

최 종  
연구보고서

육종가 권리보호를 위한 고추, 참외의  
지문연구 및 유사품종 식별을 위한 품종간  
최소거리 설정

Variety Description Using Molecular Techniques and Establishment  
of Minimum Distance for The Plant Variety Protection in Pepper  
and Oriental Melon

국립종자관리소  
서울대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “육종가 권리보호를 위한 고추, 참외의 지문연구 및 유사품종 식별을 위한 품종간 최소거리 설정” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 15 일

주관연구기관명 : 국립종자관리소

총괄연구책임자 : 이 승 인

세부연구책임자 : 유 병 천

연 구 원 : 박 대 영

권 용 삼

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 김 병 동

# 요 약 문

## I. 제 목

육종가 권리보호를 위한 고추, 참외의 지문연구 및 유사품종 식별을 위한 품종간 최소거리 설정

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

고추와 참외는 우리나라의 대표적 채소작물임에도 불구하고 육성된 유통품종의 대부분이 유전적 거리가 짧아 시장에서 그 고유의 특성이 인정받지 못하는 물론, 다수의 유사품종을 양산하는 결과를 초래하였다. 바야흐로 본격적인 품종보호 시대의 도래와 함께, 이 제도의 정착을 위해서는 품종의 유사성에 대한 명확한 판단과 함께 그 기준설정이 요구되는 것이 세계적인 추세이다. 이에 본 과제에서는 두 작물에 대한 체계적인 분자유전학적 탐구를 통하여 품종에 대한 유전적 특성 평가와 유사도 검정, 이를 위한 효과적인 마커 시스템의 개발, 이를 활용한 품종간 분자유전학적 유연관계 설정, 개발된 마커를 활용한 F<sub>1</sub> 순도검정 적용성 검토 등에 관하여 연구하였다. 이 결과들은 품종보호에 출원된 신품종의 특성검정과 유사품종 식별에 이용할 경우 효과적인 특성검정은 물론 품종 개발자의 보호권 설정에 기여하며, 선의의 육종가에게 창의적인 신품종 개발 의욕을 고취시키는 등 관련 분야 연구와 우리나라 종자산업 발전에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또 앞으로 분자마커를 이용한 우리나라 고추·참외 재래종 등 다양한 계통의 육종소재 및 유전자원에 대한 특성 평가에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제는 고추, 참외·멜론 유통품종을 중심으로 각각 66 품종과 44 품종을 대상으로 연구를 수행하였다. 이들 작물에 대하여 품종식별에 적용 가능한 AFLP, SSR 마커를 개발

· 확보하며, 이를 바탕으로 DNA 마커의 분포와 특성 및 품종간 유연관계 설정, 그리고 품종보호 측면에서 표현형 특성과의 연관도 및 분자마커를 기준으로 한 품종간최소거리설정에 관하여 연구하였다. 또한 개발된 마커의 산업적 이용도를 넓히기 위해 SSR 마커의 고추, 참외·멜론 품종들에 대한 F<sub>1</sub> 순도 검정용으로 활용 가능성을 살펴보았다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. DNA 기법을 이용한 고추의 품종식별 및 품종간 최소거리설정

고추의 품종식별에 활용 가능한 DNA 마커의 확보 및 이에 관한 기초 자료를 얻기 위하여, AFLP 및 SSR 마커의 개발 및 이를 이용한 품종간 유연관계 분석, DNA 마커와 형태적 특성과의 관계 분석, 전문가 협의회를 통한 품종간 최소거리 설정 등에 대한 연구를 수행하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

고추 66품종의 genomic DNA와 AFLP primer 19개 조합을 PCR 반응 시켰을 때 125개의 band 중에서 103개가 polymorphism을 보였고, primer 조합 당 평균 band 수는 6.6개로 나타났다. 공시품종을 UPGMA 방법에 의해 cluster 분석하였을 때 유전적 유사도 지수는 0.49~1.00의 범위로 나타났으며, 유전적 유사도 값 0.75를 기준으로 하였을 때 7개 품종군으로 분류할 수 있었다.

고추의 품종 식별에 있어서 SSR 마커의 효율성을 검토하고자, 협동연구과제에서 316개의 primer를 분양받아 polymorphism을 보인 27개를 선발하여 PCR 분석하였을 때 89개의 밴드가 증폭되었으며, primer당 평균 밴드의 수는 3.29개로 나타났고, PIC 값은 0.03~0.877 범위에 분포하였다. SSR 마커에 의한 전체 유사도 지수는 0.54~1.00로 나타났고, 유사도 값 0.82를 기준으로 할 때 총 10개의 품종군으로 분류되었다. AFLP와 SSR 마커를 이용하여 작성된 덴드로그램의 상관관계를 조사하기 위하여 Mantel matrix correspondence 분석을 실시한 바, 상관계수가 0.82로 높게 나타났다. 고추의 품종간 유연관계 분석에서 PIC 값이 높은 primer, *HpmsF15*, *HpmsF37*, *HpmsF53*은 ‘칠성초/AC2258’와 ‘칠성초/KC350-2’ 조합 F<sub>1</sub>에서 heterozygous한 형태의 밴드를 보여 F<sub>1</sub> 순도 검정에 활용할 수 있는 것으로 조사되었고, 이들 조합 F<sub>2</sub> 집단의 경우 마커의 분리양상이 멘델의 이론적 분리비에 적합한 것으로 나타났다.

고추의 품종간 최소거리를 설정하기 위하여 AFLP 유사도 지수와 형태적 특성과의 관계 분석에서 유사도가 96% 이상인 품종들은 형태적 특성조사에서 구별성을 보이지 않았으며, 96% 이하인 품종의 경우 심실수, 마디 안토시아닌 착색, 잎의 녹색 정도, 꽃자루의 자세 등과 같은 형질에서 뚜렷한 구별성을 나타내었다. 고추 육종 전문가를 초청하여 AFLP 마커의 유전적 유사도에 따른 형태적 특성 차이를 조사한 결과, 유사도 지수가 96% 이상인 품종에서는 작물학적 특성품종간의 차이를 인정하지 않았다.

이러한 연구결과들은 품종보호출원 품종의 구별성 시험에 DNA 마커를 직접적인 이용이 가능할 뿐만 아니라 대조품종 선정에도 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## 2. DNA 기법을 이용한 참외·멜론의 품종식별 및 품종간 최소거리설정

기존에 발표된 문헌 등 자료 검색을 통하여 멜론, 오이 등 *Cucumis* 종 작물에서 유래되어 발표된 137개 SSR 마커를 1차 선별하고, 우리나라 참외 유통품종에서 다형성을 보이는 37개 마커를 최종 선별하였다. 또, 재래종 참외 ‘간치’를 재료로 5'-anchored PCR과 chromosome walking 방법을 바탕으로 개발된 130여 클론을 대상으로 분석을 진행하여 최종 8개의 참외 유래 고유 SSR 마커를 개발하는 등, 참외 품종식별에 활용 가능한 총 45개의 SSR 마커를 개발·확보할 수 있었다. 이 마커를 활용 ‘금싸라기’ 등 참외 27 품종, ‘VIP’ 등 멜론 17 품종 등 참외·멜론 총 44 품종에 대한 품종간 다형성 검정을 실시한 결과 160개의 allelic band가 분석되었고, 마커들의 평균 PIC 값은 0.580이었다. SSR 마커 특성을 바탕으로 품종간 Jaccard's similarity distance에 따른 유전적 연관관계를 분석하고 덴드로그램에 의한 품종분류를 실시한 결과, 참외 품종집단 내에서는 금싸라기 계통 등 일반 참외와 멜론형 참외로 구분되었고, 멜론 품종집단 내에서는 net 계통과 no-net 계통으로 구분되는 등 형태적 특성을 반영한 뚜렷한 품종 분류가 이루어져 마커의 유용성을 확인할 수 있었다. 금싸라기 계통 참외는 similarity distance 0.92 ~ 1.0에 대부분 포함되는 고도의 유사도를 나타내어, 그간 형태적 특성에서 알려진 유사성을 분자유전학적 측면에서도 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 마커를 참외·멜론 F<sub>1</sub> 종자 순도검정에 적용한 결과 그 활용도가 매우 유용하여 기존의 방법들을 대체할 수 있을 만한 신뢰도를 보여주었으며, F<sub>2</sub> 집단에서의 특성도 안정적이어서 1:2:1의 정상적인 분리비를 보여주었다. 이와 같이 개발된 마커들의 품종간 유전적 특성은 재배시험 결과 조사된 형태적 특성과 질적형질은 0.826, 양적형질은 0.878로 높은 상관도를 보여, 마커를 이용한 품종식별 및 특성분석 등 품종의 다양한 분자유

전학적 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료되었다. SSR 마커 특성에 따라 다양한 연관도를 가진 여러 품종조합을 포장에 재배하고 육종가 공동특성 조사를 실시하여 밝혀진 품종간 최소거리는 Jaccard's similarity distance 기준 0.91로 설정되었으며, 이 기준은 덴드로그램에 나타난 금싸라기 계통 품종집단의 분류기준과 부합하였다.

본 연구를 통하여 참외 품종에서 최초로 개발된 SSR 마커와 이를 바탕으로 밝혀진 참외 품종들간 유사도, 품종간최소거리, 품종의 유전자형 특성과 표현형 특성의 상관관계를 설정 등 결과를 바탕으로 *C. melo* 작물 다수 품종의 기본적인 유전적 특성을 파악할 수 있을 뿐만 아니라, 기존품종 관리 및 대조품종 선정 등 품종보호 재배시험 등에도 활용될 수 있으며, 개발된 마커 특성은 표현형 특성과 마찬가지로 품종의 DUS 검정 시 구별성, 균일성, 안정성 등을 평가할 수 있는 인자로도 충분히 활용될 수 있을 것이다. 또 SSR 마커를 F<sub>1</sub> 종자 순도검종용으로 이용시 높은 유사도로 동위효소 이용이 용이하지 못한 박과류 (참외·멜론) 등에서 오히려 더욱 발전된 기법으로 활용도가 높을 것이다.

### 3. 고추 SSR 마커 개발

Microsatellite 혹은 simple sequence repeat (SSR)은 계놈 내에 높은 변이율을 나타내는 염기서열로 식물, 동물 모두 유전 분석에 유용하게 이용되는 분자표지이다. 고추에서 이러한 SSR 표지를 개발하기 위해, 2개의 small-insert genomic library와 GenBank 데이터 베이스로부터 표지를 개발하였다. (AT)15, (GA)15, (GT)15, (ATT)10, (TTG)10을 탐침으로 하여 library로부터 SSR 클론을 분리한 후 염기서열을 분석하였다. 이렇게 분리된 130개 클론중, 염기서열 분석결과 77개의 클론에서 SSR 염기서열을 확인하였고, 이를 통해 40개의 SSR 표지가 개발되었다. 염기서열 분석결과 (GA)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub>, (TTG)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub> 순으로 고추 계놈 내에 SSR이 존재함을 알 수 있었다. 추가적으로 36개의 SSR 표지가 GenBank와 이미 보고된 결과를 통해 개발되었다. 개발된 SSR 표지의 변이 다형성 정보를 측정하기 위해, polymorphism information content (PIC) 값을 구하였다. Library에서 개발된 SSR 표지의 PIC 값은 평균 0.76으로 GenBank에서 개발된 것보다 2배가 높았다. 총 46개의 SSR 표지는 *Capsicum annum* "TF68"과 *C. chinense* "Habanero" 이종간 교배를 통해 얻어진 집단으로 만들어진 고추 SNU-RFLP 유전자 지도에 위치 시켰다. 새로운 SNU2 유전자 지도는 46개 SSR와 287개 RFLP로 만들어진 총 333개 표지가 15개 연관군, 평균거리 5.3 cM, 총 1,716.5 cM로 구성되었다.

대단위 EST와 게놈 염기서열 연구과제들이 수행됨에 따라, 대량의 염기서열 정보는 유전자 발견과 분자표지 개발에 유용하게 쓰일 수 있다. 고추에서 중복되지 않은 10,232 EST 분석을 통해 1,201개의 SSR을 찾았다. 이는 EST에서 3.8 kb마다 1개의 SSR이 존재함을 나타냈다. EST-SSR의 66%가 3개의 염기서열이 반복되는 SSR로써 AAG가 가장 많이 존재하였다. 18%에 해당하는 SSR은 2개의 염기서열인 반복되는 것으로 AG가 제일 많았다. 4개가 반복되는 SSR은 AAAG, 5개가 반복되는 것은 AAAAG가 가장 많았다. SSR의 평균 길이를 비교하였을 때 2개가 반복되는 것이 가장 길었다. EST에서 찾은 1,201개의 SSR 중에서 PCR 조건이 맞는 812개의 프라이머를 합성하였다. 이중에서 513개의 SSR에서 PCR 증폭을 확인하였으며, 총 150개의 EST-SSR 표지가 SNU2 유전자 지도에 위치되었다.

# SUMMARY

## Part I : Development of DNA Marker Systems and Variety Description of Peppers

This study was carried out to assess the potential of variety identification using AFLP and SSR markers and to establish minimum distance among varieties through relationship between DNA marker and morphological traits for testing distinctness, uniformity and stability of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties.

Sixty-six cultivars were analyzed by AFLP using *EcoR* I / *Mse* I primer combinations. Nineteen combinations of AFLP primer led to the amplification of 125 scorable fragments ranging from 79 to 748 bp and among these 103 (82.0%) were polymorphic. Based on band patterns, UPGMA cluster analysis was conducted. These cultivars were separated into seven distinctive groups corresponding to varietal types and genetic distance of cluster ranging from 0.49 and 1.00.

Three hundred sixteen SSR markers were employed for fingerprinting for 66 pepper varieties. Twenty seven SSR markers were polymorphic, revealing a total of 89 alleles. The number of alleles at a locus ranged from 2 to 7, with a mean of 3.29. The average PIC value was 0.529 and it ranged from 0.03 to 0.877. Dendrogram of pepper variety obtained from SSR markers was constructed from genetically similarity data. As in the dendrogram based on AFLP, the 66 pepper variety are differentiated by the SSR genotypes. The dendrogram generated after the UPGMA using SSR-based genetic distances was similar to the dendrogram constructed with the AFLP data. The Mantel matrix correspondence test was used to compare the similarity of the matrices and the correlation coefficient value was 0.82.

Microsatellite markers were used for genetic purity of F<sub>1</sub> hybrid. Three SSR markers, *Hpms*F015, *Hpms*F037, and *Hpms*F053, differentiated all the hybrids derived from 'Chilseongcho/AC2258' and 'Chilseongcho/KC350-2'. To determine the inheritance mode of SSR marker in F<sub>2</sub> population derived from 'Chilseongcho/AC2258' and 'Chilseongcho/KC350-2', F<sub>2</sub> plants were screened by SSR markers. The segregation ratio of the SSR markers (*Hpms*F015, *Hpms*F037, and *Hpms*F053) was fitted to the theoretical segregation ratio of



1:2:1 or 3:1.

The relationship between morphological characters and genetic similarity through AFLP analysis was analyzed. The highly related varieties (above 96%) based on AFLP analysis was not showed distinctness among pepper cultivars. However, the varieties with less than 96% to genetic similarity was dissimilar from several character such as predominant number of locules in fruit, attitude of peduncle in flower, green color in leaf, etc. Therefore, the molecular genetic distance was consistent with the morphological traits measured for distinctiveness tests. Moreover, hot pepper breeders did not recognized distinctness for varieties with above 96% genetic similarity in comparison of morphological traits and genetic distance through AFLP analysis.

These results could be utilized to complement of DUS test of candidate variety and to select complimentary variety through pre-screening of existing variety in the context of protection of new variety of pepper.

## Part II: Development of SSR Marker System and Variety Description of Oriental Melons and Melons

Oriental melon is a variety of melon (*Cucumis melo* L. ver. *makuwa*) and has broad distribution around Oriental region including Korea, China and Japan. Korea has cultivated the crop since nearly 1500 years ago and also has large varieties of landrace. Ever since the advent of 'geumssaraki' in 1980s, it has renovated the consumption and made nearly all the market varieties a single line. Therefore, though the crop has become a major fruit vegetables now, the market varieties have narrow genetic distances with high similarity in morphology. However, the reality of genetic similarity in oriental melon varieties has not yet examined systematically. At the present study, we developed SSR marker system and determined genetic distances and minimum distances between varieties of *C. melo* including major market classes of oriental melon and melon.

In order to get useful SSR markers for description of oriental melon (*Cucumis melo*

L.), we primarily selected 37 markers from 137 SSRs which were previously reported in *Cucumis* species plants such as melon and cucumber. Also, new 8 SSR markers were developed from oriental melon, a landrace 'gganchi'. The total of 45 SSR markers were used for the characterization of 44 oriental melon and melon varieties, producing 160 allelic bands with average PIC value of 0.580. Based on the marker patterns, the Jaccard's similarity coefficient were calculated and genetic similarities were determined. The resulting dendrogram showed two main branches of melon and oriental melon with two sub-branches on each of oriental melon and mixed type, and net-type and no-net type, respectively. Most geumssaraki type varieties clustered in very narrow genetic distances of 0.92 ~ 1.0, which reassured the known phenotypic similarities in the varieties. The markers were also proved to be very useful when used for the purpose of purity check in F<sub>1</sub> seeds in a variety of oriental melon and melon. The inheritance of the marker showed stable and Mendelian segregation mode of 1:2:1 in F<sub>2</sub> generation. The dependence of phenotypic characteristics on molecular genetical characteristics of SSR markers showed high correlation of 0.826 in qualitative traits and 0.878 in quantitative traits. By combining the results of breeder's test and molecular genetical characteristics of SSR markers, the minimum genetic distances between oriental melon varieties were determined at the Jaccard's coefficient of 0.91.

### Part III : Development of SSR Markers in Pepper

Microsatellites or simple sequence repeats are highly variable DNA sequences that can be used as informative markers for the genetic analysis of plants and animals.

For development of microsatellite markers in *Capsicum*, SSRs were isolated from two small-insert genomic libraries and GenBank database. Using five types of oligonucleotides, (AT)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (GT)<sub>15</sub>, (ATT)<sub>10</sub>, and (TTG)<sub>10</sub>, as probes, positive clones were isolated from the genomic libraries, and sequenced. Out of 130 positive clones, 77 clones showed SSR motifs, out of which 40 reliable SSR markers were developed. (GA)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> sequences were found to occur most frequently in the

pepper genome, followed by (TTG)<sub>n</sub> and (AT)<sub>n</sub>. Additional 36 SSR primers were also developed from GenBank and other published data. To measure the information content of these markers, the polymorphism information contents (PICs) were calculated. *Capsicum* SSR markers from genomic libraries have shown a high level of PIC value, 0.76, twice the value for markers from GenBank data. Forty six SSR loci were placed on the SNU-RFLP linkage map, which had been derived from interspecific cross between *Capsicum annuum* "TF68" and *C. chinense* "Habanero". The current "SNU2" pepper map with 333 markers in 15 linkage groups contains 46 SSR and 287 RFLP markers covering 1,761.5 cM with average distance of 5.3 cM between markers.

As ESTs and genome sequencing projects are achieved, these resources can be exploited for gene discovery and marker development. Through analyzing non-redundant 10,232 expressed sequence tags (ESTs) in pepper, 1,201 SSRs were found in these sequences, which represents one SSR in every 3.8 kb in the ESTs. Sixty six percent of the SSRs was trinucleotide repeats, with AAG motif most abundant. Eighteen percent of the SSRs was dinucleotide repeats, sixty nine percent of which was AG motif. Among tetranucleotide repeats AAAG motifs comprised 22% and AAAT 21%. AAAAG was the most abundant (21%) motif of the pentanucleotide repeats. With respect to the average length dinucleotide repeats were the longest. Among 1,201 SSRs, 812 primer pairs were designed, which satisfied melting temperature condition and PCR product size. Five hundred and thirteen SSRs were successfully amplified. One hundred and fifty SSR markers were mapped onto SNU2 pepper map.

# CONTENTS

Unit 1. Research Overview .....	19
Chapter 1. Objectives and necessities .....	19
1. Plant variety protection – issues on similarity and distinctness .....	19
2. Variety description using DNA markers .....	19
3. DNA fingerprinting on peppers and oriental melon • melon .....	20
Chapter 2. Research organization and contents .....	21
Unit 2. Current Status on Technical Advances .....	22
Chapter 1. Overseas researches .....	22
Chapter 2. Domestic researches .....	23
Unit 3. Variety Description of Peppers Using DNA Markers .....	24
Chapter 1. Introduction .....	24
Chapter 2. Materials and Methods .....	25
1. AFLP analysis for genetic relationships among varieties .....	25
2. Selection of SSR markers and application to varieties description .....	25
3. Establishment of relationships between AFLP and SSR markers .....	27
4. Application of markers to F <sub>1</sub> seed purity inspection and genetic analysis of F <sub>2</sub> population .....	27
Chapter 3. Variety description using DNA markers .....	27
1. AFLP analysis for genetic relationships among varieties .....	27
2. SSR analysis for genetic relationships among varieties .....	31
3. Establishment of relationships between AFLP and SSR marker .....	36
4. Application of markers to F <sub>1</sub> seed purity inspection and genetic analysis of F <sub>2</sub> population .....	37
Unit 4. Variety Description of Oriental Melon and Melon Using DNA Markers .....	40
Chapter 1. Introduction .....	40

1. Historical review for the variety development and breeding .....	40
2. Cultivation and varieties on market .....	41
3. Variety protection system and application of molecular techniques .....	42
4. Objectives .....	42
Chapter 2. Considerations for variety classification and denomination .....	43
1. Introduction .....	43
2. Historical review .....	44
3. Oriental melon, a var. <i>makuwa</i> ? .....	44
Chapter 3. Selection of useful SSR primers from <i>Cucumis</i> species .....	46
1. Materials and methods .....	46
2. Selection of useful SSR primers and their applications .....	48
Chapter 4. Development of new SSR markers from oriental melon .....	51
1. Introduction .....	51
2. Materials and methods .....	51
3. Oriental melon-derived SSR markers and their applications .....	53
Chapter 5. Characterization and variety description using SSR markers .....	55
1. Materials and methods .....	55
2. Distribution and characterization of SSR markers on varieties .....	56
3. Variety description and genetic relationships between varieties .....	62
Chapter 6. Application of markers to F <sub>1</sub> seed purity inspection and genetic analysis of F <sub>2</sub> population .....	65
1. Introduction .....	65
2. Materials and methods .....	65
3. Establishment of inspection method for F <sub>1</sub> seed purity by a SSR marker ..	67
4. Genetic analysis of F <sub>2</sub> population by a SSR marker .....	68
Unit 5. Determination of Minimum Distance .....	69
Chapter 1. Introduction .....	69
Chapter 2. Establishment of minimum distance for peppers .....	70
1. Materials and methods .....	70

2. Morphological characterization of varieties .....	71
3. Morphological assessment for minimum distance .....	72
4. Establishment of minimum distance .....	77
Chapter 3. Establishment of minimum distances for oriental melon and melon .....	78
1. Materials and methods .....	78
2. Morphological characterization of varieties .....	79
3. Establishment of relationships between morphological characteristics and SSR markers .....	81
4. Breeder's test and establishment of genetic minimum distance .....	83
Unit 6. Development of pepper SSR markers .....	86
Chapter 1. Introduction .....	86
Chapter 2. Materials and methods .....	87
1. Library construction and screening .....	87
2. SSR primer development and PCR .....	91
3. Estimation of polymorphic information content (PIC) .....	91
4. GenBank and pepper EST database search for SSR development .....	92
5. Genetic mapping of pepper SSRs .....	92
Chapter 3. Results and discussion .....	92
1. Isolation and characterization of pepper microsatellites .....	92
2. <i>Capsicum</i> SSR sequences in GenBank .....	94
3. SSR marker development .....	95
4. Molecular linkage mapping .....	101
5. Analysis of SSR in pepper ESTs .....	101
6. Development of pepper EST-SSRs .....	107
Unit 7. Accomplishment and Contribution to The Related Research Fields .....	111
1. Variety description using molecular techniques in peppers .....	111
2. Variety description using molecular techniques in oriental melon and melon .....	112
3. Development of SSR markers in peppers .....	113

Unit 8. Application Plans for The Research .....	114
Unit 9. Overseas Information Collected During The Research .....	116
Unit 10. References .....	118
Appendix .....	124

# 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	2
SUMMARY .....	7
CONTENTS .....	11
목차 .....	15
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	19
제 1 절 연구개발 목적 및 필요성 .....	19
1. 품종보호 - 품종의 유사성과 구별성 문제 .....	19
2. DNA 마커를 이용한 품종식별 .....	19
3. 고추, 참외·멜론 작물의 DNA 지문연구 .....	20
제 2 절 과제의 구성 및 내용 .....	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	22
제 1 절 국외 연구현황 .....	22
제 2 절 국내 연구현황 .....	23
제3장 DNA 기법을 이용한 고추의 유사품종 식별 .....	24
제 1 절 서 론 .....	24
제 2 절 재료 및 방법 .....	25
1. AFLP 분석을 이용한 품종간 유연관계 분석 .....	25
2. SSR 마커 선발 및 고추의 품종간 유연관계 분석 .....	25
3. AFLP와 SSR 마커와의 상관관계 분석 .....	27
4. F <sub>1</sub> 순도 검정용 primer 선발 및 SSR 마커의 유전양상 .....	27
제 3 절 DNA 기법을 이용한 고추의 유사품종 식별 .....	27
1. AFLP 마커를 이용한 고추의 유연관계 분석 .....	27
가. 유전적 유사도 검정 .....	27



나. AFLP primer 선발 .....	29
2. SSR 마커를 이용한 고추의 유연관계 분석 .....	31
가. 고추 SSR primer 선발 .....	31
나. SSR 마커를 이용한 고추의 유연관계 분석 .....	34
3. AFLP 분석과 SSR 마커와의 상관관계 분석 .....	36
4. F <sub>1</sub> 순도 검정용 primer 선발 및 F <sub>2</sub> 집단을 이용한 SSR marker의 유전양상 .....	37
가. F <sub>1</sub> 순도 검정용 primer 선발 .....	37
나. SSR 마커의 유전양상 .....	38
제 4 장 DNA 기법을 이용한 참외·멜론의 유사품종 식별 .....	40
제 1 절 서론 .....	40
1. 우리나라 참외 품종분화와 육종의 역사 .....	40
2. 재배와 유통품종 .....	41
3. 품종보호제도와 분자생물학적 기술의 이용 .....	42
4. 연구의 목적 .....	42
제 2 절 참외·멜론 품종분류 및 명칭에 관한 제고찰 .....	43
1. 서론 .....	43
2. 분류기준의 변천과정 .....	44
3. 참외, var. <i>makuwa</i> 의 분류기준은 ? .....	44
제 3 절 <i>Cucumis</i> 속 작물 유래 SSR 프라이머 선발 .....	46
1. 재료 및 방법 .....	46
가. 식물체 재료 .....	46
나. 개발된 SSR primer를 이용한 참외 품종식별 적용성 검토 .....	46
2. SSR 프라이머 선발 및 적용성 검토 .....	48
제 4 절 참외 유래 고유 SSR 마커 개발 .....	51
1. 서언 .....	51
2. 재료 및 방법 .....	51
가. 5'-anchored PCR를 이용한 SSR-enriched Library 제작 및 특이 primer 확보 .....	51
나. Chromosome working을 이용한 양 단편 primer의 특이화 .....	51
3. 참외 고유 SSR 마커개발 및 적용성 검토 .....	53

제 5 절 SSR 마커를 이용한 참외·멜론 품종특성구명 .....	55
1. 재료 및 방법 .....	55
2. 참외·멜론 품종별 SSR 마커의 분포 및 특성 .....	56
3. SSR 마커에 의한 품종분류 및 유전적 연관관계 분석 .....	62
제 6 절 SSR 마커의 F <sub>1</sub> 종자 순도검정 이용과 후대 유전분석 .....	65
1. 서언 .....	65
2. 재료 및 방법 .....	65
3. SSR 마커를 이용한 F <sub>1</sub> 종자 순도검정의 실현 .....	67
4. SSR 마커의 F <sub>2</sub> 세대 유전양상 검정 .....	68
제 5 장 품종간 최소거리 설정 .....	69
제 1 절 서론 .....	69
제 2 절 고추의 품종간 최소거리 설정 .....	70
1. 재료 및 방법 .....	70
가. 형태적 특성조사 - DUS test .....	70
나. 품종간 최소거리 설정 .....	70
2. 고추의 형태적 특성조사 결과 .....	71
3. 품종간 최소거리 설정을 위한 형태적 특성조사 .....	72
4. 전문가 공동특성조사를 통한 품종간 최소거리 설정 .....	77
제 3 절 참외·멜론의 품종간 최소거리 설정 .....	78
1. 재료 및 방법 .....	78
가. 형태적 특성조사 - DUS test .....	78
나. 품종간 최소거리 설정 .....	78
2. 참외·멜론의 형태적 특성조사 결과 .....	79
3. 품종별 형태적 특성과 SSR 마커특성의 연관관계 설정 .....	81
4. 전문가 공동특성조사를 통한 품종간 최소거리 설정 .....	83
제 6 장 고추의 SSR 프라이머 개발 .....	86
제 1 절 서론 .....	86
제 2 절 재료 및 방법 .....	87

1. SSR library 구축 및 클론 선발 .....	87
2. Primer 선발 및 PCR 증폭 .....	91
3. Polymorphic information content (PIC) 분석 .....	91
4. SSR primer 개발을 위한 GenBank database 검색 및 고추 EST DB 검색 .....	92
5. 고추 SSR 유전자 지도 작성 .....	92
제 3 절. 결과 및 고찰 .....	92
1. 고추의 SSR 분리 및 동정 .....	92
2. GenBank DB에서 고추 SSR 분석 .....	94
3. SSR 표지 개발 .....	95
4. 고추의 분자 유전자 지도 작성 .....	101
5. 고추 EST DB를 통한 SSR 분석 .....	101
6. EST-SSR 표지 개발 .....	107
제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	111
1. DNA 기법을 이용한 고추의 유사품종 식별연구 .....	111
2. DNA 기법을 이용한 참외의 유사품종 식별연구 .....	112
3. 고추 SSR 마커 개발 .....	113
제 8 장 연구개발 결과의 활용계획 .....	114
제 9 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	116
제 10 장 참고문헌 .....	118
Appendix .....	124

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적 및 필요성

### 1. 품종보호 - 품종의 유사성과 구별성 문제

식물신품종 육종가 권리보호를 위한 종자산업법 시행 (1997. 12. 31)과 우리나라가 국제 식물신품종보호동맹 UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) (Choi, 2001)의 정식 회원국 (2002. 1.)이 된 이후 품종보호권 설정은 종자회사와 육종가의 큰 관심사가 되었다. 더욱이 근래 국내 대규모 종자회사들이 다국적 기업에 흡수되면서 이들은 품종보호권 침해분쟁에 대하여 적극적인 자세를 취하고 있다.

우량품종은 인류 공동의 자산이라는 인식 하에 품종육종가 권리는 정당한 지적재산권으로서 모든 나라에서 보호받음과 함께 이를 통해 우수한 품종의 개발의욕을 고취하고자 하는 바가 UPOV의 지향점이다. 우리나라 또한 UPOV 회원국으로서 국내에서도 품종보호제도의 완전한 실현을 위하여 노력하고 있다. 이를 위해서는 우선 품종을 생물학적으로 정확히 정의하고 계량화하여 ‘구별성’ 혹은 ‘유사함’의 기준을 객관적으로 설정 혹은 수치화 하는 작업 (품종간최소거리설정)이 무엇보다 필요하다.

현재 육종가권리보호를 위한 신품종의 구별성 여부의 판정 기준은 형태적 특성 차이 유무에 있다. 기존품종과 비교하여 1개 이상의 형태적 특성 차이에 근거한 구별성 판정은 이론적으로는 그 의미가 명확하나 i) 신품종과 가장 유사한 기존품종의 선정이 어렵고, ii) 수많은 기존 품종들을 관리, 파악하여 적절한 대조품종을 선정할 효과적인 방법이 없으며, iii) 재배상의 오차요인 (환경적, 년차간, 조사자의 자질에 따른)을 배제할 수 없는 등 실제 운용에 있어 몇 가지 문제점을 안고 있을 뿐만 아니라, i) 구별성으로 인정될 수 있는 표현형질의 설정에 객관적 기준이 불분명하고, ii) 형태적 형질의 구별성 기여도가 동등하여 품종에 대한 체감적 차이를 반영하지 못하는 등 품종과 구별성 정의의 본질적 부분에서도 모순을 내포한다. UPOV/BMT (Biochemical and Molecular Techniques)에서는 이러한 문제점을 보완하고 품종보호권 강화를 위한 실질적 수단의 확보를 목적으로 작물의 특성검정에 생화학 및 분자생물학적 기법을 도입하려는 노력을 적극 경주하고 있다 (UPOV, 2001).

## 2. DNA 마커를 이용한 품종식별

현재까지 품종분류에 적용된 인자로는 전통적인 표현형 위주의 형태적 형질 외에 생화학적 특성인 동위효소 변이, 저장단백질 변이 등이 주로 이용되어져 왔다. 그러나 이러한 기존의 방식들은 변이의 빈도가 낮고, 전 작물에 대한 적용에는 한계가 있는 등 보편적인 특성으로서 품종분류 방식에 적용되기보다는 종자의 순도검정, 종자 혼종 구분에 제한적으로 이용 될 수 있었다. 따라서 품종식별에 직접 적용 가능한 보다 효과적인 기법을 도입할 필요성이 부각되었으며, 최근 UPOV 차원에서 DNA 마커를 활용한 신품종의 특성조사 결과를 구별성 검정에 도입하여 품종보호권 부여에 활용하기 위한 논의를 진행중이다.

DNA 마커는 i) 품종의 유전적 특성을 본질적으로 반영할 뿐만 아니라, ii) 생물체의 보편적 특성으로서 전 작물에 대하여 개발 및 적용이 가능하며, iii) 이론적으로 거의 무한대의 마커를 확보하여 품종 특성화 할 수 있다는 측면에서 그 이상성을 발견할 수 있다. 더욱이 DNA 마커를 품종식별 목적으로 사용할 경우 i) 품종 및 품종간 구별성을 계량화하여 정의할 수 있으며, ii) 환경의 영향을 받지 않고, iii) 품종 구별성에 대한 기여도가 동일하여 구별성 정의에 왜곡이 없는 등 표현형 특성을 대체 보완하는 측면에서 활용도가 매우 높다고 할 수 있다.

## 3. 고추, 참외·멜론 작물의 DNA 지문연구

채소 분야는 우리나라가 국제경쟁력을 갖추고 있는 민간육종 분야로서, 회사간 육종 작물이 특화되어 있지 못하고 시장과 육종목표가 협소하여, 다국적 기업이 참여한 이후 종자 회사 간의 경쟁이 심화되고 있는 실정이다. 더욱이, 채소 분야 품종보호 등록을 위한 출원건수가 2000년 27 건, 2001년 45 건, 2002년 53 건, 2003년 58 건, 그리고 금년도 지난 5월 말로 39건 등으로 꾸준한 증가율을 보이고 있고, 회사별로 대표 품종에 대해서는 보호권을 설정하고 이를 적극 보호하려는 경향이 있어 품종의 구별성 여부가 중요한 관심사로 부각되고 있다. 특히 고추와 참외·멜론의 경우, 시장 규모가 크고 소비가 많지만 국내의 육종 여건상 유통품종의 상당부분이 유사하고 그 만큼 유통체계에 질서가 없는 것이 사실이다. 따라서 선량한 품종개발자의 권리를 보호하고 차후 우량한 품종의 지속적인 개발을 장려하기 위해서는, 무엇보다 품종의 명확한 식별과 특성을 이해하고 유사품종을 판별할 실질적인 수단과 기준을 확보하여야 한다. 이에 본 연구에서는 채소작물 중 소비량과 품종수, 육종면에서 우리나라를 대표하는 고추, 참외·멜론에 대하여 품종간 구별성 검정에 효과적으로 활용할 수

있는 DNA 마커를 확보하고, 이를 이용 품종들 간의 유연관계를 설정하며, 품종별 형태적 특성조사 결과와 연관시켜 대표 유통품종에 대하여 품종간 마커특성에 기준한 유전적 최소거리를 구하고자 하였다. 본 연구 결과는 고추와 참외·멜론 국내 주요 유통품종의 분자유전학적 특성 파악과 품종간 근연관계에 대한 통찰을 통하여 육종가 권리보호는 물론 나아가 우리나라 종자산업 발전에 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 2 절 과제의 구성 및 내용

본 과제는 2개 세부과제와 1개 협동과제로 이루어져 있으며, 연구재료로 고추와 참외·멜론 등 2종의 작물을 대상으로 과제를 수행하였다. 대상 품종 수는 각각 66 품종, 44 품종으로, 해당 작물의 대표적인 시장 유통품종을 상당부분 포함하고 있다. 제 1 세부과제에서는 고추, 참외, 멜론의 형태적 특성 조사, DNA 마커와의 상관관계 분석 및 전문가 협의회를 통한 품종간 최소거리 설정 연구를 수행하였다. 제 2 세부과제에서는 품종식별에 적합한 분자마커 (AFLP, SSR) 개발 및 이를 이용한 품종식별, 품종간 유연관계 설정 그리고 개발된 마커를 활용한 F<sub>1</sub> 순도검정 적용 및 F<sub>2</sub> 세대 유전양상 구명 등 DNA 기법을 이용한 고추, 참외·멜론의 유사품종 식별에 관하여 연구하였다. 협동연구과제의 경우 고추의 SSR primer 개발과 유전자 지도 작성 등에 대한 연구를 수행하였고 개발된 SSR primer는 제 2 세부과제에 분양하여 고추 연구에 활용토록 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외 연구현황

현재 DNA 분자표지 이용기법으로 RFLP, RAPD, AFLP 및 SSR 등이 마커를 활용한 식물의 종속간 유연관계 추정이나, 병저항성 유전자 등 표현형 특성과 연관된 마커 탐색 및 유전자지도 작성 등에 매우 광범위하게 활용되고 있다. 그 중, 식물염색체 상의 microsatellite 부위의 염기서열 다형성을 이용하는 SSR 마커는 개발비용이 많이 소요되는 단점에도 불구하고 PCR 기반의 사용법을 바탕으로 사용이 용이하고 재현성과 다형성 형성의 효율성이 높아 기존의 다른 DNA 마커들을 대체하면서 최근 여러 가지 목적으로 많이 사용되고 있는 바, 품종식별과 유연관계 탐색 연구에서도 현재 주류를 이루고 있는 기법이다.

그러나, DNA 마커를 품종식별 목적으로 직접 적용한 예는 아직 많지 않다. 이는 작물별로 적절한 마커 개발 등 많은 분자유전학적 기초연구의 선행이 필요하기 때문이다. 또 전통적인 표현형 특성과의 상호 조화와, 작물별 적용 방법의 표준화 등 기술적으로 해결해야 될 사항도 없지 않다. 이런 가운데, 최근에 유럽의 품종보호 기관을 중심으로 향미 (Singh et al., 2004), 오이 (Bernet et al., 2003), 밀과 토마토 (Cooke et al., 2003), 유채 (Tommasini et al., 2003), 고추 (Lefebvre et al., 2001), 밀 (Law et al., 1998), 보리 (Schut et al., 1997) 등 국가별 주요 관심 작물에 대하여 다양한 DNA 마커를 품종의 구별성 및 안정성 검정과 품종보호 분야에 적용한 결과들이 발표되고 있다. 이는 최근 UPOV/BMT (Biochemical and Molecular Techniques) 차원에서 DNA 마커를 활용한 신품종의 특성조사 결과를 구별성 검정에 도입하여 품종보호권 부여에 활용하기 위하여 진행 중인 논의와 관련된다 (UPOV, 2001).

멜론, 오이를 비롯한 *Cucumis* 속 작물에 대해서는 SSR을 비롯한 RFLP, AFLP, RAPD 등 다양한 마커가 소비가 집중되는 미국과 유럽을 중심으로 개발되어 이를 이용한 분자유전학적 연구가 이루어져 왔다 (Silberstein et al., 1999; Staub et al., 2004; Zhuang et al., 2004; Lopez-Sese et al., 2002; Staub et al., 2000; Monforte et al., 2003; Danin-Poleg et al., 1998; Danin-Poleg et al., 2001; Chiba et al., 2003; Fazio et al., 2002). 멜론의 경우 다양한 마커와 함께 분자유전자 지도도 완성된 상태다 (Danin-Poleg et al., 2000; Wang et al., 1997)

## 제 2 절      국내 연구현황

우리나라 경우 식량작물 위주의 마커 개발과 적용에 관한 연구가 주류를 이룬 가운데 (Yoon et al., 2001; Jang et al. 2001; Kwon et al., 1999), 채소 작물의 분자마커의 개발과 적용에 관한 연구는 많지 않다 (Lee et al., 2004a; Yoo et al., 2001). 최근 Kwon et al. (2003)과 Moon et al. (2003)은 무, 배추와 고추에서 품종간 분자마커를 이용한 품종식별에 대하여 보고한 바 있다. 고추의 품종 식별에는 농촌진흥청 농업생명공학 연구원에서 개발된 URP (universal rice primer) primer를 활용한 바 있고, AFLP 마커를 이용하여 품종의 genotyping 보다는 유전자 지도 작성이나 내병성 유전자의 mapping에 활용하고 있는 실정이다 (You et al., 2001). 최근에는 고추의 SSR 마커를 개발하고 이를 이용하여 유전자 지도 작성 등에 대한 연구를 수행하여 큰 성과를 얻고 있다 (Lee et al., 2004).

참외에 대해서는 경제적 가치와 우리나라 특산품종으로서 작물의 특수성에 비추어 대부분 농민소득과 직결된 재배기술 및 병해충 방제 연구에 중심이 두어져 왔으며 (Lee et al., 2004b; Park et al., 1998; Shin et al., 1997; Yi et al., 1996; Lee et al., 1995), 분자유전학적인 연구는 극히 미미한 실정이다. 최근 다수의 재래종 참외와 멜론에 대하여 집단간 유전적 다양성 분석에 RAPD 방법이 효과적으로 적용되었다 (Mo et al., 1998). 또 RAPD 마커를 이용한 분자유종 및 AFLP 마커를 이용한 분자유전자 지도 작성이 재래종 참외와 멜론의 교배조합 RILs에서 시도되었다 (이 등, 2000). 그러나 여전히 이 분야의 국내 연구는 현장에서 실용적으로 이용하기에는 분석 자료가 매우 부족한 실정이다.



## 제 3 장 DNA 기법을 이용한 고추의 유사품종 식별

### 제 1 절 서 론

고추의 국내재배 면적은 2002년 기준 76,724 ha [(건고추 : 72,104, 시설고추 : 4,620), (2003년의 경우 건고추 ; 57,502)]로 국내 채소재배 면적 (303,739 ha)의 25%를 점유하고 있고, 2002년 기준 544만불의 종자를 수출할 정도로 외화 획득에 크게 기여하고 있다. 우리나라 고추는 2004년 현재 품종보호 등록된 9품종과 생산판매 신고된 733품종이 유통되고 있으며, 재배방법에 따라 축성, 반축성, 터널조숙 및 조숙 일반재배로 구분된다.

고추는 자식성 작물이지만 타가수정율이 7.6~38.6% 정도이며 웅성불임을 이용한 잡종강제 육종법에 의해 건고추, 풋고추, 피만, 파리 및 관상용 품종이 개발되고 있고, 건고추의 경우 신미성, 내병성 (역병, 탄저병, 바이러스 등) 등과 같은 품질 개선에 육종 목표를 두고 있다. 그러나 잡종강제는 양친의 유전적 근연관계 의해 크게 좌우되기 때문에 적합한 양친의 선택이 무엇보다 중요하나, 품종 육성에 이용되는 유전자원이 제한되어 있어 근래에 육성된 품종의 경우 유전적 유사도가 높은 것으로 추정되고 있다.

최근 분자생물학이 발달하면서 DNA 마커에 활용한 여러 가지 연구가 수행되고 있는데 고추의 경우 유전자 지도 작성 (Paran et al., 2004), 내병성 유전자의 mapping (You et al., 2001), capsaicin 함량과 연관된 마커의 개발 (Bulm et al., 2003) 등과 같은 분야에 다양한 연구 결과가 보고되고 있다. DNA 마커를 활용한 고추의 품종간 유연관계 분석의 경우 외국에서는 여러 가지 유형의 genotype을 가진 고추와 RAPD나 AFLP 마커를 이용하여 유전적 유사도를 분석한 바 있고 (Lefebvre et al., 2001), 국내에서는 URP (universal rice primer) primer를 활용하여 고추 99품종을 분류하였으나 품종의 형태적 특성이 뚜렷한 품종군에 따른 품종 분류는 가능하지만 동일 품종군내에서 품종 분류가 뚜렷하게 이루어지지 않는 문제점이 제시되었다.

