

Research Report

Microsatellite Marker를 이용한 멜론 시판품종의 품종식별과 F₁ 순도검정권용삼^{1*}, 홍지화²¹동아대학교 생명자원과학대학 유전공학과²농림축산식품부 국립종자원 재배시험과

Use of Microsatellite Markers to Identify Commercial Melon Cultivars and for Hybrid Seed Purity Testing

Yong-Sham Kwon^{1*} and Jee-Hwa Hong²¹Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea²Variety Testing Division, Korea Seed and Variety Service, Ministry for Agriculture, Food and Rural Affairs, Suwon 443-400, Korea

Abstract: Microsatellite markers were used to identify 58 major commercial melon cultivars, and to assess hybrid seed purity of a melon breeding line known as '10H08'. A set of 412 microsatellite primer pairs were utilized for fingerprinting of the melon cultivars. Twenty-nine markers showed hyper-variability and could discriminate all cultivars on the basis of marker genotypes, representing the genetic variation within varietal groups. Cluster analysis based on Jaccard's distance coefficients using the UPGMA algorithm categorized 2 major groups, which were in accordance to morphological traits. The DNA bulks of female and male parents of breeding line '10H08' were tested with 29 primer pairs based on microsatellites to investigate purity testing of F₁ hybrid seeds, and 5 primer pairs exhibited polymorphism. One microsatellite primer pair (CMGAN12) produced unambiguous polymorphic bands among the parents. Among 192 seeds tested with CMGAN12, progeny possibly generated by self-pollination of the female parent were clearly distinguished from the hybrid progeny. These markers will be useful for fingerprinting melon cultivars and can help private seed companies to improve melon seed purity.

Additional key words: *Cucumis melo*, genetic purity assessment, genetic relationship, molecular markers

서 언

멜론은 2012년 현재 재배면적이 1,470ha이며 생산량이 45,634kg에 달하는 것으로 알려져 있다(http://www.mafra.go.kr). 2014년 2월 28일 현재 품종보호출원 및 등록된 30품종과 생산 수입판매 신고된 428품종이 국내 종자시장에서 유통되고 있다(http://www.seed.go.kr). 멜론에 대한 분자유전학적 연구 동향을 살펴보면, 2001년 이스라엘에서 30개의 simple sequence repeat(SSR) 표지를 최초로 개발(Danin-Poleg et al., 2001)하여 유전자원 특성평가에 활용한 이래, 일본, 브라질, 스페인에서도 멜론 유래의 SSR 표지를 개발하여 박과작

물에 활용가능성 탐색(Chiba et al., 2003), 유전자원의 특성 평가(Ritschel et al., 2004), 유전자 지도 작성(Fernandez-Silva et al., 2008; Gonzalo et al., 2005), 양적 형질과 관련된 유전자좌의 분석(Diaz et al., 2011), 오이와 멜론의 비교유전체 연구(Li et al., 2011) 등 여러 가지 분야에 활용해오고 있다.

최근 지식재산권의 하나인 신품종의 보호에 분자표지의 활용에 대한 육종가의 관심이 증가하면서 International Union for the Protection of New Cultivars of Plants(UPOV, http://www.upov.int)에서는 분자생물학적 기술의 활용과 데이터베이스 구축에 대한 국제적인 표준화를 이루기 위해서 DNA

*Corresponding author: yskwon3@dau.ac.kr

※ Received 20 December 2013; Revised 10 April 2014; Accepted 29 April 2014.

© 2014 Korean Society for Horticultural Science

검정에 대한 가이드라인(UPOV, 2010)을 제정하였을 뿐만 아니라 품종보호 재배심사에 분자생물학적 기술의 작물별 활용 방안에 대한 문서(UPOV, 2011)를 채택할 정도로 분자표지의 중요성은 점차 높아지고 있다. 실제로 유럽연합에서는 유럽품종보호사무소(Community Plant Variety Office, CPVO)의 주관 하에 여러 국가의 실험실이 공동으로 참여하는 컨소시엄을 구성하여 토마토(Bredemeijer et al., 2002), 감자(Reid et al., 2011) 등의 작물에 대하여 품종식별 분자표지를 이용하여 표준화된 데이터베이스를 구축한 일련의 연구결과를 발표한 바 있다. 중국의 경우도 벼(Ying et al., 2007)와 옥수수(Wang et al., 2011)에 대한 품종별 DNA 프로파일을 데이터베이스화하고 이를 품종보호 권리 침해에 적극 활용하고 있다. 우리나라에서는 국립종자원에서 종자 시장에서 중요도가 높거나 분쟁의 발생 가능성이 큰 고추(Kwon et al., 2013), 오이(Kwon and Choi, 2013) 등과 같은 채소 작물에 대하여 국내 유통품종에 대한 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하였으며, 이를 품종보호 출원품종의 대조 품종 선정, 품종보호 등록품종의 특성 유지 확인 및 농가와 종자회사, 농가와 육묘업체 간에 발생하는 품종진위성과 관련된 종자분쟁 발생 시 적극 활용하고 있다. 그러나 박과 작물 중에서 유일하게 종자 수출(2012년 8월 기준 6,360\$)이 이루어질 정도로 종자시장에서 점차 중요도가 높아지고 있는 멜론은 국외의 연구자에 의해 다양한 microsatellite 표지가 개발되었지만 이를 이용하여 종자회사에서 판매되고 있는 F₁ 품종에 대한 품종 지문화에 대한 연구는 미확립된 실정이다.

