

## Analysis of Genetic Relationship of Apple Varieties using Microsatellite Markers

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

Variety Testing Division, Korea Seed and Variety Service, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Suwon 443-400, Korea

Received January 17, 2013 / Revised April 18, 2013 / Accepted May 30, 2013

The objective of this study was to evaluate the suitability of microsatellite markers for variety identification in 42 apple varieties. For microsatellite analysis, 305 primer pairs were screened in 8 varieties and twenty six primer pairs showed polymorphism with clear band pattern and repetitive reproducibility. A total of 165 polymorphic amplified fragments were obtained in 42 varieties using 26 markers. Two to twelve alleles were detected for each locus with an average of 6.4 alleles per locus. A value of polymorphism information content (PIC) ranged from 0.461 to 0.849 with an average of 0.665. A total of 165 marker loci were used to calculate Jaccard's distance coefficients using unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA) cluster analysis. Genetic distance of cluster ranged from 0.27 to 1.00. Analysis of genetic relationship revealed that these 26 microsatellite marker sets discriminated a total of 41 varieties except for 1 variety among 42 varieties. These markers will be utilized as molecular data in variety identification of apple.

**Key words** : Apple, genetic relationship, genotype, microsatellite marker, variety identification

### 서 론

사과(*Malus x domestica* Borkh.)는 장미과(Rosaceae), *Malus* 속으로 경제적으로 중요한 온대 작물이다[2]. 사과는 교배육종과 변이선발에 의해서 육종이 되며 국내에 품종보호 등록된 품종수는 43품종으로 과수작물 중 복숭아 다음으로 많은 비중을 차지하고 있다(<http://www.seed.go.kr>). 사과의 신품종이 품종보호 등록되기 위해서는 구별성(D, distinctness), 균일성(U, uniformity), 안정성(S, stability)의 3가지 기술적 요건을 갖추어야 한다. 과수 작물의 경우 DUS 검정시 육종가 포장에서 특성조사를 하기에 형태적 특성을 조사하는데 많은 시간이 소요되며 출원품종과 유사한 대조품종을 선정하는데 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 품종을 식별할 수 있는 분자표지 개발과 품종들 간의 유연관계 분석이 필요한 실정이다.

분자표지는 재배환경의 영향을 받지 않고 DNA 수준에서의 품종 간 DNA profile을 비교할 수 있어 형태적 특성과 유전적인 변이와의 관계를 추정할 수 있는 효과적인 수단으로 사용되어 왔다[17]. 국제 신품종 보호동맹(UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants)이 제안하는 분자표지 중 하나인 microsatellite 마커 또는 simple se-

quence repeat (SSR) 마커는 다형성이 높고 반복 실험간에 재현성이 높으며 공우성 마커(co-dominant)로서 유전적 다양성 분석 등에 효과적인 것으로 보고된 바 있다[7, 15]. 국내에서도 microsatellite 마커를 활용하여 사과의 유전적 다양성 분석을 수행한 바 있으나[3], 아크릴아마이드 젤 전기영동을 통한 대립유전자 검출 방법을 활용하였기 때문에 PCR 증폭 산물의 크기를 정확하게 추정하기 어려울 뿐만 아니라 품종별 데이터 베이스를 구축하기가 단순하지 않은 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 사과의 품종보호 출원품종에 대한 효과적인 대조품종 선정에 위한 체계설정과 향후 품종보호 권리침해 및 분쟁 발생시 효과적인 대응방안을 마련하고자 microsatellite 마커를 이용하여 사과 42품종에 대한 유전적 유연관계를 분석한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 공시품종 및 DNA 분리

국립종자원 서부지원에 수집된 42품종의 잎을 샘플링하여 분석을 위한 재료로 활용하였다(Table 1). 공시품종의 DNA는 NucleoSpin<sup>®</sup>Plant II (Macherey-Nagel Cat. 740 770.250) 키트를 이용하여 분리하였다. 분리된 DNA는 1.2% 아가로스 젤에 전기영동하여 DNA 농도를 확인한 후  $\mu$ l 당 20 ng의 농도로 희석하여 PCR 분석에 이용하였다.