품종보호 분야의 경우 유럽을 중심으로 약 30 여개 작물에 대한 구별성 검정에 DNA 마커의 도입 가능성을 검토하고 있는 실정이다 (UPOV 2001). 실제로 스페인과 영국에서는 밀 (Jones et al., 2003, Law et al., 1998), 오이 (Bernet et al., 2003), 유채 (Tommasini et al., 2003)를 대상으로 RAPD, AFLP, SSR 마커를 이용한 DUS test의 적용 가능성을 제시하고 있다.

따라서 본 세부과제에서는 DNA 마커를 이용한 고추의 품종간 최소거리를 설정하는 하는데 기초 자료를 얻고자, AFLP 및 SSR 마커와 고추 66품종의 유연관계를 분석하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. AFLP 분석을 이용한 품종간 유연관계 분석

본 실험에는 국내 종묘회사로부터 분양 받은 고추 (*Capsicum annuum* L.) 66 품종을 이용하였다 (표 3-1). 공시품종의 종자를 50공 프러그 육묘판에 파종하여 본엽이 3~4매 완전히 전개되었을 때 각 품종당 5개의 생장점 부위 잎을 채취하고 액체질소를 이용하여 마쇄하여 DNeasy Plant Mini Kit<sup>®</sup> (QIAGEN GmbH, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA양은 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 비색 정량하고 최종 농도가 25 ng/ $\mu$ l가 되도록 희석한 다음 AFLP 분석에 이용하였다.

1.1.1. AFLP 분석은 AFLP Analysis System I kit (Gibco-BRL, USA)에 이용하여 수행하였으며, PCR 반응은 touch down PCR 14 cycles ; 95 $^{\circ}$ C 10초, 65 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C ( $\Delta$ =-0.5 $^{\circ}$ C/cycle) 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초, normal PCR 25 cycles; 95 $^{\circ}$ C 10초, 58 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분, final extension 72 $^{\circ}$ C 5분간 실시하였다. 증폭된 DNA 산물은 6% polyacrylamide sequencing gel에 2시간 전기영동 한 다음 Silver sequence<sup>TM</sup> staining reagents (Promega, USA)로 염색하여 band를 확인하고 다형성 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 수치화 하여 기록하였다.

1.1.2. 공시된 고추 품종에 대한 유전적 유사도는 NTSYSpc program (Rohlf, 2000)을 이용하여 simple matching (Sneath와 Sokal 1973) 방법에 의해 산출하였고, 이 값을 근거로 하여 비가중산술방식 (UPGMA : unweighted pair group method using arithmetic averages) 의해 집괴분석 하였다.

### 2. SSR 마커 선발 및 고추의 품종간 유연관계 분석

SSR 마커에 의한 고추 66품종의 유전적 유사도를 분석하는데 적합한 primer를 선발하기 위하여, AFLP 유사도 지수가 100%인 ‘향촌’과 ‘강골’, ‘거성’과 ‘이천년’ 및 이들 품종과 유전적으로 거리가 먼 ‘파리꽃’과 ‘토마피’의 종자를 파종하여 AFLP 분석에서 동일한 방법으로 DNA를 추출한 다음 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 비색 정량하고 최종 농도가 20 ng/ $\mu$ l가 되도록 희석한 다음 SSR 분석에 이용하였다. 본 연구에 사용된 고추 SSR primer는 협동 연구기관에서 개발된 316개를 이용하였으며, PCR 수행 조건은 95 $^{\circ}$ C 12분,

Table 4-1. Pepper cultivars surveyed with AFLP and SSR marker

No.	Cultivars	Seed companies	No.	Cultivars	Seed companies
1	Geumtap (금탑)	SeminisKorea	34	Gold Prize (금상)	Dongbu Hannong
2	Nokkwang (녹광)	SeminisKorea	35	New Viking (뉴바이킹)	Dongbu Hannong
3	Mannyang (만양)	SeminisKorea	36	Geoseong (거성)	Syngenta
4	Pungchon (풍촌)	SeminisKorea	37	Geumdang (금당)	Syngenta
5	Bugang (부강)	SeminisKorea	38	Segye (세계)	Syngenta
6	Sinpung (신평)	SeminisKorea	39	Kangse (강세)	Syngenta
7	Jogwang (조광)	SeminisKorea	40	Echeonnyeon (이천년)	Syngenta
8	Buchon (부촌)	SeminisKorea	41	Jeoktoma (적토마)	Syngenta
9	Supergeumtap(슈퍼금탑)	SeminisKorea	42	Geongang (건강)	Syngenta
10	Dabokgeon (다복건)	SeminisKorea	43	Pocheongcheon (포청천)	Syngenta
11	Myungseong (명성)	SeminisKorea	44	Gangreok Geumdang (강력금당)	Syngenta
12	Jopung (조풍)	Nongwoobio	45	Gukbo (국보)	SeminisKorea
13	Taeyangkeon (태양건)	Nongwoobio	46	Gwangbok (광복)	SeminisKorea
14	Kanggol (강골)	Jeil	47	Daemyeong (대명)	SeminisKorea
15	Singang (신강)	Nongwoobio	48	Garakgimjang2ho (가락김장2호)	SeminisKorea
16	21segi (21세기)	Nongwoobio	49	Onsesang (온세상)	SeminisKorea
17	Sintaeyang (신태양)	Nongwoobio	50	Daebong (대봉)	Nonghyup
18	Manitta (마니따)	Nongwoobio	51	Doore (두레)	Nonghyup
19	Woodeungsaeng(우등생)	Nongwoobio	52	Hangoeul (한고을)	Nonghyup
20	Sinbaram (신바람)	Nongwoobio	53	Ilseokijo (일석이조)	Hyundae
21	Daega (대가)	Nongwoobio	54	Matjarang (맛자랑)	Jinhung
22	Daewang (대왕)	Nongwoobio	55	Sinjogwang (신조광)	SeminisKorea
23	Hanbando (한반도)	Nongwoobio	56	Matjolim wrinkled green (맛조림파리꽃)	SeminisKorea
24	King (왕)	Dongbu Hannong	57	Damrok wrinkled green (담록파리꽃)	SeminisKorea
25	Red Gient (대장경)	Dongbu Hannong	58	Wrinkled green (파리꽃)	SeminisKorea
26	Nostalgia (향촌)	Dongbu Hannong	59	Hansaem wrinkled green (한샘파리꽃)	Nongwoobio
27	Dawn (여명)	Dongbu Hannong	60	Jinseong wrinkled green (진성파리꽃)	Nongwoobio
28	Bridgeroom (종가집)	Dongbu Hannong	61	Nongwoo wrinkled green (농우파리꽃)	Nongwoobio
29	Kumkangsan (금강산)	Dongbu Hannong	62	Seouljang wrinkled green(서울장파리꽃)	Syngenta
30	Four Season (사계)	Dongbu Hannong	63	Nongrok wrinkled green (농록파리꽃)	SeminisKorea
31	Ambition (야망)	Dongbu Hannong	64	Tomapi (토마피)	Dongseonongyeo
32	Fortune (만복)	Dongbu Hannong	65	Perpecto (퍼펙토)	SeminisKorea
33	Viking (바이킹)	Dongbu Hannong	66	New Ace pimento (뉴에이스퍼만)	Takii

94°C 25초, 47°C 25초, 68°C 1분, final extension은 72°C에서 20분간 수행하였다. 증폭된 DNA 산물은 6% polyacrylamide sequencing gel에 2시간 전기영동 한 다음 Silver sequence™ staining reagents (Promega, USA)로 염색하여 polymorphism 여부를 확인하였다. 그리고 SSR primer 선발과정에서 다형성을 보이면서 밴드가 깨끗하고 allele수가 많은 27개 primer를 이용하여 고추 66품종의 유사도를 분석하였다.

### 3. AFLP와 SSR 마커와의 상관관계 분석

AFLP 마커를 이용하여 작성된 덴드로그램과 SSR 마커를 이용하여 얻어진 덴드로그램의 상관관계를 분석하기 위하여 Mantel matrix test 방법 (Mantel 1967)에 의해 상관계수를 구하고 적합성 여부를 판별하였다.

### 4. F<sub>1</sub> 순도 검정용 primer 선발 및 SSR 마커의 유전양상

고추 F<sub>1</sub> 순도 검정 및 SSR primer의 유전양상을 구명하기 위하여, ‘칠성초’를 자방친으로 하고 ‘AC2258’ 및 ‘KC350-2’가 화분친으로 교배된 F<sub>1</sub> 및 F<sub>2</sub> 집단을 양성하였다. 이들 조합의 양친, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> 집단과 SSR 마커중 PIC value가 높고 밴드가 깨끗한 3개의 SSR 마커를 이용하여 F<sub>1</sub> 순도검정 및 F<sub>2</sub> 집단의 유전양상을 조사하였다.

## 제 3 절 DNA 기법을 이용한 고추의 유사품종 식별

### 1. AFLP 마커를 이용한 고추의 유연관계 분석

#### 가. AFLP primer 선발

고추의 AFLP 분석에 적합한 primer를 선발하기 위하여, *EcoRI/MseI* primer 조합 312개를 분석하여 band 수나 선명도가 양호한 48개의 조합을 선발하였으며, 최종 19개의 primer 조합에서 polymorphic band pattern을 나타내었다.

고추 66품종과 기 선발된 primer를 이용하여 AFLP 분석을 수행한 바 (표 3-2), 19개의 primer 조합에서 얻어진 전체 band의 수는 125개였고, polymorphism을 나타낸 band 수는 총 103개로 polymorphic band의 비율은 82% 였다. 각 primer 조합 당 평균 band 수는 6.6개 였

으며, 다형성을 나타내는 band는 79~748 bp에 위치하였고, 주로 분포한 band의 범위는 100~300 bp 였다 (그림 3-1).

Table 3-2. Number of polymorphic band and band size produced from 19 primer combinations

Primers	3'-end selective nucleotides of the primers		No. of polymorphic bands	Band size (bp)
	<i>EcoR</i> I	<i>Mse</i> I		
1	ACGGC	CACAG	5	80, 101, 116, 204, 398
2	ACGGC	CTGC	3	130, 151, 157
3	ACGGT	CATG	6	86, 149, 222, 271, 300, 348
4	ACGAG	CTGC	5	97, 106, 133, 213, 298
5	ACGAC	CAAC	6	79, 130, 149, 197, 269, 550
6	ACGG	CACAG	5	116, 119, 151, 255, 396
7	AGCA	CACAG	7	106, 127, 200, 257, 277, 285, 289
8	AACG	CACAG	3	142, 305, 610
9	AACG	CTAGC	4	176, 255, 317, 457
10	AAGT	CTCC	5	111, 152, 187, 231, 290
11	AACA	CACA	8	148, 164, 174, 176, 218, 250, 328, 748
12	ACGT	CTCG	13	126, 186, 273, 282, 292, 304
13	AGCA	CTCC	6	110, 131, 259, 265, 269, 294
14	AACA	CAAC	7	110, 145, 148, 157, 191, 403, 436
15	AGGC	CAGC	7	158, 166, 170, 186, 189, 204, 302
16	ACTG	CAAC	5	80, 135, 165, 173, 182
17	AGGC	CAAC	8	140, 164, 171, 182, 192, 210, 246, 390
18	ACTG	CAGC	4	120, 180, 190, 205
19	AAGC	CAGC	3	126, 235, 243
Total			103	

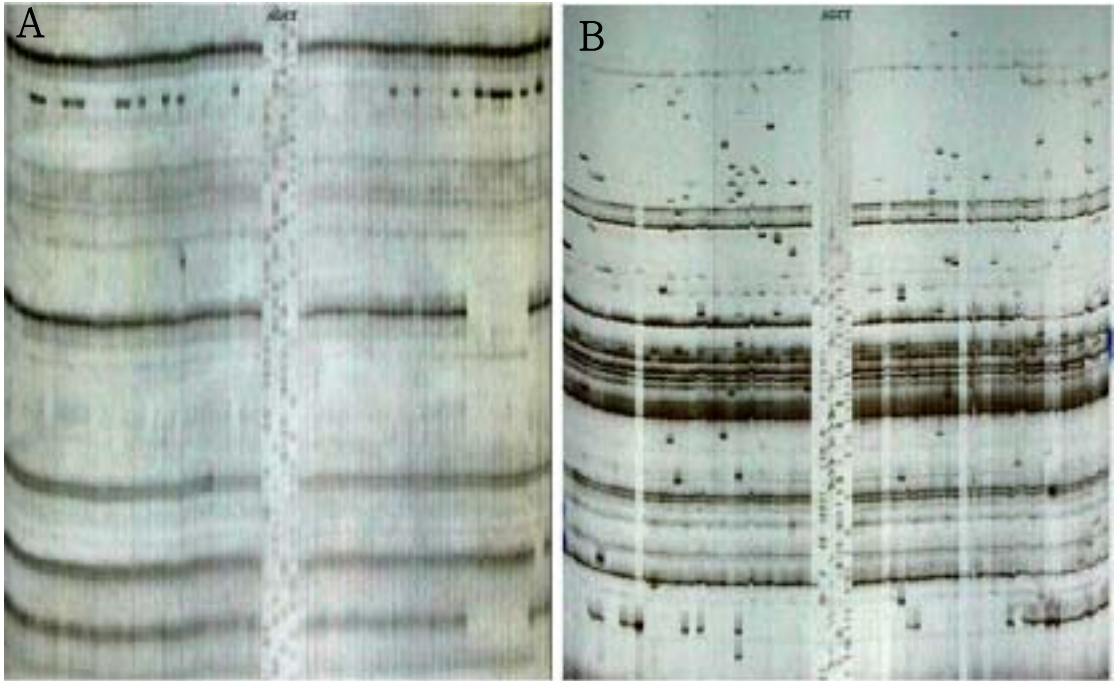


Fig. 3-1. AFLP profiles of 66 pepper varieties obtained using primer pairs 4 (A) and 7 (B).

#### 나. 유전적 유사도 검정

AFLP 분석을 통한 고추 66 품종의 유전적 유사도를 분석한 바 (그림 3-2), 전체 유사도 지수는 0.49~1.00의 범위로 나타났으며, 유전적 유사도 값 0.75를 기준으로 하였을 때 총 66개 품종을 7개 군으로 분류할 수 있었다.

제 I 군은 총 31개 품종이 속하였으며 유사도 지수 0.77에서 I-A과 I-B로 다시 2개의 군으로 분류되었다. I-A군에는 ‘금탑’, ‘거성’, ‘신태양’, ‘금당’, ‘포청천’, ‘만냥’ 및 ‘한반도’ 등 22개 품종이 속하였고, ‘금탑’과 ‘신바람’, ‘강골’과 ‘향촌’, ‘거성’과 ‘이천년’이 유사도 지수 1.00으로 나타났다. I-B군에는 ‘운세상’, ‘신강’, ‘21세기’ 등 9개 품종이 속하였으며 ‘녹광’과 ‘조풍’의 유사도 지수가 0.98로 매우 높게 나타났다. 제 II 군에는 ‘풍촌’, ‘부촌’, ‘마니따’, ‘슈퍼금탑’ 등 주로 대과종인 9개 품종이 속하였으며, ‘명성’과 ‘신조광’이 유사도 지수가 0.96으로 나타나 유전적으로 근연관계에 있는 것으로 분석되었다. 제 III 군에는 ‘금강산’, ‘강세’, ‘세계’, ‘금상’ 등 13개 품종이 속하였으며, ‘금상’은 유사도 지수 0.77에서 다른 품종들과 가장 먼저 구분되었고, 나머지 12개 품종들 중 ‘다복건’과 ‘우등생’이 유사도 지수 0.85에서 나머지 10개 품종과 구분.

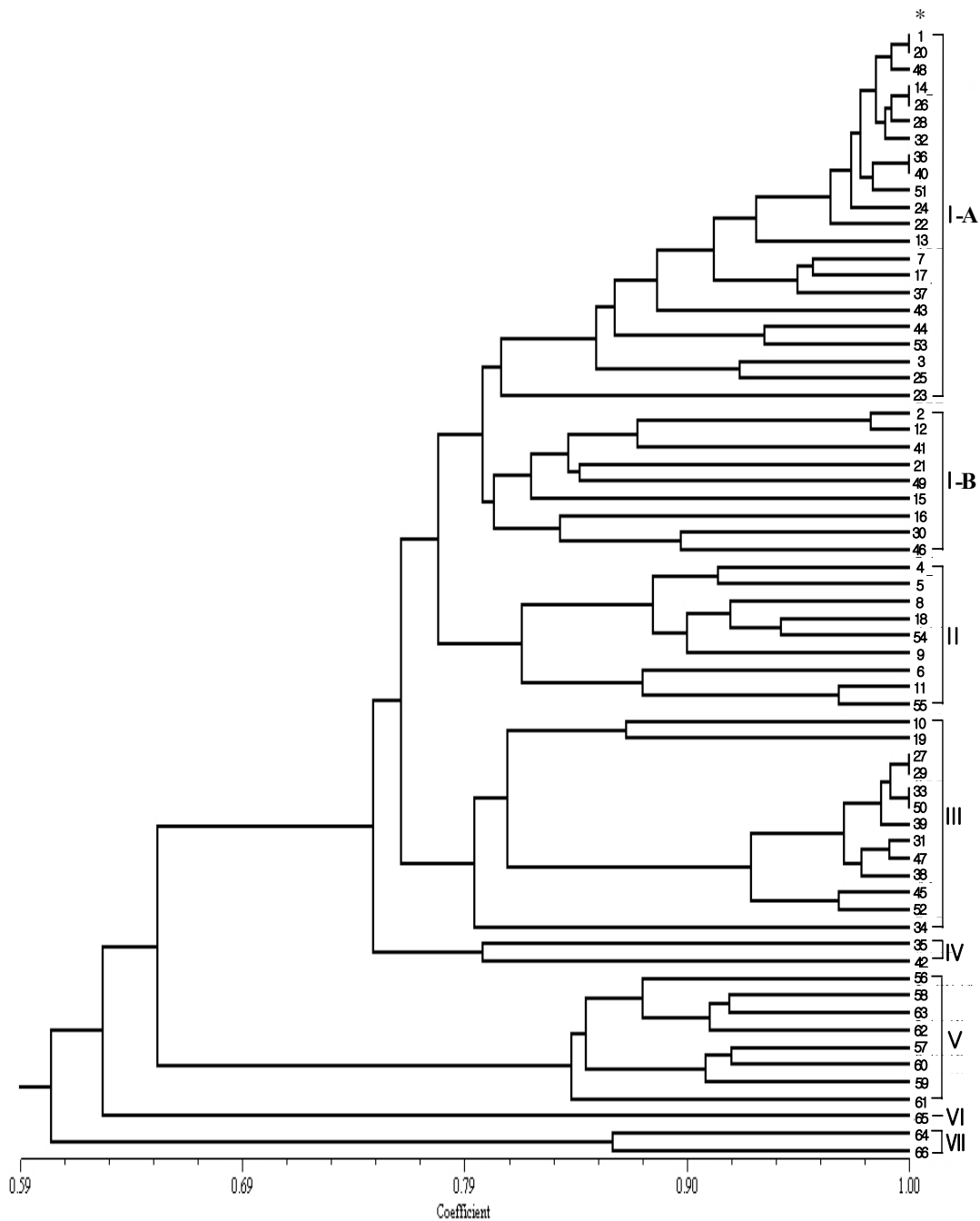


Fig. 3-2. Dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis based on genetic similarity coefficient using 103 AFLP bands of 66 pepper cultivars.

\* : Refer to the Table 4-1 for cultivar identification.

되었는데, 이들 품종들의 유사도 지수는 0.91 이상으로 나타났다. 제 IV군에는 ‘뉴바이킹’와 ‘건강’ 두 품종만이 속하였고 유사도 지수 0.76으로 비교적 유전적 거리가 멀었다. 제 V군은 파리 고추군으로 총 8개 품종이 속하였는데 유사도 값 0.82에서 ‘농우파리꽃’과 나머지 7개 품종들로 크게 분류되었고, 유사도 지수 0.83에서 ‘파리꽃’이 속하는 군과 ‘한샘파리꽃’이 속하는 군으로 분류되었다. 특히 파리 고추군은 유사도 지수 0.65에서 나머지 6개 군과 가장 뚜렷이 구분되었다. 제 VI군인 ‘퍼펙토’는 유사도 지수 0.62에서 VII군인 피만형 품종군과 구분되었다

식물의 품종간 유연관계 분석에는 형태적 특성이나 세포학적 연구 및 동위효소가 연구초기에 이용되어 왔으나, 최근에는 RFLP, RAPD, AFLP 등의 분석방법에 의한 DNA 마커가 활용되고 있다 (Staub et al., 1996). 고추의 경우 분석방법에 따라 그 효율성이 다른 것으로 보고되고 있는데, RFLP 분석은 고추 소과종과 대과종 사이에는 다형성을 보이나 유전적으로 가까운 재배종은 품종 구분에 효과적이지 않다고 하였으며 (Lefebvre et al., 1993), RAPD의 경우 분석방법이 간편하여 F<sub>1</sub>의 순도 검정에 효과적이거나, dominant 마커기 때문에 F<sub>1</sub> 품종의 경우 근연관계 분석에는 적합하지 않다고 하였다 (Ballester & de Vicente 1998). 그러나 Paran et al. (1998)과 Lefebvre et al. (2001)은 고추의 경우 AFLP 분석법은 RAPD에 비해 4배 정도의 다형성 밴드를 나타내며 AFLP의 genotype에 따라 품종 생태형을 뚜렷하게 구분할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 AFLP 유사도에 따라 7개의 품종군으로 구분되어 Paran et al. (1998)과 Lefebvre et al. (2001)의 연구 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 공시품종 중 ‘금탑’과 ‘신바람’, ‘강골’과 ‘향촌’, ‘거성’과 ‘이천년’, ‘여명’과 ‘금강산’ 및 ‘바이킹’과 ‘대봉’은 본 연구에서 선발한 primer로는 품종 구분이 어려웠는데, 앞으로 이들 품종에 대해서는 세밀한 주요 작물학적 특성조사와 더불어 다양한 DNA 마커와의 관계분석이 구체적으로 이루어진다면 이러한 연구 결과는 품종의 구별성 분석에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 2. SSR 마커를 이용한 고추의 유연관계 분석

### 가. 고추 SSR primer 선발

SSR 마커를 이용한 고추 66품종의 유전적 유연관계를 조사하기 위하여, 협동 연구기관에서 개발된 316개의 SSR primer를 분양받아 AFLP 분석에서 유사도 지수가 100%인 ‘향촌’과 ‘강골’, ‘거성’과 ‘이천년’ 및 이들 품종과 유전적으로 거리가 먼 품종인 ‘파리꽃’과 ‘토마피’와의 polymorphisms 여부를 조사한 바 (표 3-3), SSR primer중 건고추 (‘향촌’, ‘강골’,



‘거성’, ‘이천년’), ‘파리꽃’ 및 ‘토마피’에서 다형성을 보이는 비율은 전체의 16.5%인 32개 였으며, AFLP 유사도가 100%인 건고추내에서 다형성을 보이는 primer는 20개 였다. 이들 primer 중 AFLP 유사도가 가까운 ‘향촌’, ‘강골’, ‘거성’, ‘이천년’에서 polymorphism을 보인 20개의 primer와 ‘파리꽃’ 및 ‘토마피’에서 polymorphism을 보인 7개의 primer를 최종 선발하여 고추 66품종의 품종간 유연관계 분석에 이용하였다.

Table 3-3. SSR marker shown polymorphism primer in 6 pepper cultivars

No. of primers tested	No. primers shown polymorphism in cultivars with 100 % AFLP similarity (%)	No. primers shown polymorphism in wrinkled green and Tomapi (%)	Total (%)
316	20 (6.3)	32 (10.1)	52 (16.5)

고추 66품종의 genomic DNA 와 27개 SSR primer를 이용하여 PCR 증폭한 결과 89개의 밴드가 증폭되었으며, primer당 평균 밴드의 수는 3.29개로 나타났다. 그리고 각각의 primer에 의해 증폭된 대립유전자의 수는 2~7개로 비교적 다양한 분포를 보였으며, PIC 값은 0.03(*Hpms1-274*)~0.877(*HpmsF015*) 범위에 분포하였으며, 평균치는 0.529 였다 (표 3-4, 그림 3-3).

고추, 토마토 등과 같은 가지과 작물을 SSR 분석을 하였을 때 발생하는 평균 대립 유전자의 수는 다른 작물에 비해 낮게 나타나는 것으로 알려져 있다 (McCouch et al 1997). Kwon et al. (2002)은 벼에서 65개의 SSR 마커에 의해 발생된 대립유전자의 수는 2~18개로 다양한 분포를 보이며 평균 대립유전자의 수는 4.45개 이며 PIC값의 평균치는 0.43이라고 보고한 바 있고, Hu et al. (2004)은 고구마에 대한 SSR 마커의 분석 결과 2~9개의 대립유전자가 증폭되며 평균 대립유전자의 수는 4.7개라고 하였으며, He et al. (2003)은 토마토에서 158개의 SSR 마커를 이용하여 19품종을 분석하였을 때 2~6개의 SSR allele가 증폭되고 PIC 값은 0.09~0.67의 범위 안에 분포함을 밝혔다. 본 연구에서도 고추 66품종을 SSR 분석하였을 때 발생하는 평균 대립유전자의 수가 벼와 고구마보다 낮게 나타나 McCouch et al. (1997)의 연구결과를 확인할 수 있었으며, He et al (2003)이 연구한 토마토와 SSR allele의 수나 PIC value 면에서 유사한 경향을 보였다.

Table 3-4. Description and PIC values of SSR marker detected among 66 pepper cultivars

SSR primers	Core motif	No. of polymorphic bands	PIC value
<i>Hpms1-1</i>	(CA) <sub>12</sub> (TA) <sub>4</sub>	3	0.652
<i>Hpms1-5</i>	(AT) <sub>11</sub> (GT) <sub>17</sub>	5	0.608
<i>Hpms1-106</i>	(AAAAAT) <sub>14</sub>	2	0.455
<i>Hpms1-111</i>	(AAT) <sub>11</sub>	6	0.803
<i>Hpms1-143</i>	(AG) <sub>12</sub>	3	0.636
<i>Hpms1-148</i>	(GA) <sub>14</sub>	4	0.454
<i>Hpms1-172</i>	(GA) <sub>15</sub>	7	0.836
<i>Hpms1-274</i>	(GTT) <sub>7</sub>	2	0.030
<i>Hpms2-13</i>	(AC) <sub>12</sub> (AT) <sub>4</sub>	4	0.821
<i>Hpms2-21</i>	(AT) <sub>11</sub> (AC) <sub>9</sub> (ATAC) <sub>10</sub>	3	0.838
<i>HpmsAT2-14</i>	(AAT) <sub>16</sub> IMP	2	0.367
<i>HpmsE015</i>	(GCA) <sub>8</sub>	3	0.723
<i>HpmsE038</i>	(ATGTA) <sub>3</sub>	3	0.699
<i>HpmsF010</i>	-	2	0.115
<i>HpmsF013</i>	(TAC) <sub>4</sub>	3	0.454
<i>HpmsF015</i>	(CA) <sub>21</sub>	5	0.877
<i>HpmsF018</i>	(AAT) <sub>9</sub>	2	0.522
<i>HpmsF019</i>	(TC) <sub>16</sub>	4	0.624
<i>HpmsF032</i>	(TC) <sub>15</sub>	2	0.059
<i>HpmsF037</i>	(TTTC) <sub>6</sub>	2	0.531
<i>HpmsF042</i>	(ATC) <sub>5</sub>	2	0.364
<i>HpmsF053</i>	(CTT) <sub>12</sub>	6	0.834
<i>HpmsF055</i>	(TGG) <sub>4</sub>	4	0.236
<i>HpmsF061</i>	(AT) <sub>10</sub>	3	0.360
<i>HpmsF062</i>	(CTT) <sub>8</sub>	2	0.327
CAN130829	T <sub>16</sub>	2	0.543
AF244121	(TTG) <sub>5</sub> IMP(AT) <sub>6</sub> IMP(GT) <sub>3</sub> IMP	3	0.463
Mean		3.29	0.529

한편 고추 66품종의 분석에 이용된 SSR 마커에 따라 대립유전자 수와 PIC 값에서 큰 변이를 보였는데 *Hpms1-111*, *Hpms1-172*, *HpmsF015*, *HpmsF053*은 PIC 값이 0.80이상이고, 대립유전자의 수도 5개 이상으로 높게 나타나 (그림 3-3), 근연품종의 판별과 유용 유전자의 mapping 및 F<sub>1</sub> 품종의 순도검정에 유용하게 이용될 수 있을 것이라고 생각된다.

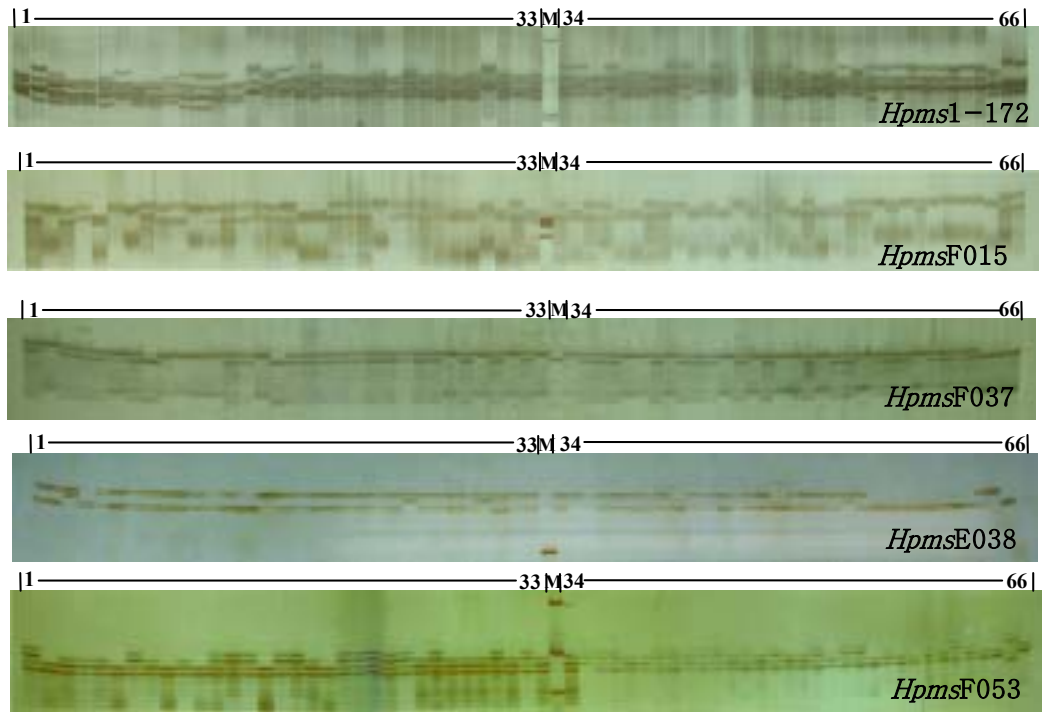


Fig. 3-3. Amplification of 66 pepper varieties using *Hpms1-172*, *HpmsF015*, *HpmsF037*, *HpmsE038* and *HpmsF053* locus. 1-66 : Refer to the Table 3-1 for cultivar identification. M : PGEM DNA 마커s

#### 나. SSR 마커를 이용한 고추의 유연관계 분석

SSR 마커를 이용한 고추 66품종의 유전적 유사도를 분석한 바 전체 유사도 지수는 0.54~1.00의 범위로 나타났으며 유사도 값 0.82를 기준으로 할 때 총 10개의 품종군으로 분류할 수 있었다 (그림 3-4). I 군에는 ‘금탑’의 23품종이 분포하였고 유사도 지수 0.83에서 2개의 품종군으로 분류되었으며 ‘금탑’과 ‘만복’, ‘신바람’과 ‘대왕’은 유사도 지수가 1.00으로 나타났다. AFLP 분석의 경우 I 군에 속한 ‘금탑’과 ‘신바람’, ‘강골’과 ‘향촌’, ‘거성’과 ‘이천년’의 경우 유사도 지수가 1.00으로 나타났는데, SSR 마커를 이용할 경우 이들 품종은 0.96%이상의 높은 유전적 유사도를 보이는 것으로 분석되었다. II 군의 경우 ‘마니따’를 포함한 14품종이 속하였는데 유사도 지수 0.88에서 대과종과 건고추군으로 다시 분류되는 경향을 보였다.

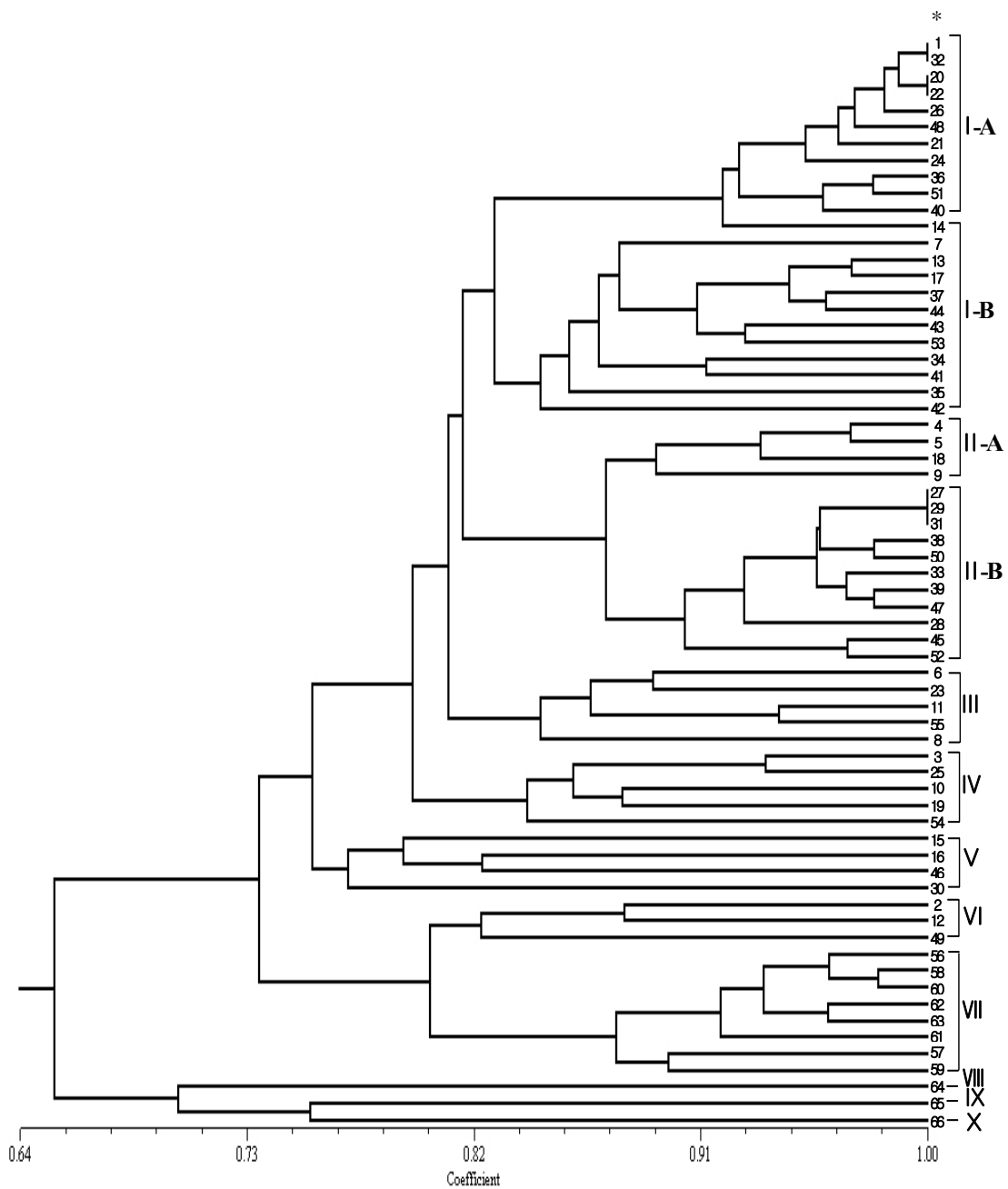


Fig. 3-4. Dendrogram of 66 pepper cultivars obtained from SSR markers.

\* : Refer to the Table 4-1 for cultivar identification.

AFLP 분석의 경우 II군에 속한 품종들중 ‘여명’과 ‘금강산’, ‘바이킹’과 ‘대봉’의 유사도 지수가 1.00으로 품종구분이 어려웠으나 SSR 마커를 이용할 경우 ‘바이킹’과 ‘대봉’의 유사도 지수가 0.96으로 조사되었으며, ‘여명’과 ‘금강산’은 SSR 마커로도 품종 구분이 어려운 것으로 조사되었다. III군은 유사도 지수 0.87~0.94 범위에서 ‘신평’의 4품종이 속하였고, IV군의 경우 유사도 지수 0.84~0.94의 범위에서 ‘만냥’의 5품종이 속하였다. V군에는 ‘신강’, ‘21세기’, ‘광복’, ‘세계’가 속하였으며 유사도 지수는 0.73 이상이었다. VI군은 ‘녹광’, ‘조풍’, ‘운세상’ 3품종이 속하였고, VII군은 ‘짜리고추’ 8개 품종이 모두 1개의 군으로 분류되었다. 그리고 유사도 지수 0.74에서 ‘토마피’, ‘퍼팩토’, ‘뉴에이스 피망’이 각각 하나의 품종군으로 뚜렷이 구분되었다.

본 연구에서 AFLP 및 SSR 마커를 이용하여 유전적 유사도를 분석하였을 때 마커의 종류에 따라 1.00의 유사도 값을 갖는 품종들은 마커의 종류를 달리하여도 0.96이상의 높은 유사도를 나타내어 이들 품종들은 유전적으로 매우 근연관계임을 확인할 수 있었다.

### 3. AFLP 분석과 SSR 마커와의 상관관계 분석

AFLP 및 SSR 마커를 이용한 고추 66품종에 대한 유전적 유사도의 상관관계를 조사하기 위하여 Mantel matrix correspondence 분석을 실시한 바 (그림 3-5), 상관계수가 0.82로 나타나 본 연구에서 이용된 두 종류의 마커 모두 고추의 품종분류에 활용할 수 있다는 것을 제시해 주고 있다. 품종의 유전적 유연관계 분석에 AFLP 마커와 SSR 마커를 이용하여 그 효율성을 보고한 것이 몇몇 연구자에 의해 보고되고 있는데, Heckenberger et al (2003)은 옥수수 inbred line을 대상으로 AFLP와 SSR 마커를 이용하여 유연관계 분석 실시한 바 두 개의 마커간의 상관계수가 0.97로 높게 나타남을 지적한 바 있고, Belaj et al (2003)은 Olive의 유연관계 분석에 AFLP와 SSR 마커의 상관계수는 다소 낮지만 덴드로그램의 topology는 거의 유사함을 지적한 바 있고, Anthony et al. (2002)는 coffee의 품종 분류에 SSR 마커와 AFLP 마커를 이용하여 두 마커간 효율성을 비교하였을 때 마커간에 큰 차이가 없음을 지적한 바 있다.

본 연구에서도 고추 유통 품종의 genotyping에 SSR과 AFLP 마커를 이용하였을 때 두 개의 마커간의 상관계수가 높게 나타나, 두 개의 마커중 어떠한 것을 활용하여도 품종식별이 가능할 것으로 추정되었다. 그러나 실험의 재현성이나 경비, 노력등과 같은 제반 여건을 고려할 때 AFLP 마커보다는 SSR 마커가 더 효율적일 것으로 사료된다.

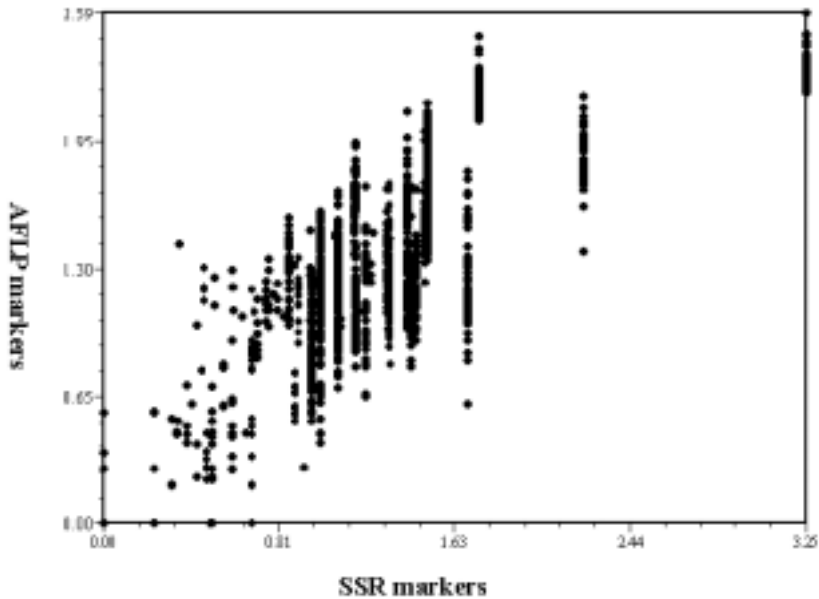


Fig. 3-5. Relationship between AFLP and SSR marker genetic distance in 66 pepper cultivars.

#### 4. F<sub>1</sub> 순도 검정용 primer 선발 및 SSR 마커의 유전양상

##### 가. F<sub>1</sub> 순도 검정용 primer 선발

SSR 마커를 활용한 고추 66품종의 품종간 유연관계 분석에서 밴드의 양상이 깨끗하거나 PIC 값이 높은 SSR 마커 *HpmsF15*, 37, 53과 ‘칠성초/AC2258’, ‘칠성초/KC350-2’ 조합을 이용하여 F<sub>1</sub> 순도 검정의 활용 가능성을 조사한 바 (그림 3-6), 양친 사이에 뚜렷한 다형성 밴드를 나타내었으며, 이들이 교배된 F<sub>1</sub>은 모두 heterozygous한 형태의 밴드를 보여 이들 primer는 F<sub>1</sub>의 순도 검정에 활용 가능성이 있는 것으로 분석되었다.

일반적으로 F<sub>1</sub> 품종의 순도검정은 표현형적 관찰이나 동위효소를 많이 이용하고 있으나, 최근에는 DNA 마커를 F<sub>1</sub> 순도 검정에 활용하는 방안이 제시되고 있으며 이를 직접 산업화에 활용하기도 한다. 그러나 품종 육성에 이용되는 양친의 유전적 근연도가 너무 유전적 거리가 가깝고, 양친에 다형성을 나타내는 마커를 선발해야 하는 등과 같은 문제점 때문에 이를 직접 활용하는 데는 큰 어려움이 있다. RAPD 마커의 경우 대부분이 dominant이기 때문에 화분친 특이적인 밴드를 보이는 마커를 선발하여 이용하고 있으나 실험의 재현성 등과

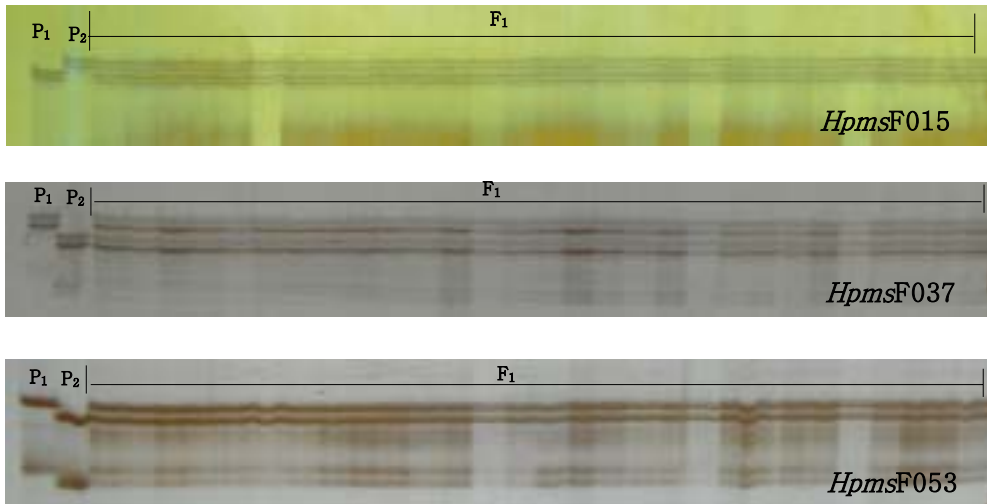


Fig. 3-6. Testing genetic purity of F<sub>1</sub> seeds of ‘Chilsungcho(P<sub>1</sub>)/AC2258(P<sub>2</sub>)’ using the SSR markers, *HpmsF015*, *HpmsF037*, and *HpmsF053*.

같은 문제점이 제기되고 있다. 그러나 본 연구에서 선발된 SSR 마커의 경우 단순 반복되는 염기서열의 차이로 polymorphism을 보이기 때문에 근연 관계인 품종의 genotyping에도 적합할 뿐만 아니라 마커의 유형이 codominant를 나타내기 때문에 F<sub>1</sub> 품종의 순도검정에 적합할 것으로 사료되었다.

