

Microsatellite와 SNP Marker를 이용한 한국재래닭의 유전적 연관지도 작성

서동원¹ · 박희복¹ · 최누리¹ · 진 실¹ · 유채경² · 슐타나¹ · 허강녕³ · 조철훈⁴ · 이준헌^{1*}

¹충남대학교 동물자원생명과학과, ²경상대학교 농업생명과학연구원,
³농촌진흥청 국립축산과학원 가금과, ⁴서울대학교 농생명공학부

Construction of Genetic Linkage Map using Microsatellite and SNP Markers in Korean Native Chicken

Dong Won Seo¹, Hee Bok Park¹, Nu Ri Choi¹, Shil Jin¹, Chae Kyoung Yoo², Hasina Sultana¹, Kang Nyeong Heo³, Cheorun Jo⁴ and Jun Heon Lee¹

¹Department of Animal Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 331-801, Korea

⁴Department of Agricultural Biotechnology and Research Institute of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea.

ABSTRACT Chicken is one of the major livestock, especially for supplying proteins to human. The chicken genome size is approximately one-third compared with that of the human genome and regarded as a valuable model animal for genetics and development biology. In this study, we constructed the genetic linkage map for Korean native chicken (KNC) using 131 microsatellite (MS) and 8 single nucleotide polymorphism (SNP) markers. As a result, the total map length was calculated as 2729.4 cM and the average genetic distance between markers was 19.64 cM. The marker orders and genetic distances were well matched with the consensus linkage map except for the physical order of *ADL0278* and *MCW0351* in GGA8. In addition, the recombination rates in macrochromosomes were 3.7 times higher than that of microchromosomes. The average numbers of alleles, expected heterozygosity (Hexp) and polymorphic information content (PIC) values were calculated as 5.5, 0.63 and 0.58, respectively. These results will give useful information for the understanding of genetic structure and QTL studies in KNC.

(Key words : Korean native chicken, linkage map, microsatellite, single nucleotide polymorphism)

서 론

닭은 주요 경제동물일 뿐만 아니라, 유전체내 반복염기서열에 반복서열이 적어 사람의 3분의 1에 해당하는 작은 크기의 유전체를 가지고 있기 때문에, 인간의 질병을 비롯한 다양한 형질 유전 연구에 모델동물로써 이용가치가 높다(Wong et al., 2004). 이러한 이유로 Bumstead와 Palyga(1992)는 1992년 처음으로 restriction fragment length polymorphisms(RFLP) 방법으로 확인된 DNA 마커를 이용하여 연관지도를 작성하려는 시도가 이루어졌다. 이후 random amplified polymorphic DNA (RAPD)와 amplified fragment length polymorphisms(AFLP)

방법을 이용하였고, 근래에는 microsatellite(MS) marker를 이용한 연관지도를 작성하였으며, 2000년에는 닭의 consensus 연관지도 작성을 보고하기도 하였다(Levin et al., 1993, 1994; Cheng et al., 1995; Groenen et al., 1998, 2000). 최근에는 대용량 SNP 분석이 가능함에 따라 SNP chip을 활용한 연관분석의 방법까지 활용되고 있다(Groenen et al., 2009).

한국재래닭은 국립축산과학원에서 피모색의 표현형에 따라 적갈색, 황갈색, 회갈색, 흑색, 백색의 다섯 계통의 순종 계통을 유지하고 있다. 이 다섯 계통은 풍미와 관련된 글라이신, 알라닌, 프롤린과 같은 핵산 물질의 조성이 브로일러와 비교하여 우수하고, 쫄깃한 식감을 가지고 있다고 보고

* To whom correspondence should be addressed : junheon@cnu.ac.kr

된 바 있다(Choe et al., 2010). 하지만 한국재래닭의 유전적 연구는 미토콘드리아 DNA 및 major histocompatibility complex(MHC) 영역, MS 마커를 이용한 다양성 연구가 주를 이루었고, 1번 염색체 영역의 MS 마커와 경제형질의 연관 지역을 탐색한 연구도 보고된 바가 있었지만, 재래닭의 우수한 경제형질들과의 연관성을 확인한 연구결과는 미진한 실정이었다(김학규 등, 2008; 이학교 등, 2010; 이풍연 등, 2011).

따라서 본 연구에서는 한국재래닭의 유전체 구조를 이해하고, 우수경제형질과 관련된 마커 개발 연구의 기초자료를 확보하기 위하여 131개의 MS 마커와 8개의 single nucleotide polymorphism(SNP) 마커를 이용하여 최초로 한국재래닭의 유전적 연관지도를 작성하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 DNA 추출

한국재래닭의 연관지도 작성을 위한 시료는 국립축산과학원으로부터 적갈색, 황갈색, 회갈색, 흑색, 백색 계통의 부모세대(F_0) 88수, 자손세대(F_1) 597수의 익하정맥에서 채혈한 혈액샘플을 공시 받았다. 공시 받은 샘플의 DNA는 Manual Extraction 방법(Miller et al., 1989)으로 추출하였으며, 확보한 DNA는 실험이 수행될 때까지 -20°C 에 보관하였다.

