

국내 감자 품종 판별을 위한 다중 초위성체 마커 세트 개발

조광수^{1*} · 원홍식¹ · 정희진^{1,2} · 조지홍¹ · 박영은¹ · 홍수영¹

¹농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터, ²강원대학교 생명과학과

Development of Multiplex Microsatellite Marker Set for Identification of Korean Potato Cultivars

Kwang-Soo Cho^{1*}, Hong-Sik Won¹, Hee-Jin Jeong^{1,2}, Ji-Hong Cho¹, Young-Eun Park¹, and Su-Young Hong¹

¹Highland Agriculture Research Center, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Pyeongchang 232-955, Korea

²Department of Biological Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract. To analyze the genetic relationships among Korean potato cultivars and to develop cultivar identification method using DNA markers, we carried out genotyping using simple sequence repeats (SSR) analysis and developed multiplex-SSR set. Initially, we designed 92 SSR primer combinations reported previously and applied them to twenty four Korean potato cultivars. Among the 92 SSR markers, we selected 14 SSR markers based on polymorphism information contents (PIC) values. PIC values of the selected 14 markers ranged from 0.48 to 0.89 with an average of 0.76. PIC value of PSSR-29 was the lowest with 0.48 and PSSR-191 was the highest with 0.89. UPGMA clustering analysis based on genetic distances using 14 SSR markers classified 21 potato cultivars into 2 clusters. Cluster I and II included 16 and 5 cultivars, respectively. And 3 cultivars were not classified into major cluster group I and II. These 14 SSR markers generated a total of 121 alleles and the average number of alleles per SSR marker was 10.8 with a range from 3 to 34. Among the selected markers, we combined three SSR markers, PSSR-17, PSSR-24 and PSSR-24, as a multiplex-SSR set. This multiplex-SSR set used in the study can distinguish all the cultivars with one time PCR and PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) analysis and PIC value of multiplex-SSR set was 0.95.

Additional key words: cluster analysis, polymorphism information contents (PIC), *Solanum tuberosum*, simple sequence repeat (SSR)

서 언

작물의 육종에 이용되는 품종이나 유전자원의 유전적 다양성과 그들간의 유연관계 분석은 유전 변이의 확대와 품종 육성 효율성 증대에 매우 효과적으로 이용될 수 있다(Li and Nelson, 2001). 과거에는 형태적 및 생화학적 특성에 의하여 유전적 다양성을 평가하여 왔으나 이러한 평가방법은 유전적 특성이 가까운 근연종간에는 사용이 매우 제한적이며, 대상형질이 환경의 영향을 받기 때문에 다양성의 평가가 어려운 실정이다(Chen and Nelson, 2004). DNA 표지인자는 형태적 특성에 관계없이 보다 쉽고 정확하게 유전적 특성 평가가 가능하다고 알려져 있으며(Hosaka et al., 1994) 이들의

종류에는 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 이외에도 RAPD(randomly amplified polymorphism DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism), SNP(single nucleotide polymorphism), 및 SSR(simple sequence repeat) 등 다양한 DNA 표지인자가 개발되어 유전적 다양성의 평가, 유전자원의 도입과 선발, 계통선발 및 품종구별 등 육종에 많이 이용되고 있다(Bernet et al., 2003; Cho et al., 2010). DNA 표지인자 중 microsatellite라고도 불리는 SSR(simple sequence repeat)은 식물체 genome상에 존재하는 단순반복 염기서열의 반복횟수의 차이로 인해 다형성(polymorphism)이 나타나며, 기존에 개발된 DNA 표지인자보다 다형성 정도가 아주 높아서 유전적 다양성과 유연관계를 평가하는데 많이 이용되고 있다(Coburn et al., 2002; Jang et al., 2009; Park et al., 2009; Pinto et al., 2006). 감자의 SSR 표지인자

*Corresponding author: kscholove@korea.kr

※ Received 5 March 2011; Accepted 20 June 2011.

에 대한 연구는 SSR 표지인자 개발(Ashkenazi et al., 2001; Milbourne et al., 1998; Provan et al., 1996), 유전자 지도 작성(Feingold et al., 2005; Yamanaka et al., 2005), 유전자원 평가(Del Rio et al., 2006; Ghislain et al., 2006) 및 품종구분 등에 활용되어 왔다(Braun et al., 2004; Fu et al., 2009; Moisan-Thiery et al., 2005). 그러나 국내 감자 품종 구분을 위한 SSR 표지인자는 연구가 미비한 실정이다(Yi et al., 2010). 따라서 본 연구는 국내에 등록된 감자 품종들 중에서 농촌진흥청 고령지농업연구센터에서 육성된 품종을 중심으로 전국적으로 많이 재배되고 있는 수미, 남작, 대지 등을 포함한 24개 품종에 대해 SSR 표지인자를 이용하여 품종간 유연관계를 분석하고 품종구분의 활용성을 검토하고자 수행되었다.

