

EST로부터 개발된 SSR 마커를 이용한 상추 유전자원 및 유통품종의 식별

홍지화^{1,2} · 권용삼¹ · 최근진¹ · Raghvendra Kumar Mishra² · 김두환^{2*}

¹농림축산식품부 국립종자원 재배시험과, ²건국대학교 분자생명공학과

Identification of Lettuce Germplasms and Commercial Cultivars Using SSR Markers Developed from EST

Jee-Hwa Hong^{1,2}, Yong-Sham Kwon¹, Keun-Jin Choi¹, Raghvendra Kumar Mishra², and Doo Hwan Kim^{2*}

¹Variety Testing Division, Korea Seed & Variety Service, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Suwon 443-707, Korea

²Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract. The objective of this study was to develop simple sequence repeat (SSR) markers from expressed sequence tags (EST) of lettuce (*Lactuca sativa*) and identify 9 germplasms from 3 wild species of lettuce and 61 commercial cultivars using the developed EST-SSR markers. A total of 81,330 lettuce ESTs from NCBI databases were used to search for SSR and 4,229 SSR loci were identified. The highest proportion (59.12%, 2500) was represented by trinucleotide, followed by dinucleotide (29.70%, 1256) and hexanucleotide (6.62%, 280) among SSR repeat motifs. Totally 474 EST-SSR primers were developed from EST and a random set of 267 primers was used to assess the genetic diversity among 9 germplasms and 61 cultivars. Out of 267 primers, 47 EST-SSR markers showed polymorphism between 7 cultivars. Twenty-six EST-SSR markers among 47 EST-SSR markers showed high polymorphism, reproducibility, and band clearance. The relationship between 26 markers genotypes and 70 accessions was analyzed. Totally 127 polymorphic amplified fragments were obtained by 26 EST-SSR markers and two to nine SSR alleles were detected for each locus with an average of 4.88 alleles per locus. Average polymorphism information content was 0.542, ranging from 0.269 to 0.768. Genetic distance of clusters ranged from 0.05 to 0.94 between 70 accessions and dendrogram at a similarity of 0.34 gave 7 main clusters. Analysis of genetic diversity revealed by these 26 EST-SSR markers showed that the 9 germplasms and 61 commercial cultivars were discriminated by marker genotypes. These newly developed EST-SSR markers will be useful for cultivar identification and distinctness, uniformity and stability test of lettuce.

Additional key words: genetic diversity, genetic relationship, molecular marker, plant variety protection

서 언

상추(*Lactuca sativa* L.)는 국화과(Asteraceae), *Lactuca*속에 속하며 전세계적으로 다양한 형태의 식물 그룹들이 분포되어 있다(Funk et al., 2005). *Lactuca*속에는 약 100개의 종이 있으며 *L. sativa*와 교배가 가능한 야생종으로는 *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*가 보고된 바 있다(Lebeda et al., 2007). 상추는 결구여부, 잎의 형태 등의 형태적인 특성에 따라 결구, 버터헤드, 코스 또는 로메인, 잎, 줄기, 라틴, 기름으로 이용되는 상추로 분류한다(Kristkova et al., 2008). 국내에

는 잎상추와 결구상추가 주로 육성되어 신품종으로 품종보호 출원되고 있으며, 최근에는 로메인 타입의 품종도 육성이 되고 있다. 잎상추의 경우 측면, 치마 계통으로 구분되고 상추 잎몸의 잎맥 모양 및 잎의 색에 따라 청측면, 청치마, 적측면, 적치마로 나누어지고 있다. 상추의 신품종이 품종보호 등록이 되기 위해서는 구별성(distinctness, D), 균일성(uniformity, U), 안정성(stability, S)의 3가지 DUS 요건을 충족해야 되는데, 재배시험 수행 시 가장 중요하고 어려운 부분이 출원품종과 형태적으로 가장 유사한 대조품종을 선정하는 것이다. 또한 채소작물의 경우 2년간(또는 2작기) 재

*Corresponding author: kimdh@konkuk.ac.kr

※ Received 13 April 2013; Revised 12 July 2013; Accepted 31 July 2013.

© 2013 Korean Society for Horticultural Science

배시험이 수행되며, 재배 환경의 영향을 받는 양적형질의 경우 특성조사에 의해 구별성을 판단하기가 어려운 문제가 종종 발생한다. 그러나 분자표지는 재배환경의 영향을 받지 않고 DNA 수준에서 품종간 유전자형을 비교할 수 있으며 많은 품종에 대한 DNA profile 데이터베이스 구축을 통하여 출원품종의 대조품종 선정 등에 활용 가능성을 알아볼 수 있다. International union for the protection of new varieties of plants(UPOV)가 제안하는 분자표지 중 하나인 simple sequence repeat(SSR) 마커는 다중대립유전자를 가지며, 게놈 내에서 위치 특이적이고, 다형성이 높고 반복 실험간에 재현성이 높아 품종식별에 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Esselink et al., 2003; Kalia et al., 2011). 특히 expressed sequence tag(EST) 유래 SSR 마커는 식물의 발현된 유전자를 기반으로 하기 때문에 식물의 형태적 특성과의 상관관계를 높일 수 있고 서로 다른 종간에도 PCR에 의해 특이적 산물을 얻을 수 있다는 연구 보고(Gupta et al., 2003; Semagn et al., 2006)가 있어, 가지와 오이에서 개발된 EST 유래 SSR 마커를 야생종과 재배품종에 대한 유전적 다양성 분석에 활용된 바 있다(Ge et al., 2011; Hu et al., 2010). 상추의 경우 genomic

library 유래 SSR 마커와 EST 유래 SSR 마커를 개발하여 다양성 분석에 활용한 바 있으나(Simko, 2009; Van de Wiel et al., 1999), 기 개발된 마커가 제한적이며 재배종인 *L. sativa*로부터 개발된 EST-SSR 마커 정보가 부족하여 비교적 유전적 다양성이 협소할 것으로 추정되는 국내 유통품종에 대한 품종식별을 위해서는 추가적인 분자표지 개발과 품종식별을 위한 체계적인 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 상추의 품종보호 출원품종에 대한 효과적인 대조품종 선정과 품종보호 심사에 활용 가능성을 알아보기 위하여 상추 EST 데이터베이스로부터 SSR 마커를 개발하고, 이를 이용하여 상추 유전자원과 유통품종에 대한 식별력 및 유전적 다양성을 분석한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료 및 DNA 분리

공시재료 중 유전자원은 국립원예특작과학원으로부터 상추 야생종인 *L. serriola*, *L. saligna* 및 *L. virosa*의 유전자원 9점을 분양 받아 활용하였으며, 유통품종은 국립종자원 재배

Table 1. List of seventy accessions used in this study.