2. MS 마커 및 SNP 마커의 유전자형 분석

한국재래닭 유전체에 고루 분포된 MS 마커 유전자형 분석을 위하여 ArkDB(<http://www.thearkdb.org/arkdb/>)에서 각 염색체 영역에 존재하는 총 200개의 MS 마커에 대한 PCR 증폭테스트를 실시하였으며, 확보된 마커는 FAM, VIC, NED, PET의 네 가지 형광물질을 정방향 프라이머에 modification 하여 증폭산물의 크기 비교를 통한 유전자형 분석을 수행하였다. 테스트한 마커 중에서 증폭이 원활히 이루어지지 않는 마커 및 multi-peak로 분석이 어려운 마커는 분석결과에서 제외하여 총 131개 MS 마커의 유전자형을 분석하였다. PCR 증폭 조건은 최초 95°C 에서 10분간 pre-denaturation을 수행하였고, 이후 95°C , 60°C , 72°C 에서 각각 30초간 denaturation, annealing, extension을 35회 반복하였으며, 72°C 에서 10분간 final-extension을 수행하였다. 확보된 증폭산물은 전기영동을 통해 size를 확인하였으며, GA3130(ABI, US)을 이용한 fragment analysis를 수행하기 위하여 $10\ \mu\text{L}$ 의 Hi-Di™ formamide와 $0.1\ \mu\text{L}$ 의 GeneScan™-500LIZ™의 size standard를 희석하여 대립유전자형을 분석하였다. 획득한 대립유전

자형은 Genemapper 3.7을 이용하여 동형접합체 및 이형접합체의 binary 값을 확보하여 MS 마커 유전자형 결정에 사용되었다. SNP 마커의 분석은 Target 유전자의 SNP 유전자형을 확보할 수 있는 알맞은 조건의 PCR-RFLP(*FABP3*, *FABP4*, *FASN*, *SCD*)의 방법과 FLUIDIGM™ assay(*MC1R*, *PRDM16*, *ODC*, *THRSF*)를 제작하여 SNP-array를 수행하였으며, 해당 SNP 정보는 Table 1에 제시되었다(Cahyadi et al., 2013a; Cahyadi et al., 2013b; Jin et al., 2014). 연관지도에 사용된 각 마커들의 이형접합도(heterozygosity)와 다형성(polymorphism information contents; PIC)은 Cervus ver 3.07을 사용하여 계산하였다(Marshall et al., 1998).

3. 연관지도 작성을 위한 통계분석

확보된 모든 MS 및 SNP 마커들의 유전자형은 CRI-MAP (Green, 1992) 프로그램을 통하여 연관지도 작성에 이용되었으며, BUILD 및 FIXED 옵션이 유전적 마커들의 순서결정 및 마커들의 유전적 거리(centi Morgan, cM) 계산에 이용되었다. 결정된 유전적 마커들의 순서와 계산된 유전적 거리는 Mapchart 2.2(Voorrips et al., 2002) 프로그램을 이용하여 유전적 연관지도로써 구현되었다.

결과 및 고찰

본 연구에서 한국재래닭의 유전적 연관지도를 작성하기 위해서 부모세대(F_0) 88수, 자손세대(F_1) 597수 집단의 131개 MS 마커 및 8개의 SNP로 총 139개 마커 유전자형을 확보해 마커들의 거리를 계산하여 순서를 결정하였다. 마커의 구성은 한국재래닭의 전체 유전체 영역에서 가능한 일정한 간격으로 유전적 거리를 조사하기 위하여 각 염색체에 위치한 MS 마커와 더불어 이전의 연구결과를 통해 다형성이 확보된 SNP 마커 정보를 추가하여 유전적 연관지도를 작성하였다. 그 결과, 26개 상염색체에서 총 2729.4 cM, 성염색체인 Z 염색체에서 113.3 cM 길이의 유전적 연관지도를 작성할 수 있었고, 마커 간 유전적 거리의 평균은 19.64 cM으로 계산되었다(Table 2, Fig. 1). 이러한 결과는 Jacobsson 등(2004)이 874수로 조성된 3세대(F_2) 집단을 145개의 마커 유전자형을 확보하여 작성된 연관지도의 결과보다 302.8 cM 더 큰 연관지도로 확인되었고, Groenen 등(2000)이 456수의 3세대(F_2) 집단을 350개의 마커를 이용하여 작성된 consensus 연관지도의 결과와 비교했을 때, 성염색체인 Z 염색체 및 28번 염색체를 제외하고, 연관지도의 길이가 80.8 cM 작은 것으로 확인되었다. 따

Table 1. Single nucleotide polymorphism (SNP) marker genotyping information using the methods of PCR-RFLP and FLUIDIGM™ SNP array

Method	Gene	Primer pair (5' to 3')	PCR product size (bp)	Annealing tem. (°C)	Identified SNP (location)	Enzyme
PCR-RFLP	<i>FABP3</i>	F:ggtgatgcatgaggacattg R:actaccgccttgctcact	460	60	g.508C>T (intron 1)	<i>NlaIII</i>
	<i>FABP4</i>	F:tgtgacctactggcaaagga R:ttctcccagtcgaagcttc	477	58	g.285C>T (exon 1)	<i>TaqI</i>
	<i>FASN</i>	F:gctgaaggctgctgacaagta R:aacaccatctccctccaataag	1,427	61	g.1222A>G	<i>HaeIII</i>
	<i>SCD</i>	F:ccccagaagaaaagtcc R:caaaaatcccaccaacaac	468	65	g.37284A>G	<i>AciI</i>
SNP array	<i>MC1R</i>	-	-	-	g.427A>G	-
	<i>PRDM16</i>	-	-	-	g.1057781C>T	-
	<i>ODC</i>	-	-	-	g.-353C>T	-
	<i>THRSP</i>	-	-	-	g.451T>C	-

라서 본 연구에서 선발한 139개의 마커들이 유전체 상에 비교적 고르고 넓은 영역에 분포한 마커들을 사용하여 적은 수의 마커로 상대적으로 큰 영역을 포함할 수 있는 연관지도를 작성할 수 있었던 것으로 사료된다. 확보된 마커 간의 유전적 거리는 Groenen 등(2000)이 확보한 consensus 연관지도와 비슷한 순서와 거리 차이를 나타낸 것을 확인할 수 있었고, 이들 마커의 정방향 프라이머 염기서열 정보를 NCBI의 BLAST 검색으로 위치정보를 확보하여 유전체 염기서열에 기반한 물리적 지도에서의 순서를 비교한 결과, GGA8의 *ADL0278*과 *MCW0351*을 제외하고 유전적 지도에서의 순서와 물리적 지도에서의 순서가 일치하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이러한 결과는 ArkDB 상에 제공되고 있는 consensus 염색체와 유전적 거리는 유사하지만, 유전체 염기서열 상에서 순서가 다른 것으로 확인되었다. 그러나 GGA11은 크기가 작은 microchromosome임에도 불구하고, 한국재래닭 집단에서는 유전적 거리가 128.5 cM, 물리적 거리가 66 Mbp로 consensus 연관지도에서 확보된 각각 69.2 cM, 21.9 Mbp에 비해 두 배 이상의 큰 차이를 확인할 수 있었는데(Table 2), 이렇게 큰 차이가 확인된 이유는 본 연구의 한국재래닭의 연관지도 GGA11의 경우, *MCW0097*, *ADL0123*, *MCW0230*의 3개의 MS 마커와 *MC1R* 1개의 SNP 마커로 총 4개의 마커를 사용하여 재조합 거리를 계산하였는데, 본 연구집

