엽록체 전장유전체 정보를 이용한 감자 야생종 *Solanum stoloniferum* 구별 분자 마커 개발

김수정 · 박태호

Comparison of the complete chloroplast genome sequence of *Solanum stoloniferum* with other *Solanum* species generates PCR-based markers specific for *Solanum stoloniferum*

Soojung Kim · Tae-Ho Park

Received: 11 June 2020 / Revised: 18 June 2020 / Accepted: 18 June 2020
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Solanum stoloniferum*, one of the wild tetraploid *Solanum* species belonging to the *Solanaceae* family, is an excellent resource for potato breeding owing to its resistance to several important pathogens. However, the sexual hybridization of *S. stoloniferum* with *S. tuberosum* (potato) is hampered due to the sexual incompatibility between the two species. To overcome this and introgress the various novel traits of *S. stoloniferum* in cultivated potatoes, cell fusion can be performed. The identification of the fusion products is crucial and can be achieved with the aid of molecular markers. In this study, the chloroplast genome sequence of *S. stoloniferum* was obtained by next-generation sequencing technology, and compared with that of six other *Solanum* species to identify *S. stoloniferum*-specific molecular markers. The length of the complete chloroplast genome of *S. stoloniferum* was found to be 155,567 bp. The structural organization of the chloroplast genome of *S. stoloniferum* was similar to that of the six other *Solanum* species studied. Phylogenetic analysis of *S. stoloniferum* with nine other *Solanaceae* family members revealed that *S. stoloniferum* was most closely related to *S. berthaultii*. Additional comparison of the complete chloroplast genome sequence of *S. stoloniferum* with that of five *Solanum* species revealed the presence of six InDels and

39 SNPs specific to *S. stoloniferum*. Based on these InDels and SNPs, four PCR-based markers were developed to differentiate *S. stoloniferum* from other *Solanum* species. These markers will facilitate the selection of fusion products and accelerate potato breeding using *S. stoloniferum*.

Keywords PCR-based marker, cpDNA, InDels, Potato, SNPs, *Solanum stoloniferum*

서 언

감자(*Solanum tuberosum* L.)는 전세계에서 네 번째로 생산량이 많은 가장 중요한 작물 중의 하나이며, 다양한 병원균의 기주식물이다. 따라서 감자 육종에서 다양한 야생종을 활용한 각종 병원균에 대한 저항성 품종 육성은 감자 품종 육종에서 가장 중요 목표이다(Pavek and Corsini 2001; Simko et al. 2007).

멕시코에서 자생하는 감자야생종 중의 하나인 *S. stoloniferum*은 괴경을 형성하며 4배체이다(Hawkes 1990; Pendinen et al. 2008). 또한, 감자역병, 감자바이러스Y 등에 저항성을 보여 감자 육종에 중요한 재료로 이용될 수 있는 것으로 알려져 있다(Flis et al. 2005; Valkonen et al. 2008; Wang et al. 2008). 하지만, EBN (Endosperm balance number)이 2로 EBN이 4인 4배체 감자와 생식적으로 교잡이 되지 않아 전통적인 육종 방법에는 적용할 수가 없다(Brown 1988; Cho et al. 1997; Ortiz and Ehlenfeldt 1992; Singsit and Hanneman 1991). 따라서, 감자 육종에서 중간 유용한 유전자의 도입에서 발생하는 이러한 생

S. Kim · T.-H. Park (✉)
대구대학교 과학생명융합대학 원예학과
(Department of Horticulture, Daegu University, Gyeongsan 38453, South Korea)
e-mail: thzoo@daegu.ac.kr

Table 1 Comparative analysis of the complete chloroplast genome sequence of *S. stoloniferum* with that of seven other *Solanum* species

Species	Accession no.	Total Length (bp)	GC content (%)	Total No. of genes	No. of tRNA	No. of rRNA	Reference
<i>S. stoloniferum</i>	MF471373	155,567	38	135	36	4	This study
<i>S. chacoense</i>	MF471371	155,532	38	136	36	4	Kim and Park (2019)
<i>S. berthaultii</i>	KY419708	155,533	38	137	39	4	Kim et al. (2018)
<i>S. nigrum</i>	KM489055	155,432	38	139	39	4	Cho and Park (2016)
<i>S. commersonii</i>	KM489054	155,525	37.5	133	33	4	Cho et al. (2016)
<i>S. tuberosum</i>	NC008096	155,296	37.5	131	36	4	Gargano et al. (2005)
<i>S. tuberosum</i>	KM489056	155,312	37	130	30	4	Cho et al. (2016)
<i>S. bulbocastanum</i>	DQ347958	155,371	38	133	30	4	Daniell et al. (2006)

*The data has been partially adopted from Kim and Park (2019).

리적 장벽을 극복하기 위해 체세포융합 방법이 하나의 해결책이 될 수 있으며(Bidani et al. 2007; Nouri-Ellouz et al. 2016), 이 경우 감자 육종 프로그램에서 염색체 유전체 정보를 이용한 적합한 유전자형을 선발하는 것이 필요하다(Chen et al. 2013, 2016; Cho and Park 2016; Cho et al. 2016; Molnár et al. 2017). 감자 품종 육성을 위해 이러한 체세포융합은 이미 다양한 야생종을 대상으로 한 연구에서 성공적인 것으로 보고된 바 있다(Barsby et al. 1984; Binding et al. 1982; Kim-Lee et al. 2005; Putie et al. 1986). 체세포융합에 의한 잡종이 육성되면 체세포융합 과정에서 생식적으로 불화합성인 두 종간에 다량의 염색체 그리고 세포질 DNA가 전이되기 때문에 이들을 대상으로 핵내 또는 세포질 DNA를 대상으로 한 특성을 구명하는 것이 필요하다(Cho and Park 2016; Cho et al. 2016; Guo et al. 2004).

