



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

SSR 마커를 이용한
차나무 품종의 판별

제주대학교 대학원

원예학과

김주영

2021년 2월

SSR 마커를 이용한 차나무 품종의 판별


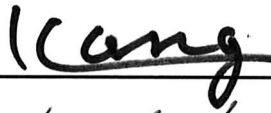

지도교수 송 관 정

김 주 영

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함.

2020년 11월

김주영의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	조 영 열 교수님	
위 원	강 훈 교수님	
위 원	송 관 정 교수님	

제주대학교 대학원

2020년 11월

Identification of Tea Plant Cultivars Using SSR Markers

Ju-Young Kim

(Supervised by Professor Kwan Jeong Song)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of
Science in Agriculture

2020.11.

This thesis has been examined and approved.

Department of Horticultural Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

목 차.....	i
LIST OF Tables.....	ii
LIST OF Figures.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I. 서언.....	1
II. 재료 및 방법.....	3
1. 식물재료.....	3
2. Genomic DNA 추출.....	6
3. SSR primer 선발.....	6
4. PCR 증폭 및 SSR 다형성 분석.....	12
5. 유전적 데이터 분석	12
III. 결과 및 고찰.....	13
1. 차나무 품종에서 SSR 마커의 다형성 분석.....	13
2. SSR 마커를 이용한 품종의 유연관계 분석.....	19
3. SSR 마커를 이용한 품종의 판별.....	22
IV. 초록.....	24
인용문헌.....	25

LIST OF TABLES

Table 1. Parentage and origin of tea plant cultivars used in the study.	4
Table 2. General SSR primers with polymorphism between "Fushun" and "Kemsull" selected from open source.	7
Table 3. RNA-seq based SSR primers with polymorphism between "Fushun" and "Kemsull" selected by Yali (2017).	9
Table 4. Characteristic of 23 polymorphic SSR primers in the tea plant including major allele frequency, number of alleles, gene diversity and polymorphic information.	17

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Comparison of leaf shape and color at the early developmental stage.	5
Fig. 2. Selection of SSR primers representing polymorphism.	15
Fig. 3. Dendrogram of 17 tea plant cultivars based on genetic distance analyzed by PowerMarker V 3.25.	21
Fig. 4. Algorithm for identification of tea plant cultivars using minimum SSR markers.	23

ABSTRACT

This study was conducted to establish the efficient cultivar discrimination systems for tea plants using SSR markers and to use them as the basic data for cross-breeding based on the genetic relationship between cultivars. PCR was performed using 45 SSR primers with polymorphisms reported in tea plants for a total of 17 cultivars, including 10 domestic cultivars, 6 Japanese cultivars, and 1 Assam cultivar. Among 45 SSR primers, 23 showed distinct amplification and clear polymorphism, and the number of alleles was 2~3, with an average of 2.5. The diversity of genes analyzed by PowerMarker V 3.25 is 0.06 to 0.66, an average of 0.40 and a genetic distance of 0.11 to 0.59, and a PIC value of 0.056 to 0.584, an average of 0.339, which shows an intermediate level of polymorphism. As a result of analyzing the genetic relationship with MEGA V 5.05, the cultivars of tea plants were divided into three groups. Group I included some domestic and Japanese cultivars, and there was a high genetic association between Korean and Japanese cultivars. Group II included domestic cultivars showing red color in the leaves and Ai 37. Group III consisted only of cultivars grown in Jeju and these have different origins from other domestic cultivars which were known to have similar origins. Of the 23 selected from 45 SSR primers, by using only 4 such as TM 068, MSG 0206, MSG 0699, and KF 0643, all 17 cultivars of tea plants can be identified. This study shows that these SSR primers can be effectively used to identify cultivars of various tea plants.

I. 서 언

차나무[*Camellia sinensis* (L.) O. kuntze]는 차나무과에 속하는 다년생 상록수로서(Tan et al., 2013) 중국 운남 귀주 및 사천 고원으로부터 기원되어(Niu et al., 2019) 중국, 인도, 스리랑카, 한국, 일본, 케냐 등 아시아 및 아프리카 중서부 국가에서 주로 재배되고 있는 작물이다.

차 산업은 지난 수십 년 동안 급속하게 성장하여 세계적으로 소비와 재배가 급격히 증가하고 있는데, 2018년에는 634만 톤이 생산되었다(FAO, 2020).

차나무 재배에 적합한 기온은 14-16℃이고 적절한 강수량을 필요로 하기 때문에 우리나라에서는 하동, 보성, 제주 등 온화하고 강우가 충분한 남부지방에서 차나무가 주로 재배되고 있다. 국내 2015년 차의 재배면적은 2,768ha, 생산량은 3,618톤을 보였으나, 2019년 재배면적은 2,845ha, 생산량은 4,758톤에 이르고 있다(MAFRA, 2020). 우리나라 차나무는 대부분 재래종 실생으로 구성되어 왔으나 제주도를 중심으로 한 평지화 다원에서는 일본 품종이 많이 재배되고 있다. 하지만 최근 국내 육성 품종이 많이 개발되고 있고 국내 차의 생산량과 재배면적이 점차 증가하고 있어 국내육성 품종의 보급도 향후 증가할 전망이다.

한국의 차산업은 주로 녹차 중심으로 발전하여 왔다. 그러나 최근 국내 홍차의 수입과 소비가 증가하고 있는 반면, 녹차의 소비는 점차 감소하는 경향을 보이고 있다(Yoo, 2013; Choi et al., 2019). 그러므로 국내 차산업의 지속적인 발전을 위해서는 다양한 품종개발을 통한 소재 및 차의 다양화가 시급한 실정이다. 차나무 품종의 개발은 주로 지자체 연구기관에서 수행되어 왔으며, 2020년 현재 출원된 차나무 품종은 상목, 금설 등 16여 개에 이르고 있다(KSV, 2020). 그러나 아직까지도 이들 신품종의 보급은 미미하고, 대부분 재래종 실생 및 일본 품종의 재배에 의존하고 있는 실정이다.

차나무의 육종에 있어서 유전적 유연관계 및 품종의 체계적인 구별은 중요한 사항이다. 품종 판별은 국가 간 품종의 구별 및 육종가의 권리 보호(Kim et al., 2006)는 물론 품종 간 교배조

합의 작성 및 교배조합 품종의 정확성 확인 등 신품종을 개발하기 위한 중요한 요소이다. 품종을 구별하기 위해서 대부분 품종 고유의 특징적인 형태적 형질을 비교하고 평가한 후 품종을 구분하여 왔다(Moon et al., 2003; Kwon et al., 2005; Bang et al., 2011). 그러나 과실이나 꽃 등 생식기관을 이용하는 과수 및 화훼작물과는 달리 차나무는 신초와 잎 등의 영양기관을 주로 이용하는 작물로 품종 간의 형태적 구분이 쉽지 않다.

