

## 엽록체 전장유전체 정보를 이용한 *Solanum hougasii* 특이적 분자마커 개발

김수정 · 박태호

### Development of *Solanum hougasii*-specific markers using the complete chloroplast genome sequences of *Solanum* species

Soojung Kim · Tae-Ho Park

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

**Abstract** *Solanum hougasii*, one of the wild *Solanum* species, has been widely used in potato breeding since it exhibits excellent resistance to diverse important pathogens. *S. hougasii* can be directly crossed with the cultivated tetraploid potato (*S. tuberosum*) owing to its EBN (Endosperm Balanced Number) value of 4, which is same as that of *S. tuberosum* although it is an allohexaploid. In this study, the complete chloroplast genome sequence of *S. hougasii* was obtained by next-generation sequencing technology, and compared with that of the chloroplast genome of seven other *Solanum* species to identify *S. hougasii*-specific PCR markers. The length of the complete chloroplast genome of *S. hougasii* was 155,549 bp. The structural organization of the chloroplast genome in *S. hougasii* was found to be similar to that of seven other *Solanum* species studied. Phylogenetic analysis of *S. hougasii* with ten other Solanaceae family members revealed that *S. hougasii* was most closely related to *S. stoloniferum*, followed by *S. berthaultii*, and *S. tuberosum*. Additional comparison of the chloroplast genome sequence with that of five other *Solanum* species revealed five InDels and 43 SNPs specific to *S. hougasii*. Based on these SNPs, four PCR-based markers were developed for the differentiation of *S. hougasii* from other *Solanum* species. The results obtained in this study will aid in exploring the evolutionary and breeding aspects of *Solanum* species.

**Keywords** PCR-based marker, cpDNA, Potato, SNPs, *Solanum hougasii*

#### 서 언

*Solanum hougasii*는 멕시코에서 자생하는 괴경을 형성하는 감자(*Solanum tuberosum* L.) 야생종 중의 하나이다. 이 야생종은 감자의 *Phytophthora infestans*에 의한 감자역병(late blight), *Alternaria solani*에 의한 겹둥근무늬병 (early blight), 감자선충(root-knot nematode), 감자바이러스Y (potato virus Y) 등 다양한 병원균에 대해 저항성을 보여 감자의 품종 육성에 중요한 재료로 이용된다(Brown et al. 1999; Cockerham 1970; Haynes and Qu 2016; Inglis et al. 2007). *S. hougasii*는 6배체이나 EBN (Endosperm Balanced Number)이 4로 재배되고 있는 4배체 감자와 동일한 EBN을 가지고 있어 이론적으로 감자와 직접적인 교배를 통한 품종 육성에 이용될 수 있다(Cho et al. 1997; Hawkes 1990; Haynes and Qu 2016; Ortiz and Ehlenfeldt 1992; Spooner et al. 2014). *S. hougasii* 엽색체의 유전체 구성은 GISH (Genomic in situ hybridization) 분석에 의해 진화적으로 구명되었는데, *S. demissum*이 AA 계통을 기반으로 조성된 동질6배체 인 반면, *S. hougasii*의 유전체는 AABBP 계통을 가지는 이질6배체 인 것으로 확인되었다(Pendinen et al. 2012). 이러한 결과는 본 연구에서 보고하고자 하는 *S. hougasii*의 엽록체 전장 유전체(cpDNA)의 결과와 함께 다른 감자 야생종의 cpDNA와의 비교 분석을 통해 AA, BB, 또는 PP 계통으로 구성되어 있는 다양한 2배체 *Solanum* 야생종과 동질배수체 및 이질배수체 계통 구성을 가지는 다양한 *Solanum* 종들을 대상으로 한 진화적인 그리고 감자 육종 측면에서의 새로운 연구의 기회를 제공할 수 있을 것이다.

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

엽록체 또는 미토콘드리아와 같은 세포질 유전체(cpDNA 또는 mtDNA)는 그들만의 특별한 유전체를 가지며 광합성, 응성불임 등과 같은 중요한 세포성 기능을 하는 특별한 유전자들로 구성되어 있다(Jheng et al. 2012; Ruiz and Daniell 2005). 감자는 기본적으로 다섯 가지의 cpDNA 타입(A, C, S, T and W)을 가지고 있으며, 대부분 재배종 감자의 경우  $\beta$  타입의 mtDNA와 함께 T 타입의 cpDNA로 알려져 있다(Hosaka and Hanneman 1988). T 타입과 다른 cpDNA 타입의 가장 큰 차이는 cpDNA 상의 *trnV*와 *ndhC* 사이의 유전자 간 영역에 *S. tuberosum*에 241 bp의 삭제(deletion)이 존재한다는 것이다(Hosaka 2002; Hosaka and Sanetome 2012). cpDNA 전체의 염기서열을 구명하는 것은 대부분의 식물종에서 나타나는 바와 같이 종 내에서는 그 다형성이 드문 반면, 종 간에는 상대적으로 분명하게 다형성이 나타나 그 정보를 이용하고자 함에 있다(Kim et al. 2015). 이는 많은 식물종의 cpDNA가 구조적으로 거의 유사한 형태를 띠고 있으나(Sugiura et al. 1998; Palmer 1991; Raubeson and Jansen 2005; Saski et al. 2005), 많은 식물종의 cpDNA에서 유전자 순서의 재배치, 역위, SNP, InDel 등과 같은 변이가 발생하여 이들의 비교 분석을 통해 다양한 정보를 얻을 수 있기 때문이다(Calsa Junior et al. 2004; Cho et al. 2015; Jheng et al. 2012; Kim et al. 2005; Saski et al. 2005).