국내에 시판되고 있는 멜론 품종은 대부분 F₁ 품종이기 때문에 양친의 교배 여부를 확인하는 순도검정의 경우 과거에는 형태적 특성 조사나 동위효소를 이용하는 방법을 주로 이용하여 왔으나 최근에는 분자생물학적 기법을 적극적으로 활용하고 있는 추세이다. 국제적으로도 해바라기(Pallavi et al., 2011)와 수박(Kwon, 2013)의 F₁ 순도 검정에 microsatellite 표지의 실용적 활용에 대한 연구 결과가 최근 보고되고 있는 추세이다. 따라서 멜론 F₁ 품종의 순도검정에 microsatellite 표지의 활용 가능성이 구체적으로 검토된다면 종자생산에 소요되는 시간과 경비를 절감시키는 효과가 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 주요한 멜론 품종에 대하여 microsatellite 표지를 활용한 품종 식별 체계 구축 및 F₁ 종자의 순도 검정 활용 가능성에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

멜론 품종 식별

본 연구에서는 국내에서 유통되고 있는 멜론 58품종을 공시하여 microsatellite 표지의 분석 재료로 활용하였다(Table 1). 공시 품종의 종자 5립과 텅스텐 구슬 1개를 2mL 튜브에 넣고 분쇄기(Pulverisette 6, Fritsch, Germany)를 이용하여 종자를 고르게 마쇄하였다. 충분히 마쇄된 시료는 NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel Cat. 740 770.250, Germany) 키트를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동하여 DNA 농도를 확인한 후 10ng·μL⁻¹의 농도로 정량하여 PCR 분석에 이용하였다.

멜론 품종식별에 효율적인 분자표지를 선별하기 위하여 ‘노란파파(Noranpapa)’, ‘얼스썸머스타(Earl’s summer star)’, ‘생생춘추계(Saengsaeng chunchugye)’, ‘뷰티(Beauty)’, ‘슈퍼VIP(Super VIP)’, ‘굳(Good)’, ‘얼스파티(Earl’s party)’, ‘얼스엘리트(Earl’s elite)’, ‘얼스탈런트(Earl’s talent)’, ‘자이언트(Giant)’, ‘MVP’ 품종의 DNA를 412개 microsatellite 프라이머 세트(Chiba et al., 2003; Danin-Poleg et al., 2001; Fernandez-Silva et al., 2008; Gonzalo et al., 2005; Kong et al., 2007; Ritschel et al., 2004)를 이용하여 증폭한 다음 모세관 전기영동 장치(HDA-GT12[™] System, eGenE, Inc., USA)와 컴퓨터 프로그램(Biocalculator 2.0)을 활용하여 각 시료별 대립 유전자의 차이를 분석한 다음 밴드의 패턴이 깨끗하며 다형성 정도가 높은 표지를 선정하였다. 최종 선정된 microsatellite 프라이머의 반복 재현성 검정 및 결과의 정밀도를 향상시키기 위하여, 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED 및 PET로 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드를 제작(Applied Biosystem, USA)한 다음 멜론 58품종(Table 1)에 대한 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하였다.

PCR 반응은 멜론 게놈 DNA 30ng, 0.1μM의 SSR primers, 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 초순수를 첨가하여 전체 부피를 25μL로 조절하였다. PCR(C1000, BioRad, USA) 증폭은 94°C에서 30초간 denature를 한 후, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 45초간 extension을 40cycles 수행하였다. PCR이 완료된 후 3.0μL의 증폭산물을 2.5% 아가로스 젤에서 전기영동하여 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) 0.25 μ L를 혼합한 다음 94°C에서 2분간 변성시켰다. 변성시킨 PCR 증폭 산물은 자동염기서열분석기(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystem, USA)를 활용하여 전기 영동한 다음 컴퓨터 프로그램 GeneMapper 3.7, Applied Biosystem)을 이용하여 분자표지별 대립 유전자의 크기를 결정하였다.

Microsatellite 표지의 다양성을 조사하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 polymorphism information content(PIC) 값을 산출하였다. 식에서 n 은 표지당 분석되어지는 대립유전

자의 수, P_{ij} 는 표지 i 의 밴드들 중에서 j 번째 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 표지로 선발하여 밴드의 유무(dominant marker scoring; present = 1, absent = 0)에 따라 NTSYSpc(version

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

No.	Cultivars	Seed companies	No.	Cultivars	Seed companies
1	Noranpapa	Jeil	30	Beauty	Monsanto Korea
2	Baekgeumdeongeori	Jeil	31	Super VIP	Monsanto Korea
3	Wonderful 1ho	Jeil	32	Hwangryong	Samsung
4	Wonderful 2ho	Jeil	33	SM-7	Samsung
5	Wonderful 3ho	Jeil	34	Good	Samsung
6	Papa	Jeil	35	Earl's party	Syngenta Korea
7	Papaya	Jeil	36	Homerun star	Syngenta Korea
8	Hwanggeumdeongeori	Jeil	37	Earl's elite	Syngenta Korea
9	Earl's summer star	Daeyeon	38	Earl's VIP	Nonghyup
10	Papaiya	Daeyeon	39	Red queen	Nonghyup
11	Baekja	Daeyeon	40	Fresh	Gonong
12	Super baekja	Daeyeon	41	Yellow queen	Gonong
13	Heukjinju	Daeyeon	42	Earl's yamujin	Myeongsan
14	Saengsaeng chunchugye	Daeyeon	43	Earl's happy	Koregon
15	Picnic	Daeyeon	44	Lipchundaegil	Asia
16	Miso	Daeyeon	45	Mone red 907	Asia
17	Earl's phoenix hage	Daeyeon	46	Hwanggeum	Asia
18	Marble	Daeyeon	47	Baekgeum	Asia
19	Earl's summer boom	Daeyeon	48	Honey one	Sejong
20	Earl's talent	Nongwoo Bio	49	Earl's grand prix	Jeonnam
21	Earl's expo	Nongwoo Bio	50	Rubyballchunchugye	Yiseo
22	Yellowsun	Nongwoo Bio	51	Betarich	Dongbu
23	Earl's luxury	Nongwoo Bio	52	Earl's betarich	Dongbu
24	Seolhyang	Nongwoo Bio	53	MVP	Nongwoo Bio
25	Earl's delicious	Seed land	54	Atlantic	Kaps
26	Earl's lovely	Seed land	55	Earl's enjoy chunchugye	Hanil
27	Earl's red king	Seed land	56	Alexandre	Jangchun
28	Giant	Mosanto Korea	57	Earl's bobae	Jeonnam
29	Emerald hage 1ho	Mosanto Korea	58	Earl's meli	Jeonnam

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.

