

수밀력 우수 꿀벌 계통 판별을 위한 계통 특이 분자마커 개발

김혜경* · 이명렬 · 이만영 · 최용수 · 김동원 · 강아랑
 농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Identification of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Marker for the Detection of Enhanced Honey Production in Hoenybee

Hye-Kyung Kim*, Myeong-Lyeol Lee, Man-Young Lee, Yong-Soo Choi,
 Dongwon Kim and Ah Rang Kang

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

(Received 6 September 2017; Revised 26 September 2017; Accepted 26 September 2017)

Abstract

Honeybees (*Apis mellifera*) are common pollinators and important insects studied in agriculture, ecology and basic research. Recently, RDA (Rural Development Administration) and YIRI (Yecheon-gun Industrial Insect Research Institute) have been breeding a triple crossbred honey bee named Jangwon, which have the ability to produce superior quality honey. In this study, we identified a single nucleotide polymorphism (SNP) marker in the genome of Jangwon honeybee, particularly, in the paternal line (D line). Initially, we performed Sequence-Based Genotyping (SBG) using the Illumina HiSeq 2500 in 5 honeybee inbred lines; A, C, D, E, and F; and obtained 1,029 SNPs. Seventeen SNPs for each inbred line were generated and selected after further filtering of the SNP dataset. The 17 SNP markers validated by performing TaqMan probe-based real-time PCR and genotyping analysis was conducted. Genotyping analysis of the 5 honeybee inbred lines and one hybrid line, D×F, revealed that one set of SNP marker, AmD9, precisely discriminated the inbred line D from the others. Our results suggest that the identified SNP marker, AmD9, is successful in distinguishing the inbred honeybee lines D, and can be directly used for genotyping and breeding applications.

Key words: *Apis mellifera*, Jangwon honeybee, Real-time PCR, SNP, SGB

서 론

서양종꿀벌(*Apis mellifera* L.)은 벌꿀, 프로폴리스,

로얄젤리, 봉독, 화분, 밀랍 등 다양한 양봉산물을 생산하는 산업화된 산업곤충 중 하나이다. 우리나라에서 서양종꿀벌이 사육되기 시작한 것은 1900년대 초

*Corresponding author. E-mail: hyebyeong@korea.kr

유럽산 서양종꿀벌이 도입된 이후부터이며, 현재는 약 190만 봉군이 사육되고 있는 것으로 조사되고 있다(농림수산식품부, 2015). 그러나 지금까지 우리나라에서 사육되는 서양종 꿀벌은 지리적 여건에 따른 계통 간의 빈번한 반복교잡으로 인해 잡종화 현상이 가속화 되고 있으며, 이는 곧 양봉산물 생산성 저하로 이어져 이를 극복 할 수 있는 방안이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

최근 국내에서는 국내 고유 우수 꿀벌계통 선발 및 육성을 위한 오랜 연구결과 끝에 국내 최초로 6개 꿀벌 계통이 육성되었으며(이 등, 2014; Kim *et al.*, 2015), 이를 토대로 수밀력 우수 꿀벌 계통인 ‘장원벌’ 이 육성된바 있다(이 등, 2014). 이 등(2014)에 따르면, ‘장원벌’ 은 동계교배(Inbred-hybrid)법을 이용한 삼원교배종 꿀벌이며, 타 계통에 비해 평균 수밀량이 30% 이상 높다고 밝혔다. 이 후 장원벌은 꿀벌로써는 처음으로 정부장려품종으로 지정되어(2014년), 전국 5개 지역을 대상으로 한 지역적응시험에서 그 우수성이 밝혀지기도 하였다(김 등, 2015).

육종에 사용되는 기존의 분자마커로는 RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism) 등이 있다(Vos *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2001; Rortais *et al.*, 2011). 이들 마커들은 대부분 게놈 염기서열간의 다형성(polymorphism)을 PCR을 통해 확인하는 방법으로 빈번하게 이용되고 있으나, 계통간의 변이가 미미한 꿀벌의 경우 이를 통한 계통간의 다형성 차이를 확인하는데 많은 어려움이 따르고 있다. 최근, 집단유전학(population genetics) 분야에서는 생물집단의 유전적 구조와 다양성 연구를 위해 microsatellite 및 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 유전형 마커(Genotyping Marker) 등이 개발되어 계통 판별 및 육종에 활용되고 있다(Appleby *et al.*, 2009). 더욱이 최근 들어 차세대 염기서열분석(NGS, next-generation sequencing) 기술이 발달함에 따라 염기서열 분석의 비용과 시간이 크게 감소되어 이들 유전형 마커 개발의 효율성이 더욱 높아져 다양한 활용이 기대

되고 있는 상황이다.

