

Research Report

박과작물의 유연관계 분석을 통한 수박 EST-SSR 마커의 종간 적용성 검증

김혁준¹, 여상석¹, 한동엽¹, 박영훈^{1,2*}¹부산대학교 원예생명과학과²부산대학교 생명산업융합연구원

Interspecific Transferability of Watermelon EST-SSRs Assessed by Genetic Relationship Analysis of Cucurbitaceous Crops

Hyeogjun Kim¹, Sang-Seok Yeo¹, Dong-Yeop Han¹, and Young-Hoon Park^{1,2*}¹Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea²Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Abstract: This study was performed to analyze genetic relationships of the four major cucurbitaceous crops including watermelon, melon, cucumber, and squash/pumpkin. Among 120 EST-SSR primer sets selected from the International Cucurbit Genomics Initiative (ICuGI) database, PCR was successful for 51 (49.17%) primer sets and 49 (40.8%) primer sets showed polymorphisms among eight Cucurbitaceae accessions. A total of 382 allele-specific PCR bands were produced by 49 EST-SSR primers from 24 Cucurbitaceae accessions and used for analysis of pairwise similarity and dendrogram construction. Assessment of the genetic relationships resulted in similarity indexes ranging from 0.01 to 0.85. In the dendrogram, 24 Cucurbitaceae accessions were classified into two major groups (Clade I and II) and 8 subgroups. Clade I comprised two subgroups, Clade I-1 for watermelon accessions [I-1a and I-1b-2: three wild-type watermelons (*Citrullus lanatus* var. *citroides* Mats. & Nakai), I-1b-1: six watermelon cultivars (*Citrullus lanatus* var. *vulgaris* Schrad.)] and Clade I-2 for melon and cucumber accessions [I-2a-1: 4 melon cultivars (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naudin.), I-2a-2: oriental melon cultivars (*Cucumis melo* var. *conomon* Makino.), and I-2b: five cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.)]. Squash and pumpkin accessions composed Clade II [II-1: two squash/pumpkin cultivars [*Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.)/Duch. & Poir. and *Cucurbita maxima* Duch.] and II-2: two squash/pumpkin cultivars, *Cucurbita pepo* L./*Cucurbita ficifolia* Bouche.]. These results were in accordance with previously reported classification of Cucurbitaceae species, indicating that watermelon EST-SSRs show a high level of marker transferability and should be useful for genetic study in other cucurbit crops.

Additional key words: comparative genetics, DNA fingerprinting, genetic distance, genetic diversity

서 언

박과(Cucurbitaceae) 식물은 118개 속(genera), 약 800종(species)으로 이루어져 있으며 대부분 1년생 초본과로 온화한 기후나 열대지방에서 생육한다(Jeffrey et al., 1980). 박과에 속하는 주요 작물로는 수박(*Citrullus lanatus*(Thunb.) Matsum. & Nakai.), 호박(*Cucurbita* spp.), 오이(*Cucumis sativus* L.),

멜론(*Cucumis melo* L.)이 있다. 이들 작물들의 2013년 전세계 생산량은 수박(1억 9백만 톤), 오이(7천 1백만 톤), 멜론(2천 구백만 톤), 호박(2천 2백만 톤)의 순으로 전체 채소 생산량의 약 30%를 차지함으로써(FAO, 2013), 생산에 따른 농가의 수익뿐만 아니라 종자산업에도 큰 수익을 창출해 내는 작물들이다.

이러한 작물들의 유연관계 및 유전적 다양성에 대한 분석

*Corresponding author: ypark@pusan.ac.kr

※ Received 19 July 2014; Revised 23 September 2014; Accepted 10 October 2014. 본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(채소종자사업단, 과제번호: 213002-04-1-SBR20)에 의해 이루어진 것임.

© 2015 Korean Society for Horticultural Science

은 유전적 범위에 대한 정보와 계통발생, 작물의 기원지 분석, 다양한 육종 재료 확보 측면에서 F₁ 잡종 품종이 주를 이루는 육종 사업에서 넓은 유전적 배경을 파악할 수 있는 중요한 연구 분야이다. 과거 시설의 필요와 많은 시간이 투자되고 환경적인 영향에 의해 유전적 판별에 오류가 발생할 수 있는 표현형(phenotype)의 차이를 이용하였다. 그러나 유전자형(genotype)을 통하여 표현형을 판별하는 방법인 분자표지(molecular marker)는 시간과 장소의 구애를 받지 않고 좀 더 정확한 유전정보를 얻을 수 있다. 분자표지는 유전적 다양성 연구, 품종판별(cultivar identification), 유전자 지도(genetic map) 작성 및 주요 형질의 분자표지를 이용한 선발(marker-assisted selection) 등 넓은 분야에 이용되고 있다 (Hwang et al., 2011). 식물의 유전적 다양성 및 유연관계 분석을 위해 활용되어 온 분자표지로서는 isozyme(Akashi et al., 2002; Knerr et al., 1989), restriction fragment length polymorphism(RFLP)(Dijkhuizen et al., 1996; Yi et al., 2006), random amplified polymorphic DNA(RAPD)(Ferriol et al., 2003b; Horejsi et al., 1999; Lee et al., 2003; Levi et al., 2001; Zhuang et al., 2004), amplified fragment length polymorphism (AFLP)(Ferriol et al., 2003a; Garcia-Mas et al., 2000), simple sequence repeat(SSR)(Chung et al., 2006; Katzir et al., 1996; Kwon et al., 2010; Ritschel et al., 2004) 등의 사례들이 있다. 특히 최근에 많이 사용되고 있는 expressed sequence tags (ESTs)은 발현된 유전자 부위에서 나타난 mRNA의 역전사를 통해 염기서열이 밝혀진 cDNA의 한 부분으로서 가지(Nunome et al., 2009), 고추(Yi et al., 2006), 토마토(D'Agostino et al., 2007), 장미(Park et al., 2010)에서뿐만 아니라 많은 수의 작물에서 EST의 염기서열이 분석되어 있고 데이터화 되어 있다.

박과의 경우 International Cucurbit Genomics Initiative(ICuGI) database(<http://www.icugi.org>) 내에 멜론, 오이, 수박, 호박에 대한 ESTs 정보가 게시되어 있다. 이러한 EST의 정보를 통하여 유전자 전사체 기반의 분자표지 개발이 가능한데, EST-SSR의 경우 EST 내에 존재하는 초위성 염기서열(microsatellite) 또는 단순반복서열(simple sequence repeat)를 이용할 수 있는 분자표지의 한 형태이다. 초위성 염기서열은 DNA 내에 비교적 풍부하게 존재하며 재현성이 뛰어난 공우성 표지로 이용 가능하다. 따라서 기존 EST 정보를 이용한 EST-SSR 개발은 새로운 SSR을 찾는 데 소비되는 비용을 절감할 수 있고, 이들 표지들이 유전자에 기반한 것이라는 측면에서 발현되는 유전자-특이적(gene-specific)라 할 수 있다. 또한 유전자의 종속간 상동성에 기인함으로써 분자표지의 종내 또는 근연종 간 이동성(transferability)이 (Ellis and Burke, 2007; Gupta et al., 2003) 중 간 비교유전체 연구에 활용성이 높다(Park et al., 2010). 이러한 EST-SSR을 이용하여 유전적 다양성을 연구한 사례는 멜론(Kong et al., 2006), 호박(Kong et al., 2007), 수박(Levi et al., 2009)이 있으나 4가지 박과 주요 작물의 유연관계분석에 이용된 사례는 드물다.

