

## SSR 마커를 이용한 한국산과 중국산 구기자의 품종 판별

정종욱\* · 이기안\*\* · 이석수\*\*\* · 방경환\*\*\*\* · 박충범\*\*\*\* · 박용진\*†

\*공주대학교, 식물자원학과, \*\*국립농업과학원, 농업유전자원센터  
\*\*\*충청남도농업기술원, 청양구기자시험장, \*\*\*\*국립원예특작과학원, 인삼특작부

### Cultivar Discrimination of Korean and Chinese Boxthorn (*Lycium chinense* Mill. and *Lycium barbarum* L.) using SSR Markers

Jong Wook Chung\*, Gi An Lee\*\*, Sok Su Lee\*\*\*, Kyong Hwan Bang\*\*\*\*, Chung Berm Park\*\*\*\*, and Yong Jin Park\*†

\*Department of Plant resources, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea.

\*\*National Agrobiodiversity center, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-100, Korea.

\*\*\*Cheongyang Boxthorn Experiment station, CNARES, Cheongyang 345-872, Korea.

\*\*\*\*Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 369-873, Korea.

**ABSTRACT :** This study was undertaken to develop a technique of discrimination using SSR makers in boxthorn cultivars. Forty one boxthorn cultivars, which were collected from Korea and China, were evaluated by 10 SSR markers. Total of 61 alleles were detected, ranging from 3 to 13 with an average of 6.1 alleles per locus. The averages of gene diversity and PIC values were 0.482 and 0.428, with a range from 0.25 (GB-LCM-022 and GB-LCM-087) to 0.83 (GB-LCM-167) and from 0.24 (GB-LCM-022 and GB-LCM-087) to 0.81 (GB-LCM-167), respectively. Five markers out of 10 markers, GB-LCM-022, GB-LCM-075, GB-LCM-104, GB-LCM-167 and GB-LCM-217, were selected as key markers for discrimination in boxthorn cultivars. All of boxthorn cultivars were individually distinguished by the combination of five SSR markers.

**Key Words :** SSRs (Simple Sequence Repeats), Cultivar Discrimination, Boxthorn, *Lycium chinense* Mill., *Lycium barbarum* L.

## 서 언

최근 유럽을 비롯한 각 국가들은 세계 무역기구의 지적재산권협정 (WTO/TRIPS)에 따라 식물품종보호제도 (Plant Variety Protection System, PVPS)의 시행을 의무화하고 있다. 우리나라도 국제 식물 신품종 보호동맹 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV) 가입, 종자 산업법의 발효 및 WTO 가입에 따른 수입 농산물의 개방으로 인하여 국내산과 외국산 농산물에 대한 품종 구분의 필요성이 대두되고 있으며, 농가 소득 보장과 육종가의 지적 재산권을 보호하기 위해서도 과학적인 품종 구분 체계를 구축하는 것은 안정적으로 종자산업 분야를 발전시켜나가는 데 중요한 일로 여겨지고 있다.

구기자 품종육성은 주로 교잡육종이 이용되고 있으나 시간이 오래 소요되고 많은 유전자원을 활용해야 하기 때문에 품종 개발이 활발히 이루어지지 않았으며, 국내에서 재배되는 구

기자의 대부분은 지역 수집종, 재래종 및 도입종에 의존하고 있다 (Park *et al.*, 2000). 한편 새로운 품종 육종에 있어서 제한된 교배 모본의 사용으로 인하여 새롭게 육성된 품종들은 기존에 육성된 품종들과 유전적 유사도가 매우 가깝기 때문에 품종을 구분하는데 어려움이 있다.

과거에는 품종을 구분하기 위하여 주로 품종 간 차이를 보이는 특정 형질들이 주로 이용되었다. 그러나 대부분의 형질은 그 수가 제한적이고 다수의 유전자가 관여하는 양적 형질로 외부 환경 조건에 의해 영향을 받기 때문에 특정 형질을 이용한 품종 구분에는 제한적으로 활용될 수밖에 없다 (Kwon *et al.*, 2005).

이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 안정적이고 환경에 영향을 받지 않는 DNA 마커가 품종 구분, 안정성 검정, 종자의 순도 검정 및 품종 보증을 위하여 콩 (Kim *et al.*, 2006), 밀 (Noil *et al.*, 2008), 벼 (Komori and Nitta, 2004; Sun *et al.*, 2009), 배추 (Kwon *et al.*, 2003), 오이 (Bernet

†Corresponding author: (Phone) +82-41-330-1201 (E-mail) yjpark@kongju.ac.kr

Received 2009 November 3 / 1st Revised 2009 December 9 / Accepted 2009 December 14

*et al.*, 2003), 유채 (Tommasini *et al.*, 2003), 대청 (Choi *et al.*, 2009) 등의 작물에 활용되고 있다.

