 상태	흰가루 접 종상태	배지조성	Petri-dish Number	품종	잎 상태	흰가루 접 종상태
Sucrose(0306)	거친 붓, T25	Queen Anne's Pocket	자엽	3	Sucrose+Mannitol(0306)	거친 붓, T25	Queen Anne's Pocket	자엽	3
		Top Mark	자엽	0			Top Mark	자엽	2
		Early Silverline	자엽	1			Early Silverline	자엽	1
Sucrose(0306)	거친 붓, T20	Queen Anne's Pocket	자엽	3	Sucrose+Mannitol(0306)	거친 붓, T20	Queen Anne's Pocket	자엽	2
		Top Mark	자엽	2			Top Mark	자엽	1
		Early Silverline	자엽	3			Early Silverline	자엽	2
Sucrose(0306)	원래 붓, T25, 1	Queen Anne's Pocket	자엽	4	Sucrose+Mannitol(0306)	원래 붓, T25, 1	Queen Anne's Pocket	자엽	0
		Top Mark	자엽	2			Top Mark	자엽	2
		Early Silverline	자엽	3			Early Silverline	자엽	5
Sucrose(0306)	원래 붓, T25, 2	Queen Anne's Pocket	자엽	4	Sucrose+Mannitol(0306)	원래 붓, T25, 2	Queen Anne's Pocket	자엽	0
		Top Mark	자엽	2			Top Mark	자엽	3
		Early Silverline	자엽	5			Early Silverline	자엽	3
Sucrose(0306)	원래 붓, T20, 1	Queen Anne's Pocket	자엽	2	Sucrose+Mannitol(0306)	원래 붓, T20, 1	Queen Anne's Pocket	자엽	1
		Top Mark	자엽	0			Top Mark	자엽	3
		Early Silverline	자엽	2			Early Silverline	자엽	5
Sucrose(0306)	원래 붓, T20, 2	Queen Anne's Pocket	자엽	2	Sucrose+Mannitol(0306)	원래 붓, T20, 2	Queen Anne's Pocket	자엽	3
		Top Mark	자엽	1			Top Mark	자엽	1
		Early Silverline	자엽	3			Early Silverline	자엽	2
Sucrose(0306)	거친 붓, T25	Queen Anne's Pocket	본엽	0	Sucrose+Mannitol(0306)	거친 붓, T25	Queen Anne's Pocket	본엽	4
		Top Mark	본엽	0			Top Mark	본엽	2
		Early Silverline	본엽	1			Early Silverline	본엽	3
Sucrose(0306)	원래 붓, T25	Queen Anne's Pocket	본엽	1	Sucrose+Mannitol(0306)	원래 붓, T25	Queen Anne's Pocket	본엽	3
		Top Mark	본엽	0			Top Mark	본엽	1
		Early Silverline	본엽	2			Early Silverline	본엽	2
Sucrose(0306)	거친 붓, T20	Queen Anne's Pocket	본엽	2	Sucrose+Mannitol(0306)	거친 붓, T20	Queen Anne's Pocket	본엽	1
		Top Mark	본엽	0			Top Mark	본엽	2
		Early Silverline	본엽	1			Early Silverline	본엽	3
Sucrose(0306)	원래 붓, T20	Queen Anne's Pocket	본엽	1	Sucrose+Mannitol(0306)	원래 붓, T20	Queen Anne's Pocket	본엽	2
		Top Mark	본엽	1			Top Mark	본엽	0
		Early Silverline	본엽	0			Early Silverline	본엽	1

기내접종 시험결과, 접종식물 조직은 자엽이 좋았으며, 배지는 MS배지의 경우 다른 곰팡이의 증식이 매우 심하여 결과를 판별하기 어려웠고, sucrose 단독첨가 혹은 sucrose+mannitol의 처리구가 증식에 도움을 주었으며 tetracyclin의 농도범위(20-25mg/L)는 큰 차이를 보이지 않았다. 한편, 접종방법에서 부드러운 붓이 상대적으로 거친 붓보다 효과가 좋아 접종시 상처는 큰 의미가 없음을 나타내었다. 증식기주 식물로서는 Early Silverline의 가장 높은 증식율을 나타내었다.

그러나, 기내접종은 접종하는 식물체의 크기가 제한적이기 때문에, 증식된 균사체나 포자의 수가 많지 않은 단점이 있어 기내접종을 통한 isolate 유지에 활용도가 높을 것으로 판단된다.

2. 흰가루병 race1W 특성 조사 및 접종법 확립

가. 현미경을 이용한 흰가루병 균주의 형태학적 관찰

흰가루병 race1W으로 추정되는 병원균 포자들을 중앙대학교 내 수박흰가루병접종 온실에서 수집하여 현미경(BX51, Olympus Co.)으로 관찰하였다. 우선 슬라이드 글라스에 생리식염수를 한 방울 떨어뜨리고 수집한 흰가루병원균 포자들을 놓은 후 커버글라스를 덮고 저배율(X100)에서 고배율(X1000) 순으로 배율을 높여가며 관찰하였다.

그 결과 중앙대학교 병포장 온실내에서 발생한 수박의 흰가루병은 감수성 식물의 잎과 줄기에 밀가루와 같은 흰가루를 형성하였다(Fig. 1A, 1B). 발생한 수박 흰가루 병원균의 모양을 현미경으로 관찰한 결과(Fig. 1C) 무성생식을 하는 분생포자(conidiospore)는 타원형인 것들이 연쇄상으로 이어진 모양이었으며(Fig. 1D), 그것으로부터 분생자(conidium)들이 하나 둘씩 분리되었다(Fig. 1E, 1F). 또한 분생자 내부의 피브로신 체(fibrosin body)가 확인됨으로써 *Podosphaera xanthii* 인 것으로 판명되었다(Fig. 1G).

*P. xanthii*와 *Golovinomyces cichoracearum* 은 박과작물의 재배온실에 발생하는 흰가루병의 대표적인 병원균으로써 병징과 형태가 비슷하여 두 병원균을 구분하는 연구가 진행되어 왔다. *P. xanthii*는 자웅이주체(heterothallic)에 속하며, 폐쇄자낭각인 자낭구(chasmothecium)의 크기가 박과식물에서는 76.7 to 108.3 μm 로 해바라기의 56 to 70 μm 보다 크다고 보고된 바 있다. 또한 *P. xanthii* 에는 분생자 내부에 피브로신 체가 존재하고 있어 *G. cichoracearum* 의 구조와 형태적으로 구분할 수 있다.

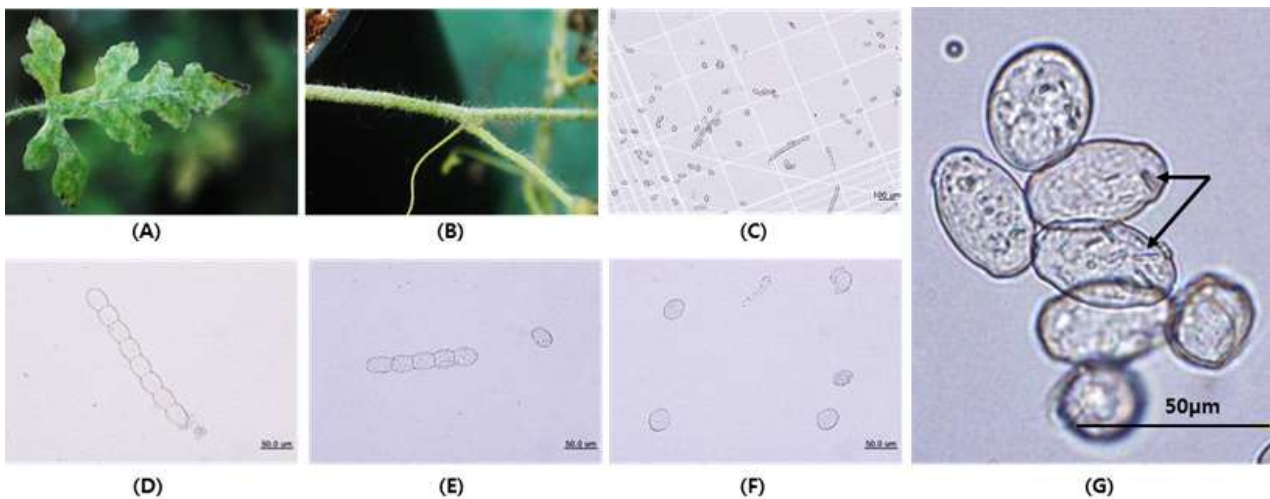


Fig. 2-2-1. Powdery mildew fungi found on watermelon leaves (A) and stem (B). (C), (D), (E), (F) and (G) are microscope observation of powdery mildew. Arrows indicate the fibrosin bodies in mature conidia of *Podosphaera xanthii* (scalebar:50 μm).

나. PCR을 이용한 수박 흰가루병 병원균의 동정

수박 흰가루병 병원균을 동정하기 위하여 Chen et al.(2008)이 고안한 ITS 염기서열에 기초한 PCR 분석법을 이용하였으며, PCR분석을 위하여 흰가루병 곰팡이 포자의 DNA를 직접 추출하여 분석하는 방법과 direct PCR 방법을 새로 고안하였다. 흰가루병 곰팡이의 DNA를 직접 추출하는 방법은 흰가루병 포자를 1.5mL tube에 수집한 후 추출버퍼[200mM Tris-HCl(pH 8.0), 50mM EDTA, 1.5M NaCl, 0.5 PVP, 2% β -mercaptoethanol] 800 μ l를 넣고 plastic homogenizer로 잘 섞은 후 lysozyme 1mg/mL과 proteinase K 200 μ g/mL를 순서대로 넣고 각각 30분씩 37 $^{\circ}$ C 항온처리하였다. 이에 2.5% SDS를 첨가한 후 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리한 후 5M potassium acetate(pH 5.2) 1/10 부피를 첨가하여 얼음상에서 10분간 침전시켜 원심분리하고 상층액을 isopropanol에 침전하였다. 회수된 DNA는 70% 에탄올로 세척한 다음에 건조하여 100 μ L의 0.1 \times TE버퍼에 녹인 후 RNase를 처리하여 분광광도계(DU 700, Beckman Instruments, USA)로 순도확인 및 정량하고 PCR에 이용하였다. Direct PCR은 흰가루병이 감염된 잎에서 0.01M Phosphate buffer(pH 7.0) 300 μ l를 반복적으로 pipetting하여 포자를 농도가 높은 것과 낮은 것 (2.4×10^5 spores/mL, 1.0×10^5 spores/mL)으로 구분하여 수집한 후 65 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간 동안 항온처리하고 13,000rpm에서 1분간 원심분리 한 상층액을 주형으로 사용하였다.

흰가루 병원균 판별을 위한 프라이머는 ITS region인 ITS-PN23/PN34과 *Podosphaera xanthii* 임플 판별하기 위한 Xanthii-S1/ S2, *Golovinomyces choracearum* 판별 프라이머 Cichora-G1/G2, 그리고 *Leveillula taurica* 판별을 위한 Taurica-L1/L2를 사용하였다. 각 프라이머들의 염기서열과 예상되는 PCR 생성물의 크기는 표 2-2-1에 나타내었다.

Table 2-2-1. Primer sequences and expected size of product in powdery mildew detection markers.

Primer	Type	Primer	Sequence	Expected Product	Size of (bp)
ITS-PN23		5'-CAC CGC CCG TCG	CTA CTA CCG-3'	750	
ITS-PN34		5'-TTG CCG CTT CAC	TCG CCG TT-3'		
<i>Xanthii</i> -S1		5'-GGA TCA TTA CTG	AGC GCG AGG CCC CG-3'	454	
<i>Xanthii</i> -S2		5'-CGC CGC CCT GGC	GCG AGA TAC A-3'		
<i>Cichora</i> -G1		5'-TCC GTA GGT GAA	CCT GCG GAA GGA T-3'	391	
<i>Cichora</i> -G2		5'-CAA CAC CAA ACC	ACA CAC ACG GCG-3'		
<i>Taurica</i> -L1		5'-CCC TCC CAC CCG	TGT CGA CTC GTC TC-3'	374	
<i>Taurica</i> -L2		5'-CTG CGT TTA AGA	GCC GCC GCG CCG AA-3'		

흰가루 병원균 판별을 위한 PCR 조건은 genomic DNA 5ng, 1ng, 0.5ng, 각각 10, 24개 포자의 DNA 나출물이 포함되어 있는 direct PCR용 DNA 상층액 1 μ l를 주형으로 하여 2mM MgCl₂가 포함된 1X ExTaq buffer(Takara Co.), dNTP 100 μ M, 각각의 프라이머 당 0.24 μ M, 1U ExTaq polymerase(Takara Co.)를 넣은 튜브를 PCR thermal cycler(AB 2700, PerkinElmer Inc.)에서 5분간 초기변성(95 $^{\circ}$ C)을 하여 94 $^{\circ}$ C 20초, 62 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초를 35회 반복하였으며 마지막으로

72°C 에서 5분간 반응시킨 후 1% TAE agarose gel에 로딩하여 PCR 반응물을 확인하였다.

Chen et al. (2008)이 제작한 흰가루병 균주의 동정 프라이머를 사용하여 PCR을 한 결과 감염된 식물체에서 흰가루병 균주를 따서 direct PCR을 실시한 결과와 곰팡이의 genomic DNA를 직접 분리하여 PCR한 결과가 모두 *P. xanthii* 임을 표지하는 S1/S2 프라이머 조합에서 450bp의 밴드를 합성하며 일치하였다(Fig. 2-2-2). 이 실험에서 Chen et al. (2008)은 흰가루병 균주의 동정을 위한 PCR 수행시 주형 DNA를 10 μ g 사용하였다고 기술하였으나, 실험을 해 본 결과 100ng 이상의 DNA 주형에서는 PCR product가 합성되지 않았고 프라이머 다이머만 형성되었다(데이터 미제시). 이에 주형 DNA의 양을 1/5000 수준으로 줄인 5ng 수준에서 정상적인 밴드가 합성되었다. Rittenour et al.(2012)은 DNA를 추출하는 방법에 따라 PCR inhibitor가 존재하여 곰팡이의 ITS 합성 및 염기서열의 분석에 영향을 미치는 것을 보고하였으며, 이는 본 실험에서 추출한 흰가루 곰팡이의 순도가 Chen et al. (2008)이 실험한 곰팡이 DNA보다 매우 높음을 시사한다.

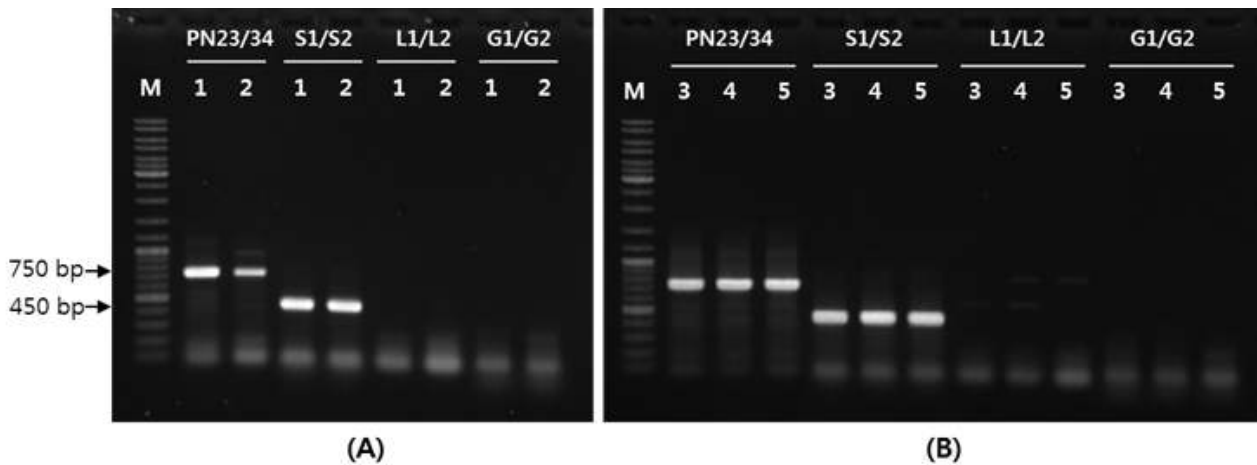


Fig. 2-2-2. PCR identification profiles of powdery mildew with 4 primer pairs. Primer sequences and expected size of product was given in Table 2.

Direct PCR (A) and fungal genomic DNA PCR were performed 50 μ l reaction volumes.

M : 1kb ladder

Lane 1: 10 spores, 2: 24 spores, 3: 0.5ng, 4: 1.0 ng, and 5: 5.0 ng fungal genomic DNA.

합성된 ITS의 클론 중 10개의 염기서열을 *P. xanthii* 와 *Golovinomyces cichoracearum* 의 ITS와 비교하여 분석한 결과 중앙대학교 온실내의 흰가루병 병원균들은 모두 *P. xanthii* 임을 알 수 있었다(Fig. 2-2-3, Fig. 2-2-4).

곰팡이 병원균에 대한 기주식물의 범위와 형태학적 분류도 유용한 방법이나 흰가루병과 같은 활물기생(biotrophic) 식물 병원균들은 rDNA의 ITS 부위의 염기서열을 분석하여 종을 구분하고 계통을 연구할 수 있다. Liang et al.(2007)은 중국에서 발생하는 흰가루병원균들을 rDNA ITS로, Cosme et al.(2012)은 멕시코의 오이온실에서 발생하는 흰가루 병원균을 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2로 분류하였다.

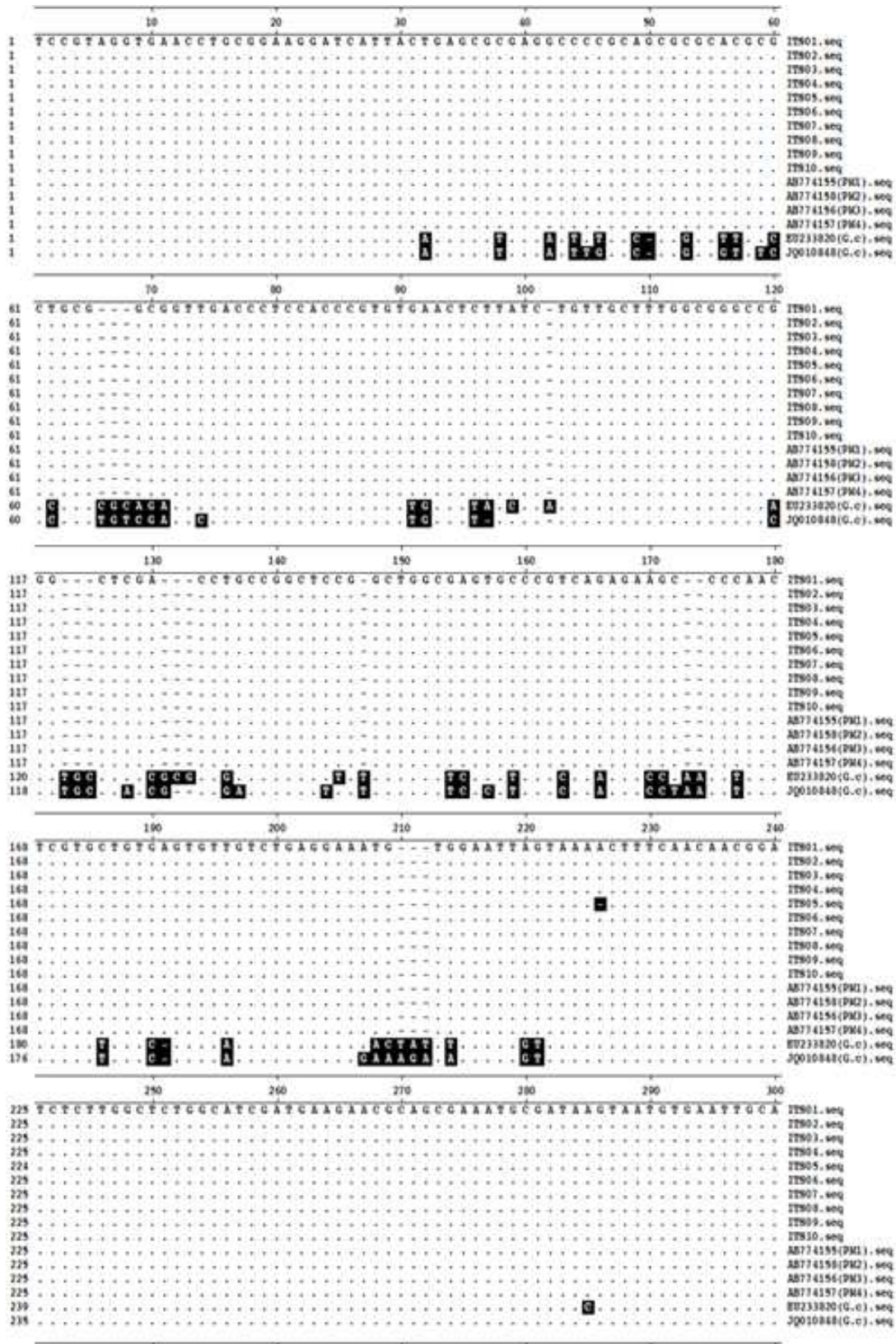


Fig. 2-2-3. ITS alignments of putative powdery mildew with *Podosphaera xanthii* (AB774155, AB774156, AB774157, and AB774158) and *Golovinomyces cichoracearum* (EU233820 and JQ010848).

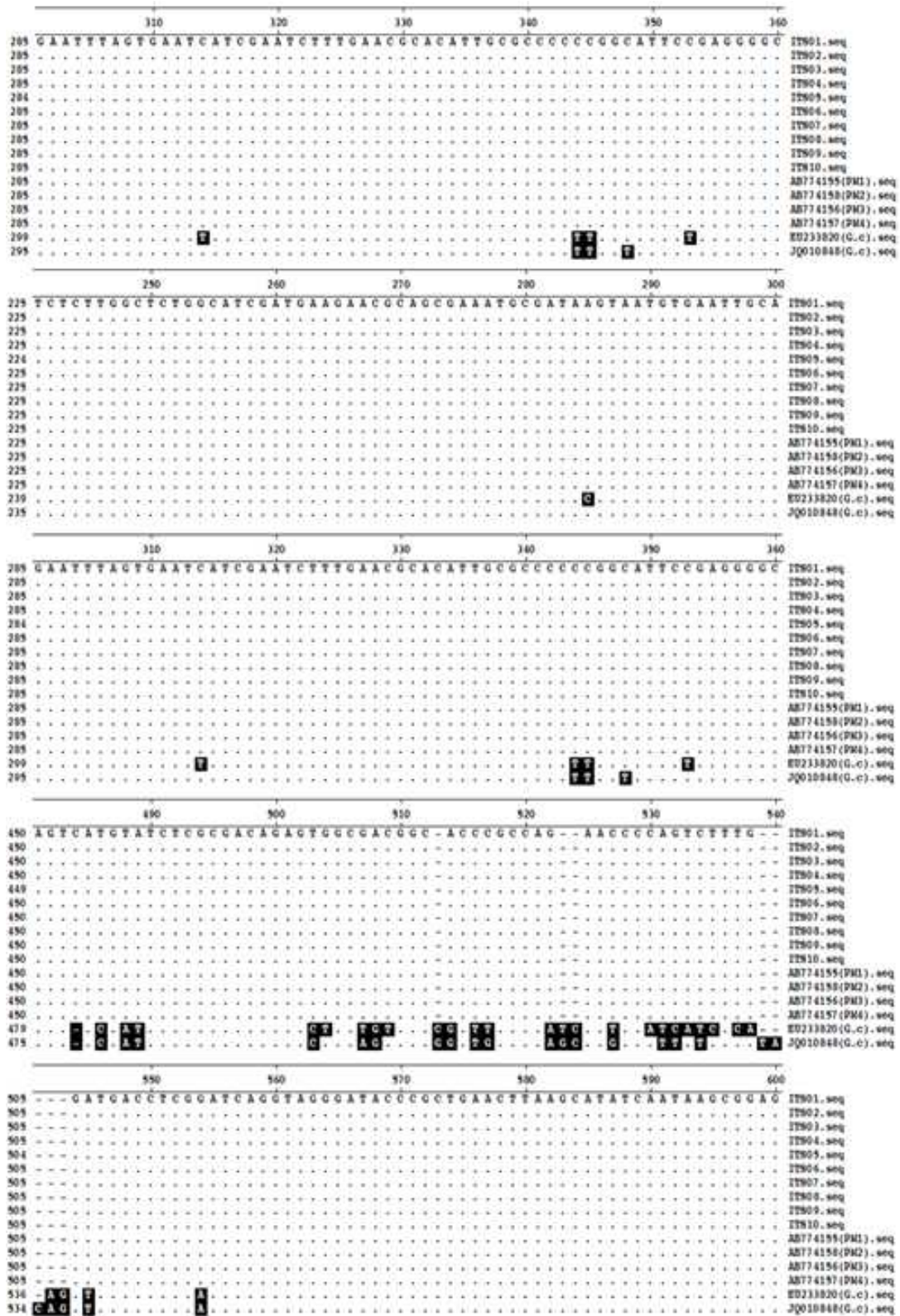


Fig. 2-2-3. (continued).

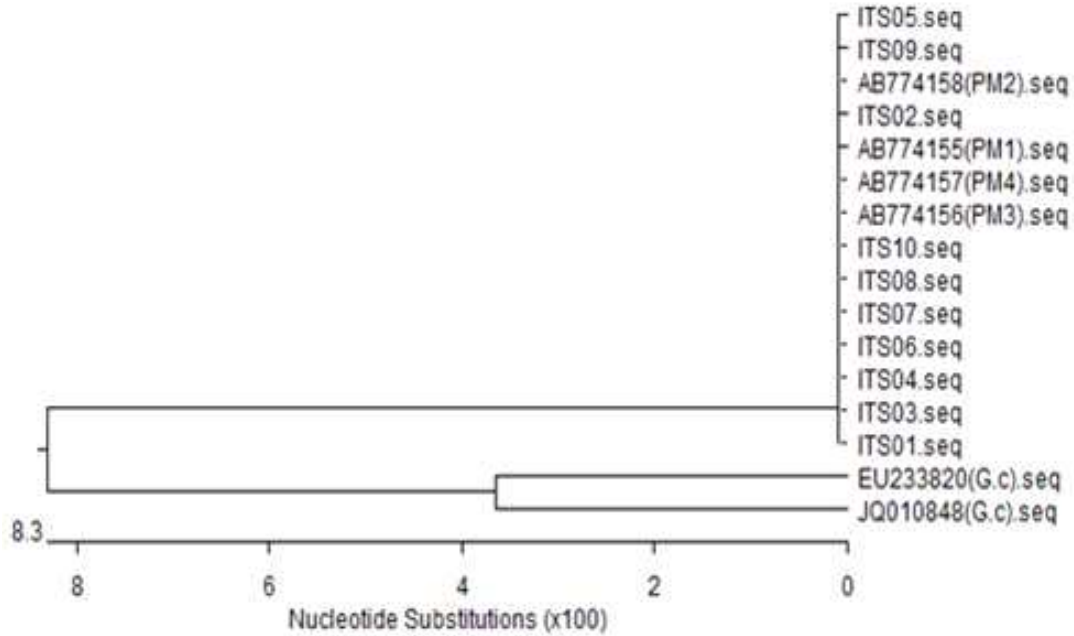


Fig. 2-2-4. Genetic diversity of ITS between putative powdery mildew and *Podosphaera xanthii* (AB774155, AB774156, AB774157, and AB774158) and *Golovinomyces cichoracearum* (EU233820 and JQ010848).

다. 판별식물을 이용한 수박 흰가루병 레이스 판별

수박에서 흰가루병균의 저항성 및 감수성 계통을 확인하기 위하여 포자검경 및 접종밀도를 결정하였으며, race를 판별식물을 통하여 확인하는 실험을 수행하였다. 접종을 위한 접종원의 제조는 수박 잎에 발병한 흰가루병균의 균사체를 멸균된 이쑤시개로 잘 긁어낸 후, 멸균 비이커에 멸균수 200mL를 넣고 흰가루병균을 잘 섞어주었다. 이를 현미경 하에서 혈구계수기 (hemocytometer)를 이용해 포자수를 확인하고 약 2.0×10^5 개/mL의 포자로 희석하는 방법으로 접종원을 준비하였다. 준비된 접종원은 본엽 2매 정도의 판별식물 ['Top Mark' , 'PMR45' , 'PMR6' , 'PMR5' , 'PMR 1 (MR-1)' , 'PI 124112' , 'PI 313970' , 'PI 414723']에 스프레이를 이용하여 살포하는 방법으로 접종한 후 10일간 관찰하였으며, Race의 판별은 Table 2에서 제시하는 바와 같이 저항성의 조합을 활용하였다. 발병의 정도는 0-9 scale의 disease index법으로 관찰하였다.

Table 2-2-2. Powdery mildew race identification with host plants.

Host plant	Race1	Race2	Race3
Top Mark	Susceptible	Susceptible	Susceptible
PMR 45	Resistant	Susceptible	Susceptible
PMR 5	Resistant	Resistant	Susceptible
PMR 6	Resistant	Resistant	Susceptible
PMR 1 (MR-1)	Resistant	Resistant	Resistant
PI 124112	Resistant	Resistant	
PI 313970	Resistant	Resistant	
PI 414723	Resistant	Susceptible	

Davis et al.(2007)과 McCreight(2006)가 제시한 저항성 조합을 활용하여 race 를 판별한 결과, ‘Top Mark’ 는 감수성을 보여주며 흰가루병이 심하게 발생하였으며, ‘PMR 45’, ‘PMR 5’, ‘PMR 6’, ‘PMR 1 (MR-1)’, ‘PI 124112’, ‘PI 313970’, ‘PI 414723’ 에서는 모두 흰가루병이 발병하지 않으며 저항성을 보여주었다(Fig. 2-2-5). 따라서 중앙대 온실에서 번식하고 있는 흰가루 병원균은 race 1으로 확인되었다.

Epinat et al.(1993)이 5개의 델론 라인을 가지고 흰가루병에 대한 저항성을 조사한 결과 ‘PMR 45’ 는 *P. xanthii* race 1(Sf1)에 저항성을 가지고 있고, ‘PMR 5’, ‘PI 124112’, ‘WMR 29’ 는 *P. xanthii* race 1(Sf1)과 *P. xanthii* race 2(Sf2) 모두에 저항성을 가지고 있었다. 이후 ‘PMR5’ 와 ‘PI 124112’, ‘PMR 45’ 와 ‘WMR 29’ 의 *P. xanthii* race 1, 2에 대한 저항성이 재차 확인되었다.

Kuzuya et al.(2006)은 감수성인 ‘Fuyu’ 와 7개의 저항성 ‘PMR 45’, ‘WMR 29’, ‘Edisto 47’, ‘PI 414723’, ‘PMR 5’, ‘PI 124112’, 그리고 ‘MR-1’ 에 *P. xanthii* race 1, 2, 5를 접종한 결과 ‘PMR 45’ 는 race 1에만 저항성이 있고, ‘WMR 29’ 와 ‘Edisto 47’ 는 race 1과 2에, 그리고 나머지 ‘PI 414723’, ‘PMR 5’, ‘PI 124112’, 그리고 ‘MR-1’ 은 race 1, 2, 5 모두에 저항성을 보이는 것을 확인하였다. 그러나 저항성을 띠는 방식에 따라 ‘PMR 45’, ‘WMR 29’, ‘Edisto 47’ 를 그룹 1, ‘PI 414723’ 은 그룹 2, ‘PMR 5’, ‘PI 124112’, 그리고 ‘MR-1’ 는 그룹 3으로 분류하였다.

Cucumis melo accession ‘PI 313970’ 는 *P. xanthii* race에 대해 많은 저항성 유전자를 가지고 있으며 감염시 저항수포(resistant blister)를 형성하는 것으로 보고되었다.

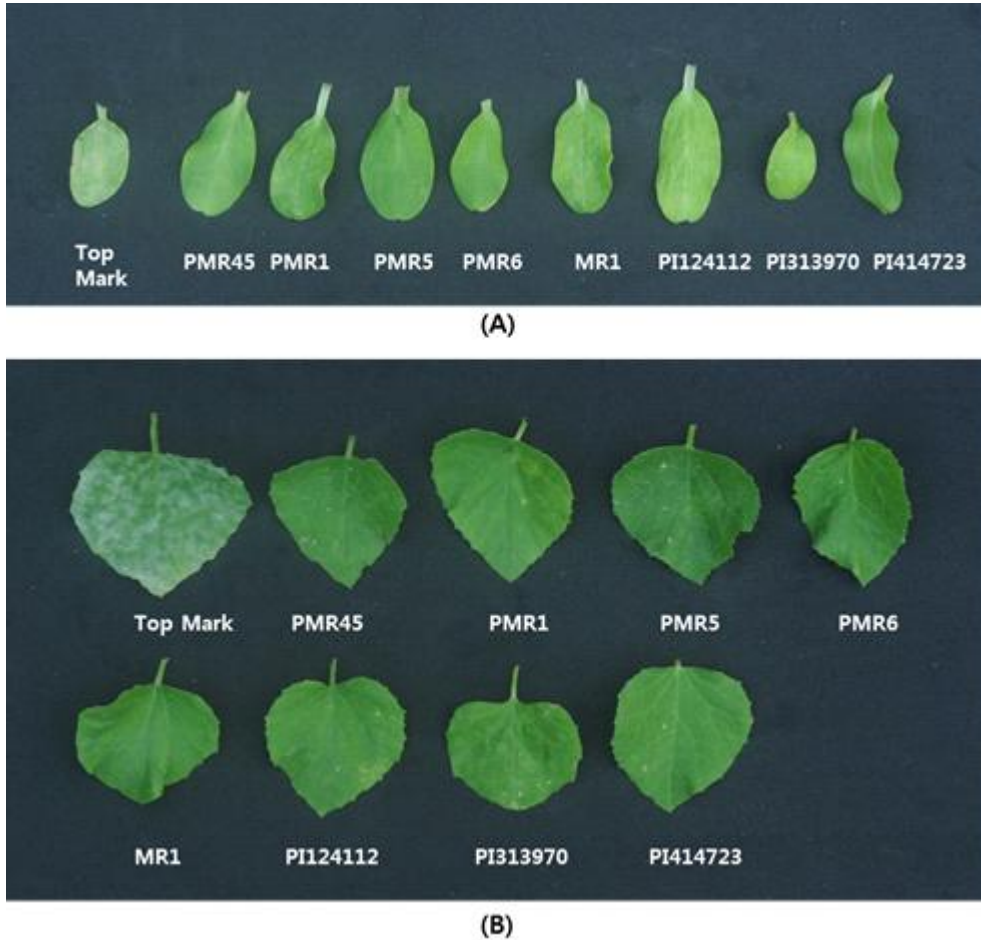


Fig. 2-2-5. Race identification of *P.xanthi* hostplants.
 (A) cotyledon, and (B) true leaf .

라. 흰가루병 저항성 NIL F₂에 대한 표현형 분석

흰가루병에 대한 저항성 표현형의 확인은 자엽이 전개된 묘 상태로 분양받은 ‘SBB’와 ‘SBB BC’, F₁인 ‘SBB x SBB BC’, 여교잡한 ‘SBB x SBB BC x SBB’와 ‘SBB x SBB BC x SBB BC’, 그리고 F₂인 ‘SBB x SBB BC’ F₂들은 다른 병원균의 오염을 막기 위하여 25±1℃가 유지되는 생육실에서 약 2주간 건강한 묘의 상태를 유지하며 생육되었으며, 본엽이 7~8매가 전개된 후 병포장(비닐하우스)으로 옮겨 정식되었다. 흰가루병의 접종은 200ml 식염수에 흰가루가 증식된 잎의 포자를 붓으로 털은 후 혈구계수기를 이용하여 포자의 수가 2 x 10⁶개/ml이 되도록 희석하여 NIL 각각의 개체당 4~5회 스프레이를 하였다. 흰가루 병원균을 살포한 후에는 비닐을 덮어 습도를 유지하였으며, 접종된 식물체들의 흰가루병 감수성과 저항성의 표현형을 조사하였다. F₂에 대한 감수성과 저항성 분리비는 카이 스퀘어로 검정하였다.

흰가루병 저항성 NIL의 F₂들에 대한 표현형의 분석은 Fig. 2-2-6에 예시한 수박 흰가루병의 0~9까지의 발병지표에 따라 분석하였다. Leibovich et al. (1996)은 스쿼시(*Cucurbitapepo*)를 가지고 흰가루병에 감수성인 품종과 저항성인 품종, 그리고 F₁, F₂의 재배에 있어서 차광그물을

적용하는 것에 대한 식물의 반응들을 평가하여 3가지의 유형으로 분류하였다. 감수성인 개체들은 감수성인 부모와 같이 줄기와 상부 및 하부 잎 표면 전체에 흰가루병이 번졌으며, 저항성인 개체들은 저항성 부모와 같이 잎과 줄기에 흰가루병이 나타나지 않았다. 그리고 F₁에서는 잎의 표면에서만 흰가루병이 부분적으로 나타났다. 즉 줄기에 나타나는 병징의 존재는 흰가루병에 대한 감수성과 관련이 있다. 따라서 F₂집단 개체들 각각의 저항성 측정을 위해서는 차광그물을 치는 것이 감수성인 개체나 부분적으로 저항성을 가지는 개체의 구분에 민감한 지표가 될 수 있다.

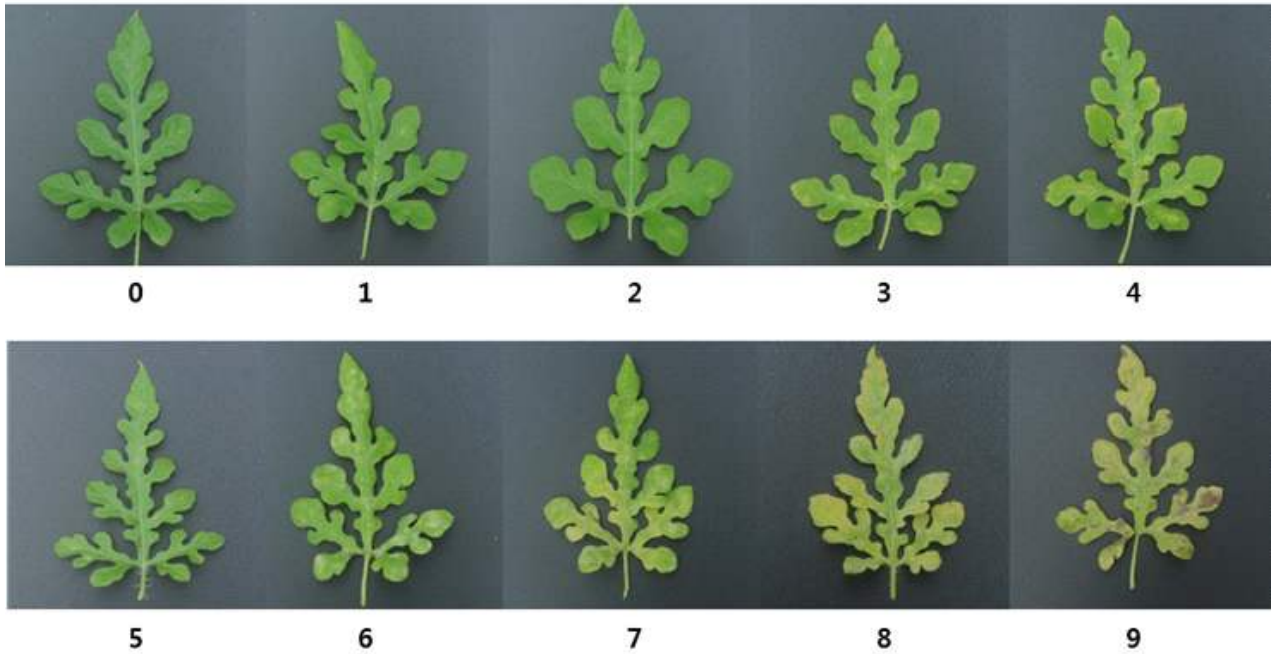


Fig. 2-2-6. Decease index of powdery mildew in watermelon.

- 0 : no symptoms, 1 : faint yellow specks on leaves,
- 2 : chlorotic lesions on leaves, 3 : chlorotic lesions covering 20% of leaves,
- 4 : yellow chlorotic lesions on leaves turned to brown necrotic areas,
- 5 : two to three healthy colonies of mycelium on leaves,
- 6 : less than 20% mycelium coverage on leaves,
- 7 : 20 to 50% mycelium coverage on leaves,
- 8 : 50 to 70% mycelium coverage with large necrotic areas,
- 9 : all leaves fully covered with powdery mycelium or plant dead.

흰가루병 저항성 NIL들의 F₂를 분석한 결과 부모친과의 여교잡(backcross)의 경우 ‘SBB x SBB BC x SBB’ 는 감수성과 저항성 표현형이 9:7의 비율이었으며, ‘SBB x SBB BC x SBB BC’ 는 완전한 저항성 개체로 표현형이 나타났다(Table 2-2-3). ‘SBB x SBB BC’ 를 다시 교배한 F₂ ‘SBBxSBBBCxSBBxSBBBC’ 는 감수성과 저항성 표현형이 48:116으로 나타났으며(Table 2-2-4), 이들을 카이 스퀘어로 검정한 결과 멘델의 분리법칙을 따르고 있었다(Table 2-2-5). 이는 흰가루 저항성 NIL로 만들어진 ‘SBB x SBB BC’ 의 *P. xanthii* race 1에 대한 유전자가 우성으로 유전된다는 사실을 보여준다.

수박은 품종들 사이에 과실의 종류가 다양하고 질적 유전형질이 다양한 작물이다. 따라서 부모-자식간의 하나의 우성유전자 혹은 불완전 우성 유전자에 관한 유전력은 양친부모(P1, P2)와 그들의 F₁, F₂, BC₁, BCP₁, BCP₂ 사이에 평가되어야 한다. *P. xanthii* race 1에 대한 저항성은 우성인자로 알려져 있으며, 이들은 독립적으로 유전하는 단인자 우성 유전자라고 보고되어 왔다.

Table 2-2-3. Scoring and phenotyping of F₂ segregation population in NIL backcross with parents.

SBB x SBB BC x SBB					SBB x SBB BC x SBB BC				
No.	Score		Phenotype		No.	Score		Phenotype	
	Leaf	Stem	Leaf	Stem		Leaf	Stem	Leaf	Stem
1	7.8	7.5	S	S	1	5	4.2	R	R
2	4.8	3.2	R	R	2	4.2	4	R	R
3	8.2	7.6	S	S	3	5	4.4	R	R
4	8.5	7.9	S	S	4	4.6	3.9	R	R
5	5.0	3.1	R	R	5	4.5	4.9	R	R
6	8.8	7.3	S	S	6	4.9	5	R	R
7	8.7	8	S	S	7	4.3	3.9	R	R
8	6.5	2.8	S	R	8	4.2	3.9	R	R
9	5.7	3	R	R	9	4.2	4.9	R	R
10	8.8	8.4	S	S	10	7.4	4.9	R	R
11	4.9	3.2	R	R	11	4.9	4.4	R	R
12	8.2	8.3	S	S	12	4.8	4.2	R	R
13	5.1	3.8	R	R	13	3.9	6	R	R
14	8.5	8.5	S	S	14	4.4	3.9	R	R
15	4.2	3.1	R	R	15	4.7	4.1	R	R
16	9.0	8.6	S	S	16	5.9	5	R	R
					17	4.7	3.5	R	R

Table 2-2-4. Scoring and phenotyping of F₂ segregation population in NIL backcross with F₁ (‘SBBxSBB BC’)x(‘SBBxSBB BC’).

F ₂ No.	Score		Phenotype		F ₂ No.	Score		Phenotype	
	Leaf	Stem	Leaf	Stem		Leaf	Stem	Leaf	Stem
1	4.8	4.1	R	R	45	8.1	8.9	S	S
2	4.6	3	R	R	46	3.8	3.9	R	R
3	4.5	4	R	R	47	4.4	3.6	R	R
4	3.8	3.7	R	R	48	4.4	3.9	R	R
5	4.3	3.8	R	R	49	4.2	5.4	R	R
6	4.7	3.9	R	R	50	6.2	6.4	S	S
7	3.5	3.5	R	R	51	4.2	3.8	R	R
8	8.1	8	S	S	52	3.5	3.9	R	R
9	3.6	3.1	R	R	53	4	3.9	R	R
10	7.3	7.6	S	S	54	4.2	4.6	R	R
11	4.2	3.9	R	R	55	3.9	3.9	R	R
12	4.2	3.7	R	R	56	3.9	3.8	R	R
13	4.1	4.2	R	R	58	3.9	3.9	R	R
14	4.1	4	R	R	60	3.9	4.3	R	R
15	5.3	3.9	R	R	61	3.8	3.7	R	R
16	7.5	8.8	S	S	62	8	8.7	S	S
17	4	3.8	R	R	63	3.9	4	R	R
20	8.8	8.5	S	S	64	8.8	8	S	S
21	3.9	3.9	R	R	65	5.3	3.9	R	R
22	4	4.5	R	R	66	7.9	7.4	S	S
23	3.9	4.9	R	R	67	4.1	3.8	R	R
24	4.7	4.8	R	R	68	7.3	7.6	S	S
25	4.7	3.8	R	R	69	8.8	8.9	S	S
26	4.9	3.9	R	R	70	4.4	3.7	R	R
27	7.2	7.5	S	S	71	8.6	8.7	S	S
28	7.5	7.8	S	S	72	4	3.9	R	R
29	4.6	4	R	R	73	3.7	3.9	R	R
30	4.5	4.1	R	R	74	5.1	3.6	R	R
31	4.8	5	R	R	75	7.5	7.9	S	S
32	3.9	5.8	R	R	77	8.1	7.8	S	S
33	4.7	3.9	R	R	78	3.8	5	R	R
34	7.2	8.3	S	S	79	3.7	3.6	R	R
35	4.7	3.8	R	R	80	4.1	4.2	R	R
36	4.1	4	R	R	83	3.9	4	R	R
37	5.3	3.9	R	R	84	3.9	3.9	R	R
38	4.4	3.6	R	R	85	4.2	3.8	R	R
39	4.2	5.6	R	R	86	3.7	4.1	R	R
40	4.1	3.7	R	R	87	4.4	3.7	R	R
41	3.8	5.5	R	R	88	4.3	3.6	R	R
42	4.7	4.2	R	R	89	3.7	3.9	R	R
44	4.7	5	R	R	90	3.8	3.9	R	R

Table 2-2-4. (continued)

F ₂ No.	Score		Phenotype		F ₂ No.	Score		Phenotype	
	Leaf	Stem	Leaf	Stem		Leaf	Stem	Leaf	Stem
91	7.2	8.8	S	S	133	3.6	4	R	R
92	3.9	3.9	R	R	134	8.8	8.8	S	S
93	3.6	3.9	R	R	135	3.8	3.5	R	R
94	3.8	3.8	R	R	136	3.8	3.9	R	R
95	3.6	3.9	R	R	137	4	3.4	R	R
96	4.2	6	R	R	138	3.7	4	R	R
97	3.7	3.8	R	R	139	4.2	3.7	R	R
98	8.9	8.7	S	S	140	4.6	3.6	R	R
99	4	6.5	R	R	141	4.7	3.9	R	R
100	4.3	3.6	R	R	142	4.1	3.9	R	R
101	4	3.9	R	R	143	4.6	3.8	R	R
102	4.3	3.6	R	R	144	9	8.7	S	S
103	5.2	5	R	R	145	5.3	4.9	R	R
104	4	3.9	R	R	146	3.9	3.9	R	R
105	3.9	3.8	R	R	147	4.4	4.1	R	R
106	4	3.9	R	R	148	4.7	3.8	R	R
107	3.8	3.8	R	R	149	3.9	3.9	R	R
108	4.4	3.9	R	R	150	4.7	3.9	R	R
109	4.3	3.7	R	R	151	5	4	R	R
110	4	5.6	R	R	152	3.6	3.9	R	R
111	7.7	8.7	S	S	153	4	3.9	R	R
112	4.2	4.6	R	R	154	3.9	3.8	R	R
113	4.1	3.5	R	R	155	9	8.4	S	S
114	4.5	4	R	R	156	8.9	8.6	S	S
115	4.8	4.3	R	R	157	8.8	8.6	S	S
116	4.3	3.2	R	R	159	4.4	3.2	R	R
117	4.1	3.8	R	R	160	4	3.9	R	R
118	8.8	8.4	S	S	161	8.2	8.1	S	S
119	3.9	4	R	R	162	3.8	3.9	R	R
121	4.1	3.9	R	R	163	8.9	7	S	S
122	4.3	3.4	R	R	164	9	8.3	S	S
123	4.2	3.7	R	R	165	2.7	3	R	R
124	4.6	3.8	R	R	166	7.5	8	S	S
125	4.7	3.9	R	R	167	3.8	3.7	R	R
126	4.7	4.9	R	R	168	4.1	3.9	R	R
127	3.8	4.3	R	R	169	4.3	3.9	R	R
128	5.3	3.9	R	R	170	3.9	3.9	R	R
129	8.9	8.7	S	S	171	3.7	3.9	R	R
130	4.5	3.9	R	R	172	9	8.9	S	S
131	8.7	8.9	S	S	173	4	3.6	R	R
132	4.1	3.9	R	R	174	3.9	3.6	R	R

Table 2-2-5. Chi-square test of susceptible and resistant powdery mildew on watermelon NIL.

	('SBBxSBB BC') x ' SBB'		('SBBxSBB BC') x ('SBBxSBB BC')	
	S	R	S	R
Observed (o)	9	7	48	116
Expected (e)	8	8	41	123
Deviation (o - e)	1	-1	7	-7
Deviation ² (d ²)	1	1	49	49
d ² /e	0.125	0.125	1.195	0.398
X ²		0.250		1.593y
P value (two-tailed)		0.6171		0.2068
Expected	50%	50%	25%	75%

^zChi square was measured with 1 degrees of freedom.

마. 수박 DNA의 추출

수박의 흰가루병 저항성 연관유전자 마커 탐색 및 제작을 위하여 본 실험에서 사용된 'PI254744', 'SBB', 'SBB BC', 'SBBxSBB254BC₃F₅' (F₁), 'SBBxSBB254BC₃F₅xSBB' (F₂), 'SBBxSBB254BC₃F₅xSBB254BC₃F₅' (F₂) 등의 total DNA는 기존의 CTAB 방법을 변형하여 추출하였다.

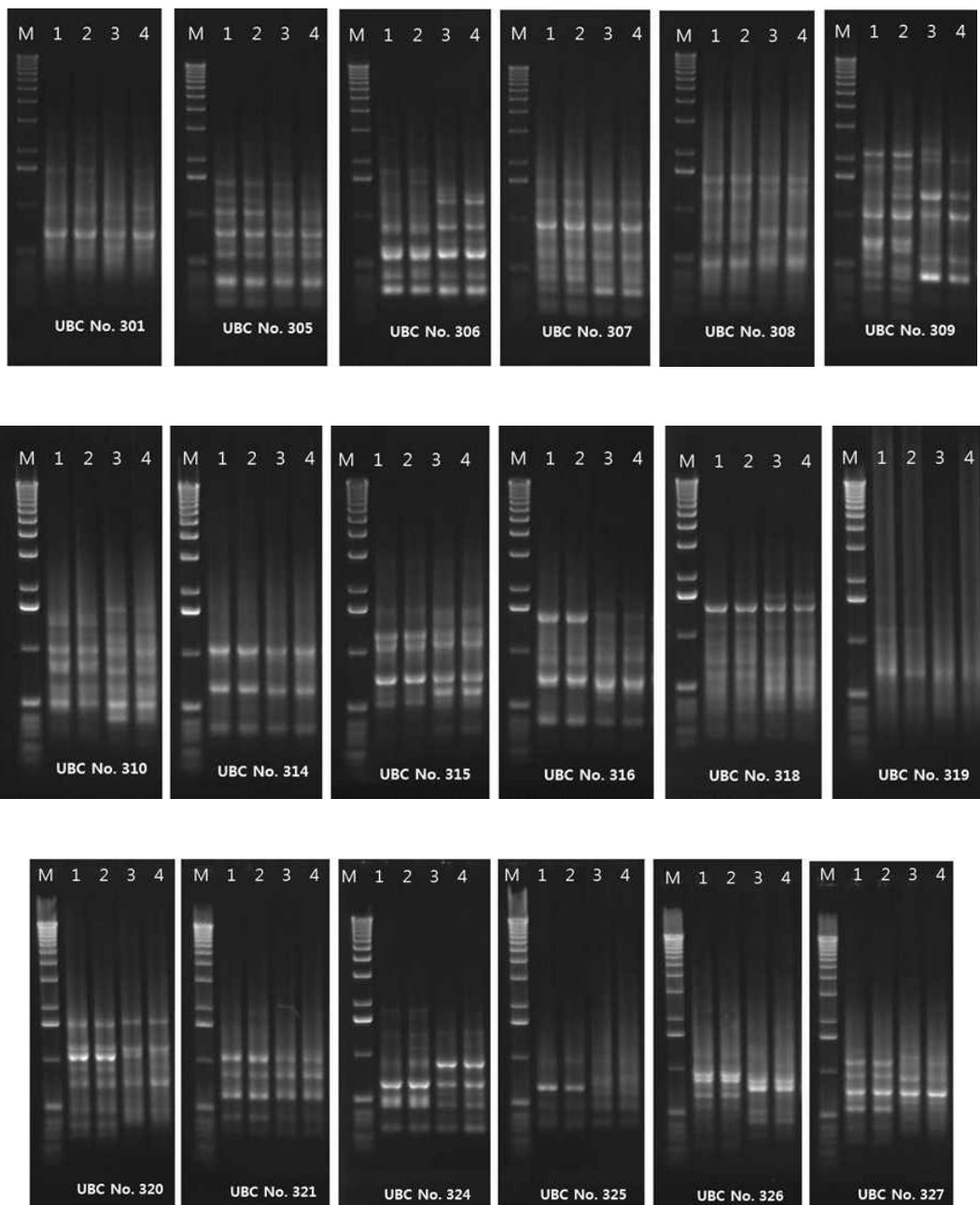
식물체의 엽절편 시료를 약 100mg씩 1.5ml eppendorf tube에 채취하여 액체질소로 냉각시킨 후 Automill(Tokken Inc., Japan)로 마쇄하고 800μl의 추출 버퍼를 첨가한 뒤 65°C 항온기에서 20분간 처리하였다. 동량의 CI (chloroform:isoamylalcohol=24:1, v/v)로 3분간 실온에서 반응시킨 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 분리 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 20분간 침전하고 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 10분)하여 침전물을 회수하였다. 회수 한 침전물은 600μl의 ultrapure water에 녹인 후 4μl RNase(10mg/mL stock)를 넣고 37°C 항온기에서 30분간 처리하였으며, 동량의 PCI(phenol: chloroform:isoamylalcohol =25:24:1,v/v/v)를 처리한 후 한번 더 CI 처리를 하였다. CI 처리후 상층액은 1/4부피의 5M NaCl과 2배의 99% 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 20분간 침전시킨 후 원심분리 하여 침전물을 회수하였다. 회수된 DNA는 70% 에탄올로 세척한 다음에 건조하여 80μL의 0.1×TE버퍼에 녹인 후 분광광도계(DU 700, Beckman Instruments, USA)로 순도확인 및 정량하였다.

수박의 흰가루병 저항성 연관유전자 마커 탐색을 위한 DNA profile 분석시 단일 개체에서의 비교 마커 탐색은 위험성이 높다는 판단 하에 DNA를 pooling(SBB, SBB BC, F2 각각 10개체씩)하여 후보 마커들을 선별하였다.

3. 흰가루병 race1W 저항성 SCAR 마커 개발

가. NIL 집단에 대한 RAPD 및 AFLP의 적용

수박의 흰가루병 저항성 연관유전자 마커 개발을 위하여 제1협동과제(파트너종묘)에서 SBB 계통에 PI254744를 여교잡하여 만들어진 BC3F4와 45NC계통에 PI254744를 여교잡하여 만들어진 BC4F6를 제공받았다. 각 계통의 반복친인 SBB와 45NC와 여교잡된 NIL에서 연관 마커 탐색을 위하여 1차년도 후반에 육성 재료를 공급받았기 때문에, 일단 먼저 RAPD와 AFLP로 분자적 다형성에 대한 background screening을 하였다. 그러나, 단일 개체에서의 비교 마커 탐색은 위험성이 높다는 판단 하에 다시 각 계통의 DNA를 pooling하여 후보 마커들을 선별하였다.



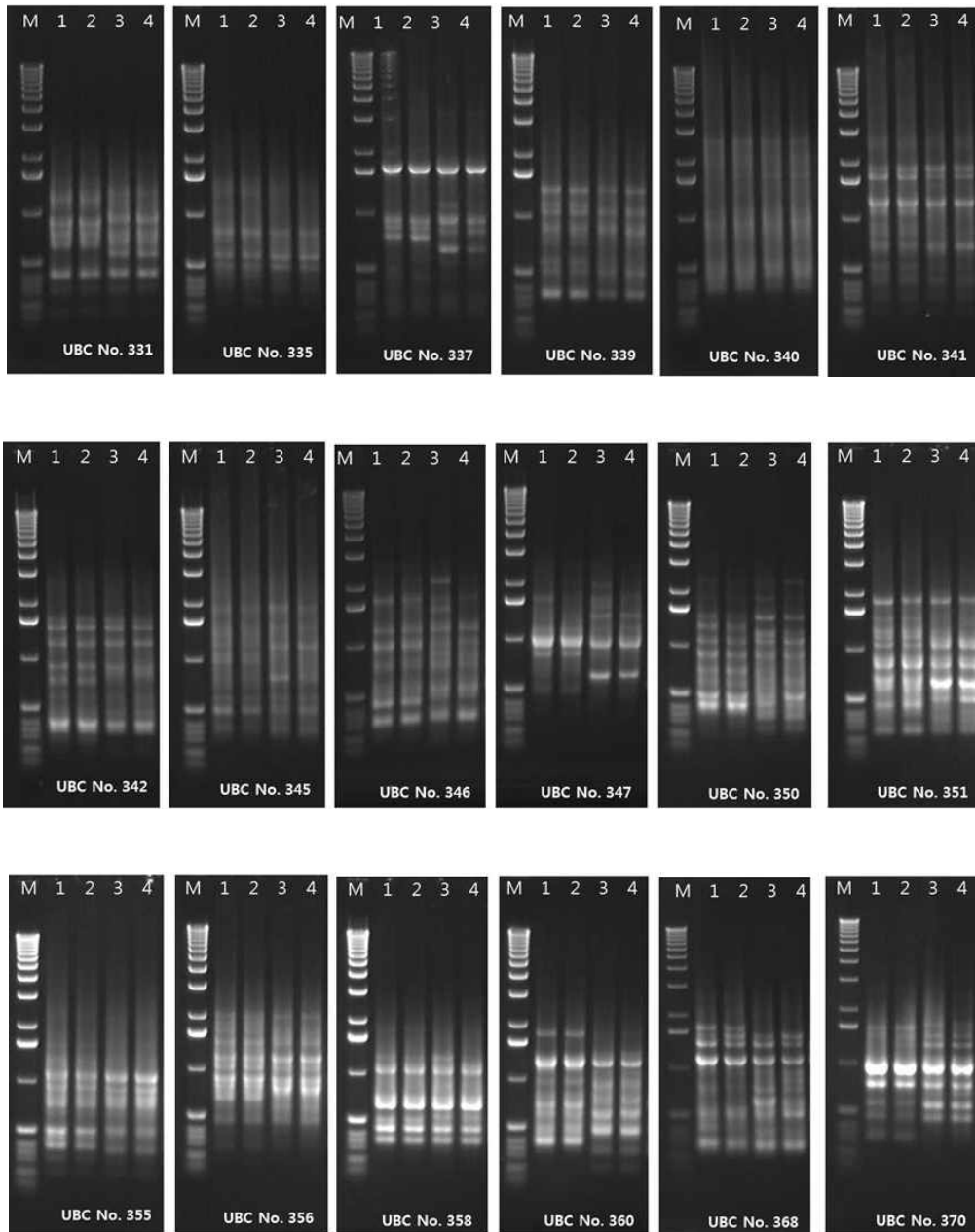
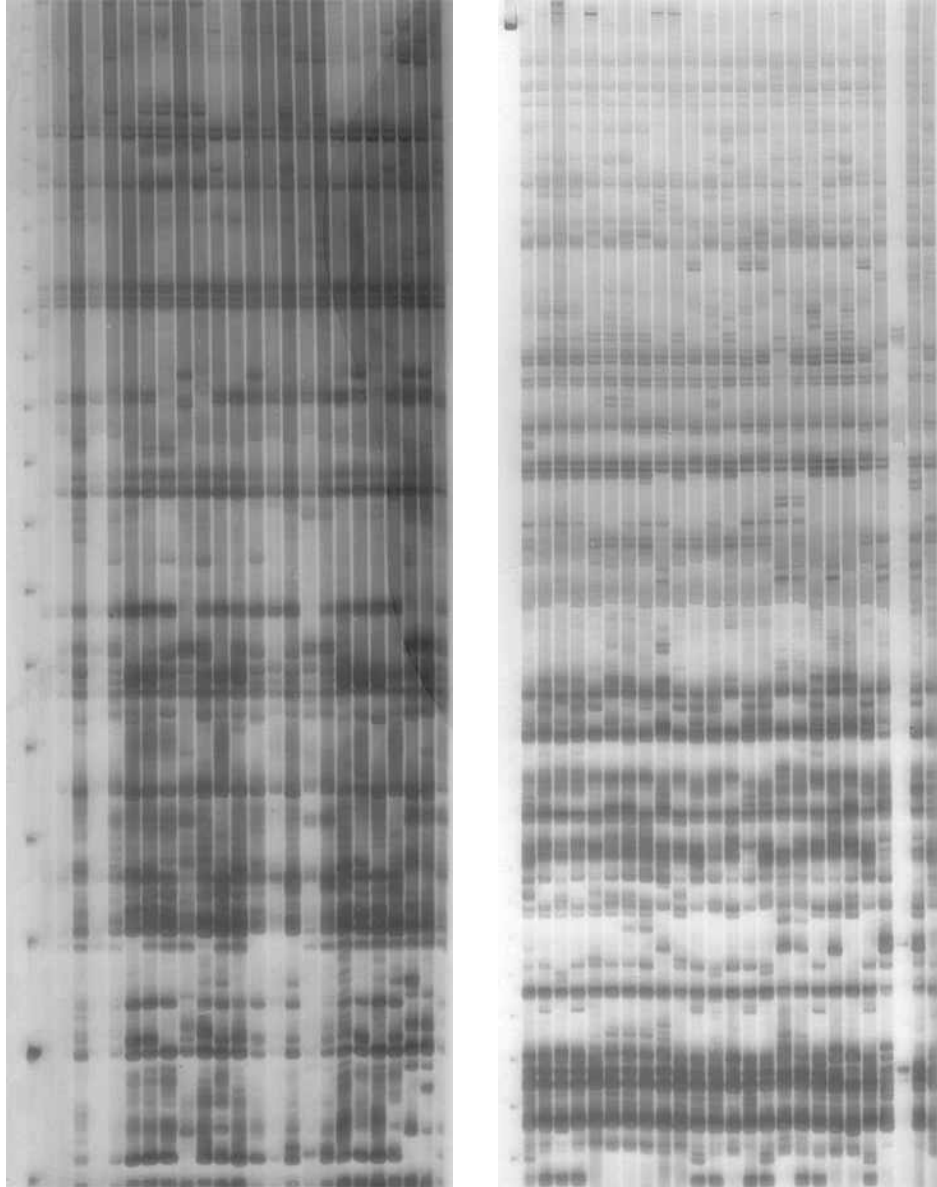


그림 2-3-1. RAPD 분석을 통한 2계통 NIL의 반복친과의 비교
 (1:45NC, 2:45NC_{BC4F6}, 3:SBB, 4:SBB_{BC3F4}.)



A

B

그림 2-3-2. 흰가루병 저항성 NIL 집단에 대한 마커탐색 (AFLP, A: E-AGG & M-CAC, B: E-AAC & M-CAT primer pairs)

나. NIL집단을 이용한 PMR1 관련 분자마커 개발

(1) 흰가루병 race1W에 대한 저항성 (PMR1) 마커 탐색

수박 흰가루병원균 (Powdery Mildew; *Podosphaera xanthii*, formerly *Sphaerotheca fuliginea*)은 2가지의 race가 우점하여 분포하고 있다고 알려져 있으며, 국내에는 주로 race 1W가 발견되고 있다. 흰가루병원균의 전염은 월동 후 4월 이후에 자낭각이 터져나온 자낭포자가 1차 전염원이 되며, 자낭포자가 발아하여 침입균사를 형성하고, 표피조직에 흡기가 형성된 후 균사가 자라서 균총이 형성된다. 접종 6-8일 후에 분생포자를 볼 수 있으며, 이병 잎에서 분생포자는 주로 야간에 15-35C에 형성되고 온도가 28C이고, 습도는 45-85%에서 가장 많이 형성되는 것으로 보고되었다 (한국작물보호협회). 분생포자의 비산은 주간에는 특히 10-15시 사이에 활발하며, 12-3시까지 최대가 되고 많은 날의 고온건조때 활발하며 제2차 전염원이 된다. 국내에서는 주로 장마철 하우스 재배에서 다량 발생한다.

흰가루병원균에 대한 감수성의 수박은 감염시, 생장이 억제되며 심할 경우, 과실의 수량과 품질에 극심한 영향을 줄 수 있다. 본 연구에서는 흰가루병원균 race1W에 대한 저항성인 PI254744를 공여친으로 하고, 반복친으로 재배종 계통인 SBB 및 45NC를 사용한 NIL (near isogenic line)을 대상으로 저항성 유전자의 연관마커를 개발하고자 하였다.

수박 NIL 집단(SBBxPI254744, 45nc x PI254744)의 흰가루병저항성 분자마커 개발 및 표현형 확증 가능성을 탐색하기 위하여 제1협동과제(파트너종묘)에서 SBB계통에 PI254744를 여교잡하여 만들어진 BC₃F₄와 45NC계통에 PI254744를 여교잡하여 만들어진 BC₄F₆를 분양받았다.

(2) 흰가루병의 접종과 저항성 표현형의 확인

자엽이 전개된 묘 상태로 분양받은 SBB와 SBB BC₃F₄(이하 SBB BC), 4NC와 4NC BC₄F₆(이하 4NC BC)은 다른 병원균의 오염을 막기 위하여 25±1C가 유지되는 생육실에서 약 2주간 건강한 묘의 상태를 유지하며 생육되었으며, 본엽이 7~8매가 전개된 후 병포장(비닐하우스)으로 옮겨 정식되었다.



그림 2-3-3. 흰가루병원균 (race1) 접종용 온실

흰가루병의 접종은 200ml 식염수에 흰가루가 증식된 잎의 포자를 붓으로 털은 후 혈구계수

기를 이용하여 포자의 수가 2×10^6 개/ml이 되도록 희석하여 SBB와 SBB BC, 45NC와45NC BC 각각의 개체당 4~5회 스프레이를 하였다. 흰가루 병원균을 살포한 후에는 비닐을 덮어 습도를 유지하였으며, 접종된 식물체들의 흰가루병 감수성과 저항성의 표현형을 조사하였다.

흰가루병 접종 후 2일 후부터 대부분의 접종엽에서 흰가루 포자의 스팟이 한 두 개씩 관찰되었으며, 접종 7일 후에는 다수의 흰가루 포자들이 발생하기 시작했다. 그러나 SBB BC 개체들에서는 접종 흔적은 남아있었으나 흰가루 포자가 관찰되지는 않았다. 접종 12일째에는 SBB, 45NC의 감수성 개체의 대부분의 접종엽들이 저항성 개체들과는 확연히 차이가 나는 수준으로 다수의 흰가루 포자들이 관찰되었으며, 접종 7일후와 비교하였을 때 포자의 면적이 확대되어 있었다. 접종 23일째에는 감수성인 SBB 개체에서 접종잎들은 앞전체에 흰가루 포자가 퍼져있고, 잎이 고사하였다. SBB의 신엽을 제외하고 개체에 전체적으로 흰가루 포자가 관찰되는 것과 대조적으로 SBB BC에서는 3~4개체에서 일부 접종엽에서만 스팟 형태로 흰가루 포자가 관찰되었으며, 흰가루 포자가 관찰된 잎의 상위엽으로는 퍼지지 않았다. 45NC개체는 접종엽은 대부분 고사하고 노엽의 경우 흰가루 포자가 앞전면에 퍼져있는 반면에 45NC BC 개체는 일부 노엽에서 흰가루 포자가 관찰되나 상위엽으로 퍼지지 않고, 전체적으로 추가 감염된 잎들이 보이지 않았다.

○ 접종 후 2일



SBB



45NC

○ 접종 후 7일



SBB



45NC

○ 접종 후 10일



SBB



45NC

○ 접종 후 27일



SBB



SBB BC



45NC

45NC BC

그림 2-3-4. 흰가루병균 접종 후 감수성 모본과 저항성 여교잡계통 표현형 확인

상기와 같은 실험을 통하여 수박 NIL 집단의 흰가루병저항성 분자마커 개발을 위한 감수성, 저항성 개체의 선별을 하였으며, 표현형이 뚜렷하게 보이는 SBB, SBB BC, 4NC, 4NC BC의 개체들 중 각각 10개씩 선별하여 RAPD, SRAP, 그리고 AFLP 분석에 이용하였다.