DNA 분자 마커는 식물의 유전적 변이, 다양성 및 계통을 구분하는데 유용한 방법이다(Ni et al., 2008; Ma et al., 2010). DNA 마커의 종류에는 AFLP(Amplified fragment length polymorphism), RFLP(Restriction fragment length polymorphism), RAPD(Randomly amplified polymorphism DNA) 및 SSR(Simple sequence repeat) 등이 있으며, 다양한 분자 마커들을 통한 유전적 다양성의 분석, 유전자 지도 작성, 계통 선발 및 품종판별 등 유전 및 육종 연구에서 활발히 사용되고 있다(Bernet et al., 2003; Cho et al., 2010; Hong et al., 2013). 여러 분자 마커들 중 microsatellite라고도 불리는 SSR 마커는 다형성이 높고 공우성이며(He et al., 2003) 재현성 및 유전형 분석에 용이한 마커로 알려져 있다(Goldstein and Schlotterer, 1999; Cai et al., 2019). 특히 PCR을 기반으로 단순하게 분석이 가능하기 때문에 키위(Zhen et al., 2004), 딸기(Honjo et al., 2011), 사과(Ban et al., 2014), 감귤(Woo et al., 2020) 등 다양한 작물에서 품종판별을 위한 연구에 활용되고 있다. 하지만 현재 국내 차에 대하여 SSR 마커를 이용한 품종판별 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구는 차나무에 대해 SSR 마커를 이용한 효율적인 품종 판별 체계를 확립하고 품종 간 유전적 관계를 구명하여 교배육종의 기초자료로 활용하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

국립종자원에 품종보호출원 및 등록되어 있는 국내 육성 차나무[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 17개 품종 중에서 제주지역에서 보유하고 있는 10개 품종과 제주대학교 부설연구실 습센터 포장에 보유하고 있는 일본 품종 6개 및 아쌈 대엽 계통의 1개 품종을 본 연구에 이용하였다(Table 1, Fig. 1). 국내 육성 품종은 중국 소엽 계통(*C. sinensis* var. *sinensis*)으로 국립식량과학원 목포시험장에서 육성된 상목(Sangmok), 중모(Jungmo) 및 화덕(Hwadeok)의 3 품종, 제주특별자치도 농업기술원에서 육성된 금설(Kemsull)과 비취설(Beachwisull)의 2품종 및 전라남도 농업기술원에서 육성된 금녹(Kumnok), 명녹(Myeongnok), 보향(Bohyang), 상녹(Sangnok) 및 참녹(Chamnok)의 5품종이다. 금설과 비취설은 제주특별자치도 농업기술원 농산물원종장(제주시 애월읍 봉성리 위치)의, 나머지 국내 육성 품종들은 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소(제주시 오등동)의 유전자원포장에 재식되어 있다. 일본 품종은 중국 소엽 계통(*C. sinensis* var. *sinensis*)의 베니후끼(Benifuki), 사에미도리(Saemidori), 야부끼타(Yabukita), 오꾸미도리(Okumidori), 유타까미도리(Yutakamidori) 및 후순(Fushun) 6품종이며, 아쌈 대엽 계통(*C. sinensis* var. *assamica*)은 Ai 37의 1품종이다.

Table 1. Parentage and origin of tea plant cultivars used in the study.

Pollen genotype	Parentage	Origin (breeding organization)
Ai 37	An assamica variety	India
Beachwisull	Individual selection from natural population of Korean landrace	Korea (JSSGPARES) ^a
Benifuki	Benihomare x MakuraCd86	Japan (IFTTS, Makurazaki) ^b
Bohyang	Selection, from Korean local variety	Korea (JARES) ^c
Chamnok	Selection, from Korean local variety	Korea (JARES)
Fushun	Z-1 x Kanayamidori	Japan (IFTTS, Kanaya) ^d
Hwadeok	Selection, from Korean local variety	Korea (NICS) ^e
Jungmo	Selection, from Korean local variety	Korea (NICS)
Keumsull	Selection, from Korean local variety	Korea (JSSGPARES)
Kumnok	Selection, from Korean local variety	Korea (JARES)
Myeongnok	Selection, from Korean local variety	Korea (JARES)
Okumidori	Yabukita x Shizuzai16	Japan (IFTTS, Kanaya)
Saemidori	Yabukita x Asatsuyu	Japan (IFTTS, Makurazaki)
Sangnok	Selection, from Korean local variety	Korea (JARES)
Sangmok	Selection, from Korean local variety	Korea (NICS)
Yabukita	Selection, from Japanese local variety	Japan (IFTTS, Shizuoka) ^f
Yutakamidori	Progeny of Asatsuyu	Japan (IFTTS, Makurazaki)

Notes : a, Jeju special self-governing province agricultural research & extension services; b, Institute of fruit tree and tea science of Makurazaki; c, Jellanamdo agricultural research & extension services; d, Institute of fruit tree and tea science of Kanaya; e, National institute of crop science, Rural development administration; f, Institute of fruit tree and tea science of Shizuoka.



Fig. 1. Comparison of leaf shape and color at the early developmental stage.

2. Genomic DNA 추출

DNA 추출은 CTAB 방법(Doyle et al., 1990; Lodhi et al., 1994, Chang et al., 2017)에 따라서 수행하였다. 차나무 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]의 연한 새순에서 잎을 채취하고 액체질소를 첨가하여 분쇄하였다. CTAB isolation solution (98% 2x CTAB + 2% β -mercaptoethanol, v/v)을 분말에 첨가하고 1시간 동안 65°C에서 가열한 후 5분 동안 4°C에서 냉각시켰다. 냉각시킨 시료에 phenol: chloroform: isoamylol (25: 24: 1)을 CTAB isolation solution과 동일한 양을 섞어주고 원심분리기(VS-15000 CFN II, Vision scientific Co., Ltd, Korea)를 15분 동안 13,000rpm에서 작동시킨 후 상정액을 새로운 튜브에 옮겨주었다. 상정액과 같은 양의 phenol: chloroform: isoamylol (25: 24: 1)을 다시 섞고 15분 동안 13,000rpm에서 원심분리시킨 후 상정액을 다시 새 튜브로 옮겼으며, 다시 동일한 양의 isopropyl alcohol과 섞어 같은 조건에서 원심분리한 다음 침전된 DNA pellet 이외의 모든 용액을 제거하였다. 침전시킨 genomic DNA는 70% ethanol과 100% ethanol로 차례로 세척한 후 TE buffer와 1 μ L의 RNase를 첨가하여 30분 동안 37°C에서 가열하여 DNA를 현탁시켰다. 이들 추출된 genomic DNA는 분광광도계(UV-1650PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 농도를 측정 후 1 μ L당 10ng의 농도로 정량한 다음 -80°C에서 보관하였다.

3. SSR primer 선발

SSR primer는 TM, MSE, MSG, KF의 총 4종류를 사용하였다. TM, MSE 및 MSG의 SSR primer는 외국에서 보고된(Ma et al, 2010; Taniguch et al., 2012) 60개 중 후순과 금설에서 다형성을 보여 선발된(Chang et al., 2017) SSR primer 15개를 선발하여 사용하였다(Table 2). KF SSR primer는 후순과 금설의 잎과 꽃에서 mRNA를 추출하여 cDNA library를 제작한 후 각각의 염기서열을 분석하고 탐색된 SSR primer 296개 중에서 후순, 금설 및 F1 계통에 대하여 다형성을 보여 선발되었던 SSR primer 30개를 사용하였다(Chang et al., 2017), (Table 3).

Table 2. General SSR primers selected from open source with polymorphism between "Fushun" and "Kemsull".

