

양친의 대량 염기서열 해독을 통해 개발된 SNP 분자표지를 이용한 고추 유전자지도 작성

이준대^{1†} · 박석진^{1†} · 도재왕¹ · 한정현¹ · 최도일² · 윤재복^{1*}

¹(주)고추와육종 기업부설연구소, ²서울대학교 식물생산과학부

Development of a Genetic Map of Chili Pepper Using Single Nucleotide Polymorphism Markers Generated from Next Generation Resequencing of Parents

Jundae Lee^{1†}, Seok Jin Park^{1†}, Jae Wahng Do¹, Jung-Heon Han¹, Doil Choi², and Jae Bok Yoon^{1*}

¹Research and Development Unit, Pepper and Breeding Institute, Suwon 441-853, Korea

²Department of Plant Science, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

Abstract. Molecular markers, as an efficient selection tool, have been and is being used for practical breeding program in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Recently, a lot of researches on inheritance and genetic analysis for quantitative traits including capsaicinoids, carotenoids, and sugar content in pepper are being performed worldwide. It has been also reported that QTL mapping is a necessary tool to develop molecular markers associated with the quantitative traits. In this study, we suggested a new method to construct a pepper genetic map using SNP (HRM) markers generated from NGS resequencing of female and male parents. Plant materials were *C. annuum* ‘NB1’ (female parent), *C. chinense* ‘Jolokia’ (male parent), and their F₂ population consisting of 94 progenies. Sequences of 4.6 Gbp and 6.2 Gbp were obtained from NGS resequencing of ‘NB1’ and ‘Jolokia’, respectively. Totally, 4.29 million SNPs between ‘NB1’ and ‘Jolokia’ were detected and the 1.76 million SNPs were clearly identified. Among them, total 145 SNP (HRM) primer pairs covering pepper genetic map were selected, and the 116 SNP (HRM) markers of them were located on this map. Total distance of the map, which consisted of 12 linkage groups and matched with basic chromosome numbers of pepper, was 1,167.9 cM. According to the mapping result, we concluded that our mapping method was suitable to construct a pepper genetic map fast and accurately. In addition, the genetic map could be directly used for QTL analysis of traits different between both parents.

Additional key words: *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, HRM, Jolokia, resequencing

서 언

고추(*Capsicum annuum* L.)는 우리나라에서 가장 중요한 채소 작물로서, 2011년 총 생산액이 건고추, 풋고추 및 파프리카를 포함하여 1조 7000억 원에 달했으며(MIFAFF, 2012), 국내 고추 종자 총 매출액은 443억 원으로 채소 종자 중에서 가장 많았다(KSA, 2012). 그 중요성에 부합하여 현재 국내에서는 많은 고추 연구들이 현재 진행되고 있고, 특히 20여 개의 형질 연관 분자표지가 개발되어 상업 육종에 직접적으

로 사용되고 있다. 현재까지는 비교적 개발이 용이하다고 알려진 질적 형질에 연관된 분자표지가 주로 개발되었는데, 예를 들면, 고추 유전자적 웅성불임 유전자인 *ms_k*, *ms_l*(synonym *ms_p*) 또는 *ms₃*에 연관된 분자표지(Lee et al., 2010a, 2010b, 2010c, 2011), 세포질웅성불임 회복유전자(*Rf*) 연관 분자표지(Jo et al., 2010; Min et al., 2009), CMV 저항성 유전자인 *Cmr1* 연관 분자표지(Kang et al., 2010), TMV 저항성 유전자인 *L* 연관 분자표지(Yang et al., 2012), TSWV 저항성 유전자인 *Tsw1* 연관 분자표지(Kim et al., 2008), 매운맛 유

*Corresponding author: yoonjb2@snu.ac.kr

†These authors contributed equally to this work.

※ Received 9 January 2013; Revised 15 March 2013; Accepted 2 April 2013. 본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(PJ008024022012)의 지원에 의해 수행되었음.

무를 결정하는 유전자인 *Pun1* 연관 분자표지(Wyatt et al., 2012), 과색을 결정하는 유전자인 *Psy(c2 locus)*와 *Ccs(y locus)* 연관 분자표지(Ha et al., 2007; Kim et al., 2010) 등이 있다.

그러나 최근에는 매운맛, 색소, 당 함량 및 역병, 탄저병, CMV 저항성 등과 같이 소수의 주동유전자와 다수의 미동유전자 또는 다수의 유전자들이 그 특성을 결정하는 양적 형질(QTL) 연관 분자표지에 대한 개발 요구도가 높아지고 있다. 이를 위해서는 QTL 연관지도(mapping) 분석이 필수적이다. 따라서, 유전자 연관지도를 쉽고 빠르게 작성하는 것이 중요하게 되었다. 초기 고추 유전자 연관지도 작성에는 RFLP(restriction fragment-length polymorphism; Botstein et al., 1980), RAPD(random amplified polymorphic DNA; Williams et al., 1990), SSR(simple sequence repeat; Tautz, 1989) 및 AFLP(amplified fragment-length polymorphism; Vos et al., 1995) 등과 같이 지도 내 위치 정보가 없는 분자표지를 주로 사용하였다(Kang et al., 2001; Lee et al., 2004; Livingstone et al., 1999; Minamiyama et al., 2006; Yi et al., 2006). 그러나 최근에는 Wu et al.(2009)이 587개의 COSII(conserved ortholog set II) 분자표지를 사용하여 토마토와 고추의 유전자 연관지도를 비교 분석하였고, The Tomato Genome Consortium(2012)이 토마토 유전체 염기서열을 완전히 해독함에 따라 고추 유전자 지도 내 위치를 추정할 수 있는 분자표지를 쉽게 개발할 수 있게 되었다.

따라서 본 연구에서는 RAPD, AFLP 등의 무작위(random) 분자표지를 사용하지 않고, 유전자 연관지도 작성에 사용할 양친의 대량 염기서열 분석(NGS resequencing)을 통해 위치 정보가 알려져 있는 COSII 분자표지를 선택적으로 선발하여 SNP(HRM) 분자표지로 개발한 후, 이를 이용하여 고추 유전자 연관지도를 쉽고 빠르게 작성할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

2010년에 *Capsicum annuum* 'NB1'을 모계로 사용하고 인도에서 도입된 *C. chinense* 'Jolokia'를 부계로 사용하여 교배한 F₁을 자가수정하여 F₂ 종자를 확보하였다. 2011년에 F₂ 세대의 종자를 파종, 육묘, 정식하여 94개 식물체에서 잎을 채취하여 유전자 연관지도 작성에 사용하였다.

