

Microsatellite 마커를 이용한 오이 유통품종 DNA Profile Data Base 구축

권용삼* · 최근진

농림축산식품부 국립종자원 재배시험과

Construction of a DNA Profile Database for Commercial Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Cultivars Using Microsatellite Marker

Yong-Sham Kwon* and Keun-Jin Choi

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

Abstract. Microsatellite is one of the most suitable marker for cultivar identification as it has great discrimination power for cultivars with narrow genetic variation. The polymorphism level between 358 microsatellite primer pairs and 11 commercial cucumber cultivars was investigated. Thirty-one primer pairs showed high polymorphism within cucumber cultivars with different fruit types. These markers were applied for the constructing DNA profile data base of 110 commercial cucumber cultivars through multiplex PCR and fluorescence based automatic detection system. A total of 139 polymorphic amplified fragments were obtained by using 31 microsatellite markers. The average of PIC value was 0.610 ranging from 0.253 to 0.873. One hundred and thirty nine microsatellite loci were used to calculate Jaccard's distance coefficients for UPGMA cluster analysis. A clustering group of varieties, based on the results of microsatellite analysis, were categorized into plant shape and fruit type. Almost the cultivars were discriminated by marker genotypes. This information may be useful to compare through genetic relationship analysis between existing variety and candidate varieties in distinctive tests and protection of plant breeders' intellectual property rights through variety identification.

Additional key words: distinctiveness, genetic marker, plant variety protection, variety identification

서 언

분자 표지는 농작물의 내병성 또는 환경 저항성과 관련된 유전자의 mapping, 유전자 지도의 작성, 형태적 특성 및 품질과 관련된 양적 유전자의 염색체상 위치의 확인 등과 같은 여러 가지 육종 분야에 활용되고 있다. 최근에는 특정 작물의 병에 대한 저항성 유전자와 밀접하게 연관된 분자 표지를 활용하여 저항성 개체를 분자 표지에 의해 간접적으로 선발하는 방법도 육종 현장에서 실용적으로 활용되고 있을 정도로 그 중요성이 높아지고 있는 추세이다. 분자 표지 기술을 육종 현장에서 직접적으로 활용하는 것은 작물의 표현형에 근거한 선발 방법에 비해 재배 환경, 연차 간 변이 등이 극히 적을 뿐만 아니라 분석에 소요되는 기간과 노력을 크게 절감시킬 수 있다는 장점이 있다.

최근, 국제 식물 신품종 보호 동맹(UPOV: International

Union for the Protection of New Varieties of Plants) 및 각 회원 국가들은 식물 품종의 지적 재산을 보호하기 위하여 분자 표지의 활용에 관한 다양한 의견을 제시하고 있다. 가장 주목할 점은 DNA 검정에 의한 품종식별 기법 중에서 amplified fragment length polymorphism(AFLP)나 random amplification of polymorphic DNA(RAPD) 분석 기술에 의해 도출된 결과는 인정하지 않고, simple sequence repeat(SSR)이나 single nucleotide polymorphism(SNP) 분석 방법의 활용을 제안하고 있다는 점이다.

분자 표지를 이용한 여러 가지 기술 중 품종 식별에 대한 국외의 연구 동향을 살펴보면, 네덜란드에서는 장미(Esselink et al., 2003), 토마토(Bredemeijer et al., 2002), 스페인의 경우 고추, 가지, 체리, 토마토, 멜론 및 포도 등의 작물에 대한 각 품종별 DNA 프로파일을 데이터베이스화하였고(UPOV, 2008a), 일본은 딸기, 벼, 복숭아, 밤, 자두 등의 작물에서

*Corresponding author: yskwon3@korea.kr

※ Received 9 January 2013; Revised 25 January 2013; Accepted 8 February 2013.

(UPOV, 2008b), 중국은 옥수수에 대한 품종 식별 방법을 개발하여 이를 품종보호권 침해, 재배심사 등에 활용하고 있다(UPOV, 2010). 이러한 연구사례를 종합해 볼 때 주된 공통점은 microsatellite 분석 기법을 이용하며 자동염기서열분석기 등과 같은 정밀도 높은 기기를 활용하여 품종별로 정확한 대립유전자의 크기를 설정하고 이를 데이터베이스화한 다음 품종보호출원 품종의 대조품종의 선정 가능성, 형태적 특성과 분자 마커의 상관 분석을 통한 기존 품종의 관리, 농업생산물의 국경검색, 품종보호권이 설정된 품종의 가공품에 대한 품종 확인 등과 같은 분야에 활용한다는 점이다.