단의 *MCW0097*의 경우, 첫 번째 마커로써 0 cM으로 계산되었지만, consensus 지도에서는 두 번째 마커로 18 cM의 위치로 계산이 되었다. 또한 마지막 마커의 경우, consensus 지도에서는 *MCW0230*이 마지막 마커로써 88 cM의 위치로 계산되었지만, 본 연구 집단에서는 세 번째 마커로 108.7 cM으로 계산되어 결과적으로 두 마커 간의 거리를 계산해 보았을 때, consensus 지도의 경우에는 70 cM, 본 연구집단의 지도의 경우에는 108.7 cM으로 38.7 cM의 차이가 나는 것으로 확인된다. 또한 본 연구집단에서는 추가로 *MCW0230*보다 뒤에 위치한 *MC1R*의 SNP 마커를 사용하여 연관지도를 작성하였기 때문에 19.8 cM이 늘어나 consensus 지도보다 58.5 cM이 늘어난 결과를 얻은 것으로 확인되었다(Groenen et al., 2000). 또한, 비교적 최근에 Groenen 등(2009)이 보고한 고밀도 SNP chip 데이터를 기반으로 한 연관지도 작성 결과를 본 연구의 결과와 비교하여 보았을 때도 consensus 연관지도를 비롯한 타 집단의 연관지도 작성 결과와 비교하여 대체로 유사한 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 한국재래닭 집단에서는 GGA25에서는 유전자형을 확인할 수 있는 마커를 확보하지 못해 기존의 연관지도와 비교하지 못한 것은 추가 연구가 필요할 수 있을 것으로 사료된다. 성염색체인 Z 염색체의 경우에도 consensus 연관지도에서는 유전적 거리가 231.5 cM의 크기로 확인되었지만, 한국재래

Table 2. Genetic and physical distances with polymorphic information of mapped 131 microsatellite and 8 SNP markers¹

No	Chr	Marker	cM	PD	k	N	H _{obs}	H _{exp}	PIC
1	1	MCW0248	0.0	2.94	3	593	0.46	0.50	0.43
2	1	ADL0160	11.7	5.71	5	567	0.65	0.65	0.60
3	1	LEI194	59.1	26.92	7	587	0.34	0.68	0.65
4	1	MCW0111	85.5	39.04	5	595	0.60	0.70	0.63
5	1	MCW0297	113.5	51.63	4	595	0.49	0.62	0.55
6	1	MCW0101	164.5	78.09	4	597	0.55	0.64	0.57
7	1	ADL0268	203.7	88.35	5	596	0.69	0.71	0.67
8	1	LEI0169	260.7	129.93	5	593	0.34	0.46	0.41
9	1	LEI0107	288.3	138.75	7	593	0.60	0.67	0.63
10	1	MCW0145	318.9	157.11	7	596	0.72	0.78	0.76
11	1	MCW0020	321.5	163.76	4	596	0.66	0.70	0.65
12	1	MCW0115	377.2	182.20	4	512	0.43	0.63	0.56
13	1	LEI0134	387.2	186.72	6	592	0.47	0.66	0.63
14	1	<i>THRSP</i>	394.5	192.07	2	593	0.24	0.36	0.29
15	1	MCW0107	440.3	195.12	4	597	0.28	0.32	0.30
16	2	MCW0206	0.0	31.43	5	595	0.64	0.66	0.61
17	2	MCW0063	18.6	38.53	7	595	0.63	0.69	0.65
18	2	MCW0039	64.2	63.28	5	580	0.76	0.74	0.69
19	2	LEI0096	89.6	69.81	6	595	0.66	0.75	0.70
20	2	MCW0034	89.8	69.97	7	595	0.61	0.73	0.69
21	2	ADL0181	94.2	77.23	3	596	0.47	0.58	0.49
22	2	MCW0087	103.1	84.93	9	586	0.75	0.85	0.83
23	2	MCW0009	103.2	88.08	2	597	0.06	0.05	0.05
24	2	MCW0288	118.4	96.02	5	596	0.57	0.61	0.55
25	2	MCW0264	161.0	112.65	6	597	0.75	0.71	0.65
26	2	<i>FABP4</i>	180.3	121.23	2	590	0.41	0.40	0.32
27	2	MCW0282	211.0	132.30	5	590	0.68	0.73	0.69
28	2	LEI0141	215.7	135.07	8	596	0.50	0.68	0.64
29	2	MCW0320	228.7	139.68	5	580	0.69	0.78	0.75
30	2	ADL0146	237.0	145.01	7	539	0.61	0.76	0.71
31	2	MCW0157	330.1	148.73	6	590	0.63	0.74	0.70
32	3	MCW0261	0.0	0.81	8	594	0.76	0.83	0.81
33	3	LEI0043	5.2	3.32	6	582	0.58	0.58	0.55
34	3	MCW0083	65.3	12.44	5	595	0.71	0.75	0.71
35	3	MCW0222	91.5	22.35	4	596	0.58	0.66	0.58
36	3	MCW0127	138.9	54.39	9	592	0.65	0.69	0.64
37	3	MCW0103	159.9	68.79	2	592	0.32	0.35	0.29
38	3	MCW0224	180.0	76.49	4	596	0.52	0.57	0.51
39	3	MCW0016	204.4	89.93	5	596	0.63	0.74	0.70
40	3	GCT0053	216.5	94.82	4	597	0.54	0.62	0.55
41	3	<i>ODC</i>	234.1	96.35	2	593	0.11	0.10	0.10
42	3	LEI0166	257.3	105.02	3	596	0.44	0.45	0.40
43	3	MCW0037	276.0	108.46	3	597	0.51	0.62	0.55
44	4	ADL0255	0.0	2.23	4	597	0.60	0.63	0.56
45	4	ADL0317	10.2	3.44	8	597	0.69	0.78	0.75
46	4	ADL0203	29.2	8.25	8	572	0.64	0.80	0.78
47	4	MCW0295	58.9	16.30	5	587	0.63	0.70	0.66
48	4	LEI0094	127.5	49.53	9	596	0.65	0.81	0.79
49	4	MCW0098	215.0	78.16	2	597	0.34	0.48	0.37
50	4	LEI0085	235.9	82.44	5	592	0.46	0.53	0.47
51	4	LEI0073	242.1	84.77	10	589	0.61	0.77	0.73
52	5	MCW0263	0.0	7.11	4	596	0.54	0.70	0.64
53	5	MCW0193	31.5	14.21	9	594	0.64	0.71	0.68
54	5	ROS0013	56.2	23.55	8	597	0.67	0.79	0.75
55	5	ADL0292	58.6	25.64	7	597	0.74	0.81	0.78
56	5	MCW0214	63.8	27.15	10	502	0.59	0.71	0.67
57	5	MCW0078	71.0	28.82	3	597	0.28	0.30	0.26
58	5	MCW0029	91.9	41.00	11	595	0.70	0.79	0.78
59	5	MCW0081	105.3	48.77	2	595	0.37	0.47	0.36
60	5	ADL0166	120.9	51.88	9	597	0.75	0.82	0.79
61	5	ADL0298	158.9	57.56	6	597	0.43	0.64	0.57
62	6	MCW0014	0.0	6.46	4	595	0.47	0.51	0.47
63	6	MCW0250	11.9	15.06	6	534	0.54	0.62	0.57
64	6	ADL0230	14.2	16.00	6	578	0.68	0.74	0.69
65	6	<i>SCD</i>	29.7	17.05	2	589	0.46	0.45	0.35