Marker	F/R	Primer sequence (5' →3')	Expected motif	T _m (°C)	Reference
TM 068	F	CTT CGT CCT CCT CTT TG	CTCAAT(5)	62.9	Ma et al. (2010)
	R	TCA CAT CAT CAG CCT TGG GT			
TM 103	F	GTC CCC ATT GCT CTT AGT TT	TATGTG(4)	58.9	
	R	ATC ATT GAC CAC ATC AT			
MSE 0159	F	AAA TCT TGA TCG CAA TCT TGC TCC	TC(20), TG(5)	54.0	Taniguchi et al. (2012)
	R	CAA ATT GAT TTC TCA CAT AGG GCC A			
MSE 0316	F	GGA AAG AGG GAA CCA CCA AAG AAT	TC(14)	63.2	
	R	CCA TTC AGA TAG CCA AAC AAA GCC			
MSG 0206	F	ATG AGA AGG TCA TCC ACC ATG AAA	AG(8), AG(10), AG(3), AG(19), TAT(3)	63.2	
	R	GTT TAA AAA TCC ACA TCC CCT CGT TCC			
MSG 0232	F	ATT TCG ATC TCC CAG ACG TGA ACT	TC(3), TC(3), TC(3), TC(3), TC(24)	64.0	
	R	GTT TAC AGA ACT AGA AGC ACC AAAC CGC			
MSG 0233	F	ATT TCT CCT CCA GAT ACG ACG GCT	AGG(3), AG(27), AGG(3), GCA(3)	62.9	
	R	GTT TAT GGG CTC TGA CAG TAT GGG			
MSG 0240	F	ACG CGA TTT CTT GAA CTA GCT CTC	CT(3), TC(26), TC(5)	62.1	
	R	GTT TCG ATC GCA AAC ATA AAC ATC CTTG			
MSG 0255	F	ACC CTT GTC TAT TCT CCA TCG CTC	TC(21), AC(3), AC(3), AC(5)	62.9	
	R	GTT TCT AGG GTT TGC GTT GAG ACC TTC			
MSG 0258	F	ACT CAT CAC CAT GCC TTC TCC ATC	TC(25), TA(4), TA(3)	69.5	
	R	GTT TAG CTC AAC TGG TGG AAC CTC AAC T			

Table 2. Continued.

MSG 0327	F	ACG TTC AAA ACC GTA ATT TGG TCC	TC(18), TC(3), CGT(3), TC(3)	62.0
	R	GTT TGC CAC AGT TGC AAT CAA GTG GTAG		
MSG 0403	F	ATG ATC GCC GGT TTA GAG ATG AAT	TC(25)	54.7
	R	GTT TAA GCT GGC TAA CCT ACA CGG AGC		
MSG 0473	F	ATG ATG TTG ATG GAT TGG TGT GGA	AG(3), AG(20)	64.0
	R	GTT TAT GTG CGG GAC TTT GTG TTT TTG		
MSG 0699	F	ATG CGA CAG TGT TGC TGA GAT TTT	AG(18)	63.0
	R	GTT TCA AAA ATG GGG TGT CTA CAG AGG G		
MSG 0811	F	ACA CCA CAC CAC ACC ACA CTT TCT	TC(15)	66.1
	R	GTT TGG TCT GAA GCT CCA AAG TGA A		

Table 3. RNA-seq based SSR primers selected with polymorphism between "Fushun" and "Kemsull" (Chang et al., 2017).

Marker	F/R	Primer sequence (5' →3')	SSR unit type	Band size
KF 0007	F	TTT CAC CAG GAC GAA TGC ACT A	ACAATA(2)	194
	R	CAC AGA ATG CAG TGC TAT GAA A		
KF 0036	F	TAT AAA CCA CCT CGC GAG ACT C	TCA(8)	362
	R	GGG GCT GGT GTT CTT CAT AGA A		
KF 0043	F	TTT GCT CTG CAT TTT GCT GC	ATCAAA(6)	260
	R	ATG CTG CTT GAG AGA CCA TGA A		
KF 0097	F	CCT CCT ACA CAG CAT CAC CAT T	CACCGC(2)	206
	R	TAA TCT CAC TCC TTT CGG TGG C		
KF 0112	F	GTA GAA ATC GCC GAA ATC ACC G	ACCCGG(2)	212
	R	AAC TCT TTG CTC CAG CTC ATC A		
KF 0120	F	TGG GGC GTT GAA CAA TCA TCT A	TTGATG(2)	194
	R	CCT GCC TGA ATC ACA AAA CCA G		
KF 0141	F	GCA TGA AGA GCT CGC CTT TAA G	AAG(7)	208
	R	ACC TTC CAT GGC ATT CGA ATC T		
KF 0147	F	CCT TGG CTA CAA AGA GCA GAG A	CAACAG(2)	387
	R	GAC CTT GCT AAA GTT GGT GCA G		
KF 0234	F	CAC TCT CTC TCA CAG AAA CCC C	TACGAC(3)	273
	R	AGG GAT GAC CAA ACA GGA TTC C		
KF 0265	F	GTG TTC TTC AGT GAT CCC GAG T	GGT(6)	373
	R	TCT GGT TTC GCA TCT TGC TAG T		

Table 3. Continued.

KF 0271	F	TGC AAG AGC CTT CAT ACT GCT A	GCAG(4)	344
	R	GCC GCA TGC TGT TAA AAG CTA A		
KF 0288	F	TCA TGG GTC ATT CAT CGT TGG T	AACCCCT(2)	361
	R	TGG AAT TCA AAG TGA GCT CCG A		
KF 0305	F	AGA CAA AGC TAT GAC CCT GGT T	TGAGT(3)	260
	R	CTC CAG AAA ACC CAT CCA CAG A		
KF 0340	F	CAA AGT GGA ATG CAC CGA TTG T	TATTAC(3)	207
	R	ATT GGC TTT CAA TCC AGC TAT GG		
KF 0365	F	GTG ACT CCG TAG ATG GTG ATC C	TGATGT(8)	420
	R	CTT GGC CCT CTA CAT CCC TTT T		
KF 0382	F	AGC TCA AGG ATT GGT TTC CGA T	TTTCT(5)	388
	R	CAC CCA GAG AGT GCA GTA AAG T		
KF 0416	F	AGC AAA GAG TCA GCT GGA TCA A	AATCCCCT(4)	261
	R	AGA GAG ACA GAG AGA TGG GCA A		
KF 0434	F	GGA AAT TCT GTT GTT GAC CGC A	CCCTAA(4)	344
	R	ACC AGC TGA GGA TGT TGA GAA G		
KF 0453	F	TTC CCA CCA CCA TAC TCT TTC G	TGCCCT(4)	187
	R	CTG AGG AGA CCC AAA CTG TAG G		
KF 0468	F	CTA AAT CGG CTT CGT CGT TGT C	ATCAGA(4)	315
	R	TCT TAC TGT TCT TCG GTT CCG G		
KF 0512	F	TGC ACC TCC AAA CCC AAT TAC T	GGAGGT(2)	436
	R	CCT CCC CAA GCT CAT ACT TGT T		

Table 3. Continued.

KF 0536	F	ACA GTC AAG CCT CCA TTC CTT T	ATC(11)	249
	R	GTT AGG GGG TTT GGA ATC GCT A		
KF 0545	F	CTC TGT TCT TCG ATC CAC ACC A	TCTCG(5)	203
	R	CGA AGA ACC AAG AAG CTC GTT C		
KF 0595	F	TTG TTC CTC TTC AAC CCC AAC A	AATCCG(3)	179
	R	AAC TGA ACT GGA GAT TCG GCA T		
KF 0607	F	TGA ACA ACG GCA GTA CTC ATC A	TCC(7)	166
	R	CAT AAG GCG GCC TTT TGA TTG G		
KF 0643	F	CCA TTG TTG TCA GCA GCA TCA A	AACCCCT(5)	338
	R	TTC AAG CCG CAA AGG CAA TTA A		
KF 0685	F	ATC CTG CTG TGT GTG TCA GAT T	AGGCGG(3)	224
	R	GTG CTT CGT CTT GTT GCT TTC T		
KF 0696	F	TGG TAC ACC AAT CCA GGA ACA G	CTG(5)	267
	R	AAC ATG TTA CAC TGC TGG GCT A		
KF 0799	F	TCA AGT TTT GCC TGC GAA TGA G	TTCCCA(5)	442
	R	ATA ATG GGG AGA AGG GGG AGA A		
KF 0810	F	GCA ACA CGC TTA GGG TTT GAT T	AGAGA(4)	257
	R	AAG TTG AGT AGA GGG CTT CTG C		