DNA 마커 중 SSR 마커는 RFLP, RAPD 마커에 비하여 높은 다형성과 분석의 용이성으로 인하여 유전적으로 가까운 근연 품종의 동정에 활용되고 있다 (Ji *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 2009; Ni *et al.*, 2002). 구기자 품종판별에 대한 선행연구는 미흡한 실정으로 DNA 수준에서 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 및 inter simple sequence repeat (ISSR) 마커를 이용한 품종분류 및 유전적 유사도에 대한 연구가 일부 수행되었다 (Lee *et al.*, 2007; Park *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000).

최근 수입농산물의 개방으로 인하여 국내산 농산물과 외국산 농산물에 대한 원산지 관리, 국내에서 개발된 품종에 대한 지적재산권 보호 및 우수 품종에 대한 품질 관리를 위해서 품종판별은 기반기술로의 가치를 인정받고 있다. 또한 수입되는 대부분의 한약재는 건조 후 절편으로 판매 되는 경우가 많아 형태에 의한 품종 구분은 사실상 불가능한 실정으로 DNA 수준에서 품종판별 시스템을 구축하는 것이 가장 효율적인 방법일 것으로 평가받고 있다.

따라서 본 연구는 SSR 마커를 이용하여 국내산과 중국산 구기자 품종에 대한 유전자형을 분석하여 품종 판별에 대한 가능성을 검토하고 효율적인 품종 판별법을 제시하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용한 재료는 국립농업유전자원센터에 보유하고 있는 구기자 41점을 사용하였으며 한국산 25점과 중국산 16점이 포함되었다 (Table 1). DNA 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)을 사용하였으며, 추출한 구기자 DNA는 BioSpec-nano (Shimadzu, Japan)를 이용하여 구기자 DNA의 quality 및 quantity를 확인하였고 PCR 반응을 위해서 DNA 농도를 20 ng/ $\mu$ l로 정량 후 사용하였다.

### 2. SSR 분석

Kwon *et al.* (2009)이 발표한 논문에서 polymorphic information content (PIC) 값이 높고 allele 수가 많은 10개 SSR 마커를 선발하여 분석에 사용하였다 (Table 2). PCR 반응을 위해서 Schuelke (2000) 방법을 변형하여 수행하였다. 주형 DNA 40 ng, M13-tailed forward primer 0.2  $\mu$ M, reverse primer 0.6  $\mu$ M, 형광 M13 primer 0.5  $\mu$ M, dATP, dGTP, dCTP, dTTP를 각각 200  $\mu$ M, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 unit Taq DNA polymerase를 사용하였다. 형광물질로는 6-FAM, HEX, NED를 사용하였으

**Table 1.** Information of 41 boxthorn cultivars and accessions used in this study.

No.	Code	Variety name or collected region	Origin
1	1-CHN	China1	CHN
2	2-CHN	China2	CHN
3	3-CHN	Younghagoogi	CHN
4	4-CHN	Nokwongoogi	CHN
5	5-CHN	Cheongjingoogi	CHN
6	6-CHN	Collected from China	CHN
7	7-CHN	Collected from China	CHN
8	8-CHN	Collected from China	CHN
9	9-CHN	Collected from China	CHN
10	10-CHN	Collected from China	CHN
11	11-CHN	Collected from China	CHN
12	12-CHN	Collected from China	CHN
13	13-CHN	Collected from China	CHN
14	14-CHN	Collected from China	CHN
15	15-CHN	Collected from China	CHN
16	16-CHN	Collected from China	CHN
17	17-KOR	Yuseong1	KOR
18	18-KOR	Yuseong2	JPN
19	19-KOR	Cheonyang6	KOR
20	20-KOR	Cheonyang7	KOR
21	21-KOR	Cheonyang8	KOR
22	22-KOR	Cheonyang9	KOR
23	23-KOR	Myeongan	KOR
24	24-KOR	Bulro	KOR
25	25-KOR	Cheongdae	KOR
26	26-KOR	Jangmyeong	KOR
27	27-KOR	Cheongun	KOR
28	28-KOR	Hwabun	KOR
29	29-KOR	Cheongyangjaerae	KOR
30	30-KOR	Jinbujaerae	KOR
31	31-KOR	Jindojaerae	KOR
32	32-KOR	Keumsanjaerae	KOR
33	33-KOR	Haenamjaerae	KOR
34	34-KOR	Cheongyangjong	KOR
35	35-KOR	Local strain (collected from Boryeong)	KOR
36	36-KOR	Local strain (collected from Wando)	KOR
37	37-KOR	Local strain (collected from Munkyeong)	KOR
38	38-KOR	Local strain (collected from Sancheong)	KOR
39	39-KOR	Local strain (collected from Youngcheon)	KOR
40	40-KOR	Local strain (collected from Geochang)	KOR
41	41-KOR	Local strain (collected from Goseong)	KOR

며, PCR 반응은 PTC-200 thermocycler (MJ Research, USA)를 이용하였다.