(3) 수박 NIL 집단의 RAPD

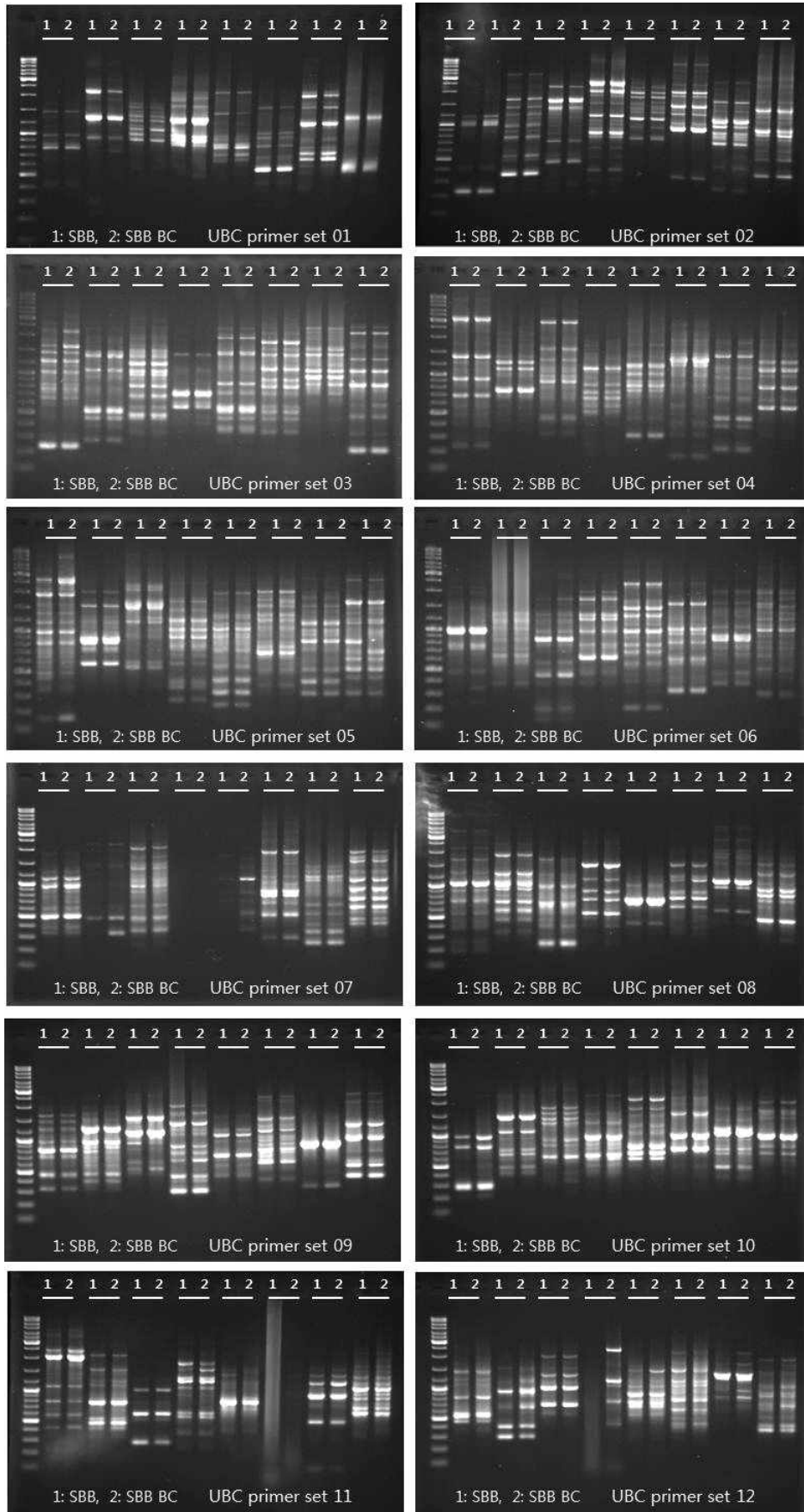
수박 NIL 집단(SBB x PI254744, 45nc x PI254744)의 흰가루병저항성 분자마커 개발을 위하여 RAPD-BSA를 실시하였다. 공시재료는 앞서 흰가루병 감수성 및 저항성의 표현형을 확인한 후 SBB, SBB BC3F4, 4NC, 4NC BC4F6의 개체들 중 저항성 표현형이 검정된 각 10개체씩 선발하여 DNA를 추출하였다. Total DNA의 추출은 CTAB과 chloroform 추출법을 기본으로 변형한 방법을 사용하였으며, A230/A260과 A260/A280 값 모두 약 2.0에 가까운 순도높은 DNA만을 분석에 사용하였다.

1차년도에 개별개체를 가지고 RAPD를 한 결과 NIL의 특성으로 인하여 저항성 개체들의 특성이 나타나는 profile을 얻을 수가 없었기 때문에 각각의 추출한 DNA들을 같은 농도로 희석한 후 pooling하여 RAPD 분석에 이용하였다.

RAPD 합성을 위한 DNA의 농도는 1-2ng을 template으로 이용하였으며, PCR 조건은 초기 95°C 에서 5분간 denaturation을 실시한 후, 94°C 20초, 37°C 40초, 72°C 1분을 45 사이클 실시하였다. PCR 반응물들은 1.5% agarose gel에 로딩한 후 결과를 확인하였으며, 재현성을 확인하기 위하여 2반복으로 실시하였다.

표 2-3-2. 수박 NIL 집단의 RAPD 분석에 사용된 primers

UBC Conifer Kit Primers			
116. TAC GAT GAC G	256. TGC AGT CGA A	370. TCA GCC AGC G	533. GCA TCT ACG C
119. ATT GGG CGA T	258. CAG GAT ACC A	372. CCC ACT GAC G	536. GCC CCT CGT C
123. GTC TTT CAG G	266. CCA CTC ACC G	381. ATG AGT CCT G	550. GTC GCC TGA G
146. ATG TGT TGC G	268. AGG CCG CTT A	402. CCC GCC GTT G	554. TCA TCC AGG G
153. GAG TCA CGA G	269. CCA GTT CGC C	408. CCG TCT CTT T	561. CAT AAC GAC C
159. GAG CCC GTA G	270. TGC GCG CGG G	424. ACG GAG GTT C	564. CGG CGT TAC G
167. CCA ATT CAC G	295. CGC GTT CCT G	427. GTA ATC GAC G	570. GGC CGC TAA T
168. CTA GAT GTG C	297. GCG CAT TAG A	429. AAA CCT GGA C	579. TGG AAT CGT G
169. ACG ACG TAG G	299. TGT CAG CGG T	460. ACT GAC CGG C	580. GCG ATA GTC C
181. ATG ACG ACG G	320. CCG GCA TAG A	479. CTC ATA CGC G	586. CCG GTT CCA G
184. CAA ACG GCA C	322. GCC GCT ACT A	485. AGA ATA GGG C	587. GCT ACT AAC C
186. GTG CGT CGC T	324. ACA GGG AAC G	493. CCG AAT CAC T	589. GAC GGA GGT C
190. AGA ATC CGC C	327. ATA CGG CGT C	499. GGC CGA TGA T	590. CCG GCA TGT T
193. TGC TGG CTT T	330. GGT GGT TTC C	504. ACC GTG CGT C	600. GAA GAA CCG C
195. GAT CTC AGC G	333. GAA TGC GAC G	507. AGA CGT ACT C	631. GGC TTA ACC G
203. CAC GGC GAG T	336. GCC ACG GAG A	509. ACA GAG ACT G	667. CGC AGA AAT C
213. CAG CGA ACT A	337. TCC CGA ACC G	517. GGT CGC AGC T	677. TCT CAG GAC A
225. CGA CTC ACA G	348. CAC GGC TGC G	519. ACC GGA CAC T	
248. GAG TAA GCG G	352. CAC AAC GGG T	530. AAT AAC CGC C	
254. CGC CCC CAT T	362. CCG CCT TAC A	531. GCT CAC TGT T	
Conifer Operons			
A-06 GGT CCC TGA C	B-08 GTC CAC ACG G	E-12 TTA TCG CCC C	J-01 CCC GGC ATA A
A-08 GTG ACG TAG G	B-13 TTC CCC CGC T	E-17 CTA CTG CCG T	J-08 CAT ACC GTG G
A-09 GGG TAA CGC C	C-04 CCG CAT CTA C	F-07 CCG ATA TCC C	X-04 CCG CTA CCG A
A-11 CAA TCG CCG T	D-12 CAC CGT ATC C	G-09 CTG ACG TCA C	Y-09 AGC AGC GCA C
A-16 AGC CAG CGA A	E-08 TCA CCA CGG T	G-10 AGG GCC GTC T	Y-17 GAC GTG GTG A
B-05 TGC GCC CTT C	E-09 CTT CAC CCG A	G-12 CAG CTC ACG A	



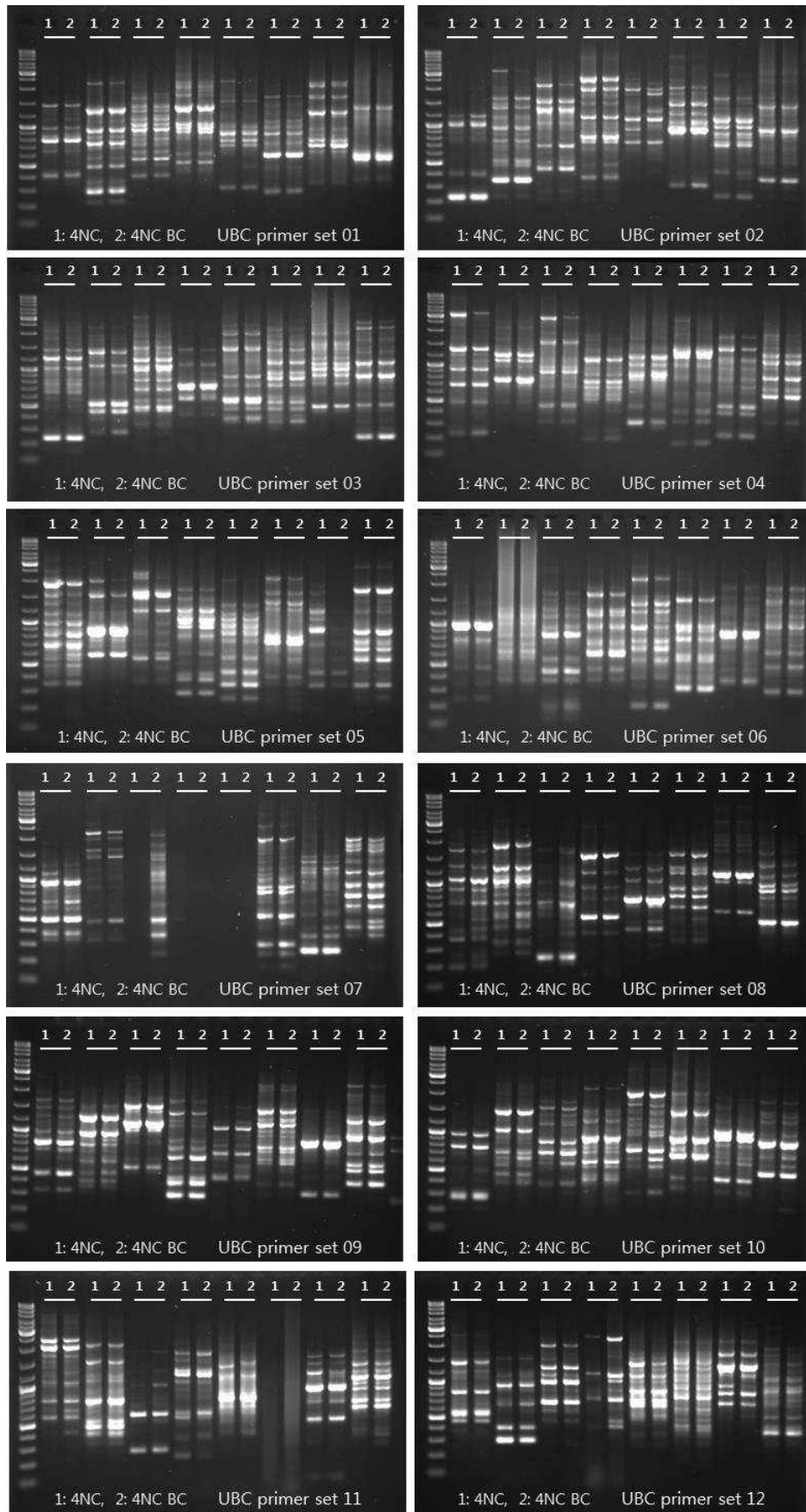


그림 2-3-5. SBB 및 45NC의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 RAPD 분석

(4) 수박 NIL 집단의 SRAP

SRAP(sequence-related amplified polymorphism)을 위해 제작된 프라이머는 A와 T염기가 풍부한 프로모터와 인트론 부위에서 우선적으로 증폭되는 것을 이용한 것으로, 간단하고 정확성이 높으며 많은 시료를 대상으로 하는 유전자형 분석에 유용하게 이용되고 있다.

본 실험에서는 Li와 Quiros(2001)가 보고한 방법을 이용하여 SRAP을 실시해보았다. SRAP 합성을 위하여 각 개체를 pooling한 DNA 100ng을 template으로 사용하였으며, PCR은 초기 5 cycles은 94°C 1분, 35°C 1분, 72°C 1분을 사용하였으며, 이후에 annealing 온도를 50°C로 하여 35 cycles을 수행하였다. PCR 수행 후에는 2% agarose gel에서 증폭여부를 확인하였으며, 확인된 PCR product는 6% polyacrylamide gel에 로딩한 후 silver staining하였다.

Li와 Quiros(2001)가 제시한 프라이머들을 조합하여 SBB, SBB BC, 4NC, 4NC BC 각각의 pooling 한 DNA에 적용한 결과, 수박 NIL에서는 다형성이 많이 나타나지 않았다.

표 2-3-3. Li와 Quiros(2001)의 SRAP primers

<i>forward primers</i>	<i>reverse primers:</i>
me1, 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em1, 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3',
me2, 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2, 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3',
me3, 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3, 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3',
me4, 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em4, 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3',
me5, 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em5, 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3',
	em6, 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'.

4NC(Lane 1)-4NC BC(Lane 2) SRAP (Li와 Quiros의 SRAP primer 사용)

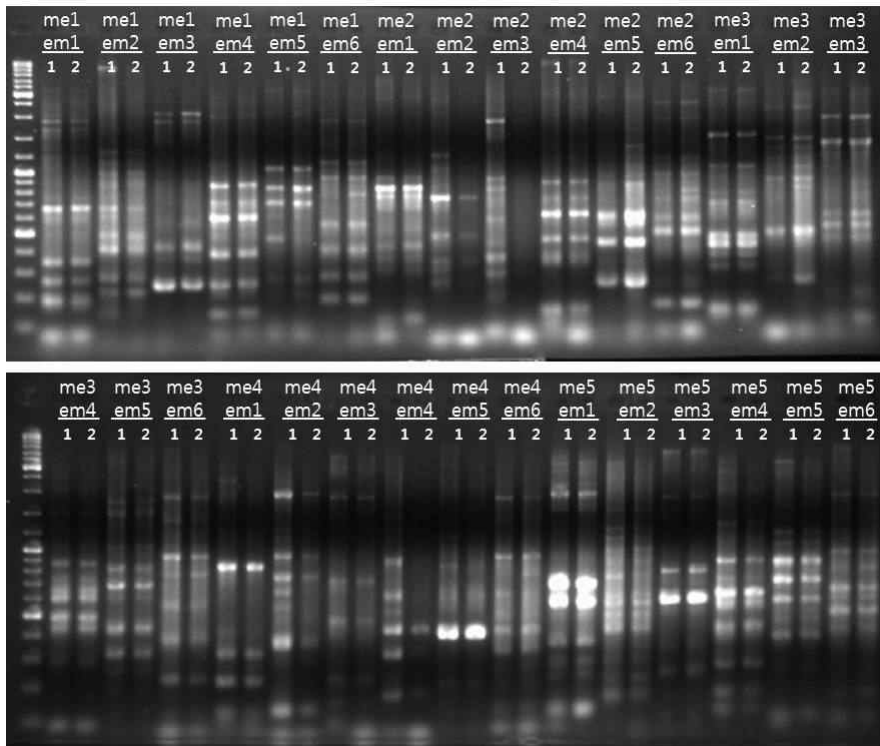


그림 2-3-6. SBB 및 45NC의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 SRAP 분석

SBB(Lane 1)-SBB BC(Lane 2) SRAP (Li와 Quiros의 SRAP primer 사용)

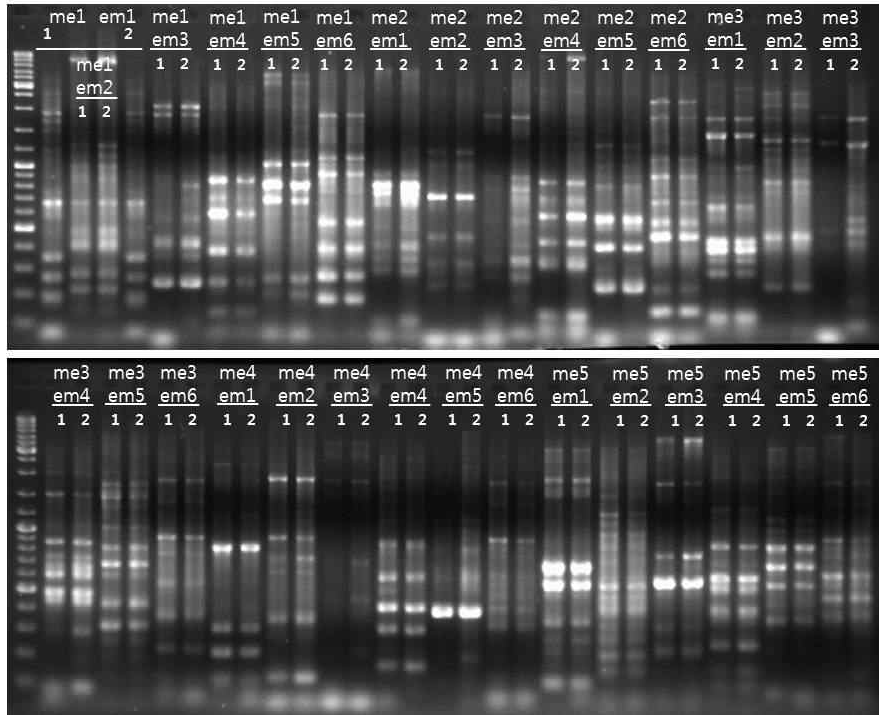


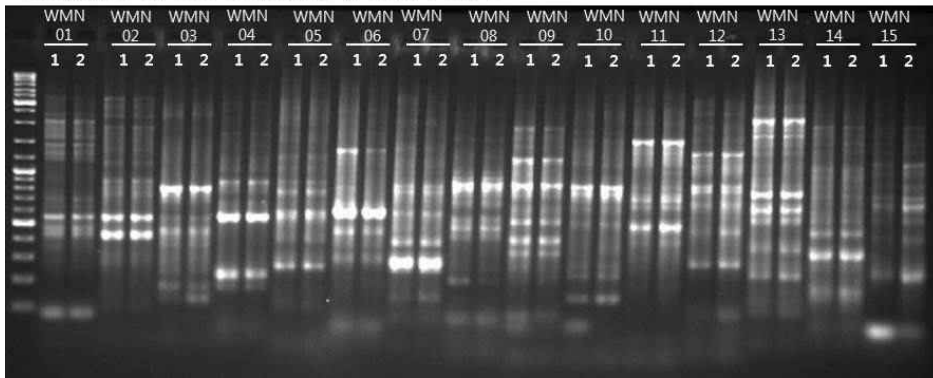
그림 2-3-6. (계속)

따라서, Watermelon Genome Database(<http://www.iwgi.org/>)에 있는 reference sequences를 참고하여 수박 NIL에 적합한 새로운 SRAP primer를 제작한 후 SRAP을 실시하였다. 그 결과 기존의 SRAP primer 조합보다 NIL group에서 더 많은 다양성 밴드를 획득할 수 있었다.

표 2-3-4. 본 연구에서 제작한 수박 NIL 적용가능 SRAP primer sequences(WMN SRAP)

No.	Forward	Reverse	N2G3	N3G2	N2G3	Max count
1	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTTAA	1	5	1	5
2	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTTTA	0	5	0	5
3	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTTCA	0	5	0	5
4	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTTTA	0	5	0	5
5	TGAGTCCAAACCGGATG	GACTGCGTACGAATTTTA	2	7	3	7
6	TGAGTCCAAACCGGAGA	GACTGCGTACGAATTCTT	0	5	0	5
7	TGAGTCCAAACCGGAGG	GACTGCGTACGAATTTGA	0	5	0	5
8	TGAGTCCAAACCGGACA	GACTGCGTACGAATTTTA	0	5	0	5
9	TGAGTCCAAACCGGACG	GACTGCGTACGAATTTTA	0	6	0	6
10	TGAGTCCAAACCGGACG	GACTGCGTACGAATTTCA	0	5	0	5
11	TGAGTCCAAACCGGACG	GACTGCGTACGAATTTCA	1	5	1	5
12	TGAGTCCAAACCGGTTG	GACTGCGTACGAATTTTC	1	5	1	5
13	TGAGTCCAAACCGGGGG	GACTGCGTACGAATTGAC	0	5	0	5
14	TGAGTCCAAACCGGCAT	GACTGCGTACGAATTTGT	0	5	0	5
15	TGAGTCCAAACCGGCGT	GACTGCGTACGAATTTGT	0	5	0	5

SBB(Lane 1)-SBB BC(Lane 2) WMN SRAP



4NC(Lane 1)-4NC BC(Lane 2) WMN SRAP

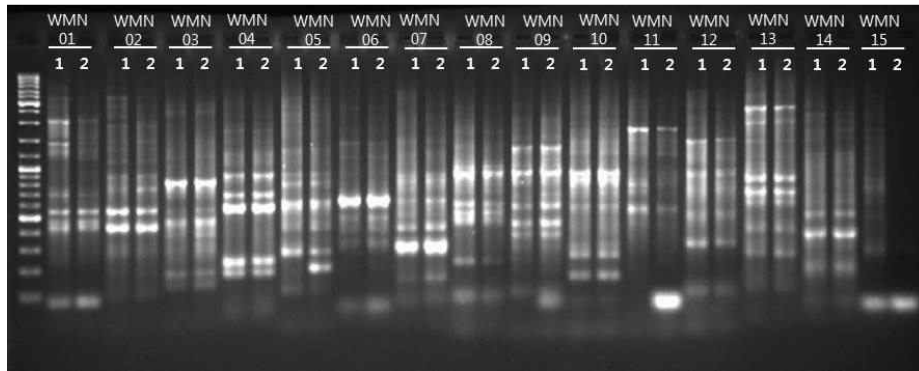


그림 2-3-7. SBB 및 45NC의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 SRAP 분석 (자체적으로 작성한 SRAP primer sets를 활용하여 분석)

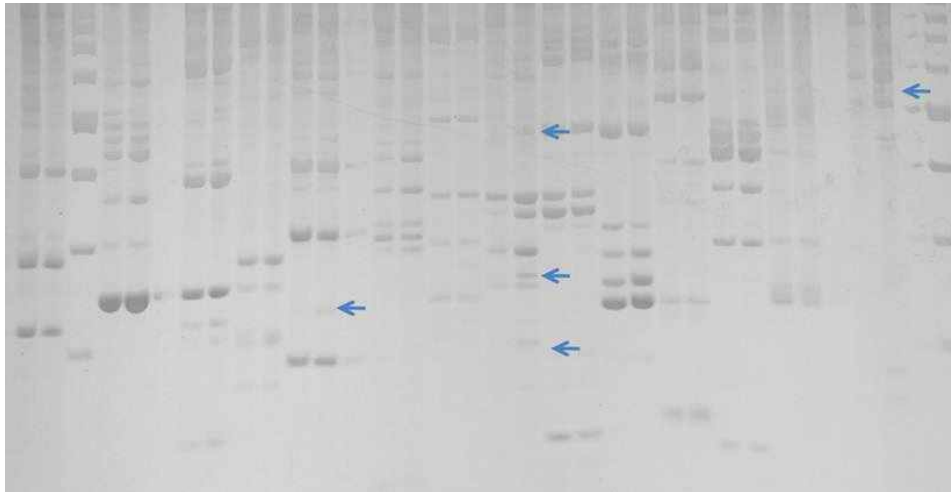


그림 2-3-8. 자체작성한 SRAP primer sets을 통한 SBB 여교잡 계통 특이 밴드 선별 (6% polyacrylamide gel)

(5) 수박 NIL 집단의 AFLP

수박 NIL 집단의 흰가루병저항성 분자마커 개발을 위한 AFLP는 Invitrogen사의 AFLP[®] Analysis System I과 AFLP[®] Starter Primer Kit을 사용하였으며, 6% polyacrylamide gel에 로딩한 후 silver staining하였다.

AFLP 분석을 위한 DNA는 SBB, SBB BC, 4NC, 4NC BC 각각의 개체를 pooling한 DNA를 200ng 사용하였으며, *EcoR* I과 *Mse* I으로 digestion한 후 adaptor를 붙이고 kit에서 제공하는 *EcoR* I과 *Mse* I 유래의 primer들을 조합하여 증폭하였다. 조합된 primer들이 제대로 증폭되었는지 확인하기 위하여 총 20ul PCR 결과물 중 5ul를 1.2% agarose gel에서 확인 할 결과 수박 NIL 집단에서는 특정 primer 조합에서 증폭이 일어나지 않는 것을 확인하였다.

SBB(Lane 1)-SBB BC(Lane 2) AFLP primer selection

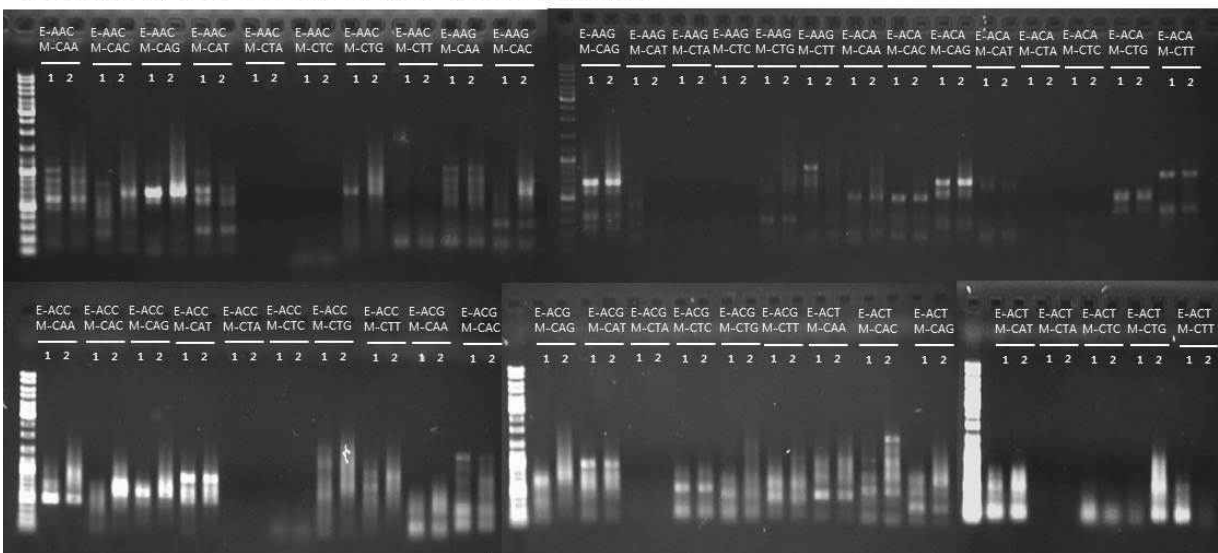


그림 2-3-9. SBB의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 AFLP primer selection

SBB-SBB BC AFLP

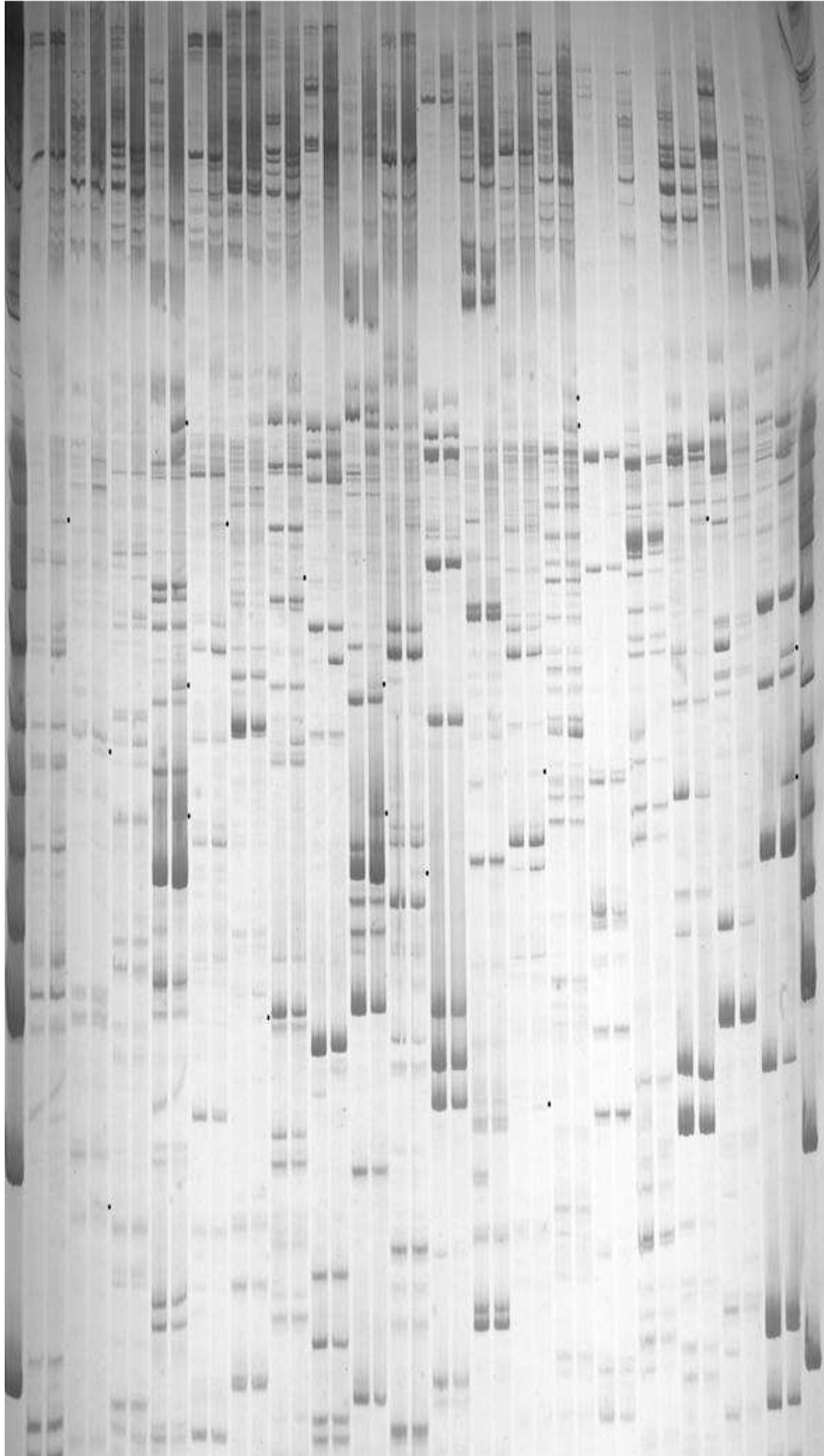


그림 2-3-10. SBB의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 AFLP 분석

4NC-4NC BC AFLP

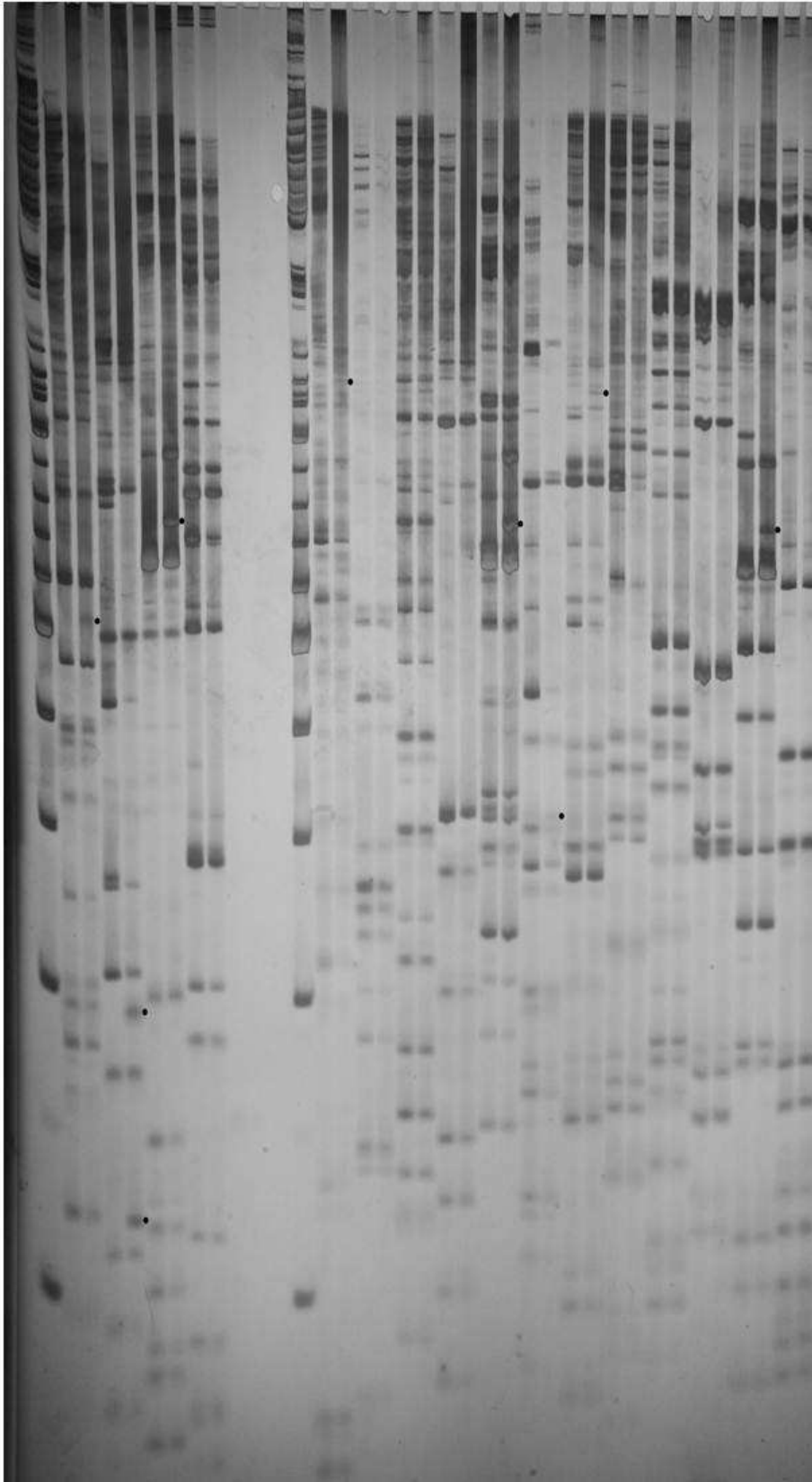


그림 2-3-11. 45NC의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 AFLP 분석

(6) 수박 NIL 집단의 PMR1 관련 분자마커 개발

상기에서 기술한 RAPD, SRAP, AFLP를 통하여 얻어진 SBB BC와 4NC BC의 특이적인 band는 QIAEX II® Gel Extraction Kit를 이용하여 elution한 후 pGEM T-EASY vector에 cloning하여 sequencing하였다. Sequencing 결과물들은 다시 Watermelon Genome Database (<http://www.iwgi.org/>)에서 blasting을 하였고, NIL 특이적인 specific primer를 제작하였다.

현재까지 RAPD에서 유래한 NIL 특이적인 band 39개, SRAP에서 유래한 특이 band 25개, AFLP에서 유래한 특이 band 49개를 확보하였다. 또한, 확인된 우성 마커들은 염기서열 결정 및 주변 염기서열 파악을 통하여 공우성 마커인 CAPS 또는 SNP 마커로 전환하였다.

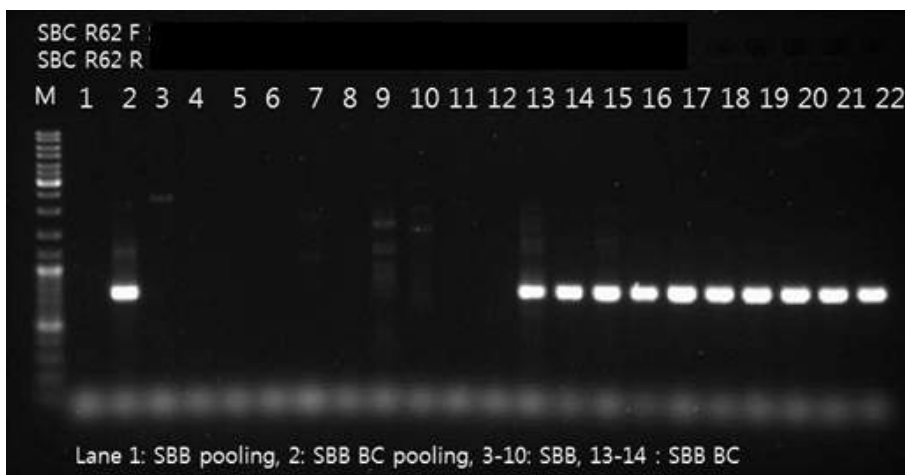


그림 2-3-12. SBB 및 45NC의 근동질계통(NIL)에 대한 흰가루병 저항성 SCAR 마커 스크리닝 결과

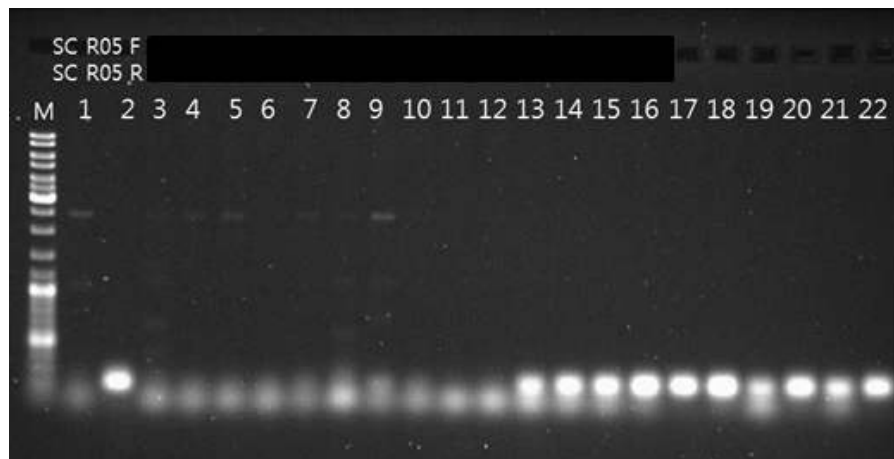
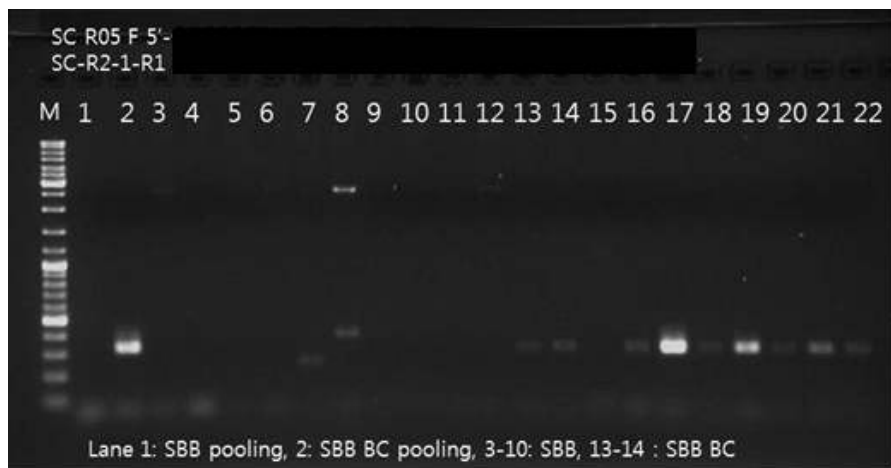
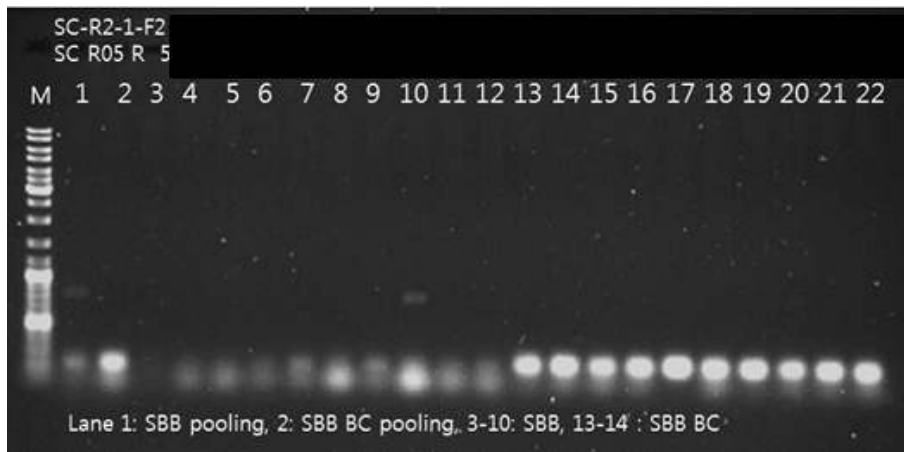


그림 2-3-12. (계속)

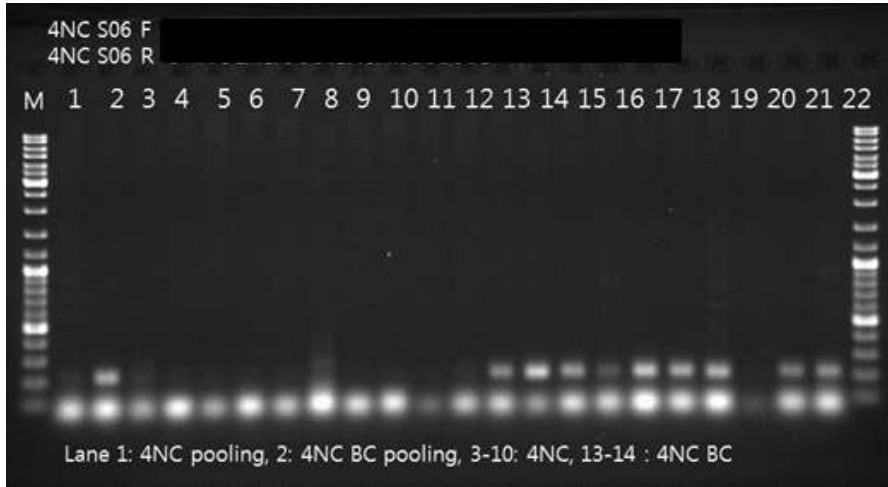


그림 2-3-12. (계속)

(7) 흰가루병 저항성 NIL의 SCAR 마커 F2 표현형과 비교확인

○ 수박 DNA의 준비

수박의 흰가루병 저항성 연관유전자 마커 탐색 및 제작을 위하여 본 실험에서 사용된 ‘PI254744’, ‘SBB’, ‘SBB BC’, ‘SBBxSBB254BC₃F₅’ (F₁), ‘SBBxSBB254BC₃F₅xSBB’ (F₂), ‘SBBxSBB254BC₃F₅xSBB254BC₃F₅’ (F₂) 등의 total DNA는 기존의 CTAB 방법을 변형하여 추출하였다.

식물체의 엽절편 시료를 약 100mg씩 1.5ml eppendorf tube에 채취하여 액체질소로 냉각시킨 후 Automill(Tokken Inc., Japan)로 마쇄하고 800μl의 추출 버퍼를 첨가한 뒤 65℃ 항온기에서 20분간 처리하였다. 동량의 CI (chloroform:isoamylalcohol=24:1, v/v)로 3분간 실온에서 반응시킨 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 분리 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 20분간 침전하고 원심분리(15,000 rpm, 4℃, 10분)하여 침전물을 회수하였다. 회수 한 침전물은 600μl의 ultrapure water에 녹인 후 4μl RNase(10mg/mL stock)를 넣고 37℃ 항온기에서 30분간 처리하였으며, 동량의 PCI(phenol: chloroform:isoamylalcohol =25:24:1,v/v/v)를 처리한 후 한번 더 CI 처리를 하였다. CI 처리후 상층액은 1/4부피의 5M NaCl과 2배의 99% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 20분간 침전시킨 후 원심분리 하여 침전물을 회수하였다. 회수된 DNA는 70% 에탄올로 세척한 다음에 건조하여 80μL의 0.1×TE버퍼에 녹인 후 분광광도계(DU 700, Beckman Instruments, USA)로 순도확인 및 정량하였다.

수박의 흰가루병 저항성 연관유전자 마커 탐색을 위한 DNA profile 분석시 단일 개체에서의 비교 마커 탐색은 위험성이 높다는 판단 하에 DNA를 pooling(SBB, SBB BC, F2 각각 10개체씩)하여 후보 마커들을 선별하였다.

○ 흰가루병 저항성 NIL의 SCAR 마커 F2 표현형과 비교확인

RAPD, SRAP, AFLP를 통하여 얻어진 ‘SBB’ 와 ‘SBB BC’ 의 특이적인 band들은 QIAEX

II® Gel Extraction Kit를 이용하여 elution한 후 pGEM T-EASY vector(Promega Co.)에 cloning 하여 sequencing하였다. Sequencing 결과물들은 다시 Watermelon Genome Database (<http://www.iwgi.org/>)에서 blasting을 한 후 NIL 특이적인 specific primer를 제작하였다.

흰가루병 저항성 NIL의 특이적인 밴드들을 RAPD에서 12개, SRAP에서 8개, AFLP에서 49개를 확보하여 클로닝한 후 Cucurbit Genomic Database(IWIGI; <http://www.icugi.org/>)에서 blast하였다. 그 결과 대부분의 염기서열들은 중국에서 발표한 수박들의 reference sequences(Xu et al., 2013)와 일치하지 않았으며, 그것으로 얻어진 밴드들의 염기서열이 흰가루 저항성 형질을 가져온 PI254744의 것에서 유래되었을 것이라고 추측되었다.

SCAR를 위한 PCR 믹스는 PI254744, SBB와 SBB BC, F2 개체들의 50ng 주형 DNA에 1X ExTaq buffer(Takara Co.), 2mM MgCl₂, 200µM dNTP, 프라이머 0.25µM, 1U ExTaq polymerase(Takara Co.)를 넣고 조제하였다.

SCAR PCR은 PCR thermal cycler(AB 2700, PerkinElmer Inc.)에서 5분간 초기변성(95°C)을 하여 94°C 30초, 65°C 1분, 72°C 1분을 35 사이클 수행하고 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시킨 후 1.2% TAE agarose gel에 로딩하여 EtBr에 염색한 후 PCR 반응물을 확인하였다.

본 연구에서 개발된 SCAR marker들을 PMR 관련 마커인자 반복친과 교잡한 F2에서 표현형과 비교하여 확인한 결과 최종적으로 CWPM01 (743 bp), CWPM02 (203 bp), CWPM03 (191 bp), CWPM04 (322 bp), CWPM05 (1051 bp) 등 5개의 마커가 선정되었다(Fig. 7, 8, 9, 10, 11). 이들 마커들은 PI254744에서 유래된 흰가루저항성 관련인자가 SBB BC에 도입되었음을 보여주며, F2 분석에서 표현형과 분자마커가 총 164개의 F2중 160개가 일치하여 97.6% 이상의 일치율을 보여주었다(Table 6). 카이 검정 결과(Table 7), NIL F2의 분리세대는 표현형과 유전자형 모두 흰가루병 감수성과 저항성이 1:3의 분리비로 분리되었음을 추정할 수 있었다.

본 연구 결과와 더불어 기존에 발표된 인도의 고정종인 Arka Manic을 활용한 수박 흰가루 저항성이 불완전우성인 것과 비교되는 다른 대립유전자로 우성 유전을 확인하였기 때문에, 연구를 통해 확인된 우성 마커들은 염기서열 결정 및 주변 염기서열 파악을 통하여 공우성 마커인 CAPS 또는 SNP 마커로 전환하였다.

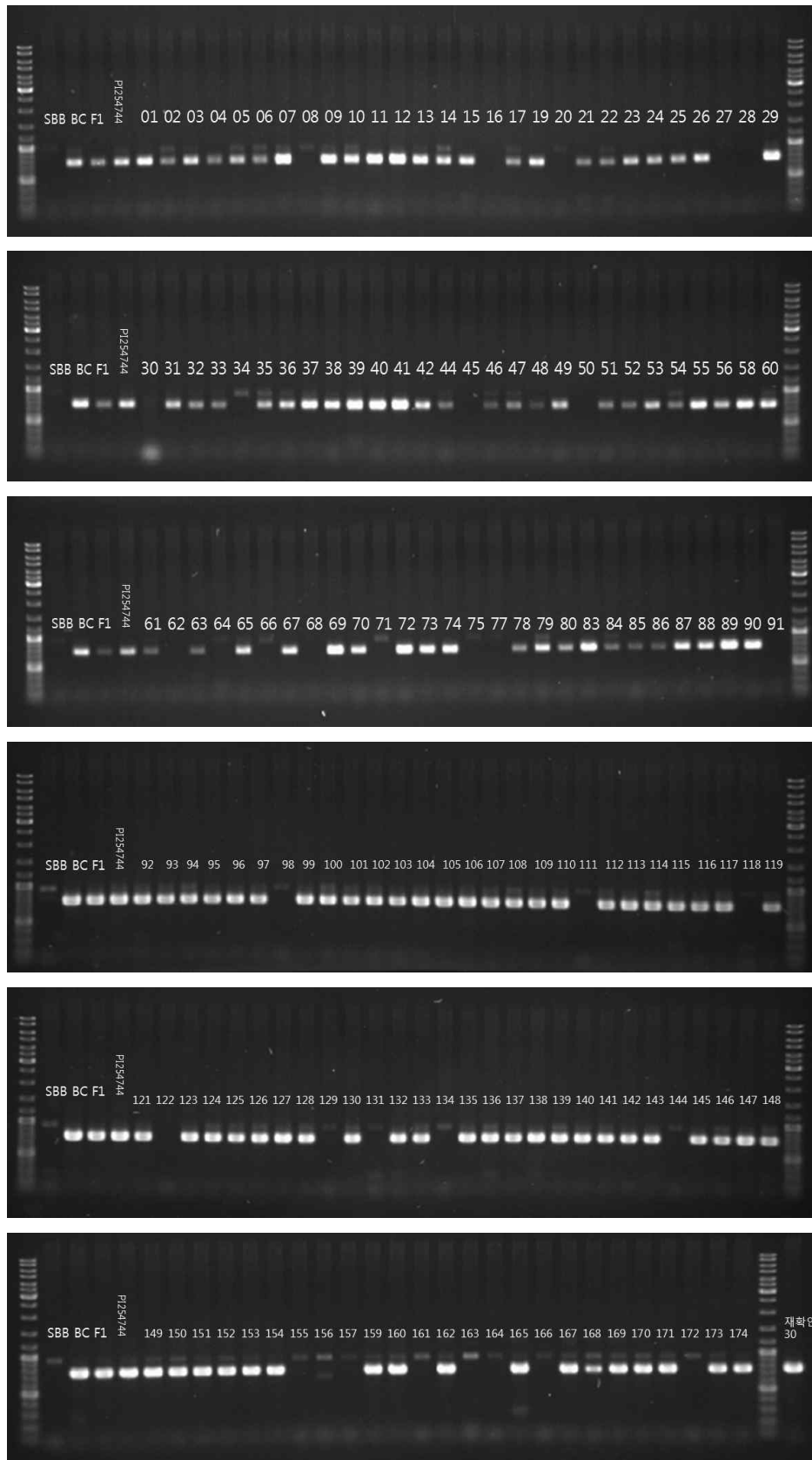


Fig. 2-3-13. CWPM01 (743 bp) SCAR marker for identification of resistance to powdery mildew in ‘PI254711’, ‘SBB’, ‘SBB BC’, and F2.

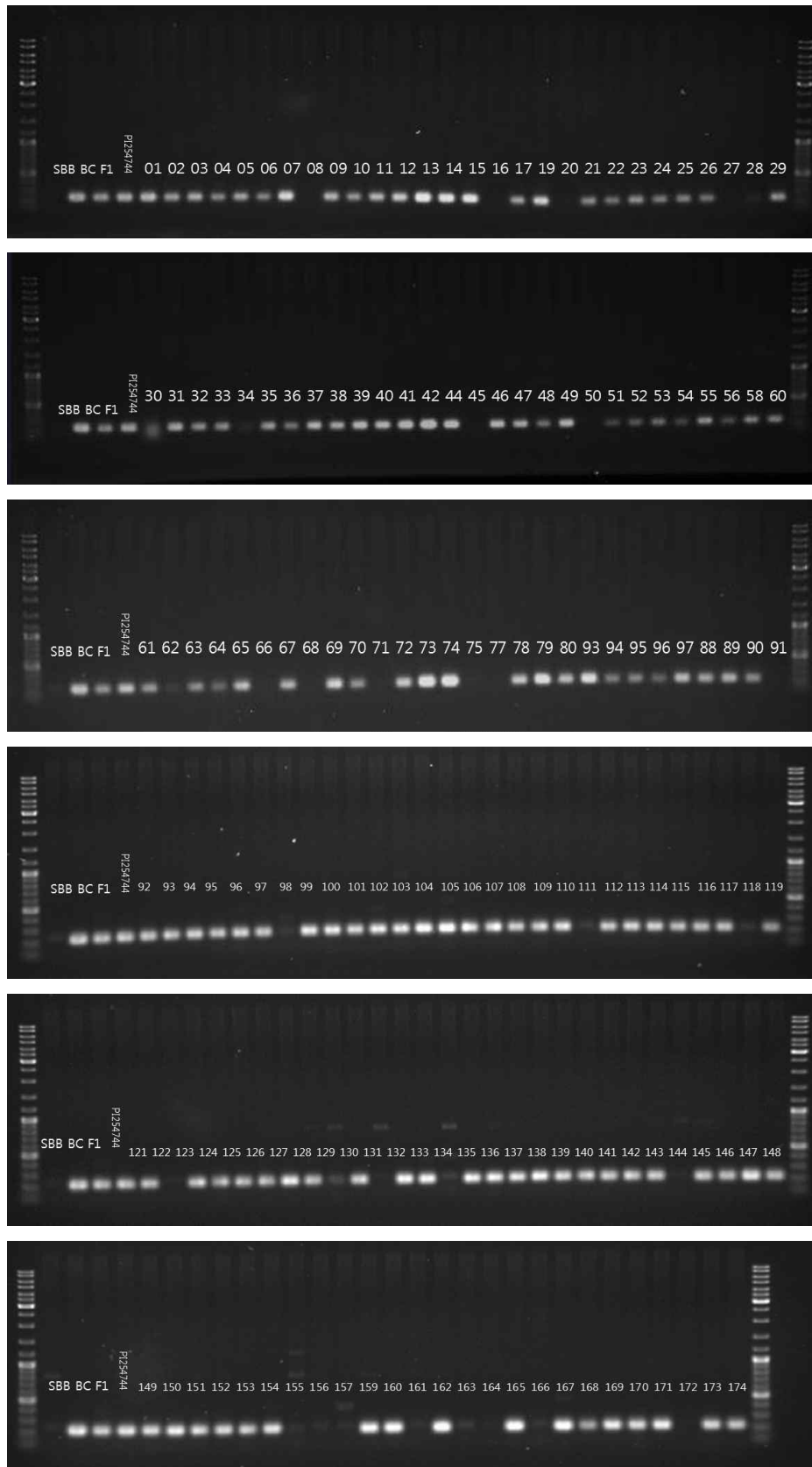


Fig. 2-3-14. CWPM02 (203 bp) SCAR marker for identification of resistance to powdery mildew in ‘PI254711’, ‘SBB’, ‘SBB BC’, and F2.

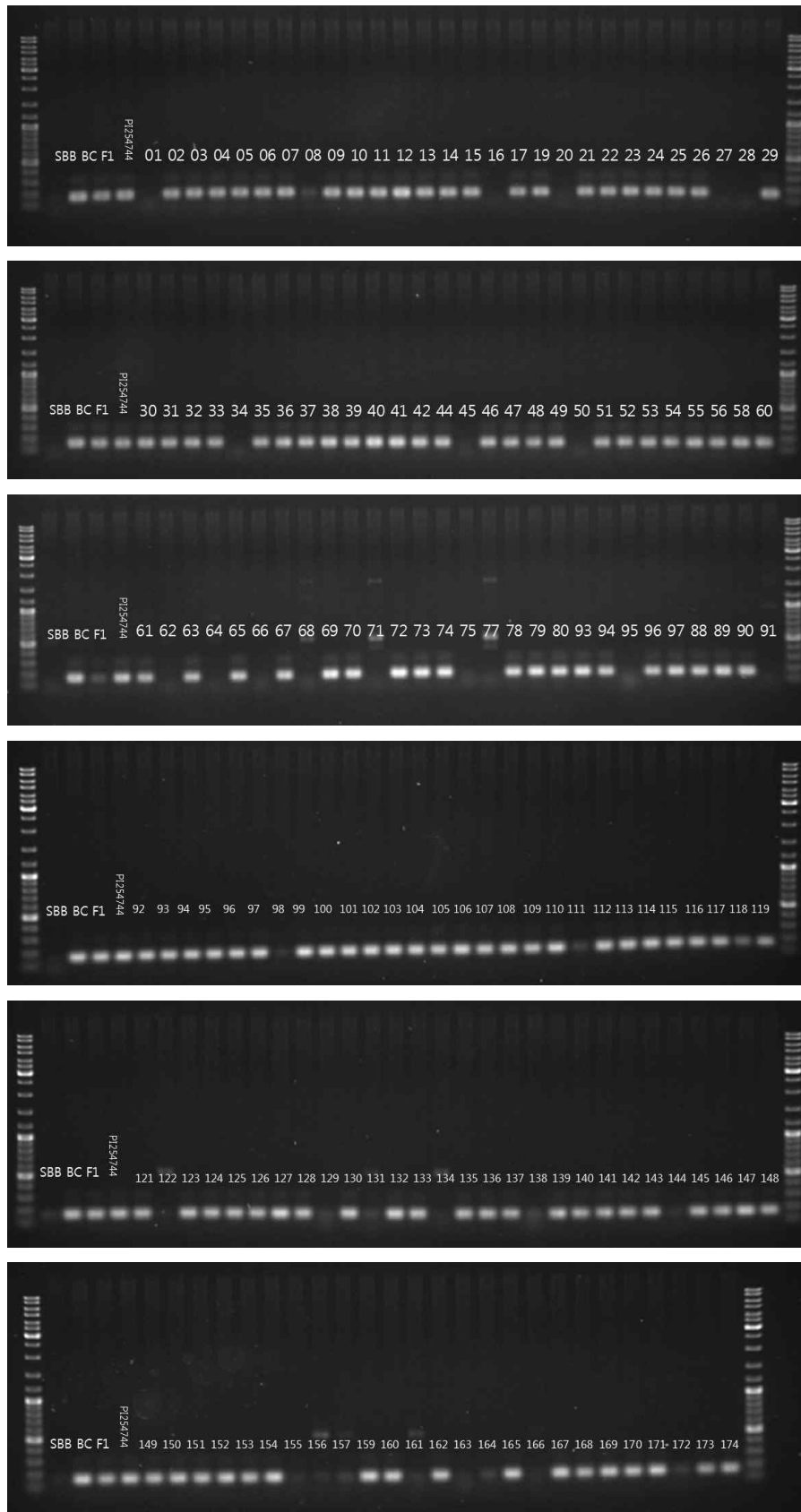


Fig. 2-3-15. CWPM03 (191 bp) SCAR marker for identification of resistance to powdery mildew in ‘PI254711’, ‘SBB’, ‘SBB BC’, and F2.

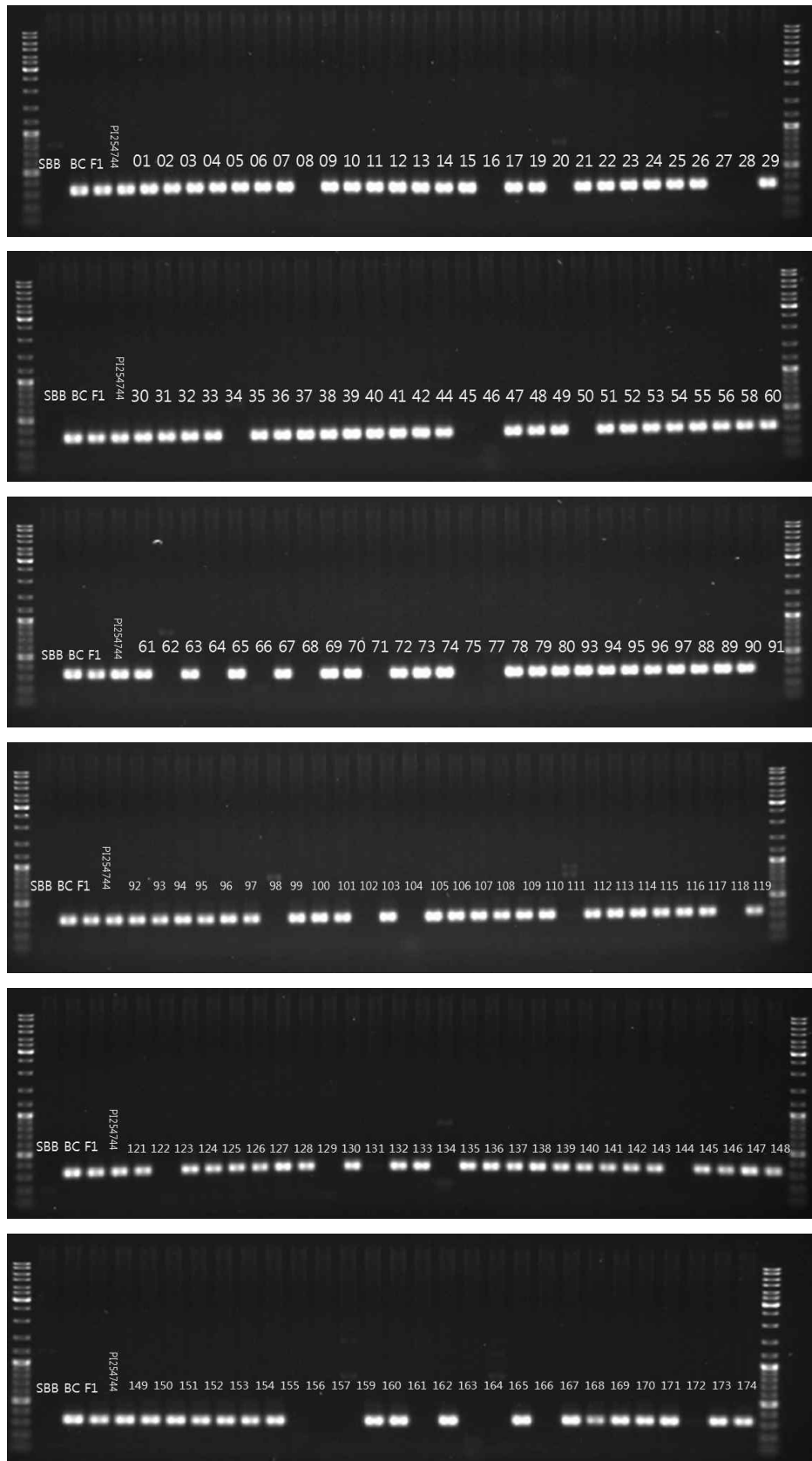


Fig. 2-3-16. CWPM04 (322 bp) SCAR marker for identification of resistance to powdery mildew in 'PI254711', 'SBB', 'SBB BC', and F2.

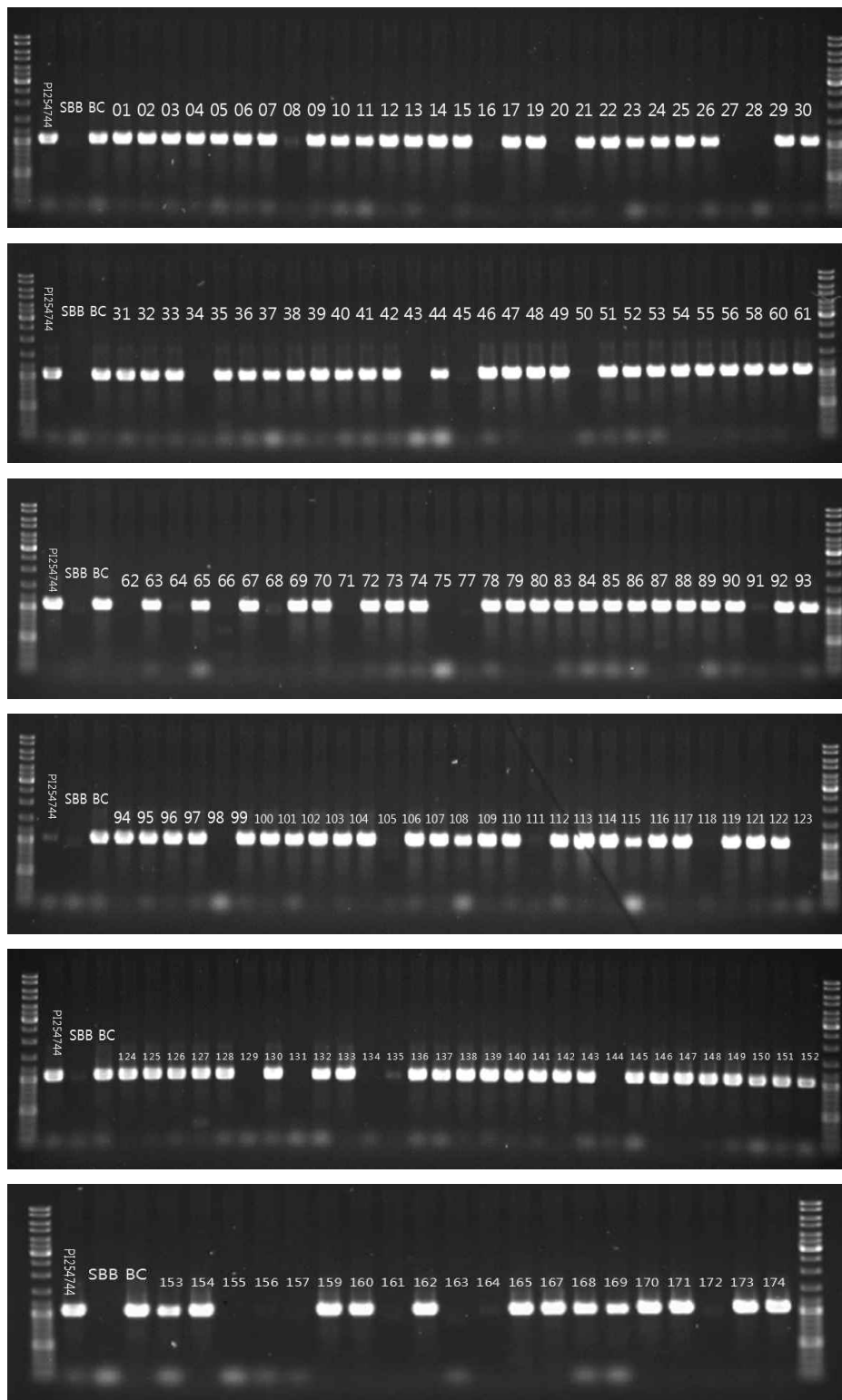


Fig. 2-3-17. CWPM05 (1051 bp) SCAR marker for identification of resistance to powdery mildew in ‘PI254711’, ‘SBB’, ‘SBB BC’, and F2.

Table 2-3-5. Comparison of phenotyping and genotyping of F₂ segregation population in NIL backcross with F₁ (‘SBBxSBB BC’)x(‘SBBxSBB BC’).

F ₂ No.	Phenotype	SCAR marker for identification of PMR				
		CWPM01	CWPM02	CWPM03	CWPM04	CWPM05
1	R	+	+	+	+	+
2	R	+	+	+	+	+
3	R	+	+	+	+	+
4	R	+	+	+	+	+
5	R	+	+	+	+	+
6	R	+	+	+	+	+
7	R	+	+	+	+	+
8	S	-	-	-	-	-
9	R	+	+	+	+	+
10	S	+	+	+	+	+
11	R	+	+	+	+	+
12	R	+	+	+	+	+
13	R	+	+	+	+	+
14	R	+	+	+	+	+
15	R	+	+	+	+	+
16	S	-	-	-	-	-
17	R	+	+	+	+	+
20	S	-	-	-	-	-
21	R	+	+	+	+	+
22	R	+	+	+	+	+
23	R	+	+	+	+	+
24	R	+	+	+	+	+
25	R	+	+	+	+	+
26	R	+	+	+	+	+
27	S	-	-	-	-	-
28	S	-	-	-	-	-
29	R	+	+	+	+	+
30	R	+	+	+	+	+
31	R	+	+	+	+	+
32	R	+	+	+	+	+
33	R	+	+	+	+	+
34	S	-	-	-	-	-
35	R	+	+	+	+	+
36	R	+	+	+	+	+
37	R	+	+	+	+	+
38	R	+	+	+	+	+
39	R	+	+	+	+	+
40	R	+	+	+	+	+
41	R	+	+	+	+	+
42	R	+	+	+	+	+
44	R	+	+	+	+	+

Table 2-3-5. (continued)

F ₂ No.	Phenotype	SCAR marker for identification of PMR				
		CWPM01	CWPM02	CWPM03	CWPM04	CWPM05
45	S	-	-	-	-	-
46	R	+	+	+	+	+
47	R	+	+	+	+	+
48	R	+	+	+	+	+
49	R	+	+	+	+	+
50	S	-	-	-	-	-
51	R	+	+	+	+	+
52	R	+	+	+	+	+
53	R	+	+	+	+	+
54	R	+	+	+	+	+
55	R	+	+	+	+	+
56	R	+	+	+	+	+
58	R	+	+	+	+	+
60	R	+	+	+	+	+
61	R	+	+	+	+	+
62	S	-	-	-	-	-
63	R	+	+	+	+	+
64	S	-	-	-	-	-
65	R	+	+	+	+	+
66	S	-	-	-	-	-
67	R	+	+	+	+	+
68	S	-	-	-	-	-
69	S	+	+	+	+	+
70	R	+	+	+	+	+
71	S	-	-	-	-	-
72	R	+	+	+	+	+
73	R	+	+	+	+	+
74	R	+	+	+	+	+
75	S	-	-	-	-	-
77	S	-	-	-	-	-
78	R	+	+	+	+	+
79	R	+	+	+	+	+
80	R	+	+	+	+	+
83	R	+	+	+	+	+
84	R	+	+	+	+	+
85	R	+	+	+	+	+
86	R	+	+	+	+	+
87	R	+	+	+	+	+
88	R	+	+	+	+	+
89	R	+	+	+	+	+
90	R	+	+	+	+	+

Table 2-3-5. (continued)

F ₂ No.	Phenotype	SCAR marker for identification of PMR				
		CWPM01	CWPM02	CWPM03	CWPM04	CWPM05
91	S	-	-	-	-	-
92	R	+	+	+	+	+
93	R	+	+	+	+	+
94	R	+	+	+	+	+
95	R	+	+	+	+	+
96	R	+	+	+	+	+
97	R	+	+	+	+	+
98	S	-	-	-	-	-
99	R	+	+	+	+	+
100	R	+	+	+	+	+
101	R	+	+	+	+	+
102	R	+	+	+	+	+
103	R	+	+	+	+	+
104	R	+	+	+	+	+
105	R	+	+	+	+	-
106	R	+	+	+	+	+
107	R	+	+	+	+	+
108	R	+	+	+	+	+
109	R	+	+	+	+	+
110	R	+	+	+	+	+
111	S	-	-	-	-	-
112	R	+	+	+	+	+
113	R	+	+	+	+	+
114	R	+	+	+	+	+
115	R	+	+	+	+	+
116	R	+	+	+	+	+
117	R	+	+	+	+	+
118	S	-	-	-	-	-
119	R	+	+	+	+	+
121	R	+	+	+	+	+
122	R	-	-	-	-	+
123	R	+	+	+	+	-
124	R	+	+	+	+	+
125	R	+	+	+	+	+
126	R	+	+	+	+	+
127	R	+	+	+	+	+
128	R	+	+	+	+	+
129	S	-	-	-	-	-
130	R	+	+	+	+	+
131	S	-	-	-	-	-
132	R	+	+	+	+	+

Table 2-3-5. (continued)

F ₂ No.	Phenotype	SCAR marker for identification of PMR				
		CWPM01	CWPM02	CWPM03	CWPM04	CWPM05
133	R	+	+	+	+	+
134	S	-	-	-	-	-
135	R	+	+	+	+	-
136	R	+	+	+	+	+
137	R	+	+	+	+	+
138	R	+	+	+	+	+
139	R	+	+	+	+	+
140	R	+	+	+	+	+
141	R	+	+	+	+	+
142	R	+	+	+	+	+
143	R	+	+	+	+	+
144	S	-	-	-	-	-
145	R	+	+	+	+	+
146	R	+	+	+	+	+
147	R	+	+	+	+	+
148	R	+	+	+	+	+
149	R	+	+	+	+	+
150	R	+	+	+	+	+
151	R	+	+	+	+	+
152	R	+	+	+	+	+
153	R	+	+	+	+	+
154	R	+	+	+	+	+
155	S	-	-	-	-	-
156	S	-	-	-	-	-
157	S	-	-	-	-	-
159	R	+	+	+	+	+
160	R	+	+	+	+	+
161	S	-	-	-	-	-
162	R	+	+	+	+	+
163	S	-	-	-	-	-
164	S	-	-	-	-	-
165	R	+	+	+	+	+
166	S	-	-	-	-	+
167	R	+	+	+	+	+
168	R	+	+	+	+	+
169	R	+	+	+	+	+
170	R	+	+	+	+	+
171	R	+	+	+	+	+
172	S	-	-	-	-	-
173	R	+	+	+	+	+
174	R	+	+	+	+	+

Table 2-3-6. Chi-square test of phenotyping and genotyping on watermelon NIL F2 segregation.