#### 나. SSR 마커의 유전양상

고추 F<sub>2</sub> 집단에서 SSR 마커의 유전양상을 분석하고자 ‘칠성초’에 ‘AC2258’이나 ‘KC350-2’가 교배된 F<sub>2</sub> 집단과 3개의 SSR 마커 (*HpmsF015*, 037, 053)의 유전양상을 조사하기 위하여 적합도 검정을 실시한 바 (표 3-5, 그림 3-7), ‘칠성초/KC350-2’ 조합 F<sub>2</sub> 집단의 경우 SSR 마커, *HpmsF015*의 분리비가 3:1로 나타나 dominant 유형을 나타내었으나, 나머지 공시조합의 SSR 마커는 1:2:1의 이론적 분리비에 적합한 것으로 분석되었다. 금후 이 연구결과는 내병성 유전자의 mapping이나 유전자 지도 작성에 기초 자료로 활용될 수 있을 것이라고 사료된다.

Table 3-5. Segregation mode and Chi-square goodness-of-fit tests for SSR markers in the F<sub>2</sub> population derived from two crosses, 'Chilsungcho/KC350-2' and 'Chilsungcho/AC2258'

SSR markers	Cross combinations	Segregation mode <sup>a)</sup>			No of plants tested	$\chi^2$	Types
		A	H	B			
<i>HpmsF015</i>	Chilsungcho/KC350-2	10		34	44	0.12	Dominant(3:1)
<i>HpmsF053</i>	Chilsungcho/KC350-2	8	17	5	30	1.12	Codominant(1:2:1)
<i>HpmsF015</i>	Chilsungcho/AC2258	10	30	10	50	1.32	Codominant(1:2:1)
<i>HpmsF037</i>	Chilsungcho/AC2258	10	29	11	50	1.32	Codominant(1:2:1)
<i>HpmsF053</i>	Chilsungcho/AC2258	5	17	8	30	1.12	Codominant(1:2:1)

<sup>a)</sup>A : 'Chilsungcho type' H : Hetero type B : 'KC350-2' or 'AC2258' type

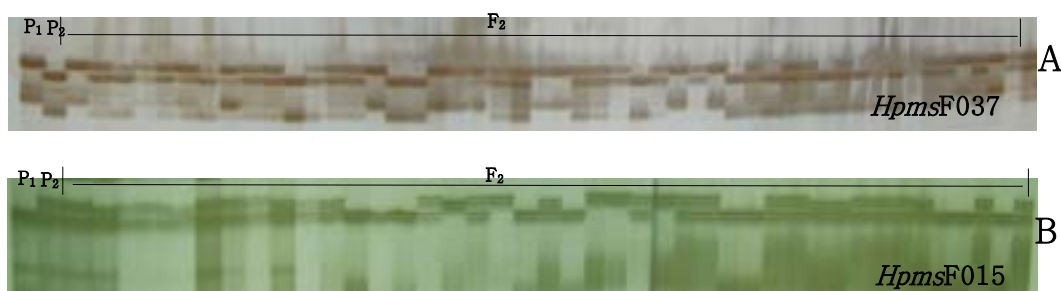


Fig. 3-7. Segregation mode of SSR markers in F<sub>2</sub> plants derived from 'Chilsungcho(P<sub>1</sub>)/KC350-2(P<sub>2</sub>)'(A) and 'Chilsungcho(P<sub>1</sub>)/AC2258(P<sub>2</sub>)'(B).



## 제 4 장 DNA 기법을 이용한 참외·멜론의 유사품종 식별

### 제 1 절 서론

#### 1. 우리나라 참외 품종분화와 육종의 역사

참외는 멜론과 함께 박과류 (Cucurbitaceae) 1년생 채소작물로서 식물분류학상으로는 동일하게 *Cucumis melo* L. (2n=24)에 속한다. 참외 (Oriental melon)는 우리나라에 전래된 재배역사가 오래되어 한국 특산품종화 되었으며(김 등, 1998; 광, 1982), 멜론은 주로 유럽 쪽에 전파되어 건조한 기후에 적응한 품종분화가 이루어져 온 것으로 알려져 왔다.

우리나라 참외의 품종개발 역사는 재래종 참외 재배단계에서 ‘금싸라기은천’이라는 교배종 참외가 나오기까지로 정리할 수 있으며, 그 과정이 대부분 최근 50 여년 사이에 이루어 졌다. 우리나라에서 오래 동안 재배되어 온 재래종 참외는 그 기원이 삼국시대에까지 미친다고 알려져 있지만, 1950년대 후반 은천 참외 도입(1957년)과 1970년대 이후 우리나라 교배종 참외의 효시가 된 신은천 참외의 육성(1974년 중앙종묘)으로 진정한 교배종 참외의 재배 역사가 시작되었다고 말할 수 있다. 이어 1984년도에 개발되어 보급된 금싸라기은천 참외는 특히 우리나라 교배종 참외의 재배 역사에 새 장을 열었다고 할 수 있다. 참외 교배종 품종들이 개발되던 초기 그 모델이 되었던 일본의 경우에 유사계통 품종들이 시장에서 자취를 감추고 소비마저 거의 사라진 지금의 상황을 살펴보면 우리나라에서 금싸라기은천 품종의 출현이 갖는 의미는 더욱 명백해 진다. 금싸라기은천 참외는 이전 품종들과 달리 단성화로 생리적 특성이 전환된 것이 가장 큰 특징이며, 당도가 높고 육질의 기호도와 저장성을 높여 전반적인 품질의 향상을 가져와 소비량 감소로 급격히 줄어들던 재배면적을 확대시키면서 우리나라 대표적인 과채류의 하나로 자리 잡게 되는 계기가 되었다. 초기 발효과 발생으로 민원이 제기되는 등 몇 가지 문제점이 없지 않았으나 재배기술의 발달에 따라 대부분 해결됨으로써 지금까지 금싸라기은천 계통 참외는 재배와 품종육성에서 우리나라 참외의 주류를 이루고 있다.

그러나 그 사이 부작용도 없지 않아, 금싸라기은천 품종이 소비자에게 심어준 강한 인상은 참외에 대한 상품적, 작물학적 가치 기준의 고정화로 이어져 필연적으로 품종의 단순화

를 촉발하였고, 더 나아가 다양한 신품종의 개발과 시장진입에 대한 강한 저항선으로 작용하고 있다는 점이다. 이는 우리나라에서 참외 작물의 지역적 집중도가 높다는 사실과 함께 품종의 다양성을 떨어뜨리는 요소로서, 구별성을 기초로 하는 국제적 기준의 품종보호시대에 하나의 약점이라 아니할 수 없다. 또한, 교배종 우량품종 위주의 재배가 계속되는 동안 우리나라 재래 품종에 대한 관심이 멀어지고 재배의 명맥이 끊기면서 품종자체가 망실되는 결과를 초래한 바, 겨우 유전자원으로서만이 일부 보관 유지되고 있는 실정이다. 그나마 고정종으로서 정확한 특성 규정이 없어 동일 품종명으로 보관되고 있는 품종들 간에 분화와 변이가 심한 것으로 알려져 있다. 일부 직무육성 분야에서 그 명맥을 이으려는 시도가 없지는 않으나 (박 등, 2002; 농민신문 2004년 7월 13일), 지금은 재래종 참외에 대한 기준 특성의 정의 자체가 시급히 요청되는 상황이다.

## 2. 재배와 유통품종

참외는 생산과 재배에서도 우리나라 주요 과채류 채소작물 중 하나이다. 재배면적은 7,731ha (2003년 농림부통계)로 수박(23,508ha) 다음으로 많은 비중을 차지하고 있지만, 딸기(7,503ha)와 같은 *Cucumis* 종인 오이(6,648ha) 등과 비슷한 수준으로, 2000년(10,203ha) 이후로는 감소추세를 보이고 있다. 그에 따라 생산량도 2000년 319,375 ton (시설기준, 2003년 농림부통계)에서 2003년 231,912 ton으로 27.5% 감소를 보였다. 멜론은 재배면적이 792ha (2001년 농림부통계)로 참외에 비하여 현저히 낮은 비율을 보이지만 꾸준한 상승세를 나타내 대조를 보인다. 또한, 참외는 재배지역 분포가 가장 협소한 작물중 하나로 2003년 (농림부 통계) 재배면적 기준(시설) 경북지방에 5,995ha가 분포함으로써 77.5%, 생산량 기준 189,337 톤으로 81.6%의 집중도를 보여준다.

참외는 매년 많은 양이 생산·판매되고 있는 것과 함께, 많은 품종들이 등록되어 유통되고 있음도 알 수 있다. 참외의 경우 2004년 6월말 기준 국립종자관리소 생산판매등록신고 품종 178 종이 있으며, 품종보호품종으로는 슈퍼금싸라기은천(세미니스코리아), 참왕, 금항아리, 수로왕, 부산 909, 부산 907, 부산 906 (이상 농촌진흥청), 대황 (동부한농화학), 007꿀, 가야꿀 (이상 농우바이오) 등 10 품종이 등록되어 있다. 멜론의 경우 2004년 6월말 기준 생산판매등록신고 품종 122 종과 품종보호품종으로 네띠안-E (동부한농화학), 부원, 온누리2호, 온누리3호 (이상 농촌진흥청) 등 4 품종이 등록되어 있다. 적지 않은 유통품종 중에서도 보호품종 수가 상대적으로 적은 것은 품종간 유사도가 높다는 사실을 반영한다. 우리나라에

서 유통되는 대부분의 참외가 단일계통으로 유사한 형태적인 특성을 가지고 있어서 품종간 특성 구별이 쉽지 않기 때문이다. 이에 따라 새롭게 개발되어 품종보호 출원되는 참외 신품종들이 기존 품종들과 다른 구별성(Distinctness)을 가지며 균일성(Uniformity), 안정성(Stability) [DUS]까지 갖춘 진정한 신품종 범주에 드는지에 대한 올바른 판단은 선의의 육종가 보호를 위한 품종보호제도의 취지에서 매우 중요한 문제로 대두되고 있다. 이는 동일계통 위주의 품종육성 등 최근 담보 상태를 면치 못하고 있는 우리나라 참외 육종의 현실이 최근 몇 년 사이 재배면적과 생산량의 감소로 이어지는 원인 중의 하나로 작용하고 있다는 현실에 비추어도 유의하여야 할 사실이다.

### 3. 품종보호제도와 분자생물학적 기술의 이용

우리나라가 2002년 UPOV 정식 회원국으로 가입한 이후 식물 신품종에 대한 품종보호권 설정과 그에 대한 지적 재산권으로서의 육종가 권리는 법적 보호대상이 되었다. 현재 UPOV 체제에서 DUS 검정은 포장에서 표현형을 위주로 하는 것을 기본적인 사항으로 규정하고 있다. 그러나, 참외와 같이 우리나라에서 소비가 많고 경제적 가치를 지닌 작물이면서 동시에 유통품종도 많고 품종간 유연관계가 밀접한 작물의 경우 관행적인 재배시험 결과에 의한 DUS의 판정은 실제적으로 쉽지 않고 여러 가지 비의도적 오류를 내포할 가능성이 있다. 이러한 경우 작물의 DNA 분자마커 기술은 기존의 형태적 특성에 의거한 구별성의 판정을 보완하며 동시에 결과의 정확성과 객관성을 확보할 수 있어 UPOV를 비롯하여 국제적으로 품종보호를 실현하고 있는 여러 나라에서 DUS 검정의 보완적 장치 및 실제적 수단으로서 DNA 분자마커 도입 가능성을 꾸준히 탐색하고 있다.

품종식별 목적으로는 Simple Sequence Repeats (SSR)이 가장 실용적인 마커 시스템으로 인정받고 있다 (Monfrte et al., 2003; Chiba et al., 2003; Staub et al., 2000) SSR은 1-6bp 정도의 짧은 염기서열 단위가 반복적으로 연결되어 나타나는 Microsatellite DNA를 말하며, 대부분의 eukaryotes genome에서 관찰되는 현상이다. SSR 반복 단위의 수(길이)는 종에 따라 심지어 개체 간에 달리 나타남으로써 고도의 다형성을 나타내며, 높은 재현성과 PCR로 분석할 수 있는 이점 때문에 많은 동식물 종에서 개발되어 유전자지도 작성 등에 효과적인 분자마커로 이용되어져 왔다.

### 4. 연구의 목적

본 연구에서는 우리나라 대표적인 참외 유통품종을 중심으로 재래종 참외 및 멜론 품종들을 포함한 *Cucumis melo* 작물에 대하여 적용 가능한 SSR 마커를 개발·확보하며, 이를 바탕으로 이들 작물의 품종간 SSR 마커의 분포와 특성 및 품종간 유연관계, 그리고 품종보호 측면에서 표현형 특성과의 연관도 및 분자마커를 기준으로 한 품종간최소거리설정에 관하여 연구하였다. 또한 개발된 마커의 산업적 이용도를 넓히기 위해 SSR 마커의 참외·멜론 품종들에 대한 F<sub>1</sub> 종자순도검정용으로 활용 가능성을 검정해 보고자 하였다. 이를 통하여, 참외·멜론 F<sub>1</sub> 교배종 및 참외 재래종에 대한 체계적인 분자유전학적 이해가 가능하며, 우리나라 *C. melo* 작물의 육종 현실과 가능성을 통찰하고 동시에 참외의 품종식별에 효과적인 분자 마커를 개발함을 목적으로 하였다. 이 결과들을 품종보호에 출원된 신품종 참외·멜론의 특성검정과 유사품종 식별에 이용할 경우 효과적인 특성검정은 물론 품종 개발자의 보호권 설정에 기여하며, 선의의 육종가에게 창의적인 신품종 개발 의욕을 고취시키는 계기가 될 것으로 생각된다. 또 앞으로 분자마커를 이용한 우리나라 재래종 참외 품종과 멜론 계통의 다양한 육종소재에 대한 특성 구명에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 2 절 참외·멜론 품종분류 및 명칭에 관한 제고찰

### 1. 서론

동양계 멜론인 참외를 포함하는 멜론 (*Cucumis melo*, 2n = 24)은 여러 가지 다른 지리적 분포와 기원을 가지고 있는 타식성 작물로서 자연적인 혼종의 가능성이 높고, 종 및 아종간 중간형 변종들이 등장함으로써 형태적으로 매우 다양한 변이를 포함할 뿐만 아니라, 국가별 지역별로 재래종과 교배종 품종들이 거의 전 대륙에 혼재되어 있고, 그리고 생물학적 명명법과 육종가들이 선호하는 품종 그룹 명칭이 혼용됨으로써 품종 정의에 매우 복잡한 양상을 보이고 있다. 따라서 학자들은 잎과 줄기, 꽃과 과실 등 형태적 다양성과 생태적 특성을 기준으로 이 식물집단의 다양한 변이를 반영하는 분류 기준을 만들기 위하여 노력하여 왔다. 국내 육종가와 학자들 간에도 이 부분에 있어 명확하지 못한 사항이 많아 우선 본 연구에 앞서 그 점에 관하여 고찰하여 보고자 한다.

## 2. 품종분류 기준의 변천 과정

멜론의 품종분류 및 명칭 정립에 관한 본격적인 시도는 Naudin (1859)에 의하여 이루어졌고 그 후 대부분의 분류가 이 기준에 따랐던 것으로 알려져 있다 (Pitrat et al. 2000; Munger and Rbinson, 1991). Munger와 Rbinson (1991)은 Naudin의 분류기준을 기본으로 *cantalupensis*와 *reticuatius* 그리고 *chito*와 *dudaim*을 통합하여 멜론을 다음과 같은 7개의 품종집단 (cultivar group)으로 나누었다: *agrestis*, *cantalupensis*, *inodorus*, *flexuosus conomon*, *chito-dudaim*과 *momordica*. 그러나, 이 기준에 따르면 우리에게 익숙한 참외 subspecies 명인 *makuwa*에 해당되는 분류명을 찾을 수 없다. 머스크멜론의 subspecies 명인 *reticulatus*에 대하여는 저자들이 밝힌 바와 같이 *cantalupensis*에 포함되는 것으로 보아야 한다. 통합 이유에 대해서 저자들은 net가 있는 기존의 *reticulatus*와 *cantalupensis*의 혼종의 출현에 따른 명명의 애매함을 들고 있다. 다시 말해 단순히 두 집단을 통합하여 단일 품종집단화 함으로써 차후 두 집단의 중간형에 대한 명명에 혼선과 고민을 원천적으로 제거해 보자는 의도였다. 그러나 이럴 경우 작은 모순을 해결하기 위해 net, 과육색, 과피색 등 명백한 형태적 차이를 무시하는 분류상 더 큰 오류가 우려될 수 있어 저자들도 ‘tentative revision’으로 조심스럽게 제안하였다. 그러나, 이와 같은 제안은 이후 Robinson과 Decker-Walters (1997)에 의하여 재확인 되고, 이후 많은 연구자들에게 그대로 받아들여져 사용되어짐으로써 지금은 거의 정설화 된 상황이다 (Chiba et al., 2003; Silberstein et al., 1999; Staub et al., 2000; Staub et al., 2004; Lopez-Sese et al., 2002). 결과적으로 우리에게 익숙한 net 계통 녹육의 머스크(혹은 얼스) 멜론은 국제적으로 *cantalupensis*라는 학술명칭으로 더욱 널리 통칭되고 있으며, 국내에서 일반적으로 사용되고 있고 *Cucumis melo* L. var. *reticulatus*라는 표현은 사용 예 (Danin-Poleg et al., 2001)가 상대적으로 많지 않은 것으로 보여진다. 국내에 당초에 *reticulatus*라고 알려지 바도 바로 Naudin의 기준 혹은 Naudin의 기준을 준용하는 미국식 분류기준(Whitaker와 Davis, 1962)을 초기에 도입한 이후 사용이 고착화된 결과가 아닌가 생각되어 진다.

## 3. 참외, var. *makuwa*의 분류기준은 ?

전술한 바와 같이 참외의 subspecies 명인 *makuwa*에 대해서는 Naudin과 Munger와

Rbinson (1991)의 분류기준에서는 그 유래를 찾을 수 없고, 다만 그 특성기술상 *conomon* 혹은 *flexuosus*에 가장 가까운 것임을 알 수 있다. Staub et al.(2000)은 *conomon*을 *oriental group*으로 분류하고 있으며, Chiba et al.(2003)도 *conomon group*에 일본, 중국, 러시아 유래의 품종을 다수 포함시키고 있다. 그러나 우리나라의 재래종, 교배종 참외 계통이 이 부류에 소속되는지에 대해서는 명확히 알 수 없다. 따라서 Munger와 Rbinson (1991)의 분류는 동양계 품종에 대한 정보들이 제대로 알려지기 전 이루어진 분류의 전통을 고수함으로써 서양적인 기준에서 동양의 다양한 재래종 특성을 반영하지 못하고 있다는 인상이 강하며, 다른 학자들도 대체로 이에 동의하고 있다 (Pitrat et al. 2000).

가장 최근에 *makuwa*에 대한 명칭은 Pitrat et al.(2000)의 분류기준에서 볼 수 있다. 저자들은 16개의 품종 그룹을 두 아종으로 나누어 *conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *acidulus* 그리고 *momordica*를 *subsp. agrestis* 아종에 포함시키고, *cantaluepnis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate*, *tibish*, *dudaim* 그리고 *chito*를 *subsp. melo* 아종에 포함시켰다. 이에 앞서 Jeffrey (1980)는 자방의 털 특성에 따라 *C. melo*를 두 아종 *subsp. melo* (자방의 모용이 짧다)와 *subsp. agrestis* (자방의 모용이 길다)로 나눈 바 있다. Pitrat et al. (2000)이 채택한 분류는 이 기준의 유용성에 동양계통의 다양한 변종들을 *subsp. agrestis* 내에 포함시켜 반영하고 있다. 또 *makuwa* 계통이 과일의 바탕색이 매우 다양하다고 말하고 있으며, 이것을 포함한 *conomon*, *chinensis* 등의 Asian types이 여러 가지 내병성 특성이 있다고 밝히고 있다.

흥미로운 사실은 Pitrat et al. (2000)은 성환참외 (Songwhan Charmi = PI 161375)를 *var. chinensis* 그룹에, Ginsen *makuwa*는 *var. makuwa*에 분류하고 있고, Munger와 Robinson (1991)은 위 두 품종을 모두 *var. conomon*에 두고 있다. 또 Danin-Poleg (2001)는 같은 PI161375을 Naudin과 뒤이은 Whitaker와 Davis (1962)의 기준에 따라 *var. conomon*에 포함시키고 이것을 포함한 *Cucumis melo* 13품종에 대한 SSR 분석을 실시하여 분자마커에 의한 분류와 전통적인 분류가 일치함을 보여주고 있다. 이상의 결과를 종합하면, 유럽식이라 할 수 있는 Pitrat et al. (2000)의 기준에 의하면 우리나라 재래종 참외는 일반적으로 *var. chinensis* 그룹에, 교배종 금싸라기 계통 참외는 *var. makuwa*에 분류될 수 있을 것이며, 미국식이라고 할 수 있는 Munger와 Rbinson (1991) 혹은 이 기준을 다소 보완한 Robinson과 Decher-Walters (1997)의 분류기준에 따르면 교배종과 재래종 모두 *var. conomon*에 포함시킬 수 있을 것이다. 이와 함께 우리나라 특산종이라 자부하는 금싸라기은천 참외를 포함하여 전통적 재래종에 이르기까지 현재 무비판적으로 사용되고 있는 품종분류에 대하여도 새

로운 기준 설정에 관한 검토가 필요한 상황이라 하겠다.

### 제 3 절 *Cucumis* 속 작물 유래 SSR 프라이머 선발

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 식물체 재료

시장에서 유통중인 참외·멜론(*Cucumis melo* L.) 대표품종 각각 25, 17품종과 깎치, 개구리참외 등 재래종 2품종을 포함하여 총 44 품종을 재료로 본 과제를 수행하였다 (Table 4-1). 이 중에는 국립종자관리소에 신품종 품종보호 등록된 참외 6 품종, 멜론 1 품종 등이 포함되어 있으며, 품종개발자로는 농우바이오, 동부한농, 세미니스코리아(중앙, 흥농), 신젠타종묘와 농진청 부산원예시험장 등을 포함한다. 품종계통을 분류해 보면 참외는 신은천계, 금싸라기 계통, 재래종, 참외형 멜론 등을, 그리고 멜론은 소과형 및 얼룩 계통, Net 멜론, No-net 멜론 등을 포함하고 있다. 참외와 멜론에 대한 품종 구분은 앞서 품종분류의 문제점에서 살펴 본 바와 같이 중간형들이 존재하는 등 뚜렷하지 않는 부분이 있으나, 현재 국립종자관리소 등에서 이루어지고 있는 전통적 분류기준을 존중하여 1 ~ 27번 품종은 참외로, 28 ~ 44번 품종은 멜론으로 하였다.

##### 나. 개발된 SSR primer를 이용한 참외 품종식별 적용성 검토

Danin-Poleg et al. (2001)이 *C. melo* var. *reticulatus* cv. Noy Yizre'el에서 개발한 멜론 유래의 SSR 마커 중 22개, Chiba et al. (2003)이 *C. melo* var. *cantaloupensis* cv. Harukei 3 gou에서 개발한 멜론 유래의 SSR 마커 중 31개, Fazio et al. (2002)이 *C. sativus*에서 개발한 오이 유래의 SSR 마커 중 84개 등 총 137개의 기존에 개발된 *Cucumis* 속 작물 유래의 SSR 마커를 선정하여 참외·멜론에 대한 SSR 마커로서의 적용성 여부를 검정하였다. 전체 primer에 대한 1차 선발은 다양한 품종 그룹을 포함하는 참외 6 품종집단 [금싸라기, 통일황, 깎치, 금보따리, 황진이, 가야꽃]에 대하여 먼저 수행하였다. PCR 반응은 genomic DNA (50  $\mu$ g), 1  $\mu$ l의 3' 과 5' -primers (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ l의 dNTPs (2.5 mM), 10  $\times$  PCR buffer (2.5  $\mu$ l), Taq DNA polymerase (1 U)에 멸균수를 첨가하여 25  $\mu$ l로 맞춘 다음 94 $^{\circ}$ C 2 분 denaturation 후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 35 cycle을 수행 후, 72 $^{\circ}$ C

Table 4-1. Varieties and description of *C. melo* L. examined

No.	Cultivar <sup>#</sup>	Breeding company	<i>Cucumis melo</i> var.	Cultivar type (grouping)
1	통일황	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
2	황옥	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Sineunchon (Ⅰ)
3	금황은천	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
4	사계철꿀	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
5	금노다지	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
6	황진이	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
7	가야꿀	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
8	007꿀*	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
9	황금알	Seminis Korea	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
10	금보라	Seminis Korea	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
11	금싸라기은천	Seminis Korea	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
12	금싸라기은천Ⅱ	Seminis Korea	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
13	슈퍼금싸라기*	Seminis Korea	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
14	금괴은천	Syngenta	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
15	금보따리	Syngenta	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
16	금미은천	Syngenta	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
17	다이아몬드	Syngenta	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
18	슈퍼금동이	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
19	금동이	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
20	금지계	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
21	스타금지계	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
22	대황*	Dongbu Hannong	<i>makuwa</i>	Geumssaraki(Ⅱ)
23	고향	Nongwoo Bio.	<i>makuwa</i>	(intermediate) <sup>1)</sup> (Ⅱ)
24	개구리	Nat'l Horti Res. Ins.	<i>makuwa</i> **	Landrace (Ⅲ)
25	간치	Nat'l Horti Res. Ins.	<i>makuwa</i> **	Landrace (Ⅲ)
26	참왕*	Busan Hort.Exp. Sta.	<i>inodorus</i> **	(intermediate) <sup>2)</sup> (Ⅳ)
27	금항아리*	Busan Hort.Exp. Sta.	<i>inodorus</i> **	(intermediate) <sup>2)</sup> (Ⅳ)
28	황금	Seminis Korea	<i>inodorus</i> **	(intermediate) <sup>2)</sup> (Ⅳ)
29	해피니스	Nongwoo Bio.	<i>inodorus</i>	Casaba type (Ⅴ)
30	감천3호	Seminis Korea	<i>inodorus</i>	Casaba type (Ⅴ)
31	MVP	Nongwoo Bio.	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
32	올림픽	Nongwoo Bio.	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
33	에메랄드하계1호	Seminis Korea	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
34	VIP	Seminis Korea	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
35	슈퍼VIP	Seminis Korea	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
36	자이언트	Seminis Korea	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
37	뷰티	Seminis Korea	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
38	얼스엘리트	Syngenta	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
39	네티안E*	Dongbu Hannong	<i>reticulatus</i>	Net type (Ⅶ)
40	베스트	Nongwoo Bio.	<i>cantalupensis</i>	No-net (white)(Ⅵ)
41	설향	Nongwoo Bio.	<i>cantalupensis</i>	No-net (white)(Ⅵ)
42	은설	Seminis Korea	<i>cantalupensis</i>	No-net (white)(Ⅵ)
43	백화	Seminis Korea	<i>cantalupensis</i>	No-net (white)(Ⅵ)
44	넘버원	Syngenta	<i>cantalupensis</i>	No-net (Yellow)(Ⅵ)

# 이해 편의상 한글 품종명을 사용함

\* Protection varieties for PVP



\*\* needs to be revised or insufficient information

- 1) geumssaraki + landrace
- 2) makuwa + inodorus (?)

3분간 반응시켰다. 반응 산물을 agarose gel에서 분석하여 특이 amplicon이 생성된 PCR 산물은 다시 polyacrylamide gel 분석을 통하여 6 품종 내에서 다형성 형성여부를 살펴보았다. 최소 1개 이상의 품종에서 다형성을 형성한 primer 조합을 선정하여 최종적으로 44 공시품종 분석에 사용하였다.

## 2. SSR 프라이머 선발 및 적용성 검토

기존에 멜론(*Cucumis melo* L.)과 오이(*Cucumis sativus* L.)에서 알려진 137종의 SSR primer sets를 선정하여 같은 *Cucumis* 속인 참외에 대하여 적용성 여부를 검정하였다. 그 결과 최종적으로 6 품종의 참외 DNA를 이용한 PCR 반응에서 특이 밴드를 보이고 품종별 다형성을 형성하는 37개의 SSR 마커를 선발할 수 있었다 (Table 4-2, Table 4-3). 이 마커들 가운데 특히 *C. melo* var. *reticulatus* cv. Noy Yizre'el 유래에서 다형성 형성을 (선발 효율)이 월등히 높음을 알 수 있다. 이는 참외와 유전적으로 가까운 두 *C. melo* 중 library 선발 시 여러 종류의 probe가 사용된 이 경우가 motif 구성이 다양하다는 사실과 관련 있을 것으로 생각된다. 오이에서 유래된 SSR 클론의 경우 선발 효율이 15.5%로 가장 낮았다.

Table 4-2. Selection of informative SSR markers from *Cucumis* species

<i>Cucumis</i> species	No. of markers tested	Polymorphic markers	Efficiency(%)	Average PICs	Reference
<i>melo</i> (melon)	22	15	68.2	0.588	Danin-Poleg et al. (2001)
<i>melo</i> (melon)	31	9	29.0	0.495	Chiba et al. (2003)
<i>sativus</i> (cucumber)	84	13	15.5	0.600	Fazio et al. (2002)
Total	137	37	27.0		

Table 4-3. Description of SSR primers derived from *Cucumis* species

Primer sets	SSR designation	Size	Sequence
CMSSR 1	CMGA15F	19	CGG CAA GAC GAT TGG CAG C
	CMGA15R	19	ATC ACC GTA GCG AAG CAC C
CMSSR 2	CMGA104F	20	TTA CTG GGT TTT GCC GAT TT
	CMGA104R	20	AAT TCC GTA TTC AAC TCT CC
CMSSR 3	CMGA146F	20	CAA CCA CCG ACT ACT AAG TC
	CMGA146R	20	CGA CCA AAC CCA TCC GAT AA
CMSSR 4	CMTC47F	20	GCA TAA AAG AAT TTG CAG AC
	CMTC47R	20	AGA ATT GAG AAG AGA TAG AG
CMSSR 5	CMCCA145F	21	GAG GGA AGG CAG AAA CCA AAG
	CMCCA145R	19	GCT ACT TTT GTG GTG GTG G
CMSSR 6	CMTC168F	21	ATC ATT GGA TGT GGG ATT CTC
	CMTC168R	21	ACA GAT GGA TGA AAC CTT AGG
CMSSR 7	CMTC123F	21	CGG ATT GTA CTT ATT GCC AAG
	CMTC123R	21	CAT GTC CAT GTG TGC ATG TAC
CMSSR 8	CMGT108F	21	CTC CTT CAA ACA TTG TGT GTG
	CMGT108R	21	GAG ATA GGT ATA GTA TAG GGG
CMSSR 9	CMTA170aF	21	TTA AAT CCC AAA GAC ATG GCG
	CMTA170aR	21	AGA CGA AGG ACG GTT AGC TTT
CMSSR 10	CMGA165F	20	CTT GTT TCG AGA CTA TGG TG
	CMGA165R	21	TTC AAC TAC AGC AAG GTC AGC
CMSSR 11	CMTA134aF	19	ACG TGC TTC AGT AAA CAT G
	CMTA134aR	21	CCG ACA TTG AAA ACC AAC TTC
CMSSR 12	CMCT134bF	20	GCT CCT CCT TAA CTC TAT AC
	CMCT134bR	21	GCA TTA TTA CCC ATG TAC GAG
CMSSR 13	CMCT160a+bF	21	GTC TCT CTC CCT TAT CTT CCA
	CMCT160a+bR	21	GAT GGT GCC TTA GTT GTT CCG
CMSSR 14	CMCT505F	21	GAC AGT AAT CAC CTC ATC AAC
	CMCT505R	20	GGG AAT GTA AAT TGG ATA TG
CMSSR 15	CMAT35F	20	GTG GGT CAT CAT TAT TGT TA
	CMAT35R	21	GCT TTT AGC CTA TTA AGT TGC
CMSSR 16	CMMS1-3F	25	TTG AAT CAT TGG AGG GAA GAT AAC G
	CMMS1-3R	25	CAA ATA TTG ATG GAT TTA ATA TAT T
CMSSR 17	CMMS2-3F	25	ATC ACC CAC CCC ACC ACT GCC AAA A
	CMMS2-3R	25	CCT TGA AAA ACC ACC AAC ATA ACA C
CMSSR 18	CMMS4-3F	25	ACC GAA ATC ATA AGG AAC ATA AGA G
	CMMS4-3R	25	TAT GAG CTG TGT TGT GTA TGA AAA C
CMSSR 19	CMMS27-1F	25	TCC ATG AAT TTA TCG GGA CTT ACC A
	CMMS27-1R	25	TTG CCT CAT TAC TCA ACT GTA TTT C
CMSSR 20	CMMS33-2F	25	GCT ACT TTT TAT GGC GGC AGT GAC G
	CMMS33-2R	25	ATT CGG ATG ATT ATT CTT CGC AGT T
CMSSR 21	CMMS34-8F	25	TTT CTT ACT TTT TGG TTT GGT TCT G
	CMMS34-8R	25	GGC GCT GTG GTG AGT GTC GGG AGA G

CMSSR 22	CMMS34-10F	25	GGG GTG TGA AGC TGA AGG CAA AGT C
	CMMS34-10R	25	AAA GGA AGA AGA AGA AAA AGG AGA A
CMSSR 23	CMMS35-3F	25	CGG AGA AGA AGG AAG GGT TTT AAG A
	CMMS35-3R	25	ATT CGT AGT TCA TAC TCT CTT TCT C
CMSSR 24	CMMS35-4F	25	ACG GAT ACA TCG AGG AGA CTT CAT G
	CMMS35-4R	25	GTC AGC TTC AAC CCT TTA CTT TTT C
CMSSR 25	14CSWCT01F	18	TTC TGA TCA ACG ACG AAG
	14CSWCT01R	19	GAA ACA AAA GCC TCC ATT G
CMSSR 26	15CSWCT02BF	18	TTC TGC ATA CCC TCT CCT
	15CSWCT02BR	18	CAC ACT TCC AGA TGG TTG
CMSSR 27	26CSWCT10F	18	AGA TCG GAA TTG AAA AAG
	26CSWCT10R	18	AAA GGG GCT TCC TCT CTA
CMSSR 28	46CSWCT24BF	24	ATC GCT TTA TCT TCG GCT TTG ATG
	46CSWCT24BR	24	AAT CCA TAG CAG TTC CCA ATG TCC
CMSSR 29	56CSWCT33F	24	ATC TAC CAT ATT CCA ACC TAA ACA
	56CSWCT33R	24	GTG GCT TTT GTG GAA AGC ATC TTC
CMSSR 30	58CSWCTT02CF	20	TCC TTC TTT TCC TCG CTC TG
	58CSWCTT02CR	21	TGC CCT AAA ATC CTC ACA CTC
CMSSR 31	70CSWCTT12F	24	CTG CTC CAT CTT GAA AAC ATG CTG
	70CSWCTT12R	24	TAT TAC AGT TCG AGC AAT TCT GCA
CMSSR 32	74CSWGAAT01F	24	GTC GGC TTG TGA AGA GAG ATT GTG
	74CSWGAAT01R	24	GTG GGC ACT GGT CAG GCG TTG AGA
CMSSR 33	76CSWGATT01AF	24	ATT CAA GCA GTT TCT TTG AAA AGA
	76CSWGATT01AR	24	CAG AAT TGC TTG TTG CTG ATG ACT
CMSSR 34	80CSWGCA01F	24	AGT GAT GGT GCA GGG CTA TCT TAT
	80CSWGCA01R	24	TTG TCT TCC CTC CTC TTC TCG TCT
CMSSR 35	81CSWGTA01F	21	TGT ATG AAT GTT TCT TAC AAG
	81CSWGTA01R	21	AGG GTT TTA TGT ATT TGC ATG
CMSSR 36	85CSWTA05F	24	GCA TGA GCT CGA GCT GGT GTA GTG
	85CSWTA05R	24	CGC CTG TTT TCA TTT TGA TTG GTT
CMSSR 37	99CSWTA17F	24	CTT TGA TGA GAC TTC TAA TCC CAA
	99CSWTA17R	24	CCA TGA TTC AAG AAG ATC AAA TGA

유전적으로 상동성이 낮은 오이와 참외 사이에 있어 SSR primer의 적용에 있어서도 그 효율이 낮으리라는 사실은 충분히 예측이 되는 사항이다. 그러나 선발된 마커들의 유전적 다양성의 지표가 되는 평균 PIC 값은 0.5 ~ 0.6 사이에 분포하고 있어, 일단 선발된 마커들의 품종식별력은 마커의 유래에 따라 큰 차이가 없음을 알 수 있다.

## 제 4 절      참외 유래 고유 SSR 마커 개발

### 1. 서언

여러 경로를 통하여 기존에 개발되어 발표된 멜론 SSR 마커 중 참외에 적용 가능한 마커를 확보함과 동시에, 참외에서 고유 SSR 마커를 개발함으로써 참외 품종간에 더욱 높은 다형성 형성율을 기대하고자 하였다. SSR 마커의 개발 방법은 방사성 동위원소를 이용한 library 선발법 외에 몇가지 비방사성 동위원소법이 보고되어 있다 (Fazio et al., 2002; Hayden et al., 2002; Hayden et al., 2001a; Hayden et al., 2001b; Fisher et al., 1996). 본 연구에서는 그 중 Fisher et al.(1996)이 제안한 단일 degenerate primer를 이용하는 5'-anchored PCR 법을 사용하고자 하였다. 이 방법은 이 과정에서 얻어진 1개의 특이 primer와 library 제작에 사용된 degenerate primer PCT4 만을 이용하여 SSR PCR을 수행하고 품종간 다형성을 검정할 수 있다는 점이 핵심이다.

그러나 이렇게 준비된 1개의 특이 primer와 원래 PCT4를 변형하여 5'-끝 쪽 anchoring base를 밝혀진 염기서열에 따라 특이화 하는 등 결과 여러 가지 시도에도 불구하고 예상과 달리 품종별로 특이적인 반응을 보이지 않았다. 반응이 특이적인 경우라도 acrylamide gel에서는 품종별 특이적 allele을 형성하지 못하였으며, 이에 따라 motif의 양단에서 모두 특이 primer를 확보하여야 한다는 결론에 도달하였다. 따라서 SSR motif를 중심으로 전체 클론을 확보하고자 PCR-based chromosome working을 실시하여 최종적으로 참외 유래 고유 SSR 클론을 확보할 수 있었다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 5'-anchored PCR를 이용한 SSR-enriched Library 제작 및 특이 primer 확보

우리나라 재래종이며 고정종 참외인 '간치'를 참외 유래 고유 SSR 마커 개발의 표준품종으로 사용하였다 (Fig. 4-1). Genomic DNA와 degenerate primer (PCT4), KKVRVRV(CT)<sub>6</sub>를 이용하여 5'-anchored PCR을 실시하였다 (Fisher et al., 1996). PCR 반응은 간치 genomic DNA (30  $\mu$ g), primer PCT4 (50  $\mu$ M), 2  $\mu$ l의 dNTPs (2.5 mM), Taq DNA polymerase (1 U)에 PCR buffer와 멸균수를 첨가하여 25  $\mu$ l로 맞추어 수행하였다. 증폭조건은 94 $^{\circ}$ C (3분), 5 cycle의 93 $^{\circ}$ C/59 $^{\circ}$ C/72 $^{\circ}$ C (각 30초), 35 cycle의 93 $^{\circ}$ C/57 $^{\circ}$ C/72 $^{\circ}$ C (각 30초),

1 cycle 72°C (2분)으로 진행하였다. 그 산물은 agarose gel에서 반응을 확인하고 size별로 정제하여 pGEM-T easy cloning vector (Promega)에 삽입하였다. 이를 *E. coli*에 형질전환시켜 SSR-enriched library를 만들고, 각 클론에서 plasmid DNA를 분리, 절단하여 삽입단편을 확인하고 염기서열을 결정하였다. 이 자료를 근거로 primer에 포함된 반복 서열을 확인하고 한쪽 프라이머를 특이화 (GSP1, GSP2) 하였다.



Figure 4-1. 'Gganchi' a landrace, standard variety for the development of oriental melon-derived SSR markers.

#### 나. Chromosome working을 이용한 양 단편 primer의 특이화

SSR을 포함하는 전체 클론을 확보하여 core motif를 정확히 동정하고 다른 한쪽 primer를 특이화 하기 위해 GenomeWalker™ Kit (BD Biosciences)를 이용한 PCR-based chromosome walking을 실시하였다. 먼저 간치 genomic DNA 25  $\mu$ l (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 4가지 제한효소 Dra I, EcoRV, PvuII, Stu I 각 8  $\mu$ l (10 U/ $\mu$ l)를 사용하여 100  $\mu$ l 반응액에서 절단하고 Phenol을 처리하여 정제한 후 최종 TE buffer 20  $\mu$ l에 녹였다. 다시 각 제한효소 처리액에 GenomeWalker Adaptor를 ligation하여 최종적으로 4가지 제한효소로 절단된 간치 genomic DNA의 GenomeWalker library를 완성하였다. 먼저 각 DNA library (1 $\mu$ l)를 주형으로 GSP1과 Adaptor primer 1 (AP1)을 이용하여 1차 PCR을 수행하였다. 2차 PCR은 1차 PCR 산물 희석액 (50배)에 대하여 GSP2와 AP2를 사용하여 실시하였다. PCR 반응이 끝난

후 결과는 agarose gel에서 확인하였다. 각 제한효소에 해당하는 DNA Library 별로 PCR amplicon이 뚜렷한 반응액을 선정하여 low melting gel과 gel elution kit를 이용하여 PCR 산물을 정제하였다. 이를 pGEM-T easy vector (Promega)에 삽입하고, *E. coli*에 형질전환한 후, 각 클론에서 plasmid DNA를 분리, 절단하여 삽입단편을 확인하고 염기서열을 결정하였다. 이를 바탕으로 5'-anchored PCR clone과 chromosome walking clone을 연결하여 contig를 제작하고 core motif를 포함하는 전체 SSR clone을 완성하였다. 각 SSR clone의 염기서열을 분석하여 유망한 core motif에 대하여 기존에 제작된 GSPs 반대쪽에서 상대되는 primer를 제작하고(GSP3) 최종적으로 해당 SSR 마커에 대한 양쪽 특이 primer를 완성하였다. GSP3와 GSP2 혹은 GSP1을 이용하는 품종별 PCR 반응은 two-step 방식으로 94°C 25초, 72°C 1분에서 7 cycle 반응 후, 94°C 25 초, 67°C 1 분에서 30 cycle, 이후 67°C, 7 분으로 수행하였다.

### 3. 참외 고유 SSR 마커개발 및 적용성 검토

참외 유래 고유 SSR 마커를 개발하고자 우리나라 재래종 참외인 간치 참외를 재료로 5'-anchored PCR을 이용한 SSR-enriched library를 제작하였다. 그로부터 385개의 plasmid를 분리하고 염기서열을 결정하여 결과가 양호한 116개의 예비 SSR 클론을 확보할 수 있었다 (Table 4-4). 염기서열이 밝혀진 전체 클론에 대한 양단 primer 부착부위의 (CT) 혹은 (AG) 반복염기서열을 분석한 결과 단위 수가 모두 primer에 포함된 6개 혹은 그 이상으로 분석되어 PCR 반응은 특이적으로 수행되었음을 알 수 있었다. 그러나 대부분의 경우 그 반

Table 4-4. Summary for the isolation of microsatellite markers from oriental melon through 5'-anchored PCR and chromosome walking.

Procedures	No. of clone	Efficiency (%)
Plasmid isolation	385	100%
Good sequencing	116	30.1
Genome walking PCR	28	7.3
Contiging and Variety PCR	16	4.2
Polymorphic	7	1.8
Monomorphic	5	1.3
Duplicate	4	1.0

복 단위수가 6 ~ 8개로 10 이상인 경우는 소수였고, 그나마 중복된 클론으로 추정되는 경우가 많아서 library의 질과 선발효율은 낮은 것으로 관찰되었다. 이로부터 core motif가 긴 쪽을 선택하여 그것을 중심으로 한쪽 편의 primer 제작에 필요한 특이 염기서열을 얻을 수 있었다.

