

배 품종 및 유전자원에 대한 Microsatellite DNA 프로파일 데이터베이스 구축

홍지화¹ · 심은조² · 권용삼^{3*}

¹농림축산식품부 국립농산물품질관리원 시험연구소, ²농림축산식품부 국립종자원 종자검정연구센터

³동아대학교 생명자원과학대학 분자유전공학과

Construction of a Microsatellite DNA Profile Database for Pear Cultivars and Germplasm

Jee-Hwa Hong¹, Eun-Jo Shim², and Yong-Sham Kwon^{3*}

¹Experiment Research Institute, National Agricultural Products Quality Management Service, Ministry for Agriculture, Food & Rural Affairs, Gimcheon 39660, Korea

²Seed Testing & Research Center, Korea Seed & Variety Service, Ministry for Agriculture, Food & Rural Affairs, Gimcheon 39660, Korea

³Department of Molecular Genetic Engineering, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 49315, Korea

*Corresponding author: yskwon3@dau.ac.kr



Hortic. Sci. Technol. 35(1):98-107, 2017
<https://doi.org/10.12972/kjhst.20170011>

pISSN : 1226-8763
 eISSN : 2465-8588

Received: July 11, 2016

Revised: July 26, 2016

Accepted: July 31, 2016

Copyright©2017 Korean Society for Horticultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IP-ET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (313043-03-1-CG000).

Abstract

A DNA profile database was constructed to investigate the genetic relatedness of 72 germplasm samples of *Pyrus* and related cultivars using microsatellite markers. Three *P. pyrifolia*, four *P. commus*, and one *P. betulifolia* cultivars with different morphological traits were screened using 387 pairs of microsatellite primers. A core set of 11 primer pairs was selected to obtain 133 polymorphic amplified fragments meeting three criteria: high polymorphism information contents (PIC), high repeatability, and distinct allele patterns. The number of alleles per locus ranged between 4 and 22. Average PIC was 0.743 (range: 0.557 - 0.879). Cluster analysis using the unweighted pair - group method with arithmetical average (UPGMA) separated the 72 pear cultivars and germplasm samples into four major groups: Chinese, European pears, and a cluster of 55 Asian pears that could be reclassified into two subclusters, I - 1st and II - 2nd, according to pedigree information. Almost all of the cultivars were discriminated by 11 microsatellite marker genotypes. The microsatellite DNA profile database may be utilized as tool to verify distinctness, uniformity, and stability between candidate cultivar, and to verify in the distinctness of existing cultivars.

Additional key words: cultivar identification, molecular marker, *Pyrus* spp, plant variety protection

서 언

배(*Pyrus* spp.)는 사과, 복숭아, 딸기 등과 함께 장미과에 속하는 온대 과수 작물의 하나이며, 유럽, 미국, 아프리카에서 재배되는 서양배(*P. communis* L.)와 동양배로 크게 대별할 수 있다. 동양배는 우리나라, 중국 남부, 일본 등지에 재배되는 남방형 배(*P. pyrifolia*)와 중국과 일본의 북부지역 및 러시아 극동지역에서 재배되는 북방형 배(*P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*)로 나누어지며 *P. communis*와 *P. pyrifolia*가 가장 많이 재배되고 있다(Bell, 1990). 우리나라의 배 재배면적은 2014년 현재 13,127 ha로 매년 감소 추세에 있으나 신품종 개발과 재배법 개선을 통해 생산량은 302,731톤으로 증가 추세에 있다(www.maffra.go.kr). 2016년 7월 현재 품종생산 수입판매 신고된 548건과 품종보호 출원 및 등록된 48품종이 유통되고 있다(www.seed.go.kr).

배와 같은 목본류 작물의 신품종 심사는 나무와 가지, 잎, 꽃, 과실 등에서 발현되는 59개 형질을 조사하고 기존 품종과 상호 비교하여 구별성을 판단하고 있다. 그러나 목본류의 경우 품종 특성 조사에 소요되는 기간이 장기간 소요되기 때문에 대부분 육종가가 육성한 포장에서 직접 조사하는 현지심사 방식을 채택하고 있다. 따라서 형태적 특성조사에 의한 품종보호 출원품종, 대조 및 표준 품종에 대한 정확한 평가가 어렵다. 이러한 문제점을 보완할 수 있는 방법이 분자표지 인자를 활용하여 품종별 데이터 베이스를 구축하고 기 알려진 품종에 대한 유전적 유연관계를 설정하는 것이다. 국제 식물 신품종 보호 동맹(UPOV: International Union for the Protection of New Varieties of Plants)에서도 분자표지에 의한 품종별 데이터베이스 구축에 대한 가이드라인을 제시하고 있으며, 반복 재현성 및 품종별 다형성 정도가 높은 microsatellite나 single nucleotide polymorphism(SNP) 마커의 활용을 권장하고 있다(UPOV, 2010). 그러나 SNP 마커를 배의 품종별 데이터베이스 구축에 활용한 경우는 품종 식별에 적합한 SNP 정보가 부족하기 때문에 국내외 연구자에 의해 거의 보고되지 않고 있다. 그러나 microsatellite 마커의 경우 배 품종 식별 및 유전자원의 다양성 평가의 경우 일본에서 Kimura et al.(2002)이 보고한 이래, 배의 과일 통조림, 주스, 건조된 과일과 같은 품종보호품종의 가공품의 분석에까지 연구 범위를 확대하고 있다(Yamamoto et al., 2006). 이러한 분석에 주로 활용된 마커는 2000년대 초반에 개발된 microsatellite 마커를 활용하였다는 점이며 몇몇 마커의 경우 대립유전자의 밴드 양상이 복잡하고 다형성 정도가 낮아 유전적 거리가 좁은 최근 품종의 식별이 어렵다는 문제점이 제기되었다. 그러나 UPOV에서 제안한 유전자 분석 지침서에서는 품종별 DNA 데이터베이스를 작성하기 위해서는 염기서열 정보가 논문 등을 통해 알려져 있고 여러 가지 분석기기, 실험실 및 실험자에 따라 동일한 결과를 나타내는 마커의 활용을 제안하고 있다(UPOV, 2010). 따라서 기존에 개발되었던 배 품종 식별용 마커보다 다형성 정도가 높으면서 대립유전자의 패턴이 우수하고 반복 재현성이 높은 마커의 개발이 필요한 것으로 판단되었다. 이들 마커를 대상으로 우리나라에서 육성된 배 품종보호출원 및 등록품종과 일본 등 해외에서 육성된 품종 및 유전자원을 대상으로 정밀도 높은 데이터베이스 구축을 통한 유전적 거리의 추정은 향후 배 신품종 개발의 기초 자료로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 품종보호권 강화 등에 크게 기여할 수 있으리라 판단된다.