재료 및 방법

시험재료 및 DNA추출

시험재료는 농촌진흥청 고령지농업연구센터에서 육성 또는 도입한 장려 품종과 (주)오리온에서 육성한 ‘두백’, 제주도농업기술원에서 육성한 ‘제서’ 등 24품종을 이용하였다(Table 1). 감자의 장려 품종은 농촌진흥청 고령지농업연구센터 양액온실에서 기본식물 생산용으로 재배되고 있던 씨감자 물에 씻어 껍질을 벗긴 후 130 × 90mm의 크기로 절단 하여 동결건조기(KR/FDA5518, IIShin Co., Korea)에서 1주일간 동결 건조시켜 막자 사발에서 분쇄하였다. ‘두백’과 ‘제서’ 품종은 각각 (주)오리온과 제주도농업기술원에서 씨감자를 공급받아 이용하였다. DNA추출은 DNeasy Plant Mini Kit(Quiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하였으며 분광광도계(ND-1000, NanoDrop Tech., USA)로 정량 후 20ng·μL⁻¹로 희석하여 PCR 반응에 사용하였다.

SSR 분석

감자 품종의 유전적 유연관계 및 품종식별에 적합한 SSR 마커를 선별하기 위하여 Ghislain et al.(2009)이 보고한 51개와 미시건 주립대학교에서 운영중인 가지과 작물 유전정보(<http://www.solanaceae.plantbiology.msu.edu>)로부터 41개의 SSR 마커 정보를 확인하여 모두 92개를 디자인하여 이용하였다. PCR 반응 용액은 PCR PreMix(Bioneer Co., Korea, 1U Top DNA polymerase, 250uM dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 30mM KCl, 1.5mM MgCl₂)에 20ng·μL⁻¹ 농도의 genomic DNA 2μL, 10pmol 농도의 0.5μL primer와 멸균수 17μL를 혼합하여 20μL에 맞추어 이용하였다. PCR 반응은 Verti® 96-Well Thermal Cycler(AppliedBiosystem, CA, USA)를 사용하였다. PCR 반응 조건은 가지과 작물 유전정보에서 제작한 마커는 touchdown PCR을 이용하였다. 95°C에서 4분간 pre-denaturation을 실시한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 65°C로 30초간 annealing하여 매 회 cycle마다 1°C씩 감한 뒤 72°C에서 30초간 extension의 과정을 25회 반복하고, 다시 95°C에서 30초 간의 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension의 과정을 30회 반복하고, 7분 동안 최종 extension을 수행하였다. 또한 Ghislain 등이 보고한 마커의 PCR조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, SSR 마커의 Tm값에 따라 50°C-60°C로 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension의 과정을 33회 반복하였고, 4분 동안 최종 extension을 수행하였다. 증폭된 DNA는 6% polyacrylamide sequencing gel 상에서 전기 영동 후 silver staining(Bioneer, Silverstar staining systemTM, Korea) 방법으로 염색하여 밴드 패턴을 관찰하였다. SSR 표지인자의 다양성 분석은 PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) gel에 전기영동한 후

Table 1. List of Korean potato cultivars used for SSR fingerprinting and their origin.

No.	Cultivar	Origin	No.	Cultivar	Origin
1	Jowon	AG54071 X Katahdin	13	Dejima	Hokkai31 X Unzen
2	Seohong	Jashim X 93K61-5	14	Superior	USDA96-56 X Minn 59-44
3	Hongyoung	Atlantic X AG34314	15	Chugang	H83005-2 X Superior
4	Atlantic	Wauseon X Lenape	16	Irish Cobbler	Mutant of Early Rose
5	Chubaek	H83011-3 X Superior	17	Dubaek	Mutant of Trent
6	Haryeong	Atlantic X Superior	18	Gawon	Namsuh X Konahubuki
7	Jaseo	Daegwan48 X B6603-6	19	Gahwang	Atlantic X AG54071
8	Jashim	Daegwan48 X B6603-6	20	Namsuh	78E28-1 X Wheeler
9	Jopung	Resy X Superior	21	Shepody	Bake King X F58050
10	Goun	Chubaek X Remhi russet	22	Jaesuh	BC1K193 X Dejima
11	Jayoung	Atlantic X AG34314	23	Chudong	H83520 X Superior
12	Sinnamjak	Irish Cobbler X Katahdin	24	Chuyoung	Dejima X HRB-31

band가 있는 것을 “1” 없는 것을 “0”으로 하여 data matrix를 작성하였으며 유전적 유사도는 NTSYS-pc computer program을 이용하여 Dice 방법에 준하여 유전적 유사도 값을 산출하였고, 이 값을 근거로 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic average)를 이용한 SHAN clustering 방법으로 집괴분석하여 dendrogram을 작성하였다. PIC(polymorphism information content) 및 heterozygosity는 PIC calculator Extra (Anderson et al., 1993, <http://www.genomics.liv.ac.kr>) 프로그램을 사용하여 계산하였다.