Table 2. Continued

No	Chr	Marker	cM	PD	k	N	H _{obs}	H _{exp}	PIC
66	6	ADL0159	41.1	19.47	9	563	0.76	0.79	0.75
67	6	MCW0176	136.1	21.72	7	578	0.59	0.78	0.74
68	7	LEI0064	0.0	0.10	10	587	0.60	0.69	0.66
69	7	MCW0183	51.6	22.21	3	595	0.50	0.57	0.48
70	7	ROS0019	64.6	26.04	10	596	0.59	0.64	0.61
71	7	ADL0315	87.1	30.33	2	597	0.48	0.50	0.38
72	7	MCW0316	99.3	32.41	2	596	0.48	0.50	0.37
73	7	ADL0169	115.2	35.88	6	562	0.67	0.75	0.71
74	8	MCW0275	0.0	5.19	3	578	0.66	0.55	0.46
75	8	MCW0095	29.4	11.02	5	597	0.54	0.60	0.52
76	8	MCW0160	38.4	14.36	5	597	0.42	0.53	0.45
77	8	ADL0278	103.4	27.97	4	595	0.49	0.59	0.54
78	8	MCW0351	109.0	27.62	5	597	0.49	0.52	0.44
79	9	ROS0078	0.0	0.49	15	593	0.76	0.83	0.81
80	9	GCT0016	38.3	3.60	8	595	0.47	0.75	0.72
81	9	ADL0191	45.6	3.80	6	590	0.56	0.57	0.54
82	9	ADL0021	56.4	6.07	8	593	0.80	0.84	0.82
83	9	ADL0259	103.3	20.47	9	594	0.82	0.83	0.82
84	10	MCW0228	0.0	0.85	6	597	0.59	0.68	0.62
85	10	MCW0194	30.9	5.27	6	596	0.70	0.72	0.68
86	10	MCW0067	33.3	7.87	3	596	0.66	0.62	0.54
87	10	ADL0158	68.7	16.76	4	595	0.38	0.48	0.43
88	10	ADL0112	86.4	19.77	3	596	0.40	0.43	0.36
89	11	MCW0097	0.0	3.16	4	577	0.52	0.58	0.49
90	11	ADL0123	8.7	4.95	3	577	0.32	0.35	0.30
91	11	MCW0230	108.7	17.84	4	529	0.51	0.61	0.56
92	11	MC1R4	128.5	69.14	2	593	0.07	0.47	0.36
93	12	ADL0372	0.0	0.73	7	551	0.72	0.82	0.79
94	12	ADL0240	9.4	1.50	7	573	0.50	0.54	0.51
95	12	MCW0198	53.6	5.61	5	580	0.63	0.65	0.61
96	12	MCW0332	62.9	10.86	2	577	0.46	0.41	0.32
97	13	LEI0251	0.0	11.12	12	597	0.80	0.87	0.86
98	13	MCW0216	4.8	12.25	4	597	0.47	0.59	0.52
99	13	ROS0083	7.7	12.43	7	596	0.68	0.75	0.71
100	13	MCW0104	28.9	17.04	12	595	0.71	0.82	0.80
101	14	ADL0200	0.0	3.97	7	597	0.59	0.80	0.77
102	14	LEI0098	20.9	7.38	6	597	0.45	0.49	0.45
103	14	MCW0123	30.6	11.34	5	591	0.48	0.72	0.67
104	15	ADL0206	0.0	1.90	14	583	0.81	0.88	0.87
105	15	LEI0120	7.3	3.68	7	529	0.55	0.64	0.61
106	15	MCW0080	42.7	10.38	4	594	0.39	0.68	0.62
107	17	MCW151	0.0	2.04	6	597	0.48	0.66	0.61
108	17	MCW0330	21.9	3.84	4	597	0.58	0.53	0.48
109	17	ADL0293	40.8	5.81	7	594	0.65	0.71	0.67
110	18	ADL0304	0.0	1.45	8	592	0.71	0.75	0.72
111	18	<i>FASN</i>	29.2	4.89	2	589	0.27	0.26	0.23
112	18	MCW0219	48.9	6.94	6	550	0.52	0.62	0.56
113	19	MCW0266	0.0	2.15	3	407	0.58	0.65	0.57
114	19	MCW0287	43.4	7.26	8	554	0.67	0.74	0.71
115	20	LEI0080	0.0	0.63	8	576	0.75	0.81	0.78
116	20	ADL0324	14.4	2.69	6	596	0.63	0.75	0.71
117	20	ADL0034	21.5	3.53	10	549	0.65	0.78	0.76
118	21	<i>PRDM16</i>	0.0	1.04	2	597	0.36	0.36	0.30
119	21	SLC2A1	89.3	6.94	2	593	0.12	0.11	0.11
120	22	GCT0042	0.0	2.70	4	596	0.60	0.68	0.61
121	22	ROS0073	24.2	2.56	9	577	0.74	0.79	0.76
122	23	<i>FABP3</i>	0.0	0.59	2	590	0.41	0.40	0.32
123	23	ADL0262	14.0	0.60	3	597	0.47	0.55	0.48
124	23	MCW0165	16.5	0.60	3	595	0.44	0.57	0.50
125	23	ADL0289	26.0	1.82	3	596	0.46	0.52	0.47
126	24	MCW0301	0.0	4.55	6	594	0.65	0.77	0.73
127	24	LEI0069	12.9	5.03	13	573	0.74	0.84	0.82
128	26	MCW0069	0.0	2.57	8	597	0.52	0.63	0.58
129	26	MCW0285	0.8	2.63	6	597	0.57	0.67	0.63
130	26	LEI0074	37.8	4.78	6	597	0.73	0.80	0.76

