

핵심 Microsatellite 마커를 이용한 한국 콩 품종에 대한 Fingerprinting 분석

권용삼

DNA fingerprinting analysis for soybean (*Glycine max*) varieties in Korea using a core set of microsatellite marker

Yong-Sham Kwon

Received: 26 October 2016 / Revised: 21 November 2016 / Accepted: 24 November 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Microsatellites are one of the most suitable markers for identification of variety, as they have the capability to discriminate between narrow genetic variations. The polymorphism level between 120 microsatellite primer pairs and 148 soybean varieties was investigated through the fluorescence based automatic detection system. A set of 16 primer pairs showed highly reproducible polymorphism in these varieties. A total of 204 alleles were detected using the 16 microsatellite markers. The number of alleles per locus ranged from 6 to 28, with an average of 12.75 alleles per locus. The average polymorphism information content (PIC) was 0.86, ranging from 0.75 to 0.95. The unweighted pair group method using the arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis for 148 varieties were divided into five distinctive groups, reflecting the varietal types and pedigree information. All the varieties were perfectly discriminated by marker genotypes. These markers may be useful to complement a morphological assessment of candidate varieties in the DUS (distinctness, uniformity and stability) test, intervening of seed disputes relating to variety authentication, and testing of genetic purity in soybean varieties.

Keywords Cluster analysis, Genetic diversity, Molecular marker, Simple sequence repeat, Variety identification

Y.-S. Kwon (✉)
동아대학교 생명자원과학대학 분자유전공학부
(Department of Molecular Genetic Engineering, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 49315, Korea)
e-mail: yskwon3@dau.ac.kr

서론

국제식물신품종보호동맹(International union for the protection of new varieties of plants; UPOV)에서는 식물 지식재산권 보호에 유전자 분석 기술의 표준화를 이루기 위하여 유전자 분석 기법과 분자 표지의 선정, DNA 분리 방법 및 데이터베이스 구축 방법 등에 대한 구체적인 가이드라인을 제시하고 있다(UPOV 2010, 2011). 이 가이드라인에서는 반복 재현성이 높고 공우성을 나타내며, 여러 가지 분석 장비에서도 오차가 없고 논문이나 계통 데이터베이스를 통해 알려진 마커를 이용해야 한다는 기준을 제시하고 있다. 이러한 기준에 가장 적합한 것이 microsatellite와 single nucleotide polymorphism (SNP) 분석 방법인데 SNP 마커에 의한 품종식별 방법은 이용할 만한 정보가 아직까지 크게 부족하기 때문에 microsatellite 검정 방법이 주로 이용되고 있다. 실제로 유럽품종보호사무소(Community plant variety office; CPVO)에서는 토마토(Bredemeijer et al. 2002), 밀(Röder et al. 2002), 감자(Reid et al. 2011) 등과 같은 작물을 대상으로 품종별 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하였다. 일본에서는 딸기, 복숭아, 사과, 밤 등에 대하여 microsatellite 분석 기술에 의한 품종식별 체계를 구축하여 농업 생산물의 가공품에 대한 품종 진위성 확인 및 자국 농산물의 보호 등과 같은 분야에 유전자 분석 기술을 활용하고 있다(http://www.ncss.go.jp). 중국의 경우 옥수수에 대하여 microsatellite 마커와 SNP 분석 기술을 활용하여 품종별 데이터베이스를 구축하고 이를 품종 보호 침해에 적극 이용하고 있다(Wang et al. 2011; Tian et al. 2015). 한편, 국립종자원에서 고추(Kwon et al. 2013), 수박(Kwon et al. 2015), 무(Bae et al. 2015), 호박(Sim et al. 2015) 등과 같은 작물에 대하여 다형성이 높은 microsatellite 마커를 활용하여 종자시장에서 유통되고 있는 주요 품종에

대하여 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하였거나 구축 중에 있다. 이러한 작물별 DNA 프로파일 데이터베이스는 품종보호출원 품종의 대조품종 선정 및 품종보호 재배심사시 구별성, 균일성 및 안정성을 확인하는데 보조자료로 이용되고 있다. 최근에는 품종보호등록 품종의 특성 유지 여부를 확인하기 위하여 유전자 분석 기술과 재배시험에 의한 특성조사를 융·복합적으로 이용하고 있다. 또한 품종 식별 분자 마커는 농가와 종자 회사 및 종자회사 간에 발생하는 품종 진위성과 관련된 종자분쟁을 해결하는 하나의 수단으로 적극 활용되고 있는 추세이다.

우리나라 콩의 재배 면적은 2015년 기준 57천 ha이며 생산량은 104천 톤으로 과거에 비해 다소 감소하고 있는 추세이다(<http://www.mafra.go.kr>). 그러나, 최근 콩을 이용한 다양한 건강 식품이 개발되고 있고 그 수요도 점점 커질 것으로 예상된다. 따라서 콩 육종 목표도 다수성 이외에 용도별 신품종 개발, 기능성 고품질, 안정된 생산을 위한 병충해 및 재해 저항성 품종 개발 등으로 다양화되고 있다. 국내 콩 품종은 2016년 9월 30일 기준 품종보호 출원된 193품종중에서 163 품종이 등록되었으며, ‘대원’, ‘태광’, ‘대풍’, ‘우람’, ‘연풍’, ‘풍산나물’은 국가에서 직접 종자를 생산하여 농가에 보급하고 있다(<http://www.seed.go.kr>).

분자 마커를 이용하여 콩의 유전자원 특성 평가 및 품종식별에 대한 국내외 연구 동향을 살펴보면, microsatellite 마커에 의한 우리나라 콩 육성 품종의 유전적 다양성과 유연관계 분석 (Kim et al. 2016a, b)과 콩 보급품종과 엘리트 품종에 대한 유전적 다양성과 품종 판별(Jang et al. 2009), STS-CAPS (Sequence tagged sites-cleaved amplification polymorphic sequence) 마커 개발(Hwang et al. 2012) 등에 대한 연구를 수행한 바 일부 품종에 대해서는 식별이 되지 않음을 지적한 바 있다. 국외의 경우 일본에서 377개 microsatellite 마커를 활용하여 82개 유전자원 및 육성품종에 대해 유전적 다양성을 분석하였으며(Hwang et al. 2008), 미국에서는 콩 품종식별에 적합한 SNP 마커를 개발하여 132개 유전자원 및 품종 식별에 대한 연구 결과도 발표된 바 있다(Yoon et al. 2007). 최근, 인도에서는 자국내의 주요 콩 102 품종에 대한 microsatellite 마커의 유전자형을 설정한 다음 이를 바코드화하여 종자 순도관리에 실용적 활용이 가능함을 제시하였다(Rani et al. 2016). 이상의 연구 결과를 종합해 볼 때, 우리나라 콩에 대한 품종식별 및 유전적 다양성 연구는 유전적으로 가까운 일부 품종이 식별이 되지 않는 점과 검정 대상 품종도 농촌진흥청과 일부 지방 자치 단체에서 육성된 품종을 대상으로 분석하였다는 점이다. 따라서 최근에 농촌진흥청, 지방자치단체, 한국원자력연구원, 대학 및 벤처기업에서 육성된 품종을 대상으로 하여 품종 식별력이 높은 핵심 분자 마커의 선정은 우리나라 콩 품종의 유전적 다양성뿐만 아니라 지