따라서 본 연구에서는 국내외에서 재배되고 있는 배 품종 및 유전자원에 유전적 근연도를 조사하기 위하여, 380개 이상의 microsatellite 마커를 활용하여 대립유전자의 다형성 및 마커 별로 증폭되는 대립유전자의 패턴 등이 우수한 마커를 선정하고, 이를 국내외에서 재배되고 있는 배의 품종 및 유전자원에 대한 DNA 프로파일데이터 베이스 구축에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Microsatellite 분석

본 연구에서는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 수집 보존하고 있는 배 유전자원 및 품종 72개(*P. pyrifolia* 54 개, *P. communis* 4개, *P. ussuriensis* 6개, *P. bretschneideri* 6개, *P. betulifolia* 2개)를 공시하여 microsatellite 마커의 분석 재료로 활용하였다(Table 1). 공시 종의 어린 잎을 액체질소를 이용하여 마쇄한 다음 NucleoSpin®Plant II (Cat. 740 770,250, Macherey

Table 1. List of pear cultivars and germplasm samples genetically characterized using microsatellite markers.

No.	Cultivar name	Parentage and origin	Scientific name	No.	Cultivar name	Parentage and origin	Scientific name
1	Jinhwang	Danbae × Kosui	<i>P. pyrifolia</i>	37	Chojuro	Chance seedling	<i>P. pyrifoliai</i>
2	Danbae	Chojuro × Cheongsilli	<i>P. pyrifolia</i>	38	Kimizukawase	Shinkozo × Doitsu	<i>P. pyrifoliai</i>
3	Yeongsan	Niitaka × Danbae	<i>P. pyrifolia</i>	39	Hanareum	Niitaka × Chuhwangbae	<i>P. pyrifoliai</i>
4	Hwanggeum	Niitaka × Nijisseiki	<i>P. pyrifolia</i>	40	Joy Skin	Hwanggeumbae × Waseaka	<i>P. pyrifoliai</i>
5	Gamcheonbae	Okusankichi × Danbae	<i>P. pyrifolia</i>	41	Tama	Gion × Kosui	<i>P. pyrifoliai</i>
6	Suhwang	Chojuro × Kimizukawase	<i>P. pyrifolia</i>	42	Shinseiki	Nijiesiki × Chojuro	<i>P. pyrifoliai</i>
7	Wonhwang	Waseaka × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	43	Eri	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
8	Hwasan	Hosui × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	44	Choju	Ashahi × Kimizukawase	<i>P. pyrifoliai</i>
9	Gamro	Niitaka × Sinsui	<i>P. pyrifolia</i>	45	Suisei	Kikusui × Yakumo	<i>P. pyrifoliai</i>
10	Mansoo	Danbae × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	46	Waseaka	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
11	Shinil	Shinko × Hosui	<i>P. pyrifolia</i>	47	Yoshikaori	Open pollination of Nijisseiki	<i>P. pyrifoliai</i>
12	Manpung	Hosui × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	48	Oushuu	C2 × Shinsetsu	<i>P. pyrifoliai</i>
13	Sincheon	Niitaka × Chuhwangbae	<i>P. pyrifolia</i>	49	Kinchaku	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
14	Josengwhangkeum	Niitaka × Shinko	<i>P. pyrifolia</i>	50	Yasato	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
15	Geumchonjosaeng	Imamuraaki × Danbae	<i>P. pyrifolia</i>	51	Chousen	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
16	Minibae	Danbae × Kosui	<i>P. pyrifolia</i>	52	Kikusui	Taihaku × Nijisseiki	<i>P. pyrifoliai</i>
17	Mihwang	Hosui × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	53	Meigetsu(Hosoguchi)	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
18	Chuhwangbae	Imamuraaki × Nijisseiki	<i>P. pyrifolia</i>	54	Amanogawa	Uncertain	<i>P. pyrifoliai</i>
19	Noksu	Danbae × Kosui	<i>P. pyrifolia</i>	55	Passe Crassane	Seedling selection	<i>P. communis</i>
20	Manhwang	Chuhwangbae × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	56	Beze Ligelya	Uncertain	<i>P. communis</i>
21	Sooyoung	Niitaka × Soohwangbae	<i>P. pyrifolia</i>	57	Abate fetel	Uncertain	<i>P. communis</i>
22	Sweet Skin	Sinsui × Won Gyo Na - No.11	<i>P. pyrifolia</i>	58	Bosc	Sport of cultivar Beurre Bosc	<i>P. communis</i>
23	Wonkyo Na - 11	Hosui × Okusankichi	<i>P. pyrifolia</i>	59	Gongjucheongsilri	Uncertain	<i>P. ussuriensis</i>
24	Changjo	Tama × 81 - 21 - 7	<i>P. pyrifolia</i>	60	Iwateyamanashi	Uncertain	<i>P. ussuriensis</i>
25	Sodam	Hwanggeum × Hwasan	<i>P. pyrifolia</i>	61	Kkulbae	Uncertain	<i>P. ussuriensis</i>
26	Solmi	Wonhwang × Seonhwang	<i>P. pyrifolia</i>	62	Yeongmokri	Uncertain	<i>P. ussuriensis</i>
27	Sweet Cost	Wonhwang × 92 - 18 - 31	<i>P. pyrifolia</i>	63	Cheongseori	Uncertain	<i>P. ussuriensis</i>
28	Shinwha	Niitaka × Hwasan	<i>P. pyrifolia</i>	64	Datouhuangli	Uncertain	<i>P. ussuriensis</i>
29	Wongyo Na-Gihoo No.1	Hwanggeum × Hwasan	<i>P. pyrifolia</i>	65	Jinchuanxueli	Uncertain	<i>P. bretschneideri</i>
30	Niitaka	Amanogawa × Imamuraaki	<i>P. pyrifolia</i>	66	Laiyangcili	Uncertain	<i>P. bretschneideri</i>
31	Sinsui	Kikusui × Kimizukawase	<i>P. pyrifolia</i>	67	Xuehuali	Uncertain	<i>P. bretschneideri</i>
32	Hosui	Kikusi × Hiratsuka 1gou	<i>P. pyrifolia</i>	68	Qinglongtian	Uncertain	<i>P. bretschneideri</i>
33	Kosui	Kikusui × Wasekozo	<i>P. pyrifolia</i>	69	Dangsansuli	Uncertain	<i>P. bretschneideri</i>
34	Imamuraaki	Uncertain	<i>P. pyrifolia</i>	70	Huangxianchangba	Uncertain	<i>P. bretschneideri</i>
35	Okusankichi	Seedling of cultivar Wasesankichi	<i>P. pyrifolia</i>	71	OPR - 113	Seedling selection from seed collected in China by Reimer	<i>P. betulifolia</i>
36	Nijisseiki	Chance seedling	<i>P. pyrifolia</i>	72	OPR - 264	<i>P. betulifolia</i> No. 3 seedling selection from Asian seed lot	<i>P. betulifolia</i>