Code	Plant name	Scientific name	Source (Origin)	Classification ²
Sample I				
Germplasms				
1	PI 251798	<i>L. saligna</i>	USA (Italy)	W1
2	PI 253229	<i>L. saligna</i>	USA (Italy)	W1
3	PI 258813	<i>L. saligna</i>	USA (Former Soviet Union)	W1
4	PI 251245	<i>L. serriola</i>	USA (Egypt)	W2
5	PI 251246	<i>L. serriola</i>	USA (Egypt)	W2
6	PI 251247	<i>L. serriola</i>	USA (Egypt)	W2
7	PI 271739	<i>L. virosa</i>	USA (Belgium)	W3
8	PI 273597	<i>L. virosa</i>	USA (Germany)	W3
9	PI 274901	<i>L. virosa</i>	USA (Netherlands)	W3
Sample II				
Cultivars				
10	Joara	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
11	Daepungjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
12	Yeolpungjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
13	Yeolgangjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
14	Hongpungyeoreumchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
15	Icered	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
16	Jeoksagye	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
17	Gangpungjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
18	Hotred	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
19	Rubella2ho	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
20	Sunmangjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
21	Rubella	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
22	Redsunjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR

²W1, *Lactuca saligna*; W2, *Lactuca serriola*; W3, *Lactuca virosa*; LR, Leaf lettuce and red color; LB, Leaf lettuce and black color; OLR, Oak leaf lettuce and red color; OLG, Oak leaf lettuce and green color; LG, Leaf lettuce and green color; RG, Romain lettuce and green color; CG, Crisp lettuce and green color.

Table 1. Continued.

Code	Plant name	Scientific name	Source (Origin)	Classification ^z
23	Seonpungpochabjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
24	Sunpung2ho	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
25	Ttukseomjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
26	Hwahongjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
27	Onpungjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
28	Hapungjeokpogi	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
29	Hartjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
30	Hongpungchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
31	Danpungjeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
32	Ace	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
33	Redstar	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
34	Manchuredstar	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
35	Jeoksamgakchae	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
36	Jeoksamgakchu	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
37	Jinsunhongjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
38	Yeosan hongjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
39	Dabaljeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
40	Misunjeokchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LR
41	Cheongjeongheukchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
42	Mujeokyeoreumheukchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
43	Seonjoheukchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
44	Sakatameokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
45	Eboniblack	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
46	Manpungjachima	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
47	Heukssammeokchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LB
48	Keongangjeokokeu	<i>L. sativa</i>	Korea	OLR
49	Royaljeokokeu	<i>L. sativa</i>	Korea	OLR
50	Keongangcheongokeu	<i>L. sativa</i>	Korea	OLG
51	Evergreen	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
52	Yereumcheongchima	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
53	Ongreen	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
54	Sanggreen	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
55	Topgreen	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
56	Jeilcheongchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
57	Ttuksumcheongchukmyeon	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
58	GrandrapidTBR	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
59	Yeoreumgaerangdambae	<i>L. sativa</i>	Korea	LG
60	Sijeoseugreen	<i>L. sativa</i>	Korea	RG
61	Mansang	<i>L. sativa</i>	Korea	RG
62	Cheonsang	<i>L. sativa</i>	Korea	RG
63	Peoseutgyeolgu	<i>L. sativa</i>	Korea	CG
64	Adam	<i>L. sativa</i>	Korea	CG
65	Wintergreen	<i>L. sativa</i>	Korea	CG
66	Buttikkeu	<i>L. sativa</i>	Korea	CG
67	Eurake	<i>L. sativa</i>	Korea	CG
68	Pungseong	<i>L. sativa</i>	Korea	CG
69	Chirivel	<i>L. sativa</i>	Korea (Netherlands)	CG
70	Sensation	<i>L. sativa</i>	Korea	CG

^zW1, *Lactuca saligna*; W2, *Lactuca serriola*; W3, *Lactuca virosa*; LR, Leaf lettuce and red color; LB, Leaf lettuce and black color; OLR, Oak leaf lettuce and red color; OLG, Oak leaf lettuce and green color; LG, Leaf lettuce and green color; RG, Romain lettuce and green color; CG, Crisp lettuce and green color.

시험과 및 동부지원에 보관된 61품종을 분석을 위한 재료로 활용하였다(Table 1). 공시품종의 DNA는 NucleoSpin[®]PlantII (Macherey-Nagel Cat. 740 770.250) 키트를 이용하여 분리하였다. 분리된 DNA는 분광광도계(NanoDrop2000, Thermo Scientific, USA)를 활용하여 DNA 농도를 확인한 후 μ L당 20ng의 농도로 맞추어 PCR 분석에 사용하였다.

EST-SSR 마커 개발

2011년 7월 1일 기준으로 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에 공개된 상추(*L. sativa*)의 81,330개 ESTs를 다운로드 받은 후 Contig Assembly Program version 3(CAP3) 프로그램(Huang and Madan, 1999)을 이용하여 염기서열을 배열한 후 microsatellite identification(MISA) 프로그램(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)을 활용하여 SSR을 포함하는 EST를 탐색하였다. 탐색 조건으로 염기 motif별로 최소 반복되는 수를 dinucleotide 6번, trinucleotide 5번, tetranucleotide 5번, pentanucleotide 4번, hexanucleotide 4번으로 설정하였다. 최종 탐색된 EST 유래 SSR에 대하여 Primer3 프로그램(Rozen and Skaletsky, 2000)을 이용하여 프라이머를 제작하였다. 프라이머 제작 조건으로 PCR 산물의 크기는 100-300bp, annealing 온도는 50-60°C(적정 55°C), GC%는 50-60%(적정 55%), 프라이머 길이는 18-27bp이었다.

