

Genetic Analysis of Polymorphic DNA Markers in Cucumber

Sun Young Lee and Sang-Min Chung*

Department of Life Science, Dongguk University, Seoul, 100-715, Korea

Received December 15, 2010 / Accepted December 23, 2010

DNA marker is a powerful tool for plant genetics and breeding. In this study, 995 SSR markers were employed with chilling resistant cucumber, known as 'NC76', and chilling susceptible cucumber, known as 'GY14'. Using 2% agarose gel electrophoresis, 145 SSR markers were identified as length variation markers between 'NC76' and 'GY14'. The SSR markers that showed no length polymorphism were then screened using high resolution melting analysis technique and additional 30 polymorphic SSR markers were identified. As a preliminary evaluation for mapping, 20 markers among these 175 markers were employed to a F₂ population of 'NC76' x 'GY14' cross. Linkage analysis revealed 13 markers that joined into six linkage groups and seven markers that remained unlinked. This result indicates that these 175 markers could be used for construction of a genetic map using a cross between 'NC76' and 'GY14' for further investigation in developing markers related to resistance to chilling in cucumbers.

Key words : Simple sequence repeat (SSR), high resolution melting analysis (HRM), DNA marker, cucumber

서 론

최근 분자 마커 기술은 작물의 유전 현상 연구 및 육종에 널리 이용되고 있다. DNA를 제한효소에 의해 절단된 단편의 크기 비교를 통하여 다형성을 확인하는 RFLP (restriction fragment length polymorphisms)와 PCR 증폭을 이용한 DNA 단편 길이 다형성을 보이는 AFLP (amplified fragment length polymorphisms), RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeat) 등이 여러 주요 작물의 유전관계분석에 이용되어 왔다[1,7,9]. 이 중 SSR 마커는 다형성을 보이는 비율이 상대적으로 높은 마커로 여러 작물에서 주요 형질과 연관된 마커가 개발되었고 또한 유전자원 분석에도 많이 사용되어 왔다[1]. 하지만 SSR 마커의 다형성은 증폭된 DNA 크기 차이를 비교하는 분석이 필요한 방법이므로 1-2 염기서열 크기 차이는 아가로스 겔에서는 분석이 어렵다. 또한 증폭된 DNA 서열 중 크기차이가 아닌 염기서열 치환 다형성은 아가로스 겔에서는 구분이 가능하지 않은 단점을 가진다.

최근 많이 주목 받는 SNP (single nucleotide polymorphism) 마커는 다른 분자 마커에 비해 상대적으로 많은 다형성 유전자좌를 제공해 줌으로써 연구자들에게 유용한 도구로 활발하게 이용되고 있다[3]. 이러한 SNP 마커를 분석하는 기술들의 발달 또한 빠르게 이루어 지고 있고 그 중 하나인 high resolution melting analysis (HRM) 기술은 sequencing을 통한 직접적인 염기서열변이 분석 방법과는 달리 DNA 조

각의 melting (denaturation) 온도 차이를 비교하여 염기서열 다형성을 추정하거나 판별하는 효과적인 기술이다[11]. 이 기술은 상보적 이중가닥 DNA가 변성(denaturation)되어 단일 가닥 DNA로 나뉘어질 때 이중가닥 DNA 특이적으로 결합하고 있던 형광염료의 결합이 줄어들면서 점점 형광이 약해지는 것을 계속적으로 측정해 그래프(변이곡선)로 제공한다. 염기 종류에 따라 melting되는 온도가 다르기 때문에 염기서열 차이에 의해 나타나는 다른 melting curve를 이용해 단일 염기 변화도 확인이 가능하다. 이는 SSR 마커의 1-2 염기서열 크기 차이와 염기서열 치환 차이도 구분이 가능한 기술이다. 따라서 기존 마커 또는 새로운 마커를 HRM 적용 가능 마커로 개발하는 연구가 여러 작물의 연구에서 진행되고 있다[1].

