

2130070
55CGF00

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

Golden Seed 프로젝트사업 2단계 최종보고서

11-1543000-003944-01

M A B 토 마 토

이 내 병 성
용 기 술

고 자 표 지
도 화

개 발
및

2022

농 립 축 산 식 품 부

농 립 식 품 기 술 기 획 평 가 원

**토마토 내병성 분자표지 개발 및
MAB 이용기술 고도화**

2022. 3. 25.

프로젝트연구기관 / 부산대학교
세부프로젝트연구기관 / 경북대학교

**농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원**

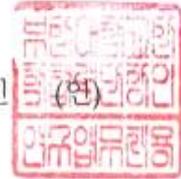
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “Golden Seed 프로젝트 사업”(기간 : 2017.01.01 ~ 2021.12. 31) 토마토 내 병성 분자표지 개발 및 MABC 이용기술 고도화 프로젝트의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 3. 25.

프로젝트연구기관명 : 부산대학교 산학협력단장 최 경 민



세부프로젝트연구기관명 : 경북대학교 산학협력단장 김 지 현



프로젝트연구책임자 : 박영훈

세부프로젝트연구책임자 : 이제민

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고 유번호	213007055 CGF00	해당단계 연구기간	2017.01.01. ~2021.12.31. (5년)	단계구분	(2단계)/ (총단계)
연구사 업명	단위사업	Golden Seed 프로젝트사업			
	사업명	GSP원예종자사업단			
프로젝 트명	프로젝 트명	토마토 내병성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화			
	세부프로젝 트명	제1세부: 토마토 곰팡이, 선충병 저항성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화 제2세부: 토마토 세균 및 바이러스병 저항성분자표지 개발			
프로젝 트책임 자	박영훈	해당단계 참여연구원 수	총: 113명 내부: 80명 외부: 33명	해당단계 연구개발비	정부: 1,258,000천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 113명 내부: 80명 외부: 33명	총 연구개발비	정부: 1,258,000천원 민간: 천원 계: 천원
연구기 관명 및 소속부 서명	부산대학교 원예생명과학과			참여기업명	
국제공 동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연 구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개 발성과 의 보안 등급 및	
----------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
특허출원 (흰가루병 저항성 토마토 개체 선발용 분자마커)		10-201 7-0146 703									
특허등록 (토마토 근부위조병 저항성 유전자 선발용 분자마커)		10-175 5231									
특허출원 (노란색과 토마토 판별용 분자 표지 개발)		10-201 7-0020 249									
특허출원 (토마토 청고병 저항성 토마토 판별용 SNP 마커)		10-201 7-0158 619									
특허출원 (프로라이코펜 고함유 토마토 판별용 분자표지 및 이의 용도)		10-201 8-0010 538									
특허등록 (흰가루병 저항성 토마토 개체 선발용 분자마커)		10-190 7825									
특허등록 (토마토 청고병 저항성 토마토 판별용 SNP 마커)		10-188 3117-0 000									
특허출원 (꽃마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 꽃마름병 저항성 토마토 선발 방법)		10-201 9-0072 870									
특허등록 (프로라이코펜 고함유 토마토 판별용 분자표지 및 이의 용도)		10-200 8607-0 000									
특허출원		10-202 0-0131									

(토마토 흰가루병 저항성 QTL 연관 단일염기서열변이 (SNP) 분자표지)		002											
특허등록 (자색 토마토 선별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 자색 토마토 선별방법)		10-209 6227-0 000											
특허등록 (꽃마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 꽃마름병 저항성 토마토 선발 방법)		10-214 4263-0 000											
특허출원 (퀘양병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 퀘양병 저항성 토마토 선발 방법)		10-202 0-0130 534											
특허등록 (퀘양병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 퀘양병 저항성 토마토 선발 방법)		10-231 1431-0 000											
특허등록(토마토 흰가루병 저항성 품종 관별용 SNP 마커 세트 및 이의 용도)		10-231 9304											
Combination of newly developed SNP and InDel markers for genotyping the Cf-9 locus conferring disease resistance to leaf mold disease in the tomato		1380 -374 3											
Ser360 and Ser364 in the Kinase Domain of Tomato SIMAPKKKa are Critical for Programmed Cell Death Associated with		1598 -225 4											

Plant Immunity											
Development of DNA markers for Slmlo1.1, a new mutant allele of the powdery mildew resistance gene SIMlo1 in tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	0831 -27 96										
Development of molecular markers for Ty-2 and Ty-3 selection in tomato breeding	0304 -423 8										
Host reactin of tomato varieties and applicability of sm-linked DNA markers to <i>Stemphylium lycopersici</i>	1380 -374 3										
CRISPR/Cas9-Mediated Generation of Pathogen-Resistant Tomato against Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Powdery Mildew	1422 -006 7										
Inferring the Genetic Determinants of Fruit Colors in Tomato by Carotenoid Profiling	1420 -304 9										
Identification of a molecular marker tightly linked to bacterial wilt resistance in tomato by genome-wide SNP analysis	0040 -575 2										
Organellar genome analysis reveals endosymbiotic gene transfers in tomato	1932 -620 3										
Distinguishing two genetic factors that control yellow fruit color in tomato	2211 -345 2										

Genetic variations underlying anthocyanin accumulation in tomato fruits	0014 -233 6										
Development of diagnostic molecular markers for marker-assisted breeding against bacterial wilt in tomato	1344 -761 0										
Development and Application of Gene-Specific Markers for Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in Both Field and Artificial Infections	2223 -774 7										
QTL-Seq Analysis for Identification of Resistance Loci to Bacterial Canker in Tomato	0168 -945 2										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

<요약문>

<p align="center">연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 세균 및 바이러스저항성 유전자 연관 분자표지 개발 - 저항성 유전자원 수집, 평가 및 등록 ○ 복합내병성 분자표지이용육종 기술 고도화 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 내병성 유전자 도입 및 집적 효율성 제고 ○ 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 세균병(세균성 점무늬병, 궤양병, 줄기썩음병), 바이러스병(TYLCV, TSWV, ToCV), 병리검정 시스템 구축, 저항성 유전자원 확보, 마커개발용 유전 집단양성 - 기 개발된 관련 분자표지 정보탐색 및 국내 육종소재 적용성 검정 - NGS-GBS, BSA, RNA-seq, SNP array 등을 이용한 저항성 연관 신규 분자표지 탐색 ○ 내병성 유전자 도입, 집적을 위한 분자표지이용육종 기술 고도화 <ul style="list-style-type: none"> - 유전자 도입 효율성 극대화를 위한 정밀 MAS 시스템 설계 및 적용 - 집적된 복합내병성 계통의 육종 중간모본화 전략 수립
<p align="center">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 4차년도에 본 연구과제의 주제인 풋마름병 관련하여 ‘Development of diagnostic molecular markers for marker-assisted breeding against bacterial wilt in tomato’ 제목으로 Breeding Science 저널(SCIE 저널) 에 출판하였음. ○ 5차년도에 본 연구과제의 주제인 TYLCV 관련하여 ‘Development and Application of Gene-Specific Markers for Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in Both Field and Artificial Infections’ 제목으로 Plants 저널(SCIE 저널) 에 출판하였음. ○ 5차년도에 본 연구과제의 주제인 궤양병 관련하여 ‘QTL-Seq Analysis for Identification of Resistance Loci to Bacterial Canker in Tomato’ 제목으로 Front in Plant Science 저널(SCIE 저널) 에 출판하였음. ○ 5년차년도에 본 연구과제의 주제인 풋마름병 관련하여 ‘풋마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 풋마름병 저항성 토마토 선발 방법’ 명칭으로 지식재산권 등록하였음. ○ 5년차년도에 본 연구과제의 주제인 궤양병 관련하여 ‘궤양병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 궤양병 저항성 토마토 선발 방법’ 명칭으로 지식재산권 출원하였음.

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 궤양병 저항성 토마토 판별용 SNP 마커를 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 청고병 저항성 토마토를 확보하는데 활용할 수 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음. ○ 풋마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 풋마름병 저항성 토마토 선발방법을 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 풋마름병 저항성 토마토를 확보하는데 활용할 수 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음. ○ TYLCV 저항성 유전자들인 <i>Ty-2</i>, <i>Ty-4</i>, <i>ty-5</i> 각각에 대한 마커 개발내용과 이들 저항성 집적에 따른 저항성 범위 및 정도 증가 효과 분석결과를 종합하여 특히 출원을 계획하고 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음. ○ ToCV 저항성 유전자를 이용한 ToCV 저항성 유전자 좌를 탐색하여 후보 유전자를 선발하고 후보 유전자 기반 마커를 개발 계획 중임. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>토마토</p>	<p>복합내병성</p>	<p>분자마커</p>	<p>분자표지선발</p>	<p>분자마커이용여 교잡</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>tomato</p>	<p>multi-disease resistance</p>	<p>molecular marker</p>	<p>MAS</p>	<p>MABC</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	10
2. 연구수행 내용 및 결과	17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	168
4. 연구결과의 활용 계획 등	176
붙임. 참고 문헌	179

- <별첨 1> 연구개발보고서 초록
- <별첨 2> 자체평가보고서
- <별첨 3> 연구성과 활용계획서

제 1장. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

가. 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발

- (1) 곰팡이 및 선충 저항성 유전자 연관 분자표지 개발
- (2) 세균 및 바이러스저항성 유전자 연관 분자표지 개발
- (3) 저항성 유전자원 수집, 평가 및 등록

나. 복합내병성 분자표지이용육종 기술 고도화 시스템 구축

- (1) 내병성 유전자 도입 및 집적 효율성 제고

다. 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발

- (1) 곰팡이병(근부위조병, 흰가루병, 회색잎점무늬병, 흑색잎곰팡이병), 선충뿌리혹병 병리검정 시스템 구축, 저항성 유전자원 확보, 마커개발용 유전집단 양성
- (2) 세균병(세균성 점무늬병, 궤양병, 줄기썩음병), 바이러스병(TYLCV, TSWV, ToCV), 병리검정 시스템 구축, 저항성 유전자원 확보, 마커개발용 유전집단 양성
- (3) 기 개발된 관련 분자표지 정보탐색 및 국내 육종소재 적용성 검정
- (4) NGS-GBS, BSA, RNA-seq, SNP array 등을 이용한 저항성 연관 신규 분자표지 탐색

라. 내병성 유전자 도입, 집적을 위한 분자표지이용육종 기술 고도화

- (1) 유전자 도입 효율성 극대화를 위한 정밀 MAS 시스템 설계 및 적용
- (2) 집적된 복합내병성 계통의 육종 중간모분화 전략 수립

2. 연구개발의 필요성

가. 분자표지 기술 및 토마토 내병성 분자표지의 중요성

- (1) 복합 내병성은 토마토 종자산업에서 경쟁력 있는 품종의 필수요건이 되었으며, 몬산토, 신젠타와 같은 글로벌 종자기업은 생명공학기술, 특히 분자표지를 적극 활용하여 병해충 저항성 품종 (*Mi*, *Cf*, *Tm2a*, *Ve*, *I2*, *Ty* 등 최소 5가지 이상의 저항성 유전자 보유) 등 우수한 신품종을 단 기간에 육성하여 세계 종자시장의 50% 이상을 점유하고 있음. 반면 국내 토마토 품종육종의 역사는 30여년에 불과하며 선진국에 비해 육종인력이 많이 부족하고 내병성 품종 육성의 기술력과 연구기반이 상대적으로 취약함.
- (2) 토마토 육종의 가장 큰 핵심기술은 병저항성 육종이라 할 수 있으며, 국내 종자회사에서도

주요 병저항성 육종과정에 MAS의 활용도를 높이고 있는 추세임. 토마토의 경우, 타 작물에 비하여 다양한 분자표지들이 개발되어 있어 다국적 종묘회사들의 육종프로그램에서 토마토의 분자표지 활용도는 다른 원예작물보다 월등히 높은 실정임. 현재 19개 이상의 복합내병성과 저장성에 관한 분자표지를 이용한 선발이 종자회사나 정부 연구기관에 의해 활용되고 있음. 다국적 종자회사의 토마토 내병성 품종은 7종 (*Ty1*, *Sw5*, *Mi*, *Cf Tm2*, *Ve*, *I* 등) 이상의 내병성 유전자를 조합으로 가지고 있음.

- (3) 일부 국내 민간기업에서 4-5개 이상의 병저항성 유전자를 가지고 있는 복합내병성 품종들이 개발되어 농가에 보급되고 있으나 새로운 분자표지 개발 연구는 초보단계이며 그 외 기업에서는 분자표지의 활용에 관심은 있으나 투자를 주저하고 있는 실정임.
- (4) 복합내병성 품종의 개발로 최근 찾아진 이상기온, 집중호우 등 기상변화에 따른 토마토 병해충의 발생에 대응하고 농약의 사용량을 감소를 유도해 친환경 농업 기반을 확립. 복합내병성 품종의 육성으로 토마토 생산성 향상 및 생산비 절감효과를 가져옴.

나. 해외 토마토 유전체 연구 및 내병성 분자표지 기술현황

- (1) 토마토는 유전체 정보를 기반으로 분자마커 개발과 활용이 선도적으로 이루어지고 있는 작물이며 1992년 야생종과 재배종 교배집단에 대한 RFLP 마커 기반 고밀도 유전자 지도(미국)가 작성된 이후 PCR 기반의 다양한 분자마커들이 원예형질 및 내병성에 대해 개발되었고 이와 더불어 선도적인 분자유종기술이 미국, 유럽, 일본 등의 국가에 의해 개발되어 왔음.
- (2) 토마토 유전체 연구는 국제 컨소시움을 통해 미국의 NSF의 지원 하에 Cornell 대학 연구팀의 주도로 이루어졌으며, 국내에는 서울대학교 최도일 교수 연구팀이 21세기 프로티어사업의 지원을 받아 염색체 2번의 염기서열 분석을 완료하였음. 본 과제 제 2세부프로젝트 책임자도 토마토 유전체 완성 국제 컨소시움에 직접 참여한 바 있음. 2012년 5월 토마토 유전체 프로젝트의 완료로 분자유종은 MAS(marker-assisted selection)에서 GAS(Genome-assisted selection)로 패러다임이 변화했음(The Tomato Genome Consortium, Nature, 2012). 이러한 유전체 정보를 활용을 통한 육종 효율 증진 방법은 선택이 아닌 필수적임.
- (3) 병저항성, 고품질 관련 형질 개선을 목표로 “150 Tomato Genome Resequencing 프로젝트”라는 이름으로 83개의 품종, 43개의 재래종, 30개의 야생종의 염기서열 확보를 몬산토, 신젠타 등 다국적 종자회사의 지원하에 BGI (Beijing Genomics Institute), 와게닝겐대학 등을 중심으로 진행되었음. 또한, 주요 가지과 작물의 분자유종 플랫폼 개발을 목적으로 미국 USDA 지원에 의해 “SolCAP (Solanaceae Coordinated Agricultural Project, <http://solcap.msu.edu>)” 진행되었으며, 본 과제 1세부의 공동연구원이 이 프로젝트에 참여한 바 있음. 추가적으로 360토마토 계통의 유전체 정보가 가지과 작물 유전체 데이터베이스에 공개, 이용가능한 상태임(<https://solgenomics.net/>). 상대적으로 열악한 국내 토마토 육종기술이 다국적 종자회사의 유전체 기반 기술로 격차가 더 벌어질 것으로 예상되는바 국내 독자적인 토마토 육종 지원 유전체 분석 프로젝트와의 실효성 있는 접목이 요구됨.
- (4) 다국적 종자회사들을 중심으로 자체 표지 개발 기술과 High-throughput(HT)-MAS 체계 확립에 많은 투자가 이루어지고 있음. 네덜란드를 비롯하여 프랑스와 일본에서도 민간 육종회사들이 육종 효율을 극대화하기 위하여 기술통합운영 시스템을 확보하여 성공적으로

운영되고 있음.

다. 국내 토마토 내병성 분자표지이용 육종 현황 및 문제점

- (1) GSP 이전 국내 토마토 분자표지 연구에 대한 대학 및 정부차원에서의 지원은 매우 제한적이었으며, 일부 민간종자회사를 제외하고는 마커개발과 활용이 가능한 회사가 없으므로 국가적 차원에서 분자표지 개발 및 MAS 지원 채널이 요구되었음. 최근 토마토 육종의 중요성이 부각되면서 2010년 농진청 FTA 연구과제, 2013년 GSP 1단계를 통해 마커개발 연구가 활성화되기 시작했으며, 주요 목표형질은 내병성이었음.
- (2) 대부분 내병성 마커는 보고된 저항성 유전자와 공개된 마커정보를 바탕으로 국내 육종소재에 적용할 수 있는 수정/보완된 형태이며, 소수 내병성(근부위조병, 흰가루병, 세균성 궤양병)에 대해서는 분리집단 등을 작성하고 유전자 맵핑을 통해 신규 마커개발을 수행해 오고 있음. 이는 본 과제의 세부프로젝트 책임자들 및 연구원들에 의해 주도되고 있음.
- (3) 현재 내병성 마커들이 확보되어 GSP 사업단을 통해 MAS 서비스에 활용되고 있음. 하지만, 문제점은 대부분 민간회사의 복합내병성 품종육성 프로그램이 마커에 의존하고 실제 병리검정을 통한 내병성의 확인, 즉 마커-표현형 간 일치성 확인이 충분히 이루어지지 않고 있어 기존 보고된 마커의 적용성이 완전히 검증되지 못한 상태에서 MAS가 진행되고 있다는 것임.
- (4) 이는 특정 병 내에서도 1)시간적, 지역적으로 다양한 균주(race, strain, phylotype)가 존재, 2) 우점균 이외에 새로운 병원성의 균종이 진화하여 출현, 3)환경적 요소에 따라 병원성과 병반응이 변화한다는 병리학적 견해, 그리고 1)내병성과 직결되는 유전자변이를 탐지할 수 있는 마커가 아닌 경우(유전자 연관마커 또는 non-functional 마커), 2) 저항성이 질적유전이 아닌 양적유전인 경우 마커적용에 한계가 있다는 유전학적 견해에 미루어 볼 때 많은 문제점들이 추후 일어날 수 있는 상황임.
- (5) 최근 1)TYLCV 저항성 유전자(*Ty-1/3*) 마커로 선발된 계통들이 포장에서 발병률이 증가되는 현상, 2) 선충뿌리혹병 저항성으로 알려졌던 품종들이 이병성으로 관찰되는 현상, 3) Cf-9유전자가 있어도 잎곰팡이병에 이병인 경우, 4)청고병에서 Bwr-12 유전자 연관마커 하나로는 충분한 내병성을 선발하지 못하고 궤양병에서 마커개발이 어려운 경우 등이 단적인 예라 할 수 있음.
- (6) 주요 병에 대한 마커가 개발되더라도 이를 이용한 복합내병성 품종육성의 효율성에 대한 문제가 제기 되고 있는데, 이는 병리학적 측면에서는 다수의 내병성 저항성유전자가 한 계통에 집적될 경우, 각 병에 대한 내성이 감소되거나 상쇄될 수 있는 가능성이 존재하며 unfavorable allele의 linkage drag에 의한 원예적 특성형질의 퇴화가 두드러질 수 있다는 점임.
- (7) 또한, 해외에서 진행된 유전체분석 결과들은 공용데이터베이스를 통해 많은 부분 열람 가능하나 토마토 관련 주된 데이터는 SNP인데 미국 재배 품종을 기반으로 한 결과이기 때문에 국내 품종 및 중국, 유럽 수출에 적합한지 검증이 필요함. SNP 분석 플랫폼이 Illumina Infinite 기반이어서 다소 비용이 높고 국내 육종지원체계 현실과 동떨어진다는 단점이 있

음.

- (8) 토마토 유전체 염기서열 분석 완료로 인하여 정밀분자표지 개발은 매우 용이한 시대가 왔으나, 저항성 형질 판별 역량 및 국내 육종 프로그램에의 도입이 가능한 저항성 유전자원의 부재가 정확도 높은 분자표지 개발에 큰 장애요소로 작용하고 있음.

라. 토마토 곰팡이병 저항성 분자표지 개발의 필요성 및 연구방향

- (1) 토마토 흑색잎곰팡이병(Black leaf mold, BLM)은 *Pseudocercospora fuligena*에 의해 발생되며 1995년도에 저항성 유전자원(PI134417, PI254655)이 야생종과 재배종에서 보고된 바 있음. 유전양상분석 결과보고에 따르면 2개의 유전자가 서로 상위유전작용을 통해 저항성이 조절된다고 함. 하지만 저항성 연관분자마커에 대한 보고는 없는 실정임. 최근 국내에서 BLM이 지속적으로 발생되어 다소 농가피해를 주고 있지만 아직 저항성 품종은 시판되지 않고 있음. 저항성 품종육성을 위해 국내 병원균주의 분리 동정, 저항성 육종소재의 탐색, 분자마커의 개발이 요구되는 상황임
- (2) 근부위조병(*Fusarium crown and root rot*, FCRR)은 *F. oxysporum f. sp. radicislycope-rsici*에 의해 발병하며, 국내 재배환경에서 습하고 저온인 시기에 심각한 수준으로 피해를 주고 있음. 내병계 대목을 이용하여 방제가 가능하나 최근 토마토 품종에서도 저항성 품종이 시판되고 있음. PI126926, 126944, Ohi89-1, FI7060 등 다수 알려져 있고, 국내에서도 본 연구팀에 의해 AV107-4 재배종 계통이 강한 저항성을 보임을 발견하였음. 저항성은 단일우성 유전자에 의해 조절되며, 문헌상 염색체 9번에 유전자 *Fr1*이 맵핑되고 연관분자마커가 개발되었지만, 본 연구팀의 연구에 따르면 국내 저항성 자원과 분자마커간 일치도가 매우 낮은 것으로 판단되어, 국내 육종소재와 병원균주에 적용가능한 신규분자마커의 개발이 필요함.
- (3) 회색점무늬병(Gray leaf spot, GLS)은 *Stemphylium spp.*에 의해 발생되며 심각한 수준은 아니지만, 국내에서도 꾸준한 병피해를 가져다 주고 있음. 하우스와 같이 따듯하고 다소 습한 기온에서 주로 나타남. 문헌에 따르면 *S. pimpinellifolium*에서 발견된 저항성이 불완전 우성유전자(*Sm*)에 의해 조절된다고 알려져 있음. 저항성 연관 분자마커는 RFLP (T10, T110)가 보고되어 있으나 실제 MAS에 활용하기 어려운 마커타입이며, 국내 병원균에 저항성인 유전자원의 확보와 SNP와 같이 PCR 기반의 분자마커 개발이 시급한 상황임.
- (4) 꽃겹무늬병(겉둥근무늬병, Early blight, EB)은 저온다습한 재배포장에서 *Alternaria spp.*에 의해 발병하며, 농가에 심각한 손실을 초래함. 하우스 재배가 대부분인 국내에서는 아직 크게 문제가 되고 있지는 않지만, 국내 시장뿐 아니라 수출을 위해서는 향후 저항성 품종개발이 반드시 개발되어야 하는 시점임. 해외의 경우 문헌에 따르면 EB 저항성 야생종(*S. habrochaites*, *S. peruviaanum*)을 이용한 육종 프로그램이 활발히 진행되어 왔으며, Near isogenic lines(NILs) 집단으로부터 QTL 영역을 분석한 후 PCR 기반 마커를 개발하여 MAS에 활용하고 있음. 반면에 국내에서는 EB에 대한 병리학적, 유전학적 연구가 거의 전무한 상황이라 국내 병원균주의 분리동정 및 해외 저항성 품종의 병반응 분석 등을 통하여 기존 개발된 QTL 마커의 국내 MAS 적용성 검정이 우선적으로 수행되어야 함.

- (1) 선충에서는 *Meloidogyne spp.*에 의한 고구마뿌리혹선충(Root knot nematode, RKN)이 국내외 포장재배시 심각한 병을 초래하고 있음. 저항성 유전자 *Mi*가 클로닝 되었고 유전자기반 분자표지도 실제 MAS에 활용하고 있지만, 최근 마커로 선발된 계통들에서 발병이 관찰되고, 국내 포장에서 기존 저항성 품종들이 병증상을 보이는 등 마커의 신뢰가 매우 떨어지고 있음. 이는 기존 저항성 유전자 *Mi*를 무너뜨리는 신종병원균이 진화하였거나, 기후온난화 등 환경변화에 따라 병원성이 크게 작용하게 되거나 저항성 유전자의 효율이 감소하는 것으로 예측됨. 따라서 병원균주-내병성육종소재-재배환경 간 상호작용을 파악하고 보다 정확한 마커의 개발이 가능할 수 있도록 신규 저항성 유전자의 발굴이 요구됨.

마. 토마토 세균병 및 바이러스병 저항성 분자표지 개발의 필요성 및 연구방향

- (1) 풋마름병은 *Ralstonia solanacearum* species complex(RSSC), 병원체에 속하며 가장 치명적인 식물성 세균병 중 하나임. 토양 전염성 세균에 의해 발생하며 증상이 빠르게 나타남. 병원체는 토양속에서 오랜기간 생존하며 넓은 범위로 퍼져 나갈 수 있음. 병원체에 감염된 식물체는 시들음 현상으로 인해 과실을 수확 할 수 없게 만들며 경제적 손실을 일으킴. 1924-1925년 남아프리카공화국 나탈 해안 지대에서 처음 발병하였음. 발병경로는 병원체가 숙주의 뿌리로 이동을 해서 식물 표피에 붙고 피층을 통과해 물관에 증식하게 됨.
- (2) 썩양병(bacterial canker)은 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*에 의한 세균병임. 종자 전염병으로 해외 채종지의 관리 부족으로 인해 국내에서 발병률이 증가하는 추세임. 효과적인 약제가 없어 토마토 재배 중 가장 방제가 어려운 병으로 꼽힘. 발병 시 수확량이 최고 70%까지 줄어 농가 피해도 막대함. 종자 채종 시 감염되면, 병징이 과종 후 2달 정도 후에 나타남으로 병 방제가 어려운 실정이며, 수입 또는 수출할 경우 초래되는 피해는 심각할 것으로 예상됨. 이를 위해 썩양병 저항성 유전자원 확보와 저항성 품종 육종이 시급함.
- (3) 최근 국내 토마토 재배에 있어서 담배가루이에 의해 충매전염되는 Geminivirus인 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)에 의한 피해가 급증하고 있음. 국내 시판품종에는 *S. chilense*에서 유래된 *Ty-1* 저항성이 적극적으로 도입되어 있기는 하지만, 저항성의 정도가 완벽하지 않고 매개충인 담배가루이의 밀도나 재배환경에 따라 저항성이 깨지는 경우가 급증하고 있음. 국내 시판중인 일본품종의 일부에서는 *Ty-2* 저항성을 활용하고 있으며, 국내 종자회사에서도 기존의 *Ty-1* 저항성에 *Ty-2* 저항성을 접목하려는 시도가 진행 중임. 이에 따라 이를 기술적으로 뒷받침해줄 수 있는 *Ty-2* 유전자 기반 분자표지의 개발이 필요한 시점임. 이 외에도 *Ty-4*, *ty-5*, *ty-6* 저항성이 문헌상으로 보고되어 있으나, 현재까지는 육종 프로그램에 도입되고 있지는 못한 실정임. 신규 TYLCV 저항성 유전자의 추가적인 도입을 활성화하기 위하여 육종재료의 개발 및 분자표지 개발이 요구됨.
- (4) 주로 온실가루이에 충매전염되는 crinivirus인 *Tomato chlorosis virus*(ToCV, 토마토퇴록 바이러스)는 해외에서 피해가 커지고 있으며, 2013년 전북, 전남 및 제주의 토마토 재배농가에서 처음 발견되었으며 국내 피해가 우려되고 있는 실정임. 저항성 자원으로는 *S. peruvianum* 'LA444'이 보고되어 있으나, *S. peruvianum*가 재배종과 교배가 어려운 이유로 embryo rescue를 통해 도입함. *S. chmielewskii* 'LA1028'도 저항성 소재로 알려짐. 이 유전

자원 확보 및 국내 재검정 후 이를 통한 분자표지 개발이 요구됨. 육종계통으로의 도입이 쉽지 않을 것으로 예상되는바 새로운 저항성 자원 선발이 필요함.

(5) 종합하여 볼 때, 내병성 분자마커는 국내 육종소재와 병원균 집단의 특성을 제대로 파악하여 기존 마커의 적용성 검증 및 활용도 증대와 신규분자마커 개발을 위해 지속적인 노력과 투자가 이루어져야 하며, 이를 위해 육종가-병리학자-마커개발자 간 협업을 기반으로 한 다음과 같은 전략이 필요함.

- 국내 발병지로부터 지속적인 병원균주 분리·동정 및 병리검정 체계 구축
- 개발된 내병성 계통의 해외 포장 검정을 통한 내병성 확인
- 국외 신규분자마커에 대한 지속적인 모니터링과 outsourcing을 통한 마커 적용성 검증
- 내병성 관련 유전자원[육성계통(cultivated lines), 야생종(wild species), 재래종(heirlooms), 돌연변이체(mutant lines), 실험집단(biparental, multiparental populations), 핵심집단(core collection)의 확보
- 확보된 유전자원에 대한 내병성 검정, 분자마커 또는 NGS 기반 염기서열분석을 통한 내병성 대립유전자변이(haplotype analysis) genotyping, mapping, GWAS 등을 통한 신규마커 개발

(6) 또한 정확한 내병성 선발 마커가 확보되더라도, 이를 이용한 복합내병성 품종육성을 위해서는 다수 저항성 유전자의 한 계통내 집적효율과 이들 유전자와 유전적으로 연관된 열성 형질에 대한 제거효율을 극대화 할 수 있는 정밀한 마커이용육종(Marker-assisted breeding) 기술이 요구됨.

(7) 복합내병성 육종을 위한 정밀 MAB 구현을 위해서는 다음과 같은 전략이 필요함

- 복합내병성 품종의 병리검정을 통해 다수 유전자 집적시 일어날 수 있는 내성 감소경향 분석
- 각 목표 유전자의 게놈상 물리적/유전적 위치 및 연관수준을 고려하여 최적 마커세트 선발
- 기존 확보되었거나 신규 개발되는 내병성 마커는 SNP 기반 대량샘플유전자형분석용 마커(KASPar, Fluidime chip)로 전환
- 내병성 유전자 도입을 위한 여교잡용 마커개발 및 MABC 체계(Fluidyme chip, targeted NGS) 구축

3. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
유전자원 수집	국내외 유전자원 은행, 종자회사로부터 분양 받거나 기존 보유한 자원을 활용	종자회사 및 Tomato Genetics Resource Center(TGRC)로부터 F1 상용품종 20점, 국내외 유전자원 은행에서 계통 150점, 도입유전자원 100점 이상 확보함.
병리검정 기술 확보	유전자은행, 국내외 대학연구소로부터 균주분양 및 경북대학교 발병포로부터 균주 분리	<ul style="list-style-type: none"> - 경희대 오창식 교수 연구실로부터 궤양병 균주 및 접종방법을 교육받고 대량접종 방법을 구축함. - 경북대 김병수 교수 연구실로부터 풋마름병 균주 및 대량접종방법을 교육받음. 동아대학교에서 청고병 균주를 분양받음. - 성균관대 이석찬 교수 연구실로부터 TYLCV 감염 클론을 분양받고 안동대 염인화 교수 연구실로부터 대량 접종방법을 교육받음. - ToCV는 현재까지 감염 클론이 개발되어 있지 않아 ToCV에 감염된 토마토를 사용하였으며, ToCV 접종 방법으로는 ToCV 접목 접종법을 본 연구에서 활용하였음.
내병성 마커정보 수집	내병성 마커정보는 기존 학술지에서 보고된 프라이머의 정보와 관련 연구자와의 교류를 통해 확보된 결과를 활용	학술지 및 관련 교류자와의 교류를 통해 세균성점무늬병 저항성 유전자 기반 분자 표지 개발함.
신규 내병성 마커 개발	Biparental population(분리집단), 내병성/ 이병성 유전자원을 이용한 병리검정 및 유전자연관분석, 선행연구결과에서 확보된 NGS data기반 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - F2 집단을 사용하여 NGS 분석을 통해 QTL-seq을 진행하여 후보 유전자 선발 및 저병원성 궤양병 저항성 연관 마커 개발을 완료함. - F2, F3 분리집단 및 유전자원, F1 상용품종을 이용하여 개발된 분자마커 효용성을 검정함.