5'-anchored PCR에서 얻어진 클론에 대한 염기서열 분석 결과 SSR motif 반복단위 수가 8개 이상으로 품종간 다형성 형성율이 높을 것으로 예상되는 클론 28개를 선정하였다. 이것으로 chromosome walking을 수행하고, 얻어진 클론에 대한 염기서열을 결정하였다. 이 클론과 5'-anchored PCR에서 얻어진 클론의 염기서열을 바탕으로 contig가 형성된 클론은 모두 16개였다 (Table 4-4). 이를 바탕으로 SSR motif를 재분석한 결과 실제 반복 단위수는 5'-anchored PCR에서 얻어진 클론의 경우와 일부는 상당히 다른 것으로 나타났다 (Table 4-4). 특히 PCT4 primer의 5' 끝쪽 anchoring base에 해당하는 염기서열은 전혀 다

Table 4-5. Analyses of microsatellite clones from 'gganchi' and application to variety description

Seq. ID	No. of repeats in core motif			Seq. length (bp)	Expected SSR PCR size (bp)	Varietal application
	Primary PCR*		Contig			
	5'-CT	3'-AG				
1006	<u>14</u>	6	14	1195	209	Polymorphic
1007	6	<u>14</u>	14	1006	144	Polymorphic
1009	<u>8</u>	6	7	1751	276	Monomorphic
1019	<u>10</u>	7	15	1515	230	Polymorphic
1046	<u>10</u>	6	28	904	225	Polymorphic
1409	6	<u>14</u>	12	947	303	(duplicate)
1418	6	<u>8</u>	14	1296	192	(duplicate)
1425	6	<u>8</u>	6	1123	281	Monomorphic
1436	<u>20</u>	6	28	1636	216	Polymorphic
1443	<u>19</u>	7	19	1188	279	Monomorphic
1448	6	<u>20</u>	13	754	222	(duplicate)
1452	<u>8</u>	7	8	1200	211	Monomorphic
1464	<u>8</u>	6	6	1757	206	Monomorphic
1468	6	<u>17</u>	14	933	306	(duplicate)
1470	<u>8</u>	6	13	1384	157	Polymorphic
1480A+B	7	<u>14</u>	19	2201	247+274	Polymorphic

\* Underline means that sides of the clone was chosen for subsequent analyses by chromosome walking PCR

르게 나타나 원래 5'-anchored PCR 결과만을 바탕으로 품종별 SSR PCR을 했을 때 특이적인 결과를 얻을 수 없었던 원인을 밝힐 수 있었다.

Contig가 완성된 16개의 SSR 클론 염기서열을 바탕으로 나머지 한쪽의 primer를 제작하고 최종적으로 양쪽 primer에 대한 특이화 작업을 마무리하였다. 이 중 클론 gganchi 1480 (CMSSR 44)은 염기서열분석 결과 두 종류의 core motif가 밝혀져 이에 대하여는 별도의 primer sets를 제작하였다 (Table 4-5). 최종적으로 17개 primer sets에 대하여 6품종에 대한 SSR PCR을 수행하여 품종간 다형성 형성여부를 검토하였다. 그 결과 8개 primer 조합 (7개 클론)은 6 품종 간에 다형성을 보이는 유용 primer로 최종 선발되었고, 5개는 다형성을 보이지 않았으며, 4개는 그 안에서 서로 중복되는 클론으로 밝혀졌다 (Table 4-5). 이어서 전 품종에 대한 SSR PCR을 수행하였다 (Fig. 4-3).

## 제 5 절      SSR 마커를 이용한 참외 · 멜론 품종특성구명

### 1. 재료 및 방법

개발된 전체 SSR 마커를 이용하여 참외 · 멜론 44품종의 다형성을 분석하고자, 공시 품종의 종자를 과중한 다음 출아 후 5 일된 유식물체 10개 이상을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다 (NucleoSpin<sup>®</sup> Plant, Macherey Nagel). PCR 반응은 primer 선발과정과 동일한 조건으로 실시하였다. 증폭된 DNA 산물은 먼저 agarose gel에 걸어서 반응의 균일성과 완결성을 검토한 후 적절한 농도를 결정해 다음 단계로 진행하였다. 품종별 SSR 다형성 분석은 6% polyacrylamide gel에서 실시하였다. PCR 반응액을 98%의 formamide loading buffer를 혼합하여 95℃에서 180초 동안 denature 시킨 후 3 $\mu$ l씩 loading하여 60W, 150분 전기영동 하였다. pGEM-3Zf<sup>®</sup> (promega) plasmid를 M13F primer로 sequencing한 산물을 함께 전기영동하여 size 마커로 활용하였다. Gel 염색은 Silver sequence<sup>™</sup> staining reagents (Promega)를 이용하였다. 염색된 gel에서 얻어진 품종별 다형성 패턴을 기초로 SSR 마커의 다형성 양상을 밴드 있음 (1)과 없음 (0)으로 수치화 하여 기초자료행렬 (data matrix)을 작성하였다. 이 자료를 근거로 SSR 마커의 PIC (Polymorphism Information Contents) =  $1 - \sum P_{ij}^2$  값을 산출하여 각 마커의 다양성 (genetic diversity) 정도를 조사하



였다. 공시 품종의 유전적 유사도는 NTSYSpc V. 2.1 프로그램 (Rohlf, 2000)을 이용하여 Jaccard's coefficient [ $a/(n-d)$ ,  $m = a(+,+) + d(-, -)$ , number of matches;  $u = b(+, -) + c(-, +)$ , number of unmatches;  $n = u+m$ , total sample size]로 산출하였고, 산출된 유전적 유사도 값을 기초로 비가중산술방식 (UPGMA: unweighted pair group method using arithmetic averages)으로 집괴분석하고 덴드로그램을 작성하였다.

## 2. 참외 · 멜론 품종별 SSR 마커의 분포 및 특성

멜론, 오이 등 *Cucumis* 속 작물에서 유용성이 검정된 37개 마커와 간치 참외에서 고유 마커로 개발된 8개 마커 등 총 45개의 SSR 마커가 참외의 품종식별 마커로서 최종적으로 개발되었다 (Table 4-6). 이들 마커는 같은 클론으로 언급되어 있는 CMSSR 11과 CMSSR 12, 그리고 CMSSR 44와 CMSSR 45를 제외하면 각각 독립적인 43개의 loci를 대표한다고 말할 수 있다. Core motif의 조성은 마커의 유래가 다른 만큼 다양한 조성을 보이나 dinucleotide unit의 분포가 가장 많고 (CT), (GA)의 반복이 많음을 알 수 있다.

개발된 45개 SSR 마커를 적용하여 참외 · 멜론 44 품종에 대한 품종별 SSR 다형성 반응을 검정한 결과, 형성된 전체 DNA 밴드 (allele) 수는 160 개로 나타났다 (Table 4-6). 이 중 157 개는 품종간 다형성에 관련되어 최소 1 품종 이상에서 품종간 밴드의 발현유무에 차이를 보였고, 나머지 3개 밴드는 전 품종에서 구별 없이 발현되었다. 마커 당 allele 형성수는 2 ~ 8개, 평균 3.6 개이고 참외, 멜론 간에는 각각 2.6 개와 3.0 개로 멜론이 다소 많지만 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 형성된 allelic band 수를 작물별로 나누어 보면 참외 품종들 간에 115개, 멜론 품종들 간에 133개를 나타냈다. 전체 마커 수에 비하여 참외와 멜론에서 각각 더 적은 수의 마커를 보인 것은 각 variety에 특이적으로 발현되는 마커들이 있기 문이며, 두 variety 간 마커의 공동 형성율은 63% (101/160)로 SSR 마커에 의한 두 작물간 유전적 유사도의 한 척도가 될 것이다. 전체 마커의 평균 PIC 값은 0.580으로 나타났고, 0.8 이상이 1개, 0.8 ~ 0.7이 5개 등이었으며, CMSSR 12가 0.808로 가장 높은 값을, 그리고 CMSSR 3과 CMSSR 36 순으로 높은 PIC 값을 보여주었다. PIC 값은 allele type의 종류(수)가 많을수록, 또 그에 해당되는 품종수가 많을수록 커지는 경향을 갖는다. 따라서 해당 마커의 PIC 값이 클수록 품종간에 생성된 allele type이 다양하고, 품종식별력이 높다는 것을 의미한다.

Table 4-6. Application of SSR markers for the description of *Cucumis melo* L.

Primer sets	SSR designation	Core motif	No. of alleles	No. of polymorphic alleles*			PIC
				OM	WM	Total	
CMSSR1	CMGA15	(GA)7	2	2	0	2	0.165
CMSSR2	CMGA104	(GA)14AA(GA)3	4	4	4	4	0.623
CMSSR3	CMGCC146	((ACC)9	4	4	4	4	0.799
CMSSR4	CMTC47	(TC)9(CT)6	5	5	4	5	0.725
CMSSR5	CMCCA145	(CCA)5	2	2	2	2	0.571
CMSSR6	CMTC168	(TC)14	5	3	3	5	0.699
CMSSR7	CMTC123	(TC)9(TTTC)2	3	2	2	2	0.583
CMSSR8	CMTC108	(GT)9N65(CT)7	3	3	3	3	0.619
CMSSR9	CMTA170a	(TA)9T(TA)3	3	2	2	3	0.381
CMSSR10	CMGA165	(GA)10	3	1	3	3	0.474
CMSSR11 <sup>a</sup>	CMTA134a	(TA)12	4	3	3	4	0.586
CMSSR12 <sup>a</sup>	CMTC134b	(TA)2(CT)8(AT)7	8	4	6	8	0.808
CMSSR13	CMTC160a+b	(TC)2(TCC)2(CT)8N122(TC)2	3	1	3	3	0.599
CMSSR14	CMTC505	(CT)15(AT)12(AC)11(AT)4	3	1	3	3	0.616
CMSSR15	CMAT35	(TA)3AA(TA)2C(AT)7	2	2	2	2	0.569
CMSSR16	CMMS1-3	(GA)13(AAT)6	2	2	2	2	0.533
CMSSR17	CMMS2-3	(GA)19	5	3	4	4	0.587
CMSSR18	CMMS4-3	(GA)19	5	MD	5	5	0.478
CMSSR19	CMMS27-1	(GA)15	3	2	2	3	0.623
CMSSR20	CMMS33-2	(GT)13	2	1	2	2	0.447
CMSSR21	CMMS34-8	(GA)13(AAT)6	3	3	3	3	0.616
CMSSR22	CMMS34-10	(GT)9N65(CT)7	2	1	2	2	0.334
CMSSR23	CMMS35-3	(GA)14AA(GA)3	2	1	2	2	0.305
CMSSR24	CMMS35-4	(GT)11	2	2	2	2	0.536
CMSSR25	14CSWCT01	(CT)9(CT)8	4	2	4	4	0.605
CMSSR26	15CSWCT02B	(CT)21(TG)8	3	2	2	3	0.614
CMSSR27	26CSWCT10	(CT)9CTTTTCT	4	4	4	4	0.654
CMSSR28	46CSWCT24B	(CT)7(CT)11(CT)7(A)8	2	1	2	2	0.361
CMSSR29	56CSWCT33	(CT)6(TATTTTC)2	6	6	5	6	0.677
CMSSR30	58CSWCTT02C	(CT)14(TA)7(CA)5	4	4	3	4	0.659
CMSSR31	70CSWCTT12	(CTTT)6	2	2	2	2	0.541
CMSSR32	74CSWGAAT01	(GAAT)5	2	2	1	2	0.553
CMSSR33	76CSWGATT01A	(A)12, (GA)10	5	2	5	5	0.581
CMSSR34	80CSWGCA01	(GCA)8	4	4	2	4	0.562
CMSSR35	81CSWGTA01	(GTA)5,(GAAA)	3	2	2	2	0.540
CMSSR36	85CSWTA05	(TA)12	4	3	4	4	0.792
CMSSR37	99CSWTA17	(TA)6(CTT)3(TA)6(T)11	4	4	4	4	0.664
CMSSR38	Gganchi1006	(CT)14	8	4	8	8	0.724
CMSSR39	Gganchi1007	(GA)14	2	2	1	2	0.555
CMSSR40	Gganchi1019	(CT)15(GAA)4	2	1	2	2	0.558

CMSSR41	Gganchi1046	(CT)28	6	3	5	6	0.652
CMSSR42	Gganchi1436	(CT)28	7	5	6	7	0.710
CMSSR43	Gganchi1470	(CT)13	2	2	1	2	0.549
CMSSR44 <sup>b</sup>	Gganchi1480A	(AT)5(A)7(GA)19(CTT)11	4	4	1	4	0.658
CMSSR45 <sup>b</sup>	Gganchi1480B	(CT)8N33(CT)8	2	2	1	2	0.616
Total			160	115	133	157	
Mean			3.6	2.6	3.0	3.4	0.580

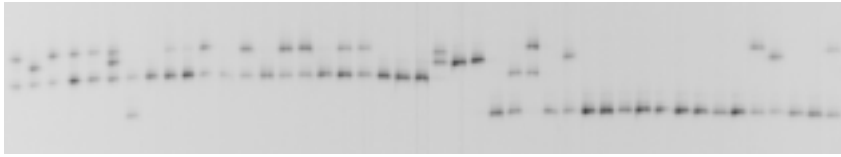
\* OM, oriental melon; WM, (western) melon; MD, missing data because of non-specific PCR in oriental melon species

a, b: each developed from the same DNA clone

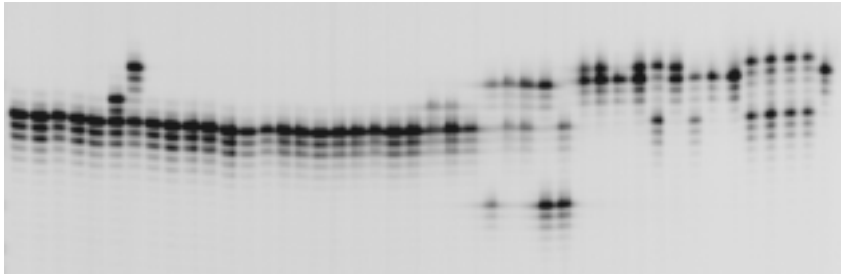
그러나 실제 gel을 보면 가장 높은 PIC 값을 나타낸 CMSSR 12의 경우 대부분의 다형성이 멜론 품종간에 형성되고 있으며 참외 품종들 간에는 거의 다형성을 보여주지 못하였다 (Fig. 4-2c). CMSSR 4도 비슷한 패턴을 보여주었다. 반대로 CMSSR 3은 멜론보다 참외 품종간에 다형성이 형성됨을 보여준다 (Fig. 4-2a). 대부분의 경우에 이처럼 유사한 유통품종이 공시된 참외 경우 보다 멜론 쪽 품종집단에서 다형성 형성율이 높았다. 또 품종별로는 대부분의 경우 allelic band 수 1 개(homozygous) 혹은 2 개(heterozygous)로서 locus 당 1 개 allele의 codominant type의 마커로서 정상적인 패턴을 보여주었으나, 81CSWGTA01의 경우는 homozygous type에서 2 개의 heterogeneous allele이 동시에 증폭됨으로써 hybrid type인 대부분의 참외품종에서 1개 motif unit (3bp) 차이에 해당하는 3 allelic band (214bp, 211bp, 208bp)를 나타냈다 (Fig 4-2d). 일반적으로 이와 같은 경우는 해당 SSR loci가 존재하는 DNA fragment의 duplication에 의하여 설명될 수 있을 것이다. CMMS 4-3의 경우에는 멜론품종에서는 locus 당 2개의 heterogeneous allele를 나타냈으나, 참외 품종들 간에는 정상적인 증폭이 되지 않아, 이 loci는 결실, 전좌와 같은 chromosome rearrangement 혹은 SNP 등 참외와 멜론 간 염색체 상에 이질성이 큰 부분에 위치하고 있는 것으로 추정되었다 (missing data) (Table 4-6). 그 외 적용한 SSR 마커는 모두 codominant type이었으며, 품종간에 dominant type을 보이는 마커는 거의 없거나, 명확히 정의할 수 있는 band 패턴을 보이지 않는 경우가 많아 수용하지 않았다.

참외 유래 8개 고유 SSR 마커로부터 형성된 allele 수는 전체 160 개 중 33 개였으며 이들만의 PIC 값은 0.618로, 앞서 다른 *Cucumis* species로부터 선발된 SSR 마커들에 비해 다소 높았으나 큰 차이를 나타내지는 않았다. 이 결과로부터 당초에 참외 유래 마커가 참외의 품종식별에 더욱 효과적일 수 있을 것이라는 가정에 대하여, 더욱이 개발된 마커 수가 많지 않은 상황에서, 마커가 유래한 작물의 유전적 근연관계와 다형성 형성율(informative index)

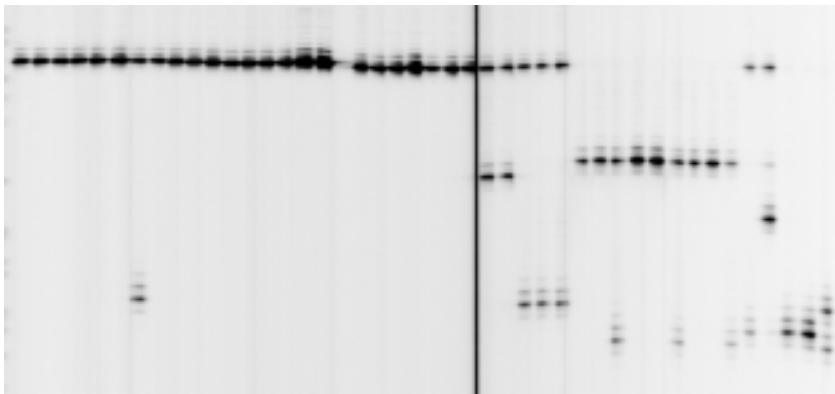
a. CMMS 3



b. CMMS 4



c. CMMS 12



d. CMMS 35



Figure 4-2. Amplification of SSR markers for the description of varieties of oriental melon and melon. Each lane from 1 to 44 corresponds to the varieties in Table 4-1.

a. gganchi 1006



b. gganchi 1007



c. gganchi 1019



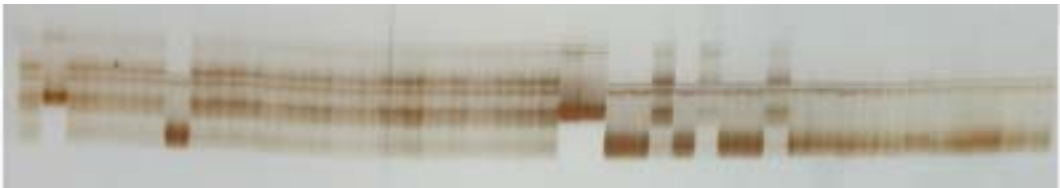
d. gganchi 1046



e. gganchi 1436



f. gganchi 1470



g. gganchi 1480a



h. gganchi 1480b



1 ————— 44

Figure 4-3. Development of 8 SSR markers from the oriental melon, 'gganchi' and production of polymorphism in 44 varieties of oriental melon and melon. Each lane from 1 to 44 corresponds to the varieties in Table 4-1.

과의 상관관계에 대하여는 결론을 내릴 수 없는 것으로 보인다. 이 마커들도 모두 codominant type이었으며, 모든 품종은 1 개 allele로 구성된 loci를 나타내었다 (Fig. 4-3).

### 3. SSR 마커에 의한 품종분류 및 유전적 연관관계 분석

45개 SSR 마커에 의하여 형성된 160개 allelic band의 품종간 분포에 따라 참외·멜론 44 품종을 분류하였다. Jaccard's coefficient로 나타나는 품종간 유전적 유사도 (Genetic Similarity)를 산출하고 이에 따라 덴드로그램을 작성하였다 (Fig. 4-4). 유사도 지수 0.27 수준에서 참외와 멜론의 두 품종군으로 구분되었고, 참외와 멜론은 각각 다시 두 품종집단으로 나누어 졌다. 참외 품종집단 내에서는 유사도 지수 약 0.47에서 일반적인 참외와 참외·멜론 중간형 교잡종으로 구분되었다. 멜론의 경우는 유사도 지수 약 0.45에서 net 형과 no-net 형으로 구분되어 졌다. 이와 같이 SSR 마커에 의한 품종분류가 일반적인 시장 기준의 품종 grouping과 정확히 일치함을 알 수 있었다.

세부적인 품종분류 내용을 살펴보면, '황옥'은 신은천 계통(I)으로, '고향', '개구리', '깎치'는 재래종 계통(III)으로 참외 품종 집단 내에서 금싸라기 계통들과 유전적으로 다소 먼 연관관계를 나타냈다. '대황'은 형태적으로 금싸라기 계통(II) 품종들과 차이가 없었으나, SSR 마커 특성에 의해서는 참외 전체 품종집단 중에서도 유전적 연관도가 가장 먼 것으로 나타났으며, 참외 품종 중에서 가장 특이한 마커 패턴을 보여주었다. 이 품종은 같은 회사 (동부한농화학) 개발품종인 '금지계' 계통 2 품종 및 '통일황' 등과 함께 유전적 유사도 측면에서 다른 금싸라기 계통 품종들에 포함되지 않아 육성회사의 기본육종소재 차원에서도 특성 차이가 있을 것으로 추정되었다. '가야꿀'은 농우바이오에서 개발한 저온기 재배용 대과형 품종으로 단성화에 골과 과피색 등 전체적으로 과실 특성은 금싸라기 계통이나 var. *inodorus* 계통 멜론 품종들과 같은 집단으로 분류되어 유전적으로는 많은 부분이 멜론 계통에서 유래되었음을 알 수 있었다.

전체적으로 세 지점의 유사도 지수 0.9, 0.8 그리고 0.7 부근에서 참외품종 간의 근연관계에 급격한 변화를 보이고 있다. 그룹 A에는 '금보라'에서 '금황은천'까지 금싸라기 계통 14 품종이 0.91 ~ 1.0 사이에 포함되어 있어 우리나라 참외 유통품종의 유전적 유사도가 매우 높다는 사실을 재차 확인할 수 있다. 그 중, '다이아몬드'와 '황금알', '금괴은천' 그리고 '금싸라기은천과' '금미은천', '금노다지', '금보따리'는 각각의 집단에서 적용된 45 개 SSR 마커 내에서는 그들 사이에 특성 차이를 보이지 않아 매우 유사한 것으로 밝혀졌다. 그룹 B는 유

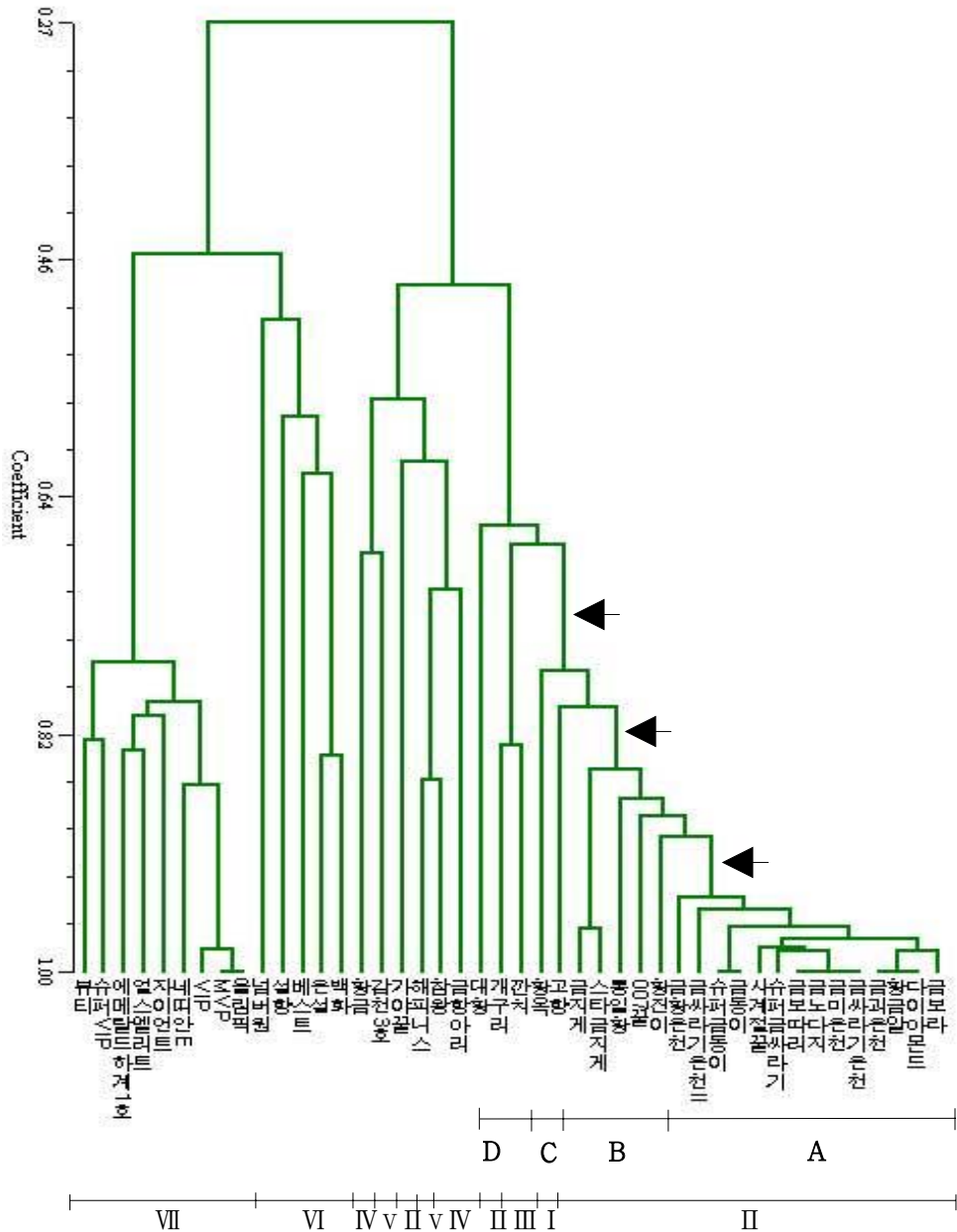


Figure 4-4. Phylogenetic relationship among 44 varieties of *C. melo* based on 160 SSR allelic bands from 45 SSR markers. The numerical scale indicates Jaccard's coefficient of genetic similarity. I ~ VII indicate the grouping types in Table 4-1.



사도 지수 0.8 ~ 0.9 사이로, 일반적으로 금싸라기 계통으로 인정되고 있으나 어느 정도 유전적 거리를 가지고 있는 품종들로, 금피계 계통은 과피색에서도 형태적 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 그룹 C는 금싸라기 계통 특성의 일부가 유래되었거나 도입되어 그 특성의 일부만을 공유하고 있는 계통들로 유전적으로 차이가 이미 알려진 품종들이다. 그룹 D는 재래종으로 금싸라기 계통과 유전적 계통이 명백히 다르다. 그러나 이 중 하나인 대황은 기존에 알려진 금싸라기 계통이나 유전적으로는 전혀 다른 경우를 보이고 있어 그 유래가 매우 흥미롭다.

그 외, '슈퍼금싸라기', '대황', '금항아리', '참왕', '가야꿀' 등 보호품종들의 유전적 유사도는 공시된 기존품종집단 내에서 차이를 보여 DNA 마커 차원에서도 구별성 [Distinctness]을 확인할 수 있었다. 이는 금싸라기 계통을 벗어나 참외 신품종 개발에 관한 의미 있는 시도들이 일부 이루어지고 있으며 또한 품종보호 출원되고 있음을 보여주는 사실들이다.

멜론 품종의 유전적 연관관계는 1차적으로 net 형(VII)과 no-net 형(VI)으로 뚜렷이 구분되는 가운데, 'VIP', '얼스엘리트' 등 net 형의 유사도 지수 분포는 0.77 ~ 1.0으로 높은 반면, '백화', '은설' 등 no-net 형은 0.51 ~ 0.84로 낮아 대조를 보였다. 특히 그 중 유일하게 황피 계통인 '넘버원'은 다른 품종들과 가장 원연관계를 보여 형태적 특성을 반영하였다. No-net 형 계통의 품종들이 유사도가 낮은 것은, net 형 계통에는 var. *reticulatus* 단일 계통만이 포함되나, 이들 no-net 형 품종에는 var. *cantalupensis*와 var. *inodorus* 및 net가 없는 교잡종 등 매우 넓은 계통들이 포함될 수 있음을 의미한다. 또한 일반적으로 시장에서 멜론으로 분류되는 '감천 3호' 등 얼룩계통 멜론(V)과 '참왕' 등 참외·멜론 중간형(IV) 5 품종은 별개의 집단을 이루어 멜론 보다는 참외에 가까운 연관관계를 보여주었다. 그러나 그들 집단 내에서 유사도는 0.52 ~ 0.85로 낮았으며, no-net 형의 일반형이라고 할 수 있는 var. *cantalupensis*의 백피계 계통과는 유전적으로 구분되어 var. *inodorus* 등 다른 계통으로 분류될 수 있음을 나타내 주었다.

## 제 6 절 SSR 마커의 F<sub>1</sub> 종자 순도검정 이용과 후대 유전분석

### 1. 서언

종자의 순도검정은 양친의 교배를 통하여 종자가 생산되는 대부분의 채소 교배종 품종에서 F<sub>1</sub> 종자 채종 후 그 순도확인 차원에서 수행되는 품질관리 행위이다. 더구나 최근 해외 위탁채종이 대부분인 상황에서 종자회사로서는 혼종의 가능성을 항상 염려하는 바 F<sub>1</sub> 종자의 순도검정 과정은 그 중요성이 증대되고 있다. 이에 따라 잡종강세 육종이 일반화된 채소 작물에서 적절한 순도검정 수단의 확보는 종자산업계 입장에서 매우 요청되는 사항이다.

십자화과를 포함한 많은 채소작물에서는 일찍이 동위효소들에 대한 연구가 진행되어 이를 마커로 활용 순도검정을 하고 있는 경우가 일반적이다. 그러나 *C. melo*를 포함한 박과류의 경우는 일반적으로 양친간 유전적 유사도가 높아 동위효소를 이용한 종자 순도검정을 이용할 수 없는 경우가 많다. 이럴 경우 산업현장에서는 이를 대체하는 ISSR (Inter SSR) (Danin-Poleg et al., 1998)이나 STR (Sequence Tagged Region) 마커를 품종별로 개발하여 이용하는 경우가 대부분이다. 그러나 이것도 품종별로 별도의 마커 개발 과정을 거쳐야 가능한 일이다. 본 연구에서는 이를 대체하여 본 과제를 통하여 개발된 SSR 마커를 종자순도검정에 효과적으로 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

아울러 이와 같은 용도로 사용하기 위하여 혹은 일반적인 유전현상으로서 SSR의 특성이 멘델유전 법칙을 따르며, 후대까지 안정적으로 유전되는지 알아보기 위하여 F<sub>1</sub> 순도검정 대상 마커와 품종에 대하여 F<sub>2</sub> 세대 개체들에서 Mendel 유전 양상을 검정하였다.

### 2. 재료 및 방법

참외·멜론 시험 품종 중 양친을 확보한 품종의 유통 F<sub>1</sub> 종자 약 200립, 수집 F<sub>2</sub> 종자 약 100립 가량을 과중하여 유묘상태에서 시료를 확보하였다. 식물체는 액체질소에서 분쇄한 후 genomic DNA를 분리하고 agarose gel에 걸어 농도를 확인하였다. SSR 마커를 이용한 PCR은 F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> 유식물체 각 개체별 genomic DNA를 주형으로 전과 동일한 방법으로 수행하였다. PCR 산물은 acrylamide gel에서 분석하였다.

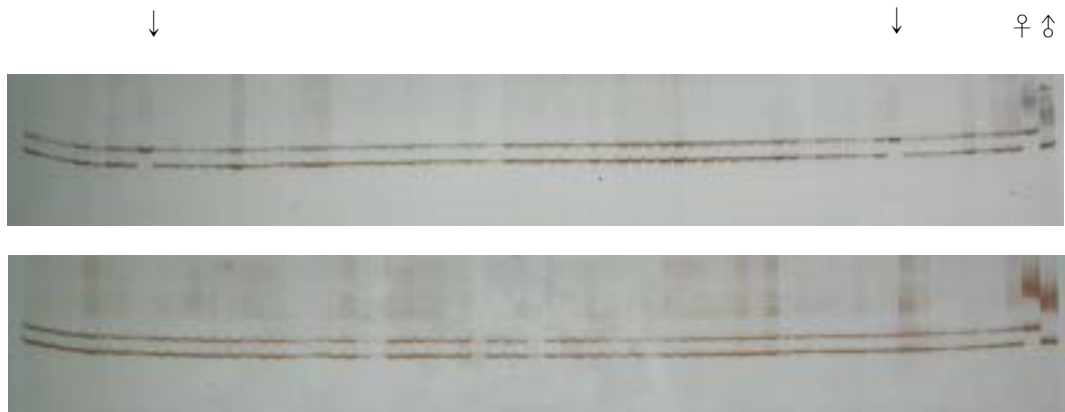


Figure 4-5. Assessment of F<sub>1</sub> seed purity for a variety of oriental melon by using a CMMS 34-8 SSR marker. A total of 136 seeds were analyzed and two of them (↓) were revealed to be selfing line. Two rightmost lanes represent parental types.

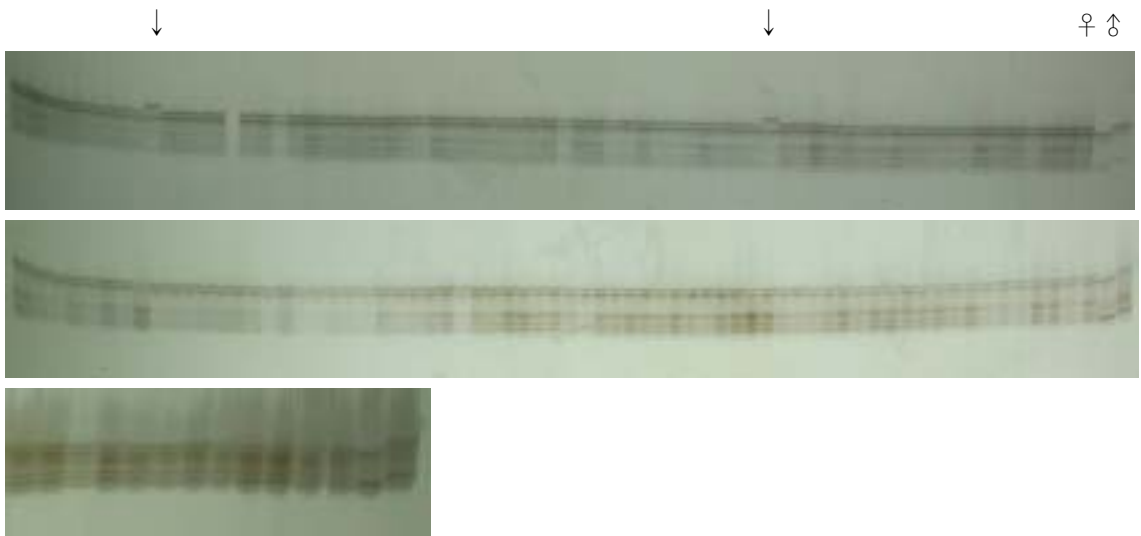
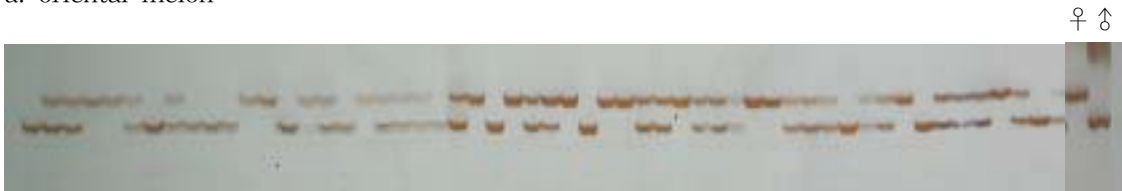


Figure 4-6. Assessment of F<sub>1</sub> seed purity for a variety of melon by using a 26CSWCT10 SSR marker. A total of 146 seeds were analyzed and two of them (↓) were revealed to be pollen contamination line. Two rightmost lanes represent parental types.

### 3. SSR 마커를 이용한 F<sub>1</sub> 종자 순도검정의 실현

양친간에 서로 다른 다형성 패턴을 보여준 CMMS34-8 마커를 적용하여 참외 F<sub>1</sub> 종자 136개에 대하여 PCR 반응을 수행하고 그 산물을 acrylamide gel에서 분석하였다. 그 결과 F<sub>1</sub> 후대 개체들에서 양호하게 양친의 allele을 모두 반영하는 heterozygous type을 보여주었으며, 이들이 정상적으로 교배되어 양친의 특성을 반영하는 hybrid 종자임을 증명할 수 있었다 (Fig. 4-5). 그러나 그 중 두 개체는 모본 allele의 homozygous type을 유지하고 있어 모본 자식개체임을 알 수 있었다. 이로부터 계산된 순도는 98.5% (134/136)로 나타나 상품화된 F<sub>1</sub> 종자의 품질 (종자관리요강 12조 / 종자 포장검사 및 종자검사의 기준 - 검사규격 98%)을 만족하고 있음을 알 수 있었다.

#### a. oriental melon



#### b. melon



Figure 4-7. Segregation of SSR markers in F<sub>2</sub> population of oriental melon (a) and melon (b). Two rightmost lanes represent parental patterns. Each segregation mode was scored and calculated for the conformity on Mendelian segregation patterns.

멜론에 대해서도 F<sub>1</sub> 종자 146개에 대하여 26CSWCT10 SSR 마커를 이용하여 종자 순도 검정을 실시하였다. 마찬가지로 그 결과는 거의 대부분 F<sub>1</sub> 후대 개체들에서 양호하게 양친의 allele을 반영하는 heterozygous type을 보여주었다. 그러나 두 개체는 원래 부분 유래의 allele과는 다른 band가 관찰되었다 (Fig. 4-6). 채종 단계에서 꽃가루 오염이나, 종자 처리 과정에서 혼종의 가능성을 제기할 수 있다. 멜론 F<sub>1</sub> 종자의 순도는 98.6%(144/146)로 역시 양호하게 나타나 상품으로서 문제없음이 증명되었다. 이와 같이 SSR 마커를 이용한 종자 순도 검정은 매우 유용함이 증명되었다. 또한 동위효소 방법에 비하여 그 마커 수와 다형성 형성율이 월등한 SSR 마커를 이용할 경우 양친간 다형성을 검정한 후 그 적용 범위를 얼마든지 넓힐 수 있어서 앞으로 박과류 등과 같이 동위효소 마커의 사용이 용이하지 않는 경우 혹은 기존에 사용되고 있는 동위효소 법을 더욱 간편한 방법으로 대체하고자 하는 경우에 그 적용성이 매우 넓을 것으로 사료된다.

#### 4. SSR 마커의 F<sub>2</sub> 세대 유전양상 검정

참외·멜론 F<sub>2</sub> 집단 각각 54 개체와 68 개체에 대하여 F<sub>1</sub> 종자 순도검정에 사용되었던 마커를 사용하여 SSR PCR을 수행하고 polyacrylamide gel에서 분석하였다 (Fig. 4-7). 그림과 같이 양친 type과 hybrid type으로 분리하였으며 그 분리비는 Table 4-7에서 보는 바와 같다. 참외·멜론 모두 F<sub>2</sub> 세대에서 1 : 2 : 1의 멘델 유전법칙에 부합하는 분리비 결과를 보였다. 이로부터 본 연구에서 개발된 SSR 마커들이 일반적인 표현형과 마찬가지로 마커로서도 F<sub>2</sub> 세대에서 유전적으로 매우 안정하며 품종의 유전분석과 F<sub>1</sub> 종자 순도검정에 사용될 수 있는 특성임이 증명되었다.

Table 4-7. Inheritance and segregation of SSR markers in F<sub>2</sub> generation

F <sub>2</sub> group	Markers	P <sub>1</sub> : H : P <sub>2</sub>	Segregaion mode	Type	$\chi^2$
oriental melon	CMMS 34-8	15: 26: 13 (54)	1.11: 1.93: 0.96	Codominant	0.222
melon	26CSWCT10	18: 33: 17 (68)	1.06: 1.94: 1.0	(1 : 2 : 1)	0.088

## 제 5 장 품종간 최소거리 설정

### 제 1 절 서론

품종보호 출원품종의 심사는 출원품종과 대조품종의 형태적 특성비교에 의해 구별성(D), 균일성(U), 안정성(S)을 갖추었는지 여부를 통해 이루어진다. 대조품종은 기존에 육성된 품종 중에서 형태적으로 출원품종과 가장 유사한 품종이 선정되는데, 기존품종에 대한 정확한 특성과악이 사전에 보장되어야만 정확한 품종심사가 비로소 가능하다. 그러나 기존의 품종집단이 방대할 경우나 이들 품종들이 형태적으로 매우 유사할 경우는 재배시험을 통해서 다양한 품종의 식물학적·형태학적 특성을 구체적으로 파악하는 데는 한계가 있다. 재배시험 담당자의 숙련도 외에도, 시설과 노동, 시간, 비용 등이 기본적으로 요구된다. 또한 환경의 영향을 많이 받는 양적형질의 경우 재배조건이나 환경, 년차 간에 변이를 보이기 때문에 특성조사 결과에 상당한 영향을 미칠 수 있다.

최근 유용 유전자의 mapping과 tagging 및 품종분류에 DNA 마커를 활용하는 방안이 논의되고 있는데, 고추, 벼, 유채 등과 같은 작물에서 품종식별에 DNA 마커의 이용 가능성을 보고한 바 있다. 아울러, 국제식물신품종보호동맹 UPOV/BMT에서도 DNA 마커에 의한 DUS 검정의 직접적인 이용에 관하여 논의를 지속하고 있는 바, 마커에 의한 품종의 genotype과 형태적 형질 간 특성의 일치성 등과 같은 문제점들이 앞으로 검토·해결되어야 할 사항들이다. 이러한 논점의 해결방안의 하나로 다양한 품종에 대한 DNA 분석을 실시하고 이에 따른 유전적 유사도와 각 작물의 형태적 특성과의 상관관계 분석을 통한 품종간 최소거리가 설정은 품종의 구별성과 유사성 판정에 매우 중요한 시사점을 갖는다. 이것은 추상적인 설정인 품종간 최소거리에 대한 구체적 거리 기준을 제시함과 동시에 유사품종 혹은 품종의 유사성 개념을 확립함으로써 회사간 유사품종의 육성을 지양토록 할 수 있는 실질적 수단이 되며, 궁극적으로 품종보호권 확립을 통한 육종가 권리보호에 기여할 수 있다. 또한, DNA 마커에 의한 품종의 사전검정 (pre-screening)이 가능하여 출원품종과 가장 가까운 대조품종 선별이 가능해 질뿐만 아니라 재배시험의 보완적 수단으로써 품종의 DUS 판정에 활용될 수 있고, 나아가 DNA 마커가 독립적인 DUS 검정 기준으로 활용되는데 기초 자료로도 이용될 수 있을 것이다.

따라서 본 세부과제에서는 고추, 참외, 멜론의 품종간 최소거리를 설정하기 위하여, 각

작물별 형태적 특성 조사와 제 2 세부과제에서 설정된 DNA 마커에 의한 유전적 유사도, 그리고 이를 바탕으로 한 전문가 협의회 및 공동특성조사 결과를 바탕으로 품종간 최소거리를 설정하였다.

## 제 2 절 고추의 품종간 최소거리 설정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 형태적 특성조사

고추의 형태적 특성을 조사하기 위하여, '향촌'의 34 품종을 2001년과 2002년 2월 26일에 파종하여 75일간 육묘한 다음 120 × 60 cm의 재식밀도로 품종당 3반복씩 정식하고, 식물체 (초형, 주간의 길이, 절간의 길이, 마디의 안토시아닌 착색), 잎 (잎몸의 길이, 잎너비, 잎녹색의 강도, 잎요철), 꽃 (꽃자루 자세, 꽃색), 과실 특성 (과실성숙전 색의 강도 외 13형질) 등을 국내의 고추 특성조사 기준 (표 5-1)에 준하여 조사하였다. 작물학적 특성 중 질적 형질은 공시품종 전체를 개괄적으로 조사하였고, 양적형질의 경우 반복 당 10주씩 조사하여 평균값을 최소유치의 검정에 의해 1~9 계급으로 구분하였다.

#### 나. 품종간 최소거리 설정

고추의 품종간 최소거리를 설정하기 위하여 AFLP 분석에 의한 유사도 지수가 87 ~ 100%인 25품종 19조합을 선정하여 2003년 2월 26일에 파종하고 약 70일간 육묘한 다음 10a 당 질소-인산-칼리가 10a 당 19-11.2-14.9 kg 수준으로 시비된 포장에 120 × 60 cm의 재식 밀도로 정식하여 품종당 20주씩 3반복 정식하였다. 우리나라 고추 재배품종군내에서 특성차이가 가장 뚜렷하게 나는 24 형질에 대해 조사하였다. 그리고 이들 품종을 대상으로 AFLP 분석에 의한 유전적 유사도 지수와 형태적 특성과의 관계를 명확하고 객관성 있는 조사를 하기 위하여, 학계, 국공립기관, 국내외의 종자회사에서 고추 품종 육성 전문가 8인을 초청하여 2003년 9월 5일 전문가 협의회를 개최하였다. 품종간 최소거리 설정을 위한 설문 방법은 공시 조합의 AFLP 유사도를 공개하여 품종간 차이를 조사할 경우 조사자의 선입관에 의해 정밀한 조사가 어려울 것으로 판단되어 유사도를 공개하지 않고 각 품종의 특성 차이

를 판단하게 하였으며, 그 결과를 종합하여 AFLP 유사도 지수에 따른 품종간 최소거리를 설정하였다.