Table 2. Continued

No	Chr	Marker	cM	PD	k	N	H _{obs}	H _{exp}	PIC
131	27	MCW0300	0.0	1.72	3	597	0.41	0.59	0.52
132	27	MCW0328	38.5	3.51	10	562	0.61	0.74	0.70
133	27	GCT0022	54.6	3.76	3	547	0.56	0.56	0.46
134	28	LEI0135	0.0	0.21	6	597	0.55	0.59	0.54
135	28	GCT0009	39.0	2.32	7	583	0.73	0.79	0.76
136	Z	ADL0273	0.0	25.10	4	596	0.25	0.45	0.40
137	Z	ADL0201	15.1	32.29	4	592	0.16	0.21	0.20
138	Z	LEI0121	73.5	50.70	4	584	0.41	0.49	0.46
139	Z	LEI0075	113.3	61.99	8	593	0.31	0.75	0.71
		Min			2	502	0.06	0.05	0.05
		Max			11	597	0.76	0.85	0.83
		Average			5.5	588	0.55	0.63	0.58

¹ SNP markers were indicated as bold and italic letters.

PD: physical distance (Mbp) from NCBI *G. gallus 4.0* genome sequence; k: number of alleles; N: number of animals; H_{obs}: observed heterozygosity, H_{exp}: expected heterozygosity; PIC: polymorphic information contents.

닭 집단에서는 113.3 cM으로 두 배 이상 작은 것으로 나타났지만, 이러한 차이는 염색체를 구성하고 있는 마커의 순서를 비교하였을 때 본 연구집단에서 첫 번째 마커는 *ADL0273*으로 0 cM에 위치하고 있지만, consensus 지도에서는 73 cM으로 확인되며, 본 연구집단의 마지막 마커는 *LEI0075*가 113.3 cM으로 계산되었지만, consensus 지도에서는 165 cM으로 확인되었기 때문에, 결과적으로 consensus 지도에서는 92 cM의 길이가 본 연구집단의 Z 염색체 길이와 같은 것으로 확인되었다. 해당 마커의 물리적 거리 역시 consensus에서는 74.6 Mbp로, 한국재래닭 집단에서는 61.99 Mbp로 확인되기 때문에 매우 유사한 결과라고 판단할 수 있다. 따라서 consensus와 같은 영역을 확인하기 위해서는 추가 마커를 확보하여 연관지도를 보충할 필요가 있을 것으로 사료된다.

연관지도에 사용된 마커들의 이형접합도(heterozygosity)와 다형성(polymorphism information contents)를 확인한 결과, 가장 낮은 이형접합도 및 다형성을 나타낸 마커는 GGA2 영역의 *MCW0009*로 각각 0.06, 0.05의 값이 확인되었다. 또한 가장 높은 이형접합도를 나타낸 마커는 GGA9 영역의 *ADL0259*로 1의 값이 계산되었고, 가장 높은 다형성은 GGA15 영역의 *ADL0206*으로 0.87의 값을 나타내었다. 이들 이형접합도의 평균은 0.55로 나타났고, 다형성의 평균은 0.58로 확인되었다(Table 2). Jacobsson 등(2004)이 보고한 연구에서도 구성한 집단의 145개 마커 유전자형의 다형성이 0.55로 확인되었고, 이렇게 확보된 다형성이 연관지도의 작성에 있어 유전적 거리를 계산하는데 충분한 다형성을 가지고 있던 점을 확인하였을 때, 본 연구의 집단의 연관지도 결과 또한 유전적 거리를 계산하여 연관지도를 작성하기에 충분한 마커의 다형성을 확보한 것으로 판단된다.