앞서 밝힌바와 같이 국내 최초로 육성된 수밀력 우수 꿀벌 계통인 ‘장원벌’ 은 AC우×D♂ 삼원교배종으로, 지역적응 시험을 통해 국내 양봉농가에 보급되고 있다. 그러나 장원벌이 가지고 있는 삼원교배종 특성은 유전정보가 고정되어 있지 않은 한계를 가지고 있어, 이를 직접적으로 구분할 수 있는 유전자형 마커를 확립하는데 많은 어려움을 겪고 있다. 최근 수행된 선행연구에서는, 차세대염기서열 분석을 이용해 국내에서 육성된 6종의 꿀벌 계통에 대한 9종의 microsatellite 마커가 개발되었으나(Kim 등, 2015), 이를 장원벌 판별 마커로 이용하는 데에는 한계를 보이고 있다. 이에 본 연구에서는 microsatellite 마커에 비해 유전적 변별력이 더욱 높을 것으로 보이는 SNP 마커를 이용해 장원벌 계통 특이 마커를 개발하고자 하였다. 그러나 앞서 기술한 장원벌의 삼원교배종 특성으로 인해, 이를 직접적으로 판별하는 데에는 기술적인 어려움이 있어 유전정보가 고정되어있는 장원벌 부계 계통인 D 계통에 대한 계통판별 마커를 개발하고자 하였다. 꿀벌 계통 판별을 위한 SNP 마커 개발을 위해 본 연구에서는 생물 유전형 분석기법인 SGB(Sequence Based Genotyping) 분석을 이용하였으며(Elshire *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2012), 이를 통해 염기서열 분석 및 유전형 분석을 수행하여 D 계통 특이적인 SNP 마커 1종을 개발하였고, 이를 통해 장원벌 계통 판별 및 육종에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

꿀벌 시료

계통 특이적인 SNP 마커 개발을 위한 GBS 분석은 국립농업과학원 시험양봉장에서 보존·육성중인 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) A, C, D, E, F 계통 96 개체에 대해 분석 되었으며, 개발된 SNP 마커에 대한 validation은 마찬가지로 국립농업과학원 시험양봉장에서 보존·육성 중인 서양종꿀벌 원종 계통인 A, C, D, E, F 및 교배조합 계통인 F×D 일벌 시료를 사용하였다.

Table 1. Summary of *Apis mellifera* genome assembly

Sample	No. of reads	Total bases (Mb)	Q30 ^a (%)	GC Ratio (%)
1	209,815,904	21,191	84.69	53.56
2	213,383,387	21,551	85.84	53.48
Total	423,199,291	42,743	85.27	

^aEquivalent to the probability of an incorrect base call 1 in 1000 times

Table 2. Characteristics of single nucleotide polymorphism selected from *Apis mellifera* reared in Korea