- Nagel GmbH & Co., KG, Deutsch) 키트를 이용하여 genomic DNA를 분리 하였다. 추출된 DNA는 1.5% 아가로스젤에서 전기 영동하여 DNA 농도를 확인한 후 μL당 20ng의 농도로 희석하여 PCR 분석에 이용하였다.

배 품종식별에 적합한 microsatellite 마커를 선별하기 위하여, 동양배로 분류되는 ‘Kinchaku’, ‘Gongjucheongsilri’, ‘Yasato’, 서양배인 ‘Passa Crassane’, ‘Beze Ligelya’, ‘Bosc’, ‘Abate fetel’, 미국 도입종인 ‘OPR - 264’와 387개의 microsatellite 프라이머

를 이용하여 PCR하고 DNA 증폭 산물을 QIAxcel Advanced System(Cat. 9001941, QIAGEN, Deusch) 을 이용하여 전기 영동한 다음 컴퓨터 프로그램(QIAxcel ScreenGel)에 의해 프라이머별 다형성 정도 및 대립유전자의 질적 특성을 Table 2의 조사 기준에 의하여 분류하였다. Microsatellite의 대립유전자 특성이 단일밴드이거나 강한 주 밴드를 나타내는 분자표지를 선정하여 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET의 화학 물질 중 한가지로 형광표지 하였다. 배 72품종 및 유전자원에 대한 DNA 프로파일 데이터베이스를 구축하기 위한 PCR 조성액은 게놈 DNA 20ng, 0.1 μ M의 형광 표지된 microsatellite primer, 2.0 μ L dNTP mixture(2.5mM), Taq polymerase 1.0U, 2.5 μ L의 10 \times PCR buffer(50mM KCl, 20mM Tris - HCl, pH 8.0, 2.0mM MgCl₂)에 초순수를 첨가하여 전체 부피를 30 μ L로 조절하였다. PCR(C1000, BioRad, USA) 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denature한 후, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extension을 40cycle 수행하였다. Microsatellite 마커에 따른 배 품종별 대립 유전자의 크기를 추정하기 위하여, PCR 증폭산물 1.0 μ L와 탈이온된 폼아마이드(deionized formamide) 10 μ L, size marker(LIZ500 size standard) 0.25 μ L를 혼합하고 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성시킨 후 자동염기서열분석기(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystems, Foster, USA)를 활용하여 전기 영동한 다음 GeneMapper(version 3.7) 프로그램(Applied Biosystems, Foster, USA)을 이용하여 각 마커 별로 대립유전자의 수와 대립유전자의 크기를 결정하였다.

유전적 다양성 분석

Microsatellite 마커의 다양성을 조사하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 Polymorphism information content(PIC) 값을 산출하였다. 식에서 P_{ij}는 마커 i의 밴드들 중에서 j번째 공통 밴드 패턴의 빈도수이다(Anderson et al., 1993).

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

그리고 NTSYSpc(version 2.10b)(Rohlf 2000) 컴퓨터 프로그램을 이용하여 Jaccard 방법에 준하여 유전적 유사도 값을 계산한 다음 unweighted pair-group method with arithmetical average(UPGMA)(Sneath and Sokal 1973) 방법으로 집괴 분석하고 계통도를 작성한 다음 배 품종 및 수집종별 유전적 다양성 및 유연 관계를 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

