참외 전장유전체 염기서열 분석 및 SSR 마커 개발

송운호 · 정상민

Whole genome re-sequencing and development of SSR markers in oriental melon

Woon-Ho Song · Sang-Min Chung

Received: 9 April 2019 / Revised: 16 April 2019 / Accepted: 16 April 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The objective of this study was to use ‘Danta PR’, NGS (Next Generation Sequencing) technology for genome resequencing to develop polymorphic makers between Chinese oriental melon, ‘Hyangseo 1’ and Korean oriental melon. From the resequencing data that covered about 81 times of the genome size, 104,357 of SSR motifs and Indel, and 1,092,436 of SNPs were identified. 299 SSR and 307 Indel markers were chosen to cover each chromosome with 25 markers. These markers were subsequently used to identify genotypes of ‘Danta PR’ BC1 (F1 x ‘Danta PR’) population and a genetic linkage map was constructed. SSR, Indel, and SNPs identified in this study would be useful as a breeding tool to develop new oriental melon varieties.

Keywords Indel, Oriental melon, Polymorphic markers, Resequencing, SSR

서론

참외(*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino)는 박과류에 속하는 중앙아시아의 고온 건조 지역에서 자라며, 현재 우리나라를 포함하여 중국, 일본 지역에서 재배되고 있다. 우리나라에 참외 연간생산량은 약 166M 톤(2017년 기준) 정도이며, 재배 면적은 약 3,500 헥타 정도(2017년 기준)로 알려져 있다(www.mafra.go.kr). 참외는 엽산, 인, 칼슘 등의 무기질과 비타

민 A와 C의 함량이 많고 특히 당도가 높아 피로 회복에 도움을 주며, 이러한 많은 식품영양학적 이점 때문에 생산성과 상업적 가치를 높이기 위해 지속적인 품종 개량이 선도되고 있다.

새로운 품종의 개발에는 많은 시간과 노력을 필요로 하는데, 이는 분자마커를 이용한 육종 기술로 노력과 비용을 줄일 수 있다(Bae et al. 2015; Han et al. 2016; Lim and Ha 2013; Sboner et al. 2011; Sim et al. 2015; Varshney et al. 2009). 지금까지 여러 작물 중에서 마커를 이용한 품종 선발을 위해 유전적 다양성 분석, QTL 연관 지도 작성, 다양한 PCR 기반 마커가 개발되고 이용되어왔으며(Aka Kacar et al. 2012; Argyris et al. 2015; Esteras et al. 2013; Fukino et al. 2008; Ramamurthy and Waters 2015), 현재 멜론과 참외에서 분자마커 개발을 위한 많은 유전체 연구가 진행되고 있다(Bang et al. 2016; Park et al. 2015).

유전체 분석 방법 중 하나인 차세대염기서열분석(NGS) 기술에 의한 유전체 혁명은 생물체의 유전 구성에 대한 이해를 크게 진전시켰으며, 식물 육종에 있어 새로운 혁명을 초래하고 있다(Barabaschi et al. 2016; Perez-de-Castro et al. 2012). 최근에는 NGS를 이용하여 작물 유전체의 해독과 재해석(resequencing), 전사체 분석, 전장유전체 연관분석(GWAS), 후성유전체 분석, 유전체 선발(genomic selection) 등이 활발히 수행되고 있으며, 특히 NGS에 의한 유전체재해석(ressequencing)은 진화 분석과 구조유전체, 기능유전체, 그리고 분자유종 연구에 효율적으로 이용되고 있다(Guo et al. 2014).