따라서 본 연구에서는 ICuGI DB에 공시되어 있는 수박의 EST-SSR에 대한 PCR Primer 염기서열을 선발하여 수박 EST-SSR 마커의 타 박과 주요 작물(오이, 참외, 멜론, 호박)에 적용 가능성을 알아보고, 박과 종의 F₁ 품종과 계통 간 유연관계를 분석하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

합성된 EST-SSR primer의 PCR 검정용 1차 DNA 분석

Table 1. Eight accessions of Cucurbitaceous crops used as the first plant sample panel for evaluation of the watermelon EST-SSR primer sets.

Species	Scientific name	Cultivar	Provider
Watermelon	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i> Mats. & Nakai	Gongdae	-
	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vulgaris</i> Schrad	Speedggul	Nongwoo-Bio.
Squash/Pumpkin	<i>Cucurbita moschata</i> (Duch. ex Lam.) Duch. & Poir	Nongwoojosengpoot	Nongwoo-Bio.
	<i>Cucurbita maxima</i> Duch.	Dambibambhobak	Jingheung Jongmyo
	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Saeronzuccine	Hyundai Jongmyo
Melon	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Naudin.	Earl's Elite	Syngenta
Oriental melon	<i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i> Makino	Geummadalggul	Mirae Jongmyo
Cucumber	<i>Cucumis sativus</i> L.	Janghyeongnakhhab	Nongwoo-Bio.

시료로 수박 F₁ 1 품종(*Citrullus lanatus* var. *vularis* Schrad.) 과 야생종 1 계통 *Citrullus lanatus* var. *citroides* Mats. & Nakai.), 호박 F₁ 3 품종[*Cucurbita moschata*(Duch. ex Lam.) Duch. & Poir, *Cucurbita maxima* Duch., *Cucurbita pepo* L.], 멜론 F₁ 1 품종(*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naudin.), 참외 F₁ 1 품종(*Cucumis melo* var. *conomon* Makino.), 오이 F₁ 1 품종(*Cucumis sativus* L.) 등 총 8점의 식물시료를 사용하였다(Table 1). 박과 작물 간 유연관계 분석을 위한 2차 DNA 분석 시료로는 수박 3 야생종 계통, F₁ 6 품종 총 9점, 호박 F₁ 4 품종, 오이 F₁ 5 품종, 멜론 F₁ 2 품종과 2 육성계통, 참외 F₁ 2 품종 등 총 24점의 식물시료가 사용되었다(Table 2).

DNA 추출

DNA 추출은 발아 후 3주된 유엽을 사용하였다. 각 식물 시료에서 얻은 잎 0.5-2g을 1.5μL micro-centrifuge tube에 넣고 steel bead와 600μL DNA extraction buffer을 넣어준 뒤 TissueLyser(QIAGEN, Netherlands)를 이용하여 분쇄시키고 45분간 65°C에 waterbath를 이용하여 반응시켰다. 그 다음 200μL 7.5 M ammonium acetate를 넣고 15분 동안 4°C에 반응 시킨 후 10분간 14,240 × g으로 원심분리 시켰다. 새로운 1.5μL micro-centrifuge tube에 5μL glycogen solution (5mg·mL⁻¹)과 600μL isopropanol을 넣은 후 원심분리시킨 tube의 상층액을 털어서 새로운 튜브에 넣어주고 잘 혼합해 준 뒤 10분간 14,240 × g으로 원심분리시켜 주었다. 원심분리

Table 2. Twenty-four accessions of Cucurbitaceous crops used as the second plant sample panel for genetic relationship study based on watermelon EST-SSRs.

EN ^z	Species	Scientific name	Cultivar	Provider
1	Watermelon	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i> Mats. & Nakai.	Gongdae	-
2		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vularis</i> Schrad.	Charleston Gray	Subaeunico
3		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vularis</i> Schrad.	Augusta	Syngenta
4		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vularis</i> Schrad.	Orangeking	Nongwoo-Bio
5		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vularis</i> Schrad.	Vasko	Elite zaden
6		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vularis</i> Schrad.	Hwabo	Nongwoo-Bio
7		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>vularis</i> Schrad.	Speedggul	Nongwoo-Bio
8		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i> Mats. & Nakai	PI189225	-
9		<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i> Mats. & Nakai	PI494817	-
10	Squash/ Pumpkin	<i>Cucurbita moschata</i> (Duch. ex Lam.) Duch. & Poir	Nongwojosengpoot	Nongwoo-Bio
11		<i>Cucurbita maxima</i> Duch.	Danbam	Nongwoo-Bio
12		<i>Cucurbita pepo</i> L.	Taeyangzuccine	Nongwoo-Bio
13		<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouche.	Heukjong	Nongwoo-Bio
14	Melon	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Naudin.	Earl's Elite	GARES ^y
15		<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Naudin.	Charentais	GARES
16		<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Naudin.	JC-23	Jangchun Jongmyo
17		<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Naudin.	JC-24	Jangchun Jongmyo
18	Oriental melom	<i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i> Makino.	Keumssaragi	GARES ^y
19		<i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i> Makino.	Seonghwan	GARES ^y
20	Cucumber	<i>Cucumis sativus</i> L.	Janghyeongnakhab	Nongwoo-Bio
21		<i>Cucumis sativus</i> L.	Gangryeoksamcheok	Nongwoo-Bio
22		<i>Cucumis sativus</i> L.	Ganghobaekchim	Nongwoo-Bio
23		<i>Cucumis sativus</i> L.	Dynersity	K.S.I
24		<i>Cucumis sativus</i> L.	Mashya	Syngenta

^zEN, Entry number of 24 accessions of Cucurbitaceous crops.

^yGARES, Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services.

가 끝난 뒤 상층액을 버리고 300 μ L 70% EtOH 용액을 넣어 주고 10분간 14,240 \times g로 원심분리 시켜 세척하여 준 다음 pellet을 완전히 건조시켜 주었다. Pellet이 완전히 건조되면 0.1 M Tris 200 μ L를 넣어 용해시키고 추출한 DNA는 Nano-drop 1000(Thermo Scientific, USA) 분광광도계로 정량분석을 하였다.

EST-SSR Primer 합성 및 선발

실험에 사용된 EST-SSR primer의 염기서열 정보는 International Cucurbit Genomics Initiative database(ICuGI, <http://www.icugi.org>)에 공시된 수박의 WMU unigene을 토대로 총 650개의 primer set를 대상으로 선발하였으며, 이 중 120개의 primer set을 합성(Bioneer, daejeon, Korea)하였다. 합성한 primer set 중 1차 DNA 분석을 통해 대립유전자 특이적 PCR 증폭이 가능하고 식물 시료 간 다형성(polymorphism)을 보이는 primer set을 선발하였다. 선발된 primer set을 이용하여 2차 DNA 분석을 통해 보다 다양한 박과 식물시료의 유전자형 분석 및 유연관계 분석을 수행하였다.