GGA1부터 GGA9까지 9개의 macrochromosome과 GGA10

부터 GGA28까지 17개의 microchromosome 각각의 유전적 거리 및 물리적 거리의 상관 정도를 확인해 본 결과, macrochromosome의 물리적 거리가 microchromosome의 거리에 비해 대략 3.7 배 정도가 큰 것으로 확인이 되었으며(Fig. 2), 이전의 연구에서도 유사한 결과가 나타난 점을 미루어 한국재래닭의 연관지도 작성이 타 연구 및 *G. gallus 4.0*의 유전체 서열과 부합하는 결과를 보여주고 있었다(Jacobsson et al., 2004; Schmid et al., 2000).

본 연구집단의 연관지도에서 암, 수를 구분한 연관지도를 작성하여 성별에 따른 염색체 크기를 비교한 결과, 26개의 상염색체 중에서 GGA1, 7, 13, 27의 네 개의 염색체에서 암, 수 성별에 따른 차이를 나타내었으며, 성염색체인 GGA Z 또한 성별에 따른 염색체 크기의 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Table 3). 이러한 결과는 Kerje 등(2003)이 보고한 연구에서는 8개 염색체(GGA1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, Z)에서 성별에 따른 유의적인 차이가 나타났던 연구결과와 비교하였을 때 GGA2, 4, 6, 11를 제외하고, 유의적인 염색체 크기 차이를 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 한국재래닭의 유전적인 구조를 이해하고, 형질 관련 마커 개발 연구에 정보를 제공할 수 있는 연관지도를 작성하기 위해 총 131개의 MS 마커와 8개의 SNP 마커 유전자형 정보를 이용하여 연관지도를 작성하였다. 그 결과, 상염색체에서는 2729.4 cM, 성염색체인 Z 염색체에서는 113.3 cM 크기의 연관지도를 확보할 수 있었고, 확보된 연관지도 작성에 사용된 모든 마커의 다형성 및 위치 정보가 이전의 연구 결과와 매우 유사한 결과들을 확인할 수 있었기 때문에 신뢰할 수 있는 연관지도가 작성된 것으로 판단되며, 본 연구를 통해 도출된 결과는 앞으로 한국재래닭의 양적 형질 좌위 탐색과 같은 응용연구를 하는데 유용하게 활용될

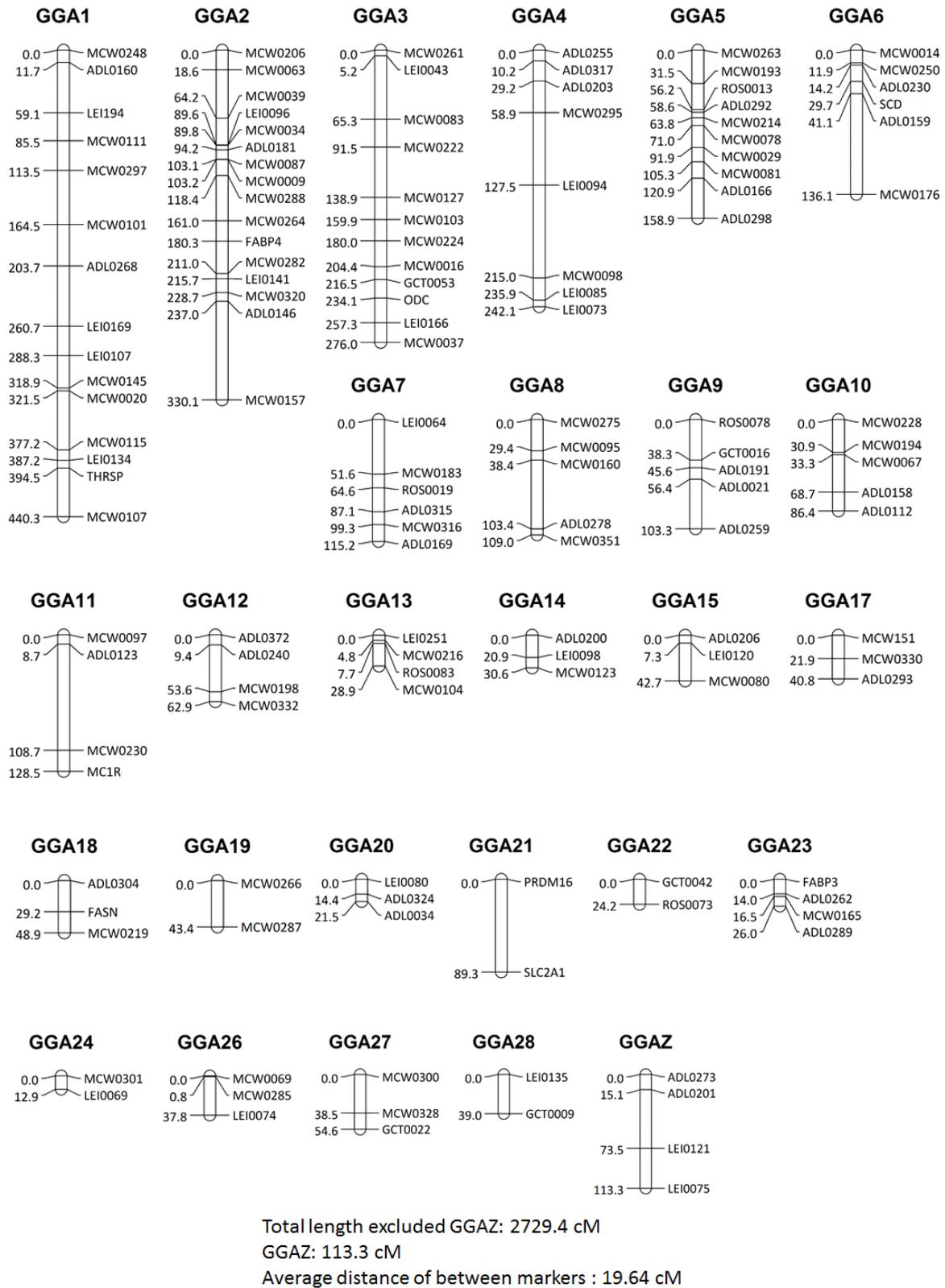


Fig. 1. Genetic linkage map using five lines of Korean native chicken with 131 microsatellite and 8 SNP markers. The marker information with genetic distances between markers in Kosambi cM is given on the vertical-axis.

