국내에서 수집된 국화 품종에 대한 SSR 분자표지 Database 구축

심은조¹ · 허은정² · 윤무경³ · 소은희¹ · 홍지화^{4*}

¹국립종자원 종자검정연구센터, ²국립종자원 경남지원, ³국립종자원 품종보호과,

⁴국립농산물품질관리원 시험연구소 품질조사과

Construction of SSR Marker Database of Chrysanthemum Varieties Collected in Korea

Eun-Jo Shim¹, Eun-Jung Heo², Moo-Kyoung Yoon³, Eun-Hee Soh¹, and Jee-Hwa Hong^{4*}

¹Seed Testing & Research Center, Korea Seed & Variety Service, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Gimcheon 39660, Korea

²Gyeongnam Provincial Office, Korea Seed & Variety Service, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Milyang 50449, Korea

³Variety Protection Division, Korea Seed & Variety Service, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Gimcheon 39660, Korea

⁴Division of Quality Examination, Experiment Research Institute, National Agricultural Products Quality Management Service, Gimcheon 39660, Korea

Abstract : Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflourm* Kitamura) is a member of the Asteraceae and one of the important horticultural crops. The objective of this study was to construct a DNA profile database for identification of chrysanthemum varieties using simple sequence repeat (SSR) markers. In order to select SSR markers for the variety identification, we screened 587 SSR primers using 20 varieties. Among them, 27 SSR markers showed polymorphism. We finally selected 14 SSR markers showing peak clearance, high polymorphism and reproducibility in 20 varieties. In conclusion, DNA profile database for 147 chrysanthemum varieties were constructed by 14 SSR markers. A total of 79 SSR alleles were detected and three to ten alleles were detected with an average of 5.6 alleles per locus. The polymorphism information content value ranged 0.287 ~ 0.785 with an average of 0.598. Genetic relationship revealed that genetic distance of 147 varieties ranged from 0.44 to 1.00. The 143 varieties among 147 varieties were distinguished by 14 SSR markers but the 2 varieties developed by mutation breeding and natural variation were not distinguished from original varieties. These constructed SSR profile database will be useful for the selection of similar varieties for candidate variety and for solving problem relating to seed dispute and infringement of plant breeder's right.

Keywords : Chrysanthemum, SSR, Genotyping, DNA profile database, Genetic relationship

서 언

국화(*Dendranthema grandiflourm* Kitamura)는 국화과(Asteraceae)에 속하고 육종목표에 따라 절화, 화분국, 화단국 등 다양한 형태로 육성되어 재배되고 있다(Anderson 2007).

국내에서 국화는 다양한 화색과 화형을 갖춘 품종들이 개발되어 2015년 6월 30일 현재 국화의 품종보호 등록 품종수는 638품종(<http://www.seed.go.kr>)으로 화훼작물 중 장미 다음으로 보호 등록된 품종수가 많은 작물이다. 따라서 품종보호 침해 등과 같은 지식재산권 분쟁이 발생할 확률이 높고, 형태적으로 유사한 품종간의 구별성 확인 등을 통한 육종가의 품종보호권 보호가 절실히 요구된다. 국화 품종을 효율적으로 관리하고, 식별하기 위한 방법 중의 하나가 품종식별 분자표지를 이용하여 이를 데이터베이스화하는 것이며 국제식물신

*Corresponding author (E-mail: hongjh19@korea.kr, Tel: +82-54-912-0230, Fax: +82-54-912-0227)

(Received on September 01, 2015. Revised on September 24, 2015.
Accepted on September 25, 2015.)

품종보호연맹(UPOV, international union for the protection of new varieties of plants)에서는 분자표지 선발과 이를 이용한 DNA profile 데이터베이스 구축에 관한 유전자 분석 지침서를 제정한바 있다(UPOV 2010). 국립종자원에서는 UPOV에서 제안한 유전자 분석 지침서를 기반으로 고추(Kwon et al. 2013), 멜론(Kwon & Hong 2014), 상추(Hong et al. 2013a) 등의 27개 작물에 대하여 계통 내 단순 반복되는 염기의 변이를 이용하는 simple sequence repeat (SSR) 분자표지를 이용하여 DNA profile 데이터베이스를 구축하여 품종보호 출원품종의 대조품종 선정과 유통종자 및 분쟁종자의 품종진위 검증 등에 활용하고 있는 실정이다.

