

발간등록번호

11-1543000-002247-01

**Technology Commercialization Support Program  
R&D Report**

# 유전체 재분석을 이용한 사과 아조변이 품종 판별 기술 개발 최종보고서

2018.01.31.

주관연구기관 / 경북대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유전체 재분석을 이용한 사과 아조변이 품종 판별 기술 개발”(개발기간 : 2015.12.18 ~ 2017.12.17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 1. 31.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 최제용



주관연구책임자 : 최 철

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	115075-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.12.18. ~ 2017.12.17 (24개월)	단 계 구 분	2/ 2
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	유전체 재분석을 이용한 사과 아조변이 품종 판별 기술 개발			
연구책임자	최 철	해당단계 참 여 연구원 수	총: 9명 내부: 9명 외부: 0명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:90,000천원 민간: 천원 계:90,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 10명 내부: 10명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:180,000천원 민간: 천원 계:180,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	경북대학교 원예과학과			참여기업명	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자: 최 철	
요약				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ‘후지’ 사과와 후지 아조변이 품종을 구별할 수 있는 판별 마커 개발</li> <li>■ ‘후지’와 아조변이 품종 판별 시스템화</li> <li>■ 유전체 재분석을 이용한 사과 유전자원의 아조변이 탐색 시스템 구축</li> <li>■ ‘후지’ 아조변이의 유전체 분석 결과를 정리하고, DB를 구축하여 자료 공유</li> </ul>					

## 〈 국문 요약문 〉

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전체 재분석을 통해 판별이 어려운 사과 ‘후지’와 아조변이 품종의 판별을 위한 molecular marker 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Resequencing과 genotyping by sequencing을 이용하여 ‘후지’와 유전적으로 유사도가 매우 높은 아조변이 품종을 구분할 수 있는 품종 판별 marker 개발 및 적용</li> </ul> </li> <li>○ ‘후지’와 아조변이 품종 판별 시스템화               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 연구에서 개발된 ‘후지’와 아조변이 품종 판별 marker 및 기존의 품종 판별 marker를 활용하여 실제적으로 적용할 수 있게 시스템화 하여 기술이전</li> </ul> </li> <li>○ 유전체 재분석을 이용한 사과 유전자원의 아조변이 탐색 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전체 재분석을 이용하여 ‘후지’와 아조변이 품종의 판별 기술이 개발되면, 다른 과종과 품종으로의 적용이 가능하므로 활용 가능한 아조변이 탐색 시스템 구축</li> </ul> </li> </ul>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ‘후지’ 사과와 아조변이 품종의 판별을 위한 molecular marker 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ‘후지’ 및 후지 사과 아조변이 품종인 ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’를 판별 할 수 있는 marker 개발</li> <li>- 후지 사과 아조변이 재배 품종 3종을 판별할 수 있는 marker 개발</li> </ul> </li> <li>○ ‘후지’와 아조변이 품종 판별 시스템화               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 교배육종으로 육성된 품종을 구분할 수 있는 기존의 품종 판별 marker 및 본 연구에서 개발된 후지아조변이 품종 판별 marker를 활용하여 실제적으로 적용할 수 있게 시스템화 하여 기술이전</li> </ul> </li> <li>○ 유전체 재분석을 이용한 사과 유전자원의 아조변이 탐색 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전체 재분석을 이용하여 ‘후지’와 아조변이 품종의 판별 기술이 개발되면, 다른 과종과 품종으로의 적용이 가능하므로 활용 가능한 아조변이 탐색 시스템 구축</li> </ul> </li> <li>○ ‘후지’ 아조변이의 유전체 분석 결과를 정리하고, DB를 구축하여 자료 공유</li> </ul>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 품종 판별 marker의 특허출원 및 산업체 기술이전</li> <li>○ ‘후지’와 아조변이 품종의 유전체 분석으로 확보된 품종 판별 marker는 과수 묘목 생산유통과 과실 유통 과정에서 품종의 혼입을 감별하므로 품질관리 원천 기술 확보가 가능</li> <li>○ ‘후지’ 아조변이의 유전적 특성을 이해함으로써 다른 아조변이 품종에 대한 유전체기반 연구모델 제시</li> <li>○ 식물 유전체 염기서열 결과를 활용하여 과수 분자육종 도입의 가시적 성과를 보여줌으로써 품종 육성 연구를 활발히 하는데 기여 할 것으로 기대됨</li> </ul>					
중심어 (5개 이내)	아조변이체	유전체 재분석	분자 표지	Indel	단일염기 다형성	

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of molecular markers for discrimination between 'Fuji' and bud mutation that are difficult to discriminate through genome resequencing</li> <li>○ Identification of 'Fuji' and bud mutation</li> <li>○ Establishment of a system to detect bud mutation in apple germplasms using genome resequencing</li> </ul>					
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of molecular marker for discrimination between 'Fuji' apple and its bud mutation cultivar                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Development of InDel marker to discriminate 'Fuji' and its bud mutation 'Danhong', 'Benishogun', 'Hawgawi' and 'Yataka'</li> <li>- Development of molecular marker to discriminate three cultivars in bud mutation of 'Fuji' apple</li> </ul> </li> <li>○ Establishment of a system to detect in 'Fuji' apple and its bud mutation cultivar</li> <li>○ Development of identification technique of 'Fuji' and bud mutation using genome resequencing, and application to other species and cultivars is possible</li> <li>○ To summarize the results of the genome resequencing of 'Fuji' bud mutation and construct a DB to share data</li> </ul>					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Patent application and industrial technology transfer of cultivar identification marker</li> <li>○ source technology secure of fruit quality control</li> <li>○ presentation of genome-based research model associated with other bud mutation varieties</li> </ul>					
Keywords	bud mutation	resequencing	molecular marker	insertion and deletion	single nucleotide polymorphism	

## < Contents >

1. Outline and performance goals of the project .....	7
2. Current status of national and overseas technology development ·	9
3. Research contents and results .....	13
4. Achievement of goal and contribution to related field .....	33
5. R&D Performance and its utilization plan .....	33
6. Overseas science and technology information collected during R&D process .....	34
7. Security level of research achievements .....	34
8. Research facility or equipments enrolled to National science and technology information system .....	34
9. Results of implementation to increase laboratory safety level .....	34
10. Representative research outputs .....	35
11. Others .....	35
12. References .....	35

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	9
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	13
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	33
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	33
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	34
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	34
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	34
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	34
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	35
11. 기타사항 .....	35
12. 참고문헌 .....	35

〈별첨〉 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

- 유전체 재분석을 이용하여 사과 ‘후지’와 아조변이 품종의 판별 기술 개발
  - 사과 ‘후지’ 아조변이 품종 판별 marker 개발
  - ‘후지’와 아조변이 품종 판별 시스템화
  - 유전체 재분석을 이용한 ‘후지’ 유전자원의 아조변이 탐색 시스템 구축

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 국내의 과수 육종 연구 주체가 단순함
  - 장기간의 육종기간과 대면적이 요구되는 특성상 과수 육종에 대한 연구는 국가기관에서만 수행되고 있음
  - 과수 아조변이 품종은 개인 육종가나 재배자에 의해서도 품종 등록이 이루어짐
  - 국가 기관에서도 교배 육종에 의해 육성된 품종에 대한 판별 marker 연구는 수행되나, 아조변이 품종에 대한 판별 marker 연구는 미흡함
  - 과수 산업 및 과수 육종의 중요성에 대한 인식 부족으로, 과수 유전체 연구에 대한 지원이 미흡함
  - 최근 국외의 경우 국내의 연구기관뿐만 아니라 다양한 연구기관이 컨소시엄을 형성하여 유전체의 정보를 사회적 요구에 따라 정밀육종에 제공하고 있음
  - 따라서 국내에서도 과수 현장육종에서의 걸림돌과 저장 유통 단계에서의 문제점을 극복할 수 있는 유전체 연구, 아조변이 탐색 시스템 구축을 위한 유전체 연구가 필요함
- 국외의 경우 품종보호, 품질, 수형 및 저항성 관련 molecular marker를 대량 발굴하였고, 이를 육종에 이용하는 연구에 장시간 많은 노력을 기울이고 있음. 반면 국내의 경우 과수를 대상으로 분자표지 개발 연구가 진행되어 왔으나 매우 제한적이고 활용성 면에서는 매우 미약한 실정임
  - 2010년에 해독된 사과 ‘Golden Delicious’의 유전체를 reference genome으로 ‘후지’의 주요 아조변이 품종에 대한 resequencing을 통해 아조변이와 관련된 품종 판별 marker 개발이 필요함
- 외국의 묘목 생산업체는 과수 묘목생산과 유통현장에서 품질 보증과 품종혼입의 경우를 대비하여 품종 판별 marker의 개발하여 보유하고 있는 실정이나 국내업체의 경우는 전무하고, 과수 묘목 선도업체 등에서 국가기관에 품종판별을 위한 유전자 기술 개발을 요구하는 실정으로
- 농촌진흥청에서 과수 품종판별 시스템을 구축하여 보급하였으나, 변이계통은 판별 할 수 없음



- 외국의 경우 대규모 컨소시엄을 형성하여 유전체의 정보를 실제 과수육종에서 이용할 수 있는 다양한 분자표지개발 기술 연구 및 아조변이의 발생 기작 등의 연구가 진행되고 있음
- 묘목업체의 영세성과 무분별한 외국 품종의 도입 등으로 과수 묘목생산과 유통현장에서 품질 보증이 미흡한 묘목의 유통 및 품종혼입 사례가 많이 발생하고 있음
- 과수는 1~2년생의 어린 나무가 겨울철에 국내외 묘목시장에서 유통되며, 이 시기에는 과실이 달리지 않으며, 품종 고유의 특성이 나타나지 않아 형태적인 품종 구분이 어려움
- 과수묘목의 품종혼입 사례는 추후, 과실의 품종혼입을 초래하여 생산·저장·유통·소비와 관련하여 생산자, 유통업자, 소비자 간의 신뢰성에 대한 문제가 발생함
- 과수 품종 혼입을 방지하기 위해 묘목 생산자에게 품종보증 의무가 요구될 것이며, 과수 묘목 생산유통시장에서 품종혼입과 무단증식 등에 대한 문제 발생 시 객관적인 판별 기준이 요구됨
- 국내 육성 신품종의 국외 무단유출을 방지해 품종 육성가의 권리를 보호하고 품종혼입으로 발생하는 분쟁을 최소화해 과수 묘목시장의 유통 안정화를 위한 과학적인 품종인증 시스템이 필요함
- 교배육종에 의한 새로운 품종들도 기존의 품종을 양친으로 사용하여 유전적으로 연관되어 있어 형태적 형질만으로 품종구분이 어려우나, RAPD, AFLP, SSR, SCAR 등의 기존의 marker 탐색 방법으로 품종 판별 marker를 개발할 수 있음
- 아조변이 품종은 유전적 유사성이 매우 높아 기존의 marker 탐색 방법으로는 아조변이 품종 구별이 불가능하여 유전체 분석을 통하여 품종 판별 marker를 개발해야 함
- 우리나라 과수산업에서 가장 중요한 위치를 차지하는 사과 유전체 정보를 바탕으로, 사과 아조변이 탐색 시스템 구축은 과수 묘목 생산업체, 농업인, 과실 유통업체 간의 신뢰도 제고뿐만 아니라 국제 경쟁 시대에 매우 시급하며 필요한 사안임