PCR 및 전기영동

마커 검정을 위한 PCR용액의 조성은 genomic DNA 20ng, forward와 reverse primer 각각 0.5 μ M, 10X PCR buffer, 0.2 μ M dNTPs, 0.6 U Taq polymerase(Solgent, Korea), 그리

고 나머지는 3차 증류수를 충당하여 총 반응 용액량을 20 μ L로 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15초간, 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 (2-10cycle 동안 각 cycle 간 0.5 $^{\circ}$ C 감소), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 10cycle, 95 $^{\circ}$ C에서 15초간, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 35cycle의 touch-down PCR 단계를 거쳐 반응시켰다.

EST-SSR primer set의 PCR 증폭 산물들은 1차적으로 아가로스젤 전기영동을 통해 확인하였다. 전기영동은 2.5% 아가로스젤을 이용하여 TAE buffer 내에서 100V로 2시간 실시하였고, 분리된 PCR 생성물은 ethidium bromide를 이용하여 염색한 후 UV light 하에서 관찰하였다.

아가로스젤 전기영동을 통해 PCR 증폭이 확인된 PCR 산물들에 대해서는 Fragment AnalyzerTM(Advanced Analytical Technologies, USA)을 이용하여 보다 정밀한 유전자형 분석을 수행하였다(Fig. 1). 유전자형의 분석은 PROSizeTM 2.0 version 1.2.1.1 프로그램을 이용하였다. PCR 증폭 산물의 크기 \pm 2 bp 오차 범위 내에 있을 경우 동일한 유전자형으로 간주하고 증폭 산물이 명확한 것만 판독하였다. 각 시료 간 대립유전자(allele)는 유무(present/absent)에 따라 '1(present)'과 '0(absent)'으로 scoring 하였다.

마커 다형성 및 유연관계 분석

유전자형 분석에 사용된 primer set의 polymorphic information content(PIC) value는 다음 식을 사용하여 구하였다.

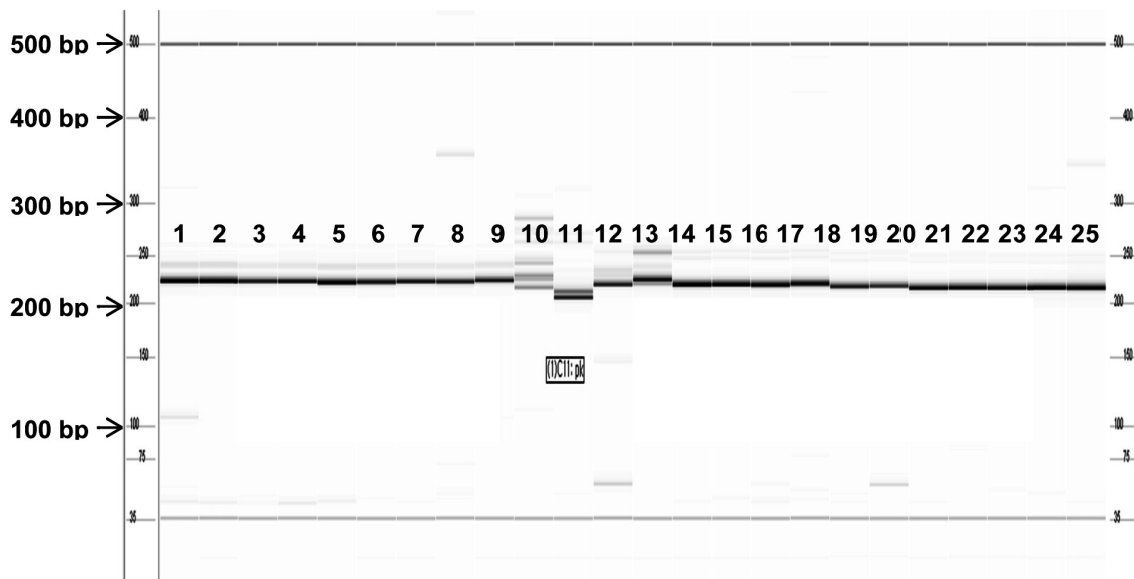


Fig. 1. Fragment Analyzer (capillary electrophoresis system) image of PCR products amplified by WMU 14110 primer set and polymorphic in 24 accessions of Cucurbitaceous crops. The numbers from 1 to 24 refer to the list of plant sample panel in Table 2.

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

PIC_j 는 EST-SSR의 polymorphic information content value를 뜻하며 P_{ij} 는 n개의 패턴 중 EST-SSR에 대한 j번째 패턴의 빈도를 나타낸다(Botstein et al., 1980). 짝유사행렬(Pairwise similarity matrix)은 Nei-Li similarity index(Nei and Li, 1979)를 이용하였으며 다음과 같다:

$$\text{Similarity} = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

N_{ab} 는 두 개의 유전자형에 공통으로 나타나는 단편의 수를 뜻하며 N_a, N_b 는 각각의 유전자형에서 나타나는 단편의 총 개수를 의미한다. 군집분석(cluster analysis)은 Nei-Li similarity 값을 기반으로 비가중 산술 결합법(UPGMA, unweighted pair group method on arithmetic averages) 방법을 이용하여 분석하였다. 모든 통계 분석에는 NTSYS-PC version 2.02k(Rohlf, 2002)를 이용하였다.

결과 및 고찰

EST-SSR Primer 선발 및 유전자형 분석

총 8개의 1차 검정 시료에 대해 120개 수박 EST-SSR primer set의 PCR 검정 결과, 51개(49.17%) primer set은 모든 식물시료에서 PCR 증폭이 가능하였으며, 이 중 식물시료 간 대립유전자 특이적 증폭산물(EST-SSR 마커) 크기에 따른 다형성을 보인 primer set은 총 49개(40.8%)였다. 선발된 49개의 primer set을 24개의 2차 식물시료에 대해 PCR 검정과 Fragment Analyzer를 이용한 전기영동 및 유전자형 분석 결과, 총 382개의 PCR 밴드가 확인되었다. 가장 많은 수와 가장 적은 수의 다형성 PCR 밴드를 나타낸 primer set은 WMU15338과 WMU15818로 각각 16개와 2개였으며, 한 primer set당 평균 다형성 PCR 밴드 수는 7.8개였다. 각 primer set의 PIC 값은 다양하였는데, 이 중 46개의 primer set이 0.5 이상의 값을 보였다(Table 3). 사용된 49개 primer set의 평균 PIC 값은 0.754였으며, 가장 높은 PIC 값을 보인 primer set은 WMU2826으로 0.904, 가장 낮은 PIC 값을 보인 primer set은 WMU15818로 0.100이었다.