본 연구에서는 앞서 Cho et al. (2018)에 의해 간략히 보고된 바 있는 *S. hougasii*의 전체 cpDNA에 대한 조금 더 상세한 정보를 제공하며, 이와 가지과(Solanaceae) 다른 종의 cpDNA와 비교 분석하고 이를 통해 개발한 PCR 기반의 *S. hougasii* 특이적 분자마커 개발에 대한 결과를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

본 연구에 사용된 식물 재료로는 엽록체 전장 유전체 분석을 위해 감자 야생종 *S. hougasii* (SH2)가 사용되었으며, 이후 *S. hougasii* 특이적 마커 개발을 위해 감자 품종 육성 계통 중 하나인 PT56와 감자 품종 ‘탐라’(‘Tamra’, TR)와 *S. hougasii* (PI161174, SH2)를 포함한 감자 야생종 16개 계통 - *S. acaule* (PI310970, SA), *S. pinatisectum* (PI190115, SP), *S. berthaultii* (PI310981, SB1), *S. mochiquense* (PI338616, SM1), *S. cardiophyllum* (PI341233, SC1), *S. kurtzianum* (PI498422, SK), *S. microdontum* (PI310979, SM2), *S. commersonii* (PI558050, SC2), *S. chacoense* (PI201846, SC3), *S. candolleianum* (PI210035, SC4), *S. brevicaulis* (PI205394, SB2), *S. vernei* (PI230468, SV2), *S. raphanifolium* (PI246488, SR), *S. jamesii* (PI578236, SJ) and *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (PI566805, ST2) - 이 이용되었다. 실험에 이용된 모든 식물 재료는 국립식량과학원 고령지농업연구소로부터

터 분양 받아 이용되었다.

### DNA 추출

DNA 분리에는 Genomic DNA Extraction kit (Plants) (RBC, New Taipei City, Taiwan)가 이용되었으며, 기내 식물체 또는 온실에서 유지되고 있는 모든 식물 재료를 대상으로 약 100 mg의 잎을 채취하여 수행되었다.

### 엽록체 전장유전체 분석

*S. hougasii* 계통 중 하나인 SH2-10을 대상으로 엽록체 DNA의 전장유전체(cpDNA) 분석이 수행되었다. SH2-10의 genomic DNA를 추출하고 Macrogen (Macrogen, Seoul, South Korea)의 Illumina Hiseq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)의 플랫폼을 이용하여 전체 염기서열 정보를 얻은 후 파이프라인의 생물정보학 파이프라인(<http://phyzen.com>) (Cho et al. 2015), 4.06 beta version CLC genome assembler (CLC Inc, Rarhus, Denmark), Nucmer (Kurtz et al. 2004) 등을 이용하여 엽록체 유전체의 염기서열을 추출하고 유전체 서열을 조립하였다. 이후, 전장 유전체의 완성본은 보고된 *S. commersonii* cpDNA (KM489054)와의 비교, 대표 콘티그들은 BLASTZ 분석 결과, 그리고 일부 영역에서의 편집을 토대로 하여 순서대로 정렬되었으며, 구조와 염기서열을 확인하였다(Cho et al. 2016; Schwartz et al. 2003).

*S. hougasii*의 cpDNA에 포함되어 있는 유전자 분석은 DOGMA (Dual Oranellar Genome Annotator) 프로그램을 통해 1차적인 유전자 부위를 확인하고, Blast search를 기반하여 최종 유전자를 확인하였다(Wyman et al. 2004). 원형의 *S. hougasii* cpDNA 전체 유전자지도는 OGDRAW (OrganellarGenomeDRAW; <http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de>) 프로그램을 이용하였다(Lohse et al. 2013).

### 엽록체 전장유전체의 비교

*S. hougasii*의 cpDNA와 다른 가지과(Solanaceae)에 속한 다양한 종들과의 유연관계 확인을 위해 계통수 분석을 진행하였다. 분석에는 본 연구 결과로 얻은 *S. hougasii*의 cpDNA를 포함하여 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) 및 본 연구와 동시에 진행되어 얻은 *S. stoloniferum* (MF471373)의 cpDNA 등, 전체 11종의 cpDNA가 이용되었으며, 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, *S. hougasii* 특이적 마커 개발을 위해 *S. hougasii*의 cpDNA와 함께 *S. chacoense* (MF471371), *S. berthaultii* (KY419708), *S. commersonii* (KM489054), *S. nigrum* (KM489055), *S. tuberosum* (KM489056)의 cpDNA 등 총 6종을 대상으로 EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)의 ClustalW2에 의해 다중 정렬이 수행되었으며, 이를 통해 InDel과 SNP영역을 구명하였다.