#### PCR 및 유전자형 분석

사과 품종식별에 효과적인 마커를 선별하기 위하여 국외에서 개발된 305개의 microsatellite 마커를 이용하여 'Fuji', 'Jonathan', 'Wangrim', 'Jonagold', 'Sinanosweet', 'Indo',

#### \*Corresponding author

Tel : +82-31-8008-0221, Fax : +82-31-203-7431

E-mail : hongjh19@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Apple varieties used for genetic relationship using microsatellite markers

| No. | Variety name           | Parentage   | Origin      |
|-----|------------------------|---|-------------|
| 1   | Mikwang                | 77349 x JulyRed   | USA         |
| 2   | Johong                 | NJ53 line   | USA         |
| 3   | Hac9                   | Fuji x Tsugaru  | Japan       |
| 4   | Summer King            | Fuji x Golden Delicious   | Korea       |
| 5   | Raritan                | Unknown   | Unknown     |
| 6   | Redprince              | Unknown   | Unknown     |
| 7   | Rinka                  | Tsugaru x Sansa   | Japan       |
| 8   | Chuk                   | Unknown   | Unknown     |
| 9   | Hye                    | Unknown   | Unknown     |
| 10  | Wonkyo Ga Dangwagi 1ho | Starkrimson x McIntosh Wijcik                                     | Korea       |
| 11  | Hongro                 | Spur Earliblaze x Spur Golden Delicious                           | Korea       |
| 12  | Tsugaru                | Golden Delicious x Jonathan                                       | Japan       |
| 13  | Jonathan               | Esopus Spitzenberg x unknown                                      | USA         |
| 14  | Hongwol                | Golden Delicious x Jonathan                                       | Japan       |
| 15  | Arisoo                 | Yanggwang x Cheonchu  | Korea       |
| 16  | Chukwang               | Fuji x Mollie's Delicious   | Korea       |
| 17  | Myrared Fuji           | Unknown   | Unknown     |
| 18  | Shinanosweet           | Fuji x Tsugaru  | Japan       |
| 19  | Fuji                   | Ralls Janet x Delicious   | Japan       |
| 20  | Hwarang                | Variation of Fuji   | Korea       |
| 21  | Bukdu                  | Fuji x Yuko   | Japan       |
| 22  | Himekkami              | Fuji x Jonathan   | Japan       |
| 23  | Korin                  | Fuji x unknown  | Japan       |
| 24  | Aidazone               | Unknown   | Unknown     |
| 25  | Redgold                | Unknown   | Unknown     |
| 26  | Segyeil                | Delicious x Golden Delicious                                      | Japan       |
| 27  | Starkrimson            | Unknown   | Unknown     |
| 28  | Cheonchu               | Donggwang x Fuji  | Japan       |
| 29  | Hwahong                | Fuji x Segyeil  | Korea       |
| 30  | Gala                   | Unknown   | Unknown     |
| 31  | Jazz                   | Unknown   | Unknown     |
| 32  | Scilate                | Royal Gala x Braburn  | New Zealand |
| 33  | Golden                 | Unknown   | Unknown     |
| 34  | Spurgolden             | Unknown   | Unknown     |
| 35  | Yuko                   | Golden Delicious x Indo   | Japan       |
| 36  | Jonagold               | Golden Delicious x Jonathan                                       | USA         |
| 37  | Wangrim                | Unknown   | Unknown     |
| 38  | Wangryeong             | Golden Delicious x Delicious                                      | Japan       |
| 39  | Alpsotome              | Chance seedling discovered in mixed planting of Fuji and Jonathan | Japan       |
| 40  | Indo                   | Unknown   | Unknown     |
| 41  | Gagayagye              | Unknown   | Unknown     |
| 42  | Jinhong                | Red Field x Jonathan  | Korea       |

'Hwahong', 'Golden' 품종을 대상으로 유전자형(genotype)을 분석하였다. PCR 반응은 사과 게놈 DNA 20 ng, 0.5  $\mu$ M의 SSR primer, 2  $\mu$ l dNTP mixture (2.5 mM), *Taq* polymerase 1 units, 2.5  $\mu$ l의 10x PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) (Genet Bio, Korea)에 증류수를 첨가하여 총 반응액을 25  $\mu$ l로 조정하였다. PCR은 Tprofessional<sup>TM</sup> thermocycler (Biometra, Germany)에서 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 전기영동 한 다음 silver sequence<sup>TM</sup> staining reagents (Promega, USA)으로 염색하였고 각 품종별 대립유전자(밴드)의 차이를 분석하여 다형성을 보이는 마커를 선발하였다. 다형성을 보이는 마커 중 반복간 재현성이 높고 밴드가 선명한 마커를 선정 후 프라이머의 정방향에 FAM, VIC,