멜론에서 resequencing을 통한 유전체 분석 연구가 계속해서 진행되고 있으며(Sim et al. 2018), 최근 이 NGS기술을 이용하여 SSR 마커를 개발한 연구 보고가 있으나(Park et al. 2013), Park 등은(2013) 국내 참외 계통들에 한정된 다형성 마커를 개발하였다. 따라서 중국 참외 계통들이 가지는 형질 도입을 통한 새로운 품종 개발을 하는데 있어서, 중국의 참외

W.-H. Song · S.-M. Chung (✉)
동국대학교 서울 생명과학과
(Department of Life Science, Dongguk University-seoul 04620, Korea)
e-mail: smchung@dongguk.edu

Table 1 Summary of resequencing data from the two oriental melon lines

	Danta PR	Hyangseo 1
Raw sequencing data		
Total bases	22,792,255,294	23,855,250,196
Read count	225,665,894	236,190,596
GC (%)	35.28	35.09
Q20 (%)	95.07	95.5
Results of reference assembly		
Sites (Ref. length)	406,928,820	406,928,820
Mapped sites ($\geq 1x$)	331,457,208	331,876,571
Coverage ($\geq 1x$)	81.45	81.56
Total read	225,665,894	236,190,596
Mapped read	191,072,937	200,137,193
Mapped read (%)	84.67	84.74
Mapped bases	16,709,612,561	17,487,688,855
Mean depth	41.06	42.97

계통과 국내 참외 계통들에 유전체 비교연구는 필요한 시점이다. 그에 따라 본 연구에서는 중국 참외 계통인 ‘향서1호’ 참외와 한국 참외 계통인 ‘단타 PR’ 참외 사이에서 다형성 마커를 개발하고자 하였다. 두 참외 계통간 유전체 비교와 분석을 통해 새로운 유전적 차이를 조사하였고, SSR 및 Indel 다형성 후보군과 SNP를 확인하였으며, 이러한 결과를 이용하여 새로운 참외 품종 육성에 기여할 정보를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료 및 DNA 정제

한국 참외 계통인 ‘단타 PR’과 중국 참외 계통인 ‘향서 1호’의 참외 종자를 장춘종묘사(Jangchun Seeds, Gyeongsangbuk-do, Korea)로부터 제공받아 발아시켜 키운 후, ‘단타 PR’ 참외와 ‘향서1호’ 참외의 교배로 얻은 F1 집단을 다시 ‘단타 PR’ 참외와 교배한 여교배 분리 집단(90개체)을 생산하였다. 트레이[540 mm(가로)×280 mm(세로)×65 mm(높이)], 폴리프로필렌]에 파종을 하고, 2~3주 지난 어린 식물의 두 번째 본 잎을 채취하였다. 수확한 두 번째 본 잎을 섭씨 -70°C 냉동고에 보관한 다음, CTAB method를 통해 DNA를 추출하였다(Winne-pennincks 1993). DNA 시료의 양은 Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE 19810, USA)을 사용하여 측정 하였다.

염기서열 분석

‘단타 PR’ 참외와 ‘향서 1호’ 참외에 대한 계놈 resequencing을 MacroGen사(MacroGen, Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 계놈

resequencing은 NGS의 대표적인 플랫폼 중에서 Illumina (<http://www.illumina.com>) 방식을 이용하여 진행하였다. NGS 시퀀싱을 통해 염기 결정(base calling) 과정을 거친 후, 레퍼런스 어셈블리(reference assembly) 과정을 거쳐 참외의 전체 유전체를 분석하였다(Table 1). 레퍼런스 어셈블리에 사용된 멜론의 서열은 MELONOMICS (<http://www.melonomics.cragenomics.es/>)에 등록된 Melon genome v3.5.1의 서열을 이용하였으며, genomic DNA로부터 paired-end library를 만들어 Hiseq2000 (Illumina) 장비로 염기서열 분석을 수행했다. ‘단타 PR’ 참외와 ‘향서 1호’ 참외의 NGS 염기서열들(reads)을 세 가지 도구 [Alignment Software: BWA v0.6.2 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), Remove PCR Duplicates, Variant Detection : Samtools v0.1.18 (<http://samtools.sourceforge.net/>), Sequencing Data Analysis Tool : GATK v1.4.11 (http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_GenomeAnalysisToolkit)]에 사용하여 표준유전체서열에 대한 mapping과(Table 1) SSR 및 indel 탐색을 수행하였다(Table 2). 참외 간의 변이를 분석하기 위해 ‘향서1호’ 참외를 레퍼런스로 하여 ‘단타 PR’ 참외와 비교하였다.