NGS 대량 염기서열 분석

모계로 사용한 'NB1'과 부계로 사용한 'Jolokia'의 잎을

각각 1.5mL 튜브에 채취하여 Prince et al.(1997)의 방법대로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 100ng·μL⁻¹ 농도로 맞추어 총 10μg을 NGS resequencing에 사용하였다. NGS resequencing 및 생물정보학적인 분석은 (주)씨터스(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

HRM 분석

HRM 분석(high resolution melting analysis; Wittwer et al., 2003)은 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. PCR 반응액은 genomic DNA 10ng, 10× PCR buffer 2μL(ELPIS Bio, Korea), 10mM dNTP mixture 1μL(ELPIS Bio), rTaq PLUS polymerase 0.1μL(ELPIS Bio), LCGreen® Plus+ Melting Dye 1μL(BioFire Diagnostics, UT, USA), 각 분자표지에 해당하는 한 쌍 각각의 10pmole·μL⁻¹ 프라이머(Table 2) 1μL, 그리고 멸균된 삼차중류수로 총 20μL로 맞추었다. PCR 반응은 CFX96을 이용하여 98°C에서 초기 denaturation을 수행한 뒤, 95°C에서 10초간 denaturation과 60°C에서 20초간 annealing하는 과정을 40회 반복하였다. 마지막으로 95°C에서 10초간 denaturation 반응을 시킨 후, 68°C에서 90°C까지 0.2°C씩 올리면서 각 온도에서 5초간 유지하는 동안 형광을 측정하여 HRM melting 그래프를 그렸고, Precision Melt Analysis 프로그램(Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 유전자형을 분석하였다.

연관 지도 작성

연관 지도 작성은 Mapmaker/EXP v. 3.0 프로그램을 사용하였다(Lincoln et al., 1993). 연관 그룹은 LOD 4.0과 최대거리 30cM을 기준으로 하여 나누었다. 또한 연관 거리는 Kosambi(1944) 계산식을 사용하여 산출하였다. 최종 연관 지도는 MAPCHART v. 2.1 프로그램을 사용하여 그렸다(Voorrips, 2002).

결과 및 고찰

양친의 NGS 대량 염기서열 분석

유전자지도 작성용 양친인 'NB1'과 'Jolokia'를 next generation resequencing 방법으로 유전체 염기서열을 해독하였다. 그 결과, 'NB1'은 고추 reference genome(2.6Gbp)의 1.74배에 해당하는 4.6Gbp를 읽었고, 'Jolokia'는 2.32배에 해당하는 6.2Gbp를 읽었다(Table 1). 또한 해독된 염기서열을 바탕으로 'NB1'과 'Jolokia' 사이를 비교하여 SNP를 탐색하였다. 'NB1'과 'Jolokia' 간의 총 SNP 수는 429만개였으며, 그 중

Table 1. Next generation resequencing of parents, 'NB1' and 'Jolokia'.

Material	Use	Total length (bp)	Genome coverage	Number of clear SNPs ^z
CM334	Reference	2,650,439,443	1.00×	NT ^y
NB1	Female parent	4,624,043,206	1.74×	1,759,589
Jolokia	Male parent	6,156,006,156	2.32×	

^zSNPs detected by comparison between 'NB1' and 'Jolokia'.

^yNot tested.

확실한 SNP 수는 176만개였다(Table 1). 이는 이전에 보고된 결과(각각 3,218개와 5,267개의 SNPs 탐색됨; Lu et al., 2011, 2012) 보다 훨씬 많은 숫자인데, 그 이유는 사용한 식물재료와 분석대상의 차이 때문인 것으로 생각된다. 이전 분석에서는 전사체(transcriptome)를 분석대상으로 한정하였고, 식물재료 또한 중 내(*C. annuum*) 고추끼리 비교한 결과였으나(Lu et al., 2011, 2012), 본 연구에서는 genome 전체를 분석대상으로 하였고, 식물재료 또한 중간(*C. annuum* vs. *C. chinense*)에서 비교 분석한 결과였다.

SNP 분자표지 개발

앞에서 탐색한 176만개의 SNP는 그 수가 너무 많아 모두 분자표지로 개발한다는 것은 불가능에 가깝다. 본 연구는 QTL mapping 분석에 사용할 수 있는 고추 유전자지도를 쉽고 빠르게 작성할 수 있는 방법을 제시하기 위한 것이기 때문에 고추 유전자지도 전체를 포함하는 분자표지를 일부 선별하여 분석에 사용하였다. 따라서, 고추 유전자지도 내 고르게 분포되어 있는 SNP를 선별하여야 하는데, 이를 위해 이미 고추 유전자지도 내 위치가 보고되어 있는 2,122개의 COSII 분자표지 염기서열을 사용하여 SNP를 선별하였다(Bombarely et al., 2011; Wu et al., 2009). 이미 고추와 토마토 유전자지도는 COSII 분자표지를 이용하여 서로 자세하게 비교되어 있기 때문에 쉽게 분자표지의 위치를 파악할 수 있었다(Wu et al., 2009). 이 중에서 최종적으로 145개의 COSII 분자표지를 선별하여 SNP 분자표지 개발에 사용하였다(Table 2).

SNP 유전자형 분석은 방법이 간편하고 비용이 상대적으로 저렴한 HRM 분석 방법을 사용하였다(Wittwer et al., 2003). 특히 SNP는 서로 구분이 잘 되는 A/G, A/C, T/G 및 T/C 조합만 선별하여 프라이머를 디자인하였다(Wittwer et al., 2003). 145개 조합의 프라이머쌍을 이용하여 HRM 분자표지 개발을 시도하였으나, 그 중 116개는 Fig. 1에서와 같은 패턴으로 분리하여 분자표지로 사용할 수 있었고, 나머지 29개는 다형성이 나타나지 않았거나 두 개 이상의 단편이 증폭되어 분자표지로 사용할 수 없었다(Table 2). 본

연구에서 HRM 분자표지 개발 성공 확률이 80%였다. 개발된 HRM 분자표지는 선별할 때 사용한 COSII 분자표지, 본 연구에서 작성한 유전자지도에서의 연관군 및 위치, 그리고 COSII 분자표지 염기서열에 해당하는 유전자 정보를 Table 2에 리스트하였다.