식재산권 보호 및 종자의 순도관리 등 다방면에 활용될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 육성된 콩 148개 품종에 대해 반복 재현성이 우수한 microsatellite 마커를 선별하고, 이를 활용한 유전적 유연관계 분석을 통한 품종식별 정도 등에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시품종 및 DNA 추출

본 연구에서는 ‘화성꽃’ 등 148품종(농촌진흥청 114품종, 강원도 6품종, 경기도 3품종, 충청북도 2품종, 경상북도 영주시 1품종, 한국원자력연구원 3품종, 경북대학교 2품종, 소이벤처 5품종, 경상대학교 6품종, 서울대학교 2품종, 영남대학교 2품종, 제노마인 1품종, 중국 1품종)의 종자를 공시재료로 선정하였다(Table 1). 공시품종의 종자 5립을 분쇄기(Pulverisette 6, Fritsch)를 이용하여 마쇄하고 분말 200 mg을 Safe-Lock 2.0 ml 튜브(Cat. W129549M, Eppendorf, USA)로 옮긴 다음, NucleoSpin® Plant II (Cat. 740 770.250, Macherey-Nagel GmbH & Co., KG, Deusch) 키트내의 Buffer PL II buffer 400 ml을 첨가하여 조직을 lysis 시켰다. 그 이후 실험 절차는 키트에 포함된 매뉴얼에 준하여 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 분광광도계(NanoDrop2000, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 농도를 확인한 후 μ l 당 10 ng의 농도로 정량하였다.

Microsatellite 분석

우리나라 콩 품종에 대한 microsatellite 분자 마커 기반의 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하기 위하여, 국제 콩 게놈 데이터베이스(<http://www.soybase.org>) 정보와 지금까지 여러 연구자에 의해 보고된 연구 결과(Hwang et al. 2008; Kim et al. 2006; Tantasawat et al. 2011; Wang et al. 2010)를 참고하여 품종식별력이 우수한 것으로 추정된 120개의 microsatellite 마커를 선정하였다. 자동염기서열분석기(Genetic Analyzer 3730XL, Applied Biosystems, Foster, USA)를 활용하여 정밀도 높은 microsatellite 마커 분석을 하기 위하여, 프라이머의 정방향에 형광물질 FAM, VIC, NED, PET을 각각 labelling하였다(Cat. 450056, Applied Biosystems® Custom Primers, USA). PCR 증폭에 사용된 용액의 조성은 50 ng의 genomic DNA, 10 pmol microsatellite primer, 2.0 μ l 10 mM dNTP mixture, 2.5 μ l 10/ Reaction buffer, 0.5U의 HS Prime Taq polymerase (G-7000, Genet Bio, Korea)에 초순수를 첨가하여 전체 부피를 30 μ l로 조절하였다. PCR 증폭은

Table 1 List of 148 soybean varieties assayed for genetic characterization using microsatellite markers