유전형 분석

‘단타 PR’ 여교배 분리 집단에 유전형 분석은 polymerase chain reaction(PCR) 분석을 기반으로 진행되었다. PCR 반응액의 총 부피는 15 μ L로, 6.12 μ L의 D.W, 5 μ L의 DNA template (4 ng/ μ L), 1.5 μ L의 10x Taq buffer, 각각 1 μ L의 forward, reverse PCR primer (1.5 ng/ μ L), 0.3 μ L의 dNTP (10 mM each), 0.08 μ L의 Taq polymerase (5 unit/ μ L)로 구성했다. PCR 반응은 Hush Run Thermal cycler (Biofact, Seoul, Korea) 모델을 이용하여 진행했

Table 2 Summary of SSR motif data from the two oriental melon lines

Motif	Line	Repeat numbers						No. of total SSR motif
		6	7	8	9	10	>10	
Mononucleotide								
A	DantaPR	768017	310837	190374	103967	75519	78284	1526998
	Hyangseo1	835992	351210	212054	115304	84365	92668	1691593
C	DantaPR	75099	42273	6298	4150	4706	128	132654
	Hyangseo1	74325	40937	7340	4902	5384	154	133042
Dinucleotide								
AC	DantaPR	79	56	28	14	15	22	214
	Hyangseo1	66	34	23	16	10	27	176
AT	DantaPR	7317	2589	581	490	366	1308	12651
	Hyangseo1	8547	3127	577	451	317	1288	14307
CG	DantaPR	10	-	-	-	-	-	10
	Hyangseo1	3	1	-	-	-	-	4
AG	DantaPR	177	100	52	40	47	138	554
	Hyangseo1	161	77	58	37	31	133	497
Trinucleotide								
ATC	DantaPR	10	8	1	2	-	26	47
	Hyangseo1	15	5	-	4	1	54	79
AAC	DantaPR	12	20	8	2	3	214	259
	Hyangseo1	15	11	6	6	4	152	194
AGC	DantaPR	3	1	1	-	-	-	5
	Hyangseo1	1	1	1	-	-	-	3
AAT	DantaPR	337	135	84	71	41	190	858
	Hyangseo1	274	154	111	76	26	172	813
ACT	DantaPR	3	2	2	2	2	23	34
	Hyangseo1	2	4	2	-	1	3	12
CCG	DantaPR	6	27	2	4	3	2	44
	Hyangseo1	4	24	2	-	-	-	30
AAG	DantaPR	53	28	33	18	13	116	261
	Hyangseo1	68	25	26	20	6	93	238
AGG	DantaPR	16	2	3	-	-	-	21
	Hyangseo1	5	2	1	1	2	-	11
ACC	DantaPR	2	3	1	-	-	-	5
	Hyangseo1	1	-	-	-	-	-	1
ACG	DantaPR	1	-	-	-	-	-	1
	Hyangseo1	2	1	1	-	-	-	4

다. PCR반응 조건은 94°C의 온도에서 10분간 pre-denaturation 과정을 진행한 다음 94°C에서 60초 변형, 55°C에서 60초 결합, 72°C에서 60초 신장 과정까지 총 3가지 과정을 40번 반복했다. 마지막 최종 신장과정은 72°C에서 10분간 진행했다. PCR 산물은 Ethidium bromide가 첨가된 2.0%의 아가로스 겔에 로딩하여 0.5%의 TBE 버퍼에서 300V 전압으로 전기영동한 다음, WiseDoc (Dehan, Seoul, Korea)에 설치된 디지털 카메라로 촬영하여 확인했다.

