수박에서 덩굴마름병 감수성 및 저항성 양친에 대한 차세대 염기서열 재분석으로 탐색된 SNP 기반 HRM 분자표지 개발

이은수¹ · 김진희¹ · 홍종필¹ · 김도선¹ · 김민경¹ · 허윤찬² · 백창기³ · 이준대⁴ · 이혜은^{1*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 기획조정과

³농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과, ⁴전북대학교 농업생명과학대학 원예학과

Development of HRM Markers Based on SNPs Identified from Next Generation Resequencing of Susceptible and Resistant Parents to Gummy Stem Blight in Watermelon

Eun Su Lee¹, Jinhee Kim¹, Jong Pil Hong¹, Do-Sun Kim¹, Minkyong Kim¹, Yun-Chan Huh², Chang-Gi Back³, Jundae Lee⁴, and Hye-Eun Lee^{1*}

¹Vegetable Research Division, NIHHS, RDA, Wanju, 55365, Republic of Korea

²Planning and Coordination Division, NIHHS, RDA, Wanju, 55365, Republic of Korea

³Horticultural and Herbal Crop Environment Division, NIHHS, RDA, Wanju, 55365, Republic of Korea

⁴Department of Horticulture, Chonbuk National University, Jeonju, 54896, Republic of Korea

Abstract Watermelon (*Citrullus lanatus*) is an economically important vegetable crop all over the world, which has functional compounds such as lycopene and citrulline. Gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* is one of the most devastating diseases in watermelon. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are genetic variations occurring between individuals with respect to a single base, were often used to construct genetic linkage maps and develop molecular markers linked to a variety of horticultural traits and resistance to several diseases. In this study, we developed high-resolution melting (HRM) markers based on SNPs generated from NGS resequencing of two parents in watermelon. Plant materials were *C. lanatus* '920533' (female and susceptible parent), *C. amarus* 'PI 189225' (male and resistant parent), and their F₁ and F₂ progenies. A total of 13.6 Gbp ('920533') and 13.1 Gbp ('PI 189225') of genomic sequences were obtained using NGS analysis. A total of 6.09 million SNPs between '920533' and 'PI 189225' were detected, and 354,860 SNPs were identified as potential HRM primer sets. From these, a total of 330 primer sets for HRM analysis were designed. As a result, a total of 61 HRM markers that have polymorphic melting curves were developed. These HRM markers can be used for the construction of SNP-based linkage maps and for the analysis of quantitative trait loci (QTLs) related to gummy stem blight resistance.

Keywords Gummy stem blight, Resistance, Genetic linkage map, Melting curve, Polymorphism

Received on October 5, 2018. Revised on October 9, 2018. Accepted on October 30, 2018.

* Corresponding Author (E-mail: helee72@korea.kr, Tel: +82-63-238-6674, Fax: +82-63-238-6605)

서 언

수박은 채소작물 중 전세계 재배면적 약 3,518천ha로 4위에 해당하는 중요한 작물이다(FAOSTAT 2016). 수박은 약 91%가 수분으로 이루어져 있어 여름철 갈증 해소를 위하여 소비가 많이 되며 또한 라이코펜, 시트룰린 등 기능성 물질을 함유하고 있어 건강 식품으로 활용되고 있다(Kim et al. 2013).

덩굴마름병은 수박을 비롯한 여러 박과 채소에 큰 피해를

주는 병으로, 일교차가 크고 고온 다습한 조건에서 주로 발생한다 (Lee et al. 2016). 발병 시 잎에서는 황갈색의 작은 반점이 생기며 점차 큰 원형 또는 부정형으로 병반이 확대되고, 줄기에서는 회갈색의 불규칙한 병반이 형성되어 심하면 식물체 전체가 고사한다(Skarshaug 1981). 특히 수박에서는 잎, 줄기, 과경 등에서 물관이 마르고 잎이 일찍 떨어지는 증상이 보이며(Maynard & Hopkins 1999), 착과 이후에 병이 급속히 진전되어 과실이 수확되기 이전에 잎과 덩굴이 고사하는 경우가 많다(Kwon et al. 1997).

수박에서 덩굴마름병을 방제하기 위해서는 병 발생 이전에 약제를 미리 살포하여 예방해야 하며, 심하게 발생하는 포장의 경우에는 윤작을 수행해야 한다(dos Santos et al. 2016). 하지만 화학적 방제의 경우 반복적으로 사용되면 생태계 오염을 야기할 수 있고 농산물의 안전성 문제를 유발시킬 수 있으며 재배적 방제 또한 노동력과 비용이 소모되는 측면에서 문제점을 갖고 있다(Wolukau et al. 2007). 병저항성 품종의 개발은 덩굴마름병 방제를 위한 근본적인 해결책이 될 수 있으며, 복합 병해 저항성 유전자를 집적할 수 있기 때문에 효율적인 방법이다(Lou et al. 2013, Norton et al. 1995).