	Phenotype		Genotyping	
	S	R	S	R
Observed (o)	32	132	34	130
Expected (e)	41	123	41	123
Deviation (o - e)	-9	9	-7	7
Deviation ² (d ²)	81	81	49	49
d ² /e	1.98	0.66	1.20	0.40
X ²		2.634		1.593
P value (two-tailed)		0.1046		0.2068
Expected	25%	75%	25%	75%

²Chi square was measured with 1 degrees of freedom.

4. 흰가루병 race1W 저항성 CAPS 마커의 개발

앞서의 NIL을 활용하여 개발된 SCAR 마커들의 염기서열을 결정한 후, 참조염기서열 (www.icugi.org)의 위치를 확인한 바, 이중 알려진 NBS-LRR의 위치에서 *Nco* I 제한효소로 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 마커를 개발할 수 있음을 확인하였다.

다음 그림 2-4-1은 PI 254744 x SBB 의 376 개체의 F2 분리세대에서 SCAR 로 확인된 염기서열 부근에서 CAPS 마커로 개발하기 위하여 PCR로 얻어진 amplicon의 결과이다.

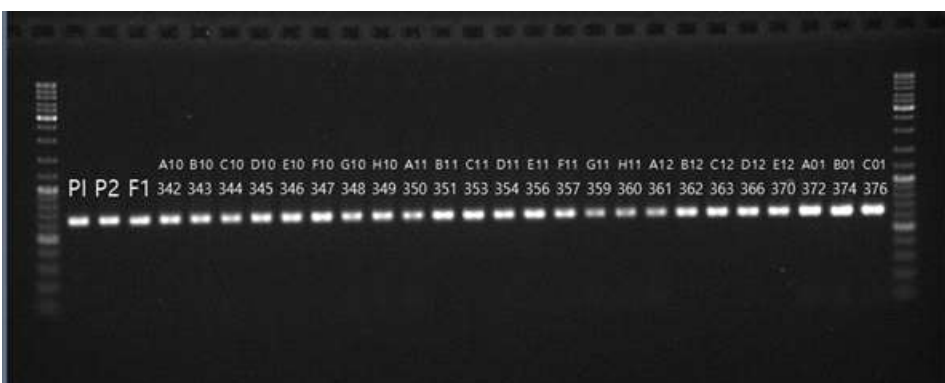
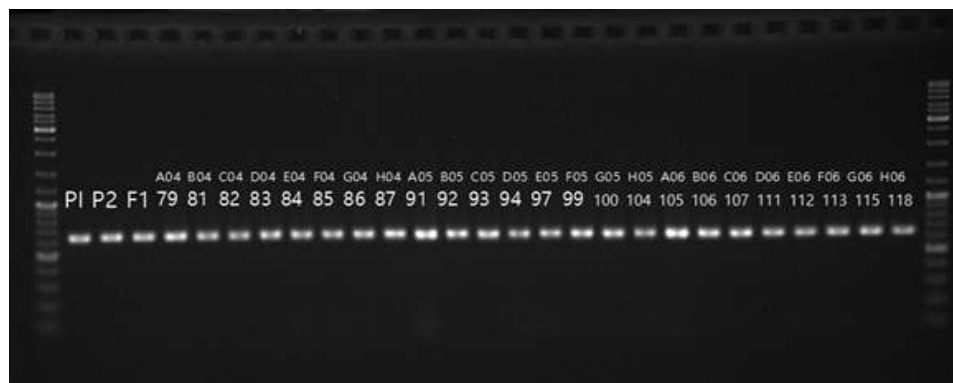


그림 2-4-1. 수박 PMR 1W 연관 CAPS 마커 개발을 위한 PCR 결과

수박 PMR-1W 연관 CAPS 마커는 4가지 후보마커들을 대상으로 하였고, 이들에 대한 F2 후대에 대한 표현형 저항성 검정결과 최종적으로 PMR1-Cap04가 선발되었고, 107개의 F2 분리세대에 대한 유전자형의 검정 결과는 그림 2-4-2와 같다.

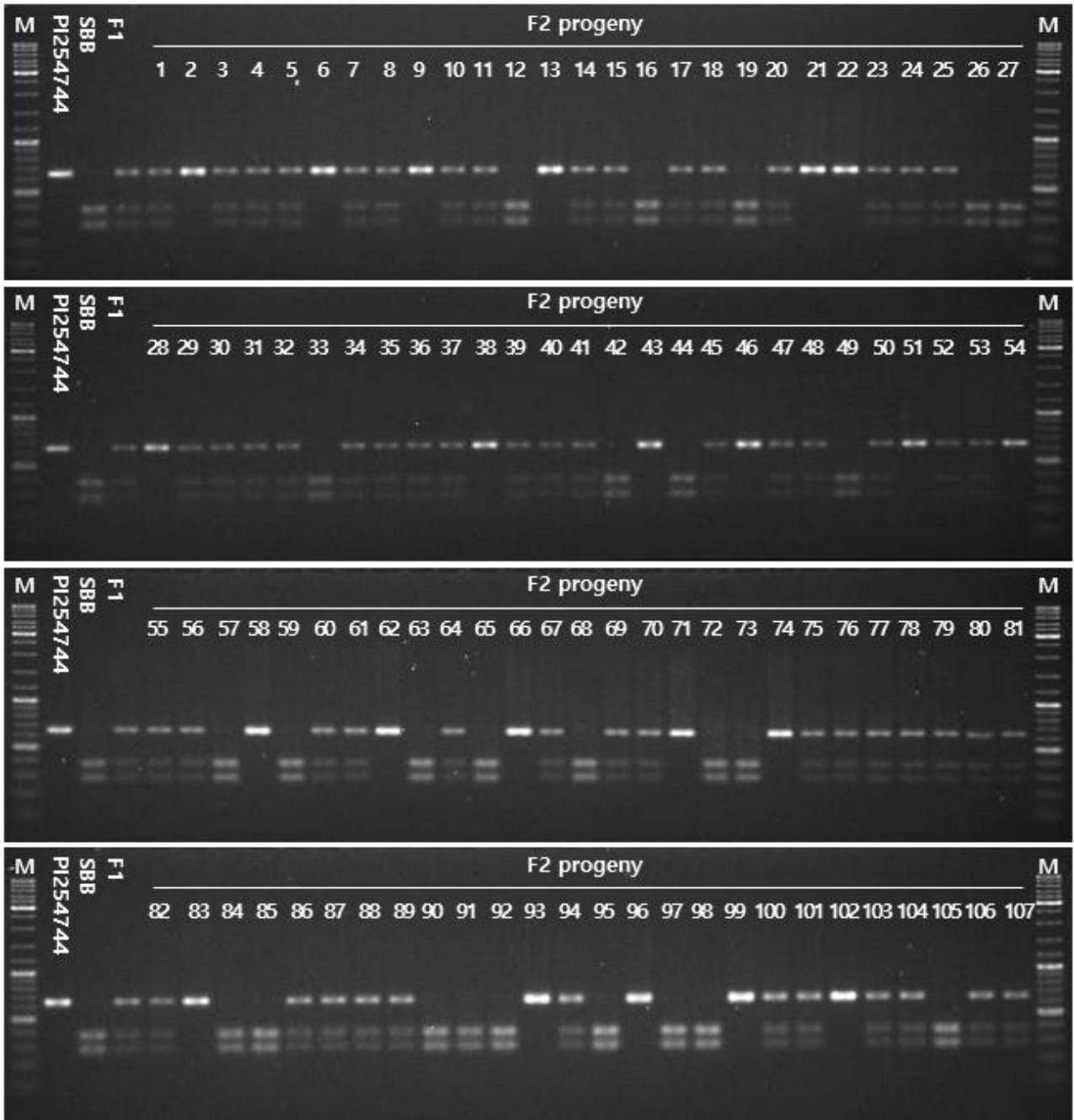


그림 2-4-2. 수박 PMR-1W 연관 CAPS 마커를 이용한 유전자형 분석 결과

개발된 수박 PMR-1W 연관 CAPS 마커인 PMR1-Cap04는 저항성 표현형과 유전자형의 일치도가 약 93% (107 F2중 100개의 유전자형이 표현형과 일치)에 이르러 실제 육종회사에서 사용 가능한 정도의 CAPS 마커로 파악되었다. 그러나, 최근의 high-throughput 분석경향에 따라, HRM 마커의 개발 필요성 및 좀더 근접한 마커의 개발이 요청되어 QTL 분석에 기반한 HRM 마커개발 연구가 진행되었다.

5. 흰가루병 race1W 저항성 QTL 분석 및 HRM 마커 개발

가. PI 254744 x TS 집단유래 F2:3 분리세대에서의 흰가루병 race1W 저항성 유전 분석

PI 254744의 흰가루병 저항성 유전양상을 밝히기 위하여, 흰가루병에 감수성인 상업용 계통 SBB와 교배하여 후대분리세대를 확보하였다(표 2-5-1). 교배후 첫세대인 F1식물체들은 흰가루병에 저항성을 보였으며, F2 세대에서는 3:1 (저항성:감수성)로 분리하였다. 또한, F1을 모본 및 부분인 TS와 PI 254744와 각각 교배하여 얻어진 여교잡 (backcross)세대에서도 멘델의 유전법칙에 상응하는 결과를 얻었다. 또한, 저항성 유전은 자엽과 본엽 1매에서 동일한 양상으로 결과를 얻었다.

표 2-5-1. PI 254744 x TS 분리집단의 흰가루병 저항성 유전분석

집단	개체수	관측 표현형		기대 표현형		자유도	카이제곱	P
		R	S	R	S			
P1(SBB)	25		25					
P2(PI254744)	25	25						
F1	30	28	2					
F2	156	112	44	117	39	1	0.26	0.608
BC1P1	60	28	32	30	30	1	0.03	0.855
BC2P2	48	45	3	48	0	1	1.376	0.242

표 2-5-1의 결과로 볼 때, 수박 야생종 PI 254744가 보유한 저항성 유전자는 단일자 완전우성으로 결론을 내릴 수 있으며, 이는 기 보고된 흰가루병저항성 자원인 인도 지역종 Arka Manic 등의 불완전우성의 결과와는 달라, 동일한 유전자가 아니며, 서로 관계없는 비대립유전자라는 것을 확인할 수 있었다.

나. PI 254744 x TS 집단유래 F2:3 분리세대에서의 흰가루병 race1W 저항성 QTL 분석

모본 (수박 계통 SBB)과 부분 (수박 야생종 PI 254744)를 교배하여 얻어진 F1을 자가수분하여 F2를 얻고 각 F2 개체를 자가수분하여 F3 세대를 얻었다 (F2:3 집단). F2세대의 각 개체들의 성숙한 잎에서 DNA를 분리하였으며, SNP 기반의 유전자지도 작성을 위하여 GBS(genotyping by sequencing)를 수행하였다.

GBS를 위하여 F2 각 개체에서 추출한 DNA를 ApeKI으로 자른 후, 각 개체를 확인할 수 있는 DNA 서열 (barcode)과 sequencing용 서열이 합성된 oligo DNA (총칭하여 adaptor)를 접합 (ligation) 시켰다. 이후 NGS (next generation sequencing)를 수행하고자 어댑터(adaptor) 서열에 상보적인 PCR 프라이머를 사용하여 sequencing용 library를 제작하였다. 제작된 library를

Illumina 사의 GAI sequencer에서 ligation 된 수박 게놈 조각들의 서열을 획득했으며, 각 F2 유래 SNP (single nucleotide polymorphism)를 생물정보학 소프트웨어로 분석하였다. 얻어진 SNP 정보를 기반으로 JoinMap (v. 4.1) 소프트웨어를 이용하여 연관유전자 지도를 작성하였고, 이를 그림 2-5-1에 나타내었다.

또한, F2:3 분리집단에서 각 F2에서 유래한 F3 개체들에 대한 흰가루병 저항성 표현형 검정을 통하여 저항성과 감수성의 disease index를 결정하였고, 이를 통하여 저항성과 감수성을 판단하였다 (표 2-5-2). 분리집단에서의 disease index의 분포는 정규분포를 보였으며, 검정된 disease index와 2-5-1의 유전자 지도를 바탕으로 QTL map을 작성하였다. QTL 분석은 MapQTL 6.0을 사용하여 cofactor를 활용한 MQM 분석을 바탕으로 LOD, %Expl. Additive effect, Dominance 등을 파악하였다 (표 2-5-3).

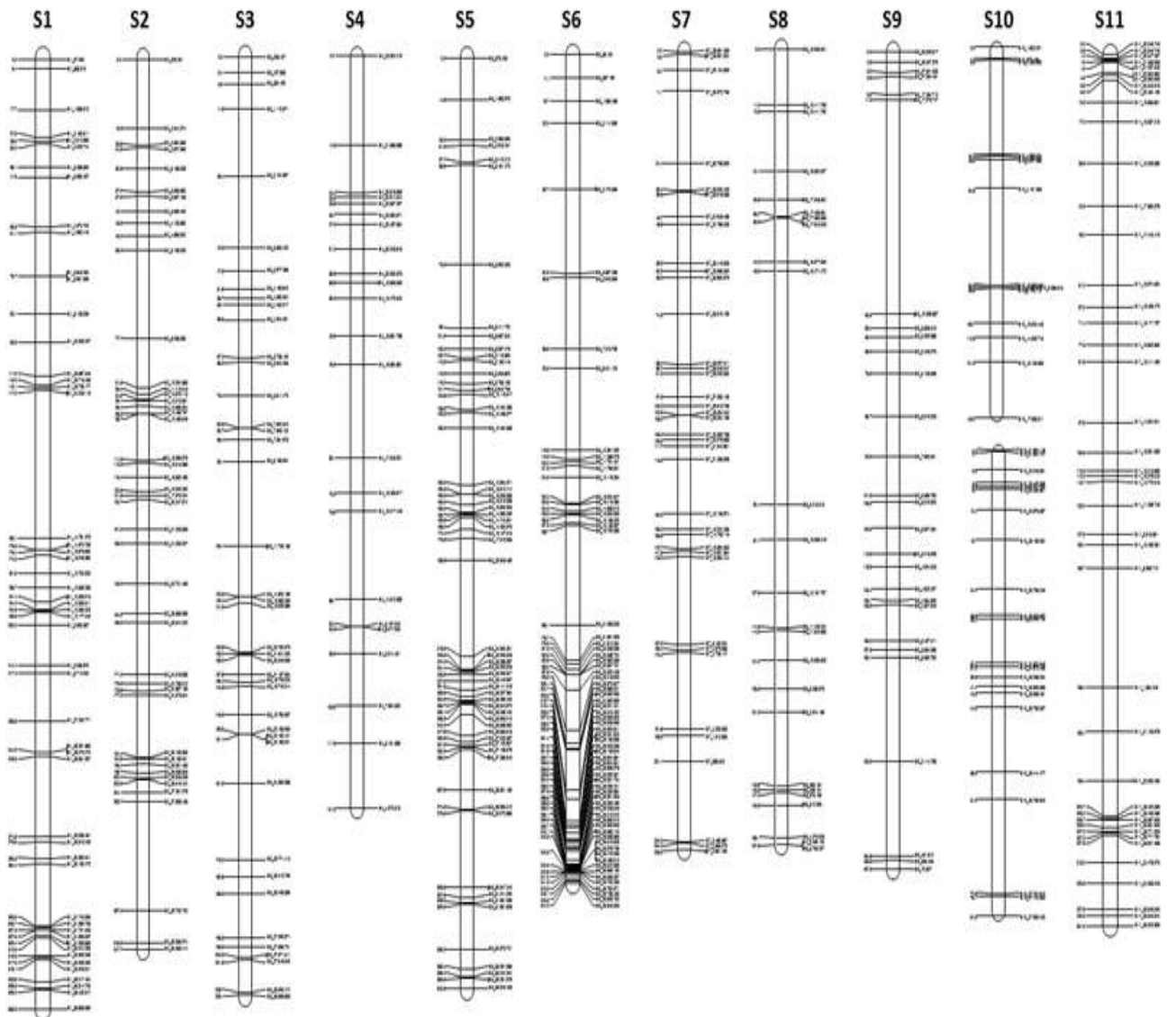


그림 2-5-1. PI 254744 x TS 집단으로 만들어진 SNP 기반 QTL 분석용 연관유전자 지도

표 2-5-2. PI 254744 x TS 의 F2 분리세대에 대한 F3의 흰가루병에 대한 표현형적 반응

F2 번호	Score	F3 세대의 저항성(R) / 감수성(S)
F2-1	9.1	S
F2-2	6.5	R
F2-4	8.8	S
F2-5	4.4	R
F2-7	8.8	S
F2-8	6.1	R
F2-16	8.2	S
F2-17	7.9	S
F2-19	4.6	R
F2-20	4.0	R
F2-21	6.4	R
F2-23	6.1	R
F2-27	8.8	S
F2-31	5.1	R
F2-32	3.4	R
F2-36	5.0	R
F2-37	3.9	R
F2-38	8.4	S
F2-40	4.9	R
F2-41	8.5	S
F2-42	5.1	R
F2-43	4.3	R
F2-44	8.9	S
F2-45	8.3	S
F2-46	6.6	R
F2-47	6.8	R
F2-48	6.0	R
F2-49	6.8	R
F2-50	4.8	R
F2-51	8.6	S
F2-53	5.1	R
F2-54	8.0	S
F2-56	5.6	R
F2-57	5.8	R
F2-58	4.2	R
F2-59	8.6	S
F2-60	5.8	R
F2-61	6.5	R
F2-62	8.8	S
F2-63	4.9	R

표 2-5-2. (계속)

F2 번호	Score	F3 세대의 저항성(R) / 감수성(S)
F2-66	4.2	R
F2-70	8.0	S
F2-74	8.4	S
F2-76	6.5	R
F2-77	5.4	R
F2-78	6.6	R
F2-79	6.8	R
F2-80	6.0	R
F2-81	6.3	R
F2-82	5.7	R
F2-83	4.7	R
F2-84	8.4	S
F2-85	5.9	R
F2-88	5.6	R
F2-90	8.3	S
F2-91	6.9	R
F2-92	8.7	S
F2-93	5.3	R
F2-94	4.3	R
F2-95	5.9	R
F2-96	8.3	S
F2-99	4.1	R
F2-100	5.1	R
F2-102	4.4	R
F2-104	5.0	R
F2-105	4.6	R
F2-106	6.0	R
F2-107	5.6	R
F2-108	4.8	R
F2-109	4.6	R
F2-112	6.2	R
F2-113	8.1	S
F2-114	6.6	R
F2-116	8.4	S
F2-117	5.2	R
F2-118	6.7	R
F2-119	5.9	R
F2-121	8.3	S
F2-125	6.2	R
F2-127	5.6	R

표 2-5-2. (계속)

F2 번호	Score	F3 세대의 저항성(R) / 감수성(S)
F2-128	6.1	R
F2-130	6.5	R
F2-134	4.3	R
F2-137	4.5	R
F2-138	5.7	R
F2-139	6.2	R
F2-140	4.3	R
F2-141	4.8	R
F2-142	5.2	R
F2-144	6.5	R
F2-145	6.6	R
F2-147	5.9	R
F2-149	4.9	R
F2-150	6.6	R

표 2-5-3. MQM 분석후 결정된 해석력을 기준으로 LOD 3.0 이상의 유전자좌

Group	Position	Locus	LOD	Variance	% Expl	Additive	Dominance	Cofactor
G2	167.01		19.25	0.533145	35.9	1.56327	-0.65529	
G2	166.01		19.24	0.533426	35.8	1.58252	-0.66289	
G2	168.01		19.16	0.535452	35.8	1.53932	-0.64386	
G2	165.01		19.12	0.536482	35.7	1.59653	-0.6658	
G2	169.01		18.99	0.540119	35.6	1.51123	-0.62942	
G2	164.01		18.9	0.542438	35.5	1.60485	-0.66324	
G2	169.79	S2_26,xxx,xxx	18.79	0.545232	35.3	1.48682	-0.61658	X
G2	163.01		18.57	0.55135	35.1	1.60713	-0.65459	
G2	162.01		18.13	0.563188	34.6	1.60311	-0.6395	
G2	161.01		17.61	0.577839	33.9	1.5927	-0.61798	
G2	160.01		17.01	0.595107	33.2	1.57594	-0.59042	
G2	170.79		16.65	0.605612	32.7	1.40876	-0.54243	
G2	159.01		16.35	0.61472	32.4	1.55305	-0.55757	
G2	158.01		15.64	0.636352	31.4	1.52441	-0.52047	
G2	157.01		14.91	0.65964	30.4	1.49053	-0.48035	
G2	156.01		14.16	0.684205	29.4	1.45205	-0.43849	
G2	155.01		13.41	0.709671	28.3	1.40967	-0.39609	
G2	154.01		12.68	0.735682	27.2	1.36414	-0.35422	
G2	153.01		11.96	0.761911	26	1.31623	-0.31374	
G2	152.01	S2_24,xxx,xxx	11.28	0.788068	24.9	1.26665	-0.27529	
G5	217.345	S5_27,xxx,xxx	4.43	0.545232	5.7	-0.01814	-0.87071	X
G5	216.703	S5_27,xxx,xxx	4.1	0.554086	5.3	-0.00729	-0.83665	

MQM으로 분석된 내용을 바탕으로 LOD 18.79 및 11.28을 보여주는 S2_26,xxx,xxx과 S2_24,xxx,xxx 유전자좌 사이에 흰가루병 저항성 유전자가 연관되었을 것으로 추정하였다.

또한, 2014, 2015년 동안 자엽과 제1본엽에 대한 흰가루병 race 1W에 대한 QTL 분석결과를 다음 표 2-5-4의 결과로 요약하였다.

표 2-5-4. TS x PI 254744 집단에서 분석된 QTL 및 SNP position (2014~2015)

Yr / Pop.	QTL name	Marker	LOD	Var.	% Expl.	Add.	Dom.
2014/TSx254744 (cotyledon)	qC2PMR1-2	S2_26,xxx,xxx	8.09	0.41	20.1	0.88	-0.41
2015/TSx254744 (cotyledon)	qC2PMR1-3	S2_26,xxx,xxx	14.04	0.69	23.6	1.36	-0.63
2015/TSx254744 (leaf, late)			18.79	0.55	35.3	1.48	-0.62

이상의 결과를 토대로, QTL chart를 작성하였으며, 그 결과는 그림 2-5-2와 같다.

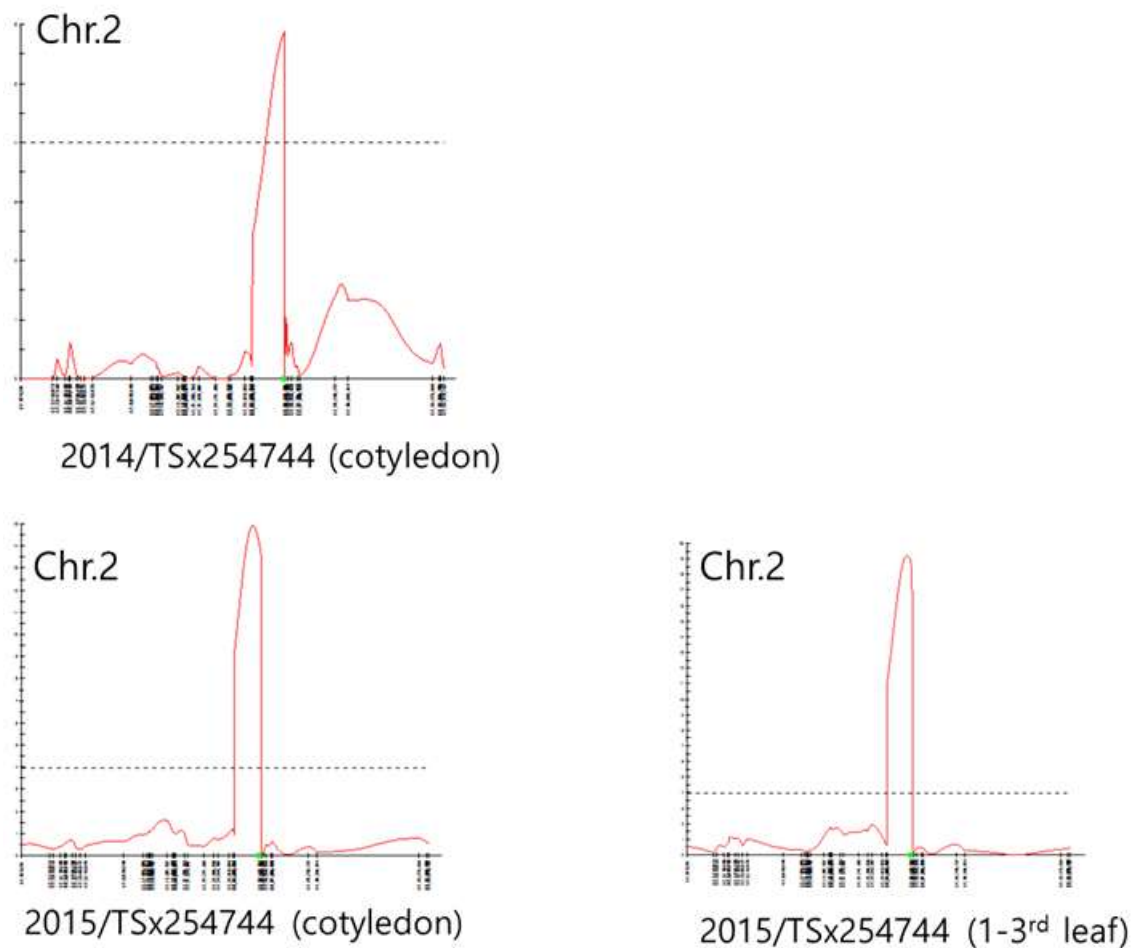


그림 2-5-2. TS x PI 254744의 흰가루병(race1W) 저항성 QTL 결과 chart (LOD=4.0)

상기 결과는 공개 소프트웨어 Windows QTL Cartographer(ver. 2.5)를 사용하여 흰가루병 저항성 QTL에 대한 검증을 위한 재분석이 수행 되었다 (그림 2-5-3).

분석집단은 SBB x PI 254744에서 유래한 F2:3 집단을 대상으로 하였으며, 11개의 수박 염색체 중, 2번 염색체의 24xxx,xxx ~ 27,xxx,xxx bp의 위치로 나타났다. 이때 자엽의 저항성 유전자좌와 제1본엽의 저항성 유전자좌가 동일한 위치에서 검정되었다. 주 QTL 지역이 전체 염색체 중 2번 염색체 한 지역에서만 LOD 19 ~ 21.5로 나타나 전체 계통 중 단일 지역으로 한정할 수 있었다.

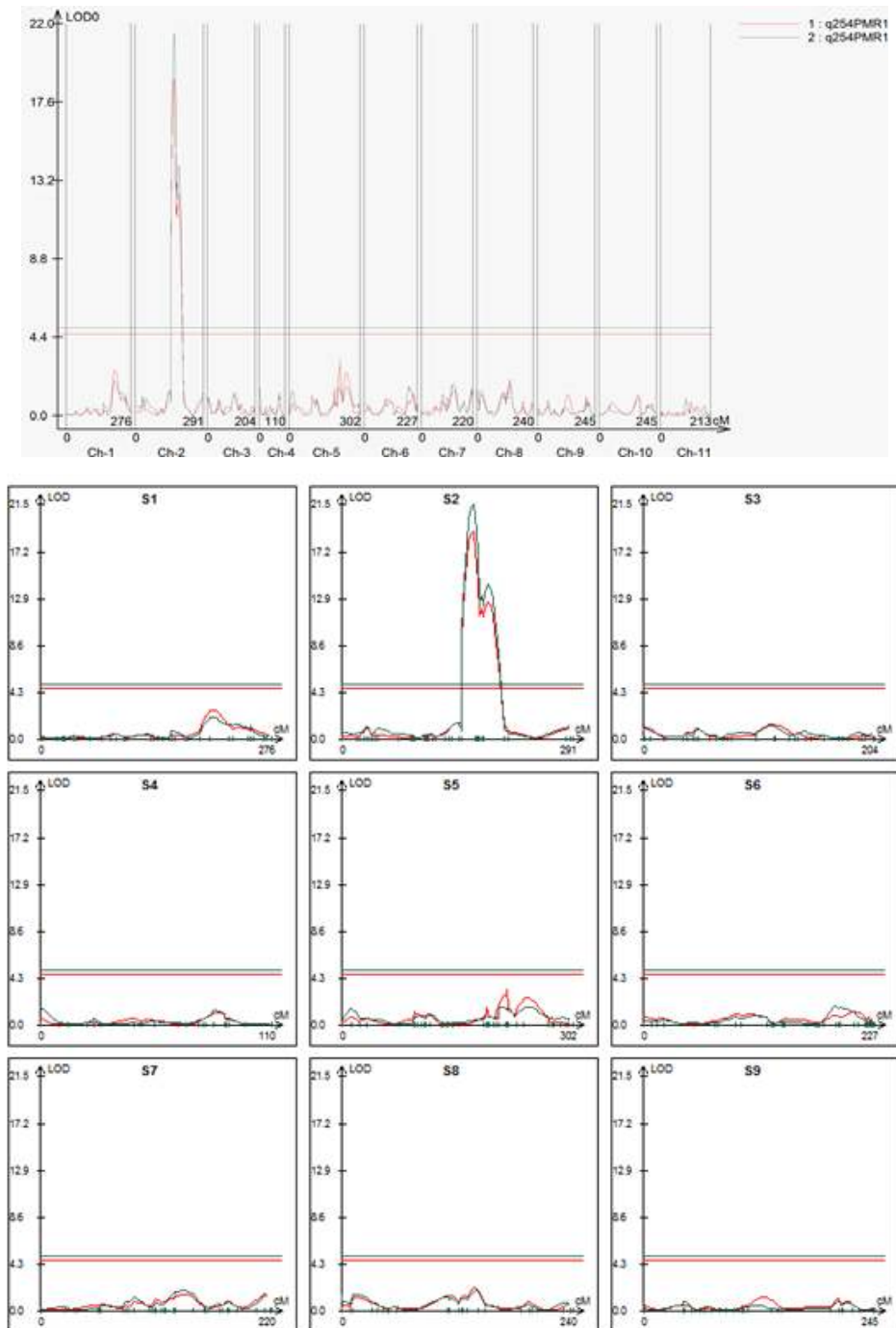


그림 2-5-3. SBB x PI 254744의 흰가루병(race1W) 저항성 QTL 결과 사례 (LOD=4.4)
(2015년, 적색: 자엽 QTL 분석, 녹색: 본엽 QTL 분석)

다. PI 254744 유래 흰가루병 저항성 마커 제작 및 검증

앞서의 PI 254744 유래 흰가루병 저항성 QTL을 결정하였고, 결정된 QTL 범위 내에서 SNP를 탐색하였다. 모부분으로 사용한 PI 254744와 TS 계통에 대하여 Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc., USA)을 활용하여 NGS를 수행하였다 (Microgen Inc., 한국). 약 20X의 sequencing read depth로 얻어진 resequencing data (high-quality short pair-end reads)를 참조유전체 (97102, www.icugi.org) 에 대하여 BWA tool (Li and Durbin, 2009)로 align하였으며, BAM (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) 파일을 SAM tools (<http://samtools.sourceforge.net>)를 이용하여 생산하였다.

GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/index.php>)로 SNPs와 short InDels을 탐색하고, single- and multi-variant call format (VCF) files (<http://vcftools.sourceforge.net>)을 생산하였으며, 최종적으로 총 18,686,310 SNPs 이 확보되었다. QTL 분석을 통해 확보된 영역인 25,xxx,xxx - 27,xxx,xxx bp를 토대로 HRM용 primer set을 제작하였다.

Primer의 제작은 Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>)를 이용하였으며, amplicon의 길이는 80 - 120 bp로 제한하고, annealing temperature는 60° C로 고정하여 후보 primer set을 도출하였다. HRM 마커의 선별 및 확인은 LightCycler® 96 (Roche Life Science, Inc., USA) 장비를 활용하였으며, 각 HRM assay는 10- μ L reactions으로 1 \times LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Life Science), 3 mM MgCl₂ (RocheLifeScience), 0.5 μ Mol primer, 1ng의 dsDNA를 template으로 사용하였다. HRM 전 PCR 조건은 다음과 같다: preincubation at 95° C for 10 min, followed by 55 cycles of 30 s at 94° C, 30 s at 60° C, and 30 s at 72° C. HRM을 위한 preconditioning step 은 60 s at 95° C, 60 s at 40° C, 60 s at 65° C 의 순서로 PCR amplicon을 사전 처리하였고, HRM의 조건은 다음과 같다: 65-97° C, with 0.07° C per 1 s of temperature increment; dsDNA melting was detected by 15 readings per 1° C. HRM data 는 LightCycler® 96 SW 1.1 program (Roche Life Science, Inc., USA)을 사용하였고, 반응이 끝난 후에는 1.5% agarose gel electrophoresis를 통하여 amplicon의 상태를 확인하였다.

제작한 HRM primer set들이 heterozygote를 잘 판별할 수 있는지 개별적으로 선별하여 최종적으로 총 10종의 primer set을 확인한 결과, 3종의 primer set이 저항성 표현형과 99%이상 연관되어 있음을 확인하였다.

표 2-5-5. PI 254744 유래 흰가루병 race1W 저항성 개체 판별을 위한 HRM 마커 정보

	Primer	Sequence	mer
Set 1	254Pmr_04-F primer	AGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx xx	22
	254Pmr_04-R primer	TTxxxxxxxx xxxxxxxxxxx x	21
Set 2	254Pmr_05-F primer	GGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
	254Pmr_05-R primer	AGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
Set 3	254Pmr_06-F primer	AAxxxxxxxx xxxxxxxxxxx xx	22
	254Pmr_06-R primer	TGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx xxx	23

라. 수박 흰가루병 race1 저항성 판별용 HRM 마커의 적용성 검증

선별된 3가지 HRM 용 primer set를 이용하여 2014년 및 2015년에 걸쳐 F2:3 분리 집단의 각 개체 (총 137개체)를 대상으로 유전자형과 표현형의 검정을 수행하였다. 그 결과 표 2-5-6과 같이 사용한 3개의 primer set에서 F2-337에서 하나의 비정상적인 결과가 나타났고, 다른 모든 개체에서는 primer 간의 차이 없이 모두 동일한 HRM 결과를 나타내었다. F2-337의 차이는 실험오차로 판단되었다.

한편, F2:3 분리세대의 각 식물체에서 검정되었던 표현형은 2014년과 2015년 (일부는 개체수 부족으로 2015년에 검정되지 못하였음)의 시험결과에서 저항성/감수성 표현형이 동일하게 나타나 환경에 따른 표현형의 변이는 매우 적어, 환경요인의 영향은 유전자형에 비하여 상당히 적었음을 알 수 있다.

또한, 시험된 137개 모든 개체에서 표현형과 HRM 마커로 검정한 유전자형이 일치하였으며, 단지 F2-317 하나의 개체에서만 표현형은 감수성이나, 유전자형은 저항성으로 나타난다. 이는 표현형을 검정하기 위한 F3 세대 진전시 F2-137의 자가수분이 제대로 이루어지지 않았을 것으로 유추되었다.

표 2-5-6. 선발된 HRM 마커의 유전자형 검정과 2014, 2015년도의 표현형 검정결과 비교

F2 개체 번호	표현형 검정		유전자형 검정		
	2014년	2015년	254Pmr04	254Pmr05	254Pmr06
F2-2	S	- ²⁾	S	S	S
F2-3	S	-	S	S	S
F2-4	R	-	H	H	H
F2-6	R	-	H	H	H
F2-8	R	-	H	H	H
F2-10	S	-	S	S	S
F2-12	S	-	S	S	S
F2-17	R	-	R	R	R
F2-23	R	-	R	R	R
F2-25	R	-	H	H	H
F2-38	R	-	H	H	H
F2-39	R	-	H	H	H
F2-56	R	-	H	H	H
F2-58	R	-	H	H	H
F2-61	R	-	H	H	H
F2-62	S	-	S	S	S
F2-64	R	-	R	R	R
F2-65	R	-	H	H	H
F2-67	S	-	S	S	S
F2-68	R	-	R	R	R
F2-70	R	-	H	H	H
F2-71	R	-	H	H	H
F2-75	S	-	S	S	S
F2-76	R	-	R	H	H
F2-79	S	-	S	S	S
F2-81	R	-	H	H	H
F2-82	R	-	H	H	H
F2-83	R	-	H	H	H
F2-84	R	-	R	R	R
F2-85	S	-	S	S	S
F2-86	R	-	H	H	H
F2-89	R	-	H	H	H
F2-91	R	-	R	R	R
F2-92	R	-	H	H	H
F2-93	R	-	H	H	H
F2-94	R	-	H	H	H
F2-97	R	-	H	H	H

표 2-5-6. (계속)

F2 개체 번호	표현형 검정		유전자형 검정		
	2014년	2015년	254Pmr04	254Pmr05	254Pmr06
F2-99	R	-	H	H	H
F2-100	R	-	R	R	R
F2-104	R	-	R	R	R
F2-105	R	-	H	H	H
F2-106	S	-	S	S	S
F2-107	S	-	S	S	S
F2-111	R	-	H	H	H
F2-112	S	-	S	S	S
F2-113	R	-	R	R	R
F2-115	S	-	S	S	S
F2-118	S	-	S	S	S
F2-121	S	-	S	S	S
F2-124	S	-	S	S	S
F2-125	R	-	R	R	R
F2-301	S	S	S	S	S
F2-302	S	S	S	S	S
F2-304	S	S	S	S	S
F2-305	R	R	R	R	R
F2-307	S	S	S	S	S
F2-308	R	R	R	R	R
F2-309	R	R	H	H	H
F2-312	R	R	H	H	H
F2-316	S	S	S	S	S
F2-317	S	S	R	R	R
F2-319	R	R	H	H	H
F2-320	R	R	R	R	R
F2-321	R	R	H	H	H
F2-323	S	S	S	S	S
F2-331	R	R	H	H	H
F2-332	R	R	R	R	R
F2-333	R	R	R	R	R
F2-336	R	R	H	H	H
F2-337	R	R	H	S	H
F2-338	S	S	S	S	S
F2-341	S	S	S	S	S
F2-342	R	R	H	H	H
F2-343	R	R	R	R	R

표 2-5-6. (계속)

F2 개체 번호	표현형 검정		유전자형 검정		
	2014년	2015년	254Pmr04	254Pmr05	254Pmr06
F2-344	S	S	S	S	S
F2-345	S	S	S	S	S
F2-346	R	R	H	H	H
F2-347	R	R	H	H	H
F2-348	R	R	H	H	H
F2-349	R	R	H	H	H
F2-350	R	R	R	H	R
F2-351	S	S	S	S	S
F2-353	R	R	S	S	S
F2-354	S	S	S	S	S
F2-356	R	R	H	H	H
F2-357	R	R	H	H	H
F2-359	S	S	S	S	S
F2-360	R	R	H	H	H
F2-361	R	R	H	H	H
F2-362	S	S	S	S	S
F2-363	R	R	H	H	H
F2-366	R	R	R	R	R
F2-370	S	S	S	S	S
F2-372	R	R	H	H	H
F2-376	R	R	H	H	H
F2-377	R	R	R	R	R
F2-378	R	R	H	H	H
F2-382	R	R	H	H	H
F2-383	R	R	R	R	R
F2-388	R	R	H	H	H
F2-390	S	S	S	S	S
F2-391	R	R	H	H	H
F2-393	R	R	H	H	H
F2-394	R	R	R	R	R
F2-395	R	R	H	H	H
F2-396	S	S	S	S	S
F2-399	R	R	R	R	R
F2-400	R	R	H	H	H
F2-402	R	R	R	H	H
F2-403	R	-	H	H	H
F2-404	R	R	R	R	R
F2-405	R	R	H	H	H

표 2-5-6. (계속)

F2 개체 번호	표현형 검정		유전자형 검정		
	2014년	2015년	254Pmr04	254Pmr05	254Pmr06
F2-406	R	R	H	H	H
F2-407	R	R	H	H	H
F2-408	R	R	H	H	H
F2-409	R	R	R	R	R
F2-411	R	-	R	R	R
F2-412	R	R	H	H	H
F2-413	S	S	S	S	S
F2-414	S	S	S	S	S
F2-417	R	R	H	H	H
F2-418	S	S	S	S	S
F2-419	R	R	H	H	H
F2-421	R	S	H	H	H
F2-425	R	R	H	H	H
F2-427	R	R	H	H	H
F2-430	R	R	H	H	H
F2-434	R	R	R	R	R
F2-438	R	R	R	R	R
F2-439	R	R	H	H	H
F2-440	R	R	R	R	R
F2-441	R	R	R	R	R
F2-442	R	R	R	R	R
F2-444	R	R	H	H	H
F2-445	R	R	H	H	H
F2-447	R	R	H	H	H
F2-449	R	R	R	H	H

마. 수박 흰가루병 race1 저항성 근동질계통에서의 HRM 마커 적용성 검증

개발된 HRM 마커의 활용성을 검정하기 위하여, PI 254744 자원을 일회친으로 사용하고, 상업용 계통 SBB 및 45NC를 반복친으로 사용한 여교잡으로 육성된 흰가루병 저항성 상업용 근동질계통 (NIL)을 육성하였다. 각 NIL은 BC4F6세대로 육성되었다.

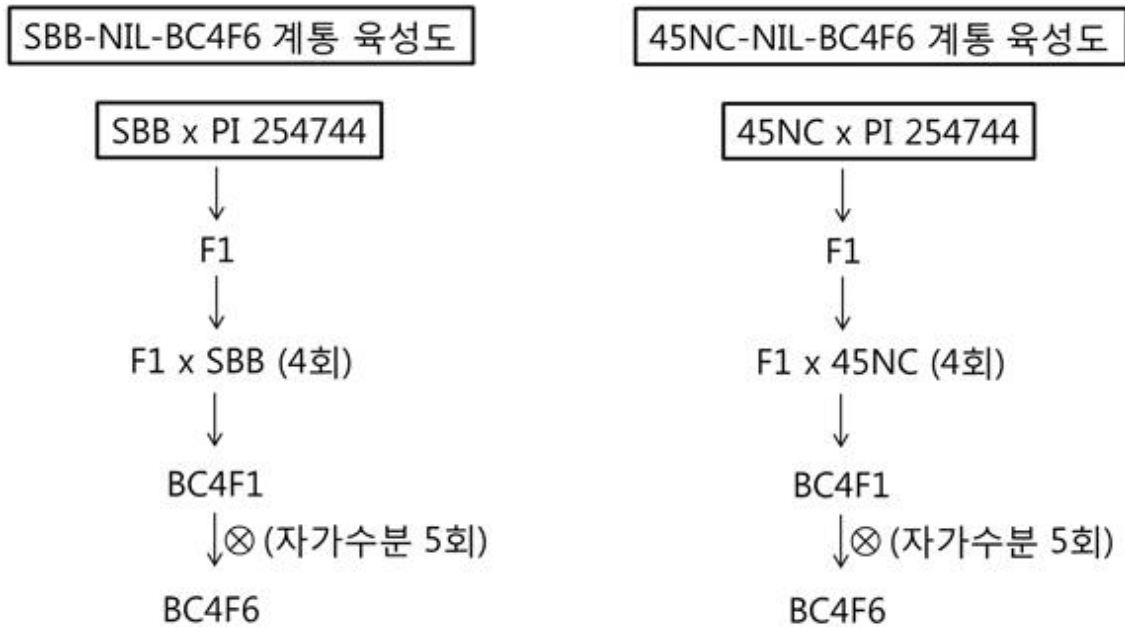


그림 2-5-4. SBB 및 45NC를 반복친으로 한 PI 254744 유래 근동질 계통들 육성과정

개발된 각 NIL 개체들 (그림 2-5-4)에 대하여 흰가루병 저항성 표현형 검정을 수행하였다. 그 결과 표 2-5-7과 같이 각 NIL 개체들은 개발된 HRM 마커의 유전자형 결과와 저항성/감수성의 표현형 검정결과가 일치하였다. 또한 2종의 NIL 개체 각각과 이를 흰가루병 감수성 상업계통인 TS와 교배한 후대 F2 분리세대들에서 멘델법칙에 상응하는 3 : 1 (저항성 : 감수성) 분리비를 보였으며, HRM 마커로 검정된 유전자형과 일치하여 PI 254744의 흰가루병 저항성 유래 후대개체들에 대한 저항성 유전자형 검정이 가능함을 보여주었다. 본 유전자형 검정실험에는 개발된 HRM 프라이머 세트 254Pmr04, 254Pmr05, 254Pmr06 모두를 사용하였고, 세 프라이머 세트의 유전자형 검정 결과는 동일하였다.

따라서, 본 과제를 통하여 제시된 PI 254744 유래 흰가루병 저항성 연관 분자마커들은 PI 254744 교배친 중 하나로 활용한 수박 흰가루병 저항성 계통 육성에 성공적인 사용이 가능하며, 육종시 표현형 검정 없이 유식물체의 DNA 만으로 저항성 유무를 판별할 수 있음을 입증하였다.

표 2-5-7. SBB-NIL 및 45NC-NIL과 TS가 교배된 후대 F2에서의 유전자형/표현형 검정

F2 (TS x SBB-NIL_BC4F6)			F2 (TS x 45NC-NIL_BC4F6)				
번호	표현형		유전자형	번호	표현형		유전자형
1	S	S	S	1	R	R	R
2	R	R	H	2	R	R	H
3	S	S	S	3	S	S	S
4	S	S	S	4	S	S	S
5	R	R	R	5	S	S	S
6	R	R	H	6	R	R	R
7	S	S	S	7	R	R	R
8	S	S	S	8	R	R	H
9	R	R	R	9	S	S	S
10	R	R	H	10	R	R	H
11	S	S	S	11	S	S	S
12	R	R	H	12	R	R	R
13	S	S	S	13	S	S	S
14	R	R	R	14	S	S	S
15	R	R	H	15	S	S	S
16	S	S	S	16	R	R	H
17	R	R	R	17	S	S	S
18	R	R	H	18	R	R	R

각 HRM 결과중 2015년 F2:3 집단 F2 유전자형을 검정한 사례를 그림 2-5-5에 제시하였다. 각 그래프는 유전자형을 나타내며, 적색그래프는 흰가루병 저항성(R)인 개체들, 청색그래프는 감수성(S)인 개체들, 노란색그래프는 헤테로(H = R+S)를 나타내며, 유전자형이 헤테로인 개체의 표현형은 저항성을 나타낸다.

본 연구결과로 도출된 3가지 수박 흰가루병 저항성 개체 판별용 HRM 마커들은 특허출원되었다 (출원번호 10-2015-0145359).

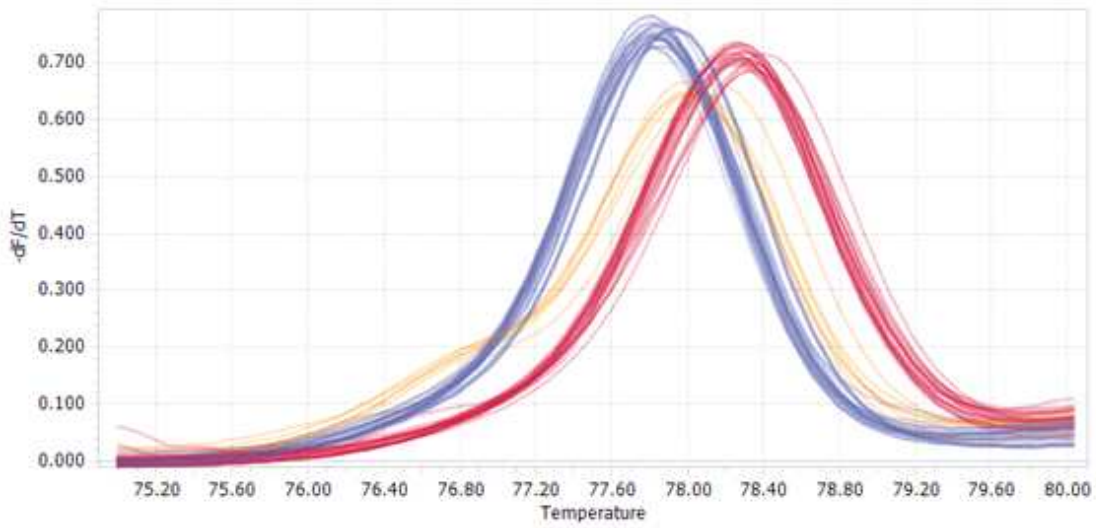
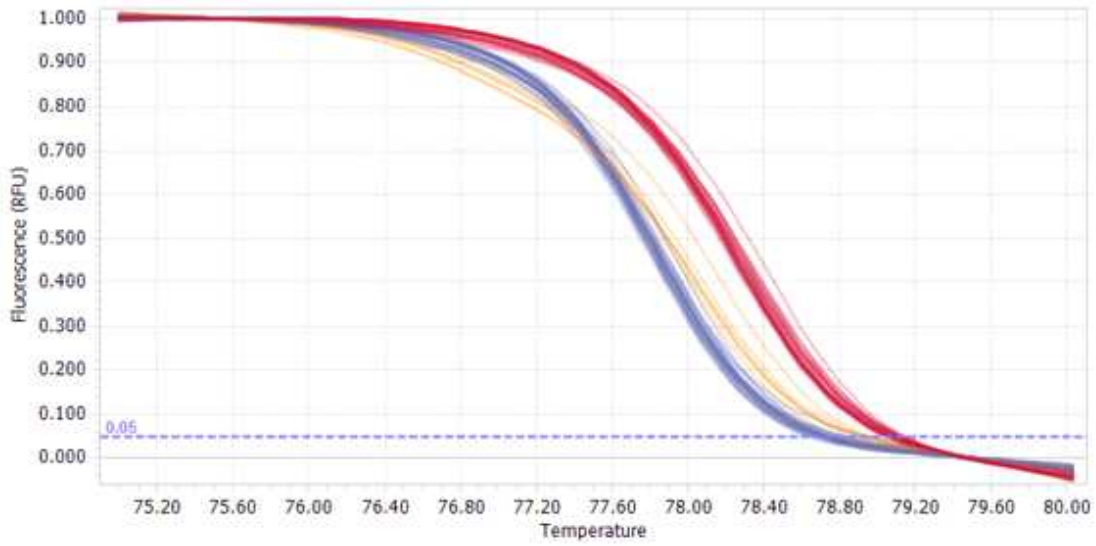


그림 2-5-5. 2015년 수박 흰가루병 저항성 F2:3 집단(TS x PI254744)의 F2 유전자형을 HRM 마커로 검정한 사례

제 3 절 수박 종자크기 연관 QTL 분석, 선별용 마커 개발 및 후보 마커 기능검정 시스템 개발 (제1세부)

1. 수박 종자크기 연관 QTL 분석

가. 수박 종자크기의 중요성

- 수박 품종개발에 있어 과실의 종자크기는 중요한 목표형질이 되어가고 있다. 동남아 수박 시장의 경우, 수박 섭취 시에 섭취 불편감이 거의 없는 매우 작은 크기의 종자크기 (TS; tomato seed size)가 선호되고 있어 육종회사로부터 이에 대한 분자마커의 요청이 증가하고 있다.
- 소비자 선호도를 고려한 품종개발시 섭취가능한 매우 작은 크기의 종자가 육종목표 형질이 될 수 있지만, 나아가 채종 경제성이 있는 종자 크기도 중요하다. 일반적으로 씨없는 3배체 수박 육성과정에서 가장 큰 문제는 채종 경제성이며, 실제로 씨없는 수박 종자 단가에 막대한 영향을 미치고 있다. 대체로 일반 수박에 비하여 약 1/5~1/10까지 적은 채종이 이루어지는데, 이 채종량을 증가시키는데는 종자의 크기가 큰 영향을 주며, small seed size가 가장 높은 종자수확량을 보여준다는 결과들이 있다.

나. 수박 종자크기 형질관련 분자마커 개발

- 수박의 유전자원에 대한 종자크기의 분류는 기존 수행된 연구결과에 따라 다음 그림 3-1-1에서와 같이 6가지 크기로 대별할 수 있다.



그림 3-1-1. 수박 유전자원의 6가지 종자크기 분포

- 본 연구에서는 협동과제에서 제공된 TS(tomato seed), MS(micro seed), NS(normal seed)에서 유래한 NIL에 대한 분자마커 탐색을 계획하였으며, 우선적인 마커 개발을 위한 종자크

기 QTL을 결정하고자 하였다.

- 종자크기 관련 집단은 종자크기가 매우 큰 야생종인 PI 189225와 가장 크기가 작은 자원인 TS3344와 그 분리세대를 활용하고자 하였으며, 특히 이전 연구에서, EST-SSR로 고밀도의 유전자 지도 작성이 불가능했던 189225 x TS3344의 유전자지도가 완성되었으므로, 이를 활용한 QTL을 결정하고자 하였다.
- 결정된 QTL을 근거로 하여 SNP 후보 마커들로 제작하고, 작성된 NIL 및 분리 집단별로 표현형을 검정하는 순서로 진행되었다.



그림 3-1-2. PI 189225와 TS3344를 모부본으로 한 집단의 각 세대별 종자크기의 분포

다. 수박 종자크기 관련 표현형 검정

- PI189225와 TS를 양친으로 하는 F2 후대분리집단에서 다시 자가수분한 F3세대에 해당하는 종자를 수확하여 100립중, 종자길이, 종자폭에 대한 데이터를 작성하였다.
- 종자의 크기에 대한 지표들은 양적형질로 나타났는데, 종자크기에 해당할 것으로 예상되는 종자의 중량은 과실의 성숙도에 따라 약간씩 차이가 있으며, 특히 섭식 시에 종자크기로 판단하는 지표는 사실상 종자면적에 해당하기 때문에, 종자폭과 종자길이를 지표로 면적을 계산하여 비교 하였다.
- 환산된 종자크기는 개체별 종자중량과 높은 상관성을 보였으며 (0.968), 최종적으로, 종자크기 표현형은 종자면적을 지표로 하였고, 이때 F2:3 집단의 분포는 정규분포를 이루어 (그림 3-1-4), 이를 QTL 분석에 이용하였다.

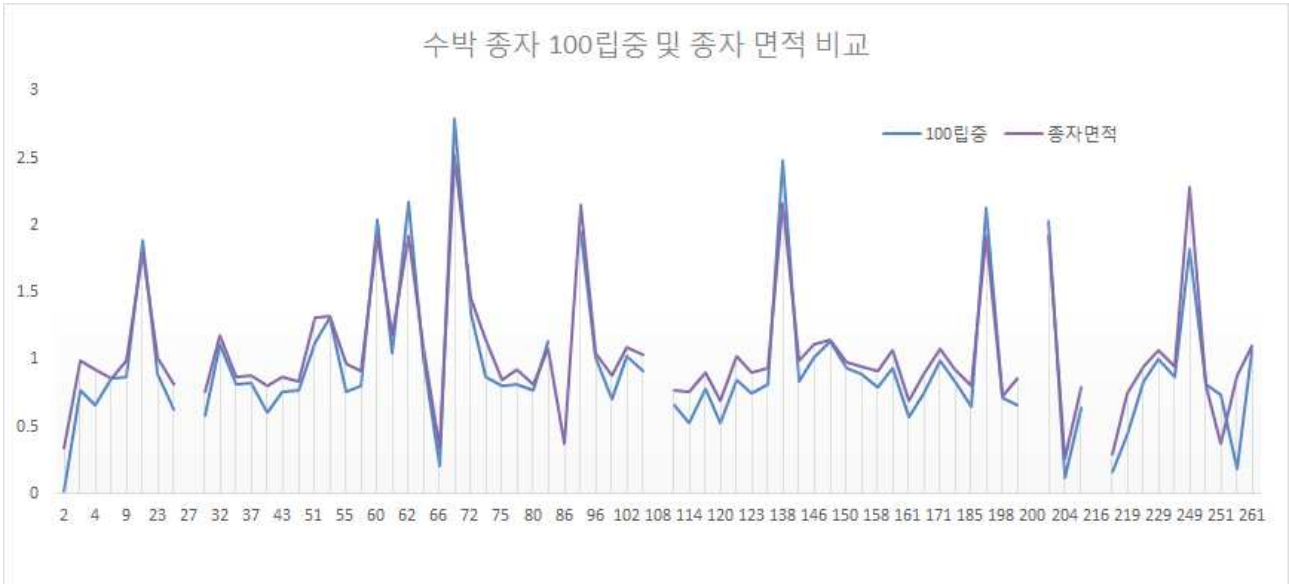


그림 3-1-3. 종자 100립중과 종자면적의 비교

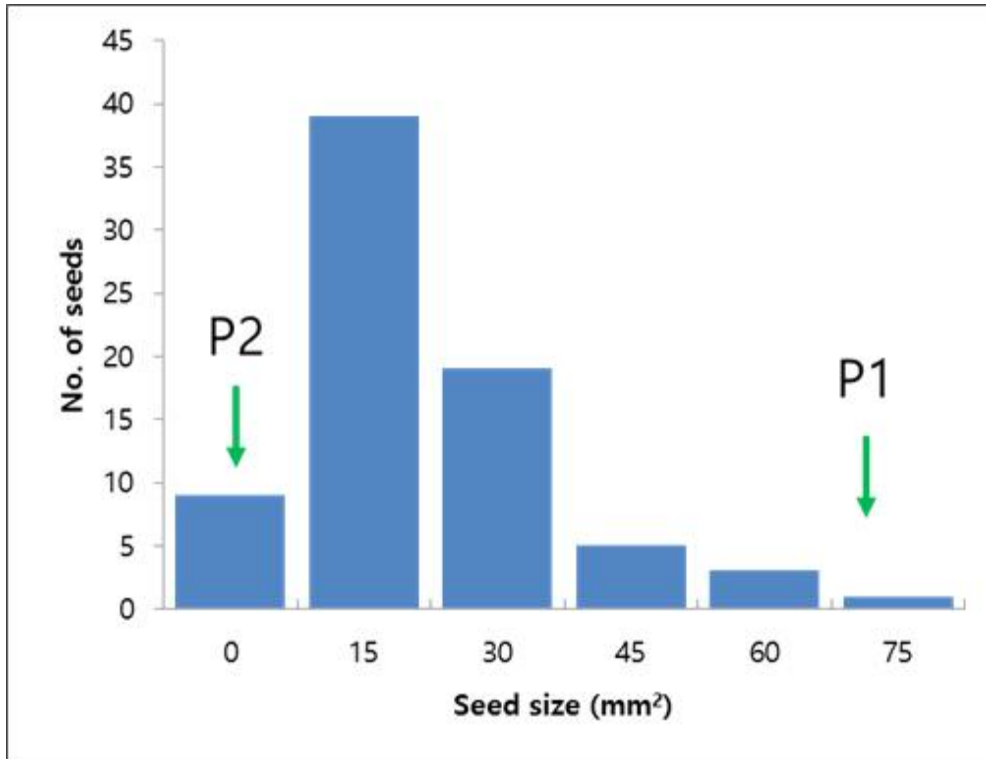


그림 3-1-4. PI 189225와 TS3344를 모부본으로 한 F2:3 집단의 종자크기 분포

라. 작성된 수박 연관유전자지도를 활용한 종자크기 QTL분석

- GBS를 통해 작성된 고밀도 유전자지도 작성에 쓰인 F2개체와 표현형 검정이 이루어진 F3 세대를 일치시켜 QTL 분석에 사용하였다.
- QTL분석은 상용 소프트웨어인 MapQTL6.0을 사용하였으며, JoinMap에서 작성된 map file 과 locus file을 사용하였고, 양적형질 data인 quantitative file을 작성하여 사용하였다.
- QTL 분석시 너무 많은 마커의 적용은 계산이 불가능할 수 있기 때문에, bin으로 사용된

SNP 마커들을 선발하였고, 기본 유전자지도를 JoinMap을 활용하여 재 작성하였다 (그림 3-1-5).

- 작성된 QTL 분석용 유전자지도는 제한적인 마커 갯수의 영향으로 11개의 연관군에서 염색체 5번과 10번에 해당하는 염색체가 각각 두 개의 linkage group으로 나뉘어 총 13개의 연관군을 형성하였고, 이는 GBS분석시 사용된 제한효소가 methylation sensitive한 특성을 갖고 있어 methylation이 많이 되어있을 것으로 추정되는 동원체 주위의 SNP 마커가 도출되지 못한 것에 기인한다.

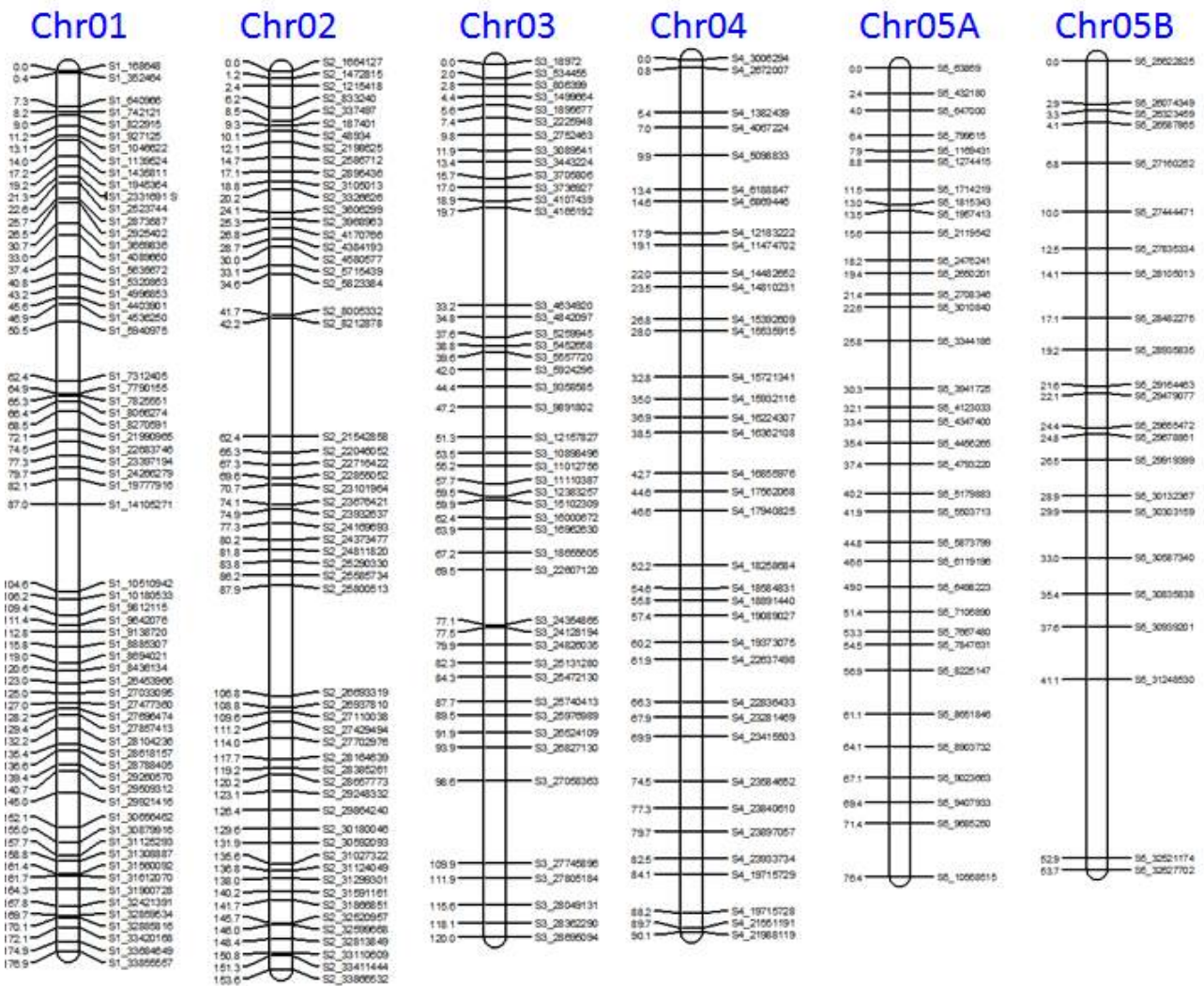


그림 3-1-5. 종자크기 QTL 분석을 위한 수박 SNP마커를 이용한 PI189225 x TS 교배 후대집단의 BIN linkage map (계속)

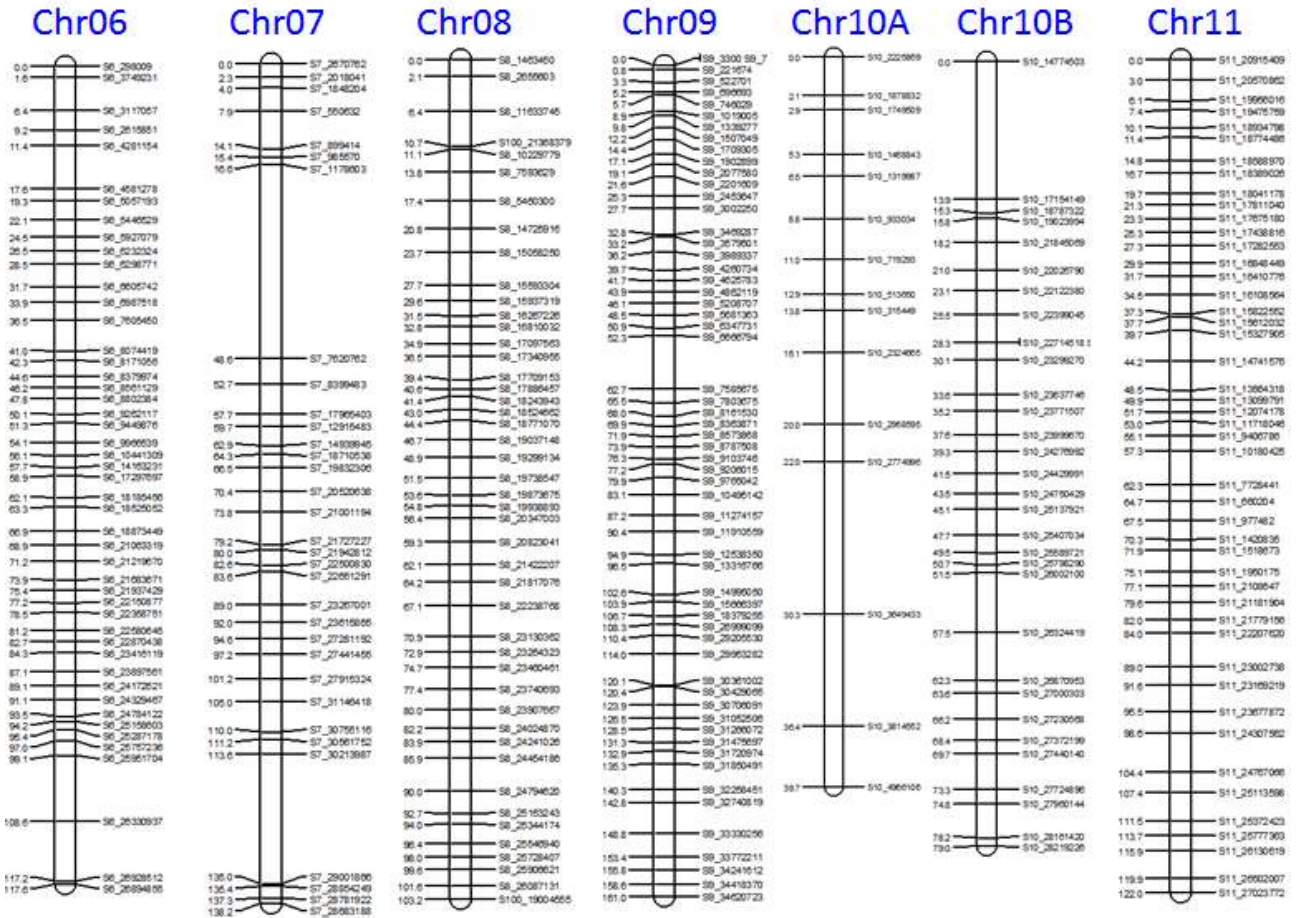


그림 3-1-5. 종자크기 QTL 분석을 위한 수박 SNP마커를 이용한 PI189225 x TS 교배 후대집단의 BIN linkage map

- 상기에서 작성된 유전자지도 분석 내용을 바탕으로 MapQTL에서 interval mapping을 수행하였고, 이에 대한 permutation test (1,000)을 3회 반복 실시하여 LOD를 3.8로 결정하였다.
- 또한, 종자크기를 결정하는 주요한 QTL은 염색체 2번과 6번에 존재하는 것으로 나타났다 (그림 3-1-6).