유전자 연관 지도 작성

본 연구에서 개발된 SSR마커의 예상되는 위치는 Melon genome v3.5.1와 비교하여 mapchart 2.2 (Roeland E. Voorrips, 2002) 소프트웨어를 통해 제작하였다. ‘단타 PR’ 참외 여교배 집단의 연관 지도는 소프트웨어 JoinMAP 4.0 (Van Ooijen, 2006)를 이용하여 진행하였다. Haldane mapping function을 마커의 재조합 빈도에 대한 genetic distance를 계산하기 위해 사용하였고,

2.0부터 10.0까지 LOD 값의 따라 분리된 linkage group들 중 LOD값 3의 linkage group을 유전자 연관 지도 작성에 사용하였다.

결 과

참외 염기서열 분석

Illumina hiseq 2000 장비를 이용하여 얻어진 ‘단타 PR’ 참외와 ‘향서 1호’ 참외의 염기서열 데이터는, 단타 PR 참외에서 약 225×10^6 reads에 약 22.7×10^9 bp의 염기서열이었으며, 향서 1호 참외에서 약 231×10^6 reads에 약 23.4×10^9 bp의 염기서열이었다. 염기 결정 과정 시에 에러율(정확도)을 보여주는 지표인 Q20(정확도 99%를 의미)이 95%가 넘는 높은 수치를 보여주고 있는 것이 확인되었다(Table 1).

염기 결정 과정이 완료된 이후, 참외의 유전체 분석을 위해 Melon genome v3.5.1를 이용하여 어셈블리를 진행하였다. ‘단타 PR’ 참외에서 약 191×10^6 reads에 약 16.7×10^9 bp의 염기서열이 mapping되어 약 41.06의 mapping depth를 나타내었으며, ‘향서 1호’ 참외에서 약 200×10^6 reads에 약 17.4×10^9 bp의 염기서열이 mapping되어 약 42.97의 mapping depth를 나타내었다(Table 1). 두 참외 모두 어셈블리 과정에서 mapped read가 약 85%를 나타내고 있고, 약 15%의 reads가 어셈블리되지 않았으며, 약 81배의 genome coverage를 보였다(Table 1).

어셈블리 과정에서 ‘단타 PR’ 참외와 ‘향서 1호’ 참외의 SSR에 대한 데이터를 분석했다(Table 2). ‘단타 PR’ 참외의 경우 SSR의 분석결과, 전체 SSR 분포에서 mononucleotide type의 SSR motif들이 차지하는 비중이 가장 높게 나타났다(Table 2). 약 99%가 이에 해당되며, 전체 비중이 약 1%정도를 dinucleotide type 이상의 SSR motif들이 차지하고 있다(Table 2). Mononucleotide type의 SSR motif들 중에서도 4가지 종류의 염기 중 아데닌(A)이 차지하는 비중이 가장 높았으며, dinucleotide type의 SSR motif에서는 AT의 반복이, trinucleotide type의 SSR motif에서는 AAT가 가장 많은 비중을 차지하는 것으로 나타났다(Table 2). ‘향서 1호’ 참외의 SSR 분석에 경우에도, ‘단타 PR’ 참외와 비슷한 양상을 나타냈다(Table 2).

다형성마커 개발

‘향서 1호’ 참외의 염기서열을 레퍼런스로 하여 ‘단타 PR’ 참외 염기서열과 SSR motif들을 비교 분석하였다. 두 참외의 염기서열 비교 분석 결과, 각 염색체 별로 SSR 및 Indel 다형성 후보군 104,357개와 1,092,436개의 SNP를 확인하였다(Table 3). 염색체 11번에서 SSR 및 Indel의 다형성 후보군과 SNP의 수는 각각 15,318개와 197,453개로 가장 많은 수를 보였으며, 염색체 4번에서 SSR 및 Indel 다형성 후보군의 수는 4984개, 염

Table 3 Number of SSR, Indel and SNP in two oriental melon lines

Chromosome	Number of SSR motifs and Indel	Number of SNPs
Chr1	12876	135252
Chr2	14608	166083
Chr3	5277	60188
Chr4	4984	35597
Chr5	5400	39140
Chr6	14172	160285
Chr7	6863	103913
Chr8	7963	74321
Chr9	6051	33453
Chr10	5210	47656
Chr11	15318	197453
Chr12	5635	39095

색체 9번에서의 SNP의 수는 33,453개로 12개의 염색체 중에서 가장 적은 수를 보였다(Table 3).

