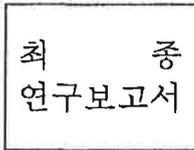


1) 631.521  
2) 639.99  
L 293人



식물 신품종 보호 및 종자보증을 위한  
핵산 표식인자의 활용  
Identification and Assurance of the Genetic Characteristics  
of Crop Lines with Specific Allele Tagging

핵산표지인자의 현주소와 문제점  
Practical and Proper Application of DNA Marker Technologies

농우계통을 통한 미확인된 핵산정보로부터의 표지인자 개발  
Undefined Elements Analysis with 'Nong-Woo' Lines

유전자좌 표지효율 극대화를 위한 방안 모색  
Sources of Defined Elements for Developing Specific PCR Primers

특정 대립유전자분석을 통한 실질적 품종표식기법의 확립  
F<sub>1</sub> Line Identification via Specific Allele Tagging Analysis

개체지향적 정보통합을 통한 품종표식인자의 보존과 활용방안 확립  
DB Construction and Management of the Information from Specific Allele Tagging

고 려 대 학 교  
(종자공급소, 농우종묘㈜)

농 립 부

## 최 종 보 고 서

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 식물·신품종 보호 및 종자보증을 위한 핵산 표식인자의 활용에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종보고서 10 부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000. 10. 28

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 신 정

주관연구기관장 : 고려대학교 총장

직 인

농 립 부 장 관 귀 하

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물 신품종 보호 및 종자보증을 위한 핵산 표식인자의 활용”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 28

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 신 정 섭

협동연구기관명 : 종자공급소

협동연구책임자 : 박 대 영

협동연구기관명 : 농우종묘㈜

협동연구책임자 : 신 윤 섭

# 요 약 문

## I. 제 목

식물 신품종 보호 및 종자보증을 위한 핵산 표식인자의 활용

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

품종으로서의 요건이 충족된 신품종이 개발되면 이를 법적으로 보호해 주어야만, 육종가와 종자생산자의 지적소유권이 보호되고, 우수품종 육성 및 우량종자의 보급을 촉진하여 궁극적으로는 농업생산성 증가와 농민소득 증대를 도모할 수 있다. 채소류의 품질은 식미적 측면과 관상적 측면 모두 중요한데, 혼종 혹은 변이로 인해 후대에서 품질의 균일성이 보장되지 않는다면, 소비자에게 거부감을 줄 뿐만 아니라 가격 하락의 주요 원인으로 작용한다. 농산물의 규격화를 위해서는 무엇보다 이러한 종자의 혼종과 변이에 의한 품질의 이질화 방지가 중요하다. 국내의 종자가 제대로 분류되어 있지 않거나, 외국의 종자에 대한 적절한 분류를 위한 판별 및 종자의 혼합에 대한 제소를 제때 행할 수 없다면 국가경제의 큰 손실이 아닐 수 없다. 이러한 측면에서 종자관련 규범을 이행하기 위한 종자구분 체제의 확립이 필요하다.

현재까지 품종분류에 주로 사용된 인자로는 형태학적 형질, 동위효소 변이, 저장단백질 변이 등이 많이 이용되어 왔다. 이러한 전통적 품종분류 방식은 품종의 순도검정 및 종자혼종의 구분에 극히 제한적으로만 적용될 수 있으며, 변이의 빈도도 아주 낮은 편이다. 그러므로 폭 넓은 변이를 관찰할 수 있고, 사용하기가 간편하며, 환경의 영향을 받지 않는 DNA 인자를 이러한 목적에 사용하는 것이 바람직하다.

에 사용된 primer 조합이름과 증폭산물의 크기를 이용하여 구분하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 기본 목표는 종자산업법에 의한 식물신품종 심사기준의 방편과, 종자의 혼입 및 형질변형으로 인한 품종의 우수성 및 균일성의 변형정도를 유묘기 혹은 종자상태에서 확인 가능하도록 하는 학문적, 기술적 바탕을 DNA인자를 통하여 제공하는데 두었다. 신품종 심사기준(안)이 확립되어있는 채소류 14가지 중에서 박과류, 특히 가장 시장성이 높은 작목인 수박과 호박을 기본 연구재료로 설정하였다.

현재까지 개발되어진 많은 DNA marker들은 단 한 개 혹은 몇 개의 분제시되는 품종들에 대해서만 제한적으로 적용되고있는 현실적 상황을 고려할 때, 개발된 DNA marker들을 이용한 실질적이고 체계적인 품종구분 및 관리체제의 모델을 제시하는 것이 본 연구의 기본적 방향이다. 이를 위하여 최대한 많은 종류의 DNA marker 개발기법 및 그 효율정도를 검정하였으며, 개발된 marker들을 재현성 높게 사용할 수 있는 최적의 조건과 분석체제를 확립하고자 하였다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- ▶ 우리나라의 수박 및 호박 품종들이 보이는 유전적 변이는 극도로 협소하여 DNA marker확립에 필수적인 polymorphism의 확인이 아주 어려웠다.
- ▶ RAPD 및 AFLP 기법을 이용해서 농우수박계통과 농우호박계통에서 각각 70개와 277개의 marker를 개발 하였다. 그러나 염기서열이 확인되지 않은 DNA를 재료로 하여 polymorphism을 확인하는 재현성이 강조되는 DNA marker를 확립하기에는 적절한 접근방식이 아니라고 판단되었다.
- ▶ 각각의 유전자좌를 정확히 표지하고, 서로 상이한 대립유전자들을 분석할 수 있는 안정적이며 체계적인 기법을 확립하는 것이 고유품종을 구분할 수 있는 최선의 방법으로 판단되었다.
- ▶ 품종표식 절차의 보편화와 단순화 그리고 표식결과의 일관성이 확보된 DNA marker 개발은 밝혀진 염기서열로부터 전환된 primer조합을 이용할 때 가장 효율적이라고 결론지었다.

▶ Defined elements의 확보를 위해 1차적으로 농우계통에서 확인된 informative band들이 cloning되었으며 추가적으로 수박에서는 retrotransposon semi-library와 cDNA library가 제작되고 SSR clone들의 염기서열이 확보되었으며, 호박에서는 active genome region-enriched semi-library가 제작되었다.

▶ Specific PCR primer 조합은 수박에서는 WA-group (35조합), WreT-group (4조합), WE-group (51조합), WM-group (33조합)들이, 호박에서는 SA-group (33조합), SGM-group (15조합)들이 각각 구분되어 합성되었다. 특정 유전자좌의 표지를 위해 총 177개의 specific primer조합들을 합성하였으며, 수박 cDNA library합성 및 EST 결과는 Plant Cell Report (vol. 19, 2000)에 보고하였다. 현재는 각 library clone들로부터 WreT-group, WE-group, 그리고 SGM-group의 primer 합성이 지속적으로 진행되고 있다.

▶ 확인된 대립유전자들이 지니는 정보의 극대화에는 제한효소를 이용하는 것이 매우 실용적이었다.

▶ 우리나라 수박과 호박 품종들의 유전변이는 주로 single nucleotide polymorphism (SNP)에 의해 나타난다고 확인되었다.

▶ 국내 여러 종묘회사에서 개발된 수박 및 호박 각각 24개 F<sub>1</sub> 품종에 대한 실질적인 품종표식을 성공적으로 수행하였다.

▶ 수박 24개 F<sub>1</sub>품종에서는 총 173개의 대립유전자들이 62개의 specific primer 조합에 의해 표지되었고, 호박 24개 F<sub>1</sub>품종에서는 총 125개의 대립유전자들이 40개의 specific primer조합에 의해 표지되었으며, 품종간 유전적 근연도는 0.83 - 0.99 (수박)와 0.72-0.98 (호박)으로 추정되어 매우 낮은 polymorphism 수준이 관찰되었다.

▶ 자료의 공유와 공정성 확보를 위하여 본 연구에 사용된 primer 조합 및 PCR 반응조건, 그리고 표지된 유전자좌에서 확인된 대립유전자들의 정보를 가시화하고 수치화하여 web site (<http://web.korea.ac.kr/~biothech/jsshin>)에 등록하였다.

## SUMMARY

Plant breeders have developed new cultivars via manipulation of genes modifying traits affecting agronomic performance and market values, and every breeding program demands long time and intensive labor. After releasing to farmers, maintenance of the superior genetic characters against unexpected mutations and seed contamination as well as from plagiarism is very important. Until recently, virtually all progress in identifying both the forfeiture of superior characters and plagiarism has relied on a phenotypic assay of genotype. In the couple of past decades there has been a remarkable increase in the number of markers available for studying genetic diversity. DNA marker techniques have successfully been applied to classify families and estimate genetic divergence among and between families tested. Plant breeders improve crops most efficiently using pre-existing few elite lines which are more closely related, but which differ for a few important genes. Therefore, there may be several practical problems associated with fingerprinting of each newly developing cultivars. Generating each line representative DNA markers with reliable DNA markers is challenging and may indeed be impossible due to the narrow genetic divergence. We, in this study, tested the reliability and efficiency of marker developing techniques in labeling of each unique cultivars. Over than 170 specific PCR primer sets have been developed from the informative bands of RAPD and AFLP, EST and SSR clones, and the gene-coding region derived gDNA library. These primer sets, with the concept of 'one primer set – one PCR product', were applied to Korean watermelon and squash  $F_1$  cultivars to find polymorphic alleles in each line. We successfully labeled every  $F_1$  cultivars with their own unique alleles, and demonstrated that the major source of polymorphism among Korean watermelon and squash  $F_1$  cultivars is single nucleotide polymorphism (SNP).

# CONTENTS

<b>Part I. Introduction</b> -----	11
Chapter 1. Background of Specific Line Identification-----	11
Chapter 2. The Need for Research and Development-----	12
1. Technical Problems-----	12
2. Economical and Social Aspects-----	12
3. Current Status and Problems-----	13
Chapter 3. The Research Objectives and Goals-----	13
<b>Part II. General Characteristics of Marker Technology in Real Situations</b> -----	15
Chapter 1. Introduction-----	15
Chapter 2. Points should be Considered Before Marker Development-----	16
1. Levels of Genetic Diversity-----	16
2. Efficiency and Reliability of Polymorphism Detection Tools-----	16
3. Simplification, Generality, and Consistency in Marker Developing Procedures and Results-----	17
4. Polymorphism in Total Chromosome versus One Locus-----	18
Chapter 3. Points should be Considered Before Marker Application-----	19
1. Polyploidy-----	19
2. Clear Judgment of a Specific Allele-----	19
3. Latent Polymorphism – SNP-----	21
<b>Part III. Materials and Methods</b> -----	22
Chapter 1. Introduction-----	22
Chapter 2. Plant Germplasm-----	23
Chapter 3. DNA Isolation-----	23
Chapter 4. Marker Development from Undefined Elements-----	26
1. RAPD analysis-----	26

2. AFLP analysis-----	27
3. Cloning and Sequencing of Informative RAPD and AFLP Bands-----	28
Chapter 5. Marker Development from Defined Elements-----	29
1. Retrotransposon Semi-Library of Watermelon-----	29
2. Sequences of Watermelon SSR Clones-----	29
3. 3'-UTR Sequencing of Watermelon cDNA Library Clones-----	30
4. Active Genome Region-Enriched Semi-Library of Squash-----	30
Chapter 6. Primer Synthesis and Application to Commercial F <sub>1</sub> Cultivars----	31
1. Primer Synthesis and Source DNA Test-----	31
2. Reaction Conditions for 'One Primer Set - One PCR Product'-----	31
3. Application of Pre-selected Primer Sets to F <sub>1</sub> Cultivars-----	33
4. Restriction of Amplified Products with Endonucleases-----	33
5. Summarization of All Information and DB Construction-----	34

## **Part IV. Undefined Elements Analysis with**

<b>'Nong-Woo' Lines-----</b>	<b>36</b>
Chapter 1. Introduction-----	36
Chapter 2. RAPD Analysis of 'Nong-Woo' Watermelon and Squash Lines---	36
Chapter 3. AFLP Analysis of 'Nong-Woo' Watermelon and Squash Lines----	38
Chapter 4. Conversion of Informative Bands into STS-PCR Primer Sets----	42
Chapter 5. Discussion-----	46

## **Part V. Sources of Defined Elements**

<b>for Specific Primer Sets-----</b>	<b>49</b>
Chapter 1. Introduction-----	49
Chapter 2. Construction of Watermelon Retrotransposon Semi-Library and STS-PCRs-----	50
Chapter 3. Watermelon SSR Flanking Primer Sets-----	53
Chapter 4. Watermelon EST Derived STS-PCR Primer Sets-----	53
Chapter 5. Squash Active Genome Region Derived STS-PCR Primer Sets--	55

Chapter 6. Discussion-----	58
<b>Part VI. F<sub>1</sub> Line Identification via Specific Allele</b>	
<b>Tagging Analysis-----</b>	<b>59</b>
Chapter 1. Introduction-----	59
Chapter 2. Pre-selection of Specific Primer Sets-----	60
Chapter 3. SSR Polymorphism among Commercial Watermelon F <sub>1</sub> Cultivars-----	62
Chapter 4. STS-PCR Polymorphism of Commercial Watermelon and Squash F <sub>1</sub> Cultivars-----	65
Chapter 5. Cleaved Amplified Product Polymorphism of Watermelon and Squash F <sub>1</sub> Cultivars-----	69
Chapter 6. Line Specific Profiles of Tagged Polymorphic Alleles-----	73
Chapter 7. Discussion-----	77
<b>Part VII. Conclusion-----</b>	<b>78</b>
Chapter 1. Narrow Genetic Diversity of Korean Commercial Watermelon and Squash F <sub>1</sub> Lines-----	78
Chapter 2. DB Construction and Management of the Information from Specific Allele Tagging-----	85
Chapter 3. Consideration of DNA Sources for Polymorphism Detection-----	86
Chapter 4. Necessity of Linkage Map Construction-----	87
<b>Part VIII. References-----</b>	<b>89</b>
<b>Part VIII. Appendix-----</b>	<b>94</b>

# 목 차

요 약 분 .....	2
I. 제 목 .....	2
II. 연구개발의 목적 및 중요성 .....	2
III. 연구개발 내용 및 범위 .....	3
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 .....	3
SUMMARY .....	5
CONTENTS .....	6
제 1 장 서 론 .....	11
제1절 연구배경 .....	11
제2절 연구개발의 필요성 .....	12
제1항 기술적 측면 .....	12
제2항 경제·사회적 측면 .....	12
제3항 국내의 관련기술의 현황과 문제점 .....	13
제3절 연구개발의 목적과 범위 .....	13
제 2 장 연구방법들의 실무적 고찰 .....	15
제1절 서 설 .....	15
제2절 품종 구분을 위한 핵산 표지 인자 (DNA MARKER) 개발 전 고려 사항 .....	16
제1항 품종간 유전적 다양성 정도 .....	16
제2항 Polymorphism의 창출 기법의 효율성과 신뢰성 .....	16
제3항 실험 절차의 단순화, 보편화 및 결과의 일관성 .....	17
제4항 Polymorphism의 두 가지 측면-염색체 전체와 하나의 유전자좌 .....	18
제3절 품종 구분을 위한 핵산 표지 인자 (DNA MARKER) 적용 시 고려사항 .....	19
제1항 배수성 .....	19
제2항 특이 대립유전자에 대한 정확한 판단 .....	19
제3항 잠재적 polymorphism .....	21
제 3 장 연구 수행 재료 선정 및 실험 방법 .....	22
제1절 서 설 .....	22
제2절 연구 재료 .....	23
제3절 DNA 추출 .....	23
제4절 UNDEFINED ELEMENT 분석을 통한 MARKER 개발 및 DEFINED ELEMENT로의 전환 .....	26
제1항 RAPD 분석 .....	26
제2항 AFLP 분석 .....	27
제3항 Polymorphic RAPD와 AFLP산물들의 cloning 및 염기서열 분석 .....	28
제5절 추가적인 DEFINED ELEMENT 확보 .....	29
제1항 수박 retrotransposon semi-library구축 .....	29
제2항 수박 SSR sequence의 확보 .....	29

제3항 cDNA 합성과 EST clone 확보 및 3'-UTR 염기서열 분석 .....	30
제4항 호박 Active genome region-enriched semi-library 구축 .....	30
제6절 SPECIFIC PRIMER 조합의 합성 및 F <sub>1</sub> 품종에 대한 적용 .....	31
제1항 Primer 합성 및 'Source' DNA에 대한 제적용 .....	31
제2항 F <sub>1</sub> 품종에서의 'One primer set' - 'One PCR product'를 위한 조건 동정 .....	31
제3항 선택된 primer 조합들의 F <sub>1</sub> line 적용 .....	33
제4항 제한효소를 이용한 monomorphic PCR product의 절단 .....	33
제5항 모든 정보의 규합을 통한 개체지향적 DB의 구축 .....	34
<b>제 4 장 농우종묘 LINE을 이용한 'UNDEFINED ELEMENTS' 분석 (RAPD, AFLP)</b> .....	<b>36</b>
제1절 서설 .....	36
제2절 RAPD 분석 .....	36
제3절 AFLP .....	38
제4절 SEQUENCING을 통한 STS-PCR PRIMER 합성 .....	42
제5절 총 설 .....	46
<b>제 5 장 추가적인 DEFINED ELEMENTS 확보</b> .....	<b>49</b>
제1절 서설 .....	49
제2절 수박 RETROTANSPOSON SEMI-LIBRARY 구축과 STS PRIMER 개발 및 적용 .....	50
제3절 SSR-PCR PRIMER 조합의 합성 .....	53
제4절 수박 EST에서부터의 STS-PCR PRIMER 조합의 합성 .....	53
제5절 호박 ACTIVE GENOME REGION-ENRICHED SEMI-LIBRARY의 구축과 STS PRIMER 합성 .....	55
제6절 총 설 .....	58
<b>제 6 장 SPECIFIC ALLELE TAGGING을 통한 F<sub>1</sub> 품종 분석의 결과 및 고찰</b> .....	<b>59</b>
제1절 서 설 .....	59
제2절 SPECIFIC PRIMER 조합들의 선별 .....	60
제3절 수박 F <sub>1</sub> 품종에서의 SSR 유전자좌 분석 .....	62
제4절 수박 및 호박 F <sub>1</sub> 품종들에 대한 STS-PCR PRIMER 조합들의 적용 .....	645
제5절 제한효소를 이용한 MONOMORPHIC PCR PRODUCT의 절단 .....	69
제6절 개체지향적 DATABASE의 구축 .....	73
제7절 총 설 .....	77
<b>제 7 장 결 론</b> .....	<b>78</b>
제1절 수박 및 호박 품종이 보이는 좁은 유전적 다양성 .....	78
제2절 특정 유전자좌의 정확한 표지와 내립유전자 정보의 관리 .....	85
제3절 품종 표지를 위한 SPECIFIC PRIMER 조합의 DNA SOURCE .....	86
제4절 유전자 지도 작성의 필요성 .....	87
<b>제 8 장 인용 문헌</b> .....	<b>89</b>
<b>부 록</b> .....	<b>94</b>

## 제 1 장 서 론

## 제1절 연구배경

품종으로서의 요건이 충족된 신품종이 개발되면 이를 법적으로 보호해 줌으로써, 육종가와 종자생산자의 권리를 보호해 주고, 우수품종 육성 및 우량종자의 보급을 촉진하여 궁극적으로는 농업생산성 증가와 농민소득 증대를 도모할 수 있다. 이것은 특허권, 저작권, 상표권, 의장권 등과 같은 지적 소유권의 한 형태이다. 기존의 교잡육종법 뿐만 아니라 최신의 기내형질전환에 의한 육종법을 사용하더라도 새로운 품종을 육성하기 위해서는 10여년의 기간이 소요된다. 이러한 노력으로 새로운 품종이 육성되더라도, 공개된 이후 다른 사람들에 의해 재생산되는 경우가 많아, 육종가의 투자에 대한 적절한 보상의 기회가 박탈되어진다. 현재 특허법 제 31조에, 무성번식 식물에 대한 보호가 명시되어 있어 극소수의 품종이 등록되어 보호 받고 있지만, 보호를 위한 요건 중 비용이성과 반복재현성의 조건을 식물에서 충족하기 곤란한 점이 많았다.

우리나라의 국민생활이 계속 고급화 되고 있는 추세와 더불어 과채류 및 과일류의 소비가 급속하게 높아지고 있으며, 이러한 추세는 후식으로 이용하는 목적 뿐 아니라 다량의 섬유소와 비타민 등을 섭취하고자 하는 건강 측면에서도 강조되어 있어 소비가 계속 증가될 것으로 전망된다. 채소류의 품질은 식미적 측면과 관상적 측면 모두 중요한데, 혼종 혹은 변이로 인해 후대에서 품질의 균일성이 보장되지 않는다면, 소비자에게 거부감을 줄 뿐만 아니라 가격 하락의 주요 원인으로 작용한다. 농산물의 규격화를 위해서는 무엇보다 이러한 종자의 혼종과 변이에 의한 품질의 이질화 방지가 중요하다. 종자산업법의 규정에 의하여 품종의 생산과 유통이 체계를 갖추어 가고, 품질이 좋은 종자가 농민들에게 공급되어, 궁극적으로 소비자들이 고품질의 농산물을 공급 받을 수 있다면, 소비자-농민-종자회사로 연결되는 시장의 신뢰성이 확보될 수 있다.

이러한 목적을 위해서, 형태적으로 구별이 불분명한 계통들을 보다 정확하고 간단한 DNA인자를 이용하여, 가지적으로 분명하게 검정할 수 있는 기법의 확립이 절실히 요구된다.

## 제2절 연구개발의 필요성

### 제1항 기술적 측면

현재까지 품종분류에 주로 사용된 인자로는 형태학적 형질 (질적, 양적), 동위효소 변이, 저장단백질 변이 등이 많이 이용되어 왔다. 형태학적 특성으로는 식물체의 곡물(종자), 유묘, 뿌리, 근계 또는 유사지하조직, 줄기, 잎, 화서, 꽃, 과실 등의 각 부위에 따라 초세, 높이, 길이, 넓이, 크기, 모양, 빛깔 등을 조사하여, 품종의 특성을 분류하고 농촌진흥청 종자은행에 보관하여 왔다. 동위효소의 변이나 저장단백질 변이 등도 마찬가지로이지만 형태학적 형질들은 품종의 순도검정 및 종자혼종의 구분에 극히 제한적으로만 적용될 수 있으며, 변이의 빈도도 아주 낮은 편이다. 이러한 이유 등으로 폭 넓은 변이를 관찰할 수 있고, 사용하기가 간편하며, 환경의 영향을 받지 않는 DNA 인자를 이러한 목적에 사용하는 것이 바람직하다.

### 제2항 경제·사회적 측면

우리나라 채소류 총생산량의 약 11%를 차지하는 과채류 생산면적은 국민생활 개선과 함께 계속 증가추세에 있고, 이와 비례하여 과채류는 농가의 소득을 높이는 주요 고부가가치 작물로 부각되고 있다. 농업 선진국들이 국내시장에 신선한 채소를 직접 수출하기는 어려움이 많으므로, 주로 채소종자 및 종묘의 무역에 심혈을 기울이고 있으며, IMF이후 대부분의 종묘회사를 합병하여 이미 상당한 영향력을 갖추고 있는 실정이다. 국내의 종자가 제대로 분류되어 있지

않거나, 외국의 종자에 대한 적절한 분류를 위한 판별 및 종자의 혼합에 대한 제소를 제때에 행할 수 없다면, 국내 농업의 후진화 뿐만 아니라 국가경제의 큰 손실이 아닐 수 없다. 이러한 측면에서 종자관련 규범을 이행하기 위한 종자의 특성과약이 무엇보다도 중요하며, 이미 선진국에서 체계화되어 있는 DNA인자를 이용한 품종분류 및 체계화가 시급하다.

### 제3항 국내의 관련기술의 현황과 문제점

국내에서도 RAPD 및 AFLP 기법을 비롯한 여러 가지 기본적 기술들이 생물자원 분석을 위하여 널리 사용되고 있으며, 농업부분에서도 농촌진흥청 뿐만 아니라 각 대학에서 사용이 급격히 증가하고 있는 상황이지만, DNA 인자를 신제품의 심사기술에 도입하여 정확하게 분별하는 연구가 미진하고, 특히 데이터의 해석을 위한 전문가가 부족하여 정부에서는 이용의 한계를 느끼고 있는 실정이다. 외국의 경우, 이미 구미와 유럽에서는 신제품 심사기술에 DNA 인자의 이용이 규정되어 있고, 많은 DNA marker들이 유전자 연관지도에 포함되어져 체계적인 육종계획의 수립 및 효과적인 육종과정 수행에 많은 정보를 제공하고 있다.

### 제3절 연구개발의 목적과 범위

본 연구의 목표는, 국내 종묘산업에 큰 영향을 줄 수 있는 종자산업법에 의한 식물신제품 심사기준의 방편을 제공하고, 종자의 혼입 및 형질변형으로 인한 품종의 우수성 및 균일성의 변형정도를 유묘기 혹은 종자상태에서 확인 가능하도록 하는 학문적·기술적 바탕을 DNA 인자를 통하여 제공하는데 초점을 맞추었다. 신제품 심사기준(안)이 확립되어있는 채소류 14가지 중에서 박과류, 특히 가장 시장성이 높은 작목인 수박과 호박을 기본 연구재료로 설정하였고, 현실적으로 가능한 모든 marker개발법을 광범위하게 적용하여 그 효율성을

검정하였고, 개발된 marker들을 안정적으로 사용할 수 있도록 최적의 조건과 분석체계를 확립하려 하였다.

본 연구에서 개발된 인자들은 F<sub>1</sub> 선별, 종자오염 및 품종변이 판정 등에 바로 사용될 수 있으며, 종내 및 종간 품종간의 변이 추정 및 국내 박과 식물의 유전적 다양성의 측정에 이용될 수 있도록 하였다. 또한 본 연구의 결과들을 모두 가시화, 계량화하여 web-site에 공개함으로써, 비전문가들도 쉽게 필요한 정보를 접할 수 있도록 하고, 차후 계속 개발되어질 DNA인자들의 체계적인 DB구축의 모형을 제시하고자 하였다.

## 제 2 장 연구방법들의 실무적 고찰

### 제1절 서 설

핵산 표지 인자 (DNA marker)의 개념이 국내에 소개된 이래, 많은 연구기관 및 단체들이 DNA marker 기술을 다양한 분야에 적용하여 왔다. 농업적으로는 한 작물의 국내 품종들과 외국종들이 보이는 'polymorphism'의 관찰로 유전자원의 다양성 추정 및 우량(저항성, 큰 형질차이 등) 품종의 표지인자 개발 등에 주로 이용되어 왔다. 그러나 국내 품종들을 정확히 구분하고, 더 나아가 품질의 우수성 및 균일성을 지속적으로 확보하기 위한 방편으로 DNA 인자를 사용하지 못하였다. 그 주된 이유로는 적응종 (ecotype)의 특성을 지니는 국내 품종간의 polymorphism의 발견이 쉽지 않을 뿐더러, 발견된다 하더라도 재현성이 보장되는 DNA marker로의 확립이 쉽지 않고, 표지된 유전자좌 (locus) 및 특정 유전자좌 내의 대립 유전자들(alleles)의 유전자형 (genotype)을 구체적으로 명시할 수 있는 기법이 제시되지 못했다는 점 등을 들 수 있다. 따라서 가시적이며 수치적으로 일관성을 지니는 DB의 구축이 불가능했으며 더불어 연구자간 원활한 정보의 공유도 극도로 제한되었다.

본 장에서는 국내외에서 널리 사용되고 있는 보편적인 유전인자 분석 방법들을 품종 판별 및 품종의 균일성 유지 등에 효과적으로 이용할 때 고려해야 할 점들을, 본 연구기관에서 경험한 시행착오 및 축적한 기술을 바탕으로 제시하고자 한다.

## 제2절 품종 구분을 위한 핵산 표지 인자 (DNA marker) 개발 전 고려 사항

### 제1항 품종간 유전적 다양성 정도

'지구촌 시대'라는 개념이 농업에도 커다란 영향을 미치고 있어서, 소수 선진 농업국에서 육종된 우수 품종들은 '도입품종'으로 전세계에 급속도로 확산되는 것이 최근의 추세이다. 이러한 우수 도입종들은 특성검정 및 적응력을 시험한 후 새로운 육종재료로 사용되어지는데, 이로 인하여 품종간 유전적 다양성이 상실된다는 것은 이미 널리 알려져 있다. 또한 육종가들은 새로운 품종 육성을 위한 육종 프로그램을 이미 존재하는 우수품종(elite line)의 교배로부터 시작하는 것이 보편적이며, 재료로 사용하는 기준품종의 수가 상당히 제한되어 있는 것이 현실이다 (Martin et al., 1991; Hayes et al., 1997). 결론적으로, 시중에서 거래되는 한 작물의 품종들이 보이는 유전적 변이 정도는 야생종 혹은 외국종까지 함께 고려하는 경우 보다 상당히 낮아질 수 밖에 없다. 그러므로 국내 시중에서 유통되는 주요 품종들만에 대하여 유전적 다양성을 추정할 때 확인 가능한 polymorphism의 정도가 극도로 낮아지게 되고, 각각의 품종을 구분하기 위한 충분한 수의 DNA marker의 개발과 정보의 집적은 상당한 노력과 시간을 필요로 하게 된다.

### 제2항 Polymorphism의 창출 기법의 효율성과 신뢰성

벼, 보리, 옥수수, 콩 등 주요 곡물의 경우 유전자 연관지도의 제작과 quantitative trait loci (QTL)분석 그리고 새로운 육종과업 수행을 위한 교배친의 선발 등에 이용하기 위하여 많은 수의 specific primer 조합들 [sequence tagged specific (STS)-PCR과 simple sequence repeats (SSR)-PCR 등]이 restriction fragment length polymorphism (RFLP) clone, expressed sequence tags (EST) clone, 혹은 SSR library clone등의 염기서열 분석 결과에 의거하여 합성되었다 (Akkaya et al., 1995;

Ghareyazie et al., 1995; Kleinhofs et al., 1993; Roder et al., 1995; Smith et al., 1994; Tanksley et al., 1992; Tragoonrung et al., 1992). 이와 병행하여, specific primer 조합들의 최적 반응조건 및 PCR 산물에 대한 양질의 정보 (band 수와 그 크기 등)가 많은 품종 및 야생 자원들에 대해 체계적으로 축적되어져 왔다. 이러한 primer 조합들은 국내종에 대해서도 품종 구분이나 유전양상 분석 등 여러 가지 용도로 쉽게 적용될 수 있으며, 양질의 DB를 단기간에 축적 시킬 수 있다는 장점이 있다.

하지만 우리나라에서 중요하게 취급되는 대부분의 채소 작물들은 세계적으로 그 연구 인력과 DB의 양이 미흡한 편이며, 유전분석 및 품종구분을 목적으로 polymorphism을 확인하기 위해서는 분석되지 않은 DNA (undefined elements)의 일부분을 증폭하거나 (randomly amplified polymorphic DNA; RAPD기법과 amplified fragment length polymorphism; AFLP기법), 전체 염색체를 대상으로 하여 분석을 시도 (restriction landmark genome scanning; RLGS 기법)하는 것으로 출발하는 것이 대부분이다. 그러나 RAPD기법(Williams et al., 1990)은 그 실험 절차는 상당히 간단하지만 모든 증폭 산물들을 안정적으로 반복해서 관찰하기가 어려우며, AFLP (Vos et al., 1995) 및 RLGS(Anderson and Anderson, 1979) 기법은 실험 과정상 여러 단계의 처리 절차를 거쳐야 하는 이유 때문에 실험상의 오류로 인한 문제가 발생하기 쉬우며, 기법 특성상 충분히 훈련된 연구 인력과 특수한 장비를 추가로 요구한다는 단점이 있다.

### 제3항 실험 절차의 단순화, 보편화 및 결과의 일관성

단시일 내에 어떤 작물의 DNA marker개발을 위하여 품종들 내의 polymorphism을 확인하는 작업으로 가장 쉽게 적용할 수 있는 것이RAPD와 AFLP 기법이다. 한 품종, 혹은 하나의 품종군에서만 확인되는 특이 증폭 산물들을 DNA marker로 활용하기 위해서, 특이 증폭 산물들을 바로 수치적으로 정보화 (사용한 primer 이름과 증폭산물의 크기를 함께 명시하는 등의 방식) 하여 연구 재료들의 유전연관 정도를 추정하거나, 특정 형질을 표지하는 DNA marker를 선발하는 등의 연구는 이미 수년 전부터 우리 나라에서도 시도되어

왔다. 그러나 DNA marker를 이용하여 한 작목의 품종을 엄정히 구분하고, 종자의 오염, 혹은 형질의 변성 등을 정확히 판정하는데 적용하기 위해서는 단순히 polymorphism을 확인하는 작업 이상으로 정보화된 polymorphism의 일관된 결과의 견지와 확인 절차의 단순화, 보편화가 필수적이다. RAPD는 실험조건 뿐만 아니라 사용하는 기자재에 따라서도 결과의 심한 변이를 보인다. 또한 AFLP도 단시간 내에 많은 polymorphism을 확인할 수 있다는 장점은 있지만, 반복적으로 실험을 진행하기에는 많은 절차상의 어려움을 내포하고 있다.

실험 절차상 많은 시간과 노력이 요구되지만 재현성이 명확한 RFLP기법을 단순화하기 위하여 probe clone들의 말단 염기서열을 분석하고 그 정보를 바탕으로 specific primer 조합을 합성하여 사용하는 기법 (STS-PCR)이 소개된 이후 (Olson, et al., 1989), polymorphism 확인 절차의 단순화, 보편화 및 일관성 모두를 STS-PCR기법으로 확보하려 하는 것이 세계적인 추세이다. 물론 STS-PCR primer로 전환시키는데 많은 경비와 시간이 소요되지만, 일단 전환되어서 'MARKER'로 확립된 후에는 새로이 육성되어지는 품종 및 외국 도입종, 더 나아가서 근연종 및 원연종 모두에 광범위하게 적용되어질 수 있으므로 영구적으로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 품종간의 polymorphism을 확인하기 위하여 어떤 기법을 사용하였던 간에, 모든 특이 증폭 산물들은 염기서열 분석을 바탕으로 STS-primer 조합으로 전환시켜 주는 것이 신품종 보호 및 종자 보증을 위한 DNA marker 활용의 높이는 최선의 방안이다.

#### 제4항 Polymorphism의 두 가지 측면-염색체 전체와 하나의 유전자좌

고도의 polymorphism은 서로 유전적 조성이 판이하게 다른 품종간 (국내 재래종과 외국 재래종 등)에서 쉽게 관찰될 수 있다. 그러므로 국내의 한 품종을 원연에 있는 외국종과 구분할 때, 하나의 유전자좌를 STS-PCR primer 조합을 이용하여 선택적으로 증폭하여 그 산물을 비교하기 보다는 염색체 전체를 대상으로 하는 기법 (RFLP, RAPD, AFLP 및 RLGS)들을 적용하는 것이 유리하다. 그러나 유전적인 변이가 극히 적은 국내 품종의 구분에는 염색체 전체에서 충분한 수의 polymorphism을 확보하여 DNA marker로 전환하기에는 어려움이

많이 따른다. 품종의 명확한 구분과 관리에 연구목표를 두고 있다면 분석 대상을 반드시 염색체 전체로 잡아야 할 필요는 없다. 즉, specific primer를 이용하여 특정 유전자좌를 선택적으로 증폭하고 그 증폭 산물을 적절한 방법으로 분석하여 정보를 가시적, 수량적으로 표현함으로써 품종간 상이점을 체계적으로 누적시켜 나가는 것이 재현성이 더욱 강조되는 분야, 즉 DNA marker를 이용한 품종식별에는 훨씬 유리하다고 볼 수 있다.

### 제3절 품종 구분을 위한 핵산 표지 인자 (DNA marker) 적용 시 고려사항

#### 제1항 배수성

거대성을 강조하는 육종 사업에서 흔히 사용하는 방법이 배수성 육종이다. 배수성은 인위적 조작이 가해지지 않은 작물에서도 흔히 존재하며, 실제로 이배성을 지니는 작물은 그리 많지 않은 편이다. 3배체 이상의 배수성이 인정되는 작물의 품종을 PCR기법으로 구분하는데에는 기술적으로 많은 어려움이 따른다. 특히 이질 배수체에서 어떤 PCR산물이 어떠한 genome set에서 기인된 것인지를 판단하려면 Single-Dose Restriction Fragments (SDRF; Wu et al., 1992)와 같은 특별한 분석 기법을 요구한다. 현실적으로 대부분의 채소 작물들은 F<sub>1</sub> 종자 형태로 시중에 유통되고 있으므로, 유전자형의 판단은 순계 품종으로 검정하는 경우보다 그 효율이 매우 낮을 수 밖에 없다. 따라서 이러한 경우 검정 품종들의 정확한 해형 분석 자료의 중요성이 더욱 높아진다.

#### 제2항 특이 내림유전자에 대한 정확한 판단

RAPD 및 AFLP의 산물, hybridization probe 및 각종 library clone들의 염기서열 분석에 의거해서 합성된 STS-, SSR-PCR primer 조합으로 증폭된 PCR산물들은

일반적으로 대개 그 크기를 예측할 수 있다. 증폭산물의 크기가 예측치에서 벗어나는 경우로는 두 가지를 들 수 있는데, 첫째, 재료적 요인으로서 primer에 의해 제한되는 범위 내에서 큰 수준의 삽입, 결실, 혹은 돌연변이에 의한 염기조성의 변환이 일어나는 경우를 들 수 있으며 (heterogeneous alleles), 둘째, 실험적 요인으로서 실험 여건 및 염색체의 유전물질 조성의 복잡성 정도에 따라서 여러 개의 증폭 산물이 나타나거나 absent (null allele)로 판단되는 경우를 들 수 있다(low replication efficiency). 이렇듯 하나의 primer 조합에 의해 여러 가지 크기의 증폭 산물들이 나타날 때에는 반드시 반복 실험을 통해서 그 재현성을 확인하고, 그렇지 못한 증폭 산물들을 억제해 주는 조건을 설정해 주는 것이 중요한데, Touch-Down PCR기법이 한 방법이다.

하나의 primer 조합에 의해 증폭된 특정 유전자좌 내의 대립 유전자들은 알려진 크기의 DNA 절편들의 전기영동 양상과 상대적으로 비교하고, 대략적 크기와 사용한 primer 조합의 이름과 함께 표기 하는 것이 일반적인 방법이다 (예; WA001-160bp). 대립유전자의 종류가 양친으로 제한되는 mapping population에서는 polymorphic한 대립유전자의 분리비를 확인하는 것이 증폭산물의 정밀한 크기 측정보다 더욱 중요하다. 그러나, 품종구분에 DNA marker를 이용하는 데에는 양친에서의 대립유전자 비율 (allele frequency)은 물론, 유전자 이동 경로 (path)가 불분명한 많은 대립 유전자들을 정확히 판별해 내는 것이 가장 큰 관건이다. 일반적인 STS-PCR 산물들과 SSR-PCR 산물들은 수 내지 수십 base pair의 크기 차이 및 단 하나의 염기조성 차이(single nucleotide polymorphism; SNP, Hudson et al., 1995)로 대립 유전자들을 구분할 수 있기 때문에, 각 품종 고유의 대립유전자를 표시하는데에는 많은 주의가 요구된다. 왜냐하면 품종구분 및 형질의 균일성 등을 관리하는 데에는 핑적 분석 개념 (여러 가지 품종 안에서 나타나는 대립유전자의 종류, 즉 polymorphism의 관찰)이 아닌, 종적 분석 개념 (혹은 개체 지향적, 즉 이미 확인된 고유의 대립유전자의 확인과 검증)이 적용되어지기 때문이다.

### 제3항 잠재적 polymorphism

대부분의 DNA marker 개발 기법들에서 polymorphism의 발견은 사용된 제한효소가 인식하는 염기서열 (RFLP, RLGS, AFLP 등)이나, primer들에 대한 상보적 염기서열이 있는 부위 (annealing site) (RAPD, SSR-PCR, STS-PCR 등)에 의해서 지배되게 된다.

Primer (RAPD), 혹은 specific primer조합 (STS-PCR 혹은 SSR-PCR primer 등)의 적용으로 인한 polymorphism은 주로 증폭 산물의 유무 (primer binding site에서 염기 서열의 품종간 차이)와 증폭 산물의 크기 (primer의 annealing으로 제한되는 부위 내에서의 삽입 및 결실) 등을 조사하고 비교함으로써 확인된다. 그러나 primer binding site 인쪽에 SNP가 존재하는 것에 대한 정보를 얻을 수 없다. 그러므로 많은 polymorphism을 확인하거나, 아주 협소한 유전 변이를 보이는 품종을 서로 구분해 내기 위해서는 적용하는 primer 조합의 수를 늘려 주는 것이 중요하며 절차상 많은 경비와 시간이 요구된다. 현실적으로 이러한 문제를 보완해 주기 위해서 PCR 증폭 산물을 여러 종류의 제한 효소로 처리하여 내재된 polymorphism을 추가로 확인하는 방법을 들 수 있다. 그러나, 절단된 증폭 산물의 확인과 비교에는 매우 신중한 주의가 필요하다. 이유로는 첫째, 비특이적으로 증폭된 산물들 역시 제한효소로 절단되기 때문에 심한 경우에는 target band를 추적할 수 없을 정도로 background가 나타나게 되며, 둘째, heterogeneous한 유전자좌의 대립 유전자들 (F<sub>1</sub> 품종의 경우)은 배수성 정도에 따라 그 해석이 더욱 어려워 질 수 있다 등을 들 수 있다.

## 제 3 장 연구 수행 재료 선정 및 실험 방법

### 제1절 서설

본 연구 수행의 재료는 신품종 심사 기준(안)이 확립되어 있는 채소류 14가지 중에서, 우선 과채류 중 우리 나라에서 시장성과 경제성이 가장 높은 박과류인 수박과 호박이다. 본 연구의 궁극적 목적은 국내  $F_1$  품종들이 보이는 유전적 다양성을 추정하고 더 나아가서 가능한 많은 유전자좌에 대해 각 품종이 지니는 대립유전자를 분석하고 DB화 하는데 있다. 그러므로 'Undefined Element'로부터의 polymorphic marker 개발 (즉 RAPD 및 AFLP)을 위해 1차적으로 사용하였던 농우 계통들에 대해서는 specific primer 조합들의 적용을 실시하지 않았다. 반면에 종자보급소로부터 분양받은 수박 및 호박  $F_1$  품종들에 대해서 specific primer를 적용함으로써 실질적인 DB를 구축함과 동시에, 우리나라에서 유통되는 수박 및 호박  $F_1$  품종들의 유전적 다양성을 추정하고자 하였다.

본 연구는 크게 두 가지 측면에서 진행되었다. 첫째, 농우종묘에서 보유하고 있는 육종 재료친들을 대상으로 RAPD 및 AFLP기법을 이용하여 무작위적 DNA 증폭 및 절단 (Undefined Elements)을 통한 polymorphic marker의 개발과 이들의 안정적 재현을 위한 STS-PCR primer로의 전환, 그리고 각종 library clone들의 염기서열분석 결과 (Defined elements: SSR clones, EST clones, gene coding region-enriched clones)를 근거로 한 STS-PCR 및 SSR-PCR primer의 합성을 시도하였다. 둘째, 전환된 specific primer 조합들의 상용품종 ( $F_1$  계통들)에 대한 적용과 품종구별을 위한 각 유전자좌에 대한 품종별 대립유전자 분석 및 그 결과들의 데이터베이스화 (Databasing of the line specific alleles of each locus among commercial cultivars)를 시도하였다.

## 제2절 연구 재료

본 연구에 사용한 수박 및 호박의 품종은 표 1과 표 2에서 보는 바와 같다. 먼저 'undefined element'로부터의 DNA marker 개발을 위해서 농우 종묘에서 형질 조사를 실시한 육종 재료친들을 사용하였다 (농우계통). STS-PCR 및 SSR-PCR primer를 합성한 후에는 종자보급소로부터 분양 받은 상용품종 (F<sub>1</sub> 계통)을 이용하였다.

EST clone들로부터의 STS-PCR primer의 제작에는 상용품종 (F<sub>1</sub>) '럭키'가 이용되었으며 (Ok et al., 2000), retrotransposon semi-library 및 active genome region-enriched semi-library 제작에는 농우 수박 1번 및 농우 호박 1번 계통이 각각 이용되었다. 모든 수박 및 호박들은 농우종묘 (농우 계통들) 및 농림부 종자관리소 (상용 F<sub>1</sub> 계통들)에서 형질 조사가 실시되었으며, 그 결과는 표 A-1에 수록하였다.

## 제3절 DNA 추출

DNA 추출을 위한 식물체 재배방법은 다음과 같다. 모든 종자들은 plug tray에 파종되었고, 묘의 관리는 비닐 하우스에서 수행하였으며, 파종상의 온도를 25°C로 유지하기 위하여 전열선을 이용한 보온을 실시하였다. 파종 약 20일 후에 초엽이 채취되었다. 전체 DNA 추출은 CTAB 방법 (Murray and Thompson, 1980)을 변형하여 추출하였다. 약 1g 정도의 잎을 액체질소로 마쇄한 다음 추출용액 [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 250 mM NaCl, 1% β -mercaptoethanol] 6 ml를 첨가하고 65°C에서 40분간 처리하였다. 냉장 보관된 20% Polyvinyl -pyrrolidone 용액 2.4 ml과 1/2 vol의 7.5M ammonium acetate 용액을 첨가하고 ice-bed에 처리하였다. 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취했다. 동일 volume의 isopropanol을 첨가하고 -20°C에서 30분간 처리한 다음, 15,000 rpm에서

Table 1. Watermelon accessions for developing DNA markers and databasing of cultivar specific allele profiles in each locus tested\*

Group I <sup>a</sup>				Group II							
Conversion of undefined polymorphic elements into defined elements.				Application of specific primer sets derived from defined elements and database construction.							
ID <sup>b</sup>	Lot No.	Type <sup>c</sup>	Application <sup>d</sup>	ID <sup>b</sup>	Name	Type	Company	ID <sup>b</sup>	Name	Type	Company
1	96-9	Parent	WA-, WReT-	1	금천	F <sub>1</sub>	농우	16	신성	F <sub>1</sub>	청원
2	96-4	Parent	WA-	2	달	F <sub>1</sub>	농우	17	내고향	F <sub>1</sub>	한농
3	96-3100	F <sub>1</sub> (1x2)	WA-	3	아폴로	F <sub>1</sub>	농우	18	창다라	F <sub>1</sub>	한농
4	96-2194	Parent	WA-	4	왕상	F <sub>1</sub>	농우	19	감로	F <sub>1</sub>	홍농
5	96-2198	Parent		5	천왕	F <sub>1</sub>	농우	20	대감	F <sub>1</sub>	홍농
6	96-3105	F <sub>1</sub> (4x5)	WA-	6	한들	F <sub>1</sub>	농우	21	미락	F <sub>1</sub>	홍농
7	96-7	Parent	WA-	7	신불	F <sub>1</sub>	농협	22	여름꿀	F <sub>1</sub>	홍농
9	96-3098	F <sub>1</sub> (7x8)	WA-	8	하나로	F <sub>1</sub>	농협	23	예쁘니	F <sub>1</sub>	홍농
10	96-19	Parent		9	달고나	F <sub>1</sub>	서울	24	혜성	F <sub>1</sub>	홍농
11	96-17	Parent		10	명가왕	F <sub>1</sub>	서울				
12	96-3101	F <sub>1</sub> (10x11)		11	호산	F <sub>1</sub>	제일				
13	92-187	Parent		12	감미	F <sub>1</sub>	중앙				
14	92-173	Parent		13	단비	F <sub>1</sub>	중앙				
15	97-3134	F <sub>1</sub> (13x14)		14	수로왕	F <sub>1</sub>	중앙				
21	력키	F <sub>1</sub>	WE-	15	일출	F <sub>1</sub>	중앙				

\* 표기상의 문체로 인하여 상용품종들은 모두 한글로 표기하였다.