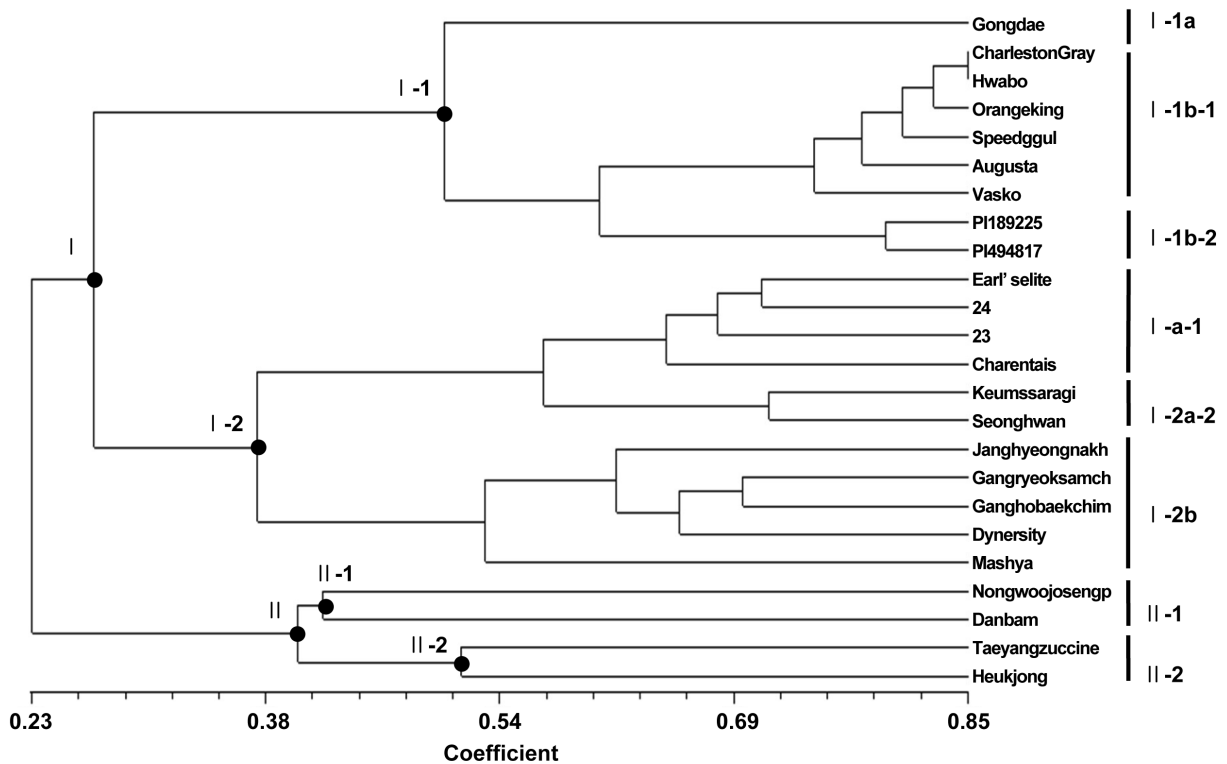


Fig. 2. A dendrogram showing the genetic relationship among 24 accessions of Cucurbitaceous crops based on 49 watermelon EST-SSR primer sets.

Table 3. List of the watermelon EST-SSR primer sets used for the evaluation of genetic relationship among 24 accessions of Cucurbitaceous crops. Tm, EPS, and An indicate melting temperature, expected product size, and allele number, respectively.

EST-SSR	Putative protein	Putative function	E-value	SSR motif	Primer sequence	Tm	EPS	PIC value	AN
WMU0003	AAL27560	abscisic acid response protein [<i>Cucumis melo</i>]	4E-10	(CCA)6	F: AAAGCCATGGCAGAAGAAGA R: CTTGTGTTTCATGGCTGTGCT	59.955	225	0.806	7
WMU0029	XP_002517606	lactoylgltutathione lyase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	2E-78	(GCA)11	F: TACCGGTGATTCCATTAGGC R: TTAATTTCTCCCGTGGGTTG	59.905	159	0.803	7
WMU0129	XP_002331872	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	1E-41	(TC)6	F: TGCITCCATTTTGGAGACC R: CAAGCACCTAGCTCTGACTCAA	59.795	265	0.842	8
WMU0155	ABC69274	putative DnaJ protein [<i>Camellia sinensis</i>]	2E-51	(TTC)10	F: GCTTCGGTTGCTACTTCTGG R: GCACGCCACAATTACTTCCT	59.819	280	0.651	4
WMU0535	ABK96555	unknown [<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>]	9E-25	(TTA)5	F: TATCCCTGACCAACCTGAGC R: ACCAACTTCTGTGACTCTAAAAA	60.14	236	0.781	7
WMU0542	XP_002227651	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	4E-15	(AGA)5	F: TGAGAAAGCAGCATTTGTTGG R: ATTATGGATTGCAAGACCCGC	59.646	241	0.662	5
WMU0597	BAA08094	AOBP (ascorbate oxidase promoter-binding protein) [<i>Cucurbita maxima</i>]	2E-32	(CT)6	F: GCATGAAGTGGAGACAAGCA R: AGGATGGCTAGCAGATTCCA	59.929	171	0.753	6
WMU0823	XP_002310274	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	1E-70	(TG)9	F: ACGGGCTCAAATGGAGAAAT R: TAGGGACCAATGGACAGTCG	59.797	268	0.790	8
WMU0850	XP_002516559	protein transporter, putative [<i>Ricinus communis</i>]	6E-40	(CAG)5	F: CTCCTGCATCGGATCAAAAT R: CCATGTTTCATGACATTCCCA	60.913	225	0.808	12
WMU0857	XP_002314149	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	6E-45	(TG)8	F: GTGCACTTCCACCATT R: ATGGAATGAATCCAGTGCT	60.177	242	0.821	8
WMU0995	CAN83645	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	3E-36	(CAG)7	F: TGGTTTGGACAAAGGCTAC R: GGGTGACTGAGAGAAGGCTG	59.971	126	0.716	7

Table 3. Continued.

EST-SSR	Putative protein	Putative function	E-value	SSR motif	Primer sequence	Tm	EPS	PIC value	AN
WMU1066	No hits found	-	-	(CCA) ₆	F: AAAGCCATGGCAGAGAAGA R: CTGGAGAGGAAAAGAAAAC	59.955 60.27	270	0.717	7
WMU1167	XP_002277383	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	4E-21	(CAC) ₅	F: GACCACAATCACCAACTCCC R: GCATGGTTTTATCATCAGCG	60.223 59.14	270	0.698	5
WMU1192	XP_002273467	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	2E-39	(GCC) ₅	F: TTGACTCTGATTCTCCCGGT R: AGGGGAGAAGAATTGGGAAA	59.655 59.875	141	0.826	11
WMU1502	XP_002303301	AP2/ERF domain-containing transcription factor [<i>Populus trichocarpa</i>]	1E-38	(GGA) ₆	F: CCTTATGCATCAAAGGGCGAT R: TCGTTCAGGGACACAGTACC	60.06 59.905	238	0.878	9
WMU1508	XP_002285195	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	8E-45	(CTT) ₅	F: CGTAGGTTGAGGAAACAGG R: ATATTTAAGGGGTGGAGGG	59.869 59.023	216	0.694	5
WMU1957	XP_002280404	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	3E-70	(TA) ₇	F: GAGCTGAACAAAAGCATCCC R: GATTACAGAAGCCTTTGGCC	59.82 60.375	204	0.858	13
WMU2124	No hits found	-	-	(TC) ₆	F: ACCCAGCCACATCTACAAA R: CCACCATTAAGGGATGATACTTTC	59.975 60.012	102	0.763	4
WMU2175	NP_196680	SHN3 (shine3); DNA binding / transcription factor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-07	(CTT) ₆	F: TAATGCCAACCCCATPAAA R: GCTGCCTGACTCCTCTGAAC	60.143 59.978	247	0.870	13
WMU2282	XP_002281427	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	2E-52	(TGA) ₆	F: TTCCAATCCGCTCTACTGCT R: TCATCATCCACTTCACCAGC	60.143 59.637	221	0.627	5
WMU2376	XP_002298707	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	2E-16	(AG) ₁₀	F: CCAAAATGGGCATGTCTAC R: TTTCTTATGGGTCAGCCAGC	60.192 60.214	236	0.896	12
WMU2504	XP_002284829	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	9E-39	(GCA) ₆	F: GCCTACAGATTGGTGGCAIT R: CTTGCATCTCTCCCTTGAGC	59.962 60.096	245	0.722	5
WMU2562	No hits found	-	-	(TC) ₆	F: TTGTTTGAGCATTGGGAAAA R: TCAGAACCACCCCATCATCAA	59.192 59.893	131	0.834	7