No.	Sequence id	Line					Coverage	Genome annotation	Query seq. length
		A	C	D	E	F			
1	AmD1	G	G	A	G	G	192	<i>Apis cerana</i> neural cell adhesion molecule 2	94
2	AmD2	C	C	T	C	C	192	<i>Apis mellifera</i> nuclear factor of activated T-cells 5	94
3	AmD3	G	G	A	G	G	192	<i>Apis mellifera</i> titin-like (LOC551319), transcript variant X3	94
4	AmD4	G	G	A	G	G	192	<i>Apis mellifera</i> probable G-protein coupled receptor B0563.6	94
5	AmD5	C	C	T	C	C	192	<i>Apis mellifera</i> odorant receptor 4-like (LOC100576940)	94
6	AmD6	C	C	T	C	C	192	<i>Apis mellifera</i> protein kinase C-binding protein NELL1-like	94
7	AmD7	C	C	T	C	C	192	<i>Apis mellifera</i> teneurin-a (LOC411155), transcript variant X7	94
8	AmD8	C	C	T	C	C	192	<i>Apis mellifera</i> guanine nucleotide dissociation stimulator	94
9	AmD9	C	C	T	C	C	192	<i>Apis mellifera</i> UPF0489 protein C5orf22 homolog	94
10	AmD10	G	G	A	G	G	192	<i>Apis mellifera</i> gamma-aminobutyric acid type B receptor	94
11	AmD11	C	C	T	C	C	192	<i>Apis cerana</i> carboxylesterase 1C-like	94
12	AmD12	C	C	T	C	C	192	<i>Apis cerana</i> MAGUK p55 subfamily member 7	94
13	AmD13	A	A	G	A	A	192	<i>Apis mellifera</i> glutamate receptor ionotropic, kainate 2	94
14	AmD14	A	A	G	A	A	192	<i>Apis mellifera</i> transformation domain-associated protein	94
15	AmD15	A	A	G	A	A	190	<i>Apis mellifera</i> serine/threonine-protein kinase 17A-like	94
16	AmD16	C	C	T	C	C	184	<i>Apis mellifera</i> cyclin-T	94
17	AmD17	G	G	A	G	G	182	<i>Apis mellifera</i> disco-interacting protein 2	94

Total genomic DNA의 추출

GBS 분석을 위한 library 제작을 위해 서양종 꿀벌 (*Apis mellifera*) A, C, D, E, F 계통, 96개체로 부터 Total genomic DNA를 분리하였다. Total genomic DNA는 DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였으며, 추출된 genomic DNA는 분광광도계(spectrophotometer) (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용해 정량하였고, 정량된 genomic DNA는 50ng/μl 의 농도가 되도록 희석하여 분석에 이용하였다.

Sequence Based Genotyping library 제작 및 Hiseq 2500(illumina) sequencing

Genomic DNA는 SGB 분석을 위한 library 제작에 이용되었다. 본 연구에서는 *Pst*I-MseI sequencing library

를 제작하였으며, 이를 위해 SBG 100-Kit v2.0 (KeyGene N.V., Wageningen, the Netherlands)가 사용되었다. library 제작에 사용된 genomic DNA는 시료 당 250ng(50ng/μl)이며, 총 2개의 세트에 library가 제작되었다. genomic DNA는 각 개체의 동일한 위치의 염기 서열 비교를 위해 *Pst*I과 *Mse*I 제한 효소를 처리하였으며, 제한효소 반응은 37°C, 2시간 동안 수행되었다. 제한효소 처리된 시료는 Adapter ligation 및 PCR 증폭을 통해 library를 증폭시켰으며, 이때 사용된 Adapter는 universal P7 *Mse*I adapter(top oligo: 5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAG-3' -; bottom oligo: 5' -TACTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3' -NH₂)로, 37°C, 3시간동안 ligation 반응이 이루어졌다. Adaptor ligation이 완료된 시료는 Library 증폭을 위해 1/10 희석하여 PCR 증폭반응을 수행하였으며, 이때 사용된 primer는 KeyGene사에서 제공하는 *Mse*I primer와 *Pst*I

Table 3. Selected marker for the determination of D line in *Apis mellifera* reared in Korea

Marker	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Probes
AmD1	TTCTGCAGCGGGTACTGTT	GAAGCCACGCCACGAAA	VIC: AGCGAGCTATCCCCTC FAM: AGCGAGCTACCCCCTC
AmD2	GCGTTTGCTGCAGGAACT	TGGAACCTCACTGGGAATGC	VIC: CCTGTGCGGGTAGAACA FAM: TTGTGCGGCAGAACA
AmD3	ACACGTTGATCCGCACACT	CCACGGAGGAACGCTTCAT	VIC: CTGGTTGCTCTTTCCCAA FAM: TGGTTGCTCTTTCCCAA
AmD4	AGAGGGCAGGATAAGCAAAGTG	CGTGAACGGTGCCATTTGC	VIC: TTTTGGCACTCACACTC FAM: TTGGCACTCGCACTC
AmD5	GCAGCTGACGTGAGTGTGTA	CCCTCTTATTGCGTTCAGTGAGAA	VIC: CGTGCTCTCTTCTCGA FAM: CGTGCTCTCTCTCGA
AmD6	GCCGAAGAGGTTTTCCAATC	CAGGTGCTGAGGGAGATTACAG	VIC: TGAGCTGCTTGTTCCT FAM: AGCTGCTCGTTCCT
AmD7	GCGTTGTTCCCGGATTTT	CTTCTTGCATGGGTCCTCTGA	VIC: ACCGGTCATCAATTC FAM: CCGGTCACCAATTC
AmD8	GGTTCCGCTCGAACGC	GCCAGCATGGATAACCAAATCTC	VIC: TCGAGGCTGTTCTCGT FAM: TCGAGGCTATTCTCGT
AmD9	CGATGTTGGGACAGAAAGAATGGAT	CCTGTGGTAGCTTCAACTGTTGATATA	VIC: CTGGCCCTATACAAAC FAM: TGGCCCTGTACAAAC
AmD10	GCGAGGTAGTAGCATTCAAAGTT	GCCCAAATGCTCTGTGACAAA	VIC: CCAATGGAGTTTGGCC FAM: CAATGGAGCTTTGGCC

