

가지속 식물의 엽록체 전장유전체 비교를 통한 PCR 기반의 *Solanum demissum* 특이적 분자마커 개발

박태호

PCR-based markers for discriminating *Solanum demissum* were developed by comparison of complete chloroplast genome sequences of *Solanum* species

Tae-Ho Park

Received: 17 March 2021 / Revised: 26 March 2021 / Accepted: 26 March 2021

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Solanum demissum* is one of the wild *Solanum* species originating from Mexico. It has widely been used for potato breeding due to its resistance to *Phytophthora infestans*. *S. demissum* has an EBN value of four, which is same as that of *S. tuberosum*, so that it is directly crossable for breeding purposes with the cultivated tetraploid potato (*S. tuberosum*). In this study, the chloroplast genome sequence of *S. demissum* obtained by next-generation sequencing technology was described and compared with those of seven other *Solanum* species to develop *S. demissum*-specific markers. The total sequence length of the chloroplast genome is 155,558 bp, and its structural organization is similar to those of other *Solanum* species. Phylogenetic analysis with ten other Solanaceae species revealed that *S. demissum* is most closely grouped with *S. hougasii* and *S. stoloniferum* followed by *S. berthaultii* and *S. tuberosum*. Additional comparison of the chloroplast genome sequence with those of seven other *Solanum* species revealed two InDels specific to *S. demissum*. Based on these InDels, two PCR-based markers for discriminating *S. demissum* from other *Solanum* species were developed. The results obtained in this study will provide an opportunity to investigate more detailed evolutionary and breeding aspects in *Solanum* species.

Keywords cpDNA, InDels, PCR-based marker, Potato, *Solanum demissum*

서 언

*Solanum demissum*은 멕시코에서 자생하는 6배체의 괴경을 형성하는 감자(*Solanum tuberosum* L.) 야생종 중의 하나이다. 이 야생종은 감자에서 *Phytophthora infestans*에 의해 발생하는 감자 역병(late blight)에 저항성을 보여 이에 대해 가장 중요한 재료로 알려져 있으며 이미 레이스 특이적인 다수의 유전자가 재배종 감자에 도입되어 활용되었다(Park et al. 2009; Plastied and Hoopes 1989; Ross 1986). 이 야생종의 EBN (Endosperm Balanced Number)은 4로 4배체의 재배종 감자와 동일한 EBN을 가지고 있어 직접적인 교배를 통해 새로운 품종을 육성하는데 이용될 수 있으며(Cho et al. 1997; Hanneman 1994; Hawkes 1990; Johnston and Hanneman 1980; Ortiz and Ehlenfeldt 1992; Spooner et al. 2014), 실제 재배종 감자인 *S. tuberosum*과의 교잡으로 잡종 세대를 어렵지 않게 얻을 수 있었다(Dionne 1961; Sanetomo et al. 2011). 이에 더해, 감자 야생종들의 유전체 구성이 유전자 및 GISH (Genomic in situ hybridization) 분석 등에 의해 진화적으로 구명되었는데, AABBPP 계통 구성으로 이질6배체로 확인된 *S. hougasii*를 포함한 몇몇 야생종의 경우 이질배수성인 반면 *S. demissum*의 경우 AA 계통 기반의 동질6배체 인 것으로 확인되었다(Ono et al. 2016; Pendinen et al. 2012; Spooner et al. 2008). 하지만, 이러한 결과는 핵내 계통 분석의 결과로 진화적 관점에서 미토콘드리아나 색소체의 계통(cpDNA 또는 mtDNA) 분

Tae-Ho Park (✉)
대구대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Daegu University, Gyeongsan
38453, South Korea)
e-mail: thzoo@daegu.ac.kr

석과 관련된 연구는 거의 없어, 본 연구에서의 *S. demissum* 엽록체 전장 유전체의 결과는 다른 야생종과의 비교 분석을 통해 다양한 배수성을 보이는 가지속(*Solanum*) 야생종의 진화와 관련된 좀 더 심도 깊은 연구를 가능하게 할 것이며, *S. demissum* cpDNA와 다른 야생종 또는 재배종 감자 cpDNA와의 비교 분석을 통해 개발된 PCR 기반의 분자마커는 감자의 품종 육성에 기여할 수 있을 것이다.