국화의 품종식별에 관한 국내외 연구동향으로 중국에서는 18품종을 대상으로 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 분자표지를 이용하여 유연관계를 분석하였고(Helan et al. 2002), amplified fragment length polymorphism (AFLP) 분자표지를 이용하여 45개 품종에 대한 유전적 다양성 연구 결과를 보고하였다(Jie et al. 2007). 최근에는 next generation sequencing(NGS) 분석법을 통해 개발한 expressed sequence tag(EST) 유래 SSR 분자표지를 이용하여 종(species) 식별에 대한 연구결과가 보고되었다(Wang et al. 2013). 국내에서는 SSR 마커를 이용하여 85품종에 대한 식별 연구가 수행되었고(Hong et al. 2013b), EST-SSR 분자표지를 이용하여 50품종에 대한 식별 연구 결과가 보고된 바 있다(Jo et al. 2015). 국화는 경제적으로 중요한 작물이기에 분자표지 연구가 최근 많이 이루어지고 있지만 많은 품종을 대상으로 한 정밀도 높은 데이터베이스 구축은 미비한 실정이기 때문에 품종보호제도, 종자분쟁 해결 등에 분자표지를 실용적으로 활용하기 위해서는 DNA profile 데이터베이스 구축을 통한 체계적인 품종식별 체계 확립이 필요하다고 판단되었다.

따라서 본 연구에서는 다양한 분자표지 분석방법들 중 SSR 분자표지를 활용하여 국내에서 수집된 147개 국화의 품종에 대한 품종식별 분자표지 선발과 품종별 DNA profile 데이터베이스 구축을 실시하였다.

재료 및 방법

공시품종 및 genomic DNA 분리

공시품종은 국화 147개 품종을 충청남도농업기술원 화훼연구소와 국립종자원 서부지원에서 수집하여 DNA profile 데이터베이스 구축에 활용하였다(Table 1). 공시품종의 DNA 추출은 본

업 3~4매를 채취하여 Nucleospin® PlantII(Macherey-Nagel Cat. 740770.250) Kit를 이용하여 분리하였다. 추출된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 DNA 농도를 확인한 후 μ l 당 20 ng의 농도로 정량하여 PCR 분석에 이용하였다.

Primer 확보 및 SSR 분석

국화 품종식별에 효과적인 SSR 분자표지를 선발하기 위해서 국내외에서 개발된 575개 primer(Wang et al. 2013), 12개의 primer(Khaing et al. 2013) 총 587개의 primer를 이용하여 ‘Borami(보라미)’, ‘Mujigae(무지개)’, ‘Hwiparam(휘파람)’, ‘Yesmorning(에스모닝)’, ‘Hibaeksan(하이백산)’, ‘Magic(매직)’, ‘Yellowcap(옐로우캡)’, ‘Sumi(수미)’, ‘Ilweol(일월)’, ‘Cherryblossom(체리블러썬)’, ‘Forestaroma(포레스트아로마)’, ‘Secretpink(시크릿핑크)’, ‘Baekma(백마)’, ‘OrangeND(오렌지엔디)’, ‘PeachND(피치엔디)’, ‘BrightND(브라이트엔디)’, ‘PowerND(파워엔디)’, ‘Dreamround(드림라운드)’, ‘Firepink(파이어핑크)’, ‘Shinma(신마)’ 20개 품종을 대표품종으로 선정하여 다형성을 분석하였다. PCR 반응을 통한 증폭산물은 QIAxcel Advanced System(QIAGEN, Germany)을 이용하여 전기영동하였고 컴퓨터 프로그램(QIAxcel ScreenGel)을 활용하여 대표품종 간에 대립유전자의 차이를 분석하여 다형성을 보이는 분자표지를 1차 선발하였다. 선발된 primer는 정방향에 FAM, VIC, NED, PET (Applied Biosystems, USA)으로 형광 표지한 다음 국화 147품종(Table 1)에 대한 DNA profile 데이터베이스 구축에 이용하였다.

PCR 반응은 국화 genomic DNA 20 ng, 0.5 μ M의 SSR primer, 2 μ l dNTP mixture(2.5 mM), Taq polymerase 1 unit, 2.5 μ l의 10 X PCR buffer(50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM $MgCl_2$)에 증류수를 첨가하여 전체 부피를 25 μ l로 반응액을 조성하였다. PCR(GeneAmp® PCR System 9700) 증폭은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension을 40 cycle 수행하였고, 72°C에서 10분간 final-extension을 수행하였다. PCR이 완료된 후 1.0~2.0 μ l의 증폭산물을 2% agarose gel에서 전기영동하여 증폭산물을 확인한 후, 초순수 220 μ l에 PCR 산물 1.0 μ l를 희석하였다. 희석된 PCR 증폭산물 1.0 μ l는 탈이온된 포름아마이드(deionized formamide) 10 μ l, size marker(LIZ500 size standard) 0.25 μ l를 혼합한 다음 95°C에서 2분간 denaturation 하였다. 변성된 PCR 증폭산물은 자동염

Table 1. Chrysanthemum varieties used for genetic relationship analysis using simple sequence repeat markers.