### PCR 기반의 분자마커 개발

*S. hougasii* (MF471372), *S. chacoense* (MF471371), *S. berthaultii* (KY419708), *S. commersonii* (KM489054), *S. nigrum* (KM489055), *S. tuberosum* (KM489056) 등 전체 6종의 cpDNA 다중 정렬을 통해 구명된 *S. hougasii* 특이적 InDel과 SNP를 대상으로 *S. hougasii* 특이 마커 개발이 수행되었다.

확인된 InDel 영역에서의 *S. hougasii* 특이성을 검증하기 위하여 InDel 영역 특이적인 프라이머를 디자인하여 PCR을 진행하였다. PCR은 총 18개의 유전자형 계통(PT56, TR, SH2, SA, SP, SB1, SM1, SC1, SK, SM2, SC2, SC3, SC4, SB2, SV2, SR, SJ, ST2)을 대상으로 Cho와 Park (2016)에 의한 방법으로 수행되었다. Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany)를 이용하여 총 25ul 볼륨(20 ng genomic DNA, 0.5 mM dNTPs, 10 pMol each primer, 1 U Taq polymerase (Genetbio, Daejeon, South Korea))으로 PCR 후, 핵산염색용액인 RedSafe (Intron Biotechnology, Seongnam, South Korea)를 이용하여 1% agarose gel에서 확인하였다.

SNP 마커의 경우, 우선 *S. hougasii* 특이적 SNP를 대상으로 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)을 이용하여 6종의 염기서열 다중 비교에서 *S. hougasii*의 단편만을 절단하고 나머지 5종의 단편은 절단하지 못하거나, 반대로 5종의 단편은 절단하나 *S. hougasii*의 단편은 절단하지 못하는, 즉 각각의 SNP 영역에 *S. hougasii* 특이적으로 PCR 단편을 절단할 수 있는 적합한 제한효소가 존재하는지를 확인하였다. 이후 SNP 영역을 포함하여 PCR에 의한 DNA 단편이 증폭될 수 있도록 프라이머를 디자인하여 PCR과 전기영동을 앞서 언급된 바와 같이 진행하였고, 특정 SNP 영역을 대

상으로 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

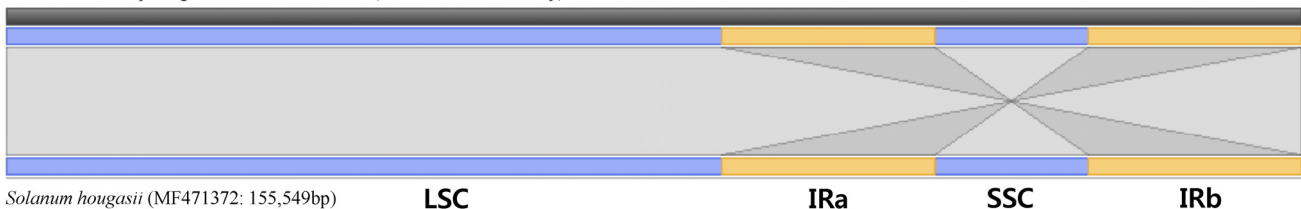
#### 감자 야생종 *S. hougasii* 엽록체 전장유전체 완성

*S. hougasii* 엽록체 전장유전체(cpDNA)는 NGS(Next-Generation Sequencing) 기술에 의해 완료되어 간략히 보고된 바가 있다 (Cho et al. 2018). 데이터는 Illumina의 PE 표준 프로코콜에 의해 평균 길이가 297.1 bp인 염기서열 총 651,869,869 bp를 얻었으며, *S. commersonii*의 cpDNA 전체 염기서열(KM489054, Cho et al. 2016)과 비교하고 BLASTZ 분석의 결과를 종합하여 엽록체 전장 유전체를 조립하여 3개의 대표 컨티그를 형성하였다(Schwartz et al. 2003) (Fig. 1).

추정되는 염기서열의 오류는 62.73x의 데이터를 맵핑하는 과정과 한 쌍의 inverted repeat 영역(IRs), small single copy 영역(SSC), large single copy 영역(LSC) 간의 경계 부분의 염기서열을 포함하는 다수의 영역을 대상으로 한 PCR과 ABI3730에 의한 BigDye Terminator Cycle Sequencing에 의해 수정되었다. 최종적인 *S. hougasii*의 cpDNA는 대다수 일반적인 식물의 cpDNA와 같이 원형의 이중가닥 분자로 이루어져 있으며 총 cpDNA의 크기는 155,549 bp였다(Cho et al. 2018; GeneBank accession no. MF471372). 세부적인 구조는 18,373 bp의 SSC 영역과 85,990 bp의 LSC 영역을 연결하는 25,593 bp의 IR 영역으로 구성된 전형적인 4분할 구조이며, 다른 *Solanum* 속의 다른 종들과 비교할 때 약간 긴 편이나, *S. stoloniferum* 보다는 18 bp 짧은 것으로 나타났다(Table 1).