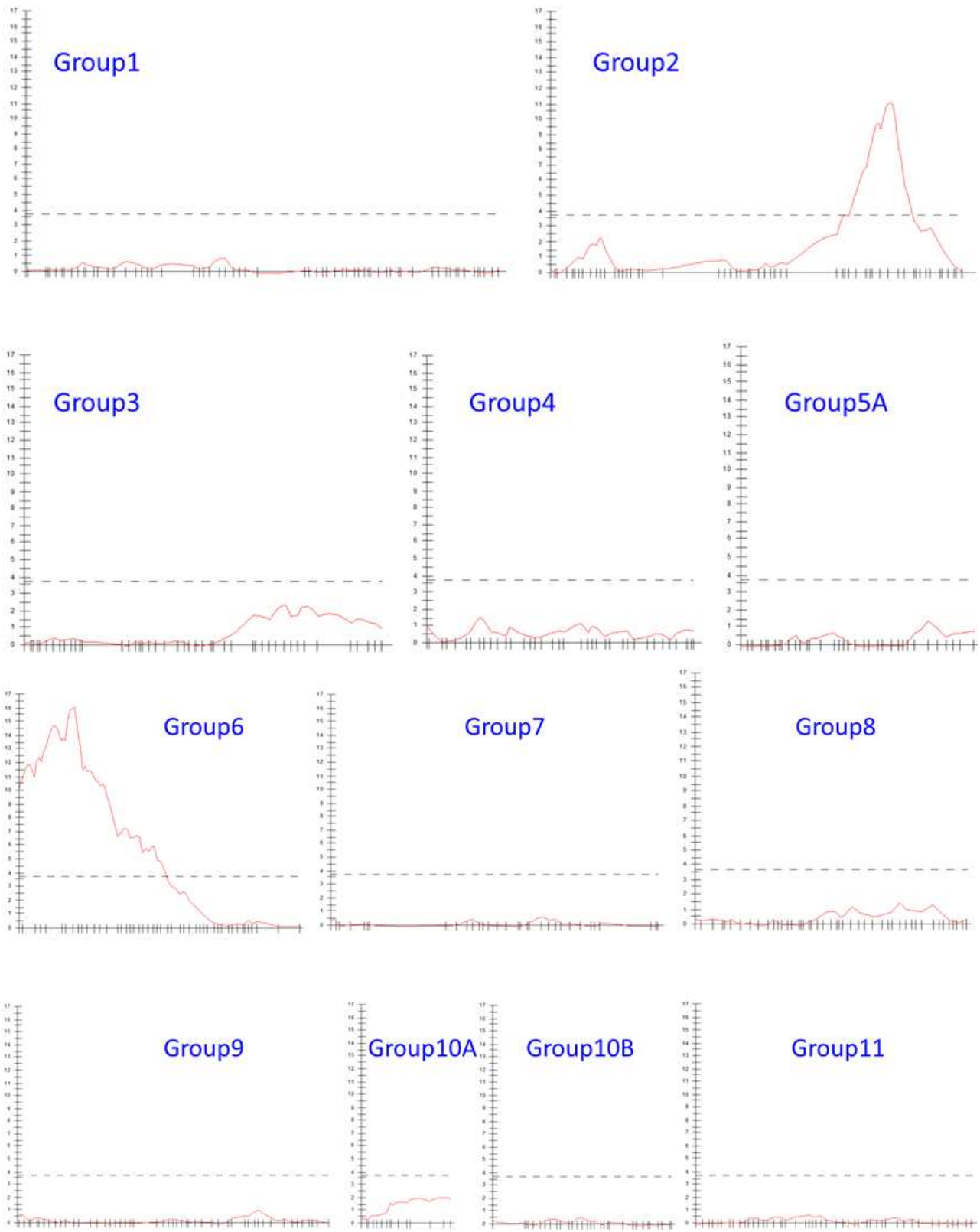


그림 3-1-6. 수박 종자크기 QTL 결정을 위한 Interval mapping 및 LOD의 결정

- 또한, 2회의 automatic cofactor selection 및 3회의 MQM (composite interval mapping) mapping을 통하여 종자크기에 연관된 QTLs을 염색체 2번과 6번에서 좁혀서 결정할 수 있었다 (그림 3-1-7).

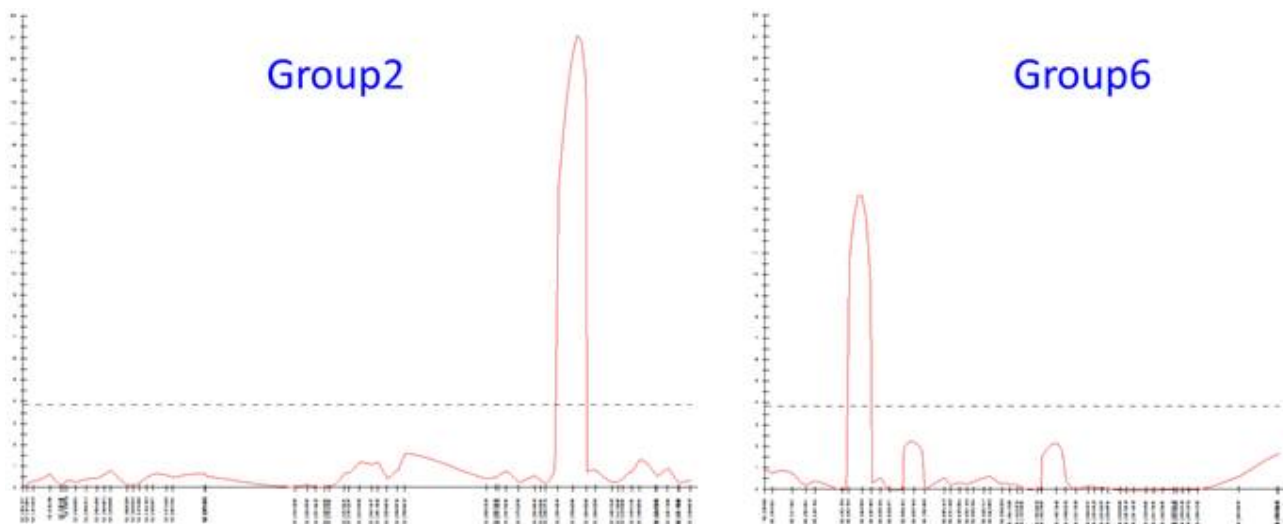


그림 3-1-7. Composite interval mapping (CIM)에 상응하는 MQM 분석 결과

- 상기의 QTL 분석 결과를 통하여, 2번 염색체의 127.402cM (LOD 21.11)에서 1cM 떨어진 126.402cM 위치의 SNP 마커를 확보하였으며, 두 번째 QTL인 6번 염색체의 21.259 cM(LOD 13.66)에서 0.81 cM 떨어진 22.073cM 위치의 마커를 확보하였다.
- 각 QTL 마커는 qCIS2-126 과 qCIS6-22로 명명하였다.
- 각 SNP 마커들은 qCIS2-126 마커의 경우 13.5의 additive 효과와 10.5의 dominance를 보였고, qCIS6-22 마커는 12.98의 additive 효과와 -9.85의 dominance를 나타내었다.
- 각 분석된 QTL 영역은 염색체 2번의 경우 29,xxx,xxx~30,xxx,xxx bp, 염색체 6번의 경우 5,xxx,xxx~5,xxx,xxx bp 로 나타났다.

마. 종자크기 QTL분석의 의미

- 본 연구를 통하여 F2분리세대를 대상으로 처음으로 GBS기법을 활용한 성공적인 수박 고밀도 유전자지도를 작성하였으며, 이를 활용한 종자크기 관련 QTL 분석에서 매우 유의한 LOD값을 보이는 두 개의 SNP 마커를 도출 하였다.
- 도출된 각 QTL 마커들은 분석된 max LOD에서 각각 1.0 및 0.81cM 떨어져 있었으며, 약 ± 10 전후의 우성성을 보이며, 이들은 각각 매우 큰 종자와 매우 작은 종자들에 대한 표현형을 설명하는 것으로 판단된다.
- 따라서, 본 연구 결과는 F2 분리세대의 GBS 분석을 통한 유전자지도는 QTL에서 바로 활용될 수 있으며, fine mapping이 가능한 사례라 생각된다.

2. 4가지 종자크기 범위 (NS, SS, MS, TS)의 고정계통 작성

종자크기 연관 마커의 개발을 위하여, 4가지 종자크기인 NS(medium-seed size), SS(small-seed size), MS(micro-seed size), TS(tamato-seed size)의 크기를 갖는 계통들을 제작하였다.

보다 구체적으로, NS 크기 (medium-seed size) 종자를 만드는 상업용 고정계통 NT와 TS 크기 (tomato-seed size) 종자를 만드는 상업용 고정계통 TS3344의 교잡 후 얻어진 F1 개체를 우선 각기 NT와 TS3344에 여교잡하였다. 이때 NT와 여교잡에서 나타난 후대에서는 NS, SS, MS 크기의 종자들이 발생하였으며, NS와 SS 크기의 식물체는 NT를 3회 더 여교잡후 각 NS와 SS 크기의 계통을 8회 자가수분하여 각기 다른 NS 및 SS 크기의 고정계통을 제작하였다.

한편, F1을 TS3344와 여교잡한 경우는 MS와 TS의 분리개체들이 나타났으며, TS와 3회 더 여교잡 후, 각 MS 크기와 TS 크기의 계통을 8회 자가수분하여 각기 다른 MS 및 TS 크기의 고정계통을 제작하였다.

각기 다른 크기의 종자를 생산하는 4가지 고정계통은 자가수분시 더 이상 분리하지 않아, 4가지 종자크기를 대변하는 고정계통(NT-BC4F9, SS-BC4F9, MS-BC4F9, TS-BC4F9)으로 작성되었다 (1협동과제 결과 참조).

3. 수박 종자크기 판별을 위한 HRM 마커 개발

가. 수박 종자크기 판별을 위한 SNP 확보

각기 다른 고정계통들을 파종 후 앞에서 DNA를 추출하고, 전체 게놈에 대하여 대량염기서열 재분석 (next generation resequencing)을 수행하였다. 얻어진 염기서열은 수박의 참조게놈서열 (reference genome sequence)과 비교하여 변이염기서열을 분석하였다.

또한, 앞서 분석된 TS3344 x PI 189225 종자크기와 연관된 QTL 영역을 기준으로, 해당 범위 내에서 4가지 종자크기 계통의 게놈 염기서열 변이를 비교 분석한 결과, 그림 3-2-1에 나타난 바와 같이, 참조염기서열을 기준으로 염색체 2번의 29,xxx,xxx - 30,xxx,xxxbp 영역은 NS와 SS 종자크기 계통은 참조염기서열과 동일한 서열을 갖고 있었으며, MS와 TS 종자크기 계통은 참조염기서열과 다른 서열들이 존재하고 있었다. 한편, 염색체 6번의 5,xxx,xxx-5,xxx,xxxbp 영역은 NS와 MS가 참조염기서열과 동일한 서열을, 그리고 SS와 TS는 참조염기서열과 다른 서열을 나타내고 있었다.

Chr	bp	NS	SS	MS	TS	Comments
2	29,xxx,xxx-30,xxx,xxx	Ref	Ref	Alt	Alt	종자크기 QTL 영역
6	5,xxx,xxx-5,xxx,xxx	Ref	Alt	Ref	Alt	종자크기 QTL 영역

그림 3-3-1. 수박의 NT, SS, MS, TS 크기 종자를 결정하는 염색체 2와 6의 게놈 영역 및 각 크기별 유전자형 조합

상기 결과들을 종합하여, 각 계통별로 재분석된 염기서열을 스크리닝하여 그림 3-3-1에 위치하는 SNP를 확보하였다.

나. 종자크기 선별을 위한 HRM primer set 제작

각 종자크기별 고정계통들의 서열변이 탐색을 통해 확보한 SNP 들을 중심으로 공개된 웹용 소프트웨어인 Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>)을 이용하여 각 SNP에 대한 프라이머 세트를 제작하였고, 각 프라이머 세트에 대한 구체적인 정보는 하기 표 3-3-1에 나타내었다.

표 3-3-1. 종자크기 선별을 위한 HRM primer set

	Primer	Sequence	mer
Set 1	WSize-Ch2-1aF	GGxxxxxxx xxxxxxxxxxx xx	22
	WSize-Ch2-1aR	CTxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
Set 2	WSize-Ch6-1F	ACxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
	WSize-Ch6-1R	AGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx xx	22
Set 3	WSize-Ch6-2aF	AGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
	WSize-Ch6-2aR	AGxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
Set 4	WSize-Ch6-4F	ATxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20
	WSize-Ch6-4R	ACxxxxxxxx xxxxxxxxxxx	20

다. 수박 종자크기별 선별을 위한 HRM 마커의 적용성

먼저, 앞서 제작된 4가지 고정계통(NT-BC4F9, SS-BC4F9, MS-BC4F9, TS-BC4F9)의 표현형을 검정하였다. 즉, 상기 4가지 고정계통(NT-BC4F9, SS-BC4F9, MS-BC4F9, TS-BC4F9) 20립씩에 대하여 20립씩 나누어 측정하여 이들의 평균, 최대값, 최소값을 얻었다(표 3-3-2). 또한 각 종자들을 촬영하여 종자면적을 ImageJ 소프트웨어로 산출하였다(표 3-3-3).

표 3-3-2. 수박의 4가지 종자크기별 평균 20립 중 및 최대값, 최소값 범위

ID	NS	SS	MS	TS
계통명	NT(NS)BC4F9	NT(SS)BC4F9	NT(MS)BC4F9	NT(TS)BC4F9
평균(gram)	0.72425	0.42383	0.21905	0.11758
최대값(gram)	0.741	0.4334	0.2361	0.1247
최소값(gram)	0.6967	0.4123	0.2046	0.1105

표 3-3-3. 수박의 4가지 종자크기별 평균 면적 및 최대값, 최소값 범위

ID	NS	SS	MS	TS
계통명	NT(NS)BC4F9	NT(SS)BC4F9	NT(MS)BC4F9	NT(TS)BC4F9
평균(mm ²)	314.53	185.61	124.08	62.73
최소값(mm ²)	270.41	153.87	109.10	49.64
최대값(mm ²)	366.45	226.53	152.88	74.93

다음으로, 제작된 프라이머 세트를 이용하여 상기 4가지 고정계통들 각 20개체에 대하여 유전자형 검정을 수행하였다. 이때, SNP 기반의 HRM 분석에서 참조계통의 서열과 동일한 뉴클레오티드일 경우 Ref로, 다른 뉴클레오티드일 경우 Alt로 표현 하였으며, 이들이 염색체 2번과 6번에서 4가지 유전자형 조합으로 종자크기를 판정하였다. 그 결과, 하기 표 3-3-4에 나타난 바와 같이, 사용한 4개의 프라이머 세트는 연관마커와 표현형이 모두 일치한 결과를 얻었다.

표 3-3-4. HRM 마커를 활용하여 4가지 수박종자 크기별 유전자형 결정

ID	계통명	HRM 마커			
		Wsize-Ch2-1a	Wsize-Ch6-1	Wsize-Ch6-2a	Wsize-Ch6-4
NS	NT(NS)BC4F9	Ref	Ref	Ref	Ref
SS	NT(SS)BC4F9	Ref	Alt	Alt	Alt
MS	NT(MS)BC4F9	Alt	Ref	Ref	Ref
TS	NT(TS)BC4F9	Alt	Alt	Alt	Alt

분석에 대한 사례로 Wsize-Ch6-2a 프라이머 세트를 이용하여 NS, SS, MS, TS 각 계통을 대상으로 한 HRM 분석을 수행한 결과, 그림 3-3-2에 나타난 바와 같이, 표현형 결과와 분석된 유전자형 결과가 일치하였다.

즉, 4가지 고정계통인 NT(NS)BC4F9, NT(SS)BC4F9, NT(MS)BC4F9, NT(TS)BC4F9에 대하여 Wsize-Ch6-2a 을 이용한 HRM 분석을 수행한 결과로, 각 그래프는 유전자형을 나타내며, 적색 그래프는 참조서열과 동일한 개체들 [NT(NS)BC4F9, NT(MS)BC4F9], 청색그래프는 참조서열과 상이한 염기를 갖는 개체들 [NT(SS)BC4F9, NT(TS)BC4F9], 노란색그래프는 헤테로(H = Ref + Alt)를 나타낸다. 유전자형이 헤테로인 개체는 NT(NS)와 NT(TS)가 교배된 F1으로 고정계통(homozygous line)들에 대한 비교를 위하여 추가 분석되었다.

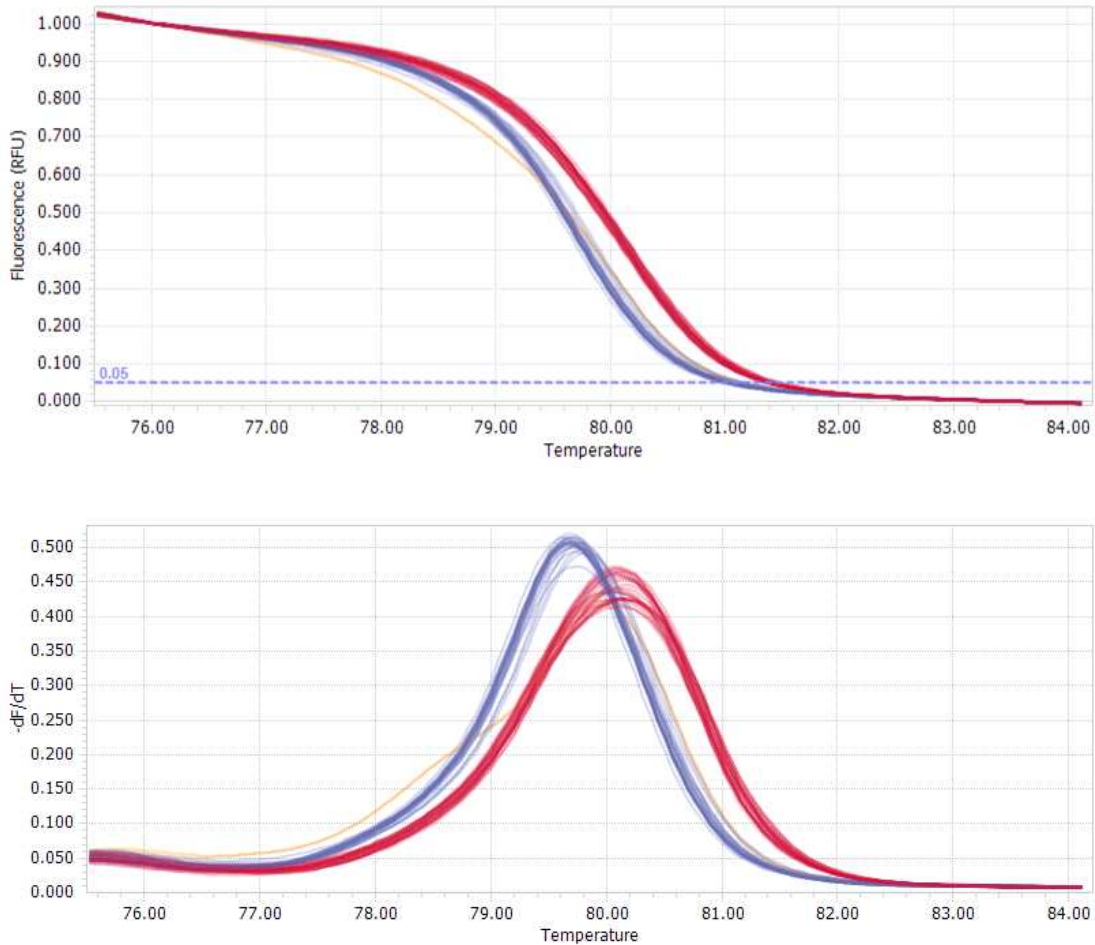


그림 3-3-2. 4가지 고정계통인 NT(NS)BC4F9, NT(SS)BC4F9, NT(MS)BC4F9, NT(TS)BC4F9에 대하여 서열번호 3을 이용한 HRM 분석을 수행한 결과 사례

또한, NS 및 TS 크기 고정계통의 교배후 얻어진 F2 분리세대의 유전자형 및 표현형 검정을 실시하였다. 구체적으로, NS크기와 TS크기 고정계통 [NT(NS)BC4F9 x NT(TS)BC4F9] 교배후 얻어진 F2 분리세대에서의 종자크기에 대한 HRM 마커 검정을 수행한 결과, 하기 표 3-3-5에 나타난 바와 같이, NS/TS F2-22를 제외하고 모두 연관마커와 표현형이 일치한 결과를 얻었다.

이에 따라, 선발된 HRM 마커는 2가지 QTL에서 존재하는 SNP의 조합을 통하여 수박종자의 4가지 크기인 NS, SS, MS, TS의 유전자형을 선발할 수 있음을 나타내었으며, 협동과제의 현장 육종에서 수박종자의 매우 작은 크기 (씨앗째 섭취 가능)인 TS와 종자생산량에 관계가 있는 SS 및 MS 크기 등에 대한 분자마커로의 적용이 가능함을 보여주었다.

본 마커 시스템은 참여한 협동과제에 기술이전될 것이며, 현재 수출되고 있는 씨앗째 먹는 ‘씨자근’ 수박의 후속 품종개발용 마커로 활용될 예정이다.

표 3-3-5. NS 및 TS 크기 고정계통의 교배후 얻어진 F2 분리세대의 HRM 유전자형 및 표현형
검정

HRM 마커 Sample	Wsize-Ch2-1a	Wsize-Ch6-1	Wsize-Ch6-2a	Wsize-Ch6-4	종자크기 표현형
NS/TS F2 03	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 11	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 12	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 14	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 15	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 20	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 22	Alt	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 25	Ref	Alt	Alt	Alt	SS
NS/TS F2 29	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 36	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 37	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 39	Ref	Alt	Alt	Alt	SS
NS/TS F2 48	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 52	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 55	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 57	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 59	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 60	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 63	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 66	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 67	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 72	Ref	Alt	Alt	Alt	SS
NS/TS F2 76	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 78	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 89	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 91	Alt	Alt	Alt	Alt	TS
NS/TS F2 92	Alt	Ref	Ref	Ref	MS
NS/TS F2 99	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 102	Ref	Ref	Ref	Ref	NS
NS/TS F2 110	Alt	Ref	Ref	Ref	MS

4. 후보마커 기능검정을 위한 VIGS 시스템 개발

본 연구과제를 시작하면서, 확보하는 연관유전자 마커 및 후보 마커 주변의 유전자 탐색을 위하여 VIGS (virus-induced gene silencing) 시스템의 적용을 계획하였다. 본 시스템은 매우 후보 유전자의 선별 가능성이 매우 높을 것으로 판단되나, 대상 마커의 개발 속도가 더딘 문제로 최종 결과에서 유전자의 기능검정은 이루어지지 못하였다. 그러나, 흰가루병 저항성의 경우는 단일 유전자좌인 major QTL 지역의 후보 유전자에 대한 knock-down 표현형을 관찰할 수 있는 VIGS 시스템이 적용되면 저항성 유전자에 대한 특성 파악에 매우 큰 도움이 될 것으로 예측하고 있다. 연관 마커 주변의 해당 유전자 획득 가능성 및 VIGS 자체의 성공가능성 문제로 인하여 과제 연구계획서 상의 목표는 아니었으나, 형질전환이 거의 불가능한 수박에서는 유전자의 기능검정이 VIGS 외에는 큰 해결책이 없기 때문에 수박에서 적용이 가능한 VIGS 시스템의 확립에 추가적인 노력을 기울였다.

가. Infectious CFMMV full-length clone의 개발

본 연구과제의 초기 실험에서 감염성을 갖는 CFMMV (Cucumber mottle mosaic virus)의 full-length clone이 개발되었고, 이 클론은 in vitro transcription을 통하여 본 연구팀에서 성공적으로 개발된 바 있다. 그러나, Agrobacterium을 이용한 infiltration이 가능한 35S-promoter derived vector를 제작하고자 추가적인 노력을 기울였으며, 이에 따라 매우 효율성이 높은 감염성 클론을 개발하였다.

이 결과는 Archives of Virology (Rhee et al., 2014)에 발표되었으며, 이후 개발을 진행한 VIGS용 virus vector의 기본 골격으로 사용되었다.

그림 3-4-1은 개발된 감염성 클론의 모식도를 나타낸다. 개발된 감염성 클론은 접종하였을 경우, 그림 3-4-2와 같이 야생형의 CFMMV와 감염성의 차이가 거의 없이 동일한 비리온(virion)을 만들어 내어, 인위적인 바이러스의 제작이 가능함을 보여주었고, 동시에 개발된 바이러스 접종용 클론은 기내에서 바이러스 유전체의 조작이 가능하며, 이후 박과식물 유전자의 기능검정이 가능한 바이러스 벡터의 개발로 이어졌다.

나. 수박 유전자 기능검정이 가능한 과발현 및 VIGS 용 바이러스 벡터의 개발

수박을 비롯한 박과식물의 유전자 기능탐색은 타 식물과 마찬가지로 기본적인 형질전환 시스템의 확립이 필수적이다. 그러나, 매우 낮은 형질전환율로 인하여 유전자의 효율적인 기능검정이 어려운 상황이다.

본 연구에서는 효율성이 높은 35S promoter 시스템을 확립하였고, 이에 따라, 바이러스 유전체 내부의 subgenomic promoter를 찾고, 이를 다양한 방법으로 변형하여 효과적인 과발현(over-expression) 및 VIGS가 가능한 시스템을 구축하고자 노력을 기울였다.

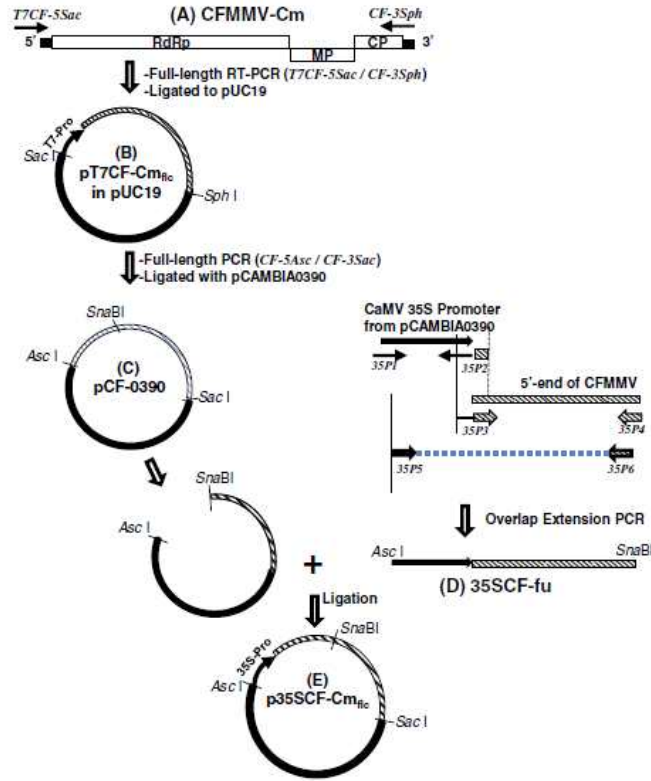


그림 3-4-1. In vitro transcription 및 35S promoter로 in vivo transcription이 가능한 감염성 CFMMV 클론의 제작 모식도

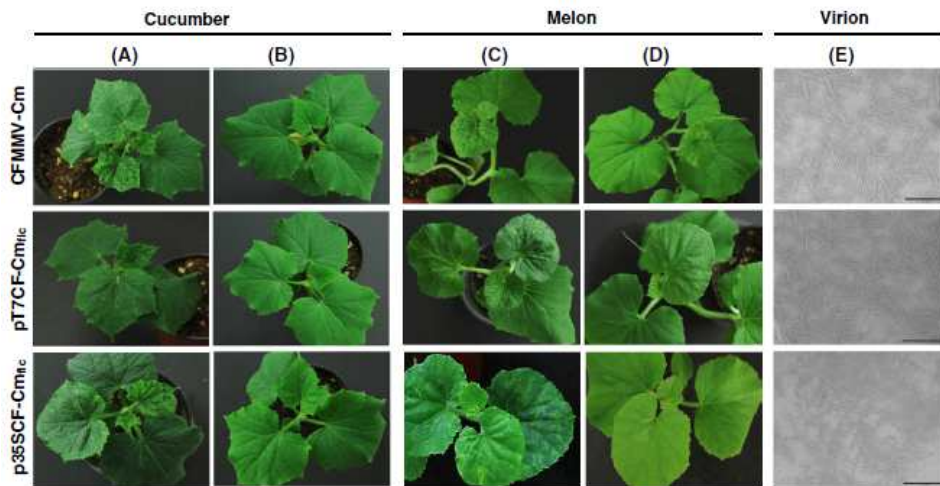


그림 3-4-2. Wild-type CFMMV-Cm과 In vitro transcript 및 35S promoter로 in vivo에서 만들어진 transcript들의 감염성 비교

(1) 과발현 시스템의 확립

개발된 p35SCF-Cm 클론을 활용하여 먼저 외피단백질(CP)의 deletion mutant를 작성하여 외래 유전자의 발현을 위한 CP의 subgenomic promoter가 약 +100bp 임을 확인하였으며, 또한, 이동단백질(MP)의 3' deletion mutant를 개발하여 CP의 발현을 위한 subgenomic promoter 영역을 결정하였다. 이를 통하여, 최종적으로 eGFP가 발현될 수 있는 CFMMV vector를 구축하였다 (그림 3-4-3; Archive of Virology 투고, 2015).

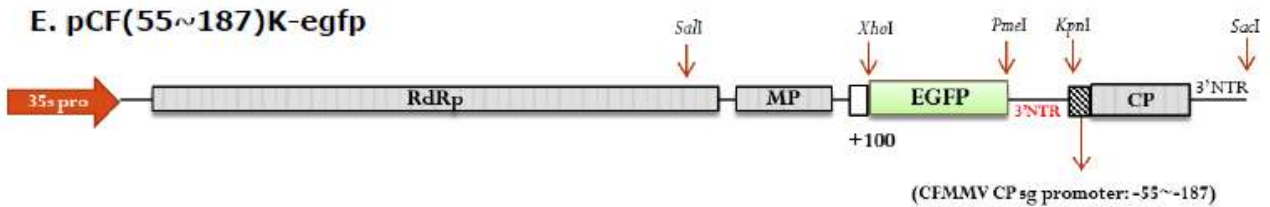


그림 3-4-3. 유전자 기능검정용 과발현 CFMMV vector의 개발

(2) VIGS용 시스템의 확립

유전자의 기능검정을 위한 CFMMV vector는 외부의 유전자 조각을 약 400-500bp 삽입함으로써 식물체 내에서 RNAi 및 micro-RNA의 생성을 유도하고, Dicer 등에 의해 siRNA의 전신 signaling을 이루는 시스템을 목표로 하였다. 과발현 시스템에서 확립된 기본 vector의 구조에서 MCS 부분을 조절하여 완성하였다.

완성된 벡터는 수박에서 pds 유전자를 silencing하였을 경우, 성공적으로 photo-bleaching 및 대사과정의 하위 합성물질인 lycopene과 beta-carotene의 합성이 억제되는 결과를 얻었다 (그림 3-4-4, 3-4-5). 본 결과는 현재 특허출원 되어있다 (10-2014-0041785).

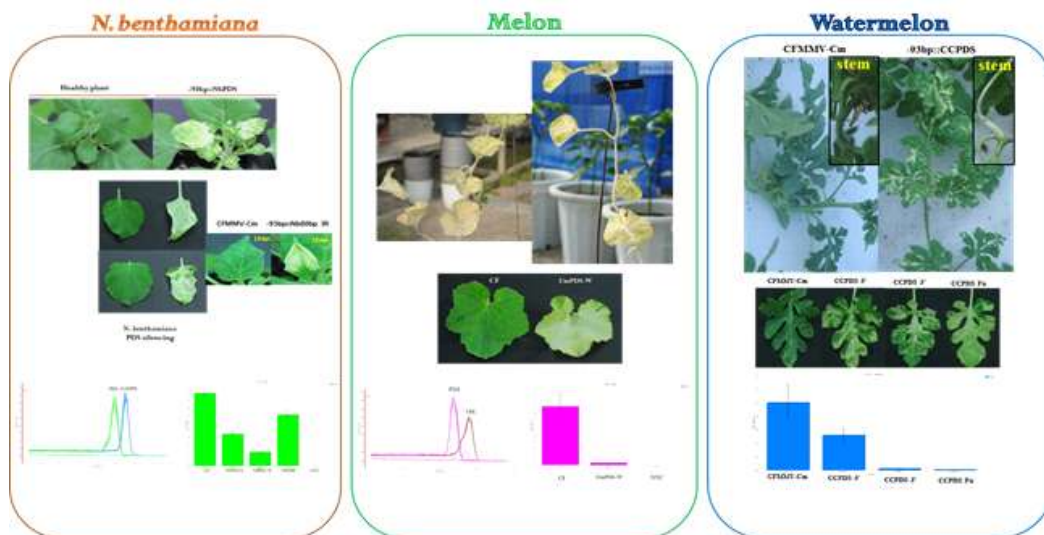
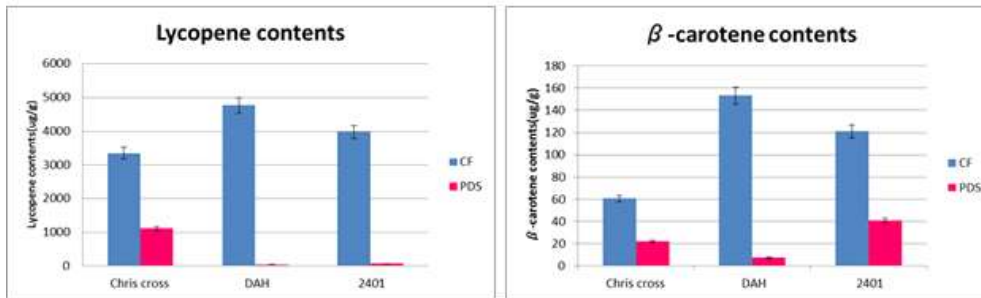
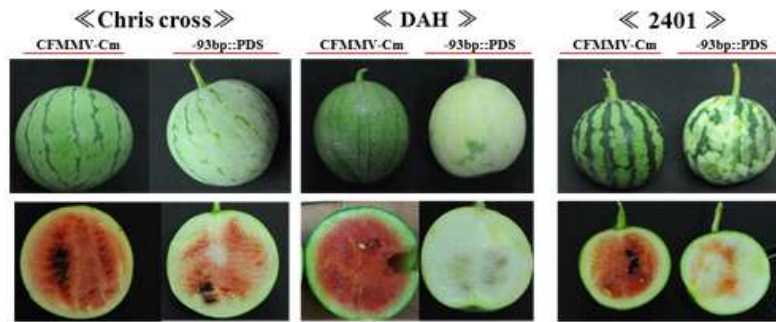


그림 3-4-4. 수박 및 멜론에서 pds gene silencing 결과



Sample name	lycopene(ug/g)	B-carotene(ug/g)
Chris cross cont	3351.514	60.550
Chris cross pds	1113.881	21.953
DAH cont	4766.654	153.325
DAH pds	42.132	7.246
2401 cont	3974.092	120.990
2401 pds	68.122	40.873

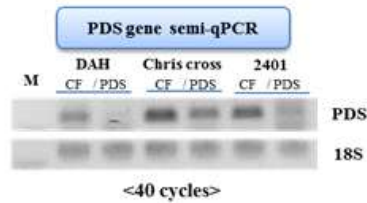


그림 3-4-5. 수박 과실에서 pds gene silencing 결과

본 결과를 통하여, 수박의 잎 뿐만 아니라 과실까지 유전자의 기능검정이 가능한 모델 시스템이 확립되었음을 알 수 있으며, 본 과제에서 주요한 연구내용인 흰가루병 race1 저항성에 밀접한 연관마커 개발의 성공으로 향후 후보 유전자들의 기능검정에 적극 활용될 수 있을 것으로 판단하고 있다.

또한, 과실의 유전자 발현 까지도 억제하는 결과를 나타내고 있어 (그림 3-4-5), 과실 내의 종자크기를 결정하는 2개의 major QTL 지역에 대한 원인 유전자들의 규명에도 매우 효과적으로 사용이 가능할 것으로 기대하였다. 그러나 최종연차에 흰가루병 저항성 및 종자크기 연관 분자마커는 개발하였으나 유전자 클로닝은 이루어지지 못하여 확인실험이 진행되지 못했다.

제 4 절 수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 계통육성 및 유전자 지도 작성용 집단양성 (1협동과제)

1. Mapping population 육성 및 유전자지도 작성용 RIL집단의 육성

가. F2 집단전개

(1) TS와 PI189225에 대한 1차 F2 전개 및 표현형조사

(가) 양친 및 F1의 특성

Mapping population의 양친으로 선정된 PI189225(*C. lanatus* ssp. *citroides*)와 TS(*C. lanatus* ssp. *lanatus*)를 파트너종묘가 운영하고 있는 태국세대진전포의 건기작형(과중 : 2011. 10. 20., 정식 : 2011. 11. 3., 수확 : 2012. 1. 15.)에 공시하여 양친 및 F1특성을 검정하고 F1개체들은 자식을 통해 F2종자를 확보하였다. 조사된 특성은 표 1과 같다. PI189225는 공대라고 불리는 야생종으로 과중은 약 2kg 내외의 원형(그림 4-1)이고 과육색은 극히 단단한 백색이고, 숙기가 매우 늦으며, 자화착생이 매우 늦고, 착과성이 낮은 야생종수박이며, 적색의 큰 종자를 포함하고 있다(그림 4-5). 이 유전자원은 만고병에 비교적 강한 특성을 가지고 있어서 만고병저항성 육종에 많이 이용되는 중요한 유전자원이다. 이 야생종은 올해 시험결과 흰가루병 race1에 저항성이 있음이 확인되어 흰가루병 마커개발 및 저항성 육종의 소재로도 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

다른 하나의 친인 TS는 호피가 있는 장타원형수박(그림 4-2)으로 일반적으로 한국형 수박의 부계타입으로 분류되고 있으며, 특히, 종자의 크기가 매우 작은(tomato seed size로 표현)특성을 지니고 있어서 씨작은 수박 또는 씨없는 수박의 한쪽 친으로 유용한 계통이다.

표 4-1. Mapping population의 양친 특성표

구분	과중(kg)	과형	과피	당도(%)	과육색	종자크기	종피색	엽특성
PI189225	1.8	원형	녹무지	2.5	백색	GS	적색	야생광택엽
TS	4.5	타원	호피	12.5	적색	TS	흑색	일반수박엽
F1	2.8	고구	호린호피	4.5	백색	NS	흑색	중간형태



그림 4-1. PI189225 과실

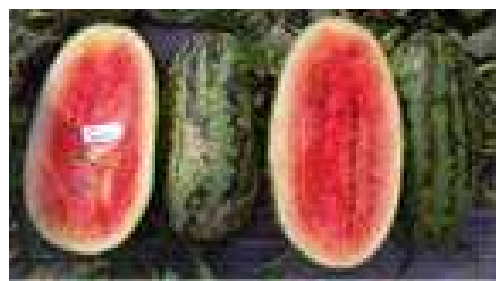


그림 4-2. TS의 과실

PI189225와 TS간의 F1은 고구형으로 종자크기, 엽형, 과피 등에서는 중간정도의 특성을 보여주고 있다. 종자의 크기는 중간이지만, 종피색은 흑색으로 나타나 적색종피는 흑색종피에 비하여 열성임을 확인할 수 있었다. F1의 과육색은 백색이고 PI189225만큼은 아니지만 과육의 경도가 강한 특성을 갖고 있다. 과육색은 PI189225와 유사한 백색을 보여주어 적색과육이 백색과육에 열성으로 나타남을 확인하였다(그림 4-4).



그림 4-3. F1 과실



그림 4-4. F1 과육



그림 4-5. PI189225(좌), F1(중양), TS(우)의 종자사진



그림 4-6. PI189225, TS, F1의 엽형

(나) F2 전개 및 표현형검정

태국 건기작형에서 확보된 F2종자는 태국 여름작형(파종 : 2012. 3. 12, 정식 : 2012. 3. 27, 교배 : 2012. 4. 18 ~ 5. 10, 수확 및 조사 : 2012. 6. 25)에서 전개하여 특성조사 및 교배를 실시하였다. F2는 총 266개체를 전개하였으며, 4월 5일에 1차로 잎샘플을 주관연구기관인 중앙대학교 식물유전육종연구실에 제공하였으며 5월 8일에 2차로 잎샘플을 채취하여 제공하여 유전자지도작성에 활용토록 하였다. F2에 대한 특성조사는 4월 초순, 5월 중순, 6월 하순에 시료채취 및 수확 시 사진촬영(그림 4-7 ~ 4-15)과 더불어 실시하였다. F2의 엽형특성은 표 2와 같다.

엽특성은 5월 중순에 공시된 F2 266개체 중에서 23개체는 바이러스 감염, 생육불량 등으로 조사에서 제외되어, 243개체의 F2 및 양친을 대상으로 완전 전개한 대략 20절위 부근의 엽을 대상으로 엽장, 엽폭, 엽형지수, 결각, 엽색의 강도를 조사하였다.

PI189225는 광택이 나는 결각이 3정도이고, 녹색이 진한 잎이었으며, 엽장과 엽폭이 유사하였고, TS의 경우에는 결각이 약간 있는 전형적인 부계형의 약간 긴 엽형을 보여주었다. F1의 경우에 양친의 중간정도의 특성을 보여주었다. 엽장특성을 보면 PI189225의 경우 짧고(17.2), TS의 경우 20.0cm로 약간 긴 특성을 보여주었다. F2의 경우 최대 30cm의 대엽개체(186번)부터 8cm로 소엽개체(221번)까지 매우 다양한 크기의 잎들이 나타났고, 거의 연속적인 분포를 보여주어 양적인 형질로 판단된다. 엽폭의 경우 양친이 각각 17.5cm, 16.4cm인데 F2에서는 최대 28cm(46번개체)부터 10cm(221번)까지 양친보다 크거나 작은 개체들이 나타났고, 엽장과 유사하게 매우 연속적인 분포를 보여주었다(표 4-2).

엽형지수를 보면 PI189225는 0.98로 둥근 잎을, TS의 경우 약간 긴 잎을 나타내었고, F1에서는 중간정도의 특성을 보여주었는데, F2에서는 0.75(67번)부터 1.77(50번)로 양친보다 더 둥글거나 더 긴 개체도 보여주어 유전양상은 매우 복잡할 것으로 판단되고, 개체들간의 엽형지수는 대체적으로 연속적인 변이를 보여주었다. 결각의 경우 PI189225는 결각이 얇고, TS의 경우는 결각이 약간 깊은 특성을 보여주었는데, F2에서는 PI189225보다 결각이 더 얇은 개체들이 많이 나타났으며(30개체), PI189225와 유사한 정도의 결각(지수3)을 보인 개체는 127개체, 결각지수5의 경우에는 93개체, TS와 유사한 정도의 결각(지수7)을 보인 개체는 11개체로 적은 수를 보여주었다. 엽색의 경우 PI189225는 진하고(지수7), TS의 경우 보통(지수5)인데 반해, F2에서는 매우 옅은(지수3)의 특성을 지닌 개체가 40개체가 보여졌으며, 엽색지수 5의 경우 183개체, 7의 경우 23개체로 조사되었다. 잎 특성에서는 전체적으로 양친의 범위를 넘어서는 특성들이 많이 나타나 관여하는 유전자들이 많고, 관여하는 여러 유전자간의 재조합이 많이 일어난 것으로 판단된다.

표 4-2. 양친, F1 및 F2개체들의 잎 특성

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
PI189225	17.2	17.5	0.98	3	7
TS	20.0	16.4	1.22	5	5
F1	19.1	21.0	1.10	5	5
1	20.0	18.0	1.11	5	5
2	26.0	26.0	1.00	5	7
3	24.0	20.0	1.20	7	5
4	25.0	22.0	1.14	5	5
5	23.0	17.0	1.35	5	5
6	24.0	23.0	1.04	3	5
7	18.0	17.0	1.06	3	5
8	20.0	16.0	1.25	2	5
9	20.0	15.0	1.33	3	3
10	18.0	14.0	1.29	5	7
11	22.0	18.0	1.22	5	3
12	16.0	17.0	0.94	5	5
13	22.0	17.0	1.29	3	5
14	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
15	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
16	24.0	22.0	1.09	5	5
17	17.0	15.0	1.13	2	3
18	23.0	18.0	1.28	3	7
19	20.0	18.0	1.11	3	5
20	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
21	21.0	15.0	1.40	3	5
22	16.0	18.0	0.89	5	5
23	25.0	20.0	1.25	5	3
24	18.0	15.0	1.20	3	5
25	21.0	15.0	1.40	5	5
26	12.0	12.0	1.00	7	7
27	23.0	25.0	0.92	5	3
28	19.0	16.0	1.19	5	5
29	18.0	16.0	1.13	3	5
30	15.0	16.0	0.94	3	5
31	18.0	15.0	1.20	5	5

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
32	15.0	17.0	0.88	3	3
33	20.0	15.0	1.33	5	5
34	23.0	17.0	1.35	3	5
35	24.0	17.0	1.41	5	5
36	17.0	13.0	1.31	3	3
37	18.0	18.0	1.00	5	5
38	15.0	17.0	0.88	5	7
39	12.0	14.0	0.86	3	3
40	14.0	13.0	1.08	3	5
41	23.0	17.0	1.35	5	5
42	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
43	20.0	17.0	1.18	3	5
44	18.0	18.0	1.00	5	7
45	20.0	20.0	1.00	5	5
46	25.0	28.0	0.89	3	3
47	20.0	17.0	1.18	5	5
48	25.0	20.0	1.25	5	7
49	19.0	19.0	1.00	5	5
50	23.0	13.0	1.77	5	5
51	15.0	15.0	1.00	5	5
52	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
53	19.0	20.0	0.95	3	5
54	17.0	14.0	1.21	5	5
55	19.0	17.0	1.12	5	5
56	14.0	12.0	1.17	3	5
57	13.0	13.0	1.00	7	5
58	17.0	15.0	1.13	5	5
59	12.0	12.0	1.00	5	3
60	13.0	12.0	1.08	3	3
61	15.0	13.0	1.15	5	3
62	14.0	13.0	1.08	2	5
63	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
64	19.0	18.0	1.06	3	5
65	18.0	17.0	1.06	3	5

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
66	14.0	15.0	0.93	3	5
67	9.0	12.0	0.75	3	5
68	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
69	13.0	15.0	0.87	2	5
70	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
71	17.0	17.0	1.00	5	5
72	15.0	13.0	1.15	3	5
73	19.0	19.0	1.00	3	5
74	19.0	17.0	1.12	5	5
75	22.0	17.0	1.29	5	5
76	18.0	19.0	0.95	3	5
77	20.0	18.0	1.11	3	5
78	15.0	15.0	1.00	3	5
79	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
80	19.0	20.0	0.95	3	3
81	18.0	18.0	1.00	2	5
82	20.0	17.0	1.18	3	7
83	14.0	13.0	1.08	3	3
84	22.0	17.0	1.29	5	7
85	25.0	25.0	1.00	5	7
86	15.0	14.0	1.07	5	3
87	20.0	22.0	0.91	3	7
88	21.0	13.0	1.62	5	3
89	19.0	14.0	1.36	3	5
90	19.0	19.0	1.00	7	5
91	18.0	15.0	1.20	3	5
92	16.0	16.0	1.00	2	5
93	12.0	12.0	1.00	3	3
94	16.0	15.0	1.07	5	5
95	23.0	20.0	1.15	5	7
96	14.0	11.0	1.27	3	5
97	22.0	17.0	1.29	5	7
98	20.0	20.0	1.00	7	3
99	12.0	12.0	1.00	5	3

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
100	14.0	13.0	1.08	3	5
101	14.0	14.0	1.00	2	5
102	20.0	18.0	1.11	3	5
103	14.0	16.0	0.88	3	3
104	17.0	16.0	1.06	5	5
105	21.0	21.0	1.00	3	5
106	15.0	13.0	1.15	2	5
107	22.0	20.0	1.10	3	3
108	17.0	14.0	1.21	3	5
109	20.0	17.0	1.18	3	5
110	22.0	22.0	1.00	3	5
111	21.0	20.0	1.05	5	3
112	16.0	15.0	1.07	5	5
113	20.0	20.0	1.00	5	5
114	20.0	12.0	1.67	5	5
115	17.0	15.0	1.13	2	5
116	18.0	18.0	1.00	3	5
117	16.0	16.0	1.00	3	5
118	15.0	13.0	1.15	5	5
119	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
120	20.0	20.0	1.00	5	5
121	17.0	16.0	1.06	7	5
122	13.0	16.0	0.81	3	5
123	16.0	15.0	1.07	2	5
124	19.0	20.0	0.95	5	5
125	21.0	17.0	1.24	2	3
126	15.0	15.0	1.00	3	5
127	14.0	14.0	1.00	5	5
128	19.0	19.0	1.00	3	3
129	19.0	17.0	1.12	7	7
130	15.0	16.0	0.94	5	5
131	18.0	16.0	1.13	5	5
132	18.0	18.0	1.00	3	5
133	24.0	24.0	1.00	3	5

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
134	23.0	18.0	1.28	5	5
135	19.0	18.0	1.06	3	5
136	16.0	14.0	1.14	2	3
137	19.0	19.0	1.00	5	5
138	20.0	20.0	1.00	3	5
139	19.0	20.0	0.95	5	5
140	15.0	15.0	1.00	3	5
141	14.0	14.0	1.00	3	5
142	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
143	24.0	20.0	1.20	3	5
144	17.0	17.0	1.00	3	5
145	20.0	20.0	1.00	5	5
146	14.0	15.0	0.93	3	5
147	17.0	17.0	1.00	5	5
148	15.0	13.0	1.15	7	5
149	16.0	17.0	0.94	3	5
150	20.0	15.0	1.33	5	5
151	18.0	17.0	1.06	5	5
152	18.0	18.0	1.00	3	5
153	14.0	17.0	0.82	3	5
154	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
155	17.0	18.0	0.94	3	5
156	19.0	17.0	1.12	3	3
157	12.0	13.0	0.92	3	3
158	13.0	15.0	0.87	3	5
159	27.0	23.0	1.17	5	5
160	21.0	19.0	1.11	5	5
161	19.0	19.0	1.00	3	5
162	14.0	12.0	1.17	3	5
163	21.0	19.0	1.11	3	5
164	17.0	17.0	1.00	3	5
165	14.0	15.0	0.93	5	5
166	19.0	17.0	1.12	3	3
167	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
168	18.0	18.0	1.00	3	5
169	19.0	18.0	1.06	3	5
170	17.0	17.0	1.00	3	7
171	16.0	14.0	1.14	3	3
172	17.0	16.0	1.06	5	5
173	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
174	19.0	17.0	1.12	3	7
175	19.0	18.0	1.06	5	5
176	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
177	22.0	22.0	1.00	3	5
178	21.0	18.0	1.17	5	3
179	20.0	17.0	1.18	3	5
180	15.0	14.0	1.07	3	5
181	17.0	17.0	1.00	3	5
182	20.0	17.0	1.18	5	5
183	17.0	17.0	1.00	3	3
184	19.0	19.0	1.00	3	5
185	19.0	18.0	1.06	5	5
186	30.0	22.0	1.36	5	3
187	20.0	20.0	1.00	5	3
188	21.0	18.0	1.17	2	5
189	18.0	17.0	1.06	3	5
190	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
191	20.0	16.0	1.25	5	5
192	17.0	16.0	1.06	5	5
193	24.0	20.0	1.20	3	5
194	24.0	22.0	1.09	3	5
195	15.0	16.0	0.94	3	3
196	21.0	24.0	0.88	5	5
197	18.0	19.0	0.95	2	5
198	19.0	19.0	1.00	3	3
199	23.0	23.0	1.00	3	5
200	17.0	16.0	1.06	3	5
201	15.0	15.0	1.00	3	5

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:심)	엽색(3:담,7:농)
202	19.0	17.0	1.12	3	5
203	17.0	17.0	1.00	5	7
204	16.0	17.0	0.94	5	5
205	15.0	12.0	1.25	3	3
206	16.0	15.0	1.07	7	7
207	16.0	15.0	1.07	5	3
208	14.0	14.0	1.00	3	5
209	14.0	15.0	0.93	5	5
210	20.0	17.0	1.18	3	5
211	22.0	20.0	1.10	5	5
212	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
213	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
214	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
215	21.0	18.0	1.17	3	5
216	22.0	20.0	1.10	5	5
217	15.0	13.0	1.15	3	5
218	16.0	16.0	1.00	3	5
219	21.0	21.0	1.00	3	5
220	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
221	8.0	10.0	0.80	5	5
222	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
223	16.0	15.0	1.07	3	5
224	19.0	22.0	0.86	3	5
225	21.0	18.0	1.17	3	5
226	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
227	17.0	14.0	1.21	5	5
228	20.0	17.0	1.18	5	5
229	21.0	17.0	1.24	5	3
230	16.0	16.0	1.00	3	3
231	16.0	15.0	1.07	3	5
232	22.0	19.0	1.16	3	5
233	19.0	19.0	1.00	3	5
234	15.0	13.0	1.15	3	5
235	25.0	26.0	0.96	3	5

표 4-2. (계속)

계통/F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:십)	엽색(3:담,7:농)
236	17.0	19.0	0.89	3	5
237	24.0	23.0	1.04	5	5
238	24.0	24.0	1.00	7	5
239	24.0	23.0	1.04	3	7
240	21.0	17.0	1.24	3	3
241	23.0	23.0	1.00	3	5
242	19.0	15.0	1.27	5	5
243	15.0	15.0	1.00	5	5
244	26.0	20.0	1.30	3	5
245	19.0	19.0	1.00	5	7
246	20.0	19.0	1.05	3	5
247	19.0	17.0	1.12	3	5
248	19.0	17.0	1.12	3	5
249	17.0	17.0	1.00	5	5
250	16.0	20.0	0.80	3	5
251	16.0	17.0	0.94	5	5
252	19.0	20.0	0.95	3	5
253	21.0	23.0	0.91	5	5
254	14.0	15.0	0.93	3	5
255	18.0	18.0	1.00	3	5
256	16.0	16.0	1.00	3	5
257	19.0	22.0	0.86	3	5
258	16.0	15.0	1.07	3	7
259	18.0	18.0	1.00	3	5
260	24.0	25.0	0.96	5	7
261	18.0	18.0	1.00	3	5
262	18.0	18.0	1.00	5	5
263	16.0	18.0	0.89	3	5
264	바이러스, 착과불량 등으로 도태됨				
265	17.0	17.0	1.00	3	5
266	21.0	23.0	0.91	2	5

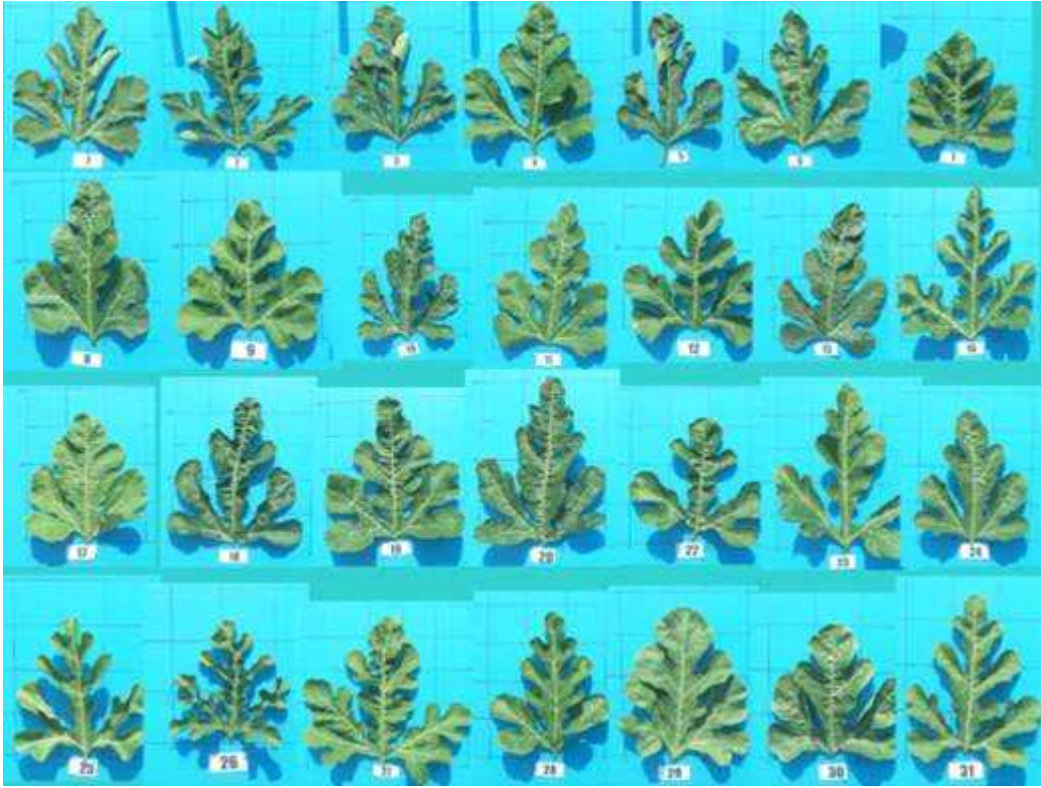


그림 4-7. F2개체들(1~31)의 엽형

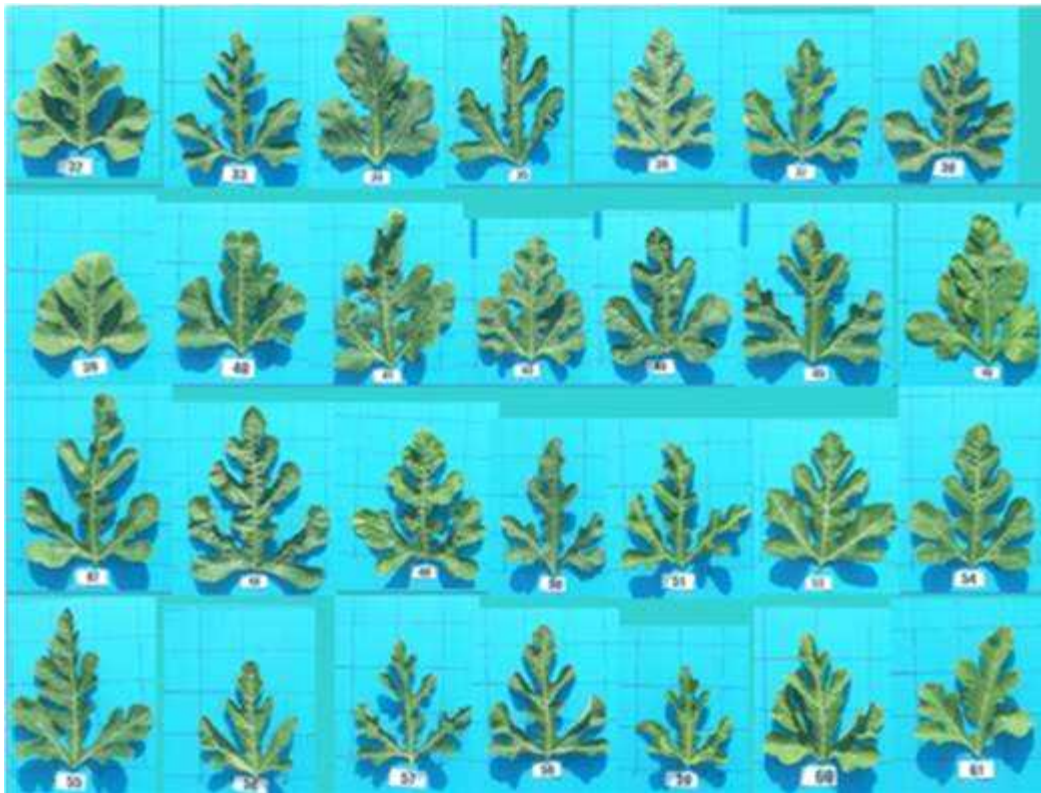


그림 4-8. F2개체들(32~61)의 엽형

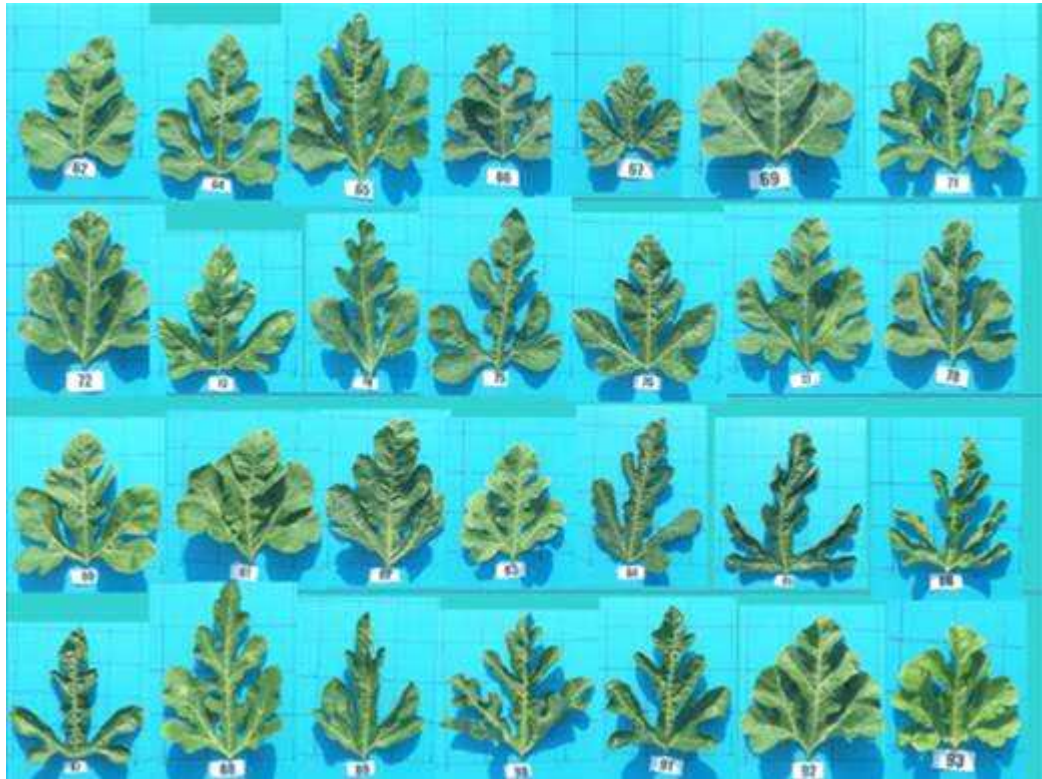


그림 4-9. F2개체들(62~93)의 엽형



그림 4-10. F2개체들(94~122)의 엽형

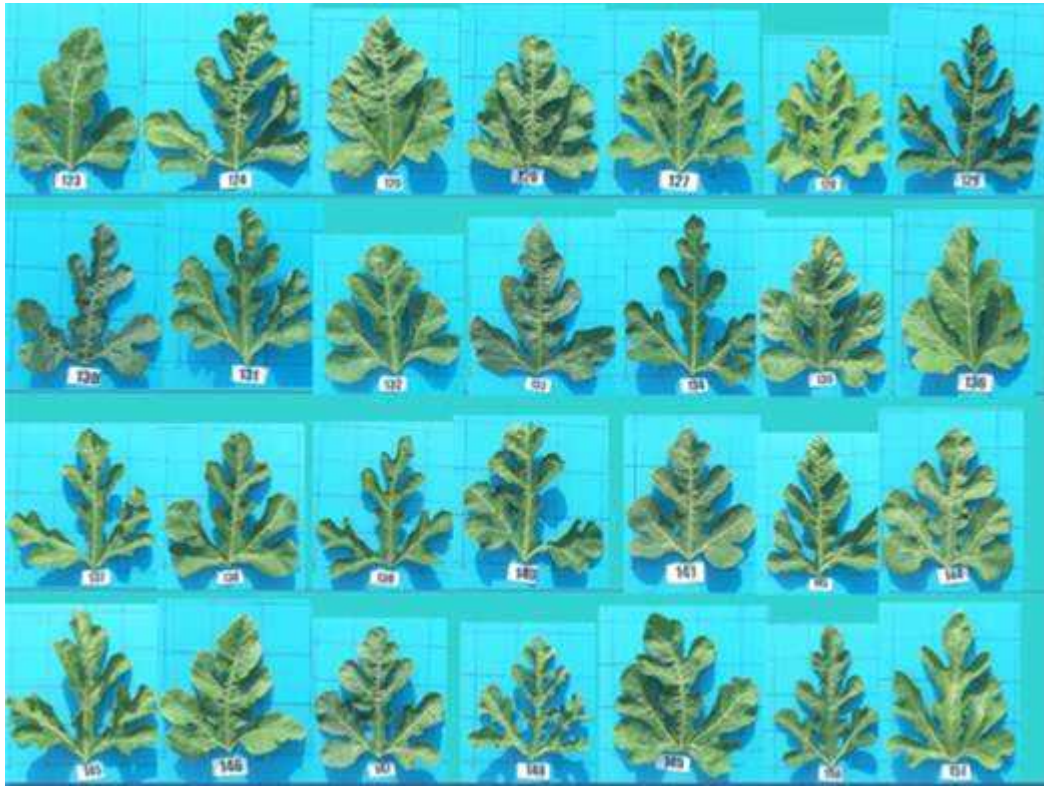


그림 4-11. F2개체들(123~151)의 엽형



그림 4-12. F2개체들(152~183)의 엽형

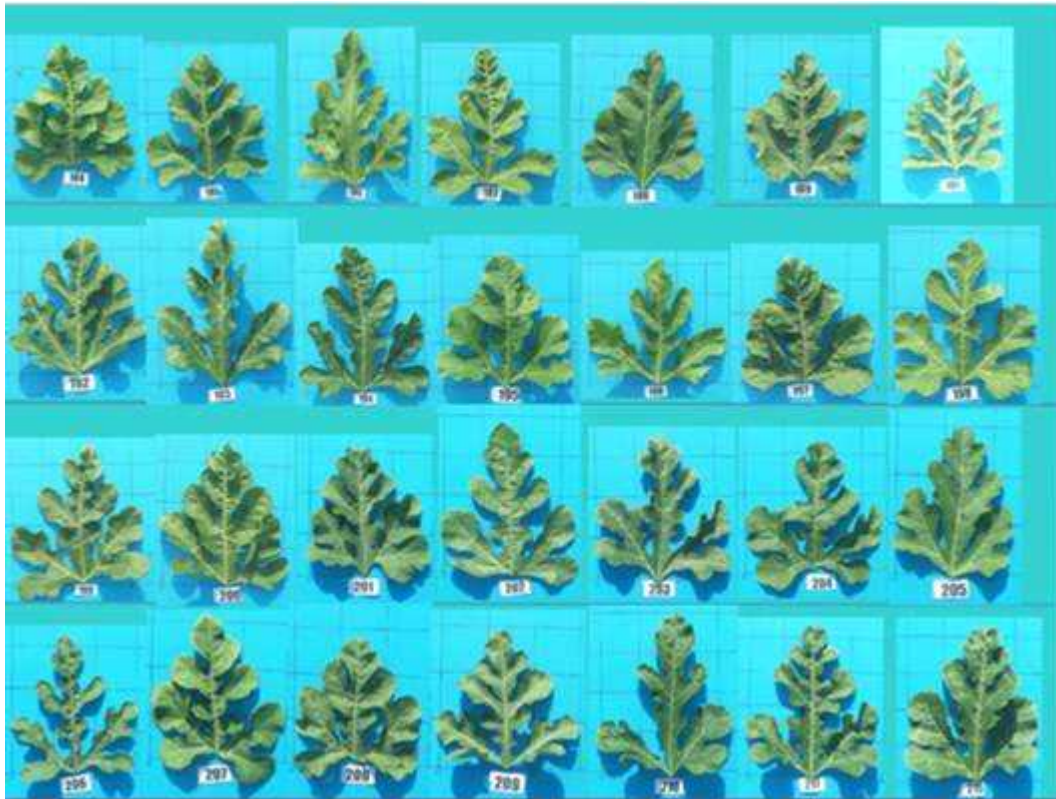


그림 4-13. F2개체들(184~215)의 엽형



그림 4-14. F2개체들(216~246)의 엽형



그림 4-15. F2개체들(216~246)의 엽형

과 특성은 6월 25일에 수확 시 과중, 과장, 과경, 당도 등을 조사하였다(표 4-3, 그림 4-16~4-23). F2에서는 총 266개체를 전개하였으나, 일부 바이러스 감염, 활착불량 등으로 도태되었다. 또, 많은 수의 야생성이 강한 개체들에서는 자화착생이 매우 늦고, 불량한 경우가 많이 있어 수정기간을 한달정도 늘려 수행하였지만, 착과가 저조하였다. 최종적으로 77개체에서 성공적으로 착과되어 조사 및 F3 종자를 채취할 수 있었다.

과형의 경우 PI189225는 원형(과형지수 1.05)이고, TS는 타원형(과형지수 1.85)이며, F1에서는 고구형(과형지수 1.13)으로 중간보다는 약간 PI189225쪽에 가까운 특성을 보여주었으며, F2에서는 PI189225보다 짧은 과들이 다수 나타났다. 과형지수 0.90이하의 편형과를 보여주는 개체가 4개체, TS와 유사한 정도의 장타원형과(과형지수 1.5이상)를 보여주는 개체가 6개체, 원형(과형지수 0.9~1.1)인 개체가 26개체, F1과 유사한 정도의 고구형(과형지수 1.1~1.2)인 개체는 20개체, 타원형(과형지수 1.2~1.5)인 개체는 22개체로 나타났다. F2의 과형은 연속적인 변이를 보여주어 양적인 형질로 판단할 수도 있으나, 과형도 재배환경에 따라 조금씩 변하는 경우가 많기 때문에 이 자료만으로 판단하기는 어려운 것으로 생각된다.