4. PCR 증폭 및 SSR 다형성 분석

PCR 반응액 조성은 10× PCR Buffer 2μL, 10mM dNTPs 2μL, 10pmol primer 1μL, 10ng Template DNA 1μL, 0.5 U Taq plus DNA polymerase 0.2μL (Dongsheng Biotecj, Guangzhou, China)에 DW 13.8μL를 첨가하여 최종 반응액을 20μL로 조성하여 사용하였다. PCR 증폭은 T100™ Thermal cycler(BioRad, CA, USA)와 96 Well Thermal Cycler(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 사용하여 94℃에서 5분 동안 Pre-denaturation를 수행하고 94℃에서 10분 denaturation, 55℃에서 1분 annealing, 72℃에서 30분 extension을 35회 반복한 후 72℃에서 10분 동안 최종 extension을 수행하였다. 차나무의 다형성 분석을 위하여 증폭한 산물은 전기영동장치 (MGU-602T, CBS Scientific, Del Mar, CA, USA)를 이용하여 전기영동을 수행한 후 gel documentation system (Azyre Biosystems, Dublin, CA, USA)을 이용하여 육안으로 마커들의 위치와 증폭의 형태를 확인하였다.

5. 유전적 데이터 분석

각 마커에 대한 대립 유전자 빈도(major allele frequency, M_{AF}), 대립 유전자 수(number of alleles, N_A), 유전적 다양성(gene diversity, GD), 이형접합성(Heterozygosity, H_0), 다형성 지수(polymorphic information content, PIC) 및 유전적 거리를 PowerMarker V 3.25을 사용하여 분석하였다(Liu and Muse, 2005). UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean) 분지도는 MEGA V 5.05(Arizona State University, Tempe, AZ, USA)를 이용하여 작성하였다(Tamura et al., 2011).

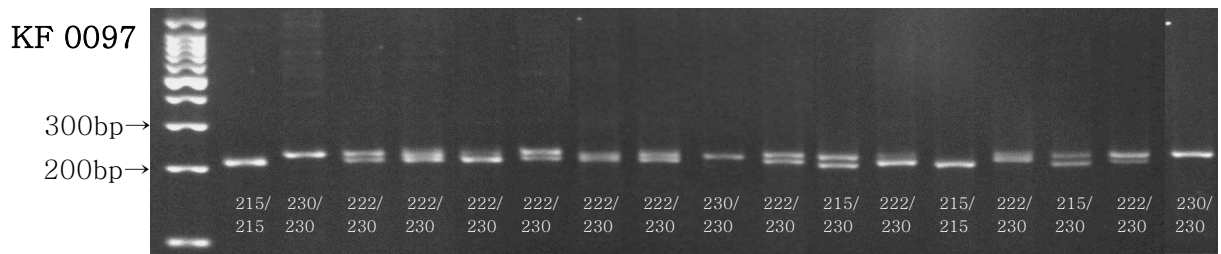
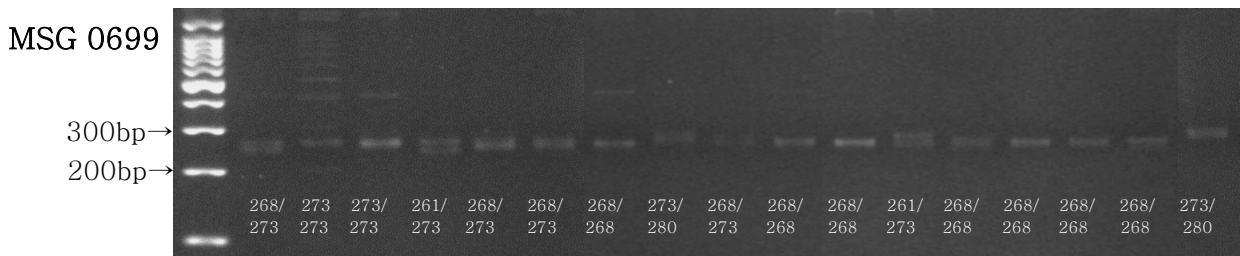
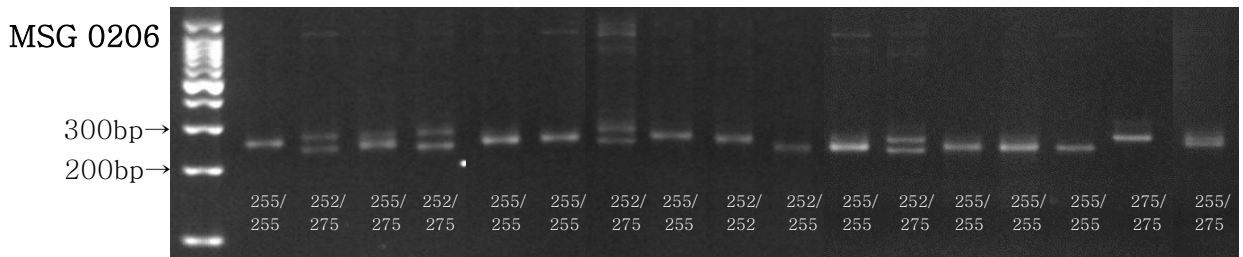
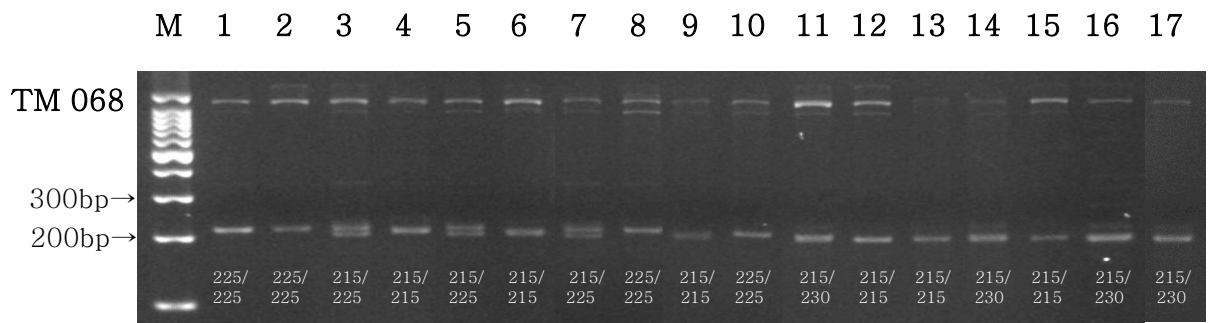
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 차나무 품종에서 SSR 마커의 다형성 분석

차나무 품종의 판별에 적합한 SSR 마커를 선별하기 위해서 국립종자원에 품종보호등록이 되어 있는 차나무 17개 품종에 대해 SSR primer를 적용하여 다형성을 분석하였다. 총 45개의 SSR primer 중 23개에서 뚜렷하게 증폭되고 분명한 다형성을 나타내었다(Fig. 2). 이들 23개 SSR primer를 사용하여 대립 유전자 빈도, 대립 유전자 수, 유전적 다양성, 이형접합성 및 다형성 지수에 대해 PowerMarker V 3.25를 이용하여 분석한 결과는 Table 4와 같다. 대립 유전자 수는 2~4개로 총 58개가 확인되었고 마커 당 평균 대립 유전자 수는 2.5개로 나타났다. 유전자 다양성은 0.06~0.66으로 평균 0.40이며, 이형접합성은 평균 0.28으로 조사되었다. PIC는 유전자좌에서 마커를 이용하여 품종의 판별을 비교하여 추정하는데 사용되는 대립유전자의 다양성 척도로써(UPOV, 2007), PIC 값은 품종 판별에 사용된 마커가 연관분석을 통하여 얼마나 유용한지를 나타내는 수치를 말한다(Hildebrand et al., 1992). PIC 값은 0.25보다 작으면 유전자좌와 관련된 다형성 수준이 낮음을 의미하고 0.25~0.5는 중간 수준의 다형성을 의미하는 반면, PIC 값이 0.5보다 높으면 높은 수준의 다형성을 나타낸다(Zhang et al., 2018). 본 연구에서 유전자 좌 당 다형성 정도를 나타내는 PIC 값은 0.056~0.584까지 나타났으며, 평균값은 0.339로 조사되었다. 이에 따라 17개의 차나무 품종의 PIC 값은 중간 수준으로 그다지 높지 않은 다형성을 보인다.

