

유통 중인 고추 품종에 대한 Microsatellite 마커 Data Base 구축

권용삼* · 홍지화 · 최근진

농림축산식품부 국립종자원 재배시험과

Construction of a Microsatellite Marker Database of Commercial Pepper Cultivars

Yong-Sham Kwon*, Jee-Hwa Hong, and Keun-Jin Choi

Variety Testing Division, Korea Seed & Variety Service, Ministry of Agriculture,
Food and Rural Affairs, Suwon 443-400, Korea

Abstract. This study was carried out to evaluate the suitability of microsatellite markers for varietal identification and genetic relationship of 170 commercial pepper cultivars. The relationship between marker genotypes and 11 pepper cultivars with different morphological traits was also analyzed. Of the 302 pairs of microsatellite primers screened against 11 pepper cultivars, 24 pairs were highly polymorphic in terms of number of alleles. These markers were applied for the construction of DNA profile data base for 170 commercial pepper cultivars. A total of 164 polymorphic amplified fragments were obtained from 24 microsatellite primers. The average polymorphism information content was 0.673 ranging from 0.324 to 0.824. One hundred and sixty four microsatellite alleles were used to calculate Jaccard's distance coefficients using unweighted pair group method. A clustering group of varieties, based on the results of microsatellite analysis, were categorized into 3 major groups corresponding to morphological traits. The phenogram discriminated all varieties by markers genotypes. These microsatellite markers will be useful as a tool for protection of plant breeders' intellectual property rights through variety identification in distinctness, uniformity and stability test.

Additional key words: *Capsicum annuum*, genetic relationship, molecular marker, plant variety protection, variety identification

서 언

분자표지는 작물의 병 저항성, 환경 저항성, 형태적 특성 등과 관계된 유전자와 밀접히 연관된 염색체상 위치를 정확히 밝혀 이를 육종현장에 직접적으로 활용될 정도로 많은 발전을 해오고 있다. 이외에도 유전자원의 특성평가, 유전자 지도 작성, 품종식별 등 다방면에 활용되어 큰 성과를 이루고 있다. 분자표지에 의한 품종식별 방법은 형태적 특성에 의한 방법보다 환경의 영향을 적게 받을 뿐만 아니라 노력, 시간, 조사자의 주관적인 판단 등에서 발생하는 오류 등을 크게 줄일 수 있다는 장점이 있다.

품종식별 및 품종보호 심사에 분자표지 활용에 대한 논의는 international union for the protection of new varieties

of plants(UPOV) 산하 기술위원회 중의 하나인 The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular(BMT)에서 집중적으로 다루어지고 있고, 최근 UPOV에서는 분자생물학적 기술의 표준화와 데이터베이스 구축에 대한 표준화를 이루기 위해서 BMT 가이드라인(UPOV, 2010)을 제정되었을 뿐만 아니라 작물별 분자생물학 기술을 품종심사제도에 활용하는 방안에 대한 문서(UPOV, 2011)를 채택할 정도로 그 중요성이 점차 높아지고 있는 추세이다. 분자표지를 이용한 여러 가지 기술 중 품종 식별에 대한 국외의 연구 동향을 살펴보면, 네덜란드에서는 장미(Esselink et al., 2003), 토마토(Bredemeijer et al., 2002), 밀(Röder et al., 2002), 영국에서는 유채(Jones et al., 2008)와 감자(Reid et al., 2011), 스페인의 경우 포도, 멜론, 복숭

*Corresponding author: yskwon3@korea.kr

※ Received 26 February 2013; Revised 27 April 2013; Accepted 15 May 2013.

© 2013 Korean Society for Horticultural Science

아 등의 작물에서 품종별로 DNA 프로파일을 데이터베이스화한 연구결과를 보고한 바 있다(Ibáñez et al., 2009; UPOV, 2008a). 한편, 일본은 딸기, 벼, 복숭아, 밤, 자두 등의 작물에서(UPOV, 2008b), 중국은 옥수수(Wang et al., 2011)와 벼(Ying, et al., 2007)에서 품종별 데이터베이스를 구축하여 이를 자국 농산물의 보호와 품종보호침해 등에 활용하고 있다. 이러한 국외의 연구사례를 종합해 볼 때 우리나라에서도 경제적으로 중요한 작물에 대하여 정밀도 높은 품종별 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축한다면 품종보호침해와 같은 권리분쟁 및 농가와 육묘장 및 종자회사간에 발생하는 분쟁 해결뿐만 아니라 품종보호 심사 제도에 직접적으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

고추(*Capsicum annuum*)는 2011년 현재 재배 면적이 42,574 ha 이며 생산량이 77,110톤에 달하며 2012년 10월 현재 품종보호출원 등록된 258품종과 생산 수입판매 신고된 2011 품종이 국내 종자시장에서 유통되고 있다. 2000년대 초반의 고추 분자표지에 대한 연구는 restriction fragment length polymorphism(RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP) 분석 방법을 이용하여 유전자 지도 작성 및 고추 표현형과 연관된 양적 형질 유전자좌의 염색체상 위치의 확인 등에 활용되어 왔다(Ben Chaim et al., 2001; Kang et al., 2001). 그러나 RFLP 분석은 반복 재현성이 높으나 다형성 정도가 낮다는 단점이 있고, RAPD와 AFLP 마커는 다형성 정도가 높으나 반복 재현성 등과 같은 문제점이 제기되었다. 이러한 점을 해결하기 위하여 게놈내의 특정 염기서열을 기반으로 하여 개발된 simple sequence repeat(SSR)과 single nucleotide polymorphism(SNP) 마커가 분자 유전 육종학 연구에 활용되고 있다. 이 분석방법 중 SSR 마커를 이용한 고추의 국내외 연구동향을 살펴보면, 2004년과 2006년에 서울대학교 연구팀에서 genomic library와 expressed sequence tag(EST)에서 유래된 SSR 마커 226개를 활용하여 ‘TF68’(*Capsicum annuum*)과 ‘Habanero’(*Capsicum chinensis*)가 교배된 F₂ 집단에 대한 유전자 지도를 작성한 이래(Lee et al., 2004; Yi et al., 2006), 일본에서는 106개의 SSR 마커를 개발하여 *C. annuum* 에 속하는 ‘Manganji’와 ‘Tongari’가 교배된 약 배양 집단을 활용하여 유전자 지도를 작성한 연구결과도 보고된 바 있다(Minamiyama et al., 2006). 이탈리아와 독일의 경우 고추 genomic library와 EST에서 유래된 SSR 마커를 개발하여 고추 유전자원의 특성평가 및 가지과 작물에 대한 활용 가능성에 대한 연구를 수행한 바 있다(Nagy et al., 2007; Portis et al., 2007). 우리나라의 경우 국립종자원과 서울대학교 연구팀이 공동으로 SSR 마커를 활용하여 국내