유전자형을 분석하기 위하여 PCR 산물 1.2  $\mu$ l, internal size standard 500 ROX (ABI, Foster city, CA) 0.3  $\mu$ l, Hi-di formamid (ABI, Foster City, CA) 9  $\mu$ l을 첨가 후 ABI 3130xl Genetic Analyzer(ABI, Foster City, CA)를 이용하여

**Table 2.** Information of 10 SSR markers used in this study.

Marker	Primer sequence		Repeated motif	T <sub>A</sub> (°C) <sup>§</sup>
	Forward	Reverse		
GB-LCM-004	ACATTTTGAATCTCCCCGT	TGGGAATCAAGATCAATAGTCA	(TA) <sub>2</sub> , (TA) <sub>4</sub>	57
GB-LCM-022 <sup>†</sup>	CGCGCAGTAATCCATGT	TGTATGATCCCTAAGTCCCCG	(CA) <sub>21</sub> (YA) <sub>12</sub> <sup>‡</sup>	58
GB-LCM-025	AAGACAGCACGCCAAAAA	AGCCACCCCCCACTAAAA	(GAG) <sub>4</sub>	58
GB-LCM-075 <sup>†</sup>	TCTCCTTCGGACCCATT	TTGGCATAAGGTGCTCGT	(CA) <sub>15</sub>	58
GB-LCM-087	CTCCTGAATACCCTGGGC	AGAAGAAGCAGCAGCAGC	(GCW) <sub>34</sub> <sup>‡</sup>	58
GB-LCM-104 <sup>†</sup>	TTTGGAATGAAACGACGG	ACACCCCCGAGACTTAGC	(GTT) <sub>2</sub> , (GTT) <sub>2</sub>	58
GB-LCM-119	AATGTACATCGCCCCCA	GATTCGGAGCCTGCTTTT	(CA) <sub>4</sub> , (CA) <sub>4</sub>	58
GB-LCM-166	CCTGAGAGCTGATGTGGC	AGGAGGAGAAGGGGGAAG	(TTC) <sub>3</sub>	58
GB-LCM-167 <sup>†</sup>	CTTGAAGATGGAGGAAAGCA	CCCAAATTAAGGGGCA	(GA) <sub>7</sub> , (GA) <sub>18</sub>	58
GB-LCM-217 <sup>†</sup>	GATGTTGGTCTTGGGCTG	GAGCAAGCGCAACACTTT	(TC) <sub>2</sub> , (TC) <sub>8</sub>	58

<sup>†</sup>: SSR markers used in cultivar discrimination

<sup>‡</sup>: Degenerated sequence; Y (C or T), W (A or T)

<sup>§</sup>: Annealing temperature

**Table 3.** Characterization of 10 SSR markers in boxthorn cultivars.

Marker	Size range (bp)	Difference (bp)	N <sub>A</sub> <sup>†</sup>	M <sub>AF</sub> <sup>‡</sup>	Gene diversity	PIC <sup>§</sup>
GB-LCM-004	238-258	20	4	0.82	0.31	0.27
GB-LCM-022	103-245	142	7	0.86	0.25	0.24
GB-LCM-025	258-267	9	3	0.51	0.54	0.44
GB-LCM-075	144-228	84	10	0.61	0.58	0.54
GB-LCM-087	117-240	123	6	0.87	0.25	0.24
GB-LCM-104	289-346	57	4	0.74	0.41	0.36
GB-LCM-119	276-286	10	3	0.52	0.51	0.39
GB-LCM-166	213-231	18	4	0.55	0.54	0.44
GB-LCM-167	189-227	38	13	0.28	0.83	0.81
GB-LCM-217	127-233	106	7	0.54	0.61	0.54
Mean			6.1	0.630	0.482	0.428

<sup>†</sup>: Number of allele

<sup>‡</sup>: Major allele frequency

<sup>§</sup>: Polymorphic information content

분석하였다. 자료 분석을 위하여 Genemapper 4.0 (ABI Fes-ster City, CA)을 이용하였다.