식물 품종보호제도에 분자표지 활용에 관한 논의는 국제 식물 신종보호연맹 산하 기술위원회 중의 하나인 분자생물학 및 생화학 실무작업반회의(BMT: The Working Group on Biochemical and Molecular Techniques, and DNA-profiling in Particular)에서 이루어지고 있다. 최근 이 회의에 참가하는 국가뿐만 아니라 국제종자연맹(ISF: International Seed Federation), 국제 무성번식 관상 식물 및 과수 품종 육종가 협회(CIOPORA: International Community of Breeders of Asexually Reproduced Ornamental and Fruit-Tree Varieties)에서는 분자 표지 기술을 품종의 구별성을 판단하는데 직접 이용하기에는 문제점이 있으나, 이를 품종보호권 침해 등과 같은 분쟁발생 시 활용 의지를 적극적으로 표명하고 있다(UPOV, 2005). 우리나라의 경우도 고추(Kwon et al., 2005), 토마토(Kwon et al., 2009), 수박(Kwon et al., 2010) 등의 작물에 대한 품종 식별 마커를 개발하여 이를 품종 진위성과 관련된 종자 분쟁 및 품종보호 심사 제도에 활용 가능성을 제시하였다.

박과 작물에 속하는 오이는 샐러드나 생과로 직접 이용되거나 김치의 재료 및 피클 등과 같은 여러 가지 음식 재료로 활용되고 있다. 오이는 형태에 따라 취청, 다다기, 가시, 청풍 등으로 크게 분류할 수 있으며, 최근에는 다다기 오이에 대한 소비자의 선호도가 점차 높아지는 추세에 있다. 우리나라에 유통되는 오이 품종은 2012년 12월 현재 생산 판매 신고된 473개 품종이 유통될 정도로 채소 시장에서 차지하는 비중이 높다.

오이에 대한 분자 유전학적 연구 동향을 살펴보면, 스페인에서는 국제 박과 작물 게놈 프로젝트(Cucurbit Genomics Projects, <http://www.icugi.org/>)가 수행되어 유전자 지도 작성 및 분자 표지 정보 등을 데이터베이스화하여 공개하고 있으며, 미국에서는 110개의 오이 microsatellite 마커를 개발하여 이를 보고한 바 있다(Fazio et al., 2002). 그리고 태국에서는 57개의 microsatellite 마커를 개발한 다음 이를 오

이 유전자원 16점에 대한 유전적 유연 관계를 분석하는데 활용한 바 있으며(Watcharawongpaiboon and Chunwongse, 2008), 최근에 일본에서는 101개의 오이 microsatellite 마커를 개발하고 이를 유전자 지도 작성에 이용한 바 있다(Fukino et al., 2008). 그러나, 지금까지 여러 연구자에 의해 다양한 microsatellite 마커가 개발되었지만, 오이 유통 품종을 식별할 수 있는 정밀한 분자표지의 선정 및 이를 이용한 품종별 데이터베이스 구축에 대한 연구는 국내외적으로 확립되지 못한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 UPOV가 제안하는 DNA 분석 방법인 microsatellite 마커를 활용하여 오이 유통품종에 대한 품종식별 분자 마커의 선정 및 이를 활용한 DNA profile 데이터베이스 구축에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시품종 및 DNA 추출

본 연구에서는 국내에서 육성된 오이 110 품종을 공시하여 microsatellite 마커의 분석 재료로 활용하였다(Table 1). 공시 품종의 종자 3립과 텅스텐 구슬 2개를 2mL 튜브에 넣고 분쇄기(Pulverisette 6, Fritsch)를 이용하여 종자를 고르게 마쇄 하였다. 충분히 마쇄된 시료는 NucleoSpin® PlantII (Macherey-Nagel Cat. 740 770.250) 키트를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는 1.5% 아가로스젤에서 전기 영동하여 DNA 농도를 확인한 후 μL 당 10ng의 농도로 정량하여 PCR 분석에 이용하였다.

Microsatellite 분석

오이 품종식별에 효과적인 분자 마커를 선별하기 위하여, ‘청백백침’, ‘만사형통’, ‘은침’, ‘한강맛’, ‘은성’, ‘대한’, ‘강한낙합’, ‘겨우살이’, ‘경도’, ‘가락만춘’, ‘중복’ 품종을 대상으로 하여 중국(Kong et al., 2006), 스페인(<http://www.icugi.org/>), 미국(Fazio et al., 2002), 태국(Watcharawongpaiboon and Chunwongse, 2008) 및 일본(Fukino et al., 2008)에서 개발된 358개 분자 마커를 활용하여 다형성 정도를 조사하였다. PCR을 통한 유전자 증폭 산물은 Genetic Analyzer(HDA-GT12™ System, eGenE, Inc.)를 이용하여 전기영동하고 컴퓨터프로그램(Biocalculator 2.0)을 활용하여 각 품종별 대립 유전자의 차이를 분석하였다. 반복 재현성이 높고 밴드의 패턴이 깨끗한 분자표지를 선정하여 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET의 화학 물질 중 한가지로 형광표지한 다음 오이 110품종(Table 1)을 DNA profile 데이터

Table 1. Commercial cucumber cultivars assayed for genetic variation using microsatellite markers.