고추 유전자 지도 작성

앞에서 개발된 116개의 SNP 분자표지와 1개의 SSR 분자표지(Hpms1-117)를 사용하여 NB1 × Jolokia-F₂ 분리집단 94개체에 분석함으로써 고추 유전자지도를 작성할 수 있었다(Fig. 2). 총 연관거리는 1,167.9cM이었고, 연관군은 12개로 나타났고, 사용된 총 분자표지수는 117개였다(Fig. 2). 2009년에 보고된 COSII 고추 유전자지도의 총 연관거리는 1,613cM(1,165개 분자표지 사용)인데, 본 연구에서는 1,168cM로 짧게 나타났다(Fig. 2). 이는 아마도 유전자지도 작성에 사용한 분자표지수가 적었기 때문인 것으로 생각된다(Wu et al., 2009). 또한 본 연구에서 LG1과 LG8은 같은 연관군으로 나타났으나 이전 연구에서 각각의 위치가 알려져 있는 분자표지를 사용하였기 때문에 인위적으로 이 두 연관군을 나눌 수 있었다(Fig. 2; Wu et al., 2009).

본 연구에서 사용한 고추 유전자지도 작성 방법은 집단만 만들어져 있다면 두 달 내에 유전자지도 작성을 완료할 수 있기 때문에 QTL mapping에 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 또한 이 방법은 분자표지 위치 예측이 상당히 정확하기 때문에 특정 위치를 fine mapping할 때도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

초 록

효율적인 선별방법으로서 분자표지는 실제적인 고추(*Capsicum annuum* L.) 육종 과정에 사용되어 왔다. 최근에는 고추의 양적 형질로 알려진 매운맛, 색소 및 당 함량 등에 관한 다수의 유전분석 연구가 세계적으로 수행되고 있다. 또한 양적형질과 연관된 분자표지를 개발하기 위해서는 QTL mapping이 필수적이라고 보고되고 있다. 본 연구에서는 하나의 새

Table 2. List of 116 SNP markers used for pepper genetic mapping in this study.

SNP (HRM) marker ^z	Previous marker ^y	LG ^x	Position ^w	Gene description ^v	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
276428	C2A11g63980	1	0.0	Pin2-interacting protein X1	TGAACAATATTGGACAACAGAGA	CCGTGTTAAAAAGTGAGGAGTGTTT
44966	C2A11g63260	1	1.7	Senescence-associated protein	GGGTTTAATGGAATTAACGAAAA	GTAAGAACCACCTGGGAAGTTTTGT
40605	C2A15g47010	1	20.9	ATP dependent helicase	AAGAGAAACCATGATCCTTAAAGAC	TTCTGTCAATTATGCATTTTGGAAAGT
560527	C2A12g35610	1	29.3	Glycosyltransferase-like protein	TTTTTGGTATAGAGGGTAACATTTG	CCTGACAAATAACAACACTTGGTG
143160	C2A13g61080	1	40.6	Fructosamine kinase family protein	TCTGGAAGTAAATCAAAATGCAATG	CTGACATTACCTCTTGAATTTGTTG
41575	C2A15g51970	1	53.3	L-threonine 3-dehydrogenase	TAATGTGCACCTTGGTGAAAG	TTTTGTTAATCTTTTTTAGTTGACATGG
43518	C2A12g34860	1	55.0	Homology to unknown gene	TTACATCTTATACAGCAAACTTACGTG	CTTCCAAGGAAGGGGTAAGTTCT
41424	C2A13g06790	1	76.1	DAG protein	ATGGTAAGAGTGAACAACAACTCA	CAACATAAACACCTACTATTATGGGAAC
6707	Skdh-1	1	85.9	Shikimic acid dehydrogenase-1	CGAGAGAACCTTGCAGATGTAGTTG	ATTTTCTGGATGGAAATTTGCTAAG
145045	C2A14g00560	1	97.2	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	GAAAAGATTTGAAGAAGTTGCTTACAC	CCACATGAGAACAATTCACAACATTT
56883	C2A13g06730	1	116.0	Thioredoxin protein	CAGTGCCATATGGAGATTTTAGTG	GATTTATGCAACCACATCAATGTGAC
564637	C2A11g09070	1	137.6	Soybean gene Regulated by COLD-2, SRC2	TTTACAACCTCGCGTATCAATTC	TAGCTTCTTCTGCTCCCTTTTATT
167621	C2A11g12680	1	160.9	Calcium-dependent protein kinase	AAAAGTGGGACCTTAAACATTAC	TCAATTGACAACCACCTTCGTATAA
1338143	C2A11g50020	1	164.5	Tubulin alpha-6 chain	ATGTCATAGGTTGCAGATGTTCT	ACATCAATGCATCAGCATACTGTC
1337242	C2A12g16920	1	181.3	Ubiquitin-conjugating enzyme 22	TGCATGTTTAAATGGAATATAGTCTGC	AACATGCCCTCAAGAACCGAATC
172059	C2A15g44200	2	0.0	Nuclear cap-binding protein subunit 2	CAAGATACAAATTGAGGTTAATTTGTTG	GGAGAGGAATTTCTAGGTGTTTTGA
562493	HpmsE134	2	14.0	Cobalt import ATP-binding protein CbiO 2	AAAAATCCCATATTCCACCAAGTA	TCTGAACACATTTTTTCACTGACTCC
294187	C2A14g20410	2	31.2	Gamma-soluble NSF attachment protein	TAGAAAGTGCAGATCCAATAGCAG	GTCTGGCAGCAGCTTATTAAGCAGA
167381	C2A14g18740	2	44.3	H2B histone-fold-like protein	AAATCTTGAAAAAGAGGATGTTGG	TTCCCAAATTTACACTTCACATCAA
1335057	C2A14g21710	2	53.5	DNA-directed RNA polymerase	ATGCACGAAACTGATTTAAACAAC	TTTTTGGGGAGTTTTCTGATTATG
44597	C2A15g66090	2	64.4	Unknown protein	CAAAAATTCAACTCCATTAGAAGCA	GAATTTGAACCTAAGACCTCATGG
7050	C2A15g67530	2	80.4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	TTCAGCTCTTACAAAATACATGAGAT	AAATTTCCATTCCCAAAAGTATGA
566534	C2A14g37130	2	88.4	Nucleoporin p58/p45	TGTCTATTTTTGCTTAGCATGGAC	TGAAAATCTAAATAATGCAAAACAACC
50659	C2A11g67730	2	98.9	3-ketoacyl-CoA reductase 1	TCTATATCAAGATATCCAACATGGAG	TAATCTTGATGCTACTCTCAAAGC
47184	C2A13g24160	3	0.0	PMP, Putative type 1 Membrane Protein	CGAGTGGACTAAACCTTAAAGATCC	TATGCTCTCGAGTCAAAAATTACCA
1335549	C2A13g23400	3	8.0	Harpin binding protein 1	ACTCCGCGGTTGAGTAAATCTAT	TTTCAACATTATTCTGCAACTGAAA
561191-2	C2A11g07310	3	17.6	C2 domain-containing protein-like	CTTTCAAAAGAAATTCCTCGAGTTTC	ACAATAGAAACGATTTTTTTCATAAGC
582126	C2A15g48720	3	23.7	X-Ray Induced transcript 1, XR11	AAAAGCCTTAAAGCATTTGGAAAGA	TGAAAAAGAGATTTAAAAGAGGGGATT
566240	C2A13g22435	3	38.2	Protein SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 homolog	CCTTTTCTTGTTTTGGATGTAAGGA	TGCTTTGGTTCTAGACAAGTCCAAAT
142847	C2A14g03200	3	60.4	Thymidylate kinase	CCGAATATTATTGATTCACCTTTATCAT	CAAACCTGGGAAGAAGACAAAAACTAA