종자시장에서 유통되고 있는 66품종을 식별할 수 있는 방법을 개발한 이후(Kwon et al., 2005), 최근에 농산물품질관리원에서 고추 SNP 마커를 개발하여 고추 98품종에 대한 식별체계를 구축하여 보고한 바 있다(Jung et al., 2010). 그러나 Kwon et al.(2005)에 의해 개발된 품종식별 체계는 polymerase chain reaction(PCR) 증폭 산물을 아크릴아미드젤 전기영동에 의하여 분석하였기 때문에 결과의 데이터베이스화가 곤란할 뿐만 아니라 분석품종도 현재에 유통되지 않고 있는 등 이에 대한 개선이 필요한 것으로 나타났고, SNP 마커를 이용한 고추 품종식별은 allele specific PCR에 의해 밴드의 유무에 따라 품종을 식별하는 방법이기 때문에 F₁ 품종을 정밀도 높게 구분하는데 어려움이 있을 것으로 사료되었다. 이러한 연구 결과를 종합해 볼 때 국내에서 최근에 육성되어 유통되거나 품종보호 출원된 고추 품종을 대상으로 microsatellite 마커에 의해 품종을 식별할 수 있는 적절한 분자표지 세트를 선정하고 품종 별로 정확한 DNA 프로파일 데이터베이스 구축이 필요할 것으로 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 UPOV가 제안하는 DNA 분석 방법의 하나인 microsatellite 마커를 활용하여 고추 유통품종에 대한 품종식별 분자표지의 선정 및 이를 활용한 DNA 프로파일 데이터베이스 구축에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시품종 및 DNA 추출

본 연구에서는 국내에서 유통되고 있는 고추 170 품종을 공시하여 microsatellite 마커의 분석 재료로 활용하였다(Table 1). 공시 품종의 종자 7립과 텅스텐 구슬 2개를 2mL 튜브에 넣고 분쇄기(Pulverisette 6, Fritsch)를 이용하여 종자를 고르게 마쇄하였다. 충분히 마쇄된 시료는 NucleoSpin[®] Plant II(Macherey-Nagel Cat. 740 770.250) 키트를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는 1.5% 아가로스젤에서 전기 영동하여 DNA 농도를 확인한 후 μ L당 10ng의 농도로 정량하여 PCR 분석에 이용하였다. 본 연구에서는 고추 공시 품종별로 정밀도 높은 microsatellite 데이터베이스를 구축하기 위하여 동일 품종 내 종자 7립씩 bulk로 균분하여 3반복 DNA를 추출한 다음 이를 PCR에 활용하였다.

Microsatellite 분석

고추 품종식별에 효과적인 분자표지를 선별하기 위하여, ‘오추’, ‘선착순’, ‘깍정’, ‘BN54’, ‘녹광’, ‘하이비타엘로우’, ‘고을’, ‘초대형꽃’, ‘독야청청’, ‘금당’, ‘슈퍼대형꽃’ 품종을

Table 1. Commercial pepper cultivars assayed for genetic characterization using microsatellite markers.

No.	Cultivar	Seed company	No.	Cultivar	Seed company
001	Supermanitta	Nongwoo	047	PR-Taepyeong	NH
002	Hongmiin	Nongwoo	048	Hanminjok	NH
003	PR-Manse	Nongwoo	049	PR-Jogang	Jinheung
004	Baerotta	Nongwoo	050	TM-Gangryeoksangjanggun	Kwonnong
005	Hongjinju	Nongwoo	051	Cheonhataepyeong	Dongbu
006	Obok	Nongwoo	052	Geumsang	Dongbu
007	PR-Daechon	Nongwoo	053	Ppalritta	Dongbu
008	PR-Sangsaeng	Nongwoo	054	Geumsugangsan	Takii
009	PR-Mannita	Nongwoo	055	Ildangbaek	Syngenta
010	PR-Eoulrim	Nongwoo	056	Geumtap	Monsanto
011	PR-Yeoljeong	Nongwoo	057	Cheongyang	Monsanto
012	PR-Geummaek	Nongwoo	058	Geumdang	Syngenta
013	PR-Sinnara	Nongwoo	059	Heungyina	Dongbu
014	Mannita	Nongwoo	060	Daechan	Nongwoo
015	Mansahyeongtong	Syngenta	061	Keunsalrim	Nongwoo
016	Ilinja	Syngenta	062	Hanbando	Nongwoo
017	Chukje	Syngenta	063	Mirakhong	Hyundae
018	Superbigarim	Syngenta	064	Pocheongcheon	Syngenta
019	Daejangbu	Syngenta	065	SS-33	Samsung
020	Powerspeed	Dongbu	066	Dogyacheongcheong	Syngenta
021	Shingiwon	Monsanto	067	Eplus	Samsung
022	Bujawang	Dongbu	068	Urigeon	Samsung
023	Geonchowang	Samsung	069	Daechon	Nongwoo
024	Jeoldaegangja	Samsung	070	Dangchan	Nongwoo
025	Yeongunghogeol	Samsung	071	Cheontong	Bayer
026	B25	Samsung	072	Homerunwang	Bayer
027	Jewang	Samsung	073	Taesan	Nongwoo
028	Superhong	KS	074	Chammani	Nongwoo
029	Bitgoeul	Sakata	075	Saengsaengput	Nongwoo
030	E-Pungseonghan	Sakata	076	Nokgwang	Monsanto
031	Anjeonbelt	Sakata	077	Cheonhangmat	Nongwoo
032	Gwangtaekna	Asia	078	Hwayang	Jeil
033	Dolpung	Asia	079	PR-Giant	Ecoseed
034	PR-Maekom	Koregon	080	TP052	Takii
035	Daedeulbo	Takii	081	Geumbuja	Dongbu
036	Jicheonmyeong	Dongwon	082	Matgichandan	Hana
037	Dokmudae	Dongwon	083	Newlife	Bayer
038	Hongnolbu	Hanter21	084	Saeroun-PR	Monsanto
039	PR-Geumgochu	Monsanto	085	PR-Cheongtap	Hyundae
040	PR-Geumgangseok	Monsanto	086	Sinpowerbulsajo	Daenong
041	Yigudongseong	Monsanto	087	Doublegeon	Daenong
042	Wangdaebak	Monsanto	088	Mannaput	Hana
043	Onnuri	Monsanto	089	PR-Dragon2	Ecoseed
044	Buchon	Monsanto	090	TP034	Takii
045	Cheonhajeil	Monsanto	091	Hana3ho	Hana
046	Hongboseok	Monsanto	092	Hana2ho	Hana