수박에서 덩굴마름병 저항성을 지니는 소재는 미국 USDA-ARS (United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service)의 수박 Germplasm Collection에서 보유 중인 ‘PI 189225’와 ‘PI 271778’ 등이 있는 것으로 보고되었으며(Sowell 1975, Sowell & Pointer 1962), 최근에는 덩굴마름병 저항성의 새로운 자원으로 ‘PI 279461’, ‘PI 526233’ 및 ‘PI 482283’ 등이 보고되었다(Gusmini et al. 2005). 그리고 ‘PI 189225’는 감수성인 ‘Chareston Gray’와 교배하여 나온 분리집단 분석을 통해 그 저항성이 단인자 열성 유전자인 *db*에 의해 조절된다고 보고되었지만(Norton 1979), 최근에는 그 저항성이 환경적인 요인에 의해 영향을 받는 다수의 유전자가 관여하고 있는 양적 형질로 보고하였기 때문에 명확한 유전양식 규명을 위한 후속 연구가 필요한 상황이다(Gusmini et al. 2017).

수박에서 병저항성을 가진 개체를 효율적으로 선발하고 육종에 필요한 시간을 줄이기 위해서 분자표지 개발과 응용에 관한 연구가 진행되고 있다. 수박 흰가루병 저항성 자원인 ‘Arka Manik’와 ‘PI 254744’를 이용하여 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 마커와 high-resolution melting (HRM) 마커가 개발되었다(Han et al. 2016, Kim et al. 2015). 또한 수박 덩굴쪼김병 race2에 대한 QTL mapping이 진행되었고, 수박에서 호박 노란 모자이크 바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV) 저항성 관련 CAPS 분자표지가 개발되었다(Branham et al. 2017, Ling et al. 2009). 이와 같이 분자표지를 활용한다면 환경 요인을 배제한 유전자형을 분석할 수 있어 표현형 예측 시 정확도가 향상되며, 또한 일정한 기준이 적용되기 때문에 실험자에 따라 조사결과가 변동되지 않는 장점이 있다(Dudley et al. 1992, Lande & Thompson 1990).

최근 염기서열 해독 기술이 발달하고 비용이 저렴해지면서 염기서열 정보를 바탕으로 하는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 정보를 활용한 분자표지가 많이 개발되고

있다(Lee et al. 2013). 그리고 이 SNP 정보를 이용한다면 단일마커 분석에서 더 나아가 다수의 샘플에 대한 다수의 분자표지 분석이 이루어지는 고속대량 유전자형 분석시스템(high-throughput genotyping system)에 적용할 수 있다(Thomson 2014, Trebbi et al. 2011).

따라서 본 연구에서는 수박 덩굴마름병 감수성 및 저항성인 양친에 대해 차세대 염기서열 재분석(next generation resequencing)을 진행하여 유의미한 SNP를 선발하고, 이 정보를 바탕으로 HRM 분자표지를 개발하였다. HRM 분석 방법은 전기영동이 필요한 CAPS, SCAR, SSR 등의 분자표지 분석 방법보다 상대적으로 간편하고 결과를 신속히 확인할 수 있으며 분석 비용이 저렴하다(Wittwer et al. 2003). 이러한 HRM 분자표지를 활용하여 추후 수박 유전자 연관지도 작성 및 덩굴마름병 저항성 양적 형질 유전자좌(quantitative trait loci, QTLs) 분석 등을 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

식물재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과 과채류 연구실에서 2013년 수박 덩굴마름병 저항성 자원인 *Citrullus amarus* Schrad. ‘PI 189225’와 감수성 자원인 *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai ‘920533’을 분양 받았다(Fig. 1). 2014년에 ‘920533’을 모계로 사용하고 ‘PI 189225’를 부계로 사용하여 F₁을 확보하였다. 2017년 5월에 F₁을 자가수정하여 F₂ 종자를 채종하였으며, 11월에 F₂ 종자를 파종하여 F₂ 식물체 13개체의 잎을 채취하여 DNA 추출에 사용하였다.

덩굴마름병 저항성 검정

수박 덩굴마름병균 접종을 위해 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)를 제작하였다. 수박 덩굴마름병균 균주는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받은 수박 덩굴마름병균 KACC40937 (*Didymella bryoniae*)을 사용하였다. 본 균주의 균사 조직을 떼어 PDA 고체배지의 중앙에 접종하여 25°C 배양기에서 5일간 배양하였다. 수박 덩굴마름병균의 인공접종을 위한 분생포자 형성을 위해 12시간 광조건과 12시간 암조건으로 5일간 배양하였다. 인공접종을 위한 현탁액은 분생포자가 형성된 PDA 고체배지에 멸균수를 부어 포자를 회수하고, 이를 거즈로 걸러 제작하였다. 포자현탁액의 접종농도를 측정하기 위해 Hemocytometer

(Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konighofen, Germany)를 사용하여 4×10^5 cfu $\cdot$ mL⁻¹ 접종농도로 맞춰 저항성 검정에 사용하였다. 인공접종은 본엽이 2~3매가 전개된 식물체 1개체당 포자현탁액을 10 mL씩 분무하였고, 48시간 동안에 25~27°C 암상태에서 습실처리를 실시하였다. 이후 25°C 생장상에서 12시간 광주조건으로 처리하였고, 접종 후 5일차부터 덩굴마름병의 발생 유무를 조사하였다(Lee et al. 2016). 감수성 자원인 ‘920533’ 20개체와 저항성 자원인 ‘PI 189225’ 20개체에 대해 각각 조사하였으며 저항성 정도는 본엽의 병반면적률을 계산하여 측정하였다.