### 3. SSR 마커 다양성 및 구기자 품종 판별

마커에 대한 number of allele (N<sub>A</sub>), major allele frequency (M<sub>AF</sub>), gene diversity (GD) 및 polymorphic information content (PIC)에 대한 분석은 PowerMarker (ver 3.25) 프로그램을 이용하였으며 expected heterozygosity는 POPGEN 프로그램을 사용하였다. 계통분류학적 분석은 PowerMarker에 포함되어 있는 CS Chord 1967 distance를 이용하여 각각의 품종에 대한 유전적 거리를 분석 후 UPGMA 방법을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하여 분석하였다.

SSR 마커를 이용하여 한국산 및 중국산 구기자에 대한 품종판별을 위하여 10개 마커 중 allele 수, gene diversity 및

PIC 값이 가장 높은 GB-LCM-167 마커를 이용하여 phylogenetic tree를 작성 후 1차 품종 판별 분석을 수행하였다. 구분이 되지 않은 자원에 대해서는 자원들이 차지고 있는 특정 allele를 포함하고 있는 마커 (GB-LCM-217, GB-LCM-104, GB-LCM-075, GB-LCM-022)를 선발하여 각각의 단계별로 하나의 마커를 추가하여 phylogenetic tree를 작성하여 최종 5단계로 구기자 품종을 판별하였다.

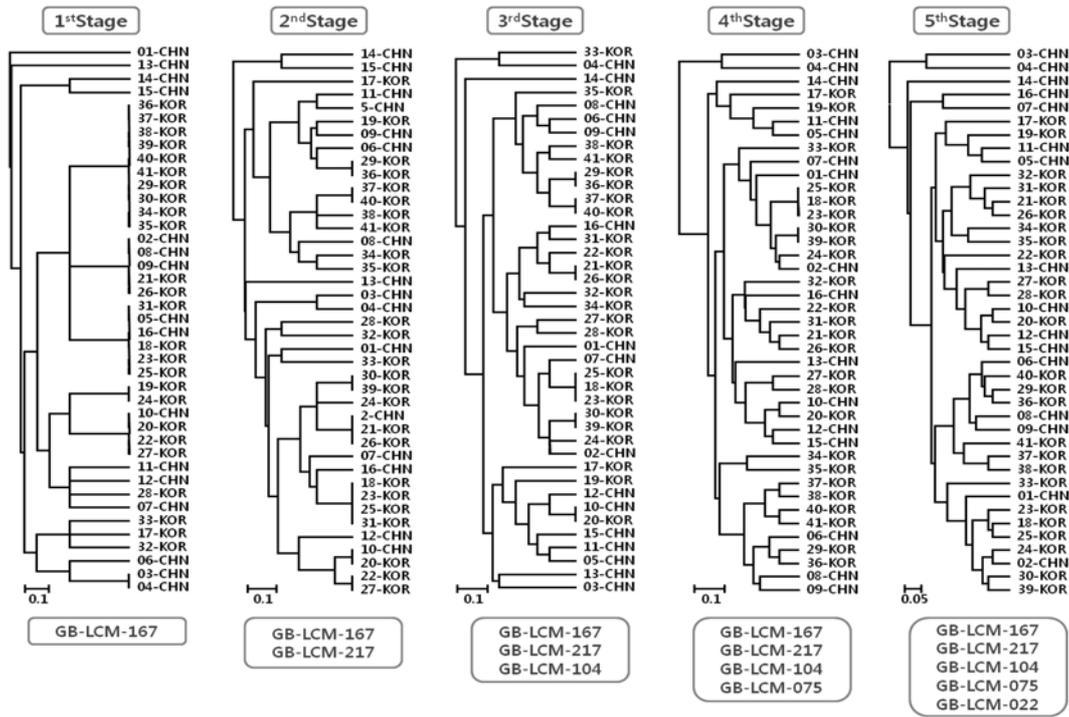
### 결과 및 고찰

10개 SSR 마커를 이용하여 41점의 한국산 및 중국산 구기자에 대하여 유전적 다양성을 분석한 결과, 총 61개 allele가 관찰되었다. Allele 수는 3개 (GB-LCM-025, GB-LCM-119)에서 13개 (GB-LCM-167)로 비교적 다양하게 나타났으며, 평

**Table 4.** The observed heterozygosity ( $H_O$ ), expected heterozygosity ( $H_E$ ), polymorphic information content (PIC) and number of specific allele ( $N_{SA}$ ) of 10 SSR loci within Korea (KOR) and China (CHN) populations.