멜론 F₁ 종자의 순도 검정

코레곤 종묘에서 분양 받은 멜론 '10H08' 계통의 양친 및 F₁종자 192개체를 '멜론 품종식별'에서와 동일한 방법으로 DNA를 추출하고 양친을 식별할 수 있는 표지 'CMGAN12'를 활용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 모세관 전기영동 장치(HDA-GT12™ System, eGENE, Inc., USA)를 이용하여 전기영동한 다음 컴퓨터프로그램(Biocalculator 2.0)을 활용하여 각 종자별 대립유전자의 크기를 양친과 비교·분석하였다. F₁ 종자의 순도는 국제 종자연맹(International Seed Testing Association, ISTA)에서 활용하고 있는 컴퓨터 프로그램 SeedCalc8 (<http://www.seedtest.org/en/>)을 활용하여 95% 신뢰도 수준에서 F₁ 종자의 순도를 산출하였다.

결과 및 고찰

Microsatellite 표지 선발

멜론 품종식별에 효과적인 분자표지를 선발하기 위하여, '노란파파(Noranpapa)' 등 11품종과 412개 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭한 다음, 증폭 산물을 자동 전기영동 장치(HDA-GT12™ System, eGENE, Inc., USA)를 활용하여 전기영동하고 분자표지에 따른 품종별 다형성 정도를 조사하였다. 317개의 프라이머가 공시품종 내에서 다형성을 보이지 않았고 95개가 다형성을 나타내었다. 다형성을 나타낸 프라이머 중에서 밴드의 패턴이 깨끗할 뿐만 아니라 반복 재현성이 높고 11품종 내에서 다형성 정도가 높은 프라이머 29개를 최종 선정하였다. 최종 선발된 29개의 microsatellite 정방향 프라이머의 5'-말단에 형광물질인 FAM, VIC, NED, PET가 각각 표지된 프라이머를 멜론 58품종의 genomic DNA와 PCR한 다음 자동염기서열분석기를 이용하여 전기영동한 후 각 프라이머에 따른 다형성 정도를 조사한 바(Table 2), microsatellite 표지에 의해 검출된 대립유전자의 수는 2-9개였고 총 111개의 대립유전자가 분석되었으며, 표지당 평균 대립유전자의 수는 4.9개로 나타났다. 한편 각 표지별 유전적 다형성 정도를 나타내는 PIC 값은 0.317-0.844까지

다양하게 나타났으며, 평균값은 0.643으로 다소 높은 경향을 나타내었다.

Microsatellite 표지를 이용하여 멜론 유전자원 및 품종에 대하여 검정하고 각 표지에 따른 대립유전자의 수 및 본 연구와 동일한 방법으로 산출한 PIC값에 대한 연구결과가 국내외 여러 연구자에 의해 보고되고 있다. Danin-Poleg et al. (2001)이 멜론 유래의 30개, 오이에서 유래된 10개의 SSR 표지를 이용하여 프랑스, 이스라엘, 미국, 스페인, 우리나라 등에서 수집된 13개의 유전자원을 분석하였을 때, 대립유전자의 수는 2-6개가 검출되었고 $1 - \sum P_{ij}^2$ (P_{ij} 는 표지 i 의 밴드들 중에서 j 번째 대립유전자의 빈도 수) 공식에 의해 산출된 genetic diversity 값은 0.26-0.79까지 다양하게 나타남을 최초로 보고한 이래, Chiba et al.(2003)이 여러 가지 유형의 멜론 12개 계통 및 품종을 28개의 표지로 분석 시 산출된 PIC 값은 0-0.740(평균; 0.350) 범위이고, 대립유전자의 수가 1-4개가 분포함을 밝혔다. Fernandez-Silva et al.(2008)은 멜론의 genomic library와 expressed sequence tag 에서 유래된 158개의 SSR을 이용하여 멜론 유전자원에 대한 다양성을 조사하였을 때 PIC 값이 0.21-0.82까지 나타남을 지적하였고, Monforte et al.(2003)도 27개의 멜론 유전자원을 18개의 SSR 표지를 이용하여 특성평가에 활용하였을 때 평균 대립유전자의 수가 6.3개로 높게 나타남을 보고하였다. 그러나 대부분의 연구자는 유전자원 특성 평가에 SSR 표지를 활용하였지 F₁ 품종의 genotyping에 적합한 microsatellite 표지의 선정 및 품종지문화에 구체적으로 활용한 연구결과는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서 412개 프라이머를 활용하여 11품종에 높은 다형성을 보인 29개 프라이머를 1차 선정하고 58개의 멜론 유통품종에 확대 적용하였을 때 2-9개의 대립유전자가 검출되었고 PIC 값도 0.317-0.844로 다양하게 나타나, 멜론 품종식별에 충분히 활용될 수 있을 것으로 나타났다. 한편, 본 연구에서 PIC 값이 0.70 이상인 microsatellite 표지(ECM124, CMGAN12, CMTCN50, CMBR7, CMBR25, CMBR64, CMBR78, CMBR79, CMBR98, CMBR109) 들은 공시된 품종에 대하여 높은 다형성을 나타내어, 종자 회사에서 기본식물, 원원종, 원종 및 시판종자의 순도관리 등 여러 가지 분야에서 실용적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

품종식별력 검정 및 유전적 유사도 분석

Microsatellite 표지에 의해 검출된 대립유전자 수를 근거로 멜론 58품종에 대한 유전적 다양성을 조사한 바(Fig. 1),

Table 2. Repeat motif, number of alleles, and polymorphism information content (PIC) value of microsatellite markers selected for genetic characterization of commercial melon cultivars.