Table 1. Continued.

No.	Cultivar	Seed company	No.	Cultivar	Seed company
093	Hana1ho	Hana	132	Yeppeundokyacheongcheong	Syngenta
094	Jajusaenggak	Jeonggio	133	Supergeumdag	Syngenta
095	Yeokdaechoigang	Samsung	134	Buldojang	Syngenta
096	PR-Donbangseok	Samsung	135	Dahongchima	Syngenta
097	PR-Action	Samsung	136	Ganghangeon	Yiseo
098	Bulmat	Syngenta	137	Sunhangilsang	Sakata
099	Gisedeungdeung	Sakata	138	PR-Smart	Nongwoo
100	Muhanjilju	Syngenta	139	Ttagottotago	Asia
101	Yeokganghongjanggun	Koregon	140	Asiajumbo	Asia
102	Odaeyang	Bunong	141	Sintongbangtong	Asia
103	Morningput	Syngenta	142	Sinchorong	Sakata
104	Asagyiput	Nongwoo	143	Goldenbell	Kwonnong
105	BN54	Sakata	144	Senongtanducho	Nongwoo
106	Giripbaksu	Syngenta	145	Senongseoncho	Nongwoo
107	Longgreenmat	Nongwoo	146	Senonghongsim	Nongwoo
108	Maepsina	Hanter21	147	Gohyangmat	Samsung
109	Nonggawang	Samsung	148	Glamour	Samsung
110	Cheongunmanma	Samsung	149	Sinhwachangjogold	Samsung
111	Sinsarangput	Dongwon	150	Mubyeongjangsugold	Samsung
112	Gangryeokdaetong	Bayer	151	PR-Geonchawang	Samsung
113	Higreenput	Samsung	152	PR-Bubu	Samsung
114	Hanipmat	KS	153	PR-Nongawang	Samsung
115	Chojiilgwan	KS	154	Geochanghan	Sakata
116	Sinsegye	Sakata	155	Segyeil	Sakata
117	PR-Dragon	Ecoseed	156	Sagaksagak	RDA
118	PR-Apollo	Ecoseed	157	Hongyeon	RDA
119	Mubyeongjangsu	Samsung	158	Hongseon	RDA
120	TPE010	Takii	159	Jeokyeon	RDA
121	Hongwon	Pyeonghwa	160	Onggojip	Bayer
122	Gangryeoksingeon	Bayer	161	RS902	Bayer
123	Seongjayeonggwang	Hyundae	162	Papeukored	Samsung
124	Dabotap	Monsanto	163	Papeukoyellow	Samsung
125	Ildangbaekgold	Syngenta	164	EcoF79	Ecoseed
126	Jeokbyeokdaejeon	Bayer	165	Neulpureunplus	Syngenta
127	Geumsongyi	Monsanto	166	Midas	Monsanto
128	Geummaru	Monsanto	167	Special	Enza
129	Wongiwangseong	Dongbu	168	Pierrot	Syngenta
130	Sinokdongja	Daenong	169	Jjukjukppangppang	Asia
131	Sindokbuljanggun	Daenong	170	Jeilmaeuncheongyang	Jeil

대상으로 하여 일본(Minamiyama et al., 2006), 이탈리아 (Portis et al., 2007), 독일(Nagy et al., 2007)에서 개발된 302 개 분자표지를 활용하여 다형성 정도를 조사하였다. PCR을 통한 유전자 증폭 산물은 Genetic Analyzer(HDA-GT12™ System, eGenE, Inc.)를 이용하여 전기영동하고 컴퓨터프

로그램(Biocalculator 2.0)을 활용하여 각 품종별 대립 유전자 의 차이를 분석하였다. 반복 재현성이 높고 밴드의 패턴 이 깨끗한 분자표지를 선정하여 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET의 화학 물질 중 한 가지로 형광 표지한 다 음 고추 170품종(Table 1)에 대한 DNA 프로파일 데이터베

이스를 구축에 이용하였다.

PCR 반응은 고추 게놈 DNA 30ng, 0.1 μ M의 SSR primer, 2.0 μ L dNTP mixture(2.5mM), *Taq* polymerase 1.0U, 2.5 μ L의 10 \times PCR buffer(50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.0mM MgCl₂)에 증류수를 첨가하여 전체 부피를 25 μ L로 조절하였다. PCR(C1000, BioRad, USA) 증폭은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denature 한 후, 50-60 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extension을 40cycle 수행하였다. PCR이 완료된 후 3.0 μ L의 증폭산물을 2.5% 아가로스 젤에서 전기 영동하여 증폭 여부를 확인한 다음, 초순수 150 μ L에 PCR 산물 1.5 μ L를 희석하였다. 희석된 PCR 증폭 산물 1.5 μ L는 탈이온된 포름아마이드(deionized formamide) 10 μ L, size marker (LIZ500 size standard) 0.25 μ L를 혼합한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성시켰다. 변성시킨 PCR 증폭 산물은 자동염기서열분석기(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystem)를 활용하여 전기 영동한 다음 GeneMapper(version 3.7) 컴퓨터 프로그램(Applied Biosystem)을 이용하여 분자표지별 대립 유전자의 크기를 결정하였다.

Microsatellite 마커의 다양성을 조사하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 Polymorphism information content(PIC) 값을 산출하였다. 식에서 P_{ij}는 마커 i의 밴드들 중에서 j번째

공통 밴드 패턴의 빈도수이다(Anderson et al., 1993).