Table 2. Continued.

SNP (HRM) marker ^z	Previous marker ^y	LG ^x	Position ^w	Gene description ^v	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
50987	C2A15g62390	3	72.5	IQ calmodulin-binding motif family protein	TTTTCAAAACCCTAACATAAACTTCA	ATACAGTCGCTACGAAATATGCAA
1339999	C2A15g23880	3	82.4	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	ATTGGTCTTTTCTTCTGAACATCC	TATCCACTCAGCCATCTACTACCA
38900	C2A15g54180	3	97.8	Plastid Transcriptionally Active 15, PTAC15	GTTATCGGGCAAACTAACACTGAG	GGCTATAAAATCAAGAAAAGAAATGG
40134	C2A13g10220	3	104.9	Tubulin folding cofactor B	GAAGAAATTTTGATTTTCATGACTT	CTATTGCAAGATGATGTTGATTCT
42250	C2A15g52820	3	120.2	Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(S)/G(T) subunit beta-3	TGAAGAAATTAGTGTTACTCGGGATA	TTGGACTTCTACATCCAAAAAGAA
42397	C2A11g18660	3	133.5	ATP-dependent protease La (LON) domain	CAATGTTACACTGAAAAAGTGGAT	ACTGAACACTATTTGTCTCATGTGG
560314	C2A11g18270	3	145.6	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit gatY	TGGTTACACTAGCTAGGAGTCTGTTT	CTGACAGAAATGGTATGATGCTTCT
1334834	C2A13g20240	3	166.5	Mitochondrial carrier protein	CACCTCTTTCATCTTGTCAACCCTTG	GGATGCTGAAGTTATACAGGACAA
40344	HpmsE081	4	0.0	Glycogen synthase kinase	TCTAATCTTGACGCAGTACATTGA	ATTGCAATAGCATTGATCGTCAAT
7611	Mbol077E18SP6	4	10.8	Unknown	TGACITTCAGGAGTAATTTTCGTCA	GCTATGCTCGCAATAAATTAACAGT
41659	PSY	4	17.4	Phytoene synthase	GATACTAGCTCCGCCCCAGTA	TATTGTTCTGGTAGTGTGTGTGTTG
51449	C2A15g65960	4	21.0	Unknown	TAAATCCGCAAAATTTTATAGCAGA	AAAGGAATCTGATAAGCACGTTGT
38698	C2A11g77250	4	34.5	Lysine-specific demethylase 5D	AGCTGTTTCTTAATGATGCATTTG	GATATATCCTTCCCAACAAAAATCG
93632	C2A12g31840	4	40.5	Thioredoxin family protein	TGACTCCGTCTCTGCTGATAAATA	CAGGTACCAAAATTAACCGGTCTAT
562756	C2A11g71810	4	47.5	Uncharacterized arF domain-containing protein kinase 1	GTGCTCCATCTAGTGAATCGTGA	GTGGAGATGCTAATAATACCCCAAG
565815	C2A11g78230	4	56.7	Phosphatase 1 regulatory subunit 7	TATCCTTGATGGAAGGCTCTAAAGG	GAATCTCTCGAAATGGACAAGGTA
43710	C2A11g09920	4	63.4	TRAF type zinc finger domain containing 1	TATTAGAAATTTGCGCCATGCACCTT	ATAATTTTTCCCTCGGGCTTT
46016	C2A13g03990	4	74.7	Hydrolase alpha/beta fold family protein expressed	CATTTCTAAGATTTATGGAATGAAAA	ATTTGTTTCATGTGAAAAAAGTCAAA
168685	C2A15g25900	4	81.6	Cytochrome P450	ACCAGATTGAAATCGTTTGATGACT	GGATTACACTGGGGATGTTGTT
42760	C2A11g76080	4	87.0	Thioredoxin	GCATGACAATGTTTTCAAAAGAAAC	TACAGCATTGCTTGGTCCCTTTT
40286-2	C2A14g25650	5	0.0	Pheophorbide a oxygenase	CCCGAAGCTTTAGAGATGCTTACT	TTCCCTTTCGTAGGACATGAAAAG
144075	C2A13g52155	5	7.0	Phosphohistidine phosphatase SixA	GTTCCGAATCTTTTAGCGCTTAGT	TATATCGATGAACCCCTTTTGT
580517	C2A11g08640	5	16.2	Heat shock protein binding protein	TCAGTACCATCGATAATAAGCATTG	CACTGGACATGATTAGGAAAATGA
570928	C2A13g17040	5	38.3	Pre-mRNA-splicing factor c1f1	ACGTTGGACTTCCCATGAA	CTTCCATGTTTTCCGAGTACATTCT
560472	C2A12g46580	5	45.8	Pyridoxamine 5'phosphate oxidase family protein	AATCTTTTTGGAACAAAATAAAATG	GATTTAAAAGCACCCCTTCTGTC
5319	C2A13g55800	5	55.7	Fructose-1 6-bisphosphatase class 1	GAATACCATTTTTCCGAGTTGTG	CTTACCTTGCAATTTCTCAAGAGG
143617	C2A15g49510	5	61.0	Prefoldin subunit 3	TATAACCATGGCCCAACCCCAAG	CCAAGAAAAGAAATTTACTTGTCCA
39997	C2A13g55360	5	79.0	Trans-2-enoyl-CoA reductase	GGAAACAATTTGGGCCGATTT	TCCGACAAACAATAGCTGAGATTA
243925	C2A15g63620	5	94.8	Alcohol dehydrogenase-like protein	TGCTATAGTCTAATCCCAATTTGAATCCT	AAGTAAAAAACGAGAAAATCAGAGT