확인된 SSR 및 Indel 다형성 후보군들 중에서 총 299개의 SSR 다형성 마커와 307개의 Indel 다형성 마커를 선별하였다(Supplementary Tables 1 and 2). 마커 선별에 있어서 mononucleotide motif의 SSR 다형성 후보군들은 제외하였다. 제작된 SSR 마커들의 염색체상에서의 예상되는 위치는 그림으로 제시하였다(Fig. 1). Indel 다형성 마커의 경우는 1번 염색체에서 2개, 2번 염색체에서 57개, 3번 염색체에서 58개, 4번 염색체에서 19개, 5번 염색체에서 21개, 6번 염색체에서 37개, 7번 염색체에서 27개, 8번 염색체에서 10개, 9번 염색체에서 6개, 10번 염색체에서 9개, 11번 염색체에서 29개, 12번 염색체에서 32개를 제작하였다(Supplementary File 2). 제작된 SSR 다형성 마커는 ‘단타 PR’ 참외와 ‘향서 1호’ 참외의 DNA에 PCR 하여 전기영동을 통해 증폭되는 DNA 길이 차이에 따른 다형성 분석을 진행하였고, 그 결과 138개의 SSR 마커와 37개의 Indel 마커가 두 참외 사이에서 다형성을 보였다(Table 4). 염색체 2번의 경우 다형성을 보인 마커의 수는 0개, 6번 염색체에서는 3개, 11번 염색체에서는 3개로 다른 염색체들에 비해 적은 수의 다형성 마커가 발견 되었다(Table 4).

연관지도

‘단타 PR’ 참외 여교배 분리 집단(BC1)에 138개의 SSR 마커와 38개의 Indel 마커로 유전형 분석을 진행하였다. ‘단타 PR’ 참외 여교배 분리 집단(BC1)에서 분리를 보이는 SSR 마커의 수는 87개, Indel 마커의 수는 15개로 나타났으며, 이 102개의 마커를 분리 집단 연관 지도 작성에 이용하였다(Fig. 2). 2.0부터 10.0까지 LOD 값의 따라 분리된 linkage group들 중에서 LOD값 3을 가지는 12개의 linkage group을 사용하여 ‘단타