Microsatellite 분석

배 품종 식별 및 유전적 다양성 분석에 적합한 microsatellite 마커를 선정하기 위하여 일본(Nishitani et al., 2009), 중국(Fan et al., 2013; Yue et al., 2014), 미국(Hemmat et al., 2003), 및 국제 장미과 작물 게놈 데이터베이스(www.rosaceae.org)에서 보고된 387개의 microsatellite 프라이머와 식물학적 특성이 다른 8개의 배 유전자원 및 품종('Kinchaku', 'Gongjuheongsilri', 'Yasato', 'Passa Crassane', 'Beze Ligelya', 'Bosc', 'Abate fetel', 'OPR - 264')에 대한 프라이머별 다형성 정도 및 대립유전자의 질적 특성을 조사하였다(Fig. 1 and Table 2). 총 387개의 microsatellite 마커 중에서 360개는 증폭되는 대립유전자의 밴드 양상이 복잡하거나 증폭반응이 미약하였고 일부 프라이머는 PCR 반응이 일어나지 않은 양상을 나타내었다. 그러나 나머지 27개의 프라이머 중에서 11개는 품종 별로 하나의 명확한 주된 밴드를 나타내었고, 16개는 부가적인 밴드를 나타내면서 강한 주된 피크를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 11개의 프라이머를 대상으로 정방향의 5' - 말단에 형광물질인 FAM, VIC, NED, PET를 각각 표지하여 배 72개의 품종 및 유전자원의 genomic DNA와 PCR하고 자동염기서열분석기를 이용하여 전기 영동한 다음 다형성 정도를 조사한 바 (Table 3), microsatellite 프라이머에 따라 검출된 대립유전자의 수는 4 - 22개로 다양하게 나타났다. 총 133개의 대립유전자가 검출되었고, 마커당 평균 대립유전자의 수는 12.1개로 분석되었다. 각 마커 별 품종의 유전적 다양성 정도를 나타내는 PIC 값은 0.557 - 0.879까지 다양한 범위에서 분포하였으며, 평균값도 0.743으로 아주 높은 경

Table 2. Allele quality of polymorphic microsatellite markers analyzed in this study.

No. of tested markers	Allele quality of polymorphic markers (%)			Microsatellite marker sources
	Good ^z	Medium ^y	Poor ^{x,w}	
73	3 (4.1)	3 (4.1)	67 (91.8)	Nishitani et al. (2009)
42	2 (4.8)	2 (4.8)	38 (90.4)	Hemmat et al. (2003)
120	1 (0.8)	2 (1.7)	117 (97.5)	Fan et al. (2013)
104	-	9 (8.6)	95 (91.4)	Yue et al. (2014)
48	5 (10.4)	-	43 (89.6)	Rosaceae genome database
Total 387	11 (2.8)	16 (4.1)	360 (93.1)	

^zSingle product, only weak or relatively strong stutter bands

^yStrong major polymorphic product with additional strong bands, and multi-locus or weak but scoreable products

^xLadders of bands at equal intensity, but which may contain weak scoreable products

^wBands of unexpected size or additional bands, and very weak bands or no amplification products

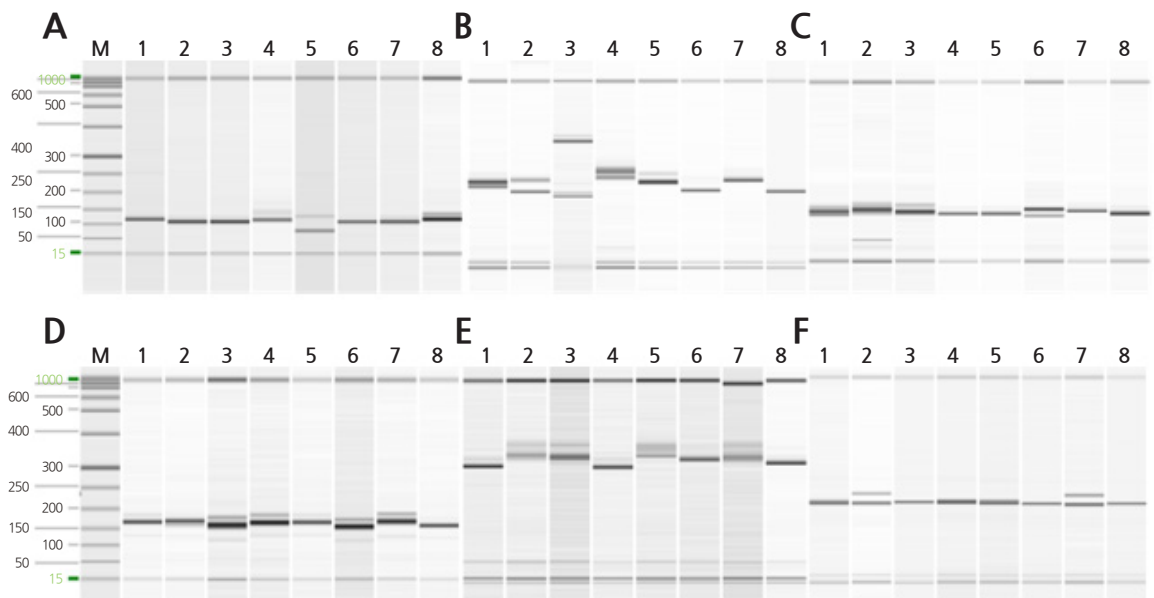


Fig. 1. Polymorphism of six microsatellite markers, CH01H01 (A), *Pyrus* - Contig3a (B), *Pyrus* - Contig4c (C), NAUpy32C (D), *Pyrus* - Contig5c (E), and *Pyrus* - Contig29a (F). PCR products were analyzed using a QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Deutsch). M; QX DNA size marker (50 - 800bp); Lane 1, 'Kinchaku'; 2, 'Passa Crassene'; 3, 'Beze Ligelya'; 4, 'Gongjucheongsilri'; 5, 'Yasato'; 6, 'Abate fetal'; 7, 'Bosc'; 8, 'OPR-264'.

향을 나타내었다. 특히, 10개 이상의 대립유전자를 가지면서 PIC 값이 0.70 이상인 TsuENH002, TsuENH019, CH01H01, GD - 144, NAUpy32c, pyrus_Contig3a, pyrus_Contig4c, pyrus_Contig5c 마커는 배 유전자원 특성 평가 및 배 가공품의 품종 진위성 확인 및 농산물의 도난 사건 등에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 나타났다.