NED, PET 중 한가지로 형광 표지하여 마커 선별시와 동일한 PCR 반응 및 조건을 이용하여 사과 42품종을 PCR 하였다. 4  $\mu$ l의 PCR 증폭산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 증폭 여부를 확인한 후 증류수 200  $\mu$ l에 PCR 산물을 증폭량에 따라 1~3  $\mu$ l씩 첨가하였다. 희석된 PCR 증폭 산물은 Hi-Di formamide와 size marker (LIZ500 size standard)를 첨가하여 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation 시킨 후 자동염기서열 분석장치 (Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystem, USA)를 활용하여 전기영동하고, GeneMapper 프로그램(Applied Biosystem, USA)을 이용하여 대립유전자 크기를 분석하였다.

### 통계 분석

자동염기서열 분석장치를 통해 분석된 대립유전자(파크)의 유무에 따라 유=1, 무=0로 기록하였다. Microsatellite 마커의 다형성을 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[1].

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

NTSYSpc (version 2.10b) [11] 컴퓨터 프로그램의 Jaccard [13] 방법에 따라 유전적 유사도 값을 계산한 후 unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA) [13] 방법을 통해 덴드로그램을 작성하였고, 최소 분자표지 조합을 선정하기 위하여 Mantel test 방법에 의해 상관계수를 분석하였다[10].

## 결과 및 고찰

### Microsatellite 분석

사과 품종식별에 적합한 분자표지를 선별하고자 총 305개의 microsatellite 마커를 대상으로 분석한 결과 'Fuji' 등 8품종 내에서 57개 마커가 다형성을 나타내었으며 마커 source 별 다형성 비율은 0~38.2%의 범위로 나타났다(Table 2). 1차로 선별된 다형성을 보이는 57개의 마커 중 반복 실험간 뚜렷한 재현성을 보이는 26개의 마커를 최종 선별하여 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET 중 한가지로 형광 표지

후 사과 42품종의 대립유전자 크기를 결정하여(Fig. 1) 다형성 정도를 조사하였다(Table 3). 총 26개의 microsatellite 마커에 의해 분석된 대립유전자의 수는 2~12개였고, 총 165개의 대립유전자가 분석되었으며 마커 당 평균 대립유전자의 수는 6.4개로 나타났다. Microsatellite 마커를 이용한 선행연구의 대립유전자 개수는 3.6개[4], 4.3개[3], 6.6개[8], 8.2개[6]로 보고되었으며, 본 연구 결과는 Kitahara 등[8]의 결과와 유사한 대립유전자 개수를 나타내었다. 대립유전자 개수의 차이는 품종식별에 활용된 마커의 유전자좌(locus)가 다르고, 분석에 사용된 품종의 유전적 다양성 정도가 다르기 때문에 나타난 결과로 판단된다. 총 26개 마커별로 유전적 다형성 정도를 나타내주는 PIC 값은 0.461~0.849까지 나타났으며, 평균값은 0.665로 조사되었다. 선행연구의 PIC 값과 비교할 때 Van Treuren 등[16]의 평균 PIC 값은 0.677이었으며, Farrokhi 등[4]의 평균 PIC 값은 0.49를 나타내어 본 연구의 PIC 값이 선행 연구결과와 비교할 때 유사하거나 우수한 것으로 판단된다. 이는 1차 선별 결과 밴드패턴이 선명하고 다형성이 높은 마커 위주로 선별하여 분석하였기 때문에 나타난 결과로 사료된다. 최종 선별된 26개의 마커 중에서 PIC값이 0.70 이상인 NZms EB 149808, NZms AB052994, NZms EE663955, NZms EB137525, CO753161f, CH02c09, CH02c11, COL, Hi02d04, Hi02f06 총 10개 마커는 공시품종 간에 높은 다형성을 나타내었다. 이 중 마커 CH02c09는 Cho 등[3]에 의해서도 품종식별력이 높다고 하였는데, 본 연구에서도 높은 다형성 정도를 나타내어 Cho 등[3]의 연구결과를 확인할 수 있었다. 그러나 CH02c09 마커의 대립유전자 크기는 Cho 등[3] 연구결과(185-260 bp)와 본 연구와 다소 다른 경향(233-259 bp)을 나타내었는데 이는 본 연구에 사용된 공시품종의 유전적 다양성 정도가 클 뿐만 아니라 대립유전자의 검출 방법 등이 다른 데서 나타난 결과로 사료된다.