용성불임이나 광합성 등과 같은 특별한 기능을 하는 유전자들로 구성되어 있는 cpDNA 및 mtDNA와 같은 세포질 유전체는 이들만의 특이한 유전체 구성을 가지고 있으며(Jheng et al. 2012; Ruiz and Daniell 2005), 감자 cpDNA의 경우 A, C, S, T, W 등 다섯 가지의 타입을 가지고 있으며, 대부분 재배종 감자의 경우 T 타입의 cpDNA와 함께 β 타입의 mtDNA를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Hosaka 2002; Hosaka and Hanneman 1988; Hosaka and Sanetome 2012). 또한, 보고된 감자와 감자 야생종 cpDNA의 유전적 구성 및 구조와 크기 등은 다른 식물들과 유사하게 한 쌍의 IR (Inverted Repeat)과 LSC (Large Single Copy) 및 SSC (Small Single Copy) 영역으로 4분할 되어 있으며, 대부분의 cpDNA는 다양한 단백질, rRNA, tRNA로 코딩되는 130여개 유전자로 구성되어 매우 유사한 것으로 알려져 있다(Palmer 1991; Raubeson and Jansen 2005; Saski et al. 2005; Sugiura et al. 1998; Yurina and Odintsova 1998). 하지만, 여전히 많은 식물종 간에는 cpDNA에서의 유전자 역위 및 재배치 등에 따른 SNP나 InDel과 같은 다형성이 나타나 이러한 정보를 통해 종 특이적 분자마커 개발이 가능하여 그 연구의 필요성이 여전히 존재하고 있다(Calsa Junior et al. 2004; Cho et al. 2015; Jheng et al. 2012; Kim et al. 2015; Kim and Park 2019, 2020a, 2020b; Saski et al. 2005).

이에 본 연구에서는 앞서 Cho et al. (2019)에 의해 간략히 보고된 바 있는 *S. demissum*의 전체 cpDNA에 대해 상세 정보를 제공하며, 이와 가지과(Solanaceae)의 다른 종들의 cpDNA와 비교 분석하고 그 결과를 이용해 PCR 기반의 *S. demissum* 특이적 분자마커를 개발한 결과를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료 및 DNA 분리

*S. demissum*의 cpDNA 분석을 위해 국립식량과학원 고령지 농업연구소로부터 분양 받은 계통 중 하나인 SD9가 이용되었으며, *S. demissum* 특이적 분자마커 개발을 위해서는 SD9에 더해 *S. demissum*의 SD7 계통 하나가 추가되었으며, 이외 재배종 감자인 ‘서홍’(SH), ‘하령’(HR), ‘대지’(DJ)와 감자 야생종 *S. acaule* (PI310970, SA), *S. berthaultii* (PI310981, SB1), *S. brevicaulle* (PI205394, SB2), *S. candolleum* (PI210035, SC4), *S. cardiophyllum* (PI341233, SC1), *S. chacoense* (PI201846, SC3),

S. commersonii (PI558050, SC2), *S. iopetalum* (PI230459, SI), *S. kurtzianum* (PI498422, SK), *S. jamesii* (PI578236, SJ), *S. microdontum* (PI310979, SM2), *S. mochiquense* (PI338616, SM1), *S. pinnatisectum* (PI190115, SP), *S. stoloniferum* (PI160224, SS), *S. vernei* (PI230468, SV2), *S. verrucosum* (PI160228, SV1)의 계통이 이용되었다.

모든 식물 재료는 기내 또는 온실에서 관리 및 유지되었으며, Genomic DNA Extraction kit (Plants) (RBC, New Taipei City, Taiwan)를 이용하여 약 100mg의 잎을 채취하여 DNA를 분리하였다.

엽록체 전장유전체 분석

S. demissum cpDNA 분석은 *S. demissum* 계통 SD9를 대상으로 genomic DNA를 추출하고 MacroGen (MacroGen, Seoul, South Korea)의 Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)의 플랫폼을 이용하여 진행되었다. 확보된 전체 염기서열 정보에서 cpDNA 염기서열 추출과 유전체 서열 조립을 위해 파이젠에 구축된 생물정보학 파이프라인(<http://phyzen.com>) (Cho et al. 2015), 4.06 beta version CLC genome assembler (CLC Inc, Aarhus, Denmark), Nucmer (Kurtz et al. 2004) 등이 이용되었다. 이후, 앞서 보고된 155,533 bp의 *S. berthaultii* cpDNA (KY419708, Park 2017; Kim et al. 2018)와 비교하고 구성된 대표 콘티그들을 BLASTZ 분석한 후, 일부 영역을 편집하여 정렬하여 그 구조와 염기서열을 확인하였다 (Cho et al. 2016; Schwartz et al. 2003).

S. demissum cpDNA의 유전자 분석은 Blast search를 기반으로 Geseq 프로그램을 이용하여 진행하였으며(Tillich et al. 2017), *S. demissum* cpDNA의 유전자지도는 OGDRAW (Organellar GenomeDRAW; <http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de>) 프로그램을 이용하여 작성되었다(Lohse et al. 2013).