Microsatellite 마커를 이용한 유전적 다양성 분석에 대한 연구는, 일본의 Kimura et al.(2002)이 서양배와 동양배 등 여러 가지 유형의 품종을 대상으로 9개의 microsatellite 마커(KA16, KU10, BGA35, BGT23b, NH004a, NH011b, NH013a, NH014a, NH015a)로 분석하였을 때 평균 대립유전자의 수는 14.8개임을 보고한 이래, 중국의 Bao et al.(2007)은 6개의 SSR 마커 (BGA35, KU10, BGT23b, NH004a, NH011b, NH015a)로 중국, 일본, 한국 등에서 수집한 98개의 배 유전자원 및 품종을 검정한 결과 평균 28개의 대립 유전자가 검출됨을 제시하였다. 이들 연구자의 공통점은 분석에 활용된 유전자원의 종류만 다르

Table 3. Repeat motif, number of alleles, and polymorphism information content (PIC) of microsatellite markers selected for genetic characterization of pear cultivars and germplasm samples.

Microsatellite designation	Primer sequence	Repeat motif	Annealing temperature	Product size (bp)	No. of alleles	PIC value
TsuENH002	F : VIC - CAGCAGGAAACACAGAAAAACAG R : ATATCGAGCAATCAAGGAAGCAG	(GA)12.5	55	106 - 133	10	0.792
TsuENH019	F : FAM - CTCCGCTCACTCCTCAGAAGTTT R : AATGCTTGAGTTGGTTGAGCTTC	(TC)20.5	55	104 - 141	13	0.702
TsuENH071	F : VIC - GAATGATGAAGGCTGTGAGTT R : GTATAGCGGGGCGAAGAAC	(CTTCCT)3	55	287 - 305	7	0.557
CH01H01	F : FAM - GAAAGACTTGCAAGTGGGAGC R : GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	-	55	72 - 132	12	0.819
GD-144	F : PET - GCAAACATAAAACCCATCATTACC R : GTAGCCCTCAAAGAACTCCTTGT	-	55	177 - 242	19	0.852
NAUpy32c	F : NED - CAAACTTCTCAGCCGCATC R : AGAGACCCCATAGAAGCAGTTT	-	55	139 - 164	11	0.748
Pyrus_Contig3a	F : VIC - GTCGGAAAACCTTCATCGGAA R : ATGCAAGCAATCTTCCTCG	-	55	205 - 264	22	0.879
Pyrus_Contig4c	F : NED - CCCCTCCACACAATAAGAA R : CCTTAGCTCCCTCCAGTTCC	-	55	133 - 159	12	0.760
Pyrus-Contig5c	F : FAM - GCCATCACTCAAGAGACAGAA R : TTCCTCTCCCCATGTCCTTA	-	55	273 - 329	19	0.817
Pyrus_Contig29a	F : PET - GGCCAAAAACCAAACATAGA R : TCCTTTCTCCAAAAGGCAAA	-	55	186 - 196	4	0.625
Pyrus-Contig29b	F : VIC - GGCCAAAAACCAAACATAGA R : CAACAAAGGGCTAGCCAAGA	-	55	103 - 112	4	0.621
Total		-			133	8.172
Mean					12.1	0.743

지 9개의 마커 중 6개가 일치한다는 점이다. 그러나 최근에 여러 연구자에 의해 배와 사과 등에서 유래된 다수의 microsatellite 마커가 개발되면서 이들을 대상으로 다형성 정도가 높고 대립유전자의 패턴이 우수하면서 반복 재현성이 높은 마커의 선정은 배 품종의 동일성 여부 및 유전자원 특성 평가에 안정적으로 활용될 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 기준에 적합한 11개의 마커를 선정할 수 있었다. 이 마커들은 일본에서 Nishitani et al.(2009)이 개발한 3개, Hemat et al.(2003)이 개발한 2개, Fan et al.(2013)이 개발한 1개, 장미과 작물 게놈데이터베이스에서 선별한 5개로 구성되어 있다. Nishitani et al.(2009)은 TsuENH002, 019, 071 마커를 동양배 11품종과 서양배 11품종에 대하여 분석하였을 때 대립유전자의 수는 1-4개의 범위에 분포함을 보고하였고, Fan et al.(2013)은 배 whole genomic sequence를 통해 개발한 마커 NAUpy32c를 서양배 1품종과 일본 및 중국에서 유래된 동양배 2품종 및 *Pyrus* 속 유전자원 4점에 대하여 분석하였을 때 4개의 대립유전자가 나타남을 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 이 마커를 대상으로 배 품종 및 유전자원 72개에 대하여 분석하였을 때 대립유전자의 수가 4-13개가 분포하는 양상을 나타내어 이들 연구자보다 대립유전자의 수가 많이 검출되었는데 이는 분석에 활용된 배 품종 및 유전자원의 유전적 조성과 대립유전자의 검출에 활용된 분석기기가 다른 데서 비롯된 결과라고 추정된다. 한편, Hemmat et al.(2003)이 사과의 유전자 지도 작성에 활용했던 사과 유래의 microsatellite 마커인 CH01H01과 GD-144 및 장미과 식물 게놈 데이터베이스에서 선별한 Pyrus_contig3a, Pyrus_contig4c, Pyrus_contig5c, Pyrus_contig29a, Pyruscontig29b의 경우 지금까지 유전자원의 특성 평가나 품종식별에 활용되지 않았던 새로운 마커로서 이를 본 연구에 공시된 재료에 대해 분석하였을 때 대립유전자의 수가 4-22개로 많고, PIC 값도 0.621-0.878까지 높게 나타났다. 따라서 본 연구에서 최종 선정된 배 품종식별용

11개의 microsatellite 마커는 배 뿐만 아니라 다양한 장미과 작물의 유전적 유연관계 설정 및 품종별 데이터베이스 작성에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 추정된다.