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 토마토 기 개발 내병성 마커 검증

1. 연구수행 내용

내병성 마커는 국외 연구에 의해 문헌상 많은 보고가 되어 있으나, 이 중 일부 마커만이 육종현장의 MAS에 실제 사용되고 있는 것으로 알려져 있다. 본 과제에서는 신속한 마커개발 및 현장 적용을 위하여 기존 보고된 마커정보의 활용을 극대화 하고, 마커정보가 없거나 국내 환경에 적용이 어려운 마커들에 대해서는 신규마커를 자체 개발하는 방향으로 연구를 진행하고자 하였다.

<Table 1. 기존 보고되었거나 부산대에서 자체 개발한 토마토 내병성 연관 분자표지>

병명 ^a	병원균 증명 ^b	보고된 마커 ^c
곰팡이		
잎곰팡이병 (Leaf mold)	Ch-2, Cf-5, Cf-6, Cf-9	SSR, SCAR, CAPS, gene-based 14종
갈색근부병 (Corky Root Rot)	py-1	3 CAPS, 3 RAPD
겉등근무늬병 (Early Blight)	Asc	2 RFLPs
근부위조병 (Fusarium crown and root rot)	Frl	3 RAPD
시들음병 (Fusarium wilt)	I, I-2, I-3	SCAR, Indel, CAPS 12종
회색잎점무늬병 (Gray leaf spot)	Sm	CAPS 1종
잎마름역병 (Late blight)	Ph-2, Ph-3	CAPS 7 종
흰가루병 (Powdery mildew)	Ol-1, ol-2	RAPD, SCAR 7종
반신위조병 (Verticillium wilt)	Ve-1	SCAR, SNP 11종
세균		
청고병 (Bacterial wilt)	Bw	RFLP, CAPS, SCAR 4 종
세균성 궤양병 (Bacterial canker)	Rcm2.0, Rcm5.1	RFLP, CAPS, SCAR 9 종
세균성반점병 (Bacterial speck)	Pto	CAPS 1 종
세균성점무늬병 (Bacterial spot)	Rx-1, Rx-2, Rx-3, Rx-4	RAPD, CAPS, SSR, SNP
바이러스		
담배모자이크바이러스 (Tobacco mosaic virus)	Tm-1, Tm-2, Tm-2(a)	RAPD, SCAR, SNP 13 종
열룩시들음병바이러스 (Tomato spot wilt virus)	Sw-5	RAPD, indel, SCAR, CAPS 11종
토마토황화잎말림바이러스 (Tomato yellow leaf curl virus)	Ty-1, Ty-2, Ty-3, Ty-3a	CAPS, SCAR 6 종
선충		
(고구마)선충뿌리혹병 (Root knot nematode)	Mi, Mi-1, Mi-3	RAPD, CAPS, SCAR 11 종

총 8개 병종에 대한 14개 마커를 120개 품종에 대해 검증하여 마커형과 표현형(상보 정보) 간 일치성을 검토하였다.

<Table 2. 1차년도 수행된 병명과 사용된 마커>

병명		병원균명	저항성 검정	
국명	영명		저항성명	사용된 마커명
얼룩시들음병바이러스	Spotted wilt	TSWV	TSWV (Sw5)	표 3 참조
토마토모자일바이러스	Tomato mosaic virus	ToMV	ToMV (Tm2a)	“
황화잎말림바이러스	TYLCV	TYLCV	Ty(Ty-1,Ty-2, Ty-3)	“
세균성반점병	bacterial speck	Pseudomonas	Pst, Pto	“
잎곰팡이병	Leaf mold	Cladosporium	Cf (Cf5, Cf9)	“
위조병(시들음병)	Fusarium wilt	Fusarium	F (F1, F2, F3)	“
반신위조병(반시들음병)	Verticilium	Verticilium	V, Vd (Ve-1)	“
선충뿌리혹병	Root knot	Meloidogyne	N, (Mi)	“

(1) 상보에 표기된 내병성과 마커간 일치성 여부 검정 결과는 <표 3>과 같다. 일반적으로 상보에는 감수성(S)에 대한 정보는 나와 있지 않으므로 비교 대상은 상보는 저항성(R)이지만 마커는 감수성인 경우만 불일치하는 경우(회색, S/R)로 간주하였다. Cf9의 경우 마커가 H와 S의 구분에 문제가 있어 정확히 R로 검정된 경우만 나타내었다.

<표 4. 품종 내병성 정보와 마커 검정 비교분석>

EN	품종명	I2	I3	Ty-1	Ty-2	Ty-3	Sw5	REX	ToMV	Pto	Ve	Ph-3	J3	Cf5	CF9
1	가야찰플러스	S	S	S	S	S	S	R	S	S	H	S	S	R	R
2	갤럭시	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	-
3	골든슈가	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	-
4	광복토마토	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
5	나이스 골드	H/R	S	S	S	S	S	S	S/R	H	S	H	S	S	-
6	다복	H	S	S	S	S	S	H	H	S	R	S	H	H	R
7	대프니스	H/R	S	H/R	S	H	S	S	H/R	S	R	S	S	H	-
8	도태랑 다이아	H/R	S	S	S	S	S	R	H/R	S	R	S	H/R	R	R
9	도태랑다이아	H/R	S	S	S	S	S	R	H/R	S	R	S	H/R	R	R
10	도태랑다이아	H/R	S	S	S	S	S	R	H/R	S	R	S	H/R	R	R
11	도태랑마스터	S	S	S	S	S	S	R	H	S	H	S	H	R	R
12	도태랑마스트	S/R	S	S	S	S	S	R	H/R	S	H/R	S	H/R	R	R
13	도태랑솔라	H/R	S	S	S	S	S	R	H/R	S	R	S	H/R	R	-/R
14	도태랑플러스	S	S	S	S	S	S	R	H	S	R	S	H	R	R
15	라피토	H	S	S	S	S	S	H	R	S	R	S	H	H	R
16	란돌리노	R	S	H/R	S	H	S	S	H	H	H	R	S	H	R
17	레드팡	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	H	S	R	R
18	로꾸산마루토마토	H/R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	R	S	S	H	R
19	루비볼	R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	S	H	S	H	R
20	마스카라	H/R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	R	H	S	H	R
21	메디슨	H/R	S	S	S	S	S	S/R	H/R	S	R	S	H/R	S	-

22	미니마루	R	S	S	S	S	S	S	H/R	H	S	R	S	S	R
23	미니마루	R	S	S	S	S	S	S	H/R	H	H	R	S	S	R
24	미니찰	R	S	S	S	S	S	S	H	S	S	R	S	S	R
25	미니찰	R	S	S	S	S	S	S	H/R	S	S	R	S	S	R
26	박커스	H	S	R	S	H	S	H	H	S	R	S	H	H	R
27	버팀목	S	S	S	S	S	S	R	H/R	S	R	S	R	R	-
28	베타티니	R	S	S	S	S	S	S	H/R	S	S	R	S	S	R
29	베타티니토마토	R	S	S	S	S	S	S	H/R	S	S	R	S	S	R
30	베테랑	R	S	R	S	S	S	S	S/R	S	R	S	S	H	R
31	블랙리치흑찰토마토	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	-
32	블랙이글	H/R	S	H/R	S	H	S	H/R	H/R	S	S/R	S	H	R	-
33	비너스	H	S	S	S	S	S	H	H	S	R	H	S	H	R
34	비타민니	R	S	S/R	S	S	S	H	H	H	S	R	S	H	R
35	빅스타	H/R	S	S	S	S	S	R	S/R	S	R	H	S	R	R
36	서광토마토	S	S	S	S	S	S	S	S/R	S	S	S	S	S	-
37	서광토마토	S	S	S	S	S	S	H/R	S/R	S	S	H	S/R	H	-
38	솔루션	H	S	S	S	S	S	H	R	S	H	S	H	H	-
39	슈가레드	R	S	S	S	S	S	S	S	H	S	H	S	S	-
40	슈가옐로우	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	-
41	슈가옐로우	R	S	S	S	S	S	S	H	S	S	H	H	S	-
42	슈퍼도테랑	H	S	S	S	S	S	R	H	S	R	S	H/R	R	R
43	슈퍼도테랑	H	S	S	S	S	S	R	H	S	R	S	H	R	R
44	슈퍼선로드	H/R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	R	S	H/R	H/R	R
45	슈퍼에이스	H/R	S	H/R	S	S	S	S/R	S/R	S	H	S	S	H	R
46	스워드	R	S	S	S	S	S	H	H	R	S	H	S	H	-
47	스위티레드꼬마	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	-
48	스틱스티와이	R	S	H	S	H	S	R	H/R	S	R	S	S/R	R	R
49	신청강	S	S	S	S	S	S	H	H	S	H	S	S	H	-
50	썬글로브	H/R	S	S	S	S	S	R	H/R	S	R	S	H	R	R
51	에스코트	R	S	H	S	S	S	H	H	S	R	S	H	R	R
52	에이스	R	S	H	S	H	S	S	H	S	R	S	S	S	-
53	올레TY	R	S	H/R	S	H	S	H	R	R	H	R	S	R	R
54	올키퍼	H/R	H	S	S	S	S	H/R	R	S	H/R	S	R	H	-
55	요요	R	S	S	S	S	S	H	H	R	S	S	S	H	-
56	요요캡틴	R	S	S	S	S	S	R	R	R	H	R	S	R	R
57	유니콘	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R
58	유니콘	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R
59	지코레드	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	-
60	청강	S	S	S	S	S	S	H	H	S	S	S	H	H	-
61	케이스타 808	R	S	S/R	S	S	S	H	H/R	S	H	S	H/R	H	-/R
62	큐피드	R	S	S	S	S	S	H	H	R	S	H	S	H	R
63	큐피랑	H	S	S	S	S	S	R	H	S	R	S	H/R	R	R
64	텐텐	R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	R	H	H	S	H	-
65	톱3	H	S	S	S	S	S	H	S	S	R	S	H	H	R
66	티리찰	R	S	H	S	H	H	S	R	H	S	H	S	H	R
67	티아라	R	S	S	S	S	S	R	H/R	R	S	R	S	R	R
68	티와이알토랑	H	S	H/R	S	H	S	H	H	S	R	S	H	R	R
69	파이팅	H/R	S	S	S	S	S	S/R	H/R	H	S/R	R	H/R	S	-
70	포세이돈	H/R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	R	S	H	H	R

71	포세이돈	H	S	S	S	S	S	H	H	S	R	S	H	H	R
72	푸루데카	R	S	S	S	S	S	H	H	S	S	R	S	H	R
73	프라임알렉산더	H/R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	R	S	H	H	R
74	핑크알파	R	S	R	S	H	S	H	S	S	R	S	S	H	-
75	핑크탑	R	S	S	S	S	S	S/R	H/R	H	S/R	R	S/R	S/R	R
76	호용	H/R	S	S	S	S	S	H/R	H/R	S	R	S	S	H/R	R/R
77	홍광토마토	S	S	S	S	S	S	R	H/R	S	H	S	S	R	-/R
78	B블로킹	S/R	S	S	S	S	S	R	R	S	H/R	S	H/R	R	-
79	B블로킹	S/R	S	S	S	S	S	R	R	S	H/R	S	H/R	R	-
80	PC-11	R	S	H	S	H	S	H	H	R	S	R	S	H	R
81	PC-12	R	S	H	H	H	S	H	H	R	S	H	S	H	R
82	PCJ-1	R	S	H	S	H	H	H	H	H	H	H	S	H	R
83	PCJ-2	R	S	S	S	S	S	S	H	S	S	R	S	S	R
84	PCJ-3	R	S	H	S	H	S	H	R	H	H	R	S	H	-
85	PP-1	R	S	H	H	H	S	R	H	S	R	S	H	R	R
86	PP-2	R	S	H	S	H	S	H	R	S	R	H	S	R	R
87	PP-3	R	S	H	H	H	S	R	H	S	R	S	H	R	R
88	SV0244tg	R	S	H	S	H	S	H	R	S	R	S	S	R	R
89	SV0339tg	H	S	H	S	H	S	R	H	S	R	S	H	R	R
90	TNA-100	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	H	R	-
91	TNT112	S	S	S	S	S	S	R	H	S	H	S	S	R	-
92	TOP3201	H	S	R	S	H	S	S	H	S	R	S	S	H	R
93	TOP3202	R	S	R	S	H	S	S	R	S	R	S	S	H	R
94	TOP3203	R	S	R	S	H	S	S	H	S	R	S	S	H	R
95	TOP3204	H	S	H	S	H	S	H	H	S	R	S	H	R	R
96	TOP3205	H	S	H	S	H	S	S	H	S	H	S	S	H	R
97	TP-7플러스	S	S	S	S	S	S	R	H	S	H	S	S	R	-
98	TSG-100	R	S	H	S	H	H	S	H	S	R	H	R	H	R
99	TSG-101	R	S	H	S	H	R	H	H	S	R	R	H	R	R
100	TSG-102	R	S	H	S	H	R	H	H	S	R	R	H	R	-
101	TSG-103	R	S	H	S	H	R	H	H	S	R	R	R	R	R
102	TY 미라클	R	S	H/R	S	H	S	H	R	S	S	S	S	R	R
103	TY 캔디	R	S	H/R	S	H/R	S	S	R	S	S/R	R	S	H	-/R
104	TY2034	H	S	H	S	H	S	R	H	S	R	S	H	R	R
105	TY레드토	R	S	H	S	H	S	S	H	S	H	S	H	H	R
106	TY미황	R	S	H	S	H	S	S	H	S	S	R	S	H	R
107	TY세로나	H	S	H	S	H	H	R	H	S	R	S	R	R	-
108	TY센스큐	R	S	H/R	S	H	H/R	S	R	S	S	H	S	H	R
109	TY슈가토	R	S	S	S	S	S	S	S	S	H	R	S	S	-
110	TY스마트시아	R	S	H/R	S	H	S	H	R	R	H	R	S	R	R
111	TY엔돌핀	R	S	H/R	S	H	S	H/R	R	H	S	H	S	R	-/R
112	TY위너	R	S	H/R	S	H	S	H/R	H/R	S	R	S	H/R	R	R
113	TY참피온	H	S	S	S	S	S	R	X	S	H	S	H	R	-
114	TY탑레드	R	S	H	S	H	S	H	H	S	R	H	S	R	-
115	TY티니	H	S	H/R	S	H	S/R	H	H/R	S	R	S	H	R	R
116	TY핑크토	R	S	H	S	H	S	H	H	S	R	S	H	H	-
117	13T510	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	H	S	R	R
118	244	R	S	H	S	H	S	H	R	S	R	S	S	R	R
119	339	H/R	S	H/R	S	H	S	R	H/R	S	R	S	H/R	R	R

120	7160	R	S	H	S	H	S	H	R	R	S	R	S	H	-
-----	------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(1) 결과를 요약하면 표 5와 같으며, 각 병종에 대해 ‘내병성 정보가 상보에 나와 있어 마커결과와의 비교가 가능하였던 품종수’/‘상보와 마커결과가 불일치 하는 품종수’로 표기하였다. 이와 같이 불일치하는 품종들에 대해서는 차년도부터 병리검정을 수행하여 불일치의 원인을 파악하고, 필요한 경우 기존마커의 수정 및 보완이나 신규마커 개발을 수행하고 하였다.

<표 4. 상보의 내병성 정보와 분자마커분석 결과가 불일치하는 품종수>

I2	I3	Ty	Sw5	REX	ToMV	Pto	Ve	Ph-3	J3	Cf
33/3	-	13/2	2/1	30/3	44/6	-	24/4	1/0	20/3	35/0

제 2 절. 토마토 선충 저항성 분자마커 개발

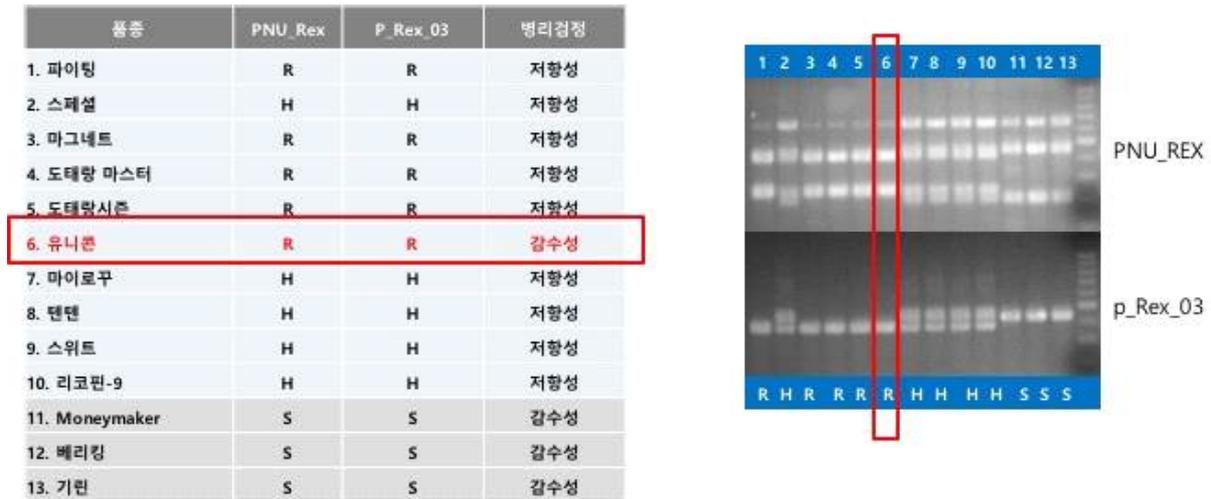
1. 연구수행 내용

가. 선충병의 중요성 및 연구배경

- (1) 선충에서는 *Meloidogyne spp.*에 의한 고구마뿌리혹선충(Root knot nematode, RKN)이 국내의 포장재배시 심각한 병을 초래하고 있다. 저항성 유전자 *Mi*가 클로닝 되었고 유전자기반 분자표지도 실제 MAS에 활용하고 있지만, 최근 마커로 선발된 계통들에서 발병이 관찰되고, 국내 포장에서 기존 저항성 품종들이 병증상을 보이는 등 마커의 신뢰가 떨어지고 있다. 이는 기존 저항성 유전자 *Mi1.1*를 무너뜨리는 신종병원균이 진화하였거나, 기후온난화 등 환경변화에 따라 병원성이 크게 작용하게 되거나 저항성 유전자의 효율이 감소하는 것으로 예측됨. 따라서 병원균주-내병성육종소재-재배환경 간 상호작용을 파악하고 보다 정확한 마커의 개발이 가능할 수 있도록 신규 저항성 유전자의 발굴이 요구된다.
- (2) 토마토 선충은 *Meloidogyne incognita*종에 의해 일어나며 현재까지 내병성 품종은 저항성으로 *Mi1.1* 유전자를 지니고 있다. 이 유전자에 대한 마커들도 개발되어 MAS에 활용되고 있다. 최근 *Mi1.1*을 지니고 있어 선충에 저항성으로 알려졌던 ‘유니콘’ 품종이 부여 지역에서 선충에 감염된 사례가 있어 기존 *Mi1.1* 유전자의 내성을 무너뜨리는 신규 선충 레이스(race)의 출현이나 *M. incognita*가 아닌 토마토에 감염성이 있는 타 종(*M. jaccanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*)에 의한 문제점의 가능성이 제기되었다.
- (3) 본 연구에서는 ‘유니콘’을 감염시킨 선충의 종을 판명하고, 신규 저항성 유전자의 발굴, 분자마커의 개발 등을 추진하기 위한 초기 실험들을 수행하였다. 감염된 ‘유니콘’ 식물체는 화학연구소에서 분양 받았으며, 마커 분석과 병리검정 등은 부산대학교의 선충 연구소와 공동으로 수행되었다.

나. 내용 및 결과

(1) *Mi1.1* 유전자 마커로서 ‘유니콘’을 포함한 13개 내병성, 감수성 품종들을 테스트한 결과, 모든 품종들에서 마커와 내병성이 일치하였으나, ‘유니콘’의 경우 감수성임에도 불구하고 마커 결과로는 저항성(R) 유전자인 *Mi1.1*을 지니는 것으로 나타나 유전자를 무너뜨리는 선충 종이 존재함을 확인할 수 있었다 (그림 1)

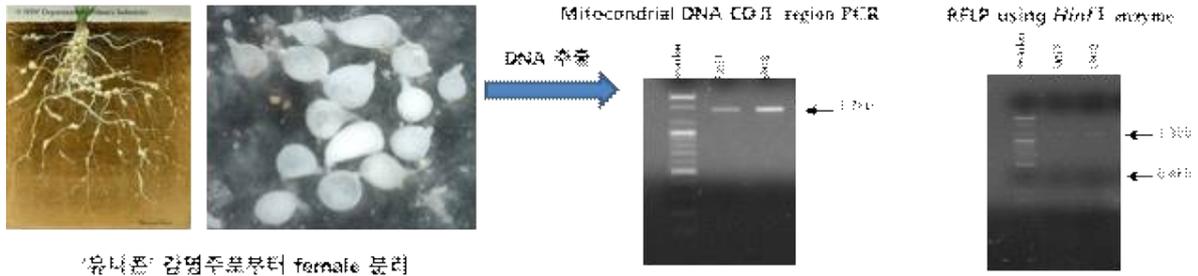


<그림 1. 선충 내병성, 감수성 품종들에 대한 *Mi1.1* 저항성 유전자 마커 (PNU_REX, p_Rex_03) 분석 결과. R=저항성, H=헤테로, S=감수성>

(2) 유니콘에 감염을 일으킨 선충이 기존 국내에서 문제가 되는 것으로 알려진 *M. incognita* race1 인지 아니면 또 른 병원성의 선충종인지 알아보기 위해 종분류에 활용되는 Mitochondrial DNA CoII region의 RFLP 마커를 이용하여 유니콘 뿌리로부터 분리한 난낭(egg mass)들을 분석하였다 (그림 2). 그 결과 *M. incognita*에 특이적인 마커 결과가 나왔으며, ‘유니콘’은 race 1이 아닌 새로운 *M. incognita* race의 출현에 의해 감염된 것으로 추정할 수 있었다.

(3) 종분류 마커 결과를 재확인하기 위하여 ‘유니콘’과 더불어 감수성 표준 품종인 ‘Rutgers’ 품종을 race 1과 ‘유니콘’에서 분리한 선충종(Uni-S로 명명)으로 접종해 보았으며, 그 결과 ‘Rutgers’는 두 접종원에 감염된 반면 ‘유니콘’은 race 1에 대해서는 저항성을 보임을 알 수 있었다.

(4) 이들 실험 결과는 ‘유니콘’의 *Mi1.1* 저항성 유전자를 무너뜨린 병원종(Uni-S)은 *M. incognita*의 또다른 race (race shift)로 생각되며, 향후 심각한 선충병 전파 및 피해의 원인이 될 수 있음을 시사한다. 따라서 Uni-S 종에 저항성을 보이는 새로운 육종소재의 발굴 및 이를 이용한 마커의 개발이 요구된다.



‘유니콘’ 감염주로부터 female 분리

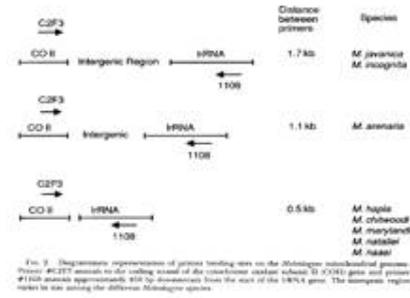


Table 4. Restriction enzyme digestion patterns of *Meloidogyne* species for COII-IRNA region

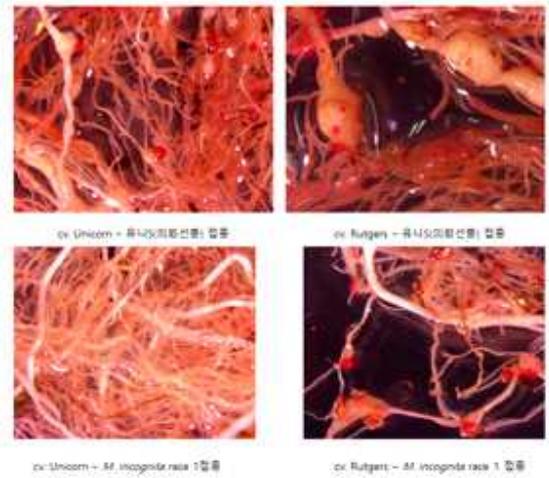
Species	Origination	Enzyme	Expected size	Fragment
<i>Meloidogyne hapla</i>	Korea	<i>Dra-I</i>	230 bp, 270 bp	230 bp, 270 bp
<i>Meloidogyne hapla</i>	USA	<i>Dra-I</i>	230 bp, 270 bp	230 bp, 270 bp
<i>Meloidogyne incognita</i>	Korea	<i>Hinf-I</i>	1300 bp, 400 bp	1300 bp, 400 bp
<i>Meloidogyne incognita</i>	USA	<i>Hinf-I</i>	1300 bp, 400 bp	1300 bp, 400 bp
<i>Meloidogyne arenaria</i>	Korea	<i>Hinf-I</i>	1,700 bp	1,700 bp
<i>Meloidogyne arenaria</i>	USA	<i>Hinf-I</i>	1,100 bp	N/A*
<i>Meloidogyne javanica</i>	USA	<i>Hinf-I</i>	1000 bp, 700 bp	1,700 bp

*Not applicable due to limited samples.

Oh et al., 2009. Molecular biological diagnosis of *Meloidogyne* species occurring in Korea

<그림 2. 선충 감염 ‘유니콘’ 식물체 뿌리에서 분리한 난낭에 대한 종분류 마커 분석 결과>

품종	선충	반복	난낭수/g
유니콘	Uni-S	1	62
		2	25
		3	30
		4	뿌리썩음(감염)
		5	접종안됨
	<i>M. incognita</i> race 1	1	0
		2	0
		3	0
		4	0
		5	0
Rutgers	Uni-S	1	52
		2	40
		3	14
		4	고사
		5	고사
	<i>M. incognita</i> race 1	1	110
		2	60
		3	27
		4	87
		5	33



<접종 후 80일째 촬영 상태>

<그림 3. *M. incognita* race 1을 이용한 ‘유니콘’과 감수성 표준 품종인 ‘Rutgers’ 품종 접종 결과 >

제 3 절. 토마토 근부위조병 저항성 분자마커 개발

1. 연구수행 내용

가. 근부위조병의 중요성 및 연구배경

- (1) *Fusarium oxysporum* (Sacc.) Snyder & Hans.는 토양 매개 반수체 진균 식물 병원균으로 다양한 농작물 및 관상용 식물에서 관다발 시들음이나 뿌리썩음을 유발한다. *F. oxysporum*의 병원성 isolates는 기주 특이성이 높으며 기주 식물 종과 품종에 따라 120종 이상의 *formae speciales*와 *races*로 분류된다. 그 중에는 많은 식물 종의 근권에서 발생하고 토마토에서 새로 형성되는 뿌리에 생성된 상처와 자연적인 구멍을 통해 fusarium crown and root rot(FCRR)를 일으키는 사물기생균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* W. R. Jarvis & R. A. Shoemaker (FORL)가 있다. FCRR은 시설과 노지에서 토마토의 가장 파괴적인 토양 매개 질병 중 하나다. 원래 원인 곰팡이는 토마토에서 fusarium 시들음에 책임이 있는 FOL의 새로운 race (J3)로 나타났다. 그러나 후에 이 곰팡이는 독특한 증상 발달과 생리적, 유전적 특성으로 인해 *F. oxysporum*의 새로운 forma specialis인 FORL로 지정되었다.
- (2) FCRR 발발을 위한 최적의 환경 조건은 18 °C의 온도와 낮은 습도이다. 토마토에서 FCRR의 다음 증상은 선행연구에서 다음과 같이 보고되었다: 토양 바로 위의 싹 바깥쪽, 뿌리의 목과 줄기 기저부를 포함하는 괴사 손상이 나타나고, 죽은 조직에 분홍색 곰팡이가 나타난다. FCRR을 제어하기 위한 실용적인 접근에는 현장에서 화학 물질(methyl bromide/chloropicrin and captafol)을 사용한 토양 증기소독으로 FORL 포자를 제거하고 재활용 암면을 사용하거나 무토경작에서 기질의 조성 변화(perlite, perlite-peat mix)를 통하여 곰팡이를 자연적으로 억제하는 것이 포함된다. Antagonistic 진균 또는 박테리아를 사용한 생물학적 방제는 살균제의 사용에 대한 대안이다. 그러나 이러한 방법은 FORL의 공기 중 포자는 언제든지 토양에 다시 감염될 수 있으므로 재배자에게 재처리가 요구되고 반복적으로 비용이 수반되기 때문에 FCRR을 효과적으로 제어할 수 없다. 따라서 FORL에 유전적으로 내성이 있는 토마토 품종을 개발하는 것은 FCRR의 장기적이고 환경적으로 안전한 통제를 위한 가장 유망한 잠재적 방법이다. 이와 관련하여 FORL의 저항성에 대한 분자 마커의 식별은 이 질병에 저항성인 토마토 품종의 개발을 촉진할 것이다.
- (3) FORL 저항성은 야생종 *S. peruvianum*에서 관찰되었으며 주로 담배 모자이크 바이러스 (TMV)에 대한 저항성 유전자(*Tm-2* 및 *Tm-2^h*)의 이입을 목표로 하는 육종 프로그램에 의해 *S. lycopersicum*에 도입되었다. 일본에서는 *Tm-2*와 FORL 저항성이 plant introduction (PI) 126944에서 *S. lycopersicum* 계통인 'IRB #301'로 이입되었다. 유사하게, 이 두 유전자는 프랑스의 또 다른 저항성 유전자원인 PI126926에서 'Moperou' 품종으로 이입되었다. 미국 오하이오주에서는 *Tm-2* 유전자좌의 또 다른 대립유전자인 *Tm-2^h*가 PI128650에서 이입되었다. 그러나 PI128650은 FORL에 감수성이고, 일본 계통 'IRB #301'은 FORL 저항성 inbred 교배계통인 'Ohio 89-1'을 개발하는 데 사용되었다. 그 후에 'Ohio 89-1'의 FORL 저항성이 *Fr1*로 지정된 단일 우성 유전자로 분리되었다는 것이 확인되었다. 후속 연구에서 *Tm-2* (또는 *Tm-2^h*)- 유전자이입 계통에서 *Fr1*의 존재가 TMV 저항성 공급원에서 도입된 두 유전자 사이의 linkage drag의 결과임을 입증했다.
- (4) Molecular mapping 연구에서 *Tm-2^h*와 *Fr1*이 염색체 9번에 위치하고 제한효소 절편길이 다형성 (RFLP) 마커인 TG101과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다. 최근에 960개체

의 여교배(BC₁) 집단[(Ohio 89-1 × Fla7482B) × Fla7482B]을 기반으로 한 molecular mapping에서는 *Fr1*과 *Tm-2* 사이의 유전적 거리가 약 5.1 ± 1.07 cM인 것으로 나타났다. 이 지도에서 TG101과 UBC random-amplified polymorphic DNA(RAPD) 마커 세트는 TG101-UBC655-116-194- *Fr1* 순서로 *Fr1*에 연관되어 있으며 UBC194와 *Fr1* 사이의 유전적 거리는 5.1cM로 나타났다. FORL 저항성 'Fla. 7781'과 FORL-감수성 'B560'의 교배조합으로 구성된 F₂와 BC₁ 집단을 사용한 선행 연구에서 역시 *Fr1*과 밀접하게 연결된 두 개의 conserved set II (COSII) 마커를 보고했다. 이러한 선행 mapping 연구는 *Fr1*이 동원체와 가까운 염색체 9번의 long arm에 있는 위치할 수 있음을 시사한다.