Table 2. Continued.

SNP (HRM) marker ^z	Previous marker ^y	LG ^x	Position ^w	Gene description ^v	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
38802	C2A14g02340	6	0.0	Epoxide hydrolase 1	GAACATACAGAAATCGGACTTGGTTGA	AATCATCCGATTCAGATTTTTTCAT
564798	C2A11g49540	6	6.5	Elongator complex protein 2	GCAAAATGGATCCTACAGTGTGA	TTTTCGAATGGAATGTTTTGGAC
299931	C2A12g29630	6	23.9	Phosphomethylpyrimidine synthase	TCTCGAAGATCTAAATAAGTGAAGACA	AGCTCCAAAAGAAATACAGGGTCTGC
1337819	C2A11g44835	6	31.3	YbaK/prolyl-tRNA synthetase	TGGTGTGTTTTAAGGTAGAGGGTA	TCGAATGTAAAGGTCTCTATCTCTCA
42158	C2A11g32130	6	40.2	Transcription factor <i>iwsl</i>	TTTCATACCAGAGTCAAACTAGAACA	TTGTCCCTATGCTCATGCATTAAGT
40851	C2A11g71990	6	47.8	Alpha-1 4-fucosyltransferase	TCGAGTTATCCATGATAAACAAA	CCCTGTTGGTATGATTAGTTGAAA
569511	C2A11g24360	6	66.8	3-oxoacyl-reductase	GCCAATCTTAAACACACTCAAGGAT	ATACGAAAACAAGAAAACAATTTGAGT
91118	C2A11g12060	6	73.1	Bcl-2-associated athanogene-like protein	AAAAATCCAAGCACCATAATTTGT	TTTTCTCACTAAATTTGTTCTGACTCA
562904	C2A11g18640	6	87.1	Phosphoserine phosphatase	AGGGCTTAGATTTCCAATTAFCGA	GGTACGCATAAAATGTACCTGATCT
40260	C2A11g20050	6	95.3	3-beta-hydroxysteroid-Delta8 Delta7-isomerase	TACACTCAATAGCAGAGCTTGAGG	AAATTACAATGGTTTGGTTAAGACTG
51189	C2A12g18710	7	0.0	Preprotein translocase <i>secY</i> subunit	CTCAATCTACGTCAGCGACCAC	ATGGTAAACAACCTCCCGCTAAAT
42788	C2A15g22010	7	5.5	DNA Replication Factor C Subunit	TCTTAATTTAGAAATGTGATTTGGCATA	AACTTATTTTCTGGTCAATGTAAATCA
63063	C2A12g24270	7	10.4	Aldehyde dehydrogenase	AGATTTCTTTTGAATGGCAAGTC	TTTTCTAAATTTCTAGCCAAAACCAAGT
40879	C2A15g35100	7	15.8	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase	GACACCTAAAAGTATTAGTGGGACA	TGTGTTGGGTACAAAGAAAAGAAAGT
583633	C2A15g34850	7	36.8	Purple acid phosphatase 3	TCTCAATGGTACCTGTATCCOCATA	GATTTGGTCTCAACATTACATCC
83995	C2A13g26060	7	40.5	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant family protein	TCACAGCTAACACATAAAAACAACCA	TACCGTGCACACTTCTTTTGAGTCAT
170671	C2A14g03210	7	54.4	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5	GCGGAAGGGTAAAGACTGATT	CCGTTAATCTCAAATCCCCTTTGTAG
39273	C2A12g42750	7	62.5	Chaperone protein <i>dnaJ</i> 10	GGGAACACTATTGATCCTCTTTGAT	CAGTGGATGTTTTCAGAATGGTAT
41190	T0463	7	77.7	Phosphoglycerate kinase	GAAGAGTGTGGATCACTGAAAGA	TCTCAGGAATACTCTCTCCCTTT
38931	C2A14g31570	8	0.0	Myosin-like protein	TTTCACCTTCGAGATGATGAATAC	GCAGAGCAGAGTAGGTGACTTG
145131	C2A13g52860	8	7.6	Unknown protein	CGATGAACCCCTTAATAAATTTCCAAC	CTAAGAGTGCAATATGATGCCAGT
39595	C2A14g17380	8	23.3	DNA mismatch repair protein <i>mutS</i>	CAAGTGGCATACTCTTCATTCTGT	ATGTTAGCATGACAGGGGCAATA
41771	C2A15g40950	8	32.9	Ribosomal Protein Large subunit 27, RPL27	CCGGATTATTATCCCTTCATGT	CTACTAGGGGTCGTTTAGTTGGAA
565690	C2A12g32600	9	0.0	Splicing factor 3a subunit 2	TCAAACGAAAGAGTTGTTTTTGC	CAGGTGTGTAATCCAGAGGGTGTAT
52144	HpmsE082	9	17.3	Adenylate kinase	TTTTTGGTAAGCTGGAATGACTAA	ATGAGATTGGAAGTCATGCTATGG
142659	C2A12g29210	9	41.0	Serine/arginine repetitive matrix 1	TCCAAATAGATATGGGAGGTGAAG	GATCTTTTGTGTTTTATCCCCAGGTG
52799	C2A14g03280	9	42.6	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	AAACTTTAGCATGGAAATTTTCGTTAT	TGAAAAGGCTGTGACTTAGTAAATG
53913	C2A12g32950	9	50.3	WD-repeat protein	TTCACCTAGACTTTTTTCATCTTCC	CTCATGCTCTTTCATATTCATCCAC
589453	C2A14g26180	9	69.4	Mitochondrial carrier protein-like	AGAGAGGTGTTTTCTGATGGTTG	TGGCAGTCAAACACTAAAACACTAGCTG

Table 2. Continued.