Fig. 1 The expected locations of the developed SSR markers on the chromosomes

Fig. 2 Genetic linkage map of 'Danta PR' BC1 population

Table 4 SSR and Indel marker list in the two oriental melon lines

Type	Chromosome	Name
SSR	1	chr1-258815, chr1-631524, chr1-2170754, chr1-2348625, chr1-3458710, chr1-3814868, chr1-4096239, chr1-4375720, chr1-5306726, chr1-6811131, chr1-7269073, chr1-7737685, chr1-8518817, chr1-9126140, chr1-10204486, chr1-16140754, chr1-32767815, chr1-33815824
	3	chr3-1147252, chr3-1578661, chr3-29344911, chr3-28998489, chr3-28385612, chr3-25891257, chr3-6562088, chr3-6129040, chr3-3175876, chr3-3910475, chr3-5136967, chr3-22722267
	4	chr4-1477765, chr4-3815029, chr4-11525549, chr4-13711663, chr4-14305540, chr4-14923731, chr4-15489521, chr4-15902926, chr4-3219870, chr4-26971523, chr4-27135515
	5	chr5-8749961, chr5-22664135, chr5-22985420, chr5-23093336, chr5-23595700, chr5-24526142, chr5-24990491, chr5-25732996, chr5-26698984, chr5-20636593, chr5-20978973, chr5-21357954, chr5-21852737, chr5-25800076
	6	chr6-739535, chr6-3824409, chr6-7389324
	7	chr7-2825823, chr7-3270418, chr7-8177507, chr7-8645267, chr7-8879254, chr7-10295360, chr7-12055367, chr7-12679328, chr7-13863498, chr7-14291015, chr7-14591470, chr7-14889037, chr7-22137785, chr7-23248577, chr7-24120290, chr7-25084270, chr7-26384747, chr7-26676125
	8	chr8-1904003, chr8-2368086, chr8-3759642, chr8-4145166, chr8-4380990, chr8-5020833, chr8-5401654, chr8-5835319, chr8-6773258, chr8-7992119, chr8-10022313, chr8-15692671, chr8-21223700, chr8-21603881, chr8-21935642
	9	chr9-1924820, chr9-2563493, chr9-5771284, chr9-7711825, chr9-18354598, chr9-19338172, chr9-19934092, chr9-20788594, chr9-21257019, chr9-21604475, chr9-22041839, chr9-22308903, chr9-23160713, chr9-23478144, chr9-23844060
	10	chr10-958550, chr10-1755073, chr10-2136238, chr10-2982492, chr10-3475479, chr10-3844299, chr10-4600408, chr10-6126207, chr10-13248855, chr10-18234755, chr10-18627928, chr10-19070643, chr10-21076549, chr10-21468992, chr10-24925811, chr10-855846, chr10-2543442, chr10-23062238
	11	chr11-29652640, chr11-30004000, chr11-30602909
	12	chr12-19814217, chr12-19973755, chr12-20102306, chr12-20466961, chr12-22553517, chr12-22669466, chr12-22941880, chr12-24925121, chr12-25190987, chr12-25441090, chr12-25587584
Indel	2	chr2-id21, chr2-id31, chr2-id34, chr2-id38, chr2-id42, chr2-id50
	3	chr3-id04
	5	chr5-id03, chr5-id15
	6	chr6-id03, chr6-id04, chr6-id22, chr6-id26, chr6-id27, chr6-id33, chr6-id35
	7	chr7-id01, chr7-id02, chr7-id05, chr7-id07, chr7-id15, chr7-id23, chr7-id24, chr7-id27
	8	chr8-id03, chr8-id05, chr8-id06, chr8-id07
	10	chr10-id04, chr10-id06, chr10-id07
	11	chr11-id14, chr11-id18, chr11-id21, chr11-id22, chr11-id24
	12	chr12-id13, chr12-id28

Table 5 Genetic linkage map information

Linkage groups	Length (cM)	No. of markers	Average distance (cM)
A	87.0	10	13.5
B	29.2	4	9.73
C	93.4	8	15.56
D	20.8	7	4.16
E	19.5	4	6.5
F	74.5	15	6.77
G	13.3	4	13.3
H	96.6	15	8.05
I	55.3	10	6.14
J	21.1	3	10.55
K	27.3	7	5.46
L	56.6	10	9.43
Total	594.6	97	9.09

PR' 참외 여교배 분리 집단의 연관 지도를 작성하였다(Fig. 2). 102개의 마커들 중 group을 형성하여 실질적으로 연관 지도에 포함된 마커의 수는 97개였다(Table 5). 97개의 마커들은 총 594.6cM길이를 구성하며 연관 지도가 작성되었다. 마커 간 평균 거리는 9.09cM이었으며, 가장 많은 수의 마커를 위치한 지도의 마커 개수는 15개로 linkage group F와 H였고, 가장 적은 수의 마커를 위치한 지도의 마커 개수는 3개로 linkage group J였다. 각 linkage group 간 가장 긴 거리 차이를 가지는 group은 linkage group G와 H로 73.3cM의 차이를 가졌다(Table 5).

결론

본 연구는 중국 참외 계통과 국내 참외 계통 사이에서 다형성 마커를 개발하기 위한 것이 목적으로 중국 참외인 '향서 1호'와 국내 참외인 '단타 PR'을 비교 대상으로 선별하였다. 두 참외 계통 간 염기서열 비교 결과에서 SSR 및 Indel 다형성 후보군들을 확인하였고, 그 중 mononucleotide motif의 SSR이 가장 많이 존재하는 것을 확인하였다. 그러나 mononucleotide motif의 SSR의 경우 일반적으로 다형성을 보이지 않은 경우가 많이 존재한다고 알려져 있다(Chen et al. 2013). 짧은 motif는 PCR과정에서 slipped-strand mispairing (stuttering)이 일어나 genotyping에 오류를 일으킬 수 있다. 따라서 mononucleotide motif의 SSR이 가장 많은 SSR 분포를 보이고 있지만 두 참외 계통간 다형성을 보이기에 어려울 것으로 판단되어, 마커를 제작함에 있어 mononucleotide motif의 SSR들은 제외하고 dinucleotide motif의 SSR과 trinucleotide motif의 SSR을 선별하여 마커를 제작하였다.