공시품종 간 식별이 가능한 최소 마커 조합을 결정하기 위하여 PIC 값이 높은 마커들을 이용하여 덴드로그램을 작성한 결과, PIC 값이 0.79 이상인 마커 중 총 6개 마커(NZms EB 149808, NZms AB052994, NZms EE663955, NZms EB137525, CH02c09, Hi02d04)를 이용하였을 때 26개 전체 마커 조합을 이용한 결과와 같이 41품종이 모두 식별이 되었다. 총 6개 마커 조합을 이용 시에 마커당 평균 대립유전자 수는 9.2개로

Table 2. Microsatellite markers screened for discriminating apple varieties and polymorphism of amplified microsatellite markers

| No. of used markers for screening | No. of polymorphic markers | Ratio of polymorphism (%) | Maker source |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------|
| 55                                | 21                         | 38.2                      | [2]          |
| 51                                | 17                         | 33.3                      | [5]          |
| 132                               | 17                         | 12.9                      | [9]          |
| 16                                | 0                          | 0.0                       | [6]          |
| 51                                | 2                          | 3.9                       | [12]         |
| 305                               | 57                         | 18.7                      |              |

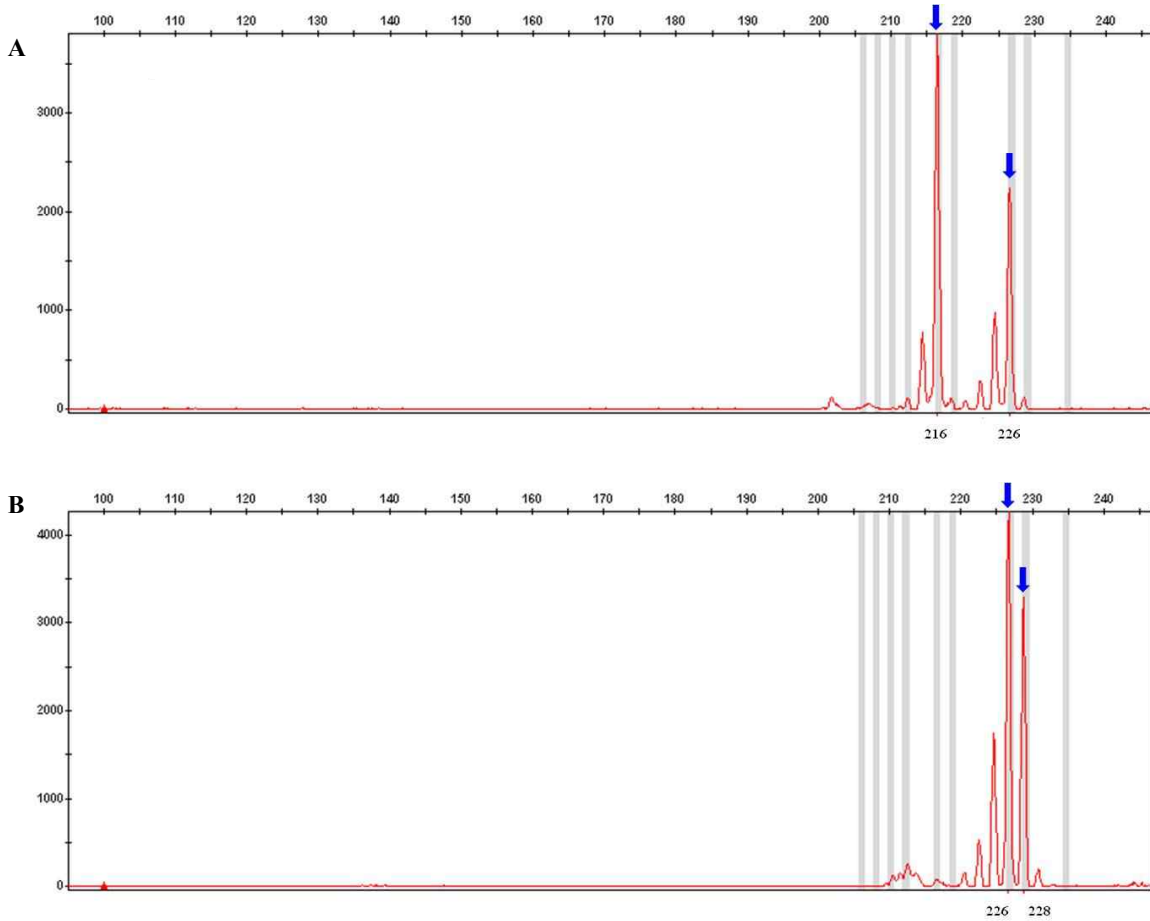


Fig. 1. Amplified microsatellite fragments of 2 apple varieties at the Hi02f06 locus. The PCR products were separated using a Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystem, USA) and detected using GeneMapper software (Applied Biosystem, USA). A: Summer King, B: Jazz.