Table 4. Genotype analysis of AmD6 and AmD9 marker from *Apis mellifera* reared in Korea

Marker	Genotype	Honey bee breeding lines					
		A	C	D	E	F	FD
AmD6	FAM	9	10	0	10	9	8
	VIC	0	0	6	0	0	0
	FAM/VIC	1	0	4	0	0	2
	Accuracy rate (%)	-	-	60	-	-	-
AmD9	FAM	8	10	0	10	10	1
	VIC	0	0	10	0	0	0
	FAM/VIC	2	0	0	0	0	9
	Accuracy rate (%)	-	-	100	-	-	-

Primer이다. 반응 조건은 72°C 2분간 반응 시킨 후 94°C 30초, 67°C 2분, 72°C 2분간 13 cycles을 반복하고, 다시 30초, 58°C 2분, 72°C 2분간 37 cycles을 반복하였다. 제작된 library는 Qiagen MinElute column으로 정제한 후 flowcell에 부착하여 cluster를 합성하였으며, HiSeq 2500(illumina)을 통한 single end 서열분석법을 이용해 101 cycles의 조건으로 염기서열을 분석하였다. 이후 SBG clustering, read-mapping 및 SNP-calling 등은 KeyGene사에서 제공하는 SBG bioinformatics pipeline을 통해 수행되었다.

Single nucleotide polymorphism (SNP) marker 제작 및 Genotyping

분석된 SNP data는 마커로서 효율성을 높이기 위해 depth(read 수), variation call rate(frequency) 등을 고려하여 filtering 하였으며, 이를 통해 유효한 SNP 마커를 포함하는 sequence 17종을 선발하였다(Table 2). 선발된 sequence는 TaqMan probe 방식의 마커를 제작하였으며, 이를 위해 Primer Express 프로그램(ABI)을 이용해 locus 특이적 PCR primer 및 allele 특이적 probe를 디자인 하였다. 이때, D계통 allele 특이적 probe는 5에 FAM 형광을 표지하였고, 그렇지 않은 allele probe는 VIC 형

광을 표지하였으며, multicomponent plot을 이용해 genotyping 분석을 수행하였다. 제작된 SNP 마커 및 프로브는 꿀벌 계통 A, C, D, E, F, F×D에 대한 일벌 시료로부터 genotype 분석을 수행하였다. 먼저 각각의 꿀벌 계통 일벌 10마리에 대한 genomic DNA를 DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 분리한 다음, SNP 마커 primer 및 probe를 이용해 RT-PCR를 수행하였다. RT-PCR 반응은 ABI 7500 real time PCR machine (Applied Biosystems)을 이용하여 수행되었으며, 2x Quantinova PCR master mix (Qiagen) 12.5ul, 40x primer/probe mix (Applied Biosystems)를 0.675ul 넣은 후 각 꿀벌에서 추출한 genomic DNA를 5ul (약 50ng)넣고 95도에서 10분간 반응시킨 후 95도 15초, 60도 1분으로 40 cycles 반응하고 각 cycle마다 FAM과 VIC의 형광수치를 확인하였다.