EST-SSR 마커의 다형성 분석

상추 유전자원과 유통품종의 식별에 효과적인 마커를 선발하기 위하여 본 연구에서 개발된 SSR primer를 이용하여 ‘강풍적치마’, ‘아이스레드’, ‘에보니블랙’, ‘탑그린’, ‘선풍포잡적죽면’, ‘치리벨’, ‘에이스’ 총 7품종을 대상으로 다형성을 분석하였다. PCR 반응은 게놈 DNA 20ng, 0.5 μ M의 SSR primer, 2 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)(Genet Bio, Korea)에 증류수를 첨가하여 총 반응액을 25 μ L로 조정하였다. PCR(C1000, BioRad, USA) 증폭은 40회 실시하며, pre-denaturation은 94°C에서 5분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 50-60°C에서 30초, extension은 72°C에서 45초, final-extension은 72°C에서 10분간 수행하였다. PCR을 통한 유전자 증폭 산물은 6% polyacrylamide gels을 이용하여 전기영동한 다음 silver sequence[™] staining reagents(Promega, USA)으로 염색하였고 각 품종별 밴드의 차이를 분석하여 다형성을 보이는 마커를 선발하였다. 다형성을 보이는 마커 중 반복간 재현성이 높고 밴드가 선명한 마커를 선정한 후 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET 중 한가지로 형광 표지하여 마

커 선발 시와 동일한 PCR 반응 및 조건을 이용하여 상추 유전자원 9점과 61품종을 PCR 하였다. 4 μ L의 PCR 증폭산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 증폭 여부를 확인한 후 증류수 220 μ L에 PCR 산물을 증폭량에 따라 1-3 μ L씩 첨가하였다. 희석된 PCR 증폭 산물은 Hi-Di formamide와 size marker(LIZ500 size standard)를 첨가하여 94°C에서 2분간 denaturation시킨 후 자동염기서열 분석장치(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystem, USA)를 활용하여 전기영동하고, GeneMapper(version 3.7) 프로그램(Applied Biosystem, USA)을 이용하여 대립유전자 크기를 분석하였다. 자동염기서열 분석장치를 통해 분석된 대립유전자(피크)의 유무에 따라 유 = 1, 무 = 0로 기록하여 Microsoft Excel(Microsoft, USA) 파일에 공시재료에 대한 분자표지별 DNA 단편의 데이터베이스를 구축하였다.

데이터 분석

최종 선발된 분자표지의 다형성 정도를 조사하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 polymorphism information content (PIC) 값을 산출하였다. 아래 공식에서 P_{ij} 는 마커 i 의 밴드들 중에서 j 번째 공통 밴드 패턴의 빈도수이다(Anderson et al., 1993).

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

공시품종의 유전적 다양성을 분석하기 위하여 NTSYSpc (version 2.10b)(Rohlf, 2000) 컴퓨터 프로그램의 Jaccard 방법에 따라 유전적 유사도 값을 계산한 후 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetical average)(Sneath and Sokal, 1973) 방법을 통해 덴드로그램을 작성하였다.

결과 및 고찰

EST-SSR 마커의 개발

상추의 EST 유래 SSR 마커를 개발하기 위하여 NCBI의 EST 데이터베이스로부터 *L. sativa*의 81,330개 EST sequences를 이용하였다. 81,330개의 EST에 대하여 CAP3 프로그램(Huang and Madan, 1999)을 이용하여 염기서열의 배열을 통해 41,609개의 singletons과 8,452개의 contigs를 조합하였다. 41,609개의 singletons EST 중 SSR motif를 포함하고 있는 EST를 찾기 위하여 MISA 프로그램(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)을 이용하여 분석한 결과 총 4,229개의 SSR을 탐색하였다(Table 2). 4,229개의 SSR의 반복 motif

별 개수는 dinucleotide 1,256개, trinucleotide 2,500개, tetranucleotide 87개, pentanucleotide 106개, hexanucleotide 280개를 나타내어 trinucleotide가 59.12%로 가장 많은 분포를 나타내었고 그 다음으로 dinucleotide 29.70%, hexanucleotide 6.62%, pentanucleotide 2.51%, tetranucleotide 2.06%의 분포를 나타내었다. SSR motif별 빈도의 경우 dinucleotide를 가지는 주요 motif는 TC 6.76%, CT 4.80%, GA 4.33%, AG 4.26%,

AC 2.15% 순으로 조사되었다. Trinucleotide의 주요 motif는 GAT 4.30%, GGT 4.11%, GAA 3.38%, TGA 2.72% 순으로 나타났으며, tetranucleotide의 주요 motif는 ATCA 0.19%, TGAA/TTTA 0.14% 순으로 나타났다(Table 3). 이러한 연구결과는 EST 유래 SSR 마커를 개발하였을 때 trinucleotide와 dinucleotide가 높은 빈도로 출현함을 보고한 Simko(2009)의 연구결과를 확인할 수 있었다. 그러나 dinucleotide의 경우 AG 및 CT가 많이 존재함을 보고한 Simko(2009)의 연구결과와 다소간의 차이를 나타내었는데, 이 원인은 분석한 EST의 source가 다른 데서 나타난 결과로 사료된다.