나타났으며, 평균 PIC 값은 0.817로 나타났다. 최종 선발된 26개의 마커 조합과 6개의 최소 마커 조합에 의해 작성된 덴드로그램의 상관관계(Mantel test)를 분석한 결과, 상관계수(r) 값은 0.793이었다(Fig. 2). 사과 42품종의 식별에 6개의 최소 마커 조합을 활용한다면 26개 전체 마커를 활용한 효과를 얻을 수 있어 품종식별에 소요되는 시간과 비용을 절감할 수 있을 것으로 사료된다.

유전적 유연관계 분석

최종 선발된 26개의 마커를 이용하여 사과 42품종에 대한 덴드로그램을 작성하였다(Fig. 3). 공시품종의 유사도 지수는 0.27~1.00의 범위로 나타났으며, ‘Spur Golden’ 품종을 제외한 41품종이 본 연구에서 선발된 26개 마커의 유전자형에 따라 식별이 되었다. ‘Spur Golden’ 품종은 ‘Golden’ 품종과 유전적 유사도 100%를 나타내었으며, 품종의 육성내역이 정확히 알려져 있지 않아 품종 간 유전관계 분석에 어려움이 있으나 품종명칭을 통해 ‘Golden’ 품종과 유전적 유사도가 높거나 ‘Golden’ 품종의 변이종으로 육성된 품종으로 추정된다. 복숭아

의 경우 Yamamoto 등[18]에 의하면 국소적으로 나타나는 돌연변이로 육성된 품종의 경우 분자표지로 구분되지 않는다는 보고가 있었다. 공시품종 중 1) ‘Fuji’와 ‘Shinanosweet’ 2) ‘Fuji’와 ‘Myrared Fuji’ 3) ‘Fuji’와 ‘Hwarang’ 품종은 유사도 지수가 각각 0.97, 0.97, 0.94로 유사도가 높게 분석되었다. 이들 품종 간의 육성내역을 살펴보면 1) ‘Shinanosweet’는 ‘Fuji’와 ‘Tsugaru’의 교배로 육성되었고, 2) ‘Myrared Fuji’는 육성내역이 알려져 있지 않으며, 3) ‘Hwarang’은 ‘Fuji’의 변이종이다. 1) ‘Shinanosweet’의 경우 ‘Fuji’가 품종 육성 시에 모본으로 활용되었기 때문에 유사도가 높게 나온 것으로 추정되며 2) ‘Myrared Fuji’는 품종명칭을 통해 ‘Fuji’를 이용하여 육성된 것으로 추정되며 3) ‘Hwarang’은 ‘Fuji’의 변이종으로서 형태적 특성에서 ‘Fuji’와 뚜렷하게 구별성을 보인 것으로 조사된 바 있다. 일반적으로 돌연변이 등 변이종으로 육성된 품종은 형태적 특성에서 원품종(initial variety)과 뚜렷하게 구별성을 보이는데, 이와 같은 경우에는 DNA 마커를 이용하여 두 품종 간의 유래관계를 증명할 수 있는 방법이 필요한 것으로 보고된 바 있다[14]. 본 연구에서는 변이종으로 육성된 품종인

Table 3. Characteristics of 26 microsatellite markers selected for genetic relationship of apple varieties