결과 및 고찰

Illumina sequencing

본 연구에서는 ‘장원벌’ 부계인 D계통 특이적인 SNP 마커 개발을 위해 SBG 분석이 수행되었다. SBG 분석은 국내에서 육성중인 5개 꿀벌 계통 A, C, D, E, F에 대해 이루어졌으며, 일벌 96개 개체를 2개의 세트로 나누어 수행하였다. 분석 결과 각각 209,815,904, 213,383,387의 read가 분석 되었으며, 총 423,199,291의 read, 42 GB의 assemble sequence를 확보할 수 있었다. GC contents는 각각 53.56%, 53.48%인 것으로 확인 되었으며, 분석 품질을 확인 할 수 있는 Q30(base가 잘못 읽혀질 가능성이 1/1000)은 각각 84.69, 85.84으로 비교적 높은 것으로 확인되었다. Sequence 결과를 토대로 SBG bioinformatics pipeline을 통한 SNP-calling 및 annotation 분석을 수행 하였으며, 그 결과 D 계통 특이적인 SNP loci를 가지는 1,029개 sequence는 선발할 수 있었다.

SNP 마커 제작 및 validation

선발된 1,029개 sequence는 annotation 결과 및

depth(read 수), variation call rate(frequency) 등을 고려하여 추가적으로 17개의 sequence를 선발 하였다(Tbale 2). 선발된 sequence는 D 계통 특이적인 SNP loci를 포함하고 있으며, 180 이상의 높은 coverage를 보이고 있었다. 이들 sequence에 대한 genome annotation 결과에 따르면, 해당 sequence는 signal transduction 및 odorant receptor, membrane integral component 등과 관련된 유전자를 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 이후 꿀벌 계통의 표현형(phenotype)과 밀접한 관련이 있을 것이라 생각하고 관련 연구를 지속시킬 필요가 있어 보인다.

선발된 sequence는 각각의 SNP loci를 포함하는 영역 특이적인 마커를 제작하는데 사용되었으며, 본 연구에서는 TaqMan probe를 이용한 마커가 제작 되었다. 특히 D계통 특이 allele을 가지는 염기서열에는 VIC 형광(Green), 그렇지 않은 염기서열은 FAM 형광(Blue)을 표지하였다. 제작된 RT-PCR primer 및 마커는 꿀벌 genomic DNA에 대한 RT-PCR 반응을 수행하였고, 반응성이 우수한 10개 primer 마커를 추가로 선발 하였다(Table 3).

Genotyping 분석

선발된 10개의 SNP 마커가 장원벌 수벌계통(D)을 특이적으로 판별 할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 각각의 primer에 대한 genotyping을 A, C, D, F 원종 계통 및 F×D 교배 계통에 대해 수행하였다. 그 결과, RT-PCR 반응성이 높으면서 D 계통을 특이적으로 검출할 수 있을 것으로 판단되는 AmD6, AmD9 2개의 후보를 선발하였고, 최종적으로 AmD9을 장원벌 수벌계통 (D) 특이마커로 선발하였으며(Fig. 1, Table 4), 이에 대한 결과는 다음과 같다. 먼저, AmD6 마커의 경우, D계통 특이 allele을 가지는 probe는 VIC 형광이 표지되어 있었고 그렇지 않은 allele을 가지는 probe는 FAM 형광이 표지되어 있었다. genotyping 결과 A, C, E, F 계통에 대해서는 VIC 형광이 전혀 검출되지 않은 것으로 나타났으나, D 계통의 경우 10개 꿀벌 개체 중 6개 개체에서 VIC 형광이 검출되었다. 그러나 D 계통 중 나머지 4 개체에서는 FAM/VIC 형광이 동시

