

Inter-simple sequence repeat (ISSR) marker를 이용한 수박의 품종간 유연관계 분석

권용삼* · 이원식¹ · 조일호

농림부 국립종자관리소 재배시험과, ¹농림부 국립종자관리소 서부지소

Received December 22, 2005 / Accepted February 8, 2006

Assessment of Genetic Relationship among Watermelon Varieties Revealed by ISSR Marker. Yong-Sham Kwon*, Won-Sik Lee¹ and Il-Ho Cho. *Variety Testing Division, National Seed Management Office, MAF, Suwon, 443-400, Korea, ¹Seobu Branch Office, National Seed Management Office, MAF, Iksan, 570-892, Korea* – Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis were used to assess genetic diversity among 18 genotypes of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) including breeding lines and commercial varieties. The 21 ISSR primers selected from 100 primers were showed the amplification of 105 reproducible fragments ranging from about 200 bp to 5000 bp. A total of 58 DNA fragments were polymorphic with an average 2.7 polymorphic bands per primer. The polymorphic primers were divided into 18 anchored primers and 3 non anchored primers. All of the anchored primers were di-nucleotide repeat motif, and was more polymorphic than non anchored primers. Eighteen watermelon genotypes were classified into two large groups. Clustering was in some accordance with the division of fruit shape into 18 watermelon. Therefore, ISSR markers may be suitable for variety discrimination and for constructing a linkage map of watermelon.

Key words – Watermelon, genetic relationship, ISSR, cluster analysis

서 론

박과 작물중 수박속(*Citrullus*) 식물은 지역에 따라 남아프리카(*Citrullus lanatus*), 북아프리카와 중동(*C. colocynthis*), 서남 아프리카(*C. cirrhosus*, *C. naudinianus*), 인도(*C. fistulosus*) 형으로 크게 분류 된다. 남아프리카형은 *C. lanatus* var. *lanatus*와 var. *citroides*로 나누어지며 우리가 식용으로 재배하는 수박은 *C. lanatus* var. *lanatus* 이다[1]. 수박의 식물체 생태형에 따라 왜성과 포복형으로 나누고 과실의 모양에 따라 타원형계와 원형계로 구분되고, 염색체수에 따라 2, 3, 4배체가 있으며 우리나라에 재배되고 있는 품종은 2배체가 대부분이다. 우리나라의 수박 재배 면적은 2004년 기준 21,654 ha로 전체 채소 재배 면적 (341,000 ha)의 6.45%를 점유하고 있으며, 재배방법에 따라 시설재배와 노지재배로 구분되고, 2004년 현재 품종보호 등록된 18품종과 생산판매 신고된 425품종이 유통되고 있다.

작물의 품종간 유전적 유연관계 분석에는 형태적 특성을 근거로 하여 유전적 근연 관계를 판단하여 왔으나, 대부분의 조사 형질은 양적형질이기 때문에 환경의 영향을 많이 받을 뿐만 아니라 조사에 소요되는 시간과 노력이 많이 소요되고 특성 조사자의 관점에 따른 차이 등과 같은 문제점이 제기되었다[13]. 분자생물학의 발달과 더불어 여러 가지 형태의 DNA marker가 개발되면서 이를 품종의 유연관계 분석에 적극 활용하고 있는데, 수박의 경우 random amplified poly-

morphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) marker를 이용하여 유전자원 및 재배품종의 변이 정도를 분석한 바 있다[3,6,8]. 그러나 RAPD 분석은 다형성을 나타내는 marker의 수가 적을 뿐만 아니라 실험의 재현성이 문제가 되고 있고[8], AFLP 분석은 실험에 소요되는 노력과 비용이 많이 소요되는 단점이 있으며[3], SSR 방법은 품종의 genotyping에 가장 효과적이거나 marker의 개발 방법이 복잡하기 때문에 수박의 경우 극소수의 SSR marker에 대한 염기서열이 공개되어 있는 실정이다[6].