SSR 마커를 이용한 차나무의 유연관계 및 품종판별에 대한 연구는 중국, 일본 등 여러 곳에서 보고되어 있다. Yao et al (2012)는 중국의 14개 지역에서 수집한 450개의 품종에 SSR 마커를 적용하여 분석한 결과 대립 유전자 수는 2~7개로 총 263개였으며 PIC 값은 0.222~0.916으로 평균 0.61을 보이며 높은 유전적 다양성을 나타낸다고 보고하였다. Ohsako

et al (2008)는 일본 차나무 12개 품종에 SSR 마커를 적용하여 분석한 결과 대립 유전자 수는 8~13개로 총 62개였으며 PIC값은 0.498~0.723으로 평균 0.682를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서는 선발된 SSR primer를 적용하여 나타나는 대립 유전자 수와 PIC 값은 중국과 일본에서 보고한 내용에 비해 대립유전자 수가 적고 PIC 값도 낮아 중간 수준의 유전적 다양성을 보였다. 이는 적용한 마커의 수가 다르고 품종에 따라 서로 다른 유전자 조성을 보이며 품종 간 변이가 그다지 크지 않기 때문에 나타나는 결과라고 생각된다. 이에 따라 차나무 개체들의 상세한 유전자 정보와 변이에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 나타났다.



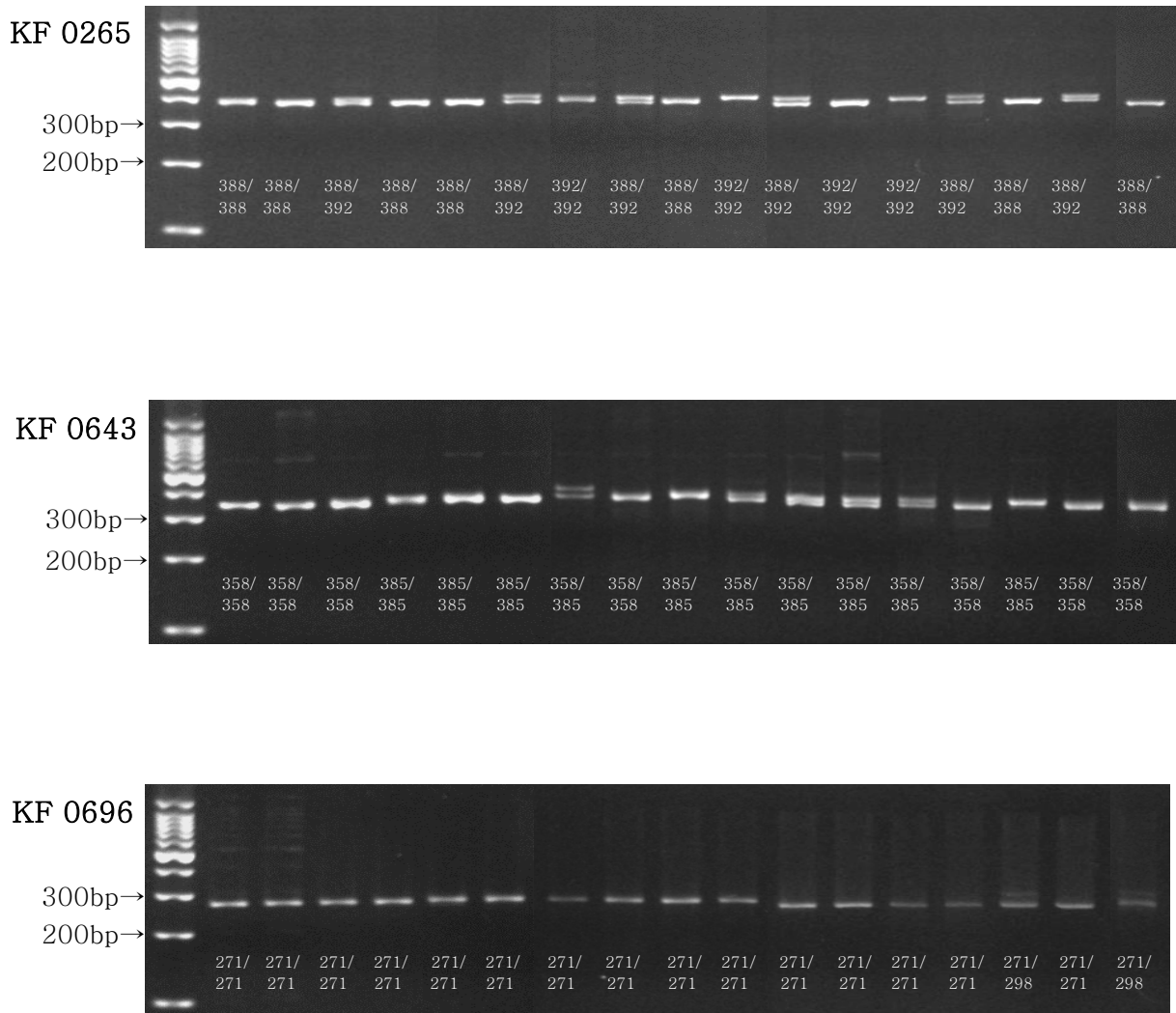


Fig 2. Representative SSR primers representing polymorphism. 1, 'Kemsull' ; 2, 'Beachwisull' ; 3, 'Kumnok' ; 4, 'Myeongnok' ; 5, 'Chamnok' ; 6, 'Hwadeok' ; 7, 'Bohyang' ; 8, 'Sangnok' ; 9, 'Sangmok' ; 10, 'Jungmo' ; 11, 'Yabukita' ; 12, 'Ai 37' ; 13, 'Yutakamidori' ; 14, 'Okumidori' ; 15, 'Saemidori' ; 16, 'Benifuki' ; 17, 'Fushun'.

Table 4. Characteristic of 23 polymorphic SSR primers including major allele frequency, number of alleles, gene diversity and polymorphic information in the tea plant.

Primer	M _{AF}	No. of alleles	Gene Diversity	H _o	PIC Value
TM 068	0.65	3	0.51	0.35	0.453
MSG 0206	0.56	3	0.59	0.41	0.524
MSG 0233	0.66	3	0.50	0.19	0.436
MSG 0240	0.47	4	0.64	0.35	0.577
MSG 0403	0.47	3	0.63	0.35	0.558
MSG 0699	0.53	4	0.59	0.47	0.513
MSG 0811	0.76	2	0.36	0.24	0.295
KF 0007	0.97	2	0.06	0.06	0.056
KF0036	0.85	2	0.25	0.06	0.219
KF 0097	0.53	3	0.61	0.71	0.538
KF 0112	0.76	3	0.38	0.12	0.340
KF 0147	0.59	2	0.48	0.00	0.367
KF 0234	0.91	2	0.16	0.18	0.148
KF 0265	0.65	2	0.46	0.35	0.352
KF 0271	0.97	2	0.06	0.06	0.056

Table 4. continued.