<sup>a</sup> All accessions of the Group I, except ID21(력키), offered from Nong-Woo seed co.

<sup>c</sup> Parental lines and F<sub>1</sub> lines (ID No. of parental line x ID No. of parental line)

<sup>d</sup> Cultivars used as DNA materials for developing of specific primer set group indicated. The first '1'; present' band was isolated from polyacrylamide gel and sequenced ( Table A-3).

<sup>b</sup> Assigned experimental identification number.

Table 2. Squash accessions for developing DNA markers and databasing of cultivar specific allele profiles in each locus tested\*

Group I <sup>a</sup>				Group II			
Conversion of undefined polymorphic elements into defined elements.				Application of specific primer sets derived from defined elements and database construction.			
ID <sup>b</sup>	Lot No.	Type <sup>c</sup>	Application <sup>d</sup>	ID <sup>b</sup>	Name	Type	Company
1	93-9-1	Parent	SA-, SGM-	15	취옥꽃	F <sub>1</sub>	청원
2	93-9-2	Parent	SA-	16	흑봉쥬치니	F <sub>1</sub>	청원
4	93-9-3	Parent		17	남도에	F <sub>1</sub>	한농
5	93-9-4	Parent		18	반짝이	F <sub>1</sub>	한농
6	96-5066	F <sub>1</sub> (4x5)		19	이쁜이애	F <sub>1</sub>	한농
7	93-9-5	Parent	SA-	20	청마쥬치니	F <sub>1</sub>	한농
8	93-9-6	Parent	SA-	21	노랑쥬치니	F <sub>1</sub>	한농
9	96-5067	F <sub>1</sub> (7x8)	SA-	22	다보도꽃	F <sub>1</sub>	한농
10	93-9-7	Parent		23	불암하우스	F <sub>1</sub>	한농
11	93-9-8	Parent		24	연록애	F <sub>1</sub>	한농
12	96-5070	F <sub>1</sub> (10x11)					
13	96-8006	Parent	SA-				
14	96-8006	Parent					
15	96-5069	F <sub>1</sub> (13x14)					

\* 표기상의 문제로 인하여 상용품종들은 모두 한글로 표기하였다.

<sup>a</sup> All accessions of the Group I, offered from Nong-Woo seed co.

<sup>b</sup> Assigned experimental identification number.

<sup>c</sup> Parental lines and F<sub>1</sub> lines (ID No. of parental line x ID No. of parental line)

<sup>d</sup> Cultivars used as DNA materials for developing of specific primer set group indicated. The first '1;present'band was isolated from polyacrylamide gel and sequenced (see Table A-4).

원심분리하였다. 침전물을 건조 시킨 후 TE buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] 500  $\mu$ l로 녹였다. 양질의 DNA를 얻기 위하여 동일 volume의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 처리하여 정선하였다. DNA의 양은 260 nm 파장으로 O.D값을 측정하여 결정하였다.

#### 제4절 Undefined element 분석을 통한 marker 개발 및 defined element로의 전환

##### 제1항 RAPD 분석

1차적인 DNA 표지인자의 개발을 위하여 농우종묘의 수박 및 호박 계통들에서 추출된 genomic DNA에 대해 RAPD기법이 이용되었다. PCR 분석을 위해 수박 55개, 호박 35개의 10-mer (UBC#1~200, Canada) random primer를 적용하였다. PCR 반응은 1  $\mu$ M의 primer와 20 ng의 genomic DNA를 1X PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>]와 200  $\mu$ M dNTP mix, 그리고 0.5 unit의 *rTaq* polymerase (Takara, Japan)로 하였다 (14  $\mu$ l final). Thermal Cycler <sup>®</sup>480 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 변성 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 35 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초로 35회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다.

반응이 끝난 시료는 7 $\mu$ l 씩 각각 취하여 1.5% agarose gel (Seakem LE agarose, FMC, USA)에서 100 volt로 약 25 cm 전기영동 후 EtBr로 염색하였다. Polymorphic band들은 특이band의 유무 (Dominant marker scoring: present = 1, absent = 0)에 따라 확인하였고, 각 polymorphic marker의 구분은 사용한 primer의 이름과 증폭산물의 크기 (bp)를 함께 표시함으로 나타내었다.

## 제2항 AFLP 분석

효율이 매우 떨어지는 RAPD를 보완하고 추가적인 polymorphism을 확인하기 위하여 AFLP기법을 수박 및 호박 농우line들에 대해서 적용하였다. 분석은 AFLP Analysis System I™ kit (Life Technologies, USA)를 이용하여 Vos et al. (1995)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다.

첫째 단계로, sample DNA의 제한효소 절단과 adaptor ligation은 250 ng의 genomic DNA에 *EcoRI* /*MseI* digestion cocktail [1.25 U/μl each enzyme in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 50% (v/v) glycerol, 0.1% Triton-X 100]를 2 μl 첨가 시킨 후, 5X reaction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM Mg-acetate, 250 mM K-acetate] 5 μl를 추가하고, 3차 증류수로 총 volume을 25 μl로 맞추어 실시하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 70°C에서 15분 동안 처리하여 제한 효소들을 heat-inactivation시켰고, adaptor ligation cocktail [*EcoRI* /*MseI* adaptors (*EcoRI*; 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' + P-5'-AATTGGTACGC AGTCTAC-3', *MseI*; 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' + P-5'-TACTCAGGACTCAT-3'), 0.4 mM ATP, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Mg-acetate, 50 mM K-acetate] 24 μl 와 adaptor ligation cocktail [T4 DNA 1 unit/μl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 50 mM KCl, 50% glycerol (v/v)] 1 μl를 첨가하여 20°C에서 3시간 동안 처리하였다.

둘째 단계로, pre-amplification은 TE buffer (pH 8.5)로 1/10 희석시킨 ligation product 5 μl를 주형으로 50 μl조건에서 반응시켰는데, primer 농도 (10pmol each)를 제외한 모든 조건은 RAPD와 동일하였다. PCR은 Gene Amp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, USA)을 이용하였으며, 총 20 cycle을 95°C 10초, 56°C 30초, 72°C 1분 실시하였다.

셋째 단계로, selective amplification은 TE buffer (pH 8.5)에 1/50로 희석된 pre-amplification산물 2 μl를 주형으로 사용하였고, 30 ng의 selective primer (Bioneer, Korea)로 증폭하였다. Selective primer는 *EcoRI* 및 *MseI* adaptor 양 말단 2개 서열에 대해서 완전 임의적 염기배치를 통하여 8개씩 (2 x 4)을 합성하여 총 64조합의 primer set이 형성되도록 하였다. PCR 반응은 pre-amplification과 동일한 조건으로 Gene Amp® PCR System 9600을 이용하였다 [touch-down PCR 14 cycles; 95°C 10초, 65°C → 58°C ( $\Delta = -0.5^\circ\text{C}/\text{cycle}$ ) 30초, 72°C 1분 30초, normal PCR 25 cycles; 95°C 10초,

58℃ 30초, 72℃ 60초, Final extension 72℃ 5분].

AFLP product는 sequencing gel [6% polyacrylamide (19:1, acrylamide: bis-acrylamide), 7 M Urea]에 전기영동 (80W constant)후 Silver Sequence™ staining reagent (Promega, USA)로 염색하여 관찰하였다. Polymorphic band들은 특이band의 유무 (Dominant marker scoring: present = 1, absent = 0)에 따라 확인하였고, 각 polymorphic marker의 구분은 specific amplification에서 적용된 primer의 조합 (표 3)과 증폭산물의 크기 (bp)를 함께 표시하여 나타내었다.

### 제3항 Polymorphic RAPD와 AFLP산물들의 cloning 및 염기서열 분석

RAPD 및 AFLP에서 확인된 특이 band는 농우계통에서 elution하였고, cloning하였다. 각 특이 band의 크기를 면밀히 검토하여 기록하고, 최대한 앞쪽 계통들에서 elution함으로써 염기분석 결과를 일관성 있게 축적하였다 (표 1 및 표 2 참조).

RAPD 특이 band는 agarose gel에서 오려내어 glassmilk (GeneClean® kit, BIO 101, USA)와 침전 상승제인 glycogen (0.1µg/elution, MRC, USA)을 이용하여 회수하였다. AFLP 특이band는 silver-staining 된 gel에서 오려내어 50 µl의 증류수에 10분간 37℃에서 처리하고, 원심분리하여 상등액을 완전히 제거하였다. 여기에 30 µl TE buffer (pH 8.5)를 첨가하여 37℃에서 8시간 동안 (overnight) 처리하여 DNA가 추출되도록 하였다. 3 µl를 주형으로 *rTaq* polymerase과 selective amplification에서 사용되었던 primer 조합을 그대로 적용하여 PCR 재증폭을 실시하였다. 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr염색하여 target band가 재증폭 되었는지를 확인하였다.

회수된 RAPD 및 재증폭된 AFLP band들은 pGEM-T® Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 T-A cloning하였고, Top 10 cell (Invitrogen, USA)에 transformation하였다. E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I을 이용하여 plasmid를 추출하였고 ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer에 전기영동 실시하고 ABI PRISM™ 310 Data Collection (version 1.0.2)과 Chromas (<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>; version 1.43) software를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

## 제5절 추가적인 defined element 확보

### 제1항 수박 retrotransposon semi-library 구축

농우종묘 수박 1번 계통에 대해서 Suoniemi et al. (1998)이 제시한 degenerate primer조합 (Forward; 5'-GTITAWYKTIGAYGAYRTIYTIRT-3', Reverse; 5'-ICKYTCISWYTGICCRT-3')을 이용하여 Gypsy type retrotransposon (Hirochika et al., 2000) 중 Reverse Transcriptase coding region과 Integrase coding region의 경계부위를 증폭하였다. PCR은 100 ng의 DNA를 주형으로 사용하였고, 각각 primer는 50 pmol을 사용하여 1X PCR buffer와 150  $\mu$ M 각 dNTP 및 1 unit의 *rTaq*을 넣어 final 50  $\mu$ l로 Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9600를 이용하여 PCR을 실시하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 초기 5분간 처리한 후, 95 $^{\circ}$ C 10초, 56 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 순서로 30 cycle을 실시한 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하였다. PCR 산물은 pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 T-A cloning하였으며, JM 109 (Promega, USA)에 transformation하였다. Plasmid 추출 및 염기서열 분석은 위 제 4절 3항에 제시된 방법과 동일하게 실시하였다.

### 제2항 수박 SSR sequence의 확보

Reperetive sequence type 중 microsatellite (혹은 SSR; simple sequence repeats)는 chromosome 전반에 고루 퍼져있으며 고도로 polymorphic하다는 점 등에 착안하여, Maughan et al. (1995), Russell et al. (1997), 그리고 Jarret et al. (1997) 등은 각각 보리품종, 대두 및 야생대두 품종, 그리고 수박 품종 등에서 합성한 SSR-PCR primer 조합을 이용하여 각 유전자좌 내에서의 대립유전자의 종류를 판단하고, 이에 근거해서 품종간 연관정도를 추정하였다.

본 연구진은 Jarret 박사로부터 50개의 putative SSR clone들의 염기서열 (unpublished data)을 양도 받았고, 이를 이용하여 SSR-PCR primer 조합을 추가로 작성하였다.

### 제3항 cDNA 합성과 EST clone 확보 및 3'-UTR 염기서열 분석

수박 F<sub>1</sub> 품종인 '럭키'의 유묘에서 total RNA를 추출하여 mRNA를 정선하고 cDNA library를 합성하였다. 704개 clone에 대하여 random sequencing을 실시하였으며, 이중 399개의 EST들이 다른 생물종들에서 확인된 유전자들과 고도의 유사성을 보이는 것을 확인하였다. 확인된 유전자들의 기능을 중심으로 10개의 EST군(category)으로 세분화 하였다 (Ok et al., 2000). 모든 정보들은 GenBank에 등록하였으며, 총괄연구책임자의 홈페이지에도 게재하였다 (<http://web.korea.ac.kr/~biotech/jsshin/>).

EST clone의 확보를 위한 염기서열분석은 5' 쪽에서만 실시되어 databasing 되었기 때문에, EST-derived STS-PCR primer 조합을 합성하기 위해서 3' 쪽에서의 염기서열 분석을 399개 clone (다른 생물종들에서 확인된 유전자들과 고도의 유사성을 보이는 것들) 중에서 선택하여 추가로 실시하였다.

### 제4항 호박 Active genome region-enriched semi-library 구축

농우종묘 호박 1번 계통의 DNA 1 µg을 methyltion insensitive endonuclease인 *EcoRI*과 sensitive endonuclease인 *HpaII*로 절단하였다. 절단 산물을 agrose gel에 전기 영동하여 200 bp ~ 1 kb 부위를 오려내고, DNA를 glassmilk (Geneclean® kit, BIO 101, USA)와 침전 상승제인 glycogen (0.1 µg/elution, MRC, USA)을 이용하여 회수하였다. pGEM3zf(+) (Promega, USA)를 *EcoRI*과 *AccI* (*HpaII*와 절단부위에서 상보적 염기서열)으로 절단하고 전기영동하여 완전히 절단된 plasmid 만을 회수하였다. 위 두가지 산물을 T4 DNA ligase (NEB, UK)를 이용하여 ligation하고, Top 10F' (Invitrogen, USA)에 transformation하였다. Plasmid 추출 및 염기서열 분석은 제 4절 3항에 제시된 방법과 동일하게 실시하였다.

## 제6절 Specific primer 조합의 합성 및 F<sub>1</sub> 품종에 대한 적용

### 제1항 Primer 합성 및 'Source' DNA에 대한 재적용

clone의 염기서열 분석으로 'defined element'를 확보하고 specific primer 조합의 합성을 위하여 사용하였던 DNA source들은 다음과 같다. 1) 수박 및 호박 농우계통들에서 확인된 RAPD 및 AFLP polymorphic band들 (WR-, SR-, WA-, 그리고 SA- primer group들), 2) 수박 F<sub>1</sub> 품종인 '럭키'의 EST clone 일부분에 대해서 3'-UTR region 추가 염기서열 분석이 완료된 것들 (WE- primer group), 3) 수박 농우계통 1번의 genomic DNA를 재료로 구축된 retrotransposon semi-library의 일부 clone들 (WreT- primer group), 4) 호박 농우계통 1번의 genomic DNA를 재료로 구축된 active genome-enriched semi-library의 일부 clone들 (SGm- primer group), 그리고 5) Jarret et al.로부터 양도받은 수박 SSR clone들의 염기서열 (WM- primer group).

모든 primer들은 internet site인 'Primer Design Application (<http://www.williamstone/primers/javascript/>)'를 통하여 18 mer ~ 22 mer로 합성되었다 (Bioneer, Korea). 합성된 specific primer 조합들은 염기서열분석에 사용한 plasmid에 먼저 적용하여 정확한 크기의 증폭산물이 증폭되는지를 재확인하였고, 다음에는 source DNA를 제공한 재료의 genomic DNA에 적용하여 비특이적 증폭산물의 유무 및 그 증폭정도를 확인하였다. 단, WM- primer group에 속하는 조합들은 양도받은 염기서열을 이용하여 제작하였기 때문에 직접 확인이 불가능 하였다.

### 제2항 F<sub>1</sub> 품종에서의 'One primer set' - 'One PCR product'를 위한 조건 동정

과제의 성공적 수행을 위해, 1) 각 primer 조합이 특정 유전자좌의 대립유전자를 정확히 표지하여 (specific allele tagging) 증폭산물을 생산하도록 하고, 2) 모든 가용 방법들로 분석하여 비교하고, 3) 재현성이 강조된 신뢰성 높은 자료의 규합을 통하여 각 품종을 구분할 수 있는 기법을 확립하는데 중점을 두었다.

합성된 각각의 primer 조합을 최적조건으로 적용하기 위해서는, primer annealing 온도의 설정이 중요하다. 그러나, 시간적, 인력적 효율을 감안할 때, 양쪽 primer Tm값의 차이 및 재료 식물의 염색체 조성 특성 등 적정 온도설정에 영향을 미칠 수 있는 많은 변수를 모두 고려해서 검사대상의 재료가 바뀔 때마다 primer 조합의 최적 반응조건을 확립하는 것은 매우 비효율적이다. 따라서, 모든 PCR 반응의 보편성이 강조되면서도 비특이적 증폭산물 출현 정도가 억제되는 조건을 확립하는데 주력하였다. 첫째, 비특이적 증폭산물의 과도한 출현을 억제하기 위하여, 모든 PCR은 'touch-down'으로 실시하였다. 둘째, 많은 primer 조합 적용에 있어서 보편성과 일관성을 확보하기 위하여 3가지의 온도 범위 (45°C ~ 50°C, 50°C ~ 55°C, 55°C ~ 60°C)만 적용하였다.

합성된 primer 조합을 모든 F<sub>1</sub> 품종들 (수박, 호박 각각 24개 계통들)에 적용하기에 앞서, 임의로 선택된 4개의 F<sub>1</sub> 품종들에 대하여 위에서 언급한 두 가지 측면을 먼저 확인하였다. 반복실험에서 비특이적 증폭산물의 출현 정도가 높거나, 증폭산물의 재현성이 떨어지는 primer 조합들은 차후 모든 F<sub>1</sub> 품종들에 대한 적용에서 제외시켰다. 가장 많은 수의 primer 조합들이 55°C → 50°C ( $\Delta = -0.5^\circ\text{C}/\text{cycle}$ ) 조건에서 양호한 증폭산물이 확인되었다. 그러므로 기본적인 PCR 반응은 Gene Amp® PCR System 9600을 이용한 touch-down PCR로 10 cycles [95°C 10초, 55°C → 50°C ( $\Delta = -0.5^\circ\text{C}/\text{cycle}$ ) 30초, 72°C 40초]을 실시하고, normal PCR로 20 cycles [95°C 10초, 50°C 20초, 72°C 40초]과 final extension 72°C 10분을 10 pmol의 각 primer로 50 µl volume으로 실시하였다 (reaction buffer 및 dNTP 농도, 그리고 Taq polymerase는 상기에 언급한 PCR 조건과 동일).

PCR 완료 후 8 µl를 취하여 Protein® II xi Cell (BIO-RAD, USA)에서 5% non-denaturing acrylamide gel (29:1, acrylamide : bisacrylamide stock)에 loading 하여 300 volt로 90분간 전기영동 하고 EtBr로 염색 시켰다. 엄정한 PCR 증폭산물의 판정 (band 유무 판단 및 증폭산물의 크기 측정 등)을 위하여 resolution power가 떨어지는 agarose gel은 사용하지 않았으며, 모든 polyacrylamide gel에는 한가지 종류의 DNA size marker만을 (100 bp size marker ; Promega, USA) 사용하였다.

### 제3항 선택된 primer 조합들의 F<sub>1</sub> line 적용

수박 및 호박 F<sub>1</sub> 계통들 중에서 임의로 선택된 4개 계통을 통한 primer screening이 완료된 후, 전체 24개 F<sub>1</sub> 계통들에 대해 specific primer 조합으로 genotyping을 실시하였다. 제 2항에서 언급된 PCR 반응 조건 및 전기영동 조건을 그대로 적용하였고, 증폭 산물들은 먼저 증폭에 사용된 specific primer 조합의 이름과 증폭산물의 크기를 함께 기록하여 유전자좌 (locus)를 구분하였다. 각 유전자좌를 대상으로 품종간 변이 (different alleles)를 증폭산물의 존재 유무로 기록하였다 (1 = present, 0 = absent). 공우성 (codominant)으로 관찰되는 증폭 산물들은 품종간 유전적 유사성 (genetic similarity)을 추정하기 위해 각각 다른 allele로 구분하여 기록하여 이용했으며, 별도로 공우성 marker임을 명기하였다. Microsatellite의 copy number차이로 인한 polymorphism은 5% non-denaturing polyacrylamide gel (약 5 bp의 resolution power)로도 확인하기 어려운 경우가 있다. 따라서 5% non-denaturing polyacrylamide gel에서 monomorphism을 보이는 증폭산물들은 다시 standard sequencing gel [6% polyacrylamide (19:1, acrylamide: bis-acrylamide), 7 M Urea]로 재차 전기영동하고 silver-staining으로 염색하여 해당 locus안에서의 polymorphism 존재 유무를 추가로 확인하였다.

### 제4항 제한효소를 이용한 monomorphic PCR product의 절단

Specific primer 조합을 이용한 PCR 증폭산물은 primer binding site의 염기서열에 따라 결정되기 때문에, 각 primer에 의해 제한된 genomic DNA부위 안에서 커다란 수준의 삽입 (addition) 혹은 결실 (deletion)이 일어난 경우 (공우성 marker)와 primer binding site에서의 mutation이 일어난 경우 (우성 marker)만이 겹상에서 구분이 가능한 polymorphism이다. 증폭산물 내부에 잠재된 polymorphism (SNP)을 추가로 확인하기 위해서 monomorphism을 보이는 PCR 산물들을 제한효소로 처리하였다. 제한효소를 이용하면, polymorphism을 추가로 발견할 수 있다는 점 이외에도, specific primer조합으로 증폭된 산물들에 보다 정교한 정보를 추가할 수 있다는 장점이 있다. 제한효소는 DB 구축의 일관성을

위하여 'frequent cutter'중에서 4가지를 선택하여 사용하였다 (*RasI*; GT<sup>^</sup>AC, *HinfI*; G<sup>^</sup>ANTC, *HaeIII*; GG<sup>^</sup>CC, *AluI*; AG<sup>^</sup>CT) (Bioneer, Korea). Monomorphic band가 전기영동에서 확인되면, PCR 산물 10  $\mu$ l를 5 unit의 각 제한효소를 첨가한 후 [10  $\mu$ l of PCR product + 5  $\mu$ l of digestion cocktail (1X final digestion buffer supplied from the company, 5 unit of restriction enzyme)], 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리하였다. 절단산물은 제 2항에서 언급한 방법을 그대로 적용하여 전기영동하고 절단산물의 크기를 100 bp size marker에 의거 측정하여 기록하였다. 제한효소를 적용하기 전에 미리 증폭산물 중 'target band'를 지정하였고, 절단산물들의 크기의 합이 이 target band와 반드시 일치할 때만 분석하였기 때문에 재현성이 떨어지는 minor band가 절단되어 나타나는 polymorphism을 구분할 수 있었다. 단 몇 개의 F<sub>1</sub> line (1 ~ 4개 line)에서 증폭산물이 없음으로 인해 polymorphism (dominantly scored PCR products)이 관찰되는 유전자좌들 역시 제한효소를 처리하여 추가적인 polymorphic allele를 찾아보고자 시도하였다. 이 경우에는 PCR 증폭산물이 확인되지 않은 line들 ('0'; absent in the loci scored dominantly)을 'null allele'로 처리하여 각 품종의 유전적 유사성 (genetic similarity)정도를 측정하기 위한 raw data에서 'missing data'로 간주하였다.

#### 제5항 모든 정보의 규합을 통한 개체지향적 DB의 구축

연구과제의 일차적 목표는 DNA marker를 이용한 실질적이고 체계적인 품종구분 및 관리체계의 모델을 제시하는데 두었으며, 개발되어진 DNA marker들은 단 한 개 혹은 몇 개의 문제시되는 품종들에 대해서만 제한적으로 적용된다는 현실적 상황을 고려하였다. 따라서 연구수행의 결과를 횡적개념 (분석한 수박, 호박 각각의 24개 line들의 동시관찰을 통한 polymorphism 비교)으로 규합하기 보다는 관찰된 PCR 증폭산물 및 제한효소 처리를 통한 절단산물들의 크기를 각 line별로 규합하는 종적개념, 즉 개체지향적 자료 규합에 중점을 두었다. DNA marker를 이용한 품종 구분의 재현성 및 보편성을 강조하기 위하여 모든 primer 조합들을 'defined elements'로부터 합성하여 적용 (specific allele tagging)함으로써 'One primer set' - 'One PCR product'를 기준으로 하는 분석체계를

강조하였다. 모든 결과는 반복적으로 재확인 하였으며, 각 F<sub>1</sub> line별로 규합하였다. 원활한 자료의 공유 및 공정성을 높이기 위해 실질적 분석 자료인 모든 gel image 및 규합된 분석표들을 web site에 등록하여 공개하였다.

국내에서 생산되어 판매되는 수박 및 호박 품종들의 유전적 다양성에 대한 고찰 또한 본 연구과제를 통하여 가능하였다. 종묘회사 한 곳의 수박 및 호박 F<sub>1</sub> 품종을 선택하는 대신에 주요 종묘회사에서 개발된 품종들을 골고루 포함하려고 노력하였다 (표 1 및 표2 참고). 증폭산물 및 제한효소 절단산물들의 유무 (present-absent)로 기록된 자료를 바탕으로 실험재료로 사용된 상용 수박 및 호박 각각 24개 F<sub>1</sub> 품종에 대해서 유전적 다양성을 측정하였다. Genetic similarity는 Nei와 Li (1979)의 방법으로 계산하였고, Cluster analysis는 computer software인 NTSYS (Rohlf, 1993)를 이용하여 UPGMA method로 분석하였다.

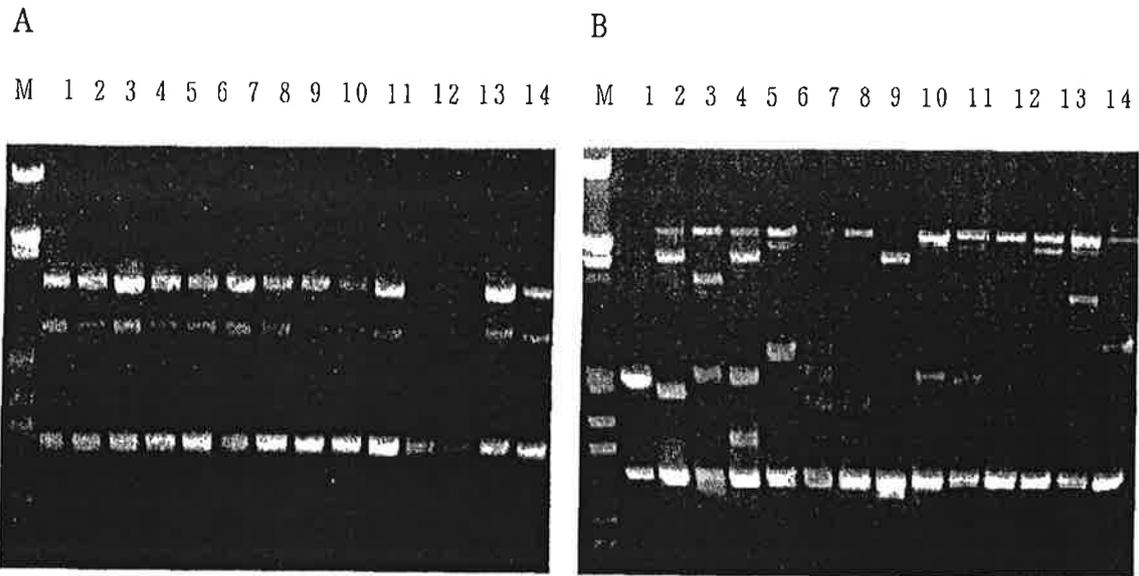
## 제 4 장 농우종묘 line을 이용한 'undefined elements' 분석 (RAPD, AFLP)

### 제1절 서설

농우 종묘에서 제공된 수박 및 호박 각각 14개 line들의 genomic DNA를 사용하였다. RAPD 및 AFLP기법을 이용하여 전체 genomic DNA로부터 polymorphism을 확인하고, 해당 특이band를 T-A cloning하여 염기서열을 분석함으로써, line간 polymorphism을 생성하는 미지의 genomic DNA 부위 (undefined elements)를 specific primer 조합을 이용 (defined elements)하여, 동일한 genomic DNA부위를 재현성 높게 재증폭할 수 있게 하는 것이 본 장의 기본 취지이다.

### 제2절 RAPD 분석

수박 및 호박 농우 line들에 대해 각각 55개 및 35개의 UBC primer (10-mer random primer)들이 적용되었다. 그림 1에서 보는 바와 같이 수박에서는 polymorphism을 확인하기가 매우 어려웠다. 55개의 random primer 중에서 단 6개만이 polymorphic band를 나타냈으며, PCR 기계가 바뀌거나 시료조성 (특히 *Taq polymerase*)이 변할 때마다 각기 다른 band scoring 결과를 나타내었다. 상당히 많은 수의 계통별 특이적 증폭산물이 확인된 호박의 경우에는 무엇보다도 증폭산물이 하나의 유전자좌 (locus)에서 기인된 것인지를 판단하기가 거의 불가능하였다. 예를 들면, 그림 1 Panel 2 (호박 RAPD)에서 젤의 상단과 중간부위에서 양호한 polymorphism이 확인되고 있으며, 같은 크기의 band들이



**Figure 1.** Examples of RAPD products with 14 Nong-Woo watermelon and squash lines described in Table 1. M indicate DNA size marker ( $\lambda$  DNA/ *EcoR* I + *Hind* III) and numbers indicate accession ID. **Panel A.** PCR products of 14 Nong-Wu watermelon lines with UBC promoter #35 resolved in 1.5% agarose gel. All products are monomorphic. **Panel B.** PCR products of 14 Nong-Woo squash lines with UBC primer #19 resolved in 1.5% agarose gel. The products are differently sized (polymorphic).

dominant type로 scoring될 수 있는 것처럼 보인다 (즉, 하나의 locus에서의 heterogeneous한 alleles). 그러나 증폭에 사용된 primer 이름과 증폭산물의 크기를 이용하여 각 line을 scoring할 때는 상당한 어려움이 있었다. 주된 이유로 agarose gel의 낮은 resolution power를 들 수 있는데, 수십 bp차이를 뚜렷이 구분하기 어렵고 전혀 다른 유전자좌들의 대립유전자들이 각 line에서 서로 비슷한 증폭산물을 생성하는지에 대한 판단이 쉽지 않았다. 이러한 문제들은 각 line의 증폭산물을 따로 elution하여 염기서열을 분석한 결과, 서로 판이하게 다른 염기서열을 보여 heterogeneous하다는 것을 쉽게 판단할 수 있었다. 결론적으로 수박은 너무 낮은 polymorphism level때문에, 호박은 agarose gel이 지니는 낮은 band resolution power때문에 RAPD기법을 이용한 'defined elements'의 확보가 어렵다고 판단되었다. 증폭 산물을 높은 resolution power를 지니는 5% non-

denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 분리 하였지만, 낮은 annealing 온도(35°C)로 인한 과도한 비특이적 증폭산물이 오히려 정확한 band scoring을 저해하였다.

각 line에서 특이적으로 증폭된 band를 cloning하여 분석한 결과, 많은 경우에 같은 band에서 파생된 plasmid들이 서로 다른 염기서열을 지닌다는 것을 발견할 수 있었다. 한 개의 line에 특이적 band의 염기서열을 기준으로 다른 line들에 대하여 제한효소를 적용하였을 때 쉽게 관찰되는 'incomplete digestion' 현상으로도 같은 크기의 'heterogeneous PCR products'를 확인할 수 있었다. 이것은 젤에서 elution된 하나의 RAPD band가 여러 부위의 genomic DNA에서 동시에 증폭된 산물임을 의미하는 것으로서 AFLP기법의 selective amplification (보통 분석대상의 1/64 만을 선별적으로 증폭함) 절차가 없는 RAPD기법이 지니는 단점이라고 볼 수 있었다.

총설에서 자세히 언급될 것이지만, 특이적 증폭산물의 cloning을 통한 RAPD polymorphic band들의 'defined elements'로의 전환 효율은 그 신빙성이 매우 낮을 뿐만 아니라, 전환된 STS-PCR primer조합으로 genomic DNA 전체수준에서 발견된 계통간 polymorphism이 제차 확인되는 경우는 극히 드물었다.

### 제3절 AFLP

농우종묘 수박 line들에 대해서는 총21개 (표 3), 농우종묘 호박 line들에 대해서는 총12개 조합 (표 4)의 selective primer set들로 AFLP를 실시하였다. RAPD의 경우와는 달리, standard sequencing gel을 이용했기 때문에 informative AFLP의 scoring은 비교적 쉽게 이루어질 수 있었다 (표 A-3, 표 A-4). 그러나 RAPD에서 관찰된 바와 같이, 농우 수박 line들에서 polymorphic band의 확인은 호박에 비하여 매우 낮은 효율을 보였다. 수박은 총 21개 primer 조합이 적용되어 70개의 polymorphic band (3.3 informative AFLPs per primer set; 표 3)를 확인하였음에 반해, 호박은 단 12개의 primer 조합을 통하여 277개의 polymorphic

band (23.1 informative AFLPs per primer set; 표 4)를 확인할 수 있었다. 수박의 AFLP들은 주로 매우 강한 PCR products로 이루어져 있으며, polymorphic band의 빈도는 매우 낮았다 (그림 2).

**Table 3.** AFLP primer combinations generating polymorphic products among watermelon cultivars tested after *EcoRI*/*MseI* Enzyme digestion, distribution of AFLP markers' primer combination, and the number of AFLP markers converted into STS-PCR primer sets (WA-)

Primer Combination 3'-selective nucleotides		Number of polymorphic bands	WA- (%) <sup>a</sup>	
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>			
AAC	CAG	5	1	20
AAG	CAG	2	2	100
ACA	CAC	1	1	100
ACA	CAT	4	4	100
ACA	CTG	1	1	100
ACC	CAA	1	.	0
ACC	CAC	5	2	40
ACC	CAG	1	.	0
ACC	CAT	2	2	100
ACC	CTT	1	1	100
ACG	CAA	2	2	100
ACG	CAC	2	2	100
ACG	CTC	1	1	100
ACT	CTA	4	4	100
ACT	CTG	1	1	100
AGC	CTA	4	3	75
AGC	CTT	1	.	0
AGG	CAC	6	4	67
AGG	CAT	3	.	0
AAG	CAA	5	3	60
ACA	CTT	4	1	25
Total		70	35	
Average		3.3	1.7	

<sup>a</sup> The number of primer sets displayed clear PCR product during replicated applications on F<sub>1</sub> lines (Group II in Table 1). Conversion ratio is expressed with percent(%).

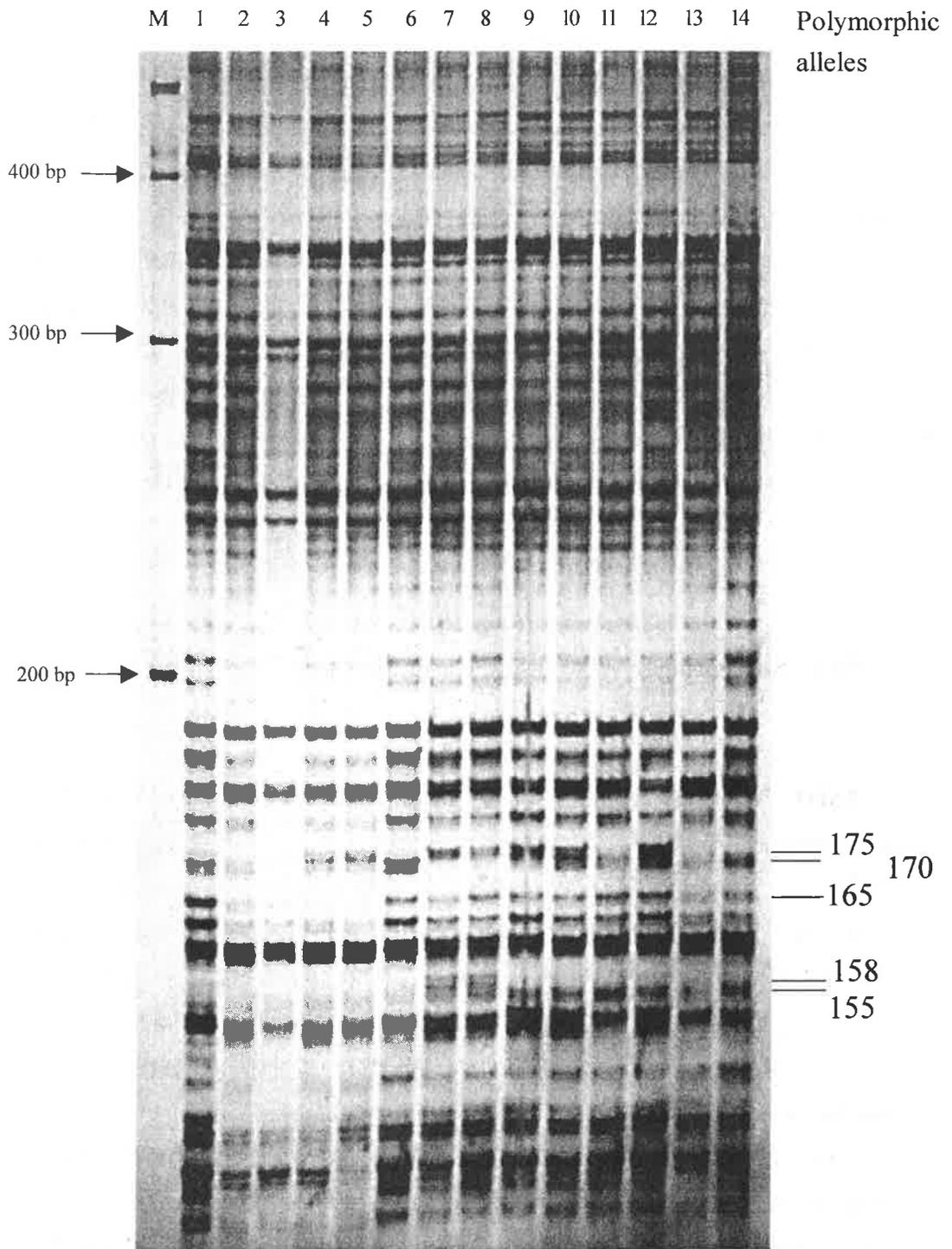
**Table 4.** AFLP primer combinations generating polymorphic products among squash cultivars tested after *EcoRI*/*MseI* enzyme digestion, distribution of AFLP markers' primer combination, and the number of AFLP markers converted into STS-PCR primer sets (SA-)

Primer Combination 3'-selective nucleotides		Number of polymorphic bands	SA- (%) <sup>a</sup>	
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>			
AAC	CTG	20	3	15
AAG	CAT	21	3	14
ACA	CAG	28	4	14
AAC	CTA	27	2	7
ACG	CAG	26	1	4
ACG	CAT	24	4	16
ACG	CTG	25	1	4
ACT	CAT	26	1	4
ACT	CTC	18	3	17
ACT	CTT	24	3	12
AGC	CAT	20	5	25
AGG	CTG	18	3	17
Total		277	33	
Average		23.1	2.8	

<sup>a</sup> The number of primer sets displayed clear PCR product during replicated applications on F<sub>1</sub> lines (Group II in Table 2). Conversion ratio is expressed with percent (%).

반면에 호박은 매우 높은 빈도로 AFLP들이 품종간 polymorphism을 나타내었다. 그러나 호박의 band screening data (표 A-4)를 살펴보면 그림 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 14개의 line들이 뚜렷한 3개의 group을 형성하고 있으며, polymorphic AFLP들이 group간 polymorphism을 표현하는 경향이 매우 높으며, 한 group 내에서는 수박 AFLP 산물들 (표 A-3)과 마찬가지로 line간 고도의 유사성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

각 informative AFLP들은 염기서열 분석 데이터의 효율적 관리를 위하여, 특정 line에 한정하여 band elution을 실시하였다. 수박의 경우, 총 7개 line (line I.D 1번, 2번, 3번, 4번, 6번, 7번 및 9번)에서 band를 elution하였으며 (표 1 참조), 호박은 총 6개 line에서 (line I.D 1번, 2번, 7번, 8번, 9번 및 12번) elution하였다 (표 2 참조).



**Figure 2.** All Example of AFLP products of 14 Nong-Woo watermelon lines described in Table 1. Polymorphism was detected by a primer combination, E-ACT/M-CTA (See Table 3) and assigned with a number to each polymorphic band according to its migration distance. Note the level of polymorphism is very low. AFLP products were separated on a standard Sequencing Gel and visualized with Silver staining.

호박에서 발견된 polymorphism 정도가 훨씬 높았음에도 불구하고, 수박보다도 적은 6개 line들만으로도 모든 informative AFLP를 표지 할 수 있다는 점에서 호박의 AFLP source는 각 line들의 SNP라고 보기 보다는 'Group'간 차이라는 것을 강하게 의미한다. 그러나 이러한 설명만으로는 농우 수박 line들이 AFLP 젤상에서 보이는 line간 고도의 유사성을 설명하기 어려운 면이 있다. 아마도 수박 genomic DNA가 지니는 복잡성 혹은 실험상의 오류 등 2차적 요인을 고려해야 할 것으로 사료된다. 종자관리소의 자료에 의하면, F<sub>1</sub> line들의 품종구분을 위한 무 및 배추의 AFLP결과와 고추의 AFLP결과를 비교할 때, 고추의 data quality가 무, 배추에 비해 상당히 떨어지며, band scoring이 가능한 AFLP들도 극히 제한되었다고 한다 (personal communication). 본 실험에서의 수박과 호박에서 나타난 AFLP 산물의 차이도 이와 상당히 유사한 경향을 보였다.

#### 제4절 Sequencing을 통한 STS-PCR primer 합성

RAPD 및 AFLP 기법은 미지의 DNA (undefined elements)를 대상으로 polymorphism을 확인할 수 있는 보편적인 방법이다. 이 두 가지 기법은 품종간의 변이 정도 및 새로운 우수 F<sub>1</sub> 품종개발을 하기위한 원연 관계의 양친 선정 등에는 별다른 수정없이 적용될 수 있다. 그러나 재현성 및 확인과정의 단순성과 보편성이 강조될 수 밖에 없는 특정 품종의 구분에는 쉽게 적용될 수 없다. 가장 큰 이유로, 2장에서도 언급되었듯이, 높은 재현성이 보장되지 못한다는 점을 들 수 있다. 재현성을 확보하기 위한 1차적 방안으로 염기서열을 근간으로 하는 specific primer조합의 합성을 시도하였다.

수박 및 호박의 RAPD에서의 specific primer합성은 제 1절에서 언급된 이유들로 인하여 전반적으로 실시하지는 않았다. 수박 및 호박에서 각각 2개 및 3개의 primer 조합을 합성하여 genomic DNA를 주형으로 STS-PCR을 실시하였으나, 그 증폭산물이 매우 다양한 하였기 때문에 제 6장에서 기술할 상용 F<sub>1</sub> 품종의 적용은 시도하지 않았으며, 본 연구보고서에서도 제외하였다.

**Table 5.** STS-PCR primer sets converted from polymorphic AFLP bands of 6 Nong-Woo watermelon lines<sup>a</sup>

Primer Name	Primer Sequence		Exp. <sup>b</sup> Size (bp)	Used to screen 24 F <sub>1</sub> lines <sup>c</sup>
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
WA001	TTAACTAACTTAGCAAAA	GAATTCAJTGAGTTAGCC	175	○
WA002	TTAACTAAATCTTTAGGA	GAATTCAGCCAAGTCAAC	195	
WA003	TTAACACAACCTCCAAAT	GAATTCACGCTGAATATG	240	
WA004	TTAACACCATTCAATTTCA	GAATTCACGTTACCAAAA	300	
WA005	TTAACATAATGATTGCC	GAATTCACACCAAGATAA	205	○
WA006	TTAACATAGGGTAGATTG	GAATTCACCCGACCCGAT	185	○
WA007	TTAACTAGACGGGACTGT	GAATTCAGCATTCTAGCA	165	
WA008	TTAACTAGGTAGATACAA	GAATTCACTTGAACTGCA	170	
WA009	TTAACAAAAAAAACGCAG	GAATTCACGCAAAACTCG	210	
WA010	TTAACTAGAAGACAGTGC	GAATTCAGCACTGACTAG	210	○
WA011	TTAACTCGCAAGCCCTCT	GAATTCACGGAGCTAACG	120	○
WA012	TTAACATCATAATTACTT	GAATTCACAAAAGTTTAA	125	
WA013	TTAACTTGGGTAGATTGA	GAATTCACCCGACCCGAT	195	○
WA014	TTAACACGAAGAAGGTGT	GAATTCACGGAACATTCA	320	○
WA015	TTAACAGAGTAACAAGCA	GAATTCACATAAACTAC	160	○
WA016	TTAACACAGCCATTATTT	GAATTCACCTTTAGATCG	185	
WA017	TTAACACAAAATGCATCA	GAATTCAGGAGGCGTGGA	105	
WA018	TTAACACGGTTGTACTAA	GAATTCAGGGAAGCCGCA	140	
WA019	TTAACATCTAAGGACATC	GAATTCACAGAAAATGAC	200	
WA020	TTAACATGAAGAAGGTGT	GAATTCACAGAACATTCA	270	○
WA021	TTAACATAATATTGATG	GAATTCAGTTCCAGTTA	210	
WA022	TTAACATAGACGAGCGA	GAATTCAGCAATGATCT	150	
WA023	TTAACTGGCAAGAAACCC	GAATTCACTTCCTATTCT	150	
WA024	TTAACACCGCTGAAGGGA	GAATTCACAAACCTTCAA	100	
WA025	TTAACTTACTGACCTCAA	GAATTCACAAGAGAAGGT	210	
WA026	TTAACTGGCAAGAAACCC	GAATTCACAACCTCACCTT	190	○
WA027	TTAACTAAAAGTGAGC	GAATTCAGGGATGCCCTT	150	○
WA028	TTAACACAAAGGGATAAA	GAATTCACCCAATTTATG	190	○
WA029	TTAACATGGAGAAACACT	GAATTCACCAAACGAAAA	200	
WA030	TTAACAGTGATATAAAGA	GAATTCAGGACACAGTT	170	
WA031	TTAACAGTGATATAAAGA	GAATTCAGGACACAGTT	90	
WA032	TTAACATAGATGAGCGG	GAATTCAGCAAAGACCT	150	
WA033	TTAACACAGGCACACTAA	GAATTCAGGGAGAGATGG	110	
WA034	TTAACTAGCAAGAAACCC	GAATTCACTYCCTATTCC	165	
WA035	TTAACTGGCAAGAAACCC	GAATTCACTTCCTATTCT	170	○
35	Total			13 (37%)

<sup>a</sup> Six Nong-Woo lines were used for band isolation and sequencing (see table 1).