No.	Variety name	Type classification	No.	Variety name	Type classification
1	Borami	Spray	45	Delidantepurple	Spray
2	Mujigae	Spray	46	Delibiscari	Spray
3	Hwiparam	Spray	47	Delitents	Spray
4	Yesmorning	Spray	48	Deliaragon	Spray
5	Magic	Spray	49	Deliquebec	Spray
6	Yellowcap	Spray	50	Delimarimo	Spray
7	Ilweol	Spray	51	Delithm	Spray
8	Cherryblossom	Spray	52	Lovemine	Spray
9	Forestaroma	Spray	53	Yeosim	Spray
10	Secretpink	Spray	54	Magicstar	Spray
11	OrangeND	Spray	55	Delmonte	Spray
12	PeachND	Spray	56	Moulinrouge	Spray
13	BrightND	Spray	57	SunnyND	Spray
14	PowerND	Spray	58	BounceND	Spray
15	Dreamround	Spray	59	Athos(Sp.)	Spray
16	Firepink	Spray	60	HappyND	Spray
17	GraceND	Spray	61	Boramiorange	Spray
18	Kingfisher	Spray	62	Azma	Spray
19	Yesruby	Spray	63	Sasineyellow	Spray
20	Vogue	Spray	64	Nostar	Spray
21	CutieND	Spray	65	Sasinecream	Spray
22	Merrybell	Spray	66	Caesarcream	Spray
23	Dreamhappy	Spray	67	Seireine	Spray
24	Dreamriver	Spray	68	Seiribbu	Spray
25	Deliacream	Spray	69	Seimyra	Spray
26	Purplecap	Spray	70	Seited	Spray
27	Lollipop	Spray	71	Seiastron	Spray
28	Pinkmam	Spray	72	Seielza	Spray
29	Argus	Spray	73	Sweetbongbong	Spray
30	Purplecone	Spray	74	Leopard	Spray
31	Biarittz P	Spray	75	Sweetsnow	Spray
32	Goldrich	Spray	76	Ford	Spray
33	Monalisa	Spray	77	Sweetsun	Spray
34	Goldenboy	Spray	78	Castelli	Spray
35	Bacardifill	Spray	79	Sweetcandy	Spray
36	Pinkyboy	Spray	80	Artirisingsun	Spray
37	Gloria	Spray	81	Pinky	Spray
38	Vatican	Spray	82	Artipurplelady	Spray
39	Yeonja	Spray	83	Artidarkchocolate	Spray
40	Naos	Spray	84	Yesholic	Spray
41	Sasine	Spray	85	Jazz	Spray
42	Neseteo	Spray	86	Yellowdream	Spray
43	Seifrillgreen	Spray	87	Spybelly	Spray
44	Delibarca	Spray	88	Yellowmarble	Spray

Table 1. Continued.

No.	Variety name	Type classification	No.	Variety name	Type classification
89	Seiagness	Spray	119	Zemblalime	Standard
90	Yellowkid	Spray	120	Armadolis	Pot mum
91	Champy	Spray	121	Aamflu	Pot mum
92	Orangedream	Spray	122	Myruby	Pot mum
93	Zarita	Spray	123	Vino	Pot mum
94	Orangekid	Spray	124	Mygirl	Pot mum
95	Hirario	Spray	125	Pinkeye	Pot mum
96	Zembla	Spray	126	Mysoul	Pot mum
97	Cutiepink	Spray	127	Gayagold	Pot mum
98	Cheeks	Spray	128	Gayaorange	Pot mum
99	Fireyellow	Spray	129	Gayaglory	Pot mum
100	Karisyellow	Spray	130	Gayayellow	Pot mum
101	Pinkycharis	Spray	131	Gayaneon	Pot mum
102	Yellowpangpang	Spray	132	Gayaruby	Pot mum
103	Pinkpangpang	Spray	133	Purpleegg	Pot mum
104	Rubyna	Spray	134	Juliet	Pot mum
105	Hongpa	Spray	135	Peacecutie	Pot mum
106	Hibaeksan	Standard	136	Gayapink	Pot mum
107	Sumi	Standard	137	Mygold	Pot mum
108	Backma	Standard	138	Mysunny	Pot mum
109	Shinma	Standard	139	Myred	Pot mum
110	Geumhwa	Standard	140	Gayasense	Pot mum
111	Boryeonghwangkuk	Standard	141	Mywing	Pot mum
112	GreenND	Standard	142	Mycream	Pot mum
113	Athos(St.)	Standard	143	Candyball	Garden mum
114	Deliakari	Standard	144	Dasomball	Garden mum
115	Whiterunner	Standard	145	Maruball	Garden mum
116	Pingpong	Standard	146	Madangball	Garden mum
117	Seolmi	Standard	147	Geumbangul	Garden mum
118	Ecogreen	Standard			