Multiplex PCR

SSR 분석에서 선발된 3개의 마커(PSSR-17, PSSR-24, PSSR-29)의 forward 및 reverse 프라이머를 각각 0.5μL(10pMole)씩 PCR PreMix(Bioneer Co., Korea)에 첨가 한 후 template DNA를 2μL(20ng;μL⁻¹) 첨가하여 총 반응용액이 20μL가 되도록 멸균수를 첨가하였다. PCR 반응용액은 SSR 분석에서

사용된 touchdown PCR 및 PAGE 분석과 같은 방법으로 수행하였다.

결 과

SSR 분석

국내에서 개발되어 보급되고 있는 감자의 품종간 유연관계 분석 및 품종판별에 적합한 SSR 마커를 선발하기 위해 92개의 SSR 마커를 디자인 후 분석한 결과 증폭된 밴드 패턴이 뚜렷하고 재현성이 높은 14개의 마커를 선발하였다 (Table 2). 이들 14개의 마커 중 3개는 가지과 유전정보 (<http://www.solanaceae.plantbiology.msu.edu>)로부터, 11개는 potato genetic identity kit(PGI kit, Ghislain et al., 2009)로부터 유래되었다. 선발된 PGI kit 유래 마커에 대한 유전자 지도상의 위치를 확인한 결과, 4개의 연관그룹을 제외한 8개의 연관그룹에 분포되어 있음을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. SSR markers used for fingerprinting of Korean potato cultivars and the description of their respective name, sequence, number of alleles, annealing temperature (Tm), heterozygosity (He), polymorphism information contents (PIC) and their map location (LG, linkage group).

No.	Name	Primer sequence(5' - 3')	Repeat motif	No. of Alleles	Tm (°C)	He	PIC	LG
1	PSSR-17-F PSSR-17-R	GCACCTAAACCAGCACCAAT GGGCCCTTAACCGTATGAAT	(CACAA) ₅	13	58	0.85	0.84	^{-z}
2	PSSR-24-F PSSR-24-R	TCCCAATCTCCACAACAACA ATCCACCAAGACCTCCAGAA	(AAC) ₆	10	58	0.81	0.79	-
3	PSSR-29-F PSSR-29-R	CTTTCAATTGGGTTGCCATT TTTGTGTTTTGCATTTGCC	(GGT) ₅	4	58	0.53	0.48	-
4	PSSR-178-F PSSR-178-R	CAGCCAACATTTGTACCCCT ACCCCCACTTGCCATATTTT	(CT) _n	8	60	0.82	0.79	11
5	PSSR-183-F PSSR-183-R	AGCTGCTCAGCATCAAGAGA ACCACCTCAGGCACTTCATC	(AGA) _n	10	55	0.87	0.86	1
6	PSSR-186-F PSSR-186-R	TGGAATCCGAATTACGCTCT AGGTTTTACTACTCGGGCTT	(AAAC) _n	8	55	0.78	0.75	10
7	PSSR-190-F PSSR-190-R	CAGCAAAATCAGAACCCGAT GGATCATCAAATTCACCGCT	(AAT) _n	5	60	0.77	0.74	4
8	PSSR-191-F PSSR-191-R	ACCATCCACCATGTCAATGC CTCATGGATGGTGTCTATTGG	(ACC) _n	15	60	0.90	0.89	8
9	PSSR-193-F PSSR-193-R	GAAGCGACTTCCAAAATCAGA AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA	(ATT) _n	9	55	0.85	0.83	4
10	PSSR-207-F PSSR-207-R	CATACGCACGCACGTACAC TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG	^{-z}	10	55	0.86	0.84	7
11	PSSR-208-F PSSR-208-R	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC ATTTGGTTGGGTATGATA	-	9	50	0.83	0.81	11
12	PSSR-214-F PSSR-214-R	TCTCCCCATCTTAATGTTTC CAACACAGCATACAGATCATC	(TA) _n (ATC) _n	4	55	0.69	0.63	3
13	PSSR-216-F PSSR-216-R	GTTCTTTTTGGTGGTTTTCTC TTATTTCTCTGTTGTTGCTG	(TA) _n (TG) _n GT(TG) _n	13	55	0.88	0.87	2
14	PSSR-222-F PSSR-222-R	AATGGCTCTCTGTATGCT GCTGTCCCAACTATCTTTGA	(ACC) _n	3	60	0.61	0.53	2
Average				8.6		0.78	0.76	

^zThe linkage map and repeat motif are not identified.