No.	Varieties name	Parentage	Sources	No.	Varieties name	Parentage	Sources
1	Hwasongput	Pure line selection derived from Gyeongido and Gangwondo germplasm	RDA	75	Songhak	Dongsan74/Jangbaek	RDA
2	Jinyul	Hwanggeum/Sinnongheuk	RDA	76	Doremi	Namhae/YS569	RDA
3	Geomjeong3	Sinnongheuk/SNUA78010	RDA	77	Soho	Namhae/YS569	RDA
4	Anpyeong	Eunha/(KAS391-7/SS88034)	RDA	78	Jimmi	HS12/Manri	RDA
5	Shingi	Baekun/Shinpaldal2	RDA	79	Sunam	Kosuzu/Bupyeong	RDA
6	Chungdul	SI93006/Shinpaldal2	RDA	80	Dagi	Namhae/D70-6545	RDA
7	Daemang	Jangyeob/Seokrangput	RDA	81	Hojang	(Jangyeob/Hwanggeum)/Suwon153	RDA
8	Cheongja3	Suwon174/Mokpo17	RDA	82	Bosug	Namhae/Camp	RDA
9	Daemang2	Shinpaldal2/Seokrangput	RDA	83	Sokang	Namhae/Camp	RDA
10	Milang	Keunol/Geomjeongol	RDA	84	Nogchae	Pureun/Milyang44	RDA
11	Dajang	(Haman/Williams)/Paldal	RDA	85	Wonhwang	Camp/Myungjunamul	RDA
12	Keumgang	[(Suwon61/SS6807)/Clark63]/(Suwon111/H-25)	RDA	86	Jangki	Eunha/MS91088	RDA
13	Hannam	YS236/SS79168-67-5	RDA	87	Pungwon	SI93001/Suwon164	RDA
14	Ilpumgeomjeong	SLSB 87-3/(Hwanggeum/SLSB-45)	RDA	88	Jonam	Eunha/Jeonju-11	RDA
15	Geomjeongol	Pure line selection derived from Milyangjaerae germplasm	RDA	89	Galchae	YS1287/Jinju1	RDA
16	Jangmi	(D69-7816/Essex)/SLSB 87-2	RDA	90	Sohwang	Pungsannamul/HS646(Pungsan/Nattosan)	RDA
17	Duyou	(Williams/S7145-BF ₂ -11-5)/Bonghwaeraejong	RDA	91	Jinpung	Suwon215/(SI993746/SS01211)	RDA
18	Bukwang	Jangbaek/Bangsa	RDA	92	Joyang1	Pungsannamul/Suwon187	RDA
19	Sobaeknamul	Milyang18/Bonghwaeraejong	RDA	93	Jungmo3008	Hwanggeum/(Suwon180/SI993791)	RDA
20	Ilmi	(Paldal/Saeal)/Paldal	RDA	94	Uram	Suwon190/(Sinpaldal2/T243)	RDA
21	Saeol	[(Danwon/Paldal)/Keunol]/Baeksaja	RDA	95	Hwangkeumol	SS92414/Hwaecomput	RDA
22	Myeongjunamul	Jangyeob/Danyeob	RDA	96	Saedanbaek	MD87L/SS92414	RDA
23	Sowon	Eunha/Bangsa	RDA	97	Neulchan	SS91501-9-1-1/SS96205	RDA
24	Daehwang	Keunol/SLSB87-3	RDA	98	Chamol	Sinpaldal2/Keunol	RDA
25	Jangwon	Bogwang/SS84040	RDA	99	Jungmo3009	Milyang121/Daemang	RDA
26	Saebyeol	Bugwang/Namhae	RDA	100	Haepum	Boseok/Suwon214	RDA
27	Cheongja	Milyang55/Geomjeong1	RDA	101	Jungmo3004	Iksan21/Milyang98	RDA
28	Seonnog	Keunol/Japan introduction	RDA	102	Jungmo3005	Cheongja/Geomjeong3	RDA
29	Shinrok	Suwon163/Jinpum2	RDA	103	Taekwang	SS77011/Dongsan53	RDA
30	Sorok	Pureun/Namhae	RDA	104	Malli	Jangyeob/PI219782	RDA
31	Geomjeong4	(Paldal/YCS87-3) /YCS87-3	RDA	105	Jangsu	Elf/SS74185	RDA
32	Daepung	Baekun/Shinpaldal2	RDA	106	Muhan	Hwanggeum/Wells	RDA
33	Dachae	Hannam/Eunha	RDA	107	Pokwang	Jangyeob/PI219787	RDA
34	Daol	Keunol/YS1040	RDA	108	Baegun	Gwanggyo/dt1-long raceme	RDA
35	Danmi	Milyang37/Josaengbaekjojodu	RDA	109	Keunol	Pure line selection derived from Chilgokjaerae	RDA
36	Dajin	(Keunol/Josaengbaekdo)/Keunol	RDA	110	Sammam	(Suwon101/YS104)/Suwon101	RDA
37	Cheongja2	Milyang70/Ilpumgeomjeong	RDA	111	Danweon	Williams/Suwon61	RDA
38	Sojin	Danyeob/SI93001	RDA	112	Namhae	Danyeob/Hill	RDA
39	Seonyu	Suwon162/(SS79168/Saeal)	RDA	113	Danhyeong	Gwanggyo/Williams	RDA
40	Geomjeongsaeol	Keunol/Geomjeongol	RDA	114	Saeal	Gwanggyo/SS7145-2B-45-3-4	RDA
41	Danmi2	Seokrangput/(Seokrang/Milyang77)	RDA	115	Heugcheong	Pure line selection derived from Yeongwoljaerae germplasm	Gangwondo
42	Ilpumgeomjeong2	Milyang68/Suwon178	RDA	116	Hoban	GWS91/Jinpum	Gangwondo
43	Heugmi	Milyang78/Milyang68	RDA	117	Cheonga	Shinpaldal2/SS97809	Gangwondo
44	Socheong	Milyang78/Peing	RDA	118	Daewang	GWS91/Seokrangput	Gangwondo
45	Nogwon	Keunol/Hyangnam1	RDA	119	Gangil	Suwon191/Suwon196	Gangwondo
46	Mansu	Hwanggeum/Dongsan118	RDA	120	Haessal	Shinpaldal2/Keunol	Gangwondo
47	Nampung	Suwon190/Bogwang	RDA	121	Manpoong	Dongsan121/Sprite87	Gyeongido
48	Sangwon	Keunol/Osimamidori	RDA	122	Yeopooong	Suwon191/Suwon196	Gyeongido
49	Daeyang	Suwon192/(Jangyeob/Hwaecomput)	RDA	123	Jangyon	SS96321/SS01242	Gyeongido
50	Daehueg	Daehwang/Milyang79	RDA	124	Daechyeong	Chucheonjaerae/Dongbukheukdu	Chungcheongbukdo
51	Heugsung	Gnome85/Cheongja	RDA	125	Galmi	Pure line selection derived from Gwangjujaerae	Chungcheongnamdo
52	Daehal	Milyang192/(Jangyeob/Hwaecomput)	RDA	126	Buseoktae1	Pure line selection derived from Yeongjaerae	Yeongjusi
53	Cheonsang	Suwon190/Hwanggeum	RDA	127	Josaengseori	Mutants derived from irradiated Seoritae	KAERI
54	Geomjeong5	Sinpaldal/Geomjeong2	RDA	128	Wonyul	Mutants derived from irradiated KAS360-22	KAERI
55	Wonheug	(Suwon182/Jinju1)/Jinju1	RDA	129	Wonhyun	Mutants derived from irradiated Paldal	KAERI

Table 1 Continued

No.	Varieties name	Parentage	Sources	No.	Varieties name	Parentage	Sources
56	Socheong2	Milyang78/Peking	RDA	130	Aga1	Eunha/KLG10084	KPNU
57	Cheongyeob1	Ilpumgeomjeong/Daehwang	RDA	131	Aga2	Eunha/KLG10084	KPNU
58	Iksannamul	Danyeob/Hill	RDA	132	Aga3	Eunha/KLG10084	Soy Venture
59	Alchan	Hwangkum/Eunha	RDA	133	Aga4	Eunha/KLG10084	Soy Venture
60	Pungsannamul	Bangsa/KLS87092	RDA	134	Aga9	Eunha/KLG10084	Soy Venture
61	Shinpaldal2	Deogyu/Paldal	RDA	135	Aga8	Eunha/KLG10084	Soy Venture
62	Geomjeong1	(Jangyeob/Jaeraebabmit)/Hwanggeum	RDA	136	Aga10	Eunha/KLG10084	Soy Venture
63	Danbaeg	Dongsan69/D76-8070	RDA	137	Gyeongsang2	Seoritae/Jinpum	KSNU
64	Kwangan	Dongsan69/Hwanggeum	RDA	138	Gaechuk 1	Gyeongsang1/(Seoritae/C242)	KSNU
65	Pureun	CheongsaeKnamul/L78-379	RDA	139	Gaechuk 2	Jinpum2/C242	KSNU
66	Tawon	Paldal/ES33	RDA	140	Gyeongsang3	Jwinunyi/SP2	KSNU
67	Daewon	Suwon133/Milyang18	RDA	141	Jinnong1	Jwinunyi/C242	KSNU
68	Jinpum2	Pure line selection derived from Japanese germplasm	RDA	142	Jinyang	Jinpum2/GS301	KSNU
69	Geomjeong2	SS83021/SS83033	RDA	143	Pulmuheukchae	Jinju1xPI96188	SNU
70	Jinpum	Pure line selection derived from Japanese germplasm	RDA	144	Pulmujigi	Pungsannamul/SS2-2	SNU
71	Somyeong	Eunha/Bangsa	RDA	145	Youngyang	Willims/YWS9301	YNU
72	Sodam	SNUA78010/Dongsan127	RDA	146	Somyeong	Eunha/Bangsa	YNU
73	Seonheuk	Hwanggeum/Sinnongheuk	RDA	147	Gyeongsang1	Seoritae/Jinpum1	Jenomine
74	Paldo	Kw220-26/Hill	RDA	148	Zhonghuang	Yeodu8/90052-76	Lee Yeong Phil