Table 3. Continued.

EST-SSR	Putative protein	Putative function	E-value	SSR motif	Primer sequence	Tm	EPS	PIC value	AN
WMU2826	AC115344	NAC domain protein NAC3 [<i>Gossypium hirsutum</i>]	2E-29	(ATT)6	F: CCGATTTTCAGTGCCGATTAT R: TGAACCGTTTGGGTACTTCC	59.923	251	0.904	15
WMU3858	XP_002514762	transcription factor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	6E-29	(ATC)8	F: TGATGAAGAAAACGTCAAGTAGTAGTG R: GAGCCTTCTTCACCCAGTTGC	59.997	211	0.658	6
WMU4058	XP_002319204	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	7E-24	(ATT)5	F: ATCGGAGGAAATCCTTTTTCG R: TGACATTTGCTATGCAGATTGAA	60.399	234	0.825	12
WMU4222	No hits found	-	-	(TTC)7	F: TCCAAGTGGCTTGTCTTTTT R: TCTCAACCTCAAATTCGGAGA	59.993	185	0.651	5
WMU4232	CAN67544	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	4E-46	(AG)6	F: GGCCACCAGATGAAAGAGAA R: CCCTTCCCAAGCTTTCCTAT	60.195	251	0.874	9
WMU11952	No hits found	-	-	(ATG)7	F: TCAATGGTGGTGAGAGCTGA R: AACCCCTGTAAAAATTGCCA	59.549	136	0.853	10
WMU12236	No hits found	-	-	(CT)6	F: TGGCCGTTCTTCAAAGCTTAC R: GTGGAGAGCCAGTAGCGAAC	59.315	149	0.460	3
WMU12270	XP_0022276078	predicted: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	3E-09	(CT)6	F: CCCACCATTGAAAAATGCTT R: GCTCGGTAGGGTTGAAATGT	60.02	248	0.801	6
WMU12334	ACU13810	unknown [<i>Glycine max</i>]	4	(ATA)8	F: CTTCTGCACTTTTTCAAAGCC R: CAGCAAATACAGATCGCTAACAA	60	198	0.711	6
WMU12911	NP_001110572	9 signal recognition particle 9 kDa protein [<i>Zea mays</i>]	2E-09	(TCT)5	F: CCTAACCCCGAAGAAATCAA R: ATCTCTTGGTACCGCACACC	59.993	209	0.863	10
WMU13711	No hits found	-	-	(TAT)5	F: AAGCAGGTGGAAGTTAGCGA R: CATCTCAACCGTGAAGGAAAG	59.997	149	0.820	10
WMU13715	No hits found	-	-	(TC)7	F: CTCCTTCTCCCACAAAACCAA R: AGGATGTAAGGGGGGAAAT	60.015	183	0.836	9
WMU13866	No hits found	-	-	(GGT)6	F: CTTGTGTTTCATGGCTGTGCT R: AAAGCCATGGCAGAAAGA	59.799	231	0.724	6
WMU14110	No hits found	-	-	(TGG)7	F: TGTTCGTCAAAGCAATAGCG R: GAGTGGCCACCGATAGAAGA	59.955	230	0.801	10
						60.014	230	0.801	10
						60.218			

Table 3. Continued.

EST-SSR	Putative protein	Putative function	E-value	SSR motif	Primer sequence	Tm	EPS	PIC value	AN
WMU14129	No hits found	-	-	(TGG)5	F: GCGGGAGCAGAGATGTTAAG R: CCTTTTAAAAAGGCCCTGTGA	59.978 60.103	232	0.753	5
WMU14987	No hits found	-	-	(CCT)5	F: GGGATGAAACAAAAACCCTGA R: TGCAACAATGGAGAAGAGGA	59.822 59.369	187	0.746	5
WMU15045	XP_002298266	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	7E-16	(TTCTCC)6	F: GATGAAGCAGTCATCGCAAA R: CCGTCGCTACTGCTCTGTAA	59.955 59.245	280	0.850	11
WMU15338	ABV25901	3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase [<i>Antirrhinum majus</i>]	1E-10	(TCT)7	F: TGCAATTTTCAGCAGGACATC R: ATTGATTCGAAAAGTCACCGC	59.805 60.081	195	0.861	16
WMU15818	XP_002265394	predicted: hypothetical protein [Vitis vinifera]	4E-17	(AGA)5	F: CATCGAAAAGTTCGACGACA R: GTCATCTCTTCTTCAGCCG	59.84 59.95	129	0.100	2
WMU16077	No hits found	-	-	(GTC)5	F: CTCCTCCATGTCGGAACTGT R: AATCTCTCTCACAAACGCATC	60.112 60.081	153	0.744	8
WMU16225	No hits found	-	-	(GGA)5	F: CAAAGTTTCAATGGCGGAAT R: TTTCCACGACCACAACTCAA	59.938 60.128	175	0.370	3
WMU16230	XP_002523973	brg-1 associated factor, putative [Ricinus communis]	1E-12	(CCG)5	F: GCTCTTTAGCTCCGTCCAA R: AGGAGAAAACCTGGGTGACCT	59.717 59.968	207	0.760	7
WMU16339	No hits found	-	-	(AT)6	F: AACTGAAATGCTCCCTGGATC R: CAGGGACCAACCCCTACAGAA	60.226 59.959	261	0.853	10
WMU16643	XP_002521470	RNA binding protein, putative [Ricinus communis]	1E-15	(GAG)5	F: ATGATATGGGCATTGGCACT R: GGACCTGGGACTTATCAGCA	60.185 60.073	201	0.869	11
WMU16698	XP_002517624	DNA binding protein, putative [Ricinus communis]	3E-51	(AT)11	F: ATTGGAACCTGCCCTCTTCCT R: TCCCAAGTCCCATAAAACAGC	60.074 59.933	258	0.861	11
WMU16703	AAD47346	ribosomal protein S26 [Pisum sativum]	4E-22	(TC)6	F: GCATTTCCACAAAAACCTTA R: AGCACCGGATGAACCTTAACG	59.801 60.132	143	0.567	5

짝유사행렬(Pairwise Similarity Matrix) 및 계통도(Dendrogram)

증폭된 384개 PCR 밴드와 Nei-Li similarity index를 이용하여 짝유사행렬(Pairwise similarity matrix)을 작성하였다 (Table 4). 작성된 짝유사행렬에서 보여진 유사도의 범위는 0.10에서 0.84이었다. 가장 높은 유사도를 보인 것은 크림슨계 수박 품종인 ‘Charleston Gray’와 무지계 수박 품종인 ‘화보’로 0.84의 값을 나타내었으며, 반면에 가장 낮은 유사도를 보인 것은 대목계 호박 F₁인 ‘흑중’과 무지계 수박 품종인 ‘화보’로 0.10의 값을 나타내었다.