선발된 14개의 SSR 마커를 24개의 감자 품종에 적용한 결과 모두 121의 대립인자가 확인되었고, 각 마커 별로 최소 3개(PSSR-222)에서 최대 13개(PSSR-17)까지 확인되었으며, 각 마커에 대해 평균 8.6개의 대립인자가 나타나는 것으로 확인되었다. 그리고, 각 마커의 다양성 정도를 나타내어 주는 PIC(polymorphism information content)값은 0.48-0.89의 범위로 나타났는데 PSSR-29가 가장 작았고 PSSR-191이 가장 높았으며 평균 0.76으로 나타나 국내 감자 품종을 구분하기 위한 다양성 정보가 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Yi et al.(2010)이 보고한 국내 감자품종 30개에 대한 SSR분석의 평균 PIC값(0.82)과 비슷한 경향이었으며, Feingold et al.(2005)이 보고한 납미, 북미, 유럽에서 수집된 30개의 품종을 61개의 SSR 마커를 이용하여 분석 결과 평균 6.8개의 대립유전자가 나타났고 평균 PIC값도 0.81이라는 결과와도 비슷한 경향이였다. 또한 Fu et al.(2009)은 캐나다 품종 114개와 캐나다로 도입된 품종 55개에 대해서 36개의 SSR 마커를 이용해 분석했을 때 평균 6.4개의 대립인자가 나타났으며, PIC값은 평균 0.35로 나타냄을 보고한 바 있어 본 시험에서 선발된 SSR 마커는 국내 감자 품종에 대한 다양성을 평가하기에 적합한 것으로 판단되었다. 이형접합성(Heterozygosity)은 PSSR-29 마커가 0.53으로 가장 적었으며 PSSR-191 마커가 0.9로 가장 큰 값을 나타내었으며 14

개 마커의 평균은 0.79였다.

품종간 유연관계 분석

선발된 14개의 SSR 마커를 이용하여 생성된 121개의 대립인자를 기반으로 24개 품종에 대한 유전적 유연관계를 조사하여 dendrogram을 작성한 결과는 그림 1과 같다. 국내 개발 품종은 전체 유사도 지수 0.62에서 0.88의 범위(Fig. 1)로 나타났으며 유사도 지수 0.69에서 크게 2개의 그룹으로 나눌 수 있었다. 제 1그룹(I)은 ‘조원’을 포함한 16개 품종이며, 제2그룹(II)은 ‘추강’을 포함한 5개 품종이었다. 또한 두백, 제서 및 가황 품종은 1과 2그룹에 속하지 않아 유전적으로 거리가 먼 것으로 나타났다. 두백은 가공회사에서 이용하는 품종으로 미국의 Trent 품종의 아조변이로 알려져 있으며 제서는 야생종과의 원형질체 융합의 후대(BC1K193)를 모친으로 이용한 품종으로 고령지농업연구소에서 육성된 품종들과 확연히 구분되어짐을 알 수 있었다. 제1그룹은 4개 그룹으로 구분되었으며, 첫 번째 그룹(I a)은 ‘조원’, ‘서홍’, ‘하령’, ‘조풍’ 이 속하였고, 두 번째 그룹(I b)은 ‘홍영’, ‘자서’, ‘자심’, ‘자영’ 이 속하였으며, 세 번째 그룹(I c)은 ‘추백’, ‘신남작’, ‘대지’, ‘남작’, 네 번째 그룹(I d)은 ‘대서’, ‘고운’, ‘수미’, ‘세풍’ 이 속하였다. 제 1그룹의 세 번째 소그룹은 휴면기간이 짧고 조숙성인 특성을 나타내고 있으며 네 번째