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Microsatellite 분석을 통하여 재현성이 높고 다형성을 보이는 밴드를 마커로 선발하여 밴드의 유무(dominant marker scoring; present = 1, absent = 0)에 따라 NTSYSpc(version 2.10b)(Rohlf, 2000) 컴퓨터 프로그램에 입력하고 Jaccard 방법(Sneath and Sokal, 1973)에 준하여 유전적 유사도 값을 계산한 다음 unweighted pair-group method with arithmetical average(UPGMA)(Sneath and Sokal, 1973) 방법으로 집괴 분석하여 계통도를 작성하였다.

결과 및 고찰

Microsatellite 분석

고추 품종식별에 효과적인 분자표지를 선발하기 위하여, 고추 과실의 유형 및 식물체의 형태가 상이한 ‘금당’ 외 10 품종을 이용하여 302개의 microsatellite 마커에 대한 다형성 정도를 조사한 바(Fig. 1), 총 302개 중에서 180개가 파프리카 품종(‘하이비타엘로우’, ‘고울’)과 일반 건고추(‘금당’,

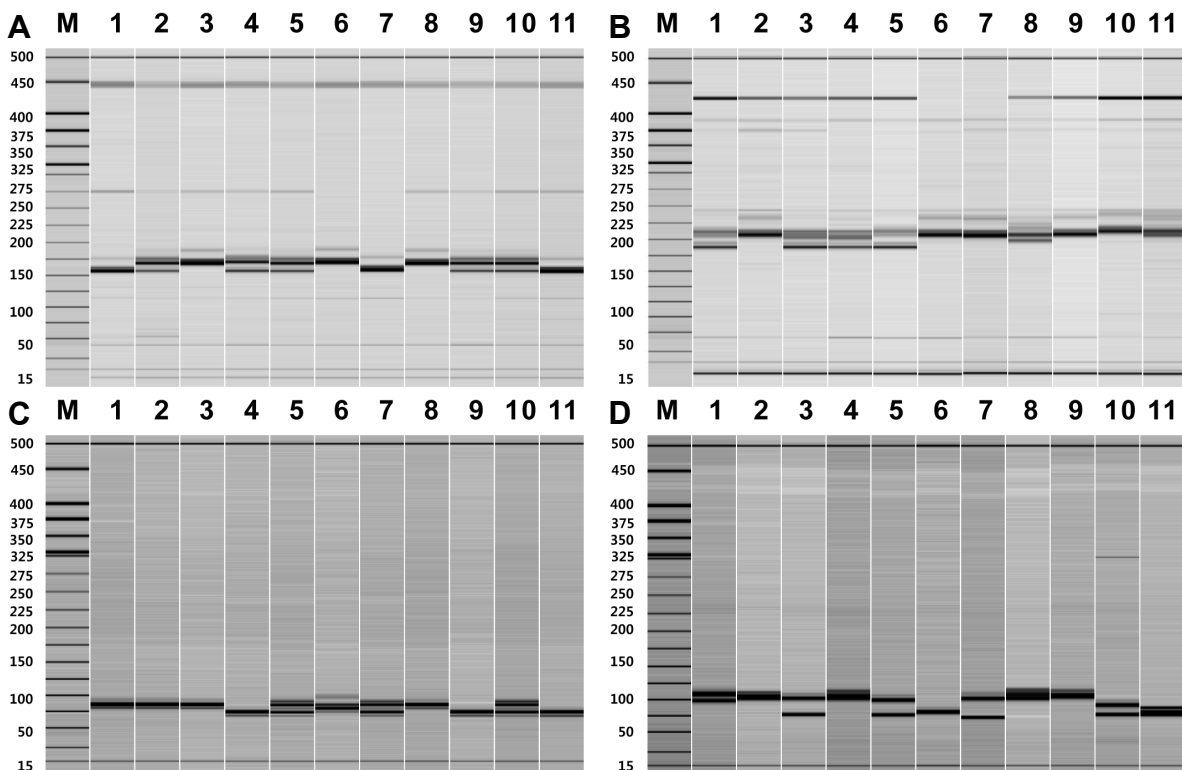


Fig. 1. Polymorphism of four microsatellite markers, CAM336 (A), CAM351 (B), EPMS305 (C), and EPMS331 (D). The PCR products were analyzed using a HAD-GT12TM Genetic Analyzer System. M; QX DNA size marker (25-450bp), Lane 1, ‘Ochu’; 2, ‘Seonchaksun’; 3, ‘Ggeogjeong’; 4, ‘BN54’; 5, ‘Nogwang’; 6, ‘Hivitayellow’; 7, ‘Goal’; 8, ‘Chodaehyungput’; 9, ‘Wongwang2ho’; 10, ‘Geumdang’; 11, ‘Superdaehyungput’.

‘독야청청’) 및 대과형(‘꼭징’, ‘BN54’, ‘오추’, ‘선착순’, ‘초대형꽃’, ‘슈퍼대형꽃’) 및 소과형(‘녹광’) 풋고추 품종군 사이에 다형성을 보이지 않았으며, 나머지 102 중 52개는

파프리카와 일반 건고추 사이에서만 다형성을 나타내었다. 최종 50개의 마커 중에서 파프리카, 풋고추, 일반 건고추 품종에서 높은 다형성을 보이면서 밴드의 패턴이 깨끗할

Table 2. Repeat motif, no. of alleles, and PIC value of microsatellite markers selected for genetic characterization of commercial pepper cultivars.