Table 5-1. List of morphological traits used DUS test of pepper

No.	Characteristics	No.	Characteristics
1	Seedling : anthocyanin coloration of hypocotyl	20	Fruit : predominant shape of longitudinal section
2	Plant : attitude	21	Fruit : predominant shape of cross section
3	Plant : length of stem	22	Fruit : sination of pericarp at basal part
4	Plant : shortened internode (in upper part)	23	Fruit : texture of surface
5	Plant : number of internodes between the first flower and shortened internodes	24	Fruit : color at maturity
6	Plant : length of internode	25	Fruit : intensity of color at maturity
7.1	Plant : anthocyanin coloration at level of nodes	26	Fruit : glossiness
7.2	Stem : hairness	27	Fruit : stalk cavity
8	Leaf : length of blade	28	Fruit : depth of stalk cavity
9	Leaf : width	29	Fruit : shape of apex
10	Leaf : green color	30	Fruit : depth of interloculary grooves
11	Leaf : blistering	31	Fruit : predominant number of locules
12	Flower : attitude of peduncle	32	Fruit : thickness of flesh
13	Flower : color	33	Placenta : size
14	Fruit : color of before maturity	34	Stalk : length
15	Fruit : intensity of color before maturity	35	Stalk : thickness
16	Fruit : attitude	36	Calyx : aspect
17	Fruit : length	37	Fruit : capsaicin in placenta
18	Fruit : diameter	38	Time of beginning of flowering
19	Fruit : ratio length/diameter	39	Time of ripening

## 2. 고추의 형태적 특성조사 결과

고추의 형태적 특성을 국립종자관리소의 특성조사 기준에 준하여 조사한 바 (Table A-1), 건고추형, 파리고추형, 피만형으로 뚜렷하게 구분할 수 있었는데, 식물체의 초형은 대체로 파리고추나 피만형이 건고추 군보다 개장형을 보였고, 건고추내에서도 ‘한반도’, ‘다복건’, ‘부촌’, ‘국보’, ‘대명’의 경우 다른 건고추 품종보다 개장형인 것으로 조사되었다. 주간의 길이는 건고추가 파리고추나 피만형 고추보다 길었으며, 건고추내에서



‘부촌’, ‘슈퍼금탑’ 외 10품종과 ‘강력금당’, ‘금당’, ‘조광’ 등과 유의성 있게 길었으나, 나머지 품종들은 큰 차이를 나타내지 않았다. 마디 안토시아닌 착색은 품종 유형에 관계 없이 아주 열은 것부터 진한 것까지 다양하게 분포하였으며, 줄기의 솜털 정도도 이와 유사한 양상을 나타내었다. 잎 관련 형질중 녹색정도는 피만형 품종이 아주 진하였으나 나머지 품종들은 품종에 따라 다양한 양상을 보였으며, 잎의 길이와 너비는 피만형 품종들이 가장 크고 파리고추가 가장 작은 양상을 나타내었다.

화기관련 형질중 꽃색은 공시품종 모두 흰색을 띠었고, 꽃자루의 자세는 파리고추와 피만형은 상향을 나타내었으나, 건고추 품종내에서 ‘한반도’, ‘강력금당’, ‘조광’, ‘온세상’, ‘일석이조’, ‘명성’, ‘풍촌’, ‘금당’, ‘신강’, ‘신태양’은 꽃자루의 자세가 상향을 나타내었으나, 나머지 품종들은 하향을 나타내어 공시 품종 간에 뚜렷한 차이를 보였다.

과실 특성 관련 형질중 과실성숙전의 색은 공시품종 모두 녹색을 나타내었고, 과실의 자세는 하향이였다. 과실너비는 피만형 품종이 가장 넓었으며, 과실길이는 ‘뉴에이스피만’을 포함한 피만형 품종이 가장 짧은 것으로 조사되었고, 건고추의 경우 ‘마니파’, ‘부촌’, ‘슈퍼금탑’이 대과종으로 분류되었으며 나머지 품종들은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 한편 건고추와 파리고추 품종들의 과실 세로로 자른면의 모양은 일자형을 나타내어 피만형 품종과 뚜렷하게 구분되었다.

고추 35품종의 형태적 특성조사를 종합해 볼 때, 고추 품종 생태형에 따른 품종간 차이는 여러 가지 형질에서 뚜렷하게 나타났으나, 동일 품종군내에서는 몇 가지 형질에서만 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 고추의 경우 신품종 육성에 이용되는 유전자원이 한정되어 있기 때문에 나타난 결과라고 추정되며, 앞으로는 형태적 특성조사에만 의존하여 구별성을 판단하기에는 큰 어려움이 있을 것으로 추정되었다. 따라서 이를 보완하기 위하여 공시품종을 확대하여 DNA 마커를 활용한 품종간 유연관계 분석이 이루어지고 유전적 유사도에 따른 형태적 특성 조사 및 육종가 협의회를 통한 품종간 최소거리가 구체적으로 설정된다면 품종보호 출원 품종의 구별성 조사 및 대조 품종의 선정에 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

### 3. 품종간 최소거리 설정을 위한 형태적 특성조사

제 2 세부과제에서 분석된 고추 AFLP 유사도와 형태적 특성과의 관계를 분석하기 위하여, AFLP 유사도가 87~100%인 품종을 각각 공시하여 식물체 초형외 23형질을 조사한 바 (표 5-2), AFLP 분석 결과 유사도가 96% 이상인 ‘여명-금강산’ 외 7 조합은 24개 형질

에서 구별성을 보이지 않았으며, ‘조광-신태양’ 및 ‘신태양-금당’ 조합의 경우 AFLP 유사도 지수가 94%로 아주 가깝게 나타났으나 심실수에서 유의성 있는 차이를 나타내었다. 한편, ‘금강산-세계’ 조합의 경우 AFLP 유사도 지수가 94%이나 조사형질에서 구별성을 나타내지 않았는데 이들 품종에 대해서는 조사형질 수를 확대하여 세밀한 조사가 있어야 될 것으로 사료된다. 그리고 유사도지수가 90%이하인 품종들은 마디 안토시아닌 착색과 잎의 녹색 정도 및 꽃자루의 자세 등과 같은 형질에서 뚜렷한 구별성을 나타내었다.

품종보호출원 품종의 구별성 분석에 DNA 마커를 활용하는 방안이 여러 연구자에게 보고되고 있는데, Bernet et al. (2003)은 오이 출원품종의 RAPD 분석 결과와 형태적 특성과는 서로 상이하게 나타나 DNA 마커를 출원품종의 구별성 분석에 이용하기 위해서는 QTL 수준에서 깊은 연구가 수행되어야 한다고 하였으며, Tommasini et al. (2003)은 SSR 마커를 이용한 유채 출원품종의 구별성 분석에서 DNA 마커에 의해 기존 및 출원품종의 생태형에 따른 분류가 가능하나, DUS test에 DNA 마커를 활용하기 위해서는 조사형질과 밀접히 연관된 마커를 이용하여야 된다고 지적한 바 있으며 Lefebvre et al. (2001)도 고추에서 이와 유사한 연구 결과를 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서는 고추 AFLP 분석 결과의 유사도 값이 DUS 검정 결과와 유사한 양상을 보여 이들 연구자의 연구결과와 다르게 나타났는데 이는 본 연구에서 이용된 AFLP 마커가 UPOV 조사 형질에 어느 정도 연관되어 있기 때문에 나타난 결과라고 추정된다. 한편 본 연구에서 조사된 품종중 ‘금강산-세계’의 경우 AFLP 유사도가 94%이나 형태적 특성조사에서 뚜렷한 구별성을 나타내지 않아 이들 품종에 대한 식물학적 및 형태적으로 세밀한 조사와 더불어 이들 품종을 구별할 수 있는 분자표지 인자에 대한 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

앞으로 본 연구과제에서 밝혀진 고추 품종간 AFLP 유사도와 품종의 형태적 조사와의 관계 분석은 DUS 검정시 공시할 유사품종 및 대조 품종의 선정에 매우 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 5-2. Comparison of morphological characters and genetic similarity through AFLP analysis in DUS test of pepper

Similarities by AFLPs(%)	Varieties	PA <sup>1</sup>	PLS <sup>2</sup>	PLI <sup>3</sup>	PAC <sup>4</sup>	LLB <sup>5</sup>	LW <sup>6</sup>	LGC <sup>7</sup>	LB <sup>8</sup>	FAP <sup>9</sup>
100	Dawn(여명)	5	5	5	5	5	6	5	3	2
	Kumgangsan(금강산)	6	5	5	5	5	6	5	3	2
100	Geoseong(거성)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
	Echeonnyeon(이천년)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
100	Viking(바이킹)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
	Daebong(대봉)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
98	Sinbaram(신바람)	5	4	5	5	5	5	5	3	2
	Nostalgia(향촌)	5	5	5	5	4	5	5	3	2
98	Ambition(야망)	6	5	5	5	5	6	5	3	2
	Daemyung(대명)	6	5	5	5	6	6	5	3	2
96	Kumgangsan(금강산)	6	5	5	5	5	6	5	3	2
	Ambition(야망)	6	5	5	5	5	6	5	3	2
96	Segye(세계)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
	Kangse(강세)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
96	Segye(세계)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
	Daemyung(대명)	6	5	5	5	6	6	5	3	2
94	Jogwang(조광)	5	5	5	5	4	4	5	3	1
	Sintaeyang(신태양)	5	5	5	5	4	4	5	3	1
94	Sintaeyang(신태양)	5	5	5	5	4	4	5	3	1
	Geumdang(금당)	4	4	4	5	4	4	5	3	1
94	Kumgangsan(금강산)	6	5	5	5	5	6	5	3	2
	Segye(세계)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
91	Taeyangkeon(태양건)	5	5	4	5	4	4	5	3	1
	Nostalgia(향촌)	5	5	5	5	4	5	5	3	2
91	Kangse(강세)	5	5	5	5	5	5	5	3	2
	Gukbo(국보)	6	6	5	7	5	6	5	3	2
91	Gukbo(국보)	6	6	5	7	5	6	5	3	2
	Daemyung(대명)	6	5	5	5	6	6	5	3	2
89	Buchon(부촌)	6	6	6	5	6	7	5	5	2
	Supergeumtap(슈퍼금탑)	5	6	5	7	6	7	7	3	2
87	Geumdang(금당)	4	4	4	5	4	4	5	3	1
	Gangreok geumdang(강력금당)	5	4	4	5	4	4	5	3	1
87	Bridgeroom(종가집)	6	5	6	7	6	6	5	5	2
	Geumdang(금당)	4	4	4	5	4	4	5	3	1
87	Fortune(만복)	5	4	5	5	5	5	5	3	2
	Pocheongcheon(포청천)	5	5	6	5	5	5	5	3	2
87	Jogwang(조광)	5	5	4	5	4	4	5	3	1
	Gangreok geumdang(강력금당)	5	4	4	5	4	4	5	3	1

<sup>1</sup>Plant : attitude, <sup>2</sup>Plant : length of stem, <sup>3</sup>Plant : length of internode, <sup>4</sup>Plant : anthocyanin coloration at level of nodes, <sup>5</sup>Leaf : length of blade, <sup>6</sup>Leaf : width, <sup>7</sup>Leaf : green color, <sup>8</sup>Leaf : blistering, <sup>9</sup>Flower : attitude of peduncle

(Continued)

Similarities by FLPs(%)	Varieties	FC <sup>10</sup>	TBF <sup>11</sup>	TR <sup>12</sup>	CA <sup>13</sup>	FICM <sup>14</sup>	FL <sup>15</sup>	FD <sup>16</sup>
100	Dawn(여명)	1	6	5	1	5	6	5
	Kumgangsán(금강산)	1	5	5	1	5	5	5
100	Geoseong(거성)	1	5	5	1	5	5	5
	Echeonnyeon(이천년)	1	5	4	1	5	5	5
100	Viking(바이킹)	1	5	6	1	5	6	5
	Daebong(대봉)	1	6	5	1	5	5	6
98	Sinbaram(신바람)	1	5	4	1	5	6	5
	Nostalgia(향촌)	1	5	4	1	5	5	5
98	Ambition(야망)	1	5	6	1	5	6	5
	Daemyung(대명)	1	5	5	1	5	6	5
96	Kumgangsán(금강산)	1	5	5	1	5	5	5
	Ambition(야망)	1	5	6	1	5	6	5
96	Segye(세계)	1	6	5	1	5	6	5
	Kangse(강세)	1	5	5	1	5	6	5
96	Segye(세계)	1	6	5	1	5	6	5
	Daemyung(대명)	1	5	5	1	5	6	5
94	Jogwang(조광)	1	4	4	1	7	5	5
	Sintaeyang(신태양)	1	4	4	1	7	5	5
94	Sintaeyang(신태양)	1	4	4	1	7	5	5
	Geumdang(금당)	1	4	4	1	7	5	5
94	Kumgangsán(금강산)	1	5	5	1	5	5	5
	Segye(세계)	1	6	5	1	5	6	5
91	Taeyangkeon(태양견)	1	4	5	1	7	5	6
	Nostalgia(향촌)	1	5	4	1	5	5	5
91	Kangse(강세)	1	5	5	1	5	6	5
	Gukbo(국보)	1	5	4	1	5	6	4
91	Gukbo(국보)	1	5	4	1	5	6	5
	Daemyung(대명)	1	5	5	1	5	6	5
89	Buchon(부촌)	1	6	5	1	7	8	5
	Supergeumtap(슈퍼금탑)	1	6	5	1	5	7	5
87	Geumdang(금당)	1	4	4	1	7	5	5
	Gangreok geumdang(강력금당)	1	4	6	1	7	6	4
87	Bridgeroom(종가집)	1	5	6	1	5	8	5
	Geumdang(금당)	1	4	4	1	7	5	5
87	Fortune(만복)	1	5	4	1	5	6	5
	Pocheongcheon(포청천)	1	6	6	1	5	6	5
87	Jogwang(조광)	1	4	4	1	7	5	5
	Gangreok geumdang(강력금당)	1	4	6	1	7	6	5

<sup>10</sup>Flower : color, <sup>11</sup>Time of beginning of flowering, <sup>12</sup>Time of ripening, <sup>13</sup>Calyx : aspect, <sup>14</sup>Fruit : intensity of color before maturity, <sup>15</sup>Fruit : length, <sup>16</sup>Fruit : diameter

(Continued)

Similarities by AFLPs(%)	Varieties	PSLS <sup>17</sup>	PICM <sup>18</sup>	FG <sup>19</sup>	PNL <sup>20</sup>	PTF <sup>21</sup>	PS <sup>22</sup>	SL <sup>23</sup>	ST <sup>24</sup>
100	Dawn(여명)	8	7	5	2	6	5	5	5
	Kumgangsán(금강산)	8	7	5	2	6	5	5	6
100	Geoseong(거성)	8	7	5	2	5	5	5	5
	Echeonnyeon(이천년)	8	7	5	2	5	5	6	5
100	Viking(바이킹)	8	7	5	2	5	5	5	5
	Daebong(대봉)	8	7	5	2	5	6	5	5
98	Sinbaram(신바람)	8	7	5	2	5	5	5	5
	Nostalgia(향촌)	8	7	5	2	6	5	5	4
98	Ambition(야망)	8	7	5	2	5	5	5	5
	Daemyung(대명)	8	7	5	2	5	5	5	5
96	Kumgangsán(금강산)	8	7	5	2	6	5	5	6
	Ambition(야망)	8	7	5	2	5	5	5	5
96	Segye(세계)	8	7	5	2	5	4	5	5
	Kangse(강세)	8	7	5	2	5	5	5	5
96	Segye(세계)	8	7	5	2	5	4	5	5
	Daemyung(대명)	8	7	5	2	5	5	5	5
94	Jogwang(조광)	8	7	7	2	4	4	5	4
	Sintaeyang(신태양)	8	7	7	1	4	5	5	4
94	Sintaeyang(신태양)	8	7	7	1	4	5	5	4
	Geumdang(금당)	8	7	7	2	4	6	5	4
94	Kumgangsán(금강산)	8	7	5	2	6	5	5	6
	Segye(세계)	8	7	5	2	5	4	5	5
91	Taeyangkeon(태양권)	8	7	5	1	4	5	5	5
	Nostalgia(향촌)	8	7	5	2	6	5	5	4
91	Kangse(강세)	8	7	5	2	5	5	5	5
	Gukbo(국보)	8	7	5	2	4	4	5	5
91	Gukbo(국보)	8	7	5	2	4	4	5	5
	Daemyung(대명)	8	7	5	2	5	5	5	5
89	Buchon(부춘)	8	7	5	2	5	4	5	6
	Supergeumtap(슈퍼금탑)	8	7	5	2	6	5	5	7
87	Geumdang(금당)	8	7	7	2	4	6	5	4
	Gangreok geumdang(강력금당)	8	7	5	2	5	5	5	5
87	Bridgeroom(종가집)	8	7	5	2	5	4	5	5
	Geumdang(금당)	8	7	7	2	4	6	5	4
87	Fortune(만복)	8	7	5	2	5	6	5	5
	Pocheongcheon(포청천)	8	7	5	2	4	5	5	5
87	Jogwang(조광)	8	7	7	2	4	4	5	4
	Gangreok geumdang(강력금당)	8	7	5	2	5	5	5	5

<sup>17</sup>Fruit : predominant shape of longitudinal section, <sup>18</sup>Fruit : intensity of color at maturity, <sup>19</sup>Fruit : glossiness, <sup>20</sup>Fruit : predominant number of locules, <sup>21</sup>Fruit : thickness of flesh, <sup>22</sup>Placenta : size, <sup>23</sup>Stalk : length, <sup>24</sup>Stalk : thickness

#### 4. 전문가 협의회를 통한 품종간 최소거리 설정

AFLP 마커의 유전적 유사도가 87~100%인 25품종 19조합을 공시하여 국내 고추 육종 전문가를 초청하여 유사도 지수에 따른 공시품종의 표현형 차이를 설문 조사한 결과 (Table 5-3), 육종가 5명중 (고추 육종가 8명중 육종 경력이 5년 미만인 2인과 AFLP 유사도에 따라 일관성 있게 응답하지 않은 1인은 제외하였음) 1명만이 AFLP 유사도 지수가 96%인 2조합과 98%인 1조합에서 일부형질의 차이점을 지적(98% : 초세, 96% : 초형) 하였으나, 이러한 차이점은 육종가의 시각 차이에 기인한 원인으로 추정되며, 나머지 4인은 AFLP 유사도 지수가 96%이상인 조합에서 품종간의 차이를 인정하지 않았다.

Table 5-3. Comparison of breeder's observation and genetic similarity through AFLP analysis in DUS test of pepper

Varieties combination*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
AFLP similarity (%)		100	100	100	98	98	96	96	96	94	94	94	91	91	91	89	87	87	87	87
Results of breeder's observation	Similar	5	5	5	4	5	5	4	4	4	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0
	Dissimilar	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	2	3	5	5	5	5	5	5	4
	No respond	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

\* : Refer to the Table 5-3 for cultivar identification.

고추 전문가 협의회에서 품종보호에 DNA 마커의 활용 방안에 대한 육종가들의 다양한 의견이 제시되었는데, DNA 마커를 유사품종에 의한 종자 분쟁 발생시 즉각적으로 활용하자는 쪽과 유사품종 식별에 이용하기보다는 출원품종의 대조품종 선정에 활용하는 의견이 양분되는 경향을 보였으며, 향후 최근에 육성된 품종을 이용하여 DNA 분석을 실시한 다음 전문가 협의회를 개최하자는 의견을 제시한 육종가도 있었다. 그러나 설문에 참가한 대부분의 육종가는 두 품종간 AFLP 마커의 유사도 지수가 96% 이상이면 뚜렷한 작물학적 특성상의 차이점을 발견하지 못하였기 때문에, 이를 품종간 최소거리로 설정한다면 앞으로 유사품종으로 인한 종자분쟁이나 육종가 권리보호에 크게 기여할 것으로 사료된다

### 제 3 절 참외 · 멜론의 품종간 최소거리 설정

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 형태적 특성조사

시장에서 유통중인 참외·멜론(*Cucumis melo* L.) 대표품종 각각 25, 17품종과 깎치, 개구리참외 등 재래종 2품종을 포함하여 총 44 품종을 재료로 과제를 수행하였다 (Table 4-1). 국립종자관리소 재배시험과 포장에서 2년 (2002, 2003)간 포장재배시험을 수행하였으며 3월에서 7월까지 과실자루의 탈리정도 등 참외 · 참외 공히 53 형질의 형태적 특성을 조사하였다 (Table A-2). 재배시험을 위한 재식거리는 멜론의 경우 100×50cm 지주재배, 참외의 경우 250×60cm 포복재배 방법으로 실시하였다. 그 외 시비, 관수, 병해충 방제 등은 최적 재배조건을 기준으로 관행적인 재배방법에 준하였다. 형태적인 특성조사 기준은 UPOV 특성조사 방법을 준용한 국립종자관리소 ‘멜론 특성조사요령’에 준하여 조사하였고, 두 작물에 대한 형태적 특성조사결과의 통용성을 위하여 전체 56 조사형질 중 53개 형질만 포함시켰다. 부위별로는 종자에 관한 형질, 잎에 관한형질, 과실에 관한 형질 및 생육습성에 관한 형질 등이 포함되어 있다. 유묘의 특성은 제1본엽 완전 전개기에, 잎특성은 과실의 녹숙기, 과실특성은 수확기에 조사하였고, 년차간 혹은 환경의 특성에 영향을 적게 받는 방향으로 조사를 실시하였다. 특히, 실측 양적형질의 경우성적을 최소유의차 검정을 통하여 유의성의 유무에 따라 1~9까지의 계급으로 분류하는 것을 원칙으로 하였다.

##### 나. 품종간 최소거리 설정

우리나라 참외 유통품종에 대하여, 임의의 두품종 간에 보여주는 SSR 마커 유사도에 근거하여, 유사도 0.46 ~ 1.0에 해당하는 24 조합 (23 품종)에 대하여 재배시험에 의한 구별성 검정을 하고자 일대일로 포장에 공시하였다 (Table 5-5). 수확기에 이 분야 육종가 혹은 재배시험 전문가 7명을 모시고 현장에서 공동특성조사를 실시하였다. 조사방법은 수확기 특성 위주로 직관적인 관찰에 의하여 실시하고, 다음 설문에 응답하도록 하였으며, 이 경우 ③, ④에 대해서는 구체적인 구별성 항목을 적시하도록 하였다.

<구별성 없음>

① 매우 유사 (구별 안 됨), ② 대체로 유사 (조사표\* 이외 특성에서 약간 다름)

<구별성 있음>

③ 약간 다름 (조사표\* 기준 다소 특성차이 있음), ④ 상당히 다름 (다수 특성)

\* 국립종자관리소 발행 참외 특성조사표

위 결과의 산술치를 더하여 구별성 구간이 7(1×7) ~ 28(4×7) 사이에 분포하도록 하고 회귀 분석에 의하여 유사도와 구별성 값의 분포에 따른 상관관계를 구한 후 품종간최소거리를 결정하였다.

## 2. 참외 · 멜론의 형태적 특성조사 결과

재배시험을 통한 형태적 특성조사 결과를 바탕으로 품종 및 계통을 구분해 보면, 참외에 서는 꽃의 성표현에서 일반적으로 시중에 유통되고 있는 F<sub>1</sub> 품종의 경우는 대부분 단성화인 반면 재래종인 '간치', '개구리', 그리고 멜론의 유전인자를 받은 것으로 추정되는 '금항아리', '참왕' 등은 양성화를 나타내어 크게 대별되었다. 성숙된 껍질의 바탕색은 노란색과 녹색으로 양분되어 재래종과 '고향'은 녹색계통을 나타내었고 '금노다지', '대황' 등 주요 대다수의 품종은 노란색을 나타냈으며 그 중에서도 성숙된 껍질의 바탕색 강도는 '스타금지계', '금지계', '금항아리' 등이 다소 짙은색을 보여주었다 (Table A-3).

멜론 품종에 대해서는, 형태적으로 뚜렷하게 네트와 무네트 멜론으로 구분할 수 있는데 코르크형성 무 즉 무네트 품종은 '백화', '해피니스', '감천3호', '은설', '설향', '넘버원', '베스트', '황금' 등 8 품종이었고 네트를 형성한 품종은 VIP 등 9 품종이었다. 성숙된 껍질의 바탕색에 따라서는 흰색(백화, 베스트, 은설, 설향), 노란색(해피니스, 감천3호, 넘버원, 황금), 녹색(올림픽, 네띠안01, MVP, 자이언트, VIP, 슈퍼VIP, 얼스엘리트, 뷰티, 에메랄드하계1호)으로 구분되었다. 과실 과육의 주요색으로 '백화' 등 7 품종은 크림색, 'VIP' 등 9 품종은 녹색, 베스트는 오렌지색을 나타냈다 (Table A-3).

조사형질 중 품종 grouping 기준형질로 되어 있는 꽃의 성표현(13), 과실성숙 전후 껍질의 바탕색 특성(15, 21), 길이/너비 비율(18), 골 유무(34), 코르크 형성(39), 코르크 무늬 밀도(42), 과육의 주요색(46), 종자크기(48), 종자색(51) 등 주요 형질을 기준으로 특성을 분류한 결과, 과실 성숙전 껍질의 바탕색 강도, 길이/너비 비율, 종자크기 등 주로 양적형질에서 품종간 차이가 두드러 졌다 (Table 5-4).



Table 5-4. Characterization of 44 varieties of *C. melo* based on grouping characteristics of melon test guideline

No.	cultivars*	group	No. of characteristics**																							
			13	15	18	21	26	34	39	42	46	48	51													
1	금보라	II	1	4	6	2	-	9	1	-	1	3	1													
2	금동이		2	5	5																					
3	황옥	I	2	7	7	4																				
4	고향		6	4																						
5	스타금지계	II	1	5	6	2																				
6	금황은천																									
7	금싸라기은천																									
8	다이아몬드																									
9	007꿀*																									
10	슈퍼금동이																									
11	통일황																									
12	금미은천																									
13	사계절꿀	IV	2	3	3	4																				
14	금향아리*		3	3	2																					
15	금노다지	II	1	5	6	2																				
16	금싸라기은천II																									
17	슈퍼금싸라기*																									
18	황금알																									
19	대황*																									
20	금보파리																									
21	금괴은천																									
22	황진이																									
23	금지계	IV	2	3	3	4																				
24	참왕*		3	3	1																					
25	가야꿀	II	1	4	5	3																				
26	간치		5	4	9																					
27	개구리	III	5	6	4	3																				
28	해피니스						4	4	2																	
29	감천3호	V	6	7	2	7																				
30	백화						5	2	5																	
31	베스트	VI	7	4	1	1																				
32	은설						2	5	2	5	3															
33	설향											4	6	2	5	1										
34	넘버원																4	4	2	5	1					
35	황금																					5	5	2	1	3
36	올림픽																									
37	네띠안E*	3	3	4	4	7																				
38	MVP						7	4	4	9	5															
39	자이언트											5	4	4	9	5										
40	VIP																7	5	4	9	5					
41	슈퍼VIP																					7	5	4	9	5
42	얼스엘리트																									
43	뷰티	7	5	4	9	5																				
44	에메랄드하계1호						2	3	3	5	5															

\* Protection varieties, \*\* refer to the no. of characteristics in Table A-2

### 3. 품종별 형태적 특성과 SSR 마커특성의 연관관계 설정

조사특성 53 형질에 대한 형태적 특성조사 결과를 질적형질 18 개와 양적형질 35 개로 구분하였다 (Table A-2). 각 형질에 simple matching distances와 average taxonomic distances를 각각 적용 품종간 유사도를 NTSYSpc Ver. 2.1 프로그램을 사용 산출하였다 (Rolf, 2000). 품종간 분자유전학적 특성과 형태적 특성의 상관도를 구하기 위하여 SSR 마커의 Jaccard's coefficient에 의하여 나타난 품종간 유사도와 위에서 구한 양적·질적 형질의 품종간 형태적 유사도를 Mantel test에 의하여 상호 비교하여 상관계수를 구하였다 (Rolf, 2000).

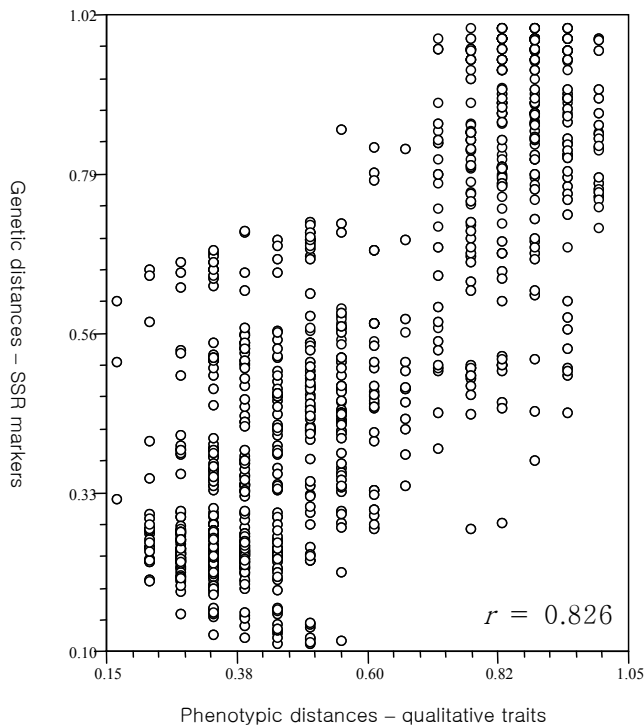


Figure 5-1. Comparison between phenotypic distances in qualitative traits and genetic distances based on SSR markers by Mantel test.

품종간 질적형질 특성과 SSR 마커 특성의 상관계수는 0.826로 비교적 높게 나타났다 (Fig. 5-1). 양적형질 경우 상관계수는 (-)0.878로 더욱 높았다 (Fig 5-2). 이로부터 참외 · 멜론의 품종별 형태적 구별성은 SSR 마커에 의한 분자유전학적 특성과 상당히 연관되어 있음을 알 수 있었다. 질적형질의 상관도가 상대적으로 낮은 것은 양적형질과 달리 소수의 유전자에 의하여 지배되는 주요 형태적 특성 차이에 따른 것으로 생각된다.

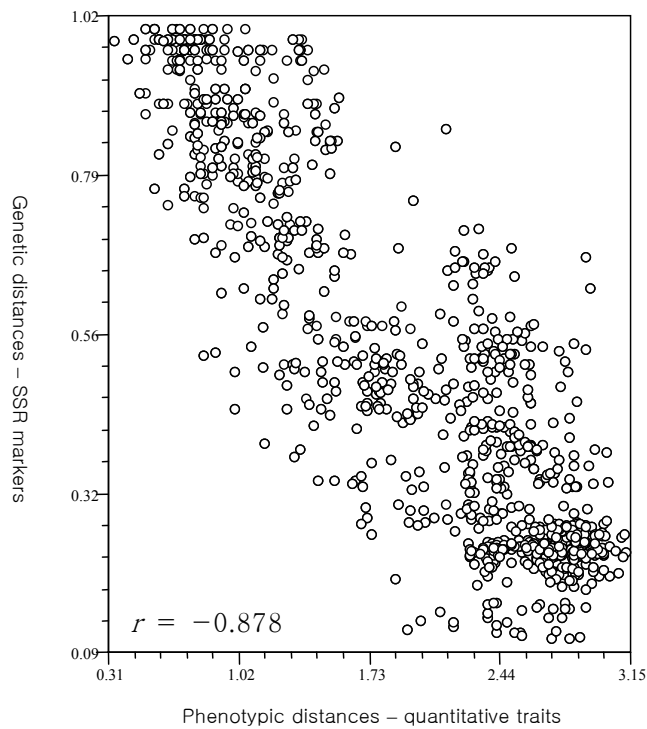


Figure 5-2. Comparison between phenotypic distances in quantitative traits and genetic distances based on SSR markers by Mantel test.

4. 전문가 공동특성조사를 통한 품종간 최소거리 설정

참외 24조합 23 품종에 대한 전문가 공동특성조사 결과는 Table 5-5와 같다. 이것을 SSR 마커특성에 의한 품종간 유사도와 전문가 구별성 검정 결과에 대한 상관관계로 나타내면 Fig. 5-3과 같다. 본 조사결과, 두 특성에 대한 상관계수( $R$ )는 0.76, 결정계수( $R^2$ )는 0.58로 나타났다. 일반적으로 품종간 최소거리는 최초로 구별성을 보이는 유전적 유사도로서 정의될 수 있다. 그런데 형태적 구별성 (전문가 공동특성조사 결과)과 유전적 유사도 간에는 일정한 상관관계가 성립한다. 즉, 그림에서 보는 바와 같이, 형태적 차이에 의한 구별성이

Table 5-5. Distinction test by breeders for the variety combinations of various genetic similarities

No.	Combination	Cultivar	Simil.**	Distinction score *	No.	Combination	Cultivar	Simil.**	Distinction score *
1	A	Geumssaraki	0.98	19	13	A	Geummi	0.97	11
	B	S.geumssaraki				B	Geumbora		
2	A	Geumssaraki	0.97	17	14	A	Geummi	1	13
	B	Geumdongi				B	Geumdongi		
3	A	Geumssaraki	0.98	14	15	A	Geummi	0.87	27
	B	Diamond				B	Stargeumjige		
4	A	Geumssaraki	0.91	24	16	A	Geummi	1	12
	B	Hwangjini				B	Geumbotari		
5	A	007ggul	0.91	18	17	A	Hwangjini	0.87	16
	B	Hwanggeumal				B	GeumssarakilI		
6	A	007ggul	0.78	19	18	A	GeumssarakilI	0.94	13
	B	Tongilhwang				B	S.geumssaraki		
7	A	007ggul	0.89	15	19	A	Diamond	1	11
	B	Geumbotari				B	Hwanggeumal		
8	A	007ggul	0.54	28	20	A	Gayaggul	0.51	23
	B	Geumhangari				B	Geumhwang		
9	A	Geumjige	0.83	23	21	A	S.geumdongi	1	10
	B	S.geumssaraki				B	Geumdongi		
10	A	Geumjige	0.82	20	22	A	Daehwang*	0.69	20
	B	Sagyejeolggul				B	S.geumdongi		
11	A	Geumjige	0.85	24	23	A	Geumhwang	0.83	23
	B	Geummi				B	Stargeumjige		
12	A	Geumjige	0.46	28	24	A	Geumhangari	0.57	28
	B	Chamwang				B	Geumkwoei		

\* the dimension of the scoring is between 7 ~ 28 in order of distinction

\*\* Similarity coefficient in Jaccard's

커질수록 유전적 유사도는 뚜렷이 작아지지만, 동시에 두 특성 간의 괴리도 커진다. 이는 두 품종 간에 소수의 coding 유전자 차이에 의하여 나타나는 표현형적인 차이가 마커에 의한 유전자형 차이로는 반영되지 않는 결과이다. 따라서 다양한 유전적 유사도를 갖는 품종조합을 공시하고 형태적 구별성과의 상관관계를 살펴서, 상관도가 최대이면서 동시에 유사도 [similarity in genotype]/구별성 [distinction in phenotype]이 최소/최대인 조건을 동시에 만족시키는 genetic similarity 값은 두 품종간의 형태적 구별성을 유전적으로 정의할 수 있는 최소 위치 (품종간최소거리 - 구별성 유무의 경계선)로서 의미를 갖는다고 말할 수 있다.

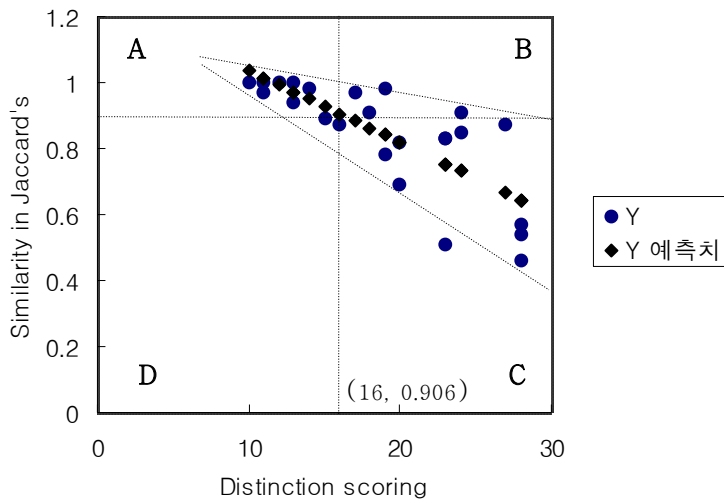


Figure 5-3. Calibration of threshold level for genetic minimum distance against traditional characteristics based on breeder's test and genetic similarity. Twenty three varieties of 24 variety combination with various genetic similarities were tested by breeders. Regression analysis was performed to get correlations.

실제로 Fig. 5-3에서 보는 바와 같이 형태적 특성과 유전자형 특성의 괴리도는 일정 기준 이상에서 급격히 증가하는 것을 볼 수 있는데, 그 시점의 이론적 계산치 (예측치)는 구별성 척도와 유전적 유사도가 [16, 0.906]으로 측정되었다. 즉, 이 지점 혹은 그 이하의 형태적 구별성 척도를 가지고 유전적 유사도 값을 예측하고자 했을 때 실제 측정치와의 편차는  $\leq 0.05$  (5%)의 조건을 만족시키고 있다. 즉, 이 구간에서는 SSR 마커에 의한 유전적 유사도와 형태적 구별성 사이에 고도의 상관관계가 성립함을 알 수 있다. 따라서 [16, 0.906]은 공시품종 조합 집단에서 최초로 형태적 구별성이 나타나면서 유전자형(SSR 마커)과 표현형의 상관도가 벗어나기 시작하는 지점으로, 이 지점에서 참외 품종간 형태적 구별성을 확보할 수 있는 최소 유전적 유사도값 (**품종간최소거리**)으로서 SSR 마커에 의한 Jaccard's similarity coefficient 0.91의 기준을 설정할 수 있다.

이 중 영역 A, C는 설정기준에 부합하는 부분으로, 이에 따르면 검정된 공시 품종의 구별성에 관한 상당부분을 설정된 품종간최소거리 기준의 상관관계에서 설명할 수 있었다. 예측의 범위에서 벗어나는 역역 B의 경우는 실제 재배 불량률의 원인이 있는 것으로 판명되었으며, 정상적인 재배시험에서는 영역 A에 해당될 수 있어 분자마커에 의한 품종간최소거리 설정의 신뢰성을 확인할 수 있었다.

이와 같은 내용은 품종간 유전적 유사도를 근거로 작성된 덴드로그램 상 분류기준과도 상응하였다 (Fig. 4-4). 즉, 유사도 값 0.91을 기준으로 그 이내의 14 품종은 매우 밀접한 연관관계를 형성하고 있지만, 동시에 그 바깥의 품종집단들과는 유사도가 급격히 떨어짐을 발견할 수 있다. 두 관정의 결과에 매우 밀접한 연관성이 있다는 사실로부터 Jaccard's similarity coefficient 0.91의 기준이 참외 품종집단에서 유사성을 판정할 수 있는 매우 특별한 의미를 갖는 다는 사실을 재확인할 수 있다.

## 제 6 장 고추의 SSR 마커 개발

### 제 1절 서 론

작물에서 분자 표지의 이용은 크게 DNA 지문법을 이용한 작물 개체간 변이 측정, 유전자지도 작성, 분자 표지를 이용한 육종재료 선발 (marker assisted selection, MAS)이 있다. UPOV (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants, 국제 식물신품종 보호동맹)에서는 유사품종의 파악을 목적으로 DNA 기법 이용의 필요성을 인정하였다. 또한 새로운 품종 육종시 소비되는 많은 노동력과 시간을 분자표지의 이용함으로 육종기간이 크게 단축되었다. 게놈 연구사업이 진행되면서 유전자 지도 작성용 분자표지가 물리지도 작성에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 게놈 염기서열 분석에서 나온 결과들이 분자표지 개발에 이용되고 있다.

고추는 국내외적으로 채소작물에 있어서 단연 중요한 작물로 인식되고 있다. 따라서 이에 관한 여러 분자유종 연구들이 보고 되었고 진행되고 있다. 현재까지 고추 분자 육종연구는 RFLP, AFLP, RAPD 표지를 근간으로 품종구분, 유전자지도 작성, MAS 등 유전학적 연구에 많이 이용되고 있으나, 기술적인 문제, 효용성, 정보력 등의 한계로 새로운 표지 개발의 대안이 필요한 실정이다.

SSR (simple sequence repeat) 혹은 microsatellite는 게놈내 1-5 bp의 짧은 염기서열이 연속적으로 반복되는 것으로 게놈내 다른 DNA 부위보다 변이가 많이 일어나는 지역이다. 이 SSR은 동 식물 모든 분양에서 최근 많이 선택되어지는 분자표지로 다른 표지에 비해 다형성도 (polymorphism)가 훨씬 높은 것으로 알려져 있다. PCR 기술을 이용하기 때문에 연구자들이 쉽고 빠르게 결과를 얻을 수 있고 primer의 염기서열의 상호교류로 기술 보급효과가 크며 codominant 표지의 장점으로 대부분의 연구자들이 선호하는 분자표지이다. 그러나 개발시 소요되는 비용 및 노동력이 필요해 대단위 연구사업이 요구 된다.

따라서 본 연구진은 고추 육종가 권리보호를 위해 품종간 구별효과가 큰 분자표지의 필요성과 고추 분자유종에서 요구되어지는 문제점을 해결하고자 고추의 SSR 표지를 개발하고자 한다. 개발된 고추 SSR 표지는 고추 품종 구분과 유전자지도 작성같은 분자유종의 기초에 핵심적인 역할을 하리라 기대한다.

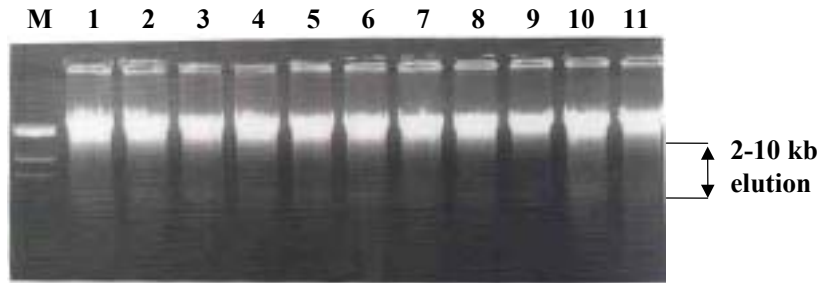
## 제 2절 재료 및 방법

### 1. SSR library 구축 및 클론 선발

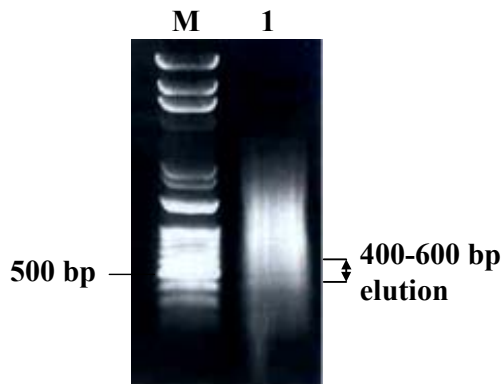
고추 SSR을 확보하기 위해 두개의 small-insert genomic library를 구축하였다. *C. annuum*의 genomic DNA를 각각 *Hind*III, *Pst*I / *Mbo*I으로 자른 후 약 500 bp 정도의 DNA fragment를 size fraction 하였다 (Fig. 6-1). 이 fragment들을 각각 *Hind*III, *Bam*HI으로 자른 dephosphorylation 시킨 pBluescript-SK+ (Stratagene, USA)에 ligation 시켰다. Ligation mixture를 MAX Efficiency DH5 $\alpha$  competent cells (Life Technologies, USA)에 electrophorator를 이용하여 transformation 시킨 후 1.8% agarose, ampicillin (50 mg/ml), X-gal (20 mg/ml), IPTG (200 mg/ml)이 포함된 LB 배지에 plating하였다. LB 배지에 자란 colony는 nylon membrane에 transfer하여 colony hybridization을 실시하였다 (Fig. 6-2) (Sambrook et al. 1989). Colony hybridization을 위한 microsatellite probe는 (AT)<sub>15</sub>, (GT)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (ATT)<sub>10</sub>, (TTG)<sub>10</sub>을 사용하였으며 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, UK)와 T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, USA)를 이용하여 oligonucleotide end-labelling하였다. SSR 클론 선발을 위한 hybridization stringency는 GT, GA, TTG는 65°C, AT, ATT는 60°C로 하였다.

선발된 클론들은 ThermoSequenase 2.0 kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) 혹은 ABI377 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)를 통해 DNA 염기서열 분석을 실시하였다 (Fig. 6-3). 염기서열의 homology 검색은 EMBL database를 이용하였다. 염기서열의 정확성을 위해 T7, T3 primer를 이용, 양방향으로 염기서열 분석을 수행하였다.