- (5) 본 연구의 목적은 FORL 저항성이 관찰된 엘리트 inbred 계통인 'AV107-4'(*S. lycopersicum*)에서 유전양상을 평가하고 그 계놈 위치를 한정하는 것이다. 이를 위해 'AV107-4' × 'L3708'(*S. pimpinellifolium*)의 중간 교배에서 유래한 F₂ 집단의 국내에서 분리한 FORL 균주에 대한 내병성을 평가하였고, *Fr1*을 유전적, 물리적으로 9번 염색체에 고정된 마커 세트를 이용하여 매핑하였다. 이 마커와 *Fr1* 사이의 연관성은 또한 다양한 상용 품종과 잡종 품종 및 육종 계통을 기반으로 평가되었다. 그 결과 'AV107-4'의 *Fr1*이 기존에 보고된 long arm에 존재한다는 선행 연구와 달리 염색체 9번의 short arm에 위치하는 것으로 나타났다. *Fr1*의 marker-assisted selection(MAS)에 대한 잠재적인 SNP 마커를 이 연구에서 개발하였다.

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료 및 DNA 추출

- (1) Marker-형질 연관 연구를 위해 FORL 내성 계통 'AV107-4'(*S. lycopersicum*)와 FORL 감수성 계통 'L3708'(*S. pimpinellifolium*)을 사용하여 F₂를 생산했다. F₁ 세대는 'AV107-4' 계통을 모계로, L3708 계통을 부계로 사용하여 인공 수분에 의해 생산되었다. 그 후, F₂ 세대는 무작위 F₁ 개체의 통제된 자가 수분에 의해 생산되었다. 이렇게 생산된 345개의 F₂ 식물을 FCRR bioassay 및 FORL 저항성 유전자좌를 국한하기 위한 마커 유전형 분석에 사용했다.
- (2) 상용 품종 및 육종 계통을 평가하기 위해 43개의 상용 F₁ 잡종 품종의 종자를 민간 종자 회사에서 조달했다. 이 품종 배열에는 FORL 감염에 대한 반응에 대하여 종자 회사의 설명에 따른 29개의 저항성 품종과 14개의 감수성 품종이 포함되었다. F₂ 개체군과 동일한 방법을 사용하여 FORL 저항성을 평가하기 위해 추가로 17개 품종을 재배했다. 이 60개 품종은 FORL 저항성과 선택된 분자 마커의 연관성을 연구하는 데 사용되었다. FORL에 내성이 있는 것으로 알려진 55개 계통 및 품종의 잎 샘플을 종자 회사(농우바이오, 이천, 대한민국)에서 제공받아 FORL 저항성의 MAS용으로 high-resolution melting (HRM) 마커를 검증하는 데 사용했다. 선행연구에서 사용한 방법에 따라 본엽을 이용하여 계놈 DNA를 추출 및 정제하였다.

나. FORL 저항성 bioassay

- (1) FCRR의 질병 중증도에 대한 생물학적 검정은 40개의 'AV107-4', 20개의 'L3708', 20개의 F₁ 개체, 345개의 F₂ 개체 및 17개의 상용 품종(품종당 10 개체)에 대해 수행되었다. 병원체 접종 및 질병 평가는 강릉원주대학교(강릉, 대한민국)의 온실에서 수행하였다.
- (2) 접종을 위해 한국농업문화원(KACC)에서 분양받은 FORL 분리주 KACC 40031을 PDA 배지에서 25°C에서 5일 동안 배양한 후, 균사를 potato dextrose broth로 옮겨 25°C에서 7

일 동안 150 rpm의 rotary shaker에서 배양하였다. C. 3중 멸균 거즈로 여과하여 균사체 조각을 제거하고, 분생포자 현탁액을 멸균증류수에 희석하여 최종 농도가 1×10^7 conidia/mL가 되도록 하였다. 토마토 종자를 원예용 상토(그린, 농우바이오, 대한민국)의 묘판(96구 플러그 트레이)에 파종하고 25 ± 5 °C의 온실에서 3주 동안 성장시켰다. 각 유묘의 뿌리를 세척하여 흙을 제거하고 절단된 면에 $FORL-1 \times 10^7$ conidia/mL 현탁액을 15분 동안 접종했다. 접종된 식물을 직경 15cm 화분으로 옮기고 온실에서 4주 동안 습도 약 90% 및 25 ± 5 °C로 유지하였다. 4주 후, 메스로 각 뿌리를 자르고 관다발 조직 갈변 정도에 따라 FORL 질병 중증도 지수(DSI)를 0-3으로 평가했다(Rowe 1980); 0 = 내부 갈변 없음, 1 = 약간의 내부 갈변, 2 = 전체 원뿌리의 중간 내지 심각한 내부 갈변, 3 = 원뿌리에서 토양선 위의 아래쪽 줄기까지 이어지는 심각한 내부 갈변. FORL에 대한 각 F_2 의 민감도는 DSI 값에 따라 결정되었습니다. 0의 값은 저항성을 나타내는 것으로 간주되고 1-3의 값은 감수성을 나타내는 것으로 간주되었다.

다. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers와 *Frl*의 연관 평가

- (1) FORL 저항성과 관련이 있다고 기존에 보고된 일련의 RAPD 마커(Vakalounakis et al. 1997)가 우리 식물 재료에 대해 평가되었다. RAPD 10-mer 프라이머 UBC655, UBC116 및 UBC194에 대한 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 Operon Technology Inc.의 절차에 따라 수행되었으며 반응 조건은 다음과 같다: 94 °C에서 30초 1반복 후 92°C에서 20초, 36°C에서 50초, 72°C에서 2분 45반복, 72°C에서 7분 1반복, 4°C에서 10분의 1반복. 겔 전기영동은 Tris-acetate EDTA(TAE)가 포함된 1.5% 아가로스 겔에서 160V에서 1시간 동안 수행되었으며, 밴드는 ethidium bromide 염색 후 자외선 아래에서 가시화되었다.
- (2) UBC116의 다형성 DNA 단편은 '영무자'(저항성 상용 품종)에서 입수하였으며, 다음과 같이 염기서열분석을 하였다. PCR band는 agarose gel에서 절단하여 Expin™ Gel SV(GeneAll Biotechnology, 서울, 대한민국)를 이용하여 정제한 후 Genotech(대전, 대한민국)의 Dye-termination 방법을 이용하여 직접 DNA 단편의 염기서열을 분석하였다. UBC116의 물리적 위치를 예측하기 위해 토마토 참조 게놈 (<http://solgenomics.net/>, ITAG2.3 release)을 사용하여 DNA 서열의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 분석을 수행했다.

라. 염색체 9번에 위치한 DNA markers 개발

- (1) Tomato EXPEN-2000 지도(<http://solgenomics.net/>)를 기반으로 UBC#116을 포함하는 40-55 cM의 유전적 거리에 걸친 분자 마커를 선택했다. 이 마커 세트에는 각각 42 및 50.37 cM에 위치한 2개의 단순 서열 반복(SSR) 마커인 SSR70 및 SSR237과 각각 48 cM, 50 cM 및 52.1 cM에 위치한 3개의 RFLP 마커 T1212, cLET-2-D4 및 CD3이 포함되었다. 이러한 마커는 다형성의 검출을 위해 AV107-4 및 L3708에서 테스트되었다.
- (2) 이들 마커는 20ng genomic DNA, 0.3M의 정방향 및 역방향 프라이머, 1x PCR 완충액, 0.2mM dNTPS 및 0.6U의 Taq 중합효소(솔젠트, 대전, 대한민국)의 조성으로 총 volume 을 20 μ L로 하여 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 95°C에서 5분 1반복, 94°C에서 30초, AT(annealing 온도)에서 30초(표 1), 72°C에서 1분 35반복 72 °C에서 7분 1반복. SSR 마커의 PCR 절편의 겔 전기영동은 Tris-acetate EDTA(TAE)를 포함하는 2% 아가로스 겔을 사용하여 160V에서 1시간 20분 동안 수행한 다음 밴드를 ethidium bromide 염색 후 자외선 아래에서 시각화했다. RFLP 마커의 경우, PCR 절편을 제조사의 지침(NEB, Ipswich, Suffolk, England)에 따라 12개의 제한 효소로 아가로스 겔 전기영동 전에 처리한 후 다형성을 확인하고 이들을 각각 PNU-T1212, PNU-D4 및 PNU- CD3로 지정했다.

(3) 염색체 9번에 추가 분자 마커를 개발하기 위해 AV107-4 및 L3708의 genomic DNA를 Infinium 플랫폼(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)에서 SolCAP Tomato SNP 어레이를 사용하여 유전자형을 검증하였다. SolCAP 어레이의 유전형 분석은 SNP Genetics Inc.(서울, 대한민국)에서 수행했다. SolCAP SNP에 대한 annotation 정보 매트릭스는 SGN 데이터베이스에서 다운로드 하였다. 총 8개의 SNP[2개의 SNP(solcap_snp_sl_100431 및 53169)는 물리적으로 PNU-D4와 SSR70 사이에, 2개의 SNP(solcap_snp_sl_100181 및 100461)는 SSR237과 PNU-CD3 사이에, 4개의 SNP(solcap_snp_sl_43011, 46840, 58307 및 63662) PNU-CD3과 9번 염색체의 텔로미어 사이에 위치한다.]는 CAPS designer software (<http://solgenomics.net/>)를 사용하여 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 마커로 전환되었다(표 1). PCR 증폭, 제한 효소 소화 및 전기영동은 RFLP에 대해 위에서 설명한 대로 수행되었다.

Table1. Molecular markers anchored on chromosome 9 of *Solanum lycopersicum* L. that were used to map the Fusarium crownroot rot resistance locus (*Fr1*).

Marker	Marker type ^a	Primer sequence (5'-3')
SSR70	SSR	F: TTTAGGGTGTCTGTGGGTCCC R: GGAGTGCGCAGAGGATAGAG
PNU-T1212	RFLP	F: GGAGGAGTTAAGTGCATGGC R: GTGACCATCGGATCCTTTGC
PNU-D4	RFLP	F: CAGCTGAAAGATGTCACCCA R: TGATCATTTACAAGGCGGCA
PNU-100431	CAPS	F: GATCACTAGTCGTCCTGGTCAA R: TTCACGATGGTCTTTATTCGT
PNU-53169	CAPS	F: AGAGACGGTACATGCTTTGACA R: GTTCATTTGCATGGCTTCCT
SSR237	SSR	F: GTGGTAACGGCAAAGGGACT R: CTTATGGCCTTAGCAGCCAG
PNU-100181	CAPS	F: TGACCAAGTTGTGAGCAAGG R: GCTTCACTTGGTGCTGGTTT
PNU-100461	CAPS	F: AAGCGTCGACCTGATGTTGT R: ATGAAATGGGACCAAATGGA
PNU-CD3	RFLP	F: CGAGTGGTGCAGTTGAGAAG R: CGCTCCTCAAATCTTCCGG
PNU-43011	CAPS	F: GATGGATATCCCGCTCAAGA R: GGCTTAGGCCCTGGTTAGTC
PNU-46840	CAPS	F: GGAGTGGATAATGTTGCCTGT R: TTGCAAGAAGATTGCTGCTC
PNU-58307	CAPS	F: TTTGCAAATGTCCAAACACAA R: TACCTCAACCCGAATTGGTC
PNU-63662	CAPS	F: TTCCATCTCCCAAAAAGACG R: AAGGACTGCCCTAGTGGTT

마. *Frl* 연관 HRM marker 개발

- (1) D4 CAPS 마커(PNU-D4)의 single nucleotide polymorphism (SNP)의 검출을 위해, PCR 절편은 RAPD에 대해 위에서 설명한 대로 시퀀싱 되었다. HRM 마커를 개발하기 위해 표적 SNP를 기반으로 3'-blocked and unlabeled oligonucleotide probe (Luna Probe) (BioFire Defense, Salt Lake, Utah, USA)를 설계했다. saturating 염료 Eva Green® Plus를 사용하여 PCR을 수행하여 프로브 하에서 유전자형의 특징적인 melting curves을 생성했다. LightScanner® Instrument System(Roche, Basel, Switzerland)을 사용하여 melting curves을 생성 및 분석했다. PCR은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 후 95°C에서 20초 동안 denaturation, 60°C에서 20초 annealing 및 72°C에서 30초 extension, 72 °C에서 40초 동안 최종 extension을 포함한다. SNP 검출을 위한 프라이머 및 프로브 세트는 표 2에 설명되어 있다.

3. 결과

가. Marker-표현형 연관 마커 개발 연구

- (1) 선행연구에서 *Frl*은 염색체 9번의 long arm에 mapping 되었고 TG101(map 순서, TG101-UBC655-UBC116-UBC194-*Frl*)을 포함하는 RAPD 마커 세트와 밀접하게 연관되어 있었다. 이 map에서 UBC194는 5.1 cM로 *Frl*과 가장 밀접하게 연관되었다. AV107-4와 L3708 사이의 다형성에 대해 이러한 마커를 평가했으나 다형성 PCR 밴드는 UBC655 및 UBC116에 대해서만 재현 가능했다. UBC116에 대한 PCR band를 클로닝하고, DNA 단편의 서열을 참조 게놈(<http://solgenomics.net/>, ITAG2.3 release)에 BLAST 하였다. 이 482-bp 시퀀스(테이터는 표시되지 않음)는 물리적으로 9번 염색체의 57.8 Mb에 위치하였고 이는 토마토 EXPEN-2000 맵(<http://solgenomics.net/>)의 50~52 cM과 일치했다.
- (2) 유전적 및 물리적으로 고정된 마커로써 토마토 EXPEN-2000 맵의 9번 염색체 40~55 cM 이내에 매핑된 2개의 SSR 및 3개의 RFLP 마커를 선택했다. 선별된 SSR 마커를 PCR로 평가하고 'AV107-4'와 'L3708' 사이에서 다형성을 검출했다. RFLP 마커의 경우 PCR 절편은 무작위로 선택된 12개의 제한 효소로 분해되었고 다형성 단편은 표 1과 같이 특정 효소에 의해 검출되었다. 이러한 공개적으로 사용 가능한 마커 외에도 SolCAP SNP array를 통해 AV107-4 및 L3708 유전자형 분석에 의해 검출된 9번 염색체의 SNP에 대한 CAPS 마커를 설계했다. 총 219개의 SNP가 9번 염색체에서 발견되었고, 염색체에 널리 분포되어 있고 제한효소 부위에 harboring된 8개의 SNP가 CAPS로의 전환을 위해 선발되었다. 따라서 3.6~72.0 Mb의 9번 psuedochromosome 게놈(SL2.50ch09)을 포함하는 총 13개의 PCR 기반 마커가 개발되어 F₂ 집단의 유전형 분석에 사용되었다(표 1).

나. Marker-표현형 연관 F₂ 자손 세대

- (1) *Frl*의 게놈 위치는 'AV107-4' × 'L3708'에서 파생된 F₂ 자손을 평가하여 평가되었다. 총 345개의 F₂ 개체가 FORL 분리주 'KACC 40031'에 대한 저항성 분석에 사용되었고 9번 염색체에 물리적으로 고정된 13개의 마커에 의해 유전자형이 분석되었다. 'AV107-4'(평균 DSI = 0.23) 및 F₁ 식물체(평균 DSI = 0.18)에서 높은 수준의 저항성이 관찰된 반면, L3708은 매우 감수성(평균 DSI = 2.43)으로 관찰되었다(그림 1). F₂ 자손의 경우 DSI의 범위는 0에서 3이고 254개의 F₂ 식물은 저항성(DSI = 0)이고 91개는 감수성(DSI ≥ 1)이었다. 감수성 F₂ 개체에 대한 저항성 개체의 비율은 3:1 Mendelian 비율($\chi^2 = 0.35$, $P <$

0.05)을 따랐으며, 이는 FORL에 대한 저항성이 단일 우성 대립유전자에 의해 제어되었음을 시사한다.

- (2) F₂ 자손은 토마토 EXPEN-2000 지도의 5개와 'AV107-4'와 'L3708' 사이의 SNP에서 파생된 8개의 CAPS 마커를 포함하여 13개의 마커에 의해 유전형이 지정되었다(그림 2). 3.6 Mb(Tomato EXPEN-2000 map에서 42 cM)에 위치한 첫 번째 마커인 SSR70은 89.5%의 상대적으로 낮은 마커 표현형 일치율을 보였다. 다음으로 5.0 Mb와 6.0 Mb(48.0 cM, 50.0 cM)에 위치한 PNU-T1212와 PNU-D4는 각각 93.0%와 92.8%로 가장 높은 마커 표현형 일치율을 보였다. 그 다음 마커인 PNU-100431 (25.1 Mb)의 경우 일치율이 92.8%로 감소했으며 흥미롭게도 9번 염색체(SL2.50ch09: 3,626,502 - 56,948,073 bp, ITAG2.4 <http://solgenomics.net/>)의 넓은 물리적 영역을 포함하는 PNU-53169 (28.0 Mb), SSR237 (46.4 Mb, 50.37 cM), PNU-100181 (48.7 Mb), and PNU-100461 (56.9 Mb)의 4개 마커에 대해 동일한 수준을 유지했다.
- (3) 이 결과와 선행 mapping 연구의 결과를 통해 9번 염색체의 동원체 영역에 속하는 이 큰 염색체 블록이 일반적으로 심하게 억제된 유전자 재조합으로 인해 유전적 거리와 물리적 거리 사이의 불일치를 나타낸다고 추측된다. 그러나 다음 downstream 마커인 PNU-CD3(63.1 Mb), PNU-43011(64.5 Mb), PNU-46840(67.1 Mb), PNU-58307(68.8 Mb) 및 PNU-63662(72.0 Mb)의 경우 일치율이 90.7%에서 60.9%로 점차 감소하여 이 게놈 범위에서 마커와 저항성 유전자와 사이의 교차가 점차 증가했음을 나타낸다.

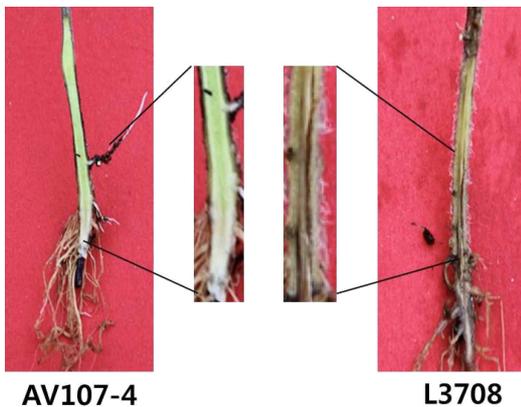


Figure1. Bioassay of two parental lines for resistance to Fusarium crown root rot (FCRR). Resistant line 'AV107-4' shows no internal browning, whereas susceptible line 'L3708' shows severe internal browning extending from the tap root into the lower stem.

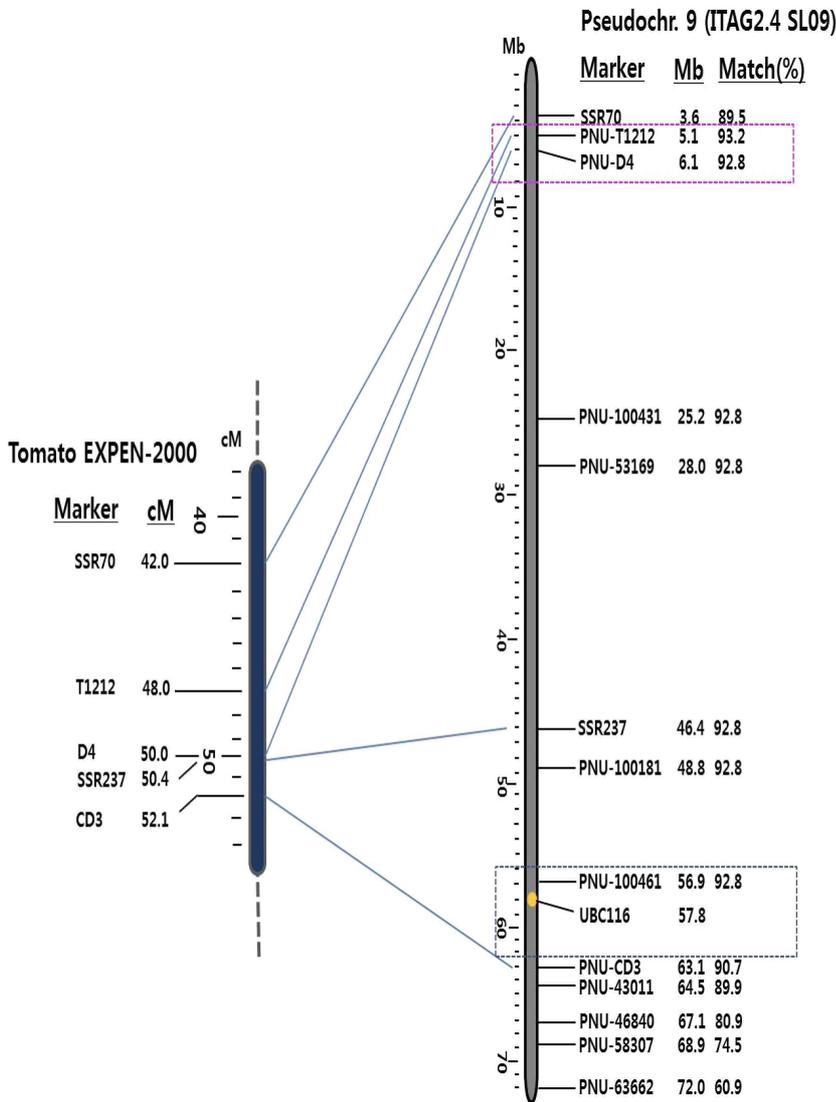


Figure 2. Genetic and physical location of 14 markers used for studying association with Fusarium crown root rot (FCRR) resistance. Despite the large physical distance between PNU-D4 and SSR237, the genetic distance is only 0.4 cM, indicating severely suppressed crossing over in this region. The previously reported possible location of *Frl* and the linked RAPD are marked by a blue dotted box and a yellow dot, respectively. In this study, PNU-T1212 and PNU-D4 showed the highest match with resistance (Match %) (pink dotted box), which implies that *Frl* is located on a pericentromeric region of short arm of Chr. 9.

다. 상용 품종에서의 Marker-표현형 연관

(1) *Frl*이 매우 제한된 교차가 발생하는 linkage block에서 운반되는 것으로 나타났기 때문에 보유한 biparental 집단에서 더 많은 마커를 추가하여 *Frl* 유전자좌를 추가로 구분하는 것은 전망이 좋지 않았다. 그 대신, 다양한 상용 잡종 토마토 품종으로 구성된 집단에서 *Frl* 과 마커의 연관성을 평가했다(표 3). 종자 회사의 설명에 따르면 이 개체군에는 43개의 FORL 저항성 품종과 17개의 FORL 감수성 품종이 포함되었다. 이러한 품종의 하위 집합 (17 품종)은 앞서 설명한 방법으로 질병 반응에 대해 분석되었다. 집중된 17개 품종 중 14

개는 저항성(DSI = 0)이었고 3개는 감수성(DSI > 1)이었는데, 이는 종자 회사의 설명과 일치하였다(표 3).

(2) 9번 염색체의 약 5.0 - 46.4 Mb (41 Mb)을 포함하는 PNU-T1212, PNU-D4, PNU-100431, PNU-53169 및 SSR237을 사용하여 60개 품종의 유전자형을 분석하였다. 예상외로 F₂ 자손에서 표현형과 가장 높은 연관성을 보인 PNU-T1212는 시험한 저항성 품종과 46.5%의 일치율을 보였으나, 감수성 품종은 모두 'Marune TY'를 제외한 marker-표현형이 일치하였다(Table 3). 반대로, 가장 높은 일치율은 마커 PNU-D4에서 나타났으며, 저항성 품종은 95.0%, 감수성 품종은 88.0%의 일치율을 보였다. 따라서 다양한 상용 품종을 사용하면 biparental F₂ 집단에서 볼 수 있는 것과 비교하여 PNU-T1212와 PNU-D4 사이에서 더 높은 교차 빈도(따라서 유전적 연관성을 더 잘 추정할 수 있음)를 탐지할 수 있다. 다른 3개의 downstream 마커는 표 3과 같이 저항성 품종과 감수성 품종 모두에 대해 감소된 일치율을 보였다. 이 결과는 PNU-T1212와 PNU-D4 사이의 연관이 특히 FORL 저항성에 대한 민간 종자 회사의 육종 과정에서 빈번한 유전적 재조합을 겪었음을 나타낸다.

Table3. Genotyping of 60 commercial hybrid cultivars by molecular markers anchored on chromosome 9 of *Solanum lycopersicum*L. that were used to study association with the Fusarium crown root rot resistance locus *Frl*. Cultivars for which bioassays were conducted and disease resistance validated are marked by asterisk. Phenotype information of all other cultivars is based on the description by seed providers.

Cultivar	Seed Provider	Pheno type	Marker Genotype				
			PNU-T1212 50900 38	PNU-D4 6097378	PNU-1004 31 25170985	PNU-53169 28023613	SSR237 46426906
Alexander Deluxe	PPS	R	S	H	H	H	H
All Round	Nongwoobio	R	R	R	R	R	R
AS6*	Daeyoun	R	S	R	R	R	R
AS7*	Daeyoun	R	S	R	R	R	R
ASD-152*	Daeyoun	R	S	H	R	R	R
ASD-312*	Daeyoun	R	S	H	H	H	H
B Blocking*	Koregon	R	H	H	R	R	R
Bacchus	Monsanto Korea	R	S	H	H	H	H
BetaAlexander	PPS	R	S	H	H	H	H
Block*	Daeyoun	R	S	H	R	R	R
Doctor Q	Nongwoobio	R	R	R	R	R	R
Dotaerang Dia	Koregon	R	S	H	H	H	H
Dotaerang Gourmet	Takii	R	S	H	H	H	H
Dotaerang Master	Koregon	R	S	H	H	H	H
Dotaerang Season	Koregon	R	S	H	H	H	H
Fighting	Takii	R	S	H	R	R	R
Ganbarune 11*	Daeyoun	R	S	H	H	H	H

Green Guard*	Daeyoun	R	R	R	R	R	R
Green Saver*	Daeyoun	R	R	R	R	R	R
Harmony	Sakata Korea	R	R	R	R	R	R
High Power*	Daeyoun	R	R	H	R	R	R
Kyupirang	Nongwoobio	R	S	H	H	H	H
Magnet	Sakata Korea	R	H	R	R	R	R
MB*	Daeyoun	R	H	H	R	R	H
Prime Alexander	PPS	R	S	H	H	H	H
Rafito	Monsanto Korea	R	H	H	R	R	R
Rex AD*	Daeyoun	R	S	R	R	R	R
Shincheonggang	Monsanto Korea	R	S	H	H	H	H
Special	Koregon	R	H	H	R	R	R
Spider	Takii	R	R	R	R	R	R
Spike 23*	Daeyoun	R	H	R	R	R	R
Suhosin	PPS	R	R	R	R	R	H
Super 334	Sakata Korea	R	H	H	H	H	H
Super sun road	Sakata Korea	R	H	H	H	H	S
Superprime	PPS	R	S	H	H	H	H
Support	Sakata Korea	R	H	R	R	R	R
Tosama*	Sakata Korea	R	H	H	H	H	S
TY Altorang	Nongwoobio	R	S	H	H	H	H
Ultra	PPS	R	R	R	R	R	R
Zuiken	Sakata Korea	R	S	H	H	H	H
Ace Kkul	Bunong seed	S	S	S	S	S	S
Biolight	Tomato life science institute	S	S	S	S	S	R
Charming	Konong seed	S	S	H	S	S	S
Dream 900*	Daeyoun	S	S	S	H	H	H
Galaxy	Hyundai seed	S	S	S	S	S	S
House Doterang	Takii	S	S	S	H	H	H
Karysma	Bunong	S	S	S	H	H	R
Koko	Koregon	S	S	S	H	H	S
Marune TY*	Daeyoun	S	H	S	H	H	H
Maskara	Bunong seed	S	S	S	H	H	R
All keeper*	Bunong seed	S	S	H	?	R	R
Sinchunggang	Monsanto korea	S	S	S	H	H	H
Super Ace	Tomato life science institute	S	S	S	S	S	S
Super Doterang	Takii	S	S	R	H	H	R
Tenten	Takii	S	S	S	H	H	S
Tiara	PPS	S	S	S	H	H	H
Umgi	Bunong seed	S	S	S	H	H	H

라. MAS 이용을 위한 HRM marker 개발

- (1) 특히 상업용 품종에서 marker-표현형 연관성에 대한 평가를 통해 PNU-D4를 FORL 저항성의 MAS에 대한 마커로 선발했다. PNU-D4를 HRM 마커로 전환하기 위해 PNU-D4용 프라이머 세트로 증폭된 PCR 단편을 'AV107-4'와 'L3708'에서 direct sequencing 했다. 두 서열의 alignment는 21개의 다형성 뉴클레오타이드 서열을 나타내었고, 그 중 한 부위에는 두 개의 복제된 서열 사이에 single-nucleotide 불일치(A/G)가 포함되어 있었다(그림 S1). 시퀀스 기반 예측은 A/G 불일치가 소화 후 단편 크기 변동을 초래하는 인과적 변동이므로 HRM 마커를 설계하는 데 이상적임을 나타낸다.
- (2) SNP 영역을 확인을 위한 melting curve 분석을 위해 3' -blocked 및 표지되지 않은 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용했다. 이 HRM 마커는 'AV107-4', 'L3708' 및 F₁을 사용하여 평가되었으며, 3개의 서로 다른 melting curves를 2개의 동형 접합 유형(A/A 및 G/G)과 이형 접합 유형(A/G)으로 구분할 수 있었다(그림 3). 이 마커는 민간 종자 회사(㈜농우바이오, 여주, 대한민국)에서 제공한 55개 육종 계통 및 품종(데이터는 표시되지 않음)의 유전형 분석에 추가로 사용되었다. Genotyping 결과는 marker genotype과 표현형이 완벽하게 일치함을 보여주었다(그림. 3).