KF 0288	0.74	2	0.339	0.54	0.314
KF 0382	0.91	2	0.16	0.18	0.148
KF 0416	0.76	2	0.36	0.12	0.295
KF 0468	0.88	3	0.21	0.12	0.204
KF 0536	0.41	3	0.66	0.82	0.584
KF 0607	0.68	2	0.44	0.65	0.342
KF 0643	0.56	2	0.49	0.29	0.372
KF 0696	0.94	2	0.11	0.12	0.105
Mean	0.71	2.5	0.40	0.29	0.339

2. SSR 마커를 이용한 품종의 유연관계 분석

SSR 마커를 적용하여 차나무 17개 품종에 대한 유연관계를 MEGA V 5.05를 이용하여 분석한 결과 3개 그룹으로 나누어졌으며 PowerMarker V 3.25을 이용하여 계산된 유전적 거리는 0.11~0.59의 범위를 나타내었다(Fig. 3). 그룹 I 은 국내 육성 품종인 ‘중모’, ‘명녹’, ‘상녹’, ‘상목’, ‘보향’ 과 일본 품종인 ‘Okumidori’, ‘Yabukita’, ‘Saemidori’, ‘Fushun’, ‘Yutakamidori’, ‘Benifuki’로 구성되었다. ‘Okumidori’와 ‘Saemidori’는 ‘Yabukita’를 모본으로 교배하여 육성된 품종들인데(Ujihara et al., 2011) 본 연구에서 이들 품종 간의 유전적 거리는 매우 가깝게 나타났다. 그룹 I 에는 본 연구에 사용된 일본의 6개 품종 모두와 국내 육성 품종인 ‘중모’, ‘명녹’, ‘상녹’, ‘상목’, ‘보향’이 함께 포함되어 있는 것으로 나타났는데, 이는 한국 재래종들이 일본 품종과 연관성이 높다는 것을 의미한다. 현재 국내 육성 품종들의 선발 집단의 유래에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다. 그러나 1970년대 보성 및 하동 지역의 다원들은 재래종 종자의 이용과 더불어 다수의 유망 대만 및 일본 품종들의 도입과 함께 혼성되어 확장되었다(Kaundun et al., 2000). 이들의 자연교잡 영향으로 국내 품종들의 유전적 다형성은 증가되고 대만 또는 일본 품종들과도 근연 관계를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

그룹 II는 국내에서 육성된 품종인 ‘금녹’, ‘참녹’, ‘화덕’과 아쌈종인 ‘Ai 37’로 구성되었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 유엽에서 붉은색을 나타내는 품종은 ‘금설’, ‘비취설’, ‘금녹’, ‘참녹’, ‘화덕’, ‘상목’, ‘Benifuki’인데, 이 중에서 ‘금설’과 ‘비취설’은 그룹 III에 분류되고 ‘금녹’, ‘참녹’, ‘화덕’은 그룹 II에 분류되는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 유전적 거리로 나누어진 그룹들의 유전적 구성에 유엽의 색과 관련된 유전자가 포함되어 있을 것으로 추정되며, 이에 대해서는 추가적으로 연구가 필요하다고 판단된다. 그룹 III은 제주에서 육성된 ‘금설’과 ‘비취설’로만 구성되었다. 이들 품종은 잎이 매우 작은 특징을 가지고 있으며 국내 재래종으로부터 선발된 것으로 다른 국내 육성 품종들과 기원 및 유래가 거의 동일한 것으로 알려져 있는 것을 감안할 때 매우 특이한 현상이라 할 수 있다. 그러므로 그룹 III이 잎의 소형화 및 유엽의 적색화와

관련된 유전적 조성과 관계될 수도 있는 것으로 추정할 수 있는데, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요해 보인다.

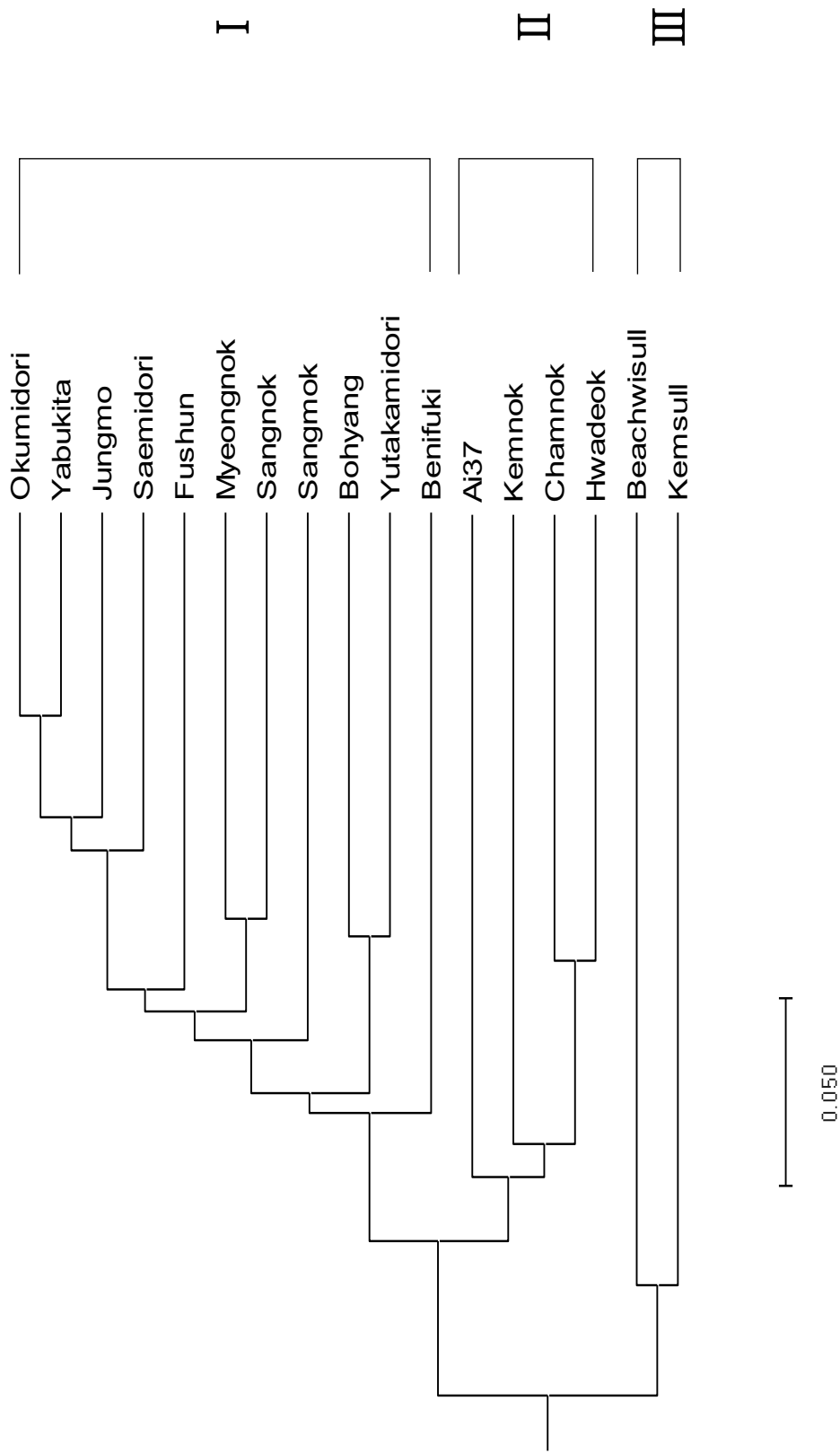


Fig. 3. Dendrogram of 17 cultivars based on genetic distance analyzed by PowerMarker V 3.25.