*S. hougasii*의 엽록체 전장 유전체는 105개의 단백질 코딩 유전자, 45개의 tRNA, 8개의 rRNA 등, 총 158개의 유전자를 포함하고 있으며, 이 중 각각 10개, 9개, 4개 등 총 23개가 한 쌍의 IR 영역에서 역배열로 중복되어 있었다(Table 1, Fig. 2). 전체 염기서열 중 59.4%가 평균 584.5 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.

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

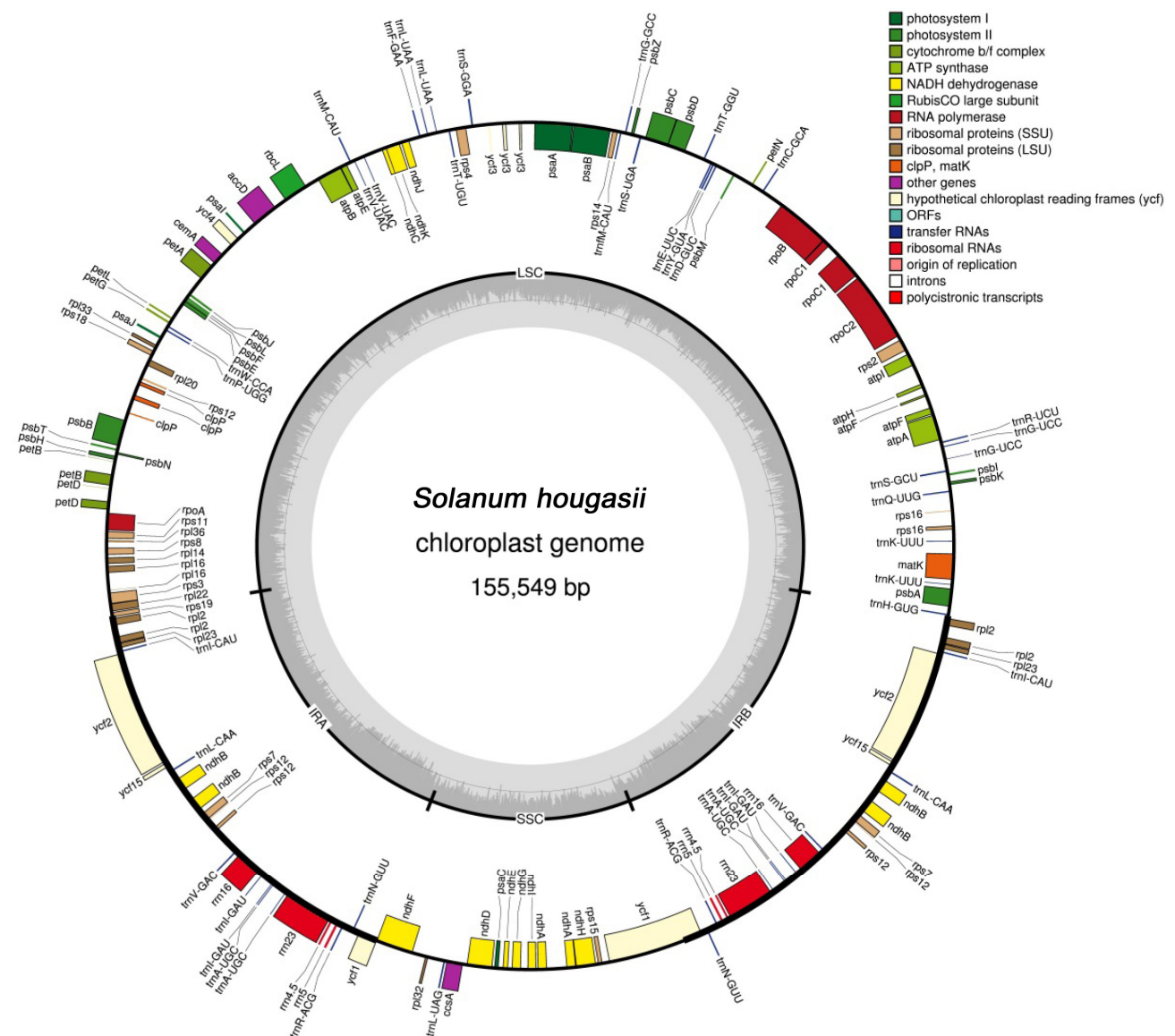


**Fig. 1** Assembly result of the complete chloroplast genome sequence of *S. hougasii*. Four contigs representative of the chloroplast genome of *S. hougasii* have been compared with the corresponding regions in the chloroplast genome of *S. commersonii* (KM489054). Blue and yellow bars indicate contig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

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

Species	Accession no.	Total Length (bp)	GC content (%)	Total No. of genes	No. of tRNA	No. of rRNA	Reference
<i>S. hougasii</i>	MF471372	155,549	38	135	36	4	This study
<i>S. stoloniferum</i>	MF471373	155,567	38	135	36	4	Concurrent 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).