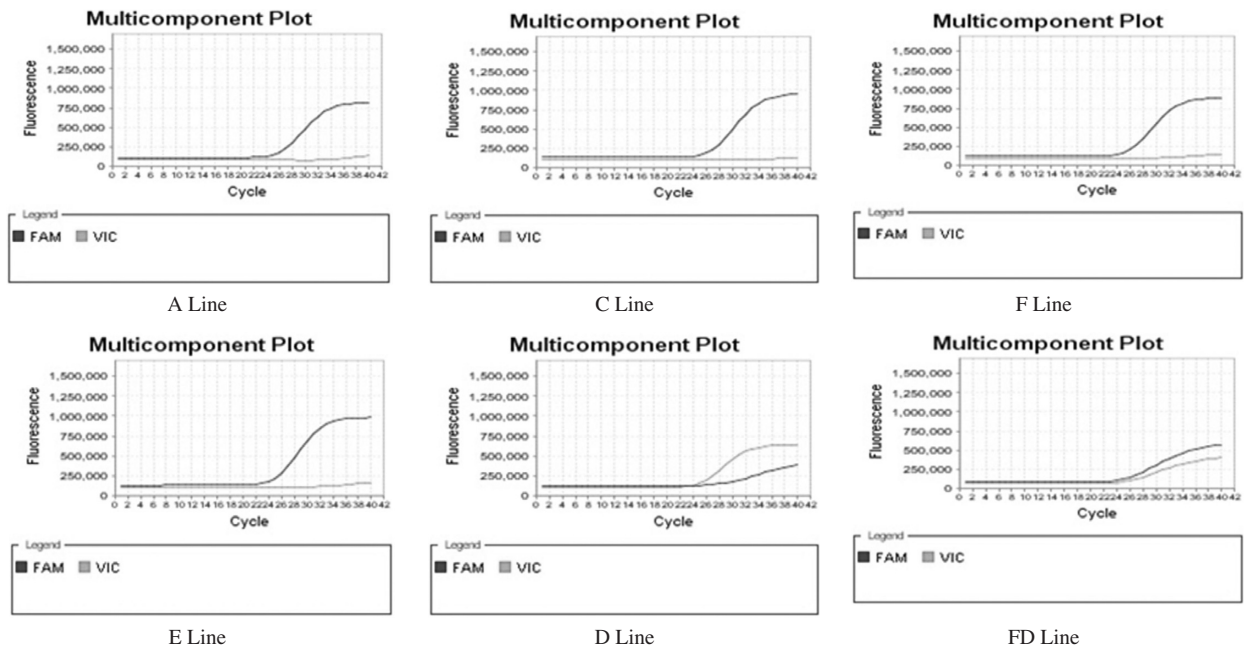


Fig. 1. Multi-component plot of the real-time PCR result of *Apis mellifera* reared in Korea using Amd9 marker.