오이(*Cucumis sativus* L.)는 내냉성이 약해 10~12°C 이하에서는 생육이 크게 억제된다. 0~12°C 정도에는 병해에도 약하기 때문에 세균성, 곰팡이성 전염에 의해 피해를 입을 수 있으므로 오이의 내냉성 유전자가 관심의 대상이 되고 있다[2,4,5]. 이러한 냉해 저항성 유전자는 작물의 생산성을 증가시키고 작물의 재배 가능 지역을 확장하는데 도움을 줄 수 있으므로 내냉성 육종을 위한 유전자 탐색 및 연관 마커 개발 연구가 필요하다고 판단된다.

본 연구에서는 오이 작물의 내냉성 유전 연구를 위한 기초 작업으로 내냉성의 'NC76' 계통과 감수성의 'GY14' 계통 간 DNA 다형성을 기존에 개발된 995개의 오이 SSR 마커[8]를 이용하여 분석하였다. 또한 agarose gel 전기연동에서 길이 다형성이 확인되지 못한 SSR 마커들에 대해서는 HRM 기술을 적용하여 다형성 존재를 재확인하였다. 오이의 고밀도 유전자 지도 작성을 위한 선행연구로서 20개 다형성 SSR 마커를 선발하여 이들의 유전적 연관성(genetic linkage)을 분석하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-2-2260-8915, Fax : +82-2-2260-8915

E-mail : smchung@dongguk.edu

재료 및 방법

식물 재료 및 DNA 정제

미국 위스콘신 주립대학교에서 분양 받은 오이 'NC76'와 'GY14' 계통의 종자를 온실에서 받아서 키운 후 교배하여 F₁ 종자를 수확하고 다시 자가수분하여 F₂ 집단을 형성하였다. 오이의 어린 잎을 수확하여 -70°C 냉동고에 보관한 후 CTAB 방법을 이용하여 total genomic DNA를 추출 하였다 [6,10]. 곱게 분쇄된 시료에 CTAB buffer를 750 µl을 가하고 30초 vortexing 한 후 60°C에서 1시간 배양하였다. 750 µl phenol:chloroform:isomyl alcohol (25:24:1)을 넣고 15초 vortexing 한 후, 5분 동안 원심분리(14,000 rpm) 하였다. 얻은 상층액을 2 ml 튜브로 옮긴 후 두 번에 걸쳐 chloroform:isomyl alcohol (24:1) 용액으로 세척한 후 EtOH를 900 µl 넣고 -70°C에서 1시간 보관 후에 4°C에서 10분간 원심분리(14,000 rpm) 하였다. DNA 펠렛을 확인한 후 상층액을 버리고 10분간 자연건조를 시켰다. 추출된 DNA는 증류수 50 µl로 현탁시켰다.

중합효소연쇄반응(PCR)과 gel 전기연동

CTAB 방법을 이용하여 얻은 'NC76'와 'GY14' DNA를 995개 SSR 프라이머[8]를 이용하여 PCR 증폭을 하였다. PCR에 사용된 모든 시약은 솔젠트(Seoul, South Korea) 회사의 e-taq kit를 사용하였다. 총 PCR 볼륨은 15 µl로 10 mM dNTP 0.3 µl, 10× buffer는 1.5 µl, taq polymerase는 0.4 unit, 100 µM의 Forward primer, Reverse primer 각각 1 µl, DNA는 15 ng을 사용하였다. PCR은 93°C에서 3분 후 93°C에서 30초, 50°C에서 1분, 68°C에서 1분 과정을 40회 반복하고, 72°C 7분 후 종료 또는 5°C에서 보관되었다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel에서 전기연동 후 EtBr로 염색하여 UV광과 디지털 카메라를 통해 확인하였다.