식물 DNA 추출

수박 덩굴마름병 저항성 및 감수성 자원인 양친과 F₁, 그리고 F₂ 13개체 식물체 각각으로부터 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 방법을 이용하여 genomic DNA의 pellet을 확보하였다(Doyle & Doyle 1990). 그 후 70% Ethanol을 700 L 분주하고 12,000 rpm에 1분간 원심분리를 하면서 2번의 세척을 한 후, 50 L triply-distilled water (TDW)를 넣고 pellet을 녹인 다음 Nanovue™ plus spectrophotometer (GE Healthcare, USA)를 이용하여 정량하였고, 추출된 genomic DNA는 20 ng $\cdot$ μ L⁻¹ 농도로 맞추어 사용하였다.

차세대 염기서열 분석 및 SNP 탐색

수박 양친인 ‘920533’과 ‘PI 189225’의 어린잎에서 추출된

genomic DNA는 총 10 μ g을 이용하여 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)을 수행하였다. 생물정보분석 업체인 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 전장유전체 염기서열 재분석(whole genome resequencing)을 실시하였다. 수박 표준유전체 정보는 박과 유전체 데이터베이스 홈페이지(<http://www.cucurbitgenomics.org>)에 공개된 *C. lanatus* subsp. *vulgaris* cv. 97103을 이용하였다(Guo et al. 2013). 수박 표준유전체의 추정된 크기는 425 Mbp이고, assembly된 정보는 약 355.2 Mbp로 전체 게놈의 약 83.6%를 차지하였으며 유전체 정보는 DNA 단편조각인 1,793개(353.5 Mbp)의 scaffold와 43,342개(321.4 Mbp)의 contig로 구성되어 있었다(Table 1).

Resequencing된 염기서열 데이터는 read 생성, 표준유전체에 정렬(alignment), SNP 탐색(variant calling), 기준에 의한 SNP 선별(filtering), HRM 프라이머 디자인의 단계를 거쳐 분석되었다. TruSeq DNA Nano Sample Preparation Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)를 활용하여 시퀀싱 라이브러리를 제작하였으며, Illumina Hiseq 4000(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)으로 염기서열을 분석하였다. 시퀀싱 결과 얻어진 raw reads의 quality 분석을 통한 전처리 과정을 진행하고 BWA (v.0.7.17) 프로그램을 이용하여 reference genome에 mapping한 후 정렬된 reads를 이용하여 SAMtools (v.1.6) 프로그램을 통한 SNP 탐색을 진행하였다(Li 2011, Li & Durbin 2009).

다음으로 ‘920533’과 ‘PI 189225’ 간의 탐색된 SNP 주위의

Fig. 1. Watermelon fruits of a susceptible line ‘920533’ (A) and a resistant line ‘PI 189225’ (B) to gummy stem blight.

Table 1. Statistics of reference genome *C. lanatus* subsp. *vulgaris* cv. 97103.

Estimated genome size (Mbp)	Genome assembly size (bp)	Genome covered by assembly (%)	Genome assembly size except ‘N’ base (bp)	Number of scaffolds (Total length of scaffolds, Mbp)	Number of contigs (Total length of contigs, Mbp)
425	355,247,419	83.6	321,373,230	1,793 (353.5)	43,342 (321.4)

400 bp에 해당하는 flanking sequence (amplicon sequence) 정보를 확보하였다. 이 중에서 동형접합형(homozygous)인 것과 SNP 종류 중 A/T와 G/C를 제외한 A/G, A/C, T/G, T/C인 것, 그리고 수박 표준유전체에 BLASTN (v.2.7.1+)을 진행하여 copy number가 1개인 것, 그리고 genic region에 위치한 것만을 선발하였고 (Zhang et al. 2000), 목표로 하는 SNP 부위를 증폭하는 high-resolution melting (HRM) 프라이머를 디자인하였다(Untergasser et al. 2012).

HRM 프라이머 제작 및 분석

HRM 반응액은 genomic DNA 2.0 L, 10x PCR buffer 2.0 L, 2.5 mM dNTP mixture 1.0 L, *Taq* DNA polymerase (Takara, Japan) 0.1 L, SYTO[®] 9 green fluorescent nucleic acid stain (Life Technologies[™], USA) 1.0 L, 선발된 HRM 프라이머 10 pmole · mL⁻¹ 농도로 forward와 reverse 각각 0.5 L, 멸균된 3차 증류수(TDW)로 총 20.0 L의 부피를 맞추었다. PCR 반응은 PCR machine (Eppendorf, Germany)을 이용하였으며, 98°C에서 2분간 denaturation을 수행한 후, 98°C에서 5초간 denaturation, 60°C에서 10초간 annealing 및 extension 과정을 40회 반복하였다. PCR 산물은 CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, CA, USA)을 이용하여 70°C에서 94.6°C까지 0.3°C씩 온도를 올리면서 각 온도에서 SYTO 9의 형광을 측정하여 melting curve를 그렸고, Precision Melt Analysis 프로그램

(Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 유전자형을 분석하였다. 온도 증가에 따른 형광 감소 그래프의 양상을 분석함으로써 다형성이 보이는 프라이머를 최종 선발하였다.