EST의 SSR flanking 부분을 증폭하기 위하여 3,906개의 SSR에 대하여 프라이머를 제작한 결과 총 474개의 프라이머의 제작이 가능한 것으로 분석되었다. 제작된 474개의 프라이머 중 dinucleotide 176개, trinucleotide 69개, tetranucleotide 1개, pentanucleotide 2개, compound formation 226개로 나타났다. 프라이머 제작 조건에 맞지 않는 SSR과 SSR의 앞뒤 말단에 염기서열이 짧은 경우 프라이머 제작이 되지 않은 것으로 사료되며 이러한 연구결과는 Van de Wiel et al. (1999)에 의해 보고된 바 있다.

Table 2. Summary of the *in silico* search for EST-SSRs in *L. sativa*.

Parameters used in screening	Data generated by MISA ^z
Total number of sequences examined	41609
Total size of examined sequences (bp)	28325253
Total number of identified SSRs	4229
Dinucleotide	1256
Trinucleotide	2500
Tetranucleotide	87
Pentanucleotide	106
Hexanucleotide	280

^zMISA, Microsatellite identification tool.

Table 3. Number and frequency of major repeat motifs of EST-SSR in lettuce.

Repeat motif	Number	Frequency (%)	Repeat motif	Number	Frequency (%)
Total	4,229				
Dinucleotide	1,256		Tetranucleotide	87	
TC	286	6.76	ATCA	8	0.19
CT	203	4.80	TGAA/TTTA	6	0.14
GA	183	4.33	AAGA/GAAG/AATG/TGCT	4	0.09
AG	180	4.26	CATC/CCTC/TCTT/TTGT/TTTC	3	0.07
AC	91	2.15			
TG	75	1.77	Pentanucleotide	106	
TA	67	1.58	TTGAT/TTTTA	6	0.14
AT	62	1.47	ATATG/GAAGA	5	0.12
GT	60	1.42	TGTCA	4	0.09
CA	49	1.16	AAACC/ATGGA/ATTGA/TGATC/TTCAA/TTGGT	3	0.07
Trinucleotide	2,500				
GAT	182	4.30	Hexanucleotide	280	
GGT	174	4.11	CATCTT	7	0.17
GAA	143	3.38	CATCAC	6	0.14
TGA	115	2.72	CGAGAG/ACCAAC	5	0.12
AGA	104	2.46			
ACC	102	2.41	AAAGAA/ACAACC/CAACAC/CACCAT/CCATCA/CTCTTT/GATGAA/GCCACC	4	0.09
ATG	95	2.25			
ATC	87	2.06			
TGG	83	1.96			
TTC	80	1.89			

Table 4. Characterization of 26 polymorphic EST-SSR markers developed in this study.

Primer name	EST/Contig ID	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Product size (bp) of <i>L. sativa</i>	Product size (bp) of <i>L. saligna</i>	Product size (bp) of <i>L. serriola</i>	Product size (bp) of <i>L. vifrosa</i>	No. of alleles	PIC ² value
KSL-1	CLSS10849	(CAA) ₁₀	F: CACCACTCCATTTTCATGCCA R: GCTCATTCCTCCAAACCCAGAT	55	159-171	165	165	159-171	4	0.269
KSL-37	CLSM1424	(AGA) ₁₅	F: TCTCTGGCTCCAATACCCGA R: GTATCGGGCTCATGTCCCTT	55	125-155	no	149	131-134	8	0.728
KSL-51	CLSZ1624	(ATG) ₁₀	F: CCCCTACCACCCACAAAGTC R: TACCAAATGACATGCACCCC	55	184-202	184-202	184-202	196-202	4	0.503
KSL-271	CLSS8197	(ATG) ₁₂	F: ACAAGGGAAGATTGGTCA R: GCGGATATGACAGCATAACA	55	231-249	237-246	237-249	231-249	5	0.541
KSL-316	QG8F02	(AAT) ₁₁	F: CGAGCCTTCAAACCTACCA R: AGCAACTGAAATCCAAACCCC	55	251-281	272	272	251-272	3	0.506
KSL-317	QG8E09	(ATG) ₁₁	F: TGTGGATCTGAATGGGCATC R: TGCAAGATGTTGGCTTCCT	55	236-251	251	251	236-251	3	0.513
KSL-357	CLSS10992	(TGA) ₁₄	F: GCAGCAACAAGAAACCCAAA R: GCCCAACATCATCATCATC	55	246-282	282	282	246-282	3	0.374
KSL-87	CLSY5704	(CT) ₁₇	F: GCGGGATCGATACTACCCCT R: ATCATCGACGGGCTTTCTT	55	256-272	268	266-270	264-272	8	0.704
KSL-173	CLSM444	(CT) ₁₄	F: ATAGTCAGACTCACGCCCA R: CCAATTTCTCTTTCTGCGA	55	151-165	159	157-159	151-155	6	0.691
KSL-245	CLSM513	(AG) ₁₆	F: CTTACCTCCGGAATCCTGT R: GAGCACGACTGCCAATTTAG	55	262-294	269-277	275-277	262-294	6	0.387
KSLC-4	A35	(GGT) ₅	F: TGGGGAAACATCAAAACAC R: ACTTCGACCCCAATAGGG	55	196-217	196-199	196	199-217	4	0.419
KSLC-30	B14	(CA) ₆	F: GGGCCTCTATCCACTCA R: AAAGTCCAGCCATCTGTCC	55	162-164	162-164	162	162-164	2	0.469
KSLC-322	L146	(TTATA) ₄	F: CTCCTCCGGAAACTATGGA R: TCTCAACACAAACCCACC	55	285-300	290-300	290	285-290	3	0.318
KSL-7	CLSS10499	(TCT) ₁₂	F: TGCTCAATCTCGAGCTTATCCT R: ATGTGCCCAACAGGAAGACA	55	378-414	378-393	378-393	393-415	3	0.447
KSL-26	CLSM14994	(TC) ₁₆	F: GGGCTTCTCTCTCTCTCTCTT R: AATTTGGATCTGTCCGAGGG	55	300-321	309-321	309-319	300-303	9	0.768
KSL-32	CLSM14764	(CT) ₁₄	F: CGGGAGCATTAGTGTGTG R: AATTTGGGTCGAGTTTGTG	55	204-218	212-216	212-216	204-218	6	0.690
KSL-43	CLSM1373	(ATC) ₉ (TTC) ₈	F: GAGCAACCTTTACCAGCA R: TCATTCATTCATTTGGGTG	55	257-272	269-272	272	257-272	3	0.447
KSL-44	CLSM13555	(TCACCA) ₄ (tcat)(CATCAC) ₅ (catcg)(CCATCA) ₅	F: CGATTCTTCACTCCACCT R: CTGCAATCGTCCAGTTCC	55	192-252	229-241	241	192-252	5	0.512
KSL-75	CLSY7906	(TC) ₆ (TT) ₆	F: AGAGGCTTCTACGCCAACCC R: TGAGGAGGGGAAAGTTCAATC	55	203-209	205-207	205-207	202-209	4	0.528
KSL-83	CLSY6646	(AG) ₆ (gtg)(GA) ₇ (aa)(GT) ₆	F: GCGGAGCTTCTTCTCACCT R: GGCTCTTTCTCTCGCCCTG	55	249-287	249-287	287	256-287	5	0.394
KSL-92	CLSY517	(CT) ₂₀	F: GAAAAGAAACCGCATTTGGAG R: TCGGTTCTGAAGTAGCCAT	55	174-196	188-196	184-192	174-192	8	0.757
KSL-97	CLSY4815	(CT) ₁₁	F: CGAGAAAAGGGATCAGACA R: TCAGAGACTGCCAAAAGGA	55	220-232	223-232	223	220-232	4	0.644
KSL-115	CLSM11208	(CT) ₁₁	F: CATTGCACTCCGTCATCTCC R: GGGTTGATTCGAAAGTTCC	55	210-240	210-212	210	232-240	4	0.534
KSL-119	CLSM10279	(TC) ₁₆	F: TTCGACTCGTTCGACGC R: CGATGTCACACCACCAATCT	55	271-285	271-281	273-275	273-285	7	0.716
KSL-123	CLSL2393	(ATC) ₁₃	F: ATTGTAACITCTGCGGCCCT R: GCCTACATGTTCTTCCCTC	55	336-360	336-360	351	336-351	5	0.510
KSL-137	CLSZ3622	(TGA) ₉ (caatgatgaaacaatgatgcagagggcaatgatgatgctggagatg aagattctcaggaagagggagag)(GA) ₇ (gaaagaccctgtaagaga tctaaggcaaatgtaactcaagacc)(GAT) ₇ (gacgagacc)(GAT) ₆	F: TTCTCTGAGCTTCAAAAGAGGG R: TCATCACCATCATCATTTTCCC	55	281-299	281-299	281-293	290-299	5	0.729
Total									127	
Mean									4.88	0.542