염색체 유전체 (cpDNA)는 원형의 이중가닥 분자로 이루어져 있으며 광합성에 관여하는 세포내 소기관이다. 피자식물의 cpDNA 크기는 약 115 ~ 165 kb로 구조는 전형적으로 한 쌍의 IR (Inverted Repeat), LSC (Large Single Copy), SSC (Small Single Copy) 영역으로 4분할 되어 있으며, 대부분의 cpDNA는 다양한 단백질, rRNA, tRNA로 코딩되는 약 110~130개의 유전자로 구성되어 있다(Yurina and Odintsova 1998). 감자와 다수의 감자 야생종 cpDNA 또한 이미 보고된 바가 있으며(Table 1), 이들의 크기, 유전자 구성, 구조 등이 거의 유사하며, 다른 식물들과 같이 정확히 한 쌍의 IR과 LSC 및 SSC 영역으로 4분할 되어 있다(Palmer 1991; Raubeson and Jansen 2005; Saski et al. 2005; Sugiura et al. 1998). 그럼에도 불구하고 여전히 많은 식물의 cpDNA에서 유전자 순서의 재배치, 역위, SNP, InDel 등과 같은 변이가 발생하여 서로 다른 식물을 대상으로 완전한 cpDNA의 비교 분석하여 충분한 정보를 얻을 필요성이 여전히 존재하고 있다(Calsa Junior et al. 2004; Cho et al. 2015; Jheng et al. 2012; Kim et al. 2005; Saski et al. 2005).

*S. stoloniferum*의 전체 cpDNA는 이미 보고된 바가 있으나(Park 2018), 본 연구에서 조금 더 상세한 *S. stoloniferum*의

cpDNA에 대한 정보를 제공하며, 이와 가지과(Solanaceae) 다른 종의 cpDNA와 비교 분석하고 이를 통해 개발한 PCR 기반의 *S. stoloniferum* 특이적 분자마커 개발에 대한 결과를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료 및 DNA 추출

감자 야생종 *S. stoloniferum* 특이적 마커 개발을 위해 감자 품종 ‘탐라’(Tamra)와 감자 품종 육성 계통 중 하나인 PT56, 그리고 *S. stoloniferum* (SS), *S. acaule* (SA), *S. pinnatisectum* (SP), *S. berthaultii* (SB1), *S. mochiense* (SM1), *S. cardiophyllum* (SC1), *S. kurtzianum* (SK), *S. microdontum* (SM2), *S. commersonii* (SC2), *S. chacoense* (SC3), *S. candolleianum* (SC4), *S. brevicaulis* (SB2), *S. vernei* (SV2), *S. raphanifolium* (SR), *S. jamesii* (SJ), *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (ST2) 등의 감자 및 감자 야생종 18개 계통이 이용되었다. 이들 16개 야생종의 유전자은행 등록 번호는 각각 PI160224, PI310970, PI190115, PI310981, PI338616, PI341233, PI498422, PI310979, PI558050, PI201846, PI210035, PI205394, PI230468, PI246488, PI578236, PI566805이며, 실험에 이용된 모든 식물 재료는 국립식량과학원 고령지농업연구소로부터 분양 받아 이용되었다.

DNA 분리는 모든 식물 재료를 대상으로 하여 기내 식물체 또는 온실에서 유지되고 있는 식물체로부터 약 100mg의 잎을 채취하여 Genomic DNA Extraction kit (Plants) (RBC, New Taipei City, Taiwan)을 이용하여 수행되었다.

염색체 전장유전체 분석

*S. stoloniferum*의 염색체 DNA의 전장유전체(cpDNA) 분석은 *S. stoloniferum* 계통 중 하나(SS16)를 대상으로 DNA를 추출하여 MacroGen (MacroGen, Seoul, South Korea)의 Illumina

Hiseq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)의 플랫폼을 이용하여 수행되었다. cpDNA의 분석을 위해 파이젠의 생물정보학 파이프라인(<http://phyzen.com>) (Cho et al. 2015), 4.06 beta version CLC genome assembler (CLC Inc, Aarhus, Denmark), Nucmer (Kurtz et al. 2004) 등을 이용하였다. 전장유전체의 완성도는 보고된 *S. commersonii*의 cpDNA (KM489054)가 이용되었으며, 대표 컨티그들은 BLASTZ 분석 결과와 *S. commersonii*의 cpDNA (KM489054)와의 비교, 그리고 일부 영역에서의 편집을 토대로 하여 순서대로 정렬되었다(Cho et al. 2016; Schwartz et al. 2003). *S. stoloniferum*의 cpDNA에 포함되어 있는 유전자 분석은 DOGMA가 이용되었으며(Wyman et al. 2004), 원형의 *S. stoloniferum* cpDNA 전체 유전자지도는 OrganellarGenome DRAW (<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de>) 프로그램을 이용하였다(Lohse et al. 2013).