품종식별력 검정 및 유전적 유사도 분석

배 및 사과에서 유래된 microsatellite 마커 중에서 다형성 정도가 높으면서 대립유전자의 밴드 패턴이 우수한 11개를 이용하여 배 72품종 및 유전자원에 대한 유전적 유사도 정도를 분석한 바(Fig. 2), 공시품종 및 유전자원에 대한 전체 유사도 지수는 0.07-1.00으로 나타났다. 유전적 유사도 지수 0.21에서 4개의 대그룹으로 분류할 수 있었다.

I 그룹에는 'Jinhwang' 등 55품종이 포함되었으며, 유사도 지수 0.32에서 2개의 소그룹으로 구분할 수 있었다. I-1 그룹은 우리나라에서 육성되어 품종보호 등록된 21품종('Jinhwang', 'Manpung', 'Noksu', 'Sodam', 'Hwasan', 'Sweet Skin', 'Gamro',

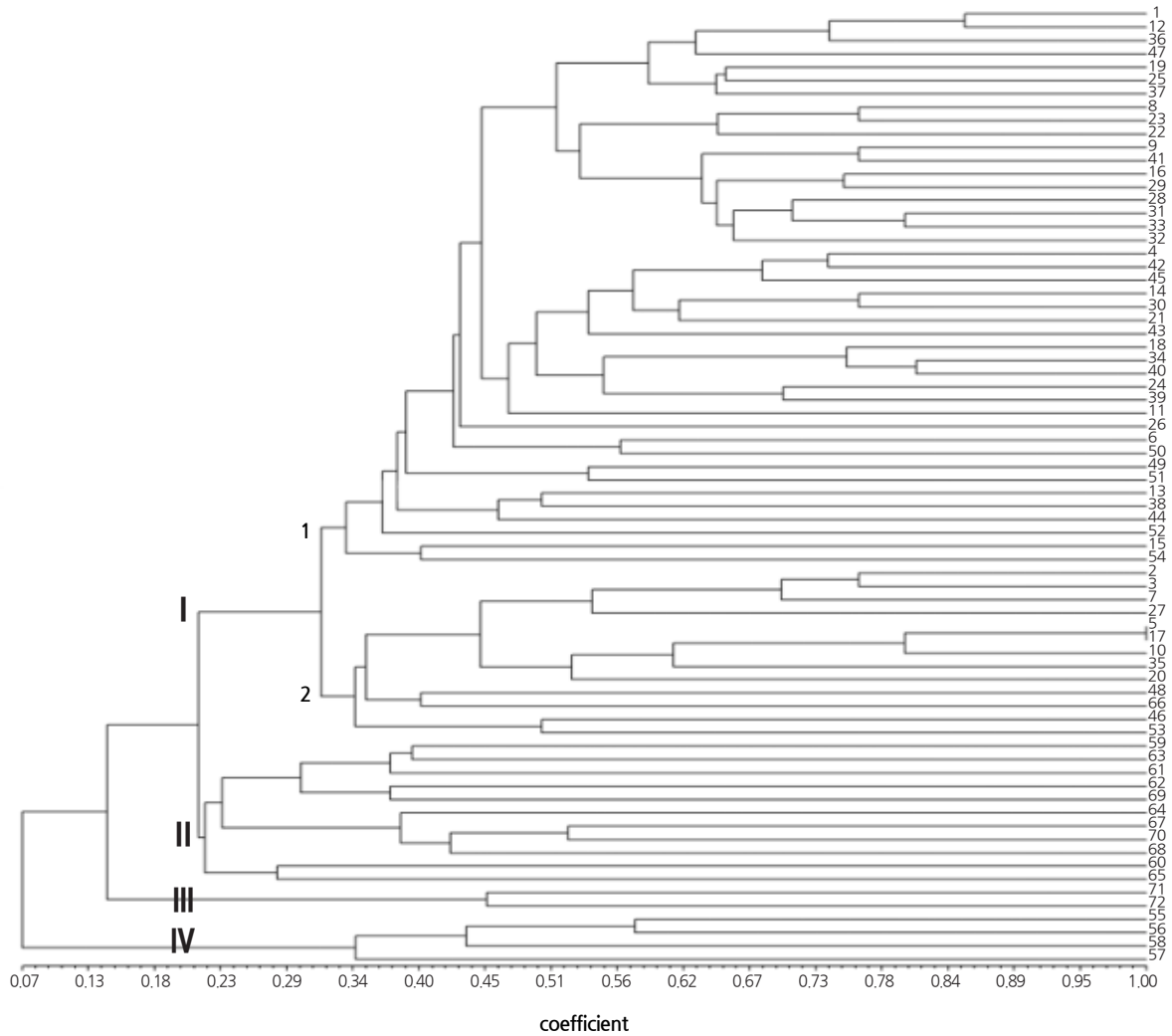


Fig. 2. Dendrogram depicting the classifications of 72 pear cultivars and germplasm samples constructed using the unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA) and based on microsatellite markers. Numbers (1 - 72) on the right - hand side refer to the list of cultivars in Table 1. Scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity. Roman numerals indicate 4 major geographic groups in 72 pear cultivars and germplasm samples, and large '1' and '2' on the left represent two subgroups in 55 Asian pears cultivars.