근래에 inter-simple sequence repeats (ISSR) marker가 품종의 genotyping에 활용되고 있는데, 이 marker는 AG..., CAG... 등과 같은 염기가 4~10회 반복되는 것으로서, 특정 primer에 의해 식물체 genome상의 SSR이 상보적으로 증폭되어 품종간에 다형성을 나타내며, PCR 수행시 annealing 온도가 높기 때문에 실험에 재현성도 크게 높은 것으로 알려져 있다[10]. 실제로 벼[2], 고구마[5], 참깨[7], 밀[9], 감자[11]와 같은 작물의 품종간 유연관계 분석에 ISSR marker가 효과적인 것으로 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 분자표지인자에 의한 수박의 품종간 유연관계를 분석하고자 ISSR marker를 이용하여 국내에서 육성된 수박 18품종과의 유전적 변이 정도를 분석하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료 및 DNA 분리

본 연구에서는 외국에서 수집된 수박 덩굴쪄김병 저항성

*Corresponding author

Tel : +82-31-273-4147, Fax : +82-31-203-7431

E-mail : yskwon@seed.go.kr

Table 1. Watermelon varieties used in this studies

No.	Varieties	Disease tolerance	Sources	No.	Varieties	Disease tolerance	Sources
1	Black diamond	-	Willhite	10	Samboggul	-	Seminis
2	Calhoun-gray	Fusarium wilt	Willhite	11	Geumbo	-	Nongwoobio
3	Au-producer	Anthraco	Willhite	12	Haboggul	-	Nongwoobio
4	Congo	Anthraco	PS petoseed	13	Sacheolggul	-	Nongwoobio
5	Jubilee	Fusarium wilt	Willhite	14	Chanchan	-	Nongwoobio
6	Charleston-gray	Fusarium wilt	Willhite	15	Jiguchon	-	Jeil
7	PI189225	Anthraco	USDA	16	Chilboggul	-	Jeil
8	PI296341-FR	Fusarium wilt	USDA	17	Festival	-	Syngenta
9	Bitna	-	Seminis	18	Tojonggul	-	Dongbuanong

판별 품종인 'Calhoun-gray' 등 4품종, 탄저병 저항성 ('Au-producer' 등 3품종)과 감수성('Black diamond')을 판별할 수 있는 4품종 및 국내 종묘회사에서 육성된 '삼복꿀'의 10품종을 공시품종으로 선정하였다(Table 1). 공시품종의 종자를 파종하여 약 15일간 육묘한 다음 유식물의 어린잎을 액체질소를 이용하여 마쇄한 다음 Nucleospion® Plant Kit (Cat no. 740.270.540.)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 µl당 7 ng 수준으로 농도를 맞추어 PCR에 이용하였다.

ISSR 분석

수박의 품종간 유연관계를 분석하기 위하여 100개의 ISSR primer (UBC primer Set no. 9, University of British Columbia, Canada)를 이용하였다. ISSR 분석을 위하여 ge-

nomiC DNA 35 ng을 template DNA로 이용하였으며, 10×E x Taq buffer 2.5 ml, dNTP mixture 1 ml, TaKaRa Ex Taq™ DNA polymerase (TaKaRa, Cat no. RR001A) 1 unit, 50 pM의 ISSR primer를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR은 UNOII Thermocycler (Biometra, Germany)에서 35 cycle을 실시하였으며, denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 48 ~ 60℃에서 1분(Table 2), 그리고 extension을 72℃에서 2분간으로 하여 수행하였다. PCR이 완료된 후 5 µl의 증폭 산물을 2.5% agarose gel에 150 V에서 30분간 전기영동한 후 UV illuminator에서 품종간의 다형성 여부를 확인하였다.

품종간 유연관계 분석

ISSR 분석을 통하여 재현성이 높고 다형성을 보이는 밴드를 marker로 선발하여 밴드의 유무(dominant marker scor-

Table 2. Primer sequences, Tm value and annealing temperature used for ISSR analysis

ISSR primers	Sequence (5'-3')	GC content (%)	Tm value (°C)	Annealing tem (°C)
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	52.9	32.2	52
UBC817	CACACACACACACAA	47.0	38.5	58
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	52.9	36.4	56
UBC825	ACACACACACACACT	47.0	35.3	55
UBC826	ACACACACACACACC	52.9	39.4	58
UBC827	ACACACACACACACG	52.9	41.0	60
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGYT	44.4	36.5	53
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAYC	50.0	34.2	55
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAYG	50.0	34.6	55
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC	50.0	34.6	55
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTYC	50.0	39.6	49
UBC855	ACACACACACACACAYT	44.4	42.0	60
UBC856	ACACACACACACACAYA	44.4	44.0	60
UBC857	ACACACACACACACYG	44.4	44.0	55
UBC858	TGTGTGTGTGTGTGRT	44.4	44.0	52
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	38.8	38.8	50
UBC879	CTTCACTTCACTTCA	40.0	28.4	48
UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	80.0	54.0	50
UBC886	VDVCTCTCTCTCTCT	41.1	31.0	58
UBC890	VHVGTTGTGTGTGTGT	41.1	35.3	55
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTG	41.1	37.0	56