### 1-3. 연구개발 범위

- ‘후지’와 아조변이 4품종의 resequencing 실시
- resequencing에서 제외된 아조변이 품종을 이용하여 genotyping by sequencing 실시
- 원품종과 아조변이 품종 간의 SNP 및 InDel 확보
- 선발 SNP와 InDel에 대한 품종 판별 marker 개발
- 개발된 품종 판별 marker 적용성 평가 및 품종 혼입비율의 검출한계 설정
- ‘후지’와 아조변이 품종, 사과 품종의 판별 marker의 시스템화
- Resequencing을 이용한 사과 유전자원의 아조변이 탐색 시스템 구축
- 사과 품종 판별 marker 정보, DB 구축

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### (1) 국내 연구 현황

- 사과는 우리나라 농업생산 및 국민 건강 증진에 중요한 과수작물임
  - 국내 사과 생산액('14년)은 9,369억원으로 농업인 소득에 매우 중요한 작물임
    - 농업생산액의 약 2%, 과실생산액의 26.2%를 차지
- FTA시대 육종 필요성
  - 한·미, 한·EU FTA 뿐만 아니라 한·중 FTA가 예견되어 개방화시대의 사과 산업경쟁력이 필요함
  - 중국은 한·중 FTA 핵심전략으로 사과를 집중육성하고 있으며, 중국 사과의 품질고급화를 위해 우량품종 육성보급, 유기사과 재배면적 확대, 규모화, 병충해 청정지역화를 추구하고 있음. 우리 사과 재배농가도 고품질, 건강, 농약안전, 기능성 사과를 생산하여 중국산과 차별화를 시급히 이루어야 함
  - 따라서 앞으로 수입되는 과실과는 다른 국내 차별화 품종의 육성이 필요함
- 자국 육성 품종에 대한 보호권 강화에 따라 국내 품종육성 및 품종판별 기술 개발 필요
  - 세계 과수종묘시장의 규모는 연간 2조원 이상으로 추정되며 국내시장도 800억 원 이상이고, 주요 과수 품목은 2002년부터 UPOV의 품종보호에 적용되어 해외 도입품종에 대한 로얄티 부담이 점차 가중될 것으로 예상
  - 과수 유전자원 및 신품종에 대한 로얄티 지급 요청 사례 증가 추세
    - 국내에서는 사과, 참다래 등의 외국품종 생산 시, 로얄티 지급
    - 국내의 주요 품종을 대체할 새로운 사과 품종육성 및 품종판별 기술이 필요
- 국내 사과 재배·육종 현황
  - 국내 사과 재배 현황
    - 국내의 사과 재배면적('14년)은 '후지'가 약 69.8%로 가장 높고, '홍로'가 14.8%, '쓰가루', '양광', '감홍'이 약 8.9%를 차지함
    - 2000년대부터 일반 '후지'보다 '후지'의 조숙계변이('료카', '히로사키')와 착색계변이('미시마', '미야마', '기쿠 8')로 전환하는 추세임
    - '후지' 계열의 재배면적('14년) 비율은 일반 '후지'가 57.4%, 착색계변이 품종들이 32.2%, 조숙계변이 품종들이 10.3%를 차지함
  - 사과 품종 육성
    - 만생 품종 육성을 목표로 개발 중이며 다양한 과피색, 크기, 과육 착색 등의 특이 품종 개발을 하고 있음
    - 1962년부터 본격적으로 교배육종을 시작하여 1988년 '홍로' 품종을 시작
    - 현재까지 국내직무육성 사과 품종은 24품종 육성되어 품종 등록됨
    - 국내 육성 품종으로 등록된 '단홍'과 '화영'은 후지 아조변이 품종임
  - 사과 '후지' 아조변이 품종
    - '후지'는 맛과 향이 좋아 소비자의 기호도가 높을 뿐만 아니라 저장성이 뛰어나고 품질이 우수하여 주요 수출 품종으로 각광받고 있음

- '후지'는 유전적으로 착색이 불량하여 봉지 씌우기, 반사필름 피복 등의 특수 노력이 부가되어 생산비 상승의 한 요인이 되고 있고, 과형이 불균일하며 과다 착과, 시비 불균형 등의 경우 해거리가 심한 단점이 있어 고품질 과실 생산을 위한 제한 요인으로 작용함
- 문제점을 해결하기 위해 착색과 여러 요인이 개선된 아조변이 계통 탐색이 활발히 이루어져 국내외에서 많은 아조변이 품종이 선발 됨
- 육종 소재의 유전적 유사성이 매우 높아 '후지'와 '후지'아조변이 품종간 표현형이 큰 차이를 보이지 않음
- '후지'는 아조변이 품종들이 농가에서 재배되고 있는 실정이지만, 묘목과 과실의 유통시 모두 '후지'로 유통되고 있는 실정임

#### □ 과수의 품종 판별

##### ○ 형태적 형질을 이용한 품종 구분 가능성

- 교배육종시 기존 품종들을 양친으로 사용하는 경우가 많아 유전적으로 매우 밀접하게 연관되어 있어 형태적 형질만으로 품종 구별이 쉽지 않음
- 개화 이후 과실의 특성 등에 따라 품종 구별이 가능하나 환경의 영향을 받고 시간이 많이 소요됨
- 과수 묘목 생산 및 유통현장에서 다른 품종이 섞여 생산자와 농업인간의 분쟁이 발생함
- 최근에 농촌진흥청에서 과수 품종판별 시스템을 구축하여, 사과 13종, 배 19종, 감 15종, 포도 16종, 복숭아 19종의 총 82종의 molecular marker를 개발하여, 이 molecular marker 조합에 의해 사과, 배, 감, 포도, 복숭아, 5과종의 총 178품종 판별이 가능하나
- 이는 교배육종에 의해 육성된 품종들이며, 이들 marker로는 아조변이 품종을 판별할 수 없음

#### □ 주요 형질관련 사과의 유전자 지도 및 분자표지 개발

- RAPD를 이용하여 'Fuji' × 'Malus baccata'의 연관 지도개발(원예원)
- 사과 점무늬낙엽병 저항성 유전자원 선발 및 분자표지 개발 연구(원예원)
- 사과 columnar type 유전자(Co) 연관 분자표지 개발(원예원)
- 사과 적색 과피색 연관 조기선발용 분자표지 선발(원예원)
- 분자표지를 이용한 사과 겹무늬썩음병 및 갈색무늬병 저항성 육종 기반 확립(원예원)
- 분자표지를 이용한 재배 품종 및 야생유전자원의 유전적 다양성 연구(경북대, 원예원)
- 국내 수집 사과 유전자원의 RGA(resistance gene analogs)분석(경북대)
- 사과 품종식별 marker 선발 및 과육색연관 유전자 탐색 및 선발 (원예원)
- 사과 당도연관 유전자 탐색 (원예원)

#### □ 유전체 분석 연구

- 차세대유전체연구 1단계에서 사과 핵심집단 선발과 사과 유전체 지도를 작성
- 2단계에서는 사과 핵심집단에 대한 GWAS(genome wide association study)를 통해 육종의 목적형질과 관련된 연관 표지 개발 연구가 진행 중

□ 전사체 분석 연구

- Differential display를 이용한 사과 자가적과성 연관 유전자 탐색(원예원)
- 사과 성숙시기의 적색 및 녹색과피에서 발현되는 유전자 비교 분석(연세대)
- 사과 품종별 동해관련 특이 발현 유용유전자 탐색(경북대)

(2) 국외 연구 현황

□ 'Golden Delicious' 사과 유전체 해독

- 2010년 전체 사과 유전체의 91.3%에 해당하는 총 contig 603.9Mb가 해독 되었고, 이로써 사과유전체의 크기는 약 742.3Mb로 정확히 추정됨
- 또한 미국, 프랑스, 남아프리카공화국, 이탈리아 등이 공동으로 DH(double haploid) 'Golden Delicious'를 이용하여 whole-genome shotgun을 만들어 낼 예정임

□ HiDRAS(High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture) 프로젝트는 유럽 국가들의 사과품질향상과 더불어 살균제의 사용을 줄이기 위한 유전체 연구를 통한 정밀 사과육종 프로그램 수행

- 1994년 영국 등 7개국이 1 단계 사과게놈프로젝트를 시작한 이래 2007년까지 수행한 12년간 3단계 프로젝트 중 마지막 단계인 HiDRAS는 EU 8개국 11개 기관에서 수행됨
- 사과유전자원의 수집/분석, 분자육종기술의 동반발전, 사과 흑성병 저항성 유전자의 발굴 및 관련지식의 DB화를 완료함
- 약 26개 유전집단 1400여점의 개체 및 370여 품종 및 선발개체 전체를 각 참여 기관마다 각각 공통 재배 후 통일된 표현형 분석을 통하여 유전분석을 시도함
- SSR marker를 분석을 통한 약 160여개의 유전자 지도를 완성하여 HiDRAS reference map을 DB화 함
- 개발된 분자표지를 실용화하기 위하여 4-6개 분자표지를 한번의 PCR로 판별할 수 있는 Multiplexes 시스템을 개발함
- Microarray analysis를 통한 전사체 분석연구 등을 통하여 다양한 사과품질관련 유전자를 확보함

□ RosBREED : Enabling marker-assisted breeding in Rosaceae 프로젝트는 미국 USDA fund로 지원되며 2010년부터 1단계(2010-2013)의 목표는 그간의 유전체 연구를 바탕으로 장미과 과수(사과, 복숭아, 체리, 딸기)를 중심으로 marker를 이용한 육종 연구를 수행함

- Infinium HD assay를 통한 SNP marker 개발을 위하여 사과(9k), 복숭아(9k) 및 체리(9k)의 chip이 개발됨
- Genome scan을 통하여 genome-wide SNP를 대량 발굴하고, 목표 유전자의 SNP를 비교유전체학을 통하여 장미과 과수 전체에 활용할 수 있도록 시도하고 있음
- 개발된 SNP marker를 과수 교배육종에 이용될 수 있도록 pedigree 분석 program 과 융합하여 육종가용 software 및 DB 구축을 목표로 함