기서열분석(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystems, USA)를 활용하여 전기영동한 후 GeneMapper (ver. 3.7) 컴퓨터 프로그램(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 SSR 분자표지에 대한 대립유전자의 크기를 분석하였다.

다형성 지수 및 품종간 유전적 유사도 분석

SSR 분자표지의 대립유전자 유무에 따라 ‘1(present)’과 ‘0(absent)’로 코드화한 후 엑셀파일에 품종별 대립유전자형을 크기별로 정리하여 데이터베이스를 구축하였다. SSR 분자표지의 다형성 정도를 조사하기 위하여 Anderson et al. (1993)이 보고한 공식을 이용하여 polymorphism information

contents(PIC) 값을 계산하였다. NTSYSpc(ver. 2.10b) (Rohlf 2000) 컴퓨터 프로그램의 Jaccard 방법에 따라 유전적 유사도 값을 산출하였고, unweighted pair-group method with arithmetical average(UPGMA)(Sneath & Sokal 1973) 방법으로 집괴 분석하여 품종간 유사도를 분석하였다.

결과 및 고찰

SSR 분자표지 데이터베이스 구축

국화 품종간 식별이 되는 분자표지를 선발하기 위하여 SSR primer 587개를 이용하여 ‘Borami(보라미)’ 포함 20품

Fig. 1. Polymorphism of 3 simple sequence repeat markers, SSR-48, SSR-127, SSR-330. The PCR products were separated using a QIAxcel Advanced System (QIAGEN). Lane 1: 'Borami', 2: 'Mujigae', 3: 'Hwiparam', 4: 'Yesmorning', 5: 'Hibaeksan', 6: 'Magic', 7: 'Yellowcap', 8: 'Sumi', 9: 'Ilweol', 10: 'Cherryblossom', 11: 'Forestaroma', 12: 'Secretpink', 13: 'Baekma', 14: 'OrangeND', 15: 'PeachND', 16: 'BrightND', 17: 'PowerND', 18: 'Dreamround', 19: 'Firepink', 20: 'Shinma'. The A, B, C indicate specific allele type.

종을 이용하여 다형성 검정을 수행한 결과 총 587개 중 SSR 48, 127, 330과 같이 다형성을 나타내는 27개의 분자표지를 선발하였다(Fig. 1). 선발된 27개의 분자표지는 12개의 genomic SSR과 575개의 EST-SSR 마커로부터 선발 되었다(Table 2). 국화 genomic DNA에서 개발된 SSR 분자표지의 다형성 비율은 EST-SSR 마커에 비해 높았으나 국화 품종식별을 위해 최종 선발된 27개 SSR 분자표지 중 25개는 EST-SSR 분자표지로 확인되었다. 본 연구에서는 SSR 마커의 선발 비율이 낮게 나타났는데 이는 Capillary 젤 전기영동 분석시 다수의 마커에서 대립유전자가 많이 나타나 복잡한 양상을 나타내었

고 이러한 마커는 선발시 제외되었기 때문인 것으로 생각된다. 선발된 27개의 SSR 분자표지를 이용하여 DNA sequencer 젤 전기영동 분석을 통해 다형성 정도, 피크 패턴, 반복성 등을 조사하여 EST에서 유래된 14개의 SSR 분자표지를 국화 품종별 DNA profile 데이터베이스 구축에 활용할 마커로 최종 선발하였다(Table 3). Leigh et al. (2003)은 EST-SSR 분자표지는 genomic SSR 분자표지에 비해 밴드가 명확하여 정밀도 높은 유전자형 분석에 효과적인 것으로 보고한 바 있는데 본 연구에서도 대립유전자 크기 판독이 용이하였다. 14개 분자표지에 의해 분석된 대립유전자 수는 총 79

Table 2. Simple sequence repeat markers screened for identifying polymorphism of chrysanthemum.