**Fig. 2** Gene map of *S. hougasii* 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 counterclockwise direction

GC의 함량은 37.87%이며, 유전자, tRNA, rRNA 등의 개수, 순서 등이 모두 다른 *Solanum* 속의 종들과 유사한 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, *S. stoloniferum*과는 거의 일치하였다 (Table 1) (Cho et al. 2016; Cho and Park 2016; Kim et al. 2018; Kim and Park, 2019).

엽록체 전장유전체 비교 및 계통수

본 연구결과로 얻은 *S. hougasii*의 cpDNA는 계통수 작성을 위해 가지과에 속하는 다른 10종의 cpDNA의 코딩 서열과 비교 분석되었다(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. hougasii*와 *S. stoloniferum*은 앞서 엽록체 전장유전체 비교 분석한 결과에서 나타난 바와 같이 거의 일치하는 수준으로 동일한 그룹으로 분류되었으며, 이후 가장 근접한 *Solanum* 종은 *S. berthaultii*와 *S. tuberosum*이었다.

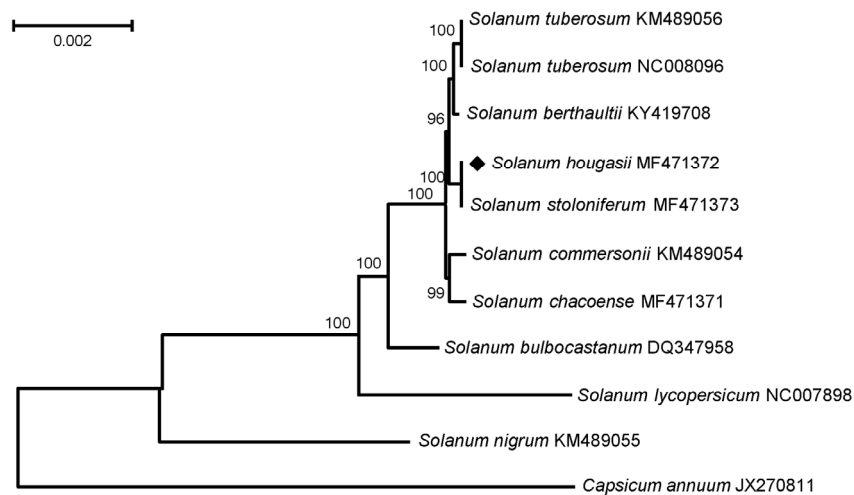
*S. hougasii*의 cpDNA를 이용하여 *S. hougasii*와 다른 *Solanum* 속에 속하는 종들을 구분할 있는 *S. hougasii* 특이적 분자마커를 개발하기 위해 EMBL의 ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)를 이용하여 *S. hougasii*의 cpDNA와 다른 5개 *Solanum* 종의 cpDNA 전체를 대상으로 다중 정렬을 수행하였다(Fig. 4). 그 결과, 앞서 보고된 바와 같이 다수의 InDel과 SNP 영역을 발견할 수 있었으나(Cho and Park 2016; Chung et al. 2006; Kim et al. 2018; Kim and Park 2019), 대부분은 계통수의 결과에 나타난 것과 같이 유연관계가 상대적으로 먼 *S. nigrum*에 의한 것이었으며(Fig. 3), *S. hougasii* 특이적으로 InDel과 SNP 기반의 마커를 개발하는데 활용할 수 있을 것으로 판단되는 영역이 각각 5개, 43개로 나타났다.

*S. hougasii* 특이적 분자마커 개발

분자마커의 개발은 다중 정렬의 결과로 얻은 다수의 InDel과 SNP 중, 다중 정렬에 이용된 6종의 cpDNA의 비교에서 *S. hougasii*에는 특이적이며 나머지 5종은 일치하는 InDel과 SNP를 대상으로 진행하였다. 앞서 보고된 바와 같이, 이들 특이적 InDel과 SNP는 전체 cpDNA 영역 중 InDel의 경우 코딩영역보다는 비코딩영역에서 조금 더 많이 분포하고 있었으며, SNP의 경우 코딩영역과 비코딩영역에서 거의 비슷하게 분포하고 있었다(Cho and Park 2016; Chung et al. 2006; Kim and Park 2019).

InDel 영역을 대상으로 프라이머를 디자인하여 PCR을 할 경우 분자마커의 다형성에 의해 효과적으로 식물종을 구별할 수 분자마커를 개발하여 적용되고 있다(Cho et al. 2015; Garcia-Lor et al. 2013; Yamaki et al. 2013). 하지만, 본 연구에서는 앞서 언급된 5개의 *S. hougasii* 특이적 InDel 영역 모두 PCR 기반의 *S. hougasii* 특이적 마커가 나타나지 않았다. 아마도 이는 상대적으로 좁은 InDel 영역에서 디자인 된 프라이머가 *S. hougasii* 만을 특이적으로 증폭하지 못한 결과인 것으로 추정된다.