결과 및 고찰

덩굴마름병 저항성 검정

감수성 계통인 ‘920533’과 저항성 계통인 ‘PI 189225’에 대해 유묘 상태에서 각 20개체씩 덩굴마름병 저항성 검정을 실시한 결과, ‘PI 189225’의 병반면적을 평균은 약 14.04%였으며, ‘920533’의 평균은 약 73.73%이었다. F-검정에서 두 집단의 분산이 등분산이 아니었기 때문에, 이분산을 가정한 t-검정을 실시하였으며 그 결과 $p < 0.001$ 으로 감수성 계통과 이병성 계통에서 유의성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 저항성 계통인 ‘PI 189225’의 경우 감수성 계통인 ‘920533’보다 확연히 뚜렷한 병징이 나타나지 않았는데, 이는 Sowell (1975)이 수박 상업 품종과 PI 자원에 대해 덩굴마름병을 접종하여 ‘PI 189225’가 저항성임을 보고한 결과와 일치하는 것이었다.

양친의 NGS 대량 염기서열 분석

수박 유전체 전체를 커버하는 분자표지를 개발하기 위해 양친인 ‘920533’과 ‘PI 189225’를 NGS resequencing한 결과, ‘920533’은 총 17.8 Gbp의 염기서열을, ‘PI 189225’는 총 16.8 Gbp의 염기서

Fig. 2. Comparison of resistance to *Didymella bryoniae* between resistant (‘PI 189225’) and susceptible (‘920533’) watermelon lines. % lesion area means the ratio of gummy stem blight lesion area to total leaf area. Bars on graphs indicate standard error. Three asterisks indicates that the susceptible cultivar represents significantly different values to the resistant cultivar. (Student’s t-test; $p < 0.001$).

열을 해독하였다(Table 2). 이 염기서열에서 필요 없는 부분을 잘라낸(trimming) 결과, ‘920533’은 총 13.6 Gbp, ‘PI 189225’는 총 13.1 Gbp의 염기서열이 남았다(Table 2). 이는 assembly된 수박 표준유전체 길이인 약 355.2 Mbp의 각각 약 38.28배(‘920533’) 및 약 36.80배(‘PI 189225’)에 해당한다(Table 2). 또한 실제 NGS resequencing에 사용한 염기는 ‘N’ 염기를 제외한 약 321.4 Mbp를 사용하였다(Table 1). Trimmed data를 이용하여 수박 표준유전체 염기서열에 mapping한 결과, ‘920533’은 표준유전체의 약 90.13%인 320 Mbp를, ‘PI 189225’는 약 85.92%인 305 Mbp를 커버하였다(Table 2).

대량 SNP 탐색 및 HRM 프라이머 제작

해독된 염기서열을 바탕으로 ‘920533’과 ‘PI 189225’ 간의 SNP를 탐색한 결과, 총 SNP 수는 6,086,851개였다(Table 3). 이는 *C. lanatus* 종 내의 SNP 개수보다 많은 것인데, 그 이유는 ‘PI 189225’가 분류학상으로 유연관계가 먼 *C. amarus*이기 때문에 종 간의 유전적 차이에 의한 것으로 생각된다.

앞서 발굴한 6,086,851개의 SNP는 그 수가 매우 많아 모두 분자표지로 활용하는 것은 어렵기 때문에, 본 연구에서는 당굴마름병 저항성 연관 수박 유전자지도 작성 방법을 제시하기 위해 분자표지를 일부 선발하여 분석에 이용하였다. 양친 계통에서 모두 동형접합형(homozygous)인 SNP는 5,113,361개였으며, 그 중에서 HRM 프라이머 제작 시 melting curve 간에 서로 구분이 잘되는 염기서열 조합인 A/G, A/C, T/G 및 T/C 조합만 선발하였는데 4,332,440개였다(Table 3). 다음으로 SNP 주위의 flanking

sequence가 전체 genome에서 1개의 copy만이 존재하는 SNP는 2,026,130개였고, genic region에 존재하는 것은 354,860개였다(Table 3). 이 중에서 수박의 각 염색체 별로 고르게 선발하여 최종 330개의 HRM 프라이머 쌍을 제작하였다(Supplementary Fig. 1).