No.	Cultivars	Seed companies	No.	Cultivars	Seed companies
001	Odae	Koregon	056	Daeseon	Koregon
002	Maya	Wonnong	057	Wolhwa	Asia
003	Welbeingmatijang	Asia	058	Baekdu	Hyundae
004	XQ1	Jeonnam	059	Eunmi-S	Koregon
005	Olbaek	NH	060	Samcheok	Gonong
006	Yeonbaek	Monsanto	061	Baeksung3	Japan
007	Neulpureun	Monsanto	062	Dongseoheuk	Wonnong
008	Younyina	Daeyeon	063	Goeun	Nongwoo
009	Silroknakhap	Hyundae	064	Nagdong	Dongbu
010	Massagematijang	Asia	065	Paldo	Dongbu
011	Gloria	Wonnong	066	Dragon	Koregon
012	Jangdaemyeong	Wonnong	067	Obokja	Asia
013	Duruheukjinju	Wonnong	068	Ganghan	Nongwoo
014	Jeongpum	Dongbu	069	Ildong	Koregon
015	Kyeongdo	Syngenta	070	Baeksungteukho	Japan
016	Namjiheukjinju	Nongwoo	071	Dongmyeong	Wonnong
017	Eunchim	Monsanto	072	Cheonggreen	Nongwoo
018	Donggangheukjinju	Koregon	073	XQ3	Jeonnam
019	Dasom	Greenheart	074	Hanbit	Nongwoo
020	Guryong	Seedone	075	Sinseonmi	Koregon
021	Baekok	Samsung	076	Bitna	Daeyeon
022	Ministop	Wonnong	077	Chamhan	Hyundae
023	Dongbang	Wonnong	078	Luckystrike	Monsanto
024	Sinjungpum	Dongbu	079	Singsing	Dongbu
025	Mansahyungtong	Hyundae	080	Baekmi	Dongbu
026	Joy	Jeonnam	081	Gangryeok	Nongwoo
027	Fresh	Koregon	082	Sinheukchim	Nongwoo
028	Sangsaeng	NH	083	Mirinae	Syngenta
029	TNC202	Takii	084	Janghyungheukjinju	Syngenta
030	Hwangje	Hyundae	085	Achim	Syngenta
031	Gyeowoosalyi	Monsanto	086	Naseong	Dongwon
032	Heukryong	Asia	087	Jangilmanneung	Dongwon
033	Uribaekchim	Dongbu	088	Myeonggwang	Myeongsan
034	Heukmiin	Nongwoo	089	Tongil	Koregon
035	Dongji	Syngenta	090	Matjon	Hyundae
036	Daehan	Syngenta	091	Hanbando	Kyungwon
037	Chasaejae	Hyundae	092	Jumbo	Wonnong
038	Puruna	Koregon	093	ND-A	Dongbu
039	TNC204	Takii	094	ND-B	Dongbu
040	Eunmi-L	Koregon	095	Jangbaekchim	Monsanto
041	Omai	Wonnong	096	Baekchim	Monsanto
042	Eunsung	Monsanto	097	Garakmanchun	Monsanto
043	Gangho	Nongwoo	098	Jungbok	Syngenta
044	Cheongbaek	Nongwoo	099	Cheonghwaheuk	Dongbu
045	Nebakja	Syngenta	100	Cheonggye	Wonnong
046	Maeil	Nongwoo	101	Sinbi	Nongwoo
047	Gangchu	Dongbu	102	Miso	Wonnong
048	Nokhyang	Greenheart	103	Plus	Wonnong
049	TNC209	Takii	104	Dongjabi	Wonnong
050	Gichan	Daeyeon	105	Omaiplus	Wonnong
051	Haneul	Syngenta	106	Eunhasol	Nongwoo
052	Miin	Dongbu	107	Donghaeng	Haeoreum
053	Cheongmyeong	Nongwoo	108	Geumbora	Haeoreum
054	Joeun	Monsanto	109	Veteran	Haeoreum
055	Jeongtong	Seedex	110	Jelrujon	Asia

베이스 구축에 활용하였다.