SNP를 기반으로 한 분자마커 개발에서는 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 것으로 Konieczny and Ausubel (1993)에 의해 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) 마커로 명명되었으며, 이는 *Solanum* 속에 속한 다른 종들을 구별하거나 같은 종내 다른 유전자형을 구별하는데 많이 이용될 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 많이 활용이 되고 있다



**Fig. 3** Phylogenetic tree of *S. hougasii* and ten *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

<b>SH2_SNP_1 (<i>trnK-rps16</i>)</b>	
SH2-10	GAATTATATTTGTTTCGATACACTGTTGTCAATATAAATATTT <b>TAAT</b> TATTGAAAAAAAAAAAA
SC3-12	GAATTATATTTGTTTCGATACACTGTTGTCAATATAAATATTGAATATTGAAAAAAAAAAAA
Sber	GAATTATATTTGTTTCGATACACTGTTGTCAATATAAATATTGAATATTGAAAAAAAAAAAA
Scom	GAATTATATTTGTTTCGATACACTGTTGTCAATATAAATATTGAATATTGAAAAAAAAAAAA
Snig	GAATTATATTTGTTTCGATACACTGTTGTCAATATAAATATTGAATATTGAAAAAAAAAAAA
Stub	GAATTATATTTGTTTCGATACACTGTTGTCAATATAAATATTGAATATTGAAAAAAAAAAAA
<b>SH2_SNP_5 (<i>rpl22-rps19</i>)</b>	
SH2-10	ATAAGGTTTGCCTCCTACTACTGAATCATAAGC <b>ATCGAT</b> ATTTTTTTTATTAATATTAACG
SC3-12	ATAAGGTTTGTCTCCTACTACTGAATCATAAGCATCTATATTTTTTTTATTAATATTAACG
Sber	ATAAGGTTTGTCTCCTACTACTGAATCATAAGCATCTATATTTTTTTTATTAATATTAACG
Scom	ATAAGGTTTGTCTCCTACTACTGAATCATAAGCATCTATATTTTTTTTATTAATATTAACG
Snig	ATAAGGTTTGCCTCCTACTACTGAATCATAAGCATCTAGATTTTTTTTATTAATATTAACG
Stub	ATAAGGTTTGTCTCCTACTACTGAATCATAAGCATCTATATTTTTTTTATTAATATTAACG
<b>SH2_SNP_13 (<i>rbcL-accD</i>)</b>	
SH2-10	TAGTTTCCCTGAATCAAGCCAAGTATTACAACCTCTTTCTACCC <b>AG</b> CCTGTATATTGTCCC
SC3-12	TAGTTTCCCTGAATCAAGCCAAGTATTACAACCTCTTTCTAC <b>CCATC</b> CTGTATATTGTCCC
Sber	TAGTTTCCCTGAATCAAGCCAAGTATTACAACCTCTTTCTAC <b>CCATC</b> CTGTATATTGTCCC
Scom	TAGTTTCCCTGAATCAAGCCAAGTATTACAACCTCTTTCTAC <b>CCATC</b> CTGTATATTGTCCC
Snig	TAGTTTCCCTGAATCAAGCCAAGTATTACAACCTCTTTCTAC <b>CCATC</b> CTGTATATTGTCCC
Stub	TAGTTTCCCTGAATCAAGCCAAGTATTACAACCTCTTTCTAC <b>CCATC</b> CTGTATATTGTCCC
<b>SH2_SNP_15 (<i>trnW-trnP</i>)</b>	
SH2-10	ACCCAATACATTTTGTATGCATATA <b>T</b> TAGAATAGCATGATAAAAAATCAAAGATTATGTC
SC3-12	ACCCAATACATTTTGTATGCATATA <b>CTAG</b> AATAGCATGATAAAAAATCAAAGATTATGTC
Sber	ACCCAATACATTTTGTATGCATATA <b>CTAG</b> AATAGCATGATAAAAAATCAAAGATTATGTC
Scom	ACCCAATACATTTTGTATGCATATA <b>CTAG</b> AATAGCATGATAAAAAATCAAAGATTATGTC
Snig	ACCCAATACATTTTGTATGCAGATA <b>CTAG</b> AATAGCATGATAAAAAATCAAAGATTATGTC
Stub	ACCCAATACATTTTGTATGCATATA <b>CTAG</b> AATAGCATGATAAAAAATCAAAGATTATGTC

**Fig. 4** Multiple alignment of the intergenic regions of the sequences containing SNPs aided in the development of PCR-based markers specific for *S. hougasii*. The chloroplast genome sequences of *S. hougasii* (SH2-10: MF471372), *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 SNP-containing regions of *S. hougasii* are highlighted and the restriction sites are indicated in bold, red letters