3. SSR 마커를 이용한 품종의 판별

차나무 17개 품종에 대해 SSR 마커를 이용한 품종의 판별 여부와 효율적인 품종 판별 체계에 대해 분석하였다. 선발된 23개 SSR 마커를 사용하여 본 연구에 사용된 17개의 품종을 모두 구분할 수 있었는데, 이 중 4개의 마커 TM 068, MSG 0206, MSG 0699, KF 0643만을 사용하여도 17개 품종의 판별이 모두 가능하였다. 먼저 TM 068을 사용하면 17개 품종이 4개의 그룹으로 나뉘지고, 이를 다시 MSG 0206을 사용하면 각각의 그룹을 세분화면서 17개 품종 중 7개 품종을 판별할 수 있었다. 그 다음 MSG 0699를 사용하면 아직 판별되지 않은 10개 품종 중 4개의 품종이 판별되고, 마지막으로 KF 0643을 사용하면 나머지 6개 품종 모두를 판별할 수 있었다(Fig. 4). 특히, 이 마커들의 PIC 값은 Table 4에서 확인할 수 있듯이 0.372~0.524로 높은 범위에 속하였다.

차나무는 새순을 수확하여 이용하는 작물로 형태적인 유사성이 매우 높아 전문가 수준에서도 정확한 품종의 구별이 쉽지 않다. 본 연구 결과, 4개의 SSR primer 이용만으로도 차나무 품종을 정확히 판별할 수 있어서 분석 시간과 비용 측면을 고려할 때 효율성이 높은 것으로 판단된다. 현재 국내 육성 출원 품종은 16개인데, 이 중 10개 품종만이 일본 품종 및 아쌈종과 더불어 분석되었고, 추가적으로 품종들은 계속 개발되고 있는 상태라서, 이들 모든 품종으로 확대하여 적용이 가능할 지는 추가적으로 연구가 필요하다.

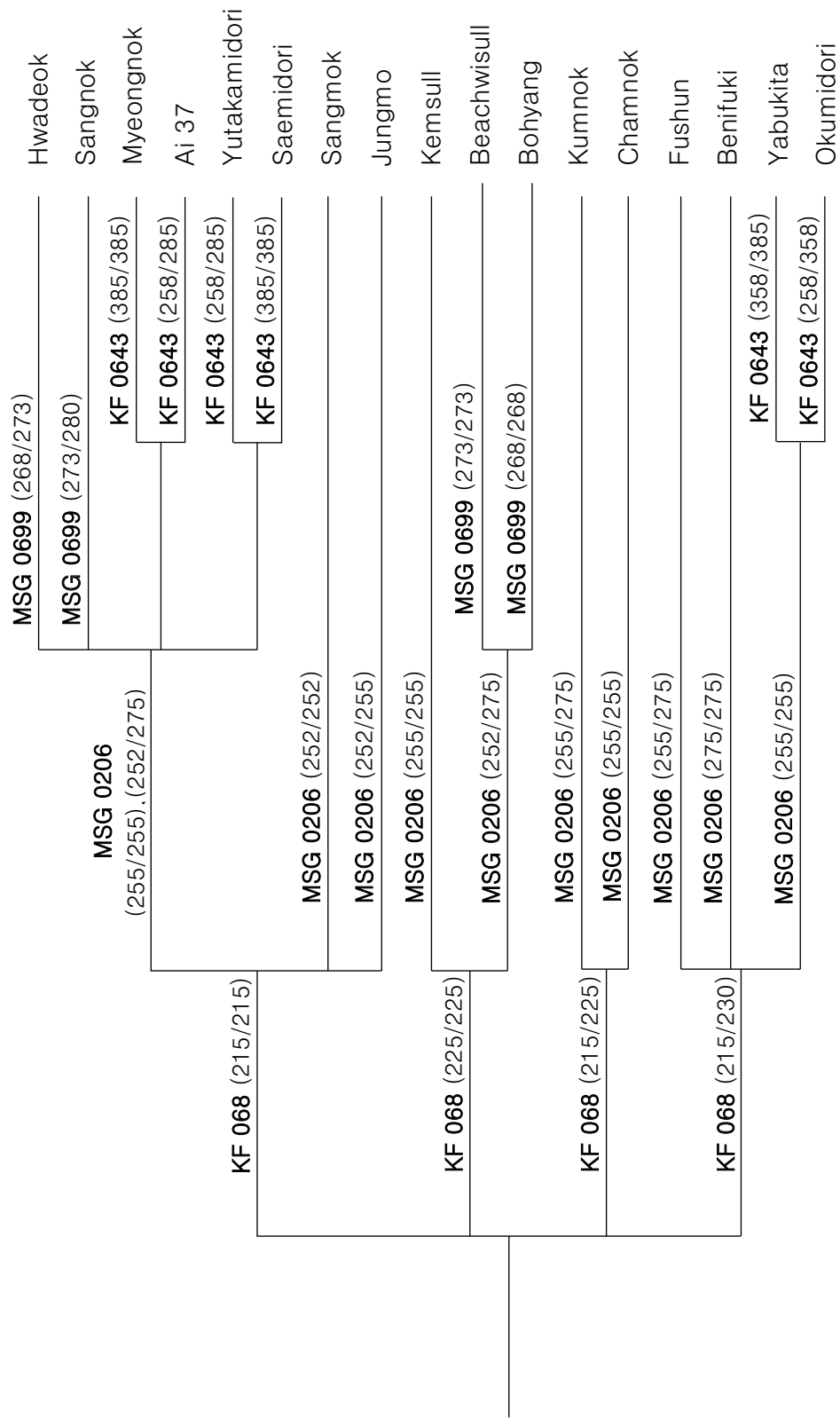


Fig. 4. Algorithm for identification of tea plant cultivars using minimum SSR markers.

V. 초록

본 연구는 SSR 마커를 이용하여 차나무에 대한 효율적인 품종 판별 체계를 확립하고 품종 간 유전적 관계를 바탕으로 교배육종의 기초자료로 활용하기 위하여 수행하였다. 국내 육성 10개 품종과 일본 품종 6개 및 아쌈 대엽 계통의 1개 등 총 17개 품종을 대상으로 차나무에서 다형성이 보고된 45개 SSR primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 45개 SSR primer 중 23개에서 증폭이 뚜렷하고 다형성이 분명하게 나타났으며 대립 유전자 수는 2~3개로 평균 2.5개이었다. PowerMarker V 3.25로 분석한 유전자의 다양성은 0.06~0.66으로 평균 0.40이고 유전적 거리는 0.11~0.59이었으며 PIC 값은 0.056~0.584로 평균 0.339를 나타내어 중간 수준의 다형성을 보였다. MEGA V 5.05로 유연관계를 분석한 결과 차나무의 품종들은 3개의 그룹으로 구분되었다. 그룹 I은 국내 품종 일부와 일본 품종이 포함되었으며 한국 품종과 일본 품종 간 유전적 연관성이 높게 나타났다. 그룹 II는 유럽에서 붉은색을 나타내는 국내 품종과 Ai 37을 포함하고 있었다. 그룹 III은 제주에서 육성된 품종들로만 구성되었으며 다른 국내 육성 품종들과 기원 및 유래가 비슷하다고 알려진 것과는 차이가 있었다. SSR primer 45개로부터 선발된 23개 중 TM 068, MSG 0206, MSG 0699, KF 0643 등 단지 4개만을 사용하여 차나무 17개 품종을 모두 판별할 수 있었다. 본 연구 결과, 다양한 차나무의 품종 판별에 이들 SSR primer들이 효율적으로 이용될 수 있음을 보여주었다.