Number of screened markers	Type of SSR markers	Number of polymorphic markers	Polymorphism (%) of amplified SSR markers	SSR marker source
12	Genomic SSR of chrysanthemum	2	2/12	Khaing et al. (2013)
575	EST-SSR of chrysanthemum	25	25/575	Wang et al. (2013)
587		27	27/587 (4.6%)	

Table 3. Characteristics of the 14 simple sequence repeat markers selected for genetic characterization of chrysanthemum varieties.

No.	Marker name	Repeat motif	Annealing temp. (°C)	Forward sequence	Reverse sequence	PCR product size (bp)	No. of alleles	PIC value	Primer labeling
1	SSR 48	(CCA)5	55	TGAGATCATTCCTCAACCTCC	CTAGCGTCCAAAGAATTGGC	206-214	4	0.655	VIC
2	SSR 51	(CCAA)4	55	CCCCCTCTTCTTCTTCAACC	CAATAGAAAGCGCGTGACAA	197-252	8	0.785	NED
3	SSR 52	(ATA)5	55	AGTGACCCGAGCCAGATAGA	CCGACAAATCATTTCCGTCT	233-247	6	0.573	FAM
4	SSR 127	(GGT)5	55	TAACAAGGGGTTTCAGCGTC	TCAGGAAGAACAACCCAACC	262-273	5	0.335	FAM
5	SSR 200	(GGT)5	55	CCCAGAGAAGCGTGAGATTT	TCCCCTGCTACTACCACCAC	129-154	4	0.637	VIC
6	SSR 222	(ATC)5	55	AGCTAAAACAAACAAGCGGC	GCGTTAACTGTGTCGGTTGA	153-185	8	0.756	NED
7	SSR 330	(CAA)5	55	CTGTTGAGCAGTTCAGGCAC	GTGTGATCGAGGCGATTTTT	204-219	6	0.597	FAM
8	SSR 332	(TGG)5	55	ACACCGAATAGGACGGACAG	TTTCTGAAGTCCCGACCAC	227-240	5	0.556	PET
9	SSR 380	(TGA)5	55	ACCAAAGCGAGCTCACAGTT	CCTCCCTCACTCATCTCTGC	190-196	4	0.658	VIC
10	SSR 649	(ACC)7	55	TCTTCCTCACACGCAACAC	AGCTGCCACTCGCTATCACT	247-259	6	0.762	FAM
11	SSR 706	(AG)8	55	CGATCACCATTCTTTTCCCA	CCGATAAGTTCGTCCTTGGT	208-240	7	0.613	PET
12	SSR 728	(ATG)5	55	TGGTTATGGGTGACCCTGAT	AAGAAAGTGCAGGCCAAGAA	145-151	3	0.488	VIC
13	SSR 792	(TGA)6	55	AGGAAGAAGATCGACACCCA	AAGTTCGGGTTTCCCCATAC	126-136	3	0.287	NED
14	SSR 863	(TC)6	55	CACAACCAGACAAGCCTTCA	ACTAACGGCGGTAGCTGAGA	129-181	10	0.678	FAM
Total							79	8.379	
Mean							5.6	0.598	

개였으며, 분자표지당 대립유전자 수는 3 ~ 10개의 분포를 나타내었고, 평균 대립유전자 수는 5.6개였다. Hong et al. (2013b)은 4개의 genomic DNA로부터 유래된 SSR 분자표지를 이용하여 재배국화 85품종을 분석한 결과 대립유전자 수는 11개에서 34개의 분포를 나타내었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 분석된 SSR 분자표지의 평균 대립 유전자 수는 Hong et al. (2013b)의 결과보다는 적게 나타났지만 재배되는 국화의 배수체인 6배체(Anderson, 2007)와 유사한 수치를 나타내었다. 그리고 Jo et al. (2015)은 16개의 EST-SSR 마커로 국화 50품종을 분석한 결과 평균 6.25개의 대립유전자를 가진다고 보고하여 본 결과와 유사한 수치를 나타내었다. 한편 다형성 정도를 나타내는 PIC 값은 0.287 ~ 0.785 범위 분포하였고, 평균 0.598를 나타내었다. Hong et al. (2013b)은 평균 PIC 값이 0.82로 높게 나타났다고 하였으나, Jo et al. (2015)는 PIC 값이 0.1516에서 0.8872의 분포로 평균 0.603을 나타내었다고 하여 본 연구에서 나타난 PIC 값은 Jo et al. (2015)과 유사하게 나타났다. 대립유전자 수와 PIC 값의 차이는 각 연구자마다 활용된 SSR 마커의 종류가 다르고, 공시품종간 유전적 다양성의 차이가 있기 때문에 나타난 결과로 사료된다. 국화는 배수체 작물로 대립유전자가 많아 분자표지 분석 시 마커에 따른 유전자형이 복잡한 양상을 많이 나타내어 유전자형 분석이 어려울 수 있으나, 실제 배수체