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

Marker name	Region	S <sup>a</sup>	Primer sequence	Size (bp) <sup>b</sup>	RE <sup>c</sup>
SH2_SNP_1	<i>trnK-rps16</i> (Intergenic)	F	TGAGTTAGCAACCCGAAGAA	394	<i>MseI</i>
		R	ATTGTAGTTTTGTTTCCAC		
SH2_SNP_5	<i>rpl22-rps16</i> (Intergenic)	F	CTAGTATCATAAGCGTTTCC	399	<i>Clal</i>
		R	TAAGCTTAACACAAAAGCAG		
SH2_SNP_13	<i>rbcL-accD</i> (Intergenic)	F	AGGATTGAGCCGAATACAAC	384	<i>BclI</i>
		R	AAAAGAGATTTGTCTCTCC		
SH2_SNP_15	<i>trnW-trnP</i> (Intergenic)	F	TTGTGAAAGTTACTGAATGG	387	<i>MaeI</i>
		R	CACTGTGGAACAATTGAAGG		

<sup>a</sup>F and R indicate forward and reverse stand of primers, respectively.

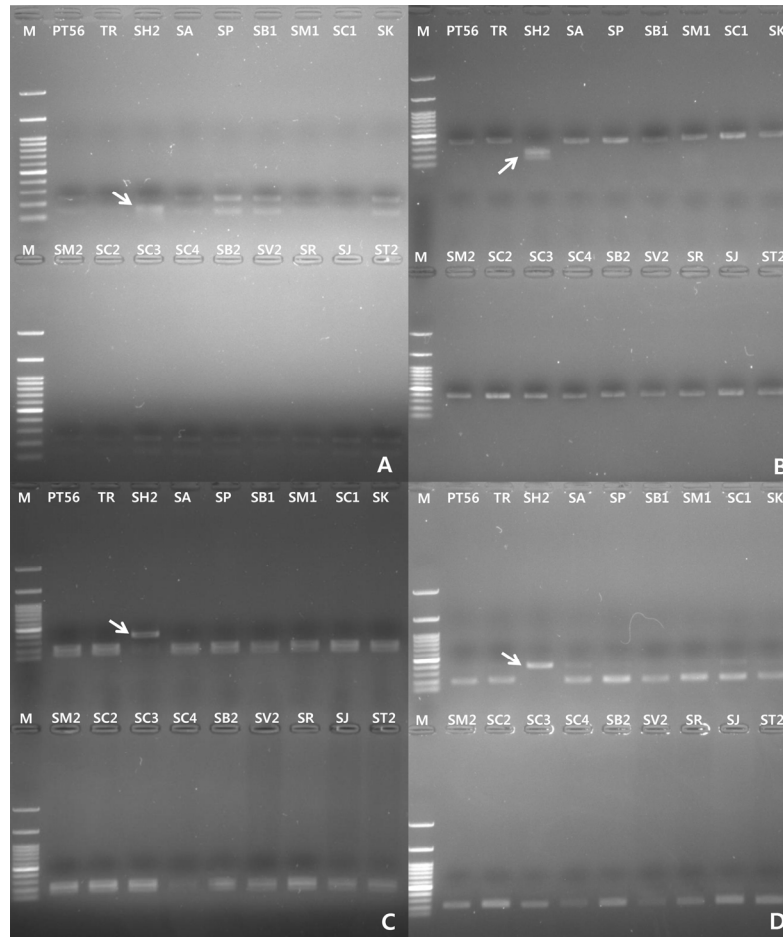
<sup>b</sup>The expected size of the PCR fragments were obtained based on the chloroplast sequence of *S. hougasii*.

<sup>c</sup>Restriction enzymes for generating *S. hougasii*-specific PCR markers.

(Komori and Nitta 2005; Uncu et al. 2015; Wang et al. 2017). 따라서, *S. hougasii* 특이적인 것으로 확인된 43개의 영역 중 일부를 대상으로 마커 개발에 적용하였으며, 그 중 *S. hougasii* 특이적인 SNP를 포함하는 PCR 결과물에 *S. hougasii*의 단편만을 절단하고 나머지 종들은 절단하지 못하거나 반대로 *S. hougasii* 단편은 절단하지 못하고 나머지 종들은 절단하는 적합한 제한효소를 구명하였다(Fig. 4). 최종적으로, 제작된 프라이머를 *S. hougasii*를 포함하는 총 18종에 적용하여 PCR

을 진행한 후 결과물에 특정 제한효소를 처리한 결과 4개의 SNP 기반의 CAPS 마커를 개발하였다(Table 2, Fig. 5).

엽록체 전장유전체는 감자의 신종 육성과정에서 야생종을 활용할 경우 그 정보를 활용하여 분자마커를 개발하는데 활용될 뿐만 아니라 그 특성은 진화와 관련된 연구에도 활용되고 있다(Bohs and Olmstead 1997; Hosaka and Sanetomo 2012). 육종적 측면에서는 체세포 융합이나 식물조직배양에서의 재분화 과정에서 cpDNA의 무작위 배분과 mtDNA (mito-