<sup>b</sup> Expected PCR band size estimated depend on the sequences of clones.

<sup>c</sup> Only the primer sets showing very good replicated PCR results were tested for 24 F<sub>1</sub> lines in Table 1. The identified loci and allele types are described in Table A-4 and Table A-6.

**Table 6.** STS-PCR primer sets converted from polymorphic AFLP bands of 4 Nong-Woo squash lines<sup>a</sup>

Primer Name	Primer Sequence		Exp. <sup>b</sup> Size (bp)	Used to screen 24 F <sub>1</sub> lines <sup>c</sup>
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
SA001	TTAACATCCTA[]ATTACT	GAATTCACGAATAGTGTT	210	
SA002	TTAACATCCCCACGAGT	GAATTCACGAAACTGAGA	195	○
SA003	TTAACGTATGGCATCAA	GAATTCAACTAACTGGG	150	○
SA004	TTAACGTAGATTCGAATC	GAATTC AACCAAATGGAA	140	
SA005	TTAACATAGCCATAGCCG	GAATTC AAGAATGCAGAA	175	○
SA006	TTAACTCATAAGGTAGCA	GAATTC ACTATCCTTTCA	215	○
SA007	TTAACATCGACAGCAGTG	GAATTCACGCAGGACAGA	230	○
SA008	TTAACATCCCTTAGGATG	GAATTC AAGAACAAAAC	195	
SA009	TTAACAGAGATCACAATG	GAATTCACAAGCCTCCAT	130	○
SA010	TTAACTGACAAGCTTCTT	GAATTC AACCATTCAGGG	130	○
SA011	TTAACTTGAAAATTCAA	GAATTC ACTTATCTGAAA	210	
SA012	TTAACATGTCTTCCTCAG	GAATTC AAGGGGAATCTA	200	○
SA013	TTAACATGATGTTTTGT	GAATTCAGCTTTAGTAG	240	○
SA014	TTAACATGTCAAAGCAGC	GAATTCAGCATTTATGTT	210	
SA015	TTAACATCAATGACAGCA	GAATTCAGCTAAA ACTGC	145	○
SA016	TTAACTGTAAGACGAAAC	GAATTCACGGTTGAGTCT	145	○
SA017	TTAACATCGCTGCGACAG	GAATTCAGCAGCGATCCC	200	○
SA018	TTAACATTTACCAGACC	GAATTCAGCTCTCCAGTC	295	
SA019	TTAACAGGAAGCCTGAAA	GAATTCACAGTGTCTACC	180	
SA020	TTAACAGCAATGACAGCA	GAATTCACAGCTGCGACC	190	
SA021	TTAACAGAACCATGTGCA	GAATTCACAAA ACTTCCA	300	
SA022	TTAACATCCTAAATTACT	GAATTCACGAATAGTGGT	190	○
SA023	CACTCTCCCGTAAAGGTC	CTTTTACTCCCCGAGAG	135	
SA024	CTCTATCCGGACTTGCTG	GGAGAACCACATTC AAAG	145	○
SA025	CGCTGTAACA ACTACAAC	GATCAATGGACGAAGTTG	100	○
SA026	GAAGCGTGGTGGTCAGCG	AATGGTAAATACCTTCGG	160	○
SA027	GGGTTGAGTCTCGGAGTG	TGTAAGACGAAATGAAAG	190	○
SA028	GTGTTAGAAAGTCAAGAC	GGTAATGGTAATGTT CAG	200	○
SA029	CCCAACCTAACCTTGATG	CACACCTAAATGCAACTG	210	○
SA030	ACGTCGCAAGGTCGATTG	GCATGATTATATCTCGAG	140	○
SA031	CCAAAGAAGGAAGCAAAG	TCTCACACCACTGAAACG	160	○
SA032	CTAATAGACGCCTGTTGG	GATAGACCCTTCTCTTCG	310	○
SA033	CAGAAATATTACAGAGCC	CAGGTGATGAAAGCTTCC	190	○
33	Total			25 (78%)

<sup>a</sup> Four Nong-Woo lines were used for band isolation and sequencing (see table 2).

<sup>b</sup> Expected PCR band size estimated depend on the sequences of clones.

<sup>c</sup> Only the primer sets showing very good replicated PCR results were tested for 24 F<sub>1</sub> lines in Table 2. The identified loci and allele types are described in Table A-5 and Table A-7.

Informative AFLP의 specific primer 조합으로의 전환에 적용한 실험기법은 제 3장 4절의 3항에서 기술하였다. 수박은 확인된 70개의 informative AFLP를 모두 회수하여 specific primer 조합으로의 전환을 시도하였다. 호박의 경우에는 각 informative AFLP들이 standard sequencing gel에서 비교적 잘 분리되어 구분하기가 용이하므로 (그림 3), AFLP 산물들 자체만으로도 충분히 안정적인 DNA marker로 사용할 수 있다고 판단되었다. 한 group에만 너무 치우치지 않도록 유의하면서 227개의 informative AFLP 중 45개에 대해서 cloning을 시도하였다.

수박의 informative AFLP들이 젤에서 상당히 강한 band로 존재하는 점에 착안하여, 하나의 cloning 산물에 존재하는 여러 colony에서 plasmid를 추출하여 상호간 염기서열을 비교한 결과 여러 개의 heterogeneous AFLP가 확인되었다 (3 AFLPs out of 10 informative AFLP-derived clones tested). 그러나 염기서열간에는 상당히 높은 수준의 homology를 나타냈기 때문에 수박에서 확인된 상당한 수의 informative AFLP들은 높은 수준의 반복적 염기서열을 보이는 genomic DNA부위에서 기인되었다고 추정할 수 있었다. 그러므로 수박 AFLP clone에서는 무작위로 한 개의 plasmid를 선택하여 염기서열을 분석하고, STS-PCR로 전환시켰다. 호박의 경우에는 수박과 달리 heterogeneous AFLP가 발견되지 않았다.

일단 specific primer 조합으로 전환시킨 후, DNA source line의 genomic DNA를 주형으로 STS-PCR을 실시하여 증폭산물이 clone size에 비추어 예상한 크기보다 전혀 다르게 나오거나 너무 다양한 증폭산물을 생성하는 조합들은 모두 제외하였다. 여러 가지 실험절차상의 오류 (band elution, AFLP specific primer set을 이용한 AFLP의 재증폭, T-A cloning 등)를 고려하더라도 안정적으로 specific primer 조합으로 전환된 AFLP의 비율은 수박 (35/70)이 호박 (33/45)에 비해 상당히 낮았다. 주된 이유로는 수박의 AFLP에서 전환된 specific primer들이 대체적으로 source DNA line의 genomic DNA에 대한 STS-PCR에서 너무 다양한 증폭산물을 생성하였던 것을 들 수 있는데, 수박 informative AFLP중 상당수가 고도의 반복적 염기서열 (highly repetitive sequences)에서 기인된 것 때문으로 사료되었다.

최종적으로 농우 수박 line들에서 관찰된 informative AFLP 중 총 35개의 specific primer 조합들 (표 3)이, 호박의 경우 33개의 조합들 (표 4)이 합성되었다. 이러한 STS-PCR primer 조합들은 WA-No. (수박), SA-No. (호박) primer group으로 명명되어, 상용 F<sub>1</sub> 품종들에 모두 적용하였다. STS-PCR primer 조합

을 합성하기 위해 염기서열 분석된 source DNA line들에 대한 정보는 표 A-3 (수박) 및 표 A-4 (호박)에 제시되어 있으며, 예상되는 증폭산물의 크기, 그리고 primer sequence들은 표 5 (수박) 및 표 6 (호박)에 자세히 명시되어 있다. 모든 informative AFLP에 대한 각 line들의 세부정보는 AFLP 젤을 image file로 전환하여 기술한 후, web site에 게재하였다.

## 제5절 총 설

미지의 genomic DNA로부터 확인되는 polymorphism으로 품종을 구분하기 위해 RAPD 및 AFLP기법을 적용할 때 고려해야 할 점은 genotyping data들이 dominant marker들로 구성된다는 점이다 (Williams et al., 1990; Tomas et al., 1995; Becker et al., 1995). 농우종묘로부터 분양받은 수박 및 호박 품종들은 그 양친 및  $F_1$  line이 명확히 제시되었음에도 불구하고, RAPD 및 AFLP의 informative band scoring data만으로는  $F_1$ 을 정확히 표현하기가 어려웠다. 예를 들면, A type allele가 증폭된다는 전제에서,  $F_1$ 에서는 band가 관찰 되는데 반하여 양친 모두에서는 band가 없던지 ( $P_1 = Aa, P_2 = Aa$ 이면서  $F_1 = aa$ ), 혹은 양친 한쪽이 band를 지니고 있었음에도 불구하고  $F_1$ 에서는 나타나지 않는 ( $P_1 = Aa, P_2 = aa$ 이면서  $F_1 = aa$ ) 경우 등이다 (Botstein et al., 1980; Soller et al., 1983). 이러한 문제들은 양친 중 적어도 하나가 분석된 유전자좌에서 서로 다른 대립유전자가 존재한다는 가정 하에서는 설명이 가능하다 (heterogeneous alleles at a locus). Heterogeneous한 유전자좌를 고려할 때는 모든 대립유전자들이 포함될 수 있도록 많은 개체로부터 추출된 DNA를 재료로 사용하는 것이 더욱 명확한 genotyping의 결과를 얻을 수 있다고 판단되었다. 또한 informative band의 재현성 보장이 어려운 RAPD (Welsh et al., 1990) 및 여러 단계의 복잡한 처리를 거쳐야 하는 AFLP의 특성 등을 고려해 볼 때, 품종판별(특히  $F_1$ )에 dominant type으로 scoring 되는 RAPD 나, 상응하는 informative band를 gel에서 확인이 거의 불가능한 AFLP를 사용하는 것은 상당한 무리가 있다고 판단되었다. 최근 AFLP product를 증폭산물의 강도의 비교와  $\chi^2$

분석을 통해 codominant type으로 scoring하는 기법이 개발되어 보고 되었지만, 특수장비를 필요로 하고, allele 공여체를 정확히 알 수 있는 mapping population에서나 적용이 가능하다 (Castiglioni et al., 1999). Informative RAPD 및 AFLP로부터 전환된 STS-PCR primer 조합을 적용할 때의 문제점은 초기 실험에서 확보한 genotyping data가 거의 유지되지 않는다는 점이다. 이는 polymorphism의 유부는 primer가 annealing되거나 (RAPD의 경우), 혹은 제한효소가 인식하는 (AFLP의 경우) genomic DNA sequence에만 의존하기 때문인데, 새로운 primer를 합성하기 위해 증폭산물 양 말단 안쪽의 염기서열을 이용할 때, 이 부위는 더 이상 RAPD 및 AFLP에서 확인된 polymorphic site가 아니기 때문이다. 아주 낮은 확률로 초기 genotyping결과가 재확인되었는 경우도 있었는데, 이는 primer annealing sites 및 제한효소 작용점들 (*EcoRI*과 *MseI*) 근처에서 높은 수준의 line specific mutation이 누적되어 있기 때문으로 판단되었다.

AFLP를 통하여 확인된 계통별 informative marker data와 포장에서 조사된 형질분석표 (표 A-1 part 1, 농우 수박 line; 표 A-2 part 1; 농우 호박 line)를 비교하여 일련의 연관성을 찾으려 노력하였으나, 표현형질과 뚜렷이 상응하는 marker는 찾을 수 없었다. 각 line간 표현형질이 다르다는 것은 총체적인 유전자 조성 및 발현이 서로 다르다는 것을 의미하지만, 염색체 조성의 80%를 차지하고 coding region에 비하여 높은 polymorphism을 보이는 'junk DNA'가 대부분의 informative marker 공여체로 작용함에 따른 결과로 해석되었다. 최근 genomic DNA 자체를 분석하기 보다는 DNA marker를 EST로부터, 혹은 유전자를 coding하는 'active chromosome'을 선택적으로 분석하는 추세가 높아지고 있다. AFLP의 경우에도 본 연구에서 사용된 *EcoRI*과 *MseI* 제한효소 조합이 아닌 methylation sensitive인 *PstI*과 *MseI* 제한효소 조합을 이용하여 gene coding region에서 informative AFLP를 확인하려는 노력이 여러 연구진에 의해 수행되고 있다 (Finnegan et al., 1998; Castiglioni et al., 1999). 본 연구에서도 DNA marker를 유전자 자체, 혹은 유전자를 지시하는 부위 주변에서 확보하기 위해서 별도의 연구를 진행하였으며, 제 5장 및 제 6장에서 자세히 언급하였다.

결론적으로 농우종묘로부터 분양 받았던 수박 및 호박에서 생성된 RAPD 및 AFLP 들로부터 안정적으로 적용할 수 있는 DNA marker를 개발하는 데에는 많은 어려움이 있었다. 첫째, 농우 수박 line들간에서 그리고 호박에서는 3가지

group내의 line들간에서 매우 낮은 polymorphism 발현빈도로 인하여 informative band를 확인하는 것 자체가 매우 어려웠다. 둘째, 많은 시간과 비용을 감수하면서 informative band를 cloning하고, 염기서열 분석을 실시하여 specific primer 조합으로 전환하였지만, 최초의 polymorphism을 그대로 관찰 할 수 있는 예가 극히 적었다. 셋째, 전환된 specific primer 조합들이 적용된 PCR 산물들은 대개 매우 다양한 양상을 띄어, 하나의 primer조합에 의해 표지되는 유전자좌들의 구분과 polymorphic한 대립유전자의 명확한 판단이 매우 어려웠다. 넷째, 확인된 대부분의 informative band들이 고도의 반복적 서열을 보이는 genomic DNA부위에서 유래되어 'DNA marker - phenotype'의 연관 관계를 발견할 확률이 아주 낮다고 판단되었다. 따라서 미분석된 DNA를 재료로 품종구분을 위한 polymorphism을 탐지하고, 이를 다시 specific primer 조합을 이용하여 안정적인 DNA marker로 확립시키기 위한 방편으로는 RAPD 및 AFLP 기법이 적절한 접근방식을 될 수 없다고 판단하였다.

## 제 5 장 추가적인 Defined elements 확보

### 제1절 서설

농우종묘에서 분양받은 수박 및 호박 line들을 기본재료로 RAPD 및 AFLP 분석을 실시하면서, 본 연구의 과제 목적을 성취하는데 있어 세 가지 문제점이 제기되었다. 첫째, 농우종묘 line들이 시중에서 유통되는 수박 및 호박의 유전적 다양성을 어느 정도나 대표할 수 있을 것인가 하는 의문이며, 둘째는 의외로 농우 line들간 유전적 다양성이 너무 협소하다는 것이었으며 (특히 수박의 경우), 셋째, 대부분의 informative marker들이 고도의 반복적 염기서열을 보이는 genomic DNA에서 기인되었다는 점 등이다.

이러한 문제점을 극복하고 현실적인 DB를 구축함과 동시에 우리나라의 수박, 호박 F<sub>1</sub> 품종들간의 유전적 다양성 정도를 추정하기 위해서, 여러 종묘회사에서 개발된 수박 및 호박 각각 24개 F<sub>1</sub> line들을 확보하였다 (표 1, 표 2). 또한 농우 수박 line들에서 관찰된 line간 극도의 유전적 유사성 뿐만 아니라 informative AFLP에서 STS primer조합으로의 낮은 전환율 때문에 새로운 primer조합을 추가하는 것이 바람직하다고 판단하였다. RAPD 및 AFLP와 같이 전체 genome 수준에서 polymorphism을 찾는 것 보다는 고도로 polymorphic 하다고 알려진 유전자좌 (locus)를 재현성이 보장되는 specific primer 조합을 이용하여 직접 표지하기로 하였다. 이를 위하여, 수박에서 retrotransposon semi-library를 제작하였고, Jarret 박사로부터 수박 SSR clone들의 염기서열을 양도받았다.

표현형적 특성에 의존하는 전통적 품종구분 방법의 비효율성을 개선하기 위한 가장 이상적인 DNA marker는 품종간 나타나는 표현형적 형질을 정확히 표지하는 것이다. 단순한 polymorphism source로서의 genomic DNA를 고려하는 것과 비교하였을 때 각 품종 특유의 표현형적 형질 발현에 필요한 유전자들을 coding하고 있는 genomic DNA 부위를 고려하는 것은 접근방식에서 커다란

차이를 보인다. 유전자 자체 혹은 유전자가 존재하는 DNA (open reading frame) 주변에서 polymorphism을 찾을 수 있다면, 'marker' 와 'gene' 간의 linkage 관계가 고려되지 않은 DNA marker에 비해 훨씬 많은 유전적 정보를 동시에 얻을 수 있다는 장점이 있다. 그러므로 STS primer 조합을 Ok et al. (2000)의 수박 EST clone 과 호박의 active chromosome enriched library clone에서 추가로 합성하여 사용하였다.

## 제2절 수박 retrotransposon semi-library 구축과 STS primer 개발 및 적용

Retrotransposon은 동식물 genome에서 대부분을 차지하는 transposable element로, long terminal repeat (LTR)내부에서 확인되는 유전자들의 상대적 위치에 따라 Gypsy type과 Copia type 등 두 group으로 크게 구분되며, Gypsy type은 많은 고등식물 종에서 흔히 확인되고 있다 (Kumar and Bennetzen, 1999). Retrotransposon은 비활성화되기 직전까지는 숙주 식물의 genomic DNA보다 훨씬 높은 evolutionary rate를 지니다가, 비활성화 후에는 숙주식물이 보이는 evolutionary rate에 편입되게 된다. 그러므로 어느 시점에서 비활성화되었는가에 따라 각 copy들이 지니는 염기조성 변이가 차이가 난다. DNA marker로서 retrotransposon이 지니는 매력은 숙주식물의 genomic DNA의 변이 정도보다 훨씬 높은 evolutionary rate를 지니며, 숙주식물의 각 품종들간 나타나는 유전적 변이정도와 판이하게 다른 변이도를 나타낸다는 것이다. 최근에 들어서 유전적으로 근연 관계에 있는 품종들을 명확히 genotyping하기 위한 수단으로 이용하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 본 연구진은 국내 수박 유전 자원들이 상당히 좁은 유전변이를 보이고 있음에 착안하여, DNA marker를 retrotransposon-like elements로부터 확보하려고 시도하였다.

Degenerate primer를 이용하여 수박 농우 line 1번 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다 (표 1). 약 1.2 kb ~ 2 kb 영역까지 PCR 증폭산물이 확인되었으며, cloning하고 transformation을 실시하여 semi-library를 구축하였다 (제 3장 5절 3항). 최초 30개의 clone들을 임의적으로 선택하여 염기서열을 분석한 결과, 19개의

독립적인 retrotransposon-like element copy들이 확인되었다. Retrotransposon-like element의 각 copy들이 RAPD 및 AFLP로 확인된 농우 수박 line들의 genomic DNA 간의 polymorphism 정도보다 높은 유전적 변이를 보이는 지를 먼저 확인하기 위하여, 일단 4개의 clone sequence를 기초로 STS-PCR primer를 제작하고 'WReT-' primer group으로 명명하였다 (표 7).

**Table 7.** STS-PCR primer sets converted from clones in watermelon retrotransposon semilibrary <sup>a</sup>

Primer Name	Primer Sequence		Exp. <sup>b</sup> Size (bp)
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
WReT1	ACAATGCAAGGTCCAACCCC	TATACTTACTGAGTCGGTCC	800
WReT2	AGTTATCATCCAAGCAAGCC	AGTATTGCCTCGAACTCCCC	550
WReT3	TCAAGTAGATATGTGCCAC	GGGTGAAGTCTCTGTCCGACC	1000
WReT4	GCTAAGTTCAGCAAGTGTGAG	TGCTGGCTTCTAATGTTCCAGG	1200
4	Total		

<sup>a</sup> Nong-Woo line 1 was used.

<sup>b</sup> Expected PCR band size estimated depend on the sequences of clones.

합성된 각 primer 조합을 농우종묘 수박 line들에 PCR 반응 조건을 조정하면서 적용하여, 각각의 specific primer 조합들이 uni-band형태로 모든 농우 수박 line에서 증폭산물이 생성되도록 하였다 (그림 4 Panel A). SNP를 찾기 위해 여러 가지의 제한효소를 증폭산물에 처리하였으나 polymorphism을 확인할 수 없었다 (그림 4 Panel B). 또한 합성된 primer 조합이 target copy 뿐 아니라 copy들 사이의 고도의 sequence homology로 인하여 다른 copy까지 증폭하는 경향이 심하여 증폭산물을 제한효소로 절단한 후 정확한 'single copy dosage'를 판단하기가 용이하지 않았다. 하나의 copy만을 증폭하기 위해서는 각 primer 조합마다 최적의 조건을 잡아주어야 하는데, 이렇게 하기에는 많은 시간이 요구된다. 이러한 결과에 비추어 수박은 본 연구진이 초기에 예상하였던 것보다 극도로 협소한 유전변이를 보이는 것으로 판단하고, 차후 24개 F<sub>1</sub> line의 품종구분에는 적용하지 않았다. 그러나 타 작물의 품종구분 및 유전변이 정도를 추정하는데 유용하게 사용될 수 있음에 착안하여, 국내에서 수집된 무궁화 품종들에게 적용한 결과 위에서 언급한 4개의 STS-PCR primer 조합과 단 3가지의 제한효소를 처리하는 것만으로도 시험한 모든 품종을 (14개) genotyping할 수 있었다 (그림 4 Panel C). 따라서 WReT-primer 조합을 계속 합성 중에 있다.

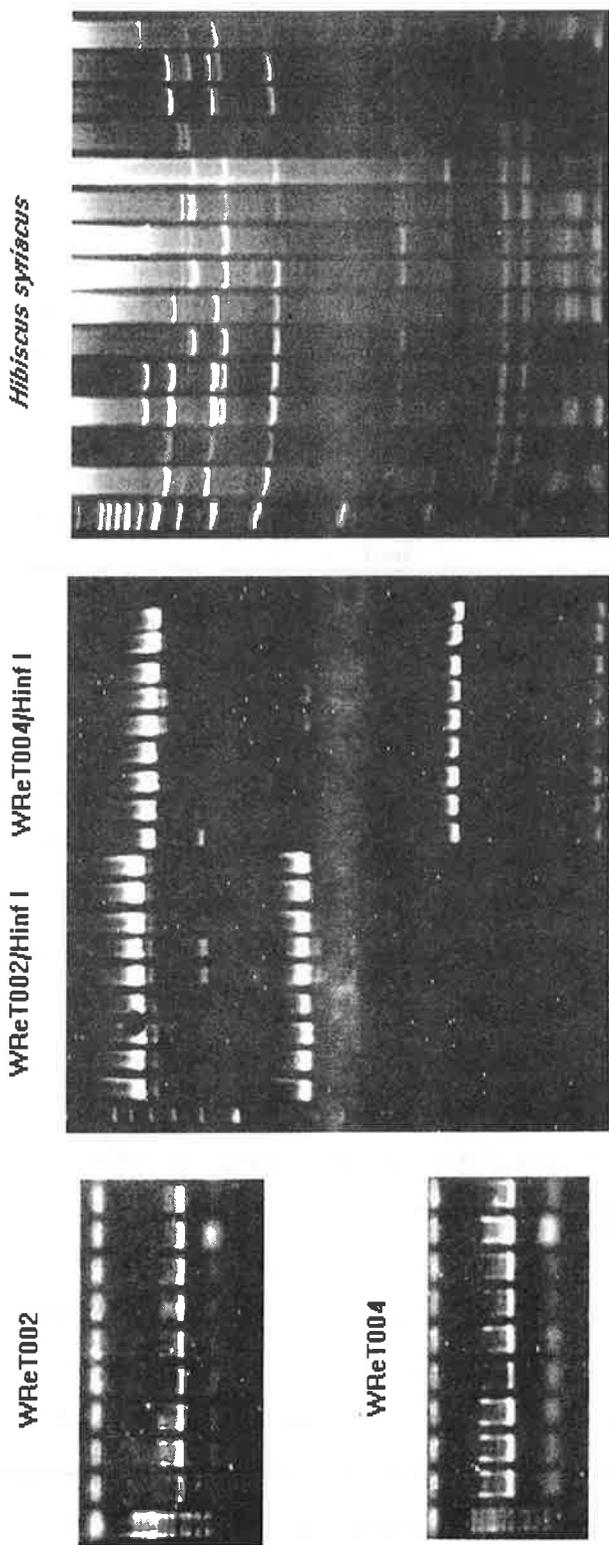


Figure 4. Examples of STS-PCR products amplified with retrotransposon specific primers and restriction patterns of amplified products. Panel A. Two WReT primer sets were to amplify the homologous genomic DNA region of the primer sequences in 7 Nong-Wu watermelon lines. Panel B. Restriction pattern of *Hinf*I digestion. Panel C. WReT001 primer set was tested to 14 accessions of *Hibiscus syriacus*, and the monomorphic PCR products were restricted with *Acl*I.

### 제3절 SSR-PCR primer 조합의 합성

Jarret et al. (1997)은 수박 genomic DNA clone들로부터 SSR을 포함하는 clone들을 선별하였고, 이중 7개의 SSR clone으로부터 primer 조합을 합성하였으며 전 세계에서 수집한 33개 수박 생태종들을 genotyping하여 유전적 근연 정도를 측정하였다. 본 연구진은 Jarret박사로부터 미발표된 50개의 수박 putative SSR clone들의 염기서열을 양도 받았다 (DNA source는 미국품종, New Hampshire Midget). 이들 염기서열로부터 33개의 SSR-PCR primer 조합을 합성하고 'WM-' primer group으로 명명하였다. 이중 17개의 SSR이 C와 T가 반복되는 (CT)<sub>n</sub> 형태의 clone으로 밝혀졌으며, 10개의 SSR들은 (GA)<sub>n</sub> type이었고, 나머지는 (ATT)<sub>n</sub>, (CTC)<sub>n</sub>, (TTA)<sub>n</sub> 등 이었다 (표 8). SSR library를 구축하는데 사용했던 New Hampshire Midget 품종을 확보하기가 어려워, 합성된 SSR-PCR primer 조합들을 DNA source line에 직접 test하지는 못하였으나 수박 F<sub>1</sub> 품종에 실용적으로 적용하였다 (제 6장).

### 제4절 수박 EST에서부터의 STS-PCR primer 조합의 합성

최근 Tsumura et al. (1999) 및 Perry et al. (1999)은 cDNA에서 3'-UTR (untranslated region)부위는 upstream (translated region) 부위에 비해 상대적으로 높은 확률의 SNP가 기대되며, 이를 이용한다면 좋은 DNA marker로 사용될 수 있을 것이라고 보고한바있다.

이 점에 착안하여, 본 연구진은 translation 부위 (forward primer)와 3'-UTR부위 (reverse primer)에서 각각 primer를 합성하고, 하나의 primer 조합으로 사용하여 F<sub>1</sub> 품종 구분에 이용하기로 하였다.

수박 F<sub>1</sub> 품종인 '럭키' (표1)로부터 총 704개의 EST를 확보하였으며, 5'말단 염기서열 분석을 통해 399개 EST들이 다른 생물종들에서 확인된 유전자들과 고

**Table 8.** SSR-PCR primer sets converted from clones in watermelon simple sequence repeats library <sup>a</sup>

Primer Name	Primer Sequence		Repeat	Used to screen 24 F <sub>1</sub> lines <sup>b</sup>
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
WM001	CACCCCTCCTCCAGTTGTCATTG	AAGGTCAGCAAAGCGGCATAGG	(CT) <sub>10</sub>	0
WM002	GCCTTTGAAAGAGAGTTGCTCG	GCGCGTCCCTTTTACCA	(GA) <sub>15</sub>	0
WM003	CGCGCGTGAGGACCCTATA	AGCAATTGATTGAGGCGGTTCT	(CT) <sub>18</sub>	0
WM004	ACCCTCGCTGCTGTTAATCA	TGTCCCACCCAACAATTCATT	(AT) <sub>10</sub> , (CT) <sub>19</sub>	
WM005	GAGGCGGAGGAGTTGAGAG	ACAAAACAACGAAACCCATAGC	(CT) <sub>15</sub>	0
WM006	TCTGCTCAGTTCTTCTTAAT	CATCCTCAAAAAAGGCTAAG	(CT) <sub>18</sub>	0
WM007	CTTTTCTTCTGATTGACTGG	ACTGTTTATCCCAGCTTACTA	(GA) <sub>20</sub>	0
WM008	GATCCATTTGAGAGCAATAAC	CTAACCAAGATGATAAGACGG	(CT) <sub>13</sub>	
WM009	GGAATTCGGTACCCCGGTTTC	CATCCAACGCGTTGGGAGCTC	(CT) <sub>19</sub>	
WM010	CGGAAACTTACTCGTCTTG	GGAAGACGTTAATGATATAC	(GA) <sub>10</sub>	0
WM011	GCCTTTGAAAGAGAGTTGCTC	CCAAGCTTATCGATAGTTGCG	(GA) <sub>15</sub>	
WM012	CAAGATTGGGTTGGAATGAGC	GTCTAGTTACTCAACTGCCAC	(TCT) <sub>5</sub> , (CT) <sub>8</sub>	0
WM013	CCCTACTCATACTCACTCTTC	GACTGTTTATCCCGACTTCAC	(CT) <sub>10</sub>	0
WM014	CATAGTGGGCAGCGGGGCGAG	CGTTGGGAGCTCTCCGGATCC	(GA) <sub>15</sub>	0
WM015	GGAATTTGAAAGGGTAATCGG	CTTTTCTTTCCCAATCCCCAC	(GA) <sub>7</sub> , (GA) <sub>5</sub>	0
WM016	GCTCTTCCCAAGTTATGGATAAG	GGTGGGTACCCACCCAAGAC	(CT) <sub>22</sub>	0
WM017	GAGGGTGAAGTCCCTTCTTG	GGGAGCTCTCCGGATCCAAGC	(CT) <sub>17</sub>	
WM018	CCCATTATTGTCCCATAGAC	GTGTTTGTGATGTGCAAATGTC	[(CT) <sub>4</sub> , TC] <sub>2</sub> (CT) <sub>4</sub>	0
WM019	CCATTTCGATGCGTAACTGTCAG	CTCCACTTGGCTCCTTGACC	(GA) <sub>7</sub>	0
WM020	CAGTTTCACTCCCAACTCTCC	CATTGCATCAGGCAAAAAGAATCG	(CT) <sub>7</sub>	0
WM021	CTGTGCTGTGCAGTTGATGAG	CCTCTGTACTTCTTACACTG	(GA) <sub>9</sub>	0
WM022	GTTCGAAATCGAGTCTCGCTC	GGAGCTCTCCGGATCCAAGC	(CT) <sub>16</sub>	0
WM023	CAGGGACGATAGCTTTCACG	CCCGGATAATTCATTGTATCC	(TTA) <sub>17</sub>	
WM024	CAGATGAAAATCAAAGAAGGC	GAACCAAGTGAAATAGCGCTC	(CT) <sub>8</sub>	
WM025	CCGGGTTCGAAATCGAATGC	CATCATATCTGCAGTACCAACG	(GA) <sub>12</sub>	
WM026	CCCGGGTTCGAAATCGAAGG	GTGAGTTCTCGTTGAGAGTTG	(CT) <sub>12</sub>	
WM027	CTCACTACAACCTGAGGGTGC	CCCAAGAACCATAATGATTGGC	(GA) <sub>14</sub>	
WM028	CACCATGCAAAGTCGTCACAG	CTCATCACCACGTATTTCCTG	(GAA) <sub>13</sub>	
WM029	GGTTCGAAATCGAGTTGCAG	GCTCTTCTCAGCTGGCACAG	(CT) <sub>7</sub> , (CT) <sub>3</sub>	0
WM030	GTCCGACGCCATTATCCACTAC	CCGAAACATGCAGCAGTAACG	(TTA) <sub>7</sub>	0
WM031	CGTGAAGTTCGCTCAGGAGC	CACAAATATCAGCAGAGTAATCC	(TTA) <sub>8</sub>	0
WM032	GTGGGTTTGGGAATCTGATTG	CTCAACCAAATCTCAGACCTC	(CTT) <sub>13</sub>	0
WM033	CGGGACGAAGGACACCACTC	CATCCAACGCGTTGGGAGCTC	(CT) <sub>9</sub>	
33	Total			21 (64%)

<sup>a</sup> Analyzed clone sequences were friendly offered by Jarret et al.(1997)

<sup>b</sup> Only the primer sets showing very good replicated PCR results were tested for 24 F<sub>1</sub> lines in Table 1. The identified loci and allele types are described in Table A-4 and Table A-6.

도의 유사성을 보인다는 것을 확인하였다 (Ok et al., 2000). 이 399개의 EST들을 STS-PCR primer 조합 합성을 위한 재료로 선정하였다. EST분석은 일반적으로 clone의 5'쪽만 염기서열 분석을 실시하므로, 3' UTR region에 대해서 추가적인 염기서열 분석을 실시하여야 했다. 일차적으로 70개의 3' UTR 염기서열을 확보하여 STS-PCR primer를 합성하였다. 합성된 각 primer 조합은 해당 EST clone에 적용하여 정확한 크기의 증폭산물이 생성되는지를 확인하였다. 총 51개 EST clone의 PCR에서 양호한 증폭산물이 생성되었다 (51/70 = 73% 효율). 이렇듯 3' UTR의 염기서열 분석은 5'쪽보다 어려움이 많았는데, 이는 *Taq* polymerase가 A가 많이 반복되는 poly-A tail을 맨 처음 지나가야 하기 때문인 것으로 판단되었다.

총 51개의 EST로부터 전환된 STS-PCR primer 조합들을 'WE-' group으로 구분하였고, Table 9에 자세한 primer sequence를 제시하였다. 현재 나머지 330여개의 EST들에 대한 3'UTR region 염기서열 분석이 계속 진행중에 있다.

## 제5절 호박 active genome region-enriched semi-library의 구축과 STS primer합성

수박과 달리 EST가 보고되지 않는 호박에서는 cDNA library를 구축하고 EST를 실시하는 대신에, 바로 genomic DNA에서부터 유전자를 coding하고 있는 부위를 확보하여 이용해 보고자 시도하였다. Active genome이라고도 불리는 유전자 coding 부위와 그렇지 않은 'junk DNA'에서의 큰 차이점 중 하나는 methylation 유무라고 보고되고있다 (Bird et al., 1985; Boyes and Bird, 1991). Active genome은 methylation이 되어 있지 않기 때문에, methylation에 sensitive한 제한효소를 사용하면 이 부위만을 선택적으로 절단할 수 있다. 진핵생물의 functional gene upstream에서는 흔히 'CpG island'라는 반복적 염기서열이 존재하며, junk DNA 부위의 'CpG' island는 고도로 methylation되어있는 것이 보편적이다. 제한효소 *HpaII*는 'CCGG'를 인식하는 methylation sensitive enzyme으로 이 제한효소

**Table 9.** STS-PCR primer sets converted from watermelon EST clones <sup>a</sup>

Primer Name	Primer Sequence		Used to screen 24 F <sub>1</sub> lines <sup>b</sup>
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
WE001	CTGCAATTTTGCTGTTGC	TAAGCATAGCCAAAAGGGA	
WE002	GAAGACGAGTATCGCGGC	TTCCCTCCTCATCTTCCC	
WE003	CCTCCCCTCGGTCATCTTC	ATGATGGCGCTCTCCITC	
WE004	TCTTCCAACGCGACATTG	GGGCACACTGTCTTGACC	0
WE005	TCGAGCGTTTGACTCGTG	CGGCACCAGGAATCACTA	0
WE006	CGTTCTCCCAACGAGAC	AGCGATGCCGACTAGAGG	
WE007	TTCTCTTCCATTTTGCC	TCGATTTGGCTCGTCTCC	
WE008	CACTAGCCAAAGGCAGCA	ATTCCCCICAGCAATGGG	0
WE009	TCTTTGGCCAIGTCCTTC	TAACCGCCACTTCCGCTA	
WE010	GCCAAATGTCACCACCCTC	GCCGACTTCAAACGAATG	0
WE011	AAGAGCAACCAAGGATAACG	GCTAGTAAAGAAGGAGACGG	
WE012	ACATTAACCCGGCAGTGAC	CCCAATCTCAACACAAATC	
WE013	CACTTATGGCCACCTCTGC	GTGAGATGCTTAAGTGTGG	0
WE014	AGATGGTTCATAATGCTAG	CATTAACAAGCAGCGGAG	0
WE015	GAGAATTGCCAAGTGCAAG	CTCTGATTCATCCTCATA	
WE016	CAGCTGGTTATGACTTCGAC	GAATATGACCCCCAAGATAC	0
WE017	CTTCGCAAATGGCAACCTC	GAACACAAAGTACAGTCTG	
WE018	CACAAGCCCTCTTGAAGGTC	GCATTCAATATTTCTACTG	0
WE019	CTTCATCTTCTCTCAGGCC	CAAACCCCATCCCATCTCTC	
WE020	GACATGATGCTAATGGC	TTCAACACCAAGTGATT	0
WE021	GTGCTATACTCTACTAGC	GAAGCCCTTCAAGAAGT	
WE022	GATGATCGAGGTGGTGCTG	GATATCACCGAACATGCAG	
WE023	CAGGGATCCGAACAATACGTC	CAGAGAAGTCTAGTCTACGAC	
WE024	GCTTCACACACTTATGGCCAC	GATTTCACTGCAGGAAGTTTC	0
WE025	CTAGTCAAGTGAGTGATGGTG	ACACATTTATGTCCCTCCATC	
WE026	CGAGGGCTCCAGTGATATATC	GCATCCTCTCTATTCCAGGTC	0
WE027	CAACATGTCTGAAGAATCTGC	GAGTTGCAAATGTAGAAATGC	0
WE028	GACAGAATCGAGGCAATGCCG	ACCAAAATFATTAACGAACAAG	0
WE029	CTATCAATCAGCTATTGACTG	AGCGAAATGATTAGTTGATTC	
WE030	CTTGAGGAACGGCGTTGATGC	ATTCTGTAGAACAATAAAGAG	
WE031	CTGCCGGTCTCGAGCTTAATG	CTTTAAAGAGACCAATGGCCC	0
WE032	TGACGTCACAACAGGCGTTTGC	CAGACTTATTCGACCAAGCAC	0
WE033	GATTC AAGTTGGGGTCTTCTC	CAATACAAAACCCCAACACAG	0
WE034	GATGAGCTTCTCTCGGATTCG	GCATTCACCAGAACATCTCCC	0
WE035	CAAATGGCAACCCTCCGTCATC	GATGAGATTACTGGGCCA	
WE036	CTTCTCCTGTATGGGAGCTGC	GATCCGTGTGGTACAGCAATC	0
WE037	CAGCTGATTCACTAGCTGATC	CCGAAACAACCTCAGTTGAGC	
WE038	GTGATGGCTTCGAAGCGGATC	CGAGCAGCGTTTTTCAGGAGG	
WE039	CAACATGTCTTTCGAGGTAGC	GCAAACACTAAACAGACATGG	0
WE040	CTGTTGAAGGAAGTTCAAAGC	GACACTTATAAAGTAAGATGC	0
WE041	CGATGGCGTACAAGGTGACTC	GAGATATCATCATCAAGC	0
WE042	CAAGATCCAGGACAAAAGAAGG	CAATGCACCATTCGGATCTTC	0
WE043	GTCCGAGGCGACTTCAAGTTC	GTTAGCCCCACATGAACATTG	0
WE044	CTCGGTGGGGTCTTGCAATCC	GAATTCACAAATGAGAGGATC	0
WE045	GGTGATGAGACTGGAATGATC	GTCACTGTATGATAGTTCAAG	
WE046	GGCCTCCAACCTCCTGAAGGAC	TACATTACATATCAATCCCTC	0
WE047	CCTGCGGATAATCTTGTCTCC	CCAATCAATTACACACGAACC	
WE048	ACATGTAGTGGTGATGATTAC	GATTATCAITCACATCTTACC	0
WE049	CTTGTGCCGATITCCTTCGAGC	GTGGAACAGTCACATAAGAGAG	
WE050	TCCCTCTTTCTGTCCACGCC	CCAATCTCCACACATAAACC	0
WE051	TGCCGATTATCGCTGAAATCG	CACGTGCTAAAACCGCTCATC	0
51	Total		28 (55%)

<sup>a</sup> 3' UTR regions of the the EST clones that reported by OK et al.(2000) were additionally sequenced.

<sup>b</sup> Only the primer sets showing very good replicated PCR results were tested for 24 F<sub>1</sub> lines in Table 1. The identified loci and allele types are described in Table A-4 and Table A-6.

를 본 실험에 이용하였다.

농우종묘 호박 1번 line의 genomic DNA를 재료로 사용하여 제 3장 5절 4항에서 서술한 기법으로 active genome region이 증폭된 library를 구축하였다. 예상하였던 것 보다는 적은 colony가 확인되었다 (약 300여개). 주된 이유로는 methylation insensitive인 *EcoRI*이 *HpaII*와 함께 처리하였기 때문에 DNA가 잘 절단되었는지를 판단하기가 모호하다는 것과 실험상의 오류를 고려해 볼 수 있을 것이다. 1차적으로 36개의 colony를 선택하여 염기서열을 분석하고 GenBank에 염기서열을 비교한 결과, 15개 clone이 이미 타 생물종에서 보고된 적이 있는 유전자의 일부분임을 확인할 수 있었다. 나머지 21개의 염기서열은 'unknown' 이거나 (15개), chloroplast genome (6개)에서 유래된 것이었다. 15개 primer조합을 농우 호박 line 1번 genomic DNA에 적용하여 PCR을 실시한 결과, 모든 조합들이 예상된 증폭산물을 생성하였다. Primer 조합들의 정확한 염기서열은 표 10에 소개되어 있다. 현재, 나머지 colony들에 대해서 염기서열 분석 및 putative gene region sequence 유무를 계속 판별하고 있는 중이다.

**Table 10. STS-PCR primer sets converted from clones in squash active genome semi-library<sup>a</sup>**

Primer Name	Primer Sequence		Exp. <sup>b</sup> Size(bp)
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
SGm001	TGCAIAGACTGCACTCTCATAT	GTTGATCCCTATAATGGTTTGA	150
SGm003	TAATACGAACCTTGCAAAATGA	AGAGATCGAGCTTCAAGAAATA	370
SGm005	AATTCAGAAACCCTAATTTTGG	GTACCGTCCGATTAAGTACAAA	430
SGm006	ACAAAAATACTTGTATGCAGCA	TTCTAGATGTGGGATTTTCGTTA	360
SGm008	ATTGTATACGTCATACGTCCG	GAGAGATCGAGCTTCAAGAAAT	430
SGm011	CTTTTCGTGAAAAAATACCAATT	CCAAGAATCGATCTTTCTTTTA	490
SGm018	CACGAGATAACCTTCTTTTCTTC	TGGCATCTTTAGGTAAGTACTCC	450
SGm019	TTTCTTTTAAGTTTCTTTCTCGG	GTTCAITTTCCAGTTCAAAAAGATC	140
SGm021	TATTAGATACACACCCCATTTGA	GATGCTCTAACCTCTGAGCTAAG	240
SGm022	TTCTAAGTACGAGCAAGAATAA	TCTACGACCATTCATTATTCTGA	170
SGm024	TATCTCGGGATACCACCTAAATA	GTATGTAAGCTGTGTATCTGGGA	250
SGm028	ACCTTGTTTAATCAGTCAAAGGT	CGAGTTAGTTCAATCAATCCATA	330
SGm031	GAAGTAAATGTTAATGTGTGTGGC	TTTGACCTCTTTTACCTACCTGT	150
SGm035	CATTTATTAATCACAGGCTGAAA	TTTCAACAAAATCATCACGTAG	400
SGm036	TCCCTCAACTATTTATGAAAAA	GTGCGCTTTGGTAGAGTTATTAC	330
15	Total		

<sup>a</sup> Nong-Woo line 1 was used.

<sup>b</sup> Expected PCR band size estimated depend on the sequences of clones.

<sup>c</sup> Only the primer sets showing very good replicated PCR results were tested for 24 F<sub>1</sub> lines in Table I. The identified loci and allele types are described in Table A-5 and Table A-7. All primer sets were used to screen 24 F<sub>1</sub> lines.

## 제6절 총 설

Informative AFLP로부터 전환한 STS-PCR primer 조합과, 추가적으로 여러 가지 defined elements로부터 전환한 SSR- 및 STS-PCR primer 조합을 확보하였다. 수박 DNA로부터 전환된 primer 조합으로는 WA-group (35개 조합), WReT-group (4개 조합), WM-group (33개 조합), 그리고 WE-group (51개 조합) 등 총 123개 조합이 확보되었다. 호박 DNA로부터 전환된 primer 조합으로는 SA-group (33개 조합) 및 SGm-group (15개 조합)으로 총 48개 조합이 확보되었다.

## 제 6 장 Specific allele tagging을 통한 F<sub>1</sub> 품종 분석의 결과 및 고찰

### 제1절 서 설

많은 연구자들이 우리나라에서 재배되는 여러 작물의 품종들을 DNA marker를 이용하여 구분하고자 노력하였다. 거의 모든 연구들은 염색체 전체 수준에서 polymorphism을 관찰하는데 주력하였고 (RAPD, AFLP), 최근에는 microsatellite의 copy number에 의거한 품종구분 및 표지를 시도하고 있으나 (Beridze, 1986; Hamann et al., 1995; Georges et al., 1991; Stallings et al., 1991; Winberg et al., 1993; Zhou et al., 1995), 몇 개의 염기차이에 의한 polymorphic allele들을 하나하나 정확히 구분하고 비교하기 위해서는 신중한 판단이 선행되어야 한다. 결과적으로 비교적 polymorphism의 발견이 용이한 타지역종과 국내종들의 유전적 차이를 강조하는데 그치거나, 국내 품종들의 비교분석 (comparative analysis) 수준 이상의 구체적이며 현실적인 품종구분을 위한 DNA marker의 활용기법을 제시하지는 못하였다.