² PIC: Polymorphism information content.

EST-SSR 마커의 다형성 분석

상추 유전자원과 유통품종의 식별에 적합한 분자표지를 선발하고자 본 연구에서 개발된 EST-SSR 마커 중 267개의 마커를 대상으로 PCR을 수행 후 polyacrylamide gels에 전기영동한 다음 다형성 여부를 조사한 결과, 267개 마커 중 47개 마커가 ‘강풍적치마’ 등 7품종 내에서 다형성을 나타내었다. 1차로 선발된 다형성을 보이는 47개 마커 중 밴드 패턴이 선명하고, 반복 실험간 뚜렷한 재현성을 보이는 26개의 마커를 최종 선발하여 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET 중 한가지로 형광 표지한 다음 상추 유전자원 9점과 61품종에 대한 다형성 정도를 조사하였다(Table 4). 총 26개의 EST-SSR 마커에 의해 분석된 대립유전자의 수는 127개였으며, 대립유전자의 수는 마커별로 2-9개로 나타나, 마커당 평균 대립유전자의 수는 4.88개로 나타났다. 총 26개 마커별로 유전적 다양성 정도를 나타내 주는 PIC 값의 분포는 0.269-0.768이었으며, 평균 PIC 값은 0.542로 조사되었다(Table 4). SSR 마커를 이용한 상추의 대립유전자의 수 및 PIC값에 대한 연구 결과로 Van de Wiel et al.(1999)는 6개 품종을 28개의 genomic-SSR 마커로 분석하였을 때 대립유전자 1-6개(평균 3.5개), PIC는 0.55를 보고하였고, Simko (2009)는 96개의 유전자원을 61개의 EST-SSR 마커로 분석 시 대립유전자 2-8개(평균 3.56개), heterozygosity는 0.32로 나타남을 보고한 바 있다. Rauscher and Simko(2013)는 33 품종과 3개의 유전자원을 32개의 genomic-SSR 마커를 이용하여 분석하였을 때 대립유전자 수는 1-19개(평균 5.5개)로 나타났으며, heterozygosity는 0.56를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구 결과는 Van de Wiel et al.(1999)와 Simko(2009)의 대립유전자 수보다는 많았으나 Rauscher and Simko(2013)의 대립유전자 수(평균 5.5개)보다는 적게 나타났다. 이러한 결과는 품종식별에 활용된 마커의 종류가 다르고, 분석에 사용된 종 및 품종의 유전적 다양성 정도가 다르기 때문에 나타난 결과로 추정된다.