작물인 블루베리(Hong et al. 2014a), 딸기(Hong et al. 2014b)에서도 다형성과 재현성이 높고 분석이 용이한 SSR 마커를 이용하여 품종별 DNA Profile 데이터베이스를 구축한 사례가 있다. 배수체 작물의 경우 정밀한 유전자형 분석이 가능하다면 분자표지 기술이 품종식별과 유사품종들에 대한 품종진위 검증 등에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

품종간 유전적 유연관계 분석

국화 DNA profile 데이터베이스의 14개 SSR 분자표지를 이용하여 147개의 국화품종에 대한 유전적 유연관계를 알아보고자 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 공시품종의 유전적 유사도 지수는 0.44 ~ 1.00의 범위에 분포하였고 ‘Borami(보라미)’, ‘Boramiorange(보라미오렌지)’와 ‘Pingpong(핑퐁)’, ‘Whiteruuner(화이트루너)’ 품종을 제외한 143 품종이 본 연구에서 선발된 14개 SSR 분자표지의 유전자형에 따라 식별됨을 확인하였다. ‘Borami(보라미)’와 ‘Boramiorange(보라미오렌지)’ 품종은 유전적 유사도 지수가 100%를 나타냈으며 이들 품종의 육성내역을 조사한 결과 ‘Boramiorange(보라미오렌지)’ 품종은 ‘Borami(보라미)’ 품종에 감마선 처리를 하여 육성한 품종으로 형태적 특성을 조사한 결과 화색

Fig. 2. Cluster dendrogram of the 147 chrysanthemum varieties using 14 simple sequence repeat markers. The numbers is at right side (1-147) refer to the list of varieties in Table 1. The scale at the bottom is jaccard's coefficient of similarity.

의 형질에서만 뚜렷한 구별성을 보이는 것으로 보고된 바 있다(Choi et al. 2014). 또한 유전적 유사도 지수가 100%인 ‘Whiterunner(화이트런너)’와 ‘Pingpong(핑퐁)’ 품종의 육성 내역을 알아본 결과 ‘Whiterunner(화이트런너)’ 품종은 ‘Pingpong(핑퐁)’ 품종을 재배 중 꽃이 크고 백색인 우수 변이종을 발견하여 육성된 품종으로 확인되었다. 국화의 경우 신품종을 육성 시 돌연변이 육종방법 중 하나인 방사선 육종법을 유용하게 이용하고 있는데 국화는 다른 종에 비해 화색의 변이 폭이 넓고, 화형, 초장 등의 변이를 관찰할 수 있어 감마선이나 이온빔 등을 이용하여 다양한 형태를 보이는 신품종 육성이 활발히 진행된다고 보고된 바 있다(Park & Song 2005). Shirao et al. (2013)는 국화의 품종 육성 시 변이에 의해 육성된 품종의 경우 SSR 분자표지로 분석하였을 때 대조품종과 같은 밴드 패턴이 나타날 수 있음을 보고하였고 Wolff & Peters-Van Rijn (1993)는 RAPD 마커로 국화 품종을 분석시 돌연변이로 육성된 품종은 분자표지로 구분되지 않았는데 그 원인으로 형태적 변이가 나타난 부분이 국화 유전체에서 극히 작은 영역이기 때문인 것으로 보고한 바 있다. 향후 분자표지로 구분되지 않은 품종들에 대해서는 NGS 분석을 통해 품종간 염기서열의 변이를 발견함으로써 이를 구분할 수 있는 마커를 추가 개발해야 할 것으로 사료된다.