SNP (HRM) marker ^z	Previous marker ^y	LG ^x	Position ^w	Gene description ^v	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
143399	C2A14g11120	9	81.0	Elongation factor Ts	CACGTA AAAACA AACTCGTTGAATC	TTCAATAAAGTTGTAACACACACAGTGG
565921	C2A13g13235	10	0.0	DNA-damage inducible protein DD11-like	AATTGAACATTTCAAGTCATGTCCG	TACCATTAACCTCCGGAGAAGAGAG
38511	C2A15g60990	10	6.1	ATP-dependent RNA helicase	ACATGGAAGGAACATCAGATTTTGT	ACTTGATGTAGCATGACATGGATT
41628	C2A15g01990	10	21.2	Auxin efflux carrier family protein	TTGTTTGTGGCATTGTAATCAAT	CGCAACAATGGTCTTAATATTTTT
143675	C2A13g51840	10	30.2	Acyl-CoA dehydrogenase	TCAAAATGCAATAAGTAAGA AACTTCG	GTACAAATGACTGTCTTGCCATCT
1335054	C2A12g37510	10	38.1	RNA binding protein	TTGCTTTGTTGTAGTTTCTATTTTTG	CAACTTAGCCAAGAGGACAGAAGT
42503	HpmsE065	10	50.9	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase	TGGGGCACATGCACCTGCT	CAAAATTAATCAATTTGGCATCAAAA
68633	CT57	10	58.4	IFA binding protein	AGAAAGCATGACAAAACAATCTGA	GTATGGCATAAAAATGTGACCTTGA
566568	C2A11g67740	10	78.0	Photosystem II core complex proteins psbY	CGGGTTCCTAGTGTGTTTGT	CACAGGAAGATTACGGGAAGCA
8175	C2A12g01110	11	0.0	Sec-independent protein translocase TatC	GTACTTATTACCTCCCACCAGCAC	TTCCCATCTCGTATGCTTTGAT
40281	C2A13g55120	11	16.1	Chalcone-flavonone isomerase	TGGCACATCAGAAATTTTCACTACTAT	TTTGTTTGTAATTTCTCAACAAGAAAA
52261	C2A12g03510	11	25.3	Erlin-2	TTTCGATTGAAAATACAGGAATCTC	GAGAAATTTGAAAAATCAATAACCA
564813	C2A11g14790	11	35.6	RNA-dependent RNA polymerase	GCATTAAGGGTGGTTCTTTTTAT	CACCTAATATAGCACAAATTAATTCCA
198266	C2A11g60440	11	48.6	Pantothenate kinase	CCAAATGATCTTACTGCACATCAGAGTT	GATCCCTCGCGAAATGT
50338	C2A12g27450	11	63.0	N-carbamoylputrescine amidase	AAGGGCTAGTAAGCAAAACAACATC	AGAGCATCTCAGTGGAAACATCTA
1336598	C2A13g44600	11	77.6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	GCTCACATACAGTTCTGTTTTCCAC	TCAGATAAATAGAGA AACTCCACATAGG
6199	C2A12g28250	11	92.3	Receptor-like protein kinase	CTAATACTCGAAAACATTTGTA A AAGC	TTTGGTAAGATCTCTCTTCGTTCA
1336291	C2A14g22260	12	0.0	Plastid terminal oxydase	TTATAAGAATGGCTTTCCGATCT	GGATATTGAAATCGTGTCTTTTGAC
576014	C2A15g16710	12	5.0	Chloride intracellular channel 6	TATATAGTTGACGGTGAACCTCAT	TTTATTAAGGGGTTCTGAAAATAAAT
40248	C2A13g60830	12	20.4	Actin	AATTGGAGAACA AATACGAAGAGG	CCTCGAATATGTTTGATATTTCTTTG
1334904	C2A15g04420	12	25.3	Kelch domain-containing protein 3	CCTTGCCTTGTATACCTTTTCTGTA	GGAAGGAAGACCTCATAGACCATA
571311	C2A12g28600	12	36.9	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 5	CAAAGCACGATCCTGAAATAGAT	CAAAAAGTAGTCCACTTCCAAGGT
1343951	C2A15g09880	12	45.7	RNA splicing factor	AAGTGATTTCTGGCCCTTTTC	TGTTCTATAAATGTTGCCCTTAGAGAC
562976	C2A11g17410	12	52.3	Nucleoside diphosphate kinase	CAAGCTGGTGCAGTAACAGAGT	CACTTTTGGGATTATACTGGGTA
570374	C2A14g16580	12	61.1	Phosphatase PTC7 homolog	TCTCCCTCATAAAAATATCGATTGG	AGTAACTCCGCCCTATATGAGCTTC
244687	C2A15g38530	12	71.2	Tryptophan synthase beta chain	AAATCAGAACCCGGCTCAATAAAG	TGAGGGGTA A AAGAAAAATAAATAGTGC
1336306	C2A11g48300	12	79.5	Soluble diacylglycerol acyltransferase	ATTCTGAAAATATCACTGTGCTTG	TGTATTTCCAGTTATCCATCAAAAGC
590661	T0800	12	82.2	Serine-glyoxylate aminotransferase	TCGTCTCCTCCAAACG TAGTATAG	CTTGGACTCTCCAAAAATGTTGTC

^zSNP (HRM) markers developed in this study.

^yPrevious markers reported by Wu et al. (2009) except four SSR markers (HpmsE134, 081, 082, and 065) by Yi et al. (2006).

^xLG linkage group.

^wPosition on linkage group analyzed in this study.

^vGene description obtained from homepage <http://solgenomics.net/>.