ing : present = 1, absent = 0)에 따라 NTSYSpc (version 2.10b)[12] 컴퓨터 프로그램에 입력하고 Dice 방법[14]에 준하여 유전적 유사도 값을 계산하였다. 유전적 유사도를 이용하여 Unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA)[14] 방법으로 집괴 분석하여 dendrogram을 작성한 다음 품종간 유전적 유연관계를 비교 분석 하였다.

결과 및 고찰

ISSR 분석

국내외에서 육성된 수박 18품종의 genomic DNA와 ISSR primer를 이용하여 PCR을 수행한 바(Table 3), 총 100개의 ISSR primer중에서 재현성이 있으면서 다형성을 뚜렷하게 나타내는 primer는 21개 였다. 이들 ISSR primer에 의해 증폭된 밴드는 105개로 조사되었고 다형성을 보이는 것은 58개 이었으며 primer당 평균 밴드의 수는 2.7개 이었다. 그리고 증폭된 DNA 단편의 크기는 200~5000 bp 사이에 위치하였다(Fig. 1).

DNA marker를 이용한 수박의 품종간 유연관계 분석은 Lee 등[9]이 수박 유전자원 39개를 15개 RAPD primer로 분석하였을 때 162개의 밴드 중에서 21%만이 다형성을 나타낸다고 하였고, Che 등[3]은 8개의 AFLP primer 이용하여 수

박 30품종을 분석하였을 때 다형성 정도는 45.3~64.2%로 높게 나타난다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 수박 18품종을 21개의 ISSR primer로 분석하였을 때 55%의 다형성 밴드를 나타내어 Lee 등[8]이 분석한 RAPD 방법보다 다형성 정도가 높았고 Che 등[3]이 분석한 AFLP 결과와 유사한 다형성 정도를 나타내었다. 이러한 연구결과는 ISSR 분석 방법의 경우 AFLP 분석과 유사한 다형성 정도를 나타낸다고 한 Blair 등[2]과 Paris 등[10]의 연구 결과를 확인할 수 있었다.

한편 ISSR primer의 염기서열의 차이에 따라 품종간 다형성 정도가 다르게 나타났는데, 21개의 다형성을 나타낸 ISSR primer는 18개의 anchored primer와 3개의 non-anchored primer로 크게 분류되었고, 18개의 anchored primer 가운데 3'-anchored primer가 15개였고 5'-anchored primer는 3개인 것으로 조사되었다. 그리고 선발된 ISSR primer의 반복 염기서열에 따라 크게 3개의 그룹으로 분류되었는데 di-nucleotide의 반복염기서열을 가진 primer가 18개, tri-nucleotide primer가 1개, penta-nucleotide primer가 2개인 것으로 나타났다. 18개의 di-nucleotide 반복 염기서열을 가진 primer중에서 GA나 CT 반복 염기 서열을 가진 primer가 7개, CA나 GT 염기서열을 가진 primer가 11개로 분석되었고, AT가 반복되는 염기서열을 가진 primer는 분석되지 않았다. 그리고 anchored primer 중에서 GA나 CT를 motif로 가지는 primer

Table 3. Percent of polymorphic loci in watermelon varieties

Primer types	Repeat	Total number of fragments	Polymorphic bands		
			number	percent	
3'-anchored primers	UBC815	(CT) ₈ G	5	4	80.0
	UBC817	(CA) ₈ A	4	2	50.0
	UBC824	(TC) ₈ G	4	3	75.0
	UBC825	(AC) ₈ T	6	2	33.3
	UBC826	(AC) ₈ C	7	2	28.6
	UBC827	(AC) ₈ G	5	2	40.0
	UBC834	(AG) ₈ YT	6	3	50.0
	UBC841	(GA) ₈ YC	4	1	25.0
	UBC842	(GA) ₈ YG	6	6	100.0
	UBC844	(CT) ₈ RC	7	5	71.4
	UBC850	(GT) ₈ YC	2	2	100.0
	UBC855	(AC) ₈ YT	10	5	50.0
	UBC856	(AC) ₈ YA	3	1	33.3
	UBC857	(AC) ₈ YG	4	2	50.0
	UBC858	(TG) ₈ RT	3	1	33.3
5'-anchored primers	UBC886	VDV(CT) ₇	5	1	20.0
	UBC890	VHV(GT) ₇	5	5	100.0
	UBC891	HVH(TG) ₇	4	2	50.0
non-anchored primers	UBC864	(ATG) ₆	5	3	60.0
	UBC879	(CTTCA) ₃	5	2	40.0
	UBC881	(GGGTG) ₃	5	4	80.0
Total		105	58		
Mean		5.0	2.7	55.2	