엽록체 전장유전체의 비교

S. demissum cpDNA 분석의 결과로 얻어진 전체 염기서열은 기존의 연구결과로 NCBI (the National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 가지과 (Solanaceae)에 속한 10개 종의 cpDNA 전체 염기서열과 비교하여 계통수를 작성하였다. 비교된 10개 종은 *Capsicum annuum* (JX270811), *S. berthaultii* (KY419708), *S. bulbocastanum* (DQ347958), *S. chacoense* (MF471371), *S. commersonii* (KM489054), *S. hougasii* (MF471372), *S. lycopersicum* (NC007898), *S. nigrum* (KM489055), *S. stoloniferum* (MF471373), *S. tuberosum* (KM489056 및 NC008096)이며, *S. demissum*을 포함하는 총 12개의 전체 cpDNA로부터 엽록체 코딩 서열을 분석하고 이를 대상으로 Kimura 2-parameter 모델과 1,000번의 Bootstrap 옵션을 이용한 Maximum likelihood 방법에 의해 계통수를 분석하였다 (Tamura et al. 2013).

Reference chloroplast genome: *S. berthaultii* (KY419708: 155,533bp)

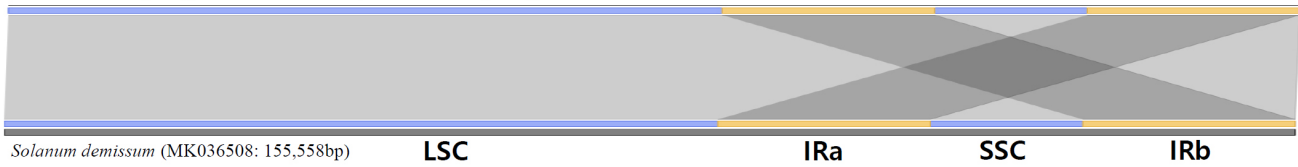


Fig. 1 Result of assembling the complete chloroplast genome sequence of *S. demissum*. The four representative contigs for the chloroplast genome of *S. demissum* and comparison with the corresponding regions of the *S. berthaultii* chloroplast genome (KY419708) are combined. Blue and yellow bars indicate contig matching with the reference sequence in forward and reverse orientations, respectively

PCR 기반의 *S. demissum* 특이적 분자마커 개발을 위해서는 확보한 *S. demissum* cpDNA 전체 염기서열을 *S. acaule* (MK036506), *S. brevicale* (MK036507), *S. bulbocastanum* (DQ347958), *S. chacoense* (MF471371), *S. commersonii* (KM489054), *S. stoloniferum* (MF471373), *S. tuberosum* (KM489056)의 cpDNA 전체 염기서열과 함께 EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)의 ClustalW2에 의해 다중 정렬되었으며, 이 결과를 통해 *S. demissum* 특이적 InDel 영역이 구명되었다.

PCR 기반의 분자마커 개발

8종의 cpDNA 전체 염기서열을 대상으로 한 다중 정렬의 결과로 구명된 *S. demissum* 특이적 InDel을 대상으로 *S. demissum* 특이성 검증이 수행되었다. 각각의 InDel 영역에 특이적인 프라이머를 제작하였으며, *S. demissum*과 *S. tuberosum*을 포함하여 총 21개의 유전자 계통, *S. demissum* (SD7 및 SC9), *S. tuberosum* (감자품종 ‘서홍(Seohong)’, ‘하령(Haryeong)’ 및 ‘대지(Daeji)’), *S. acaule* (SA), *S. berthaultii* (SB1), *S. brevicale* (SB2), *S. candolleianum* (SC4), *S. cardiophyllum* (SC1), *S. chacoense* (SC3), *S. commersonii* (SC2), *S. iopetalum* (SI), *S. kurtzianum* (SK), *S. jamesii* (SJ), *S. microdontum* (SM2), *S. mochiquense* (SM1), *S. pinnatisectum* (SP), *S. stoloniferum* (SS), *S. vernei* (SV2) and *S. verrucosum* (SV1)을 대상으로 PCR을 수행하였다. 총 25 μ l 볼륨 (약 20 ng genomic DNA, 0.5 mM dNTPs, 10 pMol each primer, 1 U Taq polymerase (Genetbio, Daejeon, South Korea))으로 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany)를 이용하여 PCR 한 후, 핵산염색용액인 RedSafe (Intron Biotechnology, Seongnam, South Korea)를 이용하여 1% agarose gel에서 확인하였다.

결과 및 고찰

감자 야생종 *S. demissum* 엽록체 전장유전체 완성

NGS (Next-Generation Sequencing) 기술에 의해 완성된 *S. demissum*의 엽록체 전장유전체(cpDNA)는 앞서 간략히 보고된 바 있다(Cho et al. 2019). 전체 염기서열의 완성 과정을 추