한편 EST에서 유래된 SSR 마커는 게놈의 발현된 부위의 염기서열을 기반으로 개발된 마커이기 때문에 genomic library 유래 SSR 마커에 비해 관련 종간에 공통적으로 존재하기 때문에 이종간에 상호 활용 가능성이 높다고 알려진 바 있다(Scott et al., 2000). 실제 *L. sativa*로부터 개발된 EST-SSR 마커의 종간 활용 가능성에 대한 연구결과에 의하면 *L. serriola*, *L. saligna* 및 *L. virosa* 종으로의 마커 증폭율이 각각 100%, 87%, 75%인 것으로 보고된 바 있다(Simko, 2009). 본 연구에서 최종 선발된 *L. sativa*의 EST 유래 SSR 마커도 야생종인 *L. saligna*, *L. serriola*, *L. virosa*에서 특이적인 증폭 산물을 얻을 수 있는 것으로 나타나 향후 상추 야생종의 유전적

다양성 분석에도 효과적인 것이라 판단된다. 또한 EST-SSR 마커는 genomic-SSR 마커에 비해 PCR 증폭반응이 안정적일 뿐만 아니라 밴드 또한 선명하기 때문에 다형성이 높은 마커를 선발한다면 보다 정밀도 높은 품종 지문화에 효과적인 것으로 보고된 바 있는데(Leigh et al., 2003; Simko, 2009), 본 연구에서도 선발된 EST-SSR 마커를 이용하여 품종식별에 활용 시 PCR 반응이 안정적이었으며 자동염기서열분석기를 이용하여 대립유전자의 크기를 분석할 때 각 분자표지별 대립유전자 크기의 판독이 용이하여 Leigh et al.(2003)과 Simko(2009)의 연구결과를 확인할 수 있었다.

상추 유전자원과 유통품종의 유전적 유사도

26개의 EST-SSR 마커를 이용하여 유전자원 9점과 상추 61품종에 대한 유전적 유사도를 분석하였다(Fig. 1). 공시재료의 유사도 지수는 0.05-0.94를 나타내었고 유사도 지수 0.34를 기준으로 할 때 7개의 주요 그룹으로 분류되었다. 제I그룹에는 잎상추 중 적색상추가 그룹화 되었으며, 제II그룹에는 잎상추 중 잎몸에 엽절이 있는 오크립 상추가 그룹화 되었다. 제III그룹은 잎상추 중 청색상추와 흑색상추가 속하였으며, 유사도 지수 0.37에서 청색상추군(III-1)과 흑색상추군(III-2)으로 재구분하였다. 제IV그룹에는 결구상추 8품종, 로메인 상추 2품종 및 청색 잎상추 2품종이 그룹화 되었으며, 제V그룹에는 상추 야생종인 *L. saligna*(PI251798, PI253229, PI258813)와 *L. serriola*(PI251245, PI251246, PI251247)가 속하였으며, *L. virosa*(PI271739, PI273597, PI274901)는 제VI그룹과 VII그룹에 포함되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 분자표지를 활용하여 상추 유전자원 9점과 61개 유통품종을 분석하여 군집 분석하였을 때 유전적 유사도에 따라 유전자원인 PI계통과 국내 유통품종으로 크게 대별되었으며 상추 유통품종의 경우 결구형태, 잎색깔, 잎몸의 엽절 여부에 따라 그룹화되는 것으로 나타났으며 분자표지에 의해 공시재료가 모두 식별이 되었다. 잎상추는 색깔에 상관없이 두 개의 그룹을 형성한 것으로 보고된 바 있어(Simko, 2009) 본 연구 결과와 상이한 경향을 나타내었다. 이는 잎상추 외에도 결구, 버터헤드, 라틴, 로메인, 줄기 상추 등의 다양한 계통의 유전자원과 함께 분석이 되어 공시재료의 유전적 다양성 정도 및 분석에 사용된 분자표지가 다른 데서 나타난 결과로 추정된다. 또한 공시품종 중 로메인 상추로 알려진 ‘시저스그린’, ‘만상’, ‘천상’ 중 ‘시저스그린’은 청색상추군(제III-1)에 포함되었고, ‘만상’ 및 ‘천상’은 결구상추군(제IV)에 포함되었는데 ‘만상’의 경우 육성 시에 결구상추인 ‘Late Texasgreen’을 모본으로 활용하여 결구상추 그룹에 속한 것으로 추정되며, ‘천상’의 경우 반결구 상추인 ‘PI342539’