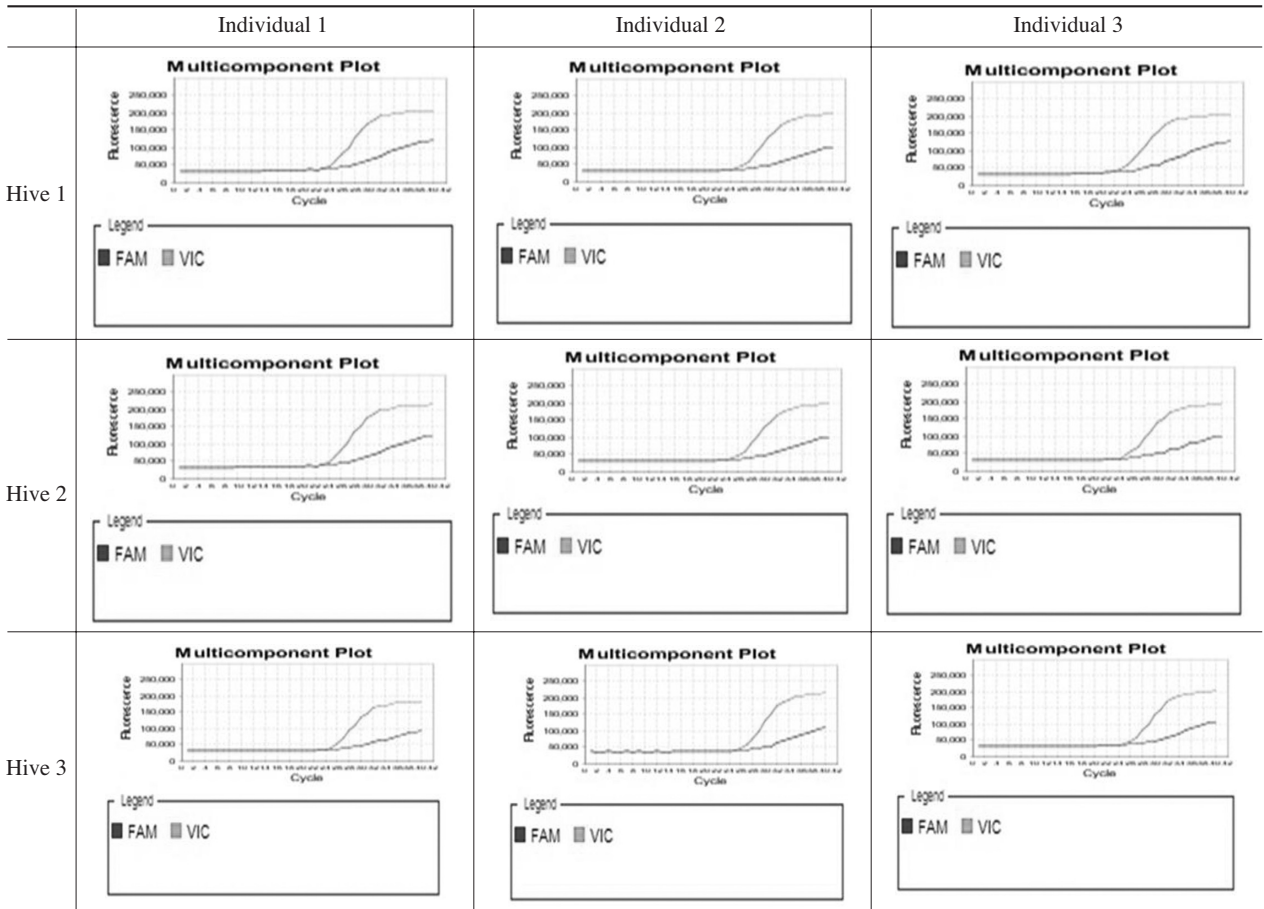


Fig. 2. Multi-component plot of the real-time PCR result of the next generation of D lines using Amd9 marker.

에 검출되어 D 계통 판별력에 대한 정확도(Accuracy rate)는 60%에 그치는 것으로 확인 되었다. 반면, AmD9 마커의 경우 A, C, F 계통에 대한 genotyping 결과는 AmD6 마커와 마찬가지로 10개 꿀벌 개체 모두 VIC 형광이 전혀 검출되지 않았다. 그러나 D 계통의 경우 모든 개체에서 VIC 형광이 검출되어 D 계통 판별력에 대한 정확도는 100% 인 것으로 확인되며, 이는 AmD6 마커에 비해 보다 높은 판별력을 지니는 것으로 판단되었다. AmD9 마커는 단일계통인 D 계통에 대해서만 높은 효율의 정확도를 보이는 것이 아니라, 교배조합계통 D×F에 대해서도 높은 효율로 판별 할 수 있는 것으로 확인되었다. 즉 AmD6 마커의 경우 교배조합계통 D×F 10개 개체 중 단 2개체만이 FAM/VIC 형광이 동시에 검출되어 교배조합 계통에 대한 D 계통 판별력은 다소 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 AmD9 마커의 경우 교배조합계통 D×F 10개 개체 모두 FAM/VIC 형광을 동시에 검출하여 교잡계통에 대한 판별력이 AmD6에 비해 높은 것으로 나타났다(Table 3). 이 결과는 다음 세대에 육성된 D 계통 일벌에 대한 genotyping 결과 에서도 역시 확인 할 수 있었다. 즉 다음 세대에 육성된 3개의 D 봉군에서 확보한 일벌 샘플은 모두 VIC 형광이 검출되어 높은 판별력을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 2)

꿀벌 육종에 있어 꿀벌의 유전적 마커는 다양한 측면에서 활용이 가능하다. Meixner 등(2013)은 꿀벌의 아종 분리를 위한 여러 가지 기술적 분석으로 mitochondrial DNA, microsatellite, SNP 등에 대해 기술한 바 있으며, Oxley 등(2010)등은 꿀벌의 청소력 우수 계통을 육성하고 이와 관련된 QTL(Quantitative trait locus) 영역을 유전자 마커로 활용하여 질병저항성 계통을 육성 기반을 마련하기도 하였다. 특히 꿀벌 육종 연구는 표현형 관찰이 상대적으로 용이한 질병저항성과 관련된 연구가 주를 이루고 있어, 이와 관련한 유전형 마커에 관한 연구도 많이 이루어져 왔다. 그러나 본 연구에서와 같이 꿀벌의 수밀력과 관련된 육종 및 유전형 마커와 관련된 연구는 거의 이루어지지 않아 관련 연구의 확대가 절실한 상황이다. 본 연구에서는 국내 최초로 육성된 수밀력 우수계통인 ‘장원벌’