짝유사행렬을 토대로 UPGMA를 통해 계통도(dendrogram)를 분석한 결과, 유사도 0.23에서 크게 2개의 clade(Clade I 과 Clade II)로 구분되었다. Clade I에는 수박, 멜론, 오이의 모든 품종들이 균을 이루었으며, Clade II에는 호박의 모든 품종들이 균을 이루었다. 이는 박과의 족(tribe)에 따른 분류와 일치한다고 볼 수 있는데, 박과(Cucurbitaceae)는

Benincaseae, Cucurbitaeae, Sycyae, Momodiceae의 4가지 족으로 이루어져 있으며 그 중 수박, 멜론, 오이는 Benincaseae 족, 호박은 Cucurbitaeae 족에 속하는 작물이다(Schaefer et al., 2009).

Clade I는 다시 0.27의 유사도에서 2개의 clade(Clade I-1, Clade I-2)로 구분되었는데, Clade I-1은 수박(*Citrullus lanatus* L.), I-2는 오리엔탈 멜론(참외)를 포함한 멜론(*Cucumis melo* L.)과 오이(*Cucumis sativus* L.)의 모든 품종이 균을 이루었다. Clade I-1은 유사도 0.50에서 다시 수박 대목용 야생종 품종인 ‘공대’가 I-1a, 그 외 8개 품종이 I-1b의 독립된 군으로 구분되었다. I-1b는 유사도 0.61에서 다시 두 개의 clade (Clade I-1b-1와 I-1b-2)로 재배종과 야생종 품종이 구분되었는데 clade I-1b-1에는 모두 재배종(*Citrullus lanatus* var. *vulgaris* Schrad.)인 6개 품종(‘Charleston Gray’, ‘Augusta’, ‘오렌지 킹’, ‘Vasko’, ‘화보’, ‘스피드’)이 위치하였으며, 유사도 범위는 0.72-0.85로서 ‘Charleston gray’계 품종인 ‘Charleston

Table 4. Pairwise similarity matrix of 24 accessions of Cucurbitaceous crops evaluated by using watermelon EST-SSRs.

EN. ²	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
1	1.0000																									
2	0.4845	1.0000																								
3	0.4615	0.8000	1.0000																							
4	0.4720	0.8235	0.8000	1.0000																						
5	0.4968	0.7831	0.7205	0.7590	1.0000																					
6	0.4654	0.8452	0.7485	0.8214	0.7195	1.0000																				
7	0.4575	0.8025	0.7516	0.8025	0.7342	0.8000	1.0000																			
8	0.5443	0.6467	0.5802	0.5749	0.6135	0.5697	0.5660	1.0000																		
9	0.6087	0.6471	0.5818	0.6000	0.6265	0.6071	0.6049	0.7904	1.0000																	
10	0.1961	0.2222	0.2038	0.1852	0.2025	0.1625	0.1818	0.2138	0.2099	1.0000																
11	0.2237	0.2236	0.2179	0.2236	0.2038	0.1635	0.1438	0.2152	0.2236	0.4183	1.0000															
12	0.2338	0.1963	0.2152	0.1963	0.2013	0.1491	0.1806	0.2250	0.2086	0.4129	0.4156	1.0000														
13	0.2119	0.1500	0.1677	0.1625	0.1538	0.1013	0.1316	0.2038	0.2375	0.4211	0.3576	0.5098	1.0000													
14	0.2038	0.2892	0.2609	0.3012	0.2716	0.2317	0.2152	0.2822	0.2289	0.2278	0.2548	0.3019	0.2308	1.0000												
15	0.1963	0.2674	0.2635	0.2558	0.2619	0.2235	0.2073	0.2722	0.2209	0.2073	0.2331	0.2303	0.1852	0.7024	1.0000											
16	0.2000	0.2642	0.2727	0.2642	0.2323	0.2420	0.2384	0.2692	0.2264	0.2384	0.2533	0.3026	0.2685	0.6839	0.5963	1.0000										
17	0.2745	0.3086	0.3057	0.2716	0.3038	0.2625	0.2468	0.2893	0.3086	0.2727	0.2484	0.3355	0.2632	0.7089	0.6380	0.6755	1.0000									
18	0.2424	0.2874	0.3077	0.2874	0.3176	0.2674	0.2410	0.2924	0.2989	0.2651	0.3152	0.2275	0.2195	0.5765	0.5341	0.5890	0.6145	1.0000								
19	0.2405	0.3114	0.2840	0.2635	0.2945	0.2909	0.2767	0.3171	0.2515	0.2893	0.2911	0.2500	0.2548	0.5644	0.5325	0.5641	0.5409	0.7135	1.0000							
20	0.2038	0.2651	0.2733	0.2892	0.2469	0.2683	0.2658	0.2577	0.2169	0.2405	0.2293	0.2390	0.1795	0.3704	0.3452	0.4000	0.4177	0.3647	0.3190	1.0000						
21	0.2237	0.2981	0.3205	0.3354	0.2675	0.3145	0.2614	0.3038	0.2609	0.2222	0.2368	0.1818	0.1457	0.4331	0.3804	0.4000	0.4575	0.4000	0.3671	0.6752	1.0000					
22	0.2360	0.2824	0.2667	0.3294	0.2651	0.2857	0.2593	0.2994	0.3176	0.2716	0.3230	0.2945	0.2375	0.4217	0.3721	0.3899	0.4198	0.4253	0.3952	0.5783	0.6957	1.0000				
23	0.2436	0.2909	0.3250	0.3294	0.2733	0.2945	0.2675	0.2840	0.2545	0.2675	0.2821	0.2911	0.2323	0.3975	0.3234	0.4026	0.4459	0.3669	0.3333	0.5839	0.6667	0.6424	1.0000			
24	0.2128	0.2667	0.2483	0.2400	0.2466	0.2297	0.2394	0.2177	0.2133	0.2676	0.2979	0.2657	0.2286	0.3151	0.3026	0.3022	0.3239	0.3247	0.3265	0.5068	0.5248	0.5467	0.5241	1.0000		

²EN, Entry number of 24 accessions of Cucurbitaceous crops shown in Table 2.