- 2015년부터 시작될 RosBREED의 2단계 프로젝트 Combining Disease Resistance with Horticultural Quality in New Rosaceous Cultivars는 1단계에서 이루어진 유전체 연구를 기반으로, 주요 장미과 과수산업에 중요한 병 저항성 유전 육종 연구를 실시할 예정임
  - 사과, 복숭아, 딸기, 체리로 시작하였던 1단계에 비해 과종을 확대하여 배, 블랙베리, 장미 등을 포함하고 1단계에서 개발된 내용을 확대된 과종에 적용하여 장미과 작물의 분자육종을 실현하는데 목표를 두고 있음
- Fruit Breedomics project : Bridging the gap between genomics and fruit breeding은 2011년 유럽을 중심으로 이스라엘, 남아프리카공화국, 뉴질랜드, 중국 등이 참가하고 있고, 현재의 유전체연구를 영양번식 과수(사과 및 복숭아를 중심으로 한 장미과 과수)의 정밀육종과 접목하는 연구가 진행 중임
- 미국에서 사과의 흰가루병 저항성 유전자 및 이용과 화상병 저항성 형질전환체 등에 대한 특허가 보고됨
- 사과의 화상병에 대한 유전자분석을 통해 민감성 sequences와 분리방법에 대한 특허가 미국에서 보고됨
- 사과의 경우 160여개의 유전자 지도를 완성하여 사과 reference map을 DB화 하고, 과실품질 및 병저항성과 관련된 다양한 형질 연관 marker를 개발하기 위해 유전체 전사체 정보 이용 연구
- 자국이 보유한 자생·야생 유전자원이 가진 유용형질을 재배 품종으로 들여오기 위한 연구 진행
- 장미과 과수류에서 Genome scan을 통하여 genome-wide SNP를 대량 발굴하고, 개발된 SNP marker를 과수의 교배육종에 이용될 수 있도록 pedigree 분석 program과 융합하여 육종가용 software 개발이 진행되고 있음
- 외국의 경우 정보를 실제 과수육종에서 이용할 수 있는 다양한 molecular marker 개발 기술 연구 및 아조변이의 발생 기작 등의 연구가 진행되고 있음
- 현재까지 국내외에서 개발된 사과의 품종 판별 마커로는 아조변이 품종을 판별할 수 없으므로, 유전체 정보를 이용하여 과수 아조변이 품종 판별 마커를 개발한다면 육성가 권리보호 품종 보증, 재배생산저장유통의 신뢰성 확보 및 원천기술 확보를 통한 국제시장성을 확보할 수 있음.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

#### 가. 연구수행 내용

##### (1) 실험재료 선정

- 농촌진흥청 사과연구소에서 후지아조변이 품종 수집
- resequencing 분석에 사용될 품종 선발(표 1)

표 1. 유전체 재분석에 사용한 후지와 아조변이 품종

Cultivars	Reported parentage	Year released
Fuji	Ralls Genet × Delicious	1958
Enhanced coloring group	Danhong Fuji	Sport of Fuji
	Hangawi Fuji	Sport of Fuji
Early season group	Benishogun Fuji	Sport of Fuji
	Yataka Fuji	Sport of Fuji

##### (2) 유전체 재분석

- 사과의 유염을 이용하여 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)으로 genomic DNA 추출
- Illumina Hiseq 2000 system을 사용하여 paired-end로 whole genome resequencing 수행
- Reference genome - *Malus domestica* var. 'Golden Delicious'
- Sequencing된 short read data 분석방법 및 조건

Sequencing된 read의 preprocessing

program : SolexaQA package

version : v.1.13

sequence quality & length trimming

probability value (between 0 and 1) : 0.05

phred quality score (between 0 and 40) : 20

min read length(bp) : 25

Reference genome에alignment

program : BWA

version : 0.6.1-r104

매핑 조건은 다음의 옵션을 제외하곤, default 값을 사용함

Maximum number of gap extensions (-e) = 50, seed length (-l) = 30,

maximum differences in the seed (-k) = 1, number threads (-t) = 64,

mismatch penalty (-M) = 6, gap open penalty (-O) = 15, gap

extension penalty (-E) = 8

Consensus sequence 추출 및 raw SNP detection

program : SAMtool

version : 0.1.16 (r963:234)

Samtools varFilter를 이용하여 reference와 샘플 간의 SNP를 추출하고, 다음의 옵션을 제외하곤, 기본 값을 사용함

Minimum mapping quality for SNPs (-Q) = 30, minimum mapping quality for gaps (-q) = 15, maximum read depth (-D) = 1000, min indel score for nearby score for near by SNP filtering (-G) = 30, SNP within INT bp around a gap to be filtered (-w) = 15, window size for filtering dense SNPs (-W) = 15

Generate SNP (InDel) matrix

program : *in-house* script

각 샘플과 reference 간에 찾은 raw SNP (InDel) 정보를 이용하여 샘플 간 통합 SNP (InDel) matrix를 작성하고, mis-calling된 값들을 필터 함

sequence quality & length trimming

prbability value (between 0 and 1) : 0.05

phred quality score (between 0 and 40) : 20

min read length(bp) : 25

SNP (InDel) annotation

annotation 출처 : *Malus domestica* var. 'Golden Delicious' (NCBI)

reference genome structure(genic/intergenic region)을 기반으로 SNP (InDel)을 분류하고, gene 정보를 정리함

- 품종간의 SNP와 InDel marker를 개발하기 위해 polymorphic SNP와 InDel을 선발

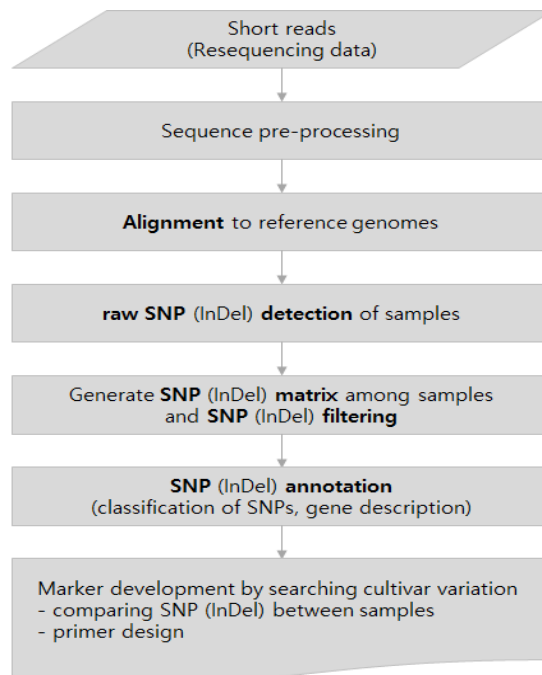


그림 1. SNP와 Indel 선발 모식도

### (3) Genotyping by sequencing (GBS) 분석

- 농촌진흥청 사과연구소에서 후지아조변이 품종 수집
- ‘후지’ 아조변이 품종 35개  
아키후, 아키후-39, 아키후-1, 아오후-5, 아오후-13, Red B.C#2, 이와후-10, 모리호 후3A, 키쿠-8, 마이라 레드, 나가후 #2, 나가후 #6, 나가후 #12, 썬 후지, TAC-114, 야마후, 고을, 라쿠라쿠 후지, 봉춘계 후지, Yamadani 2gei, 산발 2계 후지, 왕실, 천성, Spur Fuji, 일야(一野) 후지, 히로사키 후지, Mimaki Spur Fuji, Jubilee Fuji, 사이라이 후지, 하이랜드 후지, 미야마 후지, 단홍, 한가위, 홍장군, 야타카, 후지
- 사과의 유염을 이용하여 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)으로 genomic DNA 추출
- Illumina Hiseq 2000 system을 사용하여 paired-end로 Genotyping by sequencing 수행  
사용된 제한효소 *ApeK1*

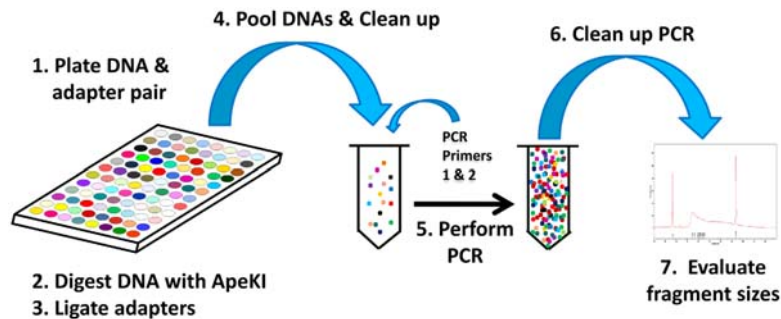


그림 2. GBS library 제작 과정

- Reference genome - *Malus domestica* var. ‘Golden Delicious’
- Sequencing된 short read data 분석방법 및 조건
  - Sequencing pre-processing
  - Barcode sequence를 이용 demultiplexing
  - Adapter sequence 제거
  - sequence quality trimming 수행
    - SolexaQA (v.1.13) package의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램 사용
    - DynamicTrim은 phred score( $\geq 20$ )에 따라 short read의 양쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정 수행
    - LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 base가 잘린 read를 제거하는 과정 수행(read length  $\geq 25$ bp)
  - Reference genome에 alignment
    - clean read를 BWA (0.6.1-r104) 프로그램을 사용하여 표준유전체에 mapping 매핑 조건은 다음의 옵션을 제외하곤, 기본 값을 사용
      - seed length (-l) = 30, maximum differences in the seed (-k) = 1,
      - number threads (-t) = 16, mismatch penalty (-M) = 6, gap open penalty (-O) = 15, gap extension penalty (-E) = 8.
  - Consensus sequence 추출 및 raw SNP detection
    - clean read를 표준유전체에 mapping하여 생성된 BAM format의 파일을



SAMtools (0.1.16) 프로그램을 사용하여 raw SNP와 InDel을 detection하고, consensus sequence를 추출

다음의 옵션 이외에는 기본 값을 사용

program : SAMtool

version : 0.1.16 (r963:234)

Samtools varFilter를 이용하여 reference와 샘플 간의 SNP를 추출하고, 다음의 옵션을 제외하곤, 기본 값을 사용함

minimum mapping quality for SNPs (-Q) = 30, minimum mapping quality for gaps (-q) = 15, minimum read depth (-d) = 3, maximum read depth (-D) = 478, min indel score for near by SNP filtering (-G) = 30, SNP within INT bp around a gap to be filtered (-w) = 15, window size for filtering dense SNPs (-W) = 15

Generate SNP (InDel) matrix

program : *in-house* script

각 샘플과 reference 간에 찾은 raw SNP (InDel) 정보를 이용하여 샘플 간 통합 SNP (InDel) matrix를 작성하고, mis-calling된 값들을 필터 함

SNP (InDel) filtering

유의한 SNP 및 InDel 후보를 선별하기 위한 SNP (InDel) filtering 과정을 수행  
SNP loci of biallelic, missing rate < 10%, minor allele frequency > 5%