엄밀한 의미에서의 polymorphism은 하나의 유전자좌에서 여러 개의 상이한 대립유전자들(heterogeneous alleles)이 존재한다는 것을 의미한다. Polymorphism이 발견되었을 때, 어떤 유전자좌에 속하는 어떤 대립 유전자들로부터 기인되는 것인지에 대한 정확한 해석이 선행되지 않으면, 각 품종이 지니는 특정 대립유전자의 특성을 기술할 수가 없다. 그동안 많은 DNA marker들이 보고되었음에도 불구하고 품종표지가 어려웠던 것은, 재현성을 확보하기 위한 노력의 부족보다는 polymorphism을 보였던 특정 유전자좌 (locus)를 제대로 관리하지 못하였음에 기인되었다고 할 수 있겠다.

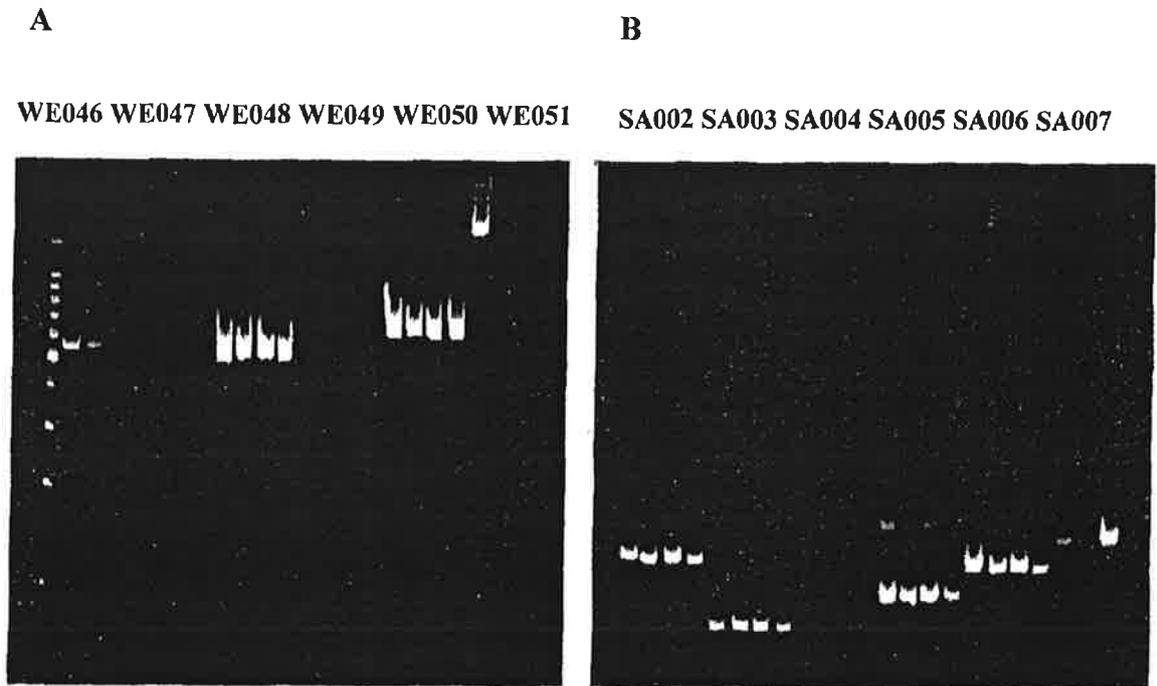
본 연구에서는 F<sub>1</sub> 품종들을 분석하기에 앞서, 특정 유전자좌를 엄정히

관리하기 위한 몇 가지 과제수행 방향을 설정하였다. 첫째, 모든 polymorphism은 반드시 'defined elements', 즉, 염기서열분석이 완료된 DNA로부터 짜여진 specific primer 조합을 이용한다. 둘째, specific primer 조합에 의해 표지되는 특정 유전자좌들은 분석되는 F<sub>1</sub> 품종들 내에서 monomorphism을 보여도 증폭산물의 크기와 사용한 primer 조합의 이름을 같이 명시하여, 차후 타 품종에 대한 재표지에 어려움이 없도록 한다. 셋째, PCR반응조건의 높은 stringency를 유지하여 하나의 primer 조합으로는 한 개의 유전자좌가 표지됨을 기준으로 한다. 만일 여러 개의 증폭산물이 발견될 때는 반복실험을 통하여 확인한다. 넷째, PCR 증폭산물의 유무 및 크기에 의한 구분이 가능하지 않을 경우 제한효소를 이용하여 잠재적인 SNP를 찾으려 노력함과 동시에 어떤 효소에 의해 절단된 어떤 크기의 산물이 확인되었는지에 대한 정확한 정보를 기록한다. 결론적으로 specific primer 조합을 이용하여 개별적인 유전자좌를 표지하고, 특정 유전자좌에 대해 각 품종에서 확인되는 대립 유전자들의 분석정보를 정리하여 보편적이면서도 구체적인 DB를 구축하는 것이 본 장의 중점이다.

## 제2절 Specific primer 조합들의 선별

Defined elements로부터 전환된 primer 조합들을 F<sub>1</sub> 품종들에 적용하기에 앞서, 하나의 유전자좌를 표지하였으며, 여러 유전자좌를 표지하더라도 재현성이 보장되는지에 대한 검정을 먼저 실시하였다. 이를 위하여 각 primer 조합당 수박 및 호박 F<sub>1</sub> 품종들 중 4개씩을 임의적으로 선정하여 제 3장 6절 1항 및 2항에서 기술한 방법으로 PCR 반응을 실시하고, 증폭산물을 확인하였다. 이러한 'primer set pre-screening'은 표 5, 6, 8, 9, 10에 제시된 171개 primer 조합 (수박 123개, 호박 48개)에 대해서 실시하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이, 하나의 증폭산물만을 생성하는 조합을 우선 선택하였고, 만일 선택된 4개의 F<sub>1</sub> 품종에서 증폭산물이 관찰되지 않을 경우나 (그림 5에서 WE047, WE049, SA004; 물론 검정된 4개

품종이외의 품종에서는 증폭산물이 확인될 수도 있음), major band를 확실히 구분할 수 없을 정도의 많은 증폭산물을 생성하는 조합은 F<sub>1</sub> 품종 분석에 적용하지 않았다. Primer 조합의 pre-screening 결과, 수박은 62개 그리고 호박은 40개의 primer 조합이 모든 F<sub>1</sub> 품종 (표 1 및 표 2)들의 'line specific allele analysis'를 위해 선정되었다.



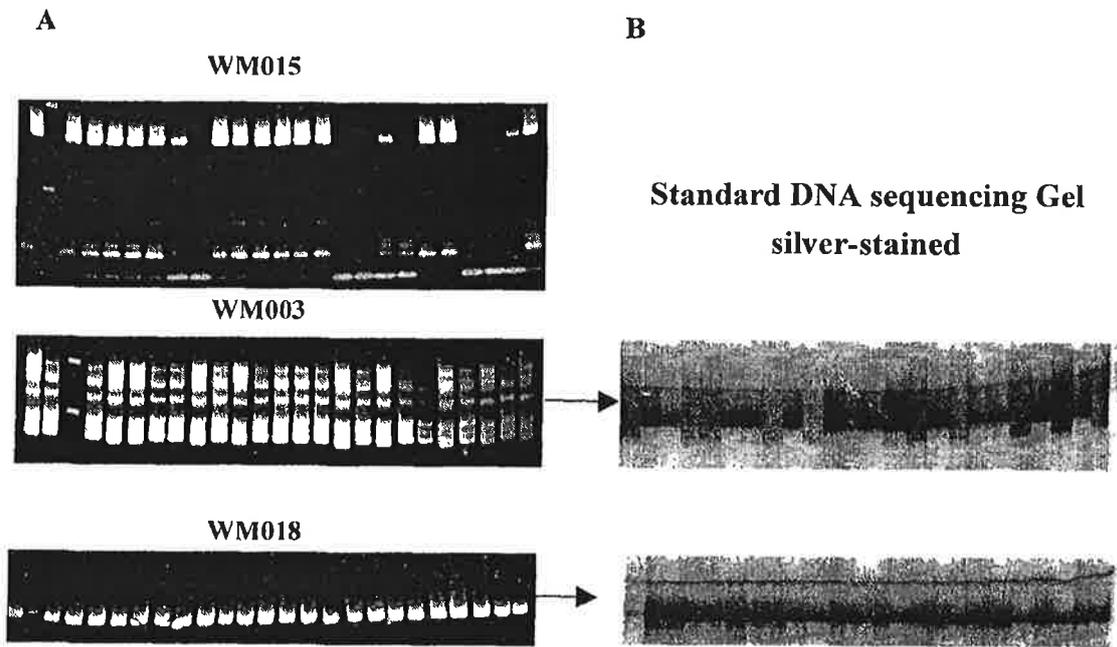
**Figure 5.** Example of specific primer screening with randomly selected 4 F<sub>1</sub> lines. All STS- and SSR- primer sets listed in Table 5 ~ Table10 were tested to confirm that only major reproducible bands for each primer sets. **Panel A.** Screening of WE- primer group. **Panel B.** Screening of SA- primer group. Total 123 and 48 specific primer sets were screened for watermelon F<sub>1</sub> lines and squash F<sub>1</sub> lines, respectively.

수박 24개 F<sub>1</sub> 품종을 분석하기 위하여 WE-group은 35개 조합 중 13개 조합만이 선정된 반면 (37%, 표 5), WM-group은 33개 조합 중 21개 (64%, 표8), 그리고 WE-group은 51개 조합중 28개 (55%, 표 9)가 선정되었다. 호박 24개 F<sub>1</sub> 품종을 분석하기 위한 primer 조합으로는 SA-group의 33개 조합 중 25개 조합

(78%)이 선정되었고 (표 6), SGm-group은 15개 조합 모두가 양호한 증폭산물을 보였다 (표 10). WA-group은 많은 PCR 산물들을 생성하였지만 뚜렷한 major band가 확인되지 않아서 많은 조합들을 제외시켰다. 그 이유로는 제 3장에서도 언급하였듯이, 대부분의 informative AFLP들이 고도의 반복성을 지니는 genomic DNA부위에서 기인되었기 때문인 것으로 사료된다. 반면에 SA-group내의 조합들은 비교적 깨끗한 PCR 증폭산물을 생성하였으며, 여러 개의 유전자좌를 동시에 표지하는 경우에도 재현성이 양호한 경우가 많았다. WM-group 조합 중 64% 만이 선정된 이유는 외국종 수박 (New Hampshire Midget)에서 분석된 염기서열을 기준으로 합성된 primer조합이 유전적으로 원연관계에 있는 국내종에 적용되었기 때문으로 판단된다. 같은 active genome으로부터 전환되었다고 할 수 있는 WE-group과 SGm-group간에서도 선정된 primer 조합의 비율이 각각 55% 및 100%로 커다란 차이를 보였다. 이러한 차이는 genomic DNA sequence를 바로 이용하는 SGm-group과는 달리, WE-group은 splicing후의 mRNA sequence를 이용함에 따른 차이라고 볼 수 있겠다. 실제 WE-group내의 primer 조합들은 대부분 EST clone sequence를 근거로 한 예측치보다 훨씬 큰 증폭산물을 생성하였으며 (그림 5 Panel A), 증폭산물의 크기가 클수록 background band가 많이 관찰되었다.

### 제3절 수박 F<sub>1</sub> 품종에서의 SSR 유전자좌 분석

농우 수박 line들 (표 1)에서의 RAPD 및 AFLP 분석과 retrotransposon-like elements에 대한 분석을 통해 확인되었던 극도로 협소한 유전적 변이가 여러 종묘 회사에서 수집된 F<sub>1</sub> 품종들에서는 어느 정도로 나타나는지를 점검하였다. 이를 위하여 WM-group의 primer 조합 (simple sequence repeat flanking primer set)을 24개 수박 F<sub>1</sub> 품종에 우선적으로 적용하였다. PCR 산물은 크게 3 가지 type으로 구분되었다 (그림 6 Panel A).



**Figure 6.** Examples of microsatellite polymorphism among 24 watermelon  $F_1$  lines in Table 1. **Panel A.** PCR products were resolved on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel having about 5 bp resolution power and detected by EtBr staining. **Panel B.** Standard DNA sequencing gel was used to find additional polymorphism owing to the increased resolution power and visualized with silver-staining. Multiple loading was used to save time and labor. Primer set WM018 detected two different loci on which one locus was scored dominantly and the other locus was scored codominantly. Unclear polymorphism at locus *WM003* on a 5% non-denaturing gel is clearly revealed on a standard DNA sequencing gel. Otherwise, locus *WM018* contains only one type of allele (monomorphic) among 24  $F_1$  lines tested.

Primer 조합 WM015에서 보이는 바와 같이 codominant type으로 scoring 되는 polymorphic locus (heterogeneous allele = 50 bp, 60 bp)가 확인되면서, 또 다른 polymorphic locus(WM015-160bp)가 표지되는 경우와(dominant type), 유전자좌 *WM003*의 경우처럼 뚜렷한 codominant type의 polymorphism이 발견되는 경우, 그리고 유전자좌 WM018처럼 monomorphic locus가 표지되는 경우이다. 5% nondenaturing polyacrylamide gel상에서 monomorphism으로 관찰된 PCR 산물들과 polymorphism이 완전히 구분되지 않는 PCR 산물들은 다시 standard sequencing gel을 이용하여 재확인하였다 (그림 6 Panel B).

21개 primer조합을 이용하여 31개 각기 다른 크기의 PCR 증폭 산물 (대립 유전자)들을 표지하였다 (표 A-5 Part 1). 8개 band는 monomorphic loci였으며,

19개 band는 dominant type의 polymorphism이 관찰되는 유전자좌들로 판명되었고, 단 4개의 band들이 codominant type으로 scoring되었다 (2개의 유전자좌; WM003과 WM018). 한 가지 특기할 점은 유전자좌 WM015-160bp의 경우처럼 flanking primer 조합이 정확히 SSR 부위를 제한하였는데도 codominant type이 아닌 dominant type으로 polymorphism이 발견되는 점인데 (그림 6 Panel A), 다른 6개의 유전자좌 (WM002-300bp + 250bp, WM006-380bp, WM013-140bp, WM016-70bp, WM019-190bp, 그리고 WM031-140bp)에서도 발견되었다 (표 A-5 Part 1 참고). 이러한 현상은 SSR-PCR에서는 좀처럼 보기 드문 경우임에도 불구하고 무려 7개의 SSR 유전자좌들의 polymorphism이 dominant type으로 scoring된 이유는, SSR-PCR primer조합이 국내 수박종과는 원연관계에 있는 외국종에서 기인된 것이기 때문이라고 판단된다. 따라서 19개의 dominant type으로 scoring 된 유전자좌 중 7개가 SSR 유전자좌이며, 나머지 12개 유전자좌는 SSR이 아닌 primer 조합의 염기서열이 유사한 다른 genomic DNA 부위를 표지한 것으로 확인되었다.

21개 SSR-PCR primer 조합을 이용해 국내 24개 수박  $F_1$  품종들이 보이는 SSR polymorphism을 검정한 결과, 각 유전자좌에서 확인되는 SSR 대립유전자의 수가 2개 이상으로 표지되는 경우는 전무하다는 것을 볼 때, 국내에서 생산되는 수박  $F_1$  품종들은 예상하였던 수준 이상으로 극도의 유전적 편협성을 보인다고 결론지었다. 이는 WReT-group의 primer 조합이 농우 수박 line들에 적용된 결과 (제 5장 2절, 그림 4)와 Jarret et al.(1997)이 33개 수집종 수박들에 대해 단 7개의 SSR 유전자좌를 검사하여 33개 품종 모두를 완벽히 genotyping하고 유전적 변이성 정도를 추정할 수 있었던 결과에 비추어 볼 때 더욱 명확해진다.

Microsatellite가 보이는 고도의 polymorphism의 원인에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않지만, 대체적으로 DNA polymerase가 주형에서 반복적 염기서열의 정확한 copy수를 잘못 인식하는 것에서 기인되는 것이라고 추론되어 왔다. Saghai Maroof et al.(1994)은 보관중이던 보리품종  $F_8$ 세대와 재배중이던  $F_{53}$ 세대를 재파종하여 얻은 DNA를 검사한 결과, 세대간에도 SSR loci들이 높은 수준의 polymorphism을 보인다는 것을 관찰하였다. 이러한 점으로 미루어 볼 때, 품종의 구분을 위한 목적으로 SSR 유전자좌를 이용하는 것은 타당하나,

오랜 기간 동안의 정확하고 안정적인 특정 품종의 표지 및 관리를 목적으로 하는 DNA marker로서는 완벽하지 못하다고 판단된다. 더욱이 F<sub>1</sub> 품종은 상당부분의 유전자좌들이 이질적인 상태이기 때문에, 수bp의 증폭산물의 크기차이로 이질적인 대립 유전자들을 scoring 해야 하는 기술적인 특성상, 한 품종의 유전자좌가 이질적인 상태일 경우에 명확한 판정이 어려울 수도 있을 것으로 사료된다.

#### 제4절 수박 및 호박 F<sub>1</sub> 품종들에 대한 STS-PCR primer 조합들의 적용

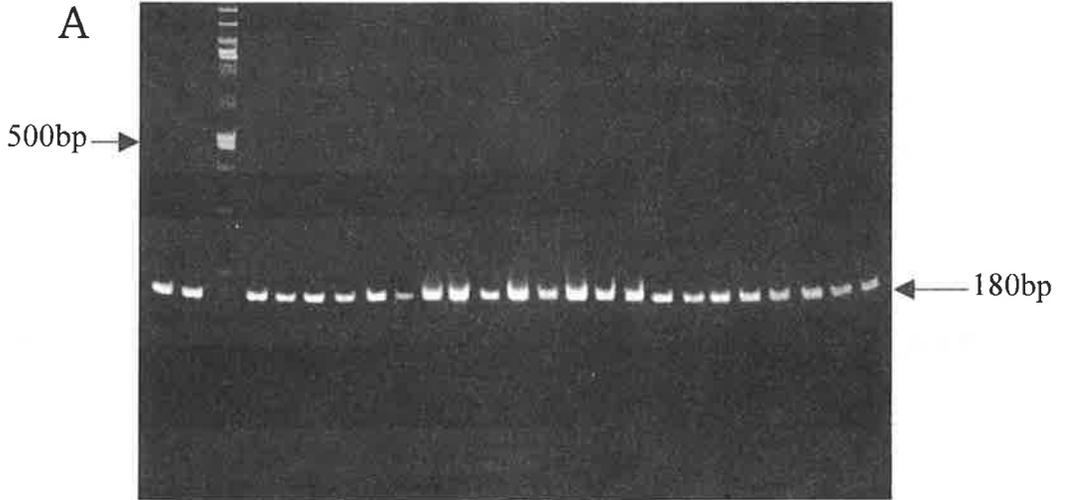
수박 F<sub>1</sub> 품종들에 대해서는 WA-group 에서 13개 조합 (표 5)이, 그리고 WE-group에서는 28개 primer 조합 (표 9)이 적용되었으며, 호박 F<sub>1</sub> 품종들에 대해서는 SA-group에서 25개 primer 조합 (표 6), 그리고 SGM-group에서는 15개 primer 조합 (표 10)이 각각 적용되어, 제 3장 6절 2항에서 기술한 방법으로 touch-down PCR을 실시하였다.

그림 7에서 보는 바와 같이 PCR 산물들은 크게 4가지 유형으로 구분되었다. 첫째, 하나의 유전자좌를 표지하면서도 대립유전자는 해당 유전자좌에서 한 가지로 나타나는 경우 (monomorphism; Panel A, WA006-180bp locus), 둘째, 뚜렷한 codominant type으로서 유전자좌에서 polymorphism이 확인되는 경우 (Panel B, SA033 locus의 130bp allele 와 <120bp + weak 130bp + 50bp>가 함께 나타나는 allele), 셋째, 하나의 primer 조합이 하나의 유전자좌를 표지하면서 dominant type으로 polymorphism이 확인되는 경우 (Panel C, WE014 locus), 마지막으로 하나의 primer 조합에 의해 두 개 이상의 유전자좌가 표지되면서 서로 다른 scoring 경향을 보일 때 (Panel D, WE027-1600bp locus와 WE027-650bp locus) 등이다. 이러한 4가지 유형은 WM-group에서도 마찬가지로 확인되었다 (그림 6). 모든 확인된 대립 유전자들을 표지에 사용된 primer 조합이름과 증폭산물의 크기를 이용하여 구분하였다.

WA006

**Watermelon F<sub>1</sub> lines**

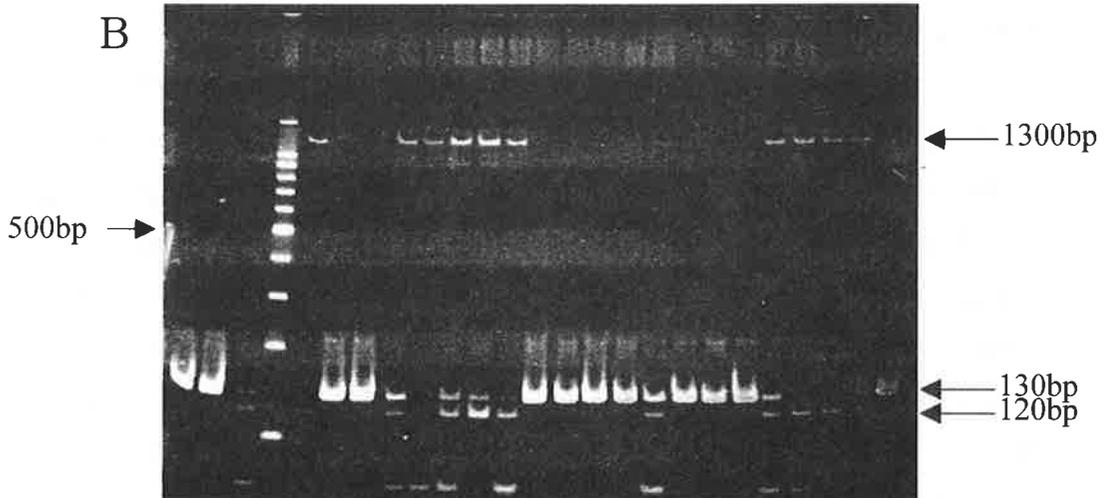
1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



SA033

**Squash F<sub>1</sub> lines**

1 2 3 M 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

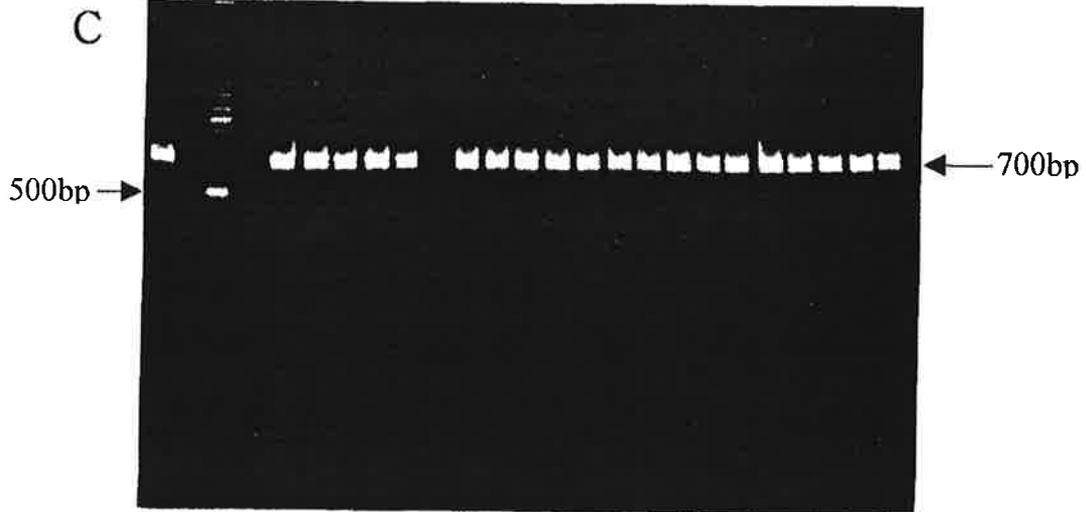


**Figure 7. (To be continued)**

**WE014**

**Watermelon F, lines**

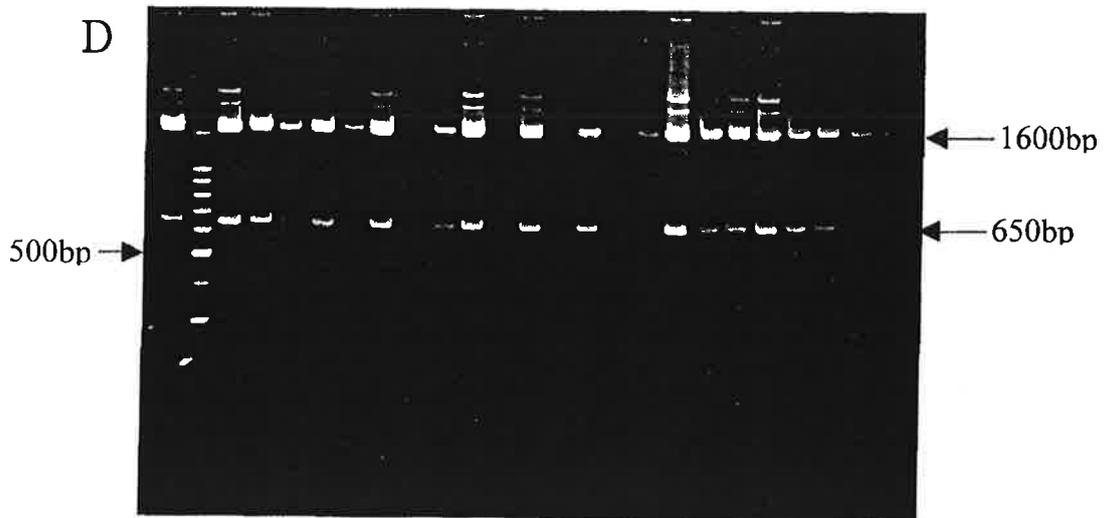
1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



**WA027**

**Watermelon F, lines**

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



**Figure 7. ( To be continued)**

**Figure 7. (continued)** Examples of amplification products of specific primer sets described in Table 5, 6, 8, 9, and 10. Productions of amplification using each primer set were resolved in a 5% non-denaturing polyacrylamide gel to increase the resolution power and stained with EtBr. Only one type of 100 bp size marker (M; Promega, USA) was used in every gel to estimate the size(s) of detected locus (loci) and allele(s) more reliably across gels. **Panel A.** Primer set WA006 detected one monomorphic locus in 24 watermelon  $F_1$  lines and be restricted by 4 endonucleases (*RsaI*, *HinfI*, *HaeIII*, and *AluI*) later to find possible additional polymorphism which latent within the primer binding sites. **Panel B.** The amplified products of primer set SA033 display two types of alleles scored codominantly. **Panel C.** Result of primer set WE014. Note while most lines produced very clear and strong amplified product (700bp), watermelon  $F_1$  I.D 2, 3, and 9 did not show any amplified product (null allele). The PCR products were also restricted with 4 endonucleases mentioned above. **Panel D.** Primer set WA027 amplified two different loci resolved by their amplified sizes. Note the present and absent scoring were exactly identical to each other locus, presumably derived from highly repetitive sequences. Some other primer sets also detected additional locus (loci) but scoring data were different to each other. These four general 'types' of PCR amplification products with 167 specific primer sets (WA-, SA-, WE-, WM-, and SGm- groups) were commonly observed.

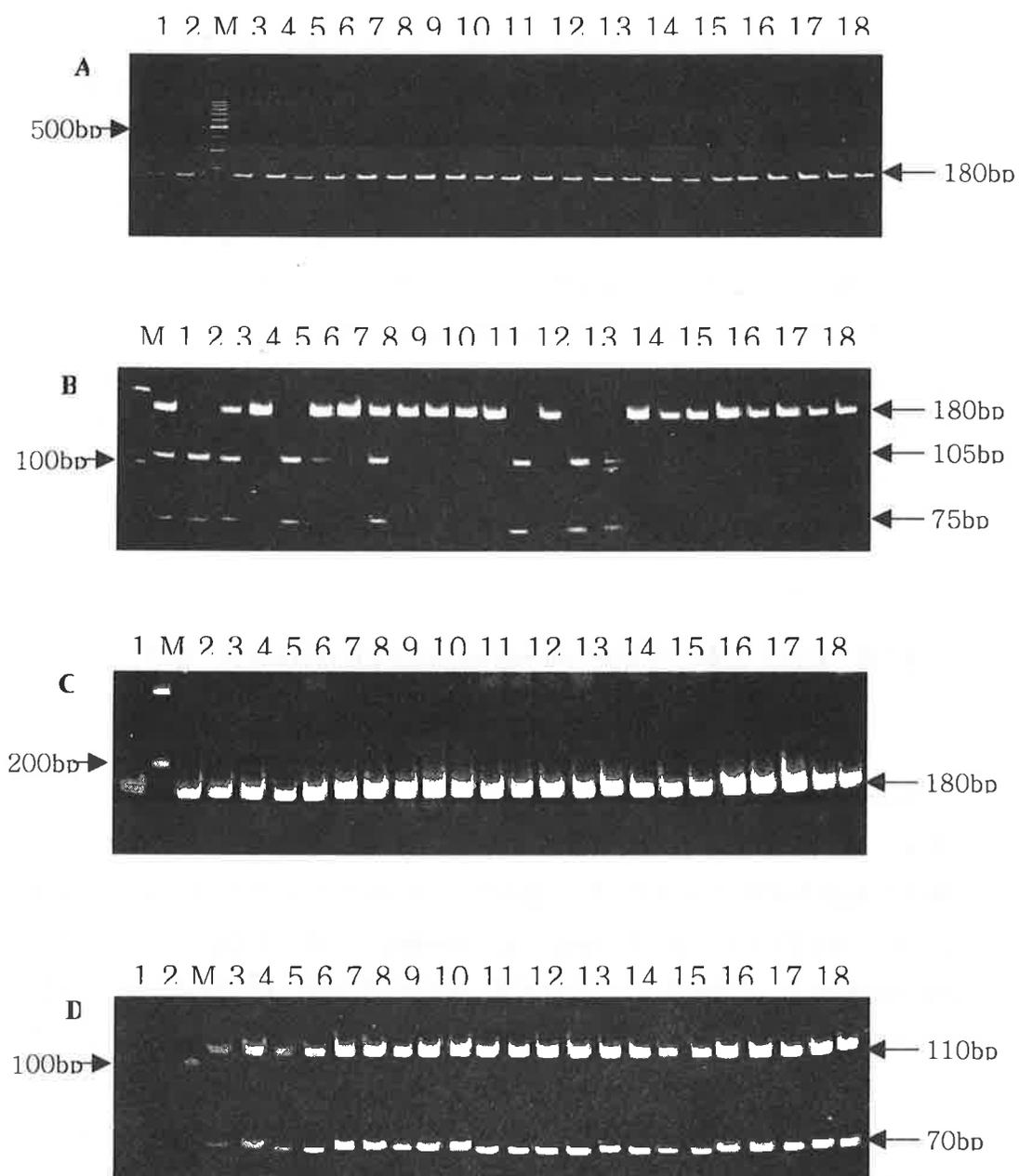
수박의 경우 WM-group의 결과까지 함께 고려한다면, 62개 primer 조합이 적용되어 91개의 PCR 증폭산물들이 확인되었으며 (표 A-5 Part 1), 이중 9개는 monomorphism을 보이는 유전자좌였으며 (25.8%), 48개는 dominant type의 polymorphism이 확인되는 유전자좌였고 (61.3%), 그리고 단 4개의 증폭산물 (12.9%)이 codominat type으로 scoring되었다 (WM003 및 WM018 primer 조합에 의한 2개의 유전자좌). 호박의 경우는 40개 primer 조합이 적용되어 65개의 PCR 증폭산물이 확인되었으며 (표 A-5 Part 2), 이중 25개는 monomorphism을 보이는 유전자좌였으며 (38.4%), 38개는 dominant type의 polymorphism이 확인되는 유전자좌였고 (58.5%), 단 2개의 증폭산물 (3.1%)이 codominat type으로 scoring되었다 (그림 7 Panel B의 SA033). 이러한 결과는 국내의 수박 및 호박 $F_1$  품종들간의 polymorphism은 극도로 낮을 뿐 아니라, polymorphism source도 삽입, 결실, 전좌, 치환 등의 커다란 수준에서의 변이 (염색체 이상)가 아니라 염기의 치환 (mutaion) 수준에서 나타나는 polymorphism이 대부분이라고 할 수 있다. 국내 수박 및 호박  $F_1$  품종들이 보이는 유전적 다양성은 거의 모두 SNP 수준에서 결정되어지는 극도로 협소한 유전적 다양성을 보인다는 것을 의미한다.

한 가지 특기할 점은, 호박 농우 line에서 관찰된 아주 많은 수의 informative AFLP (12개의 primer 조합에서 277개가 확인; 제 4장 3절)와 호박 F<sub>1</sub> 품종에 대한 STS-PCR 결과에서의 매우 낮은 polymorphism은 서로 상반된 결과로 보인다는 것이다. 그러나 앞서도 언급하였듯이 대부분의 informative AFLP가 각 line에서 고르게 발견된 것이 아니라, 3가지 group간에 발견된 것이었다는 것을 고려한다면, 농우 line들의 세가지 group이 보이는 polymorphism은 전체 chromosome의 극히 제한된 영역에서 기인되었다는 것을 의미한다. 이러한 현상은, 만일 informative AFLP들을 호박의 mapping population을 이용한 linkage analysis를 실시하여 연관지도에서 작성하여 본다면 대부분의 AFLP들이 좁은 영역에 고도로 밀집되는 것을 쉽게 관찰할 수 있을 것이다.

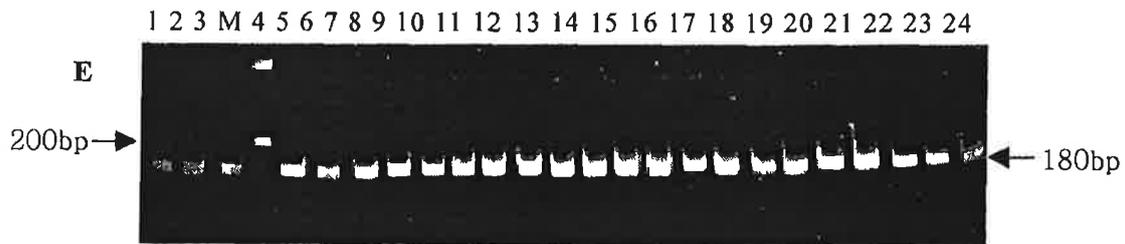
#### 제5절 제한효소를 이용한 monomorphic PCR product의 절단

Specific primer 조합을 이용한 유전자좌의 표지는 PCR 증폭산물의 유부 및 크기를 표시해줌으로서 이루어진다. 그러나 표지된 유전자좌에서 품종간 단 하나의 대립유전자가 관찰될 때는 표지된 유전자좌로부터 얻을 수 있는 정보가 상당히 제한된다 (그림 7 Panel A, WA006). 또한 검사한 유전자좌에서 polymorphism이 인정되더라도 대부분의 품종이 동일한 대립유전자를 가지는 경우에도 (그림 7 Panel C, WE014) 품종표지를 위한 polymorphism의 가치가 떨어진다. 이러한 경우에는 4가지 제한효소로 PCR산물을 절단하고 절편들의 크기를 비교하여, SNP를 확인함과 동시에 각 품종의 대립유전자들에 제한효소 작용점 및 절편들의 크기 정보를 추가하여 한 품종이 지니는 '특정 대립유전자의 관리'가 좀더 구체적일 수 있도록 시도하였다.

제한 효소의 적용과정 및 해석을 Primer set SA006의 경우를 예시하여 설명



**Figure 8. (continued)**



**Figure 8.** (continued) An example of applying endonucleases to find additional polymorphic allele(s) latent within the amplified genomic DNA region tagged by one primer set. **Panel A.** Primer set SA006 identified a monomorphic locus in 24 squash F<sub>1</sub> lines. Note that the amplified product is very small fragment (180bp). Four endonucleases (*Rsa*I; GT↓AC, *Hinf*I; G↓ANTC, *Hae*III; GG↓CC, and *Alu*I; AG↓CT), so called 'frequent cutter', were used to restrict the PCR product. **Panel B.** Cleaved amplified products are displaying polymorphic restriction patterns, and appearing to be codominant. There are 2 allele types, type A (180bp, uncleaved) and type B (105bp+75bp, one restriction site). Therefore, just with this restriction pattern, 3 genotypes, two homogeneous (AA and BB type) and one heterogeneous (AB type), could be inferred. **Panel C.** Amplified PCR product did not have *Hinf*I restriction site. **Panel D.** Application of *Hae*III shows monomorphic restriction cleaved band pattern. **Panel E.** Amplified PCR product did not have *Alu*I restriction site. Total 58 monomorphic PCR amplified band derived from WA-, WE, SA-, and SGM- primer groups (see Table 11) were restricted with 4 endonucleases and 50 additional polymorphic alleles were identified in this study.

하고자 한다 (그림 8). 모든 24개 호박 F<sub>1</sub> 품종에서 180 bp 유전자좌가 표지되었으나, 한 가지의 대립유전자만이 확인되었다 (Panel A). PCR 산물들에 대해서 4가지 제한효소를 동시에 처리하여, *Rsa*I (Panel B)과 *Hae*III (Panel D)의 처리에서는 절단산물을 확인할 수 있었고, 180 bp내에는 *Hinf*I (Panel C) 및 *Alu*I (Panel E)의 제한효소 작용점 (G<sup>^</sup>ANTC와 AG<sup>^</sup>CT)이 존재하지 않음을 알 수 있었다. *Rsa*I의 절단산물들은 추가적인 polymorphism을 보이고 있는데, *Rsa*I에 의해 절단되지 않는 대립유전자 (180 bp; A allele)와 하나의 작용점이 있는 대립유전자 (105bp + 75bp; B allele) 두가지 형태가 polymorphism을 보였다. 이를 근거로 하여 각 품종의 정확한 genotyping이 가능하다. 예를 들면, 표 2에 제시된 각 F<sub>1</sub> 품종들을 실험ID로 구분하여서, 1번 품종은 hetero (AB type)이며, 2번은 BB type의 homo, 3번은 hetero, 4번은 AA type의 homo 등 codominant scoring에 의거한 정확한 genotyping이 가능해진다. 결론적으로 SA006 primer 조합에 의해 표지되는 유전자좌는 실지로 적어도 2개 이상의 대립 유전자들이 표지된다는 것을 알 수 있었다. 하지만 모든 염기서

**Table 11.** Number of loci and alleles detected with specific primer sets among F<sub>1</sub> lines in Table 1(watermelon) and Table 2(squash)

Group of primer sets	No. of primer set	After PCR <sup>a</sup>		After digestion <sup>b</sup>		Total alleles
		No. of loci	No. of alleles	No. of targets	No. of + alleles	
WA-	13	18	27	9	+6	33
WE-	28	42	68	24	+22	92
WM-	21	31	50	-	-	50
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>91</b>	<b>145</b>	<b>33</b>	<b>+28</b>	<b>173</b>
SA-	25	43	71	12	+13	84
SGm-	15	22	32	13	+9	31
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>65</b>	<b>103</b>	<b>25</b>	<b>+22</b>	<b>125</b>

<sup>a</sup> All reasonably readable amplified products were counted and alleles in each locus were scored (monomorphic = 1, dominant type = 2, and codominant = 2 alleles in each locus).

<sup>b</sup> Four endonucleases (*RsaI*, *HinfI*, *HaeIII* and *AluI*) were applied to the 'Target bands ; major PCR products and monomorphic in most F<sub>1</sub> lines' to reveal additional polymorphism(s). '+ alleles' means that the number of alleles identified additionally with using 4 endonucleases in 24 F<sub>1</sub> lines.

열을 분석하기 전에는 몇 가지 대립유전자들이 존재하는지 알 수가 없다.

단순히 24개 품종안에서 확인되는 polymorphism만을 고려할 때, 4가지의 제한효소 처리 및 별도의 전기영동 등의 많은 노력과 경비를 투자하여 단 한 가지의 대립유전자를 추가로 확인한 것으로 극히 비효율적인 것으로 보이지만, 하나의 품종이 지니는 대립유전자의 특성을 기술하는 데에 중점을 두어 각 품종들을 관찰한다면 아래와 같은 매우 유용한 정보를 얻을 수 있다 (1번 품종만을 고려할 때).

- 1) SA006 primer 조합은 1번 품종에 대해 반드시 180 bp의 증폭산물을 생성한다.
- 2) *HinfI* 및 *AluI*에 의해서는 180 bp의 증폭산물이 절단 되지 않는다.
- 3) *HaeIII*에 의해 단 한곳이 절단되고, 110 bp와 70 bp의 절편들이 확인되어야 한다.
- 4) *RsaI*으로 절단할 때 반드시 180 bp와 105 bp 및 75 bp 등 세개의 band가 정확히

보이는 hetero type으로 관찰되어야 한다.

이러한 정보들을 각 유전자좌에 단계적으로 누적할 수 있다면, 극히 좁은 범위의 유전적 변이를 보이는 작물 품종들에도 각 품종의 정확한 표지에는 전체 chromosome 수준에서 확인되는 품종들간 polymorphism level이 문제가 아니라 각 품종에서 확인된 대립 유전자들의 정확한 묘사가 더욱 중요하다는 것이 분명해 진다. 이를 위해서는 무엇보다도 specific primer 조합이 재현성이 높게 한 품종에 대해서 하나의 유전자좌에 속하는 품종 고유의 대립유전자만을 혹은 뚜렷한 major band의 형태로 표지한다는 전제가 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 앞의 2절에서 기술한 대로 F<sub>1</sub> 품종구분에 적용할 primer 조합을 touch-down PCR을 이용하여 엄정히 선별하였고, 제한효소를 이용한 PCR 산물의 처리 전 반드시 target band를 설정하여, 젤에서 확인하기 어려운 minor band들이 절단됨으로 인하여 확인되는 polymorphism은 철저히 구분하여 DB에서 제외시켰다.

수박 24개 F<sub>1</sub> 품종들에서 33개의 target band가 설정되어 제한효소로 처리되었고, 28개의 polymorphic한 대립유전자들이 추가로 확인되어 총괄적으로는 173개의 대립유전자들이 62개의 primer 조합들에 의해 표지되었다 (표 11). 호박 24개 F<sub>1</sub> 품종들에서는 25개의 target band가 설정되어 제한효소로 처리되었고, 22개의 polymorphic한 대립유전자들이 추가로 확인되었으며, 총괄적으로는 125개의 대립 유전자들이 40개의 primer 조합들에 의해 표지되었다 (표 11).

## 제6절 개체지향적 database의 구축

타연구기관과의 원활한 정보의 공유, 실험결과의 공정성 확보, 그리고 비전문가들도 쉽게 접근할 수 있어야 한다는 점을 강조하여, 본 연구진은 과제수행에서 이용된 수박 및 호박 각각 24개 F<sub>1</sub> 품종들에 대한 개체지향적 DB를 구축하여 총괄책임자의 web site에 등록하였다 (그림 9).

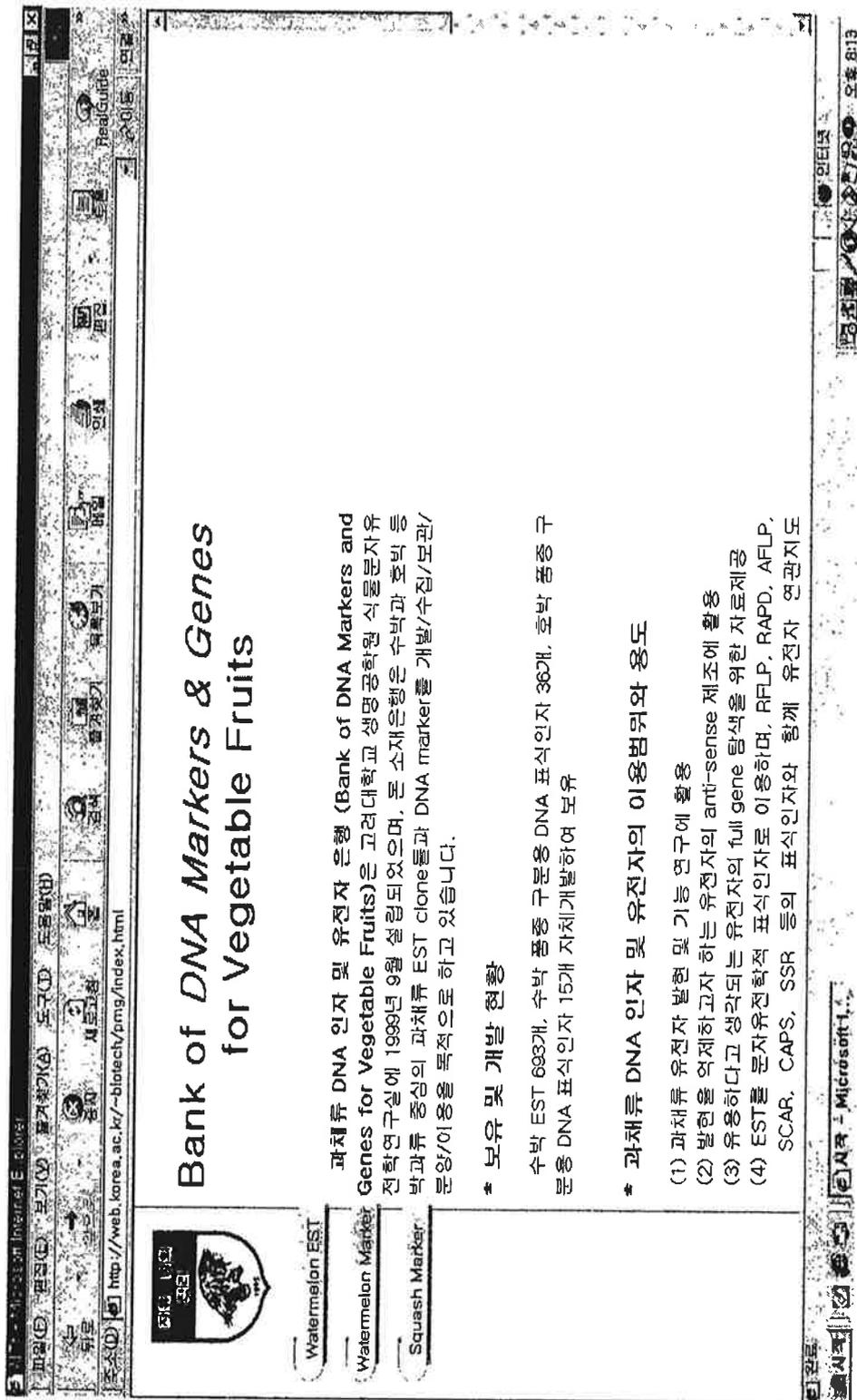


Figure 9. Homepage (<http://web.korea.ac.kr/~biotech/pmg/index.html>)

먼저 전기영동 결과는 사용된 primer 조합별로 구분하여 primer sequence와 PCR 조건, 증폭산물의 크기, 제한효소의 인식서열, 절단산물의 크기 및 2배체에 의거한 genotyping의 결과 등 모든 정보를 규합하여 정리하였다 (그림 10). 총 400여개의 image file들을 정리하여 등록하였으며 (부록 참고), 또한 image file에 소개된 모든 가시적 정보를 수치화하여 차후 지속적인 DB의 확충에 필요한 format을 확립하고자 하였다. 표 A-5 Part 1에는 수박 24개 F<sub>1</sub> 품종에 대한 PCR 산물들의 증폭 유무 및 크기가 자세히 명기되어 있고, 호박 24개 F<sub>1</sub> 품종은 표 A-5 Part 2에 소개되어 있다. 표 A-6에는 수박 F<sub>1</sub> 품종들의 PCR 산물들에서 선정된 33개의 target band에 대해 적용된 4가지 제한효소의 절단산물 및 대립유전자 해석이 각 품종별로 자세히 표기되었다. 표 A-7에는 호박에서 선정된 25개의 'target band'에 대한 결과들이 표기되어 있다. 표 A-6 및 표 A-7을 횡적으로 보았을 때 본 과제수행에서 검정된 24개 품종내에서 각각의 유전자좌에 존재하는 대립유전자들이 제한효소 절단 산물들의 비교로 표현되어 있으므로, polymorphism 유무 및 대립유전자들의 종류를 판단할 수 있다. 또한 종적으로는, 실무자들이 품종의 정확한 표지 및 관리에 유용하게 이용할 수 있는 primer 조합을 효과적으로 선정할 수 있도록 각 특정 F<sub>1</sub> 품종들의 각 유전자좌에서 관찰된 특정 대립유전자들에 대한 정보를 함축하고 있다.