Marker	$H_E^{\dagger}$		PIC <sup>‡</sup>		$N_A^{\S}$	$N_{SA}$ (bp) <sup>¶</sup>		
	KOR	CHN	KOR	CHN		KOR	CHN	Total
GB-LCM-004	0.28	0.36	0.25	0.31	4	1 (254)	1 (258)	2
GB-LCM-022	0.21	0.31	0.20	0.27	7	4 (103, 117, 157, 245)	1 (137)	5
GB-LCM-025	0.51	0.60	0.38	0.50	3		1 (267)	1
GB-LCM-075	0.56	0.65	0.50	0.59	10	3 (144, 196, 202)	4 (172, 186, 188, 206)	7
GB-LCM-087	0.00	0.56	0.00	0.51	6		5 (117, 126, 219, 222, 240)	5
GB-LCM-104	0.34	0.52	0.29	0.44	4		1 (346)	1
GB-LCM-119	0.51	0.53	0.38	0.41	3		1 (276)	1
GB-LCM-166	0.54	0.58	0.43	0.45	4	1 (225)	1 (231)	2
GB-LCM-167	0.79	0.88	0.74	0.83	13	3 (197, 207, 215)	6 (189, 199, 201, 209, 223, 227)	9
GB-LCM-217	0.60	0.61	0.54	0.51	7	2 (197, 233)	2 (127, 225)	4
Mean	0.434	0.561	0.370	0.483	6.1	1.4	2.3	3.7

<sup>†</sup>: Expected heterozygosity  
<sup>‡</sup>: Polymorphic information content  
<sup>§</sup>: Number of allele  
<sup>¶</sup>: Number of specific allele



**Fig. 1.** Diagrammatic display of cultivar discrimination by phylogenetic trees using 41 boxthorn cultivars at each stage by five SSR markers.

균 allele 수는 6.1개 였다. Allele의 변이는 GB-LCM-025에서 9bp로 가장 좁았으며, GB-LCM-022가 124bp로 가장 넓은 변이를 나타냈다.  $M_{AF}$  범위는 GB-LCM-167에서 0.28로 가장 낮았으며, GB-LCM-087에서 0.87로 가장 높게 나타났으며, 평균은 0.630이었다. 분석에 사용한 마커에 대한 유전적

다양성을 나타내는 GD와 PIC는 GB-LCM-022와 GB-LCM-087 마커에서 두 값 모두 가장 낮았으며 (0.25, 0.24), GB-LCM-167에서 가장 높게 나타났다 (0.83, 0.81). 평균은 각각 0.482와 0.428이었다 (Table 3). Park *et al.* (2000)이 11개 RAPD 마커를 이용한 구기자 품종의 유전적 유사도 분석 결

한국산과 중국산 구기자의 품종판별

과와 Park *et al.* (1996)이 구기자 품종의 분류, 동정을 위하여 RAPD 마커를 이용한 결과 및 Lee *et al.* (2007)이 ISSR 마커를 이용하여 구기자 품종의 유전적 유사도에 대한 결과와 비교 하였을 때에도 본 연구에 활용한 SSR 마커가 더 높은 다양성을 보이는 것으로 나타났다. 기존의 연구에서 SSR 마

커가 다른 마커에 비해 보다 효율적으로 자원의 변이를 탐색할 수 있다고 보고되었음을 고려하였을 때 (Ji *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2000; Olufowote *et al.*, 1997), 구기자 품종에 대한 변이 분석에 SSR 마커가 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