고해상도 용해 분석(High resolution melting analysis)

전기연동 상에서 'NC-76'와 'Gy14' PCR 증폭산물의 크기가 동일한 SSR 마커를 대상으로 Rotor-Gene Q6000 (QIAGEN Co. Seoul, South Korea)을 사용하여 HRM분석하였다. 각 SSR 마커의 PCR 수행 시 fluorescent dye의 일종인 Evagreen (Solgent, Seoul, South Korea)을 첨가하여 PCR 증폭산물을 형광표식하였다. HRM분석은 PCR 산물을 75°C에서→90°C로 천천히 heating 시키면서 매 0.3°C 상승시점 시 형광발광 정도를 측정하여 DNA 샘플 간 melting 온도 차이에 대한 변이곡선을 통해 분석하였다.

연관분석

'NC-76'와 'Gy14' 간 다형성을 보이는 20개 SSR 마커를 이용하여 F₂ mapping 집단 92개체의 마커 유전자형을 조사하였

다. 'NC76', 'GY14', 그리고 두 계통 간 이형 접합체의 유전자형을 a, b, 그리고 h기호로 각각 표시하고 Joinmap4 software (Plant Research international, Wageningen, The Netherlands)를 이용하여 마커 연관분석과 유전지도 작성을 수행하였다. 마커의 분리 비를 확인하기 위하여 χ^2 (chi-square) goodness-of-fit test를 수행하였다. 연관군 분석(grouping)은 independence LOD를 2.0에서 10범위에서 1 스텝 조건으로 수행되었고 mapping algorithm은 Maximum Likelihood mapping function을 사용하였다.

결과 및 고찰

전기연동분석

냉해성 오이 계통 'NC76'와 냉해 감수성인 'GY14' 계통 간 DNA 다형성을 총 995개 SSR 마커[8]를 이용하여 스크리닝 하였다. 본 실험에는 2%의 agarose gel을 사용한 전기연동을 수행하였는데 이는 PCR 증폭된 DNA 조각의 1 또는 2 염기 크기 차이를 구분하기에는 적당하지 않은 DNA 분리 방법이다. 하지만 3염기 크기 차이 구분은 충분히 가능하므로 polyacrylamid gel에 비해 비교적 이용이 쉽고 가격이 저렴한 agarose gel 분석으로 SSR 마커의 크기 다형성을 구분하였다.

Fig. 1은 995개의 SSR 마커 중 12개 SSR 마커의 PCR 증폭 결과를 보여준다. DNA 샘플로서 왼쪽에 'NC76' 그리고 오른쪽에 'GY14' DNA가 위치하며 1부터 12번 까지는 총 12개 SSR 마커의 PCR 증폭 후 전기연동 결과이다. 마커 1번, 8, 9, 10, 그리고 11번에서 증폭된 DNA 크기 차이를 관찰할 수 있으므로 이들 마커를 'NC76'와 'GY14' 간 공유성 마커로 사용이 가능함을 알 수 있다. 이와 같은 방법으로 총 145개의 'NC76'과 'GY14' 간 다형성 SSR 마커를 개발 할 수 있었다(Table 1). 본 연구에 사용한 995개 SSR 마커들이 *C. s. var hardwickii* (R.) Alef 계통과 'GY14' 간 다형성 마커들로서 유전자 지도 작성에 사용되었음[8]을 감안할 때, 상대적으로 현저히 낮은 수준의 'NC76'와 'GY14'간 다형성 율이 관찰되었음을 알 수 있다. Ren 등[8]의 연구에서 사용된 *C. s. var hardwickii* (R.) Alef 계통이 'NC76'에 비해 유전적으로 'GY14'과 매우 차이가 나는 오이 야생종이기 때문으로 판단된다.

확인된 다형성 SSR 마커가 추 후 'NC76'와 'GY14' 교배 집단에서 유전자 지도 작성용 마커로 사용이 가능한지 알아보기 위하여 각 145개 다형성 마커의 7개 오이 연관 그룹[8] 상에서의 분포를 조사해 보았다. 연관그룹 1번에 15개, 2번에 15개, 3번에 27개, 4번에 21개, 5번에 26개, 6번에 27개, 7번에 13개의 SSR 마커가 위치하고 있었고 이는 본 연구에서 개발된 145개의 다형성 SSR 마커가 'NC76'와 'GY14' 오이 교배 집단 계통에서 위치적으로 고루 분포하고 있음을 확인할 수 있으므로 이들 마커가 현재 확보된 교배집단의 유전자 지도를 작성하는데 유용하게 사용될 수 있음을 보여준다.