## 제7절 총 설

여러 종묘회사에서 개발된 수박 및 호박 각각 24개 F<sub>1</sub> 품종을 분석한 결과, 국내에서 생산되는 수박 및 호박 품종들간의 유전적 변이는 대부분 SNP에서 기인되는 것으로 판단되었으며, 매우 협소한 변이폭을 지니고 있는 것으로 사료된다. 이렇게 고도의 근연관계에 있는 품종들을 정확히 표기하기 위해서는 chromosome 전체 수준에서 polymorphism 관찰하여 비교하는 접근방식으로는 분제점이 많다는 것을 이미 RAPD 및 AFLP 분석을 통하여 언급한 바 있다. 따라서 본 연구에서 'specific allele tagging analysis'의 개념을 품종표지 및 관리에 도입하였으며, 모든 결과를 가시화하고 수치화가 강조된 DB로 구축하여 품종표지에 DNA marker를 효과적이며 안정적으로 적용할 수 있는 규범을 제시하였다.

## 제 7 장 결 론

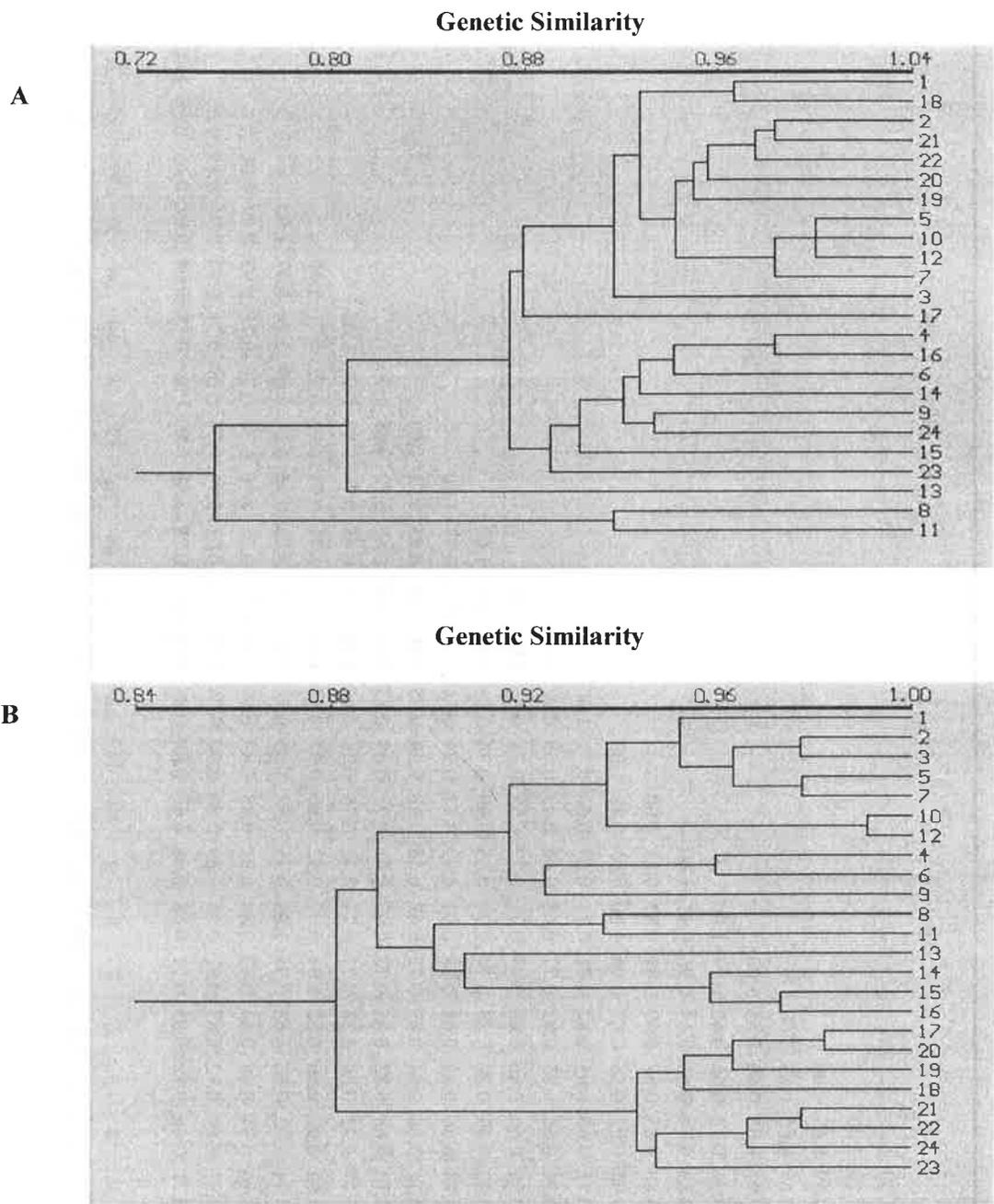
### 제1절 수박 및 호박 품종이 보이는 좁은 유전적 다양성

연구과제 수행 초기결과에서 농우종묘 수박 및 호박 line을 대상으로 RAPD 및 AFLP 분석으로 관찰된 각 line간 고도의 근연성은 한 종묘회사에만 나타나는 현상이 아니라, 우리나라에서 생산되는 수박 및 호박 품종 전반에서 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 새로운 품종개발에 극소수의 우수 품종들 (elite line)을 기본적인 유전재료로 사용한 결과이며, 우리나라에서 재배되는 타 주요작물에서도 거의 비슷한 경향으로 나타날 것으로 판단된다. Table A-5 및 Table 6과 7에 수록된 자료를 binary data로 전환하였고, UPGMA분석방법을 이용하여 추정된 genetic similarity matrix를 Table 12, 13 (수박) 및 Table 14, 15 (호박)에 수록하였다 (UPGMA분석에 따른 genetic similarity는 모든 유전자좌에서 일어날 수 있는 돌연변이의 확률은 동일하다는 것을 전제로 하였기 때문에, 수개에서 수십개의 primer 조합으로 얻어진 marker data들 혹은 한정된 target band들에 대해서 제한효소를 처리한 data들은 엄밀한 의미에서 'un-weighted data'라고 보기 힘들다. 그러므로 대략적인 수준에서의 품종간 근연도 추정에만 적용할 수 있다).

수박에서 specific primer 조합을 이용한 PCR 산물을 scoring한 data를 적용하였을 때 (Table 12), F<sub>1</sub> 품종들간의 genetic similarity는 1.0 (F<sub>1</sub> line ID; 5~10, 5~12, 10~12)에서 0.65 (F<sub>1</sub> line ID; 7~8)의 범위를 가졌으며, 제한효소를 적용한 후의 data까지 포함할 경우 (Table 13)에는 0.99 (F<sub>1</sub> line ID; 10~12)에서 0.83 (F<sub>1</sub> line ID; 8~18, 8~19, 8~20, 11~20)의 범위를 보였다. 호박의 경우, specific primer 조합을 이용한 PCR 산물들 자체를 scoring한 data를 적용하였을 때 (Table 14), F<sub>1</sub> 품종들간의 genetic similarity는 1.0 (F<sub>1</sub> line ID; 8~11, 8~21, 11~22)에서 0.60 (F<sub>1</sub> line ID; 4~6, 6~10)의 범위를 가졌고, 제한효소를 적용한 후의 data까지 포함할 경우 (Table 15)에는 0.98 (F<sub>1</sub> line ID; 20~21, 20~23)에서 0.72 (F<sub>1</sub> line ID; 2~11)의 범위를 보였다.



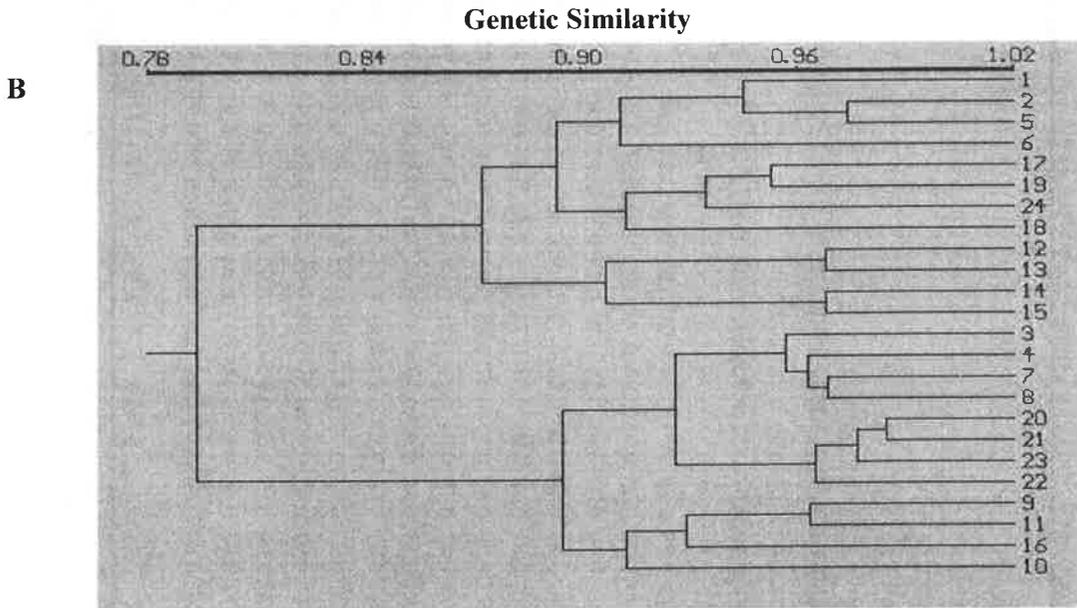
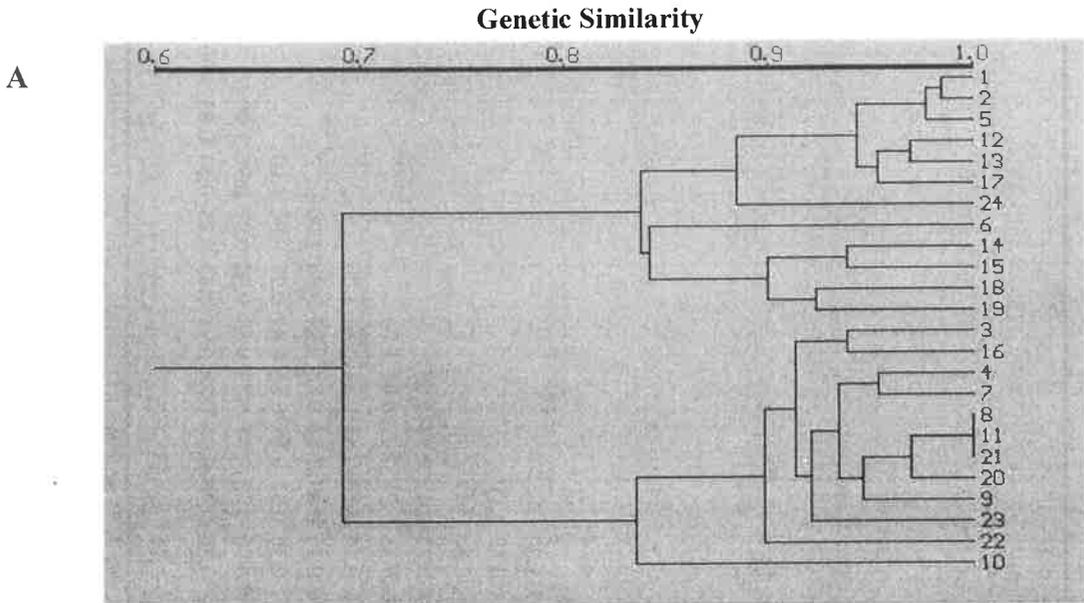




**Figure 11.** UPGMA-derived cluster analysis illustrating relationship among watermelon  $F_1$  lines. Numbers are experimental identification number in Table I. The scale on the top horizontal line indicates the genetic similarity index. **Panel A.** Analysis was conducted with the binary scoring data of 145 alleles in 91 loci (see Table 13 and Table A-5 Part1). **Panel B.** Total 173 alleles in 91 loci were used in this analysis. (see Table 14, Table A-5 Part1, and Table A-6)







**Figure 12.** UPGMA-derived cluster analysis illustrating relationship among squash  $F_1$  lines. Numbers are experimental identification number in Table 2. The scale on the top horizontal line indicates the genetic similarity index. **Panel A.** Analysis was conducted with the binary scoring data of 103 alleles in 65 loci (see Table 15 and Table A-5 Part2). **Panel B.** Total 125 alleles in 65 loci were used in this analysis. (see Table 16, Table A-5 Part2, and Table A-7)

결과적으로 PCR 증폭산물의 유무 및 크기만을 이용하여 대립유전자를 표시할 때는 수박에서는 세가지 F<sub>1</sub> line (표 12; ID 5, 10, 12), 그리고 호박에서는 네 가지 F<sub>1</sub> line들 (표 14; ID 8, 11, 21, 22)이 서로 구분되지 못하다가 제한효소를 적용한 후에는 완전히 구분되었다 (표 13, 그림 11; 수박, 표16, 그림 12; 호박). 추가적인 polymorphism을 찾기 위한 'target band'의 제한효소 처리 결과는 우리나라에서 생산되는 수박 F<sub>1</sub> 품종간 유전변이에 비하여 호박 F<sub>1</sub> 품종간 유전적 변이가 크다는 점을 잘 보여주고 있는데 (표 16), 호박 품종간 SNP가 발견될 확률은 수박에 비해 약 2배 가량 높았다.

## 제2절 특정 유전자좌의 정확한 표지와 대립유전자 정보의 관리

품종의 정확한 표지를 위해 polymorphism 만을 강조할 때는 수십개의 primer 조합을 이용하고도 명확히 판단할 수 없는 경우가 생길 수 있다. 확인된 polymorphism을 다시 정확히 제한할 수 없을 경우에는 더욱 심각한 문제를 야기할 수 있다. 그러나 specific primer를 이용하여 특정 유전자좌를 정확히 표지하고, 제한효소를 적용하여 표지된 유전자좌의 대립유전자가 지니는 SNP 정보까지 함께 체계적으로 확보하여 품종별 DB를 구축하고 품종간 DB를 규합해서 비교한다면, 단 몇 개의 primer 조합과 제한효소를 이용하여 쉽게 품종을 표지하고 구분할 수 있다. 본 연구에서 어떤 방법으로 DNA marker를 이용한 정보를 획득하고, 어떻게 이러한 정보들을 가시화하고 수치화할 수 있을 것인가에 대한 대안을 구체적으로 제시하였다.

### 제3절 품종 표지를 위한 specific primer 조합의 DNA source

표현형질에 의존해 표지되던 품종을 DNA marker를 이용하여 더욱 정확하게 표지하고자 할 때 가장 이상적인 경우는 waxy type의 벼나 보리의 경우에서처럼 표현형질을 지배하는 유전자자체를 DNA marker로 확립하는 것이다. 즉, 품종을 구분하기 위한 DNA marker의 개발을 유전자 혹은 유전자 부위의 DNA를 이용하여 진행한다면, 차후polymorphic한 대립유전자가 보이는 유전적 작용에 대한 해석이 명확진다. 그러나 'active chromosome'에서 개발된 DNA marker를 이용할 때에는 'junk DNA'부위에서 개발된 DNA marker에 비하여 낮은 수준의 polymorphism이 확인된다는 단점이 있다. 본 연구에서도 이러한 점이 확인되었다 (표 16). WA-group 및 SA-group은 AFLP분석에서 사용된 제한효소의 특성상, 전체 chromosome을 DNA source로 사용하여 전환된 primer조합들이며, WE-group 및 SGm-group은 active chromosome 부위를 DNA source로 사용하여 전환된 primer 조합이다. 분석에 사용된 제한효소는 항상 일정하였으므로, 분석에 사용된 target band의 크기와 추가로 발견된 polymorphic allele의 수를 비교하면 SNP 수준을 가늠할 수 있다.

**Table 16.** Comparison of polymorphism detected by applying 4 endonucleases to monomorphic amplified products

Specific primer group	Target band (locus) <sup>a</sup>		Additional polymorphism <sup>b</sup>	
	Number tested	Accumulative size	Number of alleles	Average
WA-	9	1,790bp	+6	298bp
WE-	24	19,420bp	+22	882bp
SA-	12	1,910bp	+13	146bp
SGm-	13	4,190bp	+9	465bp

<sup>a</sup>See Table 11 about 'Target band'. The band size of all target band were summed.

<sup>b</sup>The number of newly identified alleles with using 4 endonucleases (*RsaI*, *HinfI*, *HaeIII*, and *AclI*). The probability of detecting new polymorphism in each specific primer group expressed with [Accumulative size of target bands] / [Number of additionally identified alleles].

수박의 경우에는 WA-group에서 평균 약 300 bp마다 24개 F<sub>1</sub> 품종내에서 SNP에 의한 polymorphic allele가 발견된 반면, WE-group에 의해 증폭된 target band들에서는 약 880 bp 마다 하나의 SNP가 확인되었다. 호박의 경우는 수박보다 높은 SNP 수준을 보이는 것이 확인되었는데, SA-group에서는 약 150 bp 마다, SGm-group에서는 약 470 bp 마다 24개 F<sub>1</sub> 품종내에서 SNP에 의한 polymorphic allele가 발견되었다. 이러한 결과에 미루어 볼 때, active chromosome에서 DNA marker를 개발할 때는 chromosome 전체를 대상으로 할 때 보다 약 3배의 낮은 polymorphism이 확인된다는 추정이 가능하다. 그러나 제 4장, 5장에서도 언급하였듯이, 'junk DNA' 부위에서 전환된 primer 조합들은 그 증폭산물이 매우 다양하게 나타나는데, 그 이유는 heterochromatin 부위의 고도의 반복적 염기서열 때문인 것으로 사료되었다. 반면에 low-copy로 존재하는 실제 유전자 혹은 그 근처의 DNA를 이용할 경우는 증폭산물이 상당히 깨끗하였으며, 정확한 품종표지의 관건인 'one primer set - one PCR product'의 개념에도 잘 부합되었다. 따라서 EST의 3'-UTR을 이용하는 방안 (WE-group)과 gene-coding region을 이용하는 방안 (SGm-group) 두 가지에 중점을 두고, 앞으로도 계속 수박 EST clone들의 3' 발단을 염기서열 분석하여 specific primer조합 합성을 추가할 방침이며, 호박 'active chromosome region-enriched semi-library'의 clone들을 지속적으로 염기서열 분석하여 STS-PCR primer 조합을 지속적으로 합성할 계획으로 있다.

#### 제4절 유전자 지도 작성의 필요성

본 연구과제를 수행하는 동안 많은 수의 specific primer 조합과 제한효소절단을 이용한 SNP를 확인하면서 한가지 의문을 갖게 되었다. "발견되는 polymorphism은 염색체 전반에 걸쳐서 나타나는 것인가? 아니면 한 부위에서 집중되어 나타나는 것인가?" 이 문제에 대한 답을 얻기 위해서는 개발된 primer 조합을 이용하여 유전자지도를 작성하여야 한다. 유전자 지도가 작성되면,

우리나라 품종들이 보이는 polymorphism source부위를 정확히 알 수 있다. 또한 DNA marker들이 유전자 자체 혹은 가까이 연관되어 있는 유전자좌를 표지한다면, 1~2개의 유전자 작용으로 설명할 수 없는 양적 형질에 관여하는 유전양상을 보다 세분화하여 연구할 수 있다 (QTL analysis; Lander and Botstein, 1989; Haley and Knott, 1992). 더 나아가서는 우수품종을 육종하기 위한 양친을 보다 적극적으로 탐지해 나갈 수 있으며 (comparative mapping; ), marker assistant selection을 통해 저항성 유전자 뿐만 아니라 양적형질에 크게 기여하는 염색체 부위 (QTL)를 기존의 우수품종에 효과적으로 도입해 나갈 수 있다 (Larson et al., 1996, Spaner et al., 1999). 이번 과제에 주목적인 정확한 품종표지 및 관리를 위한 효과적인 DNA marker 기법의 개발과 품종분석 결과의 구체적이며 현실적인 DB구축의 모형을 성공적으로 제시할 수 있었음에 그치지 않고, 수박의 세밀화된 유전자 지도를 작성하기 위해 일본 및 미국의 연구기관과 현재 협의중에 있다.

## 제 8 장 인용 문헌

- Anderson, N. L., and Anderson, N. G. 1979. Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin, and  $\alpha_2$ HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88:258.
- Akkaya, M. S., Shoemaker, R. C., Specht, J. E., Bhagwat, A. A., and Cregan, P. B. 1995. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Science* 35:1439.
- Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F., and Heun, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics* 249: 65.
- Beridze, T. 1986. *Satellite DNA*(transl.). Springer-Verlag, Berlin.
- Bird, A. 1985. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, Cp-G rich DNA. *Cell* 40: 91.
- Boyes, J. and Bird, A. 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64: 1123.
- Castiglioni, P., Ajmone-Marsan, P., Wijk, R. V., and Motto, M. 1999. AFLP marker in a molecular linkage map of maize : co-dominant scoring and linkage group distribution. *Theoretical and Applied Genetics* 99:425.
- Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. 1998. DNA methylation in plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:223.
- Georges, M., Gunawardana, A., Threadgill, D. W., Lathrop, M., Olsaker, I., Mishra, A., Sargeant, L. L., Schoeberlein, A. A., Steele, M. R., Terry, C., Threadgill, D. S., Zhao, X., Holm, T., Fries, R., and Womack, J. E. 1991. Characterization of a set of variable number of tandem repeat markers conserved in Bovidae. *Genomics* 11: 24.

- Ghareyazie, B., Huang, N., Second, G., Bennett, J., and Khush, G. S. 1995. Classification of rice germplasm. I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*. 91: 218.
- Haley, C. S., and Knott, S. A. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315.
- Hamann, A., Goubely, C., Lenoir, A., Cocherel, S., Picard, G., Raynal, M., Grellet, F., and Delseny, M. 1995. Identification of the most represented repeat motif in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 91:160.
- Hayes, P. M., Cjirono, H., Witsenbore, M., Kuiper, M., Zabeau, M., Sato, K., Kleinhofs, A., Kudrna, D., Kilian, A., Saghai-Marroof, M., and Hoffman, D. 1997. Characterizing and exploiting genetic diversity and quantitative traits in barley (*Hordeum vulgare*) using AFLP markers. *J. Quantitative Trait Loci*. Vol. 3. <http://probe.nalusda.gov:800/otherodcs/jqtl>.
- Hudson, T. J., Stein, L. D., Gerety, S. G., Ma, J., Castle, A. B., Silva, J., Slonim, D. K., Baptista, R., Kruglyak, L., Xu, S.-H., Hu, X., Colbert, A. M. E., Rosenberg, C., Reeve-Dayl, M. P., Rozen, S., Hui, L., Wu, X., Vestergaard, C., Wilson, K. M., Bae, J. S., Maitra, S., Ganiatsas, S., Evans, C. A., DeAndelis, M. M., Ingalls, K. A., Nahf, R. W., Horton, L. T., Jr., Anderson, M. O., Collymore, A. J., Ye, W., Kouyoumjian, V., Zemsteva, I. S., Tam, J., Devine, R., Courtney, D. F., Reynaud, M. T., Nguyen, H., O' Connor, T. J., Fizames, C., Faure, S., Gyapay, G., Dib, C., Morissette, J., Orlin, J. B., Birren, B. W., Goodman, N., Weissenbach, J., Hawkins, T. L., Foote, S., Page, D. C., and Lander, E. S. 1995. An STS-based map of the human genome. *Science* 270:1945.
- Jarret, R. L., Merrick, L. C., Holms, T., Evans, J., and Aradhya, M. K. 1997. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome* 40: 433.
- Kleinhofs, A., Kilian, A., Saghai-Marroof, M. A., Biuashev, R. M., Hayes, P. M., Chen, F. Q., Lapitan, N., Fenwick, A., Blake, T. K., Kanazin, A., Ananiev, E., Dahleen, L., Kudrna, D., Bolling, J., and Knapp, S. J. 1993. A saturated medium density map of

- the barley genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86:705.
- Kumar, A. and Bennetzen, J. L. 1999. Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 33: 479.
- Lander, E. S., and Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185.
- Larson, S. R., Kadyrzhanova, D., McDonald, D., Sorrells, M., and Blake, T. K. 1996. Evaluation of barley chromosome-3 yield QTLs in a backcross F2 population using STS-PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 93:618.
- Martin, J. M., Blake, T. K., and Hockett, E. A. 1991. Diversity among North American spring barley cultivars based upon coefficients of parentage. *Crop Science* 31:1131.
- Maughan, P. J., Saghai Maroof, M. A. and Buss, G. R. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38: 715.
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. The isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321.
- Nei, M., and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 76: 5269.
- Ok, S. H., Chung, Y. S., Bae, J. M., Bahn, S. C., Park, H. M., Yu, S. N., Shin, J. S. 2000. Identification of expressed sequence tags of watermelon (*Citrullus lanatus*) leaf at the vegetative stage. *Plant Cell Reports* 19: 932.
- Olson, M., Hood, L., Cantor, C., and Botstein, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245:1434.
- Perry, D. J., Isabel, N. and Bousquet, J. 1999. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: the amount and nature of variation revealed in Norway spruce.

Heredity 83: 239.

- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Roder, M. S., Plaschke, J., Konig, S. U., Borner, A., Sorrells, M. E., Tanksley, S. D., and Ganal, M. W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. *Molecular and General Genetics* 246: 327.
- Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q., and Allard, R. W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:5466.
- Smith, D. N. and Devey, M. E. 1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37:977.
- Spaner, D., Rossnagel, B. G., Legge, W. G., Scoles, G. J., Eckstein, P. E., Penner, G. A., Tinker, N. A., Briggs, K. G., Falk, D. E., Afele, J. C., Hayes, P. M., and Mather, D. E. 1999. Verification of a quantitative trait locus affecting agronomic traits in two-row barley. *Crop Science* 39:248.
- Stallings, R. A., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., and Moyzis, R. K. 1991. Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807.
- Stallings, R. A., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., and Moyzis, R. K. 1991. Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807.
- Tanksley, S. D., Ganal, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messenguer, R., Miller, L., Paterson, A. H., Pineda, O., Roder, M. S., Wing, R. A., Wu, W., and Young, N. D. 1992. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141.

- Thomas, C., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D. A., Norcott, K. A., Chadwick, P. J., and Jones, J. D. G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal* 8 :785.
- Tragoonrung, S., Kanazin, V., Hayes, P. M., and Blake, T. K. 1992. Sequence-tagged-site facilitated PCR for barley genome mapping, *Theoretical and Applied Genetics* 84: 1002.
- Tsumura, Y., Tomaru, N., Suyama, Y. and Bacchus, S.,(1999) Genetic diversity and differentiation of *Taxodium* in the south-eastern United States using cleaved amplified polymorphic sequences. *Heredity* 83: 229.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18,:7213.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 5631.
- Winberg, B. C., Zhou, Z., Dallas, J. F., McIntyre, C. L., and Gustafson, J. P. 1993. Characterization of minisatellite sequences from *Oryza sativa*. *Genome* 36: 978.
- Wu, K.K., Burnquist, W., Sorrells, M.E., Tew, T.L., Moore, P.H., and Tanksley, S.D. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* 83:294.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407.
- Zhou, A. and Gustafson, J. P. 1995. Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oriza sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 481.

# 여 백

# 부 록

(Appendix)

# 여 백

## List of Contents

- Table A-1.** Morphological characters of watermelon lines tested in the study
- Table A-2.** Morphological characters of squash lines tested in the study
- Table A-3.** List of informative AFLPs identified with the 14 Nong-Woo watermelon lines in Table 1
- Table A-4.** List of informative AFLPs identified with the 14 Nong-Woo squash lines in Table 2
- Table A-5.** List of detected loci among watermelon and squash F<sub>1</sub> lines tested with specific primer sets derived from defined elements
- Table A-6.** Detail profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases
- Table A-7.** Detail profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases
- Figures.** Some image files in the web site, <http://web.korea.ac.kr/~biotech/pmg/indecx.html>, including detail information of primer sequences, PCR condition, detected loci expressed with band size, list of applied endonucleases, and inferred allele(s) depend on the cleaved band sizes of target band

Table A-1 Part 1. 수박 형질 (농우라인)

일련 번호	Lot No.	초세	회반 유무	숙기	과형	과육색	육질
1	96-9	중	유	조	호피, 원형, 대과	붉은	무름
2	96-4	중	유	만	호피, 원형, 대과	붉은	단단함
3	96-3100	중	유	중	호피, 원형, 대과	붉은	단단함
4	96-2194	영약	유	중	호피, 원형, 대과	붉은	단단함
5	96-2198	중	유	중	호피, 원형, 대과	붉은	단단함
6	96-3105	중	유	중	호피, 원형, 대과	붉은	단단함
7	96-7	약	유	조	호피, 원형, 소과	노랑	무름
9	96-3098	중	유	조	호피, 원형, 소과	노랑	무름
10	96-19	중	유	중만	무지, 원형, 대과	붉은	단단함
11	96-17	극강	유	만	호피, 타원, 대과	붉은	단단함
12	96-3101	강	유	만	호피, 타원, 대과	붉은	단단함
13	92-187	중	유	조	호피, 원형, 대과	붉은	무름
14	92-173	중	유	중	호피, 원형, 대과	붉은	단단함
15	97-3134	중	유	중	호피, 원형, 대과	붉은	무름

Table A-1 Part 2. 수박 형질 (F1 line)

번호	형질	표현형태	품종 번호 (F1 line)															
			계급	2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	14	16	19	21	23
1	배수성	2 배제 3 배제 4 배제	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	떡잎의 모양	떡잎의 모양 넓은떡잎형 넓은떡잎형	1	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
3	떡잎의 크기	작다 중간 크다	3	2	3	1	2	5	5	6	5	4	4	5	4	5	4	3
4	떡잎의 녹색정도	얇다 중간 겉다	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5	떡잎의 반열	없다 있다	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	떡잎의 맥을	없다 있다	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	배축의 길이	짧다 중간 길다	3	5	5	5	7	6	6	4	4	4	4	5	5	4	5	4
8	생장형	왜성 영원성	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	주지의 길이	짧다 중간 길다	3	5	6	5	4	5	5	6	5	4	5	4	4	5	6	5
10	양성화	없다 있다	1	9	9	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9

번호	형질	표현형태	품종 번호 (F1 line)															
			계급	2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	14	16	19	21	23
11	첫 암꽃이 피는 마디수	낮다 중간 높다	3	5	5	5	5	5	4	4	5	5	6	4	4	4	5	5
12	양성화의 양	적다 중간 많다	3	6	6	-	5	6	7	7	-	5	5	5	5	5	5	5
13	잎몸길이	짧다 중간 길다	3	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5
14	잎몸너비	좁다 중간 넓다	3	5	5	4	5	5	4	5	4	4	4	4	4	4	6	5
15	잎몸길이/너비비율	작다 중간 크다	3	5	5	6	6	5	5	5	6	5	6	5	5	5	5	5
16	잎몸색	황록색 녹색 회록색	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17	잎몸색 강도	얇다 중간 겉다	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5
18	잎몸결정도	약하다 중간 겉다	3	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
19	잎몸-식물체의 중앙부위 의 잎가장자리의 결각의 깊이	얇다 중간 겉다	3	6	6	5	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6
20	잎몸 결정도	약하다 중간 심하다	3	5	5	5	5	5	4	5	4	4	5	4	4	4	5	4

번호	형질	표현형태	계급	품종 번호 (F1 line)														
				2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	14	16	19	21	23
21	잎몸 가장 자리의 물결모양	약하다 중간 심하다	3	6	5	4	5	6	5	5	4	6	5	5	4	6	5	5
22	잎몸반점	없다 있다	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	잎자루 길이	짧다 중간 길다	3	5	6	6	5	5	6	5	5	6	5	5	6	5	5	5
24	잎몸의 굵기	작다 중간 겉다	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25	잎몸의 평면적	변칙하다 중간 평범하다	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
26	저온에서 꽃밥이 터지는 정도	약하다 중간 강하다	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	세방 크기	작다 중간 크다	3	6	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5
28	세방 털 난 정도	성기다 중간 배다	3	4	6	4	7	6	6	5	6	5	5	6	7	3	4	6
29	과실 무게	매우가볍다 가볍다 중간 무겁다 매우무겁다	1	3	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	6
30	과실 단면 모양	넓은단원형 단원형 단단원형 원뿔형	1	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2



Table A-2 Part 1. 호박 형질 (농우라인)

일련 번호	Lot No.	초세	회반 유무	숙기	과형	과육색
1	93-9-1	중	무	조	장과	녹
2	93-9-2	강	유	만	극장과	농록
3	96-5086	강	유	중	장과	농록
4	93-9-3	중약	무	중	장과	녹
5	93-9-4	강	유	중	극장과	농록
6	96-5066	강	유	중	장과	농록
7	93-9-5	중약	유	조	원추형	농록
8	93-9-6	강	유	조	원추형	녹
9	96-5067	강	유	조	원추형	녹
10	93-9-7	중	유	중만	원추형	농록
11	93-9-8	중약	유	만	원추형	농록
12	96-5070	중	유	만	원추형	농록
13	96-8005	중	유	조	장과	담록
14	96-8006	중	유	중	원추형	담록
15	96-5069	중	유	중	중장과	담록

Table A-2 Part 2. 호박 형질 (F1 line)

번호	형질	표현형태	공시품종번호				
			계급	2	12	13	15
1	식물체: 잎모양	타원형 넓은타원형 원형	1 2 3	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
2	생장형	애성 중립형 덩굴성	1 2 3	2 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3
3	결가지	없다 있다	1 9	9 9	9 9	9 9	9 9
4	결가지 생장도	약하다 중간 강하다	3 5 7	7 7 7	7 7 7	7 7 7	7 7 7
5	잎자루지체	근족서다 약간서다 없다	3 5 7	- - -	- - -	- - -	- - -
6	줄기: 녹색 진부발은색 진부어두운색 밝음/어두운곳	1 2 3	1 3 3	1 3 3	1 3 3	1 3 3	1 3 3
7	덩굴손	없거나약하다 있음 없다	1 2	2 2	2 2	2 2	2 2
8	잎몸크기	작다 중간 크다	3 5 7	4 5 4	5 4 5	4 5 4	5 4 5
9	잎몸결각	없거나약하다 약하다 중간 심하다 매우심하다	1 3 5 7	1 1 1 1	1 1 1 1	1 1 1 1	1 1 1 1
10	잎면의 녹색	밝다 중간 어둡다	3 5 7	5 5 5	5 5 5	5 5 5	5 5 5
11	잎몸: 대리석무늬	없다 있다	1 9	9 9	9 9	9 9	9 9
12	잎몸: 대리석무늬의 연직 무늬의 연직	매우작다 작다 중간 크다 매우크다	1 3 5 7 9	1 5 5 4 5	1 5 5 4 5	1 5 5 4 5	1 5 5 4 5
13	잎자루: 녹색	없다 중간 어둡다	3 5 7	4 5 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4
14	잎자루: 길이	짧다 중간 강다	3 5 7	5 5 3	7 7 7	5 5 3	7 7 7
15	잎자루: 두께	가늘다 중간 굵다	3 5 7	3 5 3	5 3 5	3 5 3	5 3 5
16	잎자루: 횡단면	원형 각형	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1
17	잎자루: 가시의 수	거의없다 중간 없다	3 5 7	4 5 3	3 3 3	4 5 3	3 3 3
18	잎몸: 꽃부리 안쪽의 고리	없다 있다	1 9	1 1	1 1	1 1	9 1
19	잎몸: 꽃부리 안쪽의 고리의 색	녹색 노란색 녹색과 노란색	1 2 3	1 - 2	- - 2	1 - 2	1 - 2
20	잎몸: 꽃부리 안쪽의 고리의 녹색 정도	약하다 중간 강하다	3 5 7	3 - -	- - -	3 - -	3 - -
21	잎몸: 꽃부리 안쪽의 길이	짧다 중간 길다	3 5 7	3 5 3	5 3 5	3 5 3	5 3 5
22	잎몸: 양쪽의 색	매우연홍 연하다 중간 짙다 매우짙다	1 3 5 7 9	1 1 2 1	1 1 2 1	1 1 2 1	1 1 2 1
23	수꽃: 꽃부리 안쪽의 고리의 착색정도	매우연홍 연하다 중간 짙다 매우짙다	1 3 5 7 9	1 1 1 1	1 1 1 1	1 1 1 1	1 1 1 1
24	수꽃: 꽃부리 안쪽의 고리의 색	녹색 노란색 녹색과 노란색	1 2 3	1 - 2	2 2 2	1 2 2	1 2 2
25	수꽃: 꽃부리 안쪽의 길이	짧다 중간 길다	3 5 7	3 5 7	5 7 7	3 5 7	5 7 7
26	수꽃: 꽃부리 안쪽의 직경	작다 중간 크다	3 5 7	3 6 5	5 6 5	3 6 5	5 6 5
27	수꽃: 꽃부리 안쪽의 색	밝은녹색 녹색 어두운녹색	3 5 7	3 5 5	5 5 5	3 5 5	5 5 5
28	수꽃: 꽃부리 안쪽의 고리	약하다 중간 심하다	3 5 7	3 4 3	3 3 3	3 4 3	3 3 3
29	수꽃: 꽃부리 안쪽의 고리의 색	성기다 중간 배다	3 5 7	3 7 5	7 7 7	3 7 5	7 7 7
30	수꽃: 꽃부리 안쪽의 길이	짧다 중간 길다	3 5 7	3 5 6	5 6 5	3 5 6	5 6 5
31	형질: 길이	짧다 중간 길다	3 5 7	3 6 7	6 7 4	3 6 7	4 4 4
32	형질: 최대직경	작다 중간 크다	3 5 7	3 4 4	4 4 7	3 4 4	7 4 7
33	형질: 과장/최대과장의 비율	없다 있다	3 5 7	3 6 7	6 7 4	3 6 7	4 4 4
34	형질: 목	없다 있다	1 9	1 9	1 1	1 9	1 1
35	형질: 목의 굵음	없다 있다	1 9	1 9	- -	1 9	- -
36	형질: 색갈색	하나 둘 셋	1 2 3	2 2 2	2 2 1	1 2 2	1 2 1
37	형질: 주립색	흰계홍 노란색 주황색 녹색 흰계홍과 노란색 흰계홍과 녹색	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 4 4	1 2 2 2 2 1	1 2 2 2 2 1	1 2 2 2 2 1
38	형질: 주립색의 강도	없다 중간 어둡다	3 5 7	3 5 5	5 5 5	3 5 5	5 5 5
39	형질: 횡단면의 모양	등들다 이랑지다 각지다 끝꼭지지다	1 2 3 4	1 2 1 1	1 1 1 1	1 2 1 1	1 1 1 1
40	형질: 시미귀(축)	없다 있다	1 9	1 1	1 1	1 1	1 1



Table A-3 List of informative AFLP markers identified with 14 Nong-Woo watermelon in Table1

Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1 -----→ 15	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1 -----→ 15	STS-PCR primer conversion
E-AAG / M-CAG	170 98 97	1111100111111 1111100111111 00000011000000	WA030 WA031	E-ACT / M-CTA	175 170 165 158 155	00011011110100 1101100111111 1000011111111 00000011000000 00010011110100	WA001 WA008 WA034
E-ACA / M-CTG	460 190 150 140	11100000000000 11011111011011 1111100111111 11111111011111	WA026	E-AGC / M-CTA	460 210 195 169 148	1000110010100 11100110110011 11110110110011 10010110110010 11110110110011	WA010 WA002 WA007
E-ACC / M-CAA	230	111100111101101		E-ACA / M-CAT	279 270 208 205 180 177 125	11111111000000 11111111111100 1111111101111 01111111010100 00110011110100 11111111011011 00000111000011	WA020 WA005 WA019
E-ACC / M-CTT	195 157 130	11011111111011 00110111001111 01011010011100	WA013	E-ACC / M-CAT	200 185	00000111000100 11011111110000	WA029 WA006
E-ACG / M-CTC	295 145 140 120	00000011000000 11111111001011 01111110110101 11111111111100	WA011	E-ACA / M-CAC	320 245 100	11 00011011000 11 11111011100 11 11011111100	WA024
E-AGG / M-CAT	230 150 125	11100011000100 11011011110100 11111111101111		E-ACG / M-CAC	320 300 240	00111110100000 00110011011100 11100011011000	WA014 WA004 WA003

Table A-3.(Continued)

Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion
E-AAC / M-CAG	160 140 110 93 80	00110011110100 11011010110101 01110111110100 0001110000101 01011000010100	WA015	E-AGC / M-CTT	150	011111000 001100	
E-ACG / M-CAA	210 110	11111111111110 01100000001000	WA009	E-AGG / M-CAC	185 170 150 140 110 105	111 1111011110 1001 1011111110 1110 1101001000 1111 1111111100 0011 1010100100 0001 1010111110	WA027 WA018 WA033 WA017
E-ACT / M-CTG	170 150	11111100111111 00000011000000	WA035 WA023	E-ACA / M-CTT	460 280 210 160	11100001000000 11111111001111 11111111111100 00000011000000	WA025
E-ACC / M-CAC	220 195 190 185 160	1111111101011 1111101101010 111111001010 000000100000 1111111101011	WA028 WA016				
E-ACC / M-CAG	135	1101111100000					

Table A-4. List of informative AFLP markers identified with 14 Nong-Woo squash cultivars in Table2.

Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1 -----→ 15	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1 -----→ 15	STS-PCR primer conversion
	380	11011000000111					
	360	1111100000111					
	260	0000011001000			210	00000 00000111	
	250	00000101111010			205	11111 00000111	SA012
	240	01010001111100			195	00000 11001000	SA008
	230	00000111110000			183	00000 11111000	
	220	00000010000000			175	11111 00000111	SA005
	206	00000111111000			160	11111 00000111	
	185	11111000110100			158	00000 11111000	
E-AAC / M-CTG	180	00000111111000		E-AAG / M-CAT	155	11111 00000111	
	168	11111000000100			152	00000 11111000	
	165	00000111111011			150	11111 00000111	
	159	11111000000111			146	00001 11111000	
	150	11111000000111	SA003		145	00000 11111000	
	140	000000011000	SA004		140	11111 00000111	
	137	00000111001000	SA010		120	10101 11111111	
	125	0000000000101			110	11111 00000111	
	123	00000111000000			108	00000 11111000	
	120	11111000111111					
	115	11111000111111					
E-AAG / M-CAT	430	00000 11111000		E-ACA / M-CAG	300	10111111111000	SA021
	270	11111 00000111			280	10101000000101	
	315	00000 00111000			260	11111000000111	
	303	11111 00000111			250	11111000000000	
	214	00000 11111011			240	00000111111000	

Table A-4.(Continued)

Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion
	230	00000000000101			540	00000000000111	
	220	1111000000111			500	0000011111000	
	200	0101000000100			390	1111000001111	
	190	0101000000111	SA020		370	1111000000111	
	180	0100000000111	SA019		320	0000011111000	
	140	0101000000111			290	1111000001111	
	130	1010011111000	SA009		270	1010100000111	
	120	0101111001111			260	0000011100111	
	110	0000000000011			240	0000011000000	
	105	0000011000111			230	10101000100100	
E-ACA /	104	1111000000000		E-AAC	220	0000011111000	SA029
M-CAG	103	0000011000000		/	210	1111000000111	
	100	0000011000000		M-CTA	0000010001000		
	99	1111000111111			0000011111000		
	85	1111000111111			1111000000111		
	80	0000011111000			0000000001100		
	70	0000011111000			1111000000111		
	65	1111000000111			0000001000000		SA025
	60	1010100000011			1111110111111		
	55	1111000000111			0000011111000		
	50	0000011111000			1111000111111		
	45	0000010111000			1100000000001		
	40	0000011111000			1111111111101		
					0000011111000		
					10111000000100		
					1111000000111		
					1111000000111		

Table A-4.(Continued)

Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion
	370	11111000000101			485	00000111001000	
	368	11111000000111			480	11111000000111	
	340	11111000000000			360	00000111111000	
	320	00000111111000			325	00000000100000	
	308	11111000000111			308	11111000000111	
	290	00000111111000			290	00000111111000	
	288	11111000000111			260	11111000000111	
	276	11111000000111			250	00000111111000	
	260	11111000000111			230	11111111011111	SA007
	125	00111000000111			225	11111111000111	
	123	11000111111101		E-ACG	218	01011110000000	
E-ACG	115	11111110011111		/	210	00000111111000	SA001
/	109	00000111111011		M-CAT	195	11111000000111	SA002
M-CAG	203	11000000000000			190	00000111111000	SA022
	193	00000000000111			175	00000111001000	
	177	11111000000111			170	00000000111000	
	165	00000000000111			155	11111000000111	
	145	11111000000111	SA030		153	00000111111000	
	135	11111000000111			149	11111000000111	
	75	11000111111000			140	00000111111000	
	70	00000010000000			130	00000111111000	
	55	10100000000111			128	00000111001000	
	47	00000111111000			102	11111000000111	
	40	00000111111000			80	00000111111000	
	20	11111000000111		E-ACG	490	00000000000101	
	10	11111000000111		/	480	11111000000111	
				M-CTG	410	11111000000111	

Table A-4.(Continued)

Primer set	Size(bp)	Accession ID number	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number	STS-PCR primer conversion
		1 -----→ 15				1 -----→ 15	
	340	00000111111000			250	00010111111000	
	335	11111000000111			230	1111111000111	
	320	11111000000111			225	01011111111011	
	310	00000111111000			215	00000111111000	
	225	0000000000010			210	01011110000101	
	220	1111101010101			205	11111000000000	
	217	00000111111000			200	00000111111000	
	207	1010100000011			198	11111000000111	
	170	11111000000111			195	00000111111000	
	167	11111000001111			180	11111000000111	
E-ACG	166	00000111001000		E-ACT	175	11111000000111	
/	164	11111000000000		/	170	00000111111000	
M-CTG	160	1111100000111		M-CAT	165	00000111111000	
	148	00000111111000	SA016		162	11111000000111	SA031
	146	11111000000111			160	00000111110000	
	141	00000111001000			150	00000011111000	
	130	00000111111000			145	01011000000111	
	125	0000000100000			135	00000111110111	
	123	00000000001000			125	11110001000001	
	109	10000111010000			120	00000111000000	
	107	10000000100000			114	00000111111000	
	102	11111111100111			100	00000111111000	
E-ACT	340	00000000000011		E-ACT	385	11111111001101	
/	330	11111000000111		/	350	00000111111000	
M-CAT	320	11111000000111		M-CTC	260	11111000000111	
	310	11111000000111			258	10101000000111	

Table A-4.(Continued)

Primer set	Size(bp)	Accession ID number		Primer set	Size(bp)	Accession ID number		STS-PCR primer conversion	
		1	15			1	15		
E-ACT / M-CTC	240	000001111110000		E-ACT / M-CTT	210	111110000001111		SA011	
	215	000001111010000	SA006		200	0000011111011			
	190	111110000001111	SA033		190	111110000001111			
	185	111110000001111			185	000001111110000			
	183	000001111110000			180	101010000001111			
	170	000000111010000			176	000001111110000			
	168	111110000001111			160	000001111110000			
	160	111110000001111			158	011100000001111			
	153	000001111110000			155	111110000001111			
	151	101010000000000			150	000001111110000			
E-ACT / M-CTT	138	000000000000111		E-AGC / M-CAT	297	000000100010000		SA018	
	135	101010000000111	SA023		295	111110000000100			
	120	111110000001111			285	000001111110111			
	107	000001000000111			246	000001111110000			
	350	000001111110000			210	00000000000101			
	315	111110000001111			202	010110000001111			
	310	111110001110000	SA032		145	10101000001101			
	280	111110000001111			130	111110000000011			
	278	000001111110000			125	000000011110000			
	265	111110000001111			104	110000000000011			

Table A-4.(Continued)

Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion	Primer set	Size(bp)	Accession ID number 1-----→ 15	STS-PCR primer conversion
	85	11111000000111			208	00000000000101	SA028
	80	00000000001111			199	00000111111000	SA027
	78	11111000000111			160	11111000000111	
E-AGC	70	00000111110000		E-AGG	150	00000100110000	
/	65	11111000000111		/	145	00000111111000	
M-CAT	45	11111000000111		M-CTG	137	11111000000111	SA024
	35	11111000000111			135	00000111111000	
	25	00000100100000			108	11111000000111	
	18	11111000000111			106	11111000000111	
	14	00000000110000					
<hr/>							
	380	00000111111000					
	370	00000111111000					
	364	11111000000111					
E-AGG	330	00000111111000					
/	319	11111000000111					
M-CTG	290	11010000000110					
	287	0010111110110					
	260	11111000000111					
	248	10101111111111					

**Table A-5. Part 1.** List of detected loci among 24 watermelon F<sub>1</sub> lines (Table 1) with 62 specific primer sets derived from defined elements

Primer Set	Detected Locus	24 F <sub>1</sub> Accessions (Table 1)																								Marker Type
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
WA001	190bp	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	D
WA005	190bp	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	D
WA006	180bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
	290bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA010	190bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA011	80bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA013	170bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA014	280bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA015	190bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA020	280bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WA026	150bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D
	260bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D
	650bp	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D
WA027	1600bp	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	D
	2100+1900bp	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	D
WA028	170bp	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	D
	280bp	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	D
WA035	160bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
13	18	Sub-Total																								M:9/18 (50%) D: 9/18 (50%)
WE004	290bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WE005	800bp	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D
WE008	920bp	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	D
WE010	330bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
	260bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	D	
WE013	310bp	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	D	D	
	600bp	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	D	
	1500bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	D
WE014	700bp	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D
WE016	400bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WE018	770bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WE020	680bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WE024	800bp	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	D
	1550bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
WE026	1750bp	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D
WE027	860bp	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	D

Table A-5. Part 1. (continued)

WE028	660bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	M	
	240bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	M	
WE031	275bp	1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1	D	
	290bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1	D	
	1150bp	1 1	M	
WE032	420bp	1 1	M	
	390bp	1 1	M	
WE033	850bp	1 1	M	
WE034	1260bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	D	
WE036	1450bp	1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	D	
WE039	360bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1	D	
	550bp	1 1	M	
WE040	1700bp	1 1	M	
WE041	420bp	1 1	M	
	800bp	1 1	M	
WE042	1000bp	1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1	D	
	1300bp	1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0	D	
	1800bp	1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1	D	
WE043	420bp	1 1	M	
WE044	600bp	1 1	M	
WE046	520bp	1 1	M	
	510bp	1 1	M	
WE048	1700bp	1 1	M	
	1800bp	1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0	D	
WE050	620bp	1 1	M	
WE051	2500bp	1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1	D	
28	42	Sub-Total		M:22/42 (52.4 %) D: 20/42 (47.6 %)
WM001	150bp	1 1	M	
WM002	300+250bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1	D	
	165bp	1 0 0 1 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 1	C	
WM003	170bp	0 1 1 0 0 1 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 1 1 0 1 0 1 0	C	
	230bp	1 1	M	
WM005	190bp	0 1	D	
WM006	380bp	0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	D	
WM007	190bp	1 1	M	
WM010	150bp	1 1	M	
	450bp	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1	D	
	150bp	1 1	M	
WM012	150+160bp	0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1	D	
	450+850bp	1 0 1 0 0 0 1 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 1 1 1	D	



Table A-6. Part 1. Profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 1; 금천(농우)					F <sub>1</sub> ID 2; 달(농우)					F <sub>1</sub> ID 3; 아플로(농우)									
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA010	190	[140 +50] [80+60 +50]	110+80	NCP	NCP	190	[140 +50] [80+60 +50]	110+80	NCP	NCP	190	[140 +50] [80+60 +50]	110+80	NCP	NCP	190	[140 +50] [80+60 +50]	110+80	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA011	80	NCP	NCP	NCP	70+10	80	NCP	NCP	NCP	70+10	80	NCP	NCP	NCP	70+10	80	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA013	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA014	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 + (65 +45)]	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 + (65 +45)]	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 + (65 +45)]	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 + (65 +45)]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA015	190	NCP	[170 +20]	NCP	120 70	190	NCP	[170 +20]	NCP	120 70	190	NCP	[170 +20]	NCP	120 70	190	NCP	[170 +20]	NCP	120 70
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA020	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 1. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
WA035	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	160	NCP	[100 +60]	NCP	NCP	160	NCP	[100 +60]	NCP	NCP	160	NCP	[100 +60]	NCP	NCP
WE005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	800	210+190+140+100x2+60	[750 +50]	NCP	240+190+120x2+70+60	800	210+190+140+100x2+60	[750 +50]	NCP	240+190+120x2+70+60	800	210+190+140+100x2+60	[750 +50]	NCP	240+190+120x2+70+60
WE010	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	330	[200 +130]	NCP	[190 +40]	NCP	330	[200 +130]	NCP	[190 +40]	NCP	330	[200 +130]	NCP	[190 +40]	NCP
WE014	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	700	[620 +80]	NCP	[650 +50]	NCP	700	NPP	NPP	NPP	NPP	800	NPP	NPP	NPP	NPP
WE018	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	770	[420 +220 +901 +40]	[510 +160 +100]	[600 +170]	[370 +310 +90]	770	[420 +220 +901 +40]	[510 +160 +100]	[600 +170]	[370 +310 +90]	770	[420 +220 +901 +40]	[510 +160 +100]	[600 +170]	[370 +310 +90]
WE020	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	680	320+200+80x2	[220+180+160+120] [170+50+180+160+120+0]	180+170+160+50	[320+300+60]	680	320+200+80x2	[220+180+160+120] [170+50+180+160+120+0]	180+170+160+50	[320+300+60]	680	320+200+80x2	[220+180+160+120] [170+50+180+160+120+0]	[510+120+50+300+190x2]	[320+300+60]

Table A-6. part 1. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE024	1550	NCP	[550+3 00X2 +200X 2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]	1550	NCP	[550+3 00X2 +200X 2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]	1550	NCP	[550+3 00X2 +200X 2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE026	1750	[750+5 70 +430]	[850+5 70 +190+ 140]	[950+4 80+32 0]	[780+3 80+23 0+170 +120+ 70]	1750	[750+5 70 +430]	[850+5 70 +190+ 140]	[950+4 80+32 0]	[780+3 80+23 0+170 +120+ 70]	1750	[750+5 70 +430]	[850+5 70 +190+ 140]	[950+4 80+32 0]	[780+3 80+230 +170+ 120+70 ]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE027	860	[460+2 30+ 120+5 0] [(370+ 90)+(1 70+65 0)+120 +50]	[580 +280]	[540 +320]	[560+1 60+14 0]	860	[460+2 30+ 120+5 0] [(370+ 90)+(1 70+65 0)+120 +50]	[580 +280]	[540 +320]	[560+1 60+14 0]	860	[460+2 30+ 120+5 0] [(370+ 90)+(1 70+65 0)+120 +50]	[580 +280]	[540 +320]	[560+1 60+140 ]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE028	660	NCP	[480+1 80] [(410+ 70)+18 0]	330+2 80+50	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80] [(410+ 70)+18 0]	330+2 80+50	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80] [(410+ 70)+18 0]	330+2 80+50	[630+3 0]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE031	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+150 ]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 1. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE032	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE033	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE034	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE036	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[500+3 00x2+ 180+1 70]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[500+3 00x2+ 180+1 70]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[500+3 00x2+ 180+1 70]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 1. (continued)

WE039	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
WE040	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]
WE041	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	420	NCP	[260+1 60]	[250+1 70]	[220+1 30+70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220+1 30+70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220+1 30+70]
WE043	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100x 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100x 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100x 2 +60]	[400 +20]
WE044	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	600	[550 +50]	NCP	NCP	[420 +180]	600	[550 +50]	NCP	NCP	[420 +180]	600	[550 +50]	NCP	NCP	[420 +180]
WE046	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	520	[280+2 40]	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	[280+2 40]	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	[280+2 40]	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]
WE048	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+ 75x2)+ (130+8 0)]	[310+2 00]	[390 +65 +55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+ 75x2)+ (130+8 0)]	[310+2 00]	[390 +65 +55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+ 75x2)+ (130+8 0)]	[310+2 00]	[390 +65 +55]

Table A-6. part 1. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE050	620	[490+1 30]	{420+1 90}	[270+1 20+110 +70+5 0]	[205+1 95+110 x2]	620	[490+1 30]	[(290+ 55+50 +35)+( 120+7 0)]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[205+1 95+110 x2]	620	[490+1 30]	[420+1 90]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[205+1 95+110 x2]
WE051	1800	[620+2 10+19 5x2+1 80x2+ 10x2]	[1200+ 395+7 5+70+ 60]	[830+6 90+63 0+280 +60]	[450+3 90+29 0x2+2 10+90 +80]	1800	[620+2 10+19 5x2+1 80x2+ 10x2]	[1200+ 395+7 5+70+ 60]	[830+6 90+63 0+280 +60]	[450+3 90+29 0x2+2 10+90 +80]	1800	[620+2 10+19 5x2+1 80x2+ 10x2]	[1200+ 395+7 5+70+ 60]	[830+6 90+63 0+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+8 0]

<sup>a</sup> 4 endonucleases; *RsaI*(GT↓AC), *HinfI*(G↓ANTC), *HaeIII*(GG↓CC), and *AluI*(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket, { }, represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-6. Part 2. Profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 4; 왕상(농우)				F <sub>1</sub> ID 5; 천왕(농우)				F <sub>1</sub> ID 6; 한들(농우)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA010	190	[140 [80 +60]	[110 +80]	NCP	NCP	190	[80 +60]	[110 +80]	NCP	NCP	190	[80 +60]	[110 +80]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA011	80	NCP	NCP	NCP	[70 +10]	80	NCP	NCP	NCP	[70 +10]	80	NCP	NCP	NCP	[70 +10]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA013	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA014	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 +(65 +40)]	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 +(65 +40)]	280	[170 +110]	NCP	NCP	[175 +105] [175 +(65 +40)]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA015	190	NCP	[170 +20]	NCP	[120 +70]	190	NCP	[170 +20]	NCP	[120 +70]	190	NCP	[170 +20]	NCP	[120 +70]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA020	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 2. (continued)

	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	
WA035	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	
WE005	800	[210+1 90+140 +(100X 2)+60]	[750+5 0]	NCP	[240+1 90+(12 0X2)+7 0+60]	800	[210+1 90+140 +(100X 2)+60]	[750+5 0]	NCP	[240+1 90+(12 0X2)+7 0+60]	800	[210+1 90+140 +(100X 2)+60]	[750+5 0]	NCP	[240+1 90+(12 0X2)+7 0+60]	800	[210+1 90+140 +(100X 2)+60]	[750+5 0]	NCP	[240+1 90+(12 0X2)+7 0+60]	[240+1 90+(12 0X2)+7 0+60]
	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	
WE010	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	NCP
	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	
WE014	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP	NCP
	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	
WE018	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	[370+310+90]
	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	
WE020	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[(180+170+160)+120+50]	[320+300+(190X2)]	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[(180+170+160)+120+50]	[320+300+(190X2)]	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[(180+170+160)+120+50]	[320+300+(190X2)]	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[(180+170+160)+120+50]	[320+300+(190X2)]	[(180+170+160)+120+50]
	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	

Table A-6. part 2. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE024	1550	NCP	[550+3 00X2 +200X 2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]	1550	NCP	[550+3 00X2 +200X 2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]	1550	NCP	[550+3 00X2 +200X 2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]
WE026	1750	[750+5 70+43 0]	[550+( 300X2 )+(200 X2)]	[1130+ (210X 2)]	[900+6 50]	1750	[750+5 70+43 0]	[550+( 300X2 )+(200 X2)]	[1130+ (210X 2)]	[900+6 50]	1750	[750+5 70+43 0]	[550+( 300X2 )+(200 X2)]	[1130+ (210X 2)]	[900+6 50]
WE027	860	[460+2 30+12 0+50] [(370+ 90)+(1 70+60) +120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]	860	[460+2 30+12 0+50] [(370+ 90)+(1 70+60) +120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]	860	[460+2 30+12 0+50] [(370+ 90)+(1 70+60) +120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]
WE028	660	NCP	[480+1 80] [(410+ 70)+18 0]	[330+2 80+50]	[630+3 0] [(350+ 280)+3 0]	660	NCP	[480+1 80] [(410+ 70)+18 0]	[330+2 80+50]	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80] [(410+ 70)+18 0]	[330+2 80+50]	[630+3 0]

Table A-6. part 2. (continued)

WE031	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]
WE032	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	420	[240+1 80]	NCP	[220+9 0+70+ 40]	[600+4 00+15 0]	420	[240+1 80]	NCP	[220+9 0+70+ 40]	[600+4 00+15 0]	420	[240+1 80]	NCP	[220+9 0+70+ 40]	[600+4 00+15 0]
WE033	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480+1 90+18 0]	[410+2 05+18 0+55]
WE034	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	1260	[570+3 60+330 ]	[650+3 50+260 ]	NCP	[480+3 20+240 +85+70 +65]	1260	[570+3 60+330 ]	[650+3 50+260 ]	NCP	[480+3 20+240 +85+70 +65]	1260	[570+3 60+330 ]	[650+3 50+260 ]	NCP	[480+3 20+240 +85+70 +65]
WE036	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+1 60+(14 0x2)+( 110x2) +90+8 0+70] [500+3 00x2+ 180+1 70]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+1 60+(14 0x2)+( 110x2) +90+8 0+70] [500+3 00x2+ 180+1 70]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+1 60+(14 0x2)+( 110x2) +90+8 0+70]

Table A-6. part 2. (continued)

WE039	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
WE040	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]
WE041	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220+1 30+70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220+1 30+70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220+1 30+70]
WE043	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]
WE044	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	600	[550+5 0]	NCP	NCP	[420+1 80]	600	[550+5 0]	NCP	NCP	[420+1 80]	600	[550+5 0]	NCP	NCP	[420+1 80]
WE046	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	[280+2 40]	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	[280+2 40]	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]
WE048	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	510	NCP	[300+2 10][15 0+75x2 )+(130+ 80]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10][15 0+75x2 )+(130+ 80]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	NCP	[310+2 00] [300+2 10]	[310+2 00]	[390+6 5+55]

Table A-6. part 2. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE050	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+11 0+70+ 50]	[205+1 95+11 0x2]	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+11 0+70+ 50]	[205+1 95+11 0x2]	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+11 0+70+ 50]	[205+1 95+110 x2]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE051	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket, [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-6. Part 3. Profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 7; 신불(동형)				F <sub>1</sub> ID 8; 하나로(동형)				F <sub>1</sub> ID 9; 달고나(서울)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	75 +25]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA010	190	[140+5 0]	[110+8 0]	NCP	NCP	190	[140+5 0]	[110+8 0]	NCP	NCP	190	[140+5 0]	[110+8 0]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA011	80	NCP	NCP	NCP	[70+1 0]	80	NCP	NCP	NCP	[70+1 0]	80	NCP	NCP	80[70 +10]	[70+1 0]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA013	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA014	280	[170+ 110]	NCP	NCP	[175+ (65+ 40)]	280	[170+ 110]	NCP	NCP	[175+ (65+ 40)]	280	[170+ 110]	NCP	NCP	[175+ 105] [175+ (65+ 40)]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA015	190	NCP	[170+ 20]	NCP	[120+ 70]	190	NCP	[170+ 20]	NCP	[120+ 70]	190	NCP	[170+ 20]	NCP	[120+ 70]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA020	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP

Table A-6. part 3. (continued)

	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
WA035	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	NCP
WE005	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
	800	[210+190+140+100x2+60]	[750+50]	NCP	[240+190+120x2+70+60]	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	800	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	800	[210+190+140+100x2+60]	750+50	NCP	[240+190+120x2+70+60]
WE010	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	NCP
WE014	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP
WE018	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	
WE020	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+300+60]	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+300+60]	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+300+60]	680	[320+200+(80X2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+300+60]	
WE024	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	
	1550	NCP	[550+300X2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300X2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300X2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300X2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]	

Table A-6. part 3. (continued)

	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
WE026	1750	[750+	[850+	[950+	[780+	1750	NPP	NPP	NPP	NPP	1750	NCP	[480+	[330+	[780+
		570+4 30]	570+1 90+14 0]	480+3 20]	380+		230+	170+	120+	70]		570+4 30]	570+1 90+14 0]	480+3 20]	230+
WE027	860	[460+	[580+	[540+	[560+	860	[460+	[580+	[540+	[560+	860	[370+	[580+	[540+	[560+
		230+	280]	320]	160+1 40]		230+	280]	320]	160+1 40]		230+	280]	320]	160+1 40]
WE028	660	NCP	[480+	[330+	[630+	660	NCP	[480+	[330+	[630+	660	NCP	[480+	[330+	[630+
			180]	280+5 0]	30]			180]	280+5 0]	30]			180]	280+5 0]	30]
WE031	1150	[400+	[1100	[770+	[600+	1150	[400+	[1100	[770+	[600+	1150	[400+	[1100	[770+	[600+
		320+2 70+16 0]	[1100 +50]	210+1 70]	400+1 50]		320+2 70+16 0]	[1100 +50]	210+1 70]	400+1 50]		320+2 70+16 0]	[1100 +50]	210+1 70]	400+1 50]

Table A-6. part 3. (continued)

	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE032	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]
WE033	390	NULL	NCP	[300+ 90]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+ 90]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+ 90]	[110 +100 +95 +85]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
	1260	[570+3 60+33 0]	[650+3 50+26 0]	NCP	[480+3 320+ 240+ 85+70 +65]	1260	[570+3 60+33 0]	[650+3 50+26 0]	NCP	[480+3 320+ 240+ 85+70 +65]	1260	[570+3 60+33 0]	[650+3 50+26 0]	NCP	[480+3 320+ 240+ 85+70 +65]
WE034	1260	[570+3 60+33 0]	[650+3 50+26 0]	NCP	[480+3 320+ 240+ 85+70 +65]	1260	[570+3 60+33 0]	[650+3 50+26 0]	NCP	[480+3 320+ 240+ 85+70 +65]	1260	[570+3 60+33 0]	[650+3 50+26 0]	NCP	[480+3 320+ 240+ 85+70 +65]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
	1450	[980+ 170+1 45+80 +75]	[760+ 305+2 80+10 5]	[1250 +120+ 80]	[550+ 160+ (140x 2)+ (110x 2)+ 90+80 +70]	1450	[980+ 170+1 45+80 +75]	[760+ 305+2 80+10 5]	[1250 +120+ 80]	[550+ 160+ (140x 2)+ (110x 2)+ 90+80 +70]	1450	[980+ 170+1 45+80 +75]	[760+ 305+2 80+10 5]	[1250 +120+ 80]	[550+ 500+1 80+11 0x2]
WE036	1450	[980+ 170+1 45+80 +75]	[760+ 305+2 80+10 5]	[1250 +120+ 80]	[550+ 160+ (140x 2)+ (110x 2)+ 90+80 +70]	1450	[980+ 170+1 45+80 +75]	[760+ 305+2 80+10 5]	[1250 +120+ 80]	[550+ 160+ (140x 2)+ (110x 2)+ 90+80 +70]	1450	[980+ 170+1 45+80 +75]	[760+ 305+2 80+10 5]	[1250 +120+ 80]	[550+ 500+1 80+11 0x2]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
WE039	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]

Table A-6. part 3. (continued)

	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
WE040	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30]
					[280+ 240+ 30]					[280 +240 +30]					[280 +240 +30]
WE041	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220+ 130+7 0]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]
WE043	420	[400+ 20]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100 X2 +60]	[400 +20]	420	[400+ 20]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100 X2 +60]	[400 +20]	420	[400+ 20]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100 X2 +60]	[400 +20]
WE044	600	[550+ 50]	NCP	NCP	[420+ 180]	600	[550+ 50]	NCP	NCP	[420+ 180]	600	[550+ 50]	NCP	600[4 20+18 0]	[420+ 180]
WE046	520	520[2 80+24 0]	NCP	[290+ 230]	[290+ 200+3 0]	520	520[2 80+24 0]	NCP	[290+ 230]	[290+ 200+3 0]	520	NCP	NCP	[290+ 230]	[290+ 200+3 0]
WE048	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+ 75X2) +(130+ 80)]	[310+2 00] [300+2 10]	[390+6 5+55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+ 75X2) +(130+ 80)]	[310+2 00] [300+2 10]	[390+6 5+55]	510	NCP	[310+2 00] [(150+ 75X2) +(130+ 80)]	[310+2 00]	[390+6 5+55]

Table A-6. part 3. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE050	620	[490+ 130]	[490+ 130]	[270+ 120+1 10+70 +50]	[205+ 195+( 60+55 ) +110]	620	[490+ 130]	[490+ 130]	[270+ 120+1 10+70 +50]	[205+ 195+( 60+55 ) +110]	620	[490+ 130]	[490+ 130]	[270+ 120+1 10+70 +50]	[205+ 195+( 60+55 ) +110]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE051	1800	[620+2 10+19 5X2+1 80X2+ 110X2]	[1200+ 395+7 5+70+ 60]	[830+6 30+28 0+60]	[450+3 90+29 0X2+2 10+90 +80]	1800	NPP	NPP	NPP	NPP	1800	[620+2 10+19 5X2+1 80X2+ 110X2]	[1200+ 395+7 5+70+ 60]	[830+6 30+28 0+60]	[450+3 90+29 0X2+2 10+90 +80]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

<sup>a</sup> 4 endonucleases; *RsaI*(GT↓AC), *HinfI*(G↓ANTC), *HaeIII*(GG↓CC), and *AluI*(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[,] , represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis,( ) , represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-6. Part 4. Profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases\*

Primer	F <sub>1</sub> ID 10; 명가왕(서울)				F <sub>1</sub> ID 11; 호산(제일)				F <sub>1</sub> ID 12; 감미(중앙)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA010	190	[140+ 50]	[110+ 80]	NCP	NCP	190	[140+ 50]	[110+ 80]	[130+ 60]	NCP	190	[140+5 0]	[110+8 0]	190 [130+ 60]	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA011	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	AluI	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	AluI	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	AluI
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA013	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA014	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+ 105] [175+ (65+ 40)]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+ 105] [175+ (65+ 40)]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+ 105] [175+ (65+ 40)]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA15	190	NCP	190 [170+ 20]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+ 70]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA020	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 4. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA035	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP
WE005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	800	[210+190+140+(100x2)+60]	[750+50]	NCP	[240+190+(120x2)+70+60]	800	[210+190+140+(100x2)+60]	[750+50]	NCP	[240+190+(120x2)+70+60]	800	[210+190+140+(100x2)+60]	[750+50]	NCP	[240+190+(120x2)+70+60]
WE010	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP
WE014	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP
WE018	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]
WE020	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	680	[320+200+(80x2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+(180+120)+60]	680	[320+200+(80x2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+(180+120)+60]	680	[320+200+(80x2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50]	[320+(180+120)+60]
WE024	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	1550	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210x2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210x2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210x2]	[900+650]

Table A-6. part 4. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE026	1750	[750+5 70+43 0]	[850+5 70+19 0+140]	[950+4 80+32 0]	[780+ 380+ 230+ 170+ 120+ 70]	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	1750	[750+ 570+ 430]	[850+ 570+ 190+ 140]	[950+ 480+ 320]	[780+ 380+ 230+ 170+ 120+ 70]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE027	860	[460+2 30+12 0+50]	[580+2 (370+ 90)+(1 80)]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]	860	[(370+ 90)+(1 70+60) +120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]	860	[(370+ 90)+(1 70+60) +120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE028	660	RsaI NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE031	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE032	420	[240+1 80]	NCP	[220+9 0+70+ 40]	[600+4 00+15 0]	420	[240+1 80]	NCP	[220+9 0+70+ 40]	[600+4 00+15 0]	420	[240+1 80]	NCP	[220+9 0+70+ 40]	[600+4 00+15 0]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI

Table A-6. part 4. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE033	850	[660+190]	NCP	[480+190+180]	[410+205+180+55]	850	[660+190]	NCP	[480+190+180]	[410+205+180+55]	850	[660+190]	NCP	[480+190+180]	[410+205+180+55]
	390	NULL	NCP	[300+90]	[110+100+95+85]	390	NULL	NCP	[300+90]	[110+100+95+85]	390	NULL	NCP	[300+90]	[110+100+95+85]
WE034	1260	[570+330]	[650+350+260]	NCP	[480+320+240+85+70+65]	1260	[570+330]	[650+350+260]	NCP	[480+320+240+85+70+65]	1260	[570+330]	[650+350+260]	NCP	[480+320+240+85+70+65]
	1450	[980+170+145+80+75]	[760+305+280+105]	[1250+120+80]	[550+500+180+110+X2]	1450	[980+170+145+80+75]	[760+305+280+105]	[1250+120+80]	[550+500+180+110+X2]	1450	[980+170+145+80+75]	[760+305+280+105]	[1250+120+80]	[550+500+180+110+X2]
WE039	360	[210+150]	[150+140+70]	NCP	[260+70+30]	360	[210+150]	[150+140+70]	NCP	[260+70+30]	360	[210+150]	[150+140+70]	NCP	[260+70+30]
	550	[190+170+120+70]	NCP	NCP	[240+180+30]	550	[190+170+120+70]	NCP	NCP	[240+180+30]	550	[190+170+120+70]	NCP	NCP	[240+180+30]
WE041	420	NCP	[260+160]	[250+170]	[220+130+70]	420	NCP	[260+160]	[250+170]	[220+130+70]	420	NCP	[260+160]	[250+170]	[220+130+70]

Table A-6. part 4. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE043	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE044	600	[550+5 0]	NCP	600 [420+1 80]	[420+1 80]	600	[550+5 0]	NCP	600 [420+1 80]	[420+1 80]	600	[550+5 0]	NCP	600 [420+1 80]	[420+1 80]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE046	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE048	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+7 5)+(130 +80)]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+7 5)+(130 +80)]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+7 5)+(130 +80)]	[310+2 00]	[390+65 +55]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE050	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+11 0+70+ 50]	[205+1 95+11 0x2]	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+11 0+70+ 50]	[205+1 95+11 0x2]	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+11 0+70+ 50]	[205+1 95+110 x2]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI
WE051	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+39 0+290x 2+210+ 90+80]
		Target	RsaI	HinfI	HaeIII		AluI	Target	RsaI	HinfI		HaeIII	AluI	Target	RsaI

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[,] represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis,( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-6. Part 5. Profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>3</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 13; 단비(중양)					F <sub>1</sub> ID 14; 수로왕(중양)					F <sub>1</sub> ID 15; 일출(중양)									
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA010	190	[140+5 0]	[110+80 ]	190 [130+6 0]	NCP	190	[140+5 0]	[110+80 ]	190 [130+6 0]	NCP	190	[140+5 0]	[110+80 ]	190 [130+6 0]	NCP	190	[140+5 0]	[110+80 ]	190 [130+6 0]	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA011	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	[70+10 ]	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	[70+10 ]	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	[70+10 ]	80	NCP	NCP	80 [70+10 ]	[70+10 ]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA013	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA014	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA015	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA020	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	260	NCP	NCP	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 5. (continued)

WA035	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP
WE005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	800	(100x2)+60]	[750+50]	NCP	[240+190+140+120x2)+70+60]	800	(100x2)+60]	[750+50]	NCP	[240+190+140+120x2)+70+60]	800	(100x2)+60]	[750+50]	NCP	[240+190+140+120x2)+70+60]
WE010	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP
WE014	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP
WE018	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]
WE020	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	680	[320+200+(80x2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50+300+(190x2)]	[320+(180+120)+60]	680	[320+200+(80x2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50+300+(190x2)]	[320+(180+120)+60]	680	[320+200+(80x2)]	[170+50+180+160+120]	[510+120+50+300+(190x2)]	[320+(180+120)+60]
WE024	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	155	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210x2]	[900+650]	155	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210x2]	[900+650]	155	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210x2]	[900+650]

Table A-6. part 5. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE026	1750	[750+ 570+ 430]	[850+ 570+ 190+ 140]	[950+ 480+ 320]	[780+ 380+ 230+ 170+ 120+ 70]	1750	[750+ 570+ 430]	[850+ 570+ 190+ 140]	[950+ 480+ 320]	[780+ 380+ 230+ 170+ 120+ 70]	1750	[750+ 570+ 430]	[850+ 570+ 190+ 140]	[950+ 480+ 320]	[780+ 380+ 230+ 170+ 120+ 70]
WE027	860	[460+ 230+ 120+ 50] [(370+ 90)+ (170+ +60)+ 120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]	860	[460+ 230+ 120+ 50] [(370+ 90)+ (170+ 60)+ 120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]	860	[460+ 230+ 120+ 50] [(370+ 90)+ (170+ 60)+ 120+ 50]	[580+2 80]	[540+3 20]	[560+1 60+14 0]
WE028	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0]	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0]
WE031	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+2 10+17 0]	[600+4 00+15 0]
WE032	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]

Table A-6. part 5. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE033	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	VV	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]
	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]
WE034	1260	[570+ 360+ 330]	[650+ 350+ 260]	NCP	[480+ 320+ 240+ 85+ 70+ 65]	NPP	[570+ 360+ 330]	NPP	NPP	NPP	1260	[570+ 360+ 330]	[650+ 350+ 260]	NCP	[480+ 320+ 240+ 85+ 70+ 65]
	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+5 00+18 0+110x 2]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+5 00+18 0+110x 2]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+5 00+18 0+110x 2]
WE039	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 5. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE040	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]
		Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td>		AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td>		HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td>	AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td>
WE041	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]
		Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td>		AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td>		HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td>	AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td>
WE043	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]
		Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td>		AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td>		HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td>	AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td>
WE044	600	[550+5 0]	NCP	[600 +420+1 80]	[420+1 80]	600	[550+5 0]	NCP	[600 +420+1 80]	[420+1 80]	600	[550+5 0]	NCP	[420+1 80]	[420+1 80]
		Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td>		AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td>		HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td>	AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td>
WE046	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]
		Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td>		AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td>		HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td>	AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td>
WE048	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+7 5x2)+(1 30+80)]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+7 5x2)+(1 30+80)]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	[310+2 00] [300+2 10]	[300+2 10] [(150+7 5x2)+(1 30+80)]	[310+2 00]	[390+6 5+55]
		Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td></td>		AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td></td>	HinfI <td>HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td></td>		HaeIII <td>AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td></td>	AluI <td>Target</td> <td>RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td></td>	Target	RsaI <td>HinfI <td>HaeIII <td>AluI </td></td></td>

Table A-6. part 5. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE050	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+110 +70+5 0]	NCP	620	[490+1 30]	[(290+ 55-50 +35)+(120+7 0)]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[(100+ 80+20) +195+(60+55) +110]	620	[490+1 30]	[(290+ 55+50 +35)+(120+7 0)]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[(100+ 80+20) +195+(60+55) +110]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE051	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]	1800	[620+2 10+195 x2+180 x2+110 x2]	[1200+ 395+75 +70+60 ]	[830+6 30+280 +60]	[450+3 90+290 x2+210 +90+80 ]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.
- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).
- Large bracket, [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.
- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.
- NCP; no cleaved product.
- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-6. Part 6..Profiles of each watermelon F1 line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases\*

Primer	F <sub>1</sub> ID 16; 신성(청원)					F <sub>1</sub> ID 17; 내고향(한농)					F <sub>1</sub> ID 18; 창다라(한농)									
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 +75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 +75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 +75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 +75 +25]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA010	190	[140+5 0]	[110+80 ]	190 [130+6 0]	NCP	190	[140+5 0]	[110+80 ]	NCP	NCP	190	[140+5 0]	[110+80 ]	NCP	NCP	190	[140+5 0]	[110+80 ]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA011	80	NCP	NCP	[70+10 ]	[70+10 ]	80	[65+15 ]	NCP	NCP	[70+10 ]	80	[65+15 ]	NCP	NCP	[70+10 ]	80	[65+15 ]	NCP	NCP	[70+10 ]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA013	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP	170	[90 +80]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA014	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]	280	[170+1 10]	NCP	NCP	[175+1 05] [175+( 65+40) ]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA015	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]	190	NCP	[170+2 0]	NCP	[120+7 0]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA020	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP	280	[160 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA026	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP	260	NCP	[190 +70]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 6. (continued)

WA035	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	160	NCP	[100 +60]	NCP	NCP	160	NCP	[100 +60]	NCP	NCP	160	NCP	[100 +60]	NCP	NCP
WE005	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	800	[210+ 190+ 140+ (100x2) +60]	[750+ 50]	NCP	[240+ 190+ (120x2) +70 +60]	800	[210+ 190+ 140+ (100x2) +60]	[750+ 50]	NCP	[240+ 190+ (120x2) +70 +60]	800	[210+ 190+ 140+ (100x2) +60]	[750+ 50]	NCP	[240+ 190+ (120x2) +70 +60]
WE010	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	330	[200 +130]	NCP	[190 +40]	NCP	330	[200 +130]	NCP	[190 +40]	NCP	330	[200 +130]	NCP	[190 +40]	NCP
WE014	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP	700	[620+8 0]	NCP	[650+5 0]	NCP
WE018	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	770	[420 +220 +901 +40]	[510 +160 +100]	[600 +170]	[370 +310 +90]	770	[420 +220 +901 +40]	[510 +160 +100]	[600 +170]	[370 +310 +90]	770	[420 +220 +901 +40]	[510 +160 +100]	[600 +170]	[370 +310 +90]
WE020	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	680	[320+2 00+(80 x2)]	[170+ 50+ 180+ 160+ 120]	[(180+ 170+ 160)+ 120+ 50]	[320+(1 80+120 ) +60]	680	[320+2 00+(80 x2)]	[220+ 180+ 160+ 120]	[510+ 120+ 50] [300+ (190x2)]	[320+(1 80+120 ) +60]	680	[320+2 00+(80 x2)]	[170+5 0+180+ 160+12 0]	[510+1 20+50] [300+(1 90x2)]	[320+(1 80+120 ) +60]
WE024	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	1550	NCP	[550+ 300x2 + 200x2]	[1130 +210X 2]	[900 +650]	1550	NCP	[550+ 300x2 + 200x2]	[1130 + 210x2]	[900 +650]	1550	NCP	[550+ 300x2 + 200x2]	[1130 + 210x2]	[900 +650]

Table A-6. part 6. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	
WE026	1750	[750+	[850+	[950+	[780+	1750	[750+	[850+	[950+	[780+	1750	[750+	[850+	[950+	[780+	
		570+	570+	480+	380+		570+	570+	480+	380+		570+	570+	480+	380+	570+
WE027	860	430]	190+	320]	170+	860	430]	190+	320]	170+	860	430]	190+	320]	170+	
		140]	140]	320]	70]		140]	140]	320]	70]		140]	140]	320]	70]	140]
WE028	660	Target	HinFI	HaeIII	AluI	660	Target	HinFI	HaeIII	AluI	660	Target	HinFI	HaeIII	AluI	
		[460+2	[580+2	[540+3	[560+1		[460+2	[580+2	[540+3	[560+1		[460+2	[580+2	[540+3	[560+1	
WE031	1150	30+12	[80]	20]	60+14	1150	30+12	[80]	20]	60+14	1150	30+12	[80]	20]	60+14	
		0+50]	80]	20]	0]		0+50]	80]	20]	0]		0+50]	80]	20]	0]	
WE032	420	[(370+	[1100+	[770+2	[600+4	420	[(370+	[1100+	[770+2	[600+4	420	[(370+	[1100+	[770+2	[600+4	
		90)+(1	50]	0]	00+15		90)+(1	50]	0]	00+15		90)+(1	50]	0]	00+15	
		70+60)	0]	40]	0]				40]	0]						
		+120+														
		50]														

Table A-6, part 6. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE033	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]
	390	NPP	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NPP	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NPP	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]
WE034	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	1260	[570+3 60+330 1]	[650+3 50+260 1]	NCP	[480+3 20+240 +85+70 +65]	1260	[570+3 60+330 1]	[650+3 50+260 1]	NCP	[480+3 20+240 +85+70 +65]	1260	[570+3 60+330 1]	[650+3 50+260 1]	NCP	[480+3 20+240 +85+70 +65]
WE036	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+5 00+18 0+110x 2]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+5 00+18 0+110x 2]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+8 0]	[550+5 00+18 0+110x 2]
WE039	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	V	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
WE040	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]
WE041	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]



- Large bracket [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.
- Small parenthesis ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.
- NCP; no cleaved product.
- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.