엽록체 전장유전체의 비교

본 연구 결과로 얻은 *S. stoloniferum*의 cpDNA와 NCBI (the National Center for Biotechnology Information)로부터 얻은 *S. tuberosum* (KM489056 및 NC008096), *S. berthaultii* (KY419708), *S. commersonii* (KM489054), *S. chacoense* (MF471371), *S. bulbocastanum* (DQ347958), *S. lycopersicum* (NC007898), *S. nigrum* (KM489055), *Capsicum annuum* (JX270811)의 cpDNA 등, 전체 10종의 cpDNA를 대상으로 MEGA 6.0을 이용하여 엽록체 코딩 서열을 분석하고(Tamura et al. 2013), 이를 기반으로 Swofford (2001)에 의해 제안된 방법에 따라 계통수 분석을 수행하였다. 또한, *Solanum* 속(genus)에 속한 다양한 종들 간의 cpDNA 비교 분석을 통한 마커 개발을 위해서 *S. stoloniferum*의 cpDNA와 함께 *S. chacoense* (MF471371), *S. berthaultii* (KY419708), *S. commersonii* (KM489054), *S. nigrum* (KM489055), *S. tuberosum* (KM489056)의 cpDNA를 대상을 EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)의 ClustalW2에 의해 다중 정렬이 수행되었다.

PCR 기반의 분자마커 개발

S. stoloniferum 특이적 InDel과 SNP가 존재하는 영역은 *S. stoloniferum* (MF471373), *S. chacoense* (MF471371), *S. berthaultii* (KY419708), *S. commersonii* (KM489054), *S. nigrum* (KM489055), *S. tuberosum* (KM489056) 등 전체 6종의 cpDNA 다중 정렬을 통해 구명되었다. *S. stoloniferum* 특이성을 검증하기 위하여 구명된 각각의 InDel 영역에서 프라이머를 디자인하여 PCR을 진행하였다. PCR은 Cho와 Park (2016)에 의한 방법으로 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany)를 이용하여 전체 18개의 유전자형 계통, a *S. tuberosum* breeding line (PT56), a potato variety ('Tamra'), *S. stoloniferum* (SS), *S. acaule* (SA), *S. pinnatisectum* (SP), *S. berthaultii* (SB1), *S. mochiense* (SM1), *S.*

cardiophyllum (SC1), *S. kurtzianum* (SK), *S. microdontum* (SM2), *S. commersonii* (SC2), *S. chacoense* (SC3), *S. candolleianum* (SC4), *S. brevicaulis* (SB2), *S. vernei* (SV2), *S. raphanifolium* (SR), *S. jamesii* (SJ), *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (ST2)을 대상으로 총 25ul 볼륨 (20 ng genomic DNA, 0.5 mM dNTPs, 10 pMol each primer, 1 U Taq polymerase (Genetbio, Daejeon, South Korea))으로 진행되었다. PCR의 결과는 핵산염색용액인 RedSafe (Intron Biotechnology, Seongnam, South Korea)를 이용하여 1% agarose gel에서 확인하였다.

S. stoloniferum 특이적 SNP 마커의 경우, 우선적으로 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)을 이용하여 각각의 SNP 영역에 적합한 제한효소의 유무, 즉 6종의 염기서열 다중 비교에서 *S. stoloniferum*의 단편만을 절단하고 나머지 5종의 단편은 절단하지 못하거나, 반대로 5종의 단편은 절단하나 *S. stoloniferum*의 단편은 절단하지 못하는 제한효소를 확인한 후 SNP 영역을 포함하여 PCR에 의한 DNA 단편이 증폭될 수 있도록 프라이머를 디자인하였다. PCR과 전기영동은 앞서 언급된 바와 같이 진행되었으며, 특정 SNP 영역을 대상으로 한 프라이머가 PCR에 의해 18개 계통의 DNA를 모두 증폭하였을 때, 확인된 제한효소를 처리하여 반응시킨 후 1% agarose gel에서 DNA 단편의 다형성을 확인하였다.

결과 및 고찰

감자 야생종 *S. stoloniferum* 엽록체 전장유전체 완성

앞서 보고된 바와 같이 *S. stoloniferum* 엽록체 전장유전체(cpDNA)가 NGS(Next-Generation Sequencing) 기술에 의해 완료되었다(Park 2018). Illumina의 PE 표준 프로코콜에 의해 평균 길이가 297.3 bp인 염기서열 총 691,727,590 bp의 데이터가 생산되었다. 이를 기반으로 *S. commersonii*의 cpDNA 전체 염기서열(KM489054, Cho et al. 2016)을 커버하는 엽록체 전장유전체를 조립하여 3개의 대표 컨티그를 형성하였으며 BLASTZ 분석에 의해 순서대로 정렬이 이루어졌다(Schwartz et al. 2003) (Fig. 1).

조립된 염기서열에서 추정되는 오류는 최종 조립과정에서 137.04x의 데이터를 맵핑하는 과정에서 교정되었으며, PCR과 ABI3730에 의한 BigDye Terminator Cycle Sequencing에 의해 한 쌍의 inverted repeat 영역(IRs), small single copy 영역(SSC), large single copy 영역(LSC) 간의 경계 부분의 염기서열을 포함하는 다수의 영역의 염기서열을 확인하였다. Park (2018)에 의해 부분적으로 간략히 보고된 바에 따르면, 최종적인 *S. stoloniferum*의 cpDNA는 대다수 일반적인 식물의 cpDNA와 같이 원형의 이중가닥 분자로 이루어져 있으며

Reference chloroplast genome: *S. commersonii* (KM489054: 155,525bp)

Solanum stoloniferum (MF471373: 155,567bp)

LSC

IRa

SSC

IRb

Fig. 1 Assembly result of the complete chloroplast genome sequence of *S. stoloniferum*. Four contigs representative of the chloroplast genome of *S. stoloniferum* have been compared with the corresponding regions in the chloroplast genome of *S. commersonii* (KM489054). Blue and yellow bars indicate contig matching with the reference sequence in the forward and reverse orientations, respectively