가해 기술하자면 Illumina의 PE 표준 프로코콜에 의해 평균 길이가 288.5 bp인 염기서열 정보 총 3,163,006,686 bp를 얻은 후, Trimmed read를 CLC de novo assembler 프로그램을 이용하여 엽록체 유전체 유래 컨티그만을 선별하고, 이를 확장하고 gap-filling 과정을 거쳐 완성되었다. 완성된 염기서열은 *S. berthaultii* cpDNA 전체 염기서열(KY419708, Park 2017; Kim et al. 2018)과 비교하고 BLASTZ 분석의 결과를 종합하여 엽록체 전장 유전체를 조립하여 3개의 대표 컨티그를 형성하였다(Schwartz et al. 2003) (Fig. 1). 추정되는 염기서열의 오류는 1,195.07x의 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. demissum*의 cpDNA는 대다수 일반적인 식물의 cpDNA와 같이 원형의 이중가닥 분자로 이루어져 있으며 총 cpDNA의 크기는 155,558 bp였다(Cho et al. 2019; GeneBank accession no. MK036508). 세부적인 구조는 18,373 bp의 SSC 영역과 85,999 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 9 bp 짧은 것으로 나타났다 (Table 1).

*S. demissum*의 전체 cpDNA에는 105개의 단백질 코딩 유전자, 45개의 tRNA, 8개의 rRNA 등, 총 158개의 유전자를 포함하고 있으며, 이 중 각각 11개, 9개, 4개 등 총 24개가 한 쌍의 IR 영역에서 역배열로 중복되어 있었다(Table 1, Fig. 2). 전체 염기서열 중 59.2%가 평균 583.1 bp의 크기로 코딩 영역이었으며, 단백질 코딩유전자와 RNA(tRNA 및 rRNA)가 각각 평균 764.6 bp, 223.6 bp의 크기로 51.6%와 7.6%의 비율로 분포되어 있었다. GC의 함량은 37.25%이며, 유전자, tRNA, rRNA 등의 개수, 순서 등이 모두 다른 *Solanum* 속의 종들과 유사한 것으로 나타났다(Table 1) (Cho et al. 2016; Cho and Park 2016; Kim et al. 2018; Kim and Park, 2019).

엽록체 전장유전체 비교 및 계통수

S. demissum cpDNA는 계통수 작성을 위해 가지과에 속하는 다른 10종의 cpDNA의 코딩 서열과 비교 분석되었다(Fig. 3).

Table 1 Results of comparative analysis of the chloroplast genome sequence of *S. demissum* with those of the cultivated potato, seven other *Solanum* species

Species	Accession no.	Total Length (bp)	GC content (%)	Total No. of genes	No. of tRNA	No. of rRNA	Reference
<i>S. demissum</i>	MK036508	155,558	37.87	135	36	4	In this study
<i>S. hougasii</i>	MF471372	155,549	37.87	135	36	4	Kim and Park (2020b)
<i>S. stoloniferum</i>	MF471373	155,567	37.87	135	36	4	Kim and Park (2020a)
<i>S. chacoense</i>	MF471371	155,532	37.89	136	36	4	Kim and Park (2019)
<i>S. berthaultii</i>	KY419708	155,533	37.88	137	39	4	Kim et al. (2018)
<i>S. commersonii</i>	KM489054	155,525	37.88	133	33	4	Cho et al. (2016)
<i>S. nigrum</i>	KM489055	155,432	37.90	139	39	4	Cho and Park (2016)
<i>S. tuberosum</i>	KM489056	155,312	37.88	130	30	4	Cho et al. (2016)
<i>S. bulbocastanum</i>	DQ347958	155,371	37.88	133	30	4	Daniell et al. (2006)
<i>S. tuberosum</i>	NC008096	155,296	37.88	131	36	4	Gargano et al. (2005)

*The data have been partially adopted from Kim and Park (2020a, 2020b).