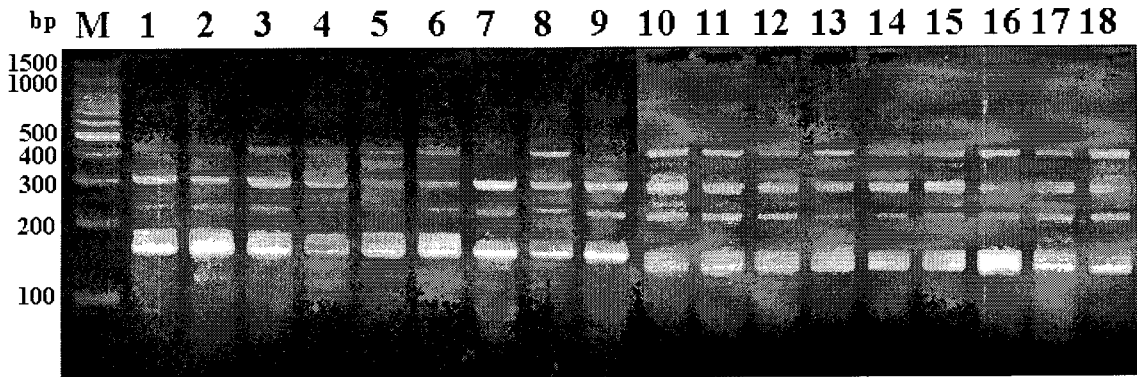


Fig. 1. Amplification of 18 watermelon varieties using UBC834.
 1. Black diamond, 2. Au-producer, 3. Congo, 4. Calhoun-gray, 5. Jubilee, 6. Charleston-gray, 7. PI189225, 8. Geumbo, 9. PI296341-FR, 10. Haboggul, 11. Chilboggul, 12. Bitna, 13. Jiguchon, 14. Festival, 15. Sacheolggul, 16. Tojonggul, 17. Samboggul, 18. Chanchan

의 다형성 정도가 62.1%, CA나 GT를 가지는 primer는 49.1%로 나타나 ISSR primer의 반복염기 서열의 염기에 따라 다형성 정도가 다르게 나타났다.

본 연구에서 ISSR primer중 수박에 다형성을 나타내는 것은 대부분이 3'-anchored primer였는데, Fang과 Roose[4]는 유전적으로 근연관계에 있는 Citrus 품종을 ISSR 분석하였을 때 3'-anchored primer는 단지 하나의 염기가 추가되기 때문에 5'-anchored primer 다형성 정도가 높게 나타남을 지적한 바 있고, Hu 등[5]도 고구마의 재배종과 야생형 간에 ISSR 분석을 실시하여 이와 유사한 연구결과를 보고한 바 있다. 본 실험에서 GA나 CT를 motif로 가지는 primer가 CA나 GT를 가지는 것보다 다형성 정도가 다소 높게 나타났는데, 이는 수박 genome상에는 GA나 CT motif를 가지는 SSR이 많이 분포한다고 보고한 Jarret 등[6]의 연구결과를 확인할 수 있었다. 한편, AT를 motif로 가지는 SSR marker는 식물체의 genome상에 아주 많이 분포하고 높은 다형성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서 이들 염기 서열을 motif로 가지는 ISSR primer는 특이적인 밴드가 증폭되지 않았는데 이는 PCR 수행시 A와 T가 상호 보충적으로 결합하기 때문인 것으로 추정되며, Hu 등[5]도 고구마의 ISSR 분석에서 AT를 motif로 가지는 primer는 특이적인 밴드가 증폭되지 않음을 보고한 바 있다.