과피의 바탕색, 줄무늬를 보면 F2에서 과피의 경우 녹색에서 진녹색으로 나타났다. 줄무늬의 경우 다양한 줄무늬, 예를 들면, 줄무늬가 없는 무지개체들도 많이 나타났고(21개체), 가느다란 줄무늬(세호피)를 보여주는 개체는 18개체, 야생종에서 많이 보여지는 야생호피(20개체), 유럽, 미국 등의 시장에서 많이 보여지는 크림슨과피(1개체), 일반 호피(18개체), 약간 퍼진 호피(4개체)등이 나타나 줄무늬에 관여하는 유전자가 많을 것으로 판단된다.

과육색을 보면 야생종인 PI189225가 백색(정확히는 약간 미황색이 보여지는)이고, TS의 경우 적육색이지만, F1 및 F2에서는 대체적으로 야생종의 특성을 보여지는 과육색이 대부분이었다. 대체적으로 단단하면서 과육색이 백색(17개체)에서 백황색(21개체), 연황색(37개체) 등이 있고,

균일한 황색을 보여주는 개체는 2개체에 불과하였으며, 적육색을 보여주는 개체는 185번 1개체에 불과하였다. 대부분을 차지하는 백색~연황색 개체들은 과피와 과육부의 경계가 불분명하였다. 이는 수박의 원산지가 아프리카 중남부 사막지대로 알려져 있고, 이 지역에서는 숙기가 늦으며, 과육이 단단하고, 저장성이 긴 쪽으로 진화가 되어 이쪽으로 많은 유전인들이 축적된 것이 아닌 가 추정한다. 수박에서는 citrulline이 과피부에 많이 있다고 알려져 있고, 이 물질의 기능성이 최근 부각되고 있는데, 기존 품종의 경우에 대부분이 과육부분의 품질을 높이는 쪽으로 육성되었으므로 citrulline의 함량을 높은 품종, 또는 citrulline 추출전용 품종을 만드는 데는 한계가 많을 것으로 판단된다. 과육이 단단한 품종, 특히 과육과 과피부의 경계가 불분명한 계통(대표적으로 123번개체, 그림 4-25)은 citrulline의 함량을 측정하여 새로운 기능성 품종의 재료로 활용할 수 있는 가능성을 타진하는 것도 좋을 듯하다.

당도의 경우 PI189225 등은 매우 낮고, TS의 경우에는 12.5%인데 반해, F1과 F2에서는 당 함량이 양친의 중간 이하로 나타났다. 가장 당도가 높은 개체(64번)의 경우에도 겨우 6%로 F2 분리세대에서는 당도가 낮은 쪽으로 많이 분포하고 있고, 과육색과 유사한 특성을 보여주고 있다. 따라서 내병성 품종 육성 등을 위해서 야생종을 이용하는 경우 여교잡 횟수를 보통의 경우보다 많이 늘려야 하고, 분리개체수를 늘려야 할 것으로 판단하며, 이러한 어려움을 극복하는 데는 본 과제에서 목표로 하고 있는 유전자 지도작성 및 이를 활용한 MAB(Marker assistant backcross breeding)가 세대단축, 비용절감 등에 많은 기여를 할 것으로 판단된다. 최근 당도가 낮아 당뇨 증상을 갖고 있어 당분섭취를 제한하고자 하는 사람들을 위해서 당도가 낮지만 수박의 향 등 풍미를 그대로 갖고 있는 기능성 품종의 가능성도 제기가 되고 있는데, 이 F2 분리세대 중에서 과육색이 적육이면서 당도가 낮은 개체(185번개체)의 경우 그 활용도를 조사해 볼 필요가 있다(그림 4-25).

표 4-3. 양친, F1 및 F2개체들의 과외관 및 과육 특성

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
PI189225	원형	녹	무지	백	1.8	2.5	12.6	13.2	1.05	
F1	고구	녹	연한호피	백	4.5	4.5	14.2	16	1.13	
TS	장타	녹	호피	적	2.8	12.5	13.2	24.4	1.85	
1	고구	연녹	세호피	연황	3.4	3.6	17.9	20.0	1.12	대엽, 연야생호피, 연황육, 극경육, 갈반립,
2	원	녹	세호피	연황	1.5	-	15.3	15.0	0.98	엽색진, 대엽, 부패, 조숙, 비대약, 태좌공동, 소립
3	편평	진녹	호피	백황	0.7	-	12.3	11.0	0.89	결각심, 대엽, 스펀지, 연황,
4	원	연녹	세호피	백황	1.2	2.6	13.2	11.9	0.90	대엽, 백육, 태좌연황
8	원	진녹	무지	연황	1.1	3.0	13	12.2	0.94	결각적, 대엽, 2착, 연후피,
9	원	흑	무지	백	1.5	2.8	13.9	15.0	1.08	엽색연, 대엽, 부름, 흑피진
11	타원	진녹	세호피	백황	2.3	3.6	14.8	20.0	1.35	엽색연, 대엽, 단타원형, 적립,
23	단타	녹	무지	백황	4.0	4.2	18.0	23.0	1.28	엽색연, 대엽, 3착, 착과양
25	타원	녹	세호피	백황	1.9	4.8	14.0	18.8	1.34	대엽, 타원, 과형안정
27	편평	연녹	퍼진호피	연황	1.7	3.6	17.5	13.0	0.74	엽색연, 대엽, 연황육, 약간편평과
31	고구	연녹	세호피	연황	2.0	3.8	14.5	17.0	1.17	고구
32	원	녹	야생호피	백황	2.4	2.0	17.0	16.0	0.94	엽색연, 소엽, 백육, 극경육, 야생성심
36	단타	녹	세호피	백황	4.5	3.8	20.0	25.0	1.25	엽색연, 2착, 태좌분질, 숙기조, 종공대,
37	타원	녹	호피	백황	5.3	2.4	19	25	1.32	종자소
38	원	녹	세호피	백	3.4	3.2	19.3	18.5	0.96	엽색진, 소엽, 2착,
43	고구	녹	호피	연황	2.4	4.0	16.4	18.5	1.13	대엽, 야생호피
47	타원	녹	세호피	연황	4.9	5.2	19.5	27.5	1.41	대엽, 침형심
51	원	진녹	무지	백	2.9	4.4	17.0	17.6	1.04	소엽, 2착과, 백육,

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
54	고구	연녹	야생호피	연황	3.5	3.2	18.5	20.4	1.10	2착,야생호피,육색균일
55	타원	연녹	세호피	백황	3.7	4.0	17.5	25.0	1.43	중공대,
58	단타	연녹	세호피	백황	2.0	3.8	15.5	19.0	1.23	2착,침형,종피코팅막
60	고구	연녹	세호피	백	0.9	2.0	11.1	12.8	1.15	엽색연,소엽,비대약약,
61	원	흑	무지	연황	3.4	3.0	18.0	19.5	1.08	엽색연,소엽,부름,흑피진
62	고구	연녹	크림슨	백	1.6	3.2	14.0	16.5	1.18	결각적,소엽,육색균일
64	고구	연녹	야생호피	연황	8.0	6.0	24.5	28.4	1.16	비대양양,태좌분질,그중당도양
66	단타	진녹	무지	백황	0.8	3.6	10.5	13.1	1.25	소엽,극소립,부름,비대약
68	고구	연녹	퍼진호피	백	2.6	3.0	17.0	19.2	1.13	그물무늬
72	단타	연녹	야생호피	연황	1.2	3.0	12.5	15.5	1.24	소엽,적립,
74	장타	진녹	무지	백	2.4	4.2	15.0	25.0	1.67	2착,백육,침형심,부름
75	고구	녹	퍼진호피	황	4.0	4.8	19.3	21.8	1.13	대엽,4착,착과양양,
76	원	녹	무지	연황	1.4	2.4	13.5	14.6	1.08	부름,
80	단타	녹	무지	연황	2.5	3.2	16.0	20.5	1.28	엽색연,3착
83	고구	녹	무지	백	2.0	2.2	14.8	16.5	1.11	엽색연,소엽,백육,
86	장타	연녹	세호피	연황	1.5	2.8	12.6	20.0	1.59	엽색연,소엽,연황,장형
94	단타	연녹	세호피	백황	1.1	2.8	12.0	15.0	1.25	3착,착과양,과피연
96	단타	연녹	야생호피	연황	3.7	2.0	18.0	23.3	1.29	소엽,과피연
100	고구	녹	야생호피	백	1.2	3.2	13.0	15.5	1.19	소엽,백육안정
102	타원	흑	무지	백	1.8	2.6	14.0	19.0	1.36	대엽,백육안정
104	원	연녹	호피	연황	2.4	2.4	16.0	17.5	1.09	호피,
108	편평	녹	호피	연황	1.8	3.8	15.3	13.5	0.88	고구,

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
109	원	연녹	퍼진호피	백황	1.8	2.0	14.8	15.5	1.05	대엽,부름
114	원	녹	야생호피	연황	5.3	4.0	22.0	21.5	0.98	대엽,비대양,태좌적색
117	타원	녹	야생호피	연황	1.2	3.2	12.0	16.5	1.38	우루미,
120	장타	녹	야생호피	연황	1.2	3.2	11.3	19.0	1.68	대엽,장형
121	원	녹	세호피	연황	6.5	4.4	23.0	25.0	1.09	결각심,비대양,태좌적색
123	단타	녹	무지	황	1.9	3.6	15.0	18.6	1.24	결각적,육색균일- 과피와 동일,citrulline추출용?
134	고구	진녹	야생호피	연황	3.3	4.4	18.0	20.0	1.11	대엽,극경육,
138	원	녹	야생호피	연황	2.2	1.8	17.0	16.5	0.97	대엽,종자극대,종자채취용?
143	고구	녹	야생호피	연황	1.2	1.2	14.0	16.0	1.14	대엽,육색불균일,
146	타원	녹	무지	백	2.0	2.0	15.0	20.0	1.33	소엽,백육,침형
148	원	녹	호피	백황	3.2	1.8	18.3	18.0	0.98	결각심,소엽,호피,
150	원	녹	세호피	연황	1.0	1.8	14.0	13.5	0.96	대엽,스폰지육,공동
156	타원	녹	세호피	백	3.0	2.6	17.0	22.4	1.32	엽색연,백육균일양
158	편평	녹	호피	백황	3.2	3.8	19.0	17.0	0.89	소엽,편형
160	고구	진녹	세호피	연황	6.7	4.0	23.0	25.2	1.10	대엽,연황균일
161	원	녹	호피	백황	1.6	2.4	15.0	16.0	1.07	백황,태좌황
170	원	녹	무지	백황	0.8	1.2	12.0	13.0	1.08	엽색진,비대약,
171	원	연녹	야생호피	연황	3.6	4.6	19.0	20.5	1.08	엽색연,야생호피
175	원	진녹	야생호피	연황	6.0	2.8	22.8	23.4	1.03	태좌안정
185	고구	진녹	야생호피	적	1.5	1.8	14.5	16.4	1.13	적육
191	고구	녹	호피	백	3.0	4.6	17.8	20.5	1.15	대엽,태좌착색
198	원	진녹	무지	백황	1.5	3.8	14.5	15.0	1.03	엽색연,녹육,숙기조

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
199	장타	녹	야생호피	백황	1.6	4.0	13.5	25.0	1.85	대엽,극장타,호리병
200	단타	녹	호피	연황	1.8	3.2	13.5	17.0	1.26	우루미,
201	장타	진녹	무지	백	1.9	3.0	12.5	19.7	1.58	소엽,백육,
204	고구	녹	호피	연황	1.0	5.0	12.0	13.2	1.10	숙기조,중공대
211	원	녹	호피	연황	1.4	2.4	14.5	15.0	1.03	대엽,경육
216	단타	연녹	야생호피	연황	2.4	4.0	14.5	18.6	1.28	대엽,야생성장
217	원	녹	호피	연황	1.1	3.0	13.5	13.0	0.96	소엽,비대약
219	타원	연녹	무지	연황	3.8	3.0	18.5	25.0	1.35	대엽,바탕연,태좌변질심,
223	고구	진녹	무지	백황	3.3	2.8	18.4	20.3	1.10	부름,과피진
229	원	녹	무지	백	1.8	2.0	15.0	16.0	1.07	엽색연,대엽,스폰지육,
246	장타	진녹	무지	백	0.9	1.8	10.8	18.0	1.67	대엽,백육,
249	원	진녹	야생호피	백황	4.0	3.2	20.0	21.5	1.08	비대중양
250	고구	녹	호피	연황	2.0	2.0	15.0	18.0	1.20	연황균일
251	원	진녹	무지	연황	1.5	4.6	13.6	14.8	1.09	부름,과피진
252	고구	녹	야생호피	연황	3.5	3.0	18.5	22.0	1.19	비대중양
261	단타	녹	야생호피	백	2.1	2.0	15.5	19.0	1.23	백육,



그림 4-16. F2개체(1~25)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-17. F2개체(27~51)의 과외관 및 과육 특성

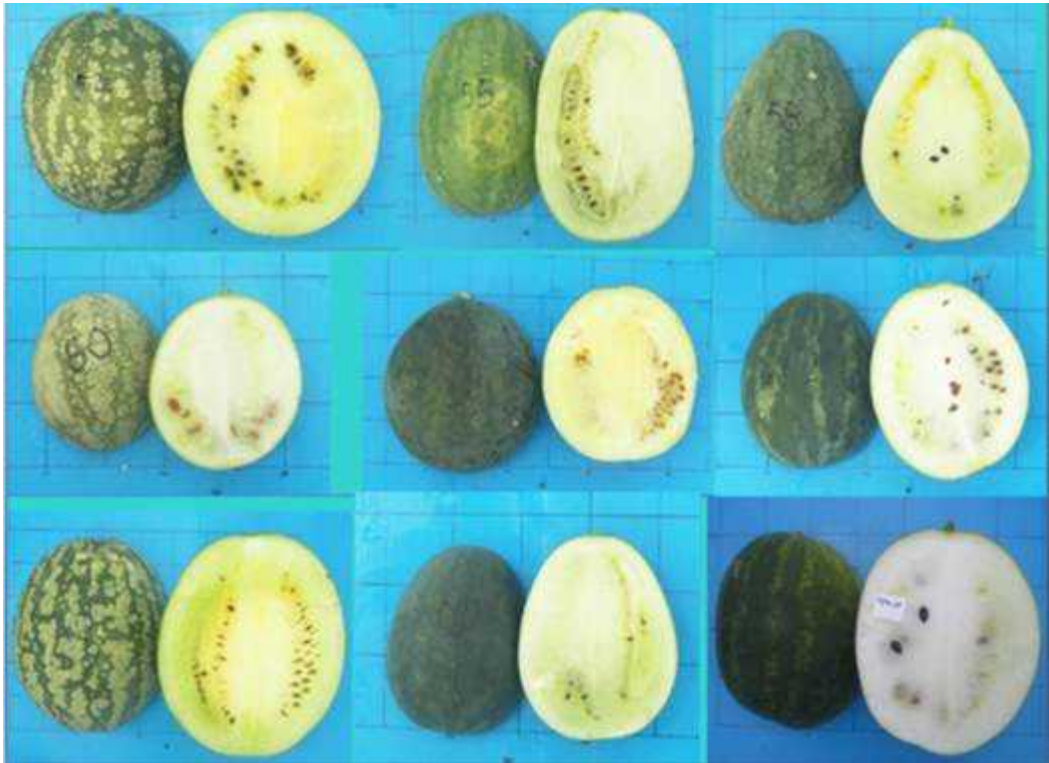


그림 4-18. F2개체(54~68)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-19. F2개체(72~96)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-20. F2개체(100~121)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-21. F2개체(123~158)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-22. F2개체(160~199)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-23. F2개체(200~229)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-24. F2개체(246~261)의 과외관 및 과육 특성

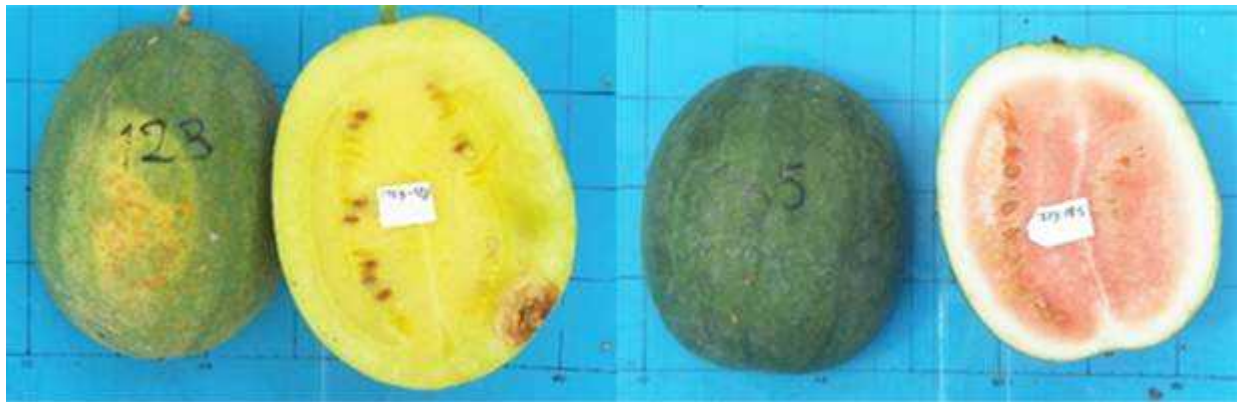


그림 4-25. 새로운 기능성 재료로 유망한 F2개체(123번, 185번)의 과외관 및 과육 특성

양친, F1, F2의 종자특성은 표 4-4, 그림 4-26 ~ 4-32에 있다. 종자특성은 수확후 완전히 건조한 후, 과당 종자량, 100립중, 종피색, 종자의 반문(2차색)을 조사하였다.

PI189225는 크기가 큰 적립(100립중 11.3g)이고 TS는 크기가 매우 작은 흑립(100립중 0.9g)이고 F1에서는 양친의 중간정도인 흑중립(100립중 6.8g)을 보여주었다. F2에서는 종자크기, 종피색, 종피의 2차색 무늬 등에서 매우 다양한 변이를 보여주고 있어 종자의 크기 및 종피색에 관여하는 유전자가 매우 많음을 알 수 있다.

F2종자의 크기는 100립중으로 TS와 유사하거나 약간 작은 개체가 7개체 출현하였고, 가장 큰 백립중(14.2g)을 보인 개체는 68번으로 매우 커서 기존의 종자섭식용 품종의 11.3g보다 커서 종자섭식용 품종을 개량하는 유전자원으로 활용가치가 있을 것으로 판단된다. 종자의 크기 분포는 매우 연속적으로 나타나(그림 4-27) 관여하는 유전자가 많을 것으로 판단된다. 종피색은 PI189225는 적색이고, TS는 흑색이며, F1에서는 흑색이지만 약한 2차색(점)이 있었고, F2에서는 흑색(16), 흑적색(15개체), 적색(11개체), 갈색(35개체) 등으로 매우 다양하게 나타났다. 종피색중

에서 적색은 virtual seedless를 개발하는데 유용한 형질로 활용될 수 있는데, 열성형질이므로 선발에 어려움이 있지만, 이 F2를 활용하여 마커를 개발한다면 그 활용성이 매우 클 것으로 판단된다.

종피에 2차색으로 나타나는 반문은 F2분리세대에서 점, 줄무늬의 형태로 나타나는데, 그 분리는 점(32개체), 줄무늬(20개체), 반문이 없음(28개체)으로 나타났으며 양친에는 없는 특성들이 보여졌다.

조사된 자료 및 사진, 종자는 주관연구기관인 중앙대와 공유하여 유전자지도, 형질관련 마커 개발 등에 활용되고 있다.

표 4-4. 양친, F1, F2의 종자특성

계통/F2개체번호	백립중(g)	종피색(흑:9,흑적:7,적:5,갈:3)	반립성(1:점,3:줄,0:무)	과당종자량(g)
189225	11.3	5	0	
F1	6.8	9	1	
TS	0.9	9	0	
2	0.6	7	1	0.1
3	4.2	3	0	1.8
4	3.6	7	0	11.8
8	4.3	3	3	1.4
9	4.5	7	1	4.1
11	9.3	5	0	12.6
23	4.6	3	1	4.3
25	3.2	3	1	2.4
27	3.2	3	0	0.5
31	2.8	5	0	5.5
32	5.6	5	0	2.5
36	4.0	9	1	5.8
37	4.2	7	1	4.5
38	3.2	7	0	3.2
43	4.1	5	0	10.7
47	3.7	9	1	2.7
51	6.2	3	0	12.3
54	6.6	3	3	7.4
55	4.2	7	1	3.3
58	4.1	9	0	1.5
60	10.1	5	0	12.6
61	5.1	3	3	18.4
62	10.9	5	1	28

계통/F2개체번호	백립중(g)	종피색(흑:9,흑적:7,적:5,갈:3)	반립성(1:점,3:줄,0:무)	과당종자량(g)
64	5.5	9	1	12.6
66	1.2	9	1	0.6
68	14.2	3	1	14
72	7.0	5	0	7.8
74	4.4	3	3	3.3
75	3.5	9	1	1.4
76	4.4	3	3	10.2
80	3.7	9	1	2.8
83	6.0	3	1	10.9
86	0.8	7	1	0.2
94	9.9	5	0	3
96	4.8	9	1	10.9
100	3.5	3	3	5.1
102	5.4	3	3	3.5
104	4.7	3	0	4.6
108	0.7	7	3	0.1
109	3.3	9	0	3.9
114	3.0	5	3	1.1
117	3.9	9	1	6.8
120	2.5	3	0	1.3
121	4.5	9	1	10.8
123	3.5	3	0	3.5
134	4.1	9	1	3.4
138	12.7	7	1	10.2
143	4.4	3	3	4.1
146	4.9	5	1	7.7
148	5.5	3	0	2.4
150	4.8	3	3	6
156	4.5	7	1	1.5
158	4.2	3	0	10.3
160	4.8	7	1	3.7
161	2.7	3	0	3.5
170	3.8	9	1	3.3
171	4.8	3	3	9.1
175	4.2	3	1	1.3
185	3.3	3	0	14.7

계통/F2개체번호	백립중(g)	종피색(흑:9,흑적:7,적:5,갈:3)	반립성(1:점,3:줄,0:무)	과당종자량(g)
191	11.0	3	0	4
198	3.2	3	3	13
199	3.3	3	3	1.8
200	4.0	3	0	0.2
201	10.5	3	0	4.3
204	0.6	7	1	0.3
211	3.2	3	3	2.9
216	0.8	7	1	0.1
217	0.9	7	3	0.5
219	2.0	3	0	3.6
223	4.2	3	3	8.2
229	4.8	3	3	7.1
246	4.2	3	3	10.2
249	9.1	9	1	11.4
250	4.2	9	1	1.6
251	0.9	7	1	0.2
252	4.0	9	1	7.4
261	5.5	5	3	2.7



그림 4-26. 양친, F1, F2의 종자



그림 4-27. F2에서 수확된 종자(크기로 정렬)



그림 4-28. F2에서 수확된 종자(2~43)



그림 4-29. F2에서 수확된 종자(47~76)



그림 4-30. F2에서 수확된 종자(60~123)



그림 4-31. F2에서 수확된 종자(134~185)



그림 4-32. F2에서 수확된 종자(198~252)



그림 4-33. F2에서 수확된 종자(249~261)

(2) TS와 PI189225에 대한 F2 추가전개

(가) F2 전개 및 특성

1차년도에 TS와 PI189225간의 F2 250개체를 전개하였으나 야생종의 특성인 자화의 늦은 발생, 착과기의 고온 등으로 인하여 68개체의 F2에서 착과가 되어 F3종자를 확보하였고, 이는 유전자지도 작성 및 F3전개를 통한 표현형분석 등에서 부족한 것으로 판단되어 추가로 300개체의 F3를 태국 세대진전시험포의 건기 3차작형(과중 : 2012. 12. 9, 정식 : 2012. 12. 26, 수확 : 2013. 3. 5 ~ 10)에서 전개하여 195개체의 F3종자를 확보하였고, 과중, 과형, 엽장, 엽폭, 종자량 등에 대한 자료를 조사하였고, 유전자지도 작성을 위하여 F2의 잎시료를, 수확이 완료된 F3종자를 내병성 검정 등을 위하여 중앙대에 제공하였다.

엽크기의 변이 양상을 보면 PI189225는 엽장 및 엽폭이 10.6cm, 10.6cm인 전형적인 야생종의

엽형을 보이고 있고, TS의 경우에는 엽장 및 엽폭이 각각 20.7cm, 16.7cm로 전형적인 장타원의 부계초형을 보이고 있다. F2분리세대에서 엽장은 최소 6.6cm에서 최대 26.9cm로 양친보다 작거나 양친보다 큰 변이를 보여주고 있어 엽크기에는 많은 인자가 작용하는 것으로 판단된다. 엽형을 보면 PI189225는 1.00이고, TS의 경우에 1.20으로 약간 긴 엽형을 보여주었는데, F2에서는 0.77에서 1.77까지 매우 폭넓은 엽형의 차이를 보여주고 있고 엽형에서도 많은 유전인자가 작용하는 것으로 생각된다. 잎의 결각을 보면 PI189225의 경우에 결각이 적은 특성(지수3)을 보여주고 있고, TS의 경우에 결각이 보통인 특성(지수5)을 보여주고 있고, F2에서는 결각이 3~7로 나타났다(표 4-5).

표 4-5. 유전자지도작성을 위한 양친 및 F2 엽 특성

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
PI189225	10.6	10.6	1.00	3	7	소엽,
TS	20.7	16.7	1.20	5	5	
F2(1)	14.4	13.1	1.10	5	5	
F2(2)	15.9	18.4	0.86	3	7	엽색진,
F2(3)	11.0	12.7	0.87	3	5	소엽,
F2(4)	12.1	12.8	0.95	3	5	
F2(5)	16.6	18.1	0.92	5	5	
F2(6)	20.0	20.4	0.98	5	5	
F2(7)	14.7	12.4	1.19	5	5	
F2(8)	14.2	15.5	0.92	3	7	엽색진,
F2(10)	17.0	12.9	1.32	5	5	
F2(11)	14.0	11.5	1.22	5	5	
F2(12)	14.5	14.5	1.00	5	5	
F2(13)	17.8	18.0	0.99	3	3	후엽심,엽색연,
F2(14)	16.4	16.6	0.99	7	5	
F2(15)	13.3	11.3	1.18	7	5	
F2(16)	19.6	19.8	0.99	3	5	
F2(17)	15.1	13.5	1.12	3	5	
F2(18)	13.7	15.3	0.90	5	5	
F2(19)	14.8	13.3	1.11	7	5	
F2(20)	14.3	12.8	1.12	5	5	
F2(21)	17.4	14.5	1.20	5	5	
F2(22)	13.7	11.7	1.17	7	5	
F2(23)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(24)	14.9	16	0.93	3	5	

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(25)	13.7	15.2	0.90	7	5	
F2(26)	14.0	14.0	1.00	5	5	
F2(27)	14.5	15.5	0.94	5	3	엽색연,
F2(28)	12.1	11.4	1.06	5	5	
F2(29)	17.6	17.4	1.01	7	5	
F2(30)	14.2	15.3	0.93	5	5	
F2(31)	16.2	17.7	0.92	3	5	
F2(32)	17.0	12.5	1.36	3	5	
F2(33)	15.4	15.8	0.97	5	5	
F2(34)	16.4	17.1	0.96	7	5	
F2(35)	16.7	17.3	0.97	5	3	엽색연,
F2(36)	11.7	13.7	0.85	3	5	소엽,
F2(37)	16.3	18.7	0.87	5	5	
F2(38)	17.3	14.2	1.22	7	5	
F2(39)	17.4	14.9	1.17	5	7	엽색진,
F2(40)	14.3	18.1	0.79	3	7	엽색진,
F2(41)	16.7	18.3	0.91	5	5	
F2(42)	15.1	13.2	1.14	5	5	
F2(43)	23.6	23.2	1.02	5	5	대엽,
F2(44)	13.8	13.3	1.04	3	5	
F2(45)	12.1	11.9	1.02	3	5	
F2(46)	14.3	15.5	0.92	7	5	
F2(47)	11.9	15.1	0.79	3	5	소엽,후엽심,
F2(48)	17.7	16.1	1.10	3	5	
F2(49)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(50)	10.0	9.3	1.08	5	5	소엽,
F2(52)	13.4	12.4	1.08	5	5	
F2(55)	14.1	13	1.08	3	3	후엽심,엽색연,
F2(56)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(57)	18.2	20.2	0.90	7	5	
F2(58)	16.9	16.0	1.06	5	5	
F2(59)	15.4	13.0	1.18	3	5	
F2(60)	17.1	14.6	1.17	3	5	후엽심,
F2(62)	13.8	14.7	0.94	7	5	
F2(63)	18.1	18.4	0.98	5	5	
F2(64)	15.5	17.6	0.88	5	5	

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(65)	24.2	20.3	1.19	3	5	대엽,
F2(66)	13.0	13.0	1.00	5	7	엽색진,
F2(67)	16.3	15.8	1.03	3	5	후엽심,
F2(68)	26.9	25.0	1.08	7	5	대엽,
F2(69)	14.7	16.8	0.88	5	5	
F2(70)	12.3	12.8	0.96	5	5	
F2(71)	11.8	11.8	1.00	3	5	소엽,후엽심,
F2(72)	16.3	13.6	1.20	3	5	
F2(76)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(77)	16.0	17.2	0.93	3	5	
F2(78)	16.9	17.2	0.98	3	5	
F2(79)	15.6	17.3	0.90	7	5	
F2(80)	16.1	16.5	0.98	7	5	
F2(81)	17.7	13.8	1.28	5	5	
F2(82)	15.6	14.0	1.11	7	5	
F2(83)	16.1	16.8	0.96	3	5	
F2(84)	14.3	14.3	1.00	3	5	
F2(85)	12.8	12.6	1.02	3	5	
F2(86)	10.4	9.7	1.07	3	5	소엽,후엽심,
F2(87)	13.7	13.5	1.01	3	5	
F2(88)	14.9	13.3	1.12	3	5	
F2(89)	14.9	13.2	1.13	3	5	
F2(90)	19.6	17.4	1.13	5	5	
F2(93)	16.5	16.2	1.02	5	5	
F2(94)	15.8	16.3	0.97	3	5	
F2(95)	11.8	12.1	0.98	7	5	소엽,
F2(96)	14.7	15.7	0.94	3	5	후엽심,
F2(97)	12.9	11.7	1.10	3	5	
F2(98)	11.6	11.1	1.05	3	5	소엽,
F2(99)	16.2	17.7	0.92	3	5	
F2(100)	12.5	14	0.89	3	5	후엽심,
F2(101)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(102)	14.6	16.3	0.90	3	5	
F2(104)	15.1	15.3	0.99	3	5	
F2(105)	14.2	15.0	0.95	3	5	
F2(106)	11.7	12.8	0.91	3	5	소엽,

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(110)	9.7	9.1	1.07	3	5	소엽,
F2(111)	17.2	17.2	1.00	3	5	
F2(112)	11.0	10.6	1.04	5	5	소엽,
F2(113)	15.1	19.2	0.79	5	5	
F2(114)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(115)	14.8	14.6	1.01	5	5	
F2(116)	17.8	19.4	0.92	7	5	
F2(117)	14.3	13.8	1.04	7	5	
F2(118)	13.5	13.4	1.01	3	5	
F2(119)	14.4	12.4	1.16	5	5	
F2(120)	17.8	17.4	1.02	5	5	
F2(121)	17.0	17.5	0.97	7	5	
F2(122)	14.2	11.1	1.28	5	5	
F2(123)	13.6	14.9	0.91	7	5	
F2(124)	18.0	16.8	1.07	3	5	후엽심,
F2(125)	15.2	15.5	0.98	5	3	엽색연,
F2(126)	15.1	14.3	1.06	5	5	
F2(127)	14.3	15.4	0.93	3	5	
F2(128)	13.7	15.4	0.89	7	5	
F2(129)	18.8	22.2	0.85	7	5	
F2(130)	21.7	20	1.09	3	5	
F2(131)	14.6	15.2	0.96	3	5	
F2(132)	15.3	15.3	1.00	3	5	
F2(133)	13.5	12.5	1.08	5	5	
F2(134)	19.9	20.5	0.97	7	5	
F2(135)	12.4	15.1	0.82	5	5	
F2(136)	14.5	16.3	0.89	5	5	
F2(137)	12.9	15.3	0.84	3	3	후엽심,엽색연,
F2(138)	15.4	12.9	1.19	5	5	
F2(139)	16.0	16.0	1.00	5	5	
F2(140)	14.7	13.6	1.08	3	5	
F2(141)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(142)	20.0	16.4	1.22	3	5	
F2(143)	16.2	14.6	1.11	7	5	
F2(144)	12.2	11	1.11	3	5	
F2(145)	16.9	16.9	1.00	3	5	

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(146)	12.4	10.5	1.18	7	5	
F2(147)	17.5	17.3	1.01	5	5	
F2(148)	13.9	13.4	1.04	3	5	
F2(149)	13.4	14.6	0.92	5	5	
F2(150)	10.4	12.1	0.86	5	5	소엽,
F2(151)	13.9	14.2	0.98	3	7	엽색진,
F2(152)	11.2	11.3	0.99	3	7	소엽,엽색진,
F2(153)	15.4	16.4	0.94	5	5	
F2(154)	10.4	10.3	1.01	7	5	소엽,
F2(155)	10.3	11.4	0.90	3	5	소엽,후엽심,
F2(156)	14.6	13.0	1.12	5	5	
F2(157)	14.9	13.7	1.09	3	7	후엽심,엽색진,
F2(158)	18.7	15.0	1.25	5	5	
F2(159)	11.0	9.3	1.18	5	5	소엽,
F2(160)	18.3	15.9	1.15	5	5	
F2(161)	12.9	11.1	1.16	3	5	
F2(162)	10.7	11.0	0.97	5	5	소엽,
F2(163)	11.8	12.2	0.97	5	5	소엽,
F2(164)	13.6	13.2	1.03	5	5	
F2(165)	12.7	11.6	1.09	5	5	
F2(166)	16.4	16.7	0.98	5	5	
F2(167)	16.4	15.1	1.09	5	5	
F2(168)	9.5	8.3	1.14	3	5	소엽,
F2(169)	13.6	12.3	1.11	5	5	
F2(170)	17.0	19.7	0.86	5	5	
F2(171)	17.9	17.3	1.03	3	5	
F2(172)	15.6	14.8	1.05	7	5	
F2(173)	11.6	12.9	0.90	3	5	소엽,
F2(174)	13.5	15.3	0.88	5	5	
F2(176)	13.6	13.3	1.02	5	5	
F2(177)	21.3	27.1	0.79	3	5	
F2(178)	14.0	13.7	1.02	5	5	
F2(179)	16.5	16.7	0.99	5	5	
F2(180)	16.2	18.7	0.87	5	5	
F2(181)	13.3	12.9	1.03	7	5	
F2(182)	19.1	13.5	1.41	5	5	

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(183)	19.1	20.0	0.96	5	5	
F2(185)	11.9	10.9	1.09	7	5	소엽,
F2(186)	16.0	17.6	0.91	3	5	후엽심,
F2(187)	14.5	16.0	0.91	5	5	
F2(188)	15.5	16.9	0.92	3	5	
F2(189)	12.6	13.9	0.91	5	5	
F2(190)	14.0	18.3	0.77	3	5	후엽심,
F2(191)	17.6	16.2	1.09	5	5	
F2(193)	14.0	16.2	0.86	5	5	
F2(194)	12.5	14	0.89	3	5	
F2(195)	16.7	15.4	1.08	5	5	
F2(196)	17.5	20.8	0.84	3	5	
F2(197)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(198)	18.5	20.8	0.89	3	5	
F2(199)	18.4	16.4	1.12	3	3	후엽심,엽색연,
F2(200)	14.8	16.6	0.89	7	5	
F2(201)	13.3	12.8	1.04	5	5	
F2(202)	12.8	11.5	1.11	5	5	
F2(203)	12.2	10.6	1.15	7	5	
F2(204)	13.5	14.4	0.94	3	5	
F2(205)	16.9	17.3	0.98	3	5	
F2(206)	14.0	14.3	0.98	7	5	
F2(207)	16.0	16.6	0.96	7	5	
F2(208)	9.9	6.3	1.57	7	5	소엽,
F2(209)	22.5	24.1	0.93	7	5	
F2(210)	11.5	13.7	0.84	5	5	소엽,
F2(211)	14.2	16.9	0.84	3	5	
F2(212)	17.5	13.9	1.26	5	5	
F2(213)	19.3	19.3	1.00	5	5	
F2(214)	20.5	14.0	1.46	3	5	
F2(215)	15.0	12.9	1.16	3	5	
F2(216)	13.7	12.3	1.11	5	5	
F2(217)	15.9	15.9	1.00	5	5	
F2(218)	11.1	10.5	1.06	3	5	소엽,
F2(220)	16.9	13.1	1.29	5	5	
F2(221)	10.5	11.5	0.91	7	5	소엽,

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(222)	14.3	13.9	1.03	5	5	
F2(223)	15.3	13.7	1.12	3	5	
F2(224)	15.2	12.5	1.22	3	5	
F2(225)	12.4	12.9	0.96	7	5	
F2(226)	16.9	16.3	1.04	5	5	
F2(227)	18.3	18.3	1.00	3	5	
F2(228)	12.8	10.8	1.19	3	5	
F2(229)	9.5	9.8	0.97	7	5	소엽,
F2(230)	14.7	12.7	1.16	7	5	
F2(231)	13.8	12.3	1.12	5	5	
F2(232)	15.5	14.5	1.07	5	5	
F2(233)	11.6	11.3	1.03	7	5	소엽,
F2(235)	12.4	11.3	1.10	5	5	
F2(236)	13.7	11.8	1.16	3	5	후엽심,
F2(237)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(238)	21.7	20.3	1.07	5	5	
F2(239)	14.7	13.6	1.08	7	5	
F2(240)	15.7	17.1	0.92	3	5	
F2(241)	14.8	14.8	1.00	3	5	
F2(242)	17.9	15.1	1.19	3	5	
F2(243)	15.6	10.3	1.51	5	5	
F2(244)	14.1	12.2	1.16	5	5	
F2(245)	12.3	11.7	1.05	3	5	
F2(246)	16.3	14.8	1.10	5	5	
F2(247)	12.6	12.1	1.04	5	5	
F2(248)	13.7	14.8	0.93	5	7	엽색진,
F2(249)	12.9	11.6	1.11	5	5	
F2(250)	19.5	18.9	1.03	5	5	
F2(251)	14.1	12.5	1.13	5	5	
F2(252)	6.6	7.2	0.92	3	5	소엽,
F2(253)	15.0	15.3	0.98	3	5	
F2(254)	13.9	12.6	1.10	5	5	
F2(255)	11.7	13.4	0.87	5	5	소엽,
F2(256)	10.7	10.0	1.07	5	5	소엽,
F2(257)	19.5	14.7	1.33	3	5	
F2(258)	17.3	16.3	1.06	5	3	엽색연,

계통 /F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(259)	16.7	18.3	0.91	5	5	
F2(260)	15.4	14.6	1.05	5	5	
F2(261)	12.3	12.3	1.00	5	5	
F2(262)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(264)	12.1	11.6	1.04	7	5	
F2(265)	15.1	16.7	0.90	3	5	
F2(266)	19.7	20	0.99	3	5	
F2(267)	15.9	14.1	1.13	5	5	
F2(268)	12.4	14.0	0.89	3	5	
F2(269)	14.0	15.3	0.92	5	5	
F2(270)	18.2	21.2	0.86	3	5	
F2(271)	14.8	14.0	1.06	5	5	
F2(272)	11.8	11.3	1.04	5	5	소엽,
F2(273)	11.0	11.5	0.96	7	5	소엽,
F2(274)	16.2	18.5	0.88	5	5	
F2(275)	10.0	9.4	1.06	5	5	소엽,
F2(276)	16.4	17.8	0.92	3	5	
F2(277)	14.8	13.8	1.07	3	5	
F2(278)	16.2	17.2	0.94	3	5	
F2(279)	12.2	12.2	1.00	3	5	
F2(280)	15.3	14.7	1.04	5	5	
F2(281)	13.8	13.8	1.00	3	5	후엽심,
F2(282)	14.6	14.3	1.02	5	5	
F2(283)	11.3	12.9	0.88	5	5	소엽,
F2(284)	11.6	9.6	1.21	3	5	소엽,
F2(286)	12.5	14.1	0.89	5	5	
F2(287)	15.4	15.7	0.98	3	5	
F2(288)	14.2	14.2	1.00	5	5	
F2(289)	13.8	12.8	1.08	7	5	
F2(290)	14.3	12.7	1.13	7	5	
F2(291)	16.9	15.3	1.10	5	5	
F2(292)	17.1	16.6	1.03	5	5	
F2(293)	바이러스 감염, 활착 불량 등으로 도태됨					
F2(294)	14.4	11.5	1.25	3	5	
F2(295)	11.7	13.3	0.88	5	5	소엽,
F2(296)	15.7	13.0	1.21	5	5	

계통 / F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수 (엽장/엽폭)	결각 (1:천,9:심)	엽색 (3:담,7:농)	엽특성
F2(298)	14.9	14.2	1.05	7	5	
F2(299)	13.3	13.0	1.02	3	5	
F2(300)	9.6	10.0	0.96	5	5	

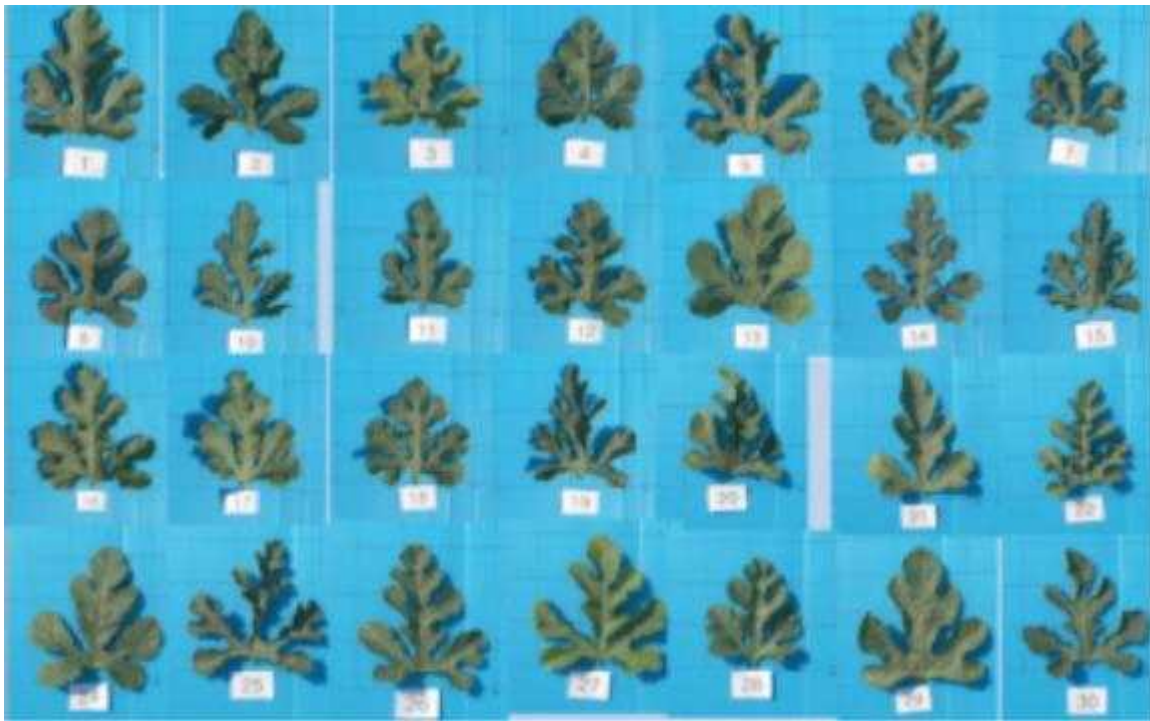


그림 4-34. F2개체들(1~30)의 엽형



그림 4-35. F2개체들(31~64)의 엽형



그림 4-36. F2개체들(65~98)의 엽형



그림 4-37. F2개체들(99~132)의 엽형



그림 4-38. F2개체들(133~160)의 엽형



그림 4-39. F2개체들(161~190)의 엽형



그림 4-40. F2개체들(191~221)의 엽형



그림 4-41. F2개체들(222~251)의 엽형



그림 4-42. F2개체들(252~280)의 엽형



그림 4-43. F2개체들(281~300)의 엽형

수확 시 양친 및 F2의 과특성에 대한 과중, 과장, 과경, 당도 등을 조사하였다(표 4-6). PI189225는 과육의 경도가 매우 높고(지수9), 당도가 낮고으며, 육색이 백색인 반면, TS는 당도가 매우 높은 장타원의 적육과의 특성(그림 4-44.)을 보인다. F2에서 대부분의 과육색은 백색이고, 일부 황색의 육색을 보이며, 아주 소수의 개체에서 적육색을 보인다. 과육색을 보면 야생종인 PI189225가 백색(정확히는 약간 미황색이 보여지는)이고, TS의 경우 적육색이지만, F1 및 F2에서는 대체적으로 야생종의 특성을 보여지는 과육색이 대부분이었다. 과육색의 경우 숙기, 과육색 관련 유전자 등이 복합적으로 작용하는 양적인 특성을 보이는 것으로 판단된다. 당도의 경우 PI189225 등은 매우 낮고, TS의 경우에는 11.0%인데 반해 F1과 F2에서는 당 함량이 양친의 중간 이하로 나타났다. 가장 당도가 높은 개체(#104)의 경우에도 겨우 6.4%로 F2 분리세대에서는 당도가 낮은 쪽으로 많이 분포하고 있고, 과육색과 유사한 특성을 보여주고 있다. 따라서 내병성 품종 육성 등을 위해서 야생종을 이용하는 경우 여교잡 횟수를 보통의 경우보다 많이 늘려야 하고, 분리개체수를 늘려야 할 것으로 판단되며, 이러한 어려움을 극복하는데는 본 과제에서 목표로 하고 있는 유전자 지도작성 및 이를 활용한 MAB(Marker assistant backcross breeding)가 세대단축, 비용절감 등에 많은 기여를 할 것으로 판단된다. 바탕색의 경우 PI189225는 바탕색이 진녹색인 야생호피를 보이고, TS의 경우에 호피를 보이는데 반해(그림 44.), F2에서는 호피가 없는 개체부터 호피정도가 매우 진한 개체들도 나타나 양친에 없는 변이개체들이 많이 보여지므로, 이 형질 또한 매우 다양한 인자가 관여하는 것으로 추정된다. F2 #32, #88과 #235에서 TS보다 매우 넓은 호피가 나타나 넓고 진한 호피를 선호하는 국내의 수박 품종 개발에 유용한 재료로 쓰일 것으로 판단된다. 과형특성을 보면 PI189225는 원형이고, TS는 장타원형이다. F2의 경우에 과형지수 0.85부터 2.24까지 매우 다양한 과형을 보여주고 있다. 과크기의 경우, PI189225는 1.7kg, TS의 경우 3.0kg인데 반해 F2에서는 최소 0.1kg에서 최

대 5.0kg까지 다양하지만 전반적으로 과중이 작은 쪽에 치우치는 경향이 있다.

표 4-6. 양친, F1 및 F2개체들의 과외관 및 과육 특성

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
PI189225	원형	녹	무지	백	1.7	2.8	15.0	15.8	1.05	
TS	단타	녹	호피	적	3.0	11.0	14.2	29.1	2.05	
F2(1)	단타	녹	세호피	황	3.3	4.9	17.0	20.5	1.21	극경육, 조착,
F2(2)	단타	녹	호피	백	1.6	5.0	13.0	17.5	1.35	
F2(4)	원	녹	호피	황	2.1	4.9	14.4	15.5	1.08	황육진
F2(5)	장타	백녹	세호피	백	1.0	3.8	10.0	15.4	1.54	
F2(6)	고구	백녹	세호피	백	1.9	5.0	14.6	17.0	1.16	
F2(7)	원	녹	세호피	연황	1.7	4.2	14.5	15.7	1.08	황육진, 극경육
F2(8)	원	녹	호피	연황	0.8	3.0	11.0	11.5	1.05	황육진
F2(10)	단타	백녹	세호피	백	1.3	4.2	12.0	15.2	1.27	
F2(11)	고구	진녹	호피	백	1.1	2.8	12.1	14.3	1.18	
F2(12)	단타	흑	무지	백	1.5	4.1	12.8	17.0	1.33	흑피진, 극경육
F2(13)	단타	백녹	호피	연한적육	0.2	4.6	7.5	9.2	1.23	
F2(14)	장타	녹	호피	백	3.3	3.6	15.4	24.0	1.56	
F2(15)	단타	연흑	호피	백	2.3	4.0	14.0	20.0	1.43	
F2(18)	고구	여흑	세호피	백	2.9	4.0	17.0	19.2	1.13	
F2(20)	단타	백녹	호피	황	0.1	-	5.5	7.8	1.42	
F2(21)	단타	녹	호피	황	1.2	4.0	12.1	15.8	1.31	극경육,
F2(22)	원	녹	호피	황	1.8	4.8	15.1	14.5	0.96	극경육,
F2(24)	원	백녹	호피	백	2.8	2.6	16.4	16.7	1.02	
F2(26)	단타	연흑	호피	백	1.8	3.0	13.9	18.0	1.29	
F2(27)	단타	흑	호피	백	2.4	3.0	15.2	20.0	1.32	
F2(28)	원	녹	세호피	황	1.2	2.8	13.0	13.1	1.01	극경육,
F2(31)	단타	녹	무지	황	2.1	5.0	14.8	18.2	1.23	
F2(32)	장타	녹	호피	황	0.7	2.8	10.0	15.3	1.53	극경육, 호피진
F2(33)	단타	녹	호피	황	1.9	5.2	13.7	19.3	1.41	
F2(34)	원	백녹	무지	백	0.9	4.0	11.4	12.0	1.05	
F2(36)	고구	녹	호피	백	1.5	3.0	13.6	15.2	1.12	
F2(37)	원	흑	무지	황	0.9	3.6	12.0	12.8	1.07	흑피진,
F2(38)	고구	흑	호피	황	0.3	5.0	8.8	9.7	1.1	
F2(39)	단타	녹	호피	백	1.2	3.8	11.8	17.4	1.47	
F2(41)	원	녹	호피	백	0.6	3.0	9.8	10.2	1.04	
F2(42)	단타	연흑	호피	백	3.6	3.6	17.4	22.0	1.26	

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
F2(44)	고구	녹	세호피	백	2.4	5.0	16.3	18.2	1.12	극경육,
F2(46)	장타	녹	세호피	황	1.4	4.8	11.3	19.4	1.72	
F2(48)	고구	백녹	세호피	백	1.4	3.6	13.8	15.4	1.12	
F2(50)	단타	백녹	세호피	황	0.1	5.0	6.1	7.8	1.28	고사,
F2(52)	원	녹	호피	백	5.9	4.4	22.4	22.3	1	비대양양-외주,
F2(57)	단타	백녹	세호피	백	2.3	3.8	15.7	19.8	1.26	
F2(59)	장타	백녹	세호피	황	0.9	4.4	10.3	17.0	1.65	
F2(60)	장타	백녹	세호피	연한적육	0.4	4.6	8.7	14.6	1.68	
F2(62)	장타	녹	세호피	황	3.4	5.0	15.6	24.5	1.57	극경육,
F2(63)	단타	녹	호피	연한적육	2.6	2.8	15.0	19.7	1.31	
F2(64)	고구	백녹	세호피	백	2.7	3.0	13.5	16.0	1.19	
F2(65)	단타	백녹	호피	백	1.3	2.4	13.0	15.6	1.2	
F2(68)	원	연흑	호피	적	2.2	2.8	15.4	16.0	1.04	
F2(71)	단타	흑	세호피	백	3.1	4.2	15.8	23.4	1.48	
F2(72)	원	녹	무지	황	0.8	3.4	11.2	12.0	1.07	고사,극경육,
F2(78)	단타	녹	무지	황	2.5	5.4	15.3	18.6	1.22	
F2(79)	단타	흑	무지	황	2.0	5.6	14.6	18.7	1.28	
F2(81)	장타	백녹	세호피	연한적육	1.5	3.8	12.2	18.4	1.51	
F2(82)	원	연흑	호피	연한적육	1.9	6.2	14.8	16.0	1.08	홍색기, 당도 양호
F2(86)	단타	녹	무지	백	0.9	3.4	11.2	14.4	1.29	극경육,
F2(88)	장타	백녹	호피	백	1.2	4.0	11.0	18.5	1.68	호피넓음-새 재료,
F2(89)	원	연흑	호피	황	1.2	4.8	13.2	12.0	0.91	극경육,
F2(90)	고구	백녹	무지	백	0.5	2.0	10.0	11.2	1.12	
F2(94)	원	녹	호피	백	1.1	4.2	12.0	12.8	1.07	
F2(95)	고구	백녹	무지	백	1.2	3.8	12.4	14.2	1.15	고사,과피백화,
F2(96)	단타	백녹	호피	백	1.5	4.0	13.4	16.4	1.22	극경육,
F2(97)	원	흑	무지	백	1.6	3.8	14.2	15.4	1.08	극경육,
F2(99)	원	백녹	세호피	황	2.3	4.2	16.0	17.4	1.09	고사,과피백화,
F2(100)	원	연흑	호피	백	3.0	2.4	17.4	17.0	0.98	
F2(104)	장타	흑	무지	황	3.7	6.4	16.4	26.2	1.6	당도 그중 양, 극경육,
F2(105)	고구	녹	세호피	백	3.2	3.6	17.2	19.8	1.15	
F2(106)	원	연흑	호피	백	1.9	3.2	14.2	15.0	1.06	
F2(110)	원	흑	세호피	황	0.9	3.6	11.8	12.2	1.03	극경육,
F2(112)	원	녹	호피	백	1.8	2.4	15.2	14.6	0.96	극경육,
F2(113)	원	녹	세호피	백	1.3	4.8	13.8	13.2	0.96	극경육,
F2(116)	원	백녹	세호피	백	0.4	3.2	9.2	10.0	1.09	

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
F2(117)	고구	백녹	호피	백	1.2	2.8	12.5	13.8	1.1	
F2(118)	단타	연흑	세호피	백	3.5	2.8	17.4	22.0	1.26	
F2(120)	고구	녹	무지	백	1.6	4.8	13.2	14.6	1.11	
F2(121)	단타	백녹	호피	백	2.6	5.6	14.8	21.2	1.43	
F2(122)	원	연흑	무지	백	3.5	5.6	17.8	19.4	1.09	
F2(123)	고구	연흑	호피	백	2.1	5.6	15.4	17.2	1.12	극경육,
F2(124)	고구	흑	무지	백	1.3	4.2	13.4	15.3	1.14	쓴맛심, 흑피진
F2(125)	원	녹	호피	백	1.7	3.8	15.2	14.4	0.95	쓴맛심,
F2(126)	단타	백녹	호피	백	0.4	3.8	7.1	10.2	1.44	
F2(127)	단타	백녹	호피	백	2.2	4.0	15.2	18.2	1.2	쓴맛심,
F2(128)	원	백녹	세호피	백	1.2	4.0	12.0	12.4	1.03	
F2(129)	장타	백녹	세호피	연한적육	1.0	3.0	10.8	17.0	1.57	
F2(131)	고구	백녹	세호피	백	1.3	3.8	13.2	15.4	1.17	
F2(132)	원	연흑	세호피	백	1.5	1.8	14.0	14.2	1.01	
F2(133)	고구	백녹	호피	백	1.2	5.6	12.2	13.4	1.1	
F2(134)	원	연흑	호피	백	1.1	3.0	12.1	13.2	1.09	
F2(137)	고구	녹	호피	백	2.0	3.8	14.6	17.2	1.18	
F2(138)	원	백녹	호피	백	1.0	3.6	12.4	13.0	1.05	
F2(139)	단타	연흑	호피	백	3.2	3.8	16.8	22.4	1.33	극경육,
F2(140)	단타	녹	세호피	백	0.9	2.4	11.4	13.8	1.21	극경육,
F2(141)	장타	녹	호피	적	0.9	3.0	9.0	20.2	2.24	과형매우 장형
F2(144)	단타	녹	세호피	백	2.1	1.8	14.6	19.8	1.36	
F2(145)	고구	연흑	호피	백	2.1	3.8	14.8	17.6	1.19	
F2(146)	고구	녹	호피	백	2.5	4.8	15.3	18.0	1.18	극경육,
F2(147)	장타	연흑	세호피	백	2.7		15.2	23.7	1.56	극경육,
F2(148)	고구	백녹	세호피	백	0.6	3.0	10.0	11.4	1.14	
F2(151)	단타	녹	호피	백	0.3	3.8	7.1	9.2	1.3	
F2(152)	단타	연흑	무지	백	2.1	3.8	14.8	19.3	1.3	극경육,
F2(153)	고구	백녹	호피	백	1.7	3.4	14.0	15.4	1.1	고사
F2(154)	원	녹	크림슨	백	3.4	5.2	18.0	18.5	1.03	
F2(155)	원	흑	무지	백	2.0	4.2	15.0	15.6	1.04	흑피진,
F2(156)	고구	녹	호피	백	0.6	4.2	9.8	11.0	1.12	
F2(157)	원	녹	세호피	황	0.9	5.2	12.0	12.8	1.07	고사
F2(158)	원	백녹	세호피	백	1.8	3.0	14.2	15.0	1.06	
F2(163)	단타	연흑	무지	연한적육	0.6	6.0	13.5	17.4	1.29	당도양
F2(165)	단타	연흑	세호피	백	1.0	3.6	11.8	14.2	1.2	

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
F2(166)	단타	백녹	호피	백	2.6	3.8	17.1	21.5	1.26	고사, 호피진, 극경육,
F2(167)	원	백녹	세호피	백	0.6	3.6	10.1	11.0	1.09	
F2(168)	고구	연흑	호피	백	1.1	5.2	12.5	13.8	1.1	
F2(169)	고구	녹	세호피	백	1.0	6.0	12.2	14.2	1.16	백육-당도양호, 극경육,
F2(170)	원	녹	호피	백	2.7	5.2	17.4	16.5	0.95	극경육,
F2(171)	원	연흑	호피	백	1.8	3.4	22.2	23.6	1.06	
F2(173)	단타	흑	무지	연	1.8	3.6	13.4	16.2	1.21	
F2(174)	고구	백녹	세호피	백	1.1	4.0	12.8	14.8	1.16	극경육,
F2(176)	단타	녹	세호피	백	0.4	4.8	7.8	11.0	1.41	
F2(177)	장타	백녹	세호피	연한적육	1.7	4.0	12.5	24.8	1.98	
F2(178)	원	녹	무지	백	0.5	4.2	9.6	10.5	1.09	고사
F2(180)	단타	연흑	세호피	백	2.7	4.8	15.8	19.0	1.2	
F2(181)	장타	백녹	무지	백	0.5	4.8	8.2	13.0	1.59	
F2(182)	단타	녹	세호피	백	2.0	4.0	13.4	17.2	1.28	
F2(183)	단타	녹	호피	백	1.3	5.0	11.6	16.2	1.4	
F2(185)	단타	연흑	무지	백	1.1	2.8	11.6	16.2	1.4	
F2(186)	장타	흑	무지	백	2.5	3.8	13.8	24.1	1.75	
F2(187)	고구	백녹	호피	백	0.7	4.4	10.6	11.8	1.11	
F2(188)	고구	연흑	세호피	백	1.9	3.8	14.4	16.2	1.13	
F2(190)	장타	연흑	무지	백	2.5	3.0	10.6	19.6	1.85	
F2(191)	고구	연흑	무지	백	2.4	3.4	15.6	17.8	1.14	
F2(193)	고구	녹	세호피	백	2.2	6.0	15.0	16.6	1.11	백육-당도양호
F2(194)	장타	녹	무지	백	0.3	1.6	7.0	10.5	1.5	
F2(195)	원	녹	세호피	백	3.7	4.4	21.5	18.8	0.87	
F2(199)	단타	녹	무지	연한적육	1.5	4.4	13.0	16.6	1.28	극경육,
F2(200)	원	녹	무지	백	2.4	4.6	16.2	17.0	1.05	
F2(202)	단타	연흑	호피	백	3.6	5.0	17.2	20.6	1.2	
F2(203)	고구	백녹	세호피	백	0.9	4.8	11.2	13.2	1.18	
F2(204)	고구	연흑	세호피	연한적육	1.6	4.0	13.1	15.2	1.16	
F2(206)	단타	연흑	세호피	백	1.3	3.6	12.8	15.4	1.2	
F2(209)	단타	백녹	세호피	백	0.5	4.6	9.0	11.2	1.24	
F2(211)	원	연흑	무지	백	0.6	4.2	11.6	11.2	0.97	극경육,
F2(212)	단타	흑	세호피	백	1.8	5.8	13.0	17.8	1.37	
F2(213)	단타	연흑	세호피	백	1.4	2.8	12.6	16.0	1.27	
F2(216)	장타	연흑	세호피	백	0.8	4.0	10.0	16.0	1.6	
F2(217)	고구	백녹	세호피	백	1.0	4.0	11.2	12.8	1.14	

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
F2(218)	원	연흑	세호피	백	3.3	5.8	18.6	19.4	1.04	
F2(221)	단타	연흑	세호피	백	2.4	5.0	15.6	18.8	1.21	
F2(222)	원	연흑	세호피	백	1.6	4.8	14.0	14.6	1.04	
F2(223)	장타	연흑	호피	백	0.9	3.2	9.8	19.0	1.94	
F2(224)	고구	연흑	세호피	백	4.5	3.6	19.2	21.5	1.12	
F2(225)	고구	연흑	무지	백	1.3	4.0	13.0	14.6	1.12	
F2(227)	단타	연흑	세호피	백	0.7	4.8	14.0	18.6	1.33	
F2(229)	단타	연흑	세호피	백	2.2	3.0	15.2	19.0	1.25	극경육,
F2(230)	고구	연흑	호피	백	3.7	4.0	18.0	20.5	1.14	
F2(231)	단타	녹	호피	백	1.1	4.8	11.8	15.2	1.29	
F2(232)	원	백녹	세호피	백	2.0	3.2	15.2	16.6	1.09	극경육,
F2(233)	원	녹	호피	백	1.3	4.0	13.4	12.6	0.94	고사,극경육,
F2(235)	고구	녹	호피	황	2.0	4.0	14.0	16.5	1.18	호피진진,호피진한재료가 농
F2(236)	장타	연흑	세호피	백	1.8	3.0	12.2	24.0	1.97	
F2(238)	장타	녹	호피	백	2.4	5.6	13.2	28.6	2.17	과형매우 장형
F2(239)	장타	녹	세호피	백	3.0	3.8	15.6	23.4	1.5	
F2(240)	단타	녹	호피	백	1.8	4.0	14.2	17.6	1.24	고사,극경육,
F2(242)	원	녹	호피	백	0.9	4.8	11.1	12.0	1.08	
F2(243)	단타	녹	호피	백	2.2	5.0	14.8	19.5	1.32	
F2(244)	단타	녹	세호피	백	1.3	3.4	12.5	15.6	1.25	
F2(245)	원	녹	세호피	백	0.8	2.2	11.4	12.0	1.05	
F2(247)	고구	백녹	무지	백	0.1	4.6	6.0	6.8	1.13	고사
F2(248)	원	연흑	세호피	백	0.5	3.8	14.5	15.0	1.03	
F2(249)	장타	녹	세호피	백	0.1	4.6	5.5	10.5	1.91	고사
F2(250)	원	연흑	세호피	백	2.6	4.8	16.0	17.5	1.09	극경육,
F2(252)	단타	연흑	무지	백	0.5	3.0	9.2	13.0	1.41	극경육,
F2(253)	단타	백녹	세호피	백	2.4	3.6	15.4	18.6	1.21	
F2(254)	원	연흑	호피	황	1.2	5.4	12.4	13.5	1.09	
F2(256)	고구	연흑	세호피	백	3.5	4.8	18.2	21.4	1.18	극경육,
F2(257)	장타	녹	세호피	백	0.3	4.8	7.2	12.2	1.69	
F2(258)	단타	백녹	세호피	백	0.4	4.0	8.4	10.5	1.25	극경육,
F2(259)	단타	녹	무지	백	1.0	2.6	10.6	14.8	1.4	
F2(260)	원	연흑	세호피	황	0.8	4.2	15.4	15.0	0.97	진황육,
F2(266)	단타	연흑	세호피	백	2.9	3.6	16.5	23.0	1.39	
F2(267)	원	백녹	세호피	백	0.8	4.6	12.0	11.6	0.97	고사
F2(270)	원	녹	호피	백	1.2	2.6	13.5	14.6	1.08	극경육,

계통/ F2개체번호	과형	바탕색	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)	비고
F2(271)	원	백녹	세호피	백	1.1	4.2	13.2	12.4	0.94	
F2(272)	원	녹	세호피	백	0.7	5.8	10.5	11.2	1.07	고사
F2(274)	단타	녹	세호피	백	1.6	3.4	13.4	16.2	1.21	극경육,
F2(276)	단타	녹	세호피	백	2.8	2.8	16.3	20.4	1.25	
F2(277)	고구	녹	세호피	백	1.0	3.8	12.2	14.0	1.15	
F2(278)	고구	녹	호피	백	1.1	2.4	13.2	15.6	1.18	고사,
F2(280)	원	녹	호피	백	1.6	4.0	13.2	13.8	1.05	
F2(283)	고구	연흑	호피	적	1.3	5.8	13.0	15.2	1.17	가장 홍색진,
F2(284)	원	백녹	세호피	황	2.4	3.6	15.8	17.0	1.08	
F2(286)	고구	녹	세호피	백	1.1	3.8	12.4	14.0	1.13	
F2(288)	장타	연흑	무지	백	2.5	5.0	12.8	24.8	1.94	장타
F2(289)	원	백녹	무지	백	1.9	3.8	14.8	16.0	1.08	
F2(290)	원	백녹	무지	백	1.5	4.4	14.1	13.2	0.94	
F2(291)	고구	녹	세호피	백	2.8	4.0	17.2	20.0	1.16	
F2(294)	고구	연흑	세호피	백	1.2	4.0	12.6	14.2	1.13	
F2(295)	단타	연흑	세호피	백	2.0	3.0	13.2	19.6	1.48	
F2(296)	원	녹	호피	백	3.2	3.0	18.0	18.4	1.02	
F2(299)	원	백녹	세호피	백	2.5	5.8	17.2	17.0	0.99	



그림 4-44. 분리세대 작성의 양친으로 사용된 PI189225(좌)와 TS(우)의 외관 및 과육색



그림 4-45. F2개체(1~27)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-46. F2개체(28~62)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-47. F2개체(63~100)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-48. F2개체(104~131)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-49. F2개체(132~156)의 과외관 및 과육 특성

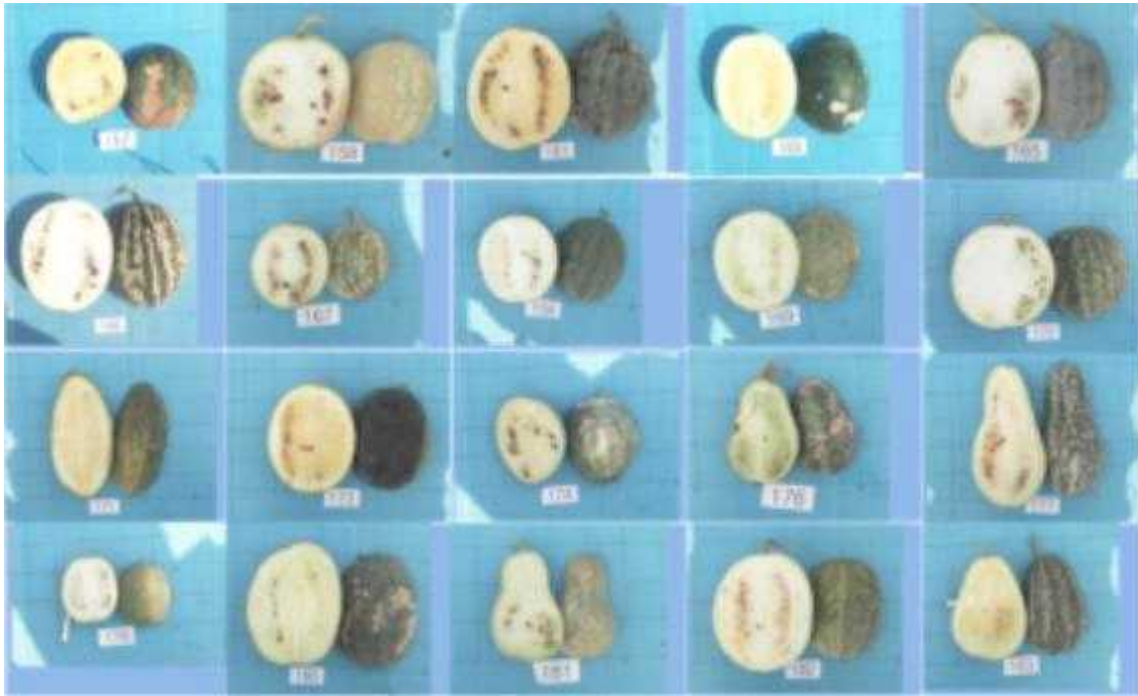


그림 4-50. F2개체(157~183)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-51. F2개체(185~216)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-52. F2개체(217~243)의 과외관 및 과육 특성



그림 4-53. F2개체(244~274)의 과외관 및 과육 특성

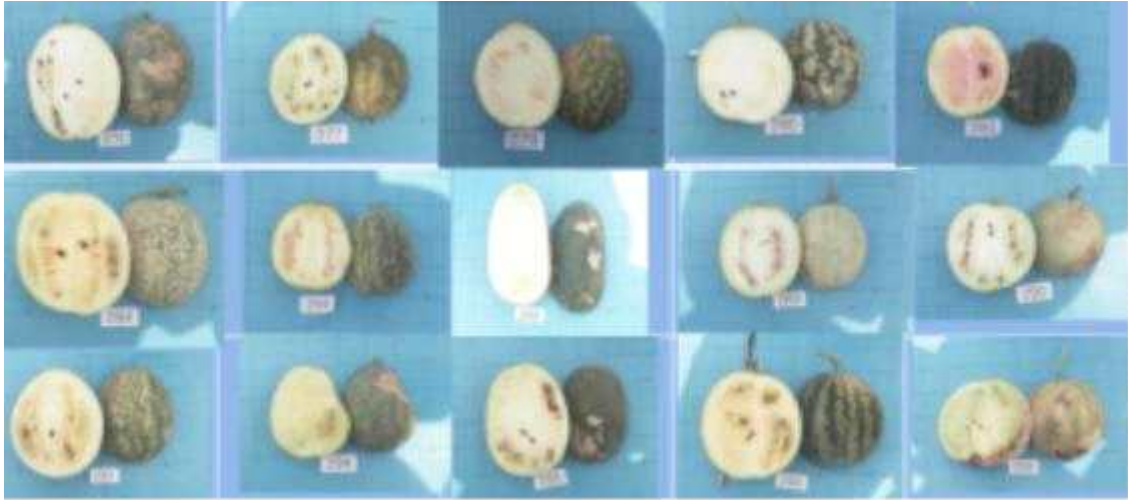


그림 4-54. F2개체(276~299)의 과외관 및 과육 특성

수확된 F2의 종자량은 표 4-7과 같다. 종피색은 일부 종자의 경우 적숙기 이전에 수확되었기 때문에 정확한 종피색 파악이 힘든 부분이 있었으며, 100립중에 의한 종자의 크기구분은 조사중에 있다. 수확된 종자의 성상은 그림 4-55 ~ 4-63에 나타나 있다. 조사된 자료 및 사진, 종자는 주관연구기관인 중앙대와 공유하여 유전자지도, 형질관련 마커개발 등에 활용되었다.