Gray'와 무지계 품종인 '화보'가 0.85의 유사도로 가장 가까웠으며, 반면에 무지계 품종 '화보'와 크림슨계 품종 'Vasko'는 0.72의 유사도로 가장 멀었다. Clade I-1b-2는 야생종 (*Citrullus lanatus* var. *citroides* Mats. & Nakai.)에 속하는 2 계통(PI189225, PI494817)이 위치하였으며 유사도는 0.79였다. *C. lanatus* var. *vulgaris*(Clade I-1b-1)는 전 세계적으로 분포하는 재배종 수박이나, *C. lanatus* var. *citroides*(Clade I-1b-2)는 주로 남아프리카에 분포하는 야생종으로 분류된다. 과의 특성 또한 차이가 나는데 *C. lanatus* var. *vulgaris*는 적색이고 단맛의 과육을 가지는 반면 *C. lanatus* var. *citroides*는 흰색 또는 녹색의 과육색을 지니며 당도함량과 풍미 또한 다양하게 분포되어 있다. 또한 I-1b-1의 품종들이 비교적 유사도 범위가 좁고 평균 유사도가 높은 것은 재배종 수박들로서 비교적 좁은 유전적 배경과 제한된 유전적 다양성을 지니고 있기 때문으로 판단된다. 반면에, I-1a와 I-1b-2의 품종들간 유사도는 개체간 유전적 다양성 및 특성형질의 차이가 재배종에서보다 야생종에서 보다 클 것이라는 예상을 뒷받침 해 주고 있으며, 특히 *C. lanatus* var. *citroides*의 재료로 쓰인 PI189225는 탄저병(anthracoise)의 race 2와 덩굴마름병(gummy stem blight)에 저항성을 보이는 재료이며(Levi et al., 2001) PI494817은 과실썩음병(bacterial fruit blotch)의 저항성 보이는 재료로서(Hopkins et al., 2008) 병 저항성 육종의 소재로서 이용될 수 있다.

Clade I-2의 멜론과 오이는 모두 *Cucumis* 속의 종들이며, 오이(*Cucumis sativus* L., $2n = 2x = 14$)는 멜론(*C. melo* L.) ($2n = 2x = 24$)과 같이 24개 염색체를 가지는 조상 종으로부터 진화하는 과정에서 염색체 융합(chromosome fusion)을 통하여 분화된 종으로 알려져 있다(Li et al., 2011). 멜론과 오이의 비교 유전자지도와 총 게놈 염기서열을 비교한 연구에서 오이의 염색체가 멜론의 염색체 위에 조각으로 산재하거나 혹은 온전하게 보존되어 있음을 보고한 바 있다(Li et al., 2011). 이와 같이 오이와 멜론은 수박과 호박 등 타 종에 비하여 유전적으로 매우 유사한 종임을 본 연구에서도 확인할 수 있었다. 멜론과 오이 품종군은 유사도 0.37에서 두 개의 독립된 군으로 나누어졌으며, 멜론군(I-2a)은 다시 유사도 0.57에서 일반 멜론(*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) (I-2a-1)과 오리엔탈 멜론(참외, *Cucumis melo* var. *conomon*) (I-2a-1)으로 구분되었다. Silberstein 등(Yi et al., 2006)은 14개의 멜론 종을 RAPD와 RFLP를 이용하여 분석한 결과 멜론과 참외가 다른 집단을 이룬다는 결과를 보였으며, Lee 등(Lee et al., 2003)도 RAPD를 이용하여 50종의 멜론 종의

유연관계를 분석한 결과 참외와 멜론의 유전적 차이가 있다는 것을 보였다. 일반 멜론 품종군(I-2a-1)에는 'Earl's Elite', 'Charentise', JC-23, JC-24이 속하였는데, 얼스엘리트계 F1 품종 '얼스엘리트'와 녹육계 계통 JC-24가 0.71의 유사도를 나타내어 가장 높은 유사도를 보였으며 JC-24와 유럽계 품종 'Charentise'가 0.64으로 가장 낮은 유사도를 보였다. 오리엔탈 멜론군(I-2a-2)에서는 '금싸라기', '성환참외'가 0.71의 유사도로 그룹을 이루었다. 오이(*Cucumis sativus* L.) 품종들로 구성된 하위그룹 I-2b에는 '장형낙합', '강력삼척', '강호백칩', '다이너스티', '마샤'의 5개의 품종이 속하였으며 이 중 가시오이계 품종인 '강력삼척'과 반백다다기계 품종인 '강호백칩'이 0.70로 가장 높은 유사도를 보였고 취청계 품종인 '장형낙합'과 피클용 품종인 '마샤'가 0.51로 가장 낮은 유사도를 보였다.

Clade II는 '농우조생꽃'[*Cucurbita moschata*(Duch. ex Lam.) Duch. & Poir.], '단밤'(*Cucurbita maxima* Duch.), '태양쭈기나'(*Cucurbita pepo* L.), '흑종'(*Cucurbita ficifolia* Bouche.)로 구성되었으며 동양계 품종인 '농우조생꽃'과 서양계 품종인 '단밤'이 0.42의 유사도를 보이며 하위그룹 II-1을 이루었고 쭈기나계 품종인 '태양쭈기나'와 대목계 품종인 '흑종'이 0.51의 유사도를 보이며 하위그룹 II-2를 이루었다. *C. moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*는 중생식물(mesophytic)의 일년생 식물로 알려져 있으며, *C. ficifolia*는 중생식물이며 다년생 식물로 알려져 있다(Bisognin, 2002). 이와 같은 생물학적 분류로 미루어 볼 때 *C. moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*와 *C. ficifolia*가 유전적 거리가 동떨어지게 그룹 지어질 것으로 예상하였지만 결과는 다르게 나왔다. 또한 Sanjur 등(Schaefer et al., 2009)의 실험에 따르면 미토콘드리아의 *nad I* 탈수소효소 유전자의 exon B와 C 사이에 있는 intron 2 지역을 이용하여 65개의 호박 종간의 유연관계를 분석한 결과 *C. moschata*와 *C. pepo*가 가장 가까운 거리를 나타내었으며 그 다음으로 *C. maxima*가 가까운 거리를 보이며, 가장 먼 거리를 나타낸 것은 *C. ficifolia*였다. 이러한 결과는 본 연구에서 보여지는 유연관계와 차이가 있다. 이는 실험에 사용된 수박 EST-SSR primer set의 수가 Cucurbitaceae 속에 속하는 호박을 명확히 분류하기에 충분치 못하였거나, 사용된 시료가 계통이 아닌 품종으로서 품종 개발 시 중간교잡 등을 통해 유전적 특성의 조합이 일어났기 때문일 수 있다.