HRM 분석 및 다형성 있는 프라이머 선발

330개의 HRM용 프라이머 쌍을 이용하여 HRM 분석을 진행하였는데, 프라이머 쌍 1개당 감수성 계통인 ‘920533’과 저항성 계통인 ‘PI 189225’와 F₁ 개체, 그리고 F₂ 13개체 총 16개의 genomic DNA 시료를 사용하여 분석하였다. 프라이머 쌍 중 61개는 Fig. 3에서와 같은 melting curve 패턴을 나타내어 다형성(polymorphic)을 보이는 분자표지로 이용할 수 있었고, 나머지 269개는 다형성이 나타나지 않는 단형성(monomorphic)을 보였거나 두 개 이상의 위치에서 증폭되어 melting curve가 복잡해져 분자표지로 활용할 수 없었다(Table 4). 본 연구에서 수박 표준유전체 정보가 불완전한 부분이 있어 게놈상 다른 부위에서 동일한 flanking sequence 지점이 존재해 다수의 증폭을 완전히 없애지 못하였기 때문인 것으로 생각된다. 또한 melting curve가 다형성(polymorphic)을 나타내었지만 melting temperature 차이가 거의 없어서 유전자형 분석이 매우 어려울 것으로 예상되는 SNP를 제외하였기에 최종 선발된 SNP 수가 적었다. 제작한 330개의 HRM 분자표지의 염색체 상의 위치는 MapChart (v.2.3)를 이용하여 Supplementary Fig. 1와 같이 물리적 지도에 위치하여 표시할 수 있었다.

Table 2. Statistics of raw reads, trimmed reads, and mapped reads obtained from next generation resequencing data.

Plant material	Use	Raw reads	Total reads			Mapped reads		
		Total length (bp)	Total length (bp)	Trimmed/ Raw	Genome coverage	The number of mapped reads (The ratio of mapped reads, %)	Mapped region of reference genome (bp)	Reference genome coverage (%)
‘920533	Female parent	17,762,375,526	13,598,385,369	≈0.77	≈38.279	80,972,784 (80.0)	320,192,188	90.13
‘PI 189225’	Male parent	116,791,415,024	13,071,171,856	≈0.78	≈36.795	87,354,113 (89.84)	305,232,561	85.92

Table 3. Summary of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and high-resolution melting (HRM) primer sets between watermelon lines ‘920533’ and ‘PI 189225’.

Raw SNP	The number of homozygous SNP	The number of HRM candidate	The number of HRM recommended (single copy)		
			Total	Intergenic region	Genic region (HRM primer sets designed)
6,086,851	5,113,361	4,332,440	2,026,130	1,671,270	354,860

Table 4. List of 61 SNP markers that were developed into HRM marker type. These markers were polymorphic between ‘920533’ and ‘PI 189225’ using HRM analysis.

Marker name ^z	Chromosome	SNP position (bp) ^y	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
WGRS002	1	1,043,418	GGTGGTACCCAATTTGTCCCT	AACAGGAAGCCGGCTAGAAA
WGRS006	1	3,819,913	GCGATCAAGAGACAAACGGG	TGCGAAGGATGCTTGTTCT
WGRS011	1	9,325,855	AGGTGCTTAGGAGGTGGAGA	CCGCCATGAGAGGAGGTTAG
WGRS017	1	20,202,103	ACGGCAAGCAGTGAAGGTAT	GGGGAGAGATGATCGAGCAC
WGRS018	1	22,049,812	TGGGAAGTGAAGACTGCC	GACTTCCACTTCCAACCCCT
WGRS028	1	30,705,477	TGGATATTCCTCGCTCCAA	TTGCTGCTCTTCAAATGGGC
WGRS030	1	33,601,876	GGACAAACCTGGCCCACTAA	TCGAAAAGCAGCAGAGGCA
WGRS039	2	13,988,030	AACGGAGCTAATCGACGACC	ACAAGGCCCAAGAGATTTAGGA
WGRS046	2	26,782,186	GCCCTGTCAGTGAACCATCA	ACAGACCTGAGAATCACTAGCT
WGRS048	2	29,195,322	AGCGTGTGGTTTGTGACTTGAG	AGATGTAATGCGATGCAGTTGC
WGRS054	3	3,074,543	CGTCTCCAACCTCATCTCCG	CTGAGGGGGTTGATGACGAG
WGRS061	3	11,069,946	GTGGGAGGGGAAAACGGATT	CATTTTCTTCGGAGCTGGCG
WGRS066	3	20,298,449	TGCAGCCCATGAAAGTGCTA	GTGTTTATTGTTCCGCCAGCT
WGRS072	3	25,926,099	GCTCTTCCATTGCTCCTGGA	GCAGGGTTCTATGGTCGAGT
WGRS074	3	26,809,484	CGCTATCAGCCGACAAAAGC	TCGAGGAAGCTTGCACCAAT
WGRS091	4	5,970,325	TGTGCTGATTGTGGACCTCC	AGCTTGCTCATTCTCTCGT
WGRS095	4	8,233,892	GGTGGCCTCACTATTACCGG	GGTTTAGAGGTGGAAGGGGTG
WGRS098	4	10,824,802	TAAGACCCAACCGAACTGCC	GCAGGCTGCTCTAACAAGC
WGRS100	4	13,147,227	TGGTAGAAAATGGCAACGCG	GATCAAGGACGGGAATGGGA
WGRS101	4	15,102,363	GGCAAAAGCAGACCCTGTTG	CCAGTTCCACCAAGCAAACC
WGRS107	4	17,910,257	TGCCAAGAGAATGCACACG	ATGGAGGACATTGCTTGCCA
WGRS121	5	1,577,748	GGGGTTCCATTCCCTAAGGG	GGCGAGATGGTCAAACCTCT
WGRS122	5	2,108,735	AGAACCCCCAACCAGCTT	TCCCCTGCCTTTGCTTGATT
WGRS124	5	4,255,857	CCAGGCATCCAATCGAGGAA	CGTCCATAAAGTTGTGGCCC
WGRS126	5	6,580,137	AGTCCGTTGTCCAGTTTCGA	AACAGTAGCCCAAGAGCTGG
WGRS148	6	36,471	GTGCTGCTCCTGGTCTCTAA	ACTCAATGGGTGCTTGTGGT
WGRS151	6	1,670,897	GCCATTTGATTCTCACC GC	GAGCTGCCCCTAATGCAATG
WGRS152	6	2,870,018	GCTGCGATCGTGTTCACATC	CAGAGGCCAAGACCCAGAAT
WGRS170	6	18,074,367	GCTGTGCTTCTGTGGCAAA	AGAGAACATCAACACGGCGT
WGRS171	6	19,159,722	AGAGCTTTTCGTCATGGCCA	TCCAGGTTTGGTTTCCGACA
WGRS172	6	20,013,243	TAGGTCAGCCCTCCCTCAA	CGTTCGAGTAATCCTCCGGG
WGRS174	6	21,093,377	TGGAGTGTTTGACTGTGGGG	TCTCCATCTCCAGCCATCCT
WGRS177	6	22,055,693	AAGTGGCAATACCTGACCCC	ACTACTCTGCAGCTCATGGC
WGRS186	6	26,890,432	CCTGCTTGTGGACCTGGAAT	GCAACCATGCGACATAACT
WGRS190	7	3,830,477	ATCCGCAGATTACAGGGAG	GGCGCTTAAATCTGGTTCCC
WGRS194	7	6,714,580	CGTTGTTTGCAAGCTCCCAA	GCCTCCGCTTCCGATTCTTA
WGRS200	7	16,377,893	AGAATCTTGCCACCTTAGGG	TCGGTGGTGACTGAGAAACA
WGRS203	7	21,480,403	AATTGGAGGGTCAAGGGGTG	TGCTCGTTTCATCAAAAGCCA
WGRS208	7	26,134,906	TGGGCTACATTGTTCTGCCT	GCTTCAAGTTTCCTTGCTGT
WGRS209	7	27,405,979	TGGTGGTGGAGGCAATCAAA	GGGGGTTATGCCTGAAACAA
WGRS212	7	30,620,572	TGCTTGGGTTGTATCACTGACA	TGGTGTGGCAGGTAATTGGA
WGRS213	7	31,054,142	AATTCTTTGCGCACTCGTGG	ATCCAATCTGAGCAATTGGC