‘Minibae’, ‘Wongyo Na-Gihoo No.1’, ‘Shinwha’, ‘Hwanggeum’, ‘Josaenghwanggeum’, Sooyoung’, ‘Joy Skin’, ‘Changjo’, ‘Hanareum’, ‘Sinil’, ‘Solmi’, ‘Suhwang’, Sincheon’, ‘Geumchonjosaeng’)과 중간모본인 ‘Wongyo Na - 11’과 일본품종인 ‘Niitaka’ 등 20품종이 포함되었다. 품종 육성 계보를 볼 때 일본에서 육성된 ‘Kosui’, ‘Hosui’, ‘Okusankichi’, ‘Sinsui’, ‘Niitaka’, ‘Nijisseiki’와 우리나라에서 육성된 ‘Hwasan’과 ‘Danbae’ 품종이 교배모본으로 활용된 품종이 속하였다. I - 2 그룹은 우리나라에서 육성되어 품종보호 등록된 ‘Yeongsan’, ‘Wonhwang’, ‘Mihwang’, ‘Mansoo’, ‘Manhwang’, ‘Sweet Cost’, ‘Gamcheon’ 등 7품종과 일본에서 육성된 ‘Okusankichi’ 등 5품종이 속하였으며, 특이하게 동양계 배중에서 *P. bretschneideri*에 속하는 ‘Laiyangcili’가 포함되었다. I - 2 그룹에 속하는 품종들의 육성 계보를 볼 때 ‘Danbae’와 ‘Okusankichi’가 주로 교배모본으로 활용된 품종이 분포되었다. 특히, ‘Gamcheon’과 ‘Mihwang’의 경우 본 연구에서 선발된 분자표지에 의해서 구분이 되지 않았는데, 두 품종의 육성 계보를 볼 때 양친 중에 ‘Okusankichi’가 부분 또는 모본으로 활용되었기 때문에 나타난 결과라고 추정되며, 향후 두 품종의 형태적 특성이나 분자 마커의 수를 확대 분석하여 품종의 동일성 여부를 판단해야 될 것으로 사료된다.

II 그룹은 우리나라, 중국, 일본에서 수집한 *P. ussuriensis* 6점과 중국에서 수집한 배 유전자원 *P. bretschneideri* 5점이 동일한 그룹에 분포하였다. 분자 마커를 활용하여 배 유전자원을 대상으로 군집분석 하였을 때 종에 따라 뚜렷하게 구분되지 않는 것이 여러 연구자에 의해 지적되고 있다. Kimura et al.(2002)은 종이 다른 동양배와 서양배 60품종을 9개의 microsatellite 마커로 분석하였을 때 종에 따라 명확히 그룹화 되지 않는다고 하였다. Cho et al.(2009)도 amplified fragment length polymorphism(AFLP) 마커를 활용한 배 유전자원의 유연관계 분석에서도 이와 유사한 연구결과를 발표한 바 있는데, 본 연구에서도 I 그룹의 *P. pyrifolia*내에 *P. bretschneideri*에 속하는 ‘Laiyangcili’ 분포하거나, II 그룹내에 *P. ussuriensis* 6점과 *P. bretschneideri* 5점이 혼재하여 그룹화되는 양상을 나타내어 이들 연구자의 연구결과를 확인할 수 있었다.

III 그룹은 *P. betulaefolia*에 속하는 ‘OPR - 113’과 ‘OPR - 165’가 포함되었으며, IV 그룹은 *P. communis*에 속하는 ‘Passe Crassane’, ‘Beze Ligelya’, ‘Bosc’, ‘Abate fetel’ 등 4품종이 분포하였다. III 그룹의 *P. betulaefolia*는 *P. bretschneideri*의 기원인 것으로 Challice and Westwood(1973)에 알려져 있으나, 본 연구에서 활용된 microsatellite 마커에 의해 독립적인 하나의 군으로 그룹화되는 것으로 보아 이 두 종간에는 유전적으로 거리가 먼 것으로 확인하였는데, Bao et al.(2007)도 중국배 유전자원을 microsatellite 마커 6개로 분석하였을 때 *P. betulaefolia*와 *P. bretschneideri*는 종간에 유전적으로 거리가 먼 독립적인 군으로 분포함을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 이들 연구자와 전혀 다른 microsatellite 마커로 분석하였을 때 *P. betulaefolia*에 속하는 2개의 유전자원 ‘OPR - 113’과 ‘OPR265’는 *P. bretschneideri*에 속하는 ‘Laiyangcili’, ‘Dansansuli’, ‘Xuehuali’, ‘Huangxianchangba’, ‘Qinglongtian’은 서로 다른 독립적인 그룹에 분포하여 Bao et al.(2007)의 연구결과를 확인할 수 있었다. IV 그룹에 속하는 *P. communis*의 경우 microsatellite 마커에 의해 동양배와 서양배를 대상으로 유전적 다양성 분석시 종에 따라 뚜렷하게 구분되지 않음을 보고하였으나(Kimura et al, 2002), Basil and Postman(2010)은 expressed sequence tags(EST)에서 유래된 13개의 microsatellite 마커를 활용하여 81개의 *P. communis*, 13개 *P. pyrifolia*와 20개의 *P. ussuriensis* 또는 *P. bretschneideri*에 대한 유전적 근연 관계를 분석하였을 때 *P. communis*는 하나의 독립적인 품종군으로 그룹화되거나 *P. pyrifolia*, *P. ussuriensis*, *P. bretschneideri* 동일 그룹내에서 혼재함을 보고하였다. 본 연구에서도 Basil and Postman(2010)이 활용한 마커와 다른 11개의 microsatellite 마커를 72품종 및 유전자원 분석에 활용하였을 때 *P. communis*에 속하는 ‘Bosc’ 외 3품종이 *P. pyrifolia*, *P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*, *P. betulifolia* 속하는 품종과 뚜렷이 구분되어 Basil and Postman(2010)의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

본 연구에서는 최근에 보고된 배 및 사과에서 유래된 387개의 microsatellite 마커 중에서 다형성이 양호할 뿐만 아니라 반복 재현성이 우수하면서 대립유전자의 패턴이 단순한 11개를 새롭게 선발하였다. 이들 마커를 활용하여 72개 배 품종 및 유전자원에 대하여 분석한 결과 배의 식물 분류학적 특성 및 품종 육성 계보에 따라 뚜렷하게 그룹화되는 경향을 보였다. 따라서 이 마커를 통해 구축된 DNA 프로파일 데이터베이스는 품종간 유연관계 설정을 통한 배 유전자원 특성 평가뿐만 아니라 품종보호 품종의 대조품종 선정 등에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 실제로 국립종자원에서는 무(Bae et al., 2015), 호