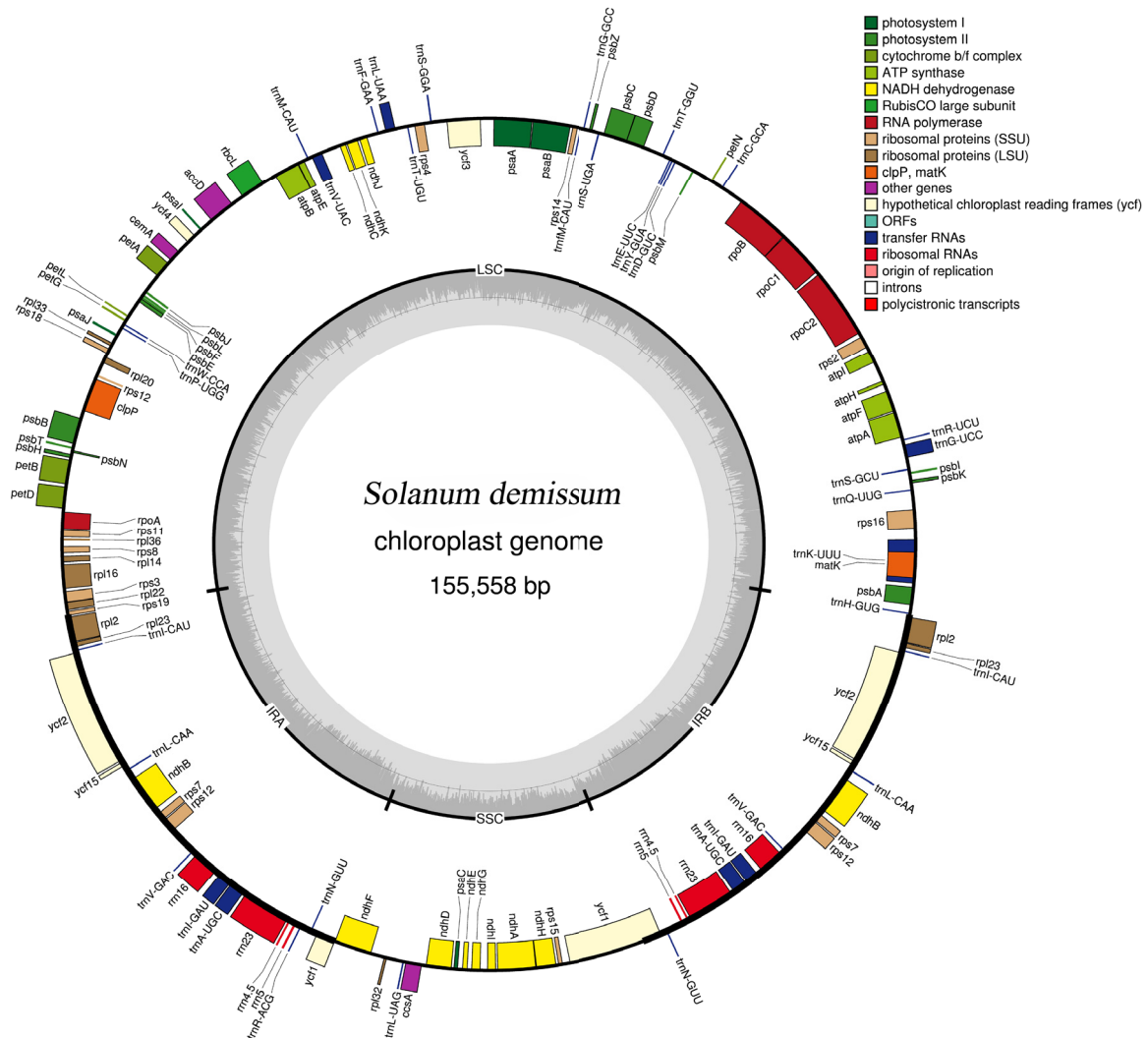


Fig. 2 Gene map of the *S. demissum* chloroplast genome. Genes on the outside of the map are transcribed in the clockwise direction, and genes on the inside of the map are transcribed in the counterclockwise direction

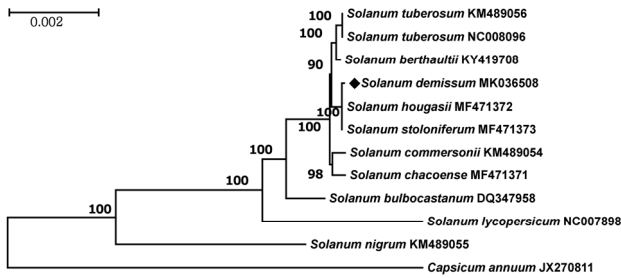


Fig. 3 Maximum-likelihood phylogenetic tree of *S. demissum* with eleven *Solanaceae* family members based on the chloroplast protein-coding sequences of each chloroplast genome. The numbers on each node indicate the bootstrap values from 1,000 replicates

분석에 이용된 방법(maximum likelihood)은 체계적인 분류의 결과를 보여주었을 뿐 만 아니라 높은 부트스트랩(bootstrap) 값은 계통수의 결과를 뒷받침 해 주었다. 결과적으로 계통수에서 *S. demissum*은 *S. hougasii*와 *S. stoloniferum*의 cpDNA 와 거의 일치하는 수준으로 동일한 그룹으로 분류되었으며, 이후 가장 근접한 *Solanum* 종은 *S. berthaultii*와 *S. tuberosum*이었다.

*S. demissum*의 cpDNA를 이용하여 *S. demissum*과 다른 *Solanum* 속에 속하는 종들을 구분할 있는 *S. demissum* 특이적 분자마커를 개발하기 위해 EMBL의 ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)를 이용하여 *S. demissum*의 cpDNA 와 다른 7개 *Solanum* 종의 cpDNA 전체를 대상으로 다중 정렬을 수행하였다(Fig. 4). 그 결과, 앞서 보고된 바와 같이 다수의 InDel과 SNP 영역을 발견할 수 있었으며(Cho and Park 2016; Chung et al. 2006; Kim et al. 2018; Kim and Park 2019), *S. demissum* 특이적인 InDel은 삽입과 삭제 각각 1개씩 총 2개의 영역으로 나타났다(Fig. 4).