Microsatellite designation	Primer sequence ¹⁾	Repeat motif	Annealing temperature	Product size (bp)	No. of alleles	PIC value
ECM54 ^z	F: VIC-TCGTGATTTTGGGTCCAGTA R: TGCAATCAGGAATGAACAACCTC	(AG)17	55	78-107	2	0.500
ECM81 ^z	F: NED-CAACCATTCCTCCATTTCAT R: CACCACCTGTGACATTTGTACG	(AG)11	55	123-138	2	0.498
ECM91 ^z	F: VIC-GTTGAACATGGAAGAGTCTGCT R: AAAGAACCAGCCCTATCCAAA	(ATC)16	55	267-297	5	0.452
ECM123 ^z	F: PET-TCTAATGGGGCTTCAACTTA R: CTCCTTAGTGCATGGCTTCAC	(AAG)13	55	239-243	3	0.322
ECM124 ^z	F: NED-GCGTCTAAAAAGGGATAAAG R: ATTTTCACAAAAGGGGAGAG	(AAG)13	55	266-274	3	0.748
ECM130 ^z	F: PET-GATTGGGAAAAAGGGTATGGA R: CTGGCTCCTTCACATTTGTTGT	(AAAG)9	55	234-243	3	0.401
ECM172 ^z	F: PET-CCCCTTCCTCCATTCTCTACC R: TGAGACGTGGCAGAGAAGAA	(AG)9	55	107-115	3	0.613
ECM197 ^z	F: VIC-TGTCTTGGCATCAATCCTACC R: TTTTGAATCACACCCCTCTCTGC	(AAG)11	55	073-111	5	0.691
ECM228 ^z	F: VIC-TCTGATCGGAAAAACCCACTT R: GCCAAGAATTTTCCCAACAT	(CAT)15	55	103-115	4	0.439
GCM521 ^z	F: FAM-TGGTTCAAATCCTCAGTGGT R: CAAGGGATTCTTCCATTTCG	(GA)5GG(GA)7	55	146-161	2	0.453
CNTCN6 ^y	F: VIC-GCATTGCTCGATCAGTTTAC R: ACTCCGTCAAGATCCCAAAA	(TC)2TT(TC)16	55	144-162	5	0.688
CMGAN12 ^y	F: NED-GCATTGCTCGATCAGTTTAC R: ACTCCGTCAAGATCCCAAAA	(GA)21	55	164-206	9	0.828
CMTCN18 ^y	F: FAM-ACCAATCCATCACTCTCACT R: GAAAGAATGGGGAAAAAGAG	(TC)11N24(TC)17(TA)12	55	147-203	6	0.673
CMTCN50 ^y	F: PET-TCTACTTCCATGAATCCATC R: TAGAATGGTTAGGAAACCCCT	(TC)16((TA)12	55	114-136	9	0.724
CMBR7 ^x	F: FAM-AAAATGAATGGGAGTGCGTG R: GCCTTCCTTTTCCACCATCAA	(AG)30	55	92-113	7	0.840
CMBR25 ^x	F: PET-TGGGGTTGTCAATACAGCAA R: GGAGTGCCTGGAATGTACG	(TC)24	55	149-173	8	0.844
CMBR40 ^x	F: VIC-CGCAATCACGGGAGAGTTT R: TTGTTGCATCAAACTAACACAATC	(CT)15T3CT2(CT)2	55	153-161	3	0.481
CMBR64 ^x	F: NED-ATACAGCAGATCCACAGGGG R: ATGGGAGTGTGTGGGATGTA	(CT)24	55	137-163	8	0.844
CMBR78 ^x	F: NED-AAAATGAATGGGAGTGCGTG R: TTGCCTTCCTGTTTACCATC	(GA)(AG)(GA)21	55	94-115	7	0.843
CMBR79 ^x	F: PET-AGTGGCTGGAATGTACGTGA R: TTGCCTTCCTTTTACCATC	(GA)(AG)(GA)24	55	84-106	7	0.840
CMBR83 ^x	F: VIC-CGGACAAATCCCTCTCTGAA R: GAACAAGCAGCCAAAGACG	(GA)21(CA)(GA)2	55	127-150	4	0.586
CMBR95 ^x	F: NED-TTGACCTTTTACGGTGGTCC R: CGGACAAATCCCTCTCTGAA	(CT)N(CT)2N2(CT)21	55	103-125	5	0.607
CMBR97 ^x	F: FAM-CGCAATCACGGGAGAGTTT R: CATATTAGACCCATATTTGTTGCAT	(CA)2N2(CT)N(GA)N3(CT)N3(GA)N5(CAA)2N4(CT)	55	170-178	3	0.481
CMBR98 ^x	F: PET-ATACAGCAGATCCACAGGGG R: TGAATGGGAGTGTGTGGAAC	(CCTT)2T2(CAT)2CA2(CT)21	55	143-167	8	0.841
CMBR109 ^x	F: VIC-TGGAATGTACCGTGTGGGT R: ATACAGCAGATCCACAGGGG	(GA)23	55	127-152	7	0.846
CMBR120 ^x	F: NED-CTGGCCCTCTCAAACATAA R: CAAAAGCATCAAATGGTTG	(CT)2N11(CT)2G2(CT)T(CT)N7(TC)15	55	159-172	3	0.522
CM16 ^w	F: PET-TGCCTGTTGTGATTGAGGAG R: TTCTTCTTACCTCCGCCAAA	(TTC)8	55	196-209	3	0.317
CM38 ^w	F: PET-TAGCATCTGATCGGAAAAACC R: CAACTTCATCCGCCAAGAAT	(TCA)15	55	118-130	4	0.439
CMSS12-4 ^v	F: NED-GATGCGGTGAGAAAGAGTTGAGAGA R: AGAGGGAGAGAGTTTGTAAAAAAT	(GA)15(GA)9	55	451-473	5	0.622
Total					111	14.139
Mean					4.897	0.643

^zFernandez-Silva et al. (2008).^yGonzalo et al. (2005).^xRitschel et al. (2004).^wKong et al. (2007).^vChiba et al. (2003).¹⁾Forward primers were labeled with fluorescent dyes.