박(Sim et al., 2015) 등의 작물에서 microsatellite 마커를 이용하여 작성된 품종별 데이터베이스를 활용하여 신품종 보호 제도에 적극 활용하고 있다. 한편, 본 연구에서 새롭게 선정된 microsatellite 마커에 의해 'Gamcheon'과 'Mihwang'은 식별이 되지 않았는데, 최근 배의 경우도 SNP 마커에 대한 정보가 다수 보고되고 있는 바(Montanari et al., 2013), 이를 활용하여 정밀 분석이 이루어져야 될 뿐만 아니라 형태적 특성을 비교 분석하여 품종 특이적인 새로운 마커 개발이 필요할 것으로 사료된다.

초 록

국내외에서 육성된 배 품종 및 유전자원에 대한 DNA 프로파일 데이터 베이스를 구축하여 유전적 연관성을 조사하고자 수행하였다. 배 동양 및 서양배 8품종을 387개의 microsatellite 마커를 이용하여 대립유전자의 패턴이 우수하면서 다형성 정도가 높은 11개를 선발하였다. 이들 마커와 배 품종 및 유전자원 72점에 대해 분석한 결과, 133개의 대립유전자가 검출되었으며, 분자 마커에 따라 4 - 22개까지 다양한 대립유전자의 분포 양상을 나타냈다. PIC 값은 0.557 - 0.879 사이에 분포하였으며 평균 0.743으로 높게 나타났다. Microsatellite 마커에 의해 나타난 대립유전자를 근거로 계통도를 작성하였을 때 72품종 및 유전자원의 유전적 유사도는 0.02 - 1.00까지 넓은 범위에 속하였고, 배나무의 식물분류학적 특성 및 품종 육성 계보에 따라 4개 대그룹으로 크게 나누어졌다. 대부분의 품종이 11개의 microsatellite 마커의 유전자형에 따라 식별이 가능하였다. 본 연구에서 microsatellite 마커에 기반한 배 품종 및 유전자원의 데이터베이스는 품종보호 출원품종의 구별성, 균일성, 안정성을 재확인하는데 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

추가주요어: 품종식별, 분자표지, 배속 식물, 식물품종보호

Literature Cited

- Anderson JA, Churchill CA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic-linkage maps. *Genome* 36:181-186. doi.org/10.1139/g93-024
- Bassil, N, Postman JD (2010) Identification of European and Asian pears using EST-SSRs from *Pyrus*. *Genet Resour Crop Evol* 57:357-370. doi.org/10.1007/s10722-009-9474-7
- Bao L, Chen K, Zhang D, Cao Y, Yamamoto T, Teng Y (2007) Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:959-971. doi.org/10.1007/s10722-006-9152-y
- 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.). *Hort Environ Biotechnol* 56:216-224. doi.org/10.1007/s13580-015-0089-y
- Bell RL (1990) Pears (*Pyrus*), In JN Moore and JR Ballington eds. *Genetic resources of temperate fruit and nut crops I*, International Society for Horticultural Science, Wageningen, Netherlands, pp 665-697
- Cho KH, Shin IS, Kim HR, Kim JH, Heo S, Yoo KY (2009) Analysis of genetic relationship of pear (*Pyrus* spp.) germplasms using AFLP markers. *Korean J Breed Sci* 41: 444-450. doi.org/10.1111/j.1095-8339.1973.tb01734.x
- Challice JS and Westwood MN (1973) Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. *Bot J Linn Soc* 67:121-148
- Fan L, Zhang MY, Liu QZ, Li LT, Song Y, Wang LF, Zhang SL, Wu J (2013) Transferability of Newly Developed Pear SSR Markers to Other Rosaceae Species. *Plant Mol Biol Rep* 31:1271-1282. doi.org/10.1007/s11105-013-0586-z
- Hemmat M, Weedon NF, Brown SK (2003) Mapping and evaluation of *Malus × domestica* microsatellites in apple and pear. *J Amer Soc. Hort Sci* 128:515-520
- Kimura T, Shi YZ, Shoda M, Kotobuki K, Matsuta N, Hayashi T, Ban Y, Yamamoto T (2002) Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breed Sci* 52: 115-121. doi.org/10.1270/jsbbs.52.115
- Montanari S, Saeed M, Kn bel M, Kim Y, Troggio M, Malnoy M, Velasco R, Fontana R, Won K, Durel C, et al (2013) Identification of *Pyrus* single nucleotide polymorphisms (SNPs) and evaluation for genetic mapping in European pear and interspecific *Pyrus* hybrids. *PLoS ONE* 8:e77022. doi.org/10.1371/journal.pone.0077022
- Nishitani C, Terakami S, Sawamura Y, Takada N, Yamamoto T (2009) Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breed Sci* 59:391-400. doi.org/10.1270/jsbbs.59.391

- Rohlf FJ** (2000) NTSYSp: 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. Hort Environ Biotechnol 56:811-820. doi.org/10.1007/s13580-015-0123-0
- Sneath PHA, Sokal RR** (1973) Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification, Freeman WH, San Francisco.
- UPOV** (2010) UPOV/INF/17/1 Guideline for DNA-Profiling: Molecular Marker Selection and Database Construction ("BMT Guideline"), Geneva
- Yamamoto Y, Kimura T, Hayashi T, Ban Y** (2006) DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. Breed Sci 56:165-171. doi.org/10.1270/jsbbs.56.165
- Yue XY, Liu GQ, Zong Y, Teng YW, Cai DY** (2014) Development of genic SSR markers from transcriptome sequencing of pear buds. Biomed Biotechnol 15:303-312. doi.org/10.1631/jzus.b1300240