RDA: Rural development administration, KAERI: Korea Atomic Energy Research Institute, KPNU: Kyungpook National University, KSNU: Kyungsang National University, SNU: Seoul National University, YNU: Yeungnam University

C1000 (BioRad, USA)를 사용하여 pre-denaturation을 94°C에서 5분간 수행하였고, 94°C에서 30초간 denaturation한 후, 50°C에서 30초간 annealing 하였고, 72°C에서 45초간 extension과정을 총39회 수행하고, 72°C에 10분간 final extension을 실시한 후 4°C, ∞ 조건에서 PCR 증폭반응을 완료하였다. 증폭된 PCR 산물을 자동염기서열분석기(Genetic Analyzer 3730XL, Applied Biosystems, Foster, USA)를 활용하여 전기영동 하기 위하여, PCR 증폭 산물 1.0 µl, Deionized formamide 10 µl, size marker (LIZ500 size standard) 0.25 µl를 혼합하여 94°C에서 2분간 denaturation 시켰다. 자동염기서열분석기에 의한 전기영동이 완료된 후, 각 마커에 따른 대립 유전자의 크기는 GeneMapper (version 4.1) 프로그램(Applied Biosystems, Foster, USA)을 이용하여 측정하였다.

유전적 유연관계 분석 및 품종식별력 검증

공시된 콩 품종에 대한 microsatellite 마커별 대립 유전자의 크기를 설정한 다음 대립유전자의 유무에 따라 1, 0으로 표기한 다음, Anderson et al. (1993)이 제안한 공식에 따라 polymorphism information content (PIC) 값을 산출하였다. 아래 공식에서 Pij는 마커 i의 밴드들 중에서 j번째 공통 밴드 패턴의 빈도수이다.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_{ij}^2$$

콩 품종별 유전적 유연관계는 NTSYSpc (version 2.10b) (Rohlf 2000) 프로그램을 이용하여 Jaccard 방법에 따라 유전적 유사도 값을 계산하였으며, unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA) (Sneath and Sokal 1973) 방법으로 계통도를 작성하고 공시품종별 그룹화양상 및 품종식별력 정도를 분석하였다.

결과 및 고찰

Microsatellite 분석

우리나라 콩 품종 식별 및 유전적 다양성 분석에 표준화된 microsatellite 마커를 선정하기 위하여, 국내외 연구자에 의해 콩 품종 및 유전자원 특성 평가에 활용된 프라이머 60개와 국제 콩 계놈 데이터베이스(<http://www.soybase.org>)에서 보고된 60개의 프라이머 정방향에 형광물질(FAM, VIC, NED, PET)을 표지하여 ‘화성꽃’ 등 148품종과 PCR을 수행하였다. 1차적으로 120개의 프라이머 중에서 80개만이 반복 재현성이 높은 증폭 양상을 보였으나, 나머지 프라이머들은 안정성 있는 PCR 반응을 나타내지 않았는데 이는 종자에서 추출한 DNA의 순도와 분석의 단순화를 위해 annealing 온도 설정을 50°C로 고정하여 분석하였기 때문에 나타난 결과라고 추정된다. PCR 반응이 안정적인 80개의 프라이머를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 자동염기서열분석기 3730XL을 이용하여 전기영동하

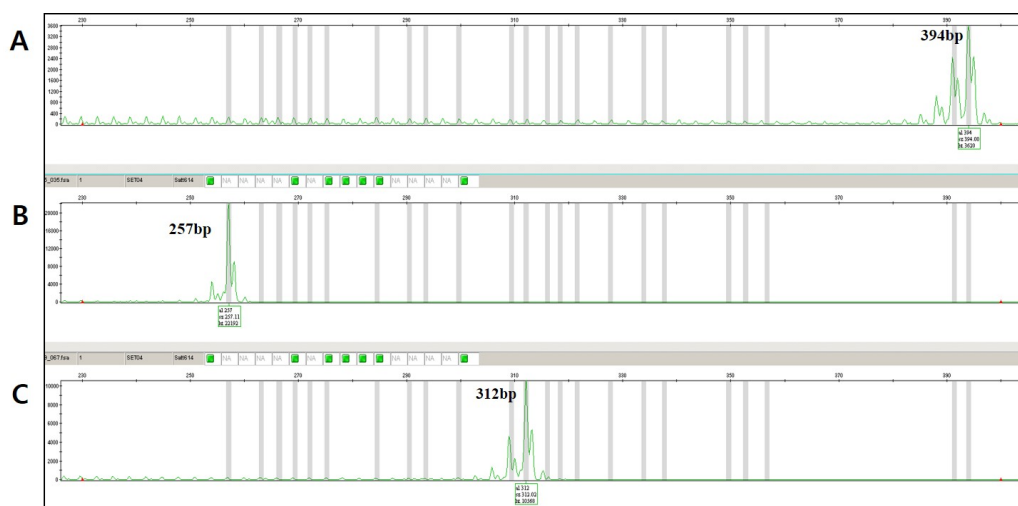


Fig. 1 Amplified fragment pattern of a SSR marker, Satt614 in 3 soybean varieties. PCR products were separated and detected using 3730 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with a 36 cm array and POP-7 polymer. Lane A, ‘Cheongja ’; B, ‘Seonnog’; C, ‘Shinrok’

Table 2 Repeat motif, number of alleles, and polymorphism information content (PIC) value of microsatellite markers selected for genetic characterization of the 148 soybean varieties