고해상도 용해 분석(High resolution melting analysis)
 PCR 증폭된 SSR DNA 조각의 크기 차이가 2 염기 이하일 때는 일반적인 2% agarose gel 에서 크기 구분이 어렵다. 앞에서 확인된 145개의 다형성 SSR 마커 외에 크기 다형성을 보이지만 아가로스 젤에서 나타나지 않는 마커는 polyacrylamid gel에서 크기 차이를 구분할 수 있다. 이러한 크기 차이 외에 증폭된 SSR DNA 조각에는 염기서열의 차이도 존재할 수 있는데 이는 일반적으로 염기서열 분석을 통하여 다형성 마커로 개발될 수 있다. 하지만 최근에 개발된 high resolution melting analysis 기술은 단 한 개의 염기 서열 차이에 의하여 달라지는 melting 온도를 구분해 줌으로써 염기서열 분석 없이

SSR 증폭 DNA 조각의 염기서열 차이를 보여줄 수 있다[11]. 따라서 이번 조사에서 2% agarose gel에서 크기 차이가 보여지지 않는 SSR 마커(Fig. 1)들을 대상으로 HRM 분석을 수행하였다. Fig. 1의 A에서 보여지는 11번째 SSR 마커 (SSR07747)는 'NC76'와 'GY14'의 PCR 증폭산물 크기가 동일하게 보여지고 있으므로 다형성 마커로 사용이 불가능하다. 하지만 이러한 DNA 조각의 HRM 분석 결과(Fig. 1B)는 두 DNA 샘플 간 melting curve에 있어 차이를 보여줌으로써 다형성 마커로 사용될 수 있음을 보여준다. 이와 같은 방법으로 총 30개의 다형성 SSR 마커를 HRM 기술을 이용하여 개발 할 수 있었다 (Table 2). Ren 등[8]이 보고한 유전자 지도상에 이들 마커들의

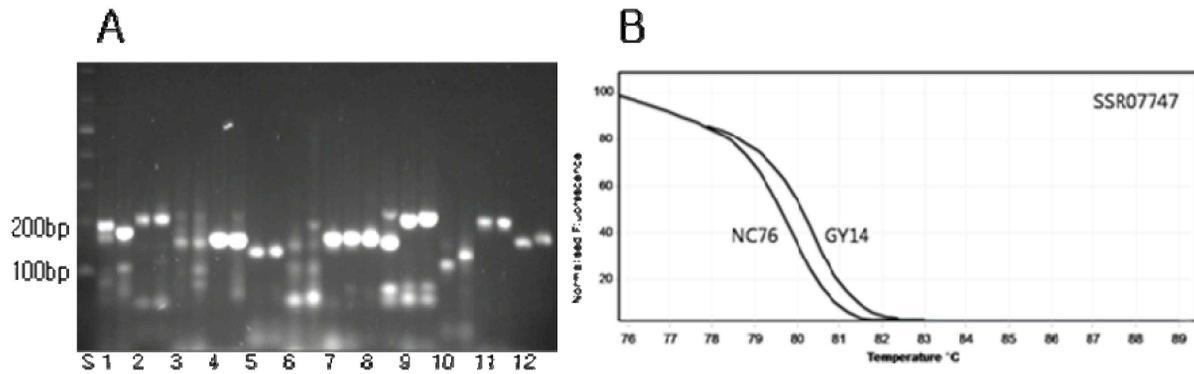


Fig. 1. Gel electrophoresis (A) and high resolution melting (B) analyses of SSR markers using the cucumber lines, 'NC76' and 'GY14'. 'NC76' and 'GY14' are located on the left and right lanes, respectively. Lane S: size marker, Lane 1~12: SSR07477, SSR07502, SSR07505, SSR07513, SSR07531, SSR07543, SSR07550, SSR07559, SSR07706, SSR07711, SSR07747, SSR07782.