**Fig. 5** PCR-based markers for the differentiation of *S. hougasii* from other *Solanum* species. A: SH2\_SNP\_1. B: SH2\_SNP\_5. C: SH2\_SNP\_13. D: SH2\_SNP\_15. The four markers are all positively specific to *S. hougasii*. M, PT56, TR, SH2, 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, the potato variety ‘Tamra’, *S. hougasii* (PI161174), *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. brevicaulis* (PI205394), *S. vernei* (PI230468), *S. raphanifolium* (PI246488), *S. jamesii* (PI578236), and *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (PI566805), respectively

chondrial genome)의 높은 재조합 빈도는 *Solanum* 종을 포함하여 다양한 식물 중에서 보고된 바가 있다(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). 본 연구에서 개발된 SNP 기반의 마커는 *S. hougasii*를 다른 *Solanum* 종과 구별하는데 이용될 수 있으며, *S. hougasii*를 이용한 감자 품종 육성 과정에서 *S. hougasii* 또는 *S. tuberosum*의 적합한 염색체형을 선발하고 육종 연한을 조금 더 단축하는데 기여할 것이다.

### 적요

*Solanum hougasii*는 감자 야생종 중의 하나로 다양한 종류의 병원균에 대해 저항성을 가지고 있어 감자 육종에서 중요한 재료로 이용되고 있다. *S. hougasii*는 이질6배체이나 4배체인 감자와 EBN이 4로 같아 직접적인 교배로 육종에 활용될 수

있다. 본 연구에서는 NGS 기술에 의해 완성된 *S. hougasii*의 염색체 전장 유전체(cpDNA)와 이를 다른 *Solanum* 종과의 비교를 통해 개발한 분자마커에 대해 보고하였다. *S. hougasii*의 전체 cpDNA의 크기는 155,549 bp였으며 그 구조는 다른 *Solanum* 종과 매우 유사하였다. *S. hougasii*의 cpDNA와 가지과에 속하는 10개 종의 cpDNA 코딩서열을 이용하여 분석한 계통수에서는 *S. hougasii*와 *S. stoloniferum*이 거의 동일한 유전체 구성을 보였으며, 다음으로 *S. berthaultii* 및 *S. tuberosum*과 유연관계가 가까운 것으로 확인되었다. *S. hougasii*와 다른 다섯 종의 *Solanum*과의 전체 cpDNA 다중 정렬을 통해 *S. hougasii* 특이적인 다섯 개의 InDel과 43개의 SNP 영역을 구명하였으며 이를 기반으로 최종적으로 PCR을 기반으로 한 네 개의 *S. hougasii* 특이적 마커를 개발하였다. 본 연구의 결과는 *Solanum* 종들을 대상으로 한 조금 더 세부적인 진화적 그리고 육종적 측면에서의 연구에 기여를 할 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

- Bohs L, Olmstead RG (1997) Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Syst Bot* 22:5-17
- Brown CR, Hojtaehedi H, Santo GS (1999) Genetic analysis of resistance to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from *Solanum hougasii* into cultivated potato. *J Nematol* 31:264-271
- 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, 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 K-S, Cho J-H, Im J-S, Choi J-G, Park Y-E, Jang D-C, Hong S-Y, Park T-H (2018) The chloroplast genome sequence of *Solanum hougasii*, one of the potato wild relative species. *Mitochondr DNA Part B* 3:755-757
- 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
- Cockerham G (1970) Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25:309-348
- 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
- Hawkes JG (1990) The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, London, UK
- Haynes KG, Qu X (2016) Late blight and early blight resistance from *Solanum hougasii* introgressed into *Solanum tuberosum*. *Amer J of Potato Res* 93:86-95
- Hosaka K (2002) Distribution of the 241 bp deletion of chloroplast DNA in wild potato species. *Am J Potato Res* 79:119-123
- Hosaka K, Hanneman RE Jr (1988) The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA. *Theor Appl Genet* 76:172-176
- 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
- Inglis DA, Brown CR, Gundersen BG, Porter LD, Miller JS, Johnson DA, Lozoya-Saldaña H, Haynes KG (2007) Assessment of *Solanum Hougasii* in Washington and Mexico as a source of resistance to late blight. *Amer J of Potato Res* 84:217-228
- 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 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 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 K, Lee SC, Lee J, Lee HO, Joh HJ, Kim NH, Park HS, Yang TJ (2015) Comprehensive survey of genetic diversity in chloroplast genomes and 45S nrDNAs within *Panax ginseng* species. *PLoS One* 10:e0117159
- 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 Bioechnol* 46:79-87
- 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) OrganellarGenome DRAW – 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 *Diplotaxis catholica* + *Brassica juncea*. *Plant Cell Rep* 17:814-818
- 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, 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
- Pendinen G, Spooner DM, Jiang J, Gavrilenko T (2012) Genomic in situ hybridization reveals both auto- and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species. *Genome* 55:407-415
- 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
- Ruiz ON, Daniell H (2005) Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome. *Plant Physiol* 138:1232-1246
- 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
- Smilde WD, Brigneti G, Jagger L, Perkins S, Jones JDG (2005) *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theor Appl Genet* 110:252-258
- Spooner DM, Ghislain M, Simon R, Jansky SH, Gavrilenko T (2014) Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot Rev* 80:283-383
- 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 interspecific 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
- 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