| No.   | Primer name                 | Repeat motif | Annealing temp. (°C) | Product size (bp) | No. of alleles | PIC value |
|-------|-----------------------------|--------------|----------------------|-------------------|----------------|-----------|
| 1     | NZms CN879773               | (AG)11       | 55                   | 139~187           | 7              | 0.634     |
| 2     | NZms EB 149808 <sup>1</sup> | (TC)7(TATG)8 | 55                   | 170~216           | 8              | 0.802     |
| 3     | NZms EB137749               | (GA)8        | 55                   | 207~213           | 4              | 0.563     |
| 4     | NZms CN943067               | (TTC)14      | 55                   | 191~223           | 6              | 0.545     |
| 5     | NZms AB052994 <sup>1</sup>  | (CT)17       | 55                   | 161~195           | 10             | 0.820     |
| 6     | NZms EB111793               | (TC)16       | 55                   | 271~283           | 4              | 0.658     |
| 7     | NZms CO905522               | (AG)6        | 55                   | 163~171           | 4              | 0.598     |
| 8     | NZms EB147967               | (TC)7        | 55                   | 169~185           | 5              | 0.461     |
| 9     | NZms EE663955 <sup>1</sup>  | (TA)7(TGTA)3 | 55                   | 124~208           | 10             | 0.791     |
| 10    | NZms EB137525 <sup>1</sup>  | (TC)6        | 55                   | 169~193           | 8              | 0.828     |
| 11    | CN884552                    | (TCT)6       | 55                   | 202~216           | 3              | 0.464     |
| 12    | CN890747                    | (TC)11       | 55                   | 246~262           | 5              | 0.642     |
| 13    | CN996647f                   | (GTG)6       | 55                   | 229~232           | 2              | 0.495     |
| 14    | CO416273                    | (CT)9        | 55                   | 254~286           | 9              | 0.688     |
| 15    | CO753161f                   | (TC)10       | 55                   | 282~308           | 7              | 0.745     |
| 16    | CV082898                    | (GA)11       | 55                   | 182~194           | 6              | 0.606     |
| 17    | CH01b09b                    | -            | 55                   | 170~179           | 3              | 0.612     |
| 18    | CH01f03a                    | -            | 55                   | 214~229           | 3              | 0.593     |
| 19    | CH02c09 <sup>1</sup>        | -            | 55                   | 233~259           | 7              | 0.813     |
| 20    | CH02c11                     | -            | 55                   | 195~239           | 11             | 0.794     |
| 21    | CH02d10b                    | -            | 55                   | 151~177           | 4              | 0.543     |
| 22    | COL                         | -            | 55                   | 224~246           | 8              | 0.706     |
| 23    | Hi01c09                     | GA           | 55                   | 203~219           | 4              | 0.566     |
| 24    | Hi02d04 <sup>1</sup>        | GA           | 55                   | 217~271           | 12             | 0.849     |
| 25    | Hi02f06                     | GA           | 55                   | 206~234           | 8              | 0.788     |
| 26    | Hi04a08                     | GA           | 55                   | 211~251           | 7              | 0.697     |
| Total |                             |              |                      |                   | 165            |           |
| Mean  |                             |              |                      |                   | 6.4            | 0.665     |

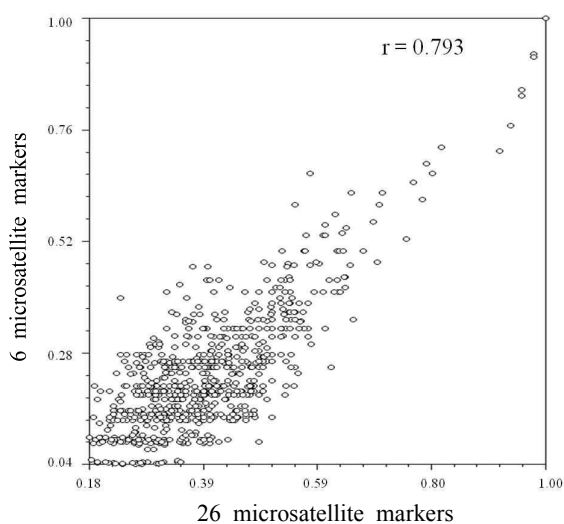
<sup>1</sup>Minimum markers.

Fig. 2. Comparison and correspondence of minimum marker combination of 6 microsatellite markers with the whole 26 microsatellite markers for discriminating 42 apple varieties.

'Hwarang'의 경우 'Fuji'의 변이종으로 알려져 있지만 microsatellite 마커로 식별이 되었다. 이는 국내에서 사과 34품종에 대한 유전적 다양성을 분석한 결과와 유사하였다[3]. 한편 과 피색이 노란색으로 알려진 'Golden', 'Spur Golden', 'Yuko', 'Jonagold' 품종의 경우 품종 간 유사도 지수가 0.74 이상에서 그룹핑 되었으며 'Yuko'와 'Jonagold' 품종의 경우 동일한 모본인 'Golden Delicious'로부터 육성되어 품종육성에 제한된 유전자원을 활용하였기 때문에 유사도가 높게 나타난 것으로 판단된다. 한편, 공시품종 중 품종의 육성내역이 명확하게 알려져 있지 않은 품종들의 연관관계를 추정하기 위해서는 향후 형태적 특성이 추가적으로 조사되어야 할 것으로 사료된다.