Table 1. Polymorphic SSR markers on length variation between the cucumber lines, 'NC76' and 'GY14'

| SSR markers ¹⁾ | Linkage group ¹⁾ | Numbers of markers |
|--|-----------------------------|--------------------|
| cs6,CSAT425a,SSR00160,SSR03462,SSR04278,SSR06727,SSR07133,SSR10550,SSR10839,SSR14697,SSR16869,SSR18530,SSR17922,SSR22913,SSR23757 | 1 | 15 |
| SSR00009,SSR01253,SSR03610,SSR04870,SSR06913,SSR07108,SSR11908,SSR15110,SSR20045,SSR20932,SSR21486,SSR21440,SSR21502,SSR22338,SSR22653 | 2 | 15 |
| SSR03918,SSR05572,SSR05621,SSR06650,SSR07057,SSR07225,SSR07782,SSR10697,SSR11397,SSR13163,SSR13998,SSR14446,SSR15029,SSR15419,SSR16680,SSR19430,SSR19521,SSR19551,SSR20338,SSR22158,SSR22215,SSR23515,SSR23517,SSR23743,SSR23627,SSR27096,SSR28074 | 3 | 27 |
| SSR00012,SSR04251,SSR04534,SSR04905,SSR05899,SSR07209,SSR14257,SSR15737,SSR17406,SSR19565,SSR19380,SSR21065,SSR21644,SSR21730,SSR22155,SSR22231,SSR22948,SSR23603,SSR25358,SSR29712,CMMS30 | 4 | 21 |
| CSWTA001,CSWCT17,SSR00170,SSR01498,SSR03514,SSR03734,SSR03943,SSR07100,SSR07184,SSR07559,SSR07711,SSR10795,SSR11012,SSR11132,SSR11439,SSR11750,SSR13237,SSR14247,SSR14899,SSR15818,SSR16032,SSR15893,SSR18259,SSR20465,SSR22469,SSR23265,SSR32717 | 5 | 26 |
| C31,C80,CMTC51,CSWCT16B,SSR00259,SSR02021,SSR03357,SSR03527,SSR04910,SSR06270,SSR07183,SSR07291,SSR07477,SSR13611,SSR14934,SSR14859,SSR17818,SSR18534,SSR19842,SSR19174,SSR21318,SSR21760,SSR21936,SSR22275,SSR27117,SSR23856,SSR30353 | 6 | 27 |
| SSR00048,SSR04689,SSR04704,SSR13189,SSR14861,SSR16591,SSR18648,SSR19963,SSR19665,SSR19835,SSR22643,SSR22777,SSR29516 | 7 | 13 |

¹⁾Ren et al. 2009.