공시품종의 전체 유사도 지수는 0.22-0.97의 범위에 분포하는 것으로 나타났으며, 공시된 모든 품종이 분자표지의 유전자형에 의해 구분이 됨을 확인할 수 있었다. 한편, 유사도 지수 0.22를 기준으로 할 때 58개 품종은 크게 2개의 대그룹으로 구분되었다. I 그룹은 무네트 멜론 품종인 ‘노란파파(Noranpapa)’ 외 18종이 속하였고 유사도 지수 0.25를 기준으로 할 때 5개의 소그룹으로 구분되었다. I-1 그룹은 과실의 형태가 달걀형이면서 과피가 노란색인 ‘노란파파(Noranpapa)’, ‘원더풀2호(Wonderful 2ho)’, 유백색인 ‘원더풀3호(Wonderful

3ho)’, 녹색 얼룩무늬 과피색을 가진 ‘파파(Papa)’, ‘파파야(Papaya)’, ‘파파이야(Papaiya)’, ‘마블(Marble)’ 등 8품종이 속하였으며, I-2 그룹은 흰색바탕에 녹색 얼룩이 있는 ‘백자(Baekja)’와 ‘슈퍼백자(Super baekja)’ 2품종이 소그룹화되었다. I-3 그룹의 경우 과실의 형태가 원형이면서 과피가 노란색인 ‘옐로우썬(Yellowsun)’, ‘황금(Hwanggeum)’, ‘황룡(Hwangryong)’, ‘옐로우퀸(Yellow queen)’ 4품종이 속하였고, I-4 그룹은 과피의 색이 흰색이면서 원형인 ‘백금덩어리(Baekgeumdeongeori)’, ‘홈런스타(Homerun star)’, ‘백금

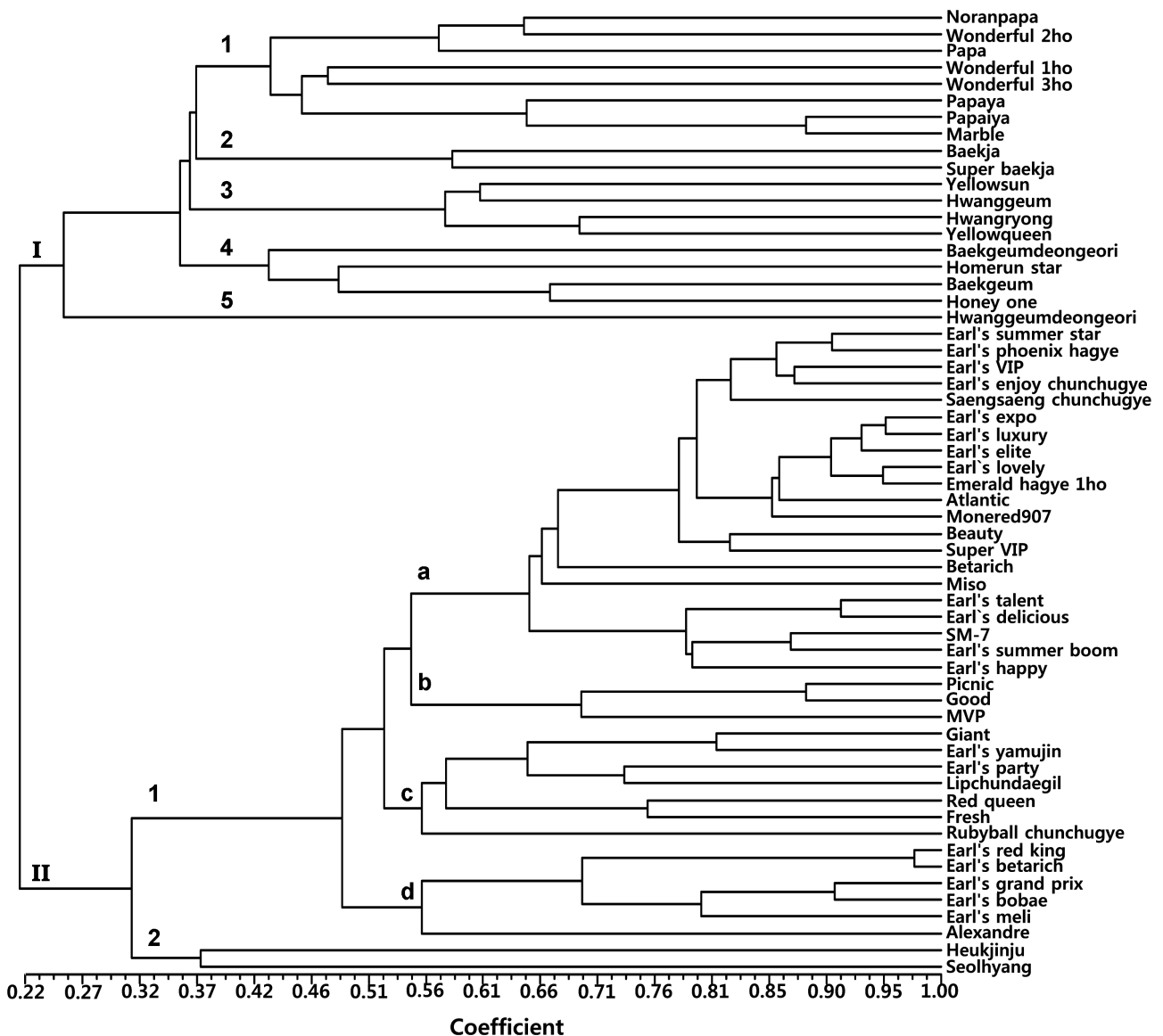


Fig. 1. A dendrogram depicting the classification of 58 commercial melon cultivars constructed based on unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA) and microsatellite markers. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