Fig. 2 Gene map of *S. stoloniferum* chloroplast genome. Genes on the outside of the map are transcribed in the clockwise direction and genes on the inside of the map are transcribed in the counter-clockwise direction

총 cpDNA의 크기는 155,567 bp였다(GeneBank accession no. MF471373). 구조는 18,374 bp의 SSC 영역과 86,007 bp의 LSC 영역을 연결하는 25,592 bp의 IR 영역으로 구성된 전형적인 4분할 구조이며, 다른 *Solanum* 속의 다른 종들과 비교할 때

약간 길었다(Table 1). *S. stoloniferum*의 cpDNA는 총 158개의 유전자로 구성되어 있으며, 그 중 23개는 IR 영역에서 중복된 것이었다(Fig. 2). 여기에는 105개의 단백질 코딩 유전자, 45개의 tRNA, 8개의 rRNA가 포함되어 있으며, 단백질 코딩

Fig. 3 Phylogenetic tree of *S. stoloniferum* and nine *Solanaceae* family members constructed using the maximum-likelihood method. The phylogenetic tree was constructed by aligning the protein-coding sequences in each chloroplast genome. The numbers on each node indicate the bootstrap values from 1,000 replicates

유전자, tRNA, rRNA 각각 10개, 9개, 4개가 IR 영역에서 역배열로 중복되어 있었다(Table 1, Fig. 2). 전체 염기서열 중 59.4%가 평균 584.4 bp의 크기로 코딩 영역이었으며, 단백질 코딩유전자와 RNA가 각각 평균 766.6 bp, 223.7 bp의 크기로 51.7%와 7.6%의 비율로 분포되어 있었다. GC의 함량은 37.87%이며, 유전자, tRNA, rRNA 등의 개수, 순서 등이 모두 다른 *Solanum* 속의 종들과 유사한 것으로 나타났다(Table 1) (Cho and Park 2016; Cho et al. 2016; Kim et al. 2018; Kim and Park, 2019).

엽록체 전장유전체 비교 및 계통수

본 연구결과로 얻은 *S. stoloniferum*의 cpDNA와 가지과에 속하는 9종의 cpDNA의 코딩 서열을 이용하여 계통수를 분석하였다(Fig. 3). 분석에 이용된 방법(maximum likelihood 및 parsimony법)은 체계적인 분류의 결과를 보여주었을 뿐만 아니라 높은 부트스트랩(bootstrap) 값은 계통수의 결과를 뒷받침 해 주었다. 결과적으로 계통수에서 *S. stoloniferum*과 근접한 *Solanum* 종은 *S. berthaultii*와 *S. tuberosum*이었다.

*S. stoloniferum*을 다른 *Solanum* 속에 속하는 종들과 구분할 있는 분자마커를 개발하기 위해 *S. stoloniferum*의 cpDNA를 *Solanum* 속에 속하는 다른 5종의 cpDNA 전체와 EMBL의 ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)를 이용하여 다중 정렬을 한 결과 앞서 보고된 바와 같이 다수의 InDel과 SNP 영역을 발견할 수 있었다(Chung et al. 2006; Cho and Park 2016; Kim et al. 2018; Kim and Park 2019). 이들 중, 대부분은 계통수의 결과에 나타난 것과 같이 유연관계가 상대적으로 먼 *S. nigrum*에 의한 것이며(Fig. 3), *S. stoloniferum* 특이적으로 InDel과 SNP 기반의 마커를 개발하는데 활용할 수 있을 것으로 판단되는 영역이 각각 6개, 39개로 나타났다.

S. stoloniferum 특이적 분자마커 개발

6종의 cpDNA를 대상으로 한 다중 정렬의 결과로 얻은 다수의 InDel과 SNP는 *S. stoloniferum* 특이적 마커를 개발하기는 제한적이며, 이들 중 *S. stoloniferum*에는 특이적이며 나머지 5종은 일치하는 InDel과 SNP를 대상으로만 특이적 마커를 개발하는데 적용할 수 있다. 이들 특이적 InDel과 SNP 중, SNP의 경우 앞서 보고된 바와 같이 *Solanum* 종의 전체 cpDNA 영역 중, 코딩영역과 비코딩영역에서 거의 비슷하게 분포하고 있었으며, InDel의 경우 코딩영역보다는 비코딩영역에서 조금 더 많이 분포하고 있었다(Cho and Park 2016; Chung et al. 2006; Kim et al. 2018; Kim and Park 2019).

InDel 영역을 대상으로 프라이머를 디자인하여 PCR을 할 경우 분자마커의 다형성에 의해 효과적으로 식물종을 구별할 수 있는 분자마커를 개발하여 적용되고 있다(Cho et al. 2015; Garcia-Lor et al. 2013; Yamaki et al. 2013). 본 연구에서는 앞서 언급된 6개의 *S. stoloniferum* 특이적 InDel 영역 중 비코딩영역(*rps18-rpl20*)에 존재하는 오직 하나(SS_InDel_19)만이 *S. stoloniferum*을 다른 종과 명확히 구별하기 충분하였다. 이 InDel 영역의 경우 *S. stoloniferum*이 *S. nigrum*과 비교하여 32 bp가 추가적으로 삽입되어 있었으며, 다른 4종 보다는 16 bp가 추가적으로 삽입되어 있었다(Fig. 4). 따라서, 이 InDel 영역 특이적인 프라이머를 제작하여(Table 2), *S. stoloniferum*을 포함한 총 18종을 대상으로 PCR 한 결과 예상한 바와 같이 *S. stoloniferum* 특이적인 마커를 개발할 수 있었다(Fig. 5A). Fig. 5A에서 SS에서 두개의 밴드 그리고 다른 종에서 같은 크기의 밴드를 포함하여 하나 또는 2개의 밴드가 나타난 것은 프라이머를 디자인한 InDel 영역의 염기서열과 동일한 염기서열이 InDel 영역 인근에 반복서열로 존재하는 것이 확인된 결과로 나타난 것이다.