S. demissum 특이적 분자마커 개발

분자마커의 개발은 다중 정렬의 결과로 얻은 2개의 InDel을 대상으로 진행하였다. 이들 특이적 InDel은 전체 cpDNA 영역 중 비코딩영역에 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). 본 연구에서는 앞서 언급된 비코딩영역 (*trnC-petN* 및 *psaA-ycf3*)에 존재하는 2개의 *S. demissum* 특이적 InDel 영역 모두에서 *S. demissum*을 다른 종과 명확히 구별하기 충분하였다. 첫번째 InDel (SD_InDel_1)의 경우 *S. demissum* 이 다른 *Solanum* 종과 비교하여 6 bp가 추가적으로 삽입되어 있었으며, 두번째 InDel (SD_InDel_2)의 경우 *S. demissum*이 다른 *Solanum* 종과 비교하여 11 bp가 삭제되어 있었다(Fig. 4). 따라서, 이 InDel 영역 특이적인 프라이머를 제작하여 (Table 2), *S. demissum*을 포함한 총 21개의 *Solanum* 종들의 계통을 대상으로 PCR 한 결과 예상한 바와 같이 *S. demissum* 특이적인 마커를 개발할 수 있었다. 두개의 InDel 기반의 분자마커 모두에서 *S. demissum* 계통인 SD7과 SD9에서만 PCR의 결과로 밴드가 나타나고 나머지에서는 밴드가 나타나지 않음을 확인하였다(Table 2, Fig. 5A and 5B).

염록체 전장유전체를 통해 얻은 정보는 감자의 다양한 야생종의 진화적인 측면에서의 연구에 활용될 수 있을 뿐만 아니라 본 연구의 결과와 같이 감자의 야생종을 활용한 신종 육성과정에서 그 정보를 활용하여 분자마커를 개발하는데 활용될 수 있다(Bohs and Olmstead 1997; Hosaka and Sanetomo 2012). 특히, 육종적 측면에서는 *Solanum* 종을 포함하여 다양한 식물 종에서 보고된 바와 같이 체세포 융합이나 식물조직

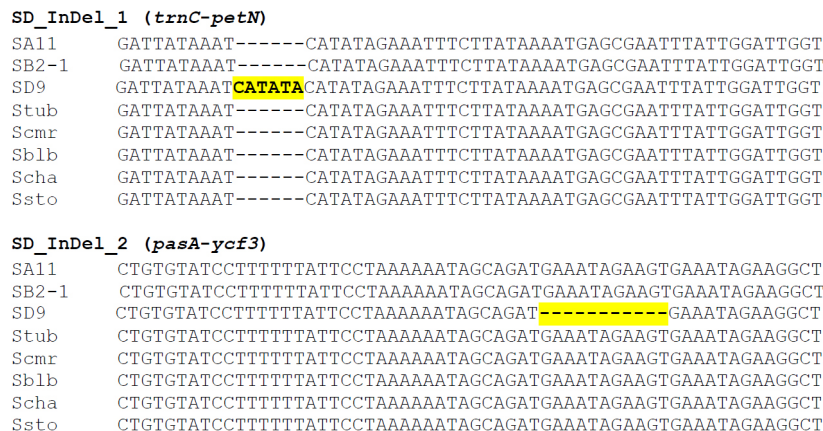


Fig. 4 Multiple alignment of the sequences on the intergenic regions containing InDels used to develop the PCR-based markers. The chloroplast genome sequences of *S. acaule* (SA11: MK036506), *S. brevicaula* (SB2-1: MK036507), *S. demissum* (SD9: MK036508), *S. tuberosum* (Stub: KM489056), *S. commersonii* (Scmr: KM489054), *S. bulbocastanum* (Sblb: DQ347958), *S. chacoense* (Scha: MF471371), and *S. stoloniferum* (Ssto: MF471373) were used and are listed from top to bottom in each region of the InDels. The regions of the InDels detected on that of *S. demissum* are bold and highlighted

Table 2 Primers used to generate *S. demissum*-specific markers

Marker name	Region	S ^a	Primer sequence	Size (bp) ^b
SD_InDel_1	<i>trnC-petN</i> (Intergenic)	F	CGATTATAAATCATATACATATA	956
		R	TCTATTGAGAGAATCAAATC	
SD_InDel_2	<i>psaA-ycf3</i> (Intergenic)	F	AGCAGATGAAATAGAAGGC	1,121
		R	TCTGTCATTACGTGCGAC	

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

^bThe expected sizes of PCR fragments are measured based on the sequence of *S. demissum*.