SSR 마커들을 제작함에 있어, 전체 염색체에 골고루 위치하도록 하기 위하여 각 염색체 당 약 25개의 마커를 제작하였다. '단타 PR' 참외와 '향서 1호' 참외 사이에서 제작한 SSR 마커들의 다형성을 확인한 결과, 염색체 2번과 6번, 11번에 해당하는 염색체는 다른 염색체들에 비해 SSR motif를 대상으로 적은 변이를 가지고 있기에 적은 수의 마커가 다형성을 보인 것으로 판단된다. 두 계통의 참외 사이에서 다형성을 보인 Indel 마커의 수는 38개로 비슷한 수로 제작한 SSR 다형성 마커의 수 138개에 비해 상대적으로 적은 수를 보였다. 이것은 일루미나 시퀀싱이 가지는 어려움이 높기 때문이라 생각된다(Manley et al. 2016). 일루미나 시퀀싱 에러의 이유에는 잘못된 염기의 첨가나 PCR에 의한 부정확한 증폭, 잘못된 형광강도에 의한 잘못된 산출 등이 있고, 이러한 에러 때문에 Indel이 존재하는 것으로 보였을 것이라 생각된다. 유전자 연관 지도 작성 결과, linkage group D와 E에서 염색체 5번이, linkage group F와 G에서 염색체 7번이, linkage group J와 K에서 염색체 10번이 연관 지도 형성에서 나누어지는 것이 확인되었다. 이는 linkage group을 형성하는데 충

분히 가까운 거리의 마커가 없어 독립적으로 group을 형성하였기 때문이라 생각된다. 염색체 2번과 6번, 11번에 해당하는 유전자 지도가 형성되지 않음을 보였는데, 이것은 해당 염색체에 다형성 마커의 수가 적기 때문이라고 판단된다.

본 연구는 중국과 국산 두 참외 계통의 재료를 resequencing하여 299개의 SSR과 307개의 Indel 다형성 마커를 확보했고, 유전자 연관 지도를 작성할 수 있었다. 그러나 연관 지도 작성 결과, 충분한 마커로 확보하지 못한 염색체가 존재했다. 이러한 부분을 보완하기 위해서는 추가적인 SSR 및 Indel 마커를 개발하거나, SNP 후보군들을 이용하여 유전자 지도의 부족한 부분을 채워줄 새로운 마커를 개발하는 것이 도움이 될 것이라 생각한다. SSR 마커의 경우 유전체 상에서 반복서열의 횟수에 따라 다형성을 보이며 근연 종 내에서 마커의 호환성을 갖는다고 알려져 있다(Um et al. 2016). 따라서 본 연구에서 개발된 299개의 SSR 마커는 '향서 1호'와 '단타 PR' 참외 이외의 참외 계통에도 적용할 수 있을 것이라 판단되며, 새로운 참외 품종을 개발하기 위한 분자 마커로서 기여할 것으로 기대된다.

사사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(317011-04-3-HD020).