SS_InDel_19 (*rps18-rpl20*)

```

SS16      AATTACAAGAATCTAGATTTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAAT
SC3-12    AATTACAAGAATCTAG-----ATTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAAT
Sber      AATTACAAGAATCTAG-----ATTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAAT
Scom      AATTACAAGAATCTAG-----ATTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAAT
Snig      AATTACAAGAATCTAG-----ATTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAAT
Stub      AATTACAAGAATCTAG-----ATTGAGTGAATCTAGATTGAGTGAAT

```

SS_SNP_20 (*rpl16-rps3*)

```

SS16      TCATTGGATAGAAGGGAAGACAAGTAGTCAAATTATTCCGTCTAGAAATATCCAAAT
SC3-12    TCATTGGATAGAAGGGAAGACAAGTAGTCAAATTATTCCCTCGTCTAGAAATATCCAAAT
Sber      TCATTGGATAGAAGGGAAGACAAGTAGTCAAATTATTCCCTCGTCTAGAAATATCCAAAT
Scom      TCATTGGATAGAAGGGAAGACAAGTAGTCAAATTATTCCCTCGTCTAGAAATATCCAAAT
Snig      TTATTGGATAGAAGGGAAGACAAGTAGTAAATTATTCCCTCGTCTAGAAATATCCAAAT
Stub      TCATTGGATAGAAGGGAAGACAAGTAGTCAAATTATTCCCTCGTCTAGAAATATCCAAAT

```

SS_SNP_25 (*ndhF*)

```

SS16      ATCAAAAAATGAGTAAATTCAGCTAATCCTCTTATCCACCAACAAAGAATCTTGATA
SC3-12    ATCAAAAAATGAGTAAATTCAGCTAATCCTCTTATCCACCAACAAAGAATCTTGATA
Sber      ATCAAAAAATGAGTAAATTCAGCTAATCCTCTTATCCACCAACAAAGAATCTTGATA
Scom      ATCAAAAAATGAGTAAATTCAGCTAATCCTCTTATCCACCAACAAAGAATCTTGATA
Snig      ATCAAAAAATGAGTAAATTCAGCTAATCCTCTTATCCACCAACTAAGAATCTTGATA
Stub      ATCAAAAAATGAGTAAATTCAGCTAATCCTCTTATCCACCAACAAAGAATCTTGATA

```

SS_SNP_30 (*ndhH*)

```

SS16      GCATTCTAAATTTTCGTAAGGCCCTCCTGGAATTCCTTCTAGAGCCTGTTGAATAATCT
SC3-12    GCATTCTAAATTTTCGTAAGGCCCTCCTGGAATTCCTTCCAGAGCCTGTTGAATAATCT
Sber      GCATTCTAAATTTTCGTAAGGCCCTCCTGGAATTCCTTCCAGAGCCTGTTGAATAATCT
Scom      GCATTCTAAATTTTCGTAAGGCCCTCCTGGAATTCCTTCCAGAGCCTGTTGAATAATCT
Snig      GGATTCTAAATTTTCGTAAGGCCCTCCTGGAATTCCTTCCAGAGCCTGTTGAATAATCT
Stub      GCATTCTAAATTTTCGTAAGGCCCTCCTGGAATTCCTTCCAGAGCCTGTTGAATAATCT

```

Fig. 4 Multiple alignment of the intergenic or intragenic regions of the sequences containing InDels and SNPs aided in the development of PCR-based markers specific for *S. stoloniferum*. The chloroplast genome sequences of *S. stoloniferum* (SS16: MF471373), *S. chacoense* (SC3-12: MF471371), *S. berthaultii* (Sber: KY419708), *S. commersonii* (Scom: KM489054), *S. nigrum* (Snig: KM489055), and *S. tuberosum* (Stub: KM489056) were used. The InDel- and SNP-containing regions of *S. stoloniferum* are highlighted, and the restriction sites are indicated in bold, red letters

Table 2 The primers and restriction enzymes used to generate *S. stoloniferum*-specific markers

Marker name	Region	S ^a	Primer sequence	Size (bp) ^b	RE ^c
SS_InDel_19	<i>rps18-rpl20</i> (Intergenic)	F	CAAGCGATCTTTTCGTAGGC	655	as
		R	TCTGTACAAGAGACAGTTGC		
SS_SNP_20	<i>rpl16-rps3</i> (Intergenic)	F	AGTGATGGGTTGGTTATTAG	377	<i>MnII</i>
		R	GAATGGATCAGAGAAGGCAG		
SS_SNP_25	<i>ndhF</i> (Intragenic)	F	GACGGAACATAAGCTAAAT	381	<i>AluI</i>
		R	GTTGTTTCAGTCAGTATAGC		
SS_SNP_30	<i>ndhH</i> (Intragenic)	F	AAACGCTCTGGTCTCCTATC	402	<i>MaeI</i>
		R	CAGTAAATTGGGGTTTATCG		

^aF and R indicate the forward and reverse strand of primers, respectively.

^bThe expected size of the PCR fragments were obtained based on the chloroplast sequence of *S. stoloniferum*.

^cRestriction enzymes for generating *S. stoloniferum*-specific markers. ‘as’ indicates allele-specific marker.