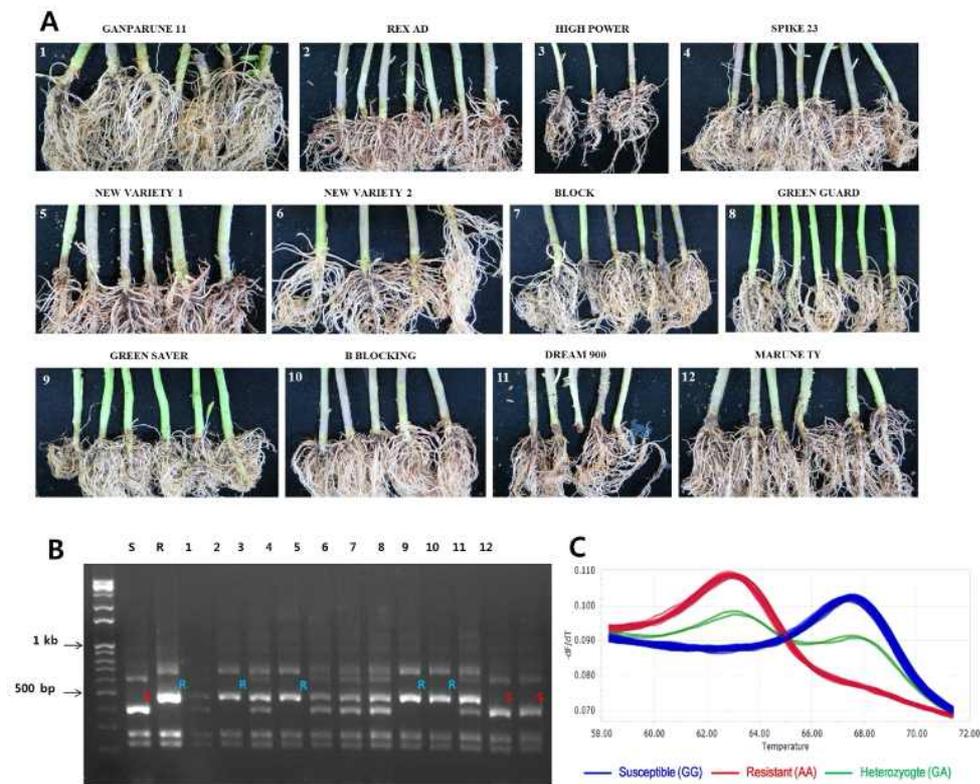


Figure. 3. (A) F₁ hybrid cultivars were evaluated for Fusarium crown root rot (FCRR). In this Figure, 12 cultivars were tested and 10 cultivars were resistant, while 2 (#11 and 12) were susceptible. (B) Marker PNU-T1212 and PNU-D4 were tested on these cultivars and PNU-D4 (CAPS) genotype was perfectly matched with the disease response, while PNU-T1212 showed 50% match. The result indicated that a high level of genetic recombination occurred between these markers in this population, and possibly, PNU-D4 is more closely linked to *Frl*. (C) PNU-D4 was converted to high-resolution melting (HRM) marker and tested on 55 breeding lines resistant or susceptible to FCRR. A perfect match between PNU-D4 HRM marker genotype and FCRR resistance

was observed.

제 4 절. 토마토 회색잎점무늬병 내병성 마커 개발

1. 연구수행 배경

- (1) 회색잎점무늬병(GLS)은 고추(*Capsicum annum* L.), 목화(*Gossypium hirsutum* L.), 시금치(*Spinacia oleracea* L.), 및 토마토(*Solanum lycopersicum* L.)과 같은 다양한 원예작물에서 *Stemphylium* (Sm)에 의해 일어남. GLS는 전 세계적으로 분포하지만 특히 습한 열대 및 아열대 지역에 영향을 미침. Sm에 감염된 토마토 식물은 노란색 후광이 있는 작은 반점이 생겨 결국 회색 중심과 짙은 갈색 테두리가 있는 괴사 병변이 됨. 심하게 영향을 받은 식물에서 잎의 병변의 중심에 구멍이 있는 백화증이 되며 결국 떨어지게 됨. 토마토 GLS를 유발하는 병원체는 주로 4종이 있음: *Stemphylium solani*, *S. lycopersici* (syn. *S. floridanum*), *S. botryosum* 및 *S. vesicarium*. 한국의 토마토 재배 지역에서 *S. lycopersici* 및 *S. solani*에 의한 GLS 발생은 이전에 보고된 바 있음. GLS에 저항성이 있는 토마토 품종을 심는 것이 질병에 의한 손실을 막기 위한 이상적인 방법임.
- (2) Sm이라는 저항성 유전자는 야생 토마토 종인 *Solanum pimpinellifolium*에서 확인됨. Sm 유전자는 앞서 언급한 Sm 종에 대한 광범위한 저항성을 제공하며 단일 불완전 우성으로 유전됨. 현재 이용 가능한 GLS 저항성 토마토 품종은 표현형에 따라 저항성 식물을 선발하는 기존의 교잡 육종을 통해 Sm을 엘리트 계통으로 유전자 이입하여 개발함. 마커를 이용한 선발(MAS)에 의해 즉 Sm 형질을 보유하는 식물을 Sm 유전자 좌에 밀접하게 연관된 DNA 마커를 사용하여 묘목 단계에서 선발하여 Sm 저항성 품종의 육성을 용이하게 할 수 있음. Sm 저항성인 'Motelle' 과 감수성 'Moneymaker' 의 F2를 이용하여 Sm을 Chr11에 매핑한 바가 있음. 또 이는 *Fusarium* race 1에 대한 저항성 유전자와 연관되어 있는 것으로 밝혀짐. 후에 PCR 기반 CAPS 마커인 'CT55'를 제작했으나 열성 마커이기 때문에 이형 및 동형 감수성 식물은 동일한 PCR 밴드 패턴을 가짐. 최근에는 'Motelle'을 스스로 사용하여 BSA 분석으로 11번 염색체에 37개 유전자를 포함하는 0.26Mb의 게놈 간격에 매핑했음. 또한, D5을 목표로 한 서열 특성화된 증폭 영역(SCAR) 마커는 Solyc11g011880.1.1 유전자로부터 개발되었으며, 이는 저항성 좌와 공동 분리됨. 보다 최근에는 '9706' 저항성 계통에서 파생된 분리 집단을 정교한 매핑하여 두 SCAR 마커인 InDel343 및 InDel-FT-32 사이의 185kb 간격 내에서 Sm 유전자좌를 확인함. 후보 유전자인 ORF9는 185kb 간격에서 여러 ORF(Open Reading Frame)의 VIGS(virus-induced gene silencing)에 의해 확인되었으며, 공우성 마커인 Sm-InDel은 이 후보 유전자 부근에서 제작함. 그러나, ORF9에 대한 서열 데이터와 유전자로부터의 직접적인 마커의 제작은 기술되지 않음.
- (3) GLS은 한국의 온실 생산, 특히 체리 또는 포도, 토마토에서 발견되었음. 몇몇 상업용 품종은 육종회사에서 Sm 저항성이라고 주장하고 있지만, 한국의 Sm 분리주를 이용한 유전자원의 대규모 질병 스크리닝은 보고되지 않음. 또한, 알려진 Sm-linked DNA 마커의 적용 가능성은 한국의 Sm 분리주에 대해 검증하지 않음. 본 연구는 상업용 F1 잡종 및 엘리트 육종 계통을 포함하여 토마토 유전자원에서 숙주 반응을 평가하고 *S. lycopersici*의 한국

분리주에 저항성을 갖는 품종을 선발하기 위한 Sm 연관 마커의 사용을 검증하는 것을 목표로 하고 있음.

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료

30개의 상업용 F1과 50개의 엘리트 inbred line을 포함하는 토마토 품종들이 이 연구에서 사용되었음. 상업용 F1의 종자와 엘리트 inbred 계통의 종자는 각각 민간 종자회사와 부산대학교 식물유전육종연구센터에서 제공했음.

나. 병원체 유지 및 병 분석

Sm 분리주(PNU-SM01)는 강릉원주대에서부터 얻었고 Potato Dextrose Agar(PDA; Difco, Detroit, MI, USA) 및 V8 주스 한천(V8; HiMedia, Mumbai, 인도)에 넣어 곰팡이 균사를 유지시키고 12시간 명암에서 25°C에서 배양시킴. 병 분석을 위해 토마토 식물은 세 번째 분엽이 완전히 발달될 때까지 플라스틱 화분에서 재배함. 다음과 같이 분생포자 현탁액으로부터 접종물을 제조함. 배양물을 25°C에서 12시간/12시간 NUV(Near-Ultra Violet) 명암 하에서 15일 동안 V8 한천에서 성장시켰음. 분생포자는 멸균 증류수를 붓고 부드럽게 솔질하여 배양액에서 분리한 다음 균사체 조각을 제거하기 위해 거즈를 통해 여과함. 분생포자 현탁액 (1×10^5 분생포자 mL⁻¹)을 0.1% Tween 20 몇 방울과 혼합하고 분무기로 토마토 식물에 분주함. 접종된 식물은 질병 증상이 감수성 참조 식물의 증상과 비슷할 때까지 15일 동안 통제된 환경 챔버에서 12시간 광주기 및 90% 상대 습도로 25°C에서 배양함. 질병 중증도 지수(DSI)는 0에서 4까지의 시각적 척도를 사용하여 평가되었으며, 여기서 0: 병든 잎 조직의 < 5%; 1: 5-25% 병든 조직; 2: 병든 조직이 25-50% 이상; 3: 병든 조직의 50-75% 이상; 및 4: > 75% 병에 걸린 조직임. DSI는 다음과 같이 계산되었음: DSI = (모든 시각적 척도 값의 합 X 100) / (총 관찰 횟수 X 최대 척도 등급). 숙주는 저항성(R): DSI < 10%, 중도 저항성(MR): DSI = 10 - 30% 및 감수성(S): DSI > 30% 로 결정되었음.

다. 병원체 동정

- 진균 DNA 추출 균사체 (균사, 분생자 및 분생자)를 ddH₂O와 혼합하고 멸균 스팟틀라로 V8 한천에서 부드럽게 문질러 제거했음. 수집된 균사체를 1.5mL 튜브로 옮기고 14,240xg에서 2분 동안 원심분리했음. 그런 다음 상층액을 버리고 600 μL의 DNA 추출 버퍼(Kim et al. 2016)를 각각 튜브 넣고 65°C에서 45분 동안 배양함. 용해물을 200 μL의 7.5 M 암모늄 아세테이트와 혼합하고, 15분 동안 얼음 위에 놓은 다음, 14,240 xg에서 10분 동안 원심분리했음. 상층액을 2.5μL 글리코젠 용액(10mg mL⁻¹) 및 600μL 이소프로판올을 포함하는 새로운 1.5mL 튜브로 옮겼음. 14,240xg에서 10분 동안 원심분리한 후, 액체를 조심스럽게 따라내고, DNA 펠렛을 300μL의 70% 에탄올로 세척하고, 건조시키고, 50μL Tris-EDTA 완충액에 재현탁시켰음. DNA 품질과 농도는 Nanodrop 1000 Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 확인함.

라. 내부 전사 스페이서(ITS) 영역 및 gpd의 시퀀싱

- rDNA의 ITS 영역과 병원체의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자(gpd)는 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGGCGG-3'); ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

및 *gpd1*(5'-CAACGGCTTCGGTTCGCATTG-3'); *gpd2* (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') 프라이머 세트를 사용하여 각각 증폭함. PCR 증폭은 2 μ L 게놈 DNA(20ng μ L⁻¹), 2 μ L 10x buffer Solg™(SolGent, Daejeon, Korea), 0.4 μ L dNTP(10 mM, SolGent), 1 μ L의 각 프라이머(10 pmol) 및 0.2 μ L eTaqSolg™ Taq 중합효소(5 U μ L⁻¹), SolGent)를 혼합하여 총 20 μ L으로 PCR 증폭을 진행함. 증폭은 다음과 같이 T100™ 열순환기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 아래와 같은 조건으로 수행했음. 94°C에서 10분 동안 변성한 다음 94°C에서 1분 동안 변성, 55°C에서 1분 동안 합성, 72°C에서 1분 동안 확장의 40반복했음. 증폭 산물은 2%에서 전기영동하고 아가로스 겔 및 Expin™ Gel SV 겔 추출 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 정제함. 정제된 PCR 산물은 Genotech(대전, 한국) 사용하여 직접 염기서열을 분석했음.

마. 서열 및 계통발생학적 분석

- PNUM01 분리주의 ITS 및 *gpd* 서열에 대한 상동 유전자는 BlastN을 사용하여 국립 생명공학 정보 센터(NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 데이터베이스에서 검색함. Blast 검색에서 얻은 시퀀스는 MEGA 소프트웨어 버전 X를 사용하여 정렬하고 수동으로 검사하고 필요한 경우 조정했음. *Stemphylium* spp.의 계통도 ITS와 *gpd*에 대한 시퀀스 데이터 세트를 기반으로 neighbor-joining 방법을 사용하여 제작함. 거리는 1000개의 부트스트랩 복제가 있는 JukesCantor 모델에 따라 결정되었음. *Alternaria alternaria*(EGS 34-016) 및 *Cochliobolus sativus*(AF071329, AF081385)를 외부 그룹으로 사용했음.

바. Sm-linked marker의 개발 및 검증

(1) CT55 열성 마커를 공동우성 마커 CT55-Co로 전환

- CT55 마커에 대한 RFLP 클론의 삽입 서열(Ji and Scott 2009)은 마커 이름을 검색하여 Sol Genomics Network(SGN) 데이터베이스에서 얻었음. 삽입물의 게놈 위치 및 전장 유전자 서열은 SGN 데이터베이스의 토마토 참조 게놈 어셈블리 버전 SL3.0에 대해 BlastN에 의해 검색되었음. blast에 의해 확인된 2개의 유전자 상동체의 게놈 서열은 CLUSTALW를 사용하여 정렬되었으며, 뉴클레오티드 변이를 비교했음. CT55-Co 마커에 대한 프라이머 쌍은 목표 유전자에 특이적인 뉴클레오티드 변이를 기반으로 설계되었음.

(2) dCAPS 및 KASP 마커 제작

- 전장유전체연관분석을 통해 발견한 Sm 연관 SNP의 게놈 위치(C/T, SL2.50 ch11_9,317,565 bp) Su et al. (2019)를 SGN 데이터베이스에서 토마토 참조 게놈 어셈블리 버전 SL4.0(iTAG 4.0)을 검색했음. dCAPS 마커(Sm-SNP)는 dCAPS finder 2.0(<http://helix.wustl.edu/dcaps/>) 및 Primer3 프로그램(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 기반으로 설계되었음. Sm-linked SNP는 Real-Time PCR 기반의 고효율 자동 유전자형 분석을 위한 마커(Sm-KASP)인 KASP로도 전환되었음. Sm-KASP에 대한 KASPTM Assay(Allele-1 forward, Allele-2 forward, reverse primers)는 LGC genomics(Teddington, England)에 의해 설계 및 합성되었음.

(3) Sm 연관 DNA 마커의 유전자형

- Sm-linked DNA markers(CT55, CT55-Co, D5, Sm-InDel, Sm-SNP, and Sm-KASP)의 유전형 분석을 위해(Table 2), 토마토 묘목의 1~2번째 본엽을 채취하여 게놈 DNA를 Kim

et al. (2016)의 방법을 약간 수정하여 나트륨 도데실 설페이트로 추출했음. 각 샘플은 1 μ L 게놈 DNA 템플릿(20ng μ L⁻¹), 0.2 μ L dNTP, 1 μ L의 10X 완충액, 0.5 μ L의 각 프라이머 (10 pmol), 0.1 μ L Taq 중합효소(SolGent) 및 6.7 μ L ddH₂O를 포함하여 증폭은 다음과 같이 T100TM 열순환기(Bio-Rad)에서 수행되었음. 95°C에서 5분 동안 변성, 그후 95°C에서 30초, T_m에서 합성(각 마커에 대해 °C이 표 2에 나열됨) 30초 동안, 72°C에서 확장 1분을 35회 반복하였음. CAPS 및 dCAPS 마커를 위해 PCR 증폭산물을 제한효소로 90분간 37°C에서 처리하였음. 그후의 산물은 1.5% agarose gel에서 180V에서 80분간 분리하고 ethidium bromide로 염색한 후 Gel Image Analysis System(CoreBiosystem, Seoul, Korea)을 이용하여 시각화했음. 각 샘플의 KASP 유전자형 분석은 2.5 μ L DNA 템플릿(20 ng μ L⁻¹), 대립유전자 특이적 PCR 및 최적 완충액(LGC 유전체학)을 위한 Taq 중합효소를 포함하는 2X KASP Master mix 2.5 μ L, KASP 분석 primer mix 0.07 μ L를 포함하여 총 5 μ L의 부피에서 수행했음. 혼합물은 다음 조건 하에서 Lightcycler® 480 Instrument II(Roche, Basel, Switzerland)에서 증폭되었음: 94°C에서 15분 동안 hotstart 활성화, touchdown PCR(94°C에서 20초; 55°C, 1분 동안 주기당 -0.6°C) 및 추가 열 순환의 26주기(20초 동안 94°C, 1분 동안 55°C). 37°C에서 1분 동안 플레이트 판독 후, end point genotyping data는 Lightcycler® 소프트웨어 버전 1.5.0(Roche)에서 분석되었음.

사. ORF9 서열의 특성화

(1) ORF9의 게놈 위치 확인

- 기존에 VIGS용 클로닝 벡터를 구성하기 위해 사용한 forward 및 reverse primer 시퀀스를 토마토 참조 게놈 어셈블리 SL4.0에 대해 blast 했음. ORF9의 구조는 FGENESH 프로그램(<http://www.softberry.com/>)을 사용하여 참조 게놈 시퀀스를 기반으로 예측함. ORF9의 단백질 기능은 NCBI BLASTP에 의해 확인했음.

(2) 다형성을 검출하기 위한 ORF9 영역의 클로닝

- 3개의 PCR 프라이머 세트는 'Moneymaker'와 'Motelle'의 ORF9의 코딩 서열(CDS) 영역을 복제하기 위해 Primer3로 설계함. 각 샘플은 5 μ L 게놈 DNA 주형(20ng μ L⁻¹), 1 μ L dNTP, 5 μ L의 10X 완충액, 2.5 μ L의 각 프라이머(10pmol), 0.5 μ L Taq 중합효소(SolGent) 및 33.5 μ L ddH₂O를 포함하는 50 μ L의 PCR 반응 혼합물에서 증폭되었음. 반응은 T100TM 열순환기(Bio-Rad)에서 다음 조건 하에 수행했음. 95°C에서 5분 동안 변성 후 95°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 합성, 및 72°C에서 1분 동안 확장을 35회 반복했음. PCR 산물을 1.5% 아가로스 겔에서 160V, 30분 동안 분리하고 Expin™ Gel SV 추출 키트(GeneAll)를 사용하여 정제했음. 정제된 PCR 산물의 벡터 클로닝 및 세포 형질전환은 Dyne™ TA kit(Dynebio, 경기도, 한국)를 사용하여 수행했음. Exprep™ Plasmid SV 미니 키트(GeneAll)를 사용하여 competent cell에서 벡터 DNA를 정제했음. 모든 절차는 제조사의 지시에 따라 진행함. 정제된 벡터 DNA는 제노텍(대전, 한국)의 염료-종결자(dye-terminator) 방법을 사용하여 시퀀싱되었으며, 생성된 삽입 서열은 Multalin 프로그램(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)을 사용하여 정렬되었음.

3. 내용 및 결과

가. Sm 병원체의 동정

- PNU-SM01 분리주는 PDA와 V8 한천 배지에서 배양했을 때 회백색의 균사체와 함께 어두운 올리브색 콜로니를 형성하고 황갈색 내지 적갈색 색소를 분비함 (그림 1a,b). 현미경 검사에서 PNU-SM01 분생포자는 기존에 보고된 *S. lycopersici*의 분생포자와 형태학적으로 유사한 것으로 확인했음. 구체적으로 분생포자는 장타원형이며 세로 격벽 1~3개, 가로 격벽 3~4개가 관찰되었음 (그림 1c). *S. solani*의 분생포자는 *S. lycopersici*의 분생포자와 구별되는데, 이는 대칭적으로 점점 가늘어지는 중심핵과 더 뾰족한 정점으로 더 길고 가늘다고 보고된 바가 있음. PNU-SM01 분리주의 병원성은 Sm에 감수성인 'Moneymaker' 식물을 이용하여 검증하였음. 접종 5일 후 잎에서 GLS의 전형적인 병 증상의 발달이 관찰되었으며, 이는 PNU-SM01이 'Moneymaker'에 병원성을 나타냄을 확인할 수 있음 (그림 1d). ITS 영역 및 *gpd*의 서열은 GenBank에서 얻은 서열과 BLAST를 하여 비교했음. 그 결과 ITS 염기서열은 *S. lycopersici*와 99.0%, *S. solani*와 98.1% 동일성을 나타냈음. 반면 *gpd* 시퀀스는 각각 99.0% 및 94.2% 동일성을 보였음. ITS-5.8S rDNA 및 *gpd* 영역을 사용한 계통발생 분석은 PNU-SM01이 *S. lycopersici*를 포함하는 하위 그룹에 속하게 되어 본 연구에 사용된 다른 *Stemphylium* 종과 명확하게 구별됨을 보여주었음(그림 2).

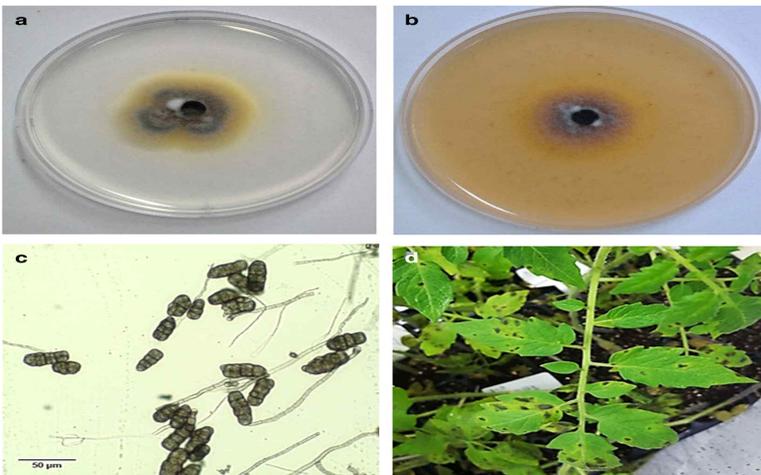


그림 1. 한국에서 분리된 균주의 병원체 동정; a. PDA에서의 성장, b. V8 배지에서의 성장, c. 분생포자와 분생포자경, d. 'moneymaker'에 대한 병원성 시험 및 감염된 잎의 증상

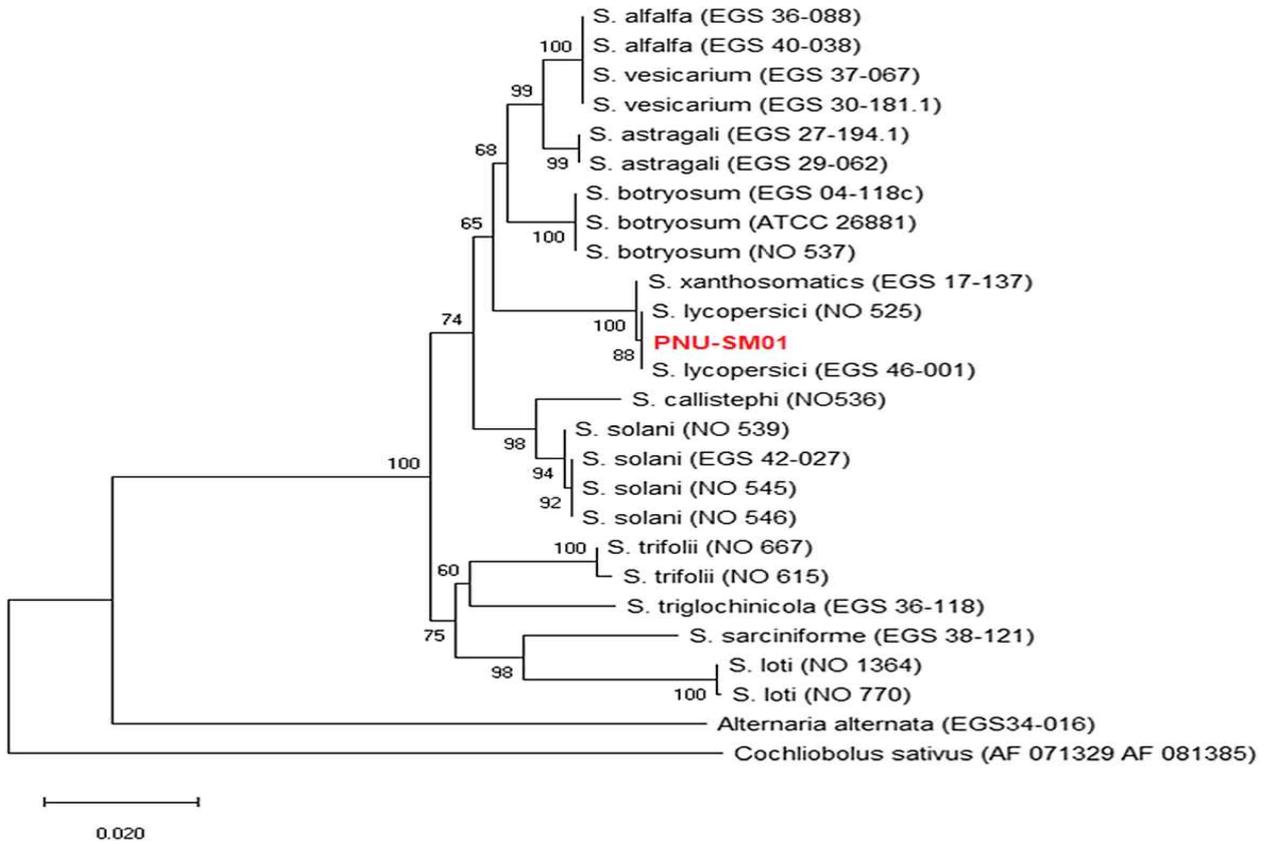


그림 2. ITS 영역 및 gpd 염기 서열을 기반으로 한 계통도

나. GLS 분석

- 총 80개의 토마토 품종을 사용하여 PNU-SM01 분리주에 대한 반응을 평가함. 'Motelle'(DSI = 4.0) 및 'Moneymaker'(DSI = 79.3)를 저항성(R) 및 감수성(S)의 기준으로 사용했음. 대부분의 품종의 DSI는 R 또는 MR 범위 내에 있음 (그림 3). 한국, 일본, 유럽에서 개발된 30개의 상용 F1 중 5개가 S로 평가되었음. 반면 Sm-저항성으로 보고된 17개 F1을 포함하여 나머지 25개는 R 또는 MR임을 확인함. 48개의 inbred line 중에서 4개가 S이고 R로 보고된 5개의 LA 계통을 포함하여 44개는 R 또는 MR임을 확인함.

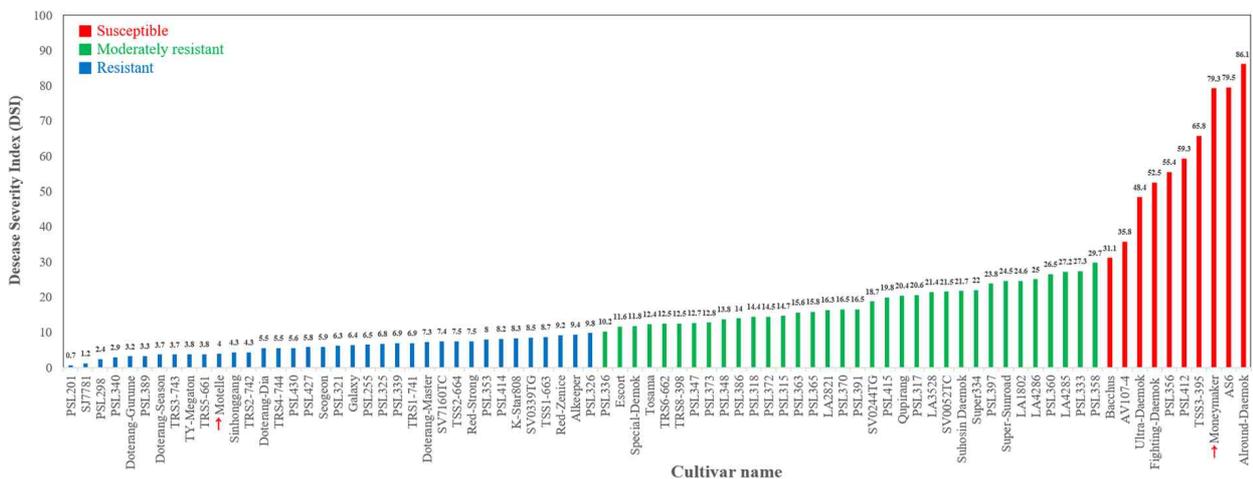


그림 3. *S. lycopersici*(PNU-SM01)를 접종한 80품종 토마토에 대한 회색잎 반점의 질병 민감도

지수(DSI); DSI < 10, DSI = 10 - 30, DSI >30인 품종은 각각 저항성(R), 중등도 저항성(MR), 감수성(S)으로 판단함. Motelle과 Moneymaker는 화살표로 표시되어 있음.