**Table 5.** Genotype information of 41 boxthorn cultivars by five SSR markers.

No	Origin	1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	3 <sup>rd</sup> stage	4 <sup>th</sup> stage	5 <sup>th</sup> stage
		GB-LCM-167	GB-LCM-217	GB-LCM-104	GB-LCM-075	GB-LCM-022
1	CHN	<b>209/227<sup>†</sup></b>	191	337	192	202
2	CHN	195/221	191	<b>337<sup>†</sup></b>	192	202
3	CHN	203	<b>127/191<sup>†</sup></b>	289/337	228	202
4	CHN	203	<b>191/191<sup>†</sup></b>	346	172/228	–
5	CHN	195/213	<b>199<sup>†</sup></b>	289/337	192	–
6	CHN	<b>195/203<sup>†</sup></b>	199	337	182/192	202
7	CHN	<b>213/223<sup>†</sup></b>	191	337	188/192	147
8	CHN	195/221	<b>191/199<sup>†</sup></b>	337	182/192	202
9	CHN	195/221	<b>199<sup>†</sup></b>	337	186/192	202
10	CHN	213/221	191/199	289/337	<b>192<sup>†</sup></b>	202
11	CHN	<b>203/213<sup>†</sup></b>	199	289/337	–	202
12	CHN	<b>201/213<sup>†</sup></b>	191/199	289/337	182/192	202
13	CHN	<b>201<sup>†</sup></b>	191/195	289/337	182/192	202
14	CHN	<b>189/199<sup>†</sup></b>	199	310/337	182/192	137/202
15	CHN	<b>199/213<sup>†</sup></b>	–	289/337	182/192	202
16	CHN	195/213	<b>191/225<sup>†</sup></b>	289/337	192/206	147
17	KOR	<b>203/215<sup>†</sup></b>	195/199	289/337	144/192	202
18	KOR	195/213	191	337	192	<b>147/202<sup>†</sup></b>
19	KOR	207/221	<b>199<sup>†</sup></b>	289/337	192	202
20	KOR	213/221	191/199	289/337	<b>182/192<sup>†</sup></b>	202
21	KOR	195/221	191	289/337	<b>182/192<sup>†</sup></b>	202
22	KOR	213/221	191	<b>289/337<sup>†</sup></b>	192/196	157/202
23	KOR	195/213	191	337	–	<b>103/202<sup>†</sup></b>
24	KOR	207/221	<b>191/191<sup>†</sup></b>	337	192	202
25	KOR	195/213	191	337	192	<b>202<sup>†</sup></b>
26	KOR	195/221	191	289/337	<b>192/228<sup>†</sup></b>	202
27	KOR	213/221	–	<b>337<sup>†</sup></b>	182/192	202
28	KOR	<b>213<sup>†</sup></b>	191/233	337	182/192	202
29	KOR	195/207	199	337	<b>182/192<sup>†</sup></b>	202
30	KOR	195/207	191	337	192	<b>117/202<sup>†</sup></b>
31	KOR	195/213	191	<b>289/337<sup>†</sup></b>	192/228	202
32	KOR	<b>195/215<sup>†</sup></b>	191/233	289/337	192/228	202
33	KOR	<b>197/215<sup>†</sup></b>	191	–	192	–
34	KOR	195/207	<b>191/197<sup>†</sup></b>	289/337	202/228	202
35	KOR	195/207	<b>191/199<sup>†</sup></b>	310/337	–	202
36	KOR	195/207	199	337	<b>182<sup>†</sup></b>	202
37	KOR	195/207	195/199	337	<b>192<sup>†</sup></b>	–
38	KOR	195/207	<b>191/195<sup>†</sup></b>	337	192	202
39	KOR	195/207	191	337	–	<b>202<sup>†</sup></b>
40	KOR	195/207	195/199	337	<b>182/192<sup>†</sup></b>	202
41	KOR	195/207	<b>195<sup>†</sup></b>	337	182/192	202/245

<sup>†</sup>: Allele size of boxthorn cultivars which were discriminated by 5 SSR markers

원산지에 따른 한국산과 중국산 구기자에 대한 유전적 다양성을 분석한 결과는 다음과 같다. 한국 구기자 집단의 평균 expected heterozygosity ( $H_E$ )와 PIC 값은 각각 0.434와 0.370로 중국 집단의 평균  $H_E$  (0.561)와 PIC (0.483) 값보다 낮게 나타났다 (Table 4). 한국 집단에서 GB-LCM-087 마커의  $H_E$ 와 PIC 값 모두 0으로 나타났으며, 이는 한국 자원들이 가지고 있는 allele의 크기가 213 bp로 모두 같았기 때문이다.

집단 내에 존재하는 특이적 allele는 본 연구에 사용된 10개의 모든 마커에서 관찰되었다. 한국과 중국집단 내에 존재하는 특이적 allele 수는 1개 (GB-LCM-025, GB-LCM-104, GB-LCM-119)에서 9개 (GB-LCM-167)로 다양하게 나타났다 (Table 4). 한국 집단에 존재하는 특이적 allele 수는 총 14개였으며 평균 1.4개로 나타났다. GB-LCM-022 마커에서 4개로 가장 많았으며, GB-LCM-004와 GB-LCM-116 마커에서 각각 1개로 가장 적었다. 중국 집단의 경우 특이적 allele 수의 평균은 2.3개였으며 GB-LCM-167 마커에서 가장 많은 6개의 allele가 관찰되었다. GB-LCM-087 마커의 경우 총 6개의 allele 중 5개 (83%)의 allele가 중국 자원에만 존재하는 특이적 allele이었으며, GB-LCM-025, GB-LCM-104, GB-LCM-119 마커의 경우 1개의 특이적 allele가 중국자원에만 존재하였다 (Table 4). 집단 내에 존재하는 이러한 특이적 allele들은 향후 한국 및 중국 원산지에 따른 품종 구분에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