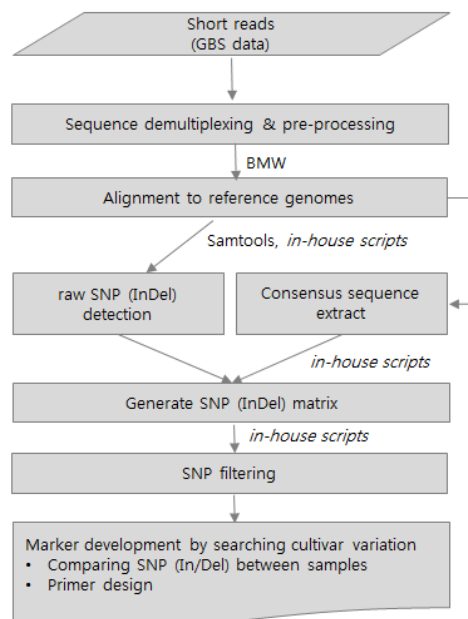


그림 3. Genotyping by sequencing 분석에 의한 SNP와 Indel 선별 모식도

#### (4) Resequencing data를 이용한 InDel marker 후보 탐색

- resequencing으로 분석된 변이영역에서 InDel 선별
- primer 디자인
- PCR 수행

- capillary electrophoresis로 PCR 결과 확인
- T-blunt vector (Solgent, Korea)를 이용하여 cloning
- 염기서열 비교

**(5) Allele specific PCR을 이용한 SNP marker 후보 탐색**

- 사과의 유전적 특성으로 인해 allele specific PCR을 이용하여 품종을 판별 하고자 함
- primer 제작
- target SNP를 primer 제작 시 3'말단에 정확하게 일치하도록 하여 전기영동 시 agarose gel 상의 band의 유무를 확인하여 품종간의 염기상의 변이 확인 가능



**(6) 품종 판별 marker 적용성 평가 및 품종 혼입비율의 검출한계 설정**

- 개발된 marker 이용하여 동일 품종을 지역별로 샘플링하여 PCR 수행
- 품종 혼입비율을 설정하여 conventional PCR 수행

**나. 연구수행 결과**

**(1) ‘후지’와 아조변이 4품종 resequencing**

- ‘후지’와 아조변이 품종은 농촌진흥청 사과연구소에서 수집하였고, 변이 특성을 고려하여 착색계 변이 품종인 ‘단홍’, ‘한가위’, 숙기 변이 품종인 ‘홍장군’, ‘야타카’를 사용하여 resequencing 분석 후 유전체를 비교함.
- Illumina HiSeq에서 paired-end로 얻어진 5품종의 평균 101bp reads의 수는 총 546,748,050 이고 총 읽은 염기서열은 55Gb로 이는 reference genome인 ‘Golden Delicious’ 약 526Mb의 21배 커버함.
- Sequence quality를 고려하여 reads를 trimming 하였을 때, reads의 길이는 85~97bp (평균 93p) 정도였음. Reads의 총 수는 ‘후지’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’ 품종별 reads 총수는 각각 107,621,100개, 100,227,872개, 97,120,364개, 92,357,640개, 76,494,810개로 평균적으로 약 17배의 genome coverage를 보임(표 2). 이 reads를 대상으로 reference genome인 ‘Golden Delicious’에 대하여 mapping 하여 ‘후지’ 약 361Mb(68.65%), ‘단홍’ 약 360Mb(68.51%), ‘한가위’ 약 360Mb(68.52%), ‘홍장군’ 약 360Mb(68.39%), ‘야타카’ 약 357Mb(67.95%)가 mapped 됨.

표 2. 후지와 아조변이 품종의 유전체 재분석 통계치

Cultivar	No. of reads	Avg. Length (bp)	Total length (bp)	Trimmed /raw <sup>a</sup>	Genome coverage <sup>b</sup>
Fuji	53,810,550	96.98	5,218,727,134	83.67%	≒ 19.31 ×
	53,810,550	91.86	4,942,949,683	79.25%	
Danhong Fuji	50,113,936	96.79	4,850,701,708	84.03%	≒ 17.94 ×
	50,113,936	91.60	4,590,472,470	79.53%	
Hangawi Fuji	49,560,182	95.53	4,734,631,547	81.15%	≒ 17.45 ×
	49,560,182	89.73	4,447,202,246	76.23%	
Benishogun Fuji	46,178,820	96.61	4,461,503,837	85.11%	≒ 16.58 ×
	46,178,820	92.34	4,264,118,068	81.35%	
Yataka Fuji	38,247,413	92.43	3,535,187,339	78.13%	≒ 12.90 ×
	38,247,413	85.02	3,251,681,370	71.86%	

<sup>a</sup>Trimmed/raw: Total length of trimmed read / total length of raw read.

<sup>b</sup>Genome coverage: Total read length of each sample / reference genome size (about 526Mb).

○ Reference genome에 mapping하여 raw SNP를 detection. 이를 이용하여 ‘후지’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’ 품종간의 통합 SNP matrix를 작성하고, 필터 기준을 통과한 SNP들을 ‘homozygous/heterozygous/기타’ 유형으로 구분한 결과, 전체 SNP 수는 ‘후지’ 2,124,148개, ‘야타카’는 1,881,325개가 발견됨(표 3).

표 3. SNP detection 통계치

Sample	No. of total SNP	No. of homozygous SNP <sup>a</sup>	No. of heterozygous SNP <sup>b</sup>	No. of rest <sup>c</sup>
Fuji	2,124,148	926,284	599,921	597,943
Danhong Fuji	2,086,811	911,452	592,231	583,128
Hangawi Fuji	2,072,148	903,355	588,883	579,910
Benishogun Fuji	2,056,036	898,575	584,487	572,974
Yataka Fuji	1,881,325	825,225	543,278	512,822

<sup>a</sup>No. of Homozygous SNP: Number of SNP type when detected SNPs from each mapped read to reference are consensus above 90%.

<sup>b</sup>No. of Heterozygous SNP: Number of SNP type when detected SNPs from each mapped read to reference are consensus in 40~60%.

<sup>c</sup>No. of rest: Indistinguishable SNP type whether homozygous or heterozygous.

○ InDel를 찾기 위해서 reference genome에 mapping하여 raw InDel을 detection. 이를 이용하여 ‘후지’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’ 품종간의 통합 InDel matrix를 작성. 필터 기준을 통과한 InDel들을 ‘homozygous/heterozygous/기타’ 유형으로 구분한 결과, 전체 InDel 수는 ‘후지’ 208,116개, ‘야타카’는 153,705개가 발견됨(표 4).

표 4. InDel detection 통계치

Sample	No. of total InDel	No. of homozygous InDel <sup>a</sup>	No. of heterozygous InDel <sup>b</sup>	No. of rest	Homo/Heterozygous InDel		
					Insertion	Deletion	Total
Fuji	208,116	51,379	50,482	106,255	40,745	61,116	101,861
Danhong Fuji	200,586	50,500	49,080	101,006	39,996	59,584	99,580
Hangawi Fuji	195,216	49,505	47,895	97,816	38,946	58,454	97,400
Benishogun Fuji	192,440	49,975	47,191	95,274	39,074	58,092	97,166
Yataka Fuji	153,705	43,860	38,519	71,326	33,147	49,232	82,379

<sup>a</sup>No. of Homozygous InDel: Number of InDel type when detected InDels from each mapped read to reference are consensus above 90%.

<sup>b</sup>No. of Heterozygous InDel: Number of InDel type when detected InDels from each mapped read to reference are consensus in 40~60%.

○ Reference genome에 각 품종의 염기서열을 비교하여 얻어진 SNP와 InDel을 이용하여 ‘후지’를 기준으로 하고 아조변이 품종 각각을 비교하여 polymorphic SNP와 InDel을 선 발함. Polymorphic SNP는 이전의 데이터 양상과 다르게 homozygous SNP 보다 heterozygous SNP 개수가 더 많이 나타남. ‘야타카’는 total reads 수가 가장 낮았음에도 가장 많은 SNP와 InDel이 나타내므로 다른 아조변이 품종에 비해 ‘후지’와 가장 큰 변이가 있음을 의미함(표 3, 5, 그림 4).

표 5. 후지와 각 아조변이 품종 간의 SNP 및 InDel detection 통계치

Sample	No. of homozygous SNP	No. of heterozygous SNP	No. of heterozygous InDel
Fuji vs Danhong Fuji	670	50,089	8,053
Fuji vs Hangawi Fuji	723	50,162	8,025
Fuji vs Benishogun Fuji	753	51,197	7,908
Fuji vs Yataka Fuji	960	57,710	8,313

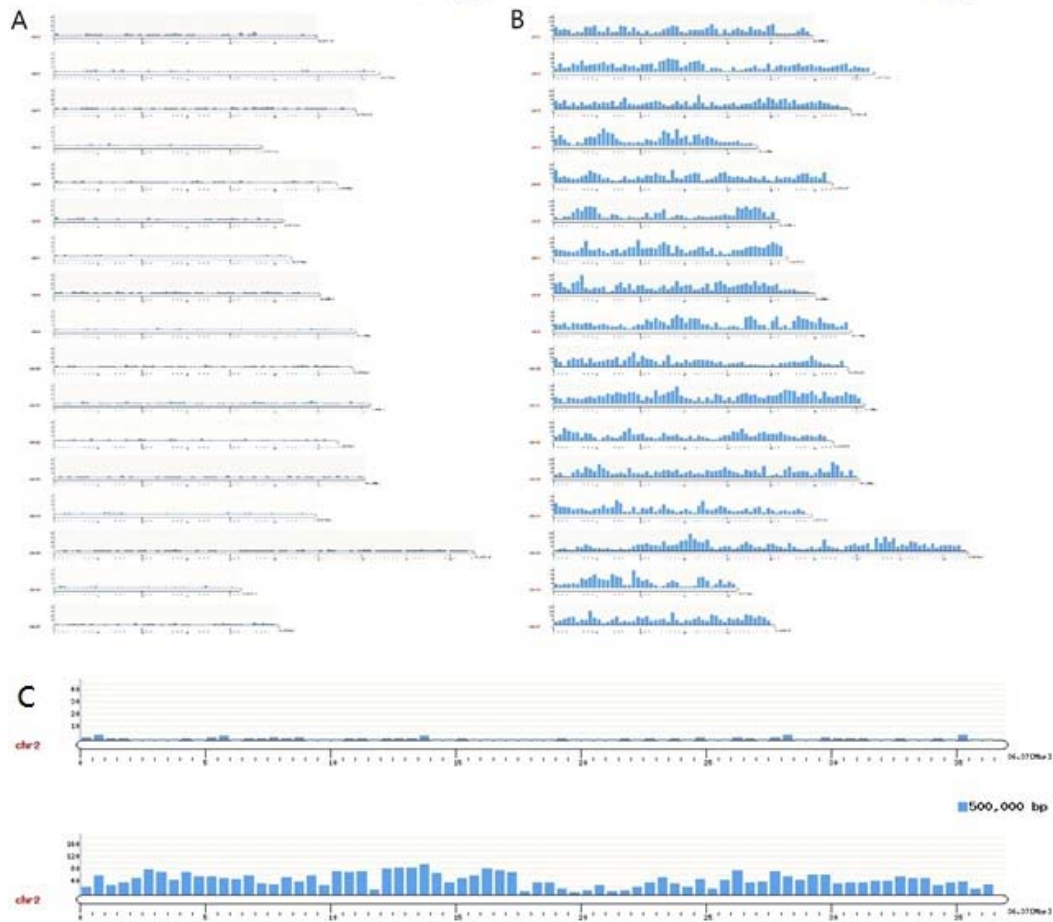


그림 4. Number of distribution of homozygous SNP and heterozygous SNP; Homozygous SNP (A) and heterozygous SNP (B) on chromosome that discriminate between 'Fuji' and 'Yataka Fuji'. (C) shows distribution of homozygous SNP and heterozygous SNP on chromosome number 2. Y axis represent the number and X axis represent total length of chromosomes.