다. Sm 연관 DNA 마커의 검증

- Sm 저항성의 MAS 적용 가능성을 평가하기 위해 이전에 보고된 3개의 Sm 연관 DNA 마커인 CT55, D5 및 Sm-InDel의 유전자형을 분석했음. CT55는 열성 마커로 이형 및 감수성 동형접합 식물은 동일한 PCR 밴딩 패턴을 가지기 때문에 구별할 수 없음. 404 bp의 PCR 증폭 산물은 Sm-저항성('Motelle'에 대한 대립유전자) 및 Sm-감수성('Motelle'에 대한 대립유전자) 유전자형 모두에 대해 생성되었음. PCR 산물을 Dde I로 절단한 후, Sm 저항성 유전자형은 194 bp, 134 bp, 76 bp의 3개 단편을 생성한 반면, Sm에 대한 감수성 및 이형 접합체 둘 모두에서 328 bp, 194 bp, 134 bp 및 76 bp의 4개 밴드를 생성했음. 따라서 CT55 마커 유전자형 분석에서 4개의 밴드를 나타내는 품종은 동형 접합체 감수성(S) 또는 이형 접합체(H)로 판단하였고, 3개의 밴드를 나타내는 품종은 동형 접합체 저항성(R)로 판단하였음. R 마커 유전자형을 나타내는 53개 품종의 경우 5개 품종이 병원성에 대한 반응이 민감한 것으로 평가되었음. 반면에 S/H 마커 유전자형이 있는 27개 품종의 경우 5개는 표현형이 S이고 22개는 R 또는 MR임.
- D5 마커의 경우 'Motelle'과 'Moneymaker' 사이에 다형성이 관찰되지 않았으며 모든 품종에서 같은 결과가 나왔음. D5 마커가 'Motelle'의 876bp 단편과 'Moneymaker'의 820bp 단편을 증폭했다고 보고된 바가 있음. 이번 실험에서는 모든 품종은 876bp의 단편을 증폭했음.
- Sm-InDel은 Sm 유전자 좌의 후보 유전자(ORF9)로부터 15kb 하류에 위치한 SCAR임. 80개 품종에서 Sm-InDel 마커 검증 결과 마커 유전자형과 표현형 결과가 대부분 일치함. GLS 분석에서 Sm-감수성인 6개 품종(4개의 F1 잡종 및 2개의 inbred line)만이 R 또는 H 마커 유전자형을 나타냈음.

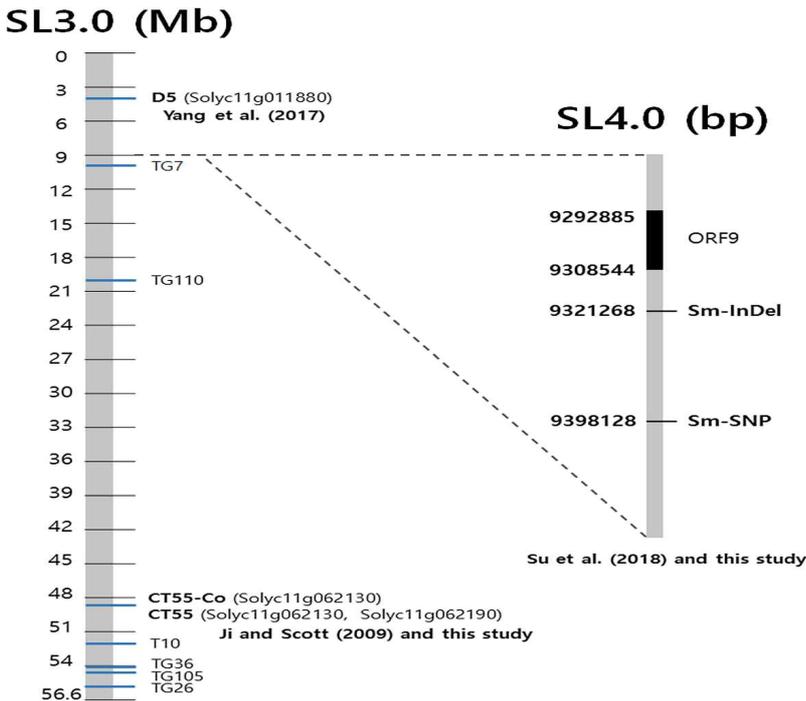


그림 4. 11번 염색체 위의 Sm 연관 마커

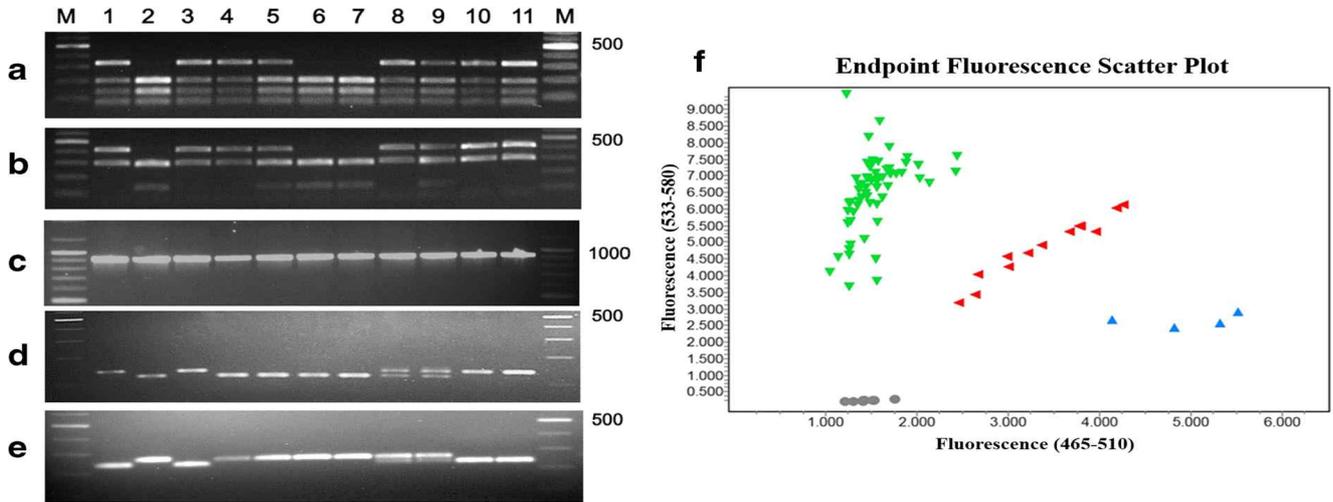


그림 5. Sm 연관 마커에 대한 유전자형 결과: a CT55. b CT55-Co. c D5. d Sm-InDel. e Sm-SNP (Agarose gel lane 1, 'Moneymaker'; lane 2, 'Motelle'; lane 3, 'Bacchus'; lane 4, 'Doterang Dia'; lane 5, 'Doterang Master'; lane 6, 'Escort'; lane 7, 'Galaxy'; lane 8, 'Qupirang'; lane 9, 'SV0052TC'; lane 10, 'AV017-4'; lane 11, 'TSS3-395'; M, 100 bp DNA size marker). f Sm-KASP [초록색, 저항성 동형접합체 (TT); Red, 이형접합체 (CT); Blue, 감수성 동형접합체 (CC); Gray, No-Template-Control]

라. 열성 CT55 마커를 공동 마커로 전환

- MAS가 효율적인지 확인하기 위해 특정 형질에 대해 이형접합과 동형접합 유전자형이 구별될 수 있어야 함. 이를 위해 여기에서는 CT55를 세 가지 유전자형 모두를 구별할 수 있는 공우성 마커로 변환했음. CT55의 열성 특성에 대한 이유를 조사하면서 CT55가 유래한 cDNA 클론의 mRNA 서열(NM_001247089.2)을 토마토 참조 게놈과 blast를 했음. 이것은 Chr11에서 74kb 떨어져 있는 2개의 반복되는 유전자 서열 Solyc11g062130 및 Solyc11g062190을 확인했음. 각 유전자의 길이는 약 4kb였으며 4개의 엑손을 포함함. CT55 마커에 의해 두 유전자 서열이 PCR에서 동시에 증폭될 것임. 감수성 대립유전자(A, uncut, 328/76 bp)에 대한 DdeI 효소 인식 부위는 Solyc11g062130에서 발견됨. 그러나 Solyc11g062190에서는 해당 부위가 C로 S 대립유전자 밴드(328 bp) 외에 R 대립유전자 특이적 밴드(cut, 194/135/76 bp)가 생성됨(그림. 6). 발견한 이 사실에 의해 CT55에서 S와 H가 왜 동일한 밴딩 패턴을 생성하는지 짐작할 수 있음.
- CT55의 순방향 및 역방향 프라이머의 원래 결합 부위를 약간 변경하여 Solyc11g062130에 특이적으로 결합하는 CT55-Co를 위한 새로운 프라이머 세트를 제작했음. CT55-Co는 Solyc11g062130의 단편만 증폭할 수 있음 (그림 6). CT55-Co 프라이머 세트로 증폭된 PCR 산물의 Dde I 처리 후, 'Moneymaker'에서 S 대립유전자(418/300 bp)의 특이적인 밴딩 패턴이 나타났고, 이형접합 유전자형(418/300/284/134 bp)의 특이적인 밴딩 패턴이 나타났음. 이를 통해 열성 마커가 공동 우성 마커로 성공적으로 전환되었음을 확인했음 (그림 5b). CT55-Co의 경우 유전자형과 표현형 관계에서 17개 품종만이 불일치를 보였음.

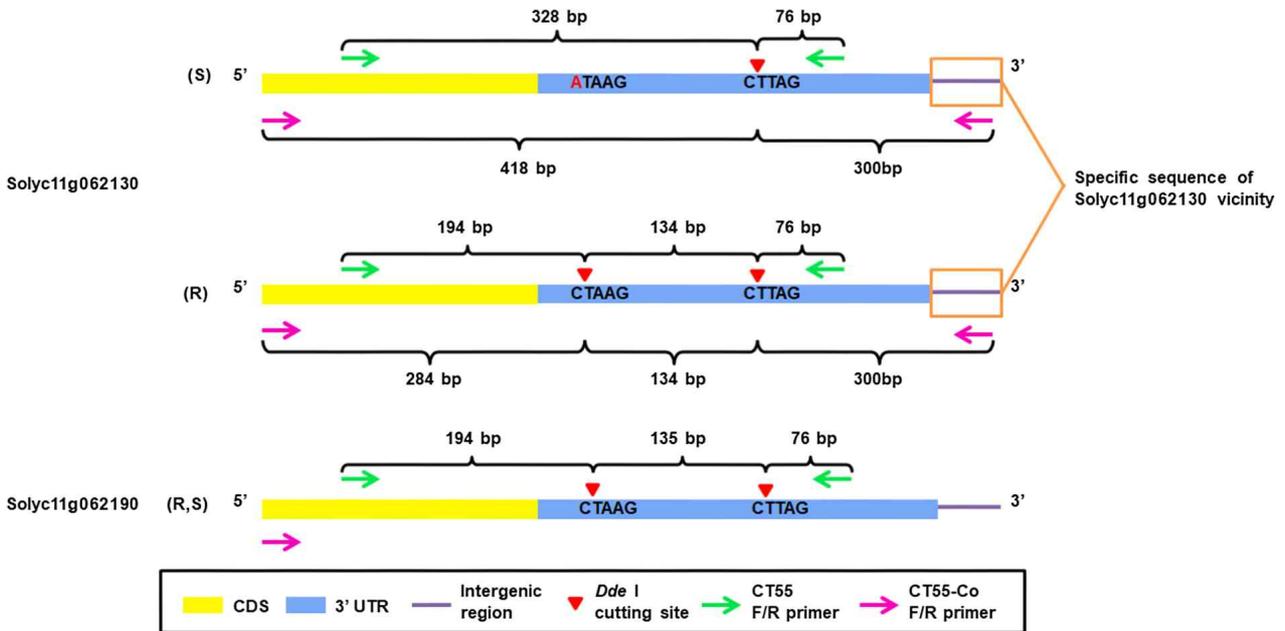


그림 6. CT55 서열을 포함하는 2개의 유전자 (Solyc11g062130 및 Solyc11g062190)

마. dCAPS 및 KASP 마커 개발

- 선행 연구에서 전장 유전체 연관 분석을 통해 Sm과 유의하게 연결된 SNP(C/T)를 확인했음. 이번 연구에서는 이 SNP를 dCAPS 마커로 변환하고 80 품종의 유전자형을 확인하여 Sm 저항성의 MAS에 대한 적용 가능성을 평가했음 (그림 5e). dCAPS 마커 (SmSNP) 유전자형은 모든 품종에서 Sm-InDel 유전자형과 완벽하게 일치했음. 제한 효소 분해 및 겔 전기 영동과 같이 dCAPS를 실행할 때 시간이 많이 걸리는 추가 단계를 피하기 위해 Sm-SNP를 적합한 KASP 마커(Sm-KASP)로 변환했음.

바. ORF9 서열의 특성화

- 선행연구에서 VIGS를 이용하여 GLS에 대한 저항성 후보 유전자로 ORF9에 대하여 보고한 바가 있음 (그림 4). 이번 연구를 통해 이를 특성화하는 것을 목표로 하고 'Motelle'과 'Moneymaker'의 ORF9 염기서열 사이의 다형성을 기반으로 한 마커를 개발하고자 함.
- VIGS 에 사용된 ORF9의 프라이머 서열을 blast하여 Chr11의 277bp 영역 (SL4.0 chr11: 9,295,938 - 9,296,214 bp)에서 두 개의 프라이머를 확인했음. ORF9의 전체 길이 서열을 얻기 위해 참조 계놈 SL4.0에서 277 bp 영역에 인접한 80 kb 서열(SL4.0 chr11: 9,281,433 - 9,361,726 bp)을 얻었음. 12개의 잠재적인 유전자가 예상되고 그중 3번째 유전자에서 ORF9의 277 bp 영역을 발견했음. 이 유전자의 CDS는 7개의 단백질 도메인 (Retrotrans_gag, zf-CCHC, retropepsin_like, RVP_2, RT-LTR, RVT_1 및 RNase_HI_RT_Ty3)을 암호화한다고 보고되어있음.
- 결과는 이 추정 유전자가 ORF9의 전장 서열에 상응함을 나타냈음. 계놈 영역인 ORF9에서 다형성을 찾기 위해 'Motelle' 및 'Moneymaker'를 이용하여 유전자를 PCR 클로닝하여 염기 서열을 확인하였음. 서열 정렬 및 비교는 2개의 GLS 저항성 및 감수성 라인 사이에 184개의 SNP 및 2개의 InDel(1bp, 15bp)을 포함하는 다형성을 보여줌. SCAR 마커는 15bp InDel에서 제작했음. 하지만 'Moneymaker'와 'Motelle'에서 15 bp 삽입 및 15 bp

결실에 대해 특이적인 2개의 PCR 밴드가 모두 관찰되었으며 다형성이 검출되지 않아 ORF9 동족체의 존재를 뒷받침함. SCAR 마커에 의해 증폭된 서열은 SGN SL4.0 참조 서열에 대해 blast 예상대로 높은 유사도(> 93.9%)를 갖는 서열이 12개 염색체 모두에서 검출되었음.

제 5 절. 토마토 흰가루병 내병성 *ol-2* 유전자 기반 마커 개발

1. 연구수행 내용

가. 흰가루병 발생과정 및 Marker-Assisted-Selection 시스템 개발

- (1) 토마토 흰가루병은 유묘단계부터 생장 단계 전반에 걸쳐 발병하며 심각한 감염의 경우 과실의 퇴화, 조기 노화, 과실 크기 및 품질 감소를 초래하여 수확량 감소 및 경제적 피해를 일으킬 수 있음. 토마토 흰가루병은 *Oidium* spp.와 *Leveillula taurica*에 의해 주로 발생하며. *Oidium* spp.는 *Oidium lycopersici*와 *O. neolycopersici*로 분류됨. *O. neolycopersici*는 전세계적으로 발생하며 *O. lycopersici*의 경우 호주에서만 발생이 보고된 바 있음.
- (2) *Oidium neolycopersici*는 포자체 발달단계에서 분생포자경에 단일 포자를 형성하며 포자 사슬을 생성하는 *Oidium lycopersici*와 형태학적으로 구별됨. 병징으로 보면 *Oidium* spp.에 속하는 두 개의 병원균은 잎과 잎자루의 윗면과 줄기에 백색 가루와 유사한 병변을 생성하지만 잎의 아래쪽에는 생성하지 않으며, *L. taurica*는 잎에만 병변을 생성하지만 잎의 위쪽과 아래쪽 모두에 생성한다는 면에서 차이점이 있음, 한국에서 *L. taurica*에 의한 흰가루병의 발생은 1995년 진주에서 보고되었으며. 현재까지 *Oidium* spp.의 국내 연구는 거의 공개되지 않았음.
- (3) *Oidium* spp.에 의해 발생하는 흰가루병에 저항성을 가지는 토마토 계통이 보고되었으며, 저항성의 유전적 기작 역시 연구되었음. 야생종 토마토인 *S. habrochaites*에서는 *Ol-1*과 *Ol-3* 두 개의 우성 저항성 유전자가 염색체 6번에서 발견되었으며, *Ol-5*는 이러한 유전자 좌와 밀접하게 연관되어 있음 *S. peruvianum*에서 다른 한 쌍의 대립 유전자 및 우성 유전자인 *Ol-4*와 *Ol-6*이 염색체 6번의 short arm에서 발견되었음. 흰가루병 저항성과 관련 있는 QTL 역시 야생종에서 보고된 바 있으며, *Ol-qul1*의 경우 *Ol-1*, *Ol-3*와 *Ol-5*에 인접한 염색체 영역에 위치하며 *Ol-qul2*와 *Ol-qt13*의 경우 염색체 12번의 Lv와 가까운 경우에 위치하는 것으로 보고되었음.
- (4) 흰가루병 저항성 유전자 중 단일 열성 유전자인 *Ol-2* (*Slmlo1*)의 경우 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Accession : LA1230)에서 보고되었음. *Slmlo1*의 7번째 exon의 19-bp 결실이 유전자의 기능 상실 돌연변이를 발생시키는 것으로 추정되며, 해당 영역을 이용한 SCAR 마커가 개발됨.
- (5) 현재까지 대부분의 흰가루병 저항성 자원이 토마토 야생종에서 확인되었다. 저항성 형질 외 야생종이 가지고 있는 불리한 형질들의 연관 지연(Linkage drag)로 인해 저항성 유전자

를 재배종 토마토로 이입시키는 것은 시간이 많이 소요될 수 있다. 흰가루병 저항성 유전자 연관 마커나, 유전자 마커를 이용한 MAS를 활용하면 육종 효율을 증진시킬 수 있다. 현재까지 흰가루병 저항성 유전자의 genetic mapping을 통해 연관된 마커들이 보고되었으나 MAS에 활용한 보고는 아직 많이 보고되지 않음. 본 연구에서는 국내에서 토마토 흰가루병을 일으키는 병원균을 확인하고, KNU-12에서 PM 저항성 유전자를 확인하는 것을 목표로 함. KNU-12의 PM 저항성이 *ol-2*의 새로운 대립유전자에 의한 것이며 해당 유전자를 기반으로 MAS에 활용할 수 있는 유전자 기반 분자마커를 개발함.

2. 재료 및 방법

가. 식물 집단

- (1) 부산대학교 온실에서 증식 중이던 유전자원 중 흰가루병에 강한 저항성 \circ 르 나타내는 'KNU-12'(S. pimpineliforum)을 선발하였으며 이를 감수성 우량 계통인 'PMS'와 교배하여 F₃ 111 계통을 작성함. 또한 민간 종자 회사로부터 구입하거나 제공받은 상업용 F1 품종을 SCAR 마커와 dCAPS 마커의 검증에 이용함.

나. 흰가루병 병원체 확인 및 흰가루병 병리검정

- (1) 흰가루병 병원체는 전남 무주와 경남 밀양에서 자연적으로 발생한 토마토 식물체로부터 수집하였으며, 종 판별을 위하여 사용함. 수집한 병원균을 감수성 계통인 'PMS'에 접종하였으며 DNA 분석과 현미경 분석에 사용함. 실험에 사용된 genomic DNA는 GenEx™ Plant Kit (GenEx™ Plant, Geneall, Seoul, South Korea)를 이용하여 추출하였음. PCR을 이용해 ribosomal DNA의 ITS(Internal transcribed spacer) 영역을 증폭시킴. PCR 조성 및 조건은 다음과 같음. 1 μ L gDNA 20 ng, 1 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.2 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 0.5 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (PMITS1/PMITS2)으로 조성되었음 (표 1).

표 1. 본 연구에서 이용한 Primer 정보

Use	Primer name		Primer sequence (5'-3')
ITS sequencing	PMITS ₁	F:	TCGGACTGGCCTCAGGGAGA
	PMITS ₂	R:	TCACTCGCCG TTA CTGAGGT
Genomic SIMl _{ol} sequencing	1-1	F:	AACATGTGTGCCTATTTGTTTCG
		R:	TCATTTGAAGTTTTGTGCCAAC
	1-2	F:	CGTATCTTTG GGTGCCATTT
		R:	ATGGCTAGGTCTGCAGCATT
	1-3	F:	GGCAGAAT GCGTTTCAAGTT
		R:	TTGTTTCCAAAAGTAAAATCTGACA
SIMl _{ol} 1.1 genotyping	SCAR_SIMl _{ol} 1.1	F:	GCAGCTATGTGACTCTCCCTCT
		R:	GCTGTATGGTGCCAGCTTCT

		dCAPS_SIM1o1.1	F:	TATATAGAGAAATTCTGTAGATGTGATC
			R:	TGGATAACCGCGTAATAAGT
		HRM_SIM1o1.1	F:	TGATCATAACAGGTCCATTGCAGCT
			R:	AGCTTCTAAGAGCTGTTGCCACAT
			Probe	:
				AATTCTGTAGATGGGTTTCATCAATG
Alternative assessment	splicing ASC-1		F:	GCACATTTAACTCCACAAAATCA
			R:	ATGGCACCCAAAGATACGAG

PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 94°C에서 1분, 53°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 40회 반복하였음. 증폭된 PCR 산물은 2% Agarose gel 전기영동을 통해 확인하였음. PCR product의 purification 후 pGEM T-Easy Vector System 1 (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 클로닝을 진행함. 재조합 플라스미드의 Sequencing을 dye terminator 방법을 이용하여 진행하였으며 Sequencing을 통해 얻은 두 개의 sequence (MJ_PM-1/MR_PM-1)의 ITS 영역을 NCBI에서 수집한 토마토의 PM 병원균 서열과 ClustalX 1.83 프로그램을 이용하여 비교함.

- (2) 2014년과 2015년에 걸쳐 병리검정을 수행함. 병리검정에 이용한 흰가루병 포자 현탁액은 흰가루병 병원체를 ddH2O를 이용하여 9.75×10^4 으로 희석하여 사용함. 현탁액은 3일 간격으로 식물체 전체에 살포함. 병원균 접종 후 오전 26~28°C/오후 10~15°C 조건 하에서 2주 동안 재배하고 발생한 PM 병 증상을 기록함. PM 저항성의 수준은 다음과 같이 Disease Symptom Index (DSI)에 기반하여 평가함. DSI=0, 증상없음. DSI=1, 잎 면적의 10% 미만을 포함하는 증상. DSI=2, 잎 면적의 10-30%에 증상. DSI=3, 잎 면적의 30% 이상을 포함하는 증상.

다. 흰가루병 저항성 연관 마커 검증

- (1) 기존 보고된 흰가루병 저항성 연관 마커를 이용하여 ‘KNU-12’와 ‘PMS’ 두 개의 계통의 유전자형을 분석하였음. 분석에 사용된 마커의 정보는 아래 표와 같음. ‘KNU-12’와 ‘PMS’의 genomic DNA는 SDS buffer를 이용하여 추출하였으며 PCR mixture의 조성은 흰가루병 병원균 확인 때와 동일하게 진행하였음. PCR 조건은 94°C에서 2분간 초기 변성시키고, 94°C에서 15초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복하였음. PCR 증폭 산물은 1.0% agarose gel에서 130V에서 1시간동안 전기영동 한 후 EtBr staining을 통해 확인하였음.

라. *ol-2* 유전자 대립유전자 변이 평가 및 유전자 기반 SCAR 마커 개발

- (1) ‘KNU-12’와 ‘PMS’의 *ol-2* 서열은 *Slm1o1* (SGN accession number Solyc04g049090) 유전자 서열을 기반으로 하여 primer 3를 이용하여 디자인한 세 개의 primer를 이용하여

결정되었음. *ol-2* 유전자 기반의 SCAR 마커를 개발하기 위하여 유전자의 intron 영역에 위치한 indel 영역을 target으로 하는 SCAR_SLM1o1.1 primer pair를 디자인하였음 (표 1). 프라이머를 이용한 증폭 및 클로닝, 시퀀싱 과정은 ‘흰가루병 병원체 확인 및 흰가루병 병리검정’에 서술한 바와 동일하게 수행함.

마. Full-length cDNA 클로닝 및 유전자 기반 dCAPS 마커 개발과 HRM 전환

- (1) ‘KNU-12’와 ‘PMS’ 유묘의 6-7번째 잎을 채취하였으며 액체질소를 이용하여 분쇄하였음. Total RNA는 RNeasy[®] MINI kit (QIAGEN, Genmantown, MD, USA)를 이용하여 추출하였으며 추출한 RNA의 Quality는 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 평가함. RNA는 10 ng μL^{-1} 으로 희석하였으며 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit (Takara, Kusatsu, Japan)을 이용하여 *ol-2* 유전자의 cDNA를 합성하였음. cDNA 말단의 증폭을 위한 Gene-specific primer는 *SIM1o1* coding sequence (CDS) 영역을 기반으로 하여 디자인하였음. full-length cDNA의 서열 비교는 ClustalX 1.83을 이용하였음.
- (2) *ol-2* 유전자 기반 dCAPS 마커의 primer는 dCAPS finder (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)을 이용하여 디자인하였으며 (표 1) dCAPS 마커를 이용한 PCR은 ‘흰가루병 저항성 연관 마커 검증’에 서술된 바와 동일하게 진행함. PCR product에 대한 제한효소 처리는 0.5 μL Time-Saver[™] *Fok I* (1,000U mL^{-1} , NEB, Ipswich, MA, USA), 1.5 μL 10X Cutsmart[™] buffer (NEB), 3 μL ddH₂O를 첨가하여 10 μL 의 volume을 37도에서 1시간 동안 진행하였음. 제한효소 처리 PCR 산물은 2.5% agarose gel에서 130V에서 1시간동안 전기영동 한 후 EtBr staining을 통해 확인하였음.
- (3) High-resolution melting (HRM) 마커 개발을 위하여 목표로 하는 indel 영역을 기반으로 하여 3'-blocked and unlabeled oligonucleotide probe (Luna Probe; BioFire Defense, Salt Lake, UT, USA)를 디자인하였음 (표 1). Melting curve 분석을 위한 PCR은 LightScanner Instrument System (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행함. PCR 조건은 95°C에서 5분간 초기 변성시키고, 95°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 30초 과정을 반복한 후 72°C에서 40초간 반응시킴. 프라이머 및 프로브에 대한 정보는 표 1에 포함되어 있음.

바. Alternative transcript 확인

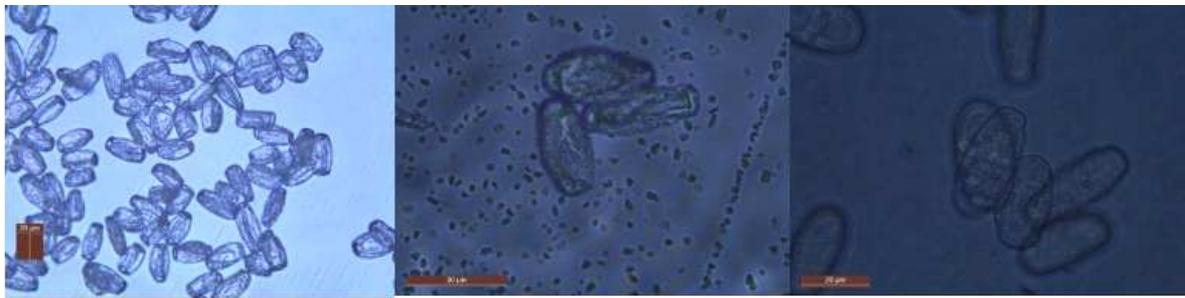
- (1) ‘KNU-12’의 본엽 4-5매의 잎을 ‘흰가루병 병원체 확인 및 흰가루병 병리검정’에 서술된 방법과 같이 접종하였음. 대조군으로 사용할 식물체는 mock inoculation을 위해 ddH₂O로 처리하였음. 접종한 잎은 접종 후 0, 12, 24, 48 시간 간격으로 샘플링하였으며 액체 질소를 이용하여 동결하였음. Total RNA 추출 및 cDNA 합성은 ‘Full-length cDNA 클로닝 및 유전자 기반 dCAPS 마커 개발과 HRM 전환’에 서술된 바와 같이 진행함.
- (2) 상보적 DNA는 *ol-2*의 9번째 엑손에 인접하도록 설계된 Primer 세트 ‘ASC-1’을 사용하여 증폭하였음 (표 1). PCR 조성은 1 μL cDNA 20 ng, 1 μL 10X Solg[™] buffer (Solgent), 0.2 μL 10 mM dNTP mixture, 0.1 μL etaqSolg[™] Taq polymerase, 각 0.5 μL 10 pmol \cdot μL^{-1} primer 으로 총 10 μL 의 volume으로 진행되었으며, PCR 조건은 94°C에서

10분간 초기 변성시키고, 94℃에서 1분, 61℃에서 1분, 72℃에서 1분 과정을 반복하였음. PCR 증폭 산물은 2.5% agarose gel에서 130V에서 1시간동안 전기영동 한 후 EtBr staining을 통해 확인하였음.

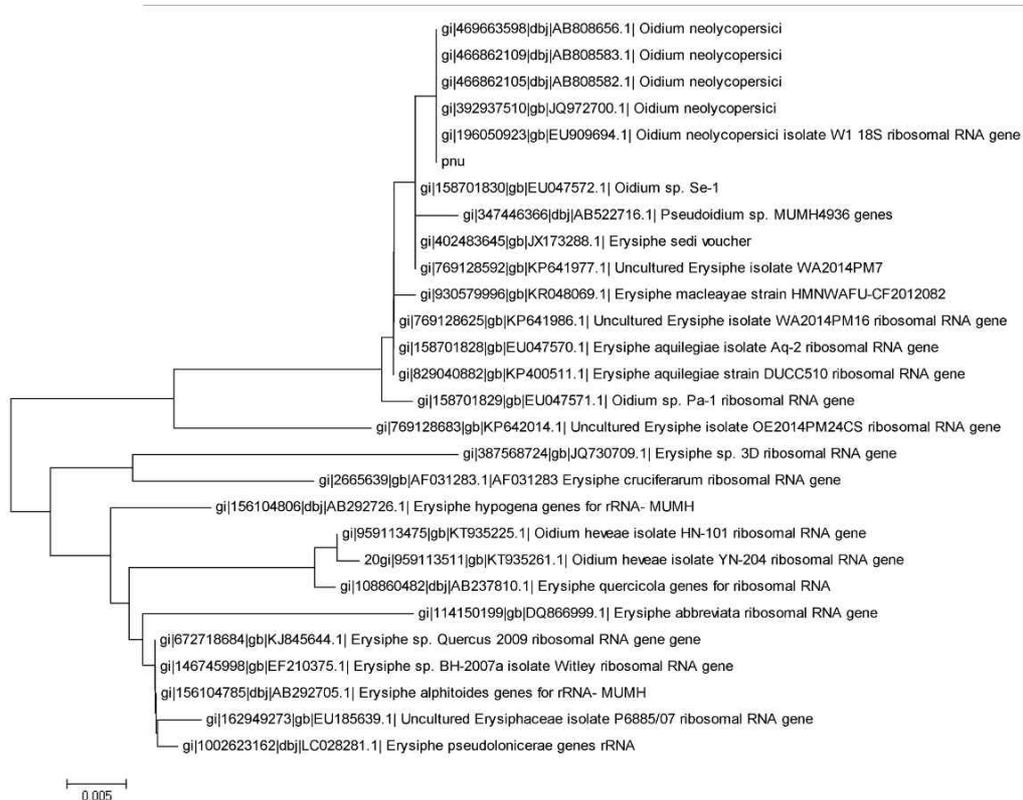
3. 내용 및 결과

가. PM 병원균 확인

- (1) 한국 무주 (MJ_PM1)와 밀양 (MR_PM1)에서 수집한 PM 병원체 시료의 형태적 특성 및 rDNA ITS 영역 서열을 분석함. 현미경 관찰에서 MJ_PM1과 MR_PM1의 표본이 나타내는 분생포자의 형태가 타원체-난형이고 평균 길이가 30um 이상인 비연속성 단일 분생포자로 나타나며 *O. neolycopersici*와 일치함을 명확하게 알 수 있었음 (그림 1).