SNP의 경우 *S. stoloniferum* 특이적인 것으로 확인된 39개의 영역 중 일부를 대상으로 마커 개발에 적용하였다. SNP를 기반으로 SNP를 포함하는 영역을 PCR로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여 PCR을 수행한 후 PCR 결과물을 대상으로 SNP 서열에서 DNA 단편을 절단할 수 있는 적절한 제한효소를 이용하여 개발하는 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence; Konieczny and Ausubel 1993) 마커는

Solanum 속에 속한 종을 구별하거나 같은 종내 다른 유전형질을 구별하는데 다형성을 나타낼 뿐만 아니라(Cho and Park 2016; Cho et al. 2016; Park et al. 2005; Smilde et al. 2005; Uribe et al. 2014), 다른 식물 종에서도 활용이 되고 있다(Komori and Nitta 2005; Uncu et al. 2015; Wang et al. 2017). 본 연구에서 구명된 다수의 *S. stoloniferum* 특이적인 SNP를 대상으로 프라이머를 제작하고 적합한 제한효소를 구명하였다. 여기서 이

Fig. 5 PCR-based markers for the differentiation of *S. stoloniferum* from other *Solanum* species. A: SS_InDel_19. B: SS_SNP_20. C: SS_SNP_25. D: SS_SNP_30. The four markers are all positively specific to *S. stoloniferum*. M, PT56, ‘Tamra’, SS, SA, SP, SB1, SM1, SC1, SK, SM2, SC2, SC3, SC4, SB2, SV2, SR, SJ, and ST2 indicate the size marker ladder, a *S. tuberosum* breeding line, a potato variety, *S. stoloniferum* (PI160224), *S. acaule* (PI310970), *S. pinnatisectum* (PI190115), *S. berthaultii* (PI310981), *S. mochiquense* (PI338616), *S. cardiophyllum* (PI341233), *S. kurtzianum* (PI498422), *S. microdontum* (PI310979), *S. commersonii* (PI558050), *S. chacoense* (PI201846), *S. candolleianum* (PI210035), *S. brevicaulum* (PI205394), *S. vernei* (PI230468), *S. raphanifolium* (PI246488), *S. jamesii* (PI578236), and *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (PI566805), respectively

용되는 제한효소는 각각의 PCR 결과물에서 *S. stoloniferum*의 단편만을 절단하고 나머지 종들은 절단하지 못하거나 반대로 *S. stoloniferum* 단편은 절단하지 못하고 나머지 종들은 절단하는 것이어야 한다. 따라서 제작된 프라이머를 *S. stoloniferum*을 포함하는 총 18종에 적용하여 PCR을 진행한 후 결과물에 특정 제한효소를 처리한 결과 최종적으로 3개의 SNP 기반의 CAPS 마커를 개발하였다(Table 2, Fig. 5B, 5C and 5D).

엽록체 전장유전체의 특성을 구명하고자 하는 분자마커의 개발은 진화적인 측면에서의 연구뿐만 아니라 다양한 감자 야생종을 활용한 감자 품종 육성에도 필요하다(Bohs and Olmstead 1997; Hosaka and Sanetomo 2012). 체세포 융합이나 식물조직배양에서의 재분화 과정에서 cpDNA의 무작위 배분과 mtDNA (mitochondrial genome)의 높은 재조합 빈도는 *Solanum* 종을 포함하여 다양한 식물 종에서 보고되었다(Chen et al. 2013; Cho et al. 2016; Lössl et al. 2000; Mohapatra et al. 1998; Smyda-Dajmund et al. 2016; Xiang et al. 2004). 결론적으로 본 연구에서 개발된 InDel과 SNP 기반의 마커는 *S.*

*stoloniferum*을 다른 *Solanum* 종과 구별하는데 이용될 수 있으며, *S. stoloniferum*과 *S. tuberosum* 간에 체세포 융합을 할 경우 적합한 엽록체형을 선발하고 *S. stoloniferum*을 이용한 감자 품종 육성에 기여할 것이다.

적 요

*Solanum stoloniferum*은 가지과에 속하는 4배체 감자 야생종의 하나로 감자 육종에서 다양한 병원균에 대한 저항성으로 인하여 좋은 재료로 활용되고 있다. 하지만, 감자와의 생식적 장벽으로 인하여 감자와 직접적인 교배를 통해 육종을 할 수 없어 이를 극복하기 위해 체세포 융합 등의 방법이 이용될 수 있다. 세포 융합 이후에는 분자마커를 이용하여 적합한 융합체 선발이 필요한데 이를 위해 본 연구에서는 *S. stoloniferum* 특이적 마커를 개발하기 위하여 *S. stoloniferum*의 엽록체 전장 유전체 정보를 분석하고 이를 기반으로 한 마커를 개발하였다. *S. stoloniferum*의 cpDNA 총 길이는

155,567 bp이고, 6개의 다른 *Solanum* 종과의 비교를 통해 *S. stoloniferum*가 *S. berthaultii*와 가장 가까운 유연관계인 것을 확인하였다. 다섯 종의 *Solanum*과의 엽록체 전장 유전체 다중 정렬에서는 *S. stoloniferum* 특이적인 6개의 InDel과 39개의 SNP를 구명하였으며, 이 정보를 이용하여 최종적으로 네 개의 *S. stoloniferum* 특이적인 PCR 기반의 분자마커를 개발하였다. 이 마커들은 적절한 체세포 융합체를 선발하고 *S. stoloniferum*을 이용한 감자 품종 육성에 기여할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청의 재원으로 농림식품기술기획평가원 Golden Seed 프로젝트 사업(식량종자사업단, 과제번호: 213009-05-4-WT411)의 지원을 받아 수행되었음.