Table 4. Continued.

Marker name ^z	Chromosome	SNP position (bp) ^y	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
WGRS220	8	7,024,617	AACAGTCAACACCCAGCCTT	TTGAGGTGGTCTTCCGAGC
WGRS221	8	7,889,760	GTGACAACCAAGCAGCACTG	TCCTGCCCAACTTGTTCCTC
WGRS225	8	10,733,107	CTTCTGCCATTAAACGCCCA	GGGTTCAATCATTGTGGTCACC
WGRS226	8	11,279,464	TGCTGGCCCCACTCAATAAA	AGGACCGGGTCTCAATCTCA
WGRS227	8	11,656,539	AGTTCTAACGACACGAGGGC	TTGTACCAGACTGCGAGCAA
WGRS229	8	15,003,269	CCTTGTGCAACCAAAGCTGT	GACAGCGGTTGCATCAGTTC
WGRS233	8	17,637,101	GTAGACACTCTTAGCCGGGC	TCCTGCATTGTGTGGTTCCA
WGRS235	8	18,473,596	ACTGTGTGCACTCACCTGTT	CGGACATCTGCTGAGGAGTT
WGRS240	8	20,663,001	ACGGCTGGTCTCATGTTCAA	TAGGGTTTGGTGCTGGTGAC
WGRS254	9	4,555,267	TGGCTAACCATGGGTTCAT	AGTTTGTTCAGCGCCATTG
WGRS263	9	16,573,290	GAGTGCTGATGGAAGCTGGA	TGCTCCATATGGAAGCAAGTCA
WGRS271	9	29,654,845	TGCACATTGTGTCACTCTACGA	CATTGCCTAGAATTTGCCGGG
WGRS272	9	30,799,073	CTAGATTCTGCGGATGCCT	ACCCATACCTTCTCGCGAAA
WGRS281	10	6,101,884	GCCGGTAGTTTCTGACCCAA	AGGTTCAAGAAGTGCGGAG
WGRS287	10	14,082,501	ACAATGCCTCCACCTTTCCA	GTAGCAGCAACAGTGGCAAA
WGRS297	10	27,692,702	TGGCAGTGTTGTACTTGGGT	AGGGCTTGGAGACTTTTGCA
WGRS307	11	6,959,074	GAGGGTGAGTTTCTGGTGGG	CACGCACACTTCACGCTTAA
WGRS316	11	14,891,680	GTGCTCTGCTTCTCAGGTT	TGGCAGTTTTAGGCTTTTCAGT
WGRS326	11	24,272,773	CAGGTTCTGAAGCAGCTGA	GCTGAATCTACCAGGCAACA

^zSNP (HRM) markers developed in this study and WGRS is the abbreviation for watermelon gummy stem blight resistance SNP.