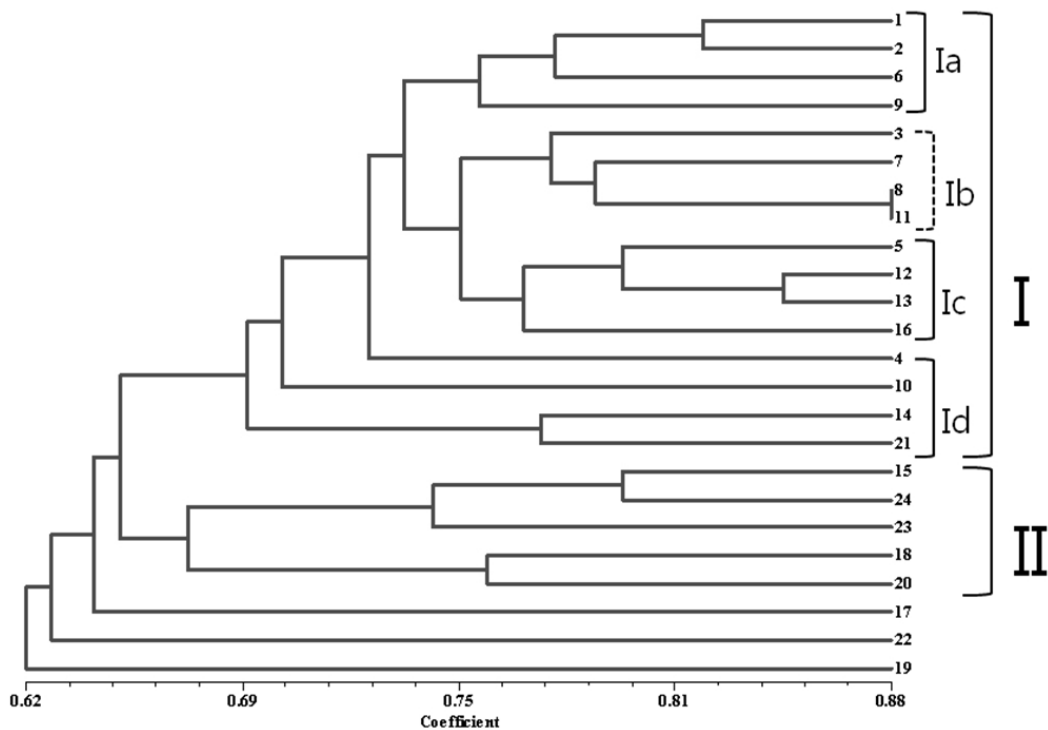


Fig. 1. A UPGMA dendrogram based on genetic distance by 14 SSR markers in 24 Korean potato cultivars. The Roman numerals besides the vertical bars indicate the cluster number and the Arabic numbers indicate cultivars shown in Table 1. The dotted line indicates colored skin or flesh potato.

ATGGGACGTTACCTTGTGTGAAAAAGCACATACAAATAAAGGAGCATGGACTAAAGAAGAAGACC
M
AACGCCTCATCAATTATATACGTGCTCATGGTGAAGGTTGTTGGCGTTCCTCTCCCTAAAGCTGCAGG
ATTGTCAAGATGTGGAAAGAGTTGCAGATTGAGATGGATAAATTATTTAAGGCCTGATCTCAAAAAGA
GGGAATTTTACTGAAGAAGAAGATGAATTGATAATCAAAC TTCATAGTTTGCTTGGAAACAAATGGT
CAGTTATAGCTGGAAGATTACCTGGAAGAACTGATAACGAAATCAAGAACTATTGGAATACACATAT
TAAACGAAAACCTCATCAGTCGTGGCATTGATCCTCAAAC TCACCGTCCACTCAACACCACCGCCACT
AACTCCCACACCACCACCATCACCACCGCAGTCAAAACCACCACCACCACCACCACCAAAAACATCA
ACATGGATTTACAAAACAACGTTGACCAAAAACAACCCACTATTATGATTGCCACGTCATCGTCATA
TGATGAAACAAAATGCCACAGTGGTACTACTGAGGAAACAAGCCACTAGAAAT TATTATTCGGAAA
ATACCCCTCACAAGTTATGATAAATCTTGAAC***CTTTCAATTGGGTTGCCATT***ACATAGTCATCATATTT
CATCACCAGAGTCAACGGCCTCATAACAAC TCTTGACCACCGCAGCACCGCCGCCAACCGGGCCGTT
ACCTGCGGCGGAGACGGTGGCGAAAACGGTTTGT TGTGTTGGCAAATTGGATATCAAG***GGTGGT***
GGTGGTCAGTGGTGT***GGCAAATGCAAAAACA***CAAAATGGAATTTACAGATATTGCT***GA***
*

Fig. 2. The SSR structure of PUT_157a_Solanum_tuberosum_12457 from EST assemblies annotated as Myb-like transcription factor in potato. The bold and under line characters are designated as SSR motif (GGT)₅. The primer sequences used in this study were shown in italic characters. The start and stop codon were represented as M and *, respectively.

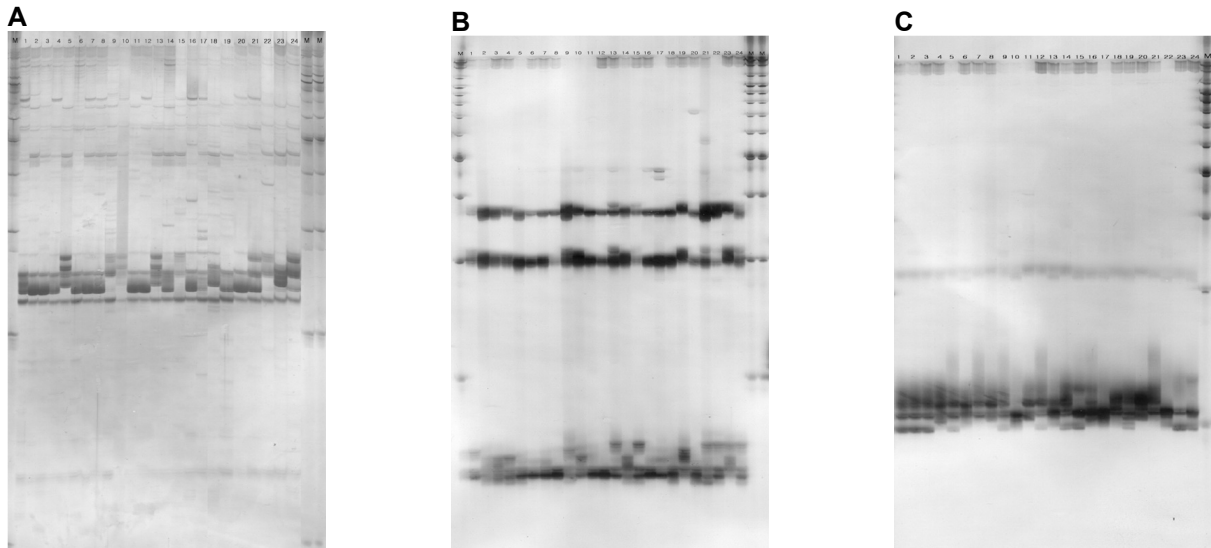


Fig. 3. Polymorphisms revealed by SSR markers PSSR17 (A), PSSR24 (B), and PSSR29 (C) in 24 Korean potato cultivars. Lane 1-24 corresponded to the Korean potato cultivars in Table 1. M, 100bp DNA ladder (Bioneer Co., Korea).