Microsatellite designation	Primer sequence ^w	Repeat motif	Linkage group	Annealing temp	Product size (bp)	No. of alleles	PIC value
CAMS051 ^z	F: VIC-ACCCAGTTCCTTTCTTGGT R: GAAGGTTAGCGGAATGAACG	(GT)3A(TA)4(TG)11	3	55	155-165	5	0.610
CAMS117 ^z	F: NED-TTGTGGAGGAAACAAGCAAA R: CCTCAGCCCAGGAGACATAA	(TG)21(TA)3	11	55	216-240	11	0.753
CAMS336 ^z	F: PET-GGTGGAAACTTGCTTGGAGA R: CCCAGAACCATCCACCTACT	(TC)16	3	55	144-175	6	0.547
CAMS351 ^z	F: FAM-CGCATGAAGCAAATGTACCA R: ACCTGCAGTTTGTGTTGGA	(TG)3...(AG)26	4	55	187-218	11	0.788
CAMS855 ^z	F: VIC-AAGTGTCAAGGAAGGGGACA R: CCTAACCACCCCCAAAAGTT	(AGT)14A(GAA)9	3	55	242-291	9	0.635
GPMS029 ^y	F: NED-CAGGCAATACGGAGCATC R: TGTGTTGCTTCTTGGACGAC	(GT)15GGT7(GTT)2	-	50	250-262	5	0.523
GPMS100 ^y	F: FAM-TCCATACGGTTGGAGGAGAG R: ACTATGCTCTGCTGTGCCCT	T5(GT)12	2	50	170-173	2	0.324
GPMS117 ^y	F: VIC-GATGTTAGGTCCGTGCTTCG R: AAGCCCATGGAAGTTATCC	(TA)25(GA)14	12	55	133-148	8	0.685
GPMS159 ^y	F: NED-AAGAACATGAGGAACCTTAACCATG R: TTCACCCCTTCTCCGACTCC	(TAA)20	10	55	284-325	14	0.814
GPMS161 ^y	F: FAM-CGAAATCCAATAAACGAGTGAAG R: CCTGTGTGAACAAGTTTTCAGG	(AAT)25	-	55	248-265	7	0.770
GPMS194 ^y	F: NED-AGGTGGCAGTTGAGGCTAAG R: GTTCTAGGTCTTTGCCCTGG	(TA)17(GA)12	-	60	224-246	5	0.558
GPMS197 ^y	F: FAM-GCAGAGAAAATAAAATCTCGG R: CAATGGAAATTTTCATCGACG	(GA)3(TAT)16	-	58	275-335	15	0.802
EPMS305 ^y	F: VIC-CGTCTTTCACTTGTCTTTTGTTCT R: AGTGGGTTCACTGACTTGGG	(CTT)3(CAT)9	-	55	064-088	5	0.559
EPMS331 ^y	F: NED-AACCCAATCCCCTTATCCAC R: GCATTAGCAGAAGCCATTG	(CA)10	11	55	070-104	11	0.710
EPMS376 ^y	F: PET-ACCCACCTTCATCAACAACC R: ATTTGTGGCTTTTCGAAACG	(CAA)6	6	55	250-263	5	0.788
EPMS386 ^y	F: VIC-ACGCCAAGAAAATCATCTCC R: CCATTGCTGAAGAAAATGGG	(CA)15	3	55	125-158	9	0.824
EPMS418 ^y	F: NED-ATCTTCTTCTCATTCTCCCTTC R: TGCTCAGCATTAAACGACGTC	(CA)10	6	55	194-208	6	0.808
EPMS426 ^y	F: FAM-GAGGAAACACTCTCTCTCTCTCTC R: TCAAGAGACCCCAATAGGG	(AT)15	7	55	099-119	4	0.788
EPMS441 ^y	F: PET-GCACGAGGAAAGAGAGACATAG R: TCAACGGATTCACTCTTCCC	(AG)11	-	55	117-129	5	0.670
EPMS542 ^y	F: NED-ATCCACTTCCCCATTATCCC R: TGGATGATCGAGTTGACTGG	(TC)10	-	58	171-189	4	0.520
EPMS642 ^x	F: FAM-CAACTTCGCGTTATTGTCCA R: AGGGCGGACAAAGAAGATT	(AT)8	-	55	187-209	5	0.695
EPMS643 ^x	F: PET-CCAAGATCAACTCTTACGCTAT R: CCCCTCAAGAATTCCTCCAT	(CT)17	-	55	197-219	4	0.748
EPMS709 ^x	F: NED-ACGCCGAGGACTATGATGAC R: TTCTTCATCCTCAGCGTGTG	(GAG)6	-	50	259-278	6	0.744
EPMS755 ^x	F: FAM-CGCTCGCTACCCTTTCATTA R: AATTTCGGAAGGGCAAAGAT	(A)12...(T)11	-	50	138-145	2	0.496
Total						164	16.17
Mean						6.83	0.673

^zMinamiyama et al. (2006).

^yNagy et al. (2007).

^xPortis et al. (2006).

^wForward primers were labeled with fluorescent dyes.

뿐만 아니라 반복 재현성이 높게 나타난 24개를 최종 선발하였다.

고추의 경우 유전자원 및 유통품종에 대한 microsatellite 마커의 다형성 정도는 아주 낮은 것으로 알려져 있는데, Kwon et al.(2005)은 316개의 SSR 마커를 이용하여 형태적 특성이 다른 6개의 고추 F₁ 품종을 검정한 결과 다형성을 보이는 마커의 비율이 8.5%에 불과하다고 보고 하였으며, Nagy et al.(2007)은 147개의 microsatellite 마커를 이용하여 고추 과실의 형태가 전혀 다른 14 계통(*C. annuum*)을 분석하였을 때 147개의 마커 중 51개가 전혀 다형성을 보이지 않은 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 국내 고추 유통품종의 식별용으로 활용이 가능한 분자표지가 24개에 불과해 Kwon et al.(2005)과 Nagy et al.(2007)의 연구결과를 확인할 수 있었다. 한편, EST에서 유래된 microsatellite 마커는 genomic library에 유래된 마커보다 다형성 정도가 낮은 것으로 알려져 있지만(Varshney et al., 2005), 본 연구에서 고추 EST에서 유래된 microsatellite 마커(EPMS serious)들은 대립유전자의 형태가 깨끗하고 PCR 반응도 안정적으로 일어나(Fig. 1) 정밀도 높은 고추 품종별 microsatellite 데이터베이스를 구축하는데 유리할 것으로 사료되었다.

최종 선발된 24개의 microsatellite primer의 5'-말단에 형광물질인 FAM, VIC, NED, PET를 각각 표지한 프라이머를 고추 170품종의 genomic DNA와 PCR한 다음 자동염기서열분석기를 이용하여 전기 영동한 후 각 프라이머에 따른 다형성 정도를 조사한 바(Table 2), microsatellite 마커에 의해 검출된 대립유전자의 수는 2-15개였고 총 164개의 대립유전자가 분석되었으며, 마커당 평균 대립유전자의 수는 6.83개로 나타났다. 한편 각 마커별로 유전적 다형성 정도를 나타내는 PIC 값은 0.324-0.824까지 다양하게 나타났으며, 평균값은 0.673으로 높은 경향을 나타내었다.