SSR designation	Primer sequence	Repeat motif	Linkage group	Annealing temp.	Product size (bp)	No. of alleles	PIC value
Satt184	F: FAM-GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGC R: GCCACTTACTGTTACTCAT	(ATT)14 (TTG)5	D1a	50	135-197	8	0.774
Satt216	F: VIC-TACCCTTAATCACCGGACAA R: AGGGAACAAACACATTTAATCATCA	(ATT)20	D1b	50	140-217	12	0.840
Satt614	F: VIC-CTCCCCTTTAACCTTTCCTTTATTAG R: CGCGGTAGGAATTAATTGTAGATAGGAT	(TTA)38	I	50	257-394	21	0.951
Satt354	F: PET-GCGAAAATGGACACCAAAAGTAGTTA R: GCGATGCACATCAATTAGAATATACAA	(ATT)14	I	50	179-247	9	0.759
Sat_151	F: FAM-GCTGCATCAGATCACCCATCCTTC R: CATGCCATGTTGTATGTATGT	(AT)27	J	50	215-272	9	0.813
Sat_255	F: VIC-CGGCATGTCATGGTATACGTAACCTTAGA R: GCGCAACTGAAGCAAGAAAAGAAACCT	(AT)32	J	50	232-328	28	0.942
Satt417	F: NED-TCTTGCTAATTGCTTCATTTTCAT R: AATTGCTTGGGATTTTCATTT	(ATT)18	K	50	280-327	8	0.753
Sat_391	F: PET-GCGTAGGCATCGGTCAATATTTT R: GCGTTAGCGAGTGGATCAAGATCA	(AT)37	M	50	220-276	17	0.918
Satt308	F: FAM-GCGTTAAGGTTGGCAGGGTGGAAAGTG R: GCGCAGCTTTATACAAAAATCAACAA	(ATT)21	M	50	132-175	12	0.898
Satt157	F: VIC-GGGCTCACTCTCGATAGTAGGTATAAAG R: GGGATACCAAAAAGGAATAATTGTCTT	(ATT)31	D1b	50	188-295	19	0.910
Satt534	F: NED-CTCCTCCTGCGCAACAACAATA R: GGGGGATCTAGGCCATGAC	(ATT)25	B2	50	148-212	17	0.893
Satt181	F: PET-TGGCTAGCAGATTGACA R: GGAGCATAGCTGTTAGGA	(ATT)18	H	50	178-217	6	0.867
Satt160	F: FAM-TCCCACACAGTTTTCATATAATATA R: CATCAAAAAGTTTATAACGTGTAGAT	(ATT)30	F	50	199-270	12	0.883
Satt002	F: VIC-TGTGGGTTAAAATAGATAAAAAAT R: TCATTTTGAATCGTTGAA	(ATT)25	D2	50	123-145	7	0.900
Satt030	F: NED-AAAAAGTGAACCAAGCC R: TCTTAAATCTTATGTTGATGC	(ATT)21	F	50	129-170	10	0.844
Satt070	F: PET-TAAAAATTTAAAATACTAGAAGACAAC R: TGGCATTAGAAAATGATATG	(ATT)24	B2	50	123-178	9	0.871
Total						204	13.815
Mean						12.75	0.863

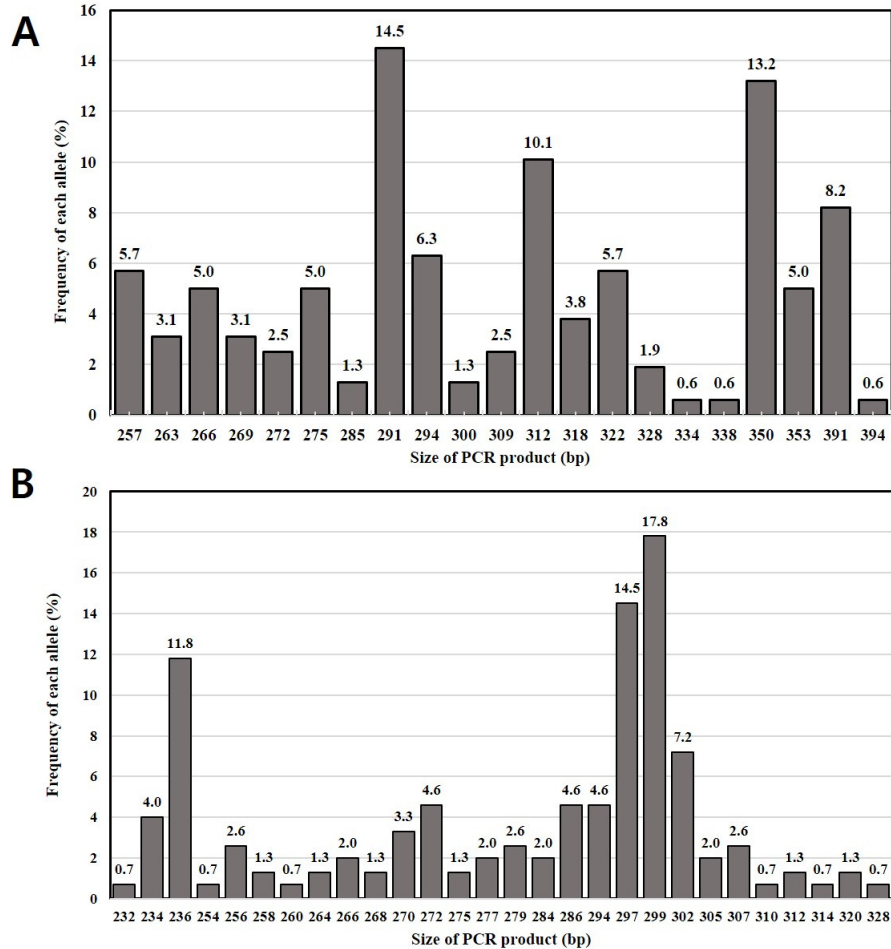


Fig. 2 Histogram depicting the alleles at 2 microsatellite loci, Satt614 (A) and Satt255 (B). Base-pair size and the frequency at each allele detected by 148 soybean varieties