인 용 문 헌

- Ban SH, Yun WH, Kim GH, Kwon SI, Choi C** (2014) Genetic identification of apple cultivars bred in Korea using simple sequence repeat markers. *Hortic Environ Biotech* 55:531-539
- Bang KH, Chung JW, Kim YC, Lee JW, Jo IH, Seo AY, Kim OT, Hyun DY, Kim DH, Cha SW** (2011) Development of SSR markers for identification of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) cultivars. *Korean J Med Crop Sci* 19:185-190
- Bernet GP, Bramardi S, Calvache D, Carbonell EA, Asins MJ** (2003) Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breed* 122:146-152
- Cai K, Zhu L, Zhang K, Li L, Zhao Z, Zeng W, Lin X** (2019) Development and characterization of EST-SSR markers from RNA-Seq data in *Phyllostachys violascens*. *Front Plant Sci* 10:50
- Chang Y, Oh EU, Lee MS, Kim HB, Moon DG, Song KJ** (2017) Construction of a genetic linkage map based on RAPD, AFLP, and SSR markers for tea plant (*Camellia sinensis*). *Euphytica* 213:190
- Cho YI, Park JH, Lee CW, Ra WH, Chung JW, Lee JR, Ma KH, Lee SY, Lee KS, Lee MC, Park YJ** (2010) Evaluation of the genetic diversity and population structure of sesame (*Sesamum indicum* L.) using microsatellite markers. *Genes Genom* 33:187-195
- Choi MJ, Jo HJ** (2019) Black tea intake in adult women in Daegu. *J Korean Tea Soc* 25:67-75
- Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)** (2020) FAOSTAT database collections
- Goldstein DB, Schlötterer C** (1999) Microsatellites: evolution and applications. *Q Rev Biol* 83:633-634
- He G, Meng R, Newman M, Gao G, Pittman RN, Prakash CS** (2003) Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biol* 3:3
- Hildebrand CE, Torney DC, Wagner RP** (1992) Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los*

Alamos Sci 20:100-102

- Honjo M, Nunome T, Kataoka S, Yano T, Yamazaki H, Hamano M, Yui S, Morishita M** (2011) Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. *Breed Sci* 61:420-425
- Hong WJ, Khaing AA, Park YJ** (2013) Cultivar identification of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) using SSR markers. *Korean J Intl Agri* 25:385-394
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)** (2007) Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction (“BMT guidelines” project 8)
- Kaundun S, Zhyvoloup A, Park Y** (2000) Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica* 115:7-16
- Kim SH, Chung JW, Moon JK, Woo SH, Cho YG, Jong SK, Kim HS** (2006) Discrimination of Korean soybean cultivars by SSR markers. *Korean J Crop Sci* 51:658-668
- Korea Seed and Variety Service (KSV)** (2020) List of national varieties database collections
- Kwon YS, Lee JM, Yi GB, Yi SI, Kim KM, Soh EH, Bae KM, Park EK, Song IH, Kim BD** (2005) Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Mol Cell* 19:428-35
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI** (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol Biol Rep* 12:6-13
- Liu K, Muse SV** (2005) Powermarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128-2129
- Ma JQ, Zhou YH, Ma CL, Yao MZ, Jin JQ, Wang XC, Chen L** (2010) Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SST markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae). *Amer J Bot* 97:153-156
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA)** (2020) Statistics Yearbook 2020, Korea
- Moon JY, Yi SI, Park DY, Song IH, Park HY, Kwon YS** (2003) Application of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis for DUS test in pepper cultivar. *Korean J Breed Sci* 35:306-312
- Ni S, Yao MZ, Chen L, Zhao LP, Wang XC** (2008) Germplasm and breeding research of tea plant based

on DNA molecular marker approaches. *Front Agric China* 2:200-207

Niu S, Song Q, Koiwa H, Qiao D, Zhao D, Chen Z, Liu X, Wen X (2019) Genetic diversity, linkage disequilibrium and population structure analysis of the tea plant (*Camellia sinensis*) from an origin center, Guizhou plateau, using genome wide SNPs developed by genotyping by sequencing. *BMC Plant Biol* 19:328

Ohsako T, Ohgushi T, Motosugi H, Oka K (2008) Microsatellite variability within and among local landrace populations of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, in Kyoto, Japan. *Genet Resour Crop Evol* 55:1047-1053

Tan LQ, Wang LY, Wei K, Zhang CC, Wu LY, Qi GN, Cheng H, Zhang Q, Cui QM, Liang JB (2013) Floral transcriptome sequencing for SSR marker development and linkage map construction in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Plos One* 8, e81611

Taniguchi F, Furukawa K, Ote-Metoku S, Yamaguchi N, Ujihara T, Kono I, Fukuoka H, Tanaka J (2012) Construction of a high-density reference linkage map of tea (*Camellia sinensis*). *Breed Sci* 62:263-273

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739

Ujihara T, Taniguchi F, Tanaka J, Hayashi N (2011) Development of expressed sequence tag (EST)-based cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers of tea plant and their application to cultivar identification. *J Agric Food Chem* 59:1557-1564

Woo JK, Yun SH, Yi KU, Park YC, Lee HY, Kim MJ, Lee Y, Song KJ, Kim HB (2020) Identification of citrus varieties bred in Korea using microsatellite makers. *Hortic Sci Technol* 38:374-384

Yao MZ, Ma CL, Qiao TT, Jin JQ, Chen L (2012) Diversity distribution and population structure of tea germplasms in China revealed by EST-SSR markers. *Tree Genet Genomes* 8:205-220

Yoo YS (2013) A study on the changes in green tea consumption and tea culture awareness of Korean university students. *J Korean Tea Soc* 19:25-33

Zhang Y, Zhang X, Chen X, Sun W, Li J (2018) Genetic diversity and structure of tea plant in qinba area in China by three types of molecular markers. *Hereditas* 155:22

Zhen Y, Li Z, Huang H (2004) Molecular characterization of kiwifruit (*Actinidia*) cultivars and selections using SSR markers. *J Amer Soc Hort Sci* 129:374-382

감사의 글

지난 2년의 시간 동안 미흡하지만 석사 학위 논문을 마치면서 고마운 분들께 감사의 말씀을 글로 남겨 보려 합니다. 우선, 연구의 시작에 있어서 기초와 방향을 잡아 주시고 저의 부족한 점을 세심하게 가르쳐주신 송관정 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 석사 교육 과정 동안 많은 지도와 조언을 해주신 강훈 교수님, 한상헌 교수님, 조영열 교수님, 박수국 교수님께도 감사드립니다.

연구실에 처음 들어와서 적응하지 못했던 제게 먼저 다가와 주고 곁에서 항상 도와준 은의언니, 석사기간 동안 말동무 역할을 해준 형호오빠, 힘들 때마다 옆에서 위로해주고 응원해주었던 하림이와 궂은 일 도맡아서 수고해주는 성연이, 승환이를 비롯한 과수육종 학우분들께도 감사의 말을 전합니다. 그리고 실험의 기본을 가르쳐주신 이경욱 박사님, 이 논문에 많은 도움을 주신 김호방 박사님께도 감사드립니다. 마지막으로 제 옆에서 언제나 믿어 주시고 사랑해주시는 아버지, 어머니, 오빠에게 감사의 마음을 전합니다.

지면상 미처 이름을 적지 못했지만 많은 도움을 주신 분들께 감사의 뜻을 전하며 이러한 도움을 바탕으로 더 큰 발전을 하도록 노력하겠습니다.