PCR 반응은 오이 게놈 DNA 30ng, 0.1μM의 SSR primer, 2.0μL dNTP mixture(2.5mM), Taq polymerase 1.0U, 2.5μL의 10× PCR buffer(50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.0mM MgCl₂)에 증류수를 첨가하여 전체 부피를 25μL로 조절하였다. PCR(C1000, BioRad, USA) 증폭은 94°C에서 30초간 denature한 후, 45-60°C에서 30초 annealing, 72°C에서 45초간 extension을 40cycle 수행하였다. PCR이 완료된 후 3.0μL의 증폭산물을 2.5% 아가로스 젤에서 전기 영동하여 증폭 여부를 확인한 다음, 초순수 150μL에 PCR 산물 1.5μL를 희석하였다. 희석된 PCR 증폭 산물 1.5μL는 탈이온된 폼아마이드(deionized formamide) 10μL, size marker (LIZ500 size standard) 0.25μL를 혼합한 다음 94°C에서 2분간 변성시켰다. 변성시킨 PCR 증폭 산물은 자동염기서열 분석장치(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystem)를 활용하여 전기 영동한 다음 GeneMapper(version 3.7) 컴퓨터 프로그램(Applied Biosystem)을 이용하여 분자 표지별 대립 유전자의 크기를 결정하였다. Microsatellite 마커의 다양성을 조사하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 PIC(polymorphism information content) 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 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetical average)(Sneath and Sokal, 1973) 방법으로 집

괴 분석하여 계통도를 작성하였다.

결과 및 고찰

Microsatellite 분석

오이 품종식별에 효과적인 분자 마커를 선발하기 위하여, 오이 과실의 유형이 상이한 ‘가락만춘’ 외 10품종을 이용하여 358개의 microsatellite 마커에 대한 다형성 정도를 조사한 바(Table 2 and Fig. 1), 총 358개 중에서 228개가 다형성을 보이지 않았으며, 나머지 123개는 다형성을 나타내었다. 이 중에서 31개는 높은 다형성을 가지면서 대립유전자의 패턴이 깨끗할 뿐만 아니라 반복 재현성이 높게 나타났다.

본 연구에서 우리나라 오이 유통품종에 대한 microsatellite 마커의 다형성 정도는 개발자에 따라 다소 다르게 나타났는데, 높은 다형성을 보이는 31개의 마커를 기준으로 할 때 스페인의 국제 박과 작물 게놈 프로젝트에서 개발한 EST (expressed sequence tag) 유래의 마커가 가장 낮은 다형성을 나타낸 반면, 일본에서 개발된 마커가 높은 다형성을 나타내었는데, 이는 microsatellite 개발에 이용된 유전자원, 개발 방법 등이 다른 데서 비롯된 결과라고 사료된다. 한편 일본에서 Fukino et al.(2008)이 개발한 microsatellite 마커가 우리나라 오이 유통 품종에 높은 품종식별력을 나타낸 것은 우리나라 오이 품종 육성 시 일본에서 도입된 유전자원을 활용한 데서 비롯된 결과라고 추정되며, 향후 이에 대한 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

최종 선발된 31개의 microsatellite primer의 5'-말단에 형광 물질인 FAM, VIC, NED, PET를 각각 표지하였다. 그리고 이들 프라이머와 오이 110품종의 genomic DNA를 PCR한 다음 자동염기서열분석기를 이용하여 전기 영동한 후 각 프라이머에 따른 다형성 정도를 조사한 바(Table 3), microsatellite 마커에 의해 검출된 대립유전자의 수는 2-9개였고 총 139개의 대립유전자가 분석되었으며, 마커당 평균 대립유전자의 수는 4.48개로 나타났다. 한편 각 마커별로 유전적 다형성 정

Table 2. Polymorphism level of microsatellite markers analyzed in this study.

No of tested markers	Type of amplified microsatellite markers			SSR marker source
	Mono (%)	Polymorphism level (%)		
		low	high	
20	7 (35.0)	11 (55.0)	2 (10.0)	Kong et al. (2006)
110	68 (61.8)	38 (34.6)	4 (3.6)	Fazio et al. (2002)
74	62 (83.8)	10 (13.5)	2 (2.7)	http://www.icugi.org/
53	31 (58.5)	16 (30.1)	6 (11.3)	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
101	68 (67.3)	16 (15.8)	17 (16.8)	Fukino et al. (2008)
Total 358	228 (63.7)	92 (25.7)	31 (8.7)	

Table 3. Repeat motif, no. of alleles, and PIC value of microsatellite markers selected for genetic characterization of cucumber varieties.