UPOV 산하 기술위원회 중의 하나인 분자생물학 및 생화학 실무작업반회의(BMT, Working Group on Biochemical and Molecular Techniques, and DNA-Profiling in Particular)에서는 분자표지를 품종보호 분야에 활용할 경우 몇 가지 이용 기준을 제시하고 있다[15]. UPOV-BMT는 분자표지를 품종의 구별성 판단에 직접적으로 활용하는 것은 인정하지 않으나

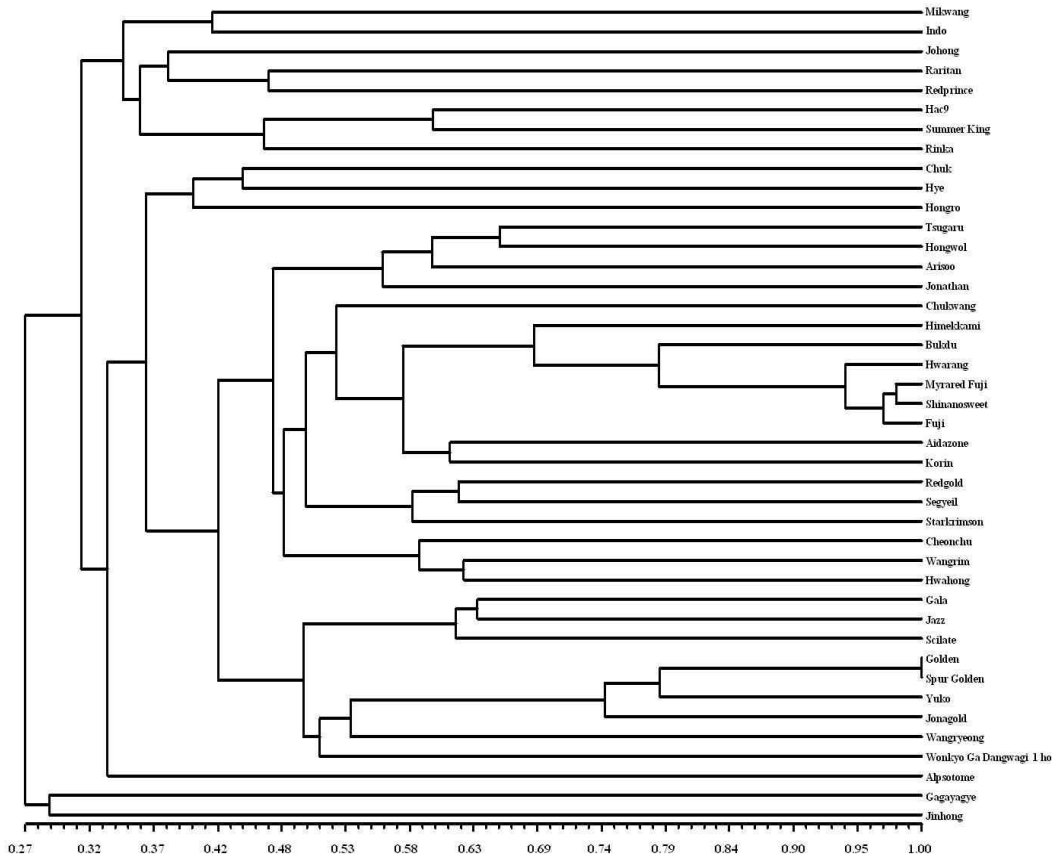


Fig. 3. Dendrogram of 42 apple varieties using microsatellite markers. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

형태적 특성을 고려하여 기존품종의 관리, 품종확인 및 유래 품종의 식별 등에 활용할 것을 제안하고 있다. 실제로 네덜란드에서는 16개 microsatellite 마커를 이용하여 사과 695품종의 품종 수집포 관리와 품종확인 등에 활용하고 있다고 보고된 바 있다[16].