분자표지를 이용한 고추 유전자원의 특성 평가 및 유통품종에 대하여 분석하였을 때 각 마커에 따른 대립유전자의 수 및 PIC값에 대한 연구결과는 Kwon et al.(2005)이 고추 66개의 유통품종에 다형성을 나타내는 27개의 microsatellite 마커로 분석하였을 때 PIC 값은 0.03-0.887(평균 0.529) 범위이고, 평균 대립유전자의 수가 3.29개로 나타남을 보고한 이래, Minamiyama et al.(2006)은 106개의 SSR 마커를 이용하여 7개의 전혀 형태적 특성이 다른 *C. annuum* 품종을 분석하였을 때 평균대립 유전자의 수는 2.9개, 평균 PIC 값은 0.46에 불과함을 지적하였고, Nagy et al.(2007)도 *C. annuum* 품종 내에 microsatellite의 다양성 정도가 낮게 나타남을 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 선발된 microsatellite 마커의 경우 2-15개의 대립 유전자의 수를 나타내어 다른 연

구자들보다 다소 많은 대립유전자를 나타내었을 뿐만 아니라 평균 PIC 값은 0.683으로 높은 경향이였다. 이러한 연구 결과는 본 연구에서 다형성 정도가 높은 마커를 1차 선발하여 품종식별에 활용하였을 뿐만 아니라 유전자 분석에 활용된 품종이 대부분 F₁ 품종이고 공시 품종의 유전적 다양성 정도가 크기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 한편, 본 연구에서 활용된 microsatellite 마커 24개중에서 PIC 값이 0.70 이상인 CAMS117, CAMS351, GPMS159, GPMS161, GPMS197, EPMS331, EPMS376, EPMS386, EPMS418, EPMS426, EPMS643, EPMS709는 고추 유통품종에 높은 다형성을 나타내어, 향후 종자회사에서 기본식물, 원원종, 원종 및 시판종자의 순도관리에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

품종식별력 검정 및 유전적 유사도 분석

Microsatellite 마커를 이용하여 증폭된 대립유전자의 크기를 근거로 고추 170품종에 대한 유전적 다양성을 조사한 바(Fig. 2), 공시품종의 전체 유사도 지수는 0.14-0.92의 범위에 분포하는 것으로 나타났으며, 공시된 모든 품종이 분자표지의 유전자형에 의해 구분이 됨을 확인할 수 있었다. 한편, 유사도 지수 0.25를 기준으로 할 때 170개 품종은 크게 3개의 그룹으로 구분되었다. I 그룹은 건고추 품종인 '슈퍼마니파' 외 149품종이 속하였고 유사도 지수 0.45를 기준으로 할 때 16개의 소그룹으로 구분할 수 있었으며, I-1그룹은 '마니파', '슈퍼마니파', '일당백', '금탑' 등 29품종이 속하였고, I-2 그룹은 대과종인 '배로파', '부촌', '천하제일' 등 62품종이 속하였으며, I-3 그룹은 우리나라 대표적인 역병저항성 품종인 '무한질주', '독야청청' 등 39품종이 분포되었다. 그리고 나머지 20품종들은 1-5개의 품종이 하나의 13개의 소그룹에 분포되었다. II 그룹은 유전적 유사도 지수 0.33을 기준으로 할 때 4개의 소그룹으로 구분되었는데 II-1 그룹은 '아삭이뽕'과 과실의 형태가 유사한 'TP052', 'TP010' 등 8품종이 속하였고, 유사도 지수 0.42에서 과실의 형태가 다른 '세농선초'가 다시 하나의 그룹으로 재구분되었다. II-2 그룹은 과피색이 노란색이면서 절임용 고추로 활용되는 '골든벨' 품종이 속하였으며, II-3 그룹은 길상이란 품종으로 알려진 'BN54'와 같이 과실의 형태가 큰 풋고추 품종인 '순한길상', '룽그린맛', '따고또따고' 4품종이 포함되었으며 II-4 그룹은 '파프코레드', '마이다스', '스페셜', '피에로', '파프코엘로우'와 같은 파프리카 품종들이 속하였다. III 그룹은 과실성숙전의 색이 연황색이면서 피클 가공용 품종으로 농촌진흥청에서 육성된 '사각사각' 품종이 하나의 대그룹으로 분류되었다. 본 연구에서 microsatellite 마커 분석에 활용된