(Baekgeum), ‘허니원(Honey one)’ 품종이 포함되었으며, ‘황금덩어리(Hwanggeumdeongeori)’ 멜론은 유사도 지수 0.25에서 나머지 18품종과 뚜렷하게 구분되었다.

II 그룹은 네트 멜론 품종인 ‘얼스그랑프리(Earl’s grand prix)’ 등 40품종이 속하였고, 유전적 유사도 지수 0.33을 기준으로 2개의 소그룹으로 구분되었는데 II-1 그룹은 ‘얼스썸머스타(Earl’s summer star)’ 등 37품종이 속하였고, II-2 그룹은 과피색이 유백색이면서 과육이 흰색인 ‘설향(Seolhyang)’과 과피가 검은색이면서 네트를 가지고 황록색의 과육인 ‘흑진주(Heukjinju)’ 품종이 속하였으며 이 두 품종은 유사도 지수 0.38에서 재구분되었다. 한편 II-1 그룹에 속하는 37품종은 유사도 지수 0.55에서 4개의 소그룹으로 구분되었으며, II-1a 그룹은 ‘얼스피닉스하계(Earl’s phoenix hagye)’ 등 21품종이 속하였고, II-1b 그룹은 ‘피크닉(Picnic)’, ‘굿(Good)’, ‘MVP’ 품종이 포함되었다. II-1c 그룹은 신젠타코리아에서 육성된 ‘얼스파티(Earl’s party)’ 등 8품종이 하나의 품종군으로 소그룹화되었고, II-1d의 경우 황녹색 과육을 가지는 ‘얼스그랑프리(Earl’s grand prix)’, ‘얼스멜리(Earl’s meli)’, ‘얼스보배(Earl’s bobae)’와 적색 과육을 가지는 ‘얼스레드킹(Earl’s red king)’, ‘얼스베타리치(Earl’s betarich)’, ‘알렉산드로(Alexandre)’ 품종이 속하였다. 본 연구에서 microsatellite 표지 분석에 활용된 품종 중에서 ‘얼스엑스포(Earl’s expo)’와 ‘얼스럭셔리(Earl’s luxury)’, ‘얼스러브리(Earl’s lovely)’와 ‘에메랄드하계1호(Emerald hagye 1ho)’, ‘얼스레드킹(Earl’s red king)’과 ‘얼스베타리치(Earl’s betarich)’ 품종들의 경우 유전적 유사도 지수가 95% 이상 높게 나타났는데 이는 국내 멜론 육성회사에서 품종 육성에 특성이 유사한 유전자원을 이용했기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 한편, 본 연구에서 과육의 색깔이 적색인 ‘얼스레드킹(Earl’s red king)’, ‘레드퀸(Red queen)’, ‘모네레드907(Mone red 907)’, ‘베타리치(Betarich)’, ‘얼스베타리치(Earl’s betarich)’, ‘알렉산드로(Alexandre)’ 품종은 하나의 소그룹 내에 속하지 않았는데 향후, 분자표지의 수를 확대하여 검정하거나 과육의 색과 밀접히 연관된 분자표지를 개발하여 분석한다면 이러한 문제점이 해결될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 최근에 유통되고 있는 중요한 멜론 58개 품종에 대하여 29개의 microsatellite 표지를 이용할 때 모든 품종이 식별이 가능하였을 뿐만 아니라 멜론 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. 또한, 본 연구

에서 선정된 멜론 품종식별 표지를 이용하여 국내 참외 품종에 대한 품종식별 정도가 구체적으로 밝혀진다면 이는 멜론뿐만 아니라 참외의 DNA 프로파일 데이터베이스가 동시에 구축될 수 있을 것이며 이러한 연구 결과는 품종보호 출원품종의 대조품종 선정 통한 권리 분쟁의 사전 방지, 품종보호등록 품종의 특성 유지확인, 농산물의 도난 사건의 해결 등 여러 방면에 활용이 가능하리라 사료된다.

멜론 F₁ 종자의 순도검정

Microsatellite 표지를 이용하여 멜론 F₁ 품종에 대한 종자 순도 검정 활용 가능성을 확인하기 위하여, ‘10H08’ 계통의 양친 및 F₁ 종자 192개를 대상으로 교배 여부를 조사한 바(Fig. 2), 멜론 품종식별에 활용된 29개 microsatellite 표지를 ‘10H08’ 계통의 양친에 대하여 검정하였을 때, 5개의 프라이머(CMGAN12, CMBR7, CMBR64, CMBR98, CMBR109)가 양친에 대해 다형성을 나타내었고 이 중 분자표지 ‘CMGAN12’는 양친에 대하여 PCR 증폭 산물이 10bp 이상의 뚜렷한 차이를 나타내었다. 이 표지를 활용하여 F₁ 종자 192개를 각 개체별로 분석한 결과 192개의 종자 중에서 191개는 정상적으로 교배된 것으로 나타났고 1개의 종자가 모계형의 유전자형을 나타내어 모계로부터 자식된 종자일 가능성이 있는 것으로 확인되었다. 이 결과를 근거로 하여 국제 종자연맹에서 종자순도 분석에 활용하고 있는 SeedCalc8을 활용하여 95% 신뢰도 수준(신뢰구간; 97.13-99.99%)에서 F₁ 종자의 순도를 산출한 결과 ‘10H08’ 계통의 순도는 97.55%로 분석되었다.