고 GeneMapper (version 4.1) 프로그램으로 대립유전자의 크기를 추정하였을 때, 80개의 프라이머 가운데 40개는 대립유전자의 패턴이 복잡하여 콩 fingerprinting 분석에 제외시켰다. 나머지 40개의 프라이머 중에서 대립유전자의 크기를 명확하게 추정할 수 있으면서 다형성 정도가 높은 16개의 프라이머를 최종 선발하였다. Fig. 1은 콩 품종 식별에 적합한 16개의 프라이머 가운데 하나인 Satt614를 ‘청자’, ‘선록’, ‘신록’ 품종에 대하여 DNA 분석하였을 때, 대립유전자의 양상을 나타낸 것인데, 품종 별로 하나의 명확한 피크를 나타내었으며, ‘청자’는 394 bp, ‘선농’은 257 bp, ‘신록’의 경우 312 bp에서 뚜렷한 대립유전자 크기의 차이를 나타내었다. 따라서 Fig. 1의 Satt614와 같이 대립유전자의 피크 특성이 우수한 16개의 마커를 이용하여 콩 148 품종에 대한 다형성 정도를 조사한 바 (Table 1), 대립유전자의 수는 분석된 마커에 따라 최소 6개(Satt181)에서 최대 28개(Sat_251)까지 분포하였다. 전체 대립유전자의 수는 204개로 나타났고, 마커 당 평균 대립

유전자의 수는 12.75개 였다. 마커에 따른 유전적 다형성 정도를 나타내는 지수인 PIC 값은 0.753 ~ 0.951까지 높은 범위에서 분포하였으며, 평균값도 0.863으로 아주 높게 나타났다. 본 연구에 최종 선정된 16개의 마커 중에서 Satt184, Satt216, Satt354, Sat_151, Satt417, Satt030을 제외한 10개의 마커는 0.85 이상의 높은 PIC 값을 나타내었다. 이상의 분석 결과를 종합해 볼 때, 본 연구에서 선정된 16개의 microsatellite 마커의 경우 마커 별 대립유전자 수와 PIC 값이 아주 높기 때문에 우리나라 콩 품종간 유전적 근연도 분석뿐만 아니라 품종 지문화에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 나타났다.

본 연구에서 선발된 콩 148품종의 품종식별에 활용된 16개의 microsatellite 마커 가운데 대립유전자의 수가 20개 이상이고 PIC 값이 0.94 이상인 Satt614와 Satt255를 이용하여 대립유전자의 분포 빈도 양상을 조사한 바(Fig. 2), Satt614에 의해 검출되는 대립유전자는 257 bp에서 394 bp 사이에서 21개가 분석되었고, 대립유전자의 크기에 따른

빈도 분포양상은 0.6~14.5%까지 고르게 분포하였다. Sat_255의 경우 232 bp에서 328 bp 사이에 총 28개의 대립유전자가 위치하였으며, 대립유전자의 크기가 236 bp, 297 bp, 299 bp에서 각각 10% 이상의 다소 높은 빈도 분포 양상을 나타내었다. 그러나 나머지 대립유전자들은 빈도 분포는 0.7~7.2%까지 고르게 분포하였다.

분자표지를 이용한 우리나라 콩 품종의 유전적 다양성 및 품종 식별에 대한 연구는 Kim 등(2016a, b)이 91개 콩 품종과 20개의 microsatellite 마커를 이용하여 분석시 평균 7.5개의 대립유전자가 확인되었고 평균 PIC 값은 0.711로 나타남을 보고하였고, PIC 값이 높은 5개의 SSR 마커 (Sat_043, Sat_036, Sat_022, Sat_088, Satt045)를 이용하여 91품종중 82품종이 식별이 가능함을 보고하였다. 일본에서는 377개의 microsatellite 마커를 이용하여 자국내의 87개 콩 품종 및 유전자원의 다양성 정도를 분석하였을 때 검출되는 대립유전자의 수는 2~10개의 범위이고, PIC 값은 0.02~0.86 범위에 속함을 보고하였으며(Hwang et al. 2008), 최근 인도에서는 102개 품종을 10개의 microsatellite 마커로 분석시 2~8개의 대립유전자가 분석되고 각 마커에 따른 PIC 값은 0.467~0.812로 나타남을 제시하였다 (Rani et al. 2016). 그러나 본 연구에서는 microsatellite 마커에 의해 검출된 평균대립유전자가 12.75개이고 평균 PIC 값도 0.863으로 높게 나타나 기존에 우리나라, 일본 및 인도에서 연구한 결과보다 대립유전자의 수도 많고 PIC 값도 높은 경향이었다. 이러한 이유는 본 연구에서 120개의 프라이머 중에서 품종식별력이 높은 16개의 핵심 분자표지를 선정하고 다양한 유전적 조성을 가진 콩 148 품종을 분석에 활용했기 때문이라 사료된다. 그리고 microsatellite 마커에 따른 품종별 대립유전자의 크기를 확인하는데 기존 연구자들은 아크릴아마이드나 아가로즈젤에서 분석한 것에 비해 본 연구에서는 자동염기서열분석기를 활용하여 품종별 대립유전자의 크기를 정확하게 설정하였기 때문에 나타난 결과라고 판단된다.

품종식별력 검정 및 유전적 유사도 분석

콩 148개 품종을 대립유전자 크기 추정이 용이하고 PIC 값이 0.75 이상인 마커 16개를 활용하여 군집분석에 의한 계통도를 작성한 바(Fig. 3), 공시된 품종들은 전체 유사도 지수는 0.04~0.88사이에 분포하였으며, 유사도 지수 0.10에서 공시품종은 5개의 대그룹으로 나눌 수 있었다. 그리고 모든 품종은 microsatellite 마커의 유전자형에 의해 뚜렷하게 식별이 되었다. I 그룹은 ‘화성꽃’ 등 49품종이 속하였고, 이들 품종은 유사도 지수 0.16에서 3개의 소그룹으로 구분이 되었다. ‘다올’과 ‘큰올’ 품종이 87% 유전적 다소 높은 유전적 유사도를 나타내었다. 이러한 이유는 ‘다올’의 경우 ‘큰올’을 교배모본으로 활용하여 육

성된 품종이기 때문인 것으로 판단된다. I-1은 ‘큰올’과 ‘검정올’이 모본이나 부분으로 활용된 ‘선늑’ 등 26품종이 속하였고, I-2은 종피색과 제색이 주로 흑색인 ‘청자’ 등 13품종이 분포하였다. I-3은 ‘진품’과 ‘진품2’ 및 이들 품종을 교배모본으로 활용된 10품종이 속하였다.