(A)



(B)

Figure 6-1. Agarose gel electrophoresis of *Capsicum annuum* genomic DNA for small insert genomic library construction

(A) *C. annuum* genomic DNAs digested by *Pst* I were electrophoresed on 0.8% agarose gel for size selection. M:  $\lambda$  DNA / *Hind*III marker, Lane 1~11: *Capsicum annuum* genomic DNAs digested by *Pst* I (B) The size-selected DNA from A was further digested with *Mbo* I. These DNAs were electrophoresed on 1.2% agarose gel for size selection. M: 100 bp ladder, Lane 1: *C. annuum* genomic DNAs digested by *Mbo* I after *Pst* I digestion and size-selection

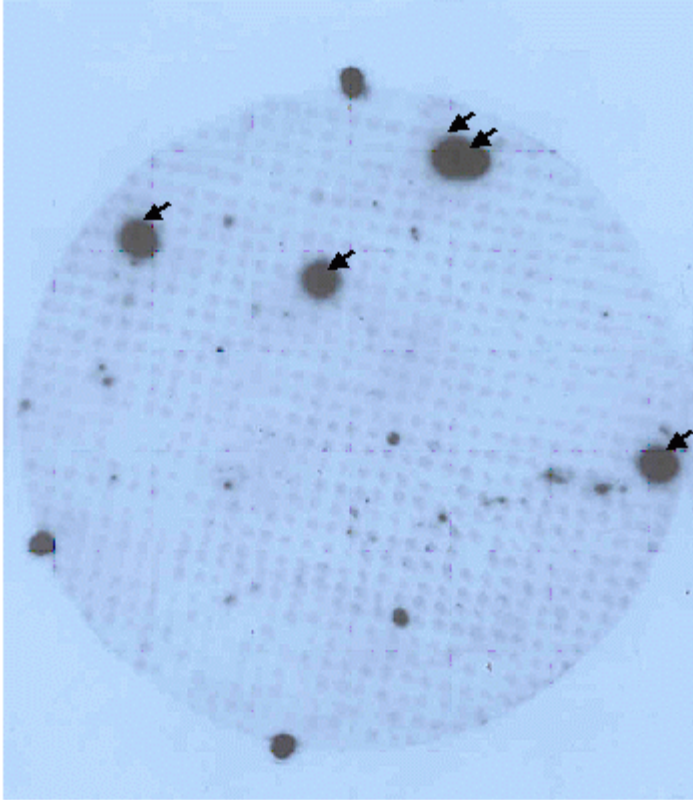


Figure 6-2. Colony hybridization of SSR clone screening

Membranes were hybridized simultaneously with  $(GT)_{15}$ ,  $(GA)_{15}$ , and  $(TTG)_{10}$  as probes.

( $\blackrightarrow$ ) indicates positive clones.

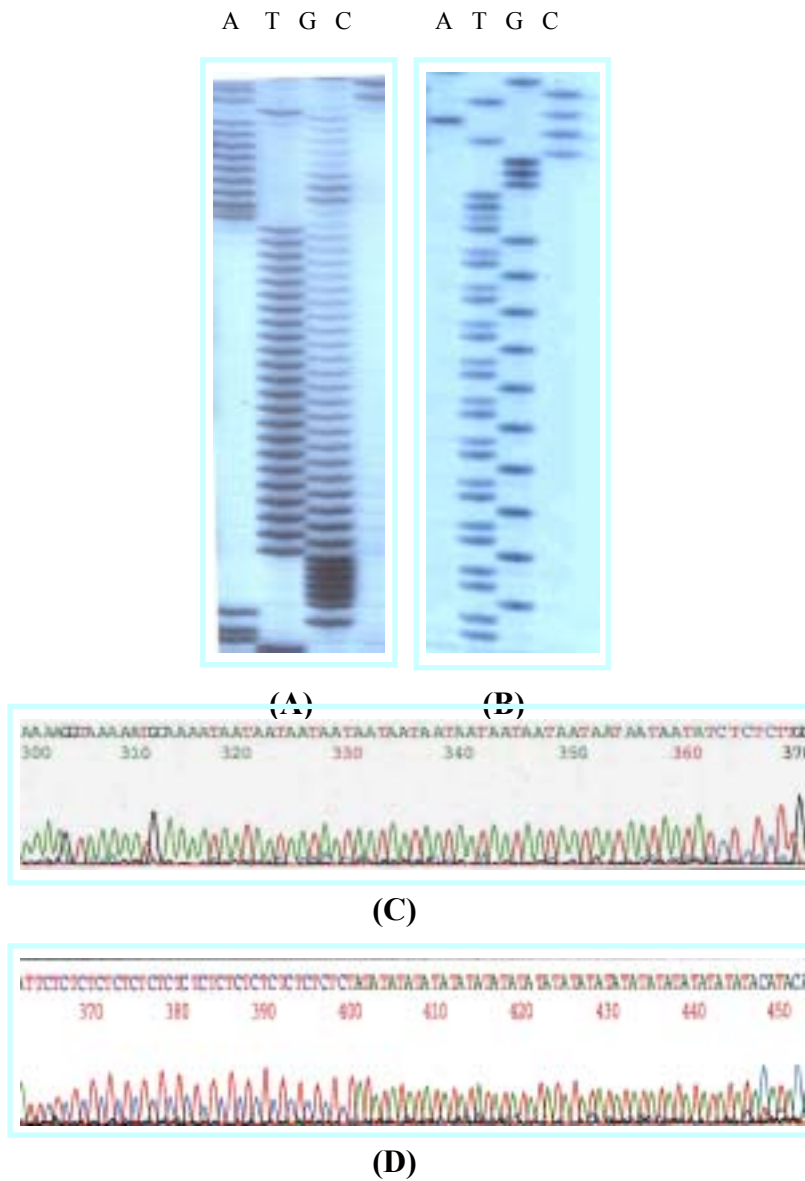


Figure 6-3. DNA sequence of SSR clones

(A) (TG)<sub>22</sub>(AG)<sub>9</sub>, (B) (TTG)<sub>10</sub>, (C) (AAT)<sub>15</sub>, (D) (TC)<sub>18</sub>(TA)<sub>24</sub>

## 2. Primer 선발 및 PCR 증폭

분석된 SSR을 기준으로 양쪽의 염기서열을 통해 SSR primer를 작성하였다. 각각의 primer 선발은 PRIMER 3.0 (<http://-genome.wi.mit.edu/>, Whitehead Institute for Biomedical Research, USA)을 이용하였고, PCR 산물의 길이는 100 bp에서 300 bp 정도로 하였으며, (주)바이오니아를 통해 합성하였다.

PCR 증폭은 25 $\mu$ l를 반응 부피로 하여 10-25ng의 genomic DNA, 1 Unit *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan), 10X PCR buffer 용액, dNTP, end-labeled SSR primer를 이용하여 수행하였다. PCR cycle 조건은 94 $^{\circ}$ C 3분 denaturation 후 94 $^{\circ}$ C, 1분/50 or 55 $^{\circ}$ C 1분/72 $^{\circ}$ C 2분의 cycle을 35회 반복 후 72 $^{\circ}$ C 10min 동안 extension cycle 1회 실시하였다. 차후 PCR 증폭 시간의 단축을 위해 denature, annealing, extension 시간을 각각 30초, 30초, 1분으로 줄였다. 서로 다른 4대의 PCR (Hybaid, UK; iCycler, USA; PTC-200, USA; GeneAmp 9600, USA) 이용하였고 재현성 문제는 없었다.

PCR 증폭 산물은 6% denatured polyacrylamide gel electrophoresis를 통해 분석하였다. 1XTBE buffer에서 전기영동, 3MM paper에 gel transfer, 80 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 진공건조 시킨 후 X-ray 필름에 감광시켜 현상하였다.

## 3. Polymorphic information content (PIC) 분석

각각의 SSR 표지의 다형성 정도를 분석하기 위해 아래와 같은 수식을 이용, PIC 값을 측정하였다.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

$P_i$ 는  $i$ 번째 allele의 빈도를 나타내며,  $k$ 는 locus에 해당하는 allele들의 수를 표시한다.

PIC 측정용 DNA 샘플 채취를 위해 *Capsicum baccatum*, *C. frutescense*, *C. chacoense*, *C. pubescence*, *C. chinense* cv. PI159236, *C. chinense* cv. Habanero, *C. annuum* cv. TF68, *C. annuum* cv. AC2258, *C. annuum* cv. CM334, *C. annuum* cv. Chilsungcho, *C. annuum* cv. ECW 총 11개의 고추 어린 잎 시료를 SeminisKorea로부터 분양받았다.

#### 4. SSR primer 개발을 위한 GenBank database 검색 및 고추 EST DB 검색

고추 microsatellite 확보를 위해 GenBank에 등록된 고추 DNA 염기서열과 ESTs (<http://plant.pdrc.re.kr/ks200201/pepper.html>)를 분석하였다. 고추 EST 염기서열은 한국생명공학원 최도일 박사님으로부터 분양받았다. Microsatellite의 자동, 대량 검색을 위해 Sputnik (<http://abajian.net>) 프로그램을 이용하였다. 총 microsatellite의 길이는 10%까지 mismatch를 허용하는 범위에서 12 bp 이상으로 하였다. 이렇게 분석된 EST-SSR은 위와 같은 방법으로 primer를 작성, PCR을 수행하였다.

#### 5. 고추 SSR 유전자 지도 작성

*Capsicum annuum* cv. TF68를 모본, *C. chinense* cv. Habanero를 부분으로 하는 107개 F2 집단을 통해 고추 유전자 지도 작성을 수행하였다 (Kang et al., 2001). 고추유전자 지도에 위치한 frame RFLP 표지 (Kang et al., 2001)와 200여개의 SSR 표지를 raw data로 이용하였다. 정확한 분자 표지의 scoring을 위해 2명 이상의 사람이 독립적으로 수행하였다. 유전자 지도작성에 사용된 프로그램은 MAPMAKER 3.0/EXP (Lander et al., 1987)으로 하였다. 연관군을 동정하기 위해 LOD 4.0, maximum distance 25 cM을 기준으로 "Group" 명령어를 이용하였다. 분자표지의 지도상의 순서를 정하기 위해 "Order" 명령어를 이용하였으며 지도상에 위치하지 않은 남은 표지들을 "Try" 명령어를 이용하여 mapping 시켰다. "Ripple" 명령어로 표지들의 순서를 재검증하였다. 정확한 유전자 지도작성을 위해 "Compare" 명령어도 사용하였다.

### 제 3절 결과 및 고찰

#### 1. 고추의 SSR 분리 및 동정

2개의 small-insert genomic libraries로부터 약 20,000여개의 클론들을 (AT)15, (GT)15, (GA)15, (ATT)10, (TTG)10 oligonucleotide을 이용, colony hybridization 수행하여 SSR 클론들을 선별하였다. 이를 통해 130개의 선별, 염기서열을 분석한 결과 95개의 클론에서 microsatellite를 확인하였다 (73% 선별효율). 18개 클론이 중복되는 것으로 확인되어 77개의

중복되지 않은 SSR sequence를 얻을 수 있었다. Repeat 길이는 최소 6번, 최대 36번까지 반복되었으며 평균 repeat 길이는 17.6 이었다. Homogeneous repeat는 38 클론, compound repeat는 39 클론이었다. SSR 염기서열 분석 결과 (GT) 25개, (TTG) 24개, (GA) 21개, (AT) 20개 (ATT) 5개 순으로 나타났다 (Fig. 6-4). Compound repeat 때문에 77개의 SSR 클론보다 많은 총 95개의 SSR 염기서열을 확인할 수 있었다. 이는 고추 게놈에 SSR이 95 kb에 1개씩 총 25,700개의 SSR이 존재함을 추정할 수 있었다.

고추 SSR 클론에서 얻은 염기서열의 생물학적 의미를 알아보기 위해 EMBL DB를 통해 homology search를 실시하였다. 총 16개의 SSR 클론이 retrotransposon 같은 repetitive element와 상동성을 가지는 것으로 확인되었다 (Table 6-1). 특히 담배의 SINE (short interspersed repetitive element)과 상동성을 가지는 클론이 많았는데, 이 SINE 내에 (TTG)7 염기서열이 있는 것으로 확인되었다. 다른 작물의 SSR 분포와 본 연구의 고추 SSR 분포와 비교하였을 때 (TTG)가 반복되는 SSR이 2번째로 많은 것이 특이할 만한 결과이다. 이는 SINE 때문이라고 볼 수 있으며 SSR의 분포가 transposon에 기인하다는 결과와 일치한다 (Ramsay et al., 1999). (TTG)가 반복되는 특징은 고추뿐만 아니라 가지과 작물 게놈의 고유한 특징이라 사려된다.

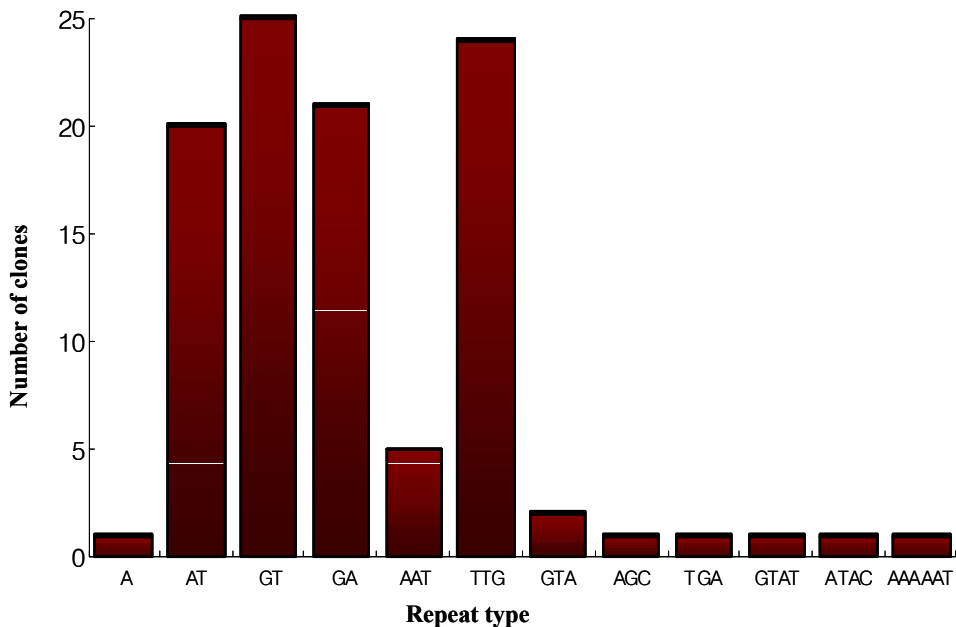


Figure 6-4. Number of clones depending on SSR type from microsatellite clones

Table 6-1. Microsatellite clones with homology to repetitive DNA sequences

Clones	Known sequence	Accession	Identity (% , bp)	E-value
<i>Hpms</i> 1-7	<i>Capsicum annuum</i> retrotransposon	AF121443	69.64, 336	2.6e-28
	<i>Lilium henryli</i> del transposon	X13886	64.33, 443	3e-28
	<i>Oryza sativa</i> gypsy-type retrotransposon	AB014740	64.88, 410	4.5e-28
<i>Hpms</i> 1-143	<i>Solanum tuberosum</i> transposon	STU91987	70.59, 102	0.68
<i>Hpms</i> 1-214	Tobacco SINE	D17455	84.73, 131	3.4e-11
<i>Hpms</i> 1-227	Tobacco SINE	D17455	82.35, 85	0.00024
<i>Hpms</i> 1-236	Tobacco SINE	D17454	74.79, 114	3.8e-05
<i>Hpms</i> 1-274	Tobacco SINE	D17455	73.91, 115	3.6e-07
<i>Hpms</i> 2-18	Tobacco SINE	D17456	74.19, 155	8.7e-08
<i>Hpms</i> 2-23	Tobacco SINE	D17456	79.41, 136	1.2e-08
<i>Hpms</i> 2-27	Tobacco SINE	D17456	75.45, 167	86.e-13
<i>Hpms</i> 2-29	Tobacco SINE	D17454	75.42, 118	9.7e-05
<i>Hpms</i> 2-30	Tobacco SINE	D17455	76.43, 140	1e-07
<i>Hpms</i> 2-41	Tobacco SINE	D17456	80.14, 146	1.1e-10
<i>Hpms</i> 2-51	Tobacco SINE	D17456	76.43, 140	1.2e-07
<i>Hpms</i> AT2-15	<i>Glycine max</i> retrovirus-like element	AF186183	85.44, 103	2.9e-05
<i>Hpms</i> AT2-20	<i>Glycine max</i> retrovirus-like element	AF186183	94.12, 68	0.048
<i>Hpms</i> AT2-28	<i>Glycine max</i> retrovirus-like element	AF186183	78.07, 114	3e-05

## 2. GenBank DB에서 고추 SSR 분석

총 312개의 고추 염기서열 정보 (1999년 10월 16일까지 NCBI에 등록된 정보), 213,061 bp의 검색을 통해 32개의 SSR을 찾았다. 대부분 (90.6%) SSR의 길이가 20 bp 미만으로 상대적으로 genomic SSR보다 짧았다. GenBank에 등록된 염기서열을 기초로 고추 SSR의 계놈내의 빈도수를 계산해 본 결과, 6.7 kb마다 1개의 빈도로 고추 계놈에 약 40만개의 SSR이 있음을 추정할 수 있었다. 이는 토마토에서 8.4 kb (Smulder et al. 1997), 아라비돕시스에서 13.8 kb (Bell and Ecker 1994)와 유사한 결과라 할 수 있다. 이러한 결과는 EST 같은 대량의 유전자 염기서열 정보에서 genomic sequence보다 많은 SSR을 개발해 낼 수 있는 중요한 근거로 제시되었고 고추에서 EST 분석을 통한 SSR의 개발에 중요한 지표가 되었다. SSR motif에 따른 빈도수는 (A)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub> 순으로 각각 21.3 kb, 53.3 kb, 53.3 kb마다 1개의 SSR의 존재를 추정할 수 있었다 (Table 6-2).

Table 6-2. Frequency of microsatellite in *Capsicum* GenBank accession

Motif	Numbers	Size(bp)		%	Predicted kb per one SSRs	Predicted # of SSRs in the genome
		12-20	21-50			
A	10	10		31.4	21.3	~127,000
G	1	1		3.1	213.1	~12,700
AT	4	3	1	12.5	53.3	~50,700
AC	3	2	1	9.4	71.0	~38,000
AG	4	4		12.5	53.3	~50,700
ATT	1	1		3.1	213.1	~12,700
AAG	3	3		9.4	71.0	~38,000
AGG	1	1		3.1	213.1	~12,700
TTG	1		1	3.1	213.1	~12,700
CCG	1	1		3.1	213.1	~12,700
AATA	1	1		3.1	213.1	~12,700
GGGC	1	1		3.1	213.1	~12,700
TTTC	1	1		3.1	213.1	~12,700
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>29</b>	<b>3</b>	<b>100</b>	<b>6.7</b>	<b>~405,000</b>
<b>%</b>	<b>100</b>	<b>90.6</b>	<b>9.4</b>			

### 3. SSR 표지 개발

분리된 77개의 genomic SSR 중 29개의 SSR에 대해서는 primer를 작성이 용이하지 못하였다. 19개에 대해서는 SSR 클론의 염기서열정보의 부정확, 8개에 대해서는 한쪽 primer를 작성하기에는 SSR이 cloning site에 너무 가까이 존재해서, 2개에 대해서는 Tm 값이 적당한 primer를 찾을 수 없는 이유로 개발할 수 없었다. 따라서 48개의 SSR 클론의 염기서열을 근간으로 primer를 개발하였다. GenBank에서 찾은 32개의 SSR중 26개의 SSR에 대해 primer를 개발하였다. 본 연구실에서 동정한 고추 유전자 *CaSIG19* (Lee 2000)와 *hpMADS* (Yu 2001)에 각각 intron, 3' UTR에 microsatellite가 존재하여 이를 이용하여 primer를 개발하였다. 이렇게 개발된 SSR 표지는 "Hot Pepper microsatellite"의 약어인 "*Hpms*"라 명명하였다. 또한 이미 보고된 SSR primer (Huang et al., 2000)를 PIC 값 측정과 지도작성을 위한 F2 genotyping에 이용되었다 (Fig. 6-5, Fig. 6-6, Table 6-3).

총 76개의 primer에 대해 PIC를 측정한 결과 평균 PIC값은 0.57로 최소 0.0에서 최대



0.91까지 다양한 수치를 보였다. Genomic SSR의 PIC 값은 0.75, GenBank SSR의 PIC 값은 0.38이었다. 평균 allele 수는 4.8로 나타났으며, genomic SSR은 6.3, GenBank SSR은 3.2이었다. 분자표지로서 SSR의 정보를 나타내는 지표인 PIC 값과 allele 수에 있어서 genomic SSR이 intragenic SSR 보다 2배나 높음을 확인할 수 있었다. 이는 벼에서 나온 결과와 일치하는 것으로 (Cho et al., 2000) genomic SSR이 분자표지 개발에 유용함을 나타내는 결과이다.

지금까지 고추에서 RFLP, AFLP, RAPD (Prince et al. 1995; Paran et al. 1998; Rodriguez et al. 1999)를 이용해서 유전자원 평가한 보고는 있으나 SSR을 이용한 보고는 전무하다. 따라서 이러한 분자표지간의 유용성 정도를 정확히 비교하기는 어려우나 다른 작물의 결과와 높은 PIC 값으로 미루어 볼 때 SSR 표지가 다른 분자표지보다 DNA 다형성 측면에서 유용하리라 사려된다.

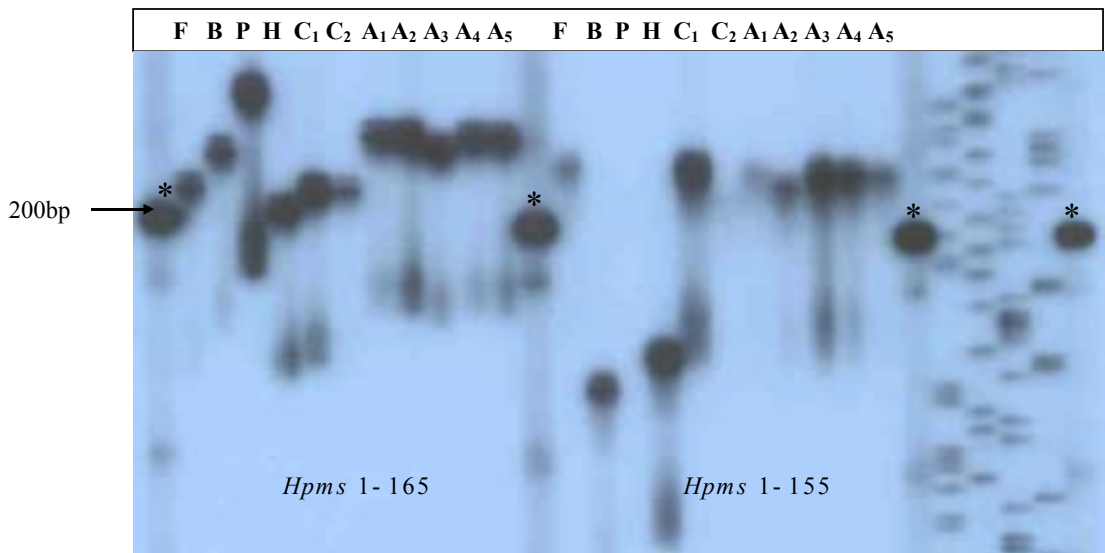


Figure 6-5. Microsatellite locus showing alleles amplified from 11 *Capsicum* germplasm DNAs isolated from different pepper accession were amplified by PCR using the primer pairs *Hpms1-165* and *Hpms1-155*. PCR products were separated on 6% polyacrylamide gel. 100 bp ladder and M13 sequence as size standard were used.

**F.** *C. frutescense*, **B.** *C. baccatum*, **P.** *C. pubescense*, **H.** *C. chacoense*,

**C1.** *C. chinense* cv. PI159236, **C2.** *C. chinense* cv. Habanero

**A1.** *C. annuum* cv. TF68, **A2.** *C. annuum* cv. AC2258, **A3.** *C. annuum* cv. CM334 **A4.**

*C. annuum* cv. Chilsungcho, **A5.** *C. annuum* cv. ECW, \* : 200 bp

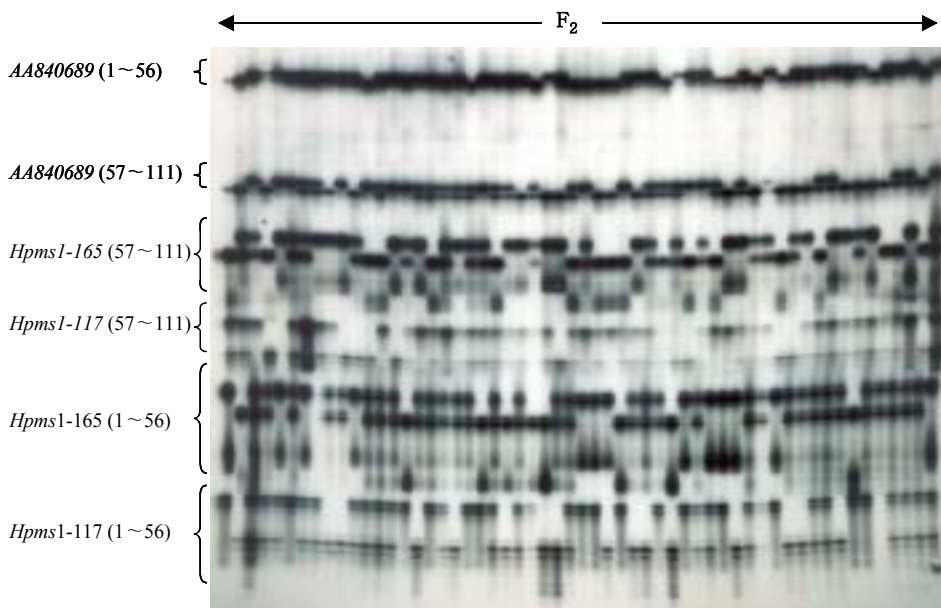


Figure 6-6. Multiple loading of 6% acrylamide gel showing 3 different microsatellite markers segregating in 107 F<sub>2</sub> plants. Three different PCR products for individual F<sub>2</sub> plant were loaded sequentially in one gel lane at 10 to 30 min intervals. *Hpms1-117*, *Hpms1-165*, and AA840689 indicated primer pairs and microsatellite loci. Number in the parenthesis identifies individual F<sub>2</sub> plant used for PCR analysis.

Table 6-3. Description of Hot pepper microsatellite markers

LOCUS	REPEAT	Primer	Size(bp)	Condition <sup>a</sup>	# of alleles	PIC	LG <sup>b</sup>
<i>Hpms1-1</i> <sup>c</sup>	(CA)12(TA)4	L <sup>d</sup> : tcaaccaatattaaggctactcc R <sup>e</sup> : ccaggcgggattgtagatg	283	50, 30	10	0.89	1
<i>Hpms1-3</i>	(AT)10(GT)12	L: tgggaaataggatgcgctaaacc R: aactttaa gactcaaa atccataacc	223	55, 30	6	0.66	9
<i>Hpms1-5</i>	(AT)11(GT)17	L: ccaaacgaaccgatgaacactc R: gacaatgttgaaaaagggtgaagac	311	55, 30	8	0.80	6
<i>Hpms1-6</i>	(AT) <sub>2</sub> (GT) <sub>4</sub> (AT) <sub>8</sub> (GT) <sub>13</sub>	L: tccataacttcacccatgagtatga R: gcaacaccacattcccttctc	197	55, 30	11	0.91	
<i>Hpms1-41</i>	(AT)6(GT)32IMP <sup>f</sup>	L: gggatcatccgttgaaagtagg R: caagagtatcacaacatgagagg	192	55, 30	3	0.66	1
<i>Hpms1-43</i>	(GT)9T(TG)7	L: aaccagcaatcccatgaaaacc R: gggctttggggagaatagtgtg	154	55, 30	3	0.36	1
<i>Hpms1-62</i>	(TG)23(AG)9	L: catgaggctctgcatgattcac R: ggagaaggaccatgtactgcagag	186	55, 30	7	0.81	1
<i>Hpms1-69</i>	(AC)9(AT)4	L: cggggcatgtagtgtctggag R: aagacatgaaatccacaagtttc	217	50, 35	5	0.64	4
<i>Hpms1-106</i>	(AAAAAT)4	L: tcaaactacaagcctgctaacc R: tttgcattatgagtcccacagc	159	55, 35	4	0.55	
<i>Hpms1-111</i>	(AAT)11	L: aagcttatcccttcaatataa R: atatctcacgtattgccgattctt	159	50, 35	11	0.91	
<i>Hpms1-117</i>	(AT)9(GT)14	L: acccaaatgacctgtgtgat R: aatccataacctatccataaa	189	50, 35	4	0.77	9
<i>Hpms1-139</i>	(CT)2(AG)15	L: ccaacagtaggaccgaaaatcc R: atgaaggctactgctgcgatcc	299	55, 30	6	0.76	1
<i>Hpms1-143</i>	(AG)12	L: aatgctgagctggcaaggaaag R: tgaaggcagtaggtggggagtg	221	55, 30	7	0.88	
<i>Hpms1-145</i>	(CT)21(AT)13	L: agcttgtctcataatctgaaaaactc R: tgaaaagacgattttgtctaattcg	150	50, 35	9	0.86	
<i>Hpms1-148</i>	(GA)14	L: ggcggagaagaactagacgattagc R: ccaccaatccacatagacg	197	55, 30	7	0.83	1
<i>Hpms1-155</i>	(TA)3CA(GA)21	L: acgaggccaagctgttatgtc R: ttgtcccgactctccattgacc	207	55, 30	6	0.66	1
<i>Hpms1-165</i>	(GA)13	L: ggctattccgacaaacctcag R: ccattgggttttctactgttg	213	55, 35	7	0.75	4
<i>Hpms1-166</i>	(GA)13AA(AT)2	L: ctcttcggaaatgcatgatgg R: cagcacttgattccagaactcg	132	55, 30	5	0.74	
<i>Hpms1-168</i>	(TA)17(GA)12	L: gccccgatcaatgaattcaac R: tgattttgggtggagagaaaaacc	208	55, 30	9	0.86	16
<i>Hpms1-172</i>	(GA)15	L: gggtttgcatgatctaagcatttt R: cgctggaatgcatgtcaaaga	344	55, 30	9	0.88	11
<i>Hpms1-173</i>	(GA)16(TG)2	L: tgctgggaaagatctcaaaagg R: atcaaggaagcaaaccaatgc	163	50, 35	6	0.86	3
<i>Hpms1-214</i>	(GTTT)2(TTG)9	L: tgcgagtaccgagtctttctag R: ggcagtcctgggacaactcg	100	50, 35	6	0.78	1
<i>Hpms1-216</i>	(TTG)7(TTG)8	L: tgctgtgtttttaccctcagc R: agtgaagggtgggcaacagc	108	55, 30	5	0.76	7
<i>Hpms1-227</i>	(TTG)7	L: cgtggctcaagatggactgc R: gggcggaacttttctatcc	237	55, 30	3	0.58	7
<i>Hpms1-230</i>	(AG)2(TTG)7(ATG)2	L: gaatgtgaatcgcccgatgc R: catccggcatcaaatgttagtagc	214	50, 35	n.d. <sup>g</sup>	n.d.	
<i>Hpms 1-274</i>	(GTT)7	L: tcccagaccctcgtgatag R: tctgctcctccacaactg	174	55, 30	7	0.83	7

Table 6-3. (continued)

<i>Hpms</i> 1-281 (TTG)6	L: t <sub>g</sub> aggcagtggtatggtctgc R: cccgagttcgtctgccaatag	132	55, 30	6	0.7	1
<i>Hpms</i> 2-2 <sup>h</sup> (GT)9	L: gcaaggatgcttagtgggtgtc R: tcccaaaattaccttgacgac	146	55, 35	7	0.83	11
<i>Hpms</i> 2-9 (GT)7	L: cccgtatgtgattctaggatgg R: cgtagcaggtactgaggataagg	189	50, 35	3	0.31	
<i>Hpms</i> 2-13 (AC)12(AT)4	L: tcacctataagggttatcaatc R: tcctaaccttacgaaacctgg	259	50, 35	8	0.84	1
<i>Hpms</i> 2-18 (TTG)11	L: cctccccagacctactttatgc R: tcaaccaacaagtgcgaagtcagc	162	55, 35	n.d.	n.d.	
<i>Hpms</i> 2-21 (AT) <sub>11</sub> (AC) <sub>9</sub> (ATAC)10	L: ttttcaattgatgcatgaccgata R: catgtcattttgctattgatttg	295	50, 35	7	0.83	10
<i>Hpms</i> 2-23 (TTG)7(GT)9	L: ccctcggctcaggataaaatcc R: ccccagactcccactttgtg	126	50, 35	6	0.75	5
<i>Hpm</i> 2-24 (CT)17(CA)5A21	L: tcgtattggcttgtgattaccg R: ttgaatcgaatacccgaggag	205	55, 35	6	0.79	9
<i>Hpms</i> 2-26 (TTG)7	L: gggatgtaggaacaaccctaacc R: tgcacttttcttcatccccttc	217	55, 35	5	0.74	1,3,5
<i>Hpms</i> 2-27 (TTG)7	L: atggactgcgtacatcctacc R: tgcctttatgcactagctgagagg	144	55, 35	n.d.	n.d.	
<i>Hpms</i> 2-41 (TTG)7	L: ctcccagacctcactttgtgg R: tctttgcggttatgtcaagtgc	161	55, 35	n.d.	n.d.	
<i>Hpms</i> 2-45 (TTG)9	L: cgaaggtagtttgggcctttg R: tggcccaatatgcttaagagc	148	55, 35	4	0.63	5
<i>Hpms</i> AT2-14 (AAT)16IMP	L: tttagggttccaacttctctcc R: ctaacccccagcaaaaacac	174	50, 35	6	0.79	4
<i>Hpms</i> AT2-20 (AAT)18	L: tgcactgtctgtgttaaaatgacg R: aaaattgcacaaatagtgctgctg	148	55, 35	6	0.75	6
<i>Hpm</i> CaSIG19 (CT) <sub>6</sub> (AT) <sub>8</sub> (GTAT) <sub>5</sub>	L: catgaattcgtcttgaaggctcc R: aagggtgtatcgtacgcagcctta	218	55, 35	7	0.89	7
<i>Hpm</i> shpMADS (AT)17	L: tgccttcaaaacaattgcatgg R: gcgtctaagcaaaacacacattac	210	55, 30	3	0.5	1
CACCEL1 <sup>i</sup> (AT)16IMP	L: ctctaataagcaatgctcacatgc R: gcagtctcccagaacgtgtgcc	243	50, 35	4	0.69	1
AA840689 (GAGGTC) <sub>2</sub> (GAGGGC) <sub>2</sub>	L: gacaacataggcggacctttgg R: tgccttaggtctacgtccttgac	267	55, 35	3	0.58	3
AA840692 T20	L: tggaaagtactggaaccatgc R: ggggtttagtcaggaatctttgc	202	55, 35	3	0.43	3
AA840749 (AAG) <sub>3</sub> (AAT) <sub>2</sub> A(AC) <sub>2</sub>	L: acactctcggtggaagcttgg R: tcctctttcgggattccttagc	181	50, 35	1	0	
CAN132623 (TTTG)2(TTG)10	L: ggatgcggaagatgaagacga R: caacaacagcaacaacaatcaaa	237	60, 35	n.d.	n.d.	
AA840721 A13	L: cacttgatacgtgaacactcc R: agttgcactggtcctgctc	112	55, 30	5	0.64	7
CAN130829 T16	L: gctaattactgctccgitttg R: aatgggggagttgttttg	184	55, 30	8	0.86	
AF242731 T18IMP	L: gggctgacggcattaagaac R: cagacagctagaaagaggaattctg	195	50, 35	5	0.55	16
AF242732 (TTG)6IMP	L: tggtagctggcatggttaag R: cagcactgttacttccccttc	205	50, 35	2	0.17	
AF244121 (TTG) <sub>5</sub> IMP(AT) <sub>6</sub> IMP(GT) <sub>3</sub> IMP	L: tacctcctcccaatccttctg R: ttgaaagtcttccatgacaacc	238	50, 35	9	0.88	1,3
CAN010950 (TA)9	L: gatittggtggcagaagaattgg R: tgcactttcgaagcaaaaacc	254	55, 35	6	0.81	1

Table 6-3. (continued)

AF208834	T7A11	L: tgcaccaaggtccagtaaggttg R: ccaaccaccatggttcatacaag	201	55, 35	5	0.76	6
AF121441	(TAG)4IMP(GTT)3	L: gcagacaatcttggttggttg R: caccttgagggttaaaggaagg	234	55, 35	1	0	
AF130118	(AT)11IMP	L: atggatgcttcacctcaac R: gacacagcagccatatgtatacgc	176	55, 35	3	0.31	
AF208832	(TC)5(TTTC)2	L: ccaagtggaagtgacgatgagg R: gactcggactacgactcgaaaag	178	50, 35	1	0	
AF222989	(GAA)6	L: actgctggcattgagggttag R: gcacatccctcacgacataac	208	55, 35	1	0	
AF242730	(ATT)7	L: aggccatggaaaaagacactgg R: acatgaccatgaccaaccatcc	189	55, 35	2	0.46	
CAN011109	(GT)5IMP(CA)3	L: ggcttcaactcctcaagacg R: tactgcatcggttcctggattg	195	55, 35	3	0.31	
AA840739	(TTTC)4	L: ccctctctctccctcacc R: agtgctacgatggcttaggg	95	50, 35	3	0.31	
AF039662	T26IMP	L: cccctcgtctctcttattt R: ttgcaaatcttttcaattttt	114	50, 35	6	0.79	
AA840677	(GA)9IMP	L: tgccttgaaggtagccaagagg R: caaacatcaattgaggaggataccg	154	55, 35	2	0.40	
AA840763	(GAA)6IMP	L: tgcattgatgaatagcgtgtgg R: cctgtcacaaggaagtcttgatcg	179	55, 35	1	0	
AA840773	(AAG)7IMP	L: gagaagaagccgaggagttc R: gcacctgctcagcaccctg	154	55, 35	1	0	
AA842818	(TA)4(TC)3	L: tcactgcaccacaaccaatg R: ccataagcaaccaacagaattaggg	202	55, 35	3	0.31	
AA842825	(CCA)8	L: ccaccatgaccaccatgagg R: ttcagccctctcatcaacc	202	55, 35	1	0	
AF065616	(AG)5(AAG)4imp	L: tctgtcccctgtgaagattgg R: gctccaccagtctgtacctgg	205	55, 35	1	0	
CM0004 <sup>j</sup>	(CT)6	L: acaacatatctatagtcaaatt R: attgtctctgtcaaaaaca	103	50, 35	1	0	
CM0005	(CCA)8	L: catgaccaccatgaggata R: gatagccacgagcatagtatt	60	50, 35	6	0.79	
CM0006	(AG)5	L: agttaacaacttggtgctgt R: taatatggtaagcacattcca	130	50, 35	1	0	
CM0007	(AG)6	L: tgttctctctctctatcg R: ccggagataagatcttgataa	103	50, 35	4	0.55	1
CM0009	(AT)5	L: tgaggctgaaaaaggtaaag R: ttagtgaactgcagaatcc	112	50, 35	1	0	
CM0010	(AT)6	L: ttggttttgctactgttaat R: aaactgcatatatttgtgact	158	50, 35	4	0.61	1
CM0011	(AC)5(TA)8	L: tctgcttaaaaacacatacat R: cattctaactgaaattgcatg	116	50, 35	5	0.74	1
CM0012	(AAT)11	L: gggatttaataaggacaatg R: tcaaatatcgacattagcatg	200	50, 35	1	0	

<sup>a</sup> PCR annealing temperature and cycle numbers      <sup>b</sup> Linkage group

<sup>c</sup> *Hpms1*: Hot pepper microsatellite from *Hind*III library      <sup>d</sup> Left primer      <sup>e</sup> Right primer

<sup>f</sup> Imperfect repeat      <sup>g</sup> Not determined      <sup>h</sup> *Hpms2*: Hot pepper microsatellite from *Pst* I/*Mbo* I library

<sup>i</sup> GenBank accession number      <sup>j</sup> Reported by Huang et al. (2000)

#### 4. 고추의 분자유전자 지도 작성

76개의 개발된 SSR 표지 중 GenBank SSR 13개, genomic SSR 29개가 지도 작성용 집단인 부·모본인 *C. annuum* cv. TF68과 *C. chinense* cv. Habanero 사이에 polymorphism을 보여 이 primer들을 유전자 지도 작성에 이용하였다. 42개의 polymorphic marker 중 3개를 제외하고 모두 하나의 유전자좌에 위치되었다 (Fig. 6). *Hpms2-26*은 3개의 유전자좌, *Hpms1-1*과 AF244121은 2개의 유전자좌에 위치되었다.

286개의 RFLP와 46개의 SSR loci를 이용 고추 유전자지도를 작성하였다. *CaSIG19*와 *hpMADS*는 SSR과 RFLP 두 가지 marker system을 이용하여 mapping 할 수 있었는데 마커에 따른 차이 없이 같은 유전자좌에 위치되었다. 다섯 개의 dominant marker *Hpms1-1-a*, *Hpms1-1-b*, *Hpms2-13*, *Hpms2-23*, *Hpms2-26-c*를 제외한 모든 SSR이 codominant marker로 mapping 되었다. SSR 표지들은 전반적으로 고추 계통에 고르게 분포되는 경향을 보였다.

#### 5. 고추 EST DB를 통한 SSR 분석

한국생명공학원 최도일 박사 연구팀으로부터 총 4,556,997 bp로 구성된 10,232 EST sequence (<http://plant.pdrc.re.kr/ks200201/pepper.html>)를 분양 받아 Sputnik (<http://abajian.net>) program을 이용하여 1,193개의 SSR을 찾았다. EST-SSR의 평균길이는 17.1 bp였고 EST sequence 3.8 kb마다 하나의 SSR이 존재하였다.

SSR의 분포를 반복 단위의 길이에 따라 구분하였을 때 trinucleotide repeat의 개수가 가장 많고 평균길이는 dinucleotide가 가장 길었다. 1193개의 SSR중에서 trinucleotide repeat가 66% dinucleotide repeat이 18% tetranucleotide pentanucleotide repeat이 각각 8%를 차지한다. trinucleotide repeat이 많은 것은 EST에서 나타나는 일반적인 특징으로 고추에서도 이와 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Table 6-4).

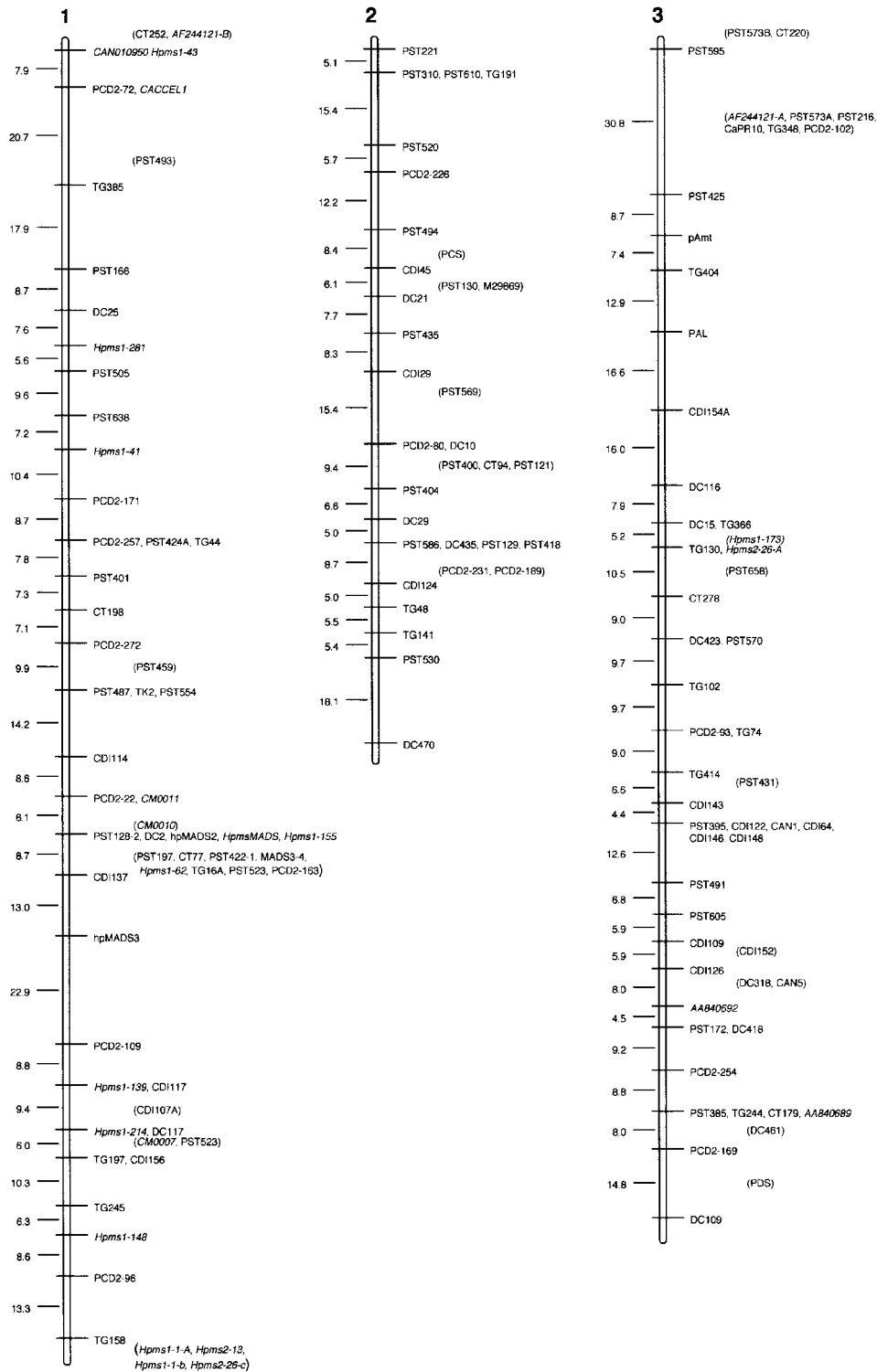


Figure 6-6.