**(2) '후지'와 아조변이 품종 genotyping by sequencing**

- 농촌진흥청 사과연구소에서 '후지'와 아조변이 품종 35개를 수집하여 genotyping by sequencing (GBS) 분석하여 유전체를 비교함(아키후, 아키후-39, 아키후-1, 아오후-5, 아오후-13, Red B.C#2, 이와후-10, 모리호후3A, 키쿠-8, 마이라 레드, 나가후 #2, 나가후 #6, 나가후 #12, 썬 후지, TAC-114, 야마후, 고을, 라쿠라쿠 후지, 봉춘계 후지, Yamadani 2gei, 산발 2계 후지, 왕실, 천성, Spur Fuji, 일야(一野) 후지, 히로사키 후지, Mimaki Spur Fuji, Jubilee Fuji, 사이라이 후지, 하이랜드 후지, 미야마 후지, 단홍, 한가위, 홍장군, 야타카, 후지).
- Illumina HiSeq에서 paired-end로 얻어진 36품종의 전체 reads 수는 258,397,724이고, 전체 길이는 26Gb로 나타남.

○ GBS library quality를 확인한 결과 시료 간 depth은 7.05~19.58 사이에 분포하며 평균은 11.46으로 비교적 균일한 편차를 나타냄. SNP 정확도 및 SNP 수에 영향을 미치는 reference genome coverage의 평균은 2.30%를 나타냄(표 6).

표 6. GBS data 통계치

Sample	No. of mapped region	Avg. depth of mapped region	Total length of mapped region (bp)	Avg. length of mapped region (bp)	Reference Genome coverage(%)
Fuji	62,054	9.35	10,323,774	166.37	1.96%
아키후	33,788	7.05	4,982,854	147.47	0.95%
아키후-39	64,395	9.68	10,805,430	167.80	2.05%
아키후-1	51,036	8.41	8,241,881	161.49	1.57%
아오후-5	97,333	14.84	17,291,318	177.65	3.29%
아오후-13	74,778	10.91	12,778,820	170.89	2.43%
Red B.C#2 Fuji	77,980	12.83	12,854,103	164.84	2.44%
이와후	42,325	7.40	6,633,156	156.72	1.26%
모리호후 3A	118,981	19.58	21,849,865	183.64	4.15%
키쿠-8	61,867	9.46	10,276,248	166.10	1.95%
마이라 레드	104,430	15.62	18,925,029	181.22	3.60%
나가후-2	111,335	17.57	20,302,035	182.35	3.86%
나가후-6	83,885	12.14	14,554,866	173.51	2.77%
나가후-12	118,318	19.04	21,770,740	184.00	4.14%
썬후지	41,816	7.75	6,442,347	154.06	1.22%
TAC-114	91,646	14.59	15,919,555	173.71	3.03%
야마후	84,044	12.43	14,615,460	173.90	2.78%
고을	92,080	14.73	16,123,539	175.10	3.06%
라쿠라쿠 후지	89,329	13.76	15,635,735	175.04	2.97%
봉촌계 후지	85,862	13.89	14,815,930	172.56	2.82%
Yamadani 2gei	80,926	12.23	13,886,313	171.59	2.64%
선밭 2계 후지	54,882	9.42	8,835,639	160.99	1.68%
왕실	46,923	9.14	7,359,132	156.83	1.40%
천성	23,329	6.51	3,116,941	133.61	0.59%
Spur Fuji	63,057	10.55	10,395,481	164.86	1.98%
일야 후지	82,345	13.73	13,900,951	168.81	2.64%
히로사키 후지	72,940	11.51	12,243,871	167.86	2.33%
Mimaki Spur Fuji	59,576	9.60	9,743,254	163.54	1.85%
Jubilee Fuji	65,589	10.14	10,801,585	164.69	2.05%
사이라이 후지	49,213	8.64	7,808,567	158.67	1.48%
하이랜드 후지	86,663	13.12	14,909,310	172.04	2.83%
미야마	76,235	11.90	13,034,879	170.98	2.48%
단홍	65,694	10.28	11,046,127	168.15	2.10%
한가위	43,279	7.52	6,758,792	156.17	1.28%
홍장군	43,883	7.41	6,905,494	157.36	1.31%
야타카	62,785	9.77	10,541,684	167.90	2.00%
Average	71,239	11.46	12,123,075	167.01	2.30%

○ Reference genome에 mapping하여 raw SNP를 detection. SNP matrix를 작성하고, 필터 기준을 통과한 SNP들을 ‘homozygous/heterozygous/기타’ 유형으로 구분한 결과, 전체 SNP 수는 ‘후지’ 38,222개, ‘키쿠8 후지’는 36,350개가 발견됨(표 7).

표 7. GBS에 의한 SNP detection 통계치

Sample	No. of total SNP	No. of homozygous SNP <sup>a</sup>	No. of heterozygous SNP <sup>b</sup>	No. of rest <sup>c</sup>
Fuji	38,222	25,316	6,046	6,860
아키후	17,111	11,910	2,393	2,808
아키후-39	40,526	26,761	6,513	7,252
아키후-1	29,507	19,805	4,530	5,172
아오후-5	69,947	43,994	12,630	13,323
아오후-13	48,881	31,791	8,320	8,770
Red B.C#2 Fuji	50,261	32,280	8,636	9,345
이와후	23,325	16,145	3,323	3,857
모리호후 3A	91,265	56,846	17,224	17,195
키쿠-8	36,350	24,149	5,753	6,448
마이라 레드	76,466	48,205	13,812	14,449
나가후-2	82,933	52,155	14,940	15,838
나가후-6	56,565	36,519	9,740	10,306
나가후-12	90,889	56,639	17,103	17,147
썬후지	22,886	15,865	3,313	3,708
TAC-114	64,157	40,770	11,461	11,926
야마후	57,651	37,067	9,825	10,759
고을	64,515	41,079	11,511	11,925
라쿠라쿠 후지	61,669	39,646	10,666	11,357
봉촌계 후지	58,334	37,253	10,344	10,737
Yamadani 2gei	53,573	34,753	9,023	9,797
선발 2계 후지	31,592	21,229	4,940	5,423
왕실	25,893	17,585	3,903	4,405
천성	10,430	7,783	1,231	1,416
Spur Fuji	38,669	25,490	6,369	6,810
일야 후지	55,693	35,247	10,008	10,438
히로사키 후지	46,992	30,573	8,056	8,363
Mimaki Spur Fuji	36,170	24,028	5,676	6,466
Jubilee Fuji	39,970	26,042	6,803	7,125
사이라이 후지	27,996	18,997	4,219	4,780
하이랜드 후지	59,020	37,743	10,336	10,941
미야마	49,866	32,312	8,273	9,281
단홍	40,782	26,920	6,539	7,323
한가위	24,109	16,716	3,445	3,948
홍장군	24,099	16,845	3,343	3,911
야타카	38,342	25,392	6,067	6,883

<sup>a</sup>No. of Homozygous SNP: Number of SNP type when detected SNPs from each mapped read to reference are consensus above 90%.

<sup>b</sup>No. of Heterozygous SNP: Number of SNP type when detected SNPs from each mapped read to reference are consensus in 40~60%.

<sup>c</sup>No. of rest: Indistinguishable SNP type whether homozygous or heterozygous.

○ Reference genome에 각 품종의 염기서열을 비교하여 얻어진 SNP를 이용하여 ‘후지’를 기준으로 하고 아조변이 품종 각각을 비교하여 polymorphic SNP를 선별함(표 8).

표 8. ‘후지’ 대비 아조변이 품종별 polymorphic SNP 통계치

Sample	Homozygous polymorphic loci <sup>a</sup>	Heterozygous polymorphic loci <sup>b</sup>	Non-polymorphic loci <sup>c</sup>	Ambiguous loci <sup>d</sup>	Unknown loci <sup>e</sup>	Depth filtered loci <sup>f</sup>
후지 vs 아키후	274	1,860	199,938	7,716	394,081	332,520
후지 vs 아키후-39	267	2,094	240,141	9,427	367,086	317,374
후지 vs 아키후-1	220	1,482	128,979	4,980	452,346	348,382
후지 vs 아오후-5	343	2,109	260,045	10,426	352,504	310,962
후지 vs 아오후-13	277	2,243	288,598	12,528	336,209	296,534
후지 vs Red B.C#2 후지	300	2,195	277,226	11,610	342,854	302,204
후지 vs 이와후	175	1,188	80,463	3,140	514,521	336,902
후지 vs 모리호후 3A	300	2,239	277,703	11,660	342,040	302,447
후지 vs 키쿠-8	306	2,072	255,752	10,197	357,714	310,348
후지 vs 마이라 레드	260	2,069	274,377	11,463	350,693	297,527
후지 vs 나가후-2	303	1,665	162,894	6,276	419,643	345,608
후지 vs 나가후-6	285	2,028	238,443	9,296	367,964	318,373
후지 vs 나가후-12	312	2,000	221,241	8,625	371,197	333,014
후지 vs 썬후지	330	2,216	283,953	12,096	338,324	299,470
후지 vs TAC-114	267	2,364	293,519	12,856	332,536	294,847
후지 vs 야마후	341	1,823	227,192	8,764	379,115	319,154
후지 vs 고을	309	2,050	259,654	10,627	355,496	308,253
후지 vs 라쿠라쿠 후지	265	2,523	300,409	13,492	332,991	286,709
후지 vs 봉촌계 후지	217	2,633	299,888	13,665	333,001	286,985
후지 vs Yamadani 2gei	280	2,377	296,237	13,316	332,689	291,490
후지 vs 선발 2계 후지	287	2,164	272,681	11,153	343,015	307,089
후지 vs 왕실	295	2,275	280,263	11,672	340,334	301,550
후지 vs 천성	288	2,001	252,183	10,288	363,296	308,333
후지 vs Spur Fuji	288	1,677	192,033	7,425	404,206	330,760
후지 vs 일야 후지	284	1,776	206,817	8,006	389,098	330,408
후지 vs 히로사키 후지	306	1,934	233,825	9,125	371,872	319,327
후지 vs Mimaki Spur Fuji	268	1,584	162,647	6,182	427,028	338,680
후지 vs Jubilee Fuji	302	2,247	284,291	11,949	341,076	296,524
후지 vs 사이라이 후지	253	1,697	181,264	7,083	412,987	333,105
후지 vs 하이랜드 후지	317	2,170	267,023	11,046	346,888	308,945
후지 vs 미야마	305	2,207	275,197	11,484	343,438	303,758
후지 vs 단홍	335	1,929	240,068	9,444	366,411	318,202
후지 vs 한가위	275	1,701	167,145	6,319	421,362	339,587
후지 vs 홍장군	301	1,727	161,299	6,284	414,192	352,586
후지 vs 야타카	334	1,910	229,030	9,043	369,060	327,012

<sup>a</sup>Homozygous polymorphic loci: 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 서로 SNP 일 때, homozygous SNP인 경우.