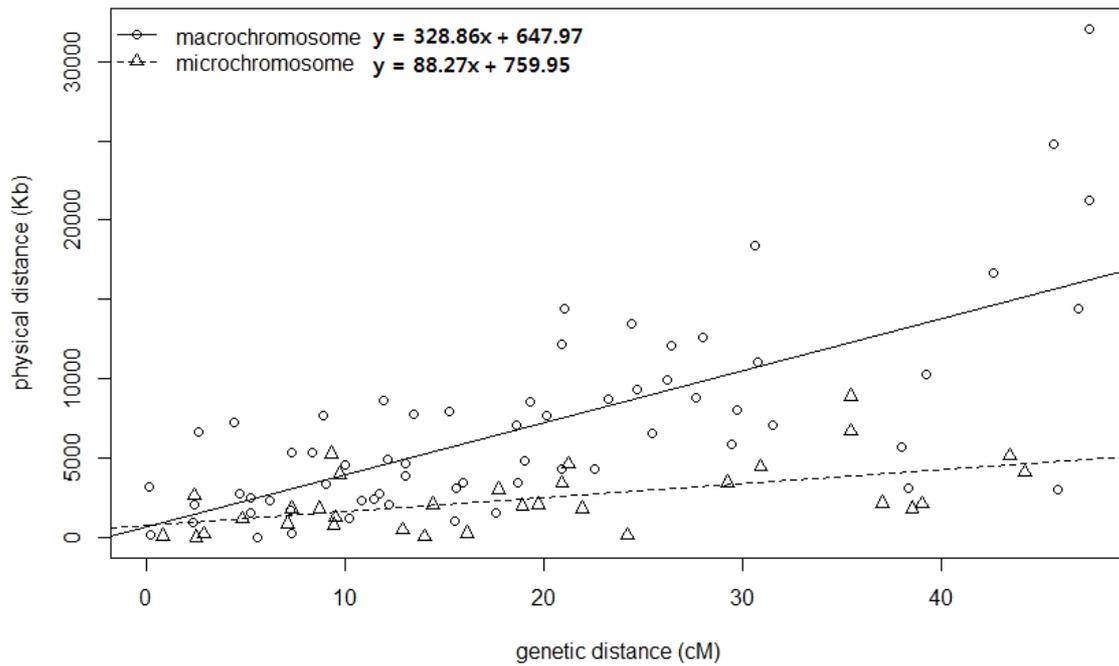


Fig. 2. Correlation analysis between genetic and physical distances on macrochromosomes (○) and microchromosomes (△). The location of physical distances of all markers were based on the forward primer sequences using NCBI blast search. Marker pairs with a genetic distance greater than 50 cM were omitted. Linear regression lines for macro- (full line) and microchromosomes (broken line) reveal a 3.7-fold higher recombination rate on microchromosomes.

Table 3. The average and sex-specific linkage map lengths in the Korean native chicken population. The linkage map difference between male and female was evaluated by χ^2 -test

GGA	Number of loci	Average	Female	Male	Sex difference χ^2
1	15	440.3	451.0	467.7	26.0*
2	16	330.0	324.7	332.8	20.3
3	12	276.0	261.5	292.5	13.6
4	8	242.0	250.1	224.1	6.2
5	10	158.9	161.7	158.7	12.1
6	6	136.1	99.8	139.4	1.9
7	6	115.2	115.1	123.8	16.5**
8	5	109.0	125.2	101.3	9.1
9	5	103.3	106.9	103.4	2.6
10	5	86.4	90.9	82.5	6.1
11	4	128.5	109.5	133.3	0.6
12	4	62.9	60.1	63.2	5.3
13	4	28.9	28.7	29.1	8.0*
14	3	30.6	33.7	28.2	2.1
15	3	42.7	45.7	39.9	3.0

Table 3. Continued

GGA	Number of loci	Average	Female	Male	Sex difference χ^2
17	3	40.8	51.6	34.0	5.7
18	3	48.9	50.4	44.7	4.9
19	2	43.4	44.1	41.9	1.8
20	3	21.5	22.3	20.9	1.4
21	2	89.3	46.0	100.0	0.4
22	2	24.2	23.6	25.4	0.1
23	4	26.0	26.3	24.3	4.1
24	2	12.9	16.0	9.9	3.6
26	3	37.8	39.0	37.1	3.3
27	3	54.6	40.4	120.7	10.9**
28	2	39.0	39.4	38.3	0.0
Z	4	113.3	97.9	173.8	12.0**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

수 있을 것이라 사료된다.

적 요

닭은 전체 염기서열의 길이가 포유류에 비해 3분의 1 정도로 비교적 작은 유전체를 가지고 있기 때문에 인간의 주요한 단백질 공급원으로써의 중요성뿐 아니라, 동물의 형질 연관 유전자 연구 및 발생유전학적 연구에 좋은 모델 동물이다. 따라서 본 연구에서는 한국재래닭 이용성을 증대시키는 목적으로 한국재래닭의 유전적 구조를 이해하고, 다양한 응용연구의 토대를 마련하기 위하여 131개의 microsatellite (MS) 마커와 8개의 SNP 마커 유전자형을 이용하여 한국재래닭의 유전적 연관지도를 작성하였다. 그 결과, 한국재래닭의 유전 연관지도의 총 길이는 2729.4 cM으로 확인되었고, 연관지도 작성에 사용된 각 마커 간의 거리는 평균 19.64 cM으로 계산되었다. 모든 마커의 유전적 거리와 물리적 거리의 순서는 GGA8의 *ADL0278*과 *MCW0351*의 물리적 거리의 순서가 바뀐 결과만 제외하고, 이전의 연구결과와 매우 유사한 결과를 나타내었다. 또한 macrochromosome과 microchromosome의 재조합률을 비교해 본 결과, macrochromosome이 microchromosome보다 3.7배 크게 나타나, 이전에 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 유전 연관지도의 암수에 따른 차이에서는 GGA1, 7, 13, 27의 네 개의 염색체에서 암, 수의 성별에 따른 차이를 나타내었다. 각 마커의 평균 대립유전자