국화 147품종에 대한 dendrogram을 작성한 결과 본 연구에서 분석된 국화 품종들은 국화 계통인 스탠다드, 스프레이, 화단, 포트 국화 별로 그룹화 되지 않았다. 카네이션의 경우에도 스탠다드와 스프레이 계통 총 41품종에 대하여 13개 SSR 마커를 이용하여 유연관계를 분석한 결과 스탠다드와 스프레이가 계통에 따라 분류하지 않음을 보고한 바 있다(Kimura et al. 2009). 이는 Zhang et al. (2014)에 의해 보고되었듯이 국화의 경우 재배되고 있는 대부분의 품종이 다양한 종간의 교잡으로부터 오랜 기간 육성되었기 때문에 유전적으로 매우 이형접합(heterozygous) 하므로 형태적으로 분류된 계통과 불일치 된 것으로 추정된다. 그러나 품종간 유사도 지수가 0.93이상으로 높게 나타난 품종들은 동일한 계통에 속하는 품종들이며, ‘Gayagold(가야골드)’와 ‘Gayaorange(가야오렌지)’ 두 품종은 스프레이 국화로서 형태적 특성이 매우 유사한 품종으로 확인되었는데 두 품종은 ‘SSR 51’ 분자표지로 구분이 되었다. 따라서 향후 분자표지의 개수를 추가하여 분석하거나 형태적 특성과의 상관관계를 알아본다면 계통별로 그룹화되지 않은 점을 해석할 수 있을 것으로 사료된다.

UPOV의 분자표지에 관한 실무기술위원회인 분자생물학

및 생화학 실무작업반회의(BMT, Working Group on Biochemical and Molecular Techniques, and DNA-Profiling in Particular) 회의에서는 최근 분자표지 이용에 관한 technical guidelines protocol(TGP) 15 문서를 제정함으로써 품종보호 재배심사에 분자표지의 활용 의지를 보다 더 적극적으로 표명하고 있다(UPOV 2013). BMT 회의에 보고된 국화의 품종식별 연구결과로서 영국에서는 inter-simple sequence repeat(ISSR)와 inverse sequence-tagged repeat(ISTR)의 분자표지를 이용하여 유사한 형태적 특성을 보이는 국화 39품종의 식별에 활용한 사례를 보고한 바 있다(UPOV 2000). 품종보호 출원품종수가 상대적으로 많은 화훼작물의 경우 기존품종의 관리와 유사품종을 선정하는데 많은 품종에 대한 정보를 조사해야 하므로 분자표지를 대조품종 선정 시에 활용한다면 심사의 정밀도를 제고할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구로부터 얻어진 국화 품종별 DNA profile 데이터베이스를 기반으로 향후 실험실간 분자표지의 교차분석을 통하여 표준화된 데이터베이스를 구축한다면 품종보호권 침해 및 종자분쟁 발생시 분자표지의 실용화가 가능할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 국내에서 유통되고 있는 국화 147품종을 수집하여 국화 품종의 식별을 위한 SSR 분자표지의 선발 및 이를 이용한 품종별 DNA profile 데이터베이스를 구축하기 위해 수행하였다. 품종식별에 적합한 분자표지를 선정하기 위해 20개 품종을 대상으로 총 587개의 SSR 분자표지를 검정하여 다형성을 나타내는 27개의 분자표지를 선발하였다. 27개의 분자표지 중 다형성, 재현성, 반복성, 대립유전자 패턴 등을 종합적으로 고려하여 14개의 SSR 분자표지를 데이터베이스 구축에 활용할 마커로 최종 선발하였고 이를 이용하여 국화 147품종에 대한 SSR 분자표지 데이터베이스를 구축하였다. 국화 147 품종을 14개의 SSR 분자표지로 분석한 결과 대립유전자 수는 79개, 마커별 대립유전자의 분포는 3~10개로 분포하였고, 분자표지 당 평균 대립유전자의 수는 5.6개로 나타났다. PIC 값은 0.287~0.785 범위에 분포하였으며, 평균값은 0.598로 분석되었다. 국화 147품종에 대한 덴드로그램을 작성하였을 때 공시품종의 유전적 거리는 0.44~1.00 범위로 나타났으며, 147품종 중 143품종은 14개 SSR 분자표지에 의해 식별이 되었으나, 돌연변이 육종법 또는 자연변이를 통해 육성된 2품종은 원품종과 구분이 되지 않았다. 본 연

구에 의해 구축된 국화 품종별 SSR 분자표지 데이터베이스는 국화 출원품종의 대조품종 선정과 품종보호권 침해 및 종자분쟁 발생시 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 생명산업기술개발사업 “작물별 형태적 특성 및 DNA 검정에 의한 품종특성의 국가표준 DB 구축”(과제번호: 313043-3)의 지원을 받아 연구되었음.