References

- Aka Kacar Y, Şimşek Ö, Solmaz I, Sari N and Mendi Y (2012) Genetic diversity among melon accessions (*Cucumis melo*) from Turkey based on SSR markers. *Genet Mol Research* 11:4622-4631
- Argyris JM, Ruiz-Herrera A, Madriz-Masis P, Sanseverino W, Morata J, Pujol M, Ramos-Onsins SE and Garcia-Mas J (2015) Use of targeted SNP selection for an improved anchoring of the melon (*Cucumis melo* L.) scaffold genome assembly. *BMC Genomics* 16:4
- Bae KM, Sim SC, Hong JH, Choi KJ, Kim DH, and Kwon YS (2015) Development of genomic SSR markers and genetic diversity analysis in cultivated radish (*Raphanus sativus* L.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 56:216-224
- Bang SW, Song KH, Sim SC and Chung SM (2016) Marker-assisted selection for monoecy in chamoe (*Cucumis melo* L.). *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 34:134-141
- Barabaschi D, Tondelli A, Desiderio F, Volante A, Vaccino P, Valè G and Cattivelli L (2016) Next generation breeding. *Plant Science* 242:3-13
- Chen C, Wu F, Xu J, Wang J, Liu L, Cao M, Zhou S, Rong T, Lu

- Y, Xu Y, Ali F and Liu Y (2013) Development and Characterization of Simple Sequence Repeat Markers Providing Genome-Wide Coverage and High Resolution in Maize. *DNA Research* 20:497–509
- Esteras C, Formisano G, Roig C, Díaz A, Blanca J, Garcia-Mas J, Gómez-Guillamón ML, López-Sesé AI, Lázaro A, Monforte AJ and Picó B (2013) SNP genotyping in melons: genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theoretical and Applied Genetics* 126:1285–1303
- Fukino N, Ohara T, Monforte AJ, Sugiyama M, Sakata Y, Kunihiisa M and Matsumoto S (2008) Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118:165–175
- Guo L, Gao Z and Qian Q (2014) Application of resequencing to rice genomics, functional genomics and evolutionary analysis. *Rice* 7:4
- Han BK, Rhee SJ, Jang YJ, Sim TY, Kim YJ, Park TS and Lee G (2016) Identification of a causal pathogen of watermelon powdery mildew in Korea and development of a genetic linkage marker for resistance in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 34:912–923
- Lim SH and Ha SH (2013) Marker development for the identification of rice seed color. *Plant Biotechnology Reports* 7:391–398
- Manley LJ, Ma D and Levine SS (2016) Monitoring Error Rates In Illumina Sequencing. *Journal of biomolecular techniques* : JBT 27:125–128
- Park G, Kim N and Park Y (2015) Genomics and Molecular Markers for Major Cucurbitaceae Crops. *Journal of Life Science* 25:1059–1071
- Park I, Kim J, Lee J, Kim S, Cho O, Yang K, Ahn J, Nahm S and Kim H (2013) Development of SSR markers by next-generation sequencing of Korean landraces of chamoe (*Cucumis melo* var. *makuwa*). *Molecular Biology Reports* 40:6855–6862
- Perez-de-Castro AM, Vilanova S, Canizares J, Pascual L, Blanca JM, Diez MJ, Prohens J and Pico B (2012) Application of Genomic Tools in Plant Breeding. *Current Genomics* 13: 179–195
- Ramamurthy RK and Waters BM (2015) Identification of fruit quality and morphology QTLs in melon (*Cucumis melo*) using a population derived from *flexuosus* and *cantalupensis* botanical groups. *Euphytica* 204:163–177
- Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, Auerbach RK and Gerstein MB (2011) The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biology* 12:125
- Sim SC, Hong JH, and Kwon YS (2015) DNA profiling of commercial pumpkin cultivars using simple sequence repeat polymorphism. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 56:811–820
- Sim SC, Nguyen NN, Kim N, Kim J and Park Y (2018) Whole-genome resequencing reveals genome-wide single nucleotide polymorphisms between orange-fleshed and green-fleshed melons. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 59:275–283
- Um Y, Jin ML, Kim OT, Kim YC, Kim SC, Chung KW, Kim S, Chung CM and Lee Y (2016) Identification of Korean Ginseng (*Panax ginseng*) Cultivars Using Simple Sequence Repeat Markers. *Plant Breeding and Biotechnology* 4:71–78
- Varshney RK, Nayak SN, May GD and Jackson SA (2009) Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* 27:522–530
- Winnepenninckx B, Backeljau T, De Wachter R (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9:407