소그룹은 국내 주요 가공용 품종이 같은 그룹으로 분류되었다. 제 1그룹의 두 번째 소그룹 (I b)에 속한 4개의 품종은 표피 혹은 껍질에 자주 색 혹은 붉은 색이 나타나는 컬러 감자로 자주색을 나타내는 자심, 자서, 자영과 붉은색을 나타내는 홍영이 같은 그룹으로 분류되었다. PSSR-29는 감자의 EST assembly 중 PUT-157a-Solanum-tuberosum-12457(Plant GDB)로부터 유래된 SSR 마커로서 3'-terminal 부위에 5개의 glycine을 코딩하는 부위(149bp)를 포함되어 증폭되도록 디자인되었다(Fig. 2). 또한 PUT-157a는 blastp 결과 Myb-like transcription factor 1으로 annotation 되었으며(TIGR Plant Transcript Assemblies TA26259) 최근 myb transcription factor는 안토시아닌 혹은 플라보노이드 생합성 조절에 관여하는 하는 것으로 알려져 있어(Jung et al., 2009) 선발된 SSR을 이용할 경우 안토시아닌 합성관련 연관 마커로서의 가능성이 있을 것으로 판단된다. 이러한 결과는 금후 보다

다양한 농업특성 즉 숙기, 전분함량 등과 같은 주요 농업형질과의 연관분석(association analysis)에 유용한 마커로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

Multiplex SSR 마커 개발

Moisan-Thierry et al.(2005)은 5개의 SSR을 이용하여 286개의 프랑스 감자 품종을 구분할 수 있다고 보고하였으며, Ghislain et al.(2009)은 24개의 SSR을 이용하여 740개의 유전자원 및 품종을 구분할 수 있는 PGI(potato genetic identify) kit를 보고하였으며 본 연구에서는 24개의 PGI kit 중 10개가 선발되었다. 선발된 SSR 마커 중 PSSR-17, PSSR-24, PSSR-29는 밴드가 선명하고 대립인자가 PSSR-17은 200-1600bp, PSSR-24는 100-200, 290-400bp, PSSR-29는 200-300bp 범위에 위치하고 있어서(Fig. 3) 한번의 PAGE 분석을 통하여 multiplexing이 가능 할 것이라고 예상되었다. 따라서 선발

Table 3. The number of alleles, heterozygosity (He) and polymorphism information contents (PIC) value from the three selected markers and their multiplex set.

Primer name	No. of alleles	He	PIC	Allele size range (bp)	Multiplex set ²	No. of alleles	He	PIC
PSSR-17	13	0.8542	0.8386	200-1600	Set	27	0.9557	0.9539
PSSR-24	10	0.8114	0.7869	100-200, 290-400				
PSSR-29	4	0.5259	0.4834	200-300				
Average	9	0.7308	0.7029					

²PSSR-17, PSSR-24, and PSSR-29 primers are mixed in a single PCR reaction and analyzed.

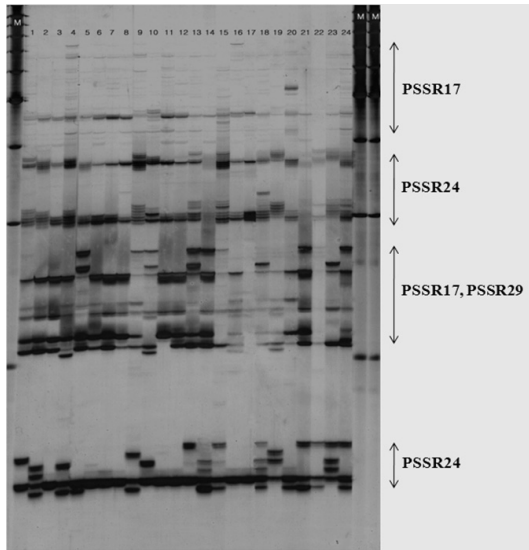


Fig. 4. Polymorphism revealed by a multiplex SSR marker set (PSSR-17, PSSR-24, PSSR-29) in 24 Korean potato cultivars. Lane 1-24 corresponded to the Korean potato cultivars in Table 1. M, 100bp DNA ladder (Bioneer Co., Korea).

된 SSR 마커를 한번의 PCR 반응과 PAGE 분석을 한 결과 27개의 대립유전자와 0.95의 높은 PIC 값을 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 이들 3개의 SSR 마커를 개별로 분석하였을 때는 평균 0.70의 PIC 값을 얻을 수 있었던 반면, multiplexing 결과 PIC 값이 0.95를 나타내어 공식된 24개의 품종을 쉽게 구분이 가능하였다 (Table 3).