Microsatellite designation	Repeat motif	Chromosome number	Annealing temp	Product Size (bp)	No. of alleles	PIC value	Source
CSN031	(tc)15	-	55	194-218	4	0.438	Fukino et al. (2008)
CSN057	(ag)14, (ac)3	-	55	262-274	3	0.510	Fukino et al. (2008)
CSN092	(tc)4, (ag)10	-	55	132-136	2	0.492	Fukino et al. (2008)
CSN147	(ac)10, (ta)7, (ta)3, (at)3, (tc)3	3	58	180-254	7	0.802	Fukino et al. (2008)
CSN159	(ag)16	5	58	179-191	3	0.739	Fukino et al. (2008)
CSN166	(tc)13, (ct)3	3	58	190-203	4	0.706	Fukino et al. (2008)
CSN180	(ag)4, (ag)8, (ga)3	-	55	202-219	5	0.755	Fukino et al. (2008)
CSN181	(ta)3, (tg)9	4	58	193-208	3	0.457	Fukino et al. (2008)
CSN201	(ta)5, (ac)4, (ac)4, (ta)8	3	55	228-236	3	0.447	Fukino et al. (2008)
CSN242	(ag)13	2	58	250-267	3	0.530	Fukino et al. (2008)
CSN244	(ta)4, (ag)26	7	55	241-277	9	0.767	Fukino et al. (2008)
CSN266	(ac)13, (ta)9	7	58	269-280	3	0.502	Fukino et al. (2008)
CSN273	(ag)6, (ag)4, (ag)11	-	58	288-295	2	0.492	Fukino et al. (2008)
CSN288	(ag)24	-	58	287-312	7	0.761	Fukino et al. (2008)
CSN293	(ag)12	6	58	286-299	3	0.502	Fukino et al. (2008)
CSN295	(ag)15	4	58	288-298	4	0.736	Fukino et al. (2008)
CSN306	(tg)12	3	58	279-306	4	0.674	Fukino et al. (2008)
CSJCT10N	imperfect	2	55	188-226	4	0.503	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
CSJCT14	(ga)27	5	53	173-204	9	0.873	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
CSJCT252	(ga)23	-	60	296-333	9	0.842	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
CSJCT315	(ct)24	5	53	201-236	9	0.869	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
CSJCT674	(ga)23	6	50	247-280	8	0.844	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
CSJCT746	(ga)23	6	47	268-303	9	0.853	Watcharawongpaiboon and Chunwongse (2008)
CSWGATT01A	(a)12, (ga)10	2	47	361-374	3	0.481	Fazio et al. (2002)
CSWGATT01C	(gaaa)10	2	47	142-153	3	0.474	Fazio et al. (2002)
CSWCT06A	(ct)9	-	45	199-200	2	0.437	Fazio et al. (2002)
CSWTA16	(ta)6, (ta)3	-	47	317-334	2	0.418	Fazio et al. (2002)
CU427	(ct)9	-	52	248-258	2	0.440	http://www.icugi.org/
CU934	(tct)5	-	52	174-186	2	0.253	http://www.icugi.org/
CS19	(ctt)8	-	54	171-177	3	0.696	Kong et al. (2006)
CS31	(aga)9	6	53	230-269	5	0.791	Kong et al. (2006)
Total					139.00	18.294	
Mean					4.48	0.610	

도를 나타내주는 PIC 값은 0.253-0.873까지 다양하게 나타났으며, 평균값은 0.610으로 높은 경향을 나타내었다.

분자표지를 이용한 오이 품종 식별에 대한 연구 결과는 국내외적으로 거의 없는 실정이나, 유전자원의 특성 평가에 RAPD나 microsatellite 마커를 활용한 연구결과가 국외의 몇몇 연구자에 의해 보고되고 있다. Horejsi and Stab(1999)

은 오이 유전자원 118점과 44개 유통 품종을 대상으로 RAPD 분석한 이후, Hu et al.(2010)은 25개의 중국 유전자원에 대하여 21개의 EST에서 유래된 microsatellite 마커로 분석하였을 때 PIC 값은 0.185-0.642 범위이고 대립유전자의 수는 2-5개 정도가 나타남을 보고하였으며, Watcharawongpaiboon and Chunwongse(2008)은 16개 오이 유전자원을 45개의