표 4-7. F2의 수확 종자량

번호	종자량	번호	종자량	번호	종자량	번호	종자량
F2(1)	13 g	F2(2)	15 립	F2(4)	7 g	F2(5)	5 립
F2(6)	5 g	F2(7)	104 립	F2(8)	3 g	F2(10)	13 g
F2(11)	13 g	F2(12)	22 g	F2(13)	74 립	F2(14)	16 g
F2(15)	10 g	F2(18)	6 g	F2(20)	11 립	F2(21)	6 g
F2(22)	44 립	F2(24)	13 g	F2(26)	28 g	F2(27)	5 g
F2(28)	8 g	F2(31)	7 g	F2(32)	5 g	F2(33)	10 g
F2(34)	30 립	F2(36)	14 g	F2(37)	34 립	F2(38)	61 립
F2(39)	157 립	F2(41)	105 립	F2(42)	28 g	F2(44)	7 g
F2(46)	33 립	F2(48)	35 립	F2(50)	16 립	F2(52)	12 g
F2(57)	6 g	F2(59)	122 립	F2(60)	8 립	F2(62)	15 g
F2(63)	35 g	F2(64)	3 g	F2(65)	39 g	F2(68)	15 g
F2(71)	14 g	F2(72)	16 립	F2(78)	6 g	F2(79)	3 g
F2(81)	23 립	F2(82)	19 g	F2(86)	7 g	F2(88)	62 립
F2(89)	29 립	F2(90)	119 립	F2(94)	15 g	F2(95)	4 g
F2(96)	10 g	F2(97)	1 g	F2(99)	77 립	F2(100)	21 g
F2(104)	7 g	F2(105)	31 g	F2(106)	51 g	F2(110)	10 g
F2(112)	9 g	F2(113)	11 g	F2(116)	40 립	F2(117)	96 립

번호	중자량	번호	중자량	번호	중자량	번호	중자량
F2(118)	26 g	F2(120)	11 g	F2(121)	2 g	F2(122)	8 g
F2(123)	44 립	F2(124)	34 립	F2(125)	11 g	F2(126)	11 립
F2(127)	10 g	F2(128)	73 립	F2(129)	130 립	F2(131)	19 g
F2(132)	17 g	F2(133)	9 g	F2(134)	58 립	F2(135)	13 g
F2(137)	23 g	F2(138)	25 립	F2(139)	48 립	F2(140)	14 g
F2(141)	67 립	F2(144)	4 g	F2(145)	9 g	F2(146)	19 g
F2(147)	10 g	F2(148)	7 g	F2(151)	48 립	F2(152)	12 g
F2(153)	13 g	F2(154)	26 g	F2(155)	53 립	F2(156)	52 립
F2(157)	11 g	F2(158)	31 립	F2(161)	29 g	F2(163)	5 g
F2(165)	16 g	F2(166)	51 g	F2(167)	50 립	F2(168)	8 g
F2(169)	90 립	F2(170)	15 g	F2(171)	12 g	F2(173)	25 g
F2(174)	10 g	F2(176)	43 립	F2(177)	5 g	F2(178)	37 립
F2(180)	5 g	F2(181)	8 g	F2(182)	11 g	F2(183)	105 립
F2(185)	9 g	F2(186)	18 g	F2(187)	67 립	F2(188)	23 g
F2(190)	34 g	F2(191)	19 g	F2(193)	6 g	F2(194)	85 립
F2(195)	11 g	F2(199)	5 g	F2(200)	4 g	F2(202)	11 g
F2(203)	3 g	F2(204)	95 립	F2(206)	8 g	F2(209)	11 립
F2(211)	52 립	F2(212)	90 립	F2(213)	15 g	F2(216)	59 립
F2(217)	4 g	F2(218)	4 g	F2(221)	12 g	F2(222)	4 g
F2(223)	90 립	F2(224)	28 g	F2(225)	7 g	F2(227)	7 g
F2(229)	3 g	F2(230)	24 g	F2(231)	85 립	F2(232)	5 g
F2(233)	15 g	F2(235)	94 립	F2(236)	13 g	F2(238)	75 립
F2(239)	17 g	F2(240)	14 g	F2(242)	75 립	F2(243)	10 g
F2(244)	13 g	F2(245)	16 g	F2(247)	43 립	F2(248)	21 g
F2(249)	4 립	F2(250)	10 g	F2(252)	4 g	F2(253)	10 g
F2(254)	103 립	F2(256)	40 g	F2(257)	20 립	F2(258)	7 립
F2(259)	11 g	F2(260)	9 g	F2(266)	21 g	F2(267)	7 g
F2(270)	54 립	F2(271)	21 립	F2(272)	27 립	F2(274)	4 g
F2(276)	17 g	F2(277)	69 립	F2(278)	6 g	F2(280)	5 g
F2(283)	7 g	F2(284)	45 립	F2(286)	54 립	F2(288)	9 g
F2(289)	4 g	F2(290)	10 g	F2(291)	4 g	F2(294)	74 립
F2(295)	47 g	F2(296)	19 g	F2(299)	34 립		



그림 4-55. F2에서 수확된 종자(#1 ~ #33)



그림 4-56. F2에서 수확된 종자(#34 ~ #79)



그림 4-57. F2에서 수확된 종자(#81 ~ #122)



그림 4-58. F2에서 수확된 종자(#123 ~ #152)



그림 4-59. F2에서 수확된 종자(#153 ~ #183)



그림 4-60. F2에서 수확된 종자(#185 ~ #222)



그림 4-61. F2에서 수확된 종자(#223 ~ #253)



그림 4-62. F2에서 수확된 종자(#254 ~ #294)



그림 4-63. F2에서 수확된 종자(#295 ~ #299)

(3) TS와 PI254744에 대한 1차 F2전개 및 표현형조사

TS와 PI254744의 F2전개는 태국 여름작형2차에서 파종 : 2013. 3. 5, 정식 : 2013. 3. 16, 수확조사 : 2013. 5. 23 ~ 5. 30에 수행되었으며, 125개체가 전개되었다. PI254744는 *Citrullus lanatus* var. *citroides*로서 본 연구에서 수행하고 있는 흰가루병 저항성친으로 사용된 유망한 유전자원이다. PI254744는 이전의 여러 연구자들에게서 매우 유망한 만고병 저항성 재료로 확인되었고, 초형 및 과특성에서 PI189225와 같은 야생종보다 훨씬 더 재배종과 가까워 저항성 도입 등에서 빠른 성과를 보이는 것으로 판단된다. PI254744는 과중 4.8kg 내외의 크림슨과피 원형과를 보여주고 있고, 백육의 중간정도의 경도를 보여주며, 당함량은 약 6.2%이며, 흑립 중 대립종자를 생산하고 있다. 엽형태는 재배종과 거의 동일하다. F1에서는 과피는 크림슨을 보여주고 있고, 과형은 단타원형의 중간정도를, 과육색에서는 연한 황색을 보여주고 있다(표 4-8, 그림 4-64).

표 4-8. F2분리집단에 이용된 양친 특성

구분	과중(kg)	과형	과피	당도(%)	과육색	종자크기	종피색	엽특성
PI254744	4.8	원	크림슨	6.2	백색	BS	흑색	일반수박엽
TS	4.5	타원	호피	12.5	적색	TS	흑색	일반수박엽
PI254744 x TS	6.8	단타원형	크림슨	8.0	연황색	NS보다 약간 큼	흑색	일반수박엽



그림 4-64. PI254744, TS, F1의 과외관 및 과육사진

F2집단의 엽장, 엽폭, 엽형지수, 결각, 엽색 등은 표 4-9에 나타나있다. PI254744는 비록 야생 종이기는 하나 엽형 등이 일반 재배종과 큰 차이를 보이지 않기 때문에 엽특성에서 TS와 PI189225간의 집단에서 보였던 넓은 범위의 변이는 보이지 않고 있다. 엽크기는 엽장이 최소 11.5cm에서 최대 21.6cm의 범위에 있고, 엽색의 경우 거의 동일한 엽색을 보여주었다(그림 4-65~4-69).

표 4-9. TS와 PI254744간의 F2집단의 엽 특성

F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:십)	엽색(3:담,7:농)	엽특성
1	14.7	15.1	0.97	5	5	
2	16.0	15.3	1.05	5	5	
3	15.6	13.7	1.14	3	5	
4	17.2	17.4	0.99	3	5	
5	15.1	14.7	1.03	5	5	
6	14.7	12.9	1.14	5	5	
7	15.6	14.6	1.07	5	5	
8	18.1	17.0	1.06	5	5	
9	15.9	12.0	1.33	5	5	
10	14.4	14.4	1.00	5	5	
11	16.4	15.8	1.04	5	5	
12	14.9	13.7	1.09	3	5	
13	14.3	13.1	1.09	5	5	
14	16.4	12.2	1.34	5	5	
15	17.1	15.2	1.13	5	5	

F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:십)	엽색(3:담,7:농)	엽특성
16	21.6	20.3	1.06	5	5	
17	17.6	17.3	1.02	3	5	
18	14.2	13.5	1.05	3	5	
19	18.2	16.9	1.08	5	5	
20	15.3	12.8	1.20	3	5	
21	16.5	12.7	1.30	5	5	
22	18.7	14.7	1.27	5	5	
23	14.5	11.8	1.23	5	5	
24	18.8	14.1	1.33	7	5	결각심
25	20.4	18.8	1.09	5	5	
26	15.6	16.5	0.95	3	5	
27	활착불량, 바이러스감염 등으로 도태됨					
28	18.1	15.0	1.21	5	5	
29	18.0	16.2	1.11	5	5	
30	17.4	17.1	1.02	5	5	
31	14.8	14.3	1.03	3	5	
32	17.4	17.4	1.00	3	5	
33	19.3	16.0	1.21	5	5	
34	19.4	18.1	1.07	5	5	
35	17.4	15.1	1.15	5	5	
36	15.9	12.2	1.30	5	5	
37	20.0	16.8	1.19	5	5	
38	19.4	19.9	0.97	3	5	
39	13.8	13.8	1.00	3	5	
40	13.4	13.9	0.96	3	5	
41	14.7	15.3	0.96	5	5	
42	17.3	15.8	1.09	5	5	
43	15.4	14.6	1.05	5	5	
44	15.4	13.5	1.14	5	5	
45	17.0	16.3	1.04	3	5	
46	16.4	17.9	0.92	5	5	
47	19.6	15.4	1.27	5	5	
48	21.6	14.0	1.54	5	5	
49	20.6	14.4	1.43	5	5	
50	14.3	11.5	1.24	5	5	
51	20.3	17.5	1.16	5	5	
52	17.1	20.7	0.83	5	5	
53	21.4	17.9	1.20	5	5	
54	18.6	21.4	0.87	5	5	
55	21.6	21.9	0.99	5	5	
56	14.6	16.3	0.90	5	5	
57	15.1	15.1	1.00	3	5	
58	20.6	18.4	1.12	5	5	

F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:십)	엽색(3:담,7:농)	엽특성
59	16.4	14.3	1.15	5	5	
60	16.0	14.7	1.09	3	5	
61	15.1	16.2	0.93	3	5	
62	15.1	12.5	1.21	5	5	
63	14.1	14.5	0.97	5	5	
64	19.1	16.4	1.16	5	5	
65	16.4	14.1	1.16	5	5	
66	활착불량, 바이러스감염 등으로 도태됨					
67	17.1	15.6	1.10	5	5	
68	18.5	19.2	0.96	5	5	
69	15.8	15.8	1.00	5	5	
70	16.2	14.4	1.13	5	5	
71	17.1	15.3	1.12	3	5	
72	15.9	14.0	1.14	3	5	
73	20.0	15.3	1.31	5	5	
74	21.4	20.7	1.03	5	5	
75	18.3	18.5	0.99	5	5	
76	16.3	14.1	1.16	3	5	
77	17.9	14.4	1.24	5	5	
78	16.3	13.8	1.18	5	5	
79	16.4	14.8	1.11	5	5	
80	14.7	16.0	0.92	3	5	
81	13.1	11.7	1.12	3	5	
82	15.0	14.6	1.03	3	5	
83	14.0	14.9	0.94	3	5	
84	11.5	13.7	0.84	3	5	
85	17.3	14.9	1.16	5	5	
86	13.5	15.3	0.88	5	5	
87	14.5	10.8	1.34	7	5	
88	18.0	15.3	1.18	5	5	
89	17.4	16.0	1.09	5	5	
90	14.4	12.3	1.17	5	5	
91	15.6	14.4	1.08	3	5	
92	14.7	15.6	0.94	5	5	
93	17.6	16.9	1.04	5	5	
94	15.8	15.8	1.00	5	5	
95	14.6	12.8	1.14	5	5	
96	17.6	14.3	1.23	5	5	
97	18.1	19.9	0.91	5	5	
98	14.7	16.2	0.91	5	5	
99	17.5	14.6	1.20	5	5	
100	20.3	17.1	1.19	7	5	결각십
101	16.2	13.9	1.17	3	5	

F2개체번호	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽형지수(엽장/엽폭)	결각(1:천,9:십)	엽색(3:담,7:농)	엽특성
102	20.6	18.4	1.12	3	5	
103	15.3	13.9	1.10	5	5	
104	15.3	14.9	1.03	7	5	결각심
105	16.7	16.9	0.99	5	5	
106	18.7	16.0	1.17	3	5	
107	17.8	14.9	1.19	5	5	
108	16.3	14.6	1.12	5	5	
109	15.2	15.9	0.96	5	5	
110	15.4	17.6	0.88	5	5	
111	19.3	21.4	0.90	3	5	
112	18.0	20.0	0.90	5	5	
113	20.1	16.9	1.19	5	5	
114	20.4	19.4	1.05	3	5	
115	18.9	15.7	1.20	5	5	
116	17.5	16.0	1.09	5	5	
117	18.2	14.3	1.27	5	5	
118	16.2	15.1	1.07	3	5	
119	19.4	17.9	1.08	3	5	
120	18.2	13.7	1.33	5	5	
121	17.1	18.1	0.94	5	5	
122	17.7	13.5	1.31	5	5	
123	17.9	17.1	1.05	7	5	결각심
124	20.8	16.6	1.25	5	5	
125	14.4	12.0	1.20	5	5	

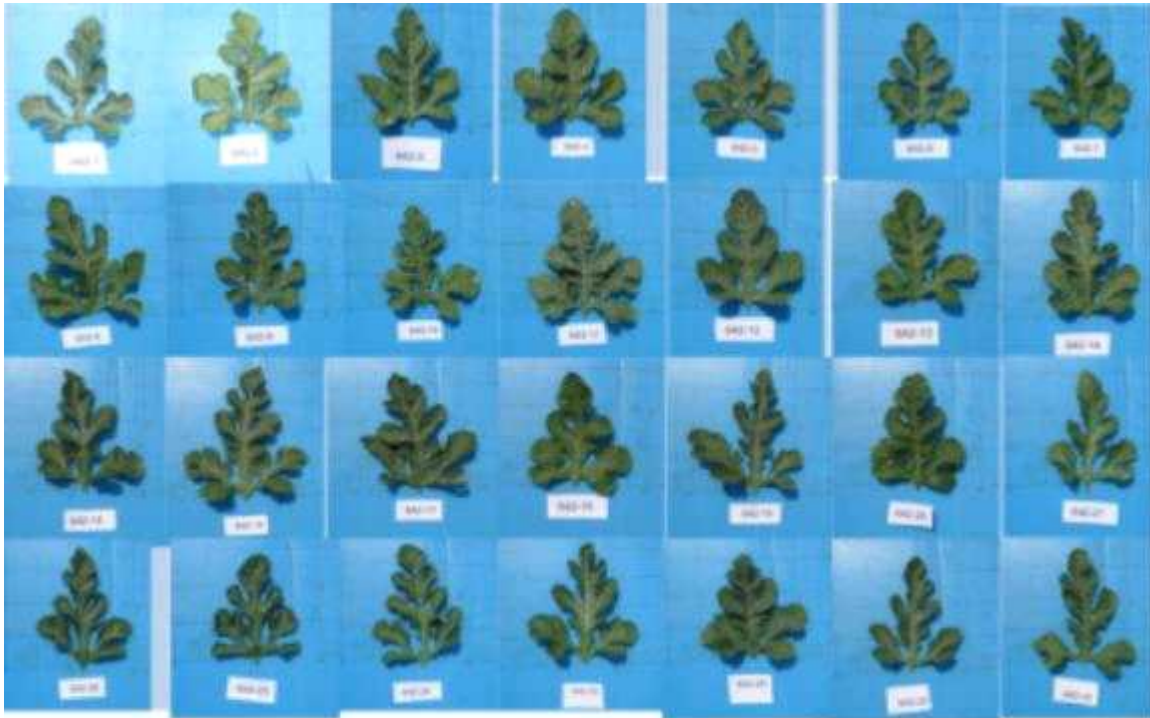


그림 4-65. F2 개체들의 엽형(1~29)



그림 4-66. F2 개체들의 엽형(30~57)



그림 4-67. F2 개체들의 엽형(58~86)

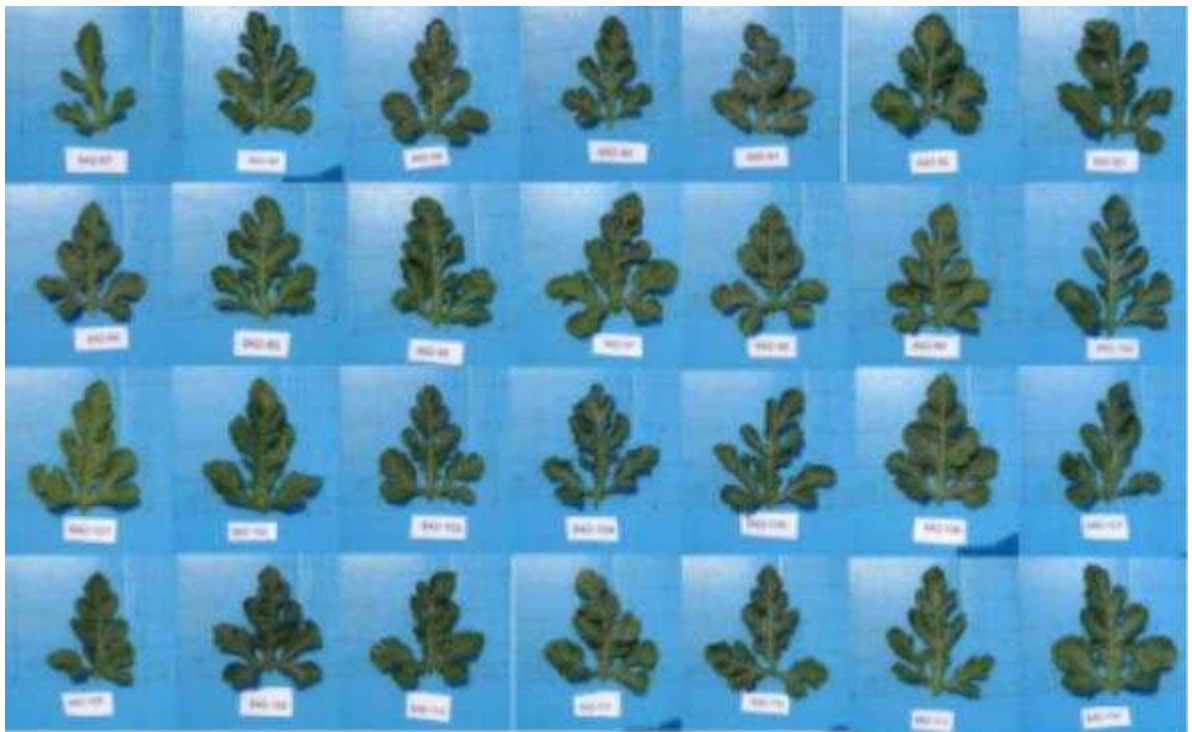


그림 4-68. F2 개체들의 엽형(87~114)



그림 4-69. F2 개체들의 엽형(115~125)

F2분리세대의 과육색, 과장, 과경, 과피 특성등을 수확시 조사하였다(표 4-10, 그림 4-70~4-73). 과피색을 보면 PI254744는 크림슨, TS는 호피, F1에서는 크림슨을 보여주어 크림슨이 호피에 우성으로 작용하는 것으로 보이지만, 이전의 육종 경험상으로 보면 크림슨과 호피는 다른 유전자좌에 존재하는 형질로써 각각 독립적으로 작용하는 것으로 판단된다. PI254744의 경우에는 크림슨 유전자와 호피 유전자를 모두 갖고 있고, TS의 경우에는 호피유전자만 갖고 있는 것으로 추정된다. F2에서는 크림슨과피를 갖고 있는 개체가 65개체중 53개체, 크림슨유전자가 없는 개체가 12개체가 나타났고, 호피의 경우 49개체, 호피유전자가 없는 개체가 16개체로 나타나 크림슨과피유전자와 호피유전자는 각각 독립적인 형질로 우성으로 작용하는 것으로 판단된다. 이 분리세대를 통해서 크림슨 및 호피유전자 관련 연관마커의 개발에도 유용하게 쓰일 것으로 생각된다. 과육색을 보면 PI254744는 백육이고, TS는 적육이고, F1에서는 연한 황육색을 보여주었다. F2분리세대에서는 백육 11개체, 황육 36개체, 적육 18개체로 Chi-square 검정을 해보면 1:2:1분리비에 적합한 것으로 확인되어 과육색의 경우 흰색과 적색의 과육색은 공우성의 관계에 있는 것으로 생각된다. 이 집단의 경우 과육색 관련 연관마커를 탐색하는 데도 매우 유용할 것으로 판단된다. 과형의 경우 PI254744는 원형, TS는 장타원형이고, F1에서는 단타원형으로 나타났는데, F2에서는 과형의 경우 원형에서 장타원형으로 연속적인 변이를 보여주어 과형에는 유전자 및 환경의 영향이 있다고 판단된다. 경험상 과형은 공우성이고, 1개의 유전자가 관여하는 것으로 추정된다. 과크기의 경우에 F2분리세대에서 최저 1.8kg에서 최고 8.6kg로 매우 폭넓은 범위의 연속적인 변이를 보여주고 있어 많은 수의 유전자와 환경의 영향이 있는 것으로 판단된다. 당도의 경우 최저 2.8%에서 최고 9.5%로 매우 넓은 범위의 연속변이를 보여주고 있어 양적인 형질로 판단되고, 본 과제에서 목표로 하고 있는 RIL집단이 완성되면, 과중 및 당도 등 육종상에서 매우 중요한 형질에 관여하는 QTL을 찾을 수 있을 것으로 판단된다. 수집된 잎 샘플 및 조사자료는 제 1세부과제에 제공하여 유전자 지도 작성에 활용되고 있다.

표 4-10. F2분리세대의 과 특성

F2개체번호	과형	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)
1	단타원	크림슨+호피	백육	3.1	6.1	17.1	21.0	1.23
2	고구	크림슨+호피	황육	2.9	6.4	16.3	18.5	1.13
3	단타원	크림슨	백육	4.3	6.8	18.7	22.8	1.22
4	단타원	크림슨	적육	3.5	6.8	17.6	21.5	1.22
5	원형	크림슨+호피	황육	6.0	7.4	22.0	23.4	1.06
6	단타원	크림슨+호피	적육	4.6	7.9	18.4	24.5	1.33
7	단타원	크림슨+호피	황육	2.7	7.0	15.4	21.7	1.41
8	단타원	크림슨	백육	3.0	6.6	16.5	22.2	1.35
10	단타원	크림슨	황육	2.6	6.0	14.3	19.2	1.34
12	단타원	크림슨+호피	백육	1.8	5.5	13.4	16.1	1.20
17	단타원	크림슨+호피	황육	6.2	6.6	20.4	25.5	1.25
23	고구	크림슨+호피	황육	3.2	5.8	21.4	25.0	1.17
25	고구	크림슨+호피	황육	5.0	9.2	20.1	23.2	1.15
28	고구	크림슨	적육	4.9	6.0	19.0	21.3	1.12
31	장타원	크림슨	황육	4.0	4.8	16.2	28.6	1.77
36	원형	크림슨+호피	황육	5.3	5.8	23.3	23.8	1.02
38	단타원	크림슨+호피	적육	3.6	6.0	16.8	22.4	1.33
39	원형	호피	황육	4.5	5.2	20.2	20.4	1.01
52	단타원	크림슨	적육	3.5	4.0	17.6	21.1	1.20
54	단타원	호피	황육	7.5	6.6	21.0	28.4	1.35
55	단타원	크림슨+호피	황육	4.6	7.2	18.1	26.0	1.44
56	단타원	크림슨	적육	4.0	6.2	17.4	23.3	1.34
58	원형	크림슨	적육	4.2	6.8	19.8	19.1	0.96
61	단타원	크림슨+호피	적육	6.2	7.2	20.6	30.0	1.46
62	단타원	크림슨	황육	4.8	7.8	17.8	25.8	1.45
64	단타원	크림슨	적육	6.0	7.0	20.6	25.0	1.21
65	고구	크림슨	황육	8.6	8.2	24.7	28.0	1.13
67	고구	크림슨+호피	백육	3.4	4.5	17.2	19.1	1.11
68	고구	호피	황육	7.0	5.6	22.4	26.2	1.17
70	단타원	크림슨	황육	4.2	7.2	17.9	24.9	1.39
71	단타원	크림슨+호피	황육	2.6	6.8	15.2	20.0	1.32
75	단타원	크림슨+호피	적육	3.1	7.0	16.0	22.4	1.40
76	고구	크림슨	백육	5.8	5.0	22.1	25.2	1.14
78	단타원	크림슨+호피	황육	4.2	6.8	17.8	21.6	1.21

F2개체번호	과형	줄무늬	육색	과중 (kg)	당도 (%)	과경 (cm)	과장 (cm)	과형지수 (과장/과경)
79	원형	크림슨+호피	황육	3.5	4.0	17.6	18.3	1.04
81	원형	크림슨	백육	2.8	7.0	17.5	18.6	1.06
82	장타원	호피	황육	2.3	5.8	12.8	22.8	1.78
83	단타원	호피	황육	2.7	7.2	16.2	23.6	1.46
84	단타원	크림슨+호피	적육	5.4	6.8	19.1	24.2	1.27
85	원형	호피	황육	4.5	6.8	20.6	20.2	0.98
86	단타원	크림슨+호피	적육	4.6	7.6	19.6	25.4	1.30
89	단타원	호피	백육	2.7	2.8	16.2	24.0	1.48
91	고구	크림슨+호피	황육	5.3	9.2	20.0	23.5	1.18
92	단타원	호피	황육	6.2	7.4	20.0	25.6	1.28
93	고구	크림슨+호피	백육	5.6	8.5	21.1	24.7	1.17
94	고구	크림슨+호피	황육	2.9	8.7	17.0	20.3	1.19
97	장타원	호피	황육	7.5	6.4	20.0	33.5	1.68
99	원형	크림슨	적육	5.8	7.0	22.5	24.4	1.08
100	고구	크림슨+호피	적육	3.4	6.8	18.6	21.5	1.16
104	단타원	크림슨+호피	황육	6.1	6.6	20.6	26.2	1.27
105	원형	크림슨+호피	황육	5.5	7.0	22.2	22.8	1.03
106	원형	크림슨+호피	황육	3.6	6.2	18.3	19.6	1.07
107	장타원	크림슨+호피	황육	3.5	6.0	15.9	25.3	1.59
109	단타원	크림슨+호피	백육	2.0	4.6	13.6	18.8	1.38
110	단타원	크림슨+호피	적육	4.5	6.4	18.0	26.0	1.44
111	고구	크림슨+호피	백육	5.2	7.5	19.7	23.5	1.19
112	원형	크림슨+호피	황육	3.6	6.2	19.2	20.4	1.06
113	단타원	호피	황육	5.0	6.3	20.3	26.0	1.28
115	단타원	크림슨+호피	황육	3.1	5.9	17.2	21.4	1.24
118	장타원	호피	황육	4.2	8.8	17.1	27.3	1.60
119	장타원	크림슨+호피	황육	2.8	8.0	15.7	24.3	1.55
121	단타원	크림슨+호피	적육	3.9	6.6	16.9	21.6	1.28
122	원형	크림슨+호피	황육	2.9	7.9	17.3	18.1	1.05
124	장타원	호피	적육	2.7	7.1	14.5	23.4	1.61
125	원형	크림슨+호피	적육	3.4	9.5	17.7	18.9	1.07



그림 4-70. F2개체들의 과외관 및 과육(1~54)



그림 4-71. F2개체들의 과외관 및 과육(55~85)



그림 4-72. F2개체들의 과외관 및 과육(86~118)



그림 4-73. F2개체들의 과외관 및 과육(119~125)

F2 전개 개체 125주 중에서 65 개체에서 착과가 되어 수확이 되었고, 수확된 종자는 표 4-11에 나타나 있다. 제1 세부과제와 협의결과, 전개된 125개체는 유전자지도와 RIL작성에 조금 부족하다는 판단, 태국 우기작형(파종 : 2013. 5. 12, 정식 : 2013. 5. 25, 교배 : 2013. 6. 22~7. 10, 수확 : 2013. 8. 5)에서 150개체가 추가 전개되었다. 확보된 65개체와 추가 전개되는 150개체에서 수확된 종자는 태국건기세대부터 F3전개 및 세대진전을 수행하였다.

표 11. F2분리세대의 수확종자량

번호	종자량	번호	종자량	번호	종자량	번호	종자량
F2(1)	14 g	F2(2)	28 g	F2(3)	43 g	F2(2)	161 립
F2(5)	41 g	F2(6)	19 g	F2(7)	4 g	F2(10)	10 g
F2(10)	21 g	F2(12)	5 g	F2(17)	9 g	F2(16)	14 g
F2(25)	24 g	F2(28)	23 g	F2(31)	6 g	F2(21)	13 g
F2(38)	10 g	F2(39)	30 g	F2(52)	41 g	F2(26)	34 립
F2(55)	7 g	F2(56)	10 g	F2(58)	38 g	F2(31)	18 g
F2(62)	8 g	F2(64)	25 g	F2(65)	31 g	F2(35)	17 g
F2(68)	33 g	F2(70)	6 g	F2(71)	4 g	F2(40)	10 g
F2(76)	40 g	F2(78)	85 립	F2(79)	16 g	F2(45)	5 g
F2(82)	3 g	F2(83)	4 g	F2(84)	15 g	F2(49)	18 g
F2(86)	13 g	F2(89)	21 g	F2(91)	13 g	F2(53)	6 g
F2(93)	48 g	F2(94)	10 g	F2(97)	30 g	F2(57)	28 g
F2(100)	5 g	F2(104)	35 g	F2(105)	12 g	F2(63)	12 g
F2(107)	8 g	F2(109)	3 g	F2(110)	34 립	F2(68)	53 g
F2(112)	14 g	F2(113)	33 g	F2(115)	15 g	F2(74)	6 g
F2(119)	82 립	F2(121)	6 g	F2(122)	7 g	F2(80)	10 g
F2(125)	21 g						

(4) TS와 PI254744에 대한 2차 F2전개 및 표현형조사

2차년도에 TS와 PI189225간의 F2 125개체를 전개하였으나, 야생종의 특성인 자화의 늦은 발생, 착과기의 고온 등으로 인하여 68개체의 F2에서 착과가 되어 F3 종자를 확보하였다.



그림 4-74. TS x PI254744의 F2 분리세대 엽형(#1~35)



그림 4-75. TS x PI254744의 F2 분리세대 엽형(#36~77)



그림 4-76. TS x PI254744 의 F2 분리세대 엽형(#73~117)



그림 4-77. TS x PI254744 의 F2 분리세대의 엽형(#118~150)

이는 유전자지도 작성 및 F3 전개를 통한 표현형분석 등에서 부족한 것으로 판단되어 추가로 150개체를 태국 우기시험에 전개(파종 : 2012. 5. 5, 정식 : 2012. 5. 20, 수확 : 2012. 7. 31 ~ 8. 3)하여 117개체의 F3 종자를 확보하였고, 과중, 과형, 엽장, 엽폭, 종자량 등에 대한 자료를 조사하였으며, 유전자지도 작성을 위하여 F2의 잎 시료와 수확이 완료된 F3 종자를 내병성 검정 등을 위하여 중앙대에 제공하였다(그림 4-74~4-77).

F2 분리세대의 과육색, 과장, 과경, 과피 특성 등을 수확 시 조사한 결과는 그림 4-79~4-82에 나타내었다.

과피색을 보면 PI254744는 크림슨이고, TS는 호피이고, F1에서는 크림슨을 보여주어 크림슨이 호피에 우성으로 작용하는 것으로 보이지만, 이전의 육종 경험상으로 보면 크림슨과 호피는 다른 유전자좌에 존재하는 형질로써 각각 독립적으로 작용하는 것으로 판단된다(표 4-12, 그림 4-78).

PI254744의 경우에는 크림슨 유전자와 호피 유전자를 모두 갖고 있고, TS의 경우에는 호피유전자만 갖고 있는 것으로 추정된다. F2에서는 크림슨 과피를 가지고 있는 개체가 91개체, 호피를 보이는 개체가 28개체로 언뜻 보면 크림슨이 호피보다 우성으로 작용하는 것 같아 보이지만, 크림슨과피 중에 강도가 진한 무늬를 보이는 것은 호피 유전자가 동시에 존재하는 것으로 생각되어 호피와 크림슨유전자는 독립적으로 작용하는 것으로 판단된다. 이 분리세대를 통해서

크림슨 및 호피유전자 관련 연관마커의 개발에도 유용하게 쓰일 것으로 생각된다. 과육색을 보면 PI254744는 백육이고, TS는 적육이고, F1에서는 연한 황육색을 보여주었다. F2분리세대에서는 백육 25개체, 황육 65개체, 적육 29개체로 Chi-square 검정을 해보면 1:2:1 분리비에 적합한 것으로 확인되어 과육색의 경우 흰색과 적색의 과육색은 공우성의 관계에 있는 것으로 생각된다.

표 4-12. 분리세대에 이용된 양친 및 F1 과특성

계통명	세대	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수 (과장/과경)
TS	고정계통	호피	적육	1.6	21.6	12.4	8.0	1.74
PI254744	고정계통	크림슨	백육	4.1	19.6	19.0	4.8	1.03
TSxPI254744	F1	크림슨	황육	3.1	22.0	16.8	3.4	1.31



그림 4-78. 분리세대에 이용된 양친 및 F1 과특성(#2549:TS, #2550:PI254744, #2551:F1)

이 집단의 경우 과육색 관련 연관마커를 탐색하는 데도 매우 유용할 것으로 판단된다. 과형의 경우 PI254744는 원형, TS는 장타원형이고, F1에서는 단타원형으로 나타났는데, F2에서는 과형의 경우 원형에서 장타원형으로 연속적인 변이를 보여주어(표 13) 과형에는 유전자 및 환경의 영향이 있다고 판단된다. 경험 상 과형은 공우성이고, 1개의 유전자가 관여하는 것으로 추정된다. 과 크기의 경우에 분리세대에서 최대 6.5kg에서 최소 0.6kg으로 폭넓은 범위의 변이를 보여주고 있다.

표 4-13. TS x PI254744 분리세대(2차)의 과특성

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
1	크림슨	황육	2.6	12.6	16.4	6.2	0.77
2	크림슨	적육	3.4	21.8	18.2	7.4	1.20
4	크림슨	황육	2.3	19.0	15.4	5.2	1.23
5	크림슨	황육	4.0	24.4	18.6	-	1.31
7	호피	적육	3.4	21.6	17.2	7.0	1.26
8	크림슨	황육	2.4	19.2	16.8	5.8	1.14
9	크림슨	적육	4.6	24.2	18.3	8.2	1.32
10	크림슨	황육	3.2	25.6	14.8	6.2	1.73
12	크림슨	황육	5.0	23.0	19.2	5.0	1.20
13	호피	황육	3.5	24.7	16.8	5.8	1.47
14	크림슨	황육	1.5	20.6	13.2	4.0	1.56
16	호피	백육	5.4	24.2	21.2	6.4	1.14
17	크림슨	적육	2.8	20.2	16.6	4.8	1.22
18	크림슨	황육	4.1	23.1	18.5	8.8	1.25
19	호피	적육	6.5	24.8	23.2	6.8	1.07
20	크림슨	백육	3.6	20.2	18.5	4.8	1.09
21	크림슨	황육	4.7	22.6	20.3	7.8	1.11
23	크림슨	백육	4.5	21.6	19.4	8.0	1.11
24	크림슨	황육	4.0	20.2	19.6	8.0	1.03
27	크림슨	백육	4.2	23.2	18.4	4.8	1.26
31	호피	백육	4.4	28.6	17.7	8.2	1.62
32	크림슨	황육	5.8	22.4	22.8	7.4	0.98
33	크림슨	황육	3.8	26.7	17.5	7.2	1.53
36	호피	황육	4.6	23.8	19.2	6.2	1.24
37	크림슨	적육	2.7	17.5	16.6	4.2	1.05
38	크림슨	백육	2.9	22.1	16.2	6.4	1.36
40	호피	적육	3.1	20.2	16.4	7.2	1.23
41	크림슨	백육	1.8	19.6	14.5	6.8	1.35
42	호피	황육	4.5	24.6	19.1	7.2	1.29
43	크림슨	적육	4.4	24.2	18.1	10.6	1.34
44	크림슨	황육	4.7	20.2	18.6	6.4	1.09
45	크림슨	황육	5.4	23.2	21.1	7.6	1.10
46	호피	황육	5.8	24.6	21.0	8.4	1.17
47	크림슨	적육	4.4	23.8	19.6	8.2	1.21
48	크림슨	황육	2.4	19.2	15.8	3.2	1.22
49	크림슨	백육	4.3	23.1	18.7	5.0	1.24
50	크림슨	백육	4.6	26.4	18.6	8.8	1.42
51	크림슨	황육	4.3	23.2	18.8	4.8	1.23
53	크림슨	백육	3.5	23.2	15.8	8.2	1.47
54	호피	황육	4.8	20.6	19.2	5.4	1.07
56	크림슨	적육	5.3	21.6	21.5	7.8	1.00
57	크림슨	백육	3.3	21.2	17.1	8.2	1.24

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
58	크림슨	황육	5.0	28.4	18.4	7.4	1.54
59	크림슨	황육	3.4	25.6	16.0	8.4	1.60
60	호피	적육	3.6	20.2	17.8	4.6	1.13
61	호피	적육	3.2	19.1	16.0	2.8	1.19
62	호피	황육	4.8	24.6	19.2	6.8	1.28
63	크림슨	황육	2.8	25.1	14.4	6.2	1.74
66	호피	황육	3.7	24.6	16.8	8.0	1.46
69	크림슨	백육	4.3	21.6	19.3	6.2	1.12
70	크림슨	황육	5.0	21.6	20.2	5.4	1.07
72	크림슨	적육	1.1	15.4	13.0	8.2	1.18
74	크림슨	황육	4.4	21.3	19.6	7.2	1.09
76	크림슨	백육	4.0	20.3	16.2	4.4	1.25
77	호피	백육	4.1	25.2	16.8	7.8	1.50
78	크림슨	황육	3.6	21.3	17.2	6.6	1.24
79	호피	적육	0.6	13.7	8.6	6.8	1.59
80	호피	황육	2.0	19.2	13.1	6.6	1.47
81	크림슨	황육	1.9	21.4	13.1	4.2	1.63
82	크림슨	적육	3.8	22.3	18.0	4.8	1.24
83	호피	황육	4.3	23.2	19.6	4.2	1.18
84	크림슨	적육	2.1	16.6	14.5	5.6	1.14
85	크림슨	백육	2.7	20.2	16.4	6.8	1.23
88	크림슨	황육	2.6	21.6	16.4	8.0	1.32
90	크림슨	적육	3.0	21.1	17.2	6.2	1.23
91	크림슨	황육	2.4	19.7	15.4	5.2	1.28
92	크림슨	적육	2.8	22.3	15.4	8.4	1.45
93	크림슨	백육	4.0	22.1	19.1	5.8	1.16
94	크림슨	황육	3.6	20.2	20.0	5.0	1.01
95	크림슨	황육	3.4	20.6	19.4	4.8	1.06
96	호피	황육	3.8	19.8	18.2	6.4	1.09
97	크림슨	황육	0.7	9.8	10.0	3.8	0.98
99	크림슨	적육	1.3	15.7	13.4	4.0	1.17
100	호피	백육	2.8	18.7	17.6	4.2	1.06
101	호피	백육	2.0	18.8	15.4	4.8	1.22
102	크림슨	적육	2.6	19.7	14.6	2.2	1.35
103	크림슨	황육	1.2	17.6	11.3	6.2	1.56
104	크림슨	백육	4.0	20.6	20.2	4.2	1.02
105	크림슨	백육	1.8	15.4	15.0	4.6	1.03
106	크림슨	적육	1.6	17.2	12.1	8.8	1.42
107	크림슨	황육	2.8	18.2	18.0	2.0	1.01
108	호피	황육	4.6	23.2	21.1	4.2	1.10
109	크림슨	황육	2.8	20.2	16.8	4.6	1.20
110	크림슨	황육	1.3	16.8	12.6	3.6	1.33
111	호피	황육	2.7	19.6	16.2	3.4	1.21

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
112	크림슨	황육	2.2	26.5	22.3	6.8	1.19
113	호피	적육	2.4	17.6	16.2	3.2	1.09
114	크림슨	황육	1.3	13.8	13.2	3.0	1.05
116	호피	황육	0.8	12.5	19.1	6.0	0.65
117	크림슨	적육	2.8	19.1	15.4	5.2	1.24
118	크림슨	백육	0.8	13.6	12.5	2.6	1.09
119	크림슨	황육	0.8	13.8	11.2	5.8	1.23
121	크림슨	황육	1.8	19.2	13.1	5.8	1.47
122	호피	황육	1.6	16.5	12.4	5.0	1.33
124	크림슨	황육	1.7	15.8	13.6	5.6	1.16
125	크림슨	백육	2.4	25.3	13.0	4.8	1.95
126	크림슨	황육	2.3	19.1	15.8	4.0	1.21
127	크림슨	황육	2.8	28.2	13.1	5.6	2.15
128	크림슨	황육	3.4	20.8	16.6	5.0	1.25
130	호피	적육	2.3	21.6	14.8	5.4	1.46
131	크림슨	황육	2.0	18.6	15.2	5.0	1.22
132	크림슨	황육	2.6	18.8	15.8	-	1.19
133	크림슨	황육	2.8	19.8	16.7	3.0	1.19
134	크림슨	적육	2.3	18.2	17.8	3.0	1.02
135	호피	황육	1.8	17.6	15.4	3.6	1.14
137	크림슨	황육	1.7	19.2	14.1	4.8	1.36
138	크림슨	황육	1.3	15.2	12.1	3.6	1.26
139	크림슨	황육	2.3	16.5	15.2	6.8	1.09
140	크림슨	황육	1.5	15.6	13.2	5.8	1.18
141	크림슨	적육	3.0	24.1	16.8	5.8	1.43
142	크림슨	백육	1.6	14.6	13.1	6.4	1.11
143	크림슨	황육	1.0	16.4	10.3	5.8	1.59
144	크림슨	백육	1.2	13.6	13.5	5.0	1.01
145	크림슨	황육	2.3	22.6	14.8	3.8	1.53
146	크림슨	적육	3.4	20.3	18.6	4.6	1.09
147	크림슨	적육	2.0	18.6	15.2	3.4	1.22
148	크림슨	황육	1.6	20.3	13.0	5.6	1.56
149	크림슨	황육	2.3	16.8	15.8	6.4	1.06
150	크림슨	백육	4.0	20.8	18.4	6.6	1.13



그림 4-79. TS x PI254744의 F2 분리세대의 과형,과피색, 과육색(#1~48)



그림 4-80. TS x PI254744의 F2 분리세대의 과형,과피색, 과육색(#49~101)



그림 4-81. TS x PI254744의 F2 분리세대의 과형, 과피색, 과육색(#102~130)

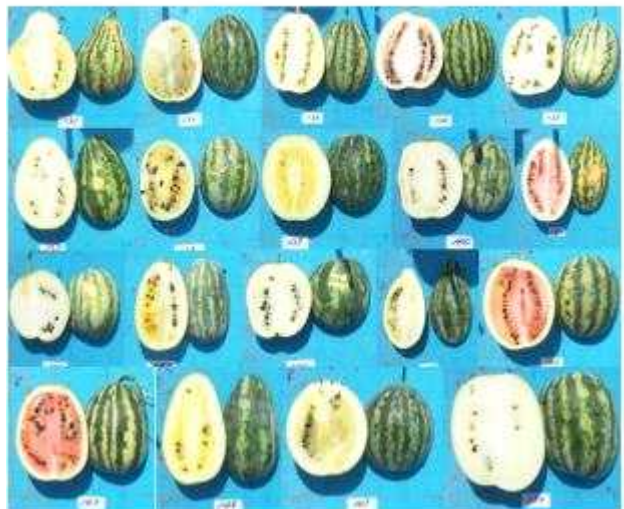


그림 4-82. TS x PI254744의 F2 분리세대의 과형, 과피색, 과육색(#131~150)

(5) SBA와 DRD에 대한 F2전개

유전자지도 작성을 위해 기존에 TS와 교배하여 F2전개에 이용된 PI189225와 PI254744의 경우에 다형성이 부족하고, 지금 주로 사용하는 계통들과는 유전적인 거리가 먼 계통들이므로 유전자지도작성을 하여도 효용성이 조금 떨어질 우려가 있을 수 있다는 내부검토에 의해서 현재 한국형 품종개발에 많이 사용되고, 또 재조합의 한쪽 친으로 사용된 SBA와의 새로운 F2 집단 전개, 그리고 RIL 집단을 양성하기로 주관기관과 협의되어 당해년도에 새로이 F2 집단을 전개하였다. SBA와 DRD의 특성은 표 4-14, 그림 4-83과 같다. 그리고 RIL 집단을 양성하기로 한 F2 분리세대의 과육색, 과장, 과경, 과피 특성 등을 수확 시 조사하였다(그림 4-84~4-91). 과피색을 보면 SBA는 호피이며, DRD는 크림슨이고, F1에서는 크림슨을 보여준다. F2에서는 호피 과피를 가지고 있는 개체가 93개체, 크림슨 과피를 보이는 개체가 161개체로 이 분리세대 또한 크림슨 및 호피유전자 관련 연관마커의 개발에도 유용하게 쓰일 것으로 생각된다.

과육색을 보면 SBA는 도홍색이고, DRD는 극적육으로 F1에서는 보통의 적색을 보여주었다. F2분리세대에서는 도홍 45개체, 적육 142개체, 극적육 65개체로 Chi-square 검정(0.027)을 해보면 1:2:1 분리비에 적합한 것으로 확인된다.

과형의 경우 SBA는 원형, DRD는 장타원형이고, F1에서는 단타원형으로 나타났는데(표. 4-14), F2에서는 과형의 경우 원형에서 장타원형으로 연속적인 변이를 보여주어 과형에는 유전자 및 환경의 영향이 있다고 판단된다. 경험 상 과형은 공우성이고, 1개의 유전자가 관여하는 것으로 추정된다. 과 크기의 경우에 분리세대에서 최대 10.9kg에서 최소 2.3kg으로 폭넓은 범위의 변이를 보여주고 있다(표 4-15).

표 4-14. SBA와 DRD의 특성

계통명	세대	바탕색	육색	과형	종자크기
SBA	고정계통	호피	도홍	원형	NS
DRD	고정계통	크림슨	극적육	장타원형	TS
SBA x DRD	F1	크림슨	적육	단타원형	-



그림 4-83. SBA(좌), DRD(우)의 과특성

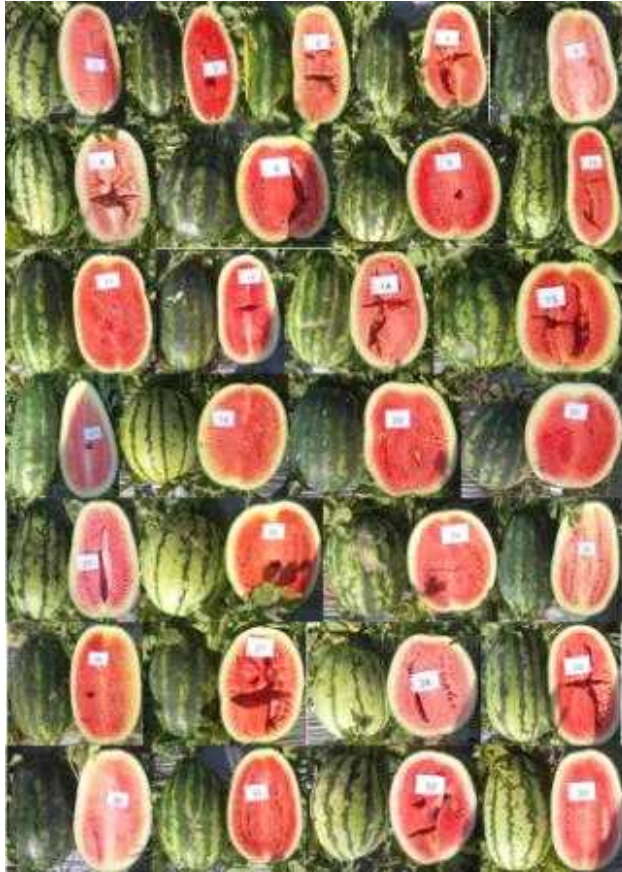


그림 4-84. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#1~#33)



그림 4-85. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#34~#74)



그림 4-86. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#75~#108)



그림 4-87. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#109~#147)



그림 4-88. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#148~#182)

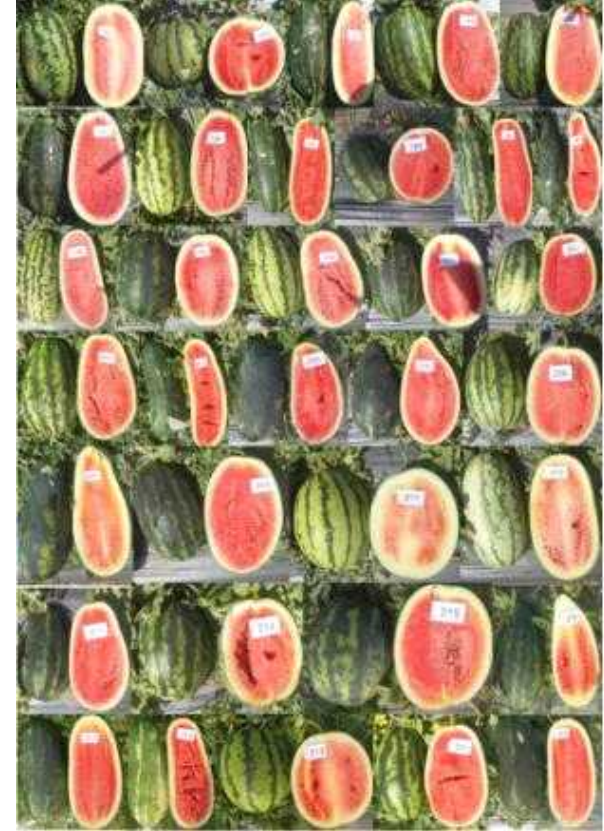


그림 4-89. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#183~#222)



그림 4-90. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#223~#266)

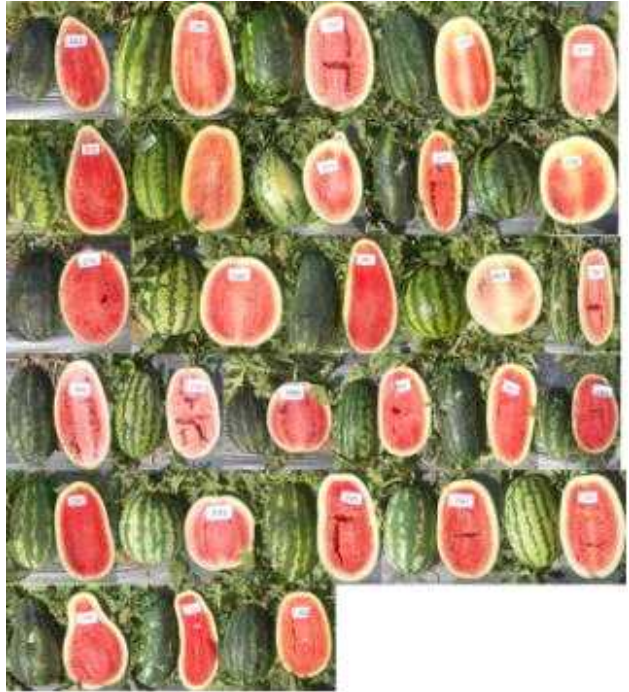


그림 4-91. SBA x DRD의 F2개체 과특성 (#267~#302)

표 4-15. SBA x DRD의 F2개체 과특성

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
1	호피	도홍	7.6	34	20.5	11	1.7
2	크림슨	극적육	4.4	34.5	12.2	12.8	2.8
3	크림슨	도홍	3.4	29.8	14.2	12.2	2.1
4	크림슨	적육	3.5	27.8	17	8	1.6
5	크림슨	도홍	9	35.4	20.8	10.8	1.7
6	호피	적육	3.7	28	14.2	9.6	2.0
8	크림슨	극적육	4.2	22.2	20.8	10.8	1.1
9	크림슨	적육	7.2	25.6	23	9.2	1.1
10	호피	적육	5.2	36.5	15.8	12.2	2.3
11	크림슨	극적육	7.6	32.4	20.5	10.8	1.6
12	크림슨	극적육	4.8	30	16.8	11.8	1.8
14	호피	도홍	3.7	26.5	18.2	13.2	1.5
15	크림슨	극적육	4.5	22	21.8	12.8	1.0

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
17	크림슨		4.7	39.7	18.2		2.2
19	호피	적육	8	27.4	23.3	12.2	1.2
20	크림슨	적육	6.9	25.8	21.6	10.2	1.2
21	크림슨	적육	8.8	27.2	25	11.2	1.1
22	호피	도홍	4.8	31.2	18.5	11.8	1.7
23	호피	적육	10.9	29	26.7	8.6	1.1
24	크림슨	적육	4.8	23.8	21.6	9.6	1.1
25	크림슨		9.5	37.2	22.4	10	1.7
26	크림슨	적육	9.6	36.5	21.8	12.2	1.7
27	크림슨	극적육	4	26.5	19.8	12	1.3
28	호피	도홍	4.1	22.2	19.8	10.8	1.1
29	호피	극적육	3.9	27.8	17	12.6	1.6
30	크림슨	도홍	8.5	34.2	22	10.4	1.6
31	크림슨	극적육	5.7	29.6	20.2	10.8	1.5
32	호피	적육	3.9	24.2	18.4	10.8	1.3
33	호피	적육	4.2	27.6	14.8	14	1.9
36	호피	극적육	3.6	20.2	17	12.2	1.2
38	크림슨	적육	6.1	22.2	25.1	11.8	0.9
39	크림슨	적육	5.4	35.2	19.8	10.8	1.8
41	크림슨	적육	7.1	36.2	19	9.8	1.9
42	크림슨	적육	6.1	30.4	20.2	9.6	1.5
43	호피	적육	6.5	24.6	23	10	1.1
44	호피	적육	5	36.5	17	12	2.1
45	크림슨	적육	8.4	26.8	24.2	10	1.1
46	크림슨	극적육	5.1	31.2	17.4	11.8	1.8
47	크림슨	적육	4.4	33.5	16.2	12.8	2.1
48	호피	극적육	6	23.8	22.6	11	1.1
49	크림슨	적육	8.4	27.6	23.8	11	1.2
50	크림슨	적육	7.4	35.2	17.4	12.2	2.0
51	크림슨	적육	7.6	34.2	20.2	12.2	1.7
52	호피	도홍	7.1	25.4	23.2	10.6	1.1
53	호피	적육	10.5	38.6	23.6	10.6	1.6
54	크림슨	적육	4	21.8	20.3	12	1.1
55	호피	적육	5.1	31.2	19.4	12	1.6
56	호피	도홍	4	28.5	18.1	11.8	1.6
57	크림슨	적육	6.6	30	20.2	9.6	1.5

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
58	크림슨	적육	7.2	32.2	17.2	11	1.9
59	크림슨	적육	6.5	37.5	15	11.8	2.5
60	호피	적육	5.9	23.8	22.4	11.2	1.1
62	호피	도홍	9.4	27.2	25.6	11.6	1.1
63	호피	적육	6.6	35.4	19.6	12	1.8
64	호피	적육	5.2	30.5	18.4	11.4	1.7
65	크림슨	적육	5.5	30	22.2	13	1.4
66	크림슨	적육	7	25.2	21.6	12	1.2
67	호피	적육	7.2	26	23.4	12.2	1.1
68		도홍	3.5	32.4	13.6	12	2.4
70		적육	3.7	30	16.2	12.8	1.9
71	호피	적육	6.1	45	16.6	13.2	2.7
73	호피	도홍	5.3	24.2	20.1	12.2	1.2
74	크림슨	극적육	5.2	29.6	17.4	11.4	1.7
75	크림슨	도홍	4.7	31.4	17.8	10.4	1.8
76	호피	도홍	9.1	34.5	22.4	11	1.5
77	크림슨	적육	7.5	25.4	23.8	12	1.1
78	호피	적육	5.1	27.2	19	12.2	1.4
79	호피	도홍	7.5	34.4	20.3	11.8	1.7
80	크림슨	극적육	5.5	37	15.8	12	2.3
81	호피	극적육	4.4	30.2	20.8	14.2	1.5
82	호피	적육	7.1	26.2	23.8	11.8	1.1
83	크림슨	도홍	9.5	34.6	23	10	1.5
84	호피	극적육	3.4	25.2	16.4	12.4	1.5
85	크림슨	적육	8.2	26.8	24	10.2	1.1
86	호피	적육	8.6	37.6	21.2	9.8	1.8
87	크림슨	극적육	6.5	30.2	20.1	12.8	1.5
88	호피	도홍	3.1	26.8	17.2	12	1.6
89	크림슨	극적육	7	33.4	20.2	10.2	1.7
90	크림슨	적육	4.2	41.2	14.1	9.8	2.9
91	호피	적육	3.9	29.1	17.2	12.8	1.7
92	호피	적육	4.2	23.2	20.6	12	1.1
93	크림슨	적육	7	25.2	22.8	11	1.1
94	호피	극적육	2.6	27.8	13.4	12.6	2.1
95	크림슨	도홍	5.9	29.6	21	12	1.4
96	크림슨	극적육	8	27	24.6	11.2	1.1

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
97	호피	극적육	5.4	2.6	18	12	0.1
99	크림슨	도홍	6.6	24.7	22		1.1
100	크림슨	극적육	5.8	29.5	19	11.2	1.6
101	크림슨	극적육	4.7	32.4	17.6	10.8	1.8
104	크림슨	적육	8.9	26.6	25.4	10.8	1.0
105	크림슨	극적육	6.4	42.4	15.6	11	2.7
107	호피	적육	6.9	32.6	20.4	11.8	1.6
108	크림슨	적육	10	40.2	17.8	9.2	2.3
109	호피	도홍	8.6	34.6	20.8	10.4	1.7
110	크림슨	적육	6.5	33.4	18.2	10.6	1.8
111	호피	적육	7.3	29.5	21.4	9.6	1.4
112	크림슨	도홍	5.5	33.2	20.2	10.4	1.6
113	크림슨	적육	5.8	32.6	18.6	10.6	1.8
115	크림슨	적육	6.8	33.6	19.2	10	1.8
116	크림슨	도홍	8.3	36	20.8	10.6	1.7
117	크림슨	적육	6	30	18.6	11.2	1.6
118	크림슨	극적육	6.5	31.2	19	8.8	1.6
119	크림슨	극적육	5.8	43.2	14.4	12.2	3.0
120	크림슨	적육	4.6	29.8	17.5	11	1.7
121	호피	적육	6.2	29	20.2	11.8	1.4
122	크림슨	적육	6.2	23.4	22.3	11.8	1.0
123	크림슨	극적육	7.5	40.2	18.4	10	2.2
124	호피	적육	8	36.2	20.5	10.8	1.8
125	크림슨	도홍	5	31.6	16.4	12.2	1.9
126	크림슨	적육	5.9	31.4	19.2	12.2	1.6
127	크림슨	적육	6.2	28.2	20	11	1.4
128	호피	적육	9.3	36.5	22	10.6	1.7
130	호피	극적육	3.6	22.5	17.8	12.6	1.3
131	크림슨	극적육	4.6	35.4	14.7	12.6	2.4
132	크림슨		7.8	33.2	21.6		1.5
133	크림슨	극적육	3	25.8	15.2	12.6	1.7
134	크림슨	극적육	4.4	27.2	18.4	9.6	1.5
135	크림슨	적육	6	23.2	22.4	8.8	1.0
136	크림슨	극적육	6.1	36.4	17	12	2.1
137	크림슨	적육	4.8	22.2	20.1	11.2	1.1
138	크림슨	도홍	3.4	28.2	15.1	12	1.9

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
139	크림슨	적육	7.1	29.5	21.2	10	1.4
140	크림슨	적육	4	27.8	16.5	14	1.7
142	크림슨	적육	6.5	25.4	22		1.2
143	호피	적육	9.1	31.2	24.1	10.2	1.3
144	호피	적육	4.6	27	17.6	11.2	1.5
146	크림슨	극적육	6	35.2	18	10.2	2.0
147	크림슨	적육	9.8	35.2	23.8	11.2	1.5
148	크림슨	도홍	5.7	26.2	20.6	11	1.3
150	크림슨	적육	6.7	25.4	23	10	1.1
151	크림슨	적육	5.2	29.6	18.2	10.2	1.6
152	크림슨	적육	4.1	21.2	18.6	10.6	1.1
153	크림슨	극적육	3.7	28.2	16.8	11.4	1.7
154	호피	도홍	5.9	24.2	22	10.2	1.1
155	호피	적육	5.5	29	18.6	11	1.6
156	크림슨	적육	7	25.8	23.2	11	1.1
157	호피	도홍	4.2	24.8	18	12	1.4
158	크림슨	극적육	5.4	36.2	16	11	2.3
159	호피	도홍	6.5	23.4	23	10.2	1.0
160	크림슨	적육	6.5	37.2	18	8.4	2.1
161	크림슨	극적육	2.9	24	15.6	10.8	1.5
162	크림슨	극적육	3	26	15.7	11.2	1.7
163	호피	도홍	8.1	32.4	21.6	9	1.5
164	크림슨	극적육	5	33.6	15.2	10	2.2
165	호피	적육	3.6	20.6	19.6	12.2	1.1
169	크림슨	적육	4	27.6	16.4	10.6	1.7
170	크림슨	극적육	10.3	36.2	23.4	9.4	1.5
171	호피	극적육	6.9	29.8	20.6	11	1.4
172	호피	적육	3.9	20.2	20	10.8	1.0
173	호피	적육	10.3	27.2	27	9.2	1.0
174	크림슨	적육	5	27.6	18.5	11.8	1.5
175	호피	적육	3.8	27.2	16.6	10	1.6
176	호피	적육	6.9	32.6	19.2	10.8	1.7
177	크림슨	적육	8.5	30.4	22.8	12.2	1.3
178	호피	도홍	6.5	32.2	19.8	11	1.6
179	크림슨	적육	5.4	29.2	18.6	9	1.6
180	호피	적육	4	22.2	20.1	9.2	1.1

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
181	크림슨	적육	5	29	18.2	10.4	1.6
182	호피	적육	5.9	39.2	16.8	12	2.3
183	호피	적육	10	36.4	22.8	11	1.6
184	호피	극적육	5	21.6	21.2	10	1.0
185	크림슨	적육	5.5	39.2	16.1	10.8	2.4
186	크림슨	극적육	6	33.2	18.6	12.2	1.8
190	호피	적육	5	31.2	18.6	12.2	1.7
191	크림슨	극적육	6.4	33.2	19	11.6	1.7
192	호피	적육	5.1	29.5	18	12.2	1.6
193	크림슨	극적육	6.4	41.4	17	13.4	2.4
194	크림슨	적육	3.5	19.5	18.2	9.4	1.1
195	호피	적육	6.5	41.6	16	10.2	2.6
197	크림슨	적육	5.5	39	17.2	12.2	2.3
198	호피	도홍	3.6	35.2	14.4	12.6	2.4
199	크림슨	적육	7.5	31.2	21.1	10.2	1.5
200	호피	적육	6	34.2	19.8	12.2	1.7
201	크림슨	극적육	6	29.6	19.2	10.2	1.5
202	크림슨	극적육	2.7	23.2	16	12	1.5
203	크림슨	도홍	6.6	33.6	20	12.2	1.7
204	크림슨	극적육	4.9	42.2	14.6	11.2	2.9
205	크림슨	적육	2.8	27.5	14.3	11.6	1.9
206	크림슨	적육	5	33.6	18	10	1.9
207			9.5	26.6	26		1.0
208	호피	적육	4.4	21.8	20.2	10.4	1.1
209	크림슨	적육	8.4	43.6	19.4	10.2	2.2
210	크림슨	적육	5.8	28.4	20.2	11	1.4
211	호피		6	25.2	22.1	11	1.1
212	호피	도홍	6.7	34.5	18.7	10.8	1.8
213	크림슨	극적육	3.8	26.8	16.4	10.8	1.6
214	크림슨	적육	2.9	18.2	17.1	10.2	1.1
215	크림슨	적육	4.5	20	19.4	12.8	1.0
216	크림슨	적육	4	30.4	16.2		1.9
217	크림슨	적육	7.3	38.2	18.6	10.2	2.1
218	크림슨	극적육	3.7	35.6	14.4	13.8	2.5
219	호피	적육	6	23.8	21.6	10	1.1
221	크림슨	적육	2.8	23.4	15.3	10.4	1.5

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
222	크림슨	극적육	6.1	38.6	17	11.2	2.3
223	크림슨	적육	5.5	28.6	19.1	11.2	1.5
224	크림슨	극적육	3.1	23.6	16	10.4	1.5
225	크림슨	적육	4.5	26.8	19	11	1.4
226	호피	적육	7.5	33.6	20.2	9.4	1.7
227	호피	극적육	4.3	30.5	16.2	10.4	1.9
230	호피	도홍	3.5	22.4	20.6	9.8	1.1
231	크림슨	도홍	5.5	29.8	18.2	10.4	1.6
232	호피	극적육	5.5	35.2	16.1	11.4	2.2
233	크림슨	극적육	10.1	29.2	25.4	11.4	1.1
234	크림슨	적육	5.5	28.8	8.2	11.6	3.5
235	크림슨	도홍	6	25.2	23.2	10.6	1.1
236	크림슨	적육	4.1	28.6	17.2	13.2	1.7
239	크림슨	적육	5.8	31.2	18.2	10.2	1.7
240	호피	도홍	6.7	41.3	16.8	11	2.5
241	크림슨	적육	9.9	27.2	26.5	11	1.0
242	호피	적육	6.5	24.8	21.6	10	1.1
243	크림슨	적육	3.5	27.6	16.2	12.4	1.7
244	크림슨	극적육	4.2	33.6	15	11.2	2.2
245	크림슨	도홍	3.9	25	17.2	12	1.5
246	크림슨	적육	8	26.8	23.4	10.6	1.1
247		적육	6.2	32.4	18.2	10.8	1.8
249	크림슨	도홍	5	22.8	20.2	10.6	1.1
251	크림슨	적육	5.6	23.2	20.1	10.8	1.2
252	호피	적육	7	38.6	18.7	9	2.1
254	크림슨	적육	3.3	20.2	19.1	13.6	1.1
255	크림슨	극적육	4.9	21.8	21.3	11.2	1.0
256	호피	극적육	7	40.6	17.8	11.8	2.3
257	호피	극적육	4	25.6	17.3	10	1.5
258	호피	극적육	5.2	23	20.8	10.2	1.1
260	크림슨	극적육	5.9	35.4	17.2	10.4	2.1
261	호피	적육				12.4	
262	호피	극적육	7.4	30	22.4	12.4	1.3
264	크림슨	적육		31.5	12.4	10.6	2.5
265	크림슨	적육	6.6	30.2	20	10	1.5
266	호피	적육	4.5	22.1	20	10.4	1.1

F2번호	바탕색	육색	과중(kg)	과장(cm)	과경(cm)	당도(%)	과형지수
267	크림슨	적육	2.7	27.4	14.6	10.8	1.9
268	크림슨	적육	7.9	35.2	19.2	12.6	1.8
269	크림슨	적육	3.6	27.2	17.2	11	1.6
270	크림슨	적육	6.1	30.4	18.2	9.8	1.7
271	호피	도홍	4	27.6	16.5	13	1.7
273	호피	극적육	6.5	35.2	18.1	10.8	1.9
274	호피	도홍	5.5	31.4	17.5	11.2	1.8
275	호피	도홍	3.5	26.8	16.6	10.8	1.6
277	크림슨	적육	2.6	31.3	13.4	12	2.3
278	크림슨	적육	8	27	24.2	10.6	1.1
279	크림슨	적육	4.8	26.5	18.4	10.6	1.4
280	호피	도홍	5.9	24.2	22.2	8.8	1.1
281	크림슨	적육	6.5	38.6	17.2	10.2	2.2
283	크림슨		4.4	22.6	24.2	8.8	0.9
284	크림슨	도홍	2.3	24.2	13.8	11.4	1.8
285		적육	3	184	17.2	8.6	10.7
286	크림슨		3.6	29.4	16		1.8
288	호피	도홍	2.6	25.6	15.8	10.6	1.6
289	크림슨	적육		17.8	16.6	9.8	1.1
290	크림슨	적육	3.5	25.6	16.3	12.2	1.6
292	크림슨	적육	4.9	30.2	17.3	11.2	1.7
293	크림슨	극적육		22.6	14		1.6
294	크림슨	극적육	7.4	33.4	19.2	11.8	1.7
295	호피	적육	2.7	17.5	17	10.2	1.0
296	크림슨	적육	5	32	17.8	12	1.8
297	크림슨	적육	3.5	25.4	15.8	12.2	1.6
298	호피	적육	7.8	33.2	22.2	11	1.5
299	크림슨	극적육	3.9	27.6	17.3	10.4	1.6
300	크림슨	극적육	3.7	34.5	13.3	11.8	2.6
302	호피	적육	3.9	27.6	17.4	12	1.6

(5) 분리집단인 F3세대 흰가루병 표현형 검정

흰가루병 저항성과 관련된 분자마커개발을 위해서 F3집단에 대해서 표현형검정을 파트너종묘의 육종연구소에서 수행되었다. 저항성검정은 주요 판별품종, 양친, F3집단에 대해서 계통당 15개체를 집중 조사하였다. 조사된 자료는 중앙대학교에 제공되어 분자마커 개발 및 유용성 분석에 활용되었다. TS와 PI189225 F3집단 표현형 검정결과는 표 4-16과 같다.