이상의 결과를 통하여 수박 EST-SSR 마커들이 타 박과 종의 유전체 및 마커 개발 연구분야에 적용될 수 있음을 확인하였다. 특히 이들 마커를 이용한 유연관계 분석 결과가

인용문헌

Cucurbitaceae 속의 호박을 제외한 Benincaseae 속에서 기존의 종명법에 따른 분류법과 종간 유연관계와 일치한다는 사실은 선발된 수박 EST-SSR 마커들이 타 박과 작물의 유전적 다양성 분석뿐만 아니라 유전자 지도 작성 및 박과작물 간 비교유전체 분석에 활용 가치가 있음을 보여준다. 또한 육종분야에 있어서도 다양한 박과작물의 형질선발용 분자마커 개발 및 F₁ 순도검정과 품종식별 마커개발(Choi et al., 2012)에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

초 록

본 연구는 수박의 EST-SSR 마커를 이용하여, 네 개의 주요 박과(Cucurbitaceae) 작물인 수박, 호박, 오이, 멜론의 유연관계를 분석하고 마커의 타 박과 작물에 활용 가능성을 알아보기 위해 수행되었다. Cucurbit Genomics Initiative(ICuGI) database로부터 선발된 120 EST-SSR 프라이머 중 51(49.17%)가 PCR이 성공하였고, 49(40.8%)가 8개 박과 유전자원에서 다형성을 보였다. 총 24개 박과 유전자원을 24개 EST-SSR 프라이머로 분석한 결과 총 382개 대립유전자 특이적 PCR 밴드를 얻었으며, 이를 토대로 짝유사행렬과 계통도를 작성하였다. 짝유사행렬의 범위는 0.01-0.85였으며, 작성된 계통도에서 24개 유전자원이 두 개의 주요그룹(Clade I, II)으로 분류되었다. Clade I은 다시 수박으로 구성된 하위집단 I-1 [I-1a, I-1b-2: 각 1개와 2수박 야생종(*Citrullus lanatus* var. *citroides* Mats. & Nakai)으로 구성, I-1b-1: 6개수박 재배종(*Citrullus lanatus* var. *vulgaris* Schrad.)로 구성]과 멜론과 오이로 구성된 하위집단 I-2 [I-2a-1: 4개 멜론 재배종(*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naudin.), I-2a-2: 2개 참외 재배종(*Cucumis melo* var. *conomon* Makino.), I-2b: 5개 오이 재배종(*Cucumis sativus* L.)]로 분류되었다. 호박으로 구성된 Clade II는 다시 *Cucurbita moschata*(Duch. ex Lam.) Duch. & Poir와 *Cucurbita maxima* Duch.로 구성된 하위집단 II-1과 *Cucurbita pepo* L.과 *Cucurbita ficifolia* Bouche로 구성된 하위집단 II-2로 나누어졌다. 이러한 결과는 기존의 종명법에 따른 분류와 일치하며, 따라서 수박 EST-SSR 마커를 이용한 타 박과 작물의 비교 유전체 등 연구분야에 적용 가능성을 확인하였다.

추가 주요어 : 비교 유전학, DNA 지문법, 유전적 거리, 유전적 다양성

- Akashi, Y., N. Fukuda, T. Wako, M. Masuda, and K. Kato. 2002. Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. *Euphytica* 125:385-396.
- Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*. 32:715-723.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Choi, Y.M., J.H. Hwang, K.W. Kim, Y.J. Lee, J.S. Lee, Y.H. Choi, B.G. Son, and Y.H. Park. 2012. Application of EST-SSR marker for purity test of watermelon F₁ cultivars. *J. Agr. Life Sci.* 46:85-92.
- Chung, S., J. Staub, and J. Chen. 2006. Molecular phylogeny of *Cucumis* species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome* 49:219-229.
- D'Agostino, N., M. Aversano, L. Frusciante, and M.L. Chiusano. 2007. TomatEST database: In silico exploitation of EST data to explore expression patterns in tomato species. *Nucleic Acids Res.* 35:D901-5.
- Dijkhuizen, A., W.C. Kennard, M.J. Havey, and J.E. Staub. 1996. RFLP variation and genetic relationships in cultivated cucumber. *Euphytica* 90:79-87.
- Ellis, J. and J. Burke. 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity* 99:125-132.
- Ferriol, M., B. Pico, and F. Nuez. 2003a. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 107:271-282.
- Ferriol, M., M.B. Pico, and F. Nuez. 2003b. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. *Genet. Resources Crop Evolution* 50:227-238.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. Production/Crop. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Garcia-Mas, J., M. Oliver, H. Gomez-Paniagua, and M. De Vicente. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.* 101:860-864.
- Gupta, P., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar, and H. Balyan. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol. Genet. Genomics* 270:315-323.
- Hopkins, D., A. Levi, and M. Pitrat. 2008. Progress in the development of Crimson Sweet-type watermelon breeding lines

- with resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Proc. 9th EUCARPIA Mtg. Genet. Breeding of Cucurbitaceae. INRA, Avignon, 21-24 May, 2008.
- Horejsi, T. and J.E. Staub. 1999. Genetic variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA1. Genet. Resources Crop Evolution 46:337-350.
- Hwang, J.H., S.G. Ahn, J.Y. Oh, Y.W. Choi, J.S. Kang, and Y.H. Park. 2011. Functional characterization of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) EST-SSR by gel electrophoresis and high resolution melting analysis. Sci. Hortic. 130:715-724.
- Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. Bot. J. Linnean Soc. 81:233-247.
- Katzir, N., Y. Danin-Poleg, G. Tzuri, Z. Karchi, U. Lavi, and P. Cregan. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. Theor. Appl. Genet. 93:1282-1290.
- Knerr, L., J. Staub, D. Holder, and B. May. 1989. Genetic diversity in *Cucumis sativus* L. assessed by variation at 18 allozyme coding loci. Theor. Appl. Genet. 78:119-128.
- Kong, Q., C. Xiang, and Z. Yu. 2006. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database. Mol. Ecol. Notes 6:1234-1236.
- 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., Y. Oh, S. Yi, H. Kim, J. An, S. Yang, S. Ok, and J. Shin. 2010. Informative SSR markers for commercial variety discrimination in watermelon (*Citrullus lanatus*). Genes Genomics 32:115-122.
- Lee, S.W. and Z.H. Kim. 2003. Genetic relationship analysis of melons (*Cucumis melo*) germplasm by RAPD method. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44:307-313.
- Levi, A., C.E. Thomas, A.P. Keinath, and T.C. Wehner. 2001. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. Genet. Resource Crop Evolution 48:559-566.
- Levi, A., P. Wechter, and A. Davis. 2009. EST-PCR markers representing watermelon fruit genes are polymorphic among watermelon heirloom cultivars sharing a narrow genetic base. Plant Genet. Resources 7:16-32.
- 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 12:396-409.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5269-5273.
- Nunome, T., S. Negoro, I. Kono, H. Kanamori, K. Miyatake, H. Yamaguchi, A. Ohyama, and H. Fukuoka. 2009. Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). Theor. Appl. Genet. 119:1143-1153.
- Park, Y.H., S.G. Ahn, Y.M. Choi, H.J. Oh, D.C. Ahn, J.G. Kim, J.S. Kang, Y.W. Choi, and B.R. Jeong. 2010. Rose (*Rosa hybrida* L.) EST-derived microsatellite markers and their transferability to strawberry (*Fragaria* spp.). Sci. Hortic. 125:733-739.
- 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. 4:9-22.
- Rohlf, F. 2002. NTSYS-pc: Numerical taxonomy system, version 2.1. Exeter Publishing. Ltd., Setauket, New York, USA.
- Schaefer, H., C. Heibl, and S.S. Renner. 2009. Gourds afloat: A dated phylogeny reveals an Asian origin of the gourd family (Cucurbitaceae) and numerous oversea dispersal events. Proc. Biol. Sci. 276:843-851.
- Yi, G., J. M. Lee, S. Lee, D. Choi, and B. Kim. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. Theor. Appl. Genet. 114:113-130.
- Zhuang, F., J. Chen, J. Staub, and C. Qian. 2004. Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis. Plant Breeding 123:167-172.