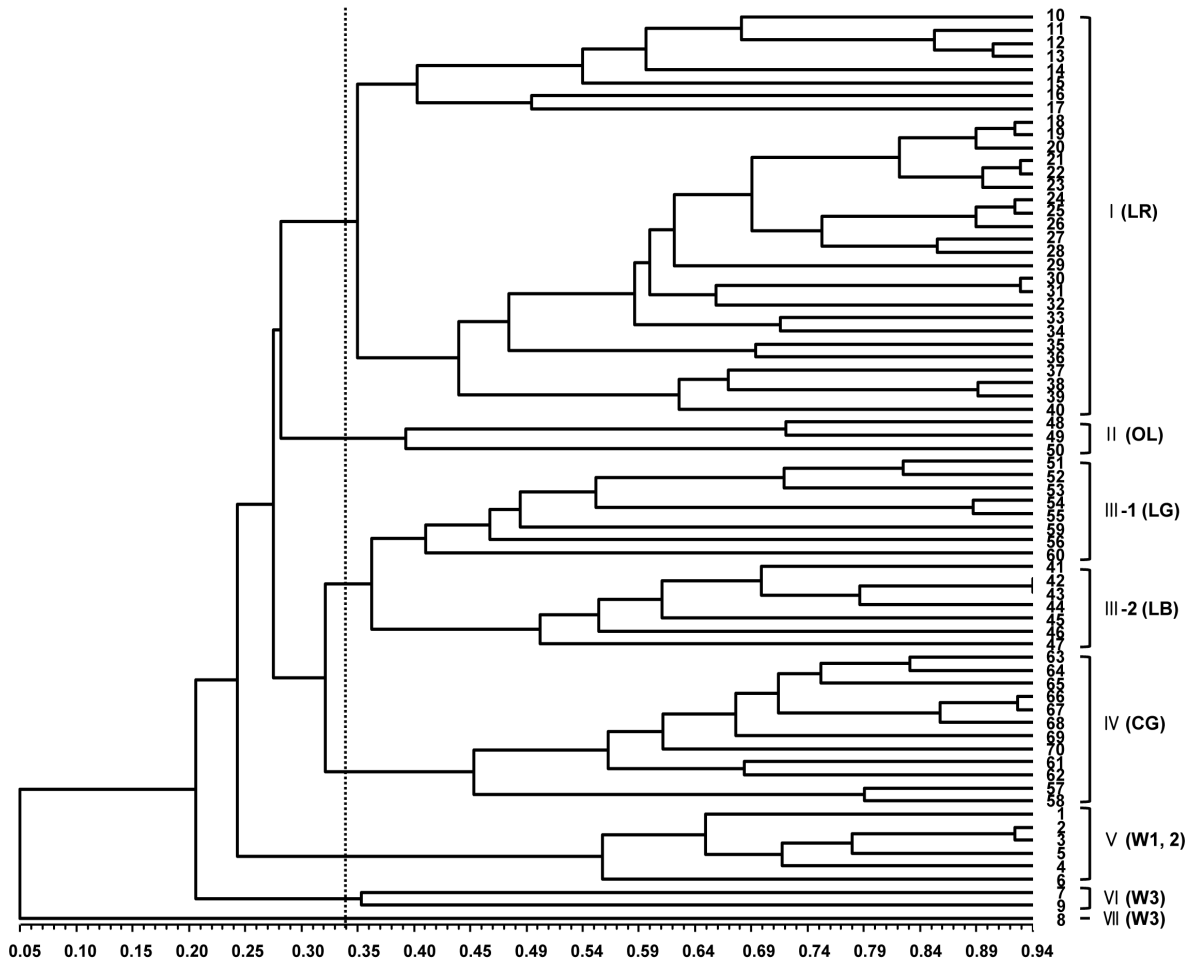


Fig. 1. Dendrogram constructed based on Jaccard's similarity coefficient from EST-SSR data on 70 lettuce accessions. The numbers (1 to 70) at right side refer to the list of germplasms and cultivars in Table 1. LR, Leaf lettuce and red color; OL, Oak leaf lettuce; LG, Leaf lettuce and green color; LB, Leaf lettuce and black color; CG, Crisp lettuce and green color; W1, *Lactuca saligna*; W2, *Lactuca serriola*; W3, *Lactuca virosa*.

를 모본으로 활용하였기 때문에 결구상추 그룹에 속한 것으로 추정된다. 청색 잎상추인 ‘뚝섬청측면’, ‘그랜드래피드TBR’ 품종은 청색상추군에 포함되지 않고, 결구상추군에 포함되었는데, 두 품종의 육성에 활용된 유전자원에 대한 정확한 정보가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다. 상추 유전자원에 대한 유전적 다양성 분석 결과로 Van de Wiel et al.(1999)에 의하면 *L. sativa*는 *L. serriola*와는 유사도가 높았으나 *L. saligna*와 *L. virosa*와는 유사도가 낮은 것으로 보고된 바 있으며, *L. sativa*는 *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa* 순으로 유사도가 높다고 Rauscher and Simko(2013)에 의해 알려진 바 있다. 본 연구에 활용된 *L. saligna*, *L. serriola* 유전자원의 경우 하나의 그룹으로 그룹핑되어 두 가지 종과 *L. sativa*의 유사도를 비교할 수는 없지만, *L. virosa*와는 유사도가 낮게 분석된 점은 기존의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

공시품종 중 육성내역이 알려진 상추 품종에 대한 유전적 유

사도를 살펴보면, ‘조아라’는 적색이 우수한 계통인 ‘KN97301’과 ‘열풍적치마’의 교배로 육성되었으며, ‘조아라’와 ‘열풍적치마’의 유사도는 0.68로 조사되었다. ‘햇레드’는 엽색이 우수한 계통인 ‘KN97435’와 ‘선풍포참적측면’의 교배로 육성되었으며, ‘햇레드’와 ‘선풍포참적측면’의 품종간 유사도는 0.82로 나타났다. 본 연구에 이용된 품종 중에서 ‘열풍적치마’/‘열강적치마’, ‘햇레드’/‘루벨라2호’, ‘루벨라’/‘레드선적측면’, ‘선풍2호’/‘뚝섬적측면’, ‘홍풍치마’/‘단풍적치마’, ‘무적여름흑치마’/‘선조흑치마’, ‘부띠끄’/‘유레이크’ 품종의 유사도는 0.90 이상으로 이들 품종들은 적색 치마상추, 적색 측면상추, 흑색 치마상추, 결구 상추끼리 유사도가 높게 분석되어 일반적으로 인식되는 상추의 형태적 특성과 유사한 양상을 나타내었다. 이는 품종 육성에 형태적으로 유사한 유전자원을 이용하였기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 특히 ‘무적여름흑치마’와 ‘선조흑치마’는 유사도가 0.94로 가장 높게 분석되었는데 두 품종을 재배시험을 통해 형태

적 특성을 조사한 결과 형태적으로도 매우 유사한 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 26개의 분자표지와 국립종자원 상추 특성조사 요령에 따라 기 공시된 품종의 형태적 특성이 정밀하게 조사되어, 분자표지와 형태적 특성과의 상관관계가 구체적으로 밝혀진다면, 국내외 유통되고 있는 상추 품종의 관리와 품종보호 출원품종에 대한 새로운 심사기법 개발 등의 분야에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

UPOV 산하 기술위원회인 BMT(The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular)에서는 품종식별 및 품종보호 심사에 분자표지 활용에 대한 논의를 하고 있으며 DNA profile 데이터베이스 구축의 표준화 방안을 마련하기 위해 BMT 가이드라인(UPOV, 2010)과 분자생물학 기술을 품종심사 제도에 활용하는 방안에 대한 문서(UPOV, 2011b)를 제정하였다. 실제 유럽에서는 토마토 500품종 이상(Bredemeijer et al., 2002)과 감자 892품종 이상(Reid et al., 2011), 중국에서는 옥수수 200품종 이상(Wang et al., 2011)에 대한 품종별 DNA 데이터베이스를 구축하여 품종보호 재배심사에 활용하고 있다. 상추의 경우 프랑스에서 500품종 이상의 품종을 대상으로 30개의 SSR 마커를 활용하여 DNA profile 데이터베이스를 구축하여 기존품종의 관리에 활용 가능성을 연구하고 있다(UPOV, 2011a).