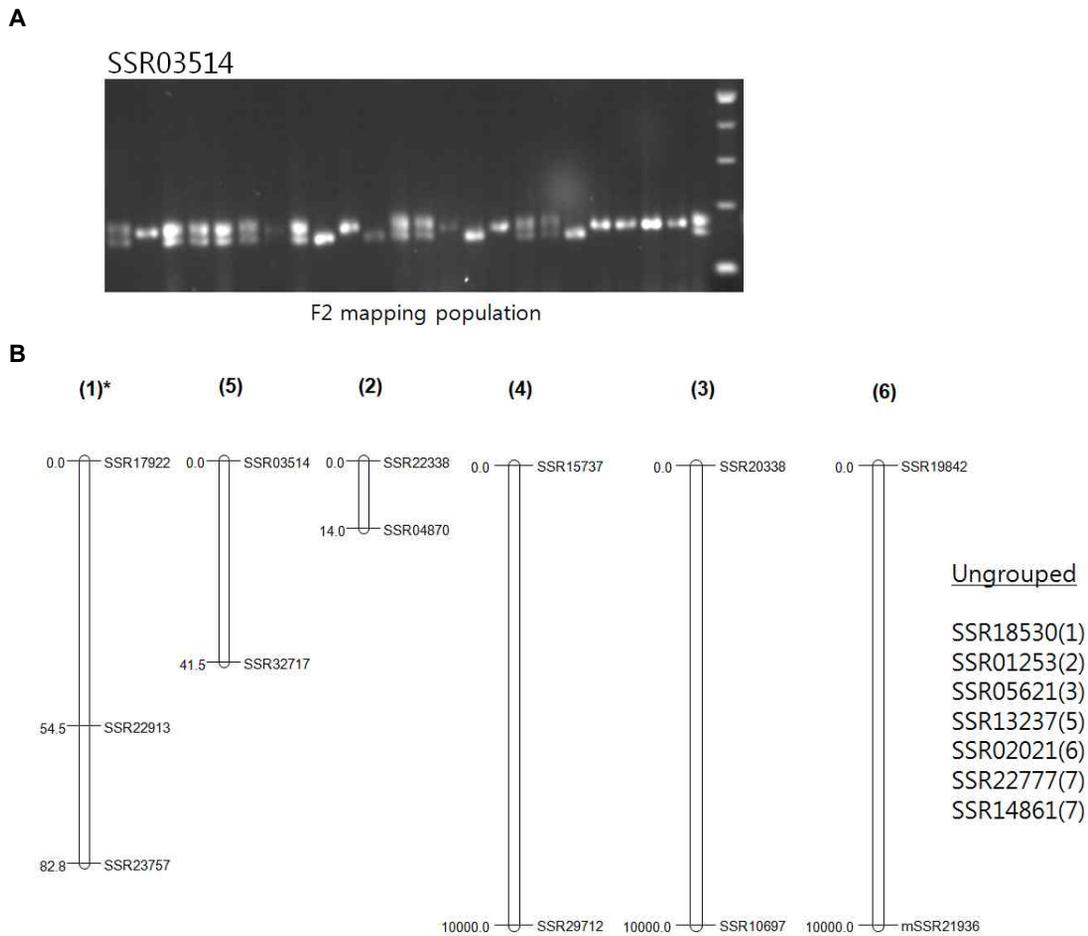


Fig. 2. Agarose gel analysis for genotyping of F₂ mapping population using SSR03514 marker (A) and Linkage groups of 13 SSR markers based on 92 F₂ mapping population derived from a cross of ‘NC76’ x ‘GY14’ (B). Numbers in parenthesis correspond to the linkage groups in the cucumber genetic map reported by Ren et al [8].

Table 2. Polymorphic SSR markers on HRM variation between the cucumber lines, ‘NC76’ and ‘GY14’

| SSR markers ¹⁾ | Linkage group ¹⁾ | Numbers of markers |
|---|-----------------------------|--------------------|
| SSR04928,SSR18192,SSR18816 | 1 | 3 |
| SSR05865,SSR17631,SSR23220 | 2 | 3 |
| CSWGATT01C,SSR02736,SSR03777,SSR16056,SSR18613 | 3 | 5 |
| SSR01601,SSR02127,SSR07747,SSR17389,SSR26165 | 4 | 5 |
| CMGA172,CMTC47,SSR00134,SSR06947,SSR10002,SSR10720,SSR23148 | 5 | 7 |
| Cs41,SSR01148,SSR21758,SSR21885 | 6 | 4 |
| SSR04584,SSR21708,SSR23373 | 7 | 3 |

¹⁾Ren et al. 2009.

위치를 파악한 결과, 이들 마커 역시 다양한 연관그룹에 고루 분포함을 확인할 수 있었다.