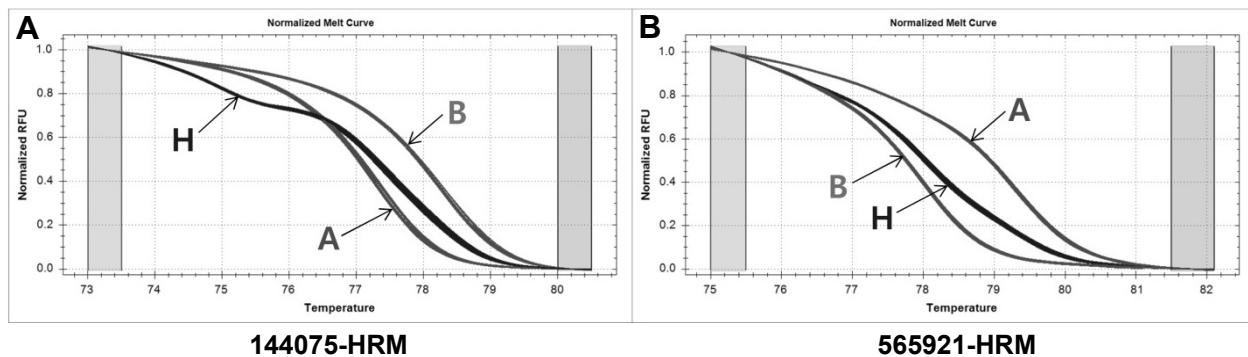


Fig. 1. Patterns of two HRM markers, 144075 (A) and 565921 (B), developed in this study. A, Plants of 'NB1' genotype; B, Plants of 'Jolokia' genotype; H, Heterozygous plants.

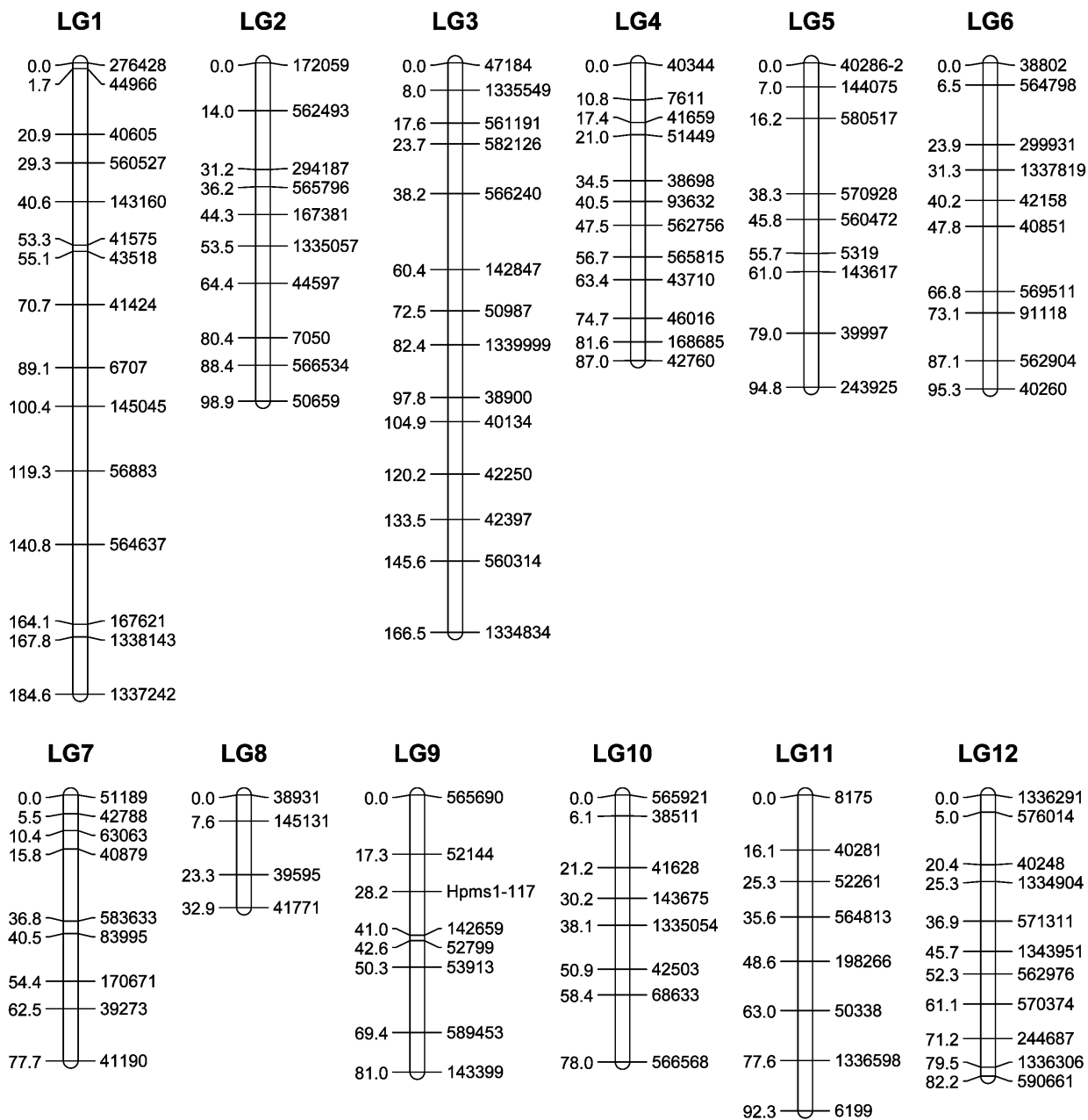


Fig. 2. Pepper genetic map constructed by one SSR marker (Hpms1-117; Lee et al., 2004) and 116 HRM markers generated through next generation resequencing of female and male parents. LG, linkage group; Bar left number, genetic position (cM); Bar right number, names of HRM markers.