SSR 마커를 이용하여 한국산 및 중국산 구기자의 판별을 위하여 10개의 마커 중 allele 수, 특이적 allele 수, gene diversity 및 PIC 값이 가장 높은 GB-LCM-167 마커를 이용하여 phylogenetic tree를 작성 후 분석을 하였다 (Fig. 1). 총 5단계로 분석을 수행하였으며 단계별로 GB-LCM-217, GB-LCM-104, GB-LCM-075, GB-LCM-022 마커 순으로 추가하여 단계별 tree를 작성하여 분석하였다 (Fig. 1).

GB-LCM-167 마커를 이용하여 1단계 판별을 수행한 결과 총 41점의 구기자 자원 중 12점 (한국 4점, 중국 8점)이 판

별되었다. 판별이 되지 않은 29점은 자원들이 가지고 있는 유전자형에 따라 6개 그룹을 형성하였다 (Fig. 1). 2단계에 GB-LCM-217 마커를 추가하여 분석한 결과 1단계에서 판별되지 않았던 29점 중에서 12점 (한국 6점, 중국 6점)이 되었다. GB-LCM-104 마커를 이용한 3단계에서는 4점 (한국 3점, 중국 1점), 4단계 (GB-LCM-075)에서는 8점 (한국 7점, 중국 1점)이 판별되었다. 5단계 (GB-LCM-022)에서는 5점의 한국 자원이 판별되었다. 1단계에서 5단계까지 판별과정에서 41점의 구기자를 모두 판별할 수 있었으며, 본 연구에 사용한 구기자의 원산지에 따른 품종 판별은 4단계까지의 마커 조합 (GB-LCM-167, GB-LCM-217, GB-LCM-104, GB-LCM-075)으로도 판별이 가능하였다 (Fig. 1, Table 5, Table 6).

최근에 작물의 품종 판별을 위하여 DNA 마커가 활용되고 있는데, Wang *et al.* (1989)은 10개 RFLP 마커를 이용하여 58개 벼 품종을 판별하였으며, Kwon *et al.* (2003)은 무와 배추의 품종 판별을 위하여 각각 22개와 17개 AFLP primer 조합을 품종 판별에 활용하였다. SSR 마커를 이용한 품종 판별에서 Kim *et al.* (2006)은 5개 SSR 마커를 이용하여 91개 콩 육성종 중에서 82개 품종을 구분하였으며, Sun *et al.* (2009)은 7개 SSR 마커 조합을 이용하여 63개 벼 품종에 대하여 판별이 가능하다고 보고하였다. 기존의 구기자에 대한 품종 구분은 9개 RAPD 마커로 국내 재래종 구기자와 외국 도입 구기자의 분류에 대한 연구가 보고되었다 (Park *et al.*, 1996).

결론적으로 5개 SSR 마커를 이용하여 국내산 구기자와 중국에서 도입한 구기자에 대한 품종 판별이 가능하였으며, 본 연구에 사용된 5개 SSR 마커는 구기자 원산지에 따른 품종 판별, 순도 검정, 품종 보호와 종자 관리 체계 확립을 위한 품종의 구별성 (Distinctness), 균일성 (Uniformity) 및 안정성 (Stability) 검정에 활용될 수 있을 것이다. 또한 수입 개방화 시대에 우리나라 육성 품종에 대한 지적 재산권 확보 및 향후 구기자 품종 등록 시 품종 보증의 표지인자로 활용될 수 있을 것이다.

**Table 6.** Sequential cultivar discrimination using five SSR markers.

Stage	Marker combination	Number of cultivars	Code
1	GB-LCM-167	12	1-CHN, 6-CHN, 7-CHN, 11-CHN, 12-CHN, 13-CHN, 14-CHN, 15-CHN, 17-KOR, 28-KOR, 32-KOR, 33-KOR
2	GB-LCM-167, GB-LCM-217	12	3-CHN, 4-CHN, 5-CHN, 8-CHN, 9-CHN, 16-CHN, 19-KOR, 24-KOR, 34-KOR, 35-KOR, 38-KOR, 41-KOR
3	GB-LCM-167, GB-LCM-217, GB-LCM-104	4	2-CHN, 22-KOR, 27-KOR, 31-KOR
4	GB-LCM-167, GB-LCM-217, GB-LCM-104, GB-LCM-075	8	10-CHN, 20-KOR, 21-KOR, 26-KOR, 29-KOR, 36-KOR, 37-KOR, 40-KOR
5	GB-LCM-167, GB-LCM-217, GB-LCM-104, GB-LCM-075, GB-LCM-022	5	18-KOR, 23-KOR, 25-KOR, 30-KOR, 39-KOR

감사의 글

본 연구는 농진청 어젠다 사업(과제번호 200901OFT 072045008)의 연구비지원을 받아 수행되었다.