고 찰

국내의 감자 신품종 등록은 DUS (distinctness, uniformity, stability) 테스트를 기본으로 하고 있다 (농림수산식품부, 작물별 특성조사요령, 2000). 특히 구별성 (Distinctness)은 UOPV (국제신품종보호연맹)의 특성 별 조사기준을 근거로 농림수산식품부의 자체 조사기준을 추가하여 특성을 조사하도록 규정되어 있으며 대부분의 특성이 괴경, 감자썩 및 식물체 특성 등 외부형태적 특성에 그 기반을 두고 있다 (Cooke, 1999). 이러한 외부 특성은 환경에 영향을 받아 품종구분에

어려움이 있어 보다 빠르고 정확한 품종구분 방법이 시급한 실정이다. 또한 감자의 싹을 틔워 크기, 모양, 털의 유무 등을 조사하여 구별성을 판단하고 있으나 이러한 방법은 감자의 휴면기간을 고려 할 경우 약 3개월 가량이 소요되고 있어 보다 빠른 시간 안에 품종을 확인하는 방법이 필요하다 (Houwing et al., 1986). 따라서 감자의 품종구분을 위하여 다양한 분자표지 인자가 개발 및 이용되고 있으며 그 중 SSR이 가장 많이 활용되고 있다 (Norero et al., 2002; Reid and Kerr, 2007). 본 시험에서는 감자의 괴경으로부터 추출한 DNA와 잎으로부터 추출한 DNA를 비교한 결과 SSR 밴드 패턴에 차이가 없었다 (data not shown). 또한 SSR의 다양성을 확인하기 위해서는 PAGE 분석 (Fu et al., 2009; Yi et al., 2010) 또는 형광 염색 (fluorescent dye)을 활용한 capillary 전기영동 (Ghislain et al., 2009; Reid and Kerr, 2007)을 활용하고 있다. Capillary 분석은 간단하고 대량의 샘플을 한번에 분석할 수 있으나 고가의 기자재가 있어야만 가능한 반면 PAGE 분석은 고가의 기자재가 필요 없으나 silver staining 방법에 많은 시간이 소요된다. 따라서 PAGE를 이용하여 분석 할 경우 가능하면 한번에 품종을 구분할 수 있는 SSR 마커를 개발 후 한번의 PCR과 PAGE 분석이 필요한 실정이다. Yi et al. (2010)은 4개의 SSR 마커를 이용하여야 국내 품종의 구분이 가능 할 것이라고 보고하고 있어 최소한 4번의 PAGE 분석이 필요한 것으로 보고 하였다. 그러나 본 시험에서 선발한 multiplex PCR 및 PAGE 분석의 경우 감자의 괴경으로부터 DNA 추출 및 PAGE 분석이 1일만에 가능하여 금후 국내 품종 구분에 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

초 록

국내 감자 품종들의 품종간 유연관계를 분석하고 품종구분을 위한 DNA 표지인자를 개발하기 위하여 SSR (simple sequence repeats) 분석 및 다중초위성체 마커 세트 (multiplex-SSR set)를 개발하였다. 기존에 보고된 92개의 SSR 마커를 디자인 하고 이들을 이용하여 국내에서 육성된 24개 감자 품종에 대

해 유전적 다양성을 분석하였다. 92개의 SSR 마커 중 PIC (polymorphism information contents) 값이 높은 14개의 SSR 마커를 선발하였고 PIC 값은 SSR 마커별로 0.48에서 0.89로 나타났고, 평균 값은 0.79였다. PSSR-29의 PIC 값은 0.48로 가장 낮은 값을 나타내었으며 PSSR-191에서 0.89로 가장 높은 값을 보였다. 선발된 14개의 SSR 마커를 이용하여 UPGMA 집괴분석 결과 24개의 감자 품종 중 21개의 품종이 2개의 집단으로 구분 할 수 있었으며 I 집단과 II 집단에는 각각 16개, 5개의 품종들이 군집되었으나 3개의 품종은 군집되지 않았다. 선발된 14개의 SSR 마커를 이용한 결과 24개의 품종에서 총 121개의 대립인자가 확인되었으며 각 마커별 대립인자는 3개에서 34개까지 확인되었고 평균 10.8개로 나타났다. 선발된 SSR 마커 중에서 PSSR-17, PSSR-24, PSSR-29 마커를 조합하여 다중초위성체 마커세트(multiplex-SSR set)를 개발하였다. 다중초위성체 마커세트는 한번의 PCR 반응과 PAGE 분석 만으로 본 연구에서 사용된 국내 24개의 감자 품종을 구분할 수 있었으며 PIC 값은 0.95로 나타났다.

추가 주요어 : 군집분석, polymorphism information contents (PIC), *Solanum tuberosum*, Simple sequence repeat(SSR)

인용문헌

Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrigue, and S.D. Tanksley. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186.