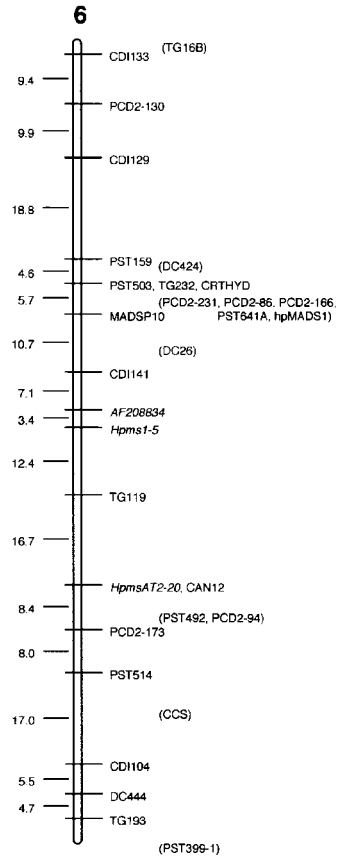
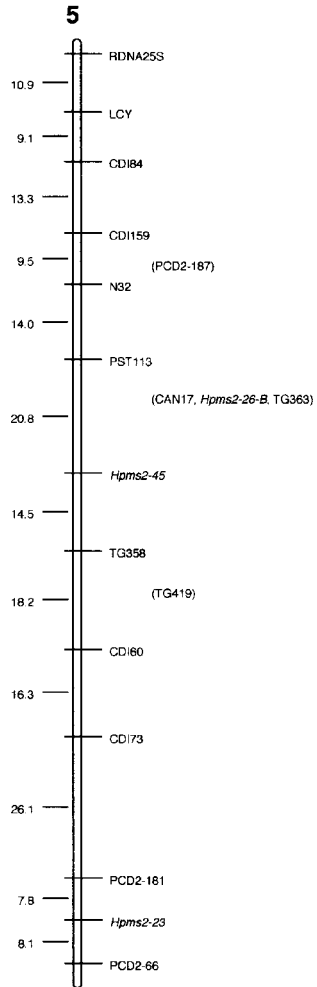
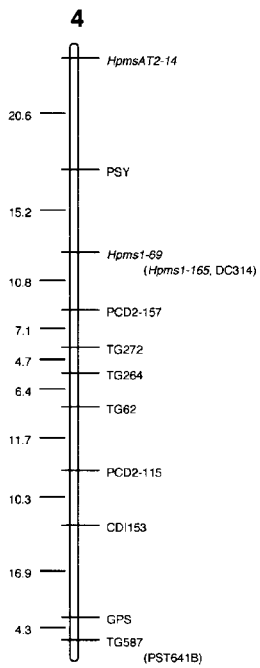


Figure 6-6. (Continued)



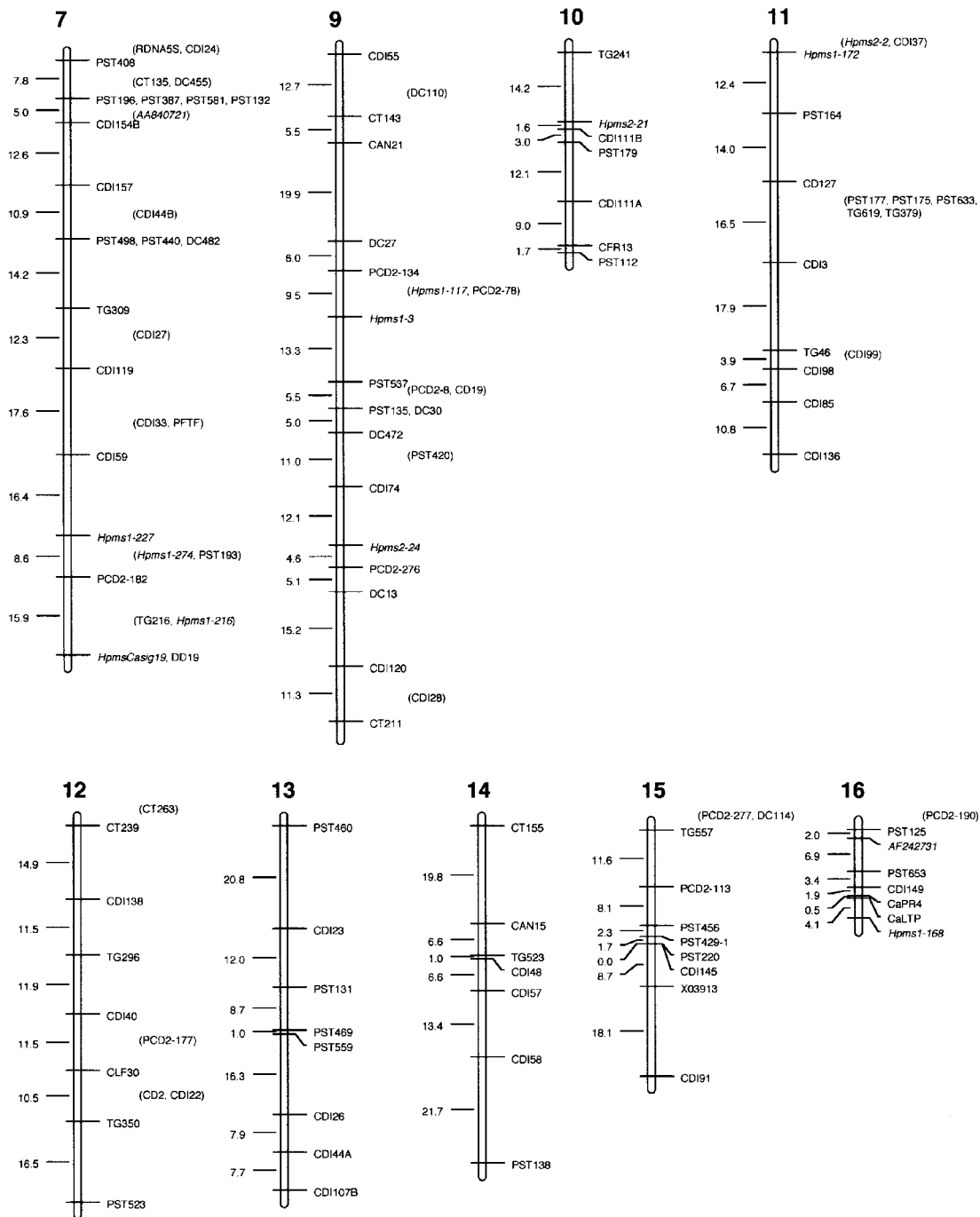


Figure 6-6. (Continued)

Figure 6-6. SNU2 pepper map consisting of 46 SSRs and 287 RFLPs. The linkage groups (1-12) were labeled according to synteny of tomato markers described in Livingstone et al. (1999) and Ben Chaim et al. (2001), and other groups were arbitrarily labeled according to total map distance of each linkage group. On the left of the vertical double lines are map distances in cM calculated by Kosambi function and on the right are DNA markers by identification numbers and names. Markers by tick marks are framework markers ordered at  $LOD > 3$ , and multiple markers at a locus mark were closely linked within 5 cM. Markers in the parenthesis were placed between framework markers at  $LOD < 3$  or located using "try" command. Markers in *italic* type correspond to SSRs (Table 6-3). Marker types and designations are as follows: pepper SSRs (*Hpms*, *CM*, and *GenBank accession number*); pepper genomic RFLP (PST); pepper cDNA RFLP (PCD, DC, and CDI); pepper secondary metabolite biosynthesis genes RFLP (PSY, GPS, PDS, LCY, CCS, TK2, CRTHYD, PFTF, COMT, PAL, Ca4H, PCS, and pAMT); pepper EST RFLP (CAN, CFR and CLF); pepper MADS genes RFLP (hpMADS and MADSP10); pepper defence related genes RFLP (DD19, CaPR, CaLTP and N32); pepper rDNA RFLP (RDNA); tomato genomic RFLP (TG); tomato cDNA RFLP (CT and CD); tobacco cDNA RFLP (X03913 and M29869). Uppercase letters at the end of the marker names indicate that the marker is one of at least two segregating loci detected by a single assay.

Table 6-4. SSR frequency in pepper ESTs

	Number of SSR		Total length		Average Length
	number	%	bp	%	bp
<b>di</b>	<b>216</b>	<b>18.1</b>	<b>5,861</b>	<b>28.7</b>	<b>27.1</b>
<b>tri</b>	<b>793</b>	<b>66.5</b>	<b>11,686</b>	<b>57.2</b>	<b>14.7</b>
<b>tetra</b>	<b>93</b>	<b>7.8</b>	<b>1,485</b>	<b>7.3</b>	<b>16.0</b>
<b>penta</b>	<b>91</b>	<b>7.6</b>	<b>1,413</b>	<b>6.9</b>	<b>15.5</b>
<b>Total</b>	<b>1,193</b>	<b>100.0</b>	<b>20,445</b>	<b>100.0</b>	<b>17.1</b>

각각의 motif에 따른 SSR의 개수와 평균 길이를 보면, dinucleotide의 경우 AG가 가장 많았고 trinucleotide의 경우 AAG와 ACC가 많았다. AAG가 가장 높은 분포를 보였다 (Table 6-3, Fig. 6-7).

Table 6-5. Distribution of SSR in pepper ESTs

<b>Motif</b>	<b>No. of SSR</b>	<b>Average length</b>	<b>% of SSR</b>
<b>AC</b>	<b>28</b>	<b>17.6</b>	<b>2.3</b>
<b>AG</b>	<b>149</b>	<b>30.9</b>	<b>12.5</b>
<b>AT</b>	<b>39</b>	<b>18.7</b>	<b>3.3</b>
<b>AAC</b>	<b>88</b>	<b>15.0</b>	<b>7.4</b>
<b>AAG</b>	<b>168</b>	<b>15.1</b>	<b>14.1</b>
<b>ACC</b>	<b>113</b>	<b>14.5</b>	<b>9.5</b>
<b>ACG</b>	<b>48</b>	<b>14.1</b>	<b>4.0</b>
<b>ACT</b>	<b>79</b>	<b>13.5</b>	<b>6.6</b>
<b>AGG</b>	<b>70</b>	<b>14.4</b>	<b>5.9</b>
<b>AGT</b>	<b>72</b>	<b>15.1</b>	<b>6.0</b>
<b>CGG</b>	<b>55</b>	<b>14.2</b>	<b>4.6</b>
<b>Tetra</b>	<b>93</b>	<b>16.0</b>	<b>7.8</b>
<b>Penta</b>	<b>91</b>	<b>15.5</b>	<b>7.6</b>
<b>Total</b>	<b>1193</b>	<b>17.1</b>	<b>100</b>

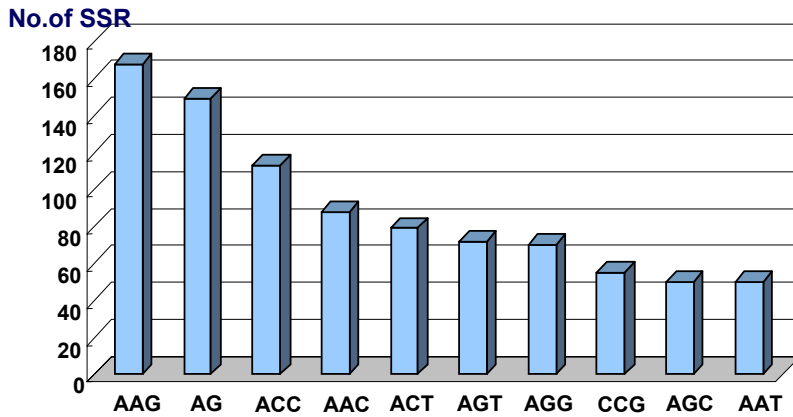


Figure 6-7. Most abundant SSR motif in pepper ESTs

## 6. EST-SSR 표지 개발

이 분석 결과를 바탕으로 총 812 쌍의 primer를 제작하였다. 이중 153개가 본 연구의 mapping 집단의 모본인 *Capsicum annuum* cv.TF68과 *C. chinense* cv.Habanero에서 polymorphism을 보였으며, 150개의 EST-SSR을 유전자 지도에 위치 시켰다 (Table 6-6).

Sequence 데이터베이스를 이용한 SSR 개발의 효율을 높이기 위해서 polymorphism을 보이는 정도와 길이의 연관관계를 보았다. 전반적으로 18bp까지는 길이가 길어질수록 polymorphism rate가 증가하는 경향을 보이는데 그 이후에서는 오히려 감소하였다. 그러나 길이가 길어질수록 sample의 수가 적어지는 것을 감안할 때, 18 bp 이상으로 하는 것이 효율을 높일 수 있으리라 생각된다 (약 2배 이상 차이, Fig. 6-8).

Table 6-6. The list of pepper EST-SSRs

Marker Name	Size (bp)	Repeat	LG	Marker Name	Size (bp)	Repeat	LG
<i>HpmsE001</i>	207	(ATT)5	2	<i>HpmsE039</i>	252	(TGG)5	1
<i>HpmsE002</i>	177	(CT)19	U	<i>HpmsE040</i>	245	(CCT)4	U
<i>HpmsE003</i>	164	(TTC)6	2	<i>HpmsE041</i>	257	(AT)7	7
<i>HpmsE004</i>	137	(CAT)13	1	<i>HpmsE042</i>	232	(TTTA)5	9
<i>HpmsE005</i>	204	(CACCAT)3	3	<i>HpmsE043</i>	241	(ACC)6	7
<i>HpmsE006</i>	243	(T)22imp	4	<i>HpmsE044</i>	246	(AG)7	2
<i>HpmsE007</i>	134	(AT)12	9	<i>HpmsE045</i>	240	(AAATT)3	2
<i>HpmsE008</i>	230	T14(AGT)5(GTT)3	3	<i>HpmsE046</i>	277	(TC )8	11
<i>HpmsE009</i>	214	(A)23	2	<i>HpmsE047</i>	260	(GAA)5	2
<i>HpmsE010</i>	198	(C)12	3	<i>HpmsE048</i>	245	(GAAA)3	1
<i>HpmsE011</i>	151	(GAA)5	6	<i>HpmsE049</i>	247	(AGC)13	4
<i>HpmsE012</i>	208	(ATT)10imp	11	<i>HpmsE050</i>	247	(TC )9	3
<i>HpmsE013</i>	256	(T)20	10	<i>HpmsE051</i>	262	(AT)12	9
<i>HpmsE014</i>	106	(CGT)7	6	<i>HpmsE052</i>	221	(AT)17	7
<i>HpmsE015</i>	146	(GCA)8	13	<i>HpmsE053</i>	197	(GAA)6	3
<i>HpmsE016</i>	187	(TACA)3	3	<i>HpmsE054</i>	219	(CT)6	12
<i>HpmsE017</i>	199	(GCA)6	3	<i>HpmsE055</i>	275	(AAC)6	4
<i>HpmsE018</i>	267	(CAA)5~A16	U	<i>HpmsE056</i>	214	(GAA)5	1
<i>HpmsE019</i>	232	(AT)9	1	<i>HpmsE057</i>	211	(TTTA)4	7
<i>HpmsE020</i>	200	(TTC)4	7	<i>HpmsE058</i>	202	(CT)6	U
<i>HpmsE021</i>	250	(AAAT)4	1	<i>HpmsE059</i>	235	(ACT)4(AGG)5	10
<i>HpmsE022</i>	206	(AGC)4	1	<i>HpmsE060</i>	206	(CT)7	3
<i>HpmsE023</i>	206	(AAT)8	11	<i>HpmsE061</i>	249	(AAG)6	11
<i>HpmsE024</i>	212	(AAC)4	12	<i>HpmsE062</i>	191	(CCG)4	1
<i>HpmsE025</i>	213	(TG)9	9	<i>HpmsE063</i>	209	(AAC)7	1
<i>HpmsE026</i>	222	(AGG)5	1	<i>HpmsE064</i>	221	(AAT)4	12
<i>HpmsE027</i>	230	(AAAC)5	1	<i>HpmsE065</i>	199	(TACA)3	10
<i>HpmsE028</i>	231	(AAC)4	U	<i>HpmsE066</i>	241	(AATT)4	2
<i>HpmsE029</i>	202	(TCG)4	1	<i>HpmsE067</i>	212	(ATC)5	14
<i>HpmsE030</i>	227	(GATT)5	3	<i>HpmsE068</i>	232	(GTA)5	7
<i>HpmsE031</i>	167	(TC )6	10	<i>HpmsE069</i>	216	(CCA)4(ACC)10	2
<i>HpmsE032</i>	231	(TG)6	12	<i>HpmsE070</i>	215	(ATT)6	11
<i>HpmsE033</i>	249	(AAATT)3	1	<i>HpmsE071</i>	188	(ACC)5	4
<i>HpmsE034</i>	202	(ATC)6	1	<i>HpmsE072</i>	199	(AAC)7	6
<i>HpmsE035</i>	226	(AAG)7	1	<i>HpmsE073</i>	220	(TTC)5	3
<i>HpmsE036</i>	261	(CA)7	1	<i>HpmsE074</i>	230	(CAA)4	12
<i>HpmsE037</i>	232	(AAT)8	3	<i>HpmsE075</i>	205	(ACC)6	12
<i>HpmsE038</i>	283	(ATGTA)3	7	<i>HpmsE076</i>	239	(AAC)4	6

Table 6-6. (continued)

Marker Name	Size (bp)	Repeat	LG	Marker Name	Size (bp)	Repeat	LG
<i>HpmsE077</i>	235	(AAC)9	1	<i>HpmsE114</i>	190	(AAG)6	7
<i>HpmsE078</i>	203	(GAG)6	6	<i>HpmsE115</i>	216	(ATTA)5	1
<i>HpmsE079</i>	197	(AG)8	7	<i>HpmsE116</i>	189	(CTT)12	5
<i>HpmsE080</i>	254	(CCT)5	16	<i>HpmsE117</i>	198	(CA)6	9
<i>HpmsE081</i>	185	(CA)8	4	<i>HpmsE118</i>	193	(CCA)7	2
<i>HpmsE082</i>	232	(ATC)5	9	<i>HpmsE119</i>	241	(CT)11	3
<i>HpmsE083</i>	209	(CT)6	1	<i>HpmsE120</i>	209	(CCA)6	6
<i>HpmsE084</i>	220	(AAAAC)3	9	<i>HpmsE121</i>	198	(TTC)7	1
<i>HpmsE085</i>	204	(ACC)4	4	<i>HpmsE122</i>	231	(ACG)4	3
<i>HpmsE086</i>	221	(TAG)6	15	<i>HpmsE123</i>	180	(TTTC)6	2
<i>HpmsE087</i>	247	(AT)10	14	<i>HpmsE124</i>	227	(CAA)10	11
<i>HpmsE088</i>	199	(GAG)6	6	<i>HpmsE125</i>	204	(GA)6	11
<i>HpmsE089</i>	240	(CTT)5	2	<i>HpmsE126</i>	192	(ATC)4	3
<i>HpmsE090</i>	184	(AAAG)4	2	<i>HpmsE127</i>	277	(GAG)4	3
<i>HpmsE091</i>	194	(CCT)5	U <sup>a</sup>	<i>HpmsE128</i>	226	(ATC)5	12
<i>HpmsE092</i>	180	(AT)10	11	<i>HpmsE129</i>	233	(CAA)4	5
<i>HpmsE093</i>	207	(CTT)4	14	<i>HpmsE130</i>	221	(AT)11	U
<i>HpmsE094</i>	241	(TGG)5	12	<i>HpmsE131</i>	246	(TCA)9	1
<i>HpmsE095</i>	184	(TAGG)4	7	<i>HpmsE132</i>	197	(AAAAC)3	11
<i>HpmsE096</i>	237	(TTC)4	U	<i>HpmsE133</i>	205	(ATG)4	U
<i>HpmsE097</i>	250	(CAA)5	U	<i>HpmsE134</i>	235	(ATTT)3	2
<i>HpmsE098</i>	198	(ATC)4	9	<i>HpmsE135</i>	209	(CTG)4	2
<i>HpmsE099</i>	163	(TTC)5	4	<i>HpmsE136</i>	294	(TTG)4	11
<i>HpmsE100</i>	220	(GCA)5	1	<i>HpmsE137</i>	189	(GGT)4	1
<i>HpmsE101</i>	167	(TAC)4	3	<i>HpmsE138</i>	250	(GAC)4~(TGA)4	7
<i>HpmsE102</i>	163	(TTG)4	9	<i>HpmsE139</i>	160	(GAC)10	14
<i>HpmsE103</i>	177	(AC)7	7	<i>HpmsE140</i>	225	(CTT)4	4
<i>HpmsE104</i>	212	(GGC)4	1	<i>HpmsE141</i>	206	(ATC)6	2
<i>HpmsE105</i>	238	(AAC)5	12	<i>HpmsE142</i>	214	(CCG)6	2
<i>HpmsE106</i>	168	(AAT)9	3	<i>HpmsE143</i>	107	(AAAAT)3	9
<i>HpmsE107</i>	184	(GCA)6	2	<i>HpmsE144</i>	236	(GAA)4~(CTT)4~(ATG)4	2
<i>HpmsE108</i>	182	(TC)16	12	<i>HpmsE145</i>	222	(TTA)4	1
<i>HpmsE109</i>	226	(AAC)4	2	<i>HpmsE146</i>	227	(AAG)4~(AAT)4	4
<i>HpmsE110</i>	191	(CTT)4	U	<i>HpmsE147</i>	178	(GA)6	U
<i>HpmsE111</i>	219	(CT)7	4	<i>HpmsE148</i>	205	(CT)6	2
<i>HpmsE112</i>	206	(GTA)6	1	<i>HpmsE149</i>	198	(TC)15(AC)18	11
<i>HpmsE113</i>	225	(GCA)4	6	<i>HpmsE150</i>	219	(CTT)7	9

<sup>a</sup>: Unlinked marker

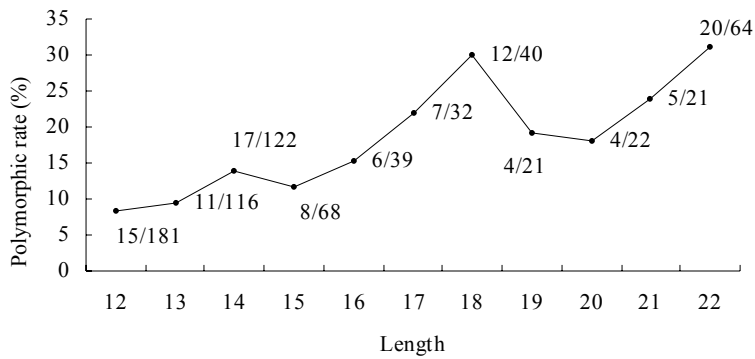


Figure 6-8. Relation between polymorphic rate and microsatellite length

SSR motif에 따른 polymorphism 정도를 분석한 결과 dinucleotide의 경우 AT repeat이 가장 높은 정도를 보였고 trinucleotide의 경우 AAT, ATC, AGC가 polymorphic SSR의 비율이 가장 높았다. 또한 두개 이상의 SSR이 존재하는 complex의 경우 polymorphic SSR의 비율이 높았다 (Table 6-7).

Table 6-7. PCR amplification and polymorphism efficiency of EST-SSRs depending on SSR motif

Motif	No. Found SSRs	No. primer pairs ordered	No. successfully Amplified	Rate of successful amplification	Percent of polymorphic SSRs	No. mapped marker
AG	149	46	23	50%	23.9	11
<b>AT</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>84.2%</b>	<b>42.1</b>	<b>8</b>
AAC	88	58	42	72.4%	19.0	11
AAG	168	114	68	59.6%	14.0	16
<b>AAT</b>	<b>50</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>51.6%</b>	<b>22.6</b>	<b>7</b>
ACC	113	56	38	67.9%	12.5	7
<b>AGC</b>	<b>50</b>	<b>32</b>	<b>23</b>	<b>71.9%</b>	<b>21.9</b>	<b>7</b>
AGG	70	44	27	61.4%	11.4	5
<b>ATC</b>	<b>52</b>	<b>50</b>	<b>38</b>	<b>76%</b>	<b>22</b>	<b>11</b>
Tetra	93	65	33	50.8%	16.9	11
Penta	91	60	45	75%	6.7	4
<b>Complex</b>	<b>122</b>	<b>78</b>	<b>50</b>	<b>64.1%</b>	<b>23.1</b>	<b>18</b>
Total	1295	812	513	63.2%	15.6	127

## 제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. DNA 기법을 이용한 고추의 유사품종 식별연구

고추에 적용 가능한 19개 AFLP primer를 선발하고 이를 활용 66품종을 대상으로 품종 식별에 성공적으로 이용할 수 있었다. 또 고추에서 개발된 316 개의 SSR 마커를 대상으로 검정한 결과 품종식별에 적용 가능한 총 27 개의 마커를 선발하였다. 선발된 AFLP와 SSR 마커를 이용 고추 66 품종에 대하여 유연관계분석을 실시하였으며, 각 마커를 기준한 품종간 유전적 유사도 및 유사품종집단을 확인할 수 있었다. 두 마커에 의하여 분석된 품종간 유전적 유사도의 상관도는 0.82로 비교적 높게 나타나, 두 종류의 마커 모두 고추 품종에 대한 유전적 특성을 일정부분 반영하고 있으며, 따라서 다수의 품종분류에도 활용할 수 있는 것으로 생각되었다. 또, SSR 마커중 PIC 값이 높은 primer *HpmsF15*, *HpmsF37*, *HpmsF53* 은 ‘칠성초/AC2258’, ‘칠성초/KC350-2’ 조합의 양친 사이에 다형성 밴드를 나타내었고, 이들 조합 F<sub>1</sub>은 heterozygous한 형태의 밴드를 보여 이들 primer는 F<sub>1</sub>의 순도 검정에 활용 가능성이 있는 것으로 분석되었다. 이들 조합 F<sub>2</sub> 집단의 마커의 분리비는 멘델의 이론적 분리비에 적합한 것으로 나타났다.

고추의 형태적 특성은 건고추형, 파리고추형, 피만형과 같이 품종생태형의 따라 여러 가지 형질에서 뚜렷한 차이가 있었으나, 동일 품종 형태 내에서는 몇몇 형질을 제외하고는 대부분의 조사형질에서 큰 차이를 보이지 않았다. AFLP 유사도에 따른 형태적 특성조사 결과 지수가 96% 이상인 조합에서는 조사형질에서 구별성을 보이지 않았으며, 이는 고추 육종 전문가들의 공동특성 조사와도 일치된 결과를 보여 주었다.

본 연구과제에서 DNA 마커를 활용하여 설정된 고추의 품종간 최소거리는 다양한 품종의 prescreening을 통하여 출원품종과 가장 가까운 대조품종의 선발에 활용될 수 있을 것이다. DNA 마커는 환경의 영향을 받지 않고 조사자의 주관이나 환경변이에 의한 오차를 줄일 수 있어 구별성 검정의 보완 수단으로도 이용될 수 있을 것이다. 본 연구과제에서 개발된 DNA 마커는육종소재나 유통품종 등 유전자원의 특성파악을 위한 기술적 수단으로 품종의 genotyping에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 유사품종의 분쟁 발생시 이를 해결하여 육종가 권리보호를 위한 효과적인 하나의 수단으로 활용할 수 있을 것이다. 본 연구과제에서 선발



된 F<sub>1</sub> 품종의 순도검정을 위해 선발된 primer는 국내·외 채종시 혼종 가능성을 배제시키는 데 직접 활용할 수 있어 종자산업 발전에 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

## 2. DNA 기법을 이용한 참외의 유사품종 식별연구

본 연구는 참외·멜론 다수의 유통품종을 대상으로 국내 최초로 이루어진 분자마커를 이용한 품종특성 연구로서, 특히 품종간 유전적 거리가 짧은 참외에서 품종간 유전적 연관관계를 밝혀 품종의 유전형 파악, 품종식별 및 품종간 유사도 판정에 유용한 기술적 수단이 되리라 생각한다. 우리나라 유통품종의 대부분을 차지하고 있는 금싸라기 계통 참외는 단일 계통으로 품종간 유사도가 매우 높은 것으로 그간 알려져 왔다. 이는 금싸라기은천 참외 출현 이후 유통품종의 대부분이 단성화 계통으로 일신되고, 품종육성이 제한되면서 오랜 기간 동안 지속되어 온 결과이다. 그러나 그 후 20 여 년 동안 우리나라 참외 유통품종의 계통 및 유사도에 관해서는 과학적인 고찰이 되지 못하였던 것이 사실이다. 그러나 이제 바야흐로 국제적 기준의 품종보호 시대에 품종은 구별성과 균일성, 안정성 [DUS] 측면에서 명확히 정의되어야 하며, 보호받고자 하는 신품종은 그 기준을 제시할 수 있어야 한다. 따라서 본 연구는 달라진 품종보호 환경 하에서 품종식별 분자마커를 이용 참외 품종의 유전적 특성과 품종간 유사도를 명확히 하여 현재 우리나라 참외 유통품종 집단이 갖는 분자유전학적 좌표와 차후 신품종 개발과 구별성 확보에 있어 기준을 제시함으로써, 궁극적으로 고품질 신품종의 육성을 촉진하고 품종보호제도 확립과 육종가 권리보호를 위한 효과적인 기술적 수단이 될 수 있을 것이다.

또 최근에 개발된 품종 중 일부는 금싸라기은천 계통과는 일정한 유전적 거리를 두고 있어, 새로운 계통을 개발하고자 하는 시도들이 있음을 파악할 수 있었던 것도 성과였다. 나아가, 참외·멜론 중간형 교잡종들의 유전적 특성을 밝혀 이들의 계통과 다른 변종 집단들과의 연관관계를 보다 명확히 하였고, 다수의 멜론 품종과 일부 재래종 참외를 함께 공시하여 이들의 유전적 유사도 및 참외품종과의 유전적 상관관계 설정을 통해 차후 유전자원으로서 참외 품종의 개량에 기여할 수 있는 가능성 등을 살펴보았다. 이와 같은 목적을 달성하기 위해 외국에서 개발된 멜론 유래 분자마커의 참외 품종에 대한 활용성을 검토·개발하였고, 또 일부 우리나라 고정종 참외 유래의 고유의 SSR primer를 국내 최초로 개발함으로써 차후 여러 목적으로 활용될 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구는 유사도가 매우 높은 다수의

품종을 대상으로 분자마커의 개발과 활용에 이르기까지 일괄 수행함으로써 관련분야 연구에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

### 3. 고추 SSR 마커 개발

본 협동과제의 최종목표는 고추에서 200개의 SSR 표지를 개발하여 육종가 권리보호를 위한 분자표지 이용 및 유전자지도 작성에 있다. 본 연구로 얻어진 표지는 200개 이상으로 그 목표를 100%로 완수하였고 이 표지는 세부과제 연구에 이용되었으며 세계 최초로 고추 SSR 유전자지도를 작성하였다.

먼저 개발된 76개의 SSR 표지에 대해서는 국제적으로 잘 알려진 식물육종학회지인 Theoretical and Applied Genetics에 출판하였고 EST-SSR에 대해서도 같은 출판지에 투고할 예정이다. 고추 분자유전육종 분야에 있어서 본 연구 집단이 리더그룹에 위치함을 알리는 좋은 기회이며 전 세계 고추 분자유전육종 연구자들에게 있어 귀중한 연구재료가 될 것이다.

## 제 8 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구 결과는 육종가 및 연구자들에게 DNA 마커에 의한 검정 결과를 제시함으로써 다수의 고추·참외 유통품종이 갖는 유전적 특성 및 유사도에 관한 분자유전학적 이해를 제고하며, 나아가 표현형 특성과 유전자형 특성에 관한 통시적 안목을 갖출 수 있는 계기로 활용코자 한다.

UPOV/BMT의 논의 동향에 맞추어 본 과제에서 수행한 고추·참외에 대한 분자유전학적 연구를 분자생물학 기술을 이용한 품종보호시스템 개발의 국가모델로 삼아 지속적인 연구를 수행하고자 하며, 본 과제의 결과에 대하여 여러 회원국과 관련 정보 교환 및 기술 공유의 기회로 적극 활용하고자 한다.

본 과제에서 개발된 AFLP, SSR 마커는 일반 마커와 달리 유전적 거리가 짧은 유통품종 간에 다형성을 나타내는 고효율 마커로서 차별성이 있으며, 차후 마커 정보공개, 학술지 발표 등 후속 연구를 지속하여 유전자 지도 작성 등 분자유전학 기초연구와 함께, 품종간 변이 측정, 내병성 유전자 등 표현형 연관마커 탐색, marker assisted selection 등 육종현장에 대한 활용 방안도 적극 모색하고자 한다.

본 과제에서 설정된 품종간 유전적 최소거리는 품종간 유사도를 판정하는 하나의 지표로서 다수의 유사품종이 범람하는 국내 종자유통 현실에 관한 실태 파악과 유사성에 대한 명확한 기준을 제시하여 그 자료를 공개하는 등 육종가 권리보호에 기여하고자 한다.

본 과제에서 수행한 DNA 마커를 활용한 고추·참외 유통품종의 유전적 유연관계설정 및 다수 품종에 대한 유전자형 특성과 표현형 특성의 상관관계를 다양한 품종의 prescreening에 활용할 경우 출원품종과 가장 가까운 대조품종의 선정을 가능케 하여 품종보호 재배시험의 신뢰성과 정확성 제고에 활용될 수 있을 것이다. 또한, 조사자간, 연차간, 환경에 따른 오차를 최소화 할 수 있는 DNA 마커 특성을 활용하여 품종보호 출원품종에 대한 DUS 검정의 보완적 수단으로 활용방안을 넓히고자 한다.

육종회사에서는 본 과제에서 개발된 마커 및 품종간 최소거리를 활용 보유한 유전자원 및 육종소재의 특성파악, 개발된 신품종의 구별성 유무에 대한 정보획득, 품종보호권 침해 의심 품종에 대한 사전 특성 파악 등에 활용할 수 있음으로써 육종가 권리보호 및 종자산업 발전에 이바지 할 수 있을 것이다..

F<sub>1</sub> 종자 순도검증용 primer 개발은 본 연구의 수행과정 중에 그 활용가능성을 충분히 제시한 바, 결과를 보완하고 참여 기업 등과의 협의를 통하여 산업적 활용가능성을 타진하고자 한다.

본 연구과제에서 개발된 SSR 마커는 그 유용성을 인정받아 이미 미국 코넬대학교, 원예연구소 등 국내외 여러 연구 그룹들에 분양되었으며, 고추 분자유종 등의 분야에서 연구에 활용되고 있다.

## 제 9 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 고추의 경우 내병성 유전자의 mapping과 유전자 지도 작성을 통한 양적형질 유전자좌 분석 대한 연구가 대부분이나, 프랑스에서는 육종가 권리보호를 목적으로 F<sub>1</sub> 19품종과 순계 36품종의 형태적 특성과 RAPD 및 AFLP 마커의 genotype과의 관계를 분석하여 품종보호에 DNA 마커의 활용 가능성을 제시한 바 있다 (Lefebvre et al. 2001).
2. 유럽을 중심으로 작물 구별성 검정에 대한 DNA 마커의 활용방안에 대한 연구로, 영국에서는 유채 출원품종의 구별성 분석에 SSR 마커를 활용할 경우 기존 및 출원품종의 생태형에 따른 분류가 가능하여 품종간 grouping이나 대조품종의 선정에 이용할 수 있을 것이라고 하였으며 (Tommasini et al, 2003), 네델란드에서는 토마토와 밀의 균일성 여부를 판단하는데 SSR 마커의 활용 가능성에 대한 연구결과가 보고되고 있다 (Cooke et al., 2003). 최근에는 인도에서 향미의 품종식별에 이용 가능한 SSR 마커를 선발하였다 (Singh et al., 2004).
3. F<sub>1</sub> 순도 검정의 경우 기존까지는 화분친에 특이적인 밴드를 보이는 RAPD 마커를 선발하여 상업적으로 이용하고 있으나, 양친의 유전자형이 가까우면 이용가능성이 상당히 어렵고 실험의 재현성 등과 같은 문제점이 제기되고 있다. 최근에 개발된 SSR 마커의 경우 마커가 유전정보의 특허 때문에 채소 작물의 순도 검정에 활용한 예는 거의 없으나, 인도에서는 SSR 마커를 벼 F<sub>1</sub> 품종의 순도 검정에 이용함을 보고하였다 (Nandakumari et al., 2004).

### 4. UPOV 논의동향 (UPOV, 2001)

UPOV/BMT(생화학 및 분자생물학기술 실무작업반)에서는 형태적 특성조사 방법의 보완을 위한 작물별 분자마커 활용 지침서를 마련하고 DUS 검정에 부분적으로 도입하기 위한 논의를 진행 중이다. 이에 따라 BMT Review Group은 품종보호 분야의 분자생물학적 기법 활용을 위하여 다음과 같이 의견을 제출하였고, 이는 UPOV 차원에서 회원국에게 공식 제안되어 검토중에 있다:

- Proposal 1 (Option 1: 표현형에 연관된 유전자 특이마커의 활용)은 UPOV Convention에 부합됨
- Proposal 2, 3, 4 (Option 2: 표현형 특성에 의한 품종간 최소거리와 분자마커를 이

용한 genetic distance의 일치성 연구: 유채, 옥수수, 장미)은 기존품종 관리에 이용될 수 있으며, UPOV Convention에 부합됨

- Proposal 5, 6 (Option 3: 분자마커 특성으로 기존 표현형 특성에 의한 DUS 검정을 대체하는 새로운 시스템 적용: 장미, 밀)은 UPOV 차원의 품종보호 개념에 합치여부를 결정하지 못 함.

이에 대한 구체적 실현 가능성을 타진하고, 기법 적용 및 활용방법 모색을 위한 모델 작물로서 UPOV/BMT Crop Subgroups을 옥수수, 유채, 장미, 토마토, 밀, 사탕수수, 감자, 버섯, 콩 등을 대상으로 선정하였다. 현재 각 회원국은 자국의 실정에 따라 주요 작물에 관한 마커 개발 및 적용에 관한 연구를 수행하고 있다.

5. 2004년 6월 7일부터 11까지 개최된 UPOV/TWV 회의에서 유럽 선진국의 경우 품종보호 출원 품종의 구별성 검정에 DNA 마커를 활용하려는 시도가 이루어지고 있음을 보고하였다. 예를 들면 프랑스에서는 아스파라거스, 당근, 스페인에서는 상추, 멜론, 고추의 구별성 검정에 분자 표지 인자의 이용 가능성에 대한 연구가 시도되고 있음을 보고하였다

#### 6. 참외 · 멜론 주요 연구그룹

문헌상으로 *Cucumis melo* L.에 대한 분자유전학적 연구를 활발하게 수행하고 연구집단은 미국에 J. Staub 연구실 (U.S. Dep. of Agriculture, Agricultural Research Service, Vegetable Crop Unit, Dep. of Horticulture, Univ. of Wisconsin)과 유럽 쪽에서는 이스라엘의 N. Katzir 연구실 (Dep. of Vegetable Crops, Agricultural Research Organization, Newe Ya'ar Research Center)을 들 수 있다. Staub 연구실에서는 주로 마커의 개발과 유전자원 평가, 품종식별, 유전적 연관관계 분석 등 품종에 대한 마커의 적용 연구를 진행하고 있다 (Staub et al., 2004; Fazio et al., 2002; Lopez-Sese et al., 2002; Staub et al., 2000). Katzir 연구실에서는 마커 개발과 이를 이용한 멜론 분자유전자 지도를 만들고 있다 (Danin-Poleg et al., 1998; Danin-Poleg et al., 2000; Danin-Poleg et al., 2001).

7. Private sector에서 Syngenta, Seminis 등 세계적인 종묘회사들이 단독으로 대단위 고추 SSR 표지를 개발했으나 그 정보는 공개되지 않고 있다. Public sector에서는 미국, 터키, 일본 등의 몇몇 연구진들이 개발 중에 있다.