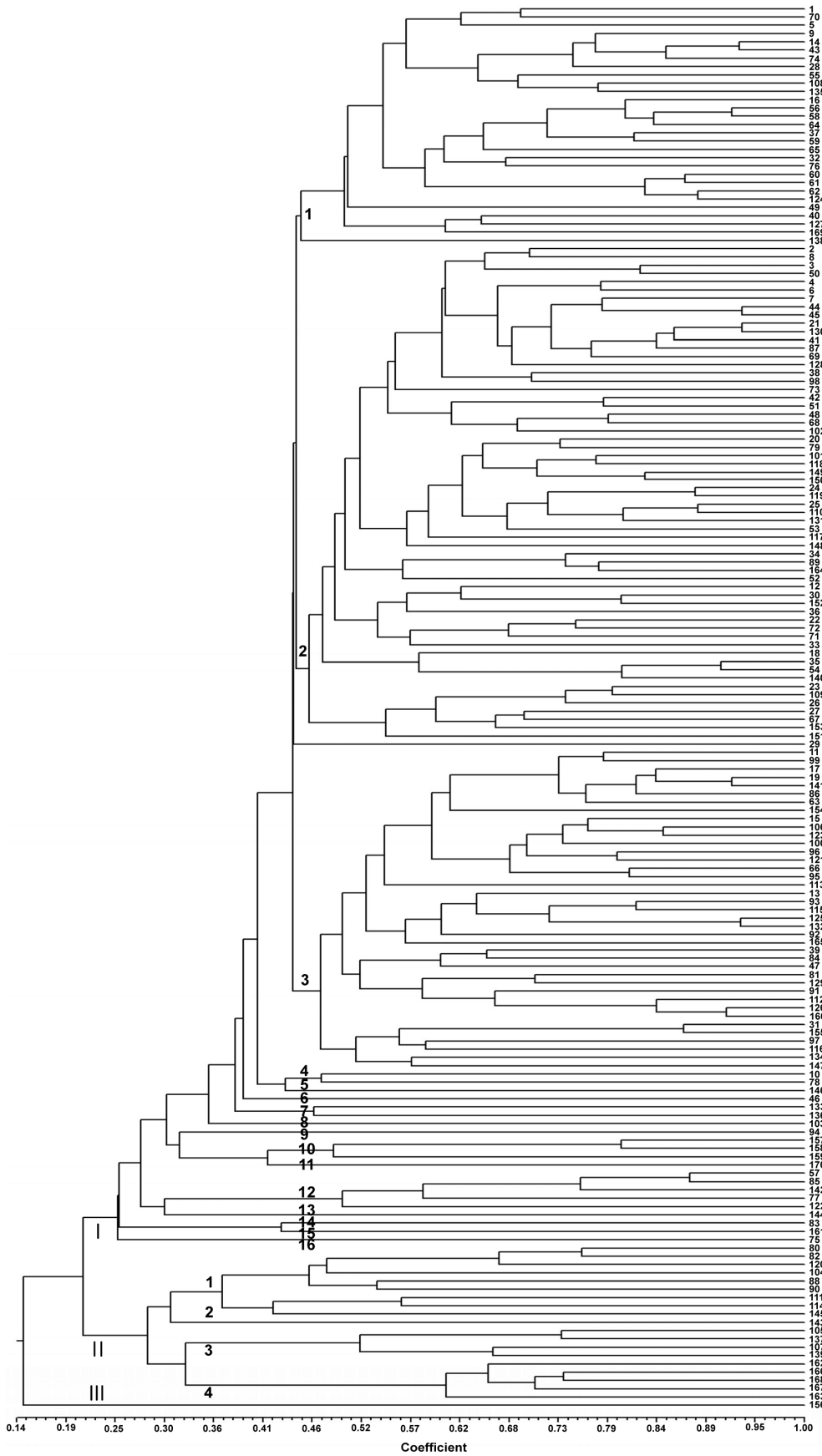


Fig. 2. Dendrogram depicting the classification of 170 commercial pepper cultivars constructed using UPGMA and based on microsatellite markers. The numbers (1 to 170) at right side refer to the list of cultivars in Table 1. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

품종중에서 ‘마니파’/‘온누리’, ‘금탑’/‘금당’, ‘부춘’/‘천하제일’, ‘신기원’/‘신옥동자’, ‘대장부’/‘신통방통’, ‘일당백골드’/‘독야청청’, ‘적벽대전’/‘웅고집’ 품종은 90% 이상 다소 높게 나타났는데 이는 국내 고추 육성회사에서 품종 육성에 특성이 유사한 유전자원을 이용했기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 최근에 육성된 고추 170 품종에 대하여 24개의 microsatellite 마커를 이용할 때 모든 고추 품종의 식별이 가능하였을 뿐만 아니라 고추 품종의 과실의 특성 등과 같은 형질에 따라 품종군들이 구분되어 이 분자표지들은 품종간 유연관계 설정뿐만 아니라 유전자원 특성 평가 등 다양한 분야에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Microsatellite 마커를 이용하여 품종별 데이터베이스 구축에 대한 연구결과는 네덜란드에서 토마토와 밀 500품종 이상에 대하여 품종식별 컨소시엄을 구성하여 실험실 및 분석기기 등을 달리하여 20개 내외의 microsatellite 마커를 활용하여 DNA 데이터베이스 구축에 대한 연구결과를 보고한 이후(Bredemeijer et al., 2002; Röder et al., 2002), 스페인의 Ibáñez et al.(2009)은 포도 991개 품종 및 유전자원을 대상으로 9개의 microsatellite 마커를 활용하여 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하고 2개의 대립유전자가 차이가 날 경우 품종의 형태적 특성에서 차이가 난다는 포도 품종간 최소거리를 설정한 연구 결과도 보고되고 있다. 최근에 Reid et al.(2011)도 유럽연합 카탈로그에 수록된 감자 892품종을 대상으로 9개의 microsatellite 마커와 19개의 형태적 특성을 활용하여 품종별 데이터베이스도 구축하였다. 이들 연구자의 공통된 점은 여러 가지 분자 표지 중에서 microsatellite 마커를 이용한다는 점과 기존의 매뉴얼 분석보다는 자동염기서열분석기를 활용하여 품종별로 데이터베이스를 구축하고 이를 기존 품종의 관리에 활용한다는 것이다. 본 연구에서도 microsatellite 마커를 활용하여 3차례 반복 실험하여 정밀도 높은 고추 170개 유통품종의 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하였는데, 이는 품종별 데이터베이스 구축에 microsatellite 마커가 효과적이라고 한 토마토, 밀, 포도, 감자의 연구결과를 확인할 수 있었다. 한편, 본 연구에서 고추 170품종을 공시하여 정밀도 높은 고추 품종별 microsatellite DNA 프로파일 데이터베이스는 품종보호출원 품종의 선 DNA 검정을 통한 대조품종 선정 및 특성조사 과정에서 품종보호출원 품종의 구별성, 균일성 및 안정성이 의심될 경우 해당 품종에 대한 유전자 분석 결과는 품종보호출원 품종의 재배심사시 보조자료로 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 실제로 국립종자원에서는 2011년도부터 고추 품종보호출원 품종의 대조품종을 선정하기 위하여 출원품종의 특성조사 전에 출원품종의 종자에 대하여 DNA