본 연구에서는 상추 EST로부터 SSR 마커를 개발하고 이를 활용하여 상추 유전자원과 국내 유통품종을 대상으로 자동염기서열분석기를 이용하여 정밀도 높은 유전자 분석을 하였을 때 공시된 유전자원과 유통품종이 분자표지에 의해 구분됨을 확인할 수 있었다. 향후 이 결과를 활용하여 형태적 특성 결과와 분자표지와 특성과의 상관관계가 구체적으로 밝혀진다면 상추 품종보호 출원품종의 대조품종 선정과 품종보호 침해 또는 중자분쟁 발생시에 이를 해결할 수 있는 근거자료로 매우 유용하게 활용될 것이며, 본 연구를 통해 개발된 마커는 상추의 유전자 지도 작성 및 분자육종 등의 다양한 분야에도 효과적으로 활용될 것으로 기대된다.

초 록

본 연구의 목적은 상추(*Lactuca sativa*)의 expressed sequence tag(EST)로부터 simple sequence repeat(SSR) 마커를 개발하고, 개발된 EST-SSR 마커를 이용하여 상추의 3가지 야생종의 유전자원 9점과 61개의 유통품종을 식별하는 것이다. NCBI 데이터베이스로부터 총 81,330개의 상추 EST를 대상으로 SSR을 탐색하였고, 총 4,229개의 SSR을 발견하였다.

SSR의 반복 motif 중 trinucleotide(59.12%, 2,500개)가 가장 많았고, 그 다음으로 dinucleotide(29.70%, 1,256개), hexanucleotide(6.62%, 280개) 순의 분포를 나타내었다. EST로부터 총 474개의 EST-SSR primers를 개발하였고, 이 중 267개의 primer를 9점의 유전자원과 61품종에 대한 유전적 다양성 평가에 활용하였다. 267개의 마커 중 47개의 EST-SSR 마커가 7개 품종 내에서 다형성을 보였으며, 이 중 다형성 정도와 반복 재현성 및 밴드의 선명성을 고려하여 26개의 EST-SSR 마커를 선발하였다. 최종 선발된 26개의 SSR 마커를 이용하여 70개 공시재료를 분석한 결과 대립유전자 수는 총 127개였으며, 최소 2개에서 9개의 분포를 나타내었으며 마커당 평균 대립유전자 수는 4.88개를 나타내었다. PIC 평균값은 0.542로 나타났으며, 0.269-0.768의 범위를 나타내었다. 70개 공시재료의 유전적 거리는 0.05-0.94로 나타났으며, 유사도 지수 0.34를 기준으로 할 때 7개의 주요 그룹으로 나누어졌다. 26개의 EST-SSR 마커를 이용한 유전적 다양성 분석 결과 9점의 유전자원과 61개의 유통품종이 마커의 유전자형에 의해 모두 식별이 되었다. 본 연구를 통해 신규 개발된 EST-SSR 마커는 상추의 품종식별과 구별성, 균일성, 안정성 검정에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

추가 주요어 : 유전적 다양성, 유전적 유연관계, 분자표지, 식물품종보호

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.
- 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. Wickert, 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.M. 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.
- Funk, V.A., R.J. Bayer, S. Keeley, R. Chan, L. Watson, B. Gemeinholzer, E. Schilling, J.L. Panero, B.G. Baldwin, N. Garcia-Jacas, A. Susanna, and R.K. Jansen. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skr.* 55:343-374.
- Ge, H., H. Li, Y. Liu, X. Li, and H. Chen. 2011. Characterization of novel developed expressed sequence tag (EST)-derived simple sequence repeat (SSR) markers and their application in

- diversity analysis of eggplant. *African J. Biotechnol.* 10:9023-9031.
- Gupta, P.K., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar, and H.S. Balyan. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol. Genet. Genomics* 270:315-323.
- Hu, J., J. Li, F. Liang, L. Liu, and S. Si. 2010. Genetic relationship of a cucumber germplasm collection revealed by newly developed EST-SSR markers. *J. Genet.* 89:28-32.
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-877.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2010. UPOV/INF/17/1 Guideline for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (BMT guideline). UPOV, Geneva.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2011a. BMT/13/12 The use of molecular markers for the lettuce species. UPOV, Brasilia.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). 2011b. UPOV/INF/18/1 Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity, and stability (DUS). UPOV, Geneva.
- Kalia, R.K., M.K. Rai, S. Kalia, R. Singh, and A.K. Dhawan. 2011. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309-334.
- Kristkova, E., I. Dolezalova, A. Lebeda, V. Vinter, and A. Novotna. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Hort. Sci. (Prague)* 38:113-129.
- Lebeda, A., E.J. Ryder, B. Grube, I. Dolezalova, and E. Kristkova. 2007. Lettuce (Asteraceae; *Lactuca* spp.), p. 377-472. In: R.J. Singh (ed.). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Leigh, F., V. Lea, J. Law, P. Wolters, W. Powell, and P. Donini. 2003. Assessment of EST- and genomic microsatellite markers for variety discrimination and genetic diversity studies in wheat. *Euphytica* 133:359-366.
- Rauscher, G. and I. Simko. 2013. Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC Plant Biol.* 13:11.
- 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.
- Rozen, S. and H.J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, p. 365-386. In: S. Krawetz and S. Misener (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N.J.
- Scott, K.D., P. Eggler, G. Seaton, M. Rosetto, E.M. Ablett, L.S. Lee, and R.J. Henry. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 100:723-726.
- Semagn, K., Å. BjØrnstad, and M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African J. Biotechnol.* 5:2540-2568.
- Simko, I. 2009. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Hered.* 100:256-262.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification, Freeman W.H., San Francisco.
- Van de Wiel, C., P. Arens, and B. Vosman. 1999. Microsatellite retrieval in lettuce. *Genome* 42:139-149.
- 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.