일반적으로 과거에 국내종자회사에서 F₁ 종자의 순도검정은 토마토에서 유묘의 안토시안 착색 등과 같은 형태적인 표지와 무, 배추 등 십자화과 작물의 경우 동위효소 분석을 활용하여 왔으나, 최근에는 분자표지의 활용이 확대되고 있는 추세이다. 그러나 박과 작물은 대부분 형태적 특성을 활용하여 F₁ 종자의 교배여부를 확인하기 때문에 순도검정에 소요되는 시간, 경비, 노력이 많이 소요되는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 분자표지에 의한 F₁ 종자의 순도 검정의 활용 가능성에 대한 연구결과가 수박(Kwon, 2013), 양배추(Liu et al., 2007), 해바라기(Pallavi et al., 2011), 목화(Selvakumar et al., 2010)와 같이 다양한 작물에서 보고되고 있는데 대부분 활용되는 기법이 microsatellite 표지를 활용한다는 점이다. 본 연구에서도 멜론 F₁ 종자의 순도검정에 microsatellite 표지가 멜론의 순도 검정에 적합하다는 측면에서 이들 연구자의 연구결과를 확인할 수 있었으며 이는

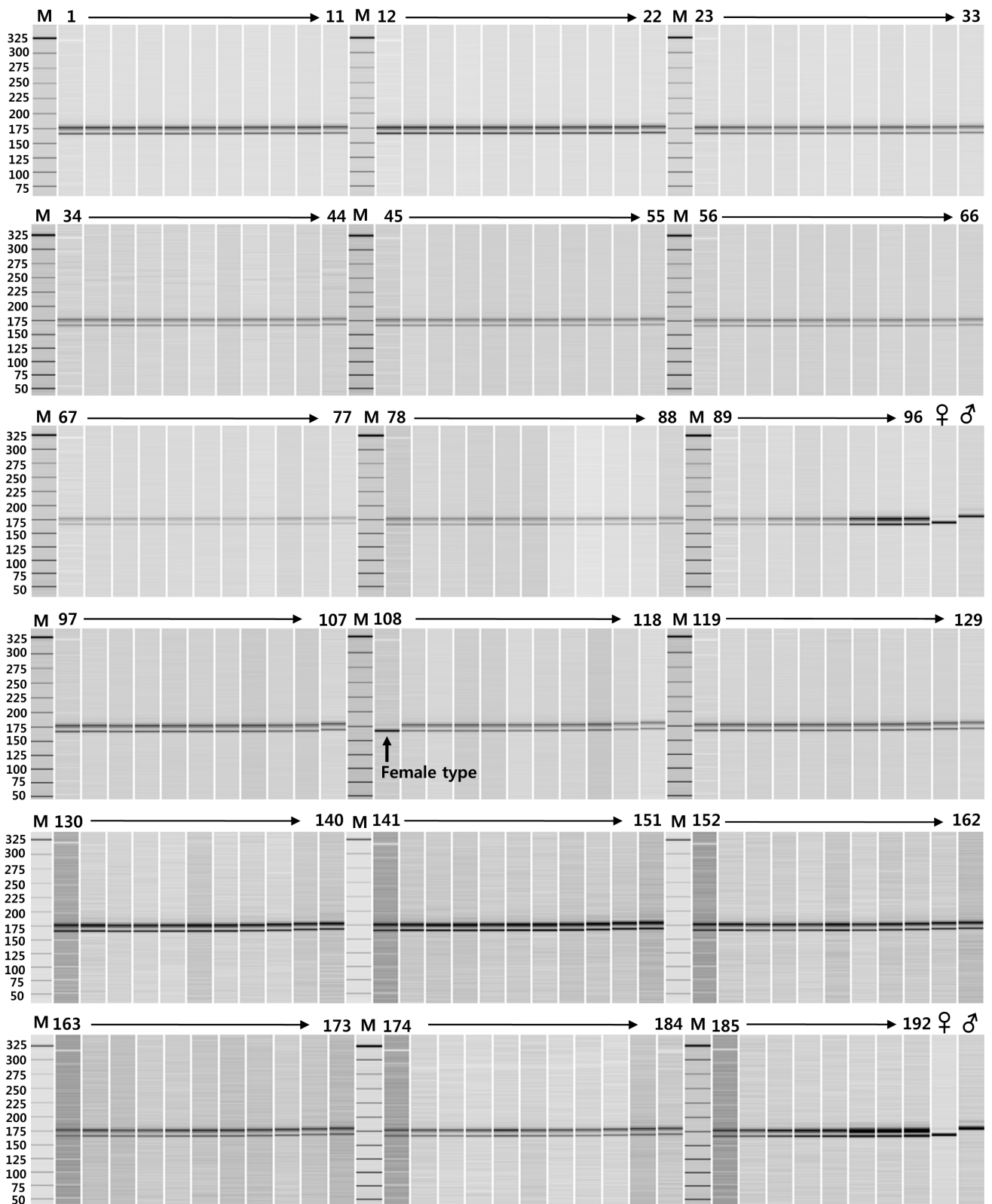


Fig. 2. Genetic purity assessment of a melon breeding line '10H08' using microsatellite primer, CMGAN12. M, QX DNA size marker (25-450 bp); lanes ♀, female plants; lanes ♂ male plants; lanes 1-192, DNA from individual F₁ seeds. The amplified products were analyzed using a HAD-GT12TM Genetic analyzer system.

멜론 품종에 대한 종자 순도를 DNA 수준에서 판단이 가능하여 종자생산에 소요되는 비용을 크게 절감할 수 있을 것으로 생각된다.