를 분리하고 본 연구에서 선정된 분자표지를 활용하여 유전자 분석한 다음 기 구축된 데이터베이스와 유전적 유연관계 선정 후 유사도가 높은 품종을 대조품종으로 선정하여 재배시험을 통한 특성조사를 실시한 결과 두 품종간에 구별성이 나타나지 않은 경우도 있어 이 방법은 향후 품종보호제도 강화에 크게 기여할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 선발된 품종식별 마커를 이용하여 농업인과 육묘장, 농업인과 종사회사간에 발생하는 품종진위성과 관련된 종자 분쟁과 사법기관에서 고추 과실 및 고추 모종의 도난 사건 등에 실제적으로 활용한 예가 2013년 현재 7건이나 있는 등 앞으로 그 활용도는 점차 증가될 것으로 예상된다. 한편, 2005년에 국립종자원에서 개발된 품종 식별용 microsatellite 마커와 농산물품질관리원에서 개발된 SNP 분석 방법을 추가적으로 활용하여 품종식별력 및 분석의 용이성 등이 비교·분석 되어진다면, 고추 DNA 프로파일 데이터베이스의 정밀도는 한층 더 높아질 것으로 판단된다. 앞으로 본 연구에서 개발된 microsatellite 마커를 활용하여 고추 유통품종에 대한 실험실 및 분석기기를 다양화하여 좀 더 표준화된 고추 DNA 데이터베이스 구축이 된다면 품종보호권의 침해의 사전 방지, 신품종의 육종효율 향상 및 종자 순도 검정시 비용 절감 등 다방면에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

국내에서 최근에 유통되고 있는 고추 170품종을 대상으로 microsatellite 마커를 이용하여 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하기 위하여 품종식별력이 높은 분자표지의 선정 및 이를 활용한 품종 식별력 및 유전적 유사도 검정 등에 대한 연구를 수행하였다. 고추 형태적 특성이 다른 11품종을 302개의 microsatellite 마커로 검정하여 24개의 다형성이 높은 마커를 선정한 다음 170품종에 대한 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하였다. 고추 170품종을 24개의 microsatellite 마커로 분석하였을 때 마커당 평균 대립유전자수는 6.83개로 나타났고, 최소 2개부터 15개까지 다양한 분포를 나타내었다. PIC 값의 경우 0.324-0.873 범위에 속하였으며 평균값은 0.673으로 높게 나타났다. Microsatellite 마커의 대립유전자를 이용하여 고추 170품종에 대한 계통도를 작성하였을 때 과실의 형태에 따라 3개의 그룹으로 크게 나누어졌으며 모든 품종이 microsatellite 마커의 유전자형에 의해 식별이 되는 것으로 나타났다. 이 연구결과에 의해 개발된 고추 품종별 DNA 프로파일 데이터베이스는 품종보호출원 품종의 선 DNA 검정을 통한 대조품종 선정, 구별성, 균일성, 안정성의 재확인에 매우 유용하게 이용되어질 수

있어 향후, 품종보호권 강화 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

추가 주요어 : 고추, 유전적 유연관계, 분자표지, 식물품종보호, 품종식별

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.
- Ben Chaim, A., I. Paran, R. Grube, M. Jahn, R. van Wijk, and J. Peleman. 2001. QTL mapping of fruit related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theor. Appl. Genet.* 102:1016-1028.
- Bredemeijer, G.M.M., R.J. Cooke, M.W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, M.S. Röder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand, and B. Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105:1019-1026.
- Esselink, G.D., M.J.W. Smulders, and B. Vosman. 2003. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theor. Appl. Genet.* 106:277-286.
- Kang, B.C., S.H. Nahm, and J.H. Huh. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinese*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 102:531-539.
- Kwon, Y.S., J.M. Lee, G.B. Yi, S.I. Yi, K.M. Kim, E.H. Soh, K.M. Bae, E.K. Park, I.H. Song, and B.D. Kim. 2005. Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Molecules Cells* 19:428-435.
- Jones, H., A. Bernole, L.B. Jensen, R.A. Horsnell, J.R. Law, R.J. Cooke, and C.E. Norris. 2008. Minimising inter-laboratory variation when constructing a unified molecular database of plant varieties in allogamous crop. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1335-1344.
- Jung, J.K., S.W. Park, W.Y. Liu, and B.C. Kang. 2010. Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification. *Euphytica* 175:91-107.
- Ibáñez, J., M.D. Vélez, M.T. Andrés, and J. Borrego. 2009. Molecular markers for establishing distinctness in vegetatively propagated crops: A case study in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 119:1213-1222.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2008a. The Spanish experience (Geslive-Irta) on the enforcement of plant variety rights: DNA-fingerprinting. The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular (Madrid, 16-18 September). BMT/11/12.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2008b. Preparation of guideline for method validation of DNA identification for the enforcement of plant breeder's rights in Japan. The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular (Madrid, 16-18 September). BMT/11/15.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2010. Guideline for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction (BMT Guideline). UPOV, Geneva. UPOV/INF/17/1.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2011. Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity, and stability (DUS). UPOV, Geneva. UPOV/INF/18/1.
- Lee, J.M., S.H. Nahm, Y.M. Kim, and B.D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108:619-627.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, and M. Horai. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breeding* 18:157-169.
- Nagy, I., A. Stágel, Z. Sasvári, Röder M, and M. Ganal. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 50:668-688.
- Portis, E., I. Nagy, Z. Sasvári, A. Stágel, L. Barchi, and S. Lanteri. 2007. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Sci.* 172:640-648.
- Reid, A., L. Hof, G. Felix, B. Rücker, S. Tams, E. Milczynska, D. Esselink, G. Uenk, B. Vosman, and A. Weitz. 2011. Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU common catalogue. *Euphytica* 182:239-249.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Röder, M.S., K. Wendehake, V. Korzun, G. Bredemeijer, D. Laborie, L. Bertrand, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, R.J. Cooke, B. Vosman, and M.W. Ganal. 2002. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106:67-73.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman W.H., San Francisco.
- Varshney, R.K., A. Garner, and M.E. Sorells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends Biotechnol.* 23:48-63.
- Wang, F.G., H.L. Tian, J.R. Zhao, H.M. Yi, L. Wang, and W. Song. 2011. Development and characterization of a core set of SSR markers for fingerprinting analysis of Chinese maize varieties. *Maydica* 56:7-18.
- Yi, G., J.M. Lee, S.H. Lee, D.I. Choi, and B.D. Kim. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 114:113-130.
- Ying, J.Z., Y.F. Shi, Z.G. E, R.Z. Zeng, J. Cheng, and Z.W. Zhu. 2007. Construction and testing of a primary microsatellite database of major rice varieties in China. *Rice Sci.* 14:247-255.