^yPosition of SNP on reference genome.

Fig. 3. Melting curves of two HRM markers, WGRS095 (A, C) and WGRS240 (B, D), developed in this study. A and B present the form of normalized melt curve, while C and D show us the image of difference curve. a, Plants of ‘920533’ genotype; b, Plants of ‘PI 189225’ genotype; h, Heterozygous plants.

이전에 수박 덩굴마름병 저항성 관련하여 동일한 양친 재료를 바탕으로 HRM 분자표지를 선발한 연구가 있었다(Lee et al. 2015). 하지만 이 연구에서는 GS FLX 454 Titanium (Roche, Basel, Switzerland) NGS 분석으로 읽어낸 염기서열이 길이가 최대 73 Mbp이었기 때문에 데이터 크기가 매우 작았으며, 이로 인하여 충분한 수의 SNP를 발굴하지 못하였다. Rotor-Gene Q Real-Time PCR machine system (Qiagen, Venlo, Netherlands)을 이용한 HRM 분석을 통해 다형성을 보이는 14개의 SNP를 확인하였지만, 오직 양친 genomic DNA에 대해서 적용을 하였고 F₁과 F₂ 개체에 적용을 하지 않아 집단 개체에 대해 유전자형 분석이 가능한 HRM 프라이머 쌍은 더욱 줄어들 수 있었다. 따라서 충분한 수의 SNP 정보를 확보하고 보다 대량의 HRM 프라이머 쌍을 제작하여 다형성 있는 분자표지를 개발하는 것이 차후에 유전자지도 작성하는 것에 도움이 될 것이라 판단하였다.

본 연구를 통해 수박 덩굴마름병에 감수성 자원과 저항성 자원을 NGS resequencing 함으로써 HRM 분자표지로 활용할 수 있는 61개의 프라이머 쌍을 최종 선발할 수 있었다. 해당 HRM 분자표지를 활용하여 F₂ 178개체 전체에 대하여 유전자형 분석을 진행하고, 분자표지 간의 거리를 계산하여 유전자지도 작성할 수 있을 것이다. 또한 기존에 HRM 형태 이외에 다른 형태로 개발된 분자표지를 추가하여 유전자지도 통합할 수도 있을 것이다. 더 나아가 F₂ 분리집단 개체에 대해 덩굴마름병 저항성 검정을 실시하여 정확한 표현형을 측정한다면 덩굴마름병 저항성과 관련된 QTL 분석을 수행하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

적 요

수박(*Citrullus lanatus*)은 전세계에서 경제적으로 중요한 채소작물이며, 라이코펜과 시트룰린과 같은 기능성 물질을 함유하고 있다. *Didymella bryoniae* 병원균에 의해 발생하는 덩굴마름병은 수박 재배에서 가장 피해를 많이 주는 병해 중에 하나이다. 단일염기다형성(SNP)은 한 개 염기에 관해 개체 간에 발생하는 유전적 변이로서 유전자 연관 지도를 작성하는 것과 원예적 형질 및 병저항성에 연관된 분자표지를 개발하는 데 자주 사용된다. 본 연구에서는 수박에서 모친과 부친의 차세대 염기서열 재분석(next generation resequencing)을 통해 SNP 분자표지를 선발하였다. 식물재료는 *C. lanatus* ‘920533’(모친, 감수성)과 *C. amarus* ‘PI 189225’(부친, 저항성) 및 이들의 F₁, F₂ 개체를 이용하였다. NGS 분석 결과, ‘920533’과 ‘PI 189225’에서 각각

13.6 Gbp와 13.1 Gbp의 염기서열을 얻었다. ‘920533’과 ‘PI 189225’ 간의 SNP 수는 609만 개였고, 그 중 HRM 프라이머로 디자인이 가능한 SNP의 수는 354,860개였다. 그 중에 HRM 분석을 위한 330개 프라이머 쌍이 디자인되었다. 결과적으로 HRM 분석을 통해 총 61개의 HRM 분자표지를 개발하였다. 이번 연구의 결과는 SNP 기반의 유전자지도 작성에 이용될 수 있으며 덩굴마름병 저항성과 연관된 양적 형질 유전자좌(QTL) 분석에 활용될 수 있을 것이다.