<sup>b</sup>Heterozygous polymorphic loci: 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 서로 SNP 일 때, heterozygous SNP인 경우.

<sup>c</sup>Non-polymorphic loci: 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 동일한 genotype인 경우.

<sup>d</sup>Ambiguous loci: 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 ‘기타’유형으로 인해 polymorphism을 확인하기 어려운 경우.

<sup>e</sup>Unknown loci: 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 ‘결실’로 인해 polymorphism을 확인하기 어려운 경우.

<sup>f</sup>Depth filtered loci: 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 ‘read depth < 3’ 조건을 만족하지 못하는 경우.



### (3) ‘후지’와 아조변이 품종 판별 marker 개발

- InDel은 SNP 보다 marker 전환이 유리하고 사용상 편리하기 때문에 InDel을 이용하여 품종 판별 marker 개발을 수행함.
- Resequencing data로부터 primer를 디자인하기 위한 조건 ① 품종간 통합 InDel matrix에서 비교품종 간에 동일한 InDel loci를 비교하여 polymorphic InDel을 선발, ② reference sequence을 이용하여 InDel position을 target으로 primer 디자인, ③ target loci 이외에 InDel, SNP, unmapped region 등의 발생하지 않도록 고려하기 위해 target 영역을 대상으로 시료간의 염기서열 비교 수행, ④ target 영역을 대상으로 샘플간의 염기서열 비교 과정을 통과한 primer들은 다시 한번 reference genome 서열에 *in-silico* PCR을 수행하여 target 영역에서 한번 관찰되는 primer 선발, ⑤ PCR 수행 후 정확한 확인을 위해 depth가 높은 InDel 영역을 선발할 수 있는 primer 선택함.
- 디자인 된 400개 InDel primer을 이용하여 PCR 수행 후 capillary analysis 방식인 Fragment Analyzer™(Advanced Analytical Technologies INC., USA) 이용하여 확인하여 품종판별 primer 후보군을 선발함(표 9).

표 9. 후지와 아조변이 품종간 InDel 후보군의 primer set (전체 400개중 일부)

	NO. of Chr.	Ref. Position	Primer size	InDel variation	Product size (bp)	5' sequence	3' sequence
Fuji	chr1	3688959	20/21	-18bp	335	AGAAG...	ACGTTTG.....
Fuji	chr2	22706359	21/20	-13bp	320	CACTT...	CATTAGT.....
Fuji	chr14	12498163	20/20	-19bp	270	GCTAA...	CAAATGG.....
Fuji	chr14	28600727	20/20	+10bp	180	TAAGC...	AAAGCCCAT.....
Danhong	chr1	22849696	20/21	-10bp	246	TGATC...	CAATTGCACA.....
Danhong	chr2	23185888	20/20	+11bp	263	TTGAA...	ACCGAATGT.....
Danhong	chr12	1688369	20/20	-8bp	113	GCAA...	TCCATCG.....
Danhong	Chr16	16802518	24/24	-16bp	175	GTACT...	TCTACC.....CTCC
Danhong	Chr6	12693430	24/20	-10bp	334	CATCA...	CAC.....CTTCAA
Danhong	chr6	25332500	24/20	-10bp	249	GCTGT...	CAG.....TGGTCC
Hangawi	chr1	11787003	20/20	+10bp	144	TTAGT...	CAACCCCGG.....
Hangawi	chr4	6854607	20/20	+8bp	304	AAAAA...	TGGACATGGTTAA...
Hangawi	chr14	28148349	21/20	-14bp	323	CCTCC...	AGCGCAAAGTC.....
Hangawi	chr15	27579390	20/22	-15bp	312	ACCTC...	TGATTAGTGTT.....
Benishogun	chr3	270420	20/20	-8bp	121	TCATT...	GAGTGAAGGCATG .....
Benishogun	chr5	15287515	21/20	+12bp	227	CTTTG...	TCCATATCCAAAGT.....
Benishogun	chr8	11455107	20/20	-39bp	256	TGATT...	CATGTTCCGGA.....
Benishogun	chr11	28140553	20/20	-9bp	345	TGTGG...	CATGGGATCA.....
Benishogun	chr14	1251572	20/20	-8bp	225	ACGGT...	AAAGCATC.....
Yataka	chr3	26611809	20/21	-9bp	337	TTTGTT...	TTCACTAAACAAATG...
Yataka	chr8	19092255	21/20	-11bp	288	TGGTC...	GAGACCAAATTTT.....
Yataka	chr8	21944611	22/20	-12bp	223	TACAA...	ATGGAAGTCC.....
Yataka	chr12	12968276	20/20	-9bp	265	TTTGT...	TGTCAGATT.....
Yataka	chr12	22831674	20/20	-23bp	356	AGCGG...	ACGGATCACTT.....
Yataka	chr15	41635173	20/20	-9bp	185	CCTGT...	ACAGATCCA.....
Yataka	Chr1	24407225	21/22	-23bp	251	TTCTC...	GCAATATGTGG.....
Yataka	chr2	8133015	20/21	-24bp	363	TTTGC...	AGCAAGAGAAG.....

○ 후지 아조변이 품종을 판별할 수 있는 후보 primer를 이용하여 PCR 수행 후 capillary analysis 방식인 Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies INC., USA) 이용하여 확인한 결과 ‘후지’, ‘홍장군’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘야타카’를 구별할 수 있는 InDel marker를 개발함(그림 5, 표 10).

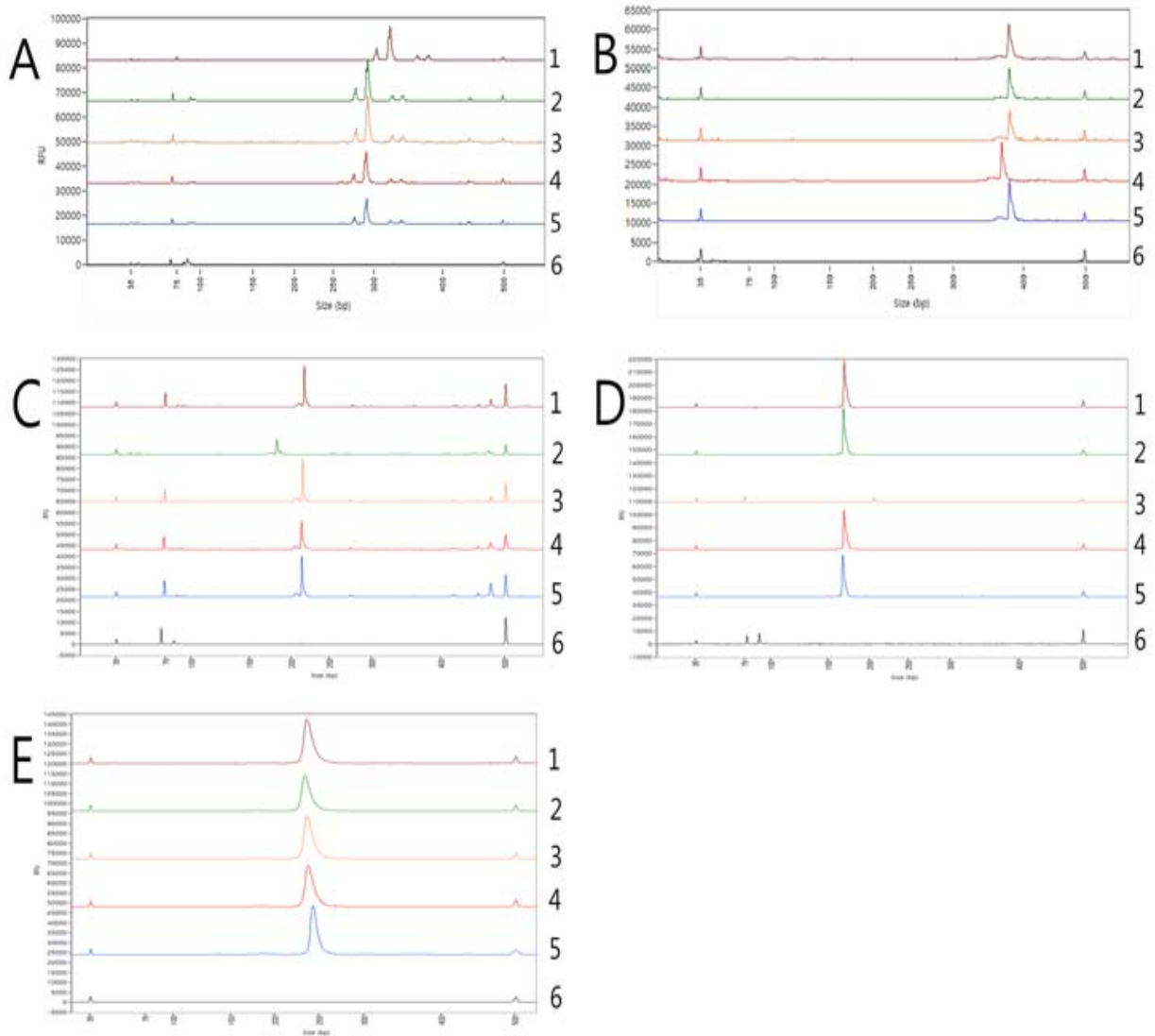


그림 5. Identification of the InDel peak pattern generated by Fragment Analyzer. A: InDel peak pattern for identification of ‘Fuji’, B: InDel peak pattern for identification of ‘Benishogun’, C: InDel peak pattern for identification of ‘Danhong’, D: InDel peak pattern for identification of ‘Hangawi’, E: InDel peak pattern for identification of ‘Yataka’, and 1: ‘Fuji’, 2: ‘Danhong’, 3: ‘Hangawi’, 4: ‘Benishogun’, 5: ‘Yataka’, 6: Negative control.

표 10. 후지와 아조변이 품종 판별을 위한 InDel primer 정보

ID	Classification	No. of Chr.	Ref. position	Primer size	InDel variation	Product Size
Fuji	KNUID16	16	1855749	F: 22mer R: 22mer	20bp Insertion	293bp
Benishogun Fuji	KNUID15	15	40542280	F: 24mer R: 22mer	11bp Deletion	394bp
Danhong Fuji	KNUC	16	-	F: 25mer R: 20mer	4bp Deletion	×
Hangawi Fuji	KNUD	12	-	F: 25mer R: 20mer	5bp Deletion	×
Yataka Fuji	KNUE	15	-	F: 24mer R: 22mer	4bp Insertion	248bp

\*특허 출원.