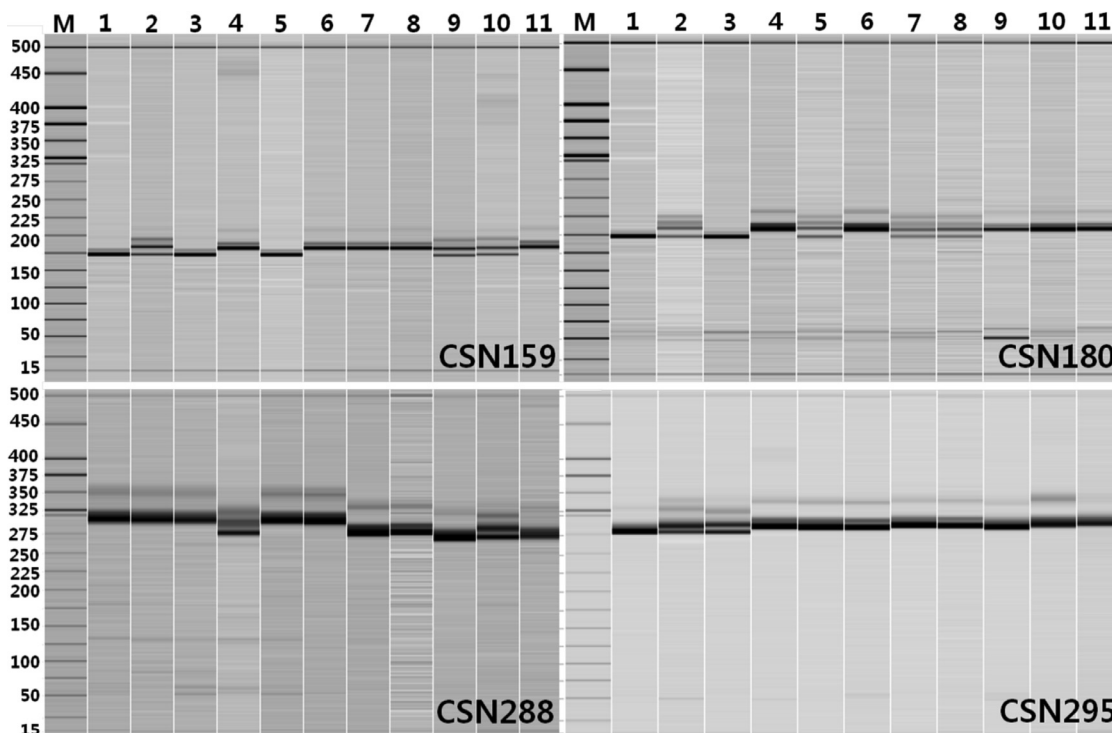


Fig. 1. Polymorphism of microsatellite markers, CSN159, CSN180, CSN288, and CSN 295. The PCR products were analyzed using a HAD-GT12™ Genetic Analyzer System. M, QX DNA size marker (25-450 bp); Lane 1, 'Cheongbaek'; 2, 'Mansahyungdong'; 3, 'Eunchim'; 4, 'Hanggangmat'; 5, 'Eunseong'; 6, 'Daehan'; 7, 'Ganghan'; 8, 'Gyeowoosalyi'; 9, 'Kyungdo'; 10, 'Garakmanchun'; 11, 'Jungbok'.

microsatellite 마커로 분석한 결과 평균 대립유전자의 수는 3.6개, PIC값은 0.47로 나타남을 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 선발된 microsatellite 마커의 경우 2-9개의 대립 유전자의 수를 나타내어 다른 연구자들보다 다소 많은 대립유전자를 나타내었을 뿐만 아니라 평균 PIC 값은 0.610으로 높은 경향이었는데 이러한 연구결과는 본 연구에 분석된 품종이 다다기, 취청, 청장 등 여러 가지 형태의 오이 품종이 포함되어 있을 뿐만 아니라 다형성 정도가 높은 마커를 1차 선발하여 이를 110품종의 품종식별에 활용했기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 한편, 본 연구에서 활용된 microsatellite 마커 중에서 PIC값이 0.70 이상인 CSN147, CSN159, CSN166, CSN180, CSN244, CSN288, CSN295, CSN306, CSJCT14, CSJCT252, CSJCT315, CSJCT674, CSJCT746, CS31은 우리나라 오이 유통품종에 높은 다형성을 나타내어, 향후 종자회사에서 오이 F₁ 품종의 순도 검정 시 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

품종식별력 검정 및 유전적 유사도 분석

Microsatellite 마커를 이용한 오이 110품종에 대한 유전적 다양성을 조사한 바(Fig. 2), 공시품종의 전체 유사도 지수는 0.24-1.00의 범위로 나타났으며, 대부분의 품종이 분자표지의 유전자형에 의해 구분이 됨을 확인할 수 있었다. 한

편, 유사도 지수 0.35를 기준으로 할 때 110개 품종은 3개 그룹으로 구분되었고, I 그룹은 다다기형 형태의 과색을 가진 오이 54품종이 속하였고, I 그룹은 다시 '럭키스트라이크'와 '웰빙맛짱'과 같은 과형이 작은 다다기형 오이와 일반 다다기 오이로 구분되었다. II 그룹은 과색이 농록색이거나 녹색인 취청, 가시 및 청풍계 오이 51품종이 포함되어 있었으며, III 그룹은 '마야', '미니스탑', '맛사지맛짱', '후레쉬', '글로벌리아' 같이 미니 오이가 하나의 품종군으로 그룹화되었다. 본 연구에서 '오대/장대명', '연백/통일/맛존', '은성/명광', '다솜/대한', '윤이나/드레곤', '겨우살이/강추', '푸루나/일동', '신록낙합/장일만능', '구룡/동방' 품종은 유전적 유사도가 95% 이상 높게 나타났는데 이는 국내 오이 육성회사에서 품종 육성에 제한된 유전자원을 이용했기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 한편, 본 연구에서 공시된 품종 중에서 '조은'과 '신흑침' 품종은 과실형태는 유사하면서 침의 색깔이 명확하게 구분되는 품종이나 분자표지의 유전자형에 의해 구분이 되지 않았는데, 이는 과실 침 색깔의 경우 단일자 우성 유전자에 의해 지배되기 때문에 이 품종을 식별하기 위해서는 침 색깔과 관계된 분자표지를 mapping하여 이와 밀접히 연관된 분자 마커를 활용해야 두 품종이 구분이 될 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 선발된 31개의 microsatellite 마커의 다형성 정도 및 반복 재현성 등을