LITERATURE CITED

**Bernet GP, Bramardi S, Calvache D, Carbonell EA and Asins MJ.** (2003). Applicability of molecular markers in the context of the protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding*. 122:146-152.

**Choi JS, Huh MK and Sung JS.** (2009). Seed purity test and evaluation in *Isatis tinctoria* var. *yezoensis* (Ohwi) Ohwi using AFLP markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:198-203.

**Jang SJ, Park SJ, Park KH, Song HL, Cho YG, Jong SK, Kong JH and Kim HS.** (2009). Genetic diversity and identification of Korean elite soybean cultivars including certified cultivars based on SSR markers. *Korean Journal of Crop Science*. 54:231-240.

**Ji HS, Koh HJ, Park SU and McCouch SR.** (1998). Varietal identification in japonica rice using microsatellite DNA markers. *Korean Journal of Breeding Science*. 30:350-360.

**Kim SH, Chung JW, Moon JK, Woo SH, Cho YG, Jong SK and Kim HS.** (2006). Discrimination of Korean soybean cultivars by SSR markers. *Korean Journal of Crop Science*. 51:658-668.

**Komori T and Nitta N.** (2004). A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. *Plant Breeding*. 123:549-553.

**Kwon SJ, Ahn SN, Suh JP, Hong HC, Kim YK, Hwang HG, Moon HP and Choi HC.** (2000). Genetic diversity of Korean native rice varieties. *Korean Journal of Breeding Science*. 32:186-193.

**Kwon YS, Moon JY, Kwon YS, Park DY, Yoon WM, Song IS and Yi SI.** (2003). AFLP analysis for cultivar discrimination in radish and chinese cabbage. *Korean Journal of Breeding Science*. 35:319-328.

**Kwon YS, Lee JM, Yi GB, Yi SI, Kim KM, Soh EH, Bae KM, Park EK, Song IH and Kim BD.** (2005). Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Molecules and Cells*. 19:428-435.

**Kwon SJ, Lee GA, Lee SY, Park YJ, Gwang JG, Kim TS and Ma KH.** (2009). Isolation and characterization of 21 microsatellite loci in *Lycium chinense* and cross-amplification in *Lycium barbarum*. *Conservation Genetics*. DOI 10.1007/s10592-008-9792-x.

**Lee WS, Choi SY, Yi SI, Cho HI, Lee SY and Kwon YS.** (2007). Assessment of genetic relationship among boxthorn (*Lycium chinensis* Mill.) accessions by ISSR markers. *Korean Journal of Breeding Science*. 39:9-14.

**Ni J, Colowit MP and Mackill DJ.** (2002). Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Science*. 42:601-607.

**Noil E, Teriaca MS, Sanguinetti MC and Conti S.** (2008). Utilization of SSR and AFLP markers for the assessment of distinctness in durum wheat. *Molecular Breeding*. 22:301-313.

**Olufowote JO, Xu Y, Chen X, Park WD, Beachell HM, Dilday RH, Goto M and McCouch SR.** (1997). Comparative evaluation of within cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP makers. *Genome*. 40:370-378.

**Park YS, Kim H, Lee BC, Sung CK and Lim YP.** (1996). Identification and classification of *Lycium chinense* Mill. cultivars by RAPD analysis. *Korean Journal of Breeding Science*. 28:221-226.

**Park JS, Lee BC, Seong CG, Lee KW, Ra SW and Choi KJ.** (2000). Genetic similarity of boxthorn varieties (*Lycium chinense* Mill.) based on RAPD analysis. *Korean Journal of Breeding Science*. 32:117-121.

**Schuelke M.** (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR products. *Nature Biotechnology*. 18:233-234.

**Sun MM, Choi KJ, Kim HS, Song BH, Woo SH, Lee CW, Jong SK and Cho YG.** (2009). Genetic diversity and discrimination of recently distributed Korean cultivars by SSR markers. *Korean Journal of Breeding Science*. 41:115-125.

**Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cooke RJ, Donini P, Lee D, Law JR, Lowe C, Moule C, Trick M and Edwards KJ.** (2003). The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 106:1091-1101.

**Wang ZY and Tansley SD.** (1989). Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. *Genome*. 32:1113-1118.