초 록

Microsatellite 표지를 이용하여 국내에서 시판되고 있는 멜론 58품종의 식별과 멜론 육종 계통 '10H08'을 이용하여 F₁ 종자 순도를 평가하였다. 412개의 microsatellite 표지 중 다형성 정도가 높은 29개는 품종 그룹 내에서도 다양한 유전 변이를 나타내었으며 분자표지의 유전자형에 의해 모든 품종을 식별할 수 있었다. Microsatellite 표지의 대립유전자를 이용하여 멜론 58품종에 대한 계통도를 작성하였을 때 멜론의 형태적 특성과 일치하면서 2개의 대그룹으로 구분되었다. F₁ 종자의 순도 검정에 microsatellite 표지를 활용하기 위하여 29개의 표지를 '10H08' 계통의 양친에 대하여 검정하였을 때 5개의 프라이머가 다형성을 보였으며, 이 중 한 개의 프라이머 'CMGAN12'는 양친간에 뚜렷한 다형성 밴드를 나타내었다. 이 프라이머를 192개의 F₁ 종자에 대하여 검정하였을 때 자식주로 보이는 개체가 분석된 종자 내에서 명확하게 구분되었다. 본 연구 결과에서 선정된 멜론 품종 식별용 microsatellite 표지는 멜론 품종의 지문화뿐만 아니라 F₁ 종자의 순도 검정이 가능하여 종자회사에서 매우 유용하게 활용될 수 있는 것으로 나타났다.

추가 주요어 : 멜론, 순도평가, 유전적 유연 관계, 분자표지

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. Dijk, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand, and B. Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 105:1019-1026.
- Chiba, N., K. Suwabe, T. Nunome, and M. Hirai. 2003. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. *Breeding Sci.* 53:21-27.
- Danin-Poleg, Y., N. Reis, G. Tzuri, and N. Katzir. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor. Appl. Genet.* 102:61-72.
- Diaz, A., M. Fergany, G. Formisano, P. Ziarsolo, J. Blanca, Z. Fei, J.E. Staub, J.E. Zalapa, H.E. Cuevas, G. Dace, M. Oliver, N. Boissot, C. Dogimont, M. Pitrat, R. Hofstede, P. van Koert, R. Harel-Beja, G. Tzuri, V. Portnoy, S. Cohen, A. Schaffer, N. Katzir, Y. Xu, H. Zhang, N. Fukino, S. Matsumoto, J. Garcia-Mas, and A.J. Monforte. 2011. A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol.* 11:111.
- Fernandez-Silva, I., I. Eduardo, J. Blanca, C. Esteras, B. Picó, F. Nuez, P. Arús, J. Garcia-Mas, and A.J. Monforte. 2008. Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118:139-150.
- Gonzalo, M.J., M. Oliver, J. Garcia-Mas, A. Monfort, R. Dolcet-Sanjuan, N. Katzir, P. Arús, and A.J. Monforte. 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110:802-811.
- 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.
- 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.
- Kong, Q., C. Xiang, Z. Yu, C. Zhang, F. Liu, C. Peng, and X. Peng. 2007. Mining and charactering microsatellites in *Cucumis melo* expressed sequence tags from sequence database. *Mol. Ecol. Notes* 7:281-283.
- Kwon, Y.S. 2013. Use of EST-SSR markers for genetic characterisation of commercial watermelon cultivars and hybrid seed purity testing. *Seed Sci. Technol.* 41:245-256.
- Kwon, Y.S. and K.J. Choi. 2013. Construction of a DNA profile database for commercial cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars using microsatellite markers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31: 344-351.
- Kwon, Y.S., J.H. Hong, and K.J. Choi. 2013. Construction of a microsatellite marker database of commercial pepper cultivars. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31:580-589.
- Li, D., H.E. Cuevas, L. Yang, Y. Li, J. Garcia-Mas, J. Zalapa, J.E. Staub, F. Luan, U. Reddy, X. He, Z. Gong, and Y. Weng. 2011. Syntenic relationships between cucumber (*Cucumis sativus* L.) and melon (*C. melo* L.) chromosomes as revealed by comparative genetic mapping. *BMC Genomics* 12:396.

- Liu, G., L. Liu, Y. Gong, Y. Wang, F. Yu, H. Shen, and W. Gui. 2007. Seed genetic purity testing of F₁ hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) with molecular marker analysis. *Seed Sci. Technol.* 35:477-486.
- Monforte, A.J., J. Garcia-Mas, and P. Arus. 2003. Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding* 122:153-157.
- Pallavi, H.M., R. Gowda, K. Vishwanath, Y.G. Shadakshari, and K. Bhanuprakash. 2011. Identification of SSR markers for hybridity and seed genetic purity testing in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Sci. Technol.* 39:259-264.
- 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 cultivars on the EU common catalogue. *Euphytica* 182:239-249.
- Ritschel, P.S., T.C. Lins, R.L. Tristan, G.S. Buso, J.A. Buso, and M.E. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol.* 4:9.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Selvakumar, P., R. Ravikesavan, A. Gopikrishnan, K. Thiyagu, S. Preetha, and N. Manikanda Boopathi. 2010. Genetic purity analysis of cotton (*Gossypium* spp.) hybrids using SSR markers. *Seed Sci. Technol.* 38:358-366.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman W.H., San Francisco.
- 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 cultivars. *Maydica* 56:7-18.
- Tomason, Y, P. Nimmakayala, A. Levi, and U.K. Reddy. 2013. Map-based molecular diversity, linkage disequilibrium and association mapping of fruit traits in melon. *Mol. Breeding* 31:829-841
- Zhao, Z., H. Gu, X. Sheng, H. Yu, J. Wang, and J. Cao. 2012. Genetic purity testing of loose-curd cauliflower hybrids using SSR markers and grow out test. *Seed Sci. Technol.* 40:209-214.