- (2) MJ_PM1과 MR_PM1 사이에는 ITS 서열 변화가 관찰되지 않음. Erysiphales 에 속하는 다른 종들의 ITS 서열과 비교하면 MJ_PM1과 MR_PM1이 *O. neolycopersici* 와 가장 밀접하게 관련되어 있음을 알 수 있음.
- (3) MJ_PM1과 MR_PM1의 ITS 서열은 AF229019 (*O. neolycopersici*)와 100% 일치하거나 AF229015 (*O. neolycopersici*) 와 1bp 차이가 나타남. *O. lycopersici*에 해당하는 AF2209021의 경우 indel을 포함한 다양한 변이가 관찰됨. 현미경 검사 및 ITS 서열 조사 *O. neolycopersici*가 한국에서는 우세한 Oidium 변성체일 수 있음이 나타남



나. PM 저항성 평가

(1) ‘KNU-12’에서 흰가루병 저항성의 유전은 F1과 111개의 F3 계통을 이용하여 조사되었음. 2014년 무주에서 수행한 첫 번째 평가에서, F1과 87개의 F3 계통은 감수성(S, DSI=1-3), 을 나타냈으며 24개의 F3 계통은 저항성(R, DSI=0-0.9)를 나타냄. 2015년 밀양에서 수행한 두 번째 평가에서 F1과 89개의 F3 계통이 감수성, 22개의 F3 계통이 저항성을 나타냄. F3 계통의 DSI는 두 개 계통 (F3-121과 F3-144, 표 2)을 제외하고 2014년과 2015년 이루어진 두 번의 평가에서 유사한 경향을 나타냄. 두 번의 반복에 의한 DSI 값의 평균값을 계산 하였으며 최종 반응은 평균 DSI를 기반으로 하여 검정하였음.

표 2. Disease assay of powdery mildew (PM) and genotyping of ol-2 gene-based SCAR_SIMlo1.1 marker for 111 F_{2:3} families derived from the tomato (*Solanum lycopersicum*) inbred line ‘KNU-12’ (PM-resistant) x ‘PMS’ (PM-susceptible)

F _{2:3}	Phenotype ^a			Genoty		F ₂ 3	Phenotype ^a			Genoty		F ₂ 3	Phenotype ^a			Genotype ^b	
	201	201	Ave	F	pe ^b		201	201	Ave	F	pe ^b		201	201	Ave	F ₂	F ₃
	4	5	r				4	5	r				4	5	r		
1	1.2	2.3	S	H	Seg	56	1.9	2.9	S	S	S	107	1.2	2.1	S	H	Seg
2	1.3	1.9	S	H	Seg	58	2.2	2.6	S	S	S	109	2.5	2.4	S	H	Seg
3	0.0	0.4	R	R	R	59	1.9	2.6	S	S	S	110	0.2	0.1	R	R	R
7	0.0	0.0	R	R	R	60	0.0	0.0	R	R	R	112	1.4	2.2	S	H	Seg

8	1.8	2.1	S	H Seg	61	0.1	0.1	R	R	R	114	1.5	2.0	S	H	Seg
9	1.7	2.8	S	S S	62	1.6	1.6	S	H Seg	115	1.9	2.2	S	H	Seg	
10	1.9	2.8	S	S S	64	2.1	3.0	S	S S	116	1.5	2.6	S	S	S	
11	2.3	2.9	S	S S	66	2.6	3.0	S	S S	117	1.6	1.5	S	H	Seg	
12	1.6	1.6	S	H Seg	67	2.1	1.0	S	S S	119	1.3	2.4	S	H	Seg	
13	0.0	0.0	R	R R	68	2.8	2.9	S	S S	120	0.0	0.0	R	R	R	
14	1.6	3.0	S	S S	69	1.9	2.1	S	H Seg	121	0.6	2.5	S	H	Seg	
15	1.6	2.7	S	H Seg	70	1.4	1.7	S	H Seg	122	1.9	2.8	S	S	S	
17	0.0	0.0	R	R R	72	2.5	2.8	S	S S	123	2.0	2.6	S	H	Seg	
19	1.6	1.8	S	H Seg	74	2.1	1.9	S	H Seg	124	1.5	2.2	S	H	Seg	
20	1.6	2.9	S	S S	75	2.6	2.0	S	H Seg	125	1.1	1.8	S	H	Seg	
21	0.0	0.0	R	R R	76	1.4	1.9	S	H Seg	126	1.5	1.8	S	H	Seg	
25	1.7	2.7	S	S S	77	1.1	1.7	S	H Seg	127	1.7	3.0	S	S	S	
26	0.0	0.0	R	R R	80	1.0	2.0	S	H Seg	128	1.6	2.1	S	H	Seg	
28	1.5	1.8	S	S S	81	1.2	2.3	S	H Seg	131	1.5	1.6	S	H	Seg	
30	2.6	2.8	S	S S	82	0.1	0.2	R	R R	132	1.8	2.0	S	H	Seg	
32	2.3	2.9	S	S S	83	1.7	2.4	S	H Seg	133	1.4	2.1	S	H	Seg	
35	-	0.0	R	R R	84	2.1	1.7	S	H Seg	134	0.0	0.1	R	R	R	
36	2.0	2.0	S	H Seg	85	0.0	0.0	R	R R	135	1.5	1.9	S	H	Seg	
37	1.5	1.4	S	H Seg	86	1.0	2.1	S	H Seg	136	1.7	2.0	S	H	Seg	
38	1.9	2.8	S	S S	87	1.1	2.6	S	H Seg	137	1.4	2.3	S	H	Seg	
41	1.1	2.0	S	H Seg	88	2.2	2.6	S	S S	138	0.0	0.2	R	R	R	
42	0.0	0.0	R	R R	91	1.6	2.5	S	H Seg	139	1.2	2.5	S	H	Seg	
43	2.1	2.6	S	S S	94	1.8	2.1	S	H Seg	140	2.1	1.3	S	H	Seg	
44	2.3	2.9	S	S S	95	1.9	1.8	S	H Seg	141	2.4	2.7	S	S	S	
45	2.1	2.9	S	S S	96	1.7	1.7	S	H Seg	142	1.4	2.6	S	S	S	

46	1.9	2.8	S	S	S	97	1.7	2.0	S	H Seg	143	2.5	2.4	S	S	S
48	1.8	2.6	S	S	S	99	0.0	0.0	R	R R	144	0.9	2.3	S	H	Seg
49	0.0	0.1	R	R	R	101	1.6	2.6	S	H Seg	145	1.0	1.8	S	H	Seg
50	2.0	1.5	S	H	Seg	102	1.6	2.5	S	S S	147	1.4	2.0	S	H	seg
52	0.0	0.0	R	R	R	103	1.6	2.5	S	H Seg	150	2.5	2.6	S	S	S
53	1.5	2.1	S	H	Seg	104	1.8	2.3	S	H Seg						
54	0.0	0.0	R	R	R	105	1.5	2.7	S	H Seg						
55	0.0	0.1	R	R	R	106	1.8	2.5	S	S S						

(2) 최종 평가에서 저항성과 감수성 간의 비율은 저항성 (21개 F3 계통), 감수성 (90개 F3 계통)으로 1:3의 비율 ($X^2=0.68$, $P=0.41$)을 따르는 것으로 확인됨. 이를 통해 'KNU-12'에서의 흰가루병 저항성은 단일 열성 유전자에 의한 것으로 추정할 수 있음.

다. PM 저항성 마커 개발 및 표현형과의 연관 분석

(1) 기존에 보고된 흰가루병 연관 마커를 이용하여 'KNU-12'와 'PMS' 품종의 유전자형을 분석하였음 (표 3). GP79I 마커를 제외하고 모든 마커에서 동일한 유전자형이 나타났음. 우성 유전자좌인 OI-4 및 OI-6과 연관된 것으로 보고된 GP79L 마커를 이용하여 111개의 F3 계통의 유전자형을 조사하였음 (그림 2). 유전자형과 PM 저항성 간의 유의한 연관성은 나타나지 않았으며 'KNU-12'의 저항성이 해당 유전자좌에 의한 것이 아님을 알 수 있음. 'KNU-12'에서 PM 저항성의 단일 열성 유전을 보인 F1 세대의 표현형 평가도 이러한 가정을 뒷받침 할 수 있음. *ol-2*가 'KNU-12'에서 PM 저항성과 연관될 수 있음을 고려한다 해도, 유전자 기반 마커 M/SIMo11을 포함한 *ol-2* 연관 마커에서 'KNU-12'와 'PMS' 사이의 다형성이 나타난 마커는 없었음. 따라서, 'KNU-12'의 PM 저항성은 'LA1230 (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*)의 *ol-2*의 원래의 돌연변이 대립유전자와 다른 대립유전자에 의해 매개되는 것으로 보여짐.

표 3. Published DNA markers that are linked to the loci associated with powdery mildew (PM) resistance in tomato.

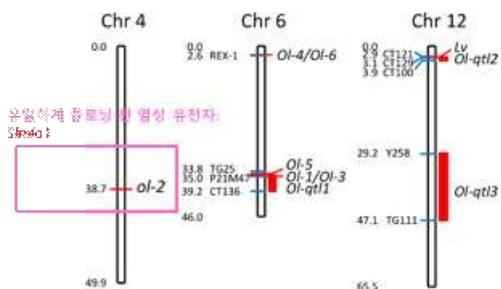
Marker	Primer sequence (5'-3')	Marker type		Target locus
		(enzyme)	Chr.	
dct136	F: CGAAGTGTCGGATCCGAAGGCTTT	dCAPS	6	<i>Ol-qt11</i>
	R: AACACAATCGGAAAAAA	(<i>Xmml</i>)		
Y258	F: GTAATCCAAAAAGTGAGGT	CAPS	12	<i>Ol-qt13</i>
	R: TTGCGTCTAGAGTTATTTT	(<i>Mbol</i>)		

tg111	F: TGCCAACCCGACAAAGA R: TGGGGAAGTGATTAGACAGGACA	SCAR	12	<i>O1-qt13</i>
P2147	F: TAACAATCTCGACCATAGTTCC R: CCATACCCGAATTCCTTCC	CAPS (<i>Ddel</i>)	6	<i>O1-1, O1-5</i>
tg25-1	F: TAATTTGGCACTGCCGT R: TTGTYATRTTGTGYTTATCG	SCAR	6	<i>O1-1, O1-5</i>
tg25-2	F: TAATTTGGCACTGCCGT R: CATGTTGYGYTTATCRAAAGTC	SCAR	6	<i>O1-1, O1-5</i>
H9A11	F: TGCTCTAACAAAATCACCAAATC R: AAATGGTCAAACAAAGTCTATTGAG	SCAR	6	<i>O1-1, O1-5</i>
Tom316	F: GAGTTGTTCTTTGGTTGTTT R: TAGATTTTTTCGTGTAGATGT	SSR	4	<i>ol-2</i>
Tom332	F: GATACCATTAAAGCTCATTC R: GGTTTCCGTCATTATGTCAG	SSR	4	<i>ol-2</i>
U3-2	F: AGTGGTTGGCGGATAGGTG R: TTGGCAAGGTGGGAAAAC	SCAR	4	<i>ol-2</i>
M/SIM1o1	F: ACCCTTAAGAACTAGGGCAA R: ACCATCATGAACCCATGTCT	SCAR	4	<i>ol-2</i>
GP79L	F: CACTCAATGGGGGAAGCAAC R: AATGGTAAACGAGCGGGACT	CAPS (<i>ApoI</i>)	6	<i>O1-4, O1-6</i>
32.5Cla	F: ACACGAAACAAAGTGCCAAG R: CCACCACCAAACAGGAGTGTG	CAPS (<i>HinfI</i>)	6	<i>O1-4, O1-6</i>

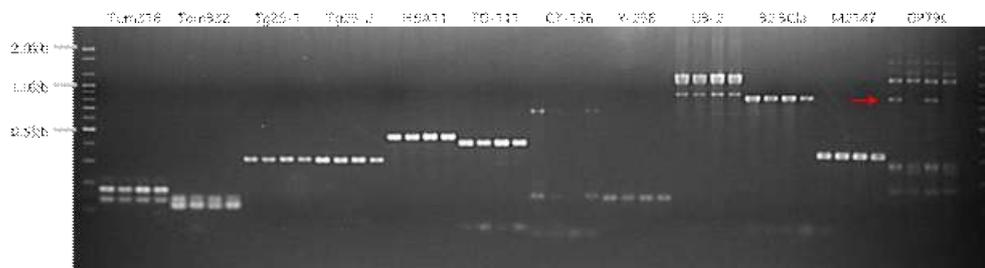


KNU-12 (*S. pimpinellifolium*)

<저항성 (KNU12)과 감수성(PMS) 재조합 F1에서 병징 상황: 단일염색>



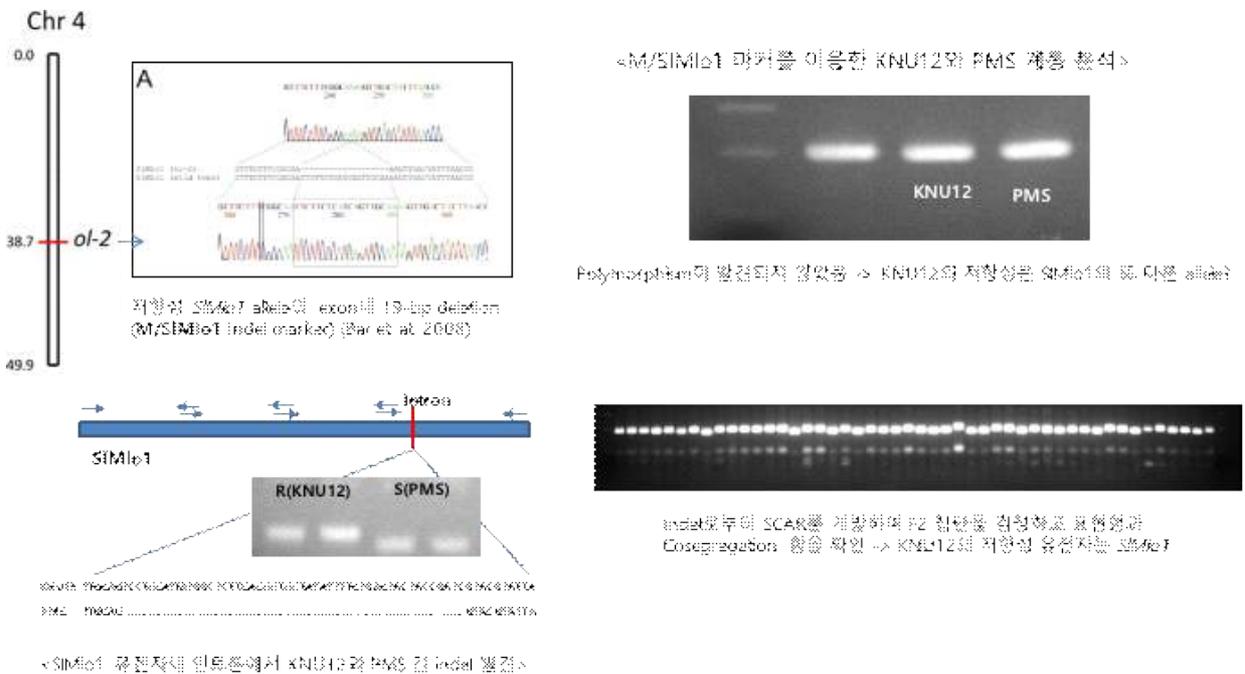
<기준 표고선 F1 저항성 locus 및 연관 마커>



<기준 표고선 F1 저항성 마커를 이용한 KNU12(왼쪽 수검체)와 PMS(오른쪽 수검체) 재조합의 유전자형 분석>

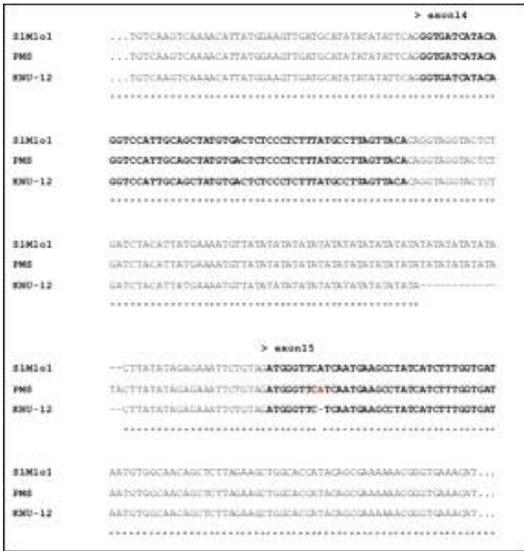
<그림 2. 흰가루 저항성/감수성 부모 계통에 대한 기존 마커의 다형성 검정>

(2) 'KNU-12'와 'PMS' 사이에 다형성인 *ol-2*에 대한 유전자 기반 마커를 개발하기 위하여 *ol-2* 유전자 (SGN accession number: Solyc04g049090; 5344bp) (그림 3) 의 genomic DNA 서열을 포함하는 3개의 primer pair (1-1, 1-2, 1-3)을 디자인하고 각 영역을 PCR로 증폭하였음. 13번째와 15번째 엑손 사이의 영역을 증폭하도록 설계된 프라이머 세트 1-3에 의해 증폭 산물 크기의 다형성이 확인되었음. 프라이머 '1-3'을 사용하여 증폭 산물의 클로닝을 수행하였음. 클로닝을 통하여 14번째와 15번째 엑손 사이에 위치한 인트론 영역에서의 14-bp의 indel [SSR 다형성; PMS, (TA)₂₁; KNU-12, (TA)₁₄]과 15번째 엑손의 1-bp indel을 발견하였음 (그림 4). Indel을 기반으로 하여 SCAR (SCAR_SIM1o1.1)와 dCAPS (dCAPS_SIM1o1.1) 마커를 개발하였음. 개발된 마커를 이용하여 KNU-12와 PMS, 두 계통 간의 F2 집단 of *ol-2* 대립유전자 유전자형을 분석하였음. SCAR_SIM1o1.1 마커의 경우 14-bp의 indel을 포함하는 프라이머를 이용하여 KNU-12에서는 182-bp, PMS에서는 196-bp 크기의 DNA 증폭산물을 확인할 수 있음. dCAPS_SIM1o1.1 마커는 1-bp의 indel을 접하며 KNU-12에서 199-bp의 DNA 증폭산물을 생성함. PMS의 경우 *BclI*을 이용한 제한 효소 처리 후 175-bp 및 24-bp의 DNA 증폭산물을 생성함 (그림 5).



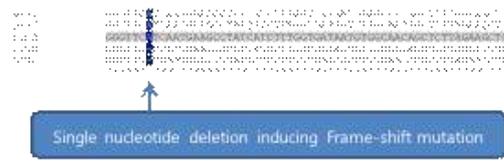
<그림 3. 기존 M/SIM1o1 indel SCAR와 'KNU-12'의 SIM1o1 유전자에서 발견된 신규 intron indel SCAR에 대한 부모본 계통 및 F2:3 집단 검정>

<Primer set 4 발현산물의 전기석출 비교분석>



<RACE PCR을 통한 full length cDNA 일기서열 분석 및 SNP 발굴>

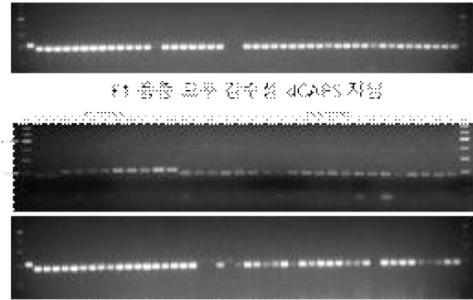
[저항성 (KNU12)과 감수성(PMS) 계통의 SIM1o1 cDNA 일기서열 비교]



Single nucleotide deletion inducing frame-shift mutation



dCAPS genotyping

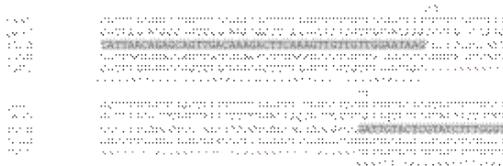


유전자원 계통들에서 저항성 dCAPS 발현을

<그림 4. 'KNU-12'의 SIM1o1 유전자 클로닝을 통해 발견된 Intron14 dml 14bp indel 및 1bp indel. 1bp indel에 기반한 dCAPS 마커 개발과 이를 이용한 감수성 F1 품종 및 다양한 유전자원 검정>

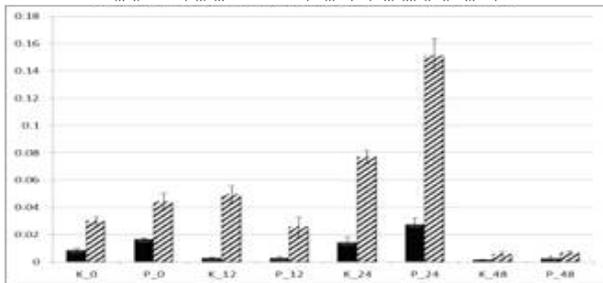
<RACE PCR을 통한 full length cDNA 일기서열 분석>

[저항성 (KNU12)과 감수성(PMS) 계통의 SIM1o1 cDNA 일기서열 비교]

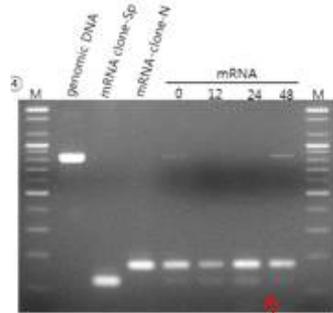


3번 exon의 결실현상(deletion)을 현 exon에서 발견 -> alternative splicing?

<집종후 시간별 SIM1o1 유전자의 발현량상 분석>



<RT-PCR을 통한 alternative splicing 확인>



spliced mRNA 존재가 매우 낮은 정도로 생성됨을 확인

- KNU12에서 SIM1o1 유전자 발현량이 감소되는 것으로 관찰됨
- 집종후 24시간 이후에는 KNU12, PMS 모두 발현량이 급격히 감소됨

<그림 5. SIM1o1 유전자의 full length cDNA 클로닝을 통한 1bp indel 재확인 및 exon8의 alternative splicing 현상 확인. 'KNU12'(K)와 'PMS'(P) 계통의 병 집종후 시간대별 유전자발현 검정>

(3) SCAR_SIM1o1.1 마커를 이용하여 111개의 KNU-12 x PMS F₂ 집단의 유전자형을 분석하였음 (그림 5). F₃ 패밀리 (F_{2,3})에서 PM 저항성을 가지는 것으로 나타난 F₂ 개체는 'KNU-12'의 마커 유전자형을 나타내며 감수성을 가지는 것으로 나타난 F₂ 개체의 경우 'PMS'의 유전자형 또는 Hetero (57 개체) 유전자형이 나타났음. 해당 결과를 추가로 확인하기 위하여 Hetero인 F₂의 각 F₃ 패밀리에서 10개의 유묘를 선택하고 genomic DNA를 추출하여 PCR을 위해 Pooling 하였음. 각 F₃ 식물의 pooling된 DNA 샘플에 샘플에 대한 모든 PCR 분석은 'KNU-12' 또는 'PMS'에 특이적인 밴드를 나타냄. 모든 F₂ 식물은 dCAPS_SIM1o1.1 마커를 이용하여 유전자형을 조사하였으며 결과는 SCAR_SIM1o101에 대한 결과와 일치하였음 (그림 5). 따라서 KNU-12의 흰가루병 저항성이 *SIM1o1*과 함께 편석된 단일 열성 유전자에 의해 부여됨을 확인하였음.

라. MAS 및 HRM으로의 마커 전환에서 유전자 기반 마커의 적용 가능성

(1) MAS에서 SCAR_SIM1o1.1 및 dCAPS_SIM1o1.1 마커의 적용 가능성은 96개의 상업용 F1 품종을 이용하여 검증되었음. 이들 품종 중 상보에 흰가루병 저항성으로 표시되지 않았으므로 흰가루병에 민감한 것으로 간주되었음. SCAR_SIM1o1.1 마커에 대한 테스트는 6개 품종에서 'KNU-12'에 특이적인 PCR 밴드를 나타내었고, 37개 품종에서 'PMS'에 특이적이었음. 나머지 품종은 다양한 PCR 밴드를 나타내었음. dCAPS_SIM1o101 마커로 테스트한 결과, 'KNU-12'에 대한 마커 유전자형을 나타내는 2개를 제외하고 모든 F1 품종이 'PMS'에 대한 마커 유전자형을 가지는 것으로 나타남. 이러한 결과는 SIM1o1.1의 15번째 exon에 있는 1-bp indel이 PM 저항성 'KNU-12'에 고유한 반면, 14번째 intron에 있는 14-bp indel은 PM에 민감한 여러 육종 계통에서 공유됨을 나타냄. dCAPS_SIM1o1.1 마커는 'KNU-12'의 PM 저항성 대립유전자의 MAS에 대한 보편적인 유전자 기반 마커로 효과적으로 사용될 수 있음.

(2) Agarose gel 전기영동을 기반으로 하는 dCAPS 마커 유전형 조사는 시간과 비용이 많이 소요되므로 Real-time PCR을 기반으로 하는 HRM과 같은 자동화된 고처리량 유전형 플랫폼에 적합한 마커가 필요함. dCAPS 마커를 HRM 마커로 전환하기 위해 1-bp indel의 melting curve 분석이 가능한 3'blocked and unlabeled oligonucleotide probe를 이용하였음. 전환한 HRM 마커 (HRM_SIM1o1.1)은 각각 'KNU-12', 'PMS' 그리고 두 계통을 이용한 F1과 F2 집단에 평가하였음. 두 개의 Homozygous type (A/A; 'PMS' 및 한 개의 F2 개체, -/- : 'KNU-12')과 Heterozygous type (A/-; F1 개체)로 세 개의 다른 melting curve가 구별되어짐.

마. *Sim1o1.1*의 Full-length cDNA

(1) SIM1o1 유전자의 full-length cDNA 서열은 'KNU-12' 및 'PMS'에서 코딩 영역의 추가 서열 변이를 확인하기 위하여 RACE PCR로 분석하였음.

(2) 각 계통에 대한 3개의 cDNA 분자(3개의 colony)의 염기서열 분석하였고, 모든 염기서열에 대해 5번째 엑손의 1-bp indel을 확인하였음. 'KNU-12'와 'PMS' 사이에는 추가적인 염기서열 변이가 감지되지 않았음. 그러나 1-bp 결실로 인한 frame-shift 돌연변이는

‘KNU-12’에서 *Ol-2* 유전자 산물(본 연구에서는 SIMlo 1.1로 지정)의 기능 상실 변이를 초래할 수 있음.

- (3) ‘KNU-12’에서 복제된 3개의 cDNA 분자 중 하나에서 전체 9번째 엑손의 결실이 검출되어 이 cDNA 분자가 다른 계통 위치에 존재하는 SIMlo 상동체에서 유래한 것인지, Simlo1.1의 RNA 처리 중 Alternative splicing에서 유래했는지 확인하고자 함. 9번째 엑손 옆에 위치한 2개의 인트론에 대한 프라이머 세트를 사용하여 ‘KNU-12’의 genomic DNA를 PCR 증폭한 결과 결실이 없는 842-bp의 Wild type PCR 밴드가 생성되어 9번째 엑손의 결실이 원인일 수 있음이 나타남. 합성된 cDNA 샘플의 PCR 증폭에 의해 Alternative splicing의 수준을 추가로 조사함. PCR 증폭 결과, 야생형 대립 유전자 크기(172-bp)의 강한 PCR 밴드 외에 집중하지 않은 오프를 포함한 모든 증폭된 cDNA 샘플에서 9번째 엑손의 결실을 나타내는 약 122-bp를 나타내는 매우 약한 PCR 밴드가 관찰됨. 따라서, Alternative splicing은 ‘KNU-12’ 및 ‘PMS’ 샘플 모두에서 매우 낮은 빈도로 발생할 수 있지만 PM 병원체 접종과는 관련이 없는 것으로 보여짐.

제 6 절. 토마토 흰가루병 내병성 QTL 마커 개발

1. 연구수행 내용

가. 흰가루 저항성 마커 개발 배경

- (1) 토마토의 흰가루병(Powdery Mildew, PM)은 서늘하고 건조한 기후 조건에서 전세계적으로 흔하게 발생되며, 감염된 식물체의 성장 정도 및 주변 환경 등의 요인에 따라 생산량의 50% 이상을 감소시킨다. 주요 병원균은 자낭균문(Ascomycota)에 속하는 순환물기생균인 *Oidium neolycopersici*, *O. lycopersici*, 그리고 *Leveillula taurica*로 알려져 있다 (Wakil et al., 2017; Jones et al., 2001). 이들 중 *O. neolycopersici*는 토마토 시설재배 시 흰가루병의 주요 원인이며, 감염 시 식물의 하엽 상부 표면에 작은 원형으로 불투명한 흰색 가루형태의 표징이 나타나며 급속히 확산되어 잎 전체를 덮어버린다(Lebeda et al., 2017). 증상이 심해지면 해당 잎은 황백화 및 괴사로 이어져 조기에 낙엽 되는데, 이는 궁극적으로 광합성을 방해하여 작물의 성장속도와 과실 품질을 저하시킨다(Lebeda et al., 2013).
- (2) 현재까지 토마토 야생종에서 밝혀진 흰가루병 저항성 유전자에는 단일 우성 유전자 6개 (*Ol-1*, *Ol-3*, *Ol-4*, *Ol-5*, *Ol-6*)와 1개의 단일 열성 유전자(*ol-2*), 그리고 3개(*Ol-qt11*, *Ol-qt2*, *Ol-qt3*)의 양적형질 유전자좌(Quantitative trait loci, QTL)가 있다(Seifi et al., 2013). 이 중 염색체 6번 단완(short arm)에서 매우 근접하여 mapping된 *Ol-4*(*S.peruvianum* accession LA2172에서 유래)와 *Ol-6*(기원이 알려져 있지 않은 Advanced breeding line 유래)은 동일 유전자위의 다른 대립유전자(*Ol-1,3*)로 제시되었다(Bai et al., 2005). 또한 염색체 6번의 장완(long arm)에 위치한 *Ol-1*(*S. habrochaites* accession G1.1560)와 *Ol-3*(*S. habrochaites* accession G1.1290) 간에도 동일 유전자의 대립유전자 관계가 추정 되었다(Bai et al., 2005). *S. habrochaites* accession PI247087로부터 유래한 *Ol-5*는 *Ol-1,3*과 근접한 영역에서 mapping 되었고, *S. neorickii* accession G1.1601에서 유래한 3개의 QTL(*Ol-qt1,2,3*)은 각각 염색체 6번의 *Ol-5* 근접부, 그리고 염색체 12번 단완과 장완에서 mapping되었다. 특히 *Ol-qt2*는 또 다

른 흰가루 병원균인 *Leveillula Taurica* 저항성 유전자좌(*Lv*)와 연관되어 있다 (Bai et al., 2003). *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* accession LA1230에서 발견된 열성유전자 *ol-2* 는 염색체 4번에 위치하며 지금까지 유일하게 클로닝 된 토마토 흰가루병 저항성 유전자 (*Slmlo1*) 이다.