REFERENCES

1. Anderson JA, Churchill GA, Autrigue JE, Tanksley SD. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.
2. Anderson NO. 2007. Chapter 14. Chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflora* Tzvelv). In: Anderson NO (ed.), *Flower breeding and genetics*. Springer, Amsterdam, The Netherlands, pp.389-437.
3. Choi HG, Pak HS, Son KS, Kim DC, Jeon NB, Jo MH, Choi JJ. 2014. A new spray chrysanthemum cultivar ‘Borami Orange’ with single type and orange color by gamma-ray irradiation. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 32: 190(Abstr.).
4. Helan Q, Jie Y, Junping G. 2002. RAPD analysis of 18 chrysanthemum cultivars. *Acta Horticulturae Sinica* 29: 488-490.
5. Hong JH, Kwon YS, Choi KJ, Mishra RK, Kim DH. 2013a. Identification of lettuce germplasms and commercial cultivars using SSR markers developed from EST. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 31: 772-781.
6. Hong JH, Kwon YS, Kim Y, Kim EJ, Soh EH, Choi KJ. 2014a. Construction of SSR profile database for variety identification of blueberry in Korea. *Korean J. Breed. Sci.* 46: 58-65.
7. Hong JH, Choi KJ, Kwon YS. 2014b. Construction of DNA profile data base of strawberry cultivars using microsatellite markers. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 32: 853-863.
8. Hong WJ, Khaing AA, Park YJ. 2013b. Cultivar identification of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) using SSR markers. *Korean J. Intl. Agri.* 25: 385-394.
9. Jie H, Nan H, Yu-ge L, Fu-de S. 2007. Genetic diversity of chrysanthemum cultivars revealed by AFLP analysis. *Acta Horticulturae Sinica* 34: 1041-1046.
10. Jo KM, Jo YH, Chu HS, Lian S, Cho WK. 2015. Development of EST-derived SSR markers using next-generation sequencing to reveal the genetic diversity of 50 chrysanthemum cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology* 60: 37-45.
11. Khaing AA, Moe KT, Hong WJ, Park CS, Yeon KH, Park HS, Kim DC, Choi BJ, Jung JY, Chae SC, Lee KM, Park YJ. 2013. Phylogenetic relationships of chrysanthemums in Korea based on novel SSR markers. *Genet. Mol. Res.* 12: 5335-5347.
12. Kimura T, Yagi M, Nishitani C, Onozaki T, Ban Y, Yamamoto T. 2009. Development of SSR markers in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78: 115-123.
13. Kwon YS, Hong JH, Choi KJ. 2013. Construction of a microsatellite marker database of commercial pepper cultivars. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 31: 580-589.
14. Kwon YS, Hong JH. 2014. Use of microsatellite markers to identify commercial melon cultivars and for hybrid seed purity testing. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 32: 525-534.
15. Leigh F, Lea V, Law J, Wolters P, Powell W, Donini P. 2003. Assessment of EST- and genomic microsatellite markers for variety identification and genetic diversity studies in wheat. *Euphytica* 133: 359-366.
16. Park IS, Song HS. 2005. Current trends of mutation breeding by radiation technology at domestic and foreign ornamentals. *J. Kor. Flower Res. Soc.* 13: 184-200.
17. Rohlf FJ. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
18. Shirao T, Ueno K, Abe T, Matsuyama T. 2013. Development of DNA markers for identifying chrysanthemum cultivars generated by ion-beam irradiation. *Mol. Breed.* 31: 729-735.
19. Sneath PHA, Sokal RR. 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco.
20. UPOV. 2000. BMT/6/2 Most similar variety comparisons in chrysanthemums. Geneva, Switzerland.
21. UPOV. 2010. INF/17/1 Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (“BMT Guidelines”). Geneva, Switzerland.

22. UPOV. 2013. TGP/15/1 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS), Geneva, Switzerland.
23. Wang H, Jiang J, Chen S, Qi X, Peng H, Li P, Song A, Guan Z, Fang W, Liao Y, Chen F. 2013. Next-generation sequencing of the *chrysanthemum nankingense* (Asteraceae) transcriptome permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. PLoS One 8: e62293.
24. Wolff K, Peters-Van Rijn J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. Heredity. 71: 335-341.
25. Zhang Y, Dai S, Hong Y, Song X. 2014. Application of genomic SSR locus polymorphisms on the identification and classification of chrysanthemum cultivars in china. PLoS One 9: e104856.