본 연구에서는 사과 42품종에 대해서 microsatellite 마커를 이용하여 품종 간 유연관계를 살펴보았으며, 향후 분자표지와 형태적 특성과의 상관관계가 구체적으로 밝혀진다면 사과 품종보호 출원품종의 대조품종 선정, 품종보호 침해 및 분쟁 발생시 이를 해결하는 분자생물학적 근거 자료로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrigue, J. E. and Tanksley, S. D. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**, 181-186.
2. Celton, J. M., Tustin, D. S., Chagné, D. and Gardiner, S. E. 2009. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genet Genomes* **5**, 93-107.
3. Cho, K. H., Heo, S., Kim, J. H., Shin, I. S., Kim, S. H., Kim,

- D. H., Han, S. E. and Kim, H. R. 2010. Analysis of genetic diversity of apple cultivars using RAPD and SSR markers. *J Crop Sci Biotechnol* **42**, 525-533.
4. Farrokhi, J., Darvishzadeh, R., Naseri, L., Mohseni Azar, M. and Hatami Maleki, H. 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars and landraces using simple sequence repeat markers. *Aust J Crop Sci* **5**, 815-821.
5. Gasic, K., Han, Y., Kertbundit, S., Shulaev, V., Iezzoni, A. F., Stover, E. W., Bell, R. L., Wisniewski, M. E. and Korban, S. S. 2009. Characteristics and transferability of new apple EST-derived SSRs to other Rosaceae species. *Mol Breed* **23**, 397-411.
6. Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet* **96**, 1069-1076.
7. Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**, 309-334.
8. Kitahara, K., Matsumoto, S., Yamamoto, T., Soejima, J., Kimura, H., Komatsu, H. and Abe, K. 2005. Molecular characterization of apple cultivars in Japan by *S*-RNase analysis and SSR markers. *J Am Soc Hortic Sci* **130**, 885-892.
9. Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C. D., Tarchini, R., Van de Weg, W. E. and Gessler, C. 2002.

- Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol Breed* **10**, 217-241.
10. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res J* **27**, 209-220.
  11. Rohlf, F. J. 2000. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate analysis system-version 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
  12. Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C. L., Van de Weg, W. E., Van Kaauwen, M. P. W., Walsler, M., Kodde, L. P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C. E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C. and Patocchi, A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet Genomes* **2**, 202-224.
  13. Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
  14. UPOV-BMT. 2008. BMT/11/16 The assessment of essential derivation in grapevine, Madrid.
  15. UPOV-INF. 2011. INF/18/1 Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS).
  16. Van Treuren, R., Kemp, H., Ernsting, G., Jongejans, B., Houtman, H. and Visser, L. 2010. Microsatellite genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) genetic resources in the Netherlands: application in collection management and variety identification. *Genet Resour Crop Evol* **57**, 853-865.
  17. Varshney, R. K., Graner, A. and Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* **23**, 48-55.
  18. Yamamoto, T., Mochida, K. and Hayashi, T. 2003. Shanghai Suimitsuto, one of the origins of Japanese peach cultivars. *J Jpn Soc Hortic Sci* **72**, 116-121.

---

#### 초록 : Microsatellite 마커를 이용한 사과 품종 간 유전적 유연관계 분석

홍지화\* · 권용삼 · 최근진

(농림수산식품부 국립종자원 재배시험과)

본 연구는 microsatellite 마커를 이용하여 국립종자원 서부지원에 수집된 사과 42품종에 대한 품종 간 유전적 유연관계를 분석하였다. 사과 품종식별에 적합한 마커를 선정하기 위하여 8개 품종을 대상으로 총 305개의 마커를 분석하였다. 8개 품종 간에 다형성이 높고, 반복간 재현성이 있으며 밴드패턴이 선명한 26개의 마커를 최종 선발하여 42품종을 대상으로 분석하였을 때 총 165개의 대립유전자가 분석되었다. 대립유전자의 수의 분포는 2~12개를 나타내었으며, 마커당 평균 대립유전자의 수는 6.4개로 조사되었다. PIC 값은 0.461~0.849의 범위에 속하였으며 평균값은 0.665로 나타났다. 165개의 대립유전자를 Jaccard 방법에 의해 유사도를 산출하고 비가중 산술방식에 의해 집괴 분석한 결과 공시품종의 유전적 거리는 0.27~1.00의 범위를 나타내었고, 총 42품종 중 41품종은 microsatellite 마커의 유전자형에 의해 구분되었다. 본 연구결과는 사과 품종의 식별을 위한 분자생물학적 자료로 유용하게 활용될 것으로 사료된다.