품종간 유연관계 분석

ISSR marker를 이용하여 수박 18품종에 대한 유전적 유연관계를 조사한 바(Fig. 2), 공시품종의 전체 유사도 지수는 0.34 ~ 1.00의 범위로 나타났으며, 유사도 지수 0.42를 기준으로 할 때 18개 품종은 2개 그룹으로 뚜렷하게 구분되었다. 제 1그룹은 수박 유전자원 6품종과 국내 종묘회사에서 육성된 10개 품종이 포함되었으며, 제 2그룹에는 'PI189225'와 'PI296341-FR'이 속하였고 이들 품종간의 유사도 지수는 0.70으로 나타나 유전적으로 큰 변이가 있는 것으로 분석되

었다. 제 1그룹에 포함된 외국 수집종들의 경우 유전적 유사도 지수가 0.75~0.96을 나타내어 이들 품종들의 유전적 변이는 비교적 큰 것으로 조사되었다. 그러나 국내에서 육성된 품종의 경우 유전적 유사도가 0.95~1.00 범위로 나타났으며, '지구촌'과 '금보', '하복꽃'의 4품종 및 '삼복꽃'과 '찬찬'은 이들 marker에 의해 구분이 되지 않을 정도로 유전적 유사도가 높았다. 그러나 수박의 형태가 원형인 '빛나', '지구촌', '금보'는 타원형계인 다른 품종들과 유전적 유사도 값 0.96에서 구분되었다. 따라서 본 연구에 다형성을 나타내는 ISSR marker 58개에 의해 수박의 과실 형태를 뚜렷하게 구분할 수 있음을 확인할 수 있었다.

수박의 품종간 유전적 유연관계를 추정하는 데는 형태적 특성이나 DNA marker를 이용하는데, 형태적 특성의 경우 대부분의 조사형질이 환경의 영향을 많이 받는 양적 유전자이기 때문에 재배방법, 기상환경 등과 같은 요인에 의해 정확한 형질을 평가하기는 상당히 어려운 실정이다. 또한 박과 작물 대부분은 과형, 과색, 종자특성과 같은 형질만으로 유전자원의 평가 및 품종 특성을 분류하여 왔기 때문에 근연관계에 있는 품종의 특성조사에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다[3]. 그러나 DNA marker에 의한 분석방법은 환경의 영향을 전혀 받지 않는 장점이 있으나 박과 작물인 수박의 경우 genome의 크기가 다른 작물에 비해 크기 때문에 다형성을 보이는 marker의 개발이 단순하지 않을 뿐만 아니라 근연관계에 있는 품종을 식별하기가 상당히 어려운 것으로 알려져 있다[1,3,6]. 본 연구에서도 수박을 ISSR marker로 분석하였을 때 몇몇 외국 품종을 제외하고 국내 육성된 대부분 품종들의 유전적 유사도가 95%이상 높게 나타나 수박 품종을 DNA marker로 분석하기에는 단순하지 않음을 확인할 수 있었고, 국내에서 육성된 수박 품종 육성에는 근연관계에 있는 계통을 양친으로 활용할 수 있음을 추정할 수 있었다.