Table A-6. part 7. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WA035	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE005	800	[210+190+(100X2)+70+60]	[750+50]	NCP	[240+190+(120X2)+70+60]	800	[210+190+(100X2)+70+60]	[750+50]	NCP	[240+190+(120X2)+70+60]	800	[210+190+(100X2)+70+60]	[750+50]	NCP	[240+190+(120X2)+70+60]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE010	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE014	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP	700	[620+80]	NCP	[650+50]	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE018	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+90+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE020	680	[320+200+(80X2)]	[220+180+160+120]	[510+120+50+300+(190x2)]	[320+(180+120)+60]	680	[320+200+(80X2)]	[220+180+160+120]	[510+120+50+300+(190x2)]	[320+(180+120)+60]	680	[320+200+(80X2)]	[220+180+160+120]	[510+120+50+300+(190x2)]	[320+(180+120)+60]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
WE024	1550	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300x2+200x2]	[1130+210X2]	[900+650]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI

Table A-6. part 7. (continued)

WE026	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	1750	[750+ 570+ 430]	[850+ 570+ 190+ 140]	[950+ 480+ 320]	[780+ 380+ 230+ 170+ 120+ 70]	1750	[750+5 70+43 0]	[850+5 70+190 +140]	[950+4 80+32 0]	[780+3 80+23 0+170 +120+ 70]	1750	[750+5 70+43 0]	[850+5 70+19 0+140]	[950+4 80+32 0]	[780+3 80+23 0+170 +120+ 70]
WE027	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	860	[460+ 230+ 120+ 50]	[580+ 280]	[540+ 320]	[560+ 160+ 140]	860	[460+ 230+ 120+ 50]	[580+ 280]	[540+ 320]	[560+ 160+ 140]	860	[460+ 230+ 120+ 50]	[580+ 280]	[540+ 320]	[560+ 160+ 140]
WE028	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0] [(350+ 280)+3 0]	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0] [(350+ 280)+3 0]	660	NCP	[480+1 80]	[330+2 80+50]	[630+3 0] [(350+ 280)+3 0]
WE031	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	1150	[400+ 320+ 270+ 160]	[1100+ 50]	[770+ 210+ 170] [610+ 540]	[600+ 400+ 150]	1150	[400+3 20+27 0+160]	[1100+ 50]	[770+ 210+ 170] [610+ 540]	[600+ 400+ 150]	1150	[400+ 320+ 270+ 160]	[1100+ 50]	[770+ 210+ 170] [610+ 540]	[600+ 400+ 150]
WE032	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]

Table A-6. part 7. (continued)

WE033	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]	850	[660 +190]	NCP	[480 +190 +180]	[410 +205 +180 +55]
WE034	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]
WE036	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	1260	[570+ 360+ 330]	[650+ 350+ 260]	NCP	[480+ 320+ 240+ 85+ 70+ 65]	1260	[570+3 60+330 ]	[650+35 0+260]	NCP	[480+ 320+ 240+ 85+ 70+ 65]	1260	[570+3 60+330 ]	[650+3 50+260 ]	NCP	[480+ 320+ 240+ 85+ 70+ 65]
WE039	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+1 05]	[550+5 00+18 0+110x 2]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 +105]	[1250+ 120+1 05]	[550+5 00+18 0+110x 2]	1450	[980+1 70+14 5+80+ 75]	[760+3 05+28 0+105]	[1250+ 120+1 05]	[550+5 00+18 0+110 x2]
WE040	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
WE040	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30]

Table A-6. part 7. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
<b>WE041</b>	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]
<b>WE043</b>	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]
<b>WE044</b>	600	[550+5 0]	600 [400+1 50+50]	NCP	[420+1 80]	600	[550+5 0]	600 [400+1 50+50]	NCP	[420+1 80]	600	[550+5 0]	600 [400+1 50+50]	NCP	[420+1 80]
<b>WE046</b>	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]	520	NCP	NCP	[290+2 30]	[290+2 00+30]
<b>WE048</b>	510	NCP	[300+2 10]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	NCP	[300+21 0]	[310+2 00]	[390+6 5+55]	510	NCP	[300+2 10]	[310+2 00]	[390+6 5+55]
<b>WE050</b>	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[205+1 95+110 x2]	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[205+1 95+110 x2]	620	[490+1 30]	[430+1 90]	[270+1 20+110 +70+5 0]	[205+1 95+110 x2]
<b>WE051</b>	1800	NPP	NPP	NPP	NPP	1800	NPP	NPP	NPP	NPP	1800	NPP	NPP	NPP	NPP

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(G↓ACC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[,] represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis,( ) represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP: no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-6. Part 8..Profiles of each watermelon F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>2</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 22; 여름꽃(홍농)				F <sub>1</sub> ID 23; 예쁘니(홍농)				F <sub>1</sub> ID 24; 혜성(홍농)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WA006	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP	180	[80 75 +25]	NCP	NCP	NCP
WA010	Target 190	RsaI 140+50	HinfI 110+80	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 190	RsaI 140+50	HinfI 110+80	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 190	RsaI 140+50	HinfI 110+80	HaeIII NCP	AluI NCP
WA011	Target 80	RsaI 80 65+15	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI 70+10	Target 80	RsaI 80 65+15	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI 70+10	Target 80	RsaI 80 65+15	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI 70+10
WA013	Target 170	RsaI [90 +80]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 170	RsaI [90 +80]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 170	RsaI [90 +80]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP
WA014	Target 280	RsaI 170 +110	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [175+ 105] [175+ (65+ 45)]	Target 280	RsaI 170 +110	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [175+ 105] [175+ (65+ 45)]	Target 280	RsaI 170 +110	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [175+ 105] [175+ (65+ 45)]
WA015	Target 190	RsaI NCP	HinfI 190 [170+2 0]	HaeIII NCP	AluI 120 +70	Target 190	RsaI NCP	HinfI 170 +20	HaeIII NCP	AluI 120 +70	Target 190	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI 120 +70
WA020	Target 280	RsaI [160 +120]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 280	RsaI [160 +120]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 280	RsaI [160 +120]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP
WA026	Target 260	RsaI NCP	HinfI [190 +70]	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 260	RsaI NCP	HinfI [190 +70]	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 260	RsaI NCP	HinfI [190 +70]	HaeIII NCP	AluI NCP
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP

Table A-6. part 8. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI		
WA035	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	160	NCP	[100+60]	NCP	NCP	NCP	
WE005	800	210+190+140+100x2+60	750+50	NCP	240+190+120x2	800	210+190+140+100x2+60	750+50	NCP	240+190+120x2	800	210+190+140+100x2+60	750+50	NCP	240+190+120x2	800	210+190+140+100x2+60	750+50	NCP	240+190+120x2	240+190+120x2	
WE010	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	330	[200+130]	NCP	[190+40]	NCP	NCP	NCP
WE014	700	620+80	NCP	650+50	NCP	700	620+80	NCP	650+50	NCP	700	620+80	NCP	650+50	NCP	700	620+80	NCP	650+50	NCP	NCP	NCP
WE018	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	770	[420+220+901+40]	[510+160+100]	[600+170]	[370+310+90]	[370+310+90]	
WE020	680	320+200+80x2	220+180+160+120	(180+170+120+50)	320+(180+120)+60	680	320+200+80x2	220+180+160+120	(180+170+120+50)	320+(180+120)+60	680	320+200+80x2	220+180+160+120	(180+170+120+50)	320+(180+120)+60	680	320+200+80x2	220+180+160+120	(180+170+120+50)	320+(180+120)+60	320+(180+120)+60	
WE024	1550	NCP	[550+300X2+200X2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300X2+200X2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300X2+200X2]	[1130+210X2]	[900+650]	1550	NCP	[550+300X2+200X2]	[1130+210X2]	[900+650]	[900+650]	
WE026	1750	750+50+70+430	850+50+140	950+40+320	780+30+230+170+120+70	1750	750+50+70+430	850+50+140	950+40+320	780+30+230+170+120+70	1750	750+50+70+430	850+50+140	950+40+320	780+30+230+170+120+70	1750	750+50+70+430	850+50+140	950+40+320	780+30+230+170+120+70	780+30+230+170+120+70	

Table A-6. part 8. (continued)

	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI
WE027	860	460+	580 +280	540 +320	560 +160 +140	860	460+2	580 +280	540 +320	560 +160 +140	860	460+2	580 +280	540 +320	560 +160 +140
		230+					30+12					30+12			
WE028	660	120+	480 +180	330+2 80+50	[(350+ 280)+3 0]	660	NCP	480 +180	330+2 80+50	[(350+ 280)+3 0]	660	NCP	480 +180	330+2 80+50	[(350+ 280)+3 0]
		50					NCP					NCP			
WE031	1150	400+3	1100+5 0	[770+2 10+17 0]	600 +400+ 150	1150	400+3	1100+5 0	[770+2 10+17 0]	600 +400+ 150	1150	400+3	1100+5 0	[770+2 10+17 0]	600 +400+ 150
		20+27					0+160					20+27			
WE032	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]	420	[240 +180]	NCP	[220 +90 +70 +40]	[600 +400 +150]
		NCP					NCP								
WE033	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]	390	NULL	NCP	[300+9 0]	[110 +100 +95 +85]
		NULL					NULL								

Table A-6. part 8. (continued)

	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE034	1260	570 +360 +330	650 +350 +260	NCP	480+32 0+240+ 85+70+ 65	1260	570 +360 +330	650 +350 +260	NCP	480+32 0+240+ 85+70+ 65	1260	570 +360 +330	650 +350 +260	NCP	480+32 0+240+ 85+70+ 65
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE036	1450	980+1 70+14 5+80+ 75	760+3 05+28 0+105	1250 +120 +80	550+5 00+18 0+110x 2	1450	980+1 70+14 5+80+ 75	760+3 05+28 0+105	1250 +120 +80	550+5 00+18 0+110x 2	1450	980+1 70+14 5+80+ 75	760+3 05+28 0+105	1250 +120 +80	550+5 00+18 0+110x 2
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE039	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]	360	[210 +150]	[150 +140 +70]	NCP	[260 +70 +30]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE040	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]	550	[190 +170 +120 +70]	NCP	NCP	[240 +180 +30] [280 +240 +30]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE041	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]	420	NCP	[260 +160]	[250 +170]	[220 +130 +70]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI
WE043	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]	420	[400+2 0]	[330 +90] [330 +60 +30]	[160 +100X 2 +60]	[400 +20]
	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	Rsal	Hinfl	HaeIII	AluI

Table A-6. part 8. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
WE044	600	550	600	NCP	420	600	550	600	NCP	420	600	550	600	NCP	420
		+50	[400 +150 +50]				[400 +150 +50]	+180				[400 +150 +50]	+180		
WE046	520	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
		NCP	[300 +220]	290 +230	290+2 00+30	520	NCP	[300 +220]	290 +230	290+2 00+30	520	NCP	520	290 +230	290+ 200+ 30
WE050	510	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
		NCP	300 +210	310 +200	390+65 +55	510	NCP	300 +210	310 +200	390+65 +55	510	NCP	300 +210	310 +200	390+ 65+ 55
WE051	1800	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
		620+21 0+195x 2+180x 2+110x 2	1200+3 95+75+ 70+60	830+69 0+630+ 280+60	450+39 0+290x 2+210+ 90+80	1800	620+21 0+195x 2+180x 2+110x 2	1200+3 95+75+ 70+60	830+69 0+630+ 280+60	450+39 0+290x 2+210+ 90+80	1800	620+21 0+195x 2+180x 2+110x 2	1200+3 95+75+ 70+60	830+69 0+630+ 280+60	450+39 0+290x 2+210+ 90+80

<sup>3</sup> 4 endonucleases: RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-7. Part 1. Profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 1; 녹수애(농우)				F <sub>1</sub> ID 2; 일등애(농우)				F <sub>1</sub> ID 3; 조생꽃(농우)						
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA002	180	[60 +120]	NCP	NCP	NCP	180	[60 +120]	NCP	NCP	NCP	180	[60 +120]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA003	120	[70 +50]	120	NCP	[80 +40]	120	120	NCP	NCP	[80 +40]	120	120	120	NCP	[80 +40]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA005	140	[90 +50]	NCP	NCP	NCP	140	[90 +50]	NCP	NCP	NCP	140	[90 +50]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA006	180	[105 +75]	NCP	[105 +75]	NCP	180	[105 +75]	NCP	[110 +70]	NCP	180	180	NCP	[105 +75]	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA007	200	NCP	[90 +70 +40]	NCP	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +40]	NCP	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +40]	NCP	[170 +30]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA009	210	[120 +90]	[120 +60 +15 +15]	NCP	NCP	210	[120 +90]	[120 +45 +15x3]	NCP	NCP	210	[70 +50 +90]	[120 +60 +15 +15]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA010	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SA012	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI

Table A-7. part 1. (continued)

	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI
SA013	230	[130 +100]	NCP	NCP	[175 +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[175 +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95+ 70+10) +55]
SA030	110	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI
SA031	80	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	[200 +30]	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP
SGm001	300	[150 +150]	[270 +30]	NCP	NCP	300	[150 +150]	[270 +30]	NCP	NCP	300	[150 +150]	[270 +30]	NCP	NCP
SGm003	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]
SGm005	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]
SGm006	140	[100 +40]	NCP	NCP	[80 +40 +40]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[80 +40 +40]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[80 +40 +40]
SGm008	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]
SGm011	520	[320 +200]	[200 +200 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 +200 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 +200 +120]	NCP	[460 +60]

Table A-7. part 1. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm018	520	NCP	NCP	[390 +130]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[390 +130]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]
SGm019	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm021	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]
SGm022	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm023	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm024	Target.	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]
SGm035	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120+ 30) +130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120+ 30) +130 +110]	410	NPP	NPP	NCP	NPP
SGm036	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP

<sup>a</sup> 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.
- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).
- Large bracket, [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.
- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.
- NCP; no cleaved product.
- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-7. Part 2. Profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 4; 진한예(농우)				F <sub>1</sub> ID 5; 각시예(동부)				F <sub>1</sub> ID 6; 친토좌(동부한농)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA002	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA003	120	[70 +50]	NCP	NCP	[80 +40]	120	[70 +50]	NCP	NCP	[80 +40]	120	[70 +50]	NCP	NCP	[80 +40]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA005	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA006	180	[105 +75]	NCP	[105+ 75]	NCP	180	[105 +75]	NCP	[105 +75]	NCP	180	[105 +75]	NCP	[105 +75]	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA007	200	NCP	[90 +70 +50]	NCP	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +50]	NCP	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +50]	NCP	[170 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA009	210	[70 +50 +90]	[120 +55 +15 x2]	NCP	NCP	210	NCP	[120 +45 +15 x3]	NCP	NCP	210	NCP	[120 +45 +15 x3]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA010	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA012	190	NCP	NCP	NCP	[160 +30] [85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-7. part 2. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA013	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95+ 70+10) +55]	230	NCP	NCP	NCP	NCP	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95+ 70+10) +55]
SA030	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
SA031	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	80	NCP	NCP	NCP	NCP		NCP	NCP	NCP	NCP		NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP
SGm001	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	300	[150X 2]	[270 +30]	NCP	NCP	300	[150X 2]	[270 +30]	NCP	NCP	300	[150X 2]	[270 +30]	NCP	NCP
SGm003	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	310	[180 +130]	[280 +30]	NPP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NPP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NPP	NCP
SGm005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]
SGm006	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	140	[100 +40]	NCP	NCP	[80+ 40X2]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[80+ 40X2]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[80+ 40X2]
SGm008	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]
SGm011	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]

Table A-7. part 2. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	NCP	NCP	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm018	520	NCP	NCP	NPP	NPP	520	NCP	NCP	NCP	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	NCP	[280 +180 +60]
SGm019	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm021	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]
SGm022	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm024	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]
SGm035	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	410	[210+ 70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	NCP	410	[210+ 70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120+ 50) +130 +110]	410	[210+ 70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120+ 50) +130 +110]
SGm036	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP

<sup>a</sup> 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket, [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogeneous locus.

- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent: 0' with the specific primer set tested.

Table A-7. Part 3. Profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 7; 농진꽃(서울)				F <sub>1</sub> ID 8; 여의봉주치니(서울)				F <sub>1</sub> ID 9; 뒤호박(일본)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA002	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP
SA003	120	RsaI 120 [70 +50]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [80+4 0]	Target 120	RsaI 120 [70 +50]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [80+4 0]	Target 120	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [80+4 0]
SA005	140	RsaI [90 +50]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 140	RsaI [90 +50]	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 140	RsaI [90 +50]	HinfI NCP	HaeIII [90 +50]	AluI NCP
SA006	180	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII [105 +75]	AluI NCP	Target 180	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII [105 +75]	AluI NCP	Target 180	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII [105 +75]	AluI NCP
SA007	200	RsaI NCP	HinfI [90 +70 +40]	HaeIII NCP	AluI [170 +30]	Target 200	RsaI NCP	HinfI [90 +70 +40]	HaeIII NCP	AluI [170 +30]	Target 200	RsaI NCP	HinfI [90 +70 +40]	HaeIII NCP	AluI [170 +30]
SA009	210	RsaI [70 +50 +90]	HinfI [120 +60 +15 +15]	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 210	RsaI [70 +50 +90]	HinfI [120 +60 +15 +15]	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 210	RsaI [70 +50 +90]	HinfI [120 +60 +15 +15]	HaeIII NCP	AluI NCP
SA010	110	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [95 +15]	Target 110	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [95 +15]	Target 110	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [90 +20]
SA012	190	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [160 +30] [85 +75 +30]	Target 190	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [85 +75 +30]	Target 190	RsaI NCP	HinfI NCP	HaeIII NCP	AluI [85 +75 +30]

Table A-7. part 3. (continued)

SA013	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	230	[130+100]	NCP	NCP	[95+70+10+55]	230	[130+100]	NCP	NCP	[95+70+10+55]	230	[130+100]	NCP	NCP	[95+70+10+55]
SA030	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
SA031	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	230	NCP	[180+50]	[190+40]	NCP	230	NCP	[180+50]	[190+40]	NCP	230	NCP	[180+50]	[190+40]	NCP
SGm001	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	300	[150 X2]	[270+30]	NCP	NCP	300	[150 X2]	[270+30]	NCP	NCP	300	[150 X2]	[270+30]	300 [170+130]	NCP
SGm003	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	310	[180+130]	[280+30]	NPP	NCP	310	[180+130]	[280+30]	NPP	NCP	310	[180+130]	[280+30]	NPP	NCP
SGm005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200+160]	NCP	[260+100]	360	NCP	[200+160]	NCP	[260+100]	360	NCP	[200+160]	NCP	[260+100]
SGm006	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	140	[100+40]	NCP	NCP	[80+40 X2]	140	[100+40]	NCP	NCP	[80+40 X2]	140	[100+40]	NCP	NCP	[110+30]
SGm008	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	400	NCP	[200+160+40]	NCP	[300+100]	400	NCP	[200+160+40]	NCP	[300+100]	400	NCP	[200+160+40]	NCP	[300+100]

Table A-7. part 3. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm011	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]
SGm018	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]
SGm019	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm021	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]
SGm022	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm024	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]
SGm035	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	410	[210 +70 X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]	410	[210 +70 X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]	410	[210 +70 X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]
SGm036	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP

<sup>a</sup> 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket, [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent, 0' with the specific primer set tested.



Table A-7. part 4. (continued)

SA030	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
SA031	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP
SGm001	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 +130]	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 +130]	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 +130]	NCP
SGm003	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	350	NCP	NCP	NCP	NCP	350	NCP	NCP	NCP	NCP	350	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm005	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200 +160]	NCP	NCP	360	NCP	[200 +160]	NCP	NCP	360	NCP	[200 +160]	NCP	NCP
SGm006	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200 +160]	NCP	NCP	360	NCP	[200 +160]	NCP	NCP	360	NCP	[200 +160]	NCP	NCP
SGm008	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	NCP	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	NCP	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	NCP
SGm011	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	NCP	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	NCP	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	NCP
SGm018	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI	Target	Rsal	HinfI	HaeIII	AluI
	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	NCP	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	NCP	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	NCP

Table A-7. part 4. (continued)

Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm019	150	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm021	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	[180 +60 +20]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm022	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm024	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	[180 +60]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm035	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]	410	[160 +150 +100]	NCP	[120 +50 +130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[120 +50 +130 +110]	[120 +50 +130 +110]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm036	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[,] , represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis,( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP, no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

**Table A-7. Part 5. Profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases\***

Primer	F <sub>1</sub> ID 13; 미향애(청원)					F <sub>1</sub> ID 14; 청봉주치니(청원)					F <sub>1</sub> ID 15; 취옥꽃(청원)										
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SA002	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA003	120	NCP	NCP	NCP	[80 +40]	120	NCP	NCP	NCP	[80 +40]	120	NCP	NCP	NCP	[80 +40]	120	NCP	NCP	NCP	NCP	[80 +40]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA005	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	[90 +50]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA006	180	[105 +75]	NCP	[110 +70]	NCP	180	[105 +75]	NCP	[110 +70]	NCP	180	[105 +75]	NCP	[110 +70]	NCP	180	[105 +75]	NCP	[110 +70]	NCP	[110 +70]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA007	200	NCP	[90 +70 +60]	200	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +60]	200	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +60]	200	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +60]	200	[170 +30]	200
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA010	110	NCP	NCP	NCP	[95 +15]	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]	110	NCP	NCP	NCP	NCP	[90 +20]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA012	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA013	230	[130 +100]	NCP	NCP	[175 +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[95+7 0+10) +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	{175 +55} [(95+7 0+10)+ 55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	{175 +55} [(95+7 0+10)+ 55]	
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target
SA030	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target

Table A-7. part 5. (continued)

SA031	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	230	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	230	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	230
SGm001	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 130]	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 130]	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 130]	NCP
SGm003	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP
SGm005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	350	NCP	NCP	NCP	[250 +100]	350	NCP	NCP	NCP	[250 +100]	350	NCP	NCP	NCP	[250 +100]
SGm006	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]
SGm008	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]
SGm011	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	520	[320 +200]	[2000 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[2000 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[2000 X2 +120]	NCP	[460 +60]
SGm018	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	520	NCP	NCP	[390 +130]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[390 +130] [240 +230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[390 +130] [240 +230 +50]	[280 +180 +60]

Table A-7, part 5. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm019	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm021	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm022	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm024	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm035	410	NPP	NPP	NPP	NPP	410	NPP	210+7 0x2+6 0	NCP	(120+5 0)+130 +110	410	NPP	160+1 50+10 0	NCP	(120+5 0)+130 +110	410	NPP	NPP	NPP	NPP	
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	
SGm036	360	NCP	180+1 30+50	NCP	NCP	360	NCP	180+1 30+50	NCP	NCP	360	NCP	180+1 30+50	NCP	NCP	360	NCP	180+1 30+50	NCP	NCP	

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[,] , represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis,( ) , represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

Table A-7. Part 6. Profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F <sub>1</sub> ID 16; 흑봉주치니(정원)				F <sub>1</sub> ID 17; 남도애(한농)				F <sub>1</sub> ID 18; 반짜이(한농)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA002	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +60]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA003	120	NCP	NCP	NCP	[80 +40]	120	120	120	NCP	[80 +40]	120	120	120	NCP	[80 +40]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA005	140	[90 +50]	NCP	[90 +50]	NCP	140	[90 +50]	NCP	NCP	NCP	140	[90 +50]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA006	180	[105 +75]	NCP	[105 +75]	NCP	180	NCP	NCP	[110 +70]	NCP	180	NCP	NCP	[110 +70]	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA007	200	NCP	[90 +70 +40]	NCP	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +40]	NCP	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +40]	NCP	[170 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA009	210	[90 +70 +50]	[120 +60 +15 x2]	NCP	[120 +60 +30]	210	[120 +90]	[120 +45 +15 x3]	NCP	NCP	210	[120 +90]	[120 +45 +15 x3]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA010	110	NCP	NCP	NCP	[95 +15]	110	NCP	NCP	NCP	[95 +15]	110	NCP	NCP	NCP	[90 +20]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA012	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-7. part 6. (continued)

	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
SA013	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95 +70 +10) +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	175 +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95 +70 +10) +55]
SA030	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
SA031	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	NCP
SGm001	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	300	[150 X2]	[270 +30]	300 [170 +130]	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	NCP	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	NCP	NCP
SGm003	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	350	NCP	NCP	NCP	[250 +100]	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]
SGm005	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]
SGm006	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	140	[100 +40]	NCP	NCP	[110 +30]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[110 +30]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[110 +30]
SGm008	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]
SGm011	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]

Table A-7. part 6. (continued)

	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfl	HaeIII	AluI
SGm018	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[390 +130]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[390 +130] [240 +230 +50]	[280 +180 +60]
SGm019	150	RsaI NCP	Hinfl NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 150	RsaI NCP	Hinfl NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 150	RsaI NCP	Hinfl NCP	HaeIII NCP	AluI NCP
SGm021	260	NCP	NCP	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]
SGm022	180	RsaI NCP	Hinfl NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 180	RsaI NCP	Hinfl NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 180	RsaI NCP	Hinfl NCP	HaeIII NCP	AluI NCP
SGm024	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]
SGm035	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120 +50) +130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120 +50) +130 +110]
SGm036	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP

<sup>a</sup> 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), Hinfl(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.

- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).

- Large bracket[,] , represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.

- Small parenthesis( ) , represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.

- NCP; no cleaved product.

- Null; Scored as ' Absent; 0' with the specific primer set tested.

**Table A-7. Part 7.** Profiles of each squash F<sub>1</sub> line specific allele(s) described with the sizes of cleaved target band, monomorphic major PCR products, with 4 endonucleases<sup>a</sup>

Primer	F1 ID 19; 이쁜이에(한농)				F1 ID 20; 청마쥬치니(한농)				F1 ID 21; 노랑쥬치니(흥농)						
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA002	180	[120 +90]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +90]	NCP	NCP	NCP	180	[120 +90]	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA003	120	[70 +50]	[80 +40]	NCP	[80 +40]	120	[70 +50]	[80 +40]	NCP	[80 +40]	120	[70 +50]	[80 +40]	NCP	[80 +40]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA005	140	[90 +50]	NCP	140	NCP	140	[90 +50]	NCP	140	NCP	140	[90 +50]	NCP	140	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA006	180	180	NCP	[110 +70]	NCP	180	180	NCP	[105 +75]	NCP	180	180	NCP	[105 +75]	NCP
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA007	200	NCP	[90 +70 +40]	[180 +20]	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +40]	[180 +20]	[170 +30]	200	NCP	[90 +70 +40]	[180 +20]	[170 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA009	210	[120 +90]	[120 +45+ 15X3]	NCP	210	210	[70 +50 +90]	[120 +60+ 15X2]	NCP	210	210	[70 +50 +90]	[120 +60+ 15X2]	NCP	210
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA010	110	NCP	NCP	NCP	[95 +15]	110	NCP	NCP	NCP	[95 +15]	110	NCP	NCP	NCP	[95 +15]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA012	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[85 +75 +30]	190	NCP	NCP	NCP	[160 +30] [85 +75 +30]
	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI

Table A-7. part 7. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SA013	230	[130 +100]	NCP	NCP	[175 +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95+7 0+10) +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95+7 0+10) +55]
SA030	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP	110	NCP	NCP	NCP	NCP
SA031	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP	80	NCP	NCP	NCP	NCP
SA032	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	230	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	230	230	NCP	[180 +50]	[190 +40]	230
SGm001	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	300	[150 X2]	[270 +30]	300	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	300	NCP	300	[150 X2]	[270 +30]	300	NCP
	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP
SGm003	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]	350	NCP	[195 +155]	NCP	[250 +100]
SGm005	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]	360	NCP	[200 +160]	NCP	[260 +100]
SGm006	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	140	[100 +40]	NCP	NCP	[110 +30]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[110 +30]	140	[100 +40]	NCP	NCP	[110 +30]
SGm008	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]	400	NCP	[200 +160 +40]	NCP	[300 +100]
SGm011	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]	520	[320 +200]	[200 X2 +120]	NCP	[460 +60]

Table A-7. part 7. (continued)

	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm018	520	NCP	NCP	[390 +130]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[240 230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm019	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm021	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm022	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm024	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180+ 60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180+ 60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180+ 60]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm035	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120+ 50)+ 130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +110]	410	[210 +70X2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[2170 130 +110]
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI
SGm036	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP
	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinFI	HaeIII	AluI

\* 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinFI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.
- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).
- Large bracket, [ ], represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.
- Small parenthesis, ( ), represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.
- NCP; no cleaved product.
- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.



Table A-7. part 8. (continued)

	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI	Target	RsaI	Hinfi	HaeIII	AluI
SA013	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95 +70 +10) +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(95 +70 +10) +55]	230	[130 +100]	NCP	NCP	[(175 +55)]
SA030	Target 110	RsaI NCP	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 110	RsaI NCP	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 110	RsaI NCP	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI NCP
SA031	Target 80	RsaI NCP	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 80	RsaI NCP	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 80	RsaI NCP	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI NCP
SA032	Target 230	RsaI NCP	Hinfi [180 +50]	HaeIII [190 +40]	AluI NCP	Target 230	RsaI NCP	Hinfi [180 +50]	HaeIII [190 +40]	AluI NCP	Target 230	RsaI NCP	Hinfi [180 +50]	HaeIII [190 +40]	AluI NCP
SGm001	Target 300	RsaI [150 x2]	Hinfi [270 +30]	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 300	RsaI [150 x2]	Hinfi [270 +30]	HaeIII NCP	AluI NCP	Target 300	RsaI [150 x2]	Hinfi [270 +30]	HaeIII NCP	AluI NCP
	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP	310	[180 +130]	[280 +30]	NCP	NCP
SGm003	Target 350	RsaI NCP	Hinfi [195 +155]	HaeIII NCP	AluI [250 +100]	Target 350	RsaI NCP	Hinfi [195 +155]	HaeIII NCP	AluI [250 +100]	Target 350	RsaI NCP	Hinfi [195 +155]	HaeIII NCP	AluI [250 +100]
SGm005	Target 360	RsaI NCP	Hinfi [200 +160]	HaeIII NCP	AluI [260 +100]	Target 360	RsaI NCP	Hinfi [200 +160]	HaeIII NCP	AluI [260 +100]	Target 360	RsaI NCP	Hinfi [200 +160]	HaeIII NCP	AluI [260 +100]
SGm006	Target 140	RsaI [100 +40]	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI [110 +30]	Target 140	RsaI [100 +40]	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI [110 +30]	Target 140	RsaI [100 +40]	Hinfi NCP	HaeIII NCP	AluI [110 +30]
SGm008	Target 400	RsaI NCP	Hinfi [200 +160 +40]	HaeIII NCP	AluI [300 +100]	Target 400	RsaI NCP	Hinfi [200 +160 +40]	HaeIII NCP	AluI [300 +100]	Target 400	RsaI NCP	Hinfi [200 +160 +40]	HaeIII NCP	AluI [300 +100]
SGm011	Target 520	RsaI [320 +200]	Hinfi [200 x2 +120]	HaeIII NCP	AluI [460 +60]	Target 520	RsaI [320 +200]	Hinfi [200 x2 +120]	HaeIII NCP	AluI [460 +60]	Target 520	RsaI 520 [320 +200]	Hinfi [200 x2 +120]	HaeIII NCP	AluI [460 +60]

Table A-7. part 8. (continued)

	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
SGm018	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[240 +230 +50]	[280 +180 +60]	520	NCP	NCP	[390 +130]	[280 +180 +60]
SGm019	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP	150	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm021	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]	260	NCP	[150 +110]	NCP	[180 +60 +20]
SGm022	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP	180	NCP	NCP	NCP	NCP
SGm024	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]	240	NCP	[100 +80 +60]	[220 +20]	[180 +60]
SGm035	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	410	[210 +70 x2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +100]	410	[210 +70 x2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[170 +130 +100]	410	[210 +70 x2 +60]	[160 +150 +100]	NCP	[(120 +50) +130 +110]
SGm036	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI	Target	RsaI	HinfI	HaeIII	AluI
	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP	360	NCP	[180 +130 +50]	NCP	NCP

<sup>a</sup> 4 endonucleases; RsaI(GT↓AC), HinfI(G↓ANTC), HaeIII(GG↓CC), and AluI(AG↓CT).

- Target is the major PCR product showing monomorphism in most F<sub>1</sub> lines.
- Cleaved products are expressed with their sizes(bp).
- Large bracket[ ] , represents each allele in each heterogeneous locus and allele pair in each homogenous locus.
- Small parenthesis( ) , represents small cleaved products of which the fragment did not have additional restriction site in the other allele type.
- NCP; no cleaved product.
- Null; Scored as 'Absent; 0' with the specific primer set tested.

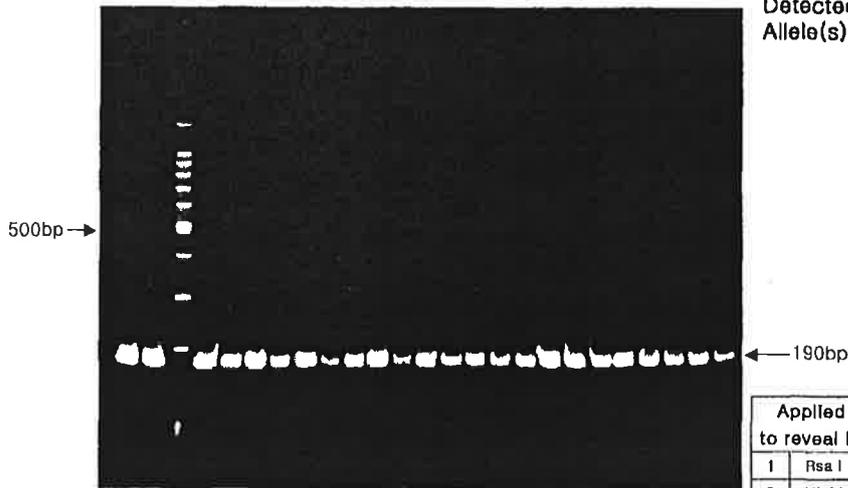
# WA010

Primer Sequence

F: TTAAGTGAAGACAGTGC  
R: GAATTCAGCACTGACTAG

PCR conditions

1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Detected Allele(s)

95°C 5min  
-----  
85°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ = -0.5 °C)  
72°C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT↓CT	
2	Hinf I	GI↓ANTC	
3	Hae III	GG↓CC	
4	Alu I	AG↓CT	NCP

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
190bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## WA010/Rsa I (GT ↓ CT)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

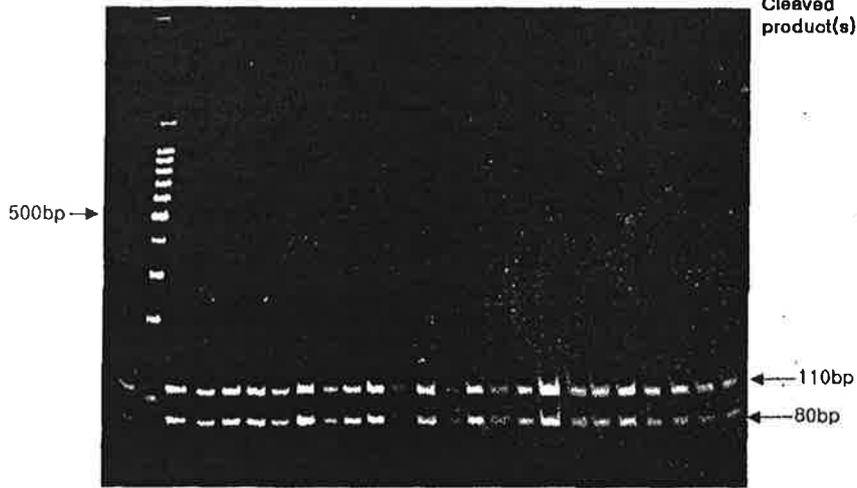


Cleaved product(s)

Reference			Product	Lanes 1-24																							
Target	Product	Type		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
190	140+50	A	140+50	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	80+60+50	B	80+60+50	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Genotype				AB	AB	AB	AB	BB	BB	AA																	

### WA010/Hinf I (G ↓ ANTC)

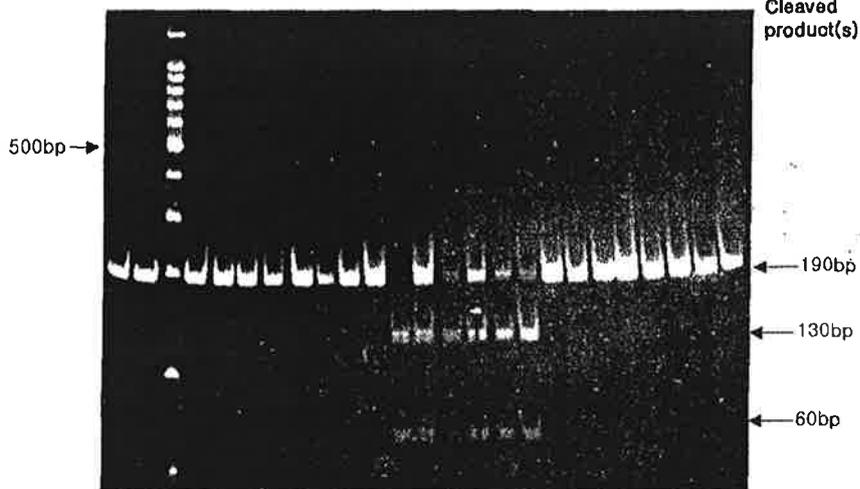
1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	110+80	Common Band Size																							
190	110+80	Uni	110+80																								

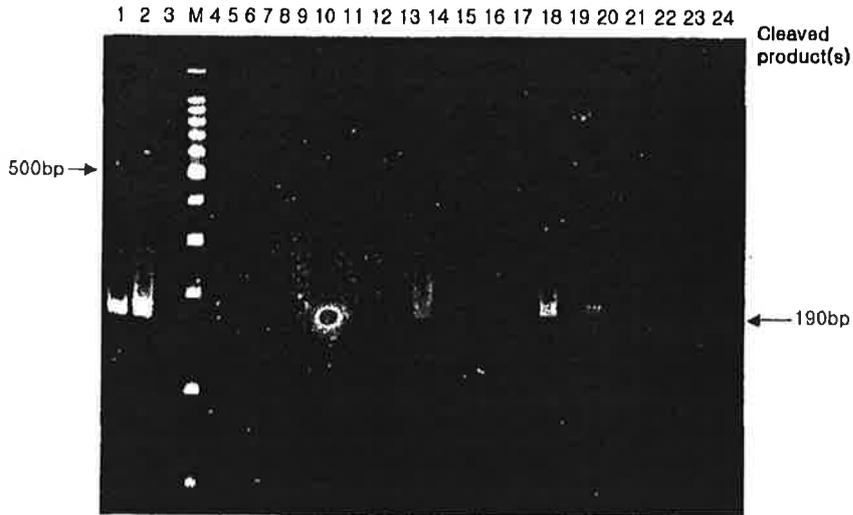
### WA010/Hae III (GG ↓ CC)

1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Target	190	A	190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	130+60	B	130+60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
Genotype				AA	BB	AB	AB	AB	AB	AB	AA																	

### WA010/Alu I (AG ↓ CT)



No Cleaved Product.

### WA020

Primer Sequence  
 F : TTAACATGAAGAAGGTGT  
 R : GAATTCACAGAACATTCA

### PCR conditions



Detected Allele(s)

95°C 5min  
 -----  
 95°C 10 sec  
 55°C → 50°C 30sec  
 (Δ = -0.5 °C)  
 72°C 30sec  
 ----- 10 cycles  
 95°C 10 sec  
 50°C 20sec  
 72°C 30sec  
 ----- 25 cycles  
 72°C 10min  
 4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT↓CT	
2	Hinf I	G↓ANTC	NCP
3	Hae III	GG↓CC	NCP
4	Alu I	AG↓CT	NCP

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
280bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

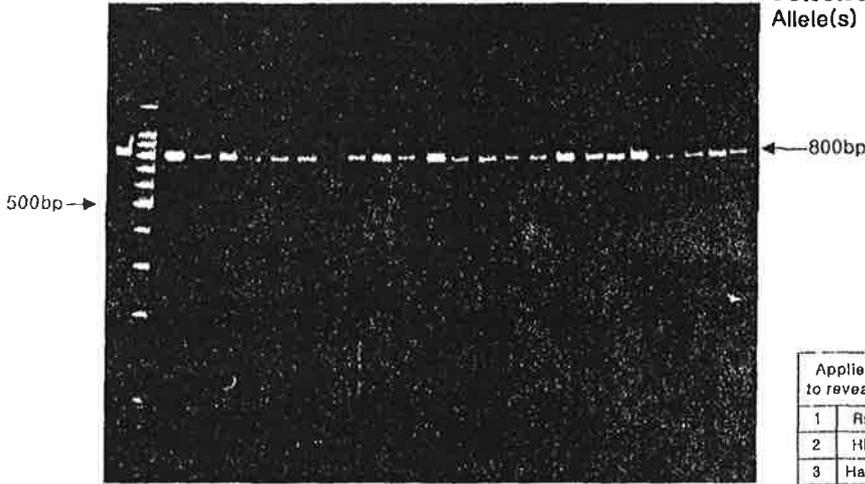
# WE005

Primer Sequence

F : TCGAGCGTTTGACTCGTG  
R : CGGCACCAGGAATCACTA

PCR conditions

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



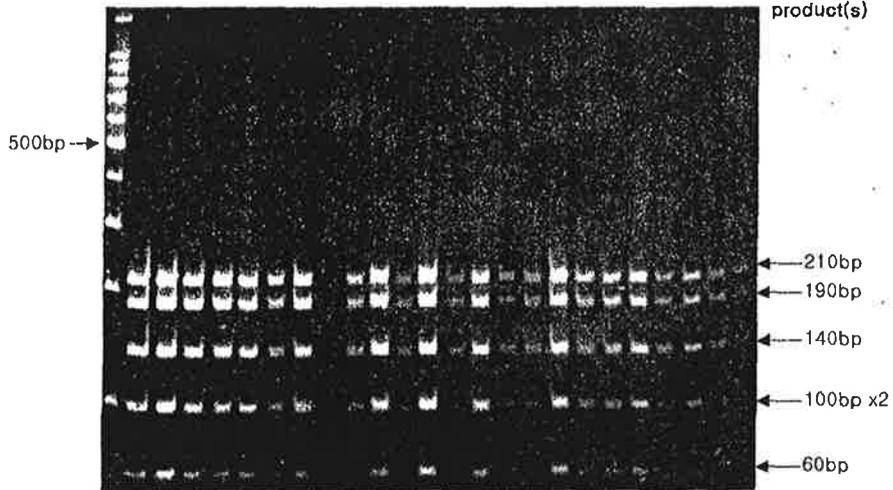
95°C 5min  
-----  
95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ -0.5 °C)  
72°C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT   CT	
2	Hinf I	GI   ANTC	
3	Hae III	GGI   CC	NCP
4	Alu I	AGI   CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
800bp	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## WE005/Rsa I (GT ↓ CT)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

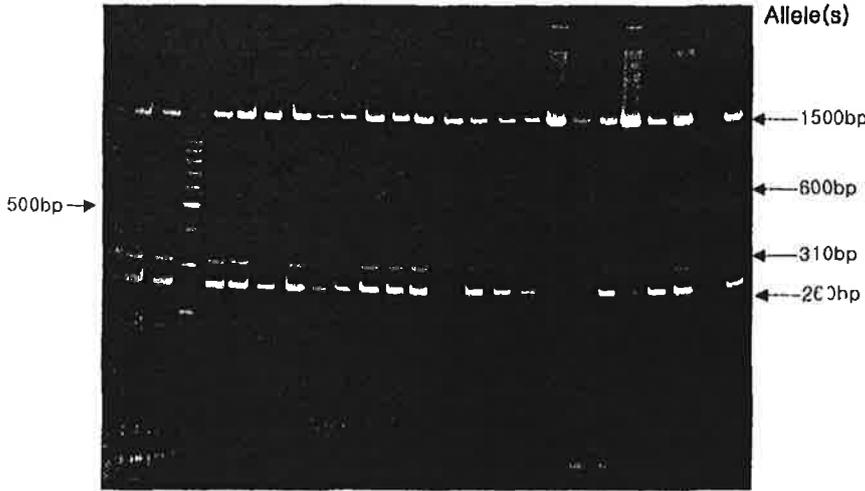


Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	210+190								N																
800bp	210		+140	1	1	1	1	1	1	1	P	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
(- lane No.8)	+100+140	uni	+100x2								P																
	+100x2+80		+80																								
Genotype				AA	NU LL	AA																					

### WE013

Primer Sequence F: CACTTATGGCCACCTCTGC  
R: GTGAGATGCTTAAGTGTGG

1 2 3 M 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



#### PCR conditions

95°C 5min  
-----  
95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ = -0.5 °C)  
72 °C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
280bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
310bp	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1
600bp	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
1500bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1

### WE014

Primer Sequence F: AGATGGTTCTAATGCTAG  
R: CATTAAACAAGCAGCGGAG

1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



#### PCR conditions

95°C 5min  
-----  
95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ = -0.5 °C)  
72 °C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

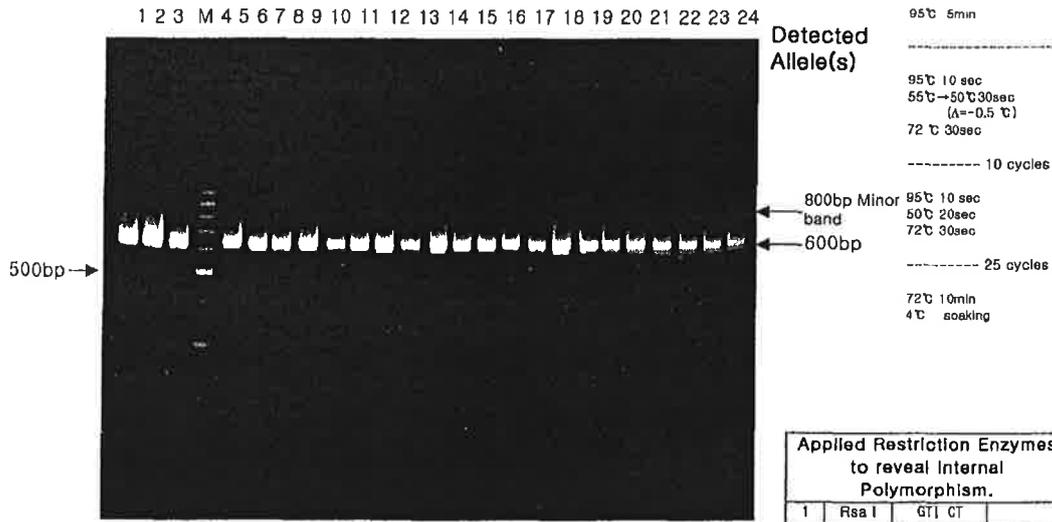
Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT  CT	
2	Hinf I	GI ANTC	NCP
3	Hae III	GG  CC	
4	Alu I	AG  CT	NCP

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
700bp	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

# WE044

Primer Sequence F: CTCGGTGGGGTCTTGCATTCC  
R: GAATTCACAATGAGAGGAGTC

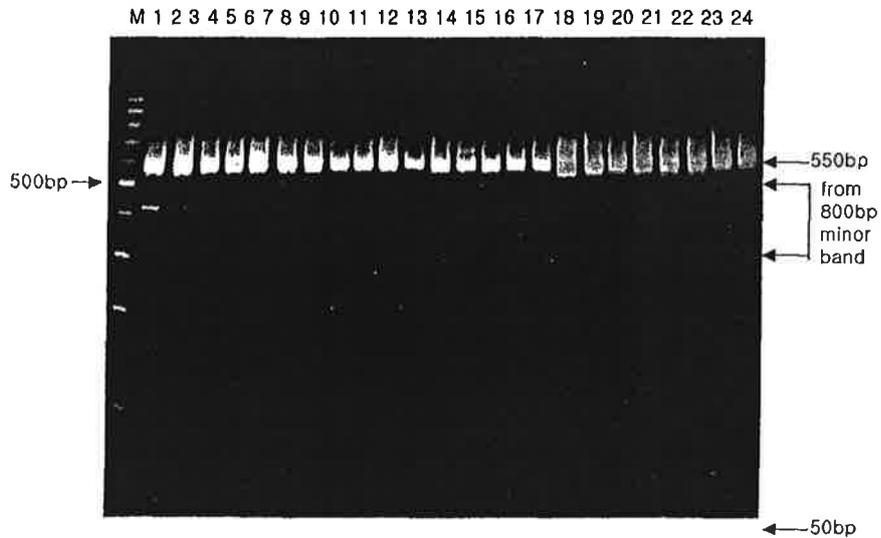
## PCR conditions



Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT↓CT	
2	Hinf I	GI↓ANTC	
3	Hae III	GG↓CC	
4	Alu I	AG↓CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
600bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

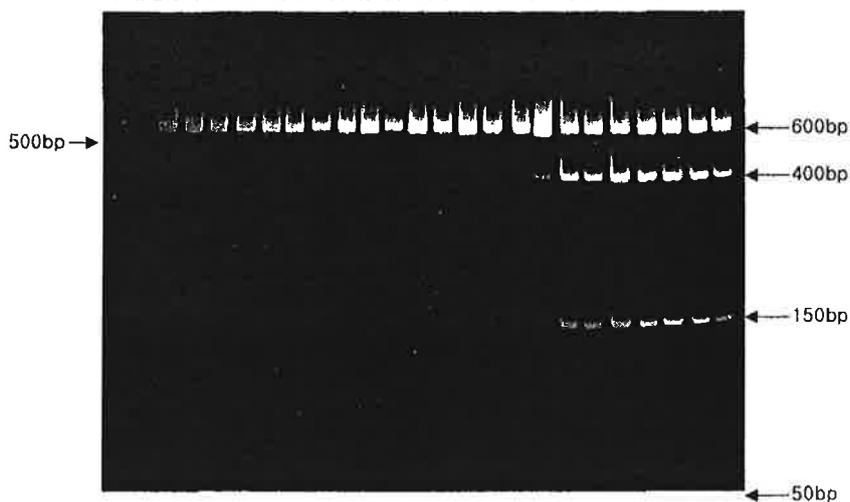
## WE044/Rsa I (GT ↓ CT)



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	Product	Common band size																							
600	550+50	Uni	550+50																								

### WE044/Hinf I (G ↓ ANTC)

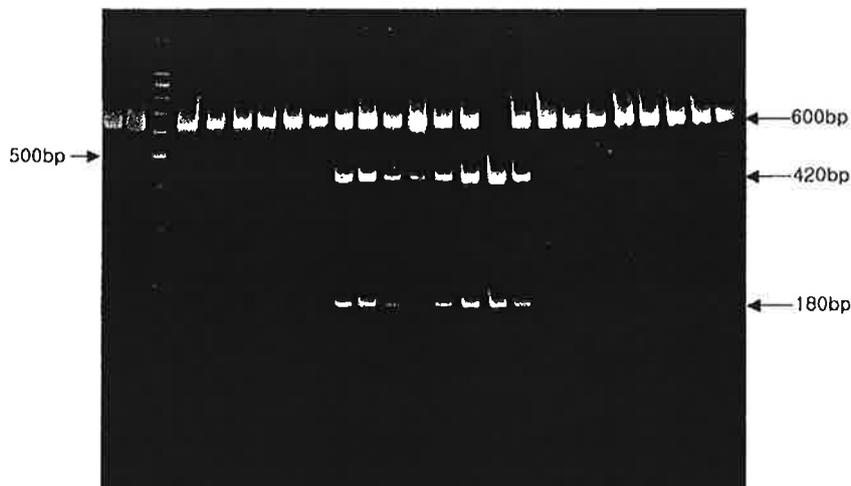
1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Target	Product	Type	Product																									
600	600	A	600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	400+150 +50	B	400+ 150+50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Genotype				AA																								

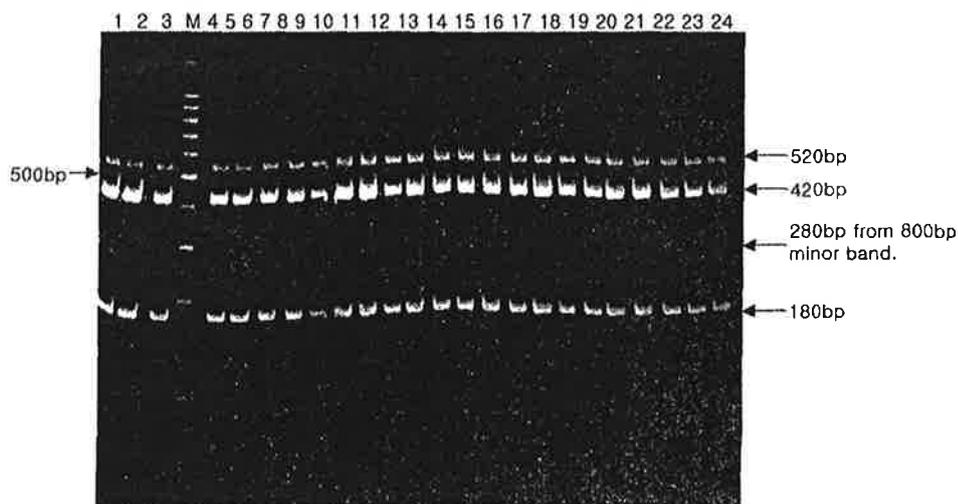
### WE044/Hae III (GG ↓ CC)