- 후지와 아조변이 품종간 InDel 후보군의 primer에서 candidate InDel marker가 선발되었고, InDel marker 확인시 resequencing하지 않은 후지 아조변이 품종 ‘Kiku 8’, ‘Mishima’, ‘Miyama’, ‘Ryoka no kisetsu’, ‘Fubrax’, ‘Fidex’ 6개를 추가하여 PCR 수행한 결과 6개 품종 중 3개 품종인 ‘Kiku 8’, ‘Fubrax’, ‘Fidex’ 구분할 수 있는 marker를 선발함.
- PCR 수행 후 KNU#1 marker는 650bp에 band가 없으면 ‘Kiku 8’, ‘Fubrax’, ‘Fidex’ 품종으로 판별되고, KNU#2 marker는 1,200bp에서 band가 생성되면 ‘Fidex’ 품종으로 판별되고, KNU#3 marker는 500bp에서 band가 생성되면 ‘Fubrax’ 품종이 판별됨(그림 6, 표 11).

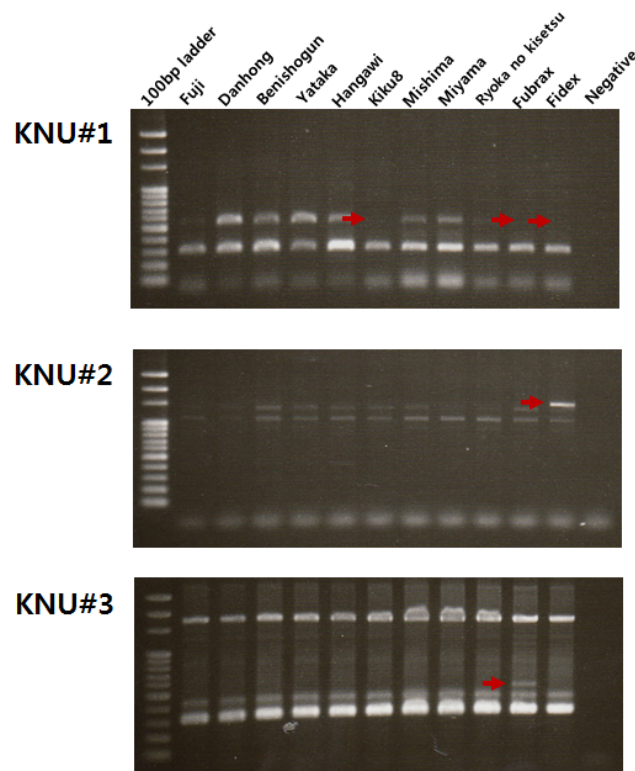


그림 6. Agarose gel electrophoresis of the PCR products.

표 11. 후지 아조변이 품종 판별을 위한 primer 정보

ID	Classification	No. of Chr.	Ref. position	Primer size	Product Size
Kiku 8 Fuj	KNU#1	3	-	F: 25mer R: 22mer	×
Fidex Fuji	KNU#2	5	-	F: 25mer R: 20mer	1,200bp
Fubrax Fuji	KNU#3	15	-	F: 25mer R: 20mer	500bp

\*특히 출원.

#### (4) ‘후지’와 아조변이 품종 판별을 위한 염기서열 비교

- Illumina Hiseq 2000 system을 이용한 resequencing 결과, ‘후지’와 아조변이 품종의 유전체는 17× genome coverage, mapped region이 68% 정도의 데이터 생산.
- 지금까지의 연구에서 resequencing으로 얻어진 InDel을 이용하여 아조변이 품종 판별 marker를 개발할 수 있는 확률은 매우 낮음(8000개의 InDel에서 1개 InDel marker 개발).
- 이러한 원인이 고도의 이형접합성 작물인 사과와 resequencing 결과 genome coverage가 낮다고 판단되어 분석된 resequencing data를 효율적으로 이용하기 위해 cloning하여 품종간 염기서열 비교함.
- ‘후지’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’, ‘Golden Delicious’에 본 실험에 사용된 일부 InDel primer를 이용하여 PCR 분석 후 4% Nusieve 3:1 agarose에서 전기영동하여, ‘Golden Delicious’의 PCR product pattern이 예상과 다르게 나타나는 것을 선발하여 T-blunt vector에 cloning 후 염기서열 분석함.
- ‘한가위’에서 8bp insertion 변이가 있는 InDel 영역(chr. 4, reference position 6854607)을 target으로 PCR을 수행한 결과, ‘후지’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’, ‘Golden Delicious’에서 polymorphic bands가 확인되어 cloning하여 염기서열 비교함.
- ‘한가위’에서 cloning된 두 개의 clone(1번· 2번 clone) 염기서열을 비교해 보면 1번 clone과 2번 clone에서 8bp 차이가 나며 나머지 품종 ‘후지’, ‘단홍’, ‘홍장군’, ‘야타카’도 동일한 분석결과를 나타냄. 이형접합성 작물인 사과와 유전적 특성상 두 개의 allele이 PCR 분석시 모두 증폭된 것으로 사료됨.
- NCBI에 보고된 reference genome ‘Golden Delicious’의 chr. 4, reference position 6854607 염기서열과 cloning한 ‘Golden Delicious’ 염기서열은 일치하나, 일부 InDel 영역에서는 SNP나 InDel이 발견됨(그림 7).







(6) 품종 판별 marker 적용성 평가 및 품종 혼입비율의 검출한계 설정

○ 아조변이 품종 판별 marker 적용성 평가는 사과의 유전적인 특성 때문에 고려될 사항이며, 개발된 marker의 검정 과정임. 경북, 경남, 충북에서 수집한 ‘Kiku 8’를 이용하여 PCR 수행 후 결과 비교시 동일한 band pattern이 확인됨(그림 9).

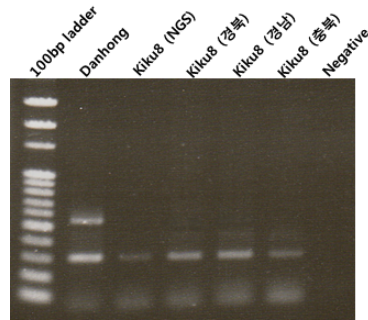


그림 9. KNU#1 marker를 이용한 ‘Kiku 8’ PCR 결과

○ 묘목업체에서 품종이 혼입될 경우는 그 수가 많기 때문에 개체별로 검증하려면 비용과 시간이 많이 소요된다. ‘Fidex’ 품종을 선발할 수 있는 KNU#2 marker를 이용하여 혼입비율을 ‘Fubrax’ vs ‘Fidex’ 1:0, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 0:1 설정하여 conventional PCR을 수행한 결과 ‘Fubrax’ 품종 30개에 ‘Fidex’ 품종이 1개 혼합되어 있으면 검출되고, ‘Fubrax’ 품종을 선발할 수 있는 KNU#3 marker를 이용하여 혼입비율을 ‘Fidex’ vs ‘Fubrax’ 1:0, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 0:1 설정하여 conventional PCR을 수행한 결과 ‘Fidex’ 품종 20개에 ‘Fubrax’ 품종이 1개 혼합되어 있으면 검출됨. 따라서, ‘Fubrax’ 품종과 ‘Fidex’ 품종의 혼입시 20개체를 한 단위로 하여 KNU#2와 KNU#3 marker로 PCR 수행하여 특이 밴드가 모두 나타나면 품종이 혼입된 것으로 판단함(그림 10).

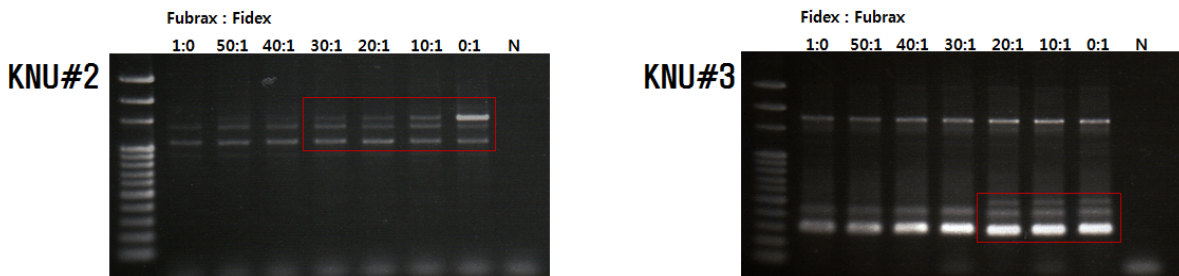


그림 10. KNU#2와 KNU#3 marker를 이용한 PCR 검출한계.

**(7) ‘후지’와 아조변이 품종 판별 시스템화**

- 사과 품종들이 혼용되어 있을 경우 step 1의 marker를 사용하여 PCR 분석 후 증폭된 band가 있으면 ‘후지’와 후지 아조변이 품종은 모두 ‘후지’ 품종으로 구분 됨.
- ‘후지’로 판별된 품종으로 step 2의 marker를 이용하여 PCR 분석 후 증폭된 band의 유무에 따라서 ‘후지’ 품종으로 구분되고, 후지 아조변이 품종인 ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’, ‘키쿠8’, ‘피텍스’, ‘후브락스’ 품종으로 구분 됨.

**step 1.**

SCAR marker 이용 PCR

- agarose gel로 band 유무 확인
- 후지와 아조변이 품종은 후지로 판명

SCAR marker	후지	단홍	한가위	홍장군	야타카	키쿠8	피텍스	후브락스
A330_424	+	+	+	+	+	+	+	+
Ak14_575	+	+	+	+	+	+	+	+
AO04_711	+	+	+	+	+	+	+	+
AO04_779	+	+	+	+	+	+	+	+

+ PCR 분석 후 증폭된 밴드 있음.

※분자표지를 이용한 사과 품종 판별 매뉴얼. 농촌진흥청국립원예특작과학원

**step 2.**

InDel marker 이용 PCR

- Fragment analyzer<sup>X</sup> 이용하여 peak pattern 확인, agarose gel<sup>Y</sup>로 band 유무 확인
- 후지와 아조변이 품종 구분 가능

InDel marker	후지	단홍	한가위	홍장군	야타카	키쿠8	피텍스	후브락스
KNUID16 <sup>X</sup>	+(293)	-	-	-	-	-	-	-
KNUID15 <sup>X</sup>	-	-	-	+(394)	-	-	-	-
KNUC <sup>X</sup>	-	+(190)	-	-	-	-	-	-
KNUD <sup>X</sup>	+(170)	+(170)	-	+(170)	+(170)	+(170)	+(170)	+(170)
KNUE <sup>X</sup>	-	-	-	-	+(249)	-	-	-
KNU#1 <sup>Y</sup>	+(650)	+(650)	+(650)	+(650)	+(650)	-	-	-
KNU#2 <sup>Y</sup>	-	-	-	-	-	-	+(1200)	-
KNU#3 <sup>Y</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+(500)

+ PCR 분석 후 증폭된 밴드 있음.