Ashkenazi, V., E. Chani, U. Lavi, D. Levy, J. Hillel, and E. Veilleux. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogentic and fingerprinting analyses. *Genome* 44:50-62.

Bernet, G.P., S. Bramardi, D. Calvache, E.A. Carbonell, and M.J. Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122:146-152.

Braun, A. and G. Wenzel. 2004. Molecular analysis of genetic variation in potato (*Solanum tuberosum* L.). I. German cultivars and advanced clones. *Potato Res.* 47:81-92.

Chen, Y. and R.L. Nelson. 2004. Genetic variation and relationships among cultivated, wild and semiwild soybean. *Crop Sci.* 44:316-325.

Cho, K.H., S. Heo, H.R. Kim, J.H. Kim, I.S. Shin, S.E. Han, S.E. Kim, and D.H. Kim. 2010. Discrimination of Korean apple cultivars using combination of RAPD-SCAR markers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:828-835.

Coburn, J.R., S.V. Temnykh, E.M. Paul, and S.R. McCouch. 2002. Design and application of microsatellite markers panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Sci.*

42:2092-2099.

Cooke, R.J. 1999. New approaches to potato variety identification. *Potato Res.* 42:529-539.

Del Rio, A., J. Bamberg, and Z. Huaman. 2006. Genetic equivalence of putative duplicate germplasm collections held at CIP and US potato genebanks. *Amer. J. Potato Res.* 83:279-285.

Feingold, S., J. Lloyd, N. Nerero, M. Bonierbale, and J. Lorenzen. 2005. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111:456-466.

Fu, Y.B., G.W. Peterson, K.W. Richards, T.R. Tarn, and J.E. Percy. 2009. Genetic diversity of Canadian and exotic potato germplasm revealed by simple sequence repeat markers. *Amer. J. Potato Res.* 86:38-48.

Ghislain, M., D. Andrade, F. Rodriguez, R.J. Hijmans, and D.M. Spooner. 2006. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. *Phureja* group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 113:1515-1527.

Hosaka, K., M. Mori, and K. Ogawa. 1994. Genetic relationships of Japanese potato cultivars assayed by RAPD analysis. *Amer. J. Potato Res.* 71:535-546.

Houwing, A., M. Mori, and K. Ogawa. 1986. Generation of light sprouts suitable for potato variety identification by means of artificial light. *Acta Hort.* 182:359-363.

Jang, S.J., S.J. Park, K.H. Park, H.L. Song, Y.G. Cho, S.K. Jong, J.H. Kang, and H.S. Kim. 2009. Genetic diversity and identification of Korean elite soybean cultivars including certified cultivars based on SSR markers. *Korean J. Crop Sci.* 54:231-240.

Jung, C.S., H.M. Griffiths, D.M. DeJong, S. Cheng, M. Bodies, T.S. Kim, and W.S. Dejong. 2009. The potato developer (D) locus encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates expression of multiple anthocyanin structural genes in tuber skin. *Theor. Appl. Genet.* 120:45-47.

Li, Z. and R.L. Nelson. 2001. Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs. *Crop Sci.* 41:1337-1347.

Ghislain, M., J. Núñez, M. del Rosario Herrera, J. Pignataro, F. Gunzman, M. Bonierbale, and D.M. Spooner. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol. Breeding* 23:377-388.

Milbourne, D., R. Meyer, A.J. Collins, L.D. Ramasy, C. Gebhardt, and R. Waugh. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeats loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259:233-245.

Moisan-Thierry, M., S. Marhdour, M.C. Kerlan, N. Dessenne, M. Perramant, T. Gokelarer, and Y. Le Hingrat. 2005. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Res.* 48:191-200.

Norero, N., M. Julieta, H. Marcelo, and F. Sergio. 2002. Cost efficient potato cultivar identification by microsatellite amplification. *Potato Res.* 45:131-138.

Park, S.W., Y.S. Hyun, and K.W. Chung. 2009. Genetic polymorphism of microsatellite markers in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ginseng Res.* 33:199-205.

Pinto, L.R., K.M. Oliveira, T. Marconi, A.A.F. Garcia, E.C. Ulian, and A.P. De Souza. 2006. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison

- with genomic SSRs. *Plant Breeding* 125:378-384.
- Provan, J., W. Powell, and R. Waugh. 1996. Microsatellite analysis of relationship between cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 92:1078-1084.
- Reid, A. and E.M. Kerr. 2007. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genet. Resources Characterization Utilization* 5:7-13.
- Yamanaka, S., I. Seish, I. Atsushi, L. Yushi, J.A. Watanabe, and K.N. Watanabe. 2005. Construction of integrated genetic map between various existing DNA markers and newly developed P450-related PBA markers in diploid potato (*Solanum tuberosum*). *Breeding Sci.* 55:223-230.
- Yi, J.Y., H.W. Seo, O.S. Huh, Y.E. Park, J. H. Cho, and H.M. Cho. 2010. Phylogenetic analysis and association of markers and traits related to starch contents in Korean potato cultivars using SSRs. *Korean J. Breed. Sci.* 42:28-34.