1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



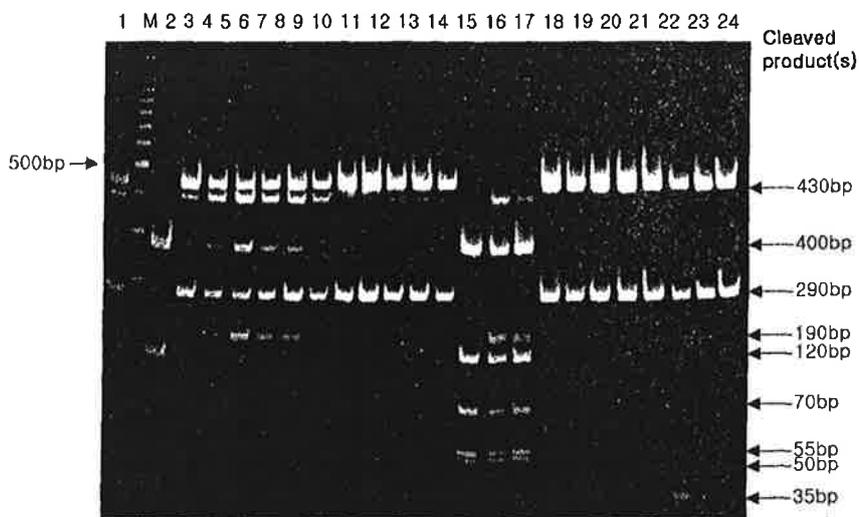
Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Target	Product	Type	Product																									
600	600	A	600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	420+180	B	420 +180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Genotype				AA																								

### WE044/Alu I (AG ↓ CT)



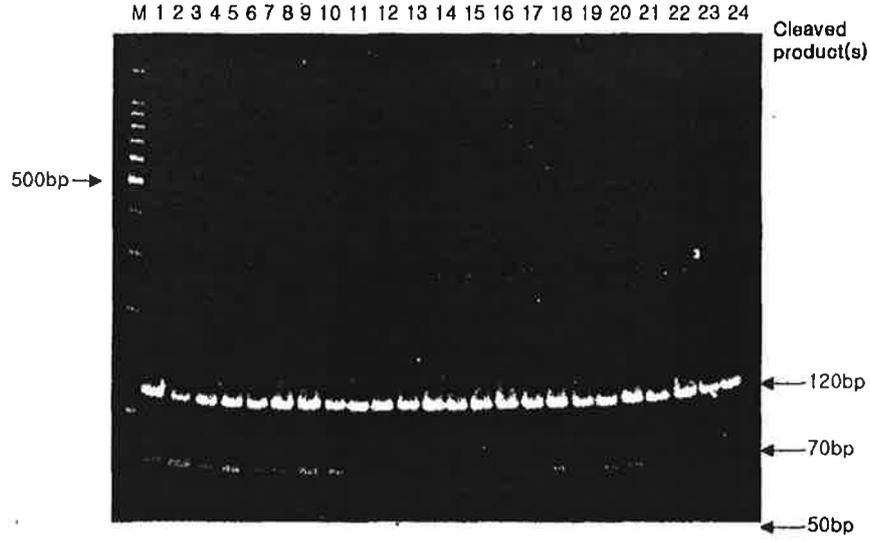
Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	420+180	Common band size																							
600	400+180	Uni																									

### WE050/ Hinf I (G ↓ ANTC)



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Target	Product	Type	420+180	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
620	(200+55+50+35)+(120+70)	B	(290+55+50+35)+(120+70)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Genotype				AA	BB	AA	BB	BB	BB	BB	AA																	

### SA003/Rsa I (GT ↓ CT)



Reference			Product																									
Target	Product	Type		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
120	120	A	120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	70+50	B	70+50	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
Genotype				AB	AA	AB																						

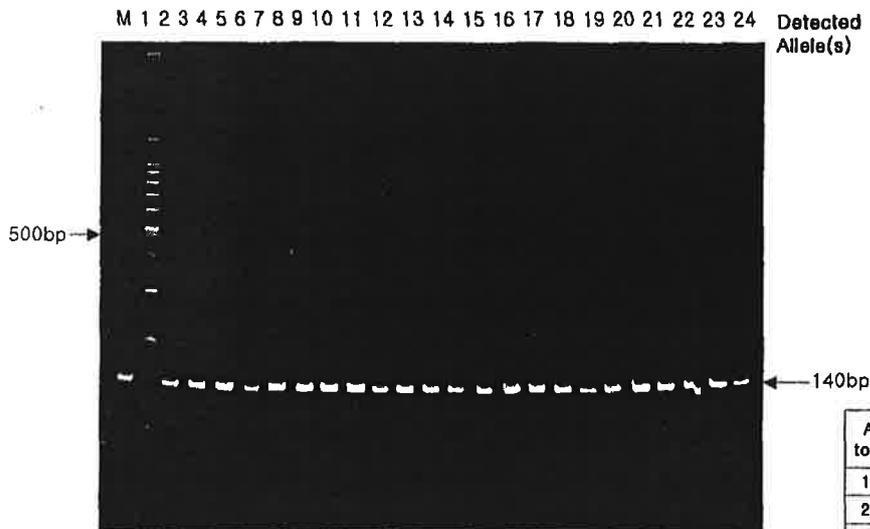
### SA005

Primer Sequence

F : TTAACATAGCCATAGCCG

R : GAATTCAGAATGCAGAA

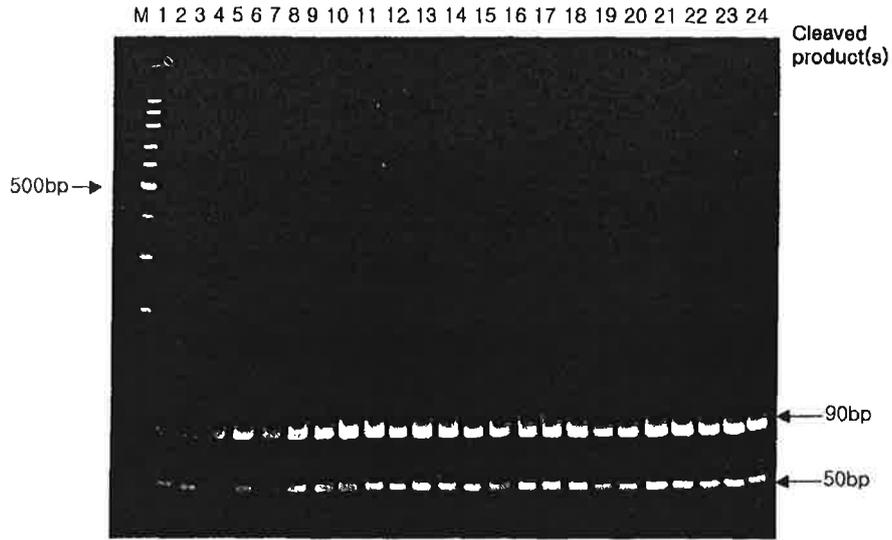
PCR conditions



Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT ↓ CT	
2	Hinf I	GI ANTC	NCP
3	Hae III	GG ↓ CC	
4	Alu I	AG ↓ CT	NCP

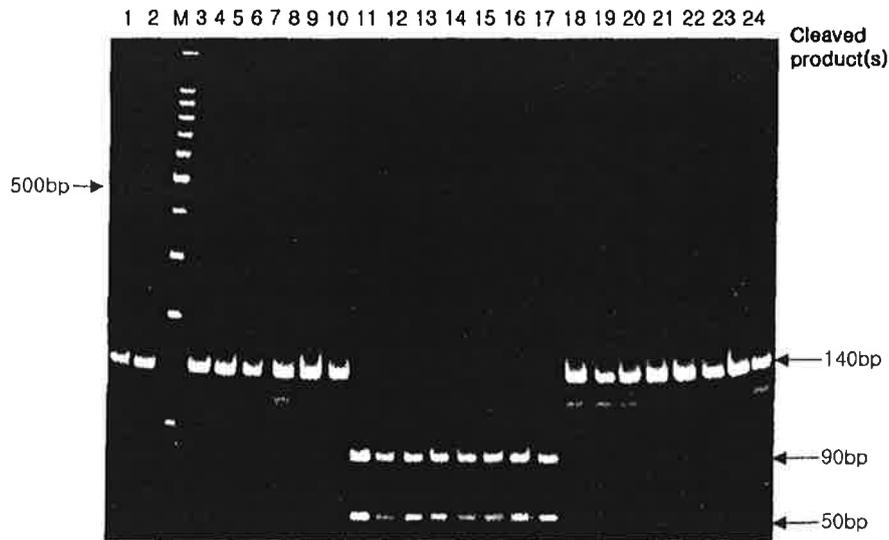
Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
140bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

### SA005/Rsa I (GT ↓ CT)



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	90+50	Common Band Size																							
140	90+50	Uni																									

### SA005/Hae III (GG ↓ CC)



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	140	A	140	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	90+50	B	90+50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Genotype				AA	BB	AA																					

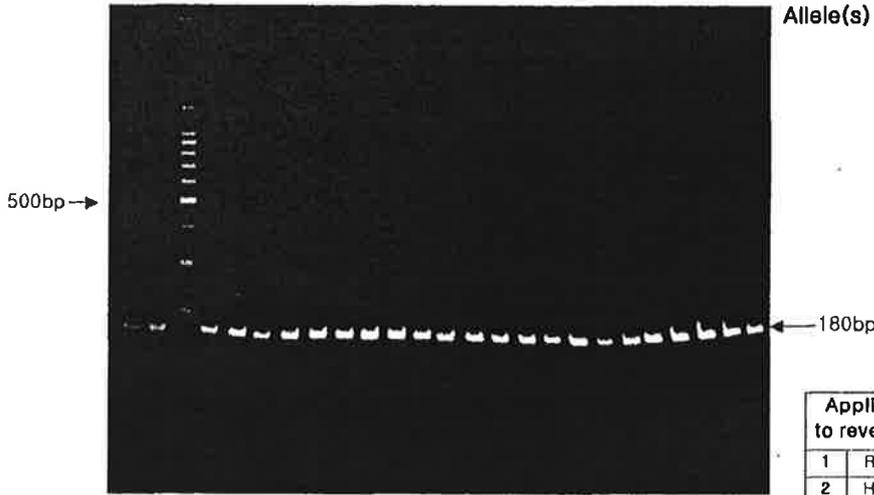
# SA006

Primer Sequence

F: TTAAGTCATAAGGTAGCA  
R: GAATTCACATATCCTTCA

PCR conditions

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



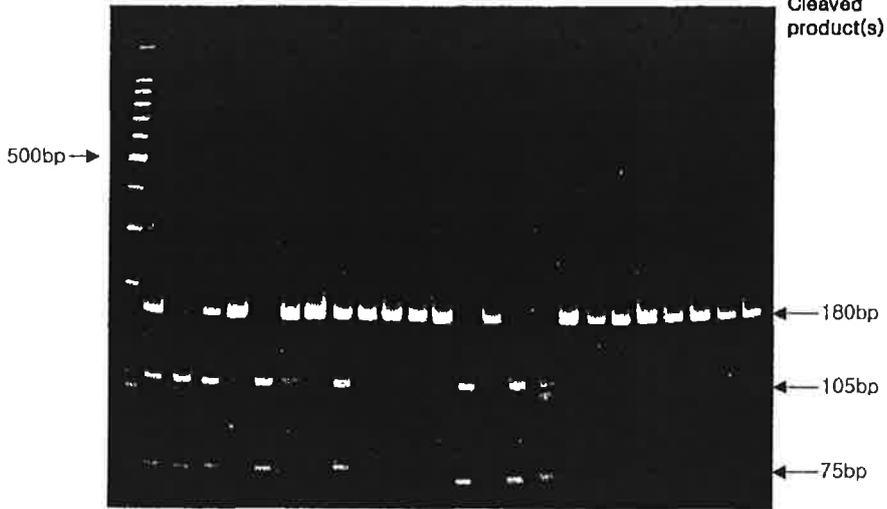
95°C 5min  
-----  
95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(A = -0.5°C)  
72°C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT ↓ CT	
2	Hinf I	G ↓ ANTC	NCP
3	Hae III	GG ↓ CC	
4	Alu I	AG ↓ CT	NCP

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
180bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

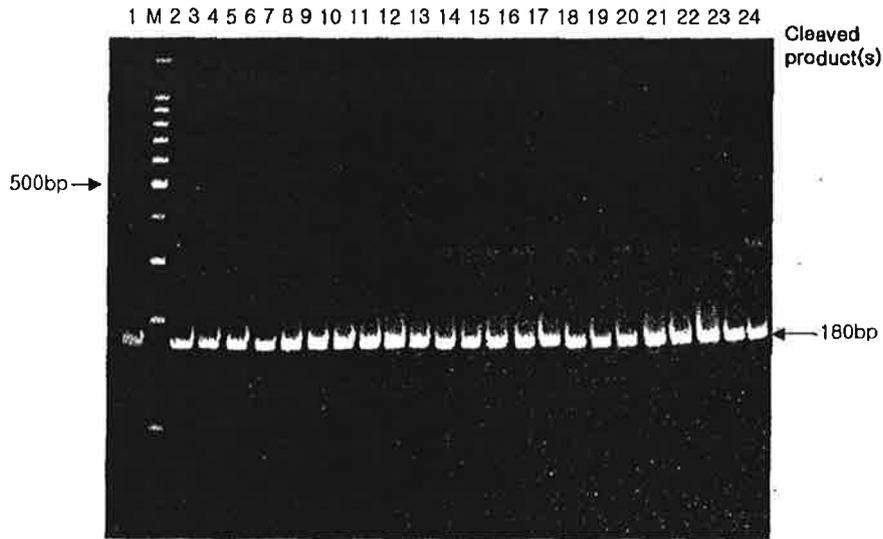
## SA006/Rsa I (GT ↓ CT)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



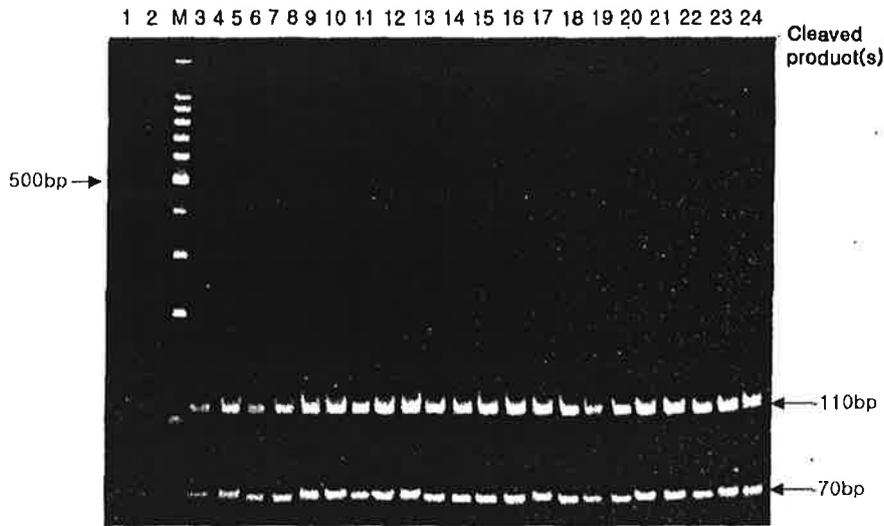
Reference			Product																							
Target	Product	Type	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
180	180	A	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
	105+75	B	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Genotype			AB	BB	AB	AB	BB	AB	AA	AB	AA	AA	AA	AA	BB	AB	BB	BB	AA							

### SA006/Hinf I (G ↓ ANTC)



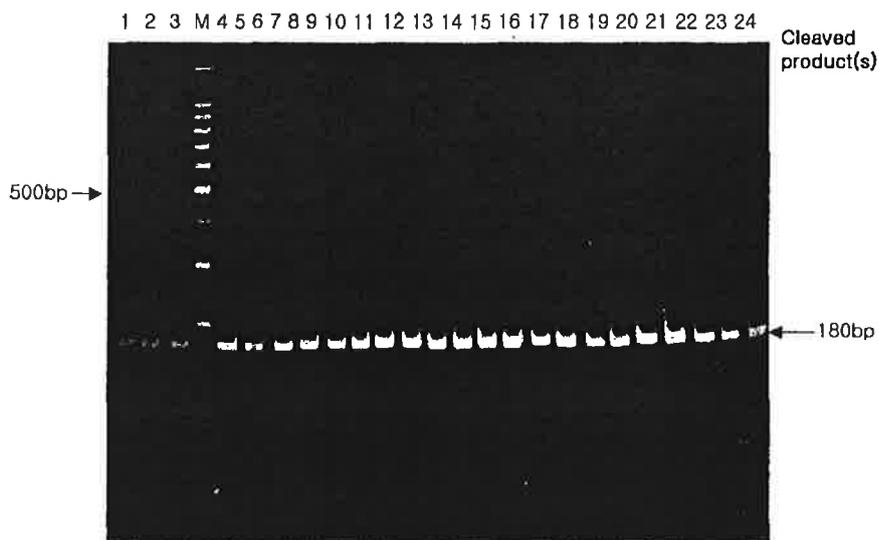
No Cleaved Product.

### SA006/Hae III (GG ↓ CC)



Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	110+70	Common Band Size																							
180	110+70	Uni	110+70																								

### SA006/Alu I (AG ↓ CT)

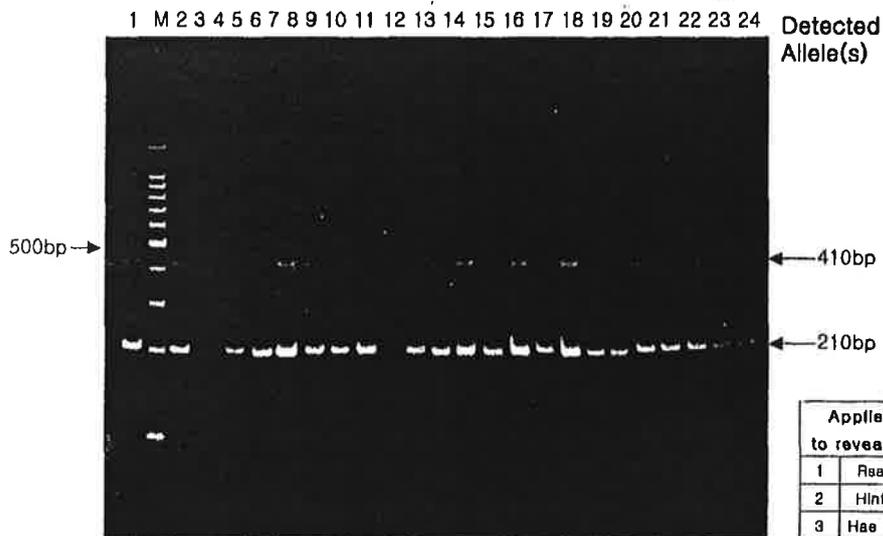


No Cleaved Product.

### SA009

Primer Sequence  
 F : TTAACAGAGATCACAATG  
 R : GAATTCACAAGCCTCCAT

#### PCR conditions

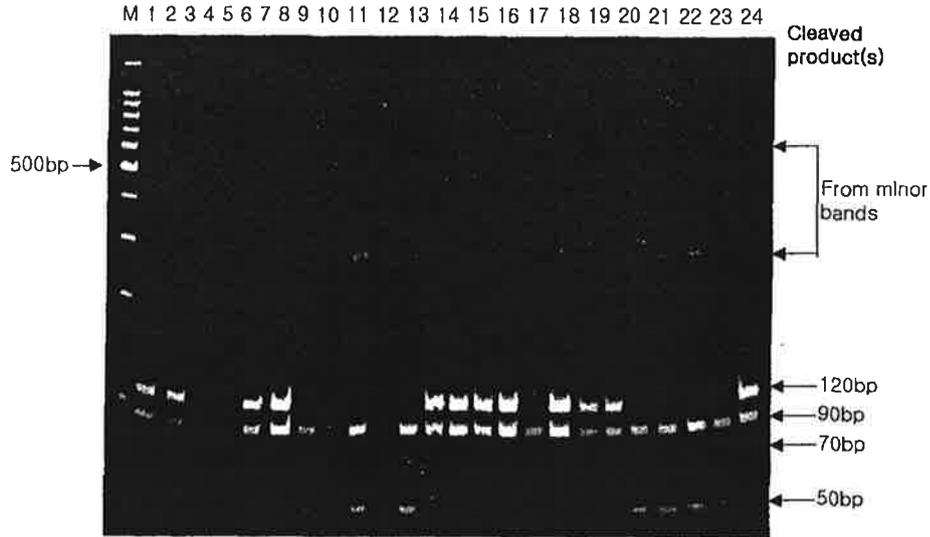


95°C 5min  
 -----  
 95°C 10 sec  
 55°C → 50°C 30sec  
 (Δ = -0.5 °C)  
 72 °C 30sec  
 ----- 10 cycles  
 95°C 10 sec  
 50°C 20sec  
 72°C 30sec  
 ----- 25 cycles  
 72°C 10min  
 4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GTI CT	
2	Hinf I	G  ANTC	
3	Hae III	GG  CC	RCP
4	Alu I	AG  CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
210bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
410bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

# SA009/Rsa I (GT ↓ CT)



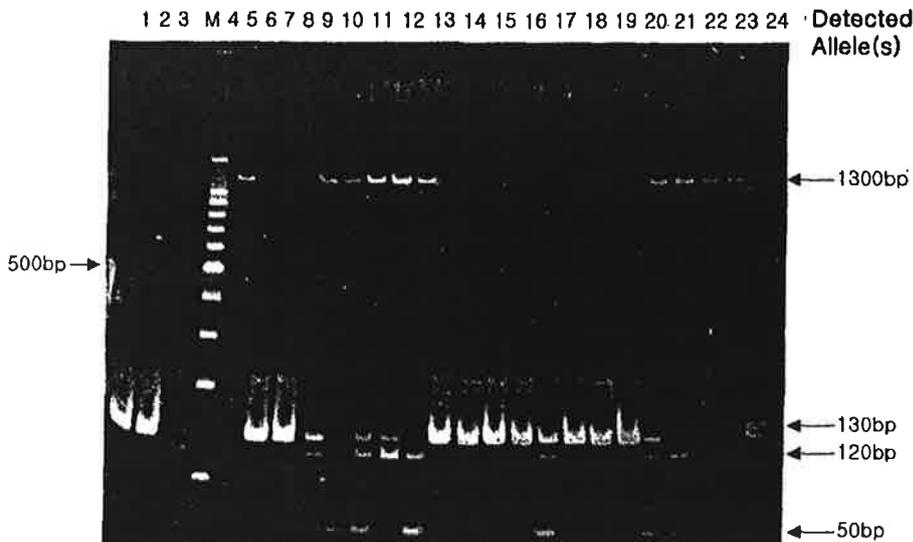
Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
210 (-lier No 10)	120+90	A	120+90	1	1	0	0	1	1	0	0	0	NP	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
	70+50+90	B	70+50+90	0	0	1	1	0	0	1	1	1	P	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	
Genotype				AA	AA	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	Nu B	BB	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	AA

# SA033

Primer Sequence

F: CAGAAATATTACAGAGCC

R: CAGGTGATGAAAGCTTCC



PCR conditions

95°C 5min  
-----  
95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ -0.5 °C)  
72 °C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
50bp	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
120+Weak130bp	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
Strong 130bp	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
1300bp	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0

# SGm003

Primer Sequence

F : TAATAACGAACTTGCAAAATGA

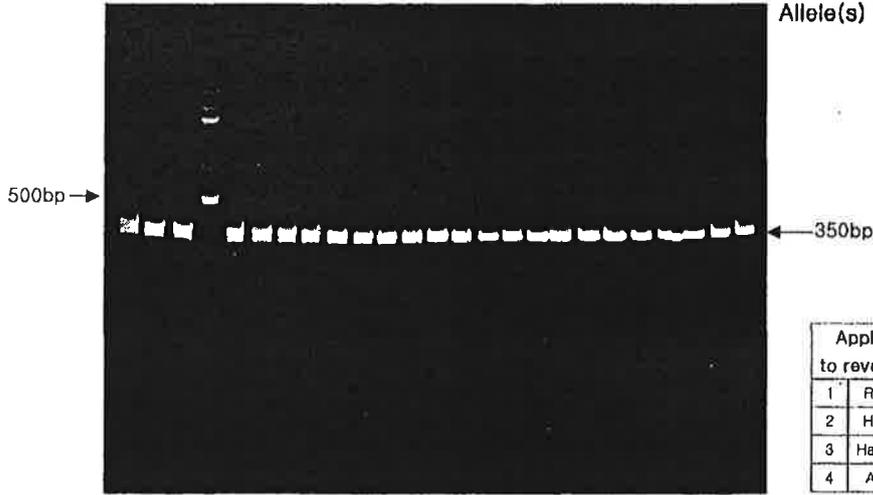
R : AGAGATCGAGCTTCAAGAAATA

## PCR conditions

95°C 5min  
 -----  
 95°C 10 sec  
 55°C → 50°C 30sec  
 (Δ = -0.5 °C)  
 72°C 30sec  
 ----- 10 cycles  
 95°C 10 sec  
 50°C 20sec  
 72°C 30sec  
 ----- 25 cycles  
 72°C 10min  
 4°C soaking

1 2 3 M 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

Detected Allele(s)



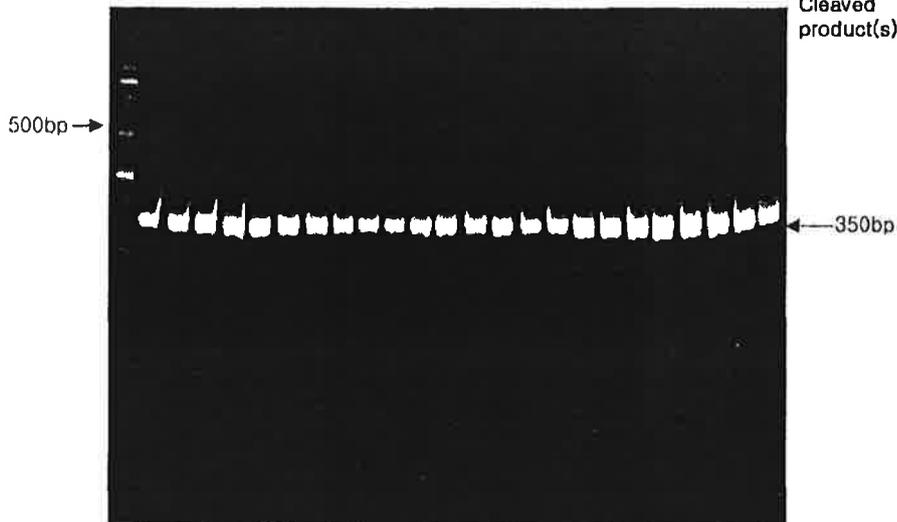
Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT↓CT	NCP
2	Hinf I	GI↓ANTC	
3	Hae III	GG↓CC	NCP
4	Alu I	AG↓CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
350bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## SGm003/Rsa I (GT ↓ CT)

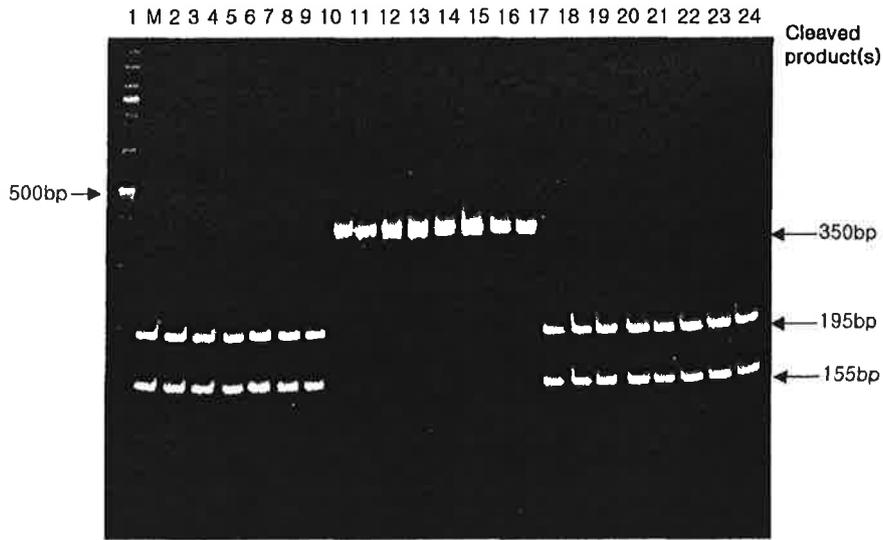
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

Cleaved product(s)



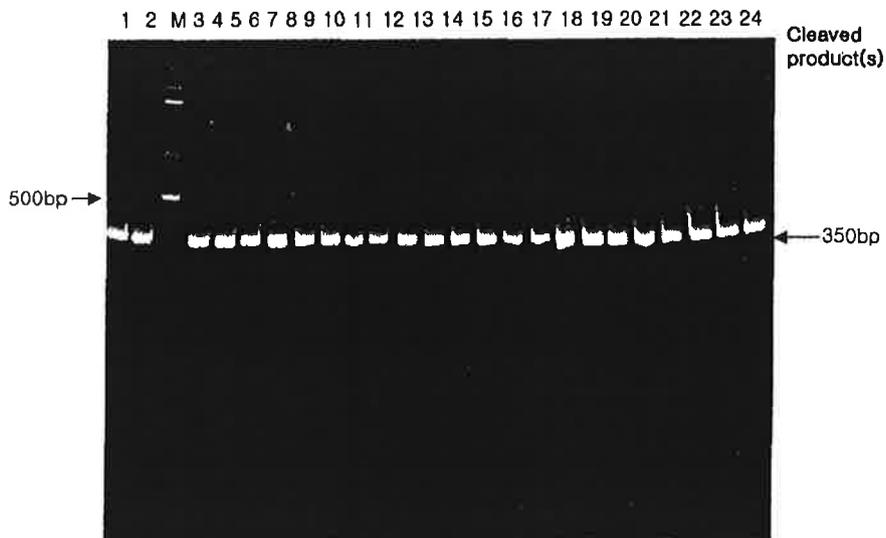
No Cleaved Product.

### SGm003/Hinf I (G ↓ ANTC)



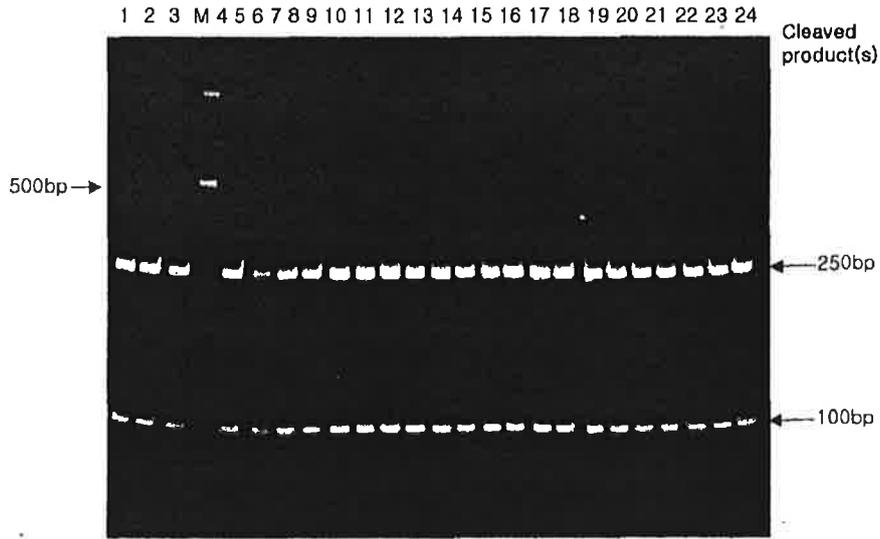
Reference			Product																								
Target	Product	Type		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
350	350	A	350	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	195+155	B	195+155	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1		
Genotype				BB	AA	BB																					

### SGm003/Hae III (GG ↓ CC)



No Cleaved Product.

### SGm003/Alu I (AG ↓ CT)



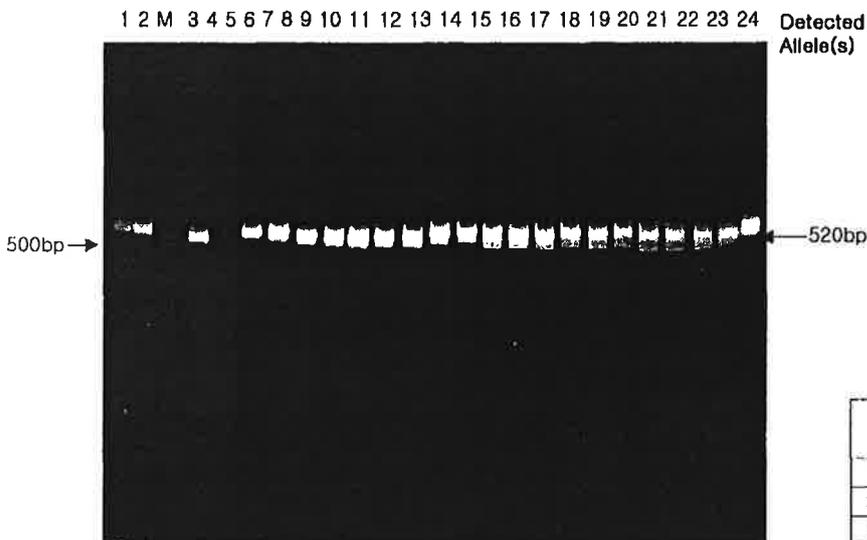
Reference			Product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Target	Product	Type	250 +100	Common Band Size																							
350	250+100	Unl																									

### SGm018

Primer Sequence

F: CACGAGATAACCTTCTTTTCCTC  
R: TGGCATCTTTAGGTAAGTACTCC

PCR conditions



95°C 5min

-----

95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ = -0.5 °C)  
72°C 30sec

----- 10 cycles

95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec

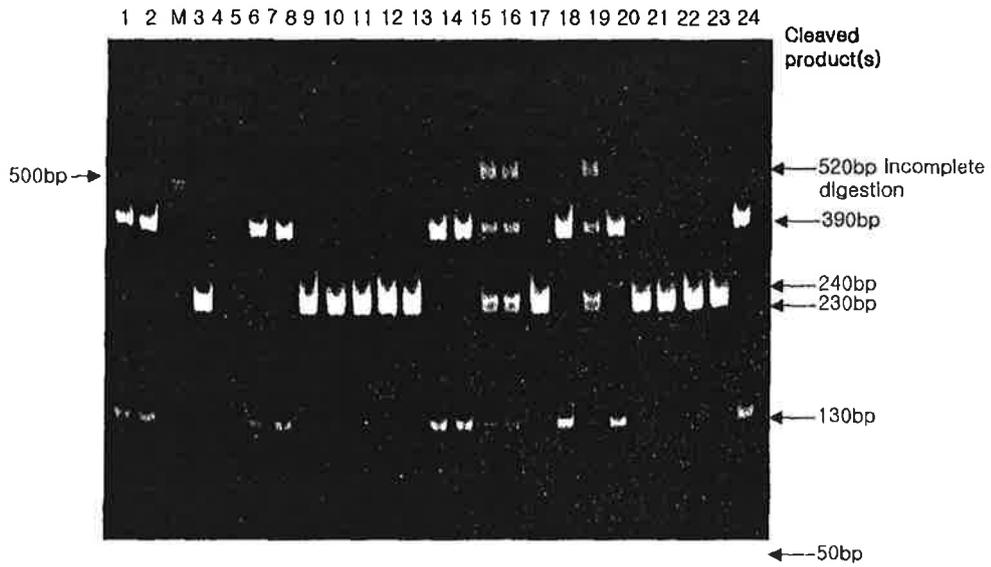
----- 25 cycles

72°C 10min  
4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GTI CT	NCP
2	Hinf I	GI ANTC	NCP
3	Hae III	GGI CC	
4	Alu I	AGI CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
520bp	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## SGm018/Hae III (GG ↓ CC)



Reference			Product																									
Target	Product	Type		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
520(-line4)	390+130	A	390+130	1	1	0	NPP	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
	240+230+50	B	240+230+50	0	0	1	NU	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0		
Genotype				AA	AA	BB	NU	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AB	AB	BB	AA	AB	AA	BB	BB	BB	BB	AA

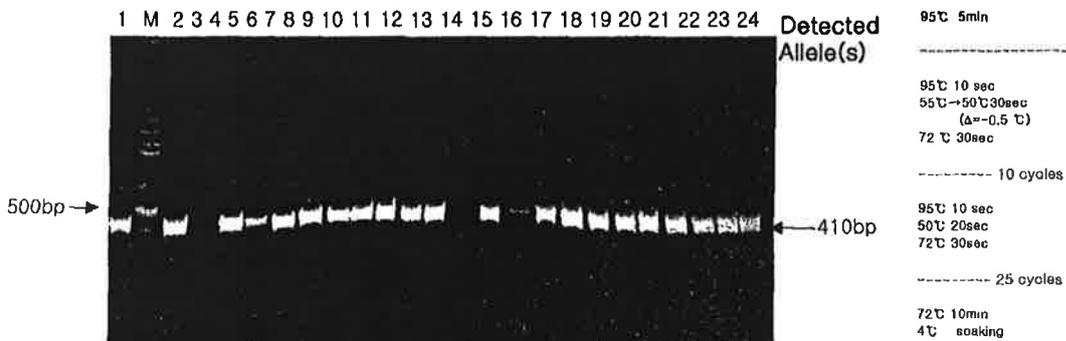
NPP: no PCR product

## SGm035

Primer Sequence

F: CATTTATAAATCACAGGCTGAAA  
R: TTTTCAACAAAATCATCACGTAG

PCR conditions

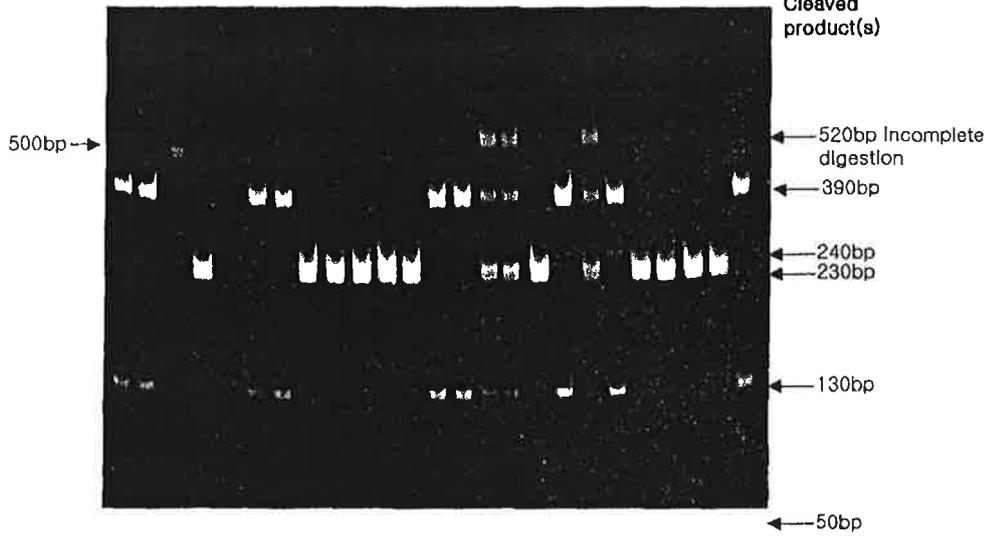


Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GTI CT	
2	Hinf I	GI ANTC	
3	Hae III	GGI CC	NCP
4	Alu I	AGI CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
410bp	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## SGm018/Hae III (GG ↓ CC)

1 2 M 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Reference			Product																								
Target	Product	Type		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
520(- line4)	390+130	A	390+130	1	1	0	NPP	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
	240+230+50	B	240+230+50	0	0	1	NP	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
Genotype				AA	AA	BB	NU LL	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AB	AB	BB	AA	AB	AA	BB	BB	BB	BB	AA

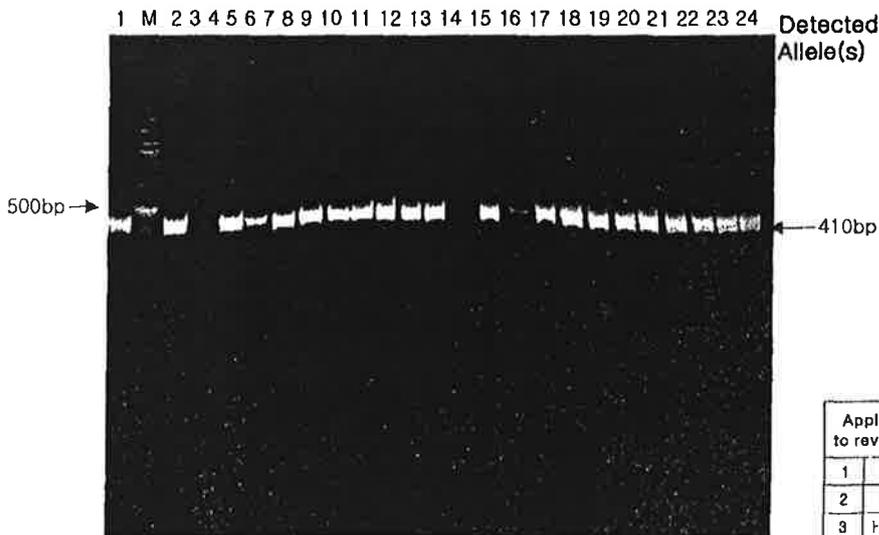
NPP: no PCR product

## SGm035

Primer Sequence

F: CATTTATAAAATCACAGGCTGAAA  
R: TTTTCAACAAAATCATCACGTAG

PCR conditions

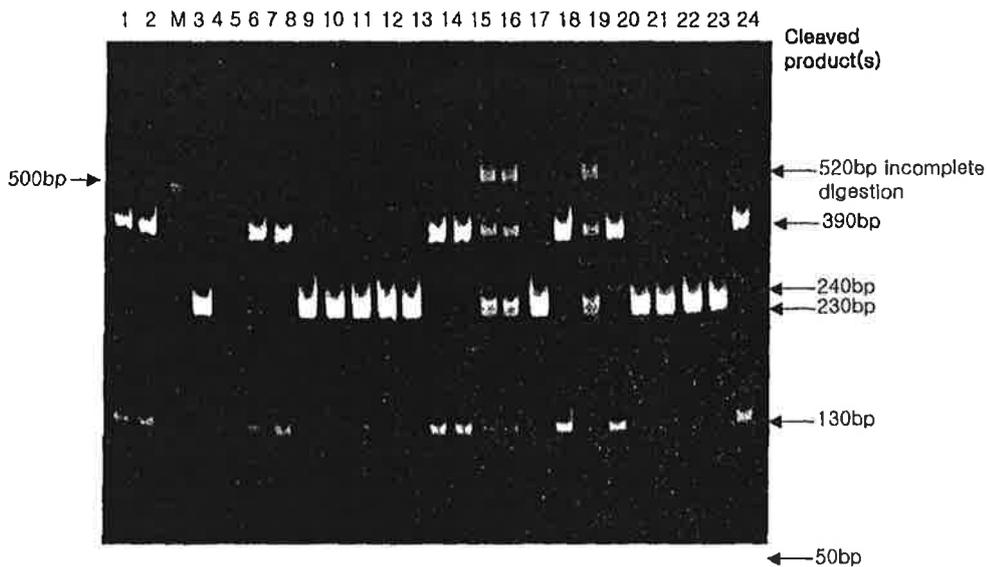


95°C 5min  
-----  
95°C 10 sec  
55°C → 50°C 30sec  
(Δ = -0.5 °C)  
72°C 30sec  
----- 10 cycles  
95°C 10 sec  
50°C 20sec  
72°C 30sec  
----- 25 cycles  
72°C 10min  
4°C soaking

Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.			
1	Rsa I	GT ↓ CT	
2	Hinf I	GI ANTC	
3	Hae III	GG ↓ CC	NCP
4	Alu I	AGI CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
410bp	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## SGm018/Hae III (GG ↓ CC)



Reference			Product																								
Target	Product	Type		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
520(-line4)	390+130	A	300+130	1	1	0	NP	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	
	240+230+50	B	240+230+50	0	0	1	P	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	
Genotype				AA	AA	BB	HU LL	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AB	AB	BB	AA	AB	AA	BB	BB	BB	BB	AA

NPP: no PCR product

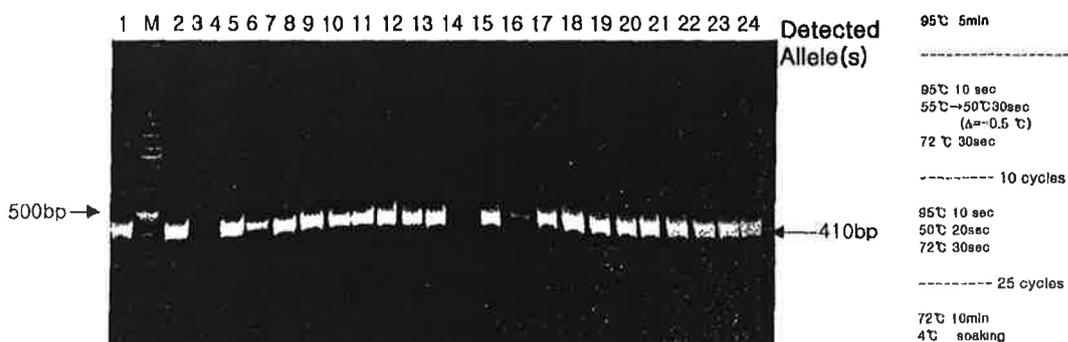
## SGm035

Primer Sequence

F: CATTATATAATCACAGGCTGAAA

R: TTTCAACAAAATCATCACGTAG

PCR conditions



Applied Restriction Enzymes to reveal Internal Polymorphism.

	Enzyme	Site	Product
1	Rsa I	GT↓CT	
2	Hinf I	GI↓ANTC	
3	Hae III	GG↓CC	NCP
4	Alu I	AG↓CT	

Genotyping	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
410bp	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1