표 4-16. TS와 PI189225 F3집단 표현형 검정(1:강,9:약)

Plot	Line	자엽	본엽	세대
4901	SBA	9.0	7.2	Fixed
4902	Arka Manik	3.6	3.7	Fixed
4903	PI189225	1.5	1.0	Fixed
4904	PI254744	3.6	2.4	Fixed
4905	PI189225	1.0	0.8	Fixed
4906	SBA	9.0	8.3	Fixed
4907	PI189225/TS:(2nd)-1	3.7	4.2	F3
4908	PI189225/TS:(2nd)-4	6.8	6.3	F3
4909	PI189225/TS:(2nd)-6	1.2	1.3	F3
4910	PI189225/TS:(2nd)-10	3.1	2.4	F3
4911	PI189225/TS:(2nd)-11	1.4	2.2	F3
4912	PI189225/TS:(2nd)-12	6.3	6.2	F3
4913	PI189225/TS:(2nd)-14	2.1	3.3	F3
4914	PI189225/TS:(2nd)-15	5.6	6.0	F3
4915	PI189225/TS:(2nd)-18	3.2	3.2	F3
4916	PI189225/TS:(2nd)-21	2.7	2.5	F3
4917	PI189225/TS:(2nd)-24	3.6	3.8	F3
4918	PI189225/TS:(2nd)-26	3.1	3.2	F3
4919	PI189225/TS:(2nd)-27	2.9	3.3	F3
4920	PI189225/TS:(2nd)-28	2.7	2.9	F3
4921	PI189225/TS:(2nd)-31	2.1	2.6	F3
4922	PI189225/TS:(2nd)-33	3.4	3.9	F3
4923	PI189225/TS:(2nd)-36	0.9	0.9	F3
4924	PI189225/TS:(2nd)-39	6.1	6.6	F3
4925	PI189225/TS:(2nd)-42	6.4	7.3	F3
4926	PI189225/TS:(2nd)-44	3.3	3.2	F3
4927	PI189225/TS:(2nd)-52	3.5	3.6	F3
4928	PI189225/TS:(2nd)-57	6.1	6.2	F3
4929	PI189225/TS:(2nd)-62	2.2	2.3	F3
4930	PI189225/TS:(2nd)-63	2.8	3.7	F3
4931	PI189225/TS:(2nd)-64	6.5	6.3	F3
4932	PI189225/TS:(2nd)-68	5.3	5.9	F3
4933	PI189225/TS:(2nd)-71	1.9	3.3	F3
4934	PI189225/TS:(2nd)-78	0.9	1.7	F3

Plot	Line	자엽	본엽	세대
4935	PI189225/TS:(2nd)-82	6.5	6.5	F3
4936	PI189225/TS:(2nd)-86	4.3	4.6	F3
4939	PI189225/TS:(2nd)-94	7.3	7.2	F3
4940	PI189225/TS:(2nd)-96	1.9	2.1	F3
4941	PI189225/TS:(2nd)-97	1.7	2.5	F3
4942	PI189225/TS:(2nd)-100	3.7	3.9	F3
4943	PI189225/TS:(2nd)-104	3.2	3.0	F3
4944	PI189225/TS:(2nd)-105	3.9	3.8	F3
4945	PI189225/TS:(2nd)-106	2.1	1.9	F3
4946	PI189225/TS:(2nd)-110	2.6	3.9	F3
4947	PI189225/TS:(2nd)-112	5.9	6.0	F3
4948	PI189225/TS:(2nd)-113	2.1	2.2	F3
4949	PI189225/TS:(2nd)-118	3.0	3.1	F3
4950	PI189225/TS:(2nd)-120	6.0	6.8	F3
4951	PI189225/TS:(2nd)-122	4.0	4.6	F3
4952	PI189225/TS:(2nd)-125	1.6	2.3	F3
4953	PI189225/TS:(2nd)-127	5.0	4.6	F3
4954	PI189225/TS:(2nd)-131	2.9	4.2	F3
4955	PI189225/TS:(2nd)-132	5.7	5.4	F3
4956	PI189225/TS:(2nd)-133	4.5	5.3	F3
4957	PI189225/TS:(2nd)-135	1.7	1.7	F3
4958	PI189225/TS:(2nd)-137	3.4	4.3	F3
4959	PI189225/TS:(2nd)-140	2.2	2.8	F3
4960	PI189225/TS:(2nd)-144	3.2	2.5	F3
4961	PI189225/TS:(2nd)-146	7.5	7.4	F3
4962	PI189225/TS:(2nd)-147	4.8	4.9	F3
4963	PI189225/TS:(2nd)-148	4.7	4.0	F3
4964	PI189225/TS:(2nd)-152	2.5	1.8	F3
4965	PI189225/TS:(2nd)-153	2.8	2.5	F3
4966	PI189225/TS:(2nd)-154	7.0	6.6	F3
4967	PI189225/TS:(2nd)-157	3.0	2.3	F3
4968	PI189225/TS:(2nd)-161	3.9	3.7	F3
4971	PI189225/TS:(2nd)-163	3.6	5.0	F3
4972	PI189225/TS:(2nd)-165	7.6	7.7	F3
4973	PI189225/TS:(2nd)-166	3.6	3.0	F3
4974	PI189225/TS:(2nd)-168	5.6	6.2	F3
4975	PI189225/TS:(2nd)-170	3.6	3.9	F3
4976	PI189225/TS:(2nd)-171	6.2	5.7	F3
4977	PI189225/TS:(2nd)-173	2.9	4.1	F3
4978	PI189225/TS:(2nd)-174	3.4	3.4	F3
4979	PI189225/TS:(2nd)-177	4.4	4.6	F3
4980	PI189225/TS:(2nd)-181	2.8	2.9	F3
4981	PI189225/TS:(2nd)-182	4.9	5.0	F3

Plot	Line	자업	본업	세대
4982	PI189225/TS:(2nd)-185	3.1	4.3	F3
4983	PI189225/TS:(2nd)-186	3.1	4.6	F3
4984	PI189225/TS:(2nd)-188	6.0	6.1	F3
4985	PI189225/TS:(2nd)-190	5.9	5.1	F3
4986	PI189225/TS:(2nd)-191	6.5	7.1	F3
4987	PI189225/TS:(2nd)-193	7.5	7.4	F3
4988	PI189225/TS:(2nd)-195	2.3	2.6	F3
4989	PI189225/TS:(2nd)-199	3.0	2.8	F3
4990	PI189225/TS:(2nd)-202	3.7	4.2	F3
4991	PI189225/TS:(2nd)-206	7.7	7.6	F3
4992	PI189225/TS:(2nd)-212	6.4	6.0	F3
4993	PI189225/TS:(2nd)-213	4.0	4.6	F3
4994	PI189225/TS:(2nd)-221	7.4	7.5	F3
4995	PI189225/TS:(2nd)-223			F3
4996	PI189225/TS:(2nd)-224	1.5	1.7	F3
4997	PI189225/TS:(2nd)-225	2.6	3.0	F3
4998	PI189225/TS:(2nd)-227	3.0	2.5	F3
4999	PI189225/TS:(2nd)-230	7.1	6.6	F3
5000	PI189225/TS:(2nd)-231	5.5	6.0	F3
5003	PI189225/TS:(2nd)-232	3.4	3.9	F3
5004	PI189225/TS:(2nd)-233	3.3	3.6	F3
5005	PI189225/TS:(2nd)-235	4.0	4.8	F3
5006	PI189225/TS:(2nd)-236	8.2	6.5	F3
5007	PI189225/TS:(2nd)-238	3.6	3.8	F3
5008	PI189225/TS:(2nd)-239	2.1	3.5	F3
5009	PI189225/TS:(2nd)-240	1.3	2.1	F3
5010	PI189225/TS:(2nd)-242	3.4	3.2	F3
5011	PI189225/TS:(2nd)-243	7.0	7.8	F3
5012	PI189225/TS:(2nd)-244	4.0	4.2	F3
5013	PI189225/TS:(2nd)-245	1.3	1.0	F3
5014	PI189225/TS:(2nd)-247	8.3	6.5	F3
5015	PI189225/TS:(2nd)-248	6.7	7.3	F3
5017	PI189225/TS:(2nd)-250	7.8	7.3	F3
5018	PI189225/TS:(2nd)-252	1.5	2.2	F3
5019	PI189225/TS:(2nd)-253	2.5	1.8	F3
5020	PI189225/TS:(2nd)-254	7.0	6.9	F3
5021	PI189225/TS:(2nd)-256	5.0	5.9	F3
5022	PI189225/TS:(2nd)-257	7.6	7.5	F3
5023	PI189225/TS:(2nd)-258	6.5	6.4	F3
5024	PI189225/TS:(2nd)-259	7.2	7.3	F3
5025	PI189225/TS:(2nd)-260	6.3	6.5	F3
5026	PI189225/TS:(2nd)-266	3.3	4.3	F3
5027	PI189225/TS:(2nd)-267	2.5	2.9	F3

Plot	Line	자엽	본엽	세대
5028	PI189225/TS:(2nd)-270	2.7	3.3	F3
5031	PI189225/TS:(2nd)-274	1.8	2.0	F3
5032	PI189225/TS:(2nd)-276	3.3	3.3	F3
5035	PI189225/TS:(2nd)-277	2.2	1.8	F3
5036	PI189225/TS:(2nd)-278	5.6	5.7	F3
5037	PI189225/TS:(2nd)-280	3.8	4.2	F3
5038	PI189225/TS:(2nd)-283	3.2	4.3	F3
5039	PI189225/TS:(2nd)-284	2.9	2.8	F3
5040	PI189225/TS:(2nd)-286	3.6	3.6	F3
5041	PI189225/TS:(2nd)-288	7.5	7.7	F3
5042	PI189225/TS:(2nd)-289	5.6	5.5	F3
5043	PI189225/TS:(2nd)-290	3.3	3.6	F3
5044	PI189225/TS:(2nd)-291	4.0	4.3	F3
5045	PI189225/TS:(2nd)-294	8.1	8.1	F3
5046	PI189225/TS:(2nd)-295	7.4	7.1	F3
5047	PI189225/TS:(2nd)-296	3.0	3.8	F3
5049	PI189225/TS:(2nd)-7	4.1	4.7	F3
5050	PI189225/TS:(2nd)-8	2.4	2.2	F3
5051	PI189225/TS:(2nd)-32	4.3	4.4	F3
5052	PI189225/TS:(2nd)-41	2.9	2.8	F3
5053	PI189225/TS:(2nd)-59	6.4	6.4	F3
5054	PI189225/TS:(2nd)-79	3.4	3.5	F3
5055	PI189225/TS:(2nd)-90	3.9	3.8	F3
5056	PI189225/TS:(2nd)-117	8.0	7.5	F3
5057	PI189225/TS:(2nd)-121	8.0	7.7	F3
5058	PI189225/TS:(2nd)-129	7.7	7.3	F3
5059	PI189225/TS:(2nd)-145	7.1	7.1	F3
5060	PI189225/TS:(2nd)-169	4.7	3.8	F3
5061	PI189225/TS:(2nd)-180	6.6	6.5	F3
5062	PI189225/TS:(2nd)-183	6.8	6.5	F3
5063	PI189225/TS:(2nd)-200	3.7	3.8	F3
5064	PI189225/TS:(2nd)-203	7.6	6.5	F3
5065	PI189225/TS:(2nd)-204	2.4	2.6	F3
5066	PI189225/TS:(2nd)-217	2.5	2.4	F3
5067	PI189225/TS:(2nd)-218	7.2	6.2	F3
5068	PI189225/TS:(2nd)-222	7.5	7.7	F3
5069	PI189225/TS:(2nd)-229	8.3	8.2	F3

TS와 PI254744 F3집단 표현형 검정결과는 표 4-17과 같다.

표 4-17. TS와 PI254744 F3집단 표현형 검정(1:강,9:약)

Plot	Line	자엽	본엽	세대
4701	SBA	5.2	5.9	Fixed
4702	TS	6.4	6.1	Fixed
4703	Arka Manik	1.4	2.8	Fixed
4704	PI189225	1.0	0.8	Fixed
4705	PI254744	2.0	2.6	Fixed
4706	Top Mark	8.7	8.5	Fixed
4707	PMR 6	3.5	1.3	Fixed
4708	PMR 1	0.9	1.0	Fixed
4709	PMR 45	3.1	1.2	Fixed
4710	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-2	6.5	6.1	F3
4711	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-5	2.9	3.4	F3
4712	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-7	8.1	7.8	F3
4713	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-8	5.5	5.1	F3
4714	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-9	4.5	4.7	F3
4715	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-12	4.0	3.5	F3
4716	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-13	4.5	4.9	F3
4717	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-16	7.1	7.2	F3
4718	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-17	7.3	6.9	F3
4719	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-18	2.8	2.9	F3
4720	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-19	3.3	3.6	F3
4721	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-20	2.8	3.0	F3
4722	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-21	5.5	5.4	F3
4723	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-23	4.8	5.1	F3
4724	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-27	8.0	7.8	F3
4725	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-31	3.8	4.1	F3
4726	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-32	2.7	2.4	F3
4727	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-33	2.6	2.6	F3
4728	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-36	3.5	4.0	F3
4729	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-37	2.4	2.9	F3
4730	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-42	4.0	4.1	F3
4731	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-43	3.0	3.3	F3
4732	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-44	8.3	7.9	F3
4733	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-46	4.8	5.6	F3
4734	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-47	5.9	6.1	F3
4735	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-48	4.2	5.0	F3
4736	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-49	5.3	6.2	F3
4737	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-50	3.2	3.8	F3
4738	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-51	8.3	7.6	F3
4739	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-53	3.6	4.1	F3
4742	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-56	5.2	4.6	F3
4743	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-57	4.4	4.8	F3
4744	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-58	3.1	3.2	F3
4745	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-59	7.0	7.6	F3

Plot	Line	자업	본업	세대
4746	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-60	3.6	4.8	F3
4747	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-61	5.1	5.5	F3
4748	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-62	7.5	7.8	F3
4749	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-70	7.5	7.0	F3
4750	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-74	7.8	7.4	F3
4751	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-76	5.9	5.5	F3
4752	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-78	5.3	5.6	F3
4753	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-79	6.3	6.4	F3
4754	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-81	5.2	5.3	F3
4755	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-82	4.2	4.7	F3
4756	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-83	3.3	3.7	F3
4757	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-88	4.7	4.6	F3
4758	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-90	7.3	7.3	F3
4759	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-93	3.8	4.3	F3
4760	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-94	3.4	3.3	F3
4761	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-95	4.4	4.9	F3
4762	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-99	3.0	3.1	F3
4763	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-100	4.3	4.1	F3
4764	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-101	7.5	7.0	F3
4765	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-102	3.3	3.4	F3
4766	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-104	4.4	4.0	F3
4767	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-105	3.5	3.6	F3
4768	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-107	4.9	4.6	F3
4769	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-108	3.2	3.8	F3
4770	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-113	6.4	7.1	F3
4771	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-114	6.4	6.6	F3
4774	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-116	7.3	7.4	F3
4775	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-117	4.0	4.2	F3
4776	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-118	8.0	6.7	F3
4777	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-119	5.7	4.9	F3
4778	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-122	7.5	7.4	F3
4779	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-125	4.9	5.2	F3
4780	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-126	6.9	7.2	F3
4781	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-127	4.2	4.6	F3
4782	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-128	4.9	5.1	F3
4783	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-131	3.5	3.7	F3
4784	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-132	3.6	4.4	F3
4785	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-133	3.4	3.8	F3
4786	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-134	3.5	3.3	F3
4787	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-135	4.6	4.9	F3
4788	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-137	3.7	3.5	F3
4789	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-138	5.1	4.7	F3
4790	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-139	5.4	5.2	F3
4791	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-140	3.3	3.3	F3

Plot	Line	자업	본업	세대
4792	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-141	3.4	3.8	F3
4793	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-142	3.9	4.2	F3
4794	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-144	5.5	5.5	F3
4795	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-145	5.6	5.6	F3
4796	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-146	5.3	5.7	F3
4797	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-147	4.8	4.9	F3
4798	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-149	4.1	3.9	F3
4799	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-150	5.6	5.6	F3
4800	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-1	8.2	8.1	F3
4801	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-4	8.8	7.8	F3
4802	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-38	8.5	7.4	F3
4803	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-40	3.7	3.9	F3
4806	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-41	8.1	7.5	F3
4807	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-45	7.8	7.3	F3
4808	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-54	7.8	7.0	F3
4809	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-63	4.1	3.9	F3
4810	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-66	3.3	3.2	F3
4811	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-72	5.1	5.1	F3
4812	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-77	4.2	4.4	F3
4813	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-80	5.2	5.0	F3
4814	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-84	8.0	7.4	F3
4815	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-85	5.6	4.9	F3
4816	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-91	5.9	6.3	F3
4817	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-92	7.7	7.7	F3
4818	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-96	7.4	7.3	F3
4819	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-106	4.6	5.0	F3
4820	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-109	3.8	3.6	F3
4821	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-110	7.8	7.5	F3
4822	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-112	4.9	5.2	F3
4823	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-121	7.3	7.3	F3
4824	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-130	5.7	6.0	F3

(6) F2세대 종자크기분석

종자크기와 관련된 관련된 분자마커개발을 위해서 F2집단에 대해서 종자크기를 조사하였다. 종자크기는 F3집에 대해서 계통당 10개체를 조사하였다. 조사된 자료는 중앙대학교에 제공되어 분자마커 개발 및 유용성 분석에 활용되었다. TS와 PI254744 F2집단 종자크기분석결과는 표 4-18과 같다.

표 4-18. TS와 PI254744 F2집단 종자크기분석

Pedigree	Gen.	20립중(g)
PI254744	Fixed	0.41
TS x PI254744	F1	0.27
TS x PI254744xTS	BC1F1(P1)	1.33
TS x PI254744xPI254744	BC1F1(P2)	1.29
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-1	F3	0.51
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-2	F3	1.22
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-4	F3	0.23
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-5	F3	0.95
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-7	F3	0.33
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-8	F3	2.25
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-9	F3	1.02
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-12	F3	0.88
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-13	F3	1.78
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-16	F3	1.30
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-17	F3	2.18
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-19	F3	1.07
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-20	F3	1.83
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-21	F3	2.19
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-23	F3	0.87
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-27	F3	0.87
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-31	F3	0.86
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-32	F3	1.24
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-33	F3	1.29
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-36	F3	1.25
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-37	F3	0.89
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-38	F3	0.46
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-41	F3	0.25
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-42	F3	1.01
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-43	F3	1.31
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-44	F3	0.36
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-45	F3	0.26
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-46	F3	1.64
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-47	F3	0.96

Pedigree	Gen.	20립 중(g)
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-48	F3	1.94
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-49	F3	1.15
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-50	F3	0.94
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-51	F3	1.92
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-53	F3	0.50
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-54	F3	0.16
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-56	F3	0.99
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-57	F3	0.98
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-59	F3	0.94
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-60	F3	1.39
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-61	F3	1.84
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-62	F3	0.98
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-63	F3	0.25
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-66	F3	0.37
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-69	F3	2.39
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-70	F3	0.98
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-72	F3	0.33
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-74	F3	0.89
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-76	F3	1.32
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-77	F3	0.31
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-78	F3	1.97
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-82	F3	1.19
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-83	F3	1.08
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-88	F3	0.84
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-90	F3	1.31
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-91	F3	0.27
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-93	F3	1.83
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-94	F3	1.23
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-95	F3	0.94
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-96	F3	0.20
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-99	F3	1.33
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-100	F3	1.23
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-101	F3	2.24
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-102	F3	1.82
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-103	F3	0.77
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-104	F3	2.24
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-105	F3	0.61
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-106	F3	0.25
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-107	F3	1.85
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-108	F3	1.21
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-109	F3	0.32

Pedigree	Gen.	20립 중(g)
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-110	F3	0.42
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-111	F3	1.01
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-112	F3	0.30
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-113	F3	2.06
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-114	F3	1.01
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-117	F3	1.42
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-118	F3	1.16
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-119	F3	0.95
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-121	F3	0.50
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-122	F3	1.33
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-125	F3	1.17
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-126	F3	0.87
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-127	F3	0.28
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-130	F3	0.24
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-131	F3	0.88
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-132	F3	0.95
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-133	F3	1.06
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-134	F3	1.77
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-135	F3	1.24
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-138	F3	1.75
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-139	F3	0.59
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-140	F3	0.84
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-141	F3	1.18
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-142	F3	1.21
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-144	F3	1.05
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-145	F3	1.83
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-146	F3	1.33
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-147	F3	1.08
(Ts34/PI254744:F2:2nd)-149	F3	1.62

표 4-19는 SBA와 DRD F2집단 종자크기분석 결과이다.

표 4-19. SBA와 DRD F2집단 종자크기분석

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-1	F3	0.43
SBA/DRD:F2-2	F3	0.34
SBA/DRD:F2-3	F3	0.09
SBA/DRD:F2-4	F3	0.07
SBA/DRD:F2-5	F3	0.70
SBA/DRD:F2-6	F3	0.05
SBA/DRD:F2-8	F3	0.22
SBA/DRD:F2-9	F3	0.41
SBA/DRD:F2-10	F3	0.19
SBA/DRD:F2-11	F3	0.39
SBA/DRD:F2-12	F3	0.10
SBA/DRD:F2-14	F3	0.10
SBA/DRD:F2-15	F3	0.07
SBA/DRD:F2-17	F3	0.42
SBA/DRD:F2-19	F3	0.38
SBA/DRD:F2-20	F3	0.48
SBA/DRD:F2-21	F3	0.52
SBA/DRD:F2-22	F3	0.12
SBA/DRD:F2-23	F3	0.46
SBA/DRD:F2-24	F3	0.43
SBA/DRD:F2-25	F3	0.43
SBA/DRD:F2-26	F3	0.56
SBA/DRD:F2-27	F3	0.11
SBA/DRD:F2-28	F3	0.33
SBA/DRD:F2-29	F3	0.12
SBA/DRD:F2-30	F3	0.41
SBA/DRD:F2-31	F3	0.84
SBA/DRD:F2-32	F3	0.12
SBA/DRD:F2-33	F3	0.35
SBA/DRD:F2-36	F3	0.11
SBA/DRD:F2-38	F3	0.48
SBA/DRD:F2-39	F3	0.38
SBA/DRD:F2-41	F3	0.35
SBA/DRD:F2-42	F3	0.48
SBA/DRD:F2-43	F3	0.93
SBA/DRD:F2-44	F3	0.37

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-45	F3	0.49
SBA/DRD:F2-46	F3	0.35
SBA/DRD:F2-47	F3	0.19
SBA/DRD:F2-48	F3	0.40
SBA/DRD:F2-49	F3	0.43
SBA/DRD:F2-50	F3	0.34
SBA/DRD:F2-51	F3	0.45
SBA/DRD:F2-52	F3	0.85
SBA/DRD:F2-53	F3	0.57
SBA/DRD:F2-54	F3	0.13
SBA/DRD:F2-55	F3	0.69
SBA/DRD:F2-56	F3	0.11
SBA/DRD:F2-57	F3	0.38
SBA/DRD:F2-58	F3	0.49
SBA/DRD:F2-59	F3	0.70
SBA/DRD:F2-60	F3	0.50
SBA/DRD:F2-62	F3	0.47
SBA/DRD:F2-63	F3	0.47
SBA/DRD:F2-64	F3	0.08
SBA/DRD:F2-65	F3	0.35
SBA/DRD:F2-66	F3	0.41
SBA/DRD:F2-67	F3	0.52
SBA/DRD:F2-68	F3	0.13
SBA/DRD:F2-70	F3	0.07
SBA/DRD:F2-71	F3	0.32
SBA/DRD:F2-73	F3	0.20
SBA/DRD:F2-74	F3	0.57
SBA/DRD:F2-75	F3	0.16
SBA/DRD:F2-76	F3	0.71
SBA/DRD:F2-77	F3	0.36
SBA/DRD:F2-78	F3	0.32
SBA/DRD:F2-79	F3	0.41
SBA/DRD:F2-80	F3	0.06
SBA/DRD:F2-81	F3	0.10
SBA/DRD:F2-82	F3	0.40
SBA/DRD:F2-83	F3	0.82
SBA/DRD:F2-84	F3	0.17

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-85	F3	0.43
SBA/DRD:F2-86	F3	0.45
SBA/DRD:F2-87	F3	0.33
SBA/DRD:F2-88	F3	0.12
SBA/DRD:F2-89	F3	0.70
SBA/DRD:F2-90	F3	0.13
SBA/DRD:F2-91	F3	0.12
SBA/DRD:F2-92	F3	0.12
SBA/DRD:F2-93	F3	0.37
SBA/DRD:F2-94	F3	0.04
SBA/DRD:F2-95	F3	0.11
SBA/DRD:F2-96	F3	0.70
SBA/DRD:F2-97	F3	0.31
SBA/DRD:F2-99	F3	0.42
SBA/DRD:F2-100	F3	0.41
SBA/DRD:F2-101	F3	0.76
SBA/DRD:F2-104	F3	0.40
SBA/DRD:F2-105	F3	0.19
SBA/DRD:F2-107	F3	0.66
SBA/DRD:F2-108	F3	0.72
SBA/DRD:F2-109	F3	0.50
SBA/DRD:F2-110	F3	0.29
SBA/DRD:F2-111	F3	0.69
SBA/DRD:F2-112	F3	0.14
SBA/DRD:F2-113	F3	0.34
SBA/DRD:F2-115	F3	0.46
SBA/DRD:F2-116	F3	0.34
SBA/DRD:F2-117	F3	0.41
SBA/DRD:F2-118	F3	0.54
SBA/DRD:F2-119	F3	0.39
SBA/DRD:F2-120	F3	0.13
SBA/DRD:F2-121	F3	0.44
SBA/DRD:F2-122	F3	0.76
SBA/DRD:F2-123	F3	0.36
SBA/DRD:F2-124	F3	0.44
SBA/DRD:F2-125	F3	0.13

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-126	F3	0.42
SBA/DRD:F2-127	F3	0.48
SBA/DRD:F2-128	F3	0.38
SBA/DRD:F2-130	F3	0.28
SBA/DRD:F2-131	F3	0.12
SBA/DRD:F2-132	F3	0.86
SBA/DRD:F2-133	F3	0.04
SBA/DRD:F2-134	F3	0.43
SBA/DRD:F2-135	F3	0.47
SBA/DRD:F2-136	F3	0.48
SBA/DRD:F2-137	F3	0.11
SBA/DRD:F2-138	F3	0.10
SBA/DRD:F2-139	F3	0.52
SBA/DRD:F2-140	F3	0.11
SBA/DRD:F2-142	F3	0.35
SBA/DRD:F2-143	F3	0.49
SBA/DRD:F2-144	F3	0.86
SBA/DRD:F2-146	F3	0.50
SBA/DRD:F2-147	F3	0.44
SBA/DRD:F2-148	F3	0.52
SBA/DRD:F2-150	F3	0.89
SBA/DRD:F2-151	F3	0.33
SBA/DRD:F2-152	F3	0.33
SBA/DRD:F2-153	F3	0.33
SBA/DRD:F2-154	F3	0.77
SBA/DRD:F2-155	F3	0.46
SBA/DRD:F2-156	F3	0.84
SBA/DRD:F2-157	F3	0.22
SBA/DRD:F2-158	F3	0.29
SBA/DRD:F2-159	F3	0.78
SBA/DRD:F2-160	F3	0.52
SBA/DRD:F2-161	F3	0.10
SBA/DRD:F2-162	F3	0.09
SBA/DRD:F2-163	F3	0.43
SBA/DRD:F2-164	F3	0.71
SBA/DRD:F2-165	F3	0.18

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-169	F3	0.19
SBA/DRD:F2-170	F3	0.52
SBA/DRD:F2-171	F3	0.43
SBA/DRD:F2-172	F3	0.17
SBA/DRD:F2-173	F3	0.76
SBA/DRD:F2-174	F3	0.39
SBA/DRD:F2-175	F3	0.76
SBA/DRD:F2-176	F3	0.43
SBA/DRD:F2-177	F3	0.29
SBA/DRD:F2-178	F3	0.46
SBA/DRD:F2-179	F3	0.44
SBA/DRD:F2-180	F3	0.36
SBA/DRD:F2-181	F3	0.43
SBA/DRD:F2-182	F3	0.28
SBA/DRD:F2-183	F3	0.40
SBA/DRD:F2-184	F3	0.43
SBA/DRD:F2-185	F3	0.14
SBA/DRD:F2-186	F3	0.83
SBA/DRD:F2-190	F3	0.41
SBA/DRD:F2-191	F3	0.54
SBA/DRD:F2-192	F3	0.30
SBA/DRD:F2-193	F3	0.28
SBA/DRD:F2-194	F3	0.31
SBA/DRD:F2-195	F3	0.43
SBA/DRD:F2-197	F3	0.38
SBA/DRD:F2-198	F3	0.13
SBA/DRD:F2-199	F3	0.77
SBA/DRD:F2-200	F3	0.35
SBA/DRD:F2-201	F3	0.47
SBA/DRD:F2-202	F3	0.13
SBA/DRD:F2-203	F3	0.75
SBA/DRD:F2-204	F3	0.32
SBA/DRD:F2-205	F3	0.52
SBA/DRD:F2-206	F3	0.43
SBA/DRD:F2-207	F3	0.35
SBA/DRD:F2-208	F3	0.50

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-209	F3	0.51
SBA/DRD:F2-210	F3	0.43
SBA/DRD:F2-211	F3	0.34
SBA/DRD:F2-212	F3	0.87
SBA/DRD:F2-213	F3	0.39
SBA/DRD:F2-214	F3	0.19
SBA/DRD:F2-215	F3	0.23
SBA/DRD:F2-216	F3	0.76
SBA/DRD:F2-217	F3	0.42
SBA/DRD:F2-218	F3	0.13
SBA/DRD:F2-219	F3	0.71
SBA/DRD:F2-221	F3	0.18
SBA/DRD:F2-222	F3	0.46
SBA/DRD:F2-223	F3	0.69
SBA/DRD:F2-224	F3	0.46
SBA/DRD:F2-225	F3	0.30
SBA/DRD:F2-226	F3	0.40
SBA/DRD:F2-227	F3	0.47
SBA/DRD:F2-230	F3	0.16
SBA/DRD:F2-231	F3	0.43
SBA/DRD:F2-232	F3	0.44
SBA/DRD:F2-233	F3	0.52
SBA/DRD:F2-234	F3	0.65
SBA/DRD:F2-235	F3	0.36
SBA/DRD:F2-236	F3	0.15
SBA/DRD:F2-239	F3	0.39
SBA/DRD:F2-240	F3	0.31
SBA/DRD:F2-241	F3	1.00
SBA/DRD:F2-242	F3	0.45
SBA/DRD:F2-243	F3	0.22
SBA/DRD:F2-244	F3	0.19
SBA/DRD:F2-245	F3	0.78
SBA/DRD:F2-246	F3	0.38
SBA/DRD:F2-247	F3	0.51
SBA/DRD:F2-249	F3	0.44
SBA/DRD:F2-251	F3	0.37

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-252	F3	0.49
SBA/DRD:F2-254	F3	0.10
SBA/DRD:F2-255	F3	0.38
SBA/DRD:F2-256	F3	0.42
SBA/DRD:F2-257	F3	0.39
SBA/DRD:F2-258	F3	0.49
SBA/DRD:F2-260	F3	0.71
SBA/DRD:F2-261	F3	0.17
SBA/DRD:F2-262	F3	0.42
SBA/DRD:F2-264	F3	0.23
SBA/DRD:F2-265	F3	0.47
SBA/DRD:F2-266	F3	0.42
SBA/DRD:F2-267	F3	0.29
SBA/DRD:F2-268	F3	0.36
SBA/DRD:F2-269	F3	0.13
SBA/DRD:F2-270	F3	0.39
SBA/DRD:F2-271	F3	0.25
SBA/DRD:F2-273	F3	0.38
SBA/DRD:F2-274	F3	0.22
SBA/DRD:F2-275	F3	0.35
SBA/DRD:F2-277	F3	0.19
SBA/DRD:F2-278	F3	0.57
SBA/DRD:F2-279	F3	0.48
SBA/DRD:F2-280	F3	0.46
SBA/DRD:F2-281	F3	0.41
SBA/DRD:F2-283	F3	0.77
SBA/DRD:F2-284	F3	0.15
SBA/DRD:F2-285	F3	0.36
SBA/DRD:F2-286	F3	0.94
SBA/DRD:F2-288	F3	0.18
SBA/DRD:F2-289	F3	0.35
SBA/DRD:F2-290	F3	0.12
SBA/DRD:F2-292	F3	0.38
SBA/DRD:F2-293	F3	0.21
SBA/DRD:F2-294	F3	0.36
SBA/DRD:F2-295	F3	0.31

Pedigree	Gen.	20립중 (g)
SBA/DRD:F2-296	F3	0.07
SBA/DRD:F2-297	F3	0.21
SBA/DRD:F2-298	F3	0.48
SBA/DRD:F2-299	F3	0.36
SBA/DRD:F2-300	F3	0.11
SBA/DRD:F2-302	F3	0.17

나. 유전자지도집단의 RIL양성

유전자지도작성, 분자마커 개발 및 검증등을 위해서, TS와 PI254744, SBA와 DRD 계통간의 RIL집단이 양성되었다. 4차년도까지 태국의 파트너종묘 세대진전시험포장에서 연 3~4회의 Single Seed Descendent 방법을 통해 세대진전이 이루어졌다.

(1) TS 와 PI254744에 대한 RIL 집단양성

PI254744는 야생종으로 암꽃 개화 빈도나 착과력이 나쁘기 때문에 TS와의 분리세대에서 종자크기도 작고, 착과력이 떨어지는 개체들이 다수 나타나서 세대진전에 많은 어려움이 있었다. 이러한 계통은 다음 작기에 재파종하여 세대진전된 계통을 확보하려고 노력하였다. 현재까지 확보된 TS와 PI254744간의 RIL 집단은 표 4-20에 나타나 있는데, F7 131계통이 확보되었고, 13계 계통에 대해서 계속적으로 세대진전을 진행 중이다.

표 4-20. TS와 PI254744간의 RIL집단

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
Ts254:003	F7	(Ts34/PI254744)F2-3-1-1-1-1	14-1431	Finished
Ts254:005	F7	(Ts34/PI254744)F2-5-1-1-1-1	15-1083	Finished
Ts254:006	F7	(Ts34/PI254744)F2-6-1-1-1-1	15-1084	Finished
Ts254:007	F7	(Ts34/PI254744)F2-7-1-1-1-1	14-1432	Finished
Ts254:008	F7	(Ts34/PI254744)F2-8-1-1-1-1	14-1433	Finished
Ts254:010	F7	(Ts34/PI254744)F2-10-1-1-1-1	14-2416	Finished
Ts254:017	F7	(Ts34/PI254744)F2-17-1-1-1-1	14-1434	Finished
Ts254:025	F7	(Ts34/PI254744)F2-25-1-1-1-1	14-1435	Finished
Ts254:028	F7	(Ts34/PI254744)F2-28-1-1-1-1	14-1436	Finished
Ts254:031	F7	(Ts34/PI254744)F2-31-1-1-1-1	15-1085	Finished
Ts254:036	F7	(Ts34/PI254744)F2-36-1-1-1-1	15-1087	Finished
Ts254:038	F7	(Ts34/PI254744)F2-38-1-1-1-1	15-1089	Finished
Ts254:039	F7	(Ts34/PI254744)F2-39-1-1-1-1	15-0967	Finished
Ts254:052	F7	(Ts34/PI254744)F2-52-1-1-1-1	14-2418	Finished
Ts254:056	F7	(Ts34/PI254744)F2-56-1-1-1-1	14-1437	Finished
Ts254:058	F7	(Ts34/PI254744)F2-58-1-1-1-1	14-2419	Finished
Ts254:061	F7	(Ts34/PI254744)F2-61-1-1-1-1	14-1438	Finished

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
Ts254:064	F7	(Ts34/PI254744)F2-64-1-1-1-1	14-1439	Finished
Ts254:065	F7	(Ts34/PI254744)F2-65-1-1-1-1	14-2420	Finished
Ts254:067	F7	(Ts34/PI254744)F2-67-1-1-1-1	15-0964	Finished
Ts254:068	F7	(Ts34/PI254744)F2-68-1-1-1-1	15-0963	Finished
Ts254:071	F7	(Ts34/PI254744)F2-71-1-1-1-1	14-2421	Finished
Ts254:076	F7	(Ts34/PI254744)F2-76-1-1-1-1	14-1441	Finished
Ts254:078	F7	(Ts34/PI254744)F2-78-1-1-1-1	15-0968	Finished
Ts254:079	F7	(Ts34/PI254744)F2-79-1-1-1-1	14-1442	Finished
Ts254:081	F7	(Ts34/PI254744)F2-81-1-1-1-1	14-1443	Finished
Ts254:082	F7	(Ts34/PI254744)F2-82-1-1-1-1	14-1444	Finished
Ts254:084	F7	(Ts34/PI254744)F2-84-1-1-1-1	14-1445	Finished
Ts254:085	F7	(Ts34/PI254744)F2-85-1-1-1-1	14-1446	Finished
Ts254:089	F7	(Ts34/PI254744)F2-89-1-1-1-1	14-1447	Finished
Ts254:091	F7	(Ts34/PI254744)F2-91-1-1-1-1	14-2428	Finished
Ts254:093	F7	(Ts34/PI254744)F2-93-1-1-1-1	14-2415	Finished
Ts254:099	F7	(Ts34/PI254744)F2-99-1-1-1-1	15-1091	Finished
Ts254:104	F7	(Ts34/PI254744)F2-104-1-1-1-1	14-1448	Finished
Ts254:105	F7	(Ts34/PI254744)F2-105-1-1-1-1	15-0965	Finished
Ts254:106	F7	(Ts34/PI254744)F2-106-1-1-1-1	14-1449	Finished
Ts254:107	F7	(Ts34/PI254744)F2-107-1-1-1-1	15-1092	Finished
Ts254:113	F7	(Ts34/PI254744)F2-113-1-1-1-1	14-1450	Finished
Ts254:118	F7	(Ts34/PI254744)F2-118-1-1-1-1	14-2424	Finished
Ts254:119	F7	(Ts34/PI254744)F2-119-1-1-1-1	15-0966	Finished
Ts254:121	F7	(Ts34/PI254744)F2-121-1-1-1-1	14-2417	Finished
Ts254:122	F7	(Ts34/PI254744)F2-122-1-1-1-1	14-1451	Finished
Ts254:124	F7	(Ts34/PI254744)F2-124-1-1-1-1	14-1452	Finished
Ts254:201	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-1-1-1-1-1	14-1470	Finished
Ts254:202	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-2-1-1-1-1	14-2445	Finished
Ts254:204	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-4-1-1-1-1	14-2429	Finished
Ts254:205	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-5-1-1-1-1	14-1471	Finished
Ts254:207	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-7-1-1-1-1	14-1472	Finished
Ts254:208	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-8-1-1-1-1	14-2443	Finished
Ts254:209	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-9-1-1-1-1	14-1473	Finished
Ts254:210	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-10-1-1-1-1	14-1474	Finished
Ts254:212	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-12-1-1-1-1	14-1475	Finished
Ts254:216	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-16-1-1-1-1	15-0977	Finished
Ts254:217	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-17-1-1-1-1	15-0975	Finished
Ts254:219	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-19-1-1-1-1	14-2430	Finished
Ts254:220	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-20-1-1-1-1	14-1476	Finished
Ts254:221	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-21-1-1-1-1	14-1477	Finished
Ts254:227	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-27-1-1-1-1	14-2431	Finished
Ts254:232	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-32-1-1-1-1	14-1478	Finished
Ts254:233	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-33-1-1-1-1	14-1479	Finished

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
Ts254:236	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-36-1-1-1-1	14-1480	Finished
Ts254:237	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-37-1-1-1-1	14-1481	Finished
Ts254:241	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-41-1-1-1-1	15-1098	Finished
Ts254:242	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-42-1-1-1-1	14-1482	Finished
Ts254:245	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-45-1-1-1-1	14-1483	Finished
Ts254:246	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-46-1-1-1-1	14-1484	Finished
Ts254:247	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-47-1-1-1-1	14-2432	Finished
Ts254:248	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-48-1-1-1-1	14-1485	Finished
Ts254:250	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-50-1-1-1-1	14-1486	Finished
Ts254:251	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-51-1-1-1-1	14-1487	Finished
Ts254:254	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-54-1-1-1-1	14-2433	Finished
Ts254:256	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-56-1-1-1-1	14-2446	Finished
Ts254:257	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-57-1-1-1-1	14-1488	Finished
Ts254:259	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-59-1-1-1-1	14-1489	Finished
Ts254:260	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-60-1-1-1-1	14-1490	Finished
Ts254:262	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-62-1-1-1-1	14-2447	Finished
Ts254:263	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-63-1-1-1-1	14-1491	Finished
Ts254:269	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-69-1-1-1-1	14-1492	Finished
Ts254:270	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-70-1-1-1-1	14-1493	Finished
Ts254:272	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-72-1-1-1-1	14-1494	Finished
Ts254:274	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-74-1-1-1-1	15-1099	Finished
Ts254:276	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-76-1-1-1-1	14-2442	Finished
Ts254:277	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-77-1-1-1-1	14-2434	Finished
Ts254:278	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-78-1-1-1-1	14-2448	Finished
Ts254:280	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-80-1-1-1-1	14-1495	Finished
Ts254:281	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-81-1-1-1-1	15-0972	Finished
Ts254:282	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-82-1-1-1-1	14-1496	Finished
Ts254:283	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-83-1-1-1-1	14-1497	Finished
Ts254:284	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-84-1-1-1-1	14-1498	Finished
Ts254:285	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-85-1-1-1-1	14-1499	Finished
Ts254:288	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-88-1-1-1-1	14-1500	Finished
Ts254:291	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-91-1-1-1-1	15-0976	Finished
Ts254:292	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-92-1-1-1-1	15-1100	Finished
Ts254:293	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-93-1-1-1-1	14-2435	Finished
Ts254:294	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-94-1-1-1-1	14-1501	Finished
Ts254:295	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-95-1-1-1-1	15-0973	Finished
Ts254:296	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-96-1-1-1-1	14-2436	Finished
Ts254:297	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-97-1-1-1-1	14-1502	Finished
Ts254:303	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-103-1-1-1-1	14-1503	Finished
Ts254:304	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-104-1-1-1-1	14-1504	Finished
Ts254:305	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-105-1-1-1-1	14-2437	Finished
Ts254:307	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-107-1-1-1-1	15-1101	Finished
Ts254:308	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-108-1-1-1-1	14-1505	Finished

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
Ts254:309	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-109-1-1-1-1	14-2438	Finished
Ts254:310	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-110-1-1-1-1	14-1506	Finished
Ts254:311	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-111-1-1-1-1	15-1103	Finished
Ts254:312	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-112-1-1-1-1	15-1104	Finished
Ts254:313	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-113-1-1-1-1	14-1507	Finished
Ts254:317	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-117-1-1-1-1	14-2440	Finished
Ts254:318	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-118-1-1-1-1	14-2441	Finished
Ts254:321	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-121-1-1-1-1	14-1508	Finished
Ts254:324	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-124-1-1-1-1	14-1509	Finished
Ts254:325	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-125-1-1-1-1	14-1510	Finished
Ts254:326	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-126-1-1-1-1	14-1511	Finished
Ts254:327	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-127-1-1-1-1	14-1512	Finished
Ts254:328	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-128-1-1-1-1	15-0979	Finished
Ts254:330	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-130-1-1-1-1	14-2450	Finished
Ts254:331	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-131-1-1-1-1	14-1513	Finished
Ts254:332	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-132-1-1-1-1	14-1514	Finished
Ts254:333	F8	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-133-1-1-1-1-1	14-2817	Finished
Ts254:334	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-134-1-1-1-1	14-1516	Finished
Ts254:338	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-138-1-1-1-1	14-1517	Finished
Ts254:339	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-139-1-1-1-1	14-2451	Finished
Ts254:340	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-140-1-1-1-1	15-0978	Finished
Ts254:342	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-142-1-1-1-1	14-1518	Finished
Ts254:343	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-143-1-1-1-1	14-2439	Finished
Ts254:345	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-145-1-1-1-1	14-1519	Finished
Ts254:346	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-146-1-1-1-1	14-1520	Finished
Ts254:347	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-147-1-1-1-1	14-1521	Finished
Ts254:348	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-148-1-1-1-1	14-1522	Finished
Ts254:349	F7	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-149-1-1-1-1	15-0974	Finished
Ts254:100	F6	(Ts34/PI254744)F2-100-1-1-1	15-0956	On going
Ts254:111	F6	(Ts34/PI254744)F2-111-1-1-1	15-1097	On going
Ts254:083	F6	(Ts34/PI254744)F2-83-1-1-1	15-0959	On going
Ts254:238	F6	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-38-1-1-1	15-1105	On going
Ts254:249	F6	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-49-1-1-1	15-0971	On going
Ts254:279	F6	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-79-1-1-1	15-1110	On going
Ts254:200	F6	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-99-1-1-1	14-1540	On going
Ts254:303	F6	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-103-1-1-1	14-0422	On going
Ts254:075	F5	(Ts34/PI254744)F2-75-1-1	13-2106	On going
Ts254:118	F5	(Ts34/PI254744)F2-118-1-1	13-2123	On going
Ts254:004	F5	(Ts34/PI254744)F2-4-1-1	14-1466	On going
Ts254:314	F5	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-114-1-1	14-1551	On going
Ts254:243	F5	(Ts34/PI254744:F2:2nd)-43-1-1	14-0452	On going

(2) SBA와 DRD에 대한 RIL 집단양성

DRD계통의 종자크기는 매우 작은 TS(tomato seed size)로 SBA와의 분리세대에서 매우 작은 크기의 종자가 나와서 이러한 계통은 발아에 문제가 많아서 빠른 세대진전이 어려워 반복과중으로 세대진전된 계통을 확보하고자 노력하였고, 현재까지 SBA와 DRD간에 확보된 RIL집단은 F7 86계통이고(표 4-21), F6 13계통을 포함해서 45계통에 대해서는 2015년 9월에 태국의 콘깬 농장에서 과중하여 세대진전을 통해서 고정된 RIL집단을 확보하는 중이다.

표 4-21. SBA와 DRD간의 RIL집단

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
SbaDrd001	F7	SBA/DRD:F2-1-1-1-1-1	15-0789	Finished
SbaDrd005	F7	SBA/DRD:F2-5-1-1-1-1	15-0790	Finished
SbaDrd009	F7	SBA/DRD:F2-9-1-1-1-1	15-0791	Finished
SbaDrd019	F7	SBA/DRD:F2-19-1-1-1-1	15-0792	Finished
SbaDrd023	F7	SBA/DRD:F2-23-1-1-1-1	15-0793	Finished
SbaDrd024	F7	SBA/DRD:F2-24-1-1-1-1	15-0794	Finished
SbaDrd028	F7	SBA/DRD:F2-28-1-1-1-1	15-0795	Finished
SbaDrd031	F7	SBA/DRD:F2-31-1-1-1-1	15-0796	Finished
SbaDrd033	F7	SBA/DRD:F2-33-1-1-1-1	15-0797	Finished
SbaDrd038	F7	SBA/DRD:F2-38-1-1-1-1	15-0798	Finished
SbaDrd039	F7	SBA/DRD:F2-39-1-1-1-1	15-0799	Finished
SbaDrd048	F7	SBA/DRD:F2-48-1-1-1-1	15-0801	Finished
SbaDrd050	F7	SBA/DRD:F2-50-1-1-1-1	15-0802	Finished
SbaDrd052	F7	SBA/DRD:F2-52-1-1-1-1	15-0803	Finished
SbaDrd054	F7	SBA/DRD:F2-54-1-1-1-1	15-0804	Finished
SbaDrd055	F7	SBA/DRD:F2-55-1-1-1-1	15-0805	Finished
SbaDrd057	F7	SBA/DRD:F2-57-1-1-1-1	15-0806	Finished
SbaDrd058	F7	SBA/DRD:F2-58-1-1-1-1	15-0807	Finished
SbaDrd059	F7	SBA/DRD:F2-59-1-1-1-1	15-0808	Finished
SbaDrd062	F7	SBA/DRD:F2-62-1-1-1-1	15-0809	Finished
SbaDrd067	F7	SBA/DRD:F2-67-1-1-1-1	15-0810	Finished
SbaDrd076	F7	SBA/DRD:F2-76-1-1-1-1	15-0811	Finished
SbaDrd077	F7	SBA/DRD:F2-77-1-1-1-1	15-0812	Finished
SbaDrd079	F7	SBA/DRD:F2-79-1-1-1-1	15-0813	Finished
SbaDrd085	F7	SBA/DRD:F2-85-1-1-1-1	15-0814	Finished
SbaDrd093	F7	SBA/DRD:F2-93-1-1-1-1	15-0815	Finished
SbaDrd096	F7	SBA/DRD:F2-96-1-1-1-1	15-0816	Finished
SbaDrd101	F7	SBA/DRD:F2-101-1-1-1-1	15-0817	Finished
SbaDrd104	F7	SBA/DRD:F2-104-1-1-1-1	15-0818	Finished

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
SbaDrd107	F7	SBA/DRD:F2-107-1-1-1-1	15-0819	Finished
SbaDrd113	F7	SBA/DRD:F2-113-1-1-1-1	15-0820	Finished
SbaDrd115	F7	SBA/DRD:F2-115-1-1-1-1	15-0821	Finished
SbaDrd117	F7	SBA/DRD:F2-117-1-1-1-1	15-0822	Finished
SbaDrd125	F7	SBA/DRD:F2-125-1-1-1-1	15-0823	Finished
SbaDrd126	F7	SBA/DRD:F2-126-1-1-1-1	15-0824	Finished
SbaDrd128	F7	SBA/DRD:F2-128-1-1-1-1	15-0825	Finished
SbaDrd135	F7	SBA/DRD:F2-135-1-1-1-1	15-0826	Finished
SbaDrd138	F7	SBA/DRD:F2-138-1-1-1-1	15-0827	Finished
SbaDrd139	F7	SBA/DRD:F2-139-1-1-1-1	15-0828	Finished
SbaDrd142	F7	SBA/DRD:F2-142-1-1-1-1	15-0829	Finished
SbaDrd143	F7	SBA/DRD:F2-143-1-1-1-1	15-0830	Finished
SbaDrd144	F7	SBA/DRD:F2-144-1-1-1-1	15-0831	Finished
SbaDrd148	F7	SBA/DRD:F2-148-1-1-1-1	15-0832	Finished
SbaDrd150	F7	SBA/DRD:F2-150-1-1-1-1	15-0833	Finished
SbaDrd154	F7	SBA/DRD:F2-154-1-1-1-1	15-1272	Finished
SbaDrd154	F7	SBA/DRD:F2-154-1-1-1-1	15-1281	Finished
SbaDrd155	F7	SBA/DRD:F2-155-1-1-1-1	15-0834	Finished
SbaDrd156	F7	SBA/DRD:F2-156-1-1-1-1	15-0835	Finished
SbaDrd160	F7	SBA/DRD:F2-160-1-1-1-1	15-1273	Finished
SbaDrd162	F7	SBA/DRD:F2-162-1-1-1-1	15-0836	Finished
SbaDrd169	F7	SBA/DRD:F2-169-1-1-1-1	15-0837	Finished
SbaDrd171	F7	SBA/DRD:F2-171-1-1-1-1	15-0838	Finished
SbaDrd172	F7	SBA/DRD:F2-172-1-1-1-1	15-0839	Finished
SbaDrd175	F7	SBA/DRD:F2-175-1-1-1-1	15-0840	Finished
SbaDrd179	F7	SBA/DRD:F2-179-1-1-1-1	15-0841	Finished
SbaDrd180	F7	SBA/DRD:F2-180-1-1-1-1	15-0842	Finished
SbaDrd190	F7	SBA/DRD:F2-190-1-1-1-1	15-0843	Finished
SbaDrd192	F7	SBA/DRD:F2-192-1-1-1-1	15-0844	Finished
SbaDrd200	F7	SBA/DRD:F2-200-1-1-1-1	15-0845	Finished
SbaDrd201	F7	SBA/DRD:F2-201-1-1-1-1	15-0846	Finished
SbaDrd203	F7	SBA/DRD:F2-203-1-1-1-1	15-0847	Finished
SbaDrd206	F7	SBA/DRD:F2-206-1-1-1-1	15-0848	Finished
SbaDrd207	F7	SBA/DRD:F2-207-1-1-1-1	15-0849	Finished
SbaDrd211	F7	SBA/DRD:F2-211-1-1-1-1	15-0850	Finished
SbaDrd212	F7	SBA/DRD:F2-212-1-1-1-1	15-0851	Finished

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
SbaDrd214	F7	SBA/DRD:F2-214-1-1-1-1	15-0852	Finished
SbaDrd215	F7	SBA/DRD:F2-215-1-1-1-1	15-0853	Finished
SbaDrd216	F7	SBA/DRD:F2-216-1-1-1-1	15-0854	Finished
SbaDrd223	F7	SBA/DRD:F2-223-1-1-1-1	15-0855	Finished
SbaDrd226	F7	SBA/DRD:F2-226-1-1-1-1	15-0856	Finished
SbaDrd232	F7	SBA/DRD:F2-232-1-1-1-1	15-0857	Finished
SbaDrd234	F7	SBA/DRD:F2-234-1-1-1-1	15-0858	Finished
SbaDrd239	F7	SBA/DRD:F2-239-1-1-1-1	15-0859	Finished
SbaDrd242	F7	SBA/DRD:F2-242-1-1-1-1	15-0860	Finished
SbaDrd251	F7	SBA/DRD:F2-251-1-1-1-1	15-0861	Finished
SbaDrd257	F7	SBA/DRD:F2-257-1-1-1-1	15-0862	Finished
SbaDrd266	F7	SBA/DRD:F2-266-1-1-1-1	15-0863	Finished
SbaDrd268	F7	SBA/DRD:F2-268-1-1-1-1	15-0864	Finished
SbaDrd278	F7	SBA/DRD:F2-278-1-1-1-1	15-0865	Finished
SbaDrd283	F7	SBA/DRD:F2-283-1-1-1-1	15-0866	Finished
SbaDrd288	F7	SBA/DRD:F2-288-1-1-1-1	15-0867	Finished
SbaDrd292	F7	SBA/DRD:F2-292-1-1-1-1	15-0868	Finished
SbaDrd294	F7	SBA/DRD:F2-294-1-1-1-1	15-0869	Finished
SbaDrd296	F7	SBA/DRD:F2-296-1-1-1-1	15-0870	Finished
SbaDrd299	F7	SBA/DRD:F2-299-1-1-1-1	15-0872	Finished
SbaDrd300	F7	SBA/DRD:F2-300-1-1-1-1	15-0873	Finished
SbaDrd025	F6	SBA/DRD:F2-25-1-1-1	14-2587	On going
SbaDrd074	F6	SBA/DRD:F2-74-1-1-1	14-2609	On going
SbaDrd087	F6	SBA/DRD:F2-87-1-1-1	15-0880	On going
SbaDrd092	F6	SBA/DRD:F2-92-1-1-1	15-0875	On going
SbaDrd100	F6	SBA/DRD:F2-100-1-1-1	15-1274	On going
SbaDrd123	F6	SBA/DRD:F2-123-1-1-1	15-0883	On going
SbaDrd181	F6	SBA/DRD:F2-181-1-1-1	15-0888	On going
SbaDrd184	F6	SBA/DRD:F2-184-1-1-1	14-2650	On going
SbaDrd219	F6	SBA/DRD:F2-219-1-1-1	14-2665	On going
SbaDrd244	F6	SBA/DRD:F2-244-1-1-1	15-0905	On going
SbaDrd252	F6	SBA/DRD:F2-252-1-1-1	15-0892	On going
SbaDrd267	F6	SBA/DRD:F2-267-1-1-1	15-0893	On going
SbaDrd297	F6	SBA/DRD:F2-297-1-1-1	14-2684	On going
SbaDrd015	F5	SBA/DRD:F2-15-1-1	14-1603	On going
SbaDrd056	F5	SBA/DRD:F2-56-1-1	14-1624	On going
SbaDrd082	F5	SBA/DRD:F2-82-1-1	15-0912	On going

RIL ID	Generation	Pedigree	Seed ID	Remarks
SbaDrd136	F5	SBA/DRD:F2-136-1-1	15-0914	On going
SbaDrd157	F5	SBA/DRD:F2-157-1-1	14-1670	On going
SbaDrd161	F5	SBA/DRD:F2-161-1-1	15-0910	On going
SbaDrd174	F5	SBA/DRD:F2-174-1-1	15-0915	On going
SbaDrd183	F5	SBA/DRD:F2-183-1-1	14-2705	On going
SbaDrd221	F5	SBA/DRD:F2-221-1-1	15-0917	On going
SbaDrd235	F5	SBA/DRD:F2-235-1-1	15-0934	On going
SbaDrd274	F5	SBA/DRD:F2-274-1-1	14-1717	On going
SbaDrd003	F4	SBA/DRD:F2-3-1	14-0576	On going
SbaDrd010	F4	SBA/DRD:F2-10-1	14-1731	On going
SbaDrd042	F4	SBA/DRD:F2-42-1	15-0950	On going
SbaDrd046	F4	SBA/DRD:F2-46-1	14-0603	On going
SbaDrd078	F4	SBA/DRD:F2-78-1	14-1738	On going
SbaDrd091	F4	SBA/DRD:F2-91-1	14-0632	On going
SbaDrd127	F4	SBA/DRD:F2-127-1	14-0654	On going
SbaDrd133	F4	SBA/DRD:F2-133-1	14-0658	On going
SbaDrd140	F4	SBA/DRD:F2-140-1	14-0664	On going
SbaDrd185	F4	SBA/DRD:F2-185-1	14-1765	On going
SbaDrd218	F4	SBA/DRD:F2-218-1	15-0954	On going
SbaDrd222	F4	SBA/DRD:F2-222-1	14-1774	On going
SbaDrd230	F4	SBA/DRD:F2-230-1	15-0932	On going
SbaDrd240	F4	SBA/DRD:F2-240-1	14-1777	On going
SbaDrd241	F4	SBA/DRD:F2-241-1	14-1778	On going
SbaDrd265	F4	SBA/DRD:F2-265-1	14-1781	On going
SbaDrd281	F4	SBA/DRD:F2-281-1	14-0741	On going
SbaDrd293	F4	SBA/DRD:F2-293-1	14-1789	On going
SbaDrd004	F3	SBA/DRD:F2-4	13-1604	On going
SbaDrd006	F3	SBA/DRD:F2-6	13-1606	On going
SbaDrd068	F3	SBA/DRD:F2-68	13-1659	On going

2. 흰가루병저항성(PMR1) 관련 NIL 육성 및 품종개발

가. 흰가루병저항성(PMR1) 관련 NIL 육성NIL 육성

PI254744는 *C. lanatus*. ssp. *lanatus*로써 흰가루병 race1에 저항성을 갖고 있고 만고병에도 강한 저항성을 가지고 있어 매우 중요한 유전자원이다(그림 4-92). 본 연구에서는 PI254744의 흰가루병 저항성을 우량 계통에 도입하고자 다양한 계통에 여교잡을 수행하였다. 이를 통해 표 4-22와 같은 흰가루병에 저항성인 NIL(그림 4-93~4-95)이 완성되어 품종개발, 저항성육종을 위한 공여친으로 활용되고 있다.



그림 4-92. 저항성유전자원과 이병성계통의 저항성 차이

표 4-22. 여교잡으로 흰가루병 저항성이 도입된 계통

계통명	과형	호피	과중	세대	반복친
PMR254744SBBBC3F8	타원형	호피	6kg	BC3F8	SBB
PMR254744SBABC4F7	원형	호피	6kg	BC4F7	SBA
PMR25474445NCBC4F9	원형	호피	7kg	BC4F9	45NC

나. 흰가루병 저항성 품종육성

최근 하우스 시설재배가 주재배방법으로 되어 있고, 특히 기후가 온난화되면서 흰가루병의 발병양상이 점점 심해지는 경향을 보이면서 흰가루병에 대한 저항성품종 요구도가 높아지고 있다. 본 과제에서 개발된 NIL간의 조합(그림 4-96)은 유묘 및 성체접종결과 흰가루병에 대해서 감수성품종보다 매우 강한 것이 확인되었다. 다만 부계로 사용된 PMR254744SBBBC36계통이

야생종에서 온 열성특성, 즉 과피가 두껍고, 당도가 약간 낮은 특성을 보여주고 있어서 조합에서도 품질측면에서 당장 상업화하기에는 어려운 것으로 판단되었다. 따라서 이후에 본 과제에서 개발된 마커를 이용해서 여교잡을 2-3회 더 진행하여 저항성 품종개발을 진행할 계획이다.



그림 4-93. 흰가루병 저항성 계통 PMR254744SBBBC3F8



그림 4-94. 흰가루병 저항성 계통 PMR25474445NCBC4F9



그림 4-95. 흰가루병 저항성 계통 PMR254744SBBBC3F8

많은 작물에서 배수성이 증가되면서 dosage effect에 의해서 저항성이 강해지는 경향을 보여 주고 있고, 수박의 경우에 3,4배체에서 탄저병 저항성이 2배체보다 강해지는 것으로 확인되었다. 본 연구에서도 최근 점차 재배면적이 늘고 있는 3배체수박에도 흰가루병을 도입하고자 하였다. SBA의 흰가루병 NIL세대인 Pmr254744SBABC4F1(43,3,10)-4-6-2-1-2-1에 배수성도입을 위한 처리를 하여 4배체로 추정되는 과를 확인하여 종자를 획득하였으며 이후 연속된 2세대에서 종자, 과형,호피형태 등으로써 4배체임을 확인하였다. 이 계통(Pmr254744SBABC4F1(43,3,10)-4-6-2-1-2-1(4X)-2-2-2)은 향후 3배체 조합작성과 다른 4배체에 흰가루병 저항성을 도입하기 위한 재료로 유용하게 사용하고 있다(그림 4-96-4-98).



그림 4-96. 흰가루병 저항성 조합(PMR254744SBABC4F5 x PMR254744SBBBC3F6)

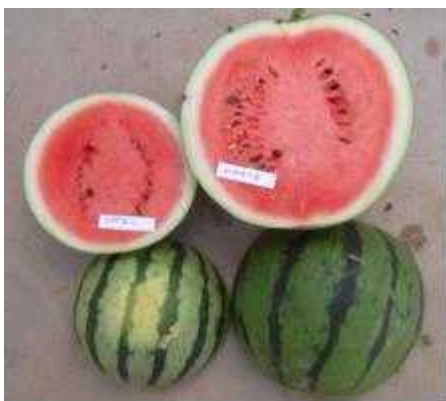


그림 4-97. T0세대의 과



그림 4-98. T2세대의 과

다. 흰가루병 유전자원 탐색 및 유전양식 탐색

현재 흰가루병에 저항성을 가지고 있어 저항성자원으로 사용되고 있는 Arka Manik, 그리고 본 과제에서 저항성을 가진 것으로 확인된 PI254744, PI189225, 그리고 본 과제에서 유전자지도 작성을 위해서 사용된 흰가루병 이병성인 TS와의 F1 등에 대해서 유묘검정을 20일 간격을 두고 2차에 걸쳐서 실시하였다.

1차와 2차 접종결과(표 4-23, 4-24)는 동일한 양상을 보여주었다. Arka Manik의 경우 접종결과 저항성을 보여주었고, TS와의 F1에서는 이병성을 보여 저항성은 열성임을 재확인하였다. PI254744는 유묘에서 저항성을 보였고, TS와의 F1에서도 동일한 정도의 저항성을 나타내어 저항성이 우성으로 작용함을 확인하였다. 또한, PI189225의 경우에도 PI254744와 동일하게 F1에서도 저항성을 보여 저항성이 우성임을 확인하였다(그림 4-99~4-101).

표 4-23. 흰가루병 유묘접종결과(1차)

번호	계통명	세대	접종결과
5101	Arka Manik	저항성계통	R
5102	Arka Manik x TS	F1	S
5103	PI254744	저항성계통	R
5104	PI254744 x TS	F1	R
5105	PI189225	저항성계통	R
5106	PI189225 x TS	F1	불발아

표 4-24. 흰가루병 유묘접종결과(2차)

번호	계통명	세대	접종결과
5201	Arka Manik	저항성계통	R
5202	Arka Manik x TS	F1	S
5203	PI254744	저항성계통	R
5204	PI254744 x TS	F1	R
5205	PI189225	저항성계통	R
5206	PI189225 x TS	F1	R



그림 4-99. Arka Manik(좌), TS의 F1(우) 유묘접종결과



그림 4-100. PI254744(좌), TS의 F1(우) 유묘접종결과



그림 4-101. PI189225(좌), TS의 F1(우) 유묘접종결과

라. 흰가루병 표현형분석을 위한 분리집단 시료 제공

PI254744가 갖고 있는 흰가루병 저항성유전자와 연관된 마커개발을 주관기관에서 수행하고 있는 바, F3 검정을 통한 F2 표현형 분석을 위해서 관련 양친 및 F3 시료를 주관기관에 제공하였으며, 본 과제를 통해 저항성임이 확인된 PI189225의 F1 및 BC1F1종자도 같이 제공되었다 (표 4-25).

표 4-25. 주관기관에 제공한 표현형검정을 위한 계통 및 분리세대 리스트

번호	계통명	세대	비고
5701	TS	이병성친	
5702	PI254744	저항성친	
5703	TS x PI254744	F1	
5704	TS x PI254744 x TS	BC1F1(P1)	
5705	TS x PI254744 x PI254744	BC1F1(P2)	
5706~5866	TS x PI254744	F2	161 점
5867	PI189225	저항성친	
5868	PI189225 x TS	F1	
5869	PI189225 x PI189225 x TS	BC1F1(P2)	

마. 흰가루병 유전자원들의 allelism test를 위한 분리집단 양성 및 표현형 조사

당해년도에 자사 연구소 포장에서 자연 발병한 흰가루병균을 수집하여 다양한 계통 및 분리집단에 유묘에 접종한 결과가 표 4-26에 나와 있다. 3601~3604는 흰가루병의 race판별을 위해 사용되는 멜론 판별품종이다. 유묘검정결과 Top Mark에서만 병반이 관찰되고 PMR 45, PMR 6, PMR 1에서는 저항성을 보였다. 이 결과는 작년과 동일하였으며 따라서 흰가루병 균주는 race1임이 재확인되었다. 흰가루병 판별품종을 이용하여 2013년부터 현재까지 김해, 부여, 장호원, 안성 등에서 수집된 모든 균주는 race1으로 판명되어 국내에는 race1이 우점하는 것으로 판단된다. #3656은 PI254744의 저항성유전자를 SBA라는 계통에 여교잡으로 도입한 BC4F7세대로 저항성으로 확인되었다. 현재 저항성친으로 확인된 Arka Manik, PI254744, PI189225의 경우 유전양상 및 저항성양상이 약간 상이하다. Arka Manik의 경우 저항성이 열성으로 확인되었고, PI254744와 PI189225의 경우에 저항성이 우성으로 작용하며, PI189225의 경우 하배축에도 포자형성이 억제되는 경향을 보여주었다.

표 4-26. 판별품종 및 주요 유전자원, 분리집단에서의 흰가루병 유묘접종 결과

번호	계통명	세대	저항성	비고
3601	Top Mark	Fixed	S	판별품종
3602	PMR45	Fixed	R	판별품종
3603	PMR6	Fixed	R	판별품종
3604	PMR1	Fixed	R	판별품종
3656	Pmr254744-SBABC4F7(2)	Fixed	R	저항성계통
3673	PI254744	Fixed	R	저항성친
3674	Arka Manik	Fixed	R	저항성친
3675	PI189225	Fixed	R	저항성친
3676	Pmr254744-SBABC5F2	F2	분리	
3677	Arka Manik x PI254744	F1	R	
3678	Arka Manik x PI254744	F2	분리	
3679	Arka Manik x PI254744 x Arka Manik	BC1F1	분리	
3680	Arka Manik x PI254744 x PI254744	BC1F1	분리	
3681	Arka Manik x PI189225	F2	분리	
3682	Arka Manik x PI189225	F1	R	
3683	Arka Manik x PI189225 x Arka Manik	BC1F1	분리	
3684	Arka Manik x PI189225 x PI189225	BC1F1	분리	
3685	SBA	Fixed	S	
3688	TS	Fixed	S	
3689	TSxPI254744	Fixed	R	
3690	TS x PI254744 x TS	BC1F1	분리	
3691	TS x PI254744 x PI254744	BC1F1	분리	
3692	TS x PI254744	F2	분리	
3693	PI189225 x TS	F1		포자형성
3694	PI189225 x PI189225 x TS	BC1F1	분리	
3695	TS x PI189225 x TS	Fixed	분리	
3696	PI189225 x TS	F2	분리	

3. 종자크기결정 형질 관련 NIL 육성

현재까지 확인된 수박의 종자크기는 본 협동연구 책임자의 박사학위 논문을 통해 GS, BS, NS, SS, MS, TS로 보고되었다. 다양한 종자크기는 씨앗용 수박, 씨없는 수박, 씨앗 껍데 먹는 수박을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있는 형질이다. 본 연구에서는 상업적으로 의미가 큰 NS, SS, MS, TS의 종자크기에 대한 NIL을 작성하여 종자크기에 대한 연관 분자마커개발, 생리적 특성 연구에 활용하고자 주관기관에 제공하였다(표 4-27). 또한 각 종자크기에 대한 NIL종자는 특허출원을 위한 한국생명공학연구원에 종자를 기탁하여 향후 타 연구자의 연구에 활용하도록 하였다.