References

- Barsby TL, Shepard JF, Kemble RJ, Wong R (1984) Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. Plant Cell Rep 3:165–167
- Bidani A, Nouri-Ellouz O, Lakhous L, Shihachakr D, Cheniclet C, Mahjoub A, Drira N, Gargouri-Bouazid R (2007) Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum berthaultii* and *Solanum tuberosum* L. showed recombinant plastome and improved tolerance to salinity. Plant Cell Tiss Organ Cult 91:179–189
- Binding H, Jain SM, Finger J, Mordhorst G, Nehls R, Gressel J (1982) Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. Theor Appl Genet 63:273–277
- Bohs L, Olmstead RG (1997) Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. Syst Bot 22:5–17
- Brown CR (1988) Characteristics of 2N pollen producing triploid hybrids between *Solanum stoloniferum* and cultivated diploid potatoes. Am Potato J 65:75–84
- Calsa Junior T, Carraro DM, Benatti MR, Barbosa AC, Kitajima JP, Carrer H (2004) Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome. Curr Genet 46:366–373
- Chen L, Guo X, Wang H, Xie C, Cai X, He L, Zhou J, Liu J (2016) Tetrasomic inheritance pattern of the pentaploid *Solanum chacoense* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid (resistant to bacterial wilt) revealed by SSR detected alleles. Plant Cell Tissue Org Cult 127:315–323
- Chen L, Guo X, Xie C, He L, Cai X, Tian L, Song B, Liu J (2013) Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. Chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. Theor Appl Genet 126:1861–1872
- Cho KS, Cheon KS, Hong SY, Cho JH, Im JS, Mekapogu M, Yu YS, Park TH (2016) Complete chloroplast genome sequences of *Solanum commersonii* and its application to chloroplast genotype in somatic hybrids with *Solanum tuberosum*. Plant Cell Rep 35:2113–2123
- Cho HM, Kim-Lee HY, Om YH, Kim JK (1997) Influence of endosperm balance number (EBN) in interploidal and interspecific crosses between *Solanum tuberosum* dihaploids and wild species. Korean J Breed 29:154–161
- Cho KS, Park TH (2016) Complete chloroplast genome sequence of *Solanum nigrum* and Development of markers for the discrimination of *S. nigrum*. Hort Environ Biotechnol 57:69–78
- Cho K-S, Yun B-K, Yoon Y-H, Hong S-Y, Mekapogu M, Kim K-H, Yang T-J (2015) Complete chloroplast genome sequence of tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and comparative analysis with common Buckwheat (*F. esculentum*). PloS One 10:e0125332
- Chung HJ, Jung JD, Park HW, Kim JH, Cha HW, Min SR, Jeong WJ, Liu JR (2006) The complete chloroplast genome sequences of *Solanum tuberosum* and comparative analysis with Solanaceae species identified the presence of a 241-bp in cultivated potato chloroplast DNA sequence. Plant Cell Rep 25:1369–1379
- Daniell H, Lee S-B, Grevich J, Saski C, Quesada-Vargas T, Guda C, Tomkins J, Jansen PK (2006) Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. Theor Appl Genet 112:1503–1518
- Flis B, Henning J, Strzelczyk-Żyta D, Gebhardt C, Marczewski W (2005) The *Ry-fsto* gene from *Solanum stoloniferum* from extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. Mol Breed 15:95–101
- Garcia-Lor A, Curk F, Snoussi-Trifa H, Morillon R, Ancillo G, Luro F, Navarro L and Ollitrault P (2013) A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. Ann Bot 111:1–19
- Gargano D, Vezzi A, Scotti N, Gray JC, Valle G, Grillo S, Cardi T (2005) The complete nucleotide sequence genome of potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) chloroplast DNA. In the abstract of the 2nd Solanaceae Genome Workshop, p. 107
- Guo WW, Cai XD, Grosser JW (2004) Somatic cell cybrids and hybrids in plant improvement, p. 635–659. In: H. Daniell, C. Chase (eds.) Molecular biology and biotechnology of plant organelles. Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Hawkes JG (1990) The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. London, UK: Belhaven Press
- Hosaka K, Sanetomo R (2012) Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. Theor Appl Genet 125:1237–1251
- Jheng C-F, Chen T-C, Lin J-Y, Chen T-C, Wu W-L, Chang C-C (2012) The comparative chloroplast genomic analysis of photosynthetic orchids and developing DNA markers to distinguish *Phalaenopsis* orchids. Plant Sci 190:62–73