(3)GWAS는 주로 전체 게놈상에서 가장 흔하고 고르게 발생하는 변이인 단일 염기 치환 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 정보를 유전자형 데이터로 이용한다 (Norrgard, 2008). 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 기술이 발달함에 따라 기존 Sanger sequencing에 비해 단기간 내 전장 염기서열분석(Whole genome sequencing, WGS) 및 re-sequencing이 가능 해졌고, 이로 인해 염기서열분석 대상의 모든 유전적 변이를 발굴 할 수 있게 되었다. 그러나 분석 대상이 많아질 경우, 상당한 비용과 노력이 소요되기 때문에 이를 보완하기 위하여 전장 유전체 내 일부 SNP에 대한 high-throughput genotyping 방법으로 Genotyping by sequencing (GBS), SNP microarray chip 기술이 주로 사용된다. GBS는 NGS 기술을 기반으로 하며 특정 제한 효소로 인해 절단된 부위 주변의 짧은 서열만을 읽어, 비용 부담을 줄이면서 빠르게 SNP를 발굴할 수 있다. 그러나 대상 샘플에 따라 탐색되는 SNP가 달라질 수 있으며, 각 염기서열마다의 read depth 차이로 인해 SNP 품질이 낮을 수 있다는 한계점을 지닌다 (Gorjanc et al., 2015). 반면 SNP chip은 반도체 표면에 수 만개에서 수백 만개의 SNP를 탐지하기 위한 고밀도 probe를 부착하여 다량의 샘플로부터 전장 유전체 내 일관성 있는 SNP 정보를 빠르고 정확하게 확보할 수 있다 (Darrier et al., 2019; Anderson et al., 2019). SNPchip을 이용한 GWAS를 수행하여 목표 형질에 관여하는 유전자에 대해 연관 mapping하거나 새로운 QTL을 탐색한 작물에는 배추, 땅콩, 밀 등이 있다 (He et al., 2017; Zhang et al., 2020; Chen et al., 2019). 현재까지 토마토에서 제작된 SNP chip array에는 SolCAP Tomato 2013 (Sim et al., 2012)과 Axiom Tomato Genotyping array (Yamamoto et al., 2016)가 알려져 있다. SolCAP chip은 재배종 토마토(*S. lycopersicum*)의 transcriptome 정보기반으로 제작되어 토마토 과실의 향미와 대사 산물함량 관련 유전자 연관 매핑 등에 사용되었으며, Axiom chip의 경우 상용 F1토마토 품종의 전장유전체서열 재분석을 기반으로 제작되어 토마토 수확량, 품질 그리고 생리장애에 영향을 미치는 주요 육종목표형질 연관 QTL탐색에 사용된 바 있으나(Yamamoto et al., 2016) 다양한 야생종의 genotyping과 토마토 흰가루병 저항성과 관련된 GWAS연구결과에 대한 보고는 없었다.

(4)PMR 토마토 품종개발을 위해서는 고도 PMR 육종소재의 지속적인 발굴이 필요하며, 양친 분리집단뿐만 아니라 자연집단을 이용한 다양한 분석기법을 적용하여 PMR gene 연관마커의 개발이 요구된다. 따라서 본 연구는 (1) 야생종을 포함한 토마토 유전자원 집단으로부터 PMR 스크리닝, (2) 기존 보고된 PMR 연관 마커를 이용한 PMR 자원의 저항성 유전자위 탐색, 그리고 (3) Axiom SNP chip genotyping과 GWAS를 통한 신규 PMR 연관 QTL 탐색 및 후보유전자 탐색을 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료

(1) 흰가루병 병리검정에 사용된 유전자원은 Asian Vegetable Research and Development Center(AVRDC), Tomato Germplasm Research Center at the University of California-Davis(TGRC), Germplasm Resources Information Network (GRIN), 강릉원주대학교

로부터 분양받은 야생종 및 재배종 184계통과 부산대학교 식물유전육종연구센터(Plant Genetics and Breeding Research Center, PGBRC)에서 보유한 재배종 160계통을 포함한 총 348계통을 사용하였다. 또한 흰가루병 저항성으로 보고된 LA1969, LA0458 (*Lv. S. chilense*), LA2172 (*Ol-4, S. peruvianum*), PI247087 (*Ol-5, S. habrochaites*) 4 계통 (Chungwongse et al., 1994, 1997; Bai et al., 2004, 2005)과 감수성으로 보고된 Moneymaker (MM, *S. lycopersicum*)와 PMS (*S. lycopersicum*) 2계통을 병리검정의 대조군으로 사용하였다 (Kim et al., 2018).

나. 병원균 분리 및 동정

- (1) 2019-2020년 부산대학교 밀양캠퍼스 첨단온실 내에서 자연 발병된 흰가루병 병원균의 분리 및 동정을 위하여 포자 현탁액을 제조하였다. 흰가루병이 발병된 ‘Moneymaker’의 잎을 채취한 후 double distilled water(ddH₂O)에 담가 잎으로부터 포자를 분리시켰으며, 거즈를 이용하여 병원균 이외의 불순물들을 걸러 내었다. 이 후 현탁액을 2.0mL 튜브에 담아 13,000 x g로 1분간 원심분리 한 후 하단에 모인 포자를 제외한 상층액을 제거하였다. 필터링 된 현탁액에 Sodium dodecyl Sulfate(SDS) 400μL를 첨가한 후 65℃ 항온수조(water bath)에서 50분간 배양하여 세포막으로부터 genomic DNA를 유리하였다. DNA로부터 세포 잔해물과 SDS 용액을 분리하기 위해 7.5M ammonium acetate 200μL를 넣고 골고루 혼합하여 얼음에 15분간 방치한 후 10분간 13,000 x g로 원심분리 하였다. 이후 상층액 400μL를 따서 새로운 1.5mL 튜브에 옮겨 담았으며, DNA 침전을 위해 glycogen(10mg/mL) 2.5μL와 isopropanol 600μL를 첨가하고 10분간 13,000 x g로 원심분리 하였다. 생성된 DNA pellet을 제외한 상층액을 제거한 후 잔여 염(salt) 제거를 위해 70% ethanol 300μL를 넣고 10분간 13,000 x g로 원심분리 하였다. pellet을 완전히 건조 시킨 후 Tris-EDTA 완충액 60μL을 넣어 재현탁(resuspension) 하였으며, Nanodrop 1000Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량하였다.
- (2) 분리된 병원균주(PNU-PM) 동정을 위하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역 염기서열 분석을 수행하였다. 흰가루병 병원균의 ITS-특이적 프라이머 PMITS1 (5'-TCGGACTGGCCTCAGGGAGA-3'), PMITS2(5'-TCACTCGCCGTTACTGAGGT-3') (Kiss et al., 2001)를 이용하여 해당 ITS 영역 염기서열을 PCR 증폭하였다. PCR mixture는 한 샘플 당 병원균 genomic DNA 5μL(20ng/μL), ddH₂O 37.5μL, dNTPs 1μL (10mM, SolGent), 10X buffer 5μL (SolGent, Daejeon, Korea), Forward/Reverse primer (10pmol) 각각 2.5μL 그리고 Taq polymerase 0.5μL (5U/mL, SolGent)를 혼합하여 총 50μL로 제조하였으며, 2반복으로 수행하였다. PCR은 Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA) 로 95℃에서 1분동안 pre-denaturation 후, 94℃에서 1분 denaturation, 65℃에서 1분 annealing, 72℃에서 2분 extension으로 35cycle 반복하고 72℃에서 7분간 final extension 조건으로 진행되었다. 증폭산물은 1% agarose gel에서 200V로 45분간 전기영동 하였으며, Expin™ Gel SVgel extraction kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 gel로부터 증폭산물을 정제하였다. 정제된 증폭산물의 direct sequencing은 Genotech (Daejeon, Korea)에서 dye-terminator 방법으로 수행되었다.
- (3) 시퀀싱 된 PNU-PM의 ITS 영역 염기서열은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X (MEGAversion X) (Kumar et al., 2018)에서 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 *L. taurica* ITS 염기서열

(Accession : MH698492.1)과 Kiss et al. (2001)에서 흰가루병 병원균 계통 분석에 사용했던 곰팡이ITS 염기서열 27종을 함께 ClustalW으로 정렬(pairwise/multiplealignment) 후 상호 유사성을 분석하였다. 흰가루병 병원균에 대한 계통발생 분석은 Neighbor-joining 방법 (Saitou and Nei, 1987)을 기반으로 하였으며, Jukes-Cantor 모델(Jukes and Cantor, 1969)을 뉴클레오타이드 치환 모델로 설정하였다. 계통수 가지는 bootstrap method 1000회 반복을 거쳐 생성되었다. 또한 PNU-PM의 ITS 염기서열을 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 standard database 기반으로 BLASTn하여 가장 높은 일치율을 보이는 병원균종을 확인하였다

다. 흰가루병 병리검정

(1) 흰가루병 병리검정은 2020년 3월 부산대학교 밀양캠퍼스 첨단온실 내에서 수행되었다. 각 계통 당 10립의 종자를 육묘용 상토(원예범용 상토 2호, 농우바이오, 수원, 대한민국)로 채운 50구 tray에 파종한 후 하에서 육묘하였다. 병원균 접종을 위한 포자 현탁액 제조는 ‘병원균 분리 및 genomic DNA 추출’에 기재된 방법과 동일하게 진행하였다. 파종 후 4주 후부터 2주 간격으로 3차례 2.4×10^4 spore/mL 농도의 포자 현탁액을 식물체가 흠뻑 적셔질 정도로 수동 스프레이기를 이용하여 뿌려주었다. 마지막 접종이 끝난 시점으로부터 3주 후에 본엽 1매에서 6매까지의 상부 엽면 표징을 관찰하여 발병지수(Disease severity index, DSI)를 산정하였다. 발병지수는 다음과 같은 기준으로 설정되었다. 0 : 본엽 6매까지의 엽면적 병징 = 0%, 1 : 엽면적 병징 < 10%, 2 : 엽면적 병징 10-30%, 3 : 엽면적 병징 > 30% (Fig. 1). 이후 Ullah et al. (2017)의 공식을 따라 발병도 백분율(Percent disease intensity, PDI)을 계산하였다. 대조구로 사용된 MM과 PMS의 PDI 값을 참고하여 각 계통들에 대해 PDI 10% 미만은 저항성(Resistance, R), PDI=10-30%는 중도저항성(Moderately resistance, MR), PDI 30% 초과 시 감수성(Susceptibility, S)로 판단하였다.

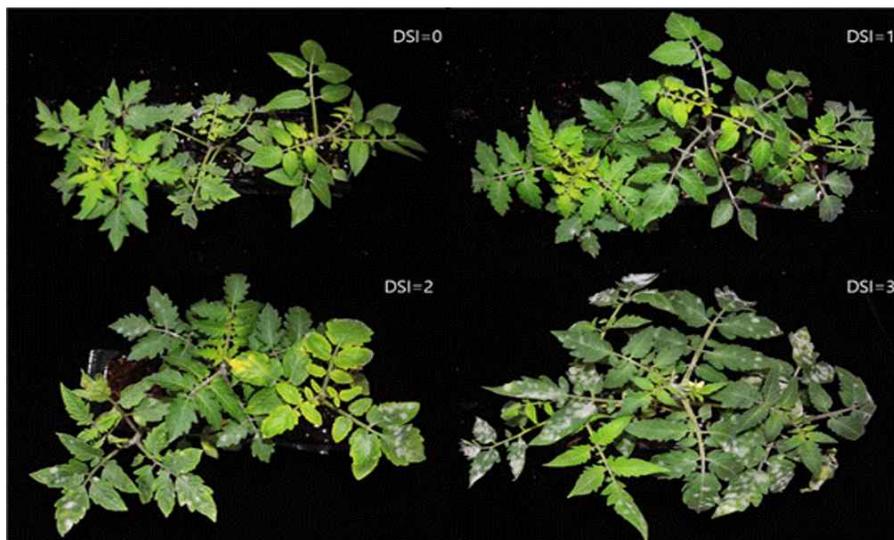


Fig. 1. Disease severity rating scales used for assessing host plant resistance to powdery mildew in tomato. Disease severity index (DSI) implemented in this study based on visual rating scales of diseased leaf area from the 1st to 6th true leaf. DSI=0 : diseased leaf area 0% up to 6 leaves ; DSI=1 : diseased leaf area < 10%; DSI=2 : diseased leaf area 10-30%, DSI=3 : diseased leaf area > 30%

라. 기 보고된 흰가루병 저항성 연관 마커검정

(1) 선행연구에서 발표한 저항성 연관 마커 검정은 병리검정 결과를 바탕으로 고도저항성(R)으로 판단된 22계통과 고도감수성(S)으로 판단된 28계통, 그리고 저항성 및 감수성 대조군을 포함하여 총 56계통에 대해 진행하였다 (Table 1). 마커로는 *Ol-1,3* 유전자 연관 마커인 P1349와 H9A11 (Bai et al., 2005), *ol-2* 유전자 (*Slmlo1*)기반 마커인 M/Slmlo1 (Balet al., 2008)와 dCAPS_Slmlo1.1 (Kim et al, 2018) *Ol-4,6* 유전자 연관 마커인 GP79L와 Cla32.5 (Bai et al., 2005), *Ol-5* 유전자 연관 마커인 TG25와 P21M47 (Bai et al., 2005), *Ol-qt11* QTL 연관 마커인 P21M47와 dCT136 (Faino et al, 2011), 그리고 *Ol-qt13* QTL 연관 마커인 Y258와 TG111 (Bai et al., 2003) 총 10종이 사용되었다 (Table 1). 모든 마커의 PCR 증폭은 샘플 당 genomic DNA 1 μ L(20ng/ μ L), ddH₂O 6.7 μ L, dNTPs 0.2 μ L (10Mm, SolGent), 10X buffer 1 μ L (SolGent,Daejeon, Korea), Forward/Reverse primer 각각 0.5 μ L(10pmol) 그리고 Taq polymerase 0.1 μ L (5U/ μ L,SolGent)이 포함된 총 10 μ L의 반응물로 수행하였다. PCR 조건은 Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (ThermofisherScientific, Waltham, MA, USA)로 95 $^{\circ}$ C에서 1분동안 pre-denaturation 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, Table 1의 T_m $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension으로 35cycle 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 final extension으로 수행되었다. Touchdown PCR의 경우, 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 pre-denaturation 후, 94 $^{\circ}$ C에서 15초 denaturation, 60 $^{\circ}$ C(-0.5 $^{\circ}$ C/cycle)에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension으로 10cycle 반복하고 94 $^{\circ}$ C에서 15초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension으로 30cycle 반복 후 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 final extension하였다. SCAR 마커의 경우 PCR 직후 증폭 산물을 전기영동 하였으며, CAPS 마커의 경우 해당 제한효소를 제조회사의 매뉴얼에 따라 증폭산물에 처리 후 전기영동 하였다. 전기영동은 2%agarose gel에서 190V로 2시간동안 수행하였으며, 이후 Ethidium Bromide에 gel staining 후Gel Image Analysis System (CoreBio-MAX™, Davinch-K, Seoul, Korea)의 자외선 하에서PCR 증폭산물을 가시화하였다. 마커 검정에 사용된 계통들의 마커 유전자형은 각 마커에 대해 보고된 저항성 및 감수성 특이적 밴드 사이즈 정보와 본 실험에서 관찰된 밴드 사이즈를 비교 분석하여 결정하였다.

Table 1. List of powdery mildew resistance (PMR) DNA markers reported in previous studies. These markers were used in the genotyping of tomato germplasm that were highly resistant or susceptible to *O. neolycopersici* in this study.

Marker	Primer Sequence (5'-3')	Location (Chr, bp)
P1349	F : TGCTAAGAATCAGAAACCACACCT R : ACAACAAGCTGATCCACCTAAAGA	Chr6 (Long arm) 35,136,894 - 35,137,379
H9A11	F : TGCTCTAACAAAATCACCAAAATC R : AAATGGTCAAACAAAGTCTATTGAG	Chr6 (Long arm) 35,347,388 - 35,347,820
M/Slmlo1	F : ACCCTTAAGAAACTAGGGCAA R : ACCATCATGAACCCATGTCT	Chr4 (Long arm) 38,702,897 - 38,703,092
dCAPS_SlMlo1.1	F : TATATAGAGAAATTCTGTAGATGTGATC R : TGGATAACCGCGTAATAAGT	Chr4 (Long arm) 38,700,768 - 38,700,970
GP79L	F : CACTCAATGGGGGAAGCAAC R : AATGGTAAACGAGCGGGACT	Chr6 (Short arm) 2,746,498 - 2,747,964
32.5Cla	F : ACAGAAACAAAGTGCCAAG R : CCACCACCAAACAGGAGTGTG	Chr6 (Short arm) 2,389,981 - 2,390,754
TG25	F : TAATTTGGCACTGCCGT R : TTGTYATRTTGTGYTTATCG	Chr6 (Long arm) 33,814,128 - 33,814,425
P21M47	F : TAACAATCTCGACCATAGTTCC R : CCATACCCGAATTCCTTCC	Chr6 (Long arm) 35,035,703 - 35,036,018
dCT136	F : CGAAGTGTCGGATCCGAAGGCTTT	Chr6 (Long arm)

Y258	R : AACACAATCGGAAAAAA F : GTAATTCCAAAAAGTGAGGT	39,171,973 - 39,172,139 Chr12 (Long arm)
TG111	R : TTGCGTCTAGAGTTATTTT F : TGCCAACCCGGACAAAGA R : TGGGGAAGTGATTAGACAGGACA	29,161,948 - 29,162,084 Chr12 (Long arm) 47,133,362 - 47,133,758

마. Axiom Tomato Genotyping array를 이용한 SNP genotyping

- (1) GWAS 분석에 이용할 SNP genotyping을 위해 병리검정에 사용된 계통들의 genomic DNA를 추출하였다. 부산대학교 밀양캠퍼스 첨단온실에서 계통 당 5립씩 육묘하였으며, 본엽 3~4매 시기에 신선한 잎을 3개체로부터 채취하여 pooling하였다. Genomic DNA 추출은 ‘병원균 분리 및 genomic DNA 추출’에 기재된 Sodium dodecyl sulfate(SDS) 추출법을 약간 수정하여 사용하였으며, 추출된 DNA는 Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermoscientific, Waltham, MA, USA)로 순도 및 농도를 측정하였다. Genomic DNA 샘플 농도는 모두 20ng/ μ L로 희석하였고, SL2.40 assembly reference genome 기반으로 제작된 55K AxiomTomato Genotyping array (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 통해 총 SNP 51,214좌에 대한 genotyping을 DNA Link, Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

바. SNP genotyping data QC 및 SNP filtering

- (1) 본 연구에서 사용한 야생종에 포함되는 계통들이 재배종의 전장염기서열 재분석을 기반으로 제작된 Axiom tomato genotyping array에 잘 적용되는지 확인하고자 Genotyping이 완료된 계통 중 재배종 125계통, 야생종 57계통으로 이루어진 182계통을 토마토 종(species)별로 분류 후 51,214raw SNP에 대한 DishQuality Control (DQC), call rate, heterozygosity rate를 분석하였다. 또한 세 요인간 상관분석을 위해 IBM®SPSS® Statistics 25.0.0 (IBM Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 피어슨 상관계수(Pearson correlation coefficient)와 유의확률(P-value)을 산출하였다.

- (2) 시더스스(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 Axiom tomato genotyping array에서 genotyping에 사용한 51,214 SNP좌마다의 70bp probe sequence를 NCBI에 등록된 토마토 재배종(*S. lycopersicum*)과 5개 야생종(*S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. arcanum*)의 reference genome assembly에 alignment를 통해 야생종 계놈서열과의 상동성을 확인하였다 (Table 2). Alignment는 Bowtie2 프로그램(Langmead and Salzberg, 2012 [user1])에서 다음과 같은 조건으로 수행되었다; Max mismatches in seed alignment (-N) : 1, Length of seed substrings (-L) : 20, Interval between seed substrings w/r/t read len(i) : S,1,0.50. 이후 각 SNP좌마다 ‘2.6.1. SNP genotyping 데이터 품질 평가’ 시 사용된 182계통 중 reference genome assembly로 사용된 종에 해당되는 계통들(*S. lycopersicum* 125계통, *S. chilense* 8계통, *S. habrochaites* 8계통, *S. pennellii* 10계통, *S. pimpinellifolium* 18계통, *S. arcanum* 3계통)의 missing 및 heterozygosity로 genotyping된 비율을 계산하여 probe-reference genome 염기서열 간 변이(variants) 정도와의 연관성을 분석하였다.

- (3) SNP chip array 결과를 검정(validation) 확인하고자 Axiom tomato genotyping array상에서 genotyping된 SNP 중 6개를 선발하였으며, CAPS 또는 dCAPS마커로 전환하여 ‘2.4.기 보고된 마커 검정’에 사용한 고도 저항성 및 감수성 56계통에 검정 후 두 genotyping결과를 상호 비교하였다 (Table 3). 먼저 선발된 SNP들의 물리적 위치(physical location)를 Sol

Genomics Network (SGN, <https://solgenomics.net/>)의 SL4.0 assembly에서 재확인하여 flanking sequence를 추출하였다. CAPS 및 dCAPS마커 전환을 위해 각각 NEB cutter v. 2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>)과 dCAPSfinder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>)에서 다형성 구별이 가능한 enzyme을 확인하였으며, 프라이머 디자인은 Primer3 v. 0.4.0. (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)사이트를 이용하였다. 이후 PCR, 제한효소처리, 전기영동 과정은 ‘기존 저항성 마커 검정’에서 CAPS 마커와동일한 방법으로 수행하였다. 단, PCR은 non-touch down 방식으로 Tm 58℃에서 수행하였다.

Table 2. Tomato reference genome assembly information used for similarity analysiswith SNP chip probe sequence.

Species type	Organism name	Assembly name	NCBI GenBank accession
Cultivar	<i>S. lycopersicum</i>	SL2.40	GCA 000188115.1
	<i>S. chilense</i>	ASM601370v1	GCA 006013705.1
	<i>S. habrochaites</i>	Sohab10	GCA 000577655.1
Wild species	<i>S. pennellii</i>	SPENNV200	GCF 001406875.1
	<i>S. pimpinellifolium</i>	ASM1496433v1	GCA 014964335.1
	<i>S. arcanum</i>	Sorac 10	GCA 000612985.1

(3) SNP chip array 결과를 검정(validation) 확인하고자 Axiom tomato genotyping array상에서 genotyping된 SNP 중 6개를 선발하였으며, CAPS 또는 dCAPS마커로 전환하여 ‘2.4.기 보고된 마커 검정’에 사용한 고도 저항성 및 감수성 56계통에 검정 후 두 genotyping결과를 상호 비교하였다 (Table 3). 먼저 선발된 SNP들의 물리적 위치(physical location)를 Sol Genomics Network (SGN, <https://solgenomics.net/>)의 SL4.0 assembly에서 재확인하여 flanking sequence를 추출하였다. CAPS 및 dCAPS마커 전환을 위해 각각 NEB cutter v. 2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>)과 dCAPSfinder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>)에서 다형성 구별이 가능한 enzyme을 확인하였으며, 프라이머 디자인은 Primer3 v. 0.4.0. (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)사이트를 이용하였다. 이후 PCR, 제한효소처리, 전기영동 과정은 ‘기존 저항성 마커 검정’에서 CAPS 마커와동일한 방법으로 수행하였다. 단, PCR은 non-touch down 방식으로 Tm 58℃에서 수행하였다.

Marker name	Target SNP	Location ^a (Chr, bp)	Marker type (Enzyme)	Sequence (5'-3')
SNP1_CAPS	AX-95781451	Chr1: 815,871	CAPS (<i>Hpy99</i> I)	F : TTACATTTAACTGTGACAAGCAGAT R : AGTAGTTCATTTTCATTGCGAACT
SNP2_dCAPS	AX-95767557	Chr2 : 3,942,590	dCAPS (<i>Aci</i> I)	F : ATTATGCCAACAACAAATCAGACAC R : ACAATAGAACAAGAAGCTGAAAGAA
SNP3_CAPS	AX-95784118	Chr4 : 6,054,103	CAPS (<i>Hinf</i> I)	F: CTTACCACATAAACATAGGGATCTG R : GGACCCAAATAATCATCAAATCTAT
SNP4_dCAPS	AX-95773152	Chr6 : 34,738,782	dCAPS (<i>Rsa</i> I)	F : TGATCAATTAATTCCC GGAGATAG R : AAAGGGCTCAATCTTTATTTGTAT
SNP5_CAPS	AX-95809776	Chr8 : 56,273,372	CAPS (<i>Apo1</i>)	F : ATTTAGTTTTCATGTGTGCGATGAAT R : TTCCTTTTAGCAATGTGATAGTTTT
SNP6_CAPS	AX-95814666	Chr11 : 49,774,551	CAPS (<i>Nde</i> I)	F : CACTTTCATTAGATTCTTGTGGTCT R : CCACTAAGGTATCAATCAATTTTGT

사. 전장유전체 연관분석 (GWAS)

- (1) 흰가루병저항성 관련 GWAS를 수행하고자 표현형과 유전자형 데이터가 존재하는 290계통들에 대해 재배종 *S.lycopersicum* 244계통으로만 이루어진 집단과 재배종과 야생종을 모두 포함한 290계통으로 이루어진 집단으로 나누어 분석하였다. SNP filtering은 각 집단마다 51,214개의 raw SNP로부터 Minorallele frequency (MAF) > 5%, missingproportion < 5%, heterozygosity proportion < 10%의 조건을 적용하여 수행하였으며, 재배종과 야생종을 모두 포함한 집단에서는 SNPgenotyping error가 낮은 SNP만을 선발하고자 야생종에 한해 heterozygosityproportion이 10%보다 낮았던 SNP만을 추가적으로 filtering하였다.
- (2) 병리검정을 통해 얻은 표현형 데이터와 함께 ‘2.6.1. GWAS 수행을 위한 최적 집단 및 SNP 선발’의 두 샘플집단과 최종적으로 선발한 SNP유전자형 데이터를 이용하여 Traits Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage (TASSEL) 5.0 (Bradbury et al., 2007)에서 혼합선형모델[MixedLinear Model (MLM, PCA + K)]로 GWAS 분석을 진행한 후 Quantile-Quantile plot (Q-Q plot)을 확인하였다. 이후 R 기반 package Genome Association and Prediction Integrated Tool(GAPIT) ver. 3 (Lipka et al., 2012)에서 TASSEL에서와 동일한 분석모델로 GWAS를 수행한 후 두 소프트웨어의 결과를 맨하탄 플롯(manhattan plot)으로 시각화하여 확인하였다. 분석 결과로부터 P -value < 0.001에 해당하는 SNP를 토마토 흰가루병 저항성 표현형과 연관성이 높은 유의한 SNP로 보았으며, TASSEL과 GAPIT 두 소프트웨어에서 공통적으로 유의하게 나온 SNP들만을 재선발하여 QTL을 탐색하였다.

아. 후보유전자 선정 및 저항성-감수성 계통간 다형성 탐색

- (1) 흰가루병 저항성 후보유전자 선정을 위해 앞서 공통적으로 유의하다고 탐색된 SNP들 중, TASSEL과 GAPIT에서 각각 $-\log(P)$ 값이 가장 높았던 SNP가 포함된 QTL영역에 위치한 공통 유의 SNP들의 물리적 위치 양 옆 50kbp 간격 내에 존재하는 유전자를 SGN의 SL4.0assembly (ITAG4.0)에서 확인하였고, 해당 유전자들의 annotation을 확인하여 병 저항성과 관련 있는 유전자들을 후보유전자로 선정하였다. 이후 선정된 후보유전자 내에서 저항성-감수성 계통간 다형성을 탐색하고자 저항성(R) 재배종(*S. lycopersicum*) 계통 A9, A45와 감수성(S) 재배종 계통 A94, MoneyMaker를 대상으로 후보유전자의 엑손 영역(exon region) 염기서열분석을 수행하였다. SGN의 SL4.0assembly (ITAG4.0)를 기반으로 후보유전자들의 염기서열 데이터와 유전자 구조를 확인하였으며, Primer3 v. 0.4.0. (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 사이트를 통해 각 유전자의 엑손 영역을 목표로 하는 프라이머 세트를 제작하였다 (Table 4). 모든 프라이머의 PCR 증폭은 샘플 당 genomic DNA 1.0 μ L (20ng/ μ L), ddH₂O 7.0 μ L, Forward/Reverse primer 각각 1.0 μ L(10pmol), 2X Phusion Master Mix with High-Fidelity Buffer 10.0 μ L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 이 포함된 총 20.0 μ L의 반응물로 수행하였다. PCR 조건은 Veriti™96-Well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 98°C에서 30초동안 pre-denaturation 후, 98°C에서 10초 denaturation, Table X의 T_m°에서 15초 annealing, 72°C에서 2분 extension으로 35cycle 반복하고 72°C에서 7분간 final extension으로 수행되었다. 증폭산물은 2% agarose gel에서 200V로 30분간 전기영동 하였으며, QIAquick® PCR purification kits (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA)를 이용하여 PCR 증폭산물을 정제하였다. 정제된 증폭산물의 directsequencing은 Genotech (Daejeon, Korea)에서 dye-terminator 방법으로 수행되었으며, 결과 서열은 Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) 사이트를 사용하여 정렬하였다. 탐색된 변이 중 Axiom tomatochip array상에 존재하여 SNP genotyping된 결과는 CAPS마커

로 전환하여 ‘2.4. 기 보고된 마커 검정’에 사용한 고도 저항성 및 감수성 56계통을 포함하여 Missing이나 heterozygosity로 genotyping되었던 계통들에 대해 재 검정하였다 (Table 5). CAPS 마커 디자인 및 검정은 ‘2.6.3. Axiom genotyping array 내 SNP의 CAPS 및 dCAPS 마커 전환 및 검정’에서와 동일한 방법으로 수행하였다.

Table 4. Marker information used for sequencing of the exon region of the PMR putative candidate genes.