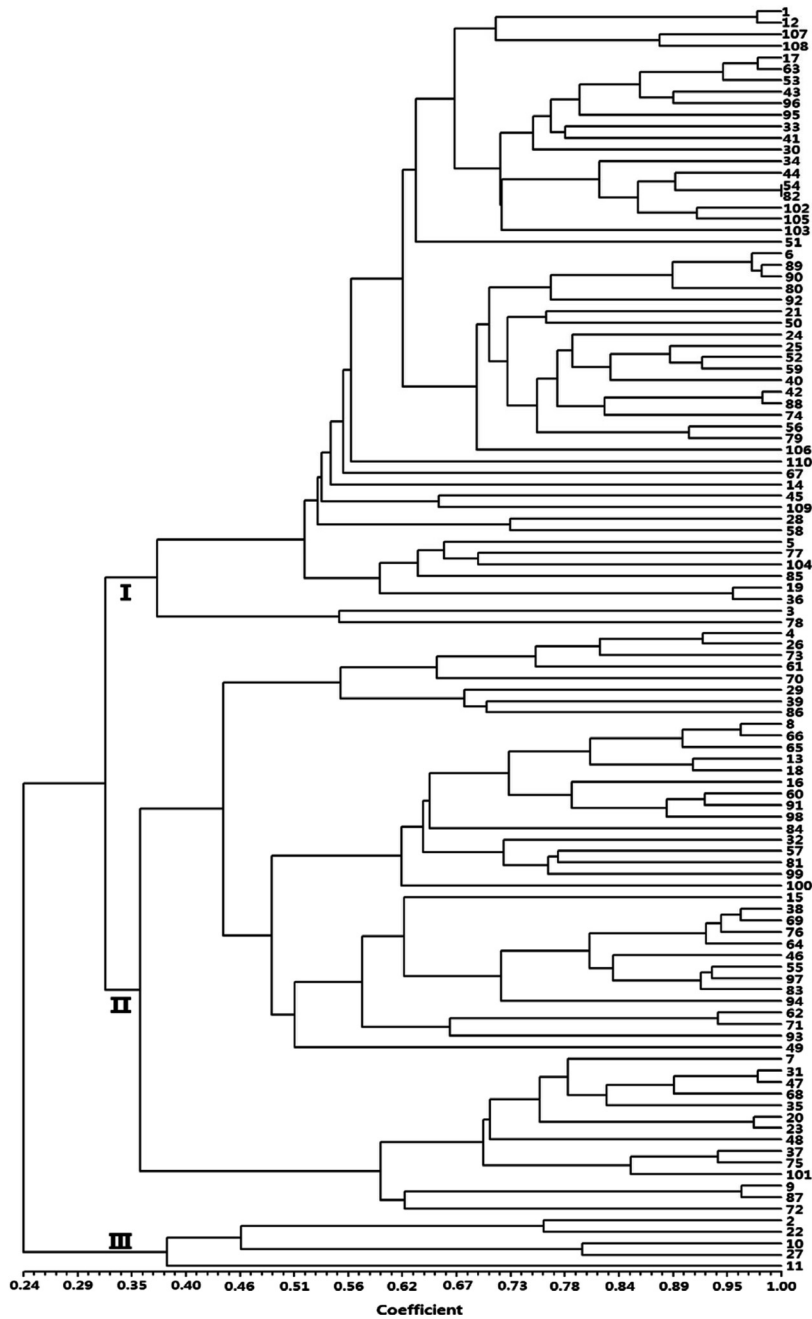


Fig. 2. Dendrogram depicting the classification of 110 cucumber cultivars constructed using UPGMA and based on microsatellite markers. Numbers 1 → 110 refer to the list of varieties in Table 1. The major clusters are marked in the dendrogram. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

고려한다면 우리나라에서 유통되고 있는 오이 대부분 품종에 대한 유전적 유연 관계 설정뿐만 아니라 품종식별도 가능할 것으로 판단된다.