연관분석

20개의 SSR 마커를 대상으로 92개체로 구성된 F₂ 집단의 분리양상을 조사하여 연관 지도를 작성 하였다. 20개 중 13개의 마커가 연관군을 구성하였으며(Fig. 2), 또한 Ren 등[8]의

유전지도에서 동일한 연관군에 속했던 마커들이 본 연관 분석에서도 같은 군에 연관되어 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 7개의 마커가 연관그룹에 포함되지 못하여 ungrouped 마커로 표기되었는데(Fig. 2) 이는 마커 간 유전 거리가 너무 멀어서 충분히 신뢰할 만한 연관성을 보이지 못하였거나 마커 사이를 연결해 줄 수 있는 마커의 부재에 인한 것으로 생각된다. 따라서 차 후 더 많은 다형성 마커들을 본 F₂ mapping 집단에 적용

함으로써 통계적으로 신뢰가 가능한 연관성이 이들 마커들 간에 회복 될 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

오이의 냉해 저항성 연관 마커 개발을 위한 선행연구로서 'NC76'과 'GY14' 계통 간 다형성 SSR마커를 개발하였다. 기존 agarose gel 전기영동방법으로 총 145개의 다형성 마커를 개발할 수 있었고, HRM 기술을 이용하여 다형성 마커 30개를 부가적으로 확인하였다. 개발된 총 175개의 다형성 SSR 마커들은 실질적으로 오이 육종재료 및 유전자원 분석과 품종 판별용 마커로 활용될 수 있으며 오이 냉해 저항성 유전자지도 작성 및 연관마커 개발에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원 (IPET: 109064-05-2-HD110) 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사 드립니다.

References

1. Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* **27**, 617-631.

2. Chung, S. M., J. E. Staub, and G. Fazio. 2003. Inheritance of chilling injury: A maternally inherited trait in cucumber. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **128**, 526-530.

3. Ganai, M. W., T. Altmann, and M. S. Roder. 2009. SNP identification in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 211-217.

4. Kozik, E. U. and T. C. Wehner. 2008. A Single Dominant Gene Ch for Chilling Resistance in Cucumber Seedlings. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **133**, 225-227.

5. Lyons, J. M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**, 445-466.

6. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor publisher, Cold Spring Harbor, NY.

7. Rauwolf, U., H. Golczyk, J. Meurer, R. G. Herrmann, and S. Greiner. 2008. Molecular Marker Systems for Oenothera Genetics. *Genetics* **180**, 1289-1306.

8. Ren, Y, Z. Zhang, J. Liu, J. E. Staub, Y. Han, Z. Cheng, X. Li, J. Lu, H. Miao, H. Kang, B. Xie, X. Gu, X. Wang, Y. Du, W. Jin, and S. Huang. 2009. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. *PLoS One* **4**, e5795.

9. Slate, J., J. Gratten, D. Beraldi, J. Stapley, M. Hale, and J. M. Pemberton. 2008. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica* **136**, 97-107.

10. Staub, J. E., F. C. Serquen, and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* **31**, 729-740.

11. Vossen, R. H., E. Aten, A. Roos, and J. T. Dunnen. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA)-More than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* **30**, 860-866.

초록 : 오이 다형성 마커를 이용한 유전분석

이선영 · 정삼민*

(동국대학교 생명과학과)

DNA 마커는 유전현상 분석이나 품종육성에 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 내냉성 오이 계통인 'NC76'과 냉해 감수성 계통인 'GY14'로부터 내냉성 연관 마커를 목적으로 기존의 총 995개 SSR 마커의 다형성을 평가하였다. Agarose gel 전기영동법으로 'NC76'과 'GY14' 간 PCR증폭 산물의 길이 다형성을 보이는 145개 SSR 마커를 개발하였으며, high resolution melting (HRM) 기술을 사용하여 염기서열 다형성을 보이는 30개의 SSR 마커를 확인하였다. 개발된 175개 SSR 마커 중 20개 마커를 선발하여 'NC76'과 'GY14' 간 F₂ 분리 집단에 대한 연관지도 를 작성하였으며 그 결과 13개의 마커가 예상했던 연관군에 일치하여 위치됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확인된 175개의 SSR 마커는 향후 냉해 저항성 연관 마커 개발을 위한 오이 유전자 지도 작성 및 이를 통한 품종 육성에 크게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.