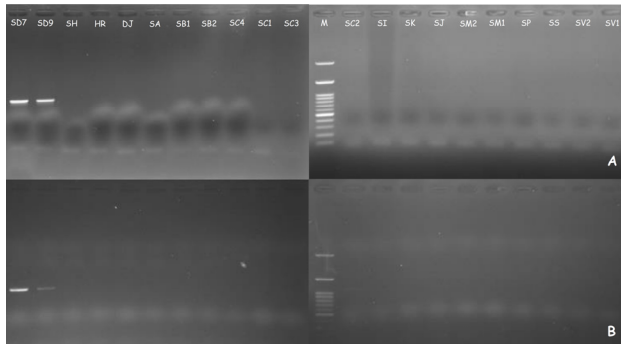


Fig. 5 PCR-based markers for the discrimination of *S. demissum* from other *Solanum* species. A: SD9_InDel_1. B: SD9_InDel_2. The two markers are all positively specific to *S. demissum*. SD7 and SD9 indicate two different lines of *S. demissum* (PI218047). M is a size marker ladder. SH, HR, DJ, SA, SB1, SB2, SC4, SC1, SC3, SC2, SI, SK, SJ, SM2, SM1, SP, SS, SV2, and SV1 indicate potato varieties ‘Seohong’, ‘Haryeong’, ‘Daeji’, *S. acaule* (PI310970), *S. berthaultii* (PI310981), *S. brevicaulis* (PI205394), *S. candolleianum* (PI210035), *S. cardiophyllum* (PI341233), *S. chacoense* (PI201846), *S. commersonii* (PI558050), *S. iopetalum* (PI230459), *S. kurtzianum* (PI578236), *S. jamesii* (PI578326), *S. microdontum* (PI310979), *S. mochiquense* (PI338616), *S. pinnatisectum* (PI190115), *S. stoloniferum* (PI160224), *S. vernei* (PI230468) and *S. verrucosum* (PI160228), respectively

배양에서 나타나는 재분화 과정에서 cpDNA의 무작위 배분과 mtDNA (mitochondrial genome)의 높은 재조합 빈도로 인하여(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), 체세포 융합이나 식물조직배양을 통해 얻은 계통들의 세포질 DNA를 구별 또는 선별할 수 있는 분자마커가 필요할 것이다. 이에, 본 연구에서 개발된 InDel 기반의 마커는 *S. demissum*을 다른 *Solanum* 종과 구별하는데 이용될 수 있으며, *S. demissum*을 이용한 감자 품종 육성 과정에서 *S. demissum* 또는 *S. tuberosum* 기반의 적합한 염록체형 선별을 통해 육종 연한을 단축하는데 기여할 것이다.

적 요

멕시코로부터 유래한 *Solanum demissum*은 감자 야생종 중의 하나로 감자 역병에 대해 저항성을 가지고 있어 감자 육종에

서 중요한 재료로 이용되고 있다. *S. demissum*의 EBN은 4배 체인 감자와 같은 4로 직접적인 교배로 육종에 활용될 수 있다. 본 연구에서는 NGS 기술에 의해 완성된 *S. demissum*의 염록체 전장 유전체(cpDNA)와 이를 다른 *Solanum* 종과의 비교를 통해 개발한 분자마커에 대해 보고하였다. *S. demissum*의 전체 cpDNA의 크기는 155,558 bp였으며 그 구조는 다른 *Solanum* 종과 매우 유사하였다. *S. demissum*의 cpDNA와 가지과에 속하는 10개 종의 cpDNA 코딩서열을 이용하여 분석한 계통수에서는 *S. demissum*이 *S. hougassii* 및 *S. stoloniferum*과 거의 동일한 유전체 구성을 보였으며, 다음으로 *S. berthaultii* 및 *S. tuberosum*과 유연관계가 가까운 것으로 확인되었다. *S. demissum*과 다른 7종의 *Solanum*과의 전체 cpDNA 다중 정렬을 통해 *S. demissum* 특이적인 두 개의 InDel 영역을 구명하였으며 이를 기반으로 최종적으로 PCR을 기반으로 한 두 개의 *S. demissum* 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

이 연구는 2020학년도 대구대학교 연구년 결과물로 제출됨.

References

Bohs L, Olmstead RG (1997) Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Syst Bot* 22:5-17