## 제 10 장 참고문헌

- 김병수, 김희태, 이호철. (1998) 참외, 성공적인 재배와 유통. 농민신문사
- 곽수년. (198) 몇가지 재래종 참외의 과실특성 및 주요형질간 상관에 관한 연구. 서울대학교 대학원 원예학과 석사학위논문.
- 박소득, 연일권, 신용습, 도한우, 배수곤. (2002) 재래형 참외 특성개량 연구. 경북농업기술원 2001년도시험연구보고서 380-385.
- 이용수, 엄영현, 김두환, 정원일. (2000) 교배육종과 분자육종에 의한 참외류의 발효과외의 감소 및 당도증진에 관한 연구. 농림기술개발과제 최종보고서 (농우바이오). 농림부.
- 한국원예학회. (1993) 원예학 용어집. 향문사.
- 한국원예학회. (2003) 원예학용어 및 작물명집. 도서출판 한림원.
- Anthony F, Combes MC, Astorga C, Bertrand B, Graziosi G, Lashermes P (2002) The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. Theor. Appl. Genet. 104:894-900.
- Bernet GP, Bramardi S, Calvache D, Carbonel IEA and Asins MJ (2003) Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. Plant Breeding 122: 146-152.
- Bell CJ, Ecker JR (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics 19:137-144
- Bulm E, Mazourek M, O'Connell M, Curry J, Thorup T, Liu K, Jahn M, Paran I (2003) Molecular mapping of capsainoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 108:79-86.
- Ben Chaim A, Paran I, Grube RC, Jahn M, van Wijk R, Peleman J (2001) QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). Theor Appl Genet 102:1016-1028
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theor. Appl. Genet 107:736-744.
- Ballester J, de Vicente MC (1998) Determination of F<sub>1</sub> hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. Euphytica 103:223-226.
- Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N, Cartinhour (2000) Diversity of microsatellite derived from genomics libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 100:713-722
- Choi, KJ (2001) What is the International Union for the Protection of New Varieties of Plants? Korean J. Breed. 33(3): 248-253.
- Chiba N, Suwabe K, Nunome T, and Hirai M (2003) Development of Microsatellite

- Markers in Melon (*Cucumis melo* L.) and Their Application to Major Cucurbit Crops. *Breeding Science* 53:21-27
- Choe YW, Park DY, Shin HK, Kwon YS, Yoon HM, Moon JY, Park HY (2002) Studies for similarity evaluation of radish and chinese cabbage cultivars. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20(2):160-167.
- Cooke RJ, Bredemeijer GMM, Ganal MW, Peeters R, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Areshchenkova, Dijcks M, Laborie D, Bertrand, L, Vosman B (2003) Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite. *Euphytica* 132(3):331-341
- Danin-Poleg Y, Reis N, Baudracco-Arnas S, Pitras M, Staub JE, Oliver M, Arus P, deVicente CM, and Katzir N (2000) Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. *Genome* 43:963-974
- Danin-Poleg Y, Reis N, Tzuri G, Katzir N (2001) Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor Ap Genet* 102:61-72
- Danin-Poleg Y, Tzuri G, Reis N, Katzir N (1998) Application of Inter-SSR Markers in Melon (*Cucumis melo* L.) Cucurbit Genetics Cooperative report 21:25-28.
- Fisger PJ, Gardner RC, and Richardson TE, (1996) Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Research* 24(21):4369-4371
- Fazio G, Staub JE, and Chung SM, (2002) Development and Characterization of PCR Markers in Cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(4):545-557
- Hayden MJ, Good G and Sharp PJ (2002) Sequence tagged microsatellite profiling(SMTP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs. *Nucleic Acids research* 30(23):e129
- Hayden MJ and Sharp PJ (2001)a Sequence-tagged microsatellite profiling(SMTP): a rapid technique for developing SSR markers. *Nucleic Acids Research* 29(8):e43
- Hayden MJ and Sharp PJ (2001)b Targeted development of informative microsatellite(SSR) markers. *Nucleic Acids Research* 29(8):e44
- Hu J, Nagatani M, Mizuno K, Fuzimura T (2004) Development and characterization of microsatellite markers in sweetpotato. *Breeding Science* 54:177-188.
- Heckenberger M, Van der Voort JR, Melchinger AE, Peleman J, Bohn M (2003) Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties : II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data. *Molecular Breeding* 12:97-106
- He C, Poysa V, Yu K (2003) Development and characterization of simple sequence repeat(SSR) markers and their use in determining relationships *Lycopersicon esculentum* cultivar. *Theor. Appl. Genet* 106:363-373
- Jones H, Jarman RJ, Austin L, White J, Cooke RJ (2003) The management of variety



- reference collections in distinctness, uniformity and stability testing of wheat. *Euphytica* 132(2):175–184.
- Jang DH, Suh SJ, Baek SB, Kim JG, Nam JH (2001) Efficiency of Morphological Traits and DNA Markers in Classification of Korean Barley Cultivars. *Korean J. Breed* 33(4):300–305
- Kwon SJ, Ahn SA, Hong HC, Hwang HG, Choi HC (2002) SSR diversity in japonica rice cultivars and its association to several traits. *Korean J. Breed.* 34(1):57–63.
- Kwon SJ, Ahn SN, Hong HC Kim YK, Hwang HG Choi HC, and Moon HP (1999) Genetic diversity of Korean japonica rice cultivars. *Korean J. Breed.* 31:268–275.
- Kwon YS, Moon JY, Kwon YS, Park DY, Yoon WM Song IH, Yi SI (2003) AFLP Analysis for Cultivar Discrimination in Radish and Chinese Cabbage. *Korean J. Breed* 35(5):319–328.
- Kang BC, Nahm SH, Huh JH, Yoo HS, Yu JW, Lee MH, Kim BD (2001) An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinese*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 102:531–539
- Law JR, Donini P, Koebner RMD, Reeves JC, and Cooke RJ (1998) DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102:335–342.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg L (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181
- Lefebvre V, Goffinet B, Chauvet JC, Caromel B, Signoret P, Brand R, and Palloix A (2001) Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD, and phenotypic data. *Theor Appl Genet* 102:741–750.
- Lee S, Kim SY, Chung E, Joung YH, Pai HS, Hur CG, Choi D (2004) EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Funct Integr Genomics* in press
- Lee KB, Kim SK, So JD (1995) Effect of irrigation Period on Quality of Oriental Melon. *RDA. J. Agri. Sci.* 37(1):250–254
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, Van Wijk R, Jahn MK (1999) Genome mapping in *Capsicum* and evolution of genome structure in Solanaceae. *Genetics* 152:1183–1202
- Lee JM, Nahm SH, Kim YM and Kim BD (2004)a Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor Appl Genet* 108:619–627.
- López-Sesè AI, Staub J, Katzir N & Gómez-Guillamón ML (2002) Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD

- and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. *Euphytica* 127:41-51
- Lefebvre V, Palloix A, Rives M (1993) Nuclear RFLP between pepper cultivars. *Euphytica* 71:189-199.
- Lee JS, Paek KY, Shin YA, Park SH, Jeong ST, Hwang JH (2004)b Effect of Soil Watermelon at Three Developmental Stages on Growth, Fruit Yield and Physiological Responses of Oriental Melon(*Cucumis melon* L. var. *makuwa* Makino). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 22(1):1-6
- Lee SJ (2000) Isolation and molecular characterization of two SA-inducible genes from hot pepper plants (*Capsicum annuum* L.). PhD thesis. Seoul National University
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized repression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
- McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T, Blair M (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35(1-2):89-99
- Mo SY, Im SH, Go GD, Ann CM, Kim DH, (1998)) RAPD Analysis for Genetic Diversity of Melon Species. *Kor. J. Hort Sci. & Tech.* 16(1):21-24
- Monforte AJ, Garcia-Mas J, and Arus P (2003) Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding* 122:153-157
- Munger HM, and Robinson RW (1991) Nomenclature of *Cucumis melo* L. *CGC* 14:43-45
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175-182
- Moon JY, Yi SI, Park YD, Song IH, Park HY, Kwon YS (2003) Application of Amplified ragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis for DUS in Pepper Cultivars. *Korean J. Breed* 35(5):306-312.
- Nandakumar N, Singh AK, Sharma RK, Mohapatra T, Prabhu KV, Zaman FU (2004) Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136(3):257-264
- Paran I, Aftergoot E, Shifriess C (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99:167-173.
- Pitrat M, Hanelt P and Hammer K (2000) Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon.
- Park DK, Kwon K, Lee JH, Um YC, Kim HT, Choi YH (1998) The Effect of Soil Water Content during at Fruit Ripening Stage on Yield and Quality in Musk melon. *J. Bio. Fac. Env.* 7(4):330-335
- Prince JP, Lackney VK, Angeles C, Blauth JR, Kyle MM (1995) A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivar. *Genome* 36:404-417

- Paran I, Vab der Voort JR, Lefebvre V, Jahn M, Landry L, Van Schriek, Tanyolac B, Caranta C, Chaim AB, Livingstone K, Palloix A, Peleman J (2004) An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp). *Molecular Breeding* 13(3):251-261.
- Rodriguez JM, Berke T, Engle L, Nienhuis J (1999) Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 99:147-156
- Robinson, RW and Decher-Walters DS (1997) Cucurbits. CAB International, Oxon.
- Rolf J (2000) NTSYSpc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Applied Biostatistics Inc. New York.
- Ramsay L, Macaulay M, Cardle L, Morgante M, Ivanissevich S, Maestri E, Powell W, Waugh R (1999) Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *Plant J* 17:415-425
- Rohlf M (1998) NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02i. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus Kortekaas W, Arens P, Vosman B (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* 94:264-272
- Staub JE, Danin-Poleg Y, Fazio G, Horesi T, Reis N & Katzir N, (2000) Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers *Euphytica* 115:225-241
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Silberstein L, Kovalski I, Huang R, Anagnostou K, Jahn MMK, Perl-Treves R (1999) Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 79:101-111
- Shin YS, Lee WS, Do HW, Bae SG, Choi BS (1997) Effect of Root Zone Warming by Hot Water on Rhizosphere Environment and Growth of Greenhouse-Grown Oriental Melon (*Cucumis melo* L.) *J. Bio. Fac. Env.* 6(2):103-109
- Staub JE, Lòpez-Sesè AI & Fanourakis N (2004) Diversity among melon landrace (*Cucumis melo* L.) from Greece and their genetic relationships with other melon germplasm of diverse origins. *Euphytica* xx:1-16
- Staub JE, Serquens FC, Gupta M (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31:729-741.
- Singh RK, Sharma RK, Singh AK, Singh VP, Singh NK, Tiwari SP, Mohapatra T (2004) Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135(2):135-143.
- Schut, JW, Qi, X, and Stam, P (1997) Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl.*

- Genet. 95:1161-1168.
- Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cooke RJ, Donini P, Lee D, Law JR, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards KJ (2003) The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theor Appl Genet. 2003:1091-1101.
- Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cooke RJ, Donini P, Lee D, Law JR, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards KJ (2003) The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theor. Appl. Genet. 106:1091-1101.
- UPOV (1994) Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity, and stability. UPOV. Geneva, Swiss. TG/76/7.
- UPOV (2000) Revised working document for a new general introduction to the assessment of distinctness, uniformity and stability in new varieties of plants. UPOV TC/36/9. 53p
- UPOV (2001) Report of discussions and developments in UPOV regarding possible use of molecular techniques in DUS testing. BMT/7/6.
- UPOV (2004) Technical working party for vegetables. TWV/38/9.
- Wang YH, Thomas CE, Dean RA (1997) A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers Theor Appl Genet 95:791-798
- Whitaker, TW and Davis, GN (1962) *Cucurbits*, botany, cultivation and utilization. Interscience, New York.
- Yoon MS, Baek HJ, Kang JH, Lee SY, Gwag JG, Park NK (2001) Relationships of Species in Subgenus Soja Based on Simple Sequence Repeat (SSR) markers. Korean J. Breed 33(1):15-21
- Yi YK, Kim RH (1996) Occurrence of Bacterial Soft Rot of Melon Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Korean J. Plant Pathol. 12(1):116-120
- Yoo HS, Kang BC, Huh JH, Nahm SH, Kim BS and Kim BD (2001) Identification of AFLP Markers Linked to Bacterial Spot Resistance Gene *Bs3* in Pepper. Korean J. Breed 33(3):167-174
- Yu JW (2001) Isolation and molecular characterization of three MADS genes from hot pepper plant (*Capsicum annuum* L.). PhD thesis. Seoul National University
- Zhuang FZ, Chen F, Staub JE and Qian CT (2004) Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis. Plant Breeding 123:167-17

부 록  
(APPENDIX)

# List of Contents

**Table A-1.** Morphological characteristics of 35 pepper varieties

**Table A-2.** Test guideline for melon (*Cucumis melo* L.)

**Table A-3.** Morphological characteristics for 44 varieties of *C. melo*

Table A-1. Morphological characteristics of 35 pepper varieties

No.	Characteristics	Description	Varieties						
			Hanbando (한반도)	Kanggol (강골)	Gangreok Geumdang (강력금당)	Jogwang (조광)	Onsesang (온세상)	Bugang (부강)	Ilseokijo (일석이조)
1	Seedling : anthocyanin coloration of hypocotyl	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
2	Plant : attitude	erect(3), semi-erect(5), prostrate(7)	6	4	5	4	5	5	5
3	Plant: length of stem	short(3), medium(5), long(7)	6	5	4	4	6	6	5
4	Plant : shortened internode	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
5	Plant : number of internodes between the first flower and shortened internodes	none(1), one to three(2), more than four(3)	-	-	-	-	-	-	-
6	Plant : length of internode	short(3), medium(5), long(7)	6	6	4	4	5	7	5
7.1	Plant : anthocyanin coloration at level of nodes	absent or very weak(1), weak(3), medium(5), strong(7), very strong(9)	5	7	5	5	5	7	5
7.2	Stem: hairness	absent or very weak(1), weak(3), medium(5), strong(7),	5	5	3	3	5	5	3
8	Leaf : length of blade	short(3), medium(5), long(7)	7	6	4	4	5	6	5
9	Leaf : width	narrow(3), medium(5), broad(7)	7	5	4	4	5	5	5
10	Leaf : green color	light(3), medium(5), dark(7)	7	7	5	5	7	7	5
11	Leaf : blistering	weak(3), medium(5), strong(7)	3	5	3	3	5	3	3
12	Flower : attitude of peduncle	erect(1), non-erect(2)	1	2	1	1	1	2	1
13	Flower : color	white(1), light purple(2), purple(3)	1	1	1	1	1	1	1
14	Fruit : color of before maturity	greenish white(1), yellowish(2), green(3), purple(4)	3	3	3	3	3	3	3
15	Fruit : intensity of color before maturity	light(3), medium(5), dark(7)	3	5	5	7	4	3	5
16	Fruit : attitude	erect(3), horizontal(5), drooping(7)	7	7	7	7	7	7	7
17	Fruit : length	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	6	6	6	6	6	6	6
18	Fruit : diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	4	4	6	6	6	6
19	Fruit : ratio length/diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	5	6	6	6	6

(Continued)

No.	Characteristics	Description	Varieties						
			Pocheon-gcheon (포청천)	New viking (뉴바이킹)	Manitta (마니따)	Myung-seong (명성)	Cheong-yang (청양)	Geumtap (금탑)	Dabokgeon (다복건)
1	Seedling : anthocyanin coloration of hypocotyl	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
2	Plant : attitude	erect(3), semi-erect(5), prostrate(7)	5	5	5	5	5	5	6
3	Plant: length of stem	short(3), medium(5), long(7)	5	6	5	5	5	5	6
4	Plant : shortened internode	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
5	Plant : number of internodes between the first flower and shortened internodes	none(1), one to three(2), more than four(3)	-	-	-	-	-	-	-
6	Plant : length of internode	short(3), medium(5), long(7)	6	6	7	5	7	5	5
7.1	Plant : anthocyanin coloration at level of nodes	absent or very weak (1), weak(3), medium(5), strong(7), very strong(9)	5	5	5	7	5	5	7
7.2	Stem: hairness	absent or very weak (1), weak(3), medium(5), strong(7),	3	5	3	5	2	2	3
8	Leaf : length of blade	short(3), medium(5) long(7)	5	6	6	6	5	5	5
9	Leaf : width	narrow(3), medium(5), broad(7)	5	5	6	6	5	5	5
10	Leaf : green color	light(3), medium(5), dark(7)	5	5	7	7	3	5	5
11	Leaf : blistering	weak(3), medium(5) strong(7)	3	5	1	5	1	1	3
12	Flower : attitude of peduncle	erect(1), non-erect(2)	2	2	2	1	2	2	2
13	Flower : color	white(1), light purple(2), purple(3)	1	1	1	1	1	1	1
14	Fruit : color of before maturity	greenish white(1), yellowish(2), green(3), purple(4)	3	3	3	3	3	3	3
15	Fruit : intensity of color before maturity	light(3), medium(5) dark(7)	6	7	5	5	5	3	5
16	Fruit : attitude	erect(3),horizontal(5),drooping(7)	7	7	7	7	7	7	7
17	Fruit : length	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	6	6	8	6	4	6	6
18	Fruit : diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	6	5	3	6	5
19	Fruit : ratio length/diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	7	5	4	6	5



(Continued)

No.	Characteristics	Description	Varieties						
			Buchon (부촌)	Super geumtap (슈퍼금탑)	Pung- chon (풍촌)	Gukbo (국보)	Daem- yung (대명)	Geoseong (계성)	Geum- dang (금당)
1	Seedling : anthocyanin coloration of hypocotyl	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
2	Plant : attitude	erect(3), semi-erect(5), prostrate(7)	6	5	5	6	6	5	4
3	Plant: length of stem	short(3), medium(5), long(7)	6	6	6	6	5	5	4
4	Plant : shortened internode	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
5	Plant : number of internodes between the first flower and shortened internodes	none(1), one to three (2), more than four(3)	-	-	-	-	-	-	-
6	Plant : length of internode	short(3), medium(5), long(7)	6	5	5	5	5	8	4
7.1	Plant : anthocyanin coloration at level of nodes	absent or very weak (1), weak(3), medium (5), strong(7), very strong(9)	5	7	7	5	5	5	5
7.2	Stem: hairness	absent or very weak (1), weak(3), medium (5), strong(7),	5	5	5	3	3	3	3
8	Leaf : length of blade	short(3), medium(5) long(7)	6	6	4	5	6	5	4
9	Leaf : width	narrow(3), medium(5), broad(7)	7	7	5	6	6	5	4
10	Leaf : green color	light(3), medium(5), dark(7)	5	7	5	5	5	5	5
11	Leaf : blistering	weak(3), medium(5) strong(7)	5	3	3	3	3	3	3
12	Flower : attitude of peduncle	erect(1), non-erect(2)	2	2	1	2	2	2	1
13	Flower : color	white(1), light purple (2), purple(3)	1	1	1	1	1	1	1
14	Fruit : color of before maturity	greenish white(1), yellowish(2), green(3), purple(4)	3	3	3	3	3	3	3
15	Fruit : intensity of color before maturity	light(3), medium(5) dark(7)	6	4	5	5	5	4	5
16	Fruit : attitude	erect(3),horizontal(5),dr ooping(7)	7	7	7	7	7	7	7
17	Fruit : length	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	8	7	6	6	6	5	6
18	Fruit : diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	4	4	5	5	7
19	Fruit : ratio length/diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	7	6	5	5	5	5	6

(Continued)

No.	Characteristics	Description	Varieties						
			Singang (신강)	21segi (21세기)	Sintae- yang (신태양)	Wrinkled green (파리꽃)	Seouljang wrinkled green (서울장파리꽃)	Hansaem wrinkled green (한샘파리꽃)	Jinseong wrinkled green (진성파리꽃)
1	Seedling : anthocyanin coloration of hypocotyl	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
2	Plant : attitude	erect(3), semi-erect(5), prostrate(7)	5	5	5	5	6	5	6
3	Plant: length of stem	short(3), medium(5), long(7)	6	6	5	4	4	4	4
4	Plant : shortened internode	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
5	Plant : number of internodes between the first flower and shortened internodes	none(1), one to three (2), more than four(3)	-	-	-	-	-	-	-
6	Plant : length of internode	short(3), medium(5), long(7)	5	6	5	4	4	4	4
7.1	Plant : anthocyanin coloration at level of nodes	absent or very weak (1), weak(3), medium (5), strong(7), very strong(9)	5	7	5	7	7	5	7
7.2	Stem: hairness	absent or very weak (1), weak(3), medium (5), strong(7),	5	5	5	5	5	5	5
8	Leaf : length of blade	short(3), medium(5) long(7)	5	5	5	3	4	3	3
9	Leaf : width	narrow(3), medium(5), broad(7)	5	5	5	3	3	3	3
10	Leaf : green color	light(3), medium(5), dark(7)	3	7	5	3	3	3	3
11	Leaf : blistering	weak(3), medium(5) strong(7)	5	1	3	3	5	5	3
12	Flower : attitude of peduncle	erect(1), non-erect(2)	1	2	1	1	1	1	1
13	Flower : color	white(1), light purple (2), purple(3)	1	1	1	1	1	1	1
14	Fruit : color of before maturity	greenish white(1), yellowish(2), green(3), purple(4)	3	3	3	3	3	3	3
15	Fruit : intensity of color before maturity	light(3), medium(5) dark(7)	7	8	7	4	2	2	3
16	Fruit : attitude	erect(3),horizontal(5),drooping(7)	7	7	7	7	7	7	7
17	Fruit : length	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	6	5	4	4	4	4
18	Fruit : diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	5	3	3	3	3
19	Fruit : ratio length/diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	5	4	4	4	4

(Continued)

No	Characteristics	Description	Varieties						
			Matjolim wrinkled green (맛조림파리꽃)	Damrok wrinkled green (담록파리꽃)	Nongrok wrinkled green (농록파리꽃)	Perpecto (퍼펙토)	Tomapi (토마피)	New ace (뉴에이스)	Global (글로벌)
1	Seedling : anthocyanin coloration of hypocotyl	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
2	Plant : attitude	erect(3), semi-erect(5), prostrate(7)	6	5	7	7	6	7	6
3	Plant: length of stem	short(3), medium(5), long(7)	4	4	5	3	3	3	3
4	Plant : shortened internode	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
5	Plant : number of internodes between the first flower and shortened internodes	none(1), one to three (2), more than four(3)	-	-	-	-	-	-	-
6	Plant : length of internode	short(3), medium(5), long(7)	4	4	4	3	3	3	3
7.1	Plant : anthocyanin coloration at level of nodes	absent or very weak (1), weak(3), medium (5), strong(7), very strong(9)	7	7	7	9	7	5	5
7.2	Stem: hairness	absent or very weak (1), weak(3), medium (5), strong(7),	5	5	5	3	3	2	3
8	Leaf : length of blade	short(3), medium(5) long(7)	3	3	5	7	7	7	7
9	Leaf : width	narrow(3), medium(5), broad(7)	3	3	3	8	7	9	8
10	Leaf : green color	light(3), medium(5), dark(7)	3	3	3	9	5	9	9
11	Leaf : blistering	weak(3), medium(5) strong(7)	3	5	5	1	3	7	7
12	Flower : attitude of peduncle	erect(1), non-erect(2)	1	1	1	1	1	1	1
13	Flower : color	white(1), light purple (2), purple(3)	1	1	1	1	1	1	1
14	Fruit : color of before maturity	greenish white(1), yellowish(2), green(3), purple(4)	3	3	5	3	3	3	3
15	Fruit : intensity of color before maturity	light(3), medium(5), dark(7)	4	4	3	9	3	5	5
16	Fruit : attitude	erect(3),horizontal(5),drooping(7)	7	7	7	7	7	7	7
17	Fruit : length	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	5	5	5	3	1	3	3
18	Fruit : diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	3	3	3	7	9	7	9
19	Fruit : ratio length/diameter	very short(1), short(3), medium(5), long(7), very long(9)	4	4	4	3	2	2	2

(Continued)

No.	Characteristics	Description	Varieties						
			Hanbando (한반도)	Kanggol (강골)	Gangreok Geumdang (강력금당)	Jogwang (조광)	Onse- sang (은세상)	Bugang (부강)	Ilseokijo (일석이조)
20	Fruit : predominant shape of longitudinal section	flattened(1), round(2), heartshaped(3), square(4), rectangular(5), trapezoid(6), triangular(7), long slender(8), narrow triangular(9), wrinkled type(10), hornshaped(11)	8	8	8	8	8	8	8
21	Fruit : predominant shape of cross section	elliptic(1), angular(2) circular(3)	3	3	3	3	3	3	3
22	Fruit : sination of pericarp at basal part	absent or very weak(1), weak(2), medium(3), strong(4), very strong(5)	1	1	1	1	1	1	1
23	Fruit : texture of surface	smooth(1), slightly wrinkled (2), strongly wrinkled(3)	1	1	1	1	1	1	1
24	Fruit : color at maturity	yellow(1), orange(2), red(3), brown(4)	3	3	3	3	3	3	3
25	Fruit : intensity of color at maturity	light(3), medium(5), dark(7)	7	7	7	7	7	7	7
26	Fruit : glossiness	weak(3), medium(5), strong(7)	7	7	7	7	7	7	7
27	Fruit : stalk cavity	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
28	Fruit : depth of stalk cavity	shallow(3), medium(5), deep(7)	-	-	-	-	-	-	-
29	Fruit : shape of apex	acute(1), rounded(2), depressed(3)	1	1	1	1	1	1	1
30	Fruit : depth of interocular grooves	nil or very shallow(1), shallow(3), medium(5), deep(7), very deep(9)	1	1	1	1	1	1	1
31	Fruit : predominant number of locules	only two(1), two and three(2), three and four(3), four and more(4)	2	2	2	2	2	1	1
32	Fruit : thickness of flesh	thin(3), medium(5), thick(7)	5	5	5	5	6	5	5
33	Placenta : size	small(3), medium(5), large(7)	-	5	5	5	5	3	5
34	Stalk : length	short(3), medium(5), long(7)	5	5	5	5	5	5	5
35	Stalk : thickness	thin(3), medium(5), long(7)	5	5	5	4	4	4	4
36	Calyx : aspect	non enveloping(1), enveloping(2)	2	2	2	2	2	2	2
37	Fruit : capsaicin in placenta	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
38	Time of beginning of flowering	early(3), medium(5), late(7)	5	6	4	2	4	5	4
39	Time of ripening	early(3), medium(5), late(7)	4	5	6	3	5	5	4

(Continued)

No.	Characteristics	Description	Varieties						
			Pocheon-gcheon (포청천)	New viking (뉴바이킹)	Manitta (마니따)	Myung-seong (명성)	Cheong-yang (청양)	Geumtap (금탑)	Dabok-geon (다복건)
20	Fruit : predominant shape of longitudinal section	flattened(1), round(2), heartshaped(3), square(4), rectangular(5), trapezoid(6), triangular(7), long slender(8), narrow triangular(9), wrinkled type(10), hornshaped(11)	8	8	8	8	8	8	8
21	Fruit : predominant shape of cross section	elliptic(1), angular(2) circular(3)	3	3	3	3	3	3	3
22	Fruit : sination of pericarp at basal part	absent or very weak(1), weak(2), medium(3), strong(4), very strong(5)	1	1	1	1	1	1	1
23	Fruit : texture of surface	smooth(1), slightly wrinkled (2), strongly wrinkled(3)	1	1	1	1	1	1	1
24	Fruit : color at maturity	yellow(1), orange(2), red(3), brown(4)	3	3	3	3	3	3	3
25	Fruit : intensity of color at maturity	light(3), medium(5), dark(7)	7	7	7	7	7	7	7
26	Fruit : glossiness	weak(3), medium(5), strong(7)	7	7	7	7	7	7	7
27	Fruit : stalk cavity	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
28	Fruit : depth of stalk cavity	shallow(3), medium(5), deep(7)	-	-	-	-	-	-	-
29	Fruit : shape of apex	acute(1), rounded(2), depressed(3)	1	1	1	1	1	1	1
30	Fruit : depth of interocular grooves	nil or very shallow(1), shallow(3), medium(5), deep(7), very deep(9)	1	1	1	1	1	1	1
31	Fruit : predominant number of locules	only two(1), two and three(2), three and four(3), four and more(4)	2	2	2	2	2	2	2
32	Fruit : thickness of flesh	thin(3), medium(5), thick(7)	4	4	6	5	4	5	6
33	Placenta : size	small(3), medium(5), large(7)	5	5	4	3	-	5	-
34	Stalk : length	short(3), medium(5), long(7)	5	6	5	5	7	5	5
35	Stalk : thickness	thin(3), medium(5), long(7)	5	5	5	5	5	4	5
36	Calyx : aspect	non enveloping(1), enveloping(2)	2	2	2	2	2	2	2
37	Fruit : capsaicin in placenta	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
38	Time of beginning of flowering	early(3), medium(5), late(7)	6	6	5	2	4	5	5
39	Time of ripening	early(3), medium(5), late(7)	6	5	5	4	5	3	4

(Continued)

No	Characteristics	Description	Varieties						
			Buchon (부촌)	Super geumtap (슈퍼금탑)	Pung- chon (풍촌)	Gukbo (국보)	Daem- yung (대명)	Geo- seong (거성)	Geum- dang (금당)
20	Fruit : predominant shape of longitudinal section	flattened(1), round(2), heartshaped(3), square(4), rectangular(5), trapezoid(6), triangular(7), long slender(8), narrow triangular(9), wrinkled type(10), hornshaped(11)	8	8	8	8	8	8	8
21	Fruit : predominant shape of cross section	elliptic(1), angular(2) circular(3)	3	3	3	3	3	3	3
22	Fruit : sination of pericarp at basal part	absent or very weak(1), weak(2), medium(3), strong(4), very strong(5)	1	1	1	1	1	1	1
23	Fruit : texture of surface	smooth(1), slightly wrinkled (2), strongly wrinkled(3)	1	1	1	1	1	1	1
24	Fruit : color at maturity	yellow(1), orange(2), red(3), brown(4)	3	3	3	3	3	3	3
25	Fruit : intensity of color at maturity	light(3), medium(5), dark(7)	7	7	7	7	7	7	7
26	Fruit : glossiness	weak(3), medium(5), strong(7)	7	7	7	7	7	7	7
27	Fruit : stalk cavity	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
28	Fruit : depth of stalk cavity	shallow(3), medium(5), deep(7)	-	-	-	-	-	-	-
29	Fruit : shape of apex	acute(1), rounded(2), depressed(3)	1	1	1	1	1	1	1
30	Fruit : depth of interocular grooves	nil or very shallow(1), shallow(3), medium(5), deep(7), very deep(9)	2	2	2	2	2	2	2
31	Fruit : predominant number of locules	only two(1), two and three(2), three and four(3), four and more(4)	2	2	2	2	2	2	2
32	Fruit : thickness of flesh	thin(3), medium(5), thick(7)	5	6	4	4	5	5	5
33	Placenta : size	small(3), medium(5), large(7)	4	5	5	4	5	5	4
34	Stalk : length	short(3), medium(5), long(7)	5	5	3	5	5	5	5
35	Stalk : thickness	thin(3), medium(5), long(7)	5	5	3	5	5	5	4
36	Calyx : aspect	non enveloping(1), enveloping(2)	2	2	2	2	2	2	2
37	Fruit : capsaicin in placenta	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	1
38	Time of beginning of flowering	early(3), medium(5), late(7)	6	6	5	5	5	5	3
39	Time of ripening	early(3), medium(5), late(7)	5	6	4	4	5	5	5

(Continued)

No	Characteristics	Description	Varieties						
			Sin-gang (신강)	21segi (21세기)	Sintae- yang (신태양)	Wrinkled green (파리꽃)	Seouljang wrinkled green (서울장파리꽃)	Hansaem wrinkled green (한샘파리꽃)	Jinseong wrinkled green (진성파리꽃)
20	Fruit : predominant shape of longitudinal section	flattened(1), round(2), heartshaped(3), square(4), rectangular(5), trapezoid(6), triangular(7), long slender(8), narrow triangular(9), wrinkled type(10), hornshaped(11)	8	8	8	8	8	8	8
21	Fruit : predominant shape of cross section	elliptic(1), angular(2), circular(3)	3	3	3	1	1	1	1
22	Fruit : sination of pericarp at basal part	absent or very weak(1), weak(2), medium(3), strong(4), very strong(5)	1	1	1	1	1	1	1
23	Fruit : texture of surface	smooth(1), slightly wrinkled (2), strongly wrinkled(3)	1	1	1	3	3	3	3
24	Fruit : color at maturity	yellow(1), orange(2), red(3), brown(4)	3	3	3	3	3	3	3
25	Fruit : intensity of color at maturity	light(3), medium(5), dark(7)	7	7	7	7	5	5	5
26	Fruit : glossiness	weak(3), medium(5), strong(7)	7	7	7	5	5	5	5
27	Fruit : stalk cavity	absent(1), present(9)	1	1	1	1	1	1	1
28	Fruit : depth of stalk cavity	shallow(3), medium(5), deep(7)	-	-	-	-	-	-	-
29	Fruit : shape of apex	acute(1), rounded(2), depressed(3)	1	1	1	3	3	3	3
30	Fruit : depth of interlocular grooves	nil or very shallow(1), shallow(3), medium(5), deep(7), very deep(9)	1	1	2	1	1	1	1
31	Fruit : predominant number of locules	only two(1), two and three(2), three and four(3), four and more(4)	1	1	1	1	1	1	1
32	Fruit : thickness of flesh	thin(3), medium(5), thick(7)	5	5	5	4	4	3	4
33	Placenta : size	small(3), medium(5), large(7)	5	5	5	3	5	3	3
34	Stalk : length	short(3), medium(5), long(7)	5	5	5	3	4	3	3
35	Stalk : thickness	thin(3), medium(5), long(7)	5	4	4	2	2	2	2
36	Calyx : aspect	non enveloping(1), enveloping(2)	2	2	2	2	2	2	2
37	Fruit : capsaicin in placenta	absent(1), present(9)	9	9	9	9	9	9	9
38	Time of beginning of flowering	early(3), medium(5), late(7)	4	5	4	3	6	2	2
39	Time of ripening	early(3), medium(5), late(7)	5	6	4	5	5	5	4

(Continued)

No	Characteristics	Description	Varieties						
			Matjolim wrinkled green (맛조림파리꽃)	Damrok wrinkled green (담록파리꽃)	Nongrok wrinkled green (농록파리꽃)	Perpecto (퍼펙토)	Tomapi (토마피)	New ace (뉴에이스)	Global (글로벌)
20	Fruit : predominant shape of longitudinal section	flattened(1), round(2), heartshaped(3), square(4), rectangular(5), trapezoid(6), triangular(7), long slender(8), narrow triangular(9), wrinkled type(10), hornshaped(11)	8	8	8	7	4	4	4
21	Fruit : predominant shape of cross section	elliptic(1), angular(2) circular(3)	1	1	1	3	2	2	2
22	Fruit : sination of pericarp at basal part	absent or very weak(1), weak(2), medium(3), strong(4), very strong(5)	1	1	1	1	1	5	5
23	Fruit : texture of surface	smooth(1), slightly wrinkled(2), strongly wrinkled(3)	3	3	3	1	1	1	2
24	Fruit : color at maturity	yellow(1), orange(2), red(3), brown(4)	3	3	3	3	3	3	3
25	Fruit : intensity of color at maturity	light(3), medium(5), dark(7)	4	5	5	7	3	5	5
26	Fruit : glossiness	weak(3), medium(5), strong(7)	5	5	5	7	7	7	7
27	Fruit : stalk cavity	absent(1), present(9)	1	1	1	1	9	9	9
28	Fruit : depth of stalk cavity	shallow(3), medium(5), deep(7)	-	-	-	-	-	-	-
29	Fruit : shape of apex	acute(1), rounded(2), depressed(3)	3	3	3	2	2	2	2
30	Fruit : depth of interloculary grooves	nil or very shallow(1), shallow(3), medium(5), deep(7), very deep(9)	1	1	4	4	5	7	5
31	Fruit : predominant number of locules	only two(1), two and three(2), three and four(3), four and more(4)	1	1	2	2	4	3	3
32	Fruit : thickness of flesh	thin(3), medium(5), thick(7)	3	3	5	7	7	7	7
33	Placenta : size	small(3), medium(5), large(7)	3	3	3	5	7	7	7
34	Stalk : length	short(3), medium(5), long(7)	3	4	3	3	7	7	5
35	Stalk : thickness	thin(3), medium(5), long(7)	3	3	5	5	5	5	5
36	Calyx : aspect	non enveloping(1), enveloping(2)	2	2	2	2	1	1	1
37	Fruit : capsaicin in placenta	absent(1), present(9)	9	9	9	9	1	1	1
38	Time of beginning of flowering	early(3), medium(5), late(7)	6	5	5	3	5	5	3
39	Time of ripening	early(3), medium(5), late(7)	6	4	6	5	6	5	5



Table A-2. Test guideline for melon (*Cucumis melo* L.)

형질 번호*	형 질	표현형태(계급)
1QN	유묘 : 배축 길이	짧다(3), 중간(5), 길다(7)
2QN	유묘 : 떡잎의 크기	작다(3), 중간(5), 길다(7)
3QN	유묘 : 떡잎의 녹색정도(1에 대해)	얼다(3), 중간(5), 짙다(7)
4QN	잎몸(Leaf blade) : 크기	작다(3), 중간(5), 크다(7)
5QN	잎몸 : 녹색	얼다(3), 중간(5), 짙다(7)
6QN	잎몸 : 엽질의 발달	약하다(3), 중간(5), 심하다(7)
7QN	잎몸 : 정부 엽질의 길이(terminal lobe)	짧다(3), 중간(5), 길다(7)
8QN	잎몸 : 가장자리 톱니모양(dentation of margin)	약하다(3), 중간(5), 심하다(7)
9QN	잎몸 : 가장자리의 물결모양(undulation of margin)	약하다(3), 중간(5), 심하다(7)
10QN	잎몸 : 요철(blistering)	약하다(3), 중간(5), 심하다(7)
11QN	잎자루(petiol) : 자세 (altitude) (3엽전개시)	곧추서다(3), 약간서다(5), 눕다(7)
12QN	잎자루 : 길이	짧다(3), 중간(5), 길다(7),
13QL	꽃차례(inflorescence) : 성표현	단성화(1), 양성화(2)
14PQ	과실(fruit) : 성숙전 껍질의 바탕색	흰색(1), 노란색(2), 녹색(3), 회녹색(4)
15QN	과실: 성숙전 껍질의 바탕색 강도	얼다(3), 중간(5), 짙다(7)
16QN	과실: 길이	짧다(3), 중간(5), 길다(7)
17QN	과실: 너비	좁다(3), 중간(5), 넓다(7)
18QN	과실: 길이/너비의 비율	낮다(3), 중간(5), 높다(7)
19PQ	과실: 최대너비의 위치	배꼽부근(1), 중앙(2), 과실자루부근(3)
20PQ	과실 : 세로로 자른면의 모양	편원형(1), 원형(2), 달걀형(3), 타원형(4), 길다란형(5)
21PQ	과실 : 성숙된 껍질의 바탕색	흰색(1), 노란색(2), 연두색(3), 녹색(4), 황갈색(5)
22QN	과실 : 성숙된 껍질의 바탕색 강도	얼다(3), 중간(5), 짙다(7)
23QL	과실 : 껍질의 2차색 (골색 제외)	없다(1), 있다(9)
24QL	과실 : 껍질의 2차색분포(24와 관련)	점(1), 점과 얼룩(2)
25QN	과실 : 점의 밀도 (density of dots)	드물다(3), 중간(5), 뽁뽁하다(7)
26QN	과실 : 얼룩의 밀도 (density of patches)	드물다(3), 중간(5), 뽁뽁하다(7)

형질 번호	형질	표현형태
27QN	과실 : 과실자루의 길이 (length of peduncle)	짧다(3), 중간(5), 길다(7)
28QN	과실 : 과실자루 두께	얇다(3), 중간(5), 두껍다(7)
29QL	과실 : 과실자루의 탈리(abscission of peduncle)	없다(1), 있다(9)
30QN	과실 : 과실자루의 탈리 정도	약하다(3), 중간(5), 심하다(7)
31PQ	과실 : 기부(과실자루부위:base) 모양	길쭉하다(1), 둥글다(2), 납작하다(3)
32PQ	과실 : 정부(꽃자리 부위:apex)의 모양	길쭉하다(1), 둥글다(2), 납작하다(3)
33QN	과실 : 배꼽의 크기 (pistil scar)	작다(3), 중간(5), 크다(7)
34QL	과실 : 골(grooves)	없다(1), 있다(9)
35QN	과실 : 골 사이의 최대너비	좁다(3), 중간(5), 넓다(7)
36QN	과실 : 골의 너비	좁다(3), 중간(5), 넓다(7)
37QN	과실 : 골의 깊이	얕다(3), 중간(5), 깊다(7)
38QN	과실 : 표면의 주름	약하다(3), 중간(5), 심하다(7)
39QL	과실 : 코르크 형성	없다(1), 있다(9)
40QN	과실 : 코르크층의 두께	얇다(3), 중간(5), 두껍다(7)
41PQ	과실 : 코르크 형성의 무늬	작은 점(1), 선형(2), 그물형(3)
42QN	과실 : 코르크형성 무늬의 밀도	희박(3), 중간(5), 조밀(7)
43QL	과실 : 골의 색	흰색(1), 노란색(2), 오렌지색(3), 녹색(4)
44QN	과실 : 골색의 강도	열다(3), 중간(5), 짙다(7)
45QN	과실 : 가로로 자른면에서 과육의 최대너비	얇다(3), 중간(5), 두껍다(7)
46PQ	과실 : 과육의 주요색	크림색(1), 녹색(2), 오렌지색(3)
47QN	과실 : 과육 주요색의 강도	열다(3), 중간(5), 짙다(7)
48QN	종자 : 크기	작다(3), 중간(5), 크다(7)
49QL	종자 : 배꼽(臍,hilum) 끝의 모양	날카롭고 길쭉하다(1), 무디고 길쭉하다(2)
50QL	종자: 가로로 자른면의 모양	좁은 타원형(1), 타원형(2)
51QL	종자 : 색	상아색(ivory)(1), 색(Cream-yellow)(2)
52QN	개화기 (암꽃 1개 이상 개화된 식물이 50%)	이르다(3), 중간(5), 늦다(7)
53QN	수확기 (1개 이상의 성숙된 과실을 가진 식물이 50%)	이르다(3), 중간(5), 늦다(7)

\* Type of characteristics QL, qualitative characteristics; QN, quantitative characteristics; PQ, pseudo-qualitative characteristics

Table A-3. Morphological characteristics for 44 *C. melo* varieties  
 (Refer to the Table 4-1 for variety identification)

Traits	No. of varieties														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	6	5	4	6	5	6	6	5	4	4	4	4	5	5	5
2	5	6	6	6	4	5	5	4	4	4	5	4	6	4	6
3	5	5	5	5	5	6	4	5	5	6	5	6	5	5	5
4	5	4	5	5	5	6	5	4	5	5	4	5	4	6	4
5	5	5	5	6	5	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5
6	4	3	4	4	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4
7	5	5	5	5	5	6	6	6	4	4	5	4	4	5	5
8	5	5	5	4	5	4	6	5	5	4	4	5	5	5	5
9	6	4	5	6	6	3	5	5	7	5	5	6	6	5	5
10	5	5	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5	5	5	5
11	5	5	5	7	6	7	4	5	7	5	5	3	6	5	5
12	5	4	4	4	4	5	4	5	4	4	5	4	4	5	4
13	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
15	6	5	5	4	5	5	4	5	5	4	5	5	5	6	5
16	5	4	5	4	4	5	6	4	4	4	5	4	4	4	5
17	5	4	4	4	4	5	6	4	4	4	4	4	4	4	4
18	6	5	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6
19	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1
20	4	5	5	4	4	5	4	5	5	5	5	5	5	4	5
21	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
22	6	6	5	3	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continued)

Traits	No. of varieties														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
27	4	5	5	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4
28	5	5	5	4	4	5	5	4	4	4	5	4	5	4	4
29	1	9	9	9	9	9	1	9	9	9	9	9	1	9	9
30	-	5	6	5	3	7	-	5	7	7	7	7	-	5	7
31	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3
32	5	7	4	5	5	5	5	4	5	3	3	5	5	5	5
33	3	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
34	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
35	5	5	4	4	4	5	5	4	4	4	5	4	4	4	4
36	5	6	5	6	5	5	5	5	5	5	6	4	6	5	5
37	7	5	4	6	6	7	7	5	6	5	4	6	5	6	5
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
44	57	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
45	5	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4
46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	4	7	5	5	5	5	5	5	5	3	5	5	3	5	5
48	4	4	3	3	3	3	7	3	3	3	3	3	3	3	3
49	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	5	5	6	4	5	5	6	5	6	5	5	5	6	6	6
53	5	4	4	5	4	5	5	5	5	5	4	4	5	5	4

(Continued)

Traits	No. of varieties														
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	4	6	5	5	4	5	6	5	7	5	5	6	6	5	4
2	5	5	5	5	4	4	6	5	3	5	6	6	5	5	4
3	5	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	4	6	5	6
4	5	5	5	5	5	5	6	5	5	4	4	4	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	6	4	4
6	4	3	4	6	5	4	4	4	7	7	5	5	4	7	4
7	4	5	5	4	5	4	5	5	6	5	5	5	6	6	6
8	5	4	5	5	5	5	6	4	6	5	4	6	4	5	6
9	7	5	6	6	5	6	6	3	5	7	5	6	4	4	4
10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	7	5	5
11	6	6	5	5	6	5	5	5	4	3	3	5	7	5	3
12	4	4	5	5	4	4	4	5	4	4	6	6	4	6	6
13	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
14	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	3	3	4	4
15	5	5	5	5	6	6	6	7	5	5	3	3	3	5	5
16	4	4	5	4	4	5	4	6	3	4	6	5	4	6	4
17	4	4	4	4	5	5	4	5	4	4	6	6	4	5	4
18	6	6	6	6	4	4	6	7	4	6	3	3	5	5	6
19	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1
20	5	4	5	3	4	4	5	5	3	3	2	4	2	4	5
21	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	2	2	2	2	2
22	5	5	5	6	7	7	5	5	8	7	5	7	5	3	7
23	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	9	9
24	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	7	5

(Continued)

Traits	No of varieties														
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
27	4	4	4	5	4	4	4	5	6	4	6	4	7	6	7
28	4	4	4	4	5	5	4	5	6	4	6	5	3	3	3
29	9	9	9	1	1	9	1	9	9	9	1	1	1	9	9
30	7	5	5	-	-	5	-	3	3	5	-	-	-	7	7
31	3	3	3	3	3	3	3	3	7	3	5	5	1	2	1
32	6	4	5	6	6	5	5	5	3	7	6	5	3	1	2
33	3	3	3	3	3	3	3	4	7	7	5	5	4	4	5
34	9	9	9	9	9	9	9	9	1	9	1	9	1	1	1
35	4	4	4	4	5	5	4	4	-	4	-	6	-	-	-
36	5	5	6	5	4	5	4	4	-	5	-	6	-	-	-
37	5	5	6	5	7	6	7	6	-	4	-	4	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	2	2	2	2	2	2	2	5	-	5	-	4	-	-	-
44	5	5	5	6	5	5	5	6	-	4	-	5	-	-	-
45	4	4	4	4	4	5	4	4	3	4	6	6	4	5	4
46	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1
47	5	5	5	5	3	3	7	3	5	3	7	7	7	7	5
48	3	3	3	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	5	4
49	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
52	4	5	5	6	6	5	6	6	6	5	4	5	-	-	-
53	5	5	4	5	5	4	5	5	5	6	5	5	3	3	3

(Continued)

Traits	No. of varieties													
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	5	5	5	5	6	5	6	6	5	6	6	6	5	6
2	5	6	5	5	5	4	6	6	5	5	6	6	4	6
3	5	5	5	5	4	6	4	5	5	5	6	5	5	4
4	4	4	5	4	5	5	5	4	5	4	4	5	4	5
5	6	5	5	6	7	4	5	6	5	4	5	4	3	5
6	3	3	5	4	4	4	3	4	4	5	4	4	5	3
7	5	4	6	6	4	6	4	8	5	5	5	5	5	5
8	4	3	4	4	4	3	3	4	3	5	5	7	7	4
9	5	5	5	5	5	4	5	5	5	4	4	4	3	4
10	5	6	6	5	5	5	4	5	4	5	5	5	4	5
11	5	5	5	5	5	5	5	7	5	7	3	3	7	5
12	5	5	4	4	4	4	4	4	4	6	4	5	5	4
13	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
14	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3
15	3	3	3	3	3	3	3	5	3	5	5	5	7	5
16	5	5	5	5	5	5	4	5	6	6	6	6	6	5
17	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	4	6	6	6
18	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	6	4	4	4
19	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	3	2	2
21	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	1	1	1	2
22	3	5	6	4	3	7	5	7	7	5	5	5	3	5
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continued)

Traits	No. of varieties													
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
27	3	3	3	3	5	3	3	3	3	5	5	3	4	3
28	7	7	7	7	7	7	7	7	7	5	7	6	6	6
29	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1
30	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
31	3	2	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2
32	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2
33	5	5	6	5	5	6	5	5	6	5	6	4	4	5
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	9	9	9	9	9	9	9	9	9	1	1	1	1	1
40	5	4	7	5	5	6	3	7	4	-	-	-	-	-
41	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-
42	7	7	7	7	7	5	7	7	5	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	6	5	5	6	5	6	6	5	6	6	4	6	5	5
46	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1
47	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	5
48	5	5	5	5	5	5	5	4	6	4	4	6	6	6
49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	5	3	3	3



## 주 의

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