계통 판별 마커 개발을 위해 장원벌 부계인 D 계통 특이적 마커인 AmD9를 개발하였다. AmD9 마커와 관련된 유전자는 *Apis mellifera* UPF0489 protein 인 것으로 확인되고 있으며, 이는 C5orf22 유전자와 상동성이 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 현재까지 본 유전자에 대한 정확한 기능은 밝혀져 있지 않아 추후 관련 연구를 통해 수밀력과의 관련성을 밝힐 수 있을 것으로 기대하고 있다.

적 요

꿀벌은 화분매개 뿐만 아니라, 양봉산물을 생산하는 주요한 산업곤충 중 하나이다. 최근 농촌진흥청과 예천곤충 연구소에서는 국내 최초로 수밀력 우수 꿀벌 품종인 ‘장원벌’ 을 선발하여 보급하고 있다. 본 연구에서는 장원벌 계통 특이 분자 마커 개발을 위해 장원벌 부계인 D계통 특이적인 분자 마커를 개발하고자 Sequence-Based Genotyping (SBG) 분석을 수행하였다. SGB 분석은 농촌진흥청 국립농업과학원에서 보존·육성중인 A, C, D, E, F 5개 기본종 계통에 대해 수행되었으며, 이를 통해 1,029개 SNP를 확보 할 수 있었다. 이후 A, C, D, F, E 기본종 계통 및 D×F 교배계통에 대한 SNP filtering 및 validation을 통해 최종적으로 AmD6 및 AmD9 두 개의 SNP 마커를 선발 하였으며, genotyping 분석을 통해 AmD9 마커가 장원벌 부계인 D 계통을 100% 구분 할 수 있는 것으로 확인되었다. 본 마커를 통해 D 계통 및 장원벌을 보다 정확하게 판별하고 육종에 활용 할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(PJ01117001)의 연구비로 수행된 결과이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

김정은, 김선곤, 강성주, 김춘성, 최용수. 2015. 전남지역 서

- 양종 꿀벌(장원벌)의 형질특성 조사. J. Apiculture 30(4): 239-244.
- 농림축산식품부 기타가축통계. 2015.
- 이명렬, 이만영, 심하식, 최용수, 김혜경, 변규호, 김인석, 권천락. 2014. 우수 삼원교배종 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 형질 특성. J. Apiculture 29(4): 257-262.
- Appleby N, D. Edwards and J. Batley 2009. New technologies for ultra-high throughput genotyping in plants. Methods in molecular biology 513: 19-39.
- Elshire R. J., J. C, Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland and K. Kawamoto. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PloS one 6: e19379.
- Kang, B.C., S. H. Nahm, J. H. Huh, H. S. Yoo, J. W. Yu, M. H. Lee and B. D. Kim. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* x *C. chinese*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 102: 531-539.
- Kim, H. K., M. L. Lee, Y. S. Choi and B. R. Jin. 2015. Microsatellite markers developed by next-generation sequencing differentiate inbred lines of *Apis mellifera*. Journal of Asia-Pacific Entomology 18: 801-805.
- Meixner, M. D., M. A. Pinto, M. Bouga, P. Kryger, E. Ivanova and S. Fuchs. 2013. Standard methods for characterizing subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. J Apic Res. 52(4): 1-27.
- Oxley, P. R., M. Spivak and B. P. Oldroyd. 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). Molecular Ecology 19(7): 1452-1461.
- Rortais, A., G. Arnold, M. Alburaki, H. Legout and L. Garnery. 2011. Review of the DraI CoI-CoII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). Conserv Genet Res. 3: 383-391.
- Truong, H. T., A. M. Ramos, F. Yalcin, R. de Ruiter M, H. J. van der Poel, K.H.J. Huvenaars, R.C.J. Hogers, L.J.G. van Enckevort, A. Janssen, N. J. van Orsouw and M.J.T. van Eijk. 2012. Sequence-Based Genotyping for Marker Discovery and Co-Dominant Scoring in Germplasm and Populations PloS one 7: e37565.
- Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans and T. van de Lee. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23: 4407-4414.