로운 방법으로, 양친의 NGS resequencing을 통해 고추 유전자지도 상의 위치가 알려져 있는 분자표지를 일부 선발하여 SNP(HRM) 분자표지로 개발한 후 이를 이용하여 고추 유전체 전체를 포함하는 유전자지도 작성을 제안하고자 하였다. 식물재료는 *C. annuum* 'NB1'(모친)과 *C. chinense* 'Jolokia'(부친) 및 이들의 F₂ 세대 94개체를 사용하였다. 양친에 대해 NGS resequencing을 수행하여 각각 4.6Gbp와 6.2Gbp의 염기서열을 얻었다. 'NB1'과 'Jolokia' 간의 총 SNP 수는 429만개였으며, 그 중 확실한 SNP 수는 176만개였다. 이 중에서 고추 유전자지도 내 위치를 고려하여 145개의 SNP (HRM) 분석용 프라이머를 디자인하였으며, 그 중 116개가 성공적으로 다형성을 보여 유전자지도 작성에 사용되었다. 총 연관거리는 1,167.9cM였고, 연관군 수는 고추의 기본염색체 수와 일치하는 12개였다. 결과적으로 본 연구에서 제시된 방법은 시간적인 효율성과 예측의 정확성 면에서 새로운 고추 유전자지도 작성에 매우 적합함은 물론 작성된 유전자지도는 양친에서 차이를 보이는 특정 형질에 대한 QTL 분석을 하는데 바로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

추가 주요어 : *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, HRM, 졸로키아, 시퀀싱

인용문헌

- Bombarely, A., N. Menda, I.Y. Teclé, R.M. Buels, S. Strickler, T. Fischer-York, A. Pujar, J. Leto, J. Gosselin, and L.A. Mueller. 2011. The sol genomics network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic Acids Res.* 39:D1149-D1155.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Ha, S.H., J.B. Kim, J.S. Park, S.W. Lee, and K.J. Cho. 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: Deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Bot.* 58:3135-3144.
- Jo, Y.D., Y.M. Kim, M.N. Park, J.H. Yoo, M.K. Park, B.D. Kim, and B.C. Kang. 2010. Development and evaluation of broadly applicable markers for *Restorer-of-fertility* in pepper. *Mol. Breeding* 25:187-201.
- Kang, B.C., S.H. Nahm, J.H. Huh, H.S. Yoo, J.W. Yu, M.H. Lee, and B.D. Kim. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 102:531-539.
- Kang, W.H., N.H. Hoang, H.B. Yang, J.K. Kwon, S.H. Jo, J.K. Seo, K.H. Kim, D. Choi, and B.C. Kang. 2010. Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 120:1587-1596.
- Kim, H.J., H.B. Yang, B.N. Chung, and B.C. Kang. 2008. Survey and application of DNA makers linked to TSWV resistance. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:464-470.
- Kim, O.R., M.C. Cho, B.D. Kim, and J.H. Huh. 2010. A splicing mutation in the gene encoding phytoene synthase causes orange coloration in habanero pepper fruits. *Mol. Cells* 30:569-574.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distance from recombination value. *Ann. Eug.* 12:172-175.
- Korean Seed Association (KSA). 2012. Production of Korean vegetable seeds in 2011. http://www.kosaseed.or.kr/html/mu4_sub03_view.asp?bbs_num=1229.
- Lee, J., J.B. Yoon, J.H. Han, W.P. Lee, S.H. Kim, and H.G. Park. 2010a. Three AFLP markers tightly linked to the genic male sterility *ms₃* gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and conversion to a CAPS marker. *Euphytica* 173:55-61.
- Lee, J., J.H. Han, C.G. An, W.P. Lee, and J.B. Yoon. 2010b. A CAPS marker linked to a genic male-sterile gene in the colored sweet pepper, 'Paprika' (*Capsicum annuum* L.). *Breed. Sci.* 60:93-98.
- Lee, J., J.W. Do, J.H. Han, C.G. An, O.Y. Kweon, Y.K. Kim, and J.B. Yoon. 2011. Allelism and molecular marker tests for genic male sterility in paprika cultivars. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29:130-134.
- Lee, J., W.P. Lee, J.H. Han, and J.B. Yoon. 2010c. Development of molecular marker linked to a genic male-sterile gene, *ms_k* in chili pepper. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:270-274.
- Lee, J.M., S.H. Nahm, Y.M. Kim, and B.D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108:619-627.
- Lincoln, S., M. Daly, and E. Lander. 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0: A tutorial and reference manual. 3rd ed. Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA.
- Livingstone, K.D., V.K. Lackney, J.R. Blauth, R. van Wijk, and M.K. Jahn. 1999. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics* 152:1183-1202.
- Lu, F.H., M.C. Cho, and Y.J. Park. 2012. Transcriptome profiling and molecular marker discovery in red pepper, *Capsicum annuum* L. TF68. *Mol. Biol. Rep.* 39:3327-3335.
- Lu, F.H., M.Y. Yoon, Y.I. Cho, J.W. Chung, K.T. Kim, M.C. Cho, S.R. Cheong, and Y.J. Park. 2011. Transcriptome analysis and SNP/SSR marker information of red pepper variety YCM334 and Taean. *Sci. Hort.* 129:38-45.
- Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF). 2012. Statistics for food, agriculture, forestry and fisheries in 2011. MIFAFF, Gwacheon, Korea.
- Min, W.K., S. Kim, S.K. Sung, B.D. Kim, and S. Lee. 2009. Allelic discrimination of the *Restorer-of-fertility* gene and its inheritance in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 119:1289-1299.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, and M. Hirai. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breeding* 18:157-169.
- Prince, J.P., Y. Zhang, E.R. Radwanski, and M.M. Kyle. 1997. A versatile and high-yielding protocol for the preparation of genomic DNA from *Capsicum* spp. (pepper). *Hortscience* 32:937-939.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general

- source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17:6463-6471.
- The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-641.
- Voorrips, R.E. 2002. MAPCHART: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93:77-78.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wittwer, C.T., G.H. Reed, C.N. Gundry, J.G. Vandersteen, and R.J. Pryor. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinic. Chem.* 49:853-860.
- Wu, F., N.T. Eannetta, Y. Xu, R. Durrett, M. Mazourek, M.M. Jahn, S.D. Tanksley. 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 118:1279-1293.
- Wyatt, L.E., N.T. Eannetta, G.M. Stellari, and M. Mazourek. 2012. Development and application of a suite of non-pungency markers for the *Pun1* gene in pepper (*Capsicum* spp.). *Mol. Breeding* 30:1525-1529.
- Yang, H.B., W.Y. Liu, W.H. Kang, J.H. Kim, H.J. Cho, J.H. Yoo, and B.C. Kang. 2012. Development and validation of *L* allele-specific markers in *Capsicum*. *Mol. Breeding* 30:819-829.
- Yi, G., J.M. Lee, S. Lee, D. Choi, and B.D. Kim. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 114:113-130.