II 그룹에는 ‘진올’ 등 54품종이 속하였고 ‘흑청’과 ‘대청’이 89%의 높은 유전적 유사도를 나타내었으며, 유사도 지수 0.14에서 4개의 소그룹으로 구분되었다. II-1은 ‘황금’이 교배모본으로 활용된 ‘진올’, ‘천상’, ‘선흑’과 ‘신농흑’을 이용하여 육성된 ‘검정3’ 등 9품종이 속하였다. II-2 그룹은 ‘신기’ 등 26품종이 포함되었고, 유사도 지수 0.17에서 2개의 그룹으로 다시 나눌 수 있었는데, II-2-a 그룹은 ‘신팔달2’와 ‘장엽’이 교배모본으로 활용된 ‘신기’, ‘검정2’, ‘검정5’, ‘대망’, ‘중모3009’, ‘대망2’ 등 8품종이 속하였고, II-2-b 그룹은 ‘수원190’, ‘수원191’, ‘수원193’ 및 미국 도입종인 ‘Williams’를 육성 재료로 활용되어 개발된 ‘다장’, ‘남풍’, ‘우람’, ‘단경’, ‘단원’, ‘만수’, ‘강일’, ‘연풍’ 등 18품종이 그룹화되었다. II-3그룹에는 ‘장엽’을 교배모본으로 육성된 ‘보광’, ‘만리’, ‘검정1’, ‘호장’ 등 9품종이 속하였고, II-4 그룹에는 ‘청두1’ 등 11품종이 속하였고, ‘백운’과 이를 이용하여 육성된 ‘명주나물’, ‘원황’, ‘대풍’이 속하였다.

III 그룹에는 ‘소명’ 등 9품종이 속하였고, ‘방사’ 또는 ‘풍산나물’을 이용하여 육성된 ‘소명’, ‘풀무지기’, ‘소황’과 한국원자력연구원에서 돌연변이 육종법으로 육성된 ‘원올’과 ‘원현’이 포함되었다. IV 그룹은 ‘안평’ 등 35품종이 속하였고, 유사도 지수 0.16에서 4개의 소그룹으로 구분할 수 있었다. IV-1은 ‘은하’, ‘남해’, ‘단엽’을 교배모본으로 이용하여 육성된 ‘안평’ 등 19품종이 속하였고, IV-2 경북대 및 소이벤처에서 ‘은하’와 야생콩(*G. soja*)를 교배하여 육성한 ‘아가1’ 등 7품종이 그룹화되었다. IV-3은 농촌진흥청에서 육성한 ‘부광’, ‘서남’, ‘소록’이 속하였고, IV-4는 종피색이 흑색인 ‘원흑’, ‘풀무흑채’, ‘다원’, ‘영양’, ‘진농’과 갈색 종피색을 가지는 ‘갈채’가 하나의 그룹을 형성하였다. V 그룹은 중국에서 육성되어 국내에 품종 보호 출원한 ‘중황13’이 독립된 그룹으로 분류되었다.

이상의 결과를 종합해보면 16개의 microsatellite마커는 지금까지 우리나라 콩 품종 식별 및 유전적 다양성 분석에 사용하지 않았던 새로운 핵심 마커 세트로서 국내에서 육성된 147품종과 중국에서 육성된 1품종에 대해서 품종 육성 계보에 따라 뚜렷하게 그룹화될 뿐만 아니라 모든 품종의 식별이 가능함을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 콩 신품종에 대한 유전적 거리의 사전 예측, 품종 보호 출원품종의 대조품종 선정과 구별성, 균일성, 안전성의 확인, 품종보호등록 품종의 특성 유지 확인, 콩 원종 및 보급종의 이품종 혼종 여부를 확인하는데 유용한 수단으로 활용될 수 있을 것이다.

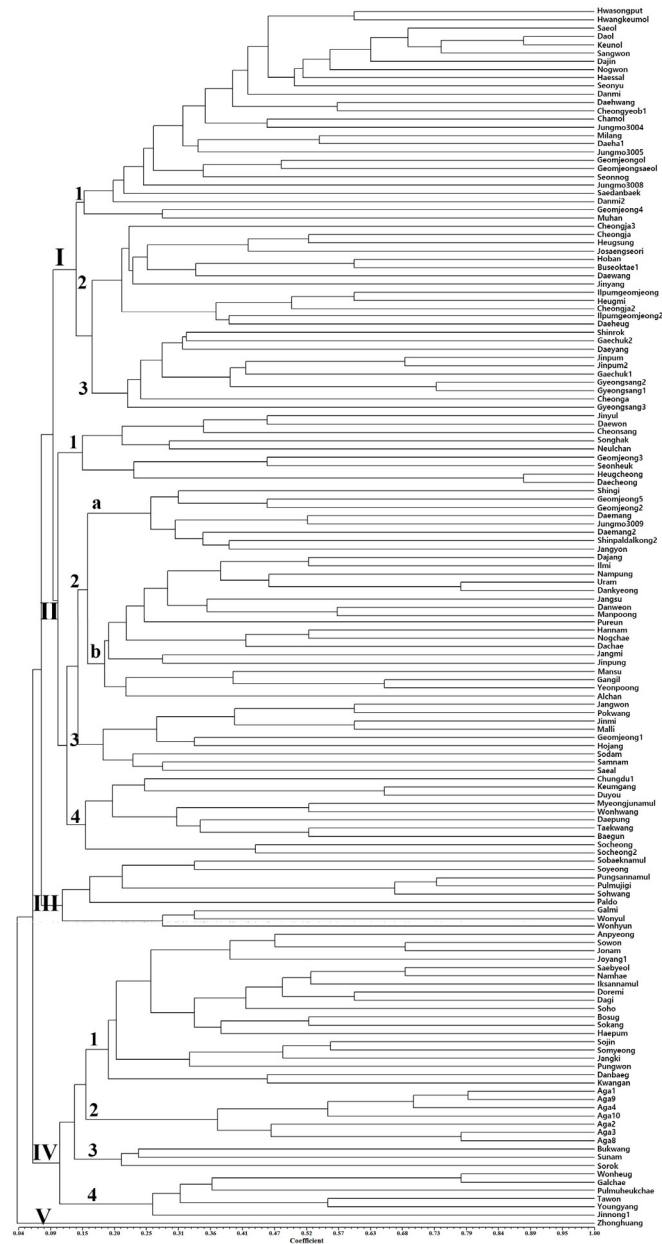


Fig. 3 Dendrogram for 148 soybean varieties constructed using cluster analysis of the 204 microsatellite loci by unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA). The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity

최근 주요 작물에 대한 유전체 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 염색체 내의 단일염기서열 변이(SNP)를 탐색하고 이를 품종식별용 마커로 개발하여 각 품종별로 바코드화한 연구가 보고 되고 있다(Tian et al. 2015; Gao et al. 2016). 향후, SNP 기반의 콩 품종식별 체계와 본 연구에서 microsatellite 마커에 의해 구축된 품종별 DNA 프로파일과의 그 효율성이 구체적으로 비교·분석된다면 콩의 품종 확인의 정확도는 한층 더 높아질 것으로 사료된다.