앞으로 본 연구에서 다형성 정도가 높게 나타난 ISSR marker 중에서 GA나 CT를 target repeat로 하여 품종식별에

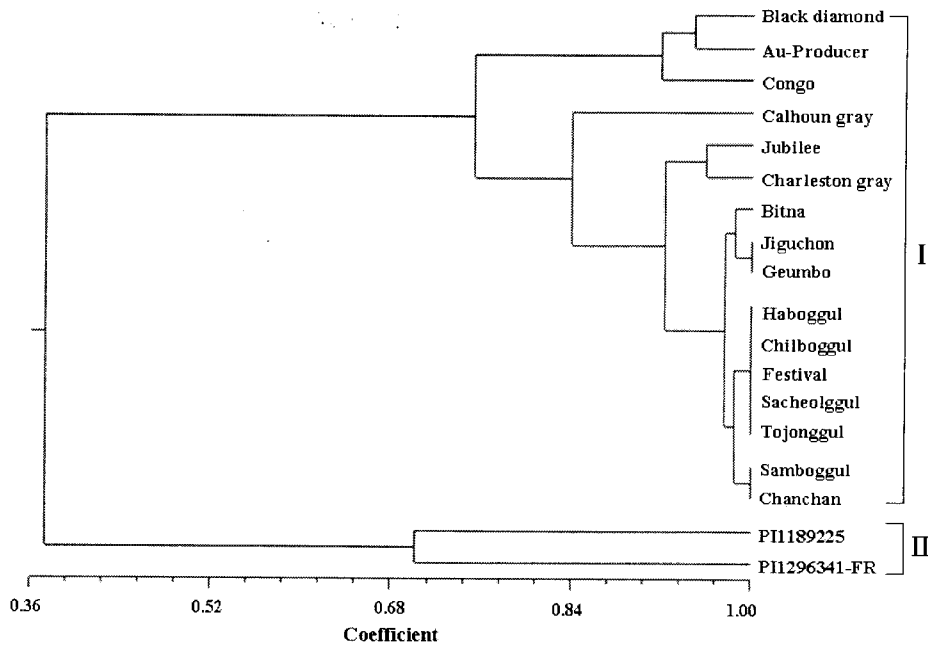


Fig. 2. Dendrogram of 18 varieties by cluster analysis based on the ISSR markers. The major clusters are marked on the right side of the dendrogram. The scale at the bottom is Dice's coefficient of similarity.

가장 효과적인 분자표지인자로 알려진 SSR marker가 개발된다면 수박 유통품종에 대한 보다 세밀한 유전적 근연관계를 추정할 수 있을 것으로 사료된다

요 약

ISSR markers를 이용하여 수박 18품종의 유전적 유연관계를 분석하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

수박 18품종의 genomic DNA와 ISSR primer 100개를 PCR 반응시킨 결과 다형성을 뚜렷하게 나타내는 primer는 21개 이었으며, 이들 primer에 의해 증폭된 밴드는 105개 이었고 다형성을 보이는 밴드는 58개였으며 증폭된 DNA 단편의 크기는 0.2 ~ 5.0 kb 사이에 위치하였다. 다형성을 나타낸 primer는 18개의 anchored primer와 3개의 non-anchored primer로 구분되었고 모든 anchored primer는 2개의 염기서열이 반복된 형태를 나타내었으며, non-anchored primer보다 다형성 정도가 높게 나타났다. 수박 18품종은 유전적 유사도 값 0.42를 기준으로 할 때 18개 품종을 2개의 그룹으로 구분할 수 있었으며, 국내에서 육성된 품종은 유전적 유사도가 아주 높은 것으로 분석되었고, 이들 품종은 수박의 과형에 따라 유사하게 구분되었다.

참 고 문 헌

1. Bates, D. M. and R. Robinson. 1995. Cucumber, melons, and watermelon : *Cucumis* and *Citrullus* (Cucurbitaceae).

pp. 89-96, In Smartt, J. and N. W. Simmonds (eds.), *Evolution of Crop Plants*. Longman, London.

2. Blair, M. W., O. Panaud and S. R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **98**, 780-792.

3. Che, K. P., C. Y. Liang, Y. G. Wang, D. M. Jin and B. Wang. 2003. Genetic assessment of watermelon germplasm using the AFLP technique. *HortScience* **38**, 81-84.

4. Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 408-417.

5. Hu, J., M. Nakatani, A. Garcia, T. Kuranouchi and T. Fujimura. 2003. Genetic analysis of sweetpotato and wild relative using Inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Science* **53**, 297-304.

6. Jarret, R. L., L. C. Merrick, T. Holms, J. Evans and M. K. Aradhya. 1996. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai]. *Genome* **40**, 433-441.

7. Kim, D. H., G. Zur, Y. Danin-Poleg, S. W. Lee, K. B. Shim, C. W. Kang and Y. Kashi. 2002. Genetic relationships of sesame germplasm collection as revealed by inter-simple sequence repeats. *Plant Breeding* **121**, 259-262.

8. Lee, S. J., J. S. Shin, K. W. Park and Y. P. Hong. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 719-725.

9. Nagaoka, T. and Y. Ogiwara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD

- markers. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 597-602.
10. Paris, H. S., N. Yonash, V. Portnoy, N. Mozes-Daube, G. Tzuri and N. Katzir. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 971-978.
 11. Prevost, A. and M. J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivar. *Theor. Appl. Genet.* **98**, 107-112.
 12. Rohlf, F. J. 2000, NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System- Version 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
 13. Staub, J. E. and F. C. Serquen. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* **31**, 729-741.
 14. Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy : The Principles and Practice of Numerical Classification, W. H. Freeman, San Francisco.