UPOV는 식물 신품종의 구별성을 판단하는데 분자 표지의 차이에 의한 구별성은 인정하지 않고 있지만, 작물의 형태적 특성과 연관된 분자 마커 및 분자 마커와 형태적 특성의 복합적 활용에 의한 기존품종의 관리, 품종보호출원 품종의 선 DNA 검정에 의한 대조품종의 선정 등의 경우 그 활용을 인정하고 있는 추세이다. 실제로 본 연구에서 개발

된 분자 마커를 활용하여 품종보호 출원품종에 대한 선 DNA 검정 후 기구축된 오이 품종별 데이터베이스와 비교 검정한 다음 유전적으로 유사도가 높은 품종을 대조품종을 선정하여 재배 시험한 결과 두 품종 간에 뚜렷한 구별성이 나타나지 않은 사례가 확인된 경우도 2차례 있어 품종보호 등록이 거절된 바 있다. 따라서 오이 품종별 microsatellite 데이터베이스를 재배시험 특성 조사와 융·복합적으로 활용한다면 품종보호 제도를 한층 더 강화시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 본 연구에서 활용된 오이 품종식별 microsatellite 마커

는 종자회사 및 육묘장과 농업인 간에 발생하는 재배 식물의 품종진위성 관련 종자 분쟁을 3건 해결하는데 중재 수단으로 활용된 바도 있어, 향후 종자 회사 간 발생하는 권리분쟁 해결할 뿐만 아니라 F₁ 종자의 순도검정 등 다방면에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

국내에서 유통되고 있는 오이 110 품종을 대상으로 micro-satellite 마커를 이용하여 DNA profile 데이터베이스를 구축하기 위하여 품종식별력이 높은 분자 마커의 선정 및 이를 활용한 품종간 유전적 유사도 검정 등에 대한 연구를 수행하였다. 오이 11 품종을 358개의 microsatellite 마커로 검정하여 31개의 다형성이 높은 마커를 선정한 다음 110 품종에 대한 DNA profile 데이터베이스를 구축하였다. 오이 110 품종을 31개의 microsatellite 마커로 분석하였을 때 대립유전자의 수는 2-9개로 비교적 다양한 분포를 나타내었으며 전체 139개의 대립유전자가 분석되었다. PIC 값은 0.253-0.873 범위에 속하였으며 평균값은 0.610으로 나타났다. Microsatellite 마커들의 대립유전자를 이용하여 계통도를 작성하였을 때 110 품종이 과실의 형태에 따라 그룹화되는 것을 확인하였으며, 대부분이 품종이 microsatellite 마커의 유전자형에 의해 식별이 되는 것으로 나타났다. 이 연구결과에 의해 개발된 오이 품종별 DNA profile 데이터베이스는 품종보호 출원 품종의 선 DNA 검정을 통한 대조품종 선정, 구별성, 균일성, 안정성 확인에 매우 유용하게 이용할 수 있어 향후, 품종보호권 강화 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

추가 주요어 : 구별성, 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.
- 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.
- Fazio, G., J.E. Staub, and S.M. Chung. 2002. Development and characterization of PCR markers in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 127:545-557.
- Fukino, N., Y. Yoshioka, N. Kubo, M. Hirai, M. Sugiyama, Y. Sakata, and S. Matsumoto. 2008. Development of 101 novel SSR markers and construction of an SSR-based genetic linkage map in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Breed Sci.* 58:475-483.
- Kong, Q., C. Xiang, and Z. Yu. 2006. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database. *Mol. Ecol. Notes* 6:1234-1236.
- 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 annum* L.) varieties. *Molecules Cells* 19:428-435.
- Kwon, Y.S., S.G. Park, and S.I. Yi. 2009. Assessment of genetic variation among commercial tomato (*Solanum lycopersicon*) varieties using SSR markers and morphological characteristics. *Genes Genomics* 31:1-10.
- Kwon, Y.S., Y.H. Oh, S.I. Yi, H.Y. Kim, J.M. An, S.G. Yang, S.H. Ok, and J.S. Shin. 2010. Informative SSR makers for commercial variety discrimination in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Genes Genomics* 32:115-122.
- Horejsi, T. and J.E. Staub. 1999. Genetic variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genetic Resources Crop Evolution* 46:337-350.
- 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.
- International Union for the Protection New Varieties of Plant (UPOV). 2005. The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular (BMT/9/14): Report. UPOV, Washington, D.C.
- International Union for the Protection New Varieties of Plant (UPOV). 2008a. The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular (BMT/11/12): The Spanish experience (GESLIVE-IRTA) on the enforcement of plant variety rights: DNA-fingerprinting. UPOV, Madrid.
- International Union for the Protection New Varieties of Plant (UPOV). 2008b. The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular (BMT/11/15): preparation of guideline for method validation of DNA identification for the enforcement of plant breeder's rights in Japan. UPOV, Madrid.
- International Union for the Protection New Varieties of Plant (UPOV). 2010. The working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular (BMT/12/09): Application of SSR and SNP in maize variety identification and database construction. UPOV, Ottawa.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman W.H., San Francisco.
- Watcharawongpaiboon, N. and J. Chunwongse. 2008. Development and characterization of microsatellite markers from an enriched genomic library of cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Breed.* 127:74-81.