적 요

핵심 microsatellite 마커를 활용하여 우리나라에서 품종보호출원 및 등록된 콩 148 품종에 대한 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축한 다음 유전적 유사도 분석을 통한 품종 식별력 정도를 조사하였다. 콩 148품종을 120개의 microsatellite 마커로 검정하고 밴드의 패턴이 명확하고 다형성 정도가 높은 핵심 마커 16개의 대립유전자의 수는 6~28개로 나타났고 평균 대립유전자의 수는 12.75개였다. PIC 값은 0.753~0.951 사이에 분포하였고 평균값은

0.863으로 아주 높았다. 콩 148 품종에 대하여 Jaccard 방법에 따라 유전적 유사도를 설정한 다음 비가중 산술평균결합에 의해 집괴분석하여 계통도를 작성하였을 때, 콩의 품종 유형 및 품종 육성 계보에 따라 5개의 대그룹으로 나누어졌으며 모든 품종이 식별이 가능하였다.

본 연구에서 콩 품종식별용 핵심 microsatellite는 품종 보호출원 품종의 구별성, 균일성, 안정성의 확인, 품종진위성과 관련된 종자분쟁, 종자 순도 관리에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

사 사

이 논문은 동아대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Anderson JA, Churchill CA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic-linkage maps. *Genome* 36:181-186
- Bae KM, Sim SC, Hong JH, Choi KJ, Kim DH, Kwon YS (2015) Development of genomic SSR markers and genetic diversity analysis in cultivated radish (*Raphanus sativus* L.). *Hortic Environ Biotechnol* 56:216-224
- Bredemeijer GMM, Cooke RJ, Ganal MW, Peeters R, Isaac P, Noordijk Y, Rendell S, Jackson J, Röder MS, Wendehake K, Dijcks M, Amelaine M, Wickaert V, Bertrand L, Vosman B (2002) Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor Appl Genet* 105:1019-1026
- Gao L, Jia J, Kong X (2016) A SNP-based molecular barcode for characterization of common wheat. *PLoS ONE* 11(3):e0150947
- Hwang TY, Nakamoto Y, Kono I, Enoki H, Funatsuki H, Kitamura K, Ishimoto M (2008) Genetic diversity of cultivated and wild soybeans including Japanese elite cultivars as revealed by length polymorphism of SSR markers. *Breed Sci* 58:315-323
- Hwang TY, Seo MJ, Lee SK, Park HM, Jeong KH, Lee YY, Kim SL, Yun HT, Lee JE, Kim DW, Jung GH, Kwon YU, Kim HS, Kim YH (2012) Discrimination of 110 Korean soybean cultivars by sequence tagged sites (STS)-CAPS markers. *Kor J Breed Sci* 44:258-272
- Jang SJ, Park SJ, Park KH, Song HL, Cho YG, Jong SK, Kang JH, Kim HS (2009) Genetic diversity and Identification of Korean elite soybean cultivars based on SSR markers. *Korean J Crop Sci* 54:231-240
- Kim SH, Chung JW, Moon JK, Woo SH, Cho YG, Jong SK, Kim HS (2006a) Discrimination of Korean soybean cultivars by SSR markers. *Kor J Crop Sci* 51:658-668
- Kim SH, Chung JW, Moon JK, Woo SH, Cho YG, Jong SK, Kim HS (2006b) Genetic diversity and relationship by SSR markers of Korean soybean cultivars. *Kor J Crop Sci* 51:248-258
- Kwon YS, Hong JH, Choi KJ (2013) Construction of a microsatellite marker database of commercial pepper cultivars. *Korean J Hort Sci Technol* 31:580-589
- Kwon YS, Hong JH, Kim DH, Kim DH (2015) Use of Microsatellite Markers Derived from Genomic and Expressed Sequence Tag (EST) to Identify Commercial Watermelon Cultivars.. *Korean J Hort Sci Technol* 33:737-750
- Rani A, Kumar V, Shukla S, Jha P, Rawal R (2016) DNA barcoding of Indian soybean varieties as constructed through SSR markers. *Seed Sci & Technol* 44:357-369
- Reid A, Hof L, Felix G, Rücker B, Tams S, Milczynska E, Esselink D, Uenk G, Vosman B, Weitz A (2011) Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU common catalogue. *Euphytica* 182:239-249
- Röder MS, Wendehake K, Korzun V, Bredemeijer G, Laborie D, Bertrand L, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Cooke RJ, Vosman B, Ganal MW (2002) Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theor Appl Genet* 106:67-73
- Rohlf FJ (2000) NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York
- Sim SC, Hong JH, Kwon YS (2015) DNA profiling of commercial pumpkin cultivars using simple sequence repeat polymorphisms. *Hortic Environ Biotechnol* 56:811-820
- Sneath, PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification, Freeman W.H., San Francisco
- Tantasawat P, Trongchuen J, Prajongjai T, Jenweerawat S, Chaowiset W (2011) SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. *Aust J Crop Sci* 4:301-308
- Tian HL, Wang FG, Zhao JR, Yi HM, Wang L, Wang R, Tang Y, Song W (2015) Development of maizeSNP3072, a high-throughput compatible SNP array, for DNA fingerprinting identification of Chinese maize varieties. *Mol Breeding* 35:136
- UPOV (2010) Guideline for DNA-profiling: molecular marker Selection and Database Construction ("BMT Guideline"). Geneva, Switzerland
- UPOV (2011) Possible Use of Molecular Markers in the Examination of Distinctness, Uniformity, and Stability (DUS), Geneva, Switzerland
- Wang M, Li RZ, Yang WM, Du WJ (2010) Assessing the genetic diversity of cultivars and wild soybeans using SSR markers. *Afr J Biotechnol* 9:4857-4866
- Wang FG, Tian HL, Zhao JR, Yi HM, Wang L, Song W (2011) Development and characterization of a core set of SSR markers for fingerprinting analysis of Chinese maize varieties. *Maydica* 56:7-17
- Yoon MS, Song QJ, Choi IY, Specht JE, Hyten DL, Cregan PB (2007) BARCSoySNP23: a panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification. *Theor Appl Genet* 114:885-899