- Kim KJ, Choi KS, Jansen RK (2005) Two chloroplast DNA inversion originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (Asteraceae). *Mol Biol Evol* 22:1783–1792
- Kim S, Cho K-S, Park T-H (2018) Development of PCR-based markers for discriminating *Solanum berthaultii* using its complete chloroplast genome species. *J Plant Biotechnol* 45:207–216
- Kim S, Park T-H (2019) PCR-based markers developed by comparison of complete chloroplast genome sequences discriminate *Solanum chacoense* from other *Solanum* species. *J Plant Biochem* 46:79–87
- Kim-Lee H, Moon JS, Hong YJ, Kim MS, Cho HM (2005) Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Amer J Potato Res* 82:129–137
- Komori T, Nitta N (2005) Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. *Breed Sci* 55:93–98
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4:403–410
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5:R12
- Lohse M, Drechsel O, Kahlau S, Bock R (2013) Organellar GenomeDRAW – a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Res* 41:W575–W581
- Lössl A, Götz A, Braun A, Wenzel G (2000) Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica* 116:221–230
- Mohapatra T, Kirti PB, Dinesh Kumar V, Prakash S, Chopra VL (1998) Random chloroplast segregation and mitochondrial genome recombination in somatic hybrid plants of *Diploaxis catholica* + *Brassica juncea*. *Plant Cell Rep* 17:814–818
- Molnár I, Besenyi E, Thieme R, Thieme T, Aurori A, Baricz A, Banciu HL, Rakory-Tican E (2017) Mismatch repair deficiency increases the transfer of antibiosis and antixenosis properties against Colorado potato beetle in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense*. *Pest Manage Sci* 73:1428–1437
- Nouri-Ellouz O, Triki MA, Jbir-Koubaa R, Louhichi A, Charfeddine S, Drira N, Gargouri-Bouzid R (2016) Somatic hybrids between potato and *S. berthaultii* show partial resistance to soil-borne fungi and potato virus Y. *J Phytopathol* 164:485–496
- Ortiz R, Ehlenfeldt MK (1992) The importance of endosperm balance number in potato breeding and the evolution of tuber-bearing *Solanum* species. *Euphytica* 60:105–113
- Palmer JD (1991) Plastid chromosomes: structure and evolution, p. 5–53. In: L. Bogorad, K. Vasil (eds.) *The molecular biology of plastids*. Academic Press, San Diego, USA
- Park T-H (2018) Chloroplast genome sequence of the wild tetraploid relative *Solanum stoloniferum*. *Mitochondr DNA Part B* 3:416–418
- Park T-H, Gros J, Sikkema A, Vleeshouwers VGAA, Muskens M, Allefs S, Jacobsen E, Visser RGF, van der Vossen EAG (2005) The late blight resistance locus *Rpi-blb3* from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight *R* gene cluster on chromosome 4 of potato. *Mol Plant-Microb Interact* 18:722–729
- Pavek JJ, Corsini DL (2001) Utilization of potato genetic resources in variety development. *Amer J Potato Res* 78:433–441
- Pendinen G, Gavrilenko T, Jiang J, Spooner DM (2008) Allopolyploid speciation of the Mexican tetraploid potato species *Solanum stoloniferum* and *S. hjertingii* revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome* 51:714–720
- Puite KJ, Roest S, Pijnacker LP (1986) Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Rep* 5:262–265
- Raubeson LA, Jansen RK (2005) Chloroplast genomes of plants, p. 45–68. In: H. Henry (ed.) *Diversity and evolution of plants: genotypic and phenotypic variation in higher plants*. CABI Publishing, Wallingford, UK
- Saski C, Lee SB, Daniell H, Wood TC, Tomkins J, Kim HG, Jansen RK (2005) Complete chloroplast genome sequence of *Glycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Mol Biol* 59:309–322
- Schwartz S, Kent WJ, Smit A, Zhang Z, Baertsch R, Hardison RC, Haussler D, Miller W (2003) Human-mouse alignments with BLASTZ. *Genome Res* 13:103–107
- Simko I, Jansky S, Stephenson S, Spooner D (2007) Genetics of resistance to pests and disease, p. 117–155. In: D. Vreugdenhil et al. (eds.) *Potato biology and biotechnology*. Elsevier, Oxford, UK
- Singsit C, Hanneman RE Jr (1991) Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Rep* 9:475–478
- Smilde WD, Brigneti G, Jagger L, Perkins S, Jones JDG (2005) *Solanum mochiense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theor Appl Genet* 110:252–258
- Sugiura M, Hirose T, Sugita M (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplast. *Annu Rev Genet* 32:437–459
- Swofford DL (2001) *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland
- Symda-Dajmund P, Śliwka J, Wasilewicz-Flis I, Jakuczun H, Zimnoch-Guzowska E (2016) Genetic composition of inter-specific potato somatic hybrids and autofused 4x plants evaluated by DArT and cytoplasmic DNA markers. *Plant Cell Rep* 35:1345–1358
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Uncu AT, Celik I, Devran Z, Ozkaynak E, Frary A, Frary A, Doganlar S (2015) Development of a SNP-based CAPS assay for the *Me1* gene conferring resistance to root knot nematode in pepper. *Euphytica* 206:393–399
- Uribe P, Jansky S, Halterman D (2014) Two CAPS markers predict *Verticillium* wilt resistance in wild *Solanum* species. *Mol Breeding* 33:465–476

- Valkonen JPT, Wiegmann K, Hämäläinen JH, Marczewski W, Watanabe KN (2008) Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to Potato virus Y controlled by *Rysto* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Ann Appl Biol* 152:121–130
- Wang M, Allefs S, van den Berg RG, Vleeshouwers VGAA, van der Vossen EAG, Vosman B (2008) Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor Appl Genet* 116:933–943
- Wang Y, Liu W, Xu L, Wang Y, Chen Y, Luo X, Tang M, Liu L (2017) Development of SNP markers based on transcriptome sequences and their application in germplasm identification in radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol Breeding* 37:26
- Wyman SK, Jansen RK, Boore JL (2004) Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20:3252–3255
- Xiang F, Xia G, Zhi D, Wang J, Nie H, Chen H (2004) Regeneration of somatic hybrids in relation to the nuclear and cytoplasmic genomes of wheat and *Setaria italica*. *Genome* 47:680–688
- Yamaki S, Ohyangi H, Yamasaki M, Eiguchi M, Miyabayashi T, Kubo T, Kurata N and Nonomura K (2013) Development of INDEL markers to discriminate all genome types rapidly in the genus *Oryza*. *Breeding Sci* 63:246–254
- Yurina NP, Odintsova MS (1998) Comparative structural organization of plant chloroplast and mitochondrial genomes. *Russ J Genet* 34:5–22