표 4-27. 각 종자크기에 대한 NILs

NIL ID	Seed Size	Seed ID	Pedigree	특허기탁번호
NT(NS)BC4F6	NS	15-0319	SszNTBC4F2-14-2-1-1-1	KCTC18406P
NT(SS)BC4F9	SS	14-3079	SszNTBC4F2-15-2-3-4-1-8-2-1	KCTC18407P
NT(MS)BC4F9	MS	14-3080	SszNTBC4F2-7-1-1-3-3-2-2-1	KCTC18405P
NT(TS)BC4F9	TS	14-3081	SszNTBC4F2-3-2-1-7-5-2-1-0	KCTC18408P

가. NS 크기의 고정

2차년도에 고정된 것이 확인된 F6세대를 2013년 우기, 2013년 건기 및 2014년 여름작형에서 세대를 진전시켜 보다 homozygous한 계통을 육성하였다. 세 작기 모두에서 종자크기는 분리하지 않고 NS크기를 보여주어 고정된 것이 재확인되었다(표 4-28, 그림 4-102).

표 4-28. NS크기의 NIL 고정

계통명	작기	종자크기
SszNTABC4F2-14-2-1-1-1	03우기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-2	03우기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3	03우기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-4	03우기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-5	03우기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-6	03우기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3-1	03건기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3-2	03건기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3-3	03건기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3-4	03건기	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3-2-1	04여름	NS
SszNTABC4F2-14-2-1-1-3-2-2	04여름	NS



그림 4-102 . NS크기로 고정된 NIL집단(좌:2013건기, 우:2014여름)

나. SS 크기의 고정

SS크기의 고정을 위해 2013년 우기에 2계통 11개체를 전개한 결과 종자크기가 완전히 고정되지 않음이 확인되었다. 이어진 2013년 건기작형에서 4계통 32개체를 전개하여 그중에서 3계통에서 종자크기가 SS크기로 고정된 것이 확인되었다. 이어진 2014년 여름작형에서 3계통 8개체를 전개한 결과 SS크기로 고정된 것이 재확인되었다(표 4-29, 그림 4-103).

표 4-29. SS크기의 NIL 고정

계통명	작기	종자크기
SszNTABC4F2-15-2-1-1-1	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-1-1-2	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-1-1-3	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-1-1-4	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-1-1-5	03우기	TS
SszNTABC4F2-15-2-1-1-6	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-2	03우기	NS/SS?
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5	03우기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-1	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-2	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-3	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-4	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-5	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-6	03건기	SS

계통명	작기	종자크기
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-7	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-8	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-1	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-2	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-3	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-4	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-5	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-6	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-7	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-3-8	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-1	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-2	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-3	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-4	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-5	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-6	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-7	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-8	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-1	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-2	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-3	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-4	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-5	03건기	SS/MS?
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-6	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-7	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-8	03건기	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-8-1	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-8-2	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-1-8-3	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-4-1	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-4-2	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-4-4-3	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-6-1	04여름	SS
SszNTABC4F2-15-2-3-4-5-6-2	04여름	SS



그림 4-103. SS크기로 고정된 NIL집단좌;2013년 건기, 우:2014여름)

다. MS 크기의 고정

2013년 여름작형에서 고정된 1계통을 2013년 우기에서 6개체 건개결과 모두 MS크기로 확인되었고, 2013년 건기, 2014년여름작형에서도 MS 크기가 분리하지 않음을 확인하였다.(표 4-30, 그림 4-104).

표 4-30. MS크기의 NIL 고정

계통명	작기	종자크기
SszNTABC4F2-7-1-1-3-1	03우기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-2	03우기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3	03우기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-4	03우기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-5	03우기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-6	03우기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3-1	03건기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3-2	03건기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3-3	03건기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3-4	03건기	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3-2-1	04여름	MS
SszNTABC4F2-7-1-1-3-3-2-2	04여름	MS



그림 4-104. MS크기로 고정된 NIL집단(좌:2013년 건기, 우:2014여름)

라. TS 크기의 고정

전년도에 TS크기로 고정된 것이 확인된 1계통을 5주 전개한 결과 모두 TS크기를 보여주었으며, 이어진 2013년 건기, 2014년 여름작형에서도 모두 분리하지 않고 TS크기를 보여주어 종자 크기가 TS로 고정된 NIL을 확보하였다(표 4-31, 그림 4-105).

표 4-31. TS크기의 NIL 고정

계통명	작기	종자크기
SszNTABC4F2-3-2-1-7-1	03우기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-2	03우기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-3	03우기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-4	03우기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5	03우기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-6	03우기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5-1	03건기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5-2	03건기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5-3	03건기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5-4	03건기	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5-2-1	04여름	TS
SszNTABC4F2-3-2-1-7-5-2-2	04여름	TS



그림 4-105. TS크기로 고정된 NIL집단(좌;2013건기, 우:2014여름)

마. 씨앗채 먹는 수박 개발

수박의 씨앗을 MS크기로 줄여서 씨앗 채 먹어도 전혀 부담이 없는 일명 micro-seeded watermelon이 유럽 등에서 재배가 확산되고 있으며, 국내에서도 소과종에 대한 요구도가 높아지면서 씨앗이 작은 수박의 개발필요성이 인식되고 있다. 본 연구과정에 씨작은 수박에 대한 개발의 필요성을 인식하여 종자의 크기가 MS인 “씨자근” 수박을 개발하여 품종보호출원하여 국내외에 보급하고 있으며 2014년부터 스페인에 kg당 4,444불의 고단가로 수출을 하고 있으며 2015년 10월 현재 3kg의 수출요청을 받았고, 2016년 10월까지 10kg의 수출계약을 확보하였다.

표 4-32. 씨자근수박(AP-11) 수출현황

수출대상국	수출대상회사	수출일	수출금액 (USD)
스페인	INTERSEMILLARS S.A.	2014년 12월 9일	889
스페인	INTERSEMILLARS S.A.	2014년 12월 16일	5,999
스페인	INTERSEMILLARS S.A.	2015년 5월 11일	667
계			7,555

향후, 1세부과제에서 개발된 마커를 활용하여 지속적으로 다양한 육종재료를 활용하여, 흰가루병 저항성이며 과실크기가 작은 씨앗채 먹는 수박품종 등의 신품종 개발을 기대하고 있다.

민원인을 가족같이, 민원을 내일같이	
봉지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.	
담당자: 김민지 전화: (054) 912-0113 FAX: (054) 912-0210	
인터넷 홈페이지: www.sced.go.kr	
740-220	경상북도 김천시 혁신8로 119

품종보호출원번호 통지서

출원일자: 2015. 5. 8	품종보호 출원번호: 출원 2015 - 388
	품종명칭 출원번호: 명칭 2015 - 827

작 품 명: 수박
 품종 명칭: 씨자근
 출 원 안: 파트너종묘
 주 소: 경기 안성시 비양면후평리 269-20

2015년05월08일

국립종자원

그림 4-106. 씨자근수박 품종보호출원통지서

씨작은 수박(품종명: 씨자근수박)
 누구나 손쉽게 키울 수 있는 수박



보통수박



씨작은 수박

씨기 길어 편리민감,
 씨 개 먹어 양민감
 오리이이 교육용으로 최고

내 손으로 키워 먹는 기쁨있애움
 2~3kg 소형수박
 한 포기 길 3~4개 작과



파트너종묘 Partner Seed "고부가가치 기능성 수박 육종 전문"

그림 4-107. 씨자근수박 홍보자료

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성 (제1세부)	마커용 EST-SSR, gSSR primer set 정보획득 및 선발	100	- EST-SSR, gSSR 등 sequence, primer set 결정 - ICUGI의 EST-SSR, 수박 BAC-end sequencing에서 확보, 오이 전체게놈 염기서열에서 확보하는 transferable SSR - GenBank를 비롯한 다양한 data를 대상으로 실시간 SSR 분석 - Mapping 집단의 모부분에 대한 SSR 마커로 사용가능 여부를 agarose gel에서 확인
		흰가루병저항성(PMR1) 선발 마커 탐색 시작	100	-흰가루병 race판별 및 병검정 방법의 확립 - PMR1 관련 마커 선발을 위하여 RAPD 또는 AFLP, SSR, SNP 적용 및 탐색 시작
	수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 계통육성 및 유전자지도 작성용 집단 양성 (제1협동)	Mapping population 육성 및 유전자 지도작성용 RIL집단 육성	130	- 태국에서 mapping 집단에 이용되는 Mapping 계통 P1 (PI189225), P2 (Ts), F1의 작성, F2 전개, 특성조사 수행
		흰가루병저항성(PMR1) 관련 NIL 육성	100	- PMR1 관련 NIL (현재 BC4F2)의 F3 분리를 평가하고, homozygote를 선발하여 NIL 육성 - 흰가루병에 대한 유묘, 성체 선발을 하여 저항성을 확인하고 종자 및 잎 시료를 중앙대에 제공함.
		종자크기결정 형질 관련 NIL 육성	100	- BC3F5를 진전, BC4F4를 전개

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	수박의 종자크기 와 흰가루병저항 성 관련 분자마 커 개발 및 연관 유전자지도 작성 (제1세부)	유전자지도 작성을 위한 생 물정보학적 분자마커 탐색 및 적용	100	유전자 지도 작성을 위한 모부분개체에 대한 re-sequencing으로 SNP, SSR에 대한 생물정보학적 정보획득, 분석, 마커도출 및 HRM과 gel data 제시
		유전자지도 초안 작성	100	-PI189225 x Ts 집단의 분자마커 탐색으로 얻어진 결과를 적용한 유전자지도 초안 작성 --유전자지도용 모부분의 resequencing -GBS방법 적용을 통한 유전자지도 작성을 개시
		NIL을 이용한 PMR1 관련 분 자마커 개발	100	-NIL 집단 (SBBxPI254744, 45nc x PI254744)의 흰가루병저항성 (PMR1) 분자마커 개발 및 표현형 확증 가능성 탐색
	수박의 종자크기 와 흰가루병저항 성 관련 계통육 성 및 유전자지 도 작성용 집단 양성 (제1협동)	유전자 지도 작성용 집단양 성 및 RIL작성	100	(PI0189225 x TS)F2 300개체를 재전개하여 195개체의 F3종자 를 확보함. (PI254744 x TS)F2 125개체를 전개하여 68개체의 F3종자를 확보하였고, 추가로 150개체를 재전개 (SBB x PI254744)F1 작성함 (45NC x PI254744)F1 작성함 (Crimsonsweet x TS)F1을 작성 하였고, F2 전개
		흰가루병저항성(PMR1) 관련 NIL 육성	100	흰가루병에 대한 유묘, 성체선 발을 하여 저항성을 확인하고 종자 및 잎 시료를 중앙대에 제 공함. SBB BC5F2 종자를 확보하였 고, 이를 중앙대에 제공함
		종자크기관련 NIL 육성	100	NS, SS, MS, TS종자크기 BC4S4 세대를 확보하였고, NS, MS, TS에서 고정됨을 확인

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2013)	수박의 종자크기 와 흰가루병저항 성 관련 분자마 커 개발 및 연관 유전자지도 작성 (제1세부)	PMR1 분자마커 확보 및 마커시험	100	-PMR1 분자마커 개발 완료 -PMR1 마커 확증을 위한 NIL-F2세대 및 교배집단의 표현형 검정
		유전자지도 작성 (2차)	100	-PI189225 x Ts 집단의 F2:3세대에서 분자마커 적용을 통해 SNP 유전자지도 작성 -GBS방법 적용을 통한 유전자지도 작성
		NIL을 활용한 종자크기관련 분자마커개발 시작	100	-육성이 완료된 종자크기관련 NIL계통들 (TS, MS, NS)에 대한 분자마커 개발 시작
	수박의 종자크기 와 흰가루병저항 성 관련 계통육 성 및 유전자지 도 작성용 집단 양성 (제1협동)	유전자 지도 작성용 집단양 성 및 RIL작성	100	(TS x PI254744)F2 재전개 (TS x PI254744)F3, F4 세대진 전 (Crimsonsweet x TS) F2~F4전 개,
		흰가루병저항성(PMR1) 관련 NIL 육성	100	NIL population의 종자 및 잎시 료 제공 관련 계통, 조합, 분리세대의 phynotyping
		종자크기관련 NIL 육성	100	NS, SS, MS, TS종자크기 BC4S5~S6세대 고정화

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4차 년도 (2014)	수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성 (제1세부)	PMR1 분자마커 확보 및 마커시험	100	-PMR1 분자마커 개발 완료 -타 교배집단에 대한 시험 완료
		유전자지도 작성 (2차)	100	-QTL용 고밀도 유전자지도 작성
		NIL을 활용한 종자크기관련 분자마커개발 시작	100	- 육성이 완료된 종자크기관련 NIL계통들 (TS, MS, NS)에 대한 QTL 분자마커 탐색 및 검증
	수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 계통육성 및 유전자지도 작성용 집단양성 (제1협동)	유전자 지도 작성용 집단양성 및 RIL작성	100	(TS x PI254744)F7의 RIL 작성 (SBA x DRD)F4~F6 세대진전
		흰가루병저항성(PMR1) 관련 NIL 육성	100	NIL population의 종자 및 잎시료 제공, 각 저항성재료들간의 분리세대 전개 및 표현형분석
		종자크기관련 NIL 육성	100	NS, SS, MS, TS종자크기 관련 개발된 마커의 validation

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

1. 수박의 고밀도 연관유전자지도 작성

수박의 고밀도 연관유전자지도의 작성은 그 학술적 의미 외에도 수박 육종분야에서 다양한 대립유전자의 집적시 반드시 필요한 형질연관 분자마커의 개발에 핵심적인 부분이다.

본 연구과제에서는 코넬대학교 협력하여 수박에서 GBS 방법에 기반한 연관유전자지도 작성을 시작한 바 있으며, 현재 자체적으로 GBS library를 제작하여 sequencing후 서열분석이 가능한 상태이다. 이에 따라, 국내에서는 처음으로 수박의 GBS 분석 방법을 확립하여 이 분야의 complexity reduced sequencing에 기여하였다.

GBS 방법의 확립에 따라 수박 자원 내에서 보여지는 낮은 수준의 분자적 다양성을 극복하여 대량의 SNP 다형성 마커를 확보할 수 있게 되었고, sequencing 그 자체로 genotyping을 수행할 수 있어, 단기간에 낮은 단가로 고밀도 연관유전자지도 작성이 가능한 기틀을 마련하였다. 최근에는 국내에서도 다양한 작물에서 GBS 방법을 통한 유전자지도 작성, GWAS 분석 등의 SNP 기반 분자적 다형성을 이용한 대립유전자 및 LD (linkage disequilibrium) 분석이 이루어지고 있다.

2. 수박의 흰가루병 저항성 분자마커 개발

수박의 흰가루병은 전 세계적으로 과실의 수확량 및 품질에 피해를 주는 절대활물기생 진균병으로 육종분야에서는 현재까지 다양한 흰가루병 저항성 자원 및 그 유전분석이 이루어져 왔다. 본 연구팀은 국내에서 발생하는 PM-1W에 대한 연구를 통하여 현재 국내에 만연한 흰가루병의 속이 *Podospaera* 이며, 박과식물에 빈발하고 있는 타 속인 *Golovinomyces*와 구분할 수 있는 방법을 확립하였고, race 판별 방법을 제시하여 흰가루병 저항성에 대한 객관성을 확보하였다.

또한, PM-1W 저항성 자원 탐색으로 PI 254744를 공시하고 이에 대한 SCAR 및 CAPS 마커를 개발하였고, QTL 분석을 통하여 연관군들에서의 저항성 형질 유전자좌의 범위를 결정하였으며 (0.8 cM이내의 분자마커 범위), SNP 기반 근접 분자마커를 개발하여 F2:3세대에서 매우 높은 연관도(0.1 cM 이내)를 보이는 결과를 얻었다.

이 연구결과는 현재 특허출원하였으며 세계적인 경쟁력을 갖고 있는 것으로 판단되며, 국내 타 연구팀이 개발한 Arka Manic 자원의 저항성 대립유전자 연관마커와 함께, 육종회사들의 흰가루병 저항성 MAS용 마커로서 활용이 가능할 것으로 생각된다.

3. 수박 종자크기 관련 분자마커 개발

수박의 종자크기는 수박 유전자원별로 크기가 다양한데, 특징적인 것은 계통별로 한 과실 내에서 만들어지는 종자의 크기는 매우 일정하며, 전체 유전자원을 대상으로 할 때, GS (giant

seed), BS (big seed), NS (medium seed), SS (small seed), MS (micro seed), TS (tomato seed)의 순서로 크기에 따른 분류가 보고되어 있다. 수박 종자의 크기는 종자의 생산성과도 관련이 커서 크기가 작을수록 과실당 종자생산량은 증가하는 경향을 뚜렷하게 나타낸다. 특히, TS (가장 작은 크기의 종자크기 범위) 크기는 수박의 섭취시 과육과 같이 섭취하여도 섭취 거부감이 매우 적어 동남아 등지에서 각광받고 있으며, SS 크기의 수박종자를 생산할 수 있으면, 3배체 수박 (씨없는 수박)의 종자생산성도 향상시킬 수 있다. 따라서, 수박 육종 및 채종에 있어 종자의 크기에 대한 유전분석은 매우 중요하며, 종자크기에 연관된 분자마커를 확보할 경우, 수박의 과실을 획득할 때까지의 재배기간 없이, 어린 식물생장시기에 분자마커로 미리 종자크기를 판별할 수 있는 장점이 있다.

본 연구과제에서는 수박 종자크기가 가장 작은 자원인 TS3344와 가장 큰 종자크기를 보여주는 PI 189225를 대상으로 QTL 분석을 수행하였고, 염색체 2번과 6번에서 major QTL을 얻을 수 있었다. 또한, 4가지 종자크기(NS, SS, MS, TS)가 고정된 계통들에 대한 whole genome resequencing을 통하여 각 크기별로 SNP기반의 분자마커를 개발하고 특허출원하였다. 종자크기가 가장 작은 TS 크기의 계통은 협동과제의 상업용 품종특허출원에 사용되어 시판품종(‘씨자근’ 수박)의 출원에 기여한 바 있다.

현재 유럽을 중심으로 섭취시 거부감이 없는 씨작은 수박품종들이 출시되고 있으며, 소비자들은 매우 높은 선호도를 보이고 있으나, 아직 분자마커에 대한 발표는 없는 실정이다. 향후, 본 연구과제에서 개발된 종자크기별 분자마커는 세계적인 경쟁력을 갖는 품종개발에 일익을 담당할 것으로 판단하고 있다.

4. Shuttle breeding 체계 확립 및 RIL 집단 제공

본 연구과제를 수행하는 동안 협동과제에서 작성한 연구 자원 및 집단은 모두 처음부터 모부분에서 출발하여 다양한 F2 분리집단을 새로이 양성하였다. 단기간에 이들 집단양성과 표현형 검정이 가능하고, RIL 양성이 짧은 기간 내에 효율적으로 이루어진 것은, 한국에서는 1세대/1년의 세대진전이 이루어지고 높은 노동단가로 가능한 수박 육종연구가, 태국에서는 1년에 2~3 세대의 진전 (seed to seed)이 이루어져 매우 효율적인 한국-태국 간의 shuttle breeding을 수행할 수 있었기 때문이다. 따라서, 향후 수박을 비롯한 박과식물 관련 연구에서는 shuttle breeding 연구체계가 필요할 것으로 판단된다.

또한, 협동과제에서는 국내 수박 유전 및 유전체 연구에 기여할 수 있는 RIL을 2집단을 양성하여 F2 집단과는 달리 영속적 표현형/유전자형 분석이 가능한 기반을 구축하였다. 개발된 RIL 집단은 유전자형이 고정되어 있으므로 유전자지도 및 QTL 분석 등에 적극적으로 활용될 수 있어 향후 수박 연구그룹들과 공유하여 관련분야 기술발전에 기여할 수 있을 것으로 기대하.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

가. 연구성과 목표 및 달성실적

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술 이전	사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술 창업	매출 창출	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	3	-	1	-	-	-	-	-	3	4	-	-	-	1			
연구기간 내 달성실적	5		3	1		1			3	-	3		4	2			
달성율(%)	167		300	200		100			100	-	300		400	200			

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자		학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자				
2014	Infectivity and complete nucleotide sequence of cucumber fruit mottle mosaic virus isolate Cm cDNA	Sun-Ju Rhee	Gung Pyo Lee	Arch Virol	159: 1807-1811	국외	SCI
2015	Construction of a genetic linkage map using a frame set of simple sequence repeat and high-resolution melting markers for watermelon (<i>Citrullus</i> spp.)	Sun-Ju Rhee	Gung Pyo Lee	Hortic. Environ. Biotechnol.	56(5) 669-676	국외	SCIE
2015	Transcriptome profiling of differentially expressed genes in floral buds and flowers of male sterile and fertile lines in watermelon	Sun-Ju Rhee	Gung Pyo Lee	BMC Genomics	16: 914	국외	SCIE

다. 지식재산권 (특허 성과)

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	신규한 오이과실모틀모자이크바이러스 유래 서브 게놈 프로모터와 발현백터 제작 및 이의 응용	중앙대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0041785
2015	수박 흰가루병 저항성 개체 판별용 분자마커 및 이의 응용	중앙대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0145359
2015	수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 이용	중앙대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0145360
2015	수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 이용	중앙대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0145853

라. 지식재산권 (국내용 품종 생산판매신고 및 품종보호출원)

품종보호출원			
출원연도	품종보호출원 품종명	출원인	품종보호출원 번호
2015	씨자근 수박	파트너종묘	2015-388

마. 기술이전

- 3건, 총 2천만원 기술이전 계약 완료

기술이전계약서

■ 계약명 : "수박 흰가루병 저항성 개체 판별용 분자 마커 및 이의 응용"에 10-2015-0145359호가 통상실시권 부여 계약

2015년 11월 10일

계약당사자
"갑" : 서울특별시 동대문구 회기동 1로 제131호 중앙대학교 산학협력단
"을" : 경기도 고양시 덕양구 흥왕사 288-1 가 101 중앙대학교 산학협력단
대표자 : 김문호 (중앙대 산학협력단장) / 김문호 (중앙대 산학협력단장)
담당자 : 김문호 (중앙대 산학협력단장) / 김문호 (중앙대 산학협력단장)
연락처 : 02-950-0284 / 02-950-0284
이메일 : kimw@cau.ac.kr / kimw@cau.ac.kr

<계약내용의 요약>

계약명 : "수박 흰가루병 저항성 개체 판별용 분자 마커 및 이의 응용" 통상 실시권 부여

기 술 1. 특허권

출원번호	발명의 명칭	출원인	발명자
10-2015-0145359호	수박 흰가루병 저항성 개체 판별용 분자 마커 및 이의 응용	중앙대학교 산학협력단	김문호

대금지급 1. 결핵기준료

구분	금액 (단위 : ₩1000)	지급일	기타
1. 계약금	4,800,000	2015.11.30.	100%
2. 후금	2,200,000	2016.10.31.	50%
합계	7,000,000		

기 간 : 2015.11.10 ~ 2020.11.09 (50개월)

기술이전계약서

■ 계약명 : "수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 응용"에 10-2015-0145360호가 통상실시권 부여 계약

2015년 11월 10일

계약당사자
"갑" : 서울특별시 동대문구 회기동 1로 제131호 중앙대학교 산학협력단
"을" : 경기도 고양시 덕양구 흥왕사 288-1 가 101 중앙대학교 산학협력단
대표자 : 김문호 (중앙대 산학협력단장) / 김문호 (중앙대 산학협력단장)
담당자 : 김문호 (중앙대 산학협력단장) / 김문호 (중앙대 산학협력단장)
연락처 : 02-950-0284 / 02-950-0284
이메일 : kimw@cau.ac.kr / kimw@cau.ac.kr

CAU

<계약내용의 요약>

계약명 : "수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 응용" 통상실시권 부여 계약

기 술 1. 특허권

출원번호	발명의 명칭	출원인	발명자
10-2015-0145360호	수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 응용	중앙대학교 산학협력단	김문호

대금지급 1. 결핵기준료

구분	금액 (단위 : ₩1000)	지급일	기타
1. 계약금	2,800,000	2015.11.30.	100%
2. 후금	2,400,000	2016.10.31.	50%
합계	5,200,000		

기 간 : 2015.11.10 ~ 2020.11.09 (50개월)

기술이전계약서

■ 계약명 : "수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 응용"에 10-2015-0145853호가 통상실시권 부여 계약

2015년 11월 10일

계약당사자
"갑" : 서울특별시 동대문구 회기동 1로 제131호 중앙대학교 산학협력단
"을" : 경기도 고양시 덕양구 흥왕사 288-1 가 101 중앙대학교 산학협력단
대표자 : 김문호 (중앙대 산학협력단장) / 김문호 (중앙대 산학협력단장)
담당자 : 김문호 (중앙대 산학협력단장) / 김문호 (중앙대 산학협력단장)
연락처 : 02-950-0284 / 02-950-0284
이메일 : kimw@cau.ac.kr / kimw@cau.ac.kr

CAU

<계약내용의 요약>

계약명 : "수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 응용" 통상실시권 부여 계약

기 술 1. 특허권

출원번호	발명의 명칭	출원인	발명자
10-2015-0145853호	수박 종자 크기 판별용 분자 마커 및 이의 응용	중앙대학교 산학협력단	김문호

대금지급 1. 결핵기준료

구분	금액 (단위 : ₩1000)	지급일	기타
1. 계약금	3,000,000	2015.11.30.	100%
2. 후금	2,400,000	2016.10.31.	50%
합계	5,400,000		

기 간 : 2015.11.10 ~ 2020.11.09 (50개월)

바. 기타

1) 제품화



2) 매출창출

2014년부터 스페인에 kg당 4,444불의 고단가로 수출을 하고 있으며 2015년 10월 현재 3kg의 수출요청을 받았고, 2016년 10월까지 10kg의 수출계약을 확보

[씨작은수박(AP-11) 수출현황]

수출대상국	수출대상회사	수출일	수출금액(USD)
스페인	INTERSEMILLARS S.A.	2014년 12월 9일	889
스페인	INTERSEMILLARS S.A.	2014년 12월 16일	5,999
스페인	INTERSEMILLARS S.A.	2015년 5월 11일	667
계			7,555

3) 홍보전시

- “씨앗째 먹는 씨자근 수박품종 개발” 한국농업신문 2015.11.10.
- “수박흰가루병 저항성 유전자 정보 밝혀져” 한국농업신문 2015.11.17.

1. 수박 종자크기 판별 마커

씨앗째 먹는 '씨자근' 수박품종 개발
2~3소형 수박 - "외국인 선호도 높여"
이도현 기자 2015.11.10 02:44:11

작년 6888봉-올해 3000봉 수출 성과
해외에서 선호도가 높아지고 있는 소형과 인기예 원일이 소형 수박 품종이 국내에서 개발돼 농가 수익증대와 수출시장 활성화에 기여할 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다.

파트너종묘(대표 김종재)와 중앙대학교(이금표 교수)는 수박 과실의 씨앗이 극도로 작아 씨앗째 먹어도 심식에 전혀 거부감이 느껴지지 않는 수박 신 품종 '씨자근'을 개발했다고 밝혔다.

이번에 개발한 '씨자근' 수박은 농림수산식품기술기획평가원(원장 이상길)이 농림축산식품부 농생명산업개발사업 과제로 선정해 이금표 중앙대학교 교수팀과 파트너종묘가 지난 2011년부터 연구를 시작, 최근 품종 육성에 성공해 상품화했다.

'씨자근' 수박은 한 포기당 약 3~4의 과실을 착과시키고 2~3kg의 소형 수박을 생산하는 품종이다. 앞으로 갈수록 소형화되는 수박 품종군에서 리딩 품종으로의 전망이 매우 밝다고 할 수 있다. 또한 외국인의 선호도가 높아 작년 해외 시험재배를 실시해 스페인의 중자회사에 2회 6888봉을 수출했고 올해에도 3000봉의 중자수출이 이뤄진 상태이다.

이금표 교수팀은 씨가 매우 작은 수박을 비롯해 총 4종류의 씨앗크기별로 어린 식물체에서 사전 선별이 가능한 분자마커를 개발하고 이를 특허출원(10-2015-0145980, 10-2015-0145985)하고 향후 소형과와 씨가 작은 품종개발에 나설 계획이다.

파트너 종묘는 종자크기에 대한 분자마커 관련 특허의 기술이전과 '씨자근' 수박에 대한 품종보호 출원을 통해 내년부터는 본격적인 시판될 추진한다.

이도현 기자 dohee@nemstarm.co.kr



2. 수박 흰가루병 저항성 마커 및 유전자지도

'수박 흰가루병' 저항성 유전자 정보 밝혀져
중앙대-파트너종묘, "2년 내 품종보호 출원"
이도현 기자 2015.11.17 20:09:36

이금표 교수팀 개농분식 연구 분자마커 개발
수박재배시 가장 큰 골칫거리중 하나인 흰가루병에 저항성을 가지는 유전자 정보가 밝혀져 흰가루병에 저항성을 가지는 수박품종에 대한 연구에 가속이 붙을 것으로 기대되고 있다.

중앙대학교(이금표 교수)와 파트너종묘(대표 김종재)는 수박 아생종의 흰가루병 저항성 유전 및 개농분식 연구를 마치고 최근 연관 분자마커 개발을 완료했다고 밝혔다.

이번 연구는 농림수산식품기술기획평가원(원장 이상길)이 지난 2011년 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업 과제로 선정된 수박 흰가루병 저항성 연관 분자마커 개발 연구의 일환으로 진행했다.

이금표 교수 연구팀은 작년 국내 최초로 수박 고밀도 유전자 지도를 완성했으며 올해 아생종의 염기서열 변이와 저항성을 탐색해 흰가루병에 저항성을 나타내는 수박 개농 상의 위치를 밝혔다.

이 결과를 통해 교수 팀은 국내에 만연한 수박 흰가루병에 완벽히 저항성을 보이는 아생종의 유전자에 대해 99% 가까운 연관 분자마커를 개발하고 최근 특허출원(10-2015-0145959)했다.

기존 흰가루병 저항성 아생종 자원 확보와 분자마커를 개발함에 따라 협력 육종회사인 파트너 종묘는 향후 2년 내 흰가루병 저항성 품종보호 출원이 가능할 것으로 예상하고 있다.

이에 수박 시설재배 농가의 농약 사용량이 대폭 줄어들 수 있으며 현재 함께 개발 중인 고당도, 고관아코편 품종에 도입해 국내 시장과 수출에 연인차 역할을 할 것으로 기대를 모으고 있다.

이도현 기자

제 2 절 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구과제를 통하여 확보한 기술인 수박 흰가루병 저항성 연관 분자마커 및 수박 종자크기 연관 분자마커는 품종개발에 직접적인 활용이 가능한 마커들로 협동 육종회사에 기술이전을 실시하였으므로, 향후 지속적인 신품종 개발에 활용될 예정임.

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

본 연구과제의 수박 흰가루병 저항성 연관 분자마커 및 수박 종자크기 연관 분자마커 개발 성과를 통하여 향후 지속적인 신품종 개발을 이루고 그 실적을 언론기관(신문사 등)에 배포하여 성과를 홍보하고자 함

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 과제를 통하여 특허 4건, 품종보호출원 1건이 이루어졌고, SCI급 논문 3편이 달성되어 연구목표는 충실히 달성하였음. 한편 개발된 마커의 특허출원이 이루어졌으므로, 이에 대한 추가적인 논문이 발표될 예정임.

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

본 연구를 통하여 확보한 흰가루병 저항성 연관 분자마커 및 종자크기 연관 분자마커는 향후 해당 유전자 클로닝을 위한 기초자료로 사용될 계획이며, 작성된 고밀도 연관유전자지도 및 RIL 집단들은 수박의 다양한 타 형질연관 분자마커 개발에 사용될 예정임. 또한 개발된 분자마커는 추후 MABC 등 여교잡을 통한 계통양성에서 MAS 마커로 활용될 예정임.

5. 연구기획사업 등

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2015년 8월 중국 농림과학원 산하 채소작물연구소에서는 본 연구팀과 동일한 야생 수박 유전자원인 PI 189225를 사용하여 DArTseq 방법으로 유전자지도를 작성하였으며, segregation distortion 에 대한 해석을 시도하였다. 특히 PI 189225 자원에 대한 중요성을 언급하였다.

Mol Genet Genomics
DOI 10.1007/s00438-015-0997-7

ORIGINAL PAPER

Construction of a high-density DArTseq SNP-based genetic map and identification of genomic regions with segregation distortion in a genetic population derived from a cross between feral and cultivated-type watermelon

Runsheng Ren · Rumiana Ray · Pingfang Li ·
Jinhua Xu · Man Zhang · Guang Liu · Xiefeng Yao ·
Andrzej Kilian · Xingping Yang

Received: 18 November 2014 / Accepted: 17 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] is an economically important vegetable crop grown extensively worldwide. To facilitate the identification of agronomically important traits and provide new information for genetic and genomic research on this species, a high-density genetic linkage map of watermelon was constructed using an F₂ population derived from a cross between elite watermelon cultivar K3 and wild watermelon germplasm PI 189225. Based on a sliding window approach, a total of 1,161 bin markers representing 3,465 SNP markers were mapped onto 11 linkage groups corresponding to the chromosome pair number of watermelon. The total length of the genetic map is 1,099.2 cM, with an average distance between bins of 1.0 cM. The number of markers in each chromosome varies from 62 in chromosome 07 to 160 in chromosome 05. The length of individual chromosomes ranged between 61.8 cM for chromosome 07 and 140.2 cM for chromosome 05. A total of 616

SNP bin markers showed significant ($P < 0.05$) segregation distortion across all 11 chromosomes, and 513 (83.3 %) of these distorted loci showed distortion in favor of the elite watermelon cultivar K3 allele and 103 were skewed toward PI 189225. The number of SNPs and InDels per Mb varied considerably across the segregation distorted regions (SDRs) on each chromosome, and a mixture of dense and sparse SNPs and InDel SDRs coexisted on some chromosomes suggesting that SDRs were randomly distributed throughout the genome. Recombination rates varied greatly among each chromosome, from 2.0 to 4.2 centimorgans per megabase (cM/Mb). An inconsistency was found between the genetic and physical positions on the map for a segment on chromosome 11. The high-density genetic map described in the present study will facilitate fine mapping of quantitative trait loci, the identification of candidate genes, map-based cloning, as well as marker-assisted selection (MAS) in watermelon breeding programs.

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00438-015-0997-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Ren · P. Li · J. Xu · M. Zhang · G. Liu · X. Yao · X. Yang (✉)
Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural
Sciences, 50 Zhongling Street, Nanjing 210014, China
e-mail: xingping@jaas.ac.cn

R. Ren · R. Ray
Division of Plant and Crop Sciences, School of Biosciences,
University of Nottingham, Sutton Bonington Campus,
Loughborough LE12 5RD, UK

A. Kilian
DArT P/L, PO Box 7141, Yarralumla, Canberra,
ACT 2600, Australia

Keywords Watermelon · Linkage map · SNP ·
High density · DArTseq

Introduction

Watermelon is an important vegetable crop worldwide with production of more than 100 million tons accounting for about 7 % of total vegetable production worldwide (FAO Stat; <http://www.fao.org/>). Watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai ($2n = 2x = 22$) is a diploid species belonging to the family *Cucurbitaceae* with an estimated genome size of 425 Mb (Arumuganathan and Earle 1991). The development of genetic linkage maps can facilitate the identification of biologically and agronomically important trait loci and further deployment in crop

Published online: 22 February 2015

 Springer

2015년 미국의 수박 연구그룹은 수박의 microsatellite marker를 이용하여 과실의 형질에 대한 mapping을 selective sweeps 방법으로 수행하여 보고하였다. 즉, 야생자원의 재배화 과정에서 주요한 대립유전자에 대한 연구로 형질마커를 개발한 내용이다.

Journal of Heredity 2015;106(2):166–176
doi:10.1093/hered/esu077
Advance Access publication November 25, 2014

© The American Genetic Association 2014. All rights reserved.
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

A Genome-Wide Scan of Selective Sweeps and Association Mapping of Fruit Traits Using Microsatellite Markers in Watermelon

UMESH K. REDDY*, LAVANYA ABBURI*, VENKATA LAKSHMI ABBURI, THANGASAMY SAMINATHAN, ROBERT CANTRELL, VENKATA GOPINATH VAJJA, RISHI REDDY, YAN R. TOMASON, AMNON LEVI, TODD C. WEHNER, AND PADMA NIMMAKAYALA*

From the Department of Biology, Gus R. Douglass Institute, West Virginia State University, Institute, WV 25112-1000 (Reddy, Abburi, Saminathan, Cantrell, Vajja, Reddy, Tomason, and Nimmakayala); the U.S. Vegetable Laboratory, USDA, ARS, 2875 Savannah Highway, Charleston, SC 29414 (Levi); and the Department of Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695-7609 (Wehner).

*These authors contributed equally to the work.

Author correspondence to Umesh K. Reddy at the address above, or e-mail: uredy@wvstateu.edu.

Abstract

Our genetic diversity study uses microsatellites of known map position to estimate genome level population structure and linkage disequilibrium, and to identify genomic regions that have undergone selection during watermelon domestication and improvement. Thirty regions that showed evidence of selective sweep were scanned for the presence of candidate genes using the watermelon genome browser (www.icugi.org). We localized selective sweeps in intergenic regions, close to the promoters, and within the exons and introns of various genes. This study provided an evidence of convergent evolution for the presence of diverse ecotypes with special reference to American and European ecotypes. Our search for location of linked markers in the whole-genome draft sequence revealed that BVWS00358, a GA repeat microsatellite, is the GAGA type transcription factor located in the 5' untranslated regions of a structure and insertion element that expresses a Cys₂His₂ Zinc finger motif, with presumed biological processes related to chitin response and transcriptional regulation. In addition, BVWS01708, an ATT repeat microsatellite, located in the promoter of a DTW domain-containing protein (CJa002761); and 2 other simple sequence repeats that association mapping link to fruit length and rind thickness.

Subject areas: Genomics and gene mapping; Quantitative genetics and Mendelian inheritance

Key words: domestication; heterozygosity; linkage disequilibrium; population structure; recombination rate

Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai] is a specialty crop with a genome size of 425 Mb ($2n = 2x = 22$). The cultivated dessert watermelon flesh contains 87–90% water, a high sugar content (8–13%), and several important health-related compounds, including lycopene, citrulline, arginine, and glutathione (Ren et al. 2012; Nimmakayala et al. 2014a). *Citrullus lanatus* subsp. *microspermus* represent the “egusi” watermelon group, and have large edible seeds with a fleshy pericarp; *C. lanatus* subsp. *vulgaris* represent the red sweet dessert type (Fursa 1972; Jeffrey 2001). Although genetic diversity within subsp. *vulgaris* is extremely narrow, the cultivars are phenotypically diverse in fruit shape, flesh

texture and color, fruit weight, soluble solids, and rind thickness (Levi 2004).

Breeding watermelon of fairly similar backgrounds has resulted in a narrow bottleneck of genetic diversity (Levi et al. 2001). The molecular diversity of watermelon cultivars is reflected in the low number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) between the American heirloom cultivar Charleston Gray and the Chinese elite line 97103, which show an average of 1 SNP every 1430 bp (Guo et al. 2013). Our previous study confirmed the narrow genetic diversity among American watermelon accessions (Nimmakayala et al. 2014a). One explanation for this narrow diversity is the

2014년 중국 농림과학원 산하 채소작물연구소의 수박 연구그룹은 4가지 수박 mapping 용 집단을 양성하고 이 집단을 이용하여 주요 경제적 형질에 연관된 QTL 분석을 수행한 바 있다.

Ren et al. BMC Plant Biology 2014, 14:33
http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/33



RESEARCH ARTICLE

Open Access

An integrated genetic map based on four mapping populations and quantitative trait loci associated with economically important traits in watermelon (*Citrullus lanatus*)

Yi Ren^{1,2}, Cecilia McGrégor¹, Yan Zhang¹, Guoyi Gong², Haiying Zhang², Shaogui Guo², Honghe Sun², Wantao Cai², Jiè Zhang² and Yong Xu^{2*}

Abstract

Background: Modern watermelon (*Citrullus lanatus* L.) cultivars share a narrow genetic base due to many years of selection for desirable horticultural qualities. Wild subspecies within *C. lanatus* are important potential sources of novel alleles for watermelon breeding, but successful trait introgression into elite cultivars has had limited success. The application of marker assisted selection (MAS) in watermelon is yet to be realized, mainly due to the past lack of high quality genetic maps. Recently, a number of useful maps have become available, however these maps have few common markers, and were constructed using different marker sets, thus, making integration and comparative analysis among maps difficult. The objective of this research was to use single-nucleotide polymorphism (SNP) anchor markers to construct an integrated genetic map for *C. lanatus*.

Results: Under the framework of the high density genetic map, an integrated genetic map was constructed by merging data from four independent mapping experiments using a genetically diverse array of parental lines, which included three subspecies of watermelon. The 698 simple sequence repeat (SSR), 219 insertion-deletion (InDel), 36 structure variation (SV) and 386 SNP markers from the four maps were used to construct an integrated map. This integrated map contained 1339 markers, spanning 798 cM with an average marker interval of 0.6 cM. Fifty-eight previously reported quantitative trait loci (QTL) for 12 traits in these populations were also integrated into the map. In addition, new QTL identified for brix, fructose, glucose and sucrose were added. Some QTL associated with economically important traits detected in different genetic backgrounds mapped to similar genomic regions of the integrated map, suggesting that such QTL are responsible for the phenotypic variability observed in a broad array of watermelon germplasm.

Conclusions: The integrated map described herein enhances the utility of genomic tools over previous watermelon genetic maps. A large proportion of the markers in the integrated map are SSRs, InDels and SNPs, which are easily transferable across laboratories. Moreover, the populations used to construct the integrated map include all three watermelon subspecies, making this integrated map useful for the selection of breeding traits, identification of QTL, MAS, analysis of germplasm and commercial hybrid seed detection.

Keywords: Watermelon, Integrated genetic map, QTL, Sugar content

* Correspondence: xuyong@nerc.org.cn

²National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Beijing 100097, China. Full list of author information is available at the end of the article.



© 2014 Ren et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2014년 미국과 이스라엘의 수박 연구그룹은 고밀도 유전자지도를 작성하였으며, 수박의 계통 수준에서 교차에 의한 재조합율을 분석하였고, 수박 자원을 야생형, 반야생형, 재배형으로 나누어 전체 염기의 다양성, LD, selective sweep을 분석하였다.

High-Resolution Genetic Map for Understanding the Effect of Genome-Wide Recombination Rate on Nucleotide Diversity in Watermelon

Umesh K. Reddy,^{*1,2} Padma Nimmakayala,^{*1} Amnon Levi,[†] Venkata Lakshmi Abburi,^{*} Thangasamy Saminathan,^{*} Yan. R. Tomason,^{*} Gopinath Vajja,^{*} Rishi Reddy,^{*} Lavanya Abburi,^{*} Todd C. Wehner,[‡] Yefim Ronin,[§] and Abraham Karol[§]

^{*}Gus R. Douglass Institute, Department of Biology, West Virginia State University, Institute, West Virginia 25112-1000, [†]U.S. Vegetable Laboratory, USDA-ARS, 2875 Savannah Highway, Charleston, South Carolina 29414, [‡]Department of Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695-7609, and [§]Institute of Evolution, Haifa University, Haifa 31905, Israel

ABSTRACT We used genotyping by sequencing to identify a set of 10,480 single nucleotide polymorphism (SNP) markers for constructing a high-resolution genetic map of 1096 cM for watermelon. We assessed the genome-wide variation in recombination rate (GWRR) across the map and found an association between GWRR and genome-wide nucleotide diversity. Collinearity between the map and the genome-wide reference sequence for watermelon was studied to identify inconsistency and chromosome rearrangements. We assessed genome-wide nucleotide diversity, linkage disequilibrium (LD), and selective sweep for wild, semi-wild, and domesticated accessions of *Citrullus lanatus* var. *lanatus* to track signals of domestication. Principal component analysis combined with chromosome-wide phylogenetic study based on 1563 SNPs obtained after LD pruning with minor allele frequency of 0.05 resolved the differences between semi-wild and wild accessions as well as relationships among worldwide sweet watermelon. Population structure analysis revealed predominant ancestries for wild, semi-wild, and domesticated watermelons as well as admixture of various ancestries that were important for domestication. Sliding window analysis of Tajima's *D* across various chromosomes was used to resolve selective sweep. LD decay was estimated for various chromosomes. We identified a strong selective sweep on chromosome 3 consisting of important genes that might have had a role in sweet watermelon domestication.

KEYWORDS
high-density
genetic map
genotyping by
sequencing
genome-wide
recombination
rate
linkage
disequilibrium
selective sweep
watermelon

Watermelon belongs to the genus *Citrullus* Schrad. Ex Eckl. et Zeyh., which thrives in the Kalahari Desert (Namibia and Botswana) and is indigenous to southern Africa (Whitaker and Bemis 1976). The genus comprises four known diploid ($n = 11$) species (Dane and Liu 2007;

Reddy *et al.* 2013). Among them is the annual *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum et Nakai, which is indigenous to arid sandy regions of southern Africa (Meuse 1962; Robinson and Decker-Walters 1999). *C. lanatus* var. *lanatus* Schrad. Ex Eckl. et Zeyh and *C. lanatus* var. *citroides* (L.H. Bailey) are two botanical varieties (Levi *et al.* 2013). *C. lanatus* var. *lanatus* includes the wild and semi-wild *mucospermus* (egusi types) and sweet *vulgaris* forms. The wild *mucospermus* forms and the Tsamma types (*citroides*) look similar, except that in var. *lanatus*, the stomata have one pair of subsidiary cells as compared with three pairs in the Tsamma melon (Botha 1982). However, the types are quite diverse at the molecular and cytological levels (Nimmakayala *et al.* 2010; Reddy *et al.* 2013).

The Plant Genetic Resources Conservation Unit (PGRCU; Griffin, GA), US Department of Agriculture-Agricultural Research Services (USDA-ARS), maintains more than 1650 US plant introductions of *Citrullus lanatus* var. *lanatus* (Levi *et al.* 2013). Nimmakayala *et al.* (2014) performed the most recent diversity analysis using 134 single

Copyright © 2014 Reddy *et al.*

doi: 10.1534/g3.114.012815

Manuscript received June 18, 2014; accepted for publication September 7, 2014; published Early Online September 15, 2014.

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

Supporting information is available online at <http://www.g3journal.org/lookup/suppl/doi:10.1534/g3.114.012815/-/DC1>

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author: 25 Barron Drive, Gus R. Douglass Institute, Department of Biology, West Virginia State University, Institute, WV 25112. E-mail: ureddy@wvstateu.edu

제 7 장 연구시설·장비 현황

* (해당 없음).

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 연구실 안전관리 개요

: 교내 연구실 안전사고를 예방하고 연구실의 안전성을 확보하고자 연구실안전관리규정에 의거 연구실 정기점검 및 정밀안전진단 실시, 연구활동종사자의 교육 및 검진을 통한 안전성 확보, 사고 발생 시 초동대응을 통한 인적, 물적 피해를 최소화 하고자함.

2. 연구실 안전관리 조직 및 담당업무

구 분	담당 업무
총장 및 부총장	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실 안전관리 총괄
연구환경안전관리자 (시설관리처 안전관리팀)	<ul style="list-style-type: none"> • 연구(실험)실 안전관리 총괄 관리 • 연구활동종사자 안전교육 운영 관리 • 상시 연구활동종사자 건강검진 진행 • 연구(실험)실 안전점검 진행 (정기점검, 정밀안전진단) • 관련법, 안전수칙 교육 및 홍보 • 법 이행사항 보고 외부 점검 수행
대학 연구환경담당자 /학과담당자	<ul style="list-style-type: none"> • 계열 연구(실험)실 안전관리 관리 • 연구활동종사자 안전교육 홍보 및 이수현황 관리 • 상시 연구활동종사자 건강검진 홍보 및 현황 관리 • 연구(실험)실 안전점검 관리(정기점검, 정밀안전진단) • 관련법, 안전수칙 교육 및 지도 • 각종 폐기물 처리 지침 준수 및 교육
연구실안전관리자 (정,부)	<ul style="list-style-type: none"> • 연구(실험)실 실별 안전관리 총괄 관리 • 연구활동종사자 안전교육 홍보 및 이수현황 관리 • 상시 연구활동종사자 건강검진 홍보 및 현황 관리 • 연구(실험)실 안전점검 대비 일지 작성 • 관련법, 안전수칙 교육 및 지도 • 각종 폐기물 처리 지침 준수 및 교육 • 위험물 및 유해인자별 MSDS 비치 및 교육 • 각종 폐기물 처리 지침 준수 및 교육
(상시)연구활동종사자	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실 안전교육 및 건강검진 참여 • 연구(실험)실 안전점검 실시 • 각종 폐기물 처리 지침 준수 폐기 • 위험물 및 유해인자별 MSDS 확인 후 실험

3. 연구실 안전관리

1) 위험도에 따른 연구실 등급 관리

- 가) A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- 나) B등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- 다) C등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 연구실 정기점검 및 정밀안전진단

- 가) 일상 점검 : 연구실안전관리자 책임 하에 일일 및 월별 점검 실시하여 특이사항 안전관리팀으로 보고
- 나) 정기 점검 : 연구실 등급에 따라 안전관리팀 주관 하에 교내 전체 연구실에 대한 안전점검을 실시하여 문제점 개선 조치(1회/년)
- 라) 정밀안전진단 : 외부 전문기관에 의뢰하여 교내 위험등급 A, B등급 연구실에 대하여 정밀안전진단을 실시하고 문제점 도출 및 개선 조치(1회/년)



3) 연구실 안전교육

- 가) 관련 근거 : 연구실안전환경 조성에 관한 법률 제18조 및 연구실안전관리규정 18조(안전교육)에 의거 교내 연구활동종사자에 대하여 교육 실시
- 나) 교육 대상 : 과학기술분야 학과(부)생 및 대학원생, 위험등급 A, B등급 연구실에 상시 근무하는 대학원 수료생 및 연구원
- 다) 교육 방법 : 재학생(학부생, 대학원생)은 일괄 등록되며, 위험등급 A, B등급 상시연구활동종사자의 경우 학과에서 취합 후 안전관리팀으로 대상 인원 제출
- 라) 교육 이수시간 : 학기당 6시간, 연간 12시간 이수해야 하며, 이수증 연구실 앞 게시

구분	교육 대상	시간	교육 내용
정기	(상시)연구활동종사자	6시간이상 /학기	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 · 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 · 물질보건 안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
특별	중대사고 및 필요시 (상시) 연구활동종사자	2시간이상	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실내 유해·위험 요인에 관한 사항 · 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 · 물질안전보건자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항

4) 연구실 건강검진

- 가) 관련 근거 : 연구실안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙 제10조, 연구실안전관리규정 21조(건강 검진)
- 나) 검진 대상 : 위험등급 A, B등급 연구실에 상주하는 상시연구활동종사자
- 다) 검진 방법 : 위험등급 A, B등급 연구실 유해인자에 따른 상시 연구활동종사자 특수검진 실시(매년)

5) 연구실 안전 보험

- 가) 관련 근거 : 연구실안전환경 조성에 관한 법률 제14조, 연구실안전관리규정 20조(보험가입)
- 나) 보험 대상 : 과학기술분야 학과(부)생 및 대학원생, 위험등급 A, B등급 연구실에 상시 근무하는 대학원 수료생 및 연구원
- 다) 보험 보상 한도
 - 상해사망 : 1인당 1억원
 - 상해, 후유장애 : 1인당 1억원 한도로 장애등급별 정액 보상
 - 부상 : 1인당 1천만원 한도로 상해등급별 정액 및 실손 보상
- 라) 보험 청구 절차 : 연구실안전관리자가 연구활동종사자에 대한 사고경위서 및 보험청구서를 작성하여 안전관리팀으로 제출하며, 안전관리팀에서는 사고 경위 및 피해 상황을 검토하여 보험금 청구 및 안전조치 이행

4. 2015년 연구실안전관리 이행

- 1) 연구실 위험등급별 조정 및 조정에 따른 환경 개선 조치
- 2) 연구실 환경개선공사 실시
- 3) 연구실 정밀안전진단 실시
- 4) 계열별 안전용품 수요조사를 실시하여 위험요소에 따른 안전용품 지급
- 5) 안전교육 우수학과 안전용품 포상
- 6) 연구실 실내 공기 질 측정 및 안전조치 시행
- 7) 15년 안전 업무 일정

일정	내용	세부사항	비고
매월	Clean & Safety day 실시	매월 자체 안전점검 실시 안전점검 시 필요 사항 즉시 개선	
3월	1학기 연구종사자 집체교육	연구실 신규종사자 및 부안전관리자 대상	
4월 ~ 8월	1학기 온라인 안전 교육 실시	상시 종사자 및 학부 재학생 대상	
4월	연구실 정밀 진단 실시	시설관리팀 등 관련 부서 협조	
4월	LMO 관련 생명안전책임자 선임	교육(8시간) 이수	
5월	연구실 정밀 진단 결과 개선		
6월	LMO 연구시설 점검 실시	서울캠퍼스 포함	
7월	LMO 연구시설 진단 결과 개선	서울캠퍼스 포함	
7월~8월	연구실 안전관련 집기 설치 및 시설 개선	위험물보관함 등 안전관련 집기 수요 조사 비상세안기 등 시설개선 수요조사 후 실시	
7, 8월 중	연구실 안전위원회 회의 실시	연구실 안전관리지도(미래부) 점검 대비	
9월	2학기 연구종사자 집체교육	연구실 신규종사자 및 부안전관리자 대상	
10월	2학기 온라인 안전 교육 실시	상시 종사자 및 학부 재학생 대상	
9월	연구실 정기 안전진단 실시	외부 기관 의뢰	
9월	정기 안전진단 결과 개선		
11월	연구종사자 건강검진 실시	일반, 특수 검진 실시외부 기관 의뢰	
12월	연구실 안전관리 결과 개선		

제 9 장 참고문헌

- Boyhan, G.E., J.D. Norton, B.R. Abrahams, and H.H. Wen, 1994. A New Source of Resistance to Anthracnose (Race 2) in Watermelon. *Hortscience* 29:111-112.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler, and S.E. Mitchell, 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6:e19379.
- Fernandez-Silva, I., I. Eduardo, J. Blanca, C. Esteras, B. Pico, F. Nuez, P. Arus, J. Garcia-Mas, and A.J. Monforte, 2008. Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 118:139-150.
- Gusmini, G., 2005. Inheritance of fruit characteristics and disease resistance in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai]. North Carolina State University, Ann Arbor, 3162441 Ph.D.
- Hasan, M.M., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, M. Mahmood, H.A. Rahim, M.A. Alam, S. Ashkani, M.A. Malek, and M.A. Latif, 2015. Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. *Biotechnol Biotechnol Equip* 29:237-254.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, Y. Harushima, M. Yui, T. Sato, T. Imai, and M. Hirai, 1996. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90:265-273.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, and M. 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.
- Inthichack, P., Y. Nishimura, and Y. Fukumoto, 2014. Effect of diurnal temperature alternations on plant growth and mineral composition in cucumber, melon and watermelon. *Pak J Biol Sci* 17:1030-1036.
- Kim, K.H., S.G. Ahn, J.H. Hwang, Y.M. Choi, H.S. Moon, and Y.H. Park, 2013. Inheritance of resistance to powdery mildew in the watermelon and development of a molecular marker for selecting resistant plants. *Horticulture Environment and Biotechnology* 54:134-140.
- Kosambi, D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175.
- Levi, A., J.A. Thies, W.P. Wechter, H.F. Harrison, A.M. Simmons, U.K. Reddy, P. Nimmakayala, and Z.J. Fei, 2013. High frequency oligonucleotides: targeting active gene (HFO-TAG) markers revealed wide genetic diversity among *Citrullus* spp. accessions useful for enhancing disease or pest resistance in watermelon cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:427-440.
- Levi, A., C.E. Thomas, T. Trebitsh, A. Salman, J. King, J. Karalius, M. Newman, O.U.K. Reddy, Y. Xu, and X. Zhang, 2006. An extended linkage map for watermelon based on SRAP,

- AFLP, SSR, ISSR, and RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131:393–402.
- Levi, A., C.E. Thomas, X.P. Zhang, T. Joobeur, R.A. Dean, T.C. Wehner, and B.R. Carle, 2001. A genetic linkage map for watermelon based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:730–737.
- Levi, A., E. Thomas, T. Joobeur, X. Zhang, and A. Davis, 2002. A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population: (*Citrullus lanatus* var. *citroides* x *C. lanatus* var. *lanatus*) x *Citrullus colocynthis*. *Theor Appl Genet* 105:555–563.
- Li, H. and R. Durbin, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760.
- Li, Y.D., Z.Z. Chu, X.G. Liu, H.C. Jing, Y.G. Liu, and D.Y. Hao, 2010. A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants. *J Integr Plant Biol* 52:1036–1042.
- Nimmakayala, P., A. Levi, L. Abburi, V.L. Abburi, Y.R. Tomason, T. Saminathan, V.G. Vajja, S. Malkaram, R. Reddy, T.C. Wehner, S.E. Mitchell, and U.K. Reddy, 2014a. Single nucleotide polymorphisms generated by genotyping by sequencing to characterize genome-wide diversity, linkage disequilibrium, and selective sweeps in cultivated watermelon. *BMC Genomics* 15:767.
- Nimmakayala, P., A. Levi, L. Abburi, V.L. Abburi, Y.R. Tomason, T. Saminathan, V.G. Vajja, S. Malkaram, R. Reddy, T.C. Wehner, S.E. Mitchell, and U.K. Reddy, 2014b. Single nucleotide polymorphisms generated by genotyping by sequencing to characterize genome-wide diversity, linkage disequilibrium, and selective sweeps in cultivated watermelon. *BMC Genomics* 15:767.
- Petroli, C.D., C.P. Sansaloni, J. Carling, D.A. Steane, R.E. Vaillancourt, A.A. Myburg, O.B. da Silva, Jr., G.J. Pappas, Jr., A. Kilian, and D. Grattapaglia, 2012. Genomic characterization of DArT markers based on high-density linkage analysis and physical mapping to the *Eucalyptus* genome. *PLoS One* 7:e44684.
- Reddy, U.K., P. Nimmakayala, A. Levi, V.L. Abburi, T. Saminathan, Y.R. Tomason, G. Vajja, R. Reddy, L. Abburi, T.C. Wehner, Y. Ronin, and A. Karol, 2014. High-resolution genetic map for understanding the effect of genome-wide recombination rate on nucleotide diversity in watermelon. *G3 (Bethesda)* 4:2219–2230.
- Ren, R., R. Ray, P. Li, J. Xu, M. Zhang, G. Liu, X. Yao, A. Kilian, and X. Yang, 2015. Construction of a high-density DArTseq SNP-based genetic map and identification of genomic regions with segregation distortion in a genetic population derived from a cross between feral and cultivated-type watermelon. *Mol Genet Genomics*.
- Ren, Y., H. Zhao, Q. Kou, J. Jiang, S. Guo, H. Zhang, W. Hou, X. Zou, H. Sun, G. Gong, A. Levi, and Y. Xu, 2012. A High Resolution Genetic Map Anchoring Scaffolds of the Sequenced Watermelon Genome. *PLoS ONE* 7.
- Sonnante, G., A. Gatto, A. Morgese, F. Montemurro, G. Sarli, E. Blanco, and D. Pignone, 2011. Genetic map of artichoke x wild cardoon: toward a consensus map for *Cynara*

- cardunculus. *Theor Appl Genet* 123:1215-1229.
- Soteriou, G.A., M.C. Kyriacou, A.S. Siomos, and D. Gerasopoulos, 2014. Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition during ripening as affected by grafting. *Food Chem* 165:282-289.
- Stewart, C.N., Jr. and L.E. Via, 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14:748-750.
- Tetteh, A.Y., T.C. Wehner, and A.R. Davis, 2013. Inheritance of Resistance to the New Race of Powdery Mildew in Watermelon. *Crop Science* 53:880-887.
- van Ooijen, J.W., 2006. JoinMap 4: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental population. Kyazma BV, Wageningen.
- Verma, M. and L. Arya, 2008. Development of EST-SSRs in watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) and their transferability to *Cucumis* spp. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83:732-736.
- Xu, Y., S. Guo, H. Sun, H. Zhang, Y. Ren, H. Zhao, H. He, Y. Zhang, J. Liu, Q. Kou, W. Hou, X. Zou, J. Jiang, G. Gong, Y. Xia, X. Zhang, Y. Li, Y. Zheng, L. Mao, S. Gao, M. Huang, Y. Xu, S. Zhong, A. Bombarely, L.A. Mueller, J.J. Giovannoni, Z. Fei, J. Wang, J. Zhang, Z. Wang, J. Min, X. Guo, P. Ni, B. Wang, Y. Huang, X. Hu, S. Dong, D. Liang, J. Wang, K. Wu, X. Zhao, Z. Zheng, M. Xing, X. Liang, B. Huang, T. Lv, J. Wang, Y. Yin, J. Salse, F. Murat, W.J. Lucas, B.K. Ham, Z. Zhang, Z. Zhang, S. Huang, T. Tan, E. Pang, K. Lin, Q. Hu, H. Kuang, K. Klee, H. Schoof, H. Yi, M. Wu, R. Li, and A. Levi, 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics* 45:51-58.

<첨부>

특허, 논문 및 시장분석 보고서

과제명	수박의 종자크기와 흰가루병저항성관련 분자마커 개발 및 연관유전자지도 작성에 관한 연구		
주관연구책임자	이 공 표	주관기관	중앙대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
수박 흰가루병 저항성 분자마커	대한민국	100	100	100	
수박 종자크기 판별용 분자마커	대한민국	100	100	100	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽, 중국, 호주, 캐나다, 러시아, 대만)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간 (2010-2015)
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

- 기존의 흰가루병 저항성 연관 분자마커는 수박 흰가루병 저항성 유전자가 MLO type의 서열을 갖는다는 가정으로 시작한 생물정보학적 분석 데이터에 불과하나, 본 연구는 생물검정을 통하여 연관마커를 개발하였고, MLO type의 유전자 마커가 아니라는 차이점이 있음.
- 종자크기 연관마커에 관한 기존 특허는 QTL 분석 결과만으로 대립유전자의 존재 범위를 추정하고 있으나, 본 연구팀이 출원한 특허는 4가지 계통 각각에 대한 SNP 기반 분자마커로 특이성을 포함하고 있음

개발기술명		수박 흰가루병저항성 분자마커	수박 종자크기 연관 분자마커
Keyword		powdery mildew, genetic marker	seed size genetic marker
검색건수		351	188
유효특허건수		1	1
핵심특허 및 관련성	특허명	Rapid identification of watermelon MLO type anti-powdery mildew gene	Methods and compositions for producing watermelon plants with selected seed sizes
	보유국	중국	PCT (Syngenta Co.)
	등록년도	2015	2014
	관련성(%)	70%	50%
	유사점	수박 흰가루병 저항성 유전자 또는 연관마커 개발	수박의 종자크기를 결정하는 게놈상의 대립유전자좌를 밝히고자 함
	차이점	수박의 참조유전체에서 MLO type의 유전자는 흰가루병에 대한 저항성 관련 유전자라는 전제 하에, 신규 자원에 대해 SNP 등 관련 정보를 활용한 유전자를 확보할 수 있다는 내용이나, 이 유전자정보는 항상 옳을 수 없으며, 흰가루병 저항성 유전자 또는 연관마커는 MLO type 유전자와 관련이 없을 수 있다. 본 연구결과의 연관마커는 MLO type 유전자 마커가 아니며, 생물검정을 통해 개발된 마커이다.	등록된 Syngenta의 종자관련 특허는 QTL 분석을 통하여 대략적인 대립유전자좌의 존재범위를 제시하였음. 본 연구에서 출원한 특허는 F2:3 QTL 분석 및 NIL에 대한 분석을 통하여 좀더 면밀한 위치를 결정하였고, 특히 4가지 크기 계통 각각에 대한 게놈서열분석을 토대로 4가지 크기 각각에 대한 SNP 기반의 분자마커를 제시한 내용임.

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽 등 전 세계
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

- 수박의 흰가루병 저항성 및 종자크기 연관 분자마커는 전혀 검색되지 않음. 단지 최근 흰가루병 race 1W에 대한 저항성 유전분석 연구만이 수행되었음

개발기술명		수박 흰가루병저항성 분자마커	수박 종자크기 연관 분자마커
Keyword		powdery mildew, genetic marker	seed size genetic marker
검색건수		2	0
유효논문건수		1	0
핵심논문 및 관련성	논문명	Inheritance of resistance to powdery mildew race 1W in watermelon	-
	학술지명	Phytopathology	-
	저 자	Ben-Naim and Cohen	-
	게재년도	2015	-
	관련성(%)	30	-
	유사점	수박에서 흰가루병 race 1W에 대한 유전분석	-
	차이점	해당 논문은 2흰가루병 race 1W에 대한 유전분석 연구로 흰가루병 저항성 분자마커 개발과는 직접적 관련성이 없음	-

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 수박 흰가루병 저항성 품종 및 분자마커

국내에는 대부분 시설재배로 수박 과실생산이 이루어지고 있으며, 특히 저온기 육묘를 통한 수박 조기출하를 목표로 하고 있는 농가의 경우 흰가루병이 만연하는 상황이다. 따라서, 본 연구를 통한 흰가루병 저항성 수박품종의 출시는 농가의 농약사용 감소, 재배의 수월성 및 안정성에 기여할 수 있어 매우 전망이 밝다고 할 수 있다.

따라서, 많은 육종회사에서 흰가루병 저항성 분자마커의 활용할 것으로 기대하고 있으며, 여교잡을 통한 육종프로그램에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

○ 수박 씨앗째 먹는 품종 및 종자크기 연관 분자마커

국내에서는 아직 씨앗째 먹는 수박품종이 출시되지 않고 있으나, 동남아시아와 유럽의 경우 씨가 매우 작아 씨앗째 섭취가 가능한 품종들이 출시되고 있어 향후의 품종개발 및 판매는 전망이 밝다. 한편 씨앗의 크기를 미리 알 수 있는 분자마커는 씨없는 수박 생산용 3배체의 종자생산성을 높일 수 있는 SS크기 및 씨가 가장 작은 유전자원을 기초로 만들어진 분자마커의 활용도도 매우 클 것으로 기대한다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 수박 흰가루병 저항성 품종 및 분자마커

미국 및 유럽의 대단위 수박재배 농가에서는 접목재배로는 방지할 수 없는 흰가루병의

발병으로 당도의 저하, 농약의 과다사용 등의 문제가 지속적으로 대두되고 있다. 한편, 씨없는 수박이 주도하고 있는 미국 시장 등에서 흰가루병 저항성 품종의 중요성이 매우 높은 것으로 판단되며, 유럽의 경우 매우 높은 흰가루병 발병을 때문에 저항성 품종의 출시는 곧바로 종자단가의 상승으로 이어질 확률이 매우 높다고 할 수 있다. 또한, 품종 주기가 3년 정도로 빠른 변화주기를 보이는 중국의 경우에도 시설재배의 면적이 많아 흰가루병 저항성 품종과 분자마커에 대한 수요도가 높을 것으로 기대하고 있다.

○ 수박 씨앗째 먹는 품종 및 종자크기 연관 분자마커

유럽의 경우, 바이엘은 ‘제니스’ 품종을 소개하며 씨앗째 먹을 수 있는 micro-seed 또는 tomato-seed 크기의 품종을 선보이고 있다. 본 연구팀에서도 2014년의 스페인 시교에서부터 종자판매가 고단가로 이루어지고 있어 이 분야에서의 수출이 기대되고 있다. 특히, 씨앗째 먹을 수 있는 극소의 종자크기를 갖는 유럽 품종의 경우 대부분 당도가 높지 않아, 스페인의 경우 일반종자의 단가는 약 500불/kg 수준이나, 수출되고 있는 협동과제 참여기업의 경우 5000불/kg으로 계약을 하고 있어 향후, 씨작은 수박고당도의 씨앗째 먹는 품종의 전망은 매우 밝다고 할 수 있다.

또한 본 과제를 통해 개발된 종자크기 관별용 분자마커의 활용을 통한 신속한 여교잡은 종자개발 기간 및 비용을 줄일 수 있어, 향후 수요가 높을 것으로 기대하고 있다.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 개발된 분자마커의 기술이전

- 본 연구를 통해 개발된 분자마커들은 진단 노하우와 같이 기술이전되었다.
- 향후, multiplex PCR 및 Fluidigm platform에서 사용할 수 있는 마커 시스템으로 개량되면 더욱 높은 활용도와 가치를 갖을 수 있을 것으로 기대하고 있다.

○ 품종개발

- 본 연구를 통해 이미 ‘씨자근’ 수박 종자의 유럽 수출이 이루어지고 있으며, 향후 흰가루병 저항성 형질의 추가적 도입을 통해 지속적인 수출증대를 기대하고 있다.

2) 산업화를 통한 기대효과

- 직접 경제효과 : 본 연구과제의 ‘씨자근’ 수박 및 흰가루병 저항성 품종의 개발을 통해 매년 직접적으로 2000만원 이상의 수출이 가능할 것으로 판단되며, 기술이전료는 2000만원을 기록하여, 마커활용으로 인한 품종개발비용은 이 이상의 경제효과를 갖는 것으로 판단된다.
- 경제적 파급효과 : 농가는 흰가루병 제어를 위한 농약사용량을 획기적으로 줄일 수 있을 것으로 판단되며, 흰가루병 저항성 및 기존에는 없었던 씨작은 품종의 출시로 신제품 판매수익 효과가 나타날 것으로 예상된다.
- 부가가치 창출효과 : 본 연구과제 결과물인 ‘씨자근’ 수박의 수출로 매년 2000만원 이상의 수출효과가 기대되며, 한국 수박종자의 고당도 및 내병성 품종 개발을 포함한 수박 품종개발의 기술적 우위성을 통한 브랜드 가치가 높아질 것으로 기대된다.

주 의

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