수와 이형접합도(Hexp), 다형성(PIC) 수치는 각각 5.5, 0.63, 0.58로 유전적 지도를 작성하기에 충분하 다형성을 가진 것을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과는 한국재래닭의 유전적 구조를 이해하고, 유전체 QTL 연구와 같은 응용연구에 기초자료로써 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

(색인어 : 한국재래닭, 연관지도, microsatellite, SNP)

사 사

본 연구 결과는 차세대바이오그린21 사업(PJ008133) 및 충남대학교 학술연구진흥사업(2014-1684)의 지원에 의해 이루어진 것으로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bumstead N, Palyga J 1992 A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics* 13(3):690-697.
- Cahyadi M, Seo DW, Choi NR, Jin S, Maharani D, Heo KN, Kang BS, Jo C, Lee JH 2013 FABP3 and FABP4 genes are the potential candidates for body weights in Korean Native Chicken. *Korean J Poult Sci* 40(2):91-96.
- Cahyadi M, Seo DW, Jin S, Choi NR, Park HB, Heo KN, Kang BS, Jo C, Lee JH 2013 Association of SNPs in ODC and PRDM16 with body weight traits in Korean

- Native Chicken. *Korean J Poult Sci* 40(2):157-162.
- Cheng HH, Levin I, Vallejo RL, Khatib H, Dodgson JB, Crittenden LB, Hillel J 1995 Development of a genetic-map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Sci* 74:1855-1874.
- Choe JH, Jung S, Yun HJ 2010 Article: Differences in the quality characteristics between commercial Korean native chickens and broilers. *Korean J Food Sci Ani Resour* 30: 13-19.
- Green P 1992 Construction and comparison of chromosome 21 radiation hybrid and linkage maps using CRI-MAP. *Cytogenet Genome Res* 59:122-124.
- Groenen MAM, Crooijmans RPMA, Veenendaal A, Cheng HH, Siwek M, van der Poel JJ 1998 A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics* 49:265-274.
- Groenen MAM, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Briles WE, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, de Leon AP, Soller M, Takahashi H, Vignal A 2000 A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res* 10:137-147.
- Groenen MAM, Wahlberg P, Foglio M, Cheng HH, Megens HJ, Crooijmans RPMA, Besnier F, Lathrop M, Muir WM, Wong GKS, Gut I, Andersson L 2009 A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. *Genome Res* 19:510-519.
- Jacobsson L, Park HB, Wahlberg P, Jiang S, Siegel PB, Andersson L 2004 Assignment of fourteen microsatellite markers to the chicken linkage map. *Poultry Sci* 83:1825-1831.
- Jin S, Park HB, Seo DW, Cahyadi M, Choi NR, Heo KN, Jo C, Lee JH 2014 Association of MC1R genotypes with shank color traits in Korean native chicken. *Livestock Sci* 170:1-7.
- Kerje S, Carlborg O, Jacobsson L, Schutz K, Hartmann C, Jensen P, Andersson L 2003 The twofold difference in adult size between the red junglefowl and White Leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. *Animal Genetics* 34:264-274.
- Kim HK, Oh JD, Kang BS, Park MN, Chae EJ, Jung HM, Seo OS, Choe HS, Jeon GJ, Lee HK, Kong HS 2008 Potential allelic association of microsatellite markers on chromosome 1 with economic traits in Korean native chicken. *Korean J Poult Sci* 35(2):163-169.
- Lee PY, Yeon SH, Kim JH, Ko YG, Son JK, Lee HH, Cho CY 2011 Genetic composition of Korean native chicken populations - national scale molecular genetic evaluation base on microsatellite markers. *Korean J Poult Sci* 38(2): 81-87.
- Lee HK, Oh JD, Park CH, Lee KW, Lee JH, Jeon GJ, Kong HS 2010. Comparison for genetic diversity between Korean native commercial chicken brand groups using microsatellite markers. *Korean J Poult Sci* 37(4):355-360.
- Levin I, Crittenden LB, Dodgson JB 1993 Genetic-map of the chicken Z-chromosome using random amplified polymorphic DNA (Rapl) markers. *Genomics* 16:224-230.
- Levin I, Santangelo L, Cheng H, Crittenden LB, Dodgson JB. 1994. An autosomal genetic-linkage map of the chicken. *J Hered* 85:79-85.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LE, Pemberton JM 1998 Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7:639-655.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215-1215.
- Schimid M, Nanda I, Guttenbach M, Steinlein C, Hoehn H, Schartl M, Haaf T, Weigend S, Fries R, Buerstedde JM, Wimmers K, Burt DW, Smith J, A'Hara S, Law A, Griffin DK, Bumstead N, Kaufman J, Thomson PA, Burke T, Groenen MAM, Crooijmans RPMA, Vignal A, Fillon V, Morisson M, Pitel F, Tixier-Boichard M, Ladjali-Mohammed K, Hillel J, Maki-Tanila A, Cheng HH, Delany ME, Burnside J, Mizuno S 2000 First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet* 90:171-218.
- Voorrips RE 2002 Map chart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77-78.
- Wong GKS, Liu B, Wang J, Zhang Y, Yang X, Zhang Z, Meng Q, Zhou J, Li D, Zhang J 2004 A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 432:717-722.

Received Feb. 16, 2015, Revised Mar. 6, 2015, Accepted Mar. 12, 2015