() peak size.



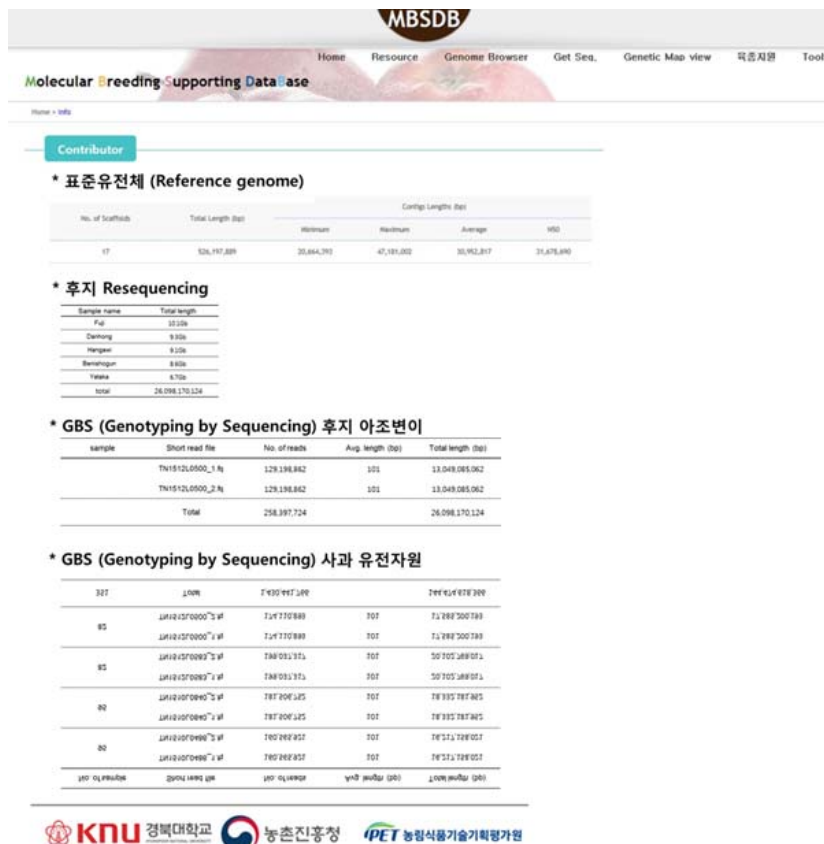
Table 12. 사과 품종 판별용 SCAR primer 염기서열

marker	염기서열 (5'→3')	PCR 산물 크기(bp)
A330_424	F : GATATTTCCGTGTTTTTCGGACTAC R : GGTGGTTTCCCTAAGTAGAGCCACA	424
AK14_575	F : CCCGCTACACCCATTTTGTGTACGTGT R : TAGCCAAAGGACTCCACTATAAGGAGG	575
AO04_711	F : AAGTCCGCTCACCAGTAACATAAAA R : AAGTCCGCTCCAGATAAAAGGAGT	711
AO04_779	F : AAGTCCGCTCAAATCCACCTCAAG R : AAGTCCGCTCTACAGACTGTTCAAT	779

※SCAR marker : 분자표지를 이용한 사과 품종 판별 매뉴얼. 농촌진흥청국립원예특작과학원

(8) 사과 품종 판별 marker 정보, DB 구축

○ 후지와 후지아조변이 품종의 resequencing과 genotyping by sequencing 분석으로 도출된 sequencing 결과를 정리하여 DB를 구축하였음. DB구축시 타기관에서 수행중인 과제에서 도출된 사과 유전체에 대한 정보도 이용하였음. 사과 유전체 관련 연구자들에게 사과 연구와 관련된 중요한 정보를 제공하는 토대를 마련함.



사과 유전체 DB

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
성과목표	개발내용	달성도	
사과 ‘후지’ 아조변이 품종 판별 marker 개발	1) ‘후지’와 아조변이 4품종 ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’로 resequencing 수행하여 InDel과 SNP 탐색 2) ‘후지’와 아조변이 35품종으로 Genotype by Sequencing 분석으로 InDel과 SNP 선별 3) InDel marker 개발 확률이 매우 낮은 원인 분석과 효율적으로 resequencing data를 활용하기 위해 cloning 수행 4) Resequencing data로부터 ‘후지’, ‘단홍’, ‘한가위’, ‘홍장군’, ‘야타카’ 및 아조변이 재배품종 3품종을 구분할 수 있는 marker 개발	100%	
‘후지’와 아조변이 품종 판별 시스템화	SCAR marker와 InDel marker 이용하여 품종 판별 시스템 구축	100%	
유전체 재분석을 이용한 사과 유전자원의 아조변이 탐색 시스템 구축	아조변이를 탐색할 수 있는 marker의 개발로 아조변이 품종을 판별할 수 있는 시스템이 구축	100%	
4-2. 관련분야 기여도			
○ ‘후지’와 아조변이 품종의 유전체 분석으로 확보된 품종 판별 marker는 과수 묘목 생산유통과 과실 유통 과정에서 품종의 혼입을 감별하므로 품질관리 원천 기술 확보가 가능			

#### 5. 연구결과의 활용계획

		코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전체 연구 결과를 활용한 사과 분자육종 효율 증진에 활용</li> <li>○ Resequencing을 통하여 사과 아조변이의 주요 유전적 특성을 이해함으로써 그동안 품종 판별이 불가능하거나 어려웠던 아조변이 품종 판별 기술 개발이 가능해짐</li> <li>○ 식물 유전체 염기서열 결과를 활용하여 과수 분자육종 도입의 가시적 성과를 보여줌으로써 품종 육성 연구를 활발히 하는데 기여 할 것으로 기대됨</li> <li>○ 사과 아조변이에 대한 유전체 정보의 DB 및 품종 판별 marker 기술은 PCR, 전기영동 장치로도 분석할 수 있어 기술이전을 통해 기업, 기관, 연구시설에서 직접 분석이 가능할 것으로 판단됨</li> <li>○ 품종 분석을 의뢰하고자하는 묘목생산업체나 농업인들은 이러한 기관을 통해 품종분석이 가능함</li> <li>○ 추후에도, marker를 이용한 품종 판별이 가능한 목록외에 현장 적용성 검증중인 계통과 육성된 새품종을 추가하여 판별 가능한 품종 수를 확대할 필요가 있으며 주요 과종의 대목품종에 대한 판별 marker도 개발할 필요가 있음</li> </ul>			

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ ‘Golden Delicious’ 사과 유전체 해독</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2010년 전체 사과 유전체의 91.3%에 해당하는 총 contig 603.9Mb가 해독되었고, 이로써 사과 유전체의 크기는 약 742.3Mb로 추정됨</li> <li>- 2017년 미국, 프랑스, 남아프리카공화국, 이탈리아 등이 공동으로 DH(double haploid) ‘Golden Delicious’를 이용하여 contig들을 scaffold하여 whole-genome shotgun을 작성하여 703Mb 염기서열 정보 제공</li> </ul>		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 경북대학교 연구실 안전관리규정에 의하여 연구실안전 확보</p> <p>연구실 안전환경 조성에 관한 법률 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실 안전점검 및 정밀 안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진실시, 보험가입 등)에 의하여 연구실안전 확보</p>		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Analysis of 'Fuji' apple somatic variants from next-generation sequencing	경북대학교	교신저자	Genetics and Molecular Research		2016.08.12	단독사사	SCI
2	특허	후지 사과 품종의 아조 변이 관별용 조성물	경북대학교	발명자	대한민국		2016.10.28	단독사사	출원
3	특허	후지 사과 품종의 아조 변이 관별용 조성물	경북대학교	발명자	대한민국		2017.10.30	단독사사	출원
4	특허	후지 사과 품종의 아조 변이 관별용 조성물	경북대학교	발명자	대한민국		2017.11.10	단독사사	등록

## 11. 기타사항

코드번호		D-13
○		

## 12. 참고문헌

코드번호		D-14
Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagné D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.). <i>Nature genetics</i> . 42(10):833-9		
Liu B1, Wang Y, Zhai W, Deng J, Wang H, Cui Y, Cheng F, Wang X, Wu J. 2013. Development of InDel markers for <i>Brassica rapa</i> based on whole-genome re-sequencing. <i>Theoretical and applied genetics</i> . 126(1):231-9		

Zhao G, Dai H, Chang L, Yue M, Sun H, He P, Zhang Z. 2010. Isolation of two novel complete Ty1-copia retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *Malus domestica* cv. Fuji. *Tree Genetics & Genomes*. 6(1):149-159

Lü Y, Cui X, Li R, Huang P, Zong J, Yao D, Li G, Zhang D, Yuan Z. 2015. Development of genome-wide insertion markers in rice based on graphic pipeline platform. *Journal of integrative plant biology*. Doi: 10.1111 /jipb.12354

Lijavetzky D, Cabezas J A, Ibáñez A, Rodríguez V, Martínez-Zapater J M. 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics*. 8:424

Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S. 2012. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. *International journal of plant genomics*. Doi: 10. 1155/2012/728398

Kumar S, Banks T W, Cloutier S. 2012. SNP Discovery through Next-Generation Sequencing and Its Applications. *International journal of plant genomics*. doi:10.1155/2012/831460

Kanesaki Y, Shiwa Y, Tajima N, Suzuki M, Watanabe S, Sato N, Ikeuchi M, Yoshikawa H. 2012. Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA research*. 19(1):67-79

Cox M P, Peterson D A, Biggs P J. 2010. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 11:485

Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 25(14):1754-60

Li H1, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25(16):2078-9

Kim J E, Oh S K, Lee J H, Lee B M, Jo S H. 2014. Genome-Wide SNP Calling Using Next Generation Sequencing Data in Tomato. *Molecules and cells*. 37(1):36-42

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B C, Remm M, Rozen S G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. 40(15):e115

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*. 32(3):314-31

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms

amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*. 18(22):6531-5

Vos P1, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*. 23(21):4407-14

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*. 17(16):6463-71

Varsheny R K, Nayak S N, May G D, Jackson S A. 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*. 27(9):522-530

Gao Q, Yue G, Li W, Wang J, Xu J, Yin Y (2012) Recent progress using high-throughput sequencing technologies in plant molecular breeding. *Journal of Integrative Plant Biology*. 54: 215- 227

You, F. M., Huo, N., Gu, Y. Q., Luo, M.-c., Ma, Y., Hane, D., et al. (2008). BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 253. doi: 10.1186/1471-2105-9-253

조강희, 신일섭, 김세희, 김대현, 권순일, 김정희, 이정우, 박종택 (2014) 분자표지를 이용한 사과 품종 판별 매뉴얼. 국립원예특작과학원

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.