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, Park Y-E, Park T-H (2019) Chloroplast genome sequence of *Solanum demissum*, a wild tuber-bearing species was completed. Mitochondr DNA Part B 4:1800–1802
- Cho HM, Kim-Lee HY, Om YH, Kim JK (1997) Influence of endosperm balance number (EBN) in interploidal and interspecific crosses between *Solanum tuberosum* dihaploids and wild species. Korean J Breed 29:154–161
- Cho KS, Park TH (2016) Complete chloroplast genome sequence of *Solanum nigrum* and Development of markers for the discrimination of *S. nigrum*. Hort Environ Biotechnol 57:69–78
- Cho K-S, Yun B-K, Yoon Y-H, Hong S-Y, Mekapogu M, Kim K-H, Yang T-J (2015) Complete chloroplast genome sequence of tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and comparative analysis with common Buckwheat (*F. esculentum*). PLoS One 10:e0125332
- Chung HJ, Jung JD, Park HW, Kim JH, Cha HW, Min SR, Jeong WJ, Liu JR (2006) The complete chloroplast genome sequences of *Solanum tuberosum* and comparative analysis with Solanaceae species identified the presence of a 241-bp in cultivated potato chloroplast DNA sequence. Plant Cell Rep 25:1369–1379
- Daniell H, Lee S-B, Grevich J, Sasaki C, Quesada-Vargas T, Guda C, Tomkins J, Jansen PK (2006) Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. Theor Appl Genet 112:1503–1518
- Dionne LA (1961) Cytoplasmic sterility in derivatives of *Solanum demissum*. Am Potato J 38:117–120
- Garcia-Lor A, Curk F, Snoussi-Trifa H, Morillon R, Ancillo G, Luro F, Navarro L and Ollitrault P (2013) A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. Ann Bot 111:1–19
- Gargano D, Vezzi A, Scotti N, Gray JC, Valle G, Grillo S, Cardi T (2005) The complete nucleotide sequence genome of potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) chloroplast DNA. In the abstract of the 2nd Solanaceae Genome Workshop, p. 107
- Hanneman RE Jr (1994) Assignment of endosperm balance numbers to the tuber-bearing Solanums and their close non-tuber-bearing relatives. Euphytica 74:19–25
- Hawkes JG (1990) The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, London, UK
- 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
- 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
- Johnston SA, Hanneman RE Jr (1980) Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. Am Potato J 57:7–14
- 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 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 rDNAs 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
- Kim S, Park T-H (2020a) Comparison of the complete chloroplast genome sequences of *Solanum stoloniferum* with other *Solanum* species generate PCR-based markers specific for *Solanum stoloniferum*. J Plant Bioechnol 47:131–140
- Kim S, Park T-H (2020b) Development of *Solanum hougasii*-specific markers using the complete chloroplast genome sequences of *Solanum* species. J Plant Bioechnol 47: 141–149
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. Genome Biol 5:R12
- Lohse M, Drechsel O, Kahlau S, Bock R (2013) Organellar GenomeDRAW – a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. Nucleic Acids Res 41:W575–W581
- Lössl A, Götz A, Braun A, Wenzel G (2000) Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. Euphytica 116:221–230
- Mohapatra T, Kirti PB, Dinesh Kumar V, Prakash S, Chopra VL (1998) Random chloroplast segregation and mitochondrial genome recombination in somatic hybrid plants of *Diplotaxis catholica* + *Brassica juncea*. Plant Cell Rep 17:814–818
- Ono S, Sanetomo R, Hosaka K (2016) Genetic transmission of *Solanum demissum* ($2n=6x=72$) chromosomes from a pentaploid hybrid of *S. tuberosum* ($2n=4x=48$) into aneuploidy BC₁ progeny. Euphytica 207:149–168
- 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 (2017) The complete chloroplast genome of *Solanum berthaultii*, one of the potato wild relative species. Mitochondr DNA Part B 2:88–89
- Park T-H, Vleeshouwers VGAA, Jacobsen E, van der Vossen E, Visser RGF (2009) Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. Plant Breed 128:109–117

- 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
- Plastided RL, Hoopes RW (1989) The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *Am Potato J* 66:603–627
- Ross H (1986) Potato breeding: problems and perspectives. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, Germany
- 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
- Sanetomo R, Ono S, Hosaka K (2011) Characterization of crossability in the crosses between *Solanum demissum* and *S. tuberosum*, and the F₁ and BC₁ progenies. *Am J Potato Res* 88:500–510
- 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
- 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
- Spooner DM, Rodríguez F, Polgár Z, Ballard HE, Jr, Jansky SH (2008) Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *Crop Sci* 48:527–536
- Sugiura M, Hirose T, Sugita M (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplast. *Annu Rev Genet* 32:437–459
- 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, Filipiski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Tillich M, Lehwark P, Pellizzer T, Ulbricht-Jones ES, Fischer A, Bock R, Greiner S. (2017) GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Res* 45:W6–W11
- Xiang F, Xia G, Zhi D, Wang J, Nie H, Chen H (2004) Regeneration of somatic hybrids in relation to the nuclear and cytoplasmic genomes of wheat and *Setaria italica*. *Genome* 47:680–688
- Yamaki S, Ohyangi H, Yamasaki M, Eiguchi M, Miyabayashi T, Kubo T, Kurata N and Nonomura K (2013) Development of INDEL markers to discriminate all genome types rapidly in the genus *Oryza*. *Breeding Sci* 63:246–254
- Yurina NP, Odintsova MS (1998) Comparative structural organization of plant chloroplast and mitochondrial genomes. *Russ J Genet* 34:5–22