보충자료

본문의 Supplementary Fig. 1은 한국육종학회지 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ00926101)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

REFERENCES

1. Branham SE, Levi A, Farnham, MW, Wechter, WP. 2017. A GBS-SNP-based linkage map and quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2 identified in *Citrullus lanatus* var. *citroides*. Theor Appl Genet 130: 319-330.
2. dos Santos GR, Sousa SCR, Juliatti FC, Rodrigues AC, Dalcin MS, Bonifacio A. 2016. Control of gummy stem blight in watermelon through different management systems. Biosci J 32: 371-377.
3. Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
4. Dudley JW, Maroof S, Rufener GK. 1992. Molecular marker information and selection of parents in corn breeding. Crop Sci 32: 310-304.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Food and agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
6. Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas WJ, Zhang H, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z, Min J, Guo X, Murat F, Ham BK, Zhang Z, Gao S, Huang M, Xu Y, Zhong S, Bombarely A, Mueller LA, Zhao H, He H, Zhang Y, Zhang Z, Huang

- S, Tan T, Pang E, Lin K, Hu Q, Kuang H, Ni P, Wang B, Liu J, Kou Q, Hou W, Zou X, Jiang J, Gong G, Klee K, Schoof H, Huang Y, Hu X, Dong S, Liang D, Wang J, Wu K, Xia Y, Zhao X, Zheng Z, Xing M, Liang X, Huang B, Lv T, Wang J, Yin Y, Yi H, Li R, Wu M, Levi A, Zhang X, Giovannoni JJ, Wang J, Li Y, Fei Z, Xu Y. 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics* 45: 51-60.
7. Gusmini G, Rivera-Burgos LA, Wehner TC. 2017. Inheritance of resistance to gummy stem blight in watermelon. *HortScience* 52: 1477-1482.
8. Gusmini G, Song R, Wehner TC. 2005. New sources of resistance to gummy stem blight in watermelon. *Crop Sci* 45: 582-588.
9. Han BK, Rhee SJ, Jang YJ, Sim TY, Kim YJ, Park TS, Lee GP. 2016. Identification of a causal pathogen of watermelon powdery mildew in Korea and development of a genetic linkage marker for resistance in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Korean J Hort Sci Technol* 34: 912-923.
10. Kim JY, Lee SH, Hwang SJ, Kim GH, Eun JB. 2013. Physicochemical characteristics and functional components of Mudeungsan watermelon and the other cultivars from Korea. *Korean J Food Sci Technol* 45: 345-349.
11. Kim, KH, Hwang JH, Han DY, Park M, Kim S, Choi D, Kim Y, Lee GP, Kim ST, Park YH. 2015. Major quantitative trait loci and putative candidate genes for powdery mildew resistance and fruit-related traits revealed by an intraspecific genetic map for watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*). *PLOS ONE* 10: e1-e18.
12. Kwon MK, Hong HJ, Sung KY, Cho BH, Kim KL. 1997. Standardization of a mass-production technique for pycnidiospores of *Didymella bryoniae*, gummy stem blight fungus of Cucurbits. *Korea J Plant Pathol* 13: 105-112.
13. Lande R, Thompson, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124: 743-756.
14. Lee HY, Hong JP, Suh HY, Huh YC, Ahn YK, Kim JH, Kim DS. 2015. Survey of SNP markers based on genome related to gummy stem blight resistance in watermelon. *J Agr Sci Chungbuk Nat'l Univ* 31: 107-113.
15. Lee J, Park SJ, Do JW, Han JH, Choi D, Yoon JB. 2013. Development of a genetic map of chili pepper using single nucleotide polymorphism markers generated from next generation resequencing of parents. *Korean J Hort Sci Technol* 31: 473-482.
16. Lee JH, Jang KS, Choi YH, Kim JC, Choi GJ. 2016. Development of an efficient screening system for resistance of watermelon plants to *Didymella bryoniae*. *Res Plant Dis* 22: 72-80.
17. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754-1760.
18. Li H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27: 2987-2993.
19. Ling KS, Harris KR, Meyer JDF, Levi A, Guner N, Wehner TC, Bendahmane A, Havey MJ. 2009. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*. *Theor Appl Genet* 120: 191-200.
20. Lou L, Wang H, Qian C, Liu J, Bai Y, Chen J. 2013. Genetic mapping of gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) resistance genes in *Cucumis sativus-hystrix* introgression lines. *Euphytica* 192: 359-369.
21. Maynard DN, Hopkins DL. 1999. Watermelon fruit disorders. *HortTechnology* 9: 155-161.
22. Norton JD, Boyhan G, Smith DA, Abrahams BR. 1995. 'AU-Sweet Scarlet' watermelon. *HortScience* 30: 393-394.
23. Norton JD. 1979. Inheritance of resistance to gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* in watermelon. *HortScience* 14: 630-632.
24. Skarshaug AJ. 1981. Centrum development in *Didymella bryoniae*. *Am J Bot* 68: 1096-1103.
25. Sowell G, Pointer GR. 1962. Gummy stem blight resistance introduced watermelons. *Plant Dis Rep* 46: 883-885.
26. Sowell G. 1975. An additional source of resistance to gummy stem blight in watermelon. *Plant Dis Rep* 59: 413-415.
27. Thomson MJ. 2014. High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breed Biotech* 2: 195-212.
28. Trebbi D, Maccaferri M, de Heer P., Sorensen A, Gluliani S, Salvi S, Sanguineti MC, Massi A, van der Vossen EAG., Tuberosa R. 2011. High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet* 123: 555-569.
29. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115-e115.
30. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinic Chem* 49: 853-860.

31. Wolukau JN, Zhou XH, Li Y, Zhang YB, Chen JF. 2007. Resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from plant introductions 157076, 420145, and 323498. HortScience 42: 215-221.
32. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 7: 203-214.