Candidate gene (Gene name) ^a	Marker name	Sequence (5'-3')	Target exon
<i>PMS-NBS1</i> (Solyc04g015630.2.1)	PMR-NBS-LRR1-1	F : TACTCTGGTGTGTGGGAAGG R : CACTCCCGTCTCTCAGTTTTCT	Exon1
	PMR-NBS-LRR1-2	F : CTCAGAAACCAGGCATTAAGGA R : AGCGGAGATTCATATAGCCAAC	Exon2
<i>PMR-NBS2</i> (Solyc04g015640.1.1)	PMR-NBS-LRR2	F : CTTACTCGAGCGGAGAATTTTT R : AGCACCCACCATCAACAAC	Exon1, 2
	SL-STPK-SEQ1	F : GGTTGGAGCAGTTACAATAAGAATG R : CAAGTCAAAACAGAGGGAGTCAA	Exon1
<i>SL-STPK</i> (Solyc08g074980.4.1)	SL-STPK-SEQ2	F : GTCCCAAACTTAATAGGGCTGAAT R : TTATGGTTGAGAGAAGGACCAA	Exon2, 3, 4
	SL-STPK1-SEQ3	F : AGAAGGATCAAACACTCATGTTACT R : AAAAATAGAAATGAGTGCATCAAAA	Exon 5

^aGene name was based on SL4.0 assembly in SGN

Table 5. Information of CAPS markers designed to validate genotyping results of SNP chip arrays for SNPs located in PMR putative candidate gene exon regions.

Marker name	Target SNP	Location (Chr, bp)	Enzyme	Sequence (5'-3')
CAPS_958	AX-95781958	Chr8. 56274080	<i>Alu</i> I	F : GTTCATGTTCCACTTGTGATGTAG R : ACTGAATATTGTCCACCAAATCTT
CAPS_404	AX-95809404	Chr8 56276176	<i>Mwo</i> I	F : TATATTTCCCATCAACTTCTCCAT R : CTTCAATATTAAGAAGCTTCACAGC

자. 집단 구조 분석

- (1) 최종적으로 GWAS 수행 시 사용한 11,912 SNP좌를 기반으로 STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000)의 admixture model을 사용하여 290계통에 대해 집단 구조화 분석을 수행하였다. K(집단 수) 범위 1~10에서 각 K당 Burn-in period 1,000회와 MarkovChain Monte-Carlo (MCMC) 10,000회를 10번 반복하였으며, 최적 집단 수를 판별하기 위해 STRUCTURE HARVESTER (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>)에서 Evanno method (Evanno et al., 2005)에 의해 계산된 ad hoc statistics (ΔK) 값을 확인하였다. 계통간 유연관계분석은 R기반 package GAPIT상에서 VanRaden kinship algorithm을 이용하여 수행되었으며, Kinship heatmap plot과 dendrogram을 통해 유연관계를 확인하였다

3. 내용 및 결과

가. 흰가루 병원균 동정

(1) 부산대학교 밀양캠퍼스 첨단온실 내 생육중인 토마토 개체에 발병한 병원균 (PNU-PM으로 명명)을 분리하여 ITS 영역 염기서열분석을 수행하였다. PMITS1,2 프라이머로 증폭된 PNU-PM의 ITS 염기서열 길이는 agarose gel 상에서 약 700bp로 확인되었다 (data not shown). PNU-PM, *L. taurica*, 그리고 Kiss et al. (2001)에서 사용한 병원균 염기서열을 포함한 총 29종을 Clustal X에서 alignment하여 최종적으로 537bp를 기반으로 계통수를 작성하였다. PNU-PM의 ITS 서열(NCBI accession : MW082786.1)은 *O. neolycopersici* France strain 염기서열과는 100%, Netherland strain과는 99.8% 일치하였으며 계통수 상에서 bootstrap value 86%로 가장 가깝게 묶였다 (Fig. 2). 또한 100% bootstrap value로 *Erysiphe aquilegiae* 및 *E. macleavae*와 추가 분류군(clade)을 생성하였는데, 이는 Kiss et al. (2001, 2005)의 결과와 일치하였다. 토마토에서 흰가루병을 유발하는 다른 병원균인 '*O. lycopersici*'나 '*L. taurica*'는 PNU-PM과 염기서열간 각각 79.5%, 72.6%의 일치율을 보이면서 '*O. neolycopersici*'와는 뚜렷하게 분간되었다(Fig. 2). 또한 PNU-PM의 ITS 염기서열을 BLASTn한 결과, NCBI에 등록된 *O. neolycopersici* 분리균주 ITS 염기서열 42개와 100% 일치율 (Query cover 100%, E-value=0)을 보였다. 따라서 부산대학교 첨단온실 내에서 분리한 PNU-PM 균주는 '*O. neolycopersici*'로 추정되었다.

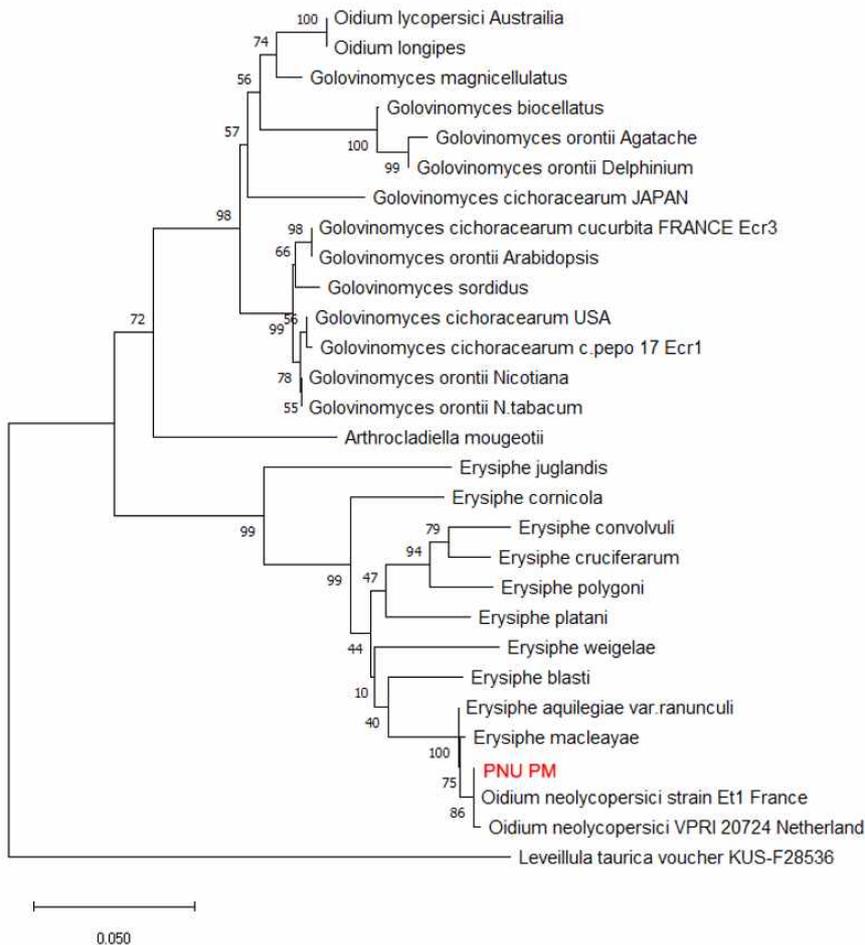


Figure 2. Phylogenetic tree of powdery mildew pathogens constructed by using Neighbor-joining method based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA. The ITS of 'PNU-PM' powdery mildew pathogen (red) isolated in this study is identical to that of *O. neolycopersici*.

나. 흰가루 저항성 병리검정

(1) 병리검정에 사용된 348계통 중 발아율이 3개체 이하로 낮고, 개체 간 DSI 분산이 높았던 59계통을 제외한 289계통과 6개의 저항성, 감수성 대조군들을 포함한 총 295계통에 한해 결과분석을 진행하였다 (Table 6). PNU-PM 접종 후 본엽 6매까지 상부 엽면적 표징을 관찰한 결과, 저항성 및 감수성 대조군을 포함한 총 295계통 중 24개의 계통이 고도저항성 (Resistance, R, PDI<10%)으로 판단되었다 (Table 6 and Fig. 3). 고도저항성 계통은 대부분 야생종이 주를 이루고 있었으며, 병징을 보이지 않은 (PDI=0) 계통은 17개로, *S.galapagense* accession B26, *S.pennellii* accession B72, B77, *S.cornerliomulleri* accession B34, *S.chilense* accession B83, B119, *S.pimpinellifolium* accession B94, *S.chmielewskii* accession B34, *S.peruvianum* accession B112, *S.habrochaites* accession B178, *S.lycopersicum* accession B17, A9, A10, A45가 있었으며 *Leveillula taurica* 저항성 *Lv* 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있는 *S.chilense* accession LA0458, LA1969 (Seifiet al., 2013)이 이에 포함되었다. 중도저항성 (Moderately resistance, MR, PDI=10~30%)으로 판단된 계통은 저항성 유전자 *Ol-4*를 가지는 것으로 보고된 LA2172 (*S. peruvianum*) 계통을 포함한 48계통이었다. 나머지 223계통은 감수성 (Susceptibility, S, PDI>30%)이었는데 이 중 저항성 유전자 *Ol-5*를 가지는 PI247087 (*S. habrochaites*) 계통과 감수성 대조군 PMS, Moneymaker (*S.lycopersicum*)이 이에 포함되었으며, 204계통이 재배종 (*S.lycopersicum*)이었다 (Fig. 3).

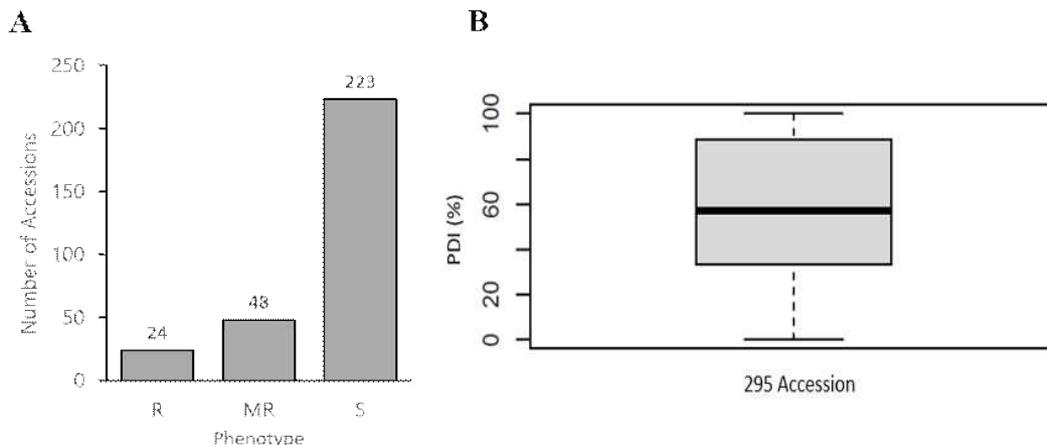


Fig. 3. Phenotypic distribution of tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*) resistance (A) and box plot showing the statistics of distribution (B). In the box plot, the bold line in the middle of the gray box represents the median (cumulative percentage 50%, 57.14%), and the upper and lower edges of the box represent the cumulative percentage 75% (88.89%) and 25% (33.33%), respectively.

다. 기존 저항성 마커 검정

- (1) 병리검정에서 저항성(PDI<10%)을 보인 22개 계통과 높은 감수성(S, PDI=100%)을 보인 28개 계통, 그리고 대조군으로 사용된 6개 계통을 포함하여 총 56계통에 대해 기 보고된 저항성 마커들의 마커형(marker genotype)을 분석하였다(Table 7). 그 결과 분석된 모든 마커에 대해서 15개 저항성 계통들로부터 저항성 마커형이 관찰되었지만, 감수성 계통에서는 저항성 마커형이 발견되지 않았다. 유전자 기반 마커가 개발된 열성 저항성 유전자와 *ol-2*의 경우, *Slmlo1* 대립유전자 마커형을 가진 계통은 없는 것으로 나타났으나, 또 다른 대립유전자인 *Slmlo1.1*의 마커형이 B17과 B16계통에서 관찰되었다 (Table 7). 나머지 유전자들에 대해서는 저항성 유전자와의 양측 연관 마커를 검정하여 두 마커 모두에서 저항성 마커형으로 나오는 경우, 해당 유전자를 보유하고 있는 것으로 추정하였다. 단일 우성 유전자와의 경우, *Ol-1,3*의 마커형은 B23(*S. pennellii*)와 B183(*S. habrochaites*)에서 관찰된 반면, *Ol-4,6* 마커형은 *Ol-4* 유래 계통인 LA2174(*S. peruvianum*)와 B178(*S. habrochaites*)에서 발견되었다. *Ol-5* 유전자와의 마커형은 *Ol-5* 유래 계통으로 보고되었던 PI247087(*S. habrochaites*)을 포함하여 LA2174(*S. peruvianum*), B34(*S. cornerliomulleri*), B109(*S. chmielewskii*), B178, B183, B188(*S. habrochaites*) 7계통에서 발견되었다. 저항성 QTL의 경우 *Ol-qt11* 마커형이 야생종5계통 [B72, B77, B23(*S. pennellii*), B34(*S. cornerliomulleri*), B109(*S. chmielewskii*)]과 *Lv* 유전자 보유계통으로 보고된 LA1969(*S. chilense*)에서 발견되었다. *Ol-qt13* 마커형은 *Ol-4* 유래 계통 LA2174(*S. peruvianum*)을 포함하여 야생종 9계통 [B23, B45, B72, B77(*S. pennellii*), B34(*S. cornerliomulleri*), B109(*S. chmielewskii*), B112(*S. peruvianum*), B178, B188(*S. habrochaites*)]에서 발견되었다. 이외에 표현형 검정에서 저항성으로 판정되었으나, 저항성 마커형이 관찰되지 않았던 계통에는 B26 (*S. galapagense*), B33(*S. pennellii*), B83, B119 (*S. chilense*), B94, B95 (*S. pimpinellifolium*), A9, A10, A12, A45 (*S. lycopersicum*)과 *Lv* 유전자 보유 계통인 LA0458 (*S. chilense*)이 있었다.

라. SNP 유전자형 분석 및 SNP filtering

- (1) Axiom tomato Genome array를 통해 병리검정이 완료된 343계통에 대한 총51,214개 SNP의 genotyping raw data를 얻었다. 이후 야생종에서의 SNP 품질 평가를 위해 genotyping이 완료된 샘플들 중 재배종으로만 이루어진 PGMBC로부터 제공받은 160계통을 제외한 182계통을 대상으로 토마토 종(species)별로 Dish QC (DQC), call rate, heterozygosityrate를 분석하였다 (Table 8). 그 결과, 재배종 (*S. lycopersicum*)에 속하는 계통들의 평균 DQC는 0.79-0.99로 높았으며, 나머지 야생종에 속하는 계통들은 0.04-0.15범위에 속해 낮은 경향을 보였다. 이들 중 가까운 유연관계로 재배종과의 높은 교배 화합성(cross compatibility)을 나타내는 것으로 알려진 야생종 *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium* (Schwarz et al., 2014)의 DQC는 각각 0.15, 0.14, 0.10으로 0.03-0.04범위에 머물러있는 타 야생종(*S. neorickii*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense*)들에 비해 상대적으로 높은 수치를 나타냈다. 또한 재배종에서는 5.43-7.44%로 낮은 평균 heterozygosityrate를 보였던 반면, 야생종의 경우 계통임에도 불구하고 7.74-33.44%의 높은 비율의 heterozygosity로 유전자형이 결정된 것으로 나타났다. 그러나, call rate는 최소 88.64% (B189, *S. pimpinellifolium*), 최대 98.85% (B136, *S. lycopersicum*)로 (Table S1), 전반적인 SNP chip array의 genotyping은 적절하게 수행된 것으로 나타났으나, 해당 요인 또한 야생종이 재배종에 비해 상대적으로 낮은 비율로써 야생종에서 SNP call

signal missing이 높은 경향을 볼 수 있었다.이후 182계통을 기반으로 DQC와 call rate, heterozygosity rate 세 요인간 관련성을 알아보려고 상관분석을 수행한 결과,DQC-call rate의 상관계수는 0.672로 양의 상관관계를 보여 DQC가 높으면call rate도 다소 높은 경향을 나타냈으며, DQC-heterozygosity rate와 callrate-heterozygosity rate의 상관계수는 각-0.807, -0.881로 요인간 강한 음의 상관관계를 가지면서 DQC 또는 call rate가 낮으면heterozygosity rate가 높은 경향을 나타냈다 (Table 9).

Table 8. Analysisresults of Dish QC (DQC), call rate and heterozygosity rate by tomato specieswithin 182 accessions.

Species	DQC ^a	Call rate (%)	Heterozygosity rate (%)
<i>S. lycopersicum</i>	0.95	96.29	5.43
<i>S. lycopersicum</i> (<i>habrochaites</i> ILS ^b)	0.96	96.56	4.29
<i>S. lycopersicum</i> (<i>lycopersicoides</i> ILS)	0.99	95.76	5.85
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	0.79	95.57	7.44
<i>S. cheesmaniae</i>	0.15	95.31	7.74
<i>S. galapagense</i>	0.14	95.51	7.53
<i>S. pimpinellifolium</i>	0.10	94.21	14.88
<i>S. neorickii</i>	0.04	91.85	25.22
<i>S. chmielewskii</i>	0.04	91.02	26.87
<i>S. habrochaites</i>	0.03	91.00	33.44
<i>S. pennellii</i>	0.03	90.88	31.76
<i>S. peruvianum</i>	0.03	90.33	29.85
<i>S. chilense</i>	0.04	90.56	31.12
<i>S. arcanum</i>	0.04	91.61	24.68
<i>S. corneliomulleri</i>	0.04	90.68	27.42
<i>S. huaylasense</i>	0.04	90.06	28.10

^aDish QC (DQC) measures the amountof overlap between two homozygous peaks created by non-polymorphic probes. DQCof 1 is no overlap, which is good. DQC of 0 is complete overlap, which is bad. ^bIL : Introgression line

Table 9.Correlation between DQC, call rate, heterozygosity rate.

	DQC	Call rate	Heterozygosity rate
DQC	1		
Call rate	0.672***	1	
Heterozygosity rate	-0.807***	-0.881***	1

*** $P < 0.01$

(2) 야생종에서 낮은 DQC, call rate와 높은 heterozygosityrate를 보였던 원인을 파악하고자

Axiom tomato genotyping array에 사용된 51,214 SNP좌의 probe sequence와 NCBI에 등록된 재배종 및 야생종 5개의 reference genome assembly를 기반으로 상동성(homology)분석을 수행하였다. 각 종의 reference genome별로 probe sequence를 alignment한 결과, 재배종에서는 51,214 SNP좌의 probe sequence가 모두 mapping되었으나, 야생종 *S. chilense*에서는 전체의 71.88%에 해당하는 36,811 SNP좌, *S. habrochaites*는 38,335 SNP좌(74.85%), *S. pennellii*는 38,117 SNP좌(74.43%), *S. pimpinellifolium*은 49,738 SNP좌(97.12%), 그리고 *S. arcanum*에서는 42,550 SNP좌(83.08%)가 mapping되어 재배종에 비해 야생종에서 Axiom chip array에 부착된 SNP flanking probe sequence와의 낮은 상동성을 확인할 수 있었다 (data not shown). 또한 각 종마다 reference genome에 대해 각 probe sequence에서의 변이 개수에 따라 SNP chip array 상에서 missing 또는 heterozygosity로 genotyping된 비율의 관계를 확인한 결과(Fig. 4), 재배종에서는 염기서열간 변이가 없거나 변이 개수가 1개에 그쳤으며 missing과 heterozygosity로 genotyping되었던 비율은 각각 3.97-3.98%, 6.63-6.64%로 거의 동일하게 나타났다. 야생종에서는 genome 염기서열과 완전히 일치하는 probe sequence를 가진 SNP에서 missing/heterozygosity로 genotyping된 비율이 *S. chilense*에서 4.15%/10.48%, *S. habrochaites*에서 3.34%/8.66%, *S. pennellii*에서 3.35%/8.27%, *S. pimpinellifolium*에서 4.73%/14.01%, *S. arcanum*에서 4.52%/9.80%로 가장 낮았으며, reference genome에 mapping되지 않았던 (Aligned 0 time) probe sequence를 가진 SNP들에서 missing/heterozygosity로 genotyping된 비율은 *S. chilense*에서 12.46%/56.61%, *S. habrochaites*에서 12.41%/61.64%, *S. pennellii*에서 12.71%/58.96%, *S. pimpinellifolium*에서 10.33%/28.00%, *S. arcanum*에서 12.47%/50.78%로 가장 높아 전체적으로 변이 정도가 많아질수록 missing이나 heterozygosity로 genotyping되는 비율이 비례하여 증가하는 경향이 나타남을 볼 수 있었다.

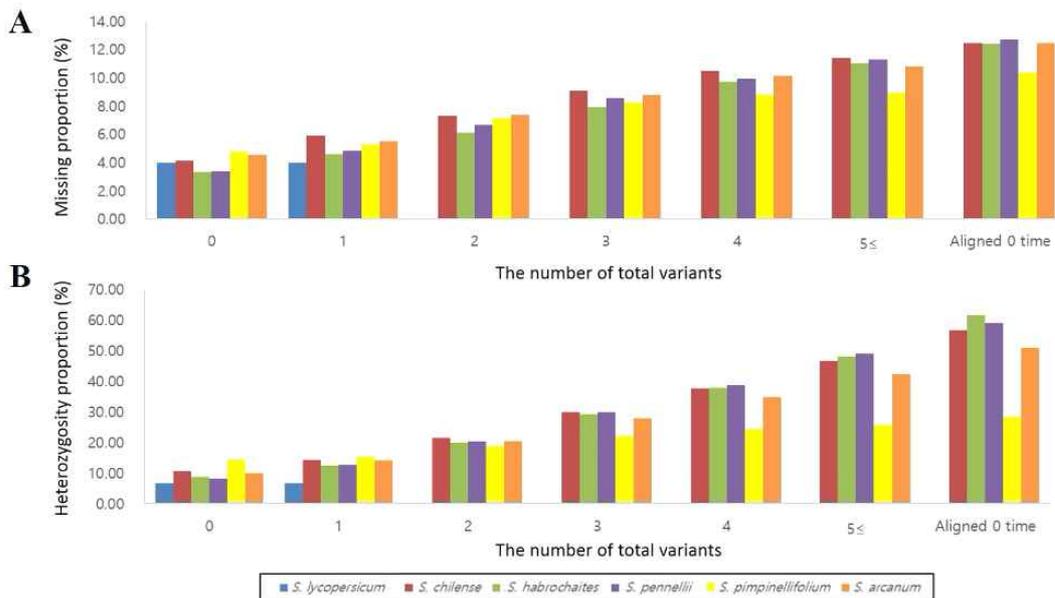


Fig. 4. The missing proportion and heterozygosity proportion genotyped from each species according to the number of variants between sequences analyzed by aligning the probe sequences for 51,214 SNP loci in the Axiom tomato genotyping array to the cultivar and wild species reference genome assembly. (A) Missing proportion in chip array genotyping by species according to the number of variants. (B) Heterozygosity proportion in chip array genotyping by species according to the number

of variants. Aligned 0 timeon the horizontal axis represents that the probe sequence is not aligned withthe reference genome assembly.

(3) 야생종 SNP chip genotyping 결과에 대한 신뢰성 검증(validation)을 위해 SNP chip array에 사용된 6개의 SNP를 PCR-based 마커 (Table 3)로 전환하여 고도 저항성 계통과 고도 감수성 계통들에서 재 검정하였다 (Table 10).저항성 22계통에서 SNP chip array에서 SNP call missing으로 나타난 계통은 AX-95781451마커에서 3계통, AX-957675571계통, AX-957841184계통,AX-95809776 3계통, 그리고 AX-958146662계통이었으며,heterozygosity로 유전자형이 결정된 계통은AX-95781451에서 6계통, AX-957675573계통, AX-957841184계통,AX-95773152 18계통, AX-958097768계통, 그리고 AX-9581466610계통이었다. 그러나 해당 유전자형들을 CAPS 또는 dCAPS마커로 전환하여 검정한 결과에서는 모두homozygosity 유전자형을 보였으며,AX-95773152마커의 재배종 3계통(A9, A10,A12)을 제외하고 주로 야생종 계통들에서 이러한 경향을 보이는 것으로 나타났다.주로 재배종으로 이루어진 감수성 28계통에서는 6개의 SNP chip array상에서 모두 homozygosity로 유전자형이 결정되었으며, AX-95781451마커의 1계통(A148,A>R)을 제외하고 모두 chip array와 PCR-based 마커 간 검정결과가 일치하였다.

마. GWAS 수행을 위한 분석집단 및 SNP 선발

(1) SNP 유전자형 데이터 분석결과로부터 야생종을 대상으로 한 SNP chip genotyping의 한계점을 보완하여 GWAS를 수행하고자 분석 대상을 재배종으로만 이루어진 244계통과 모든 야생종과 재배종을 포함한 290계통 두 집단으로 구분하였다 (Table 11). 각 집단 별로 MAF>5%, missingproportion<5%, heterozygosity proportion<10% 조건에서 SNPs를 filtering한 결과, 재배종 244계통에서는 전체 51,214개의 SNPs 중 58.8%에 해당하는 30,125개, 모든 종을 포함한 290계통에서는 55.4%에 해당하는 28,374개를 선발하였으며, 이 중 재배종과 야생종을 모두 포함시킨 집단에서는 genotyping error 발생이 낮은 SNPs만을 선발하고자, 야생종 내에서 heterozygosity rate가 10%보다 낮은 SNPs만을 추가적으로 filtering하여 최종적으로 11,912(23.2%)개의 SNP를 선발하였다 (Table 11).

SNP filtering process	<i>S. lycopersicum</i> (244 accessions)	<i>S. lycopersicum</i> and wild species (290 accessions)
Stage 1. MAF > 5%	40,028	47,090
Stage 2. Missing proportion < 5%	33,149	37,097
Stage 3. Heterozygosity rate < 10%	30,125 ^a	28,374
Stage 4. Heterozygosity rate < 10% in wild species	-	11,912 ^a

Table 11. Number of SNPs remaining after filteringstage from 51,214 raw SNPs per sample group.

^a최종적으로 filtering을 거쳐 GWAS에 사용된 SNP개수

바. 흰가루병 저항성 전장유전체 연관분석

- (1) 각 집단 별로 filtering criteria에 의해 걸러진 유전자형 정보와 병리검정을 통해 얻은 표현형 정보를 기반으로 먼저 TASSEL에서 Mixed Linear Model (PCA+K) 방법으로 GWAS를 수행하고 Q-Q plot을 확인하였다 (Fig. 5). 재배종으로만 이루어진 집단에서는 연관분석에서 실제 검정 값이 $-\log(P) > 3$ 에 해당하는 SNP들의 P -value가 예측된 P -value값보다 큰 것으로 나타나 형질-유전자형간 연관성이 없는 것으로 예상되는 결과를 나타냈다(Fig. 5A). 반면 재배종과 야생종 모두 포함된 집단에서는 $-\log(P) > 3$ 에 해당하는 SNP들의 실제 검정된 P -value가 예측된 P -value보다 작아 형질-유전자형간 연관성을 나타내는 것으로 예상되는 결과를 보여(Fig. 5B), 해당 샘플집단에 대한 유전자형-표현형 데이터를 이용하여 GAPIT software에서 TASSEL에서와 동일한 분석모델로 추가 GWAS를 수행하고 두 소프트웨어의 GWAS결과를 manhattan plot으로 나타내었다 (Fig. 6). $-\log_{10}(P) > 3$ 조건에서 유의적 마커-흰가루병 저항성 형질 연관(significant marker-trait association) SNP들을 탐색하였을 때, TASSEL에서는 염색체 1번, 4번, 6번, 8번, 12번에서 20개의 SNP가 나타났으며 (Fig. 6A), GAPIT에서는 염색체 1번, 2번, 4번, 6번, 8번, 10번, 11번, 12번에서 14개의 유의한 SNP가 발견되었다 (Fig. 6B and Table S2). 이 중 9개의 SNP가 두 분석 프로그램 상에서 공통적으로 탐색되었으며, 해당 유의 SNP들이 존재하는 QTL 영역을 확인하였다 (Fig. 7). 기존에 알려진 저항성 유전자좌와 다른 새로운 위치에 탐색된 QTL들은 총 5개로 염색체 1번(QTL1), 4번(QTL2), 6번(QTL3), 8번(QTL4), 12번(QTL5)에서 나타났으며 공통 유의 SNP가 1개씩 탐색된 다른 QTL과 달리 QTL2 영역 내에는 5개의 공통 SNP들(AX-95803738, AX-95799308, AX-95776428, AX-95771531, AX-95783448)이 위치해 있었다. 유의한 공통 SNP들 중 GAPIT에서 $-\log_{10}(P) = 4.41$ 로 가장 낮았던 SNP는 염색체 4번의 QTL2 내에 위치한 AX-95771531이었으며, TASSEL에서는 $-\log_{10}(P) = 4.57$ 로 염색체 8번의 QTL4 내에 위치한 AX-95810925가 가장 유의한 SNP로 나타났다 (Table 12).

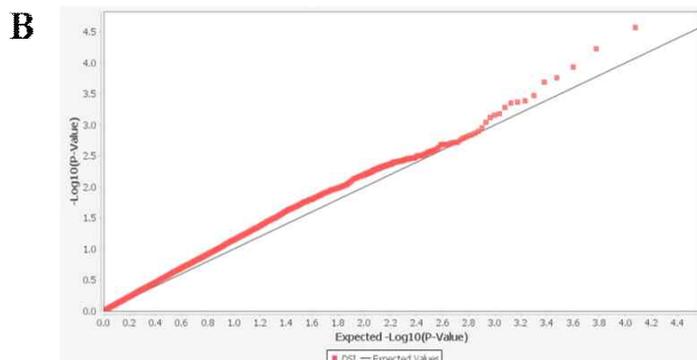
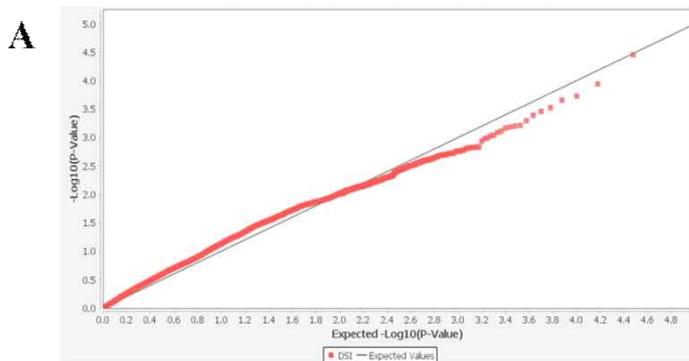


Fig. 5. Quantile-Quantileplots (Q-Q plots) generated by performing GWAS with MLM (PCA + K) model using TASSEL 5.0 software in each condition. (A) Q-Q Plot obtained by performing GWAS based on 30,125 SNPs loci through filtering procedure for the cultivar *S.lycopersicum* 244 accessions. (B) Q-Q plot obtained by performing GWAS for 11,912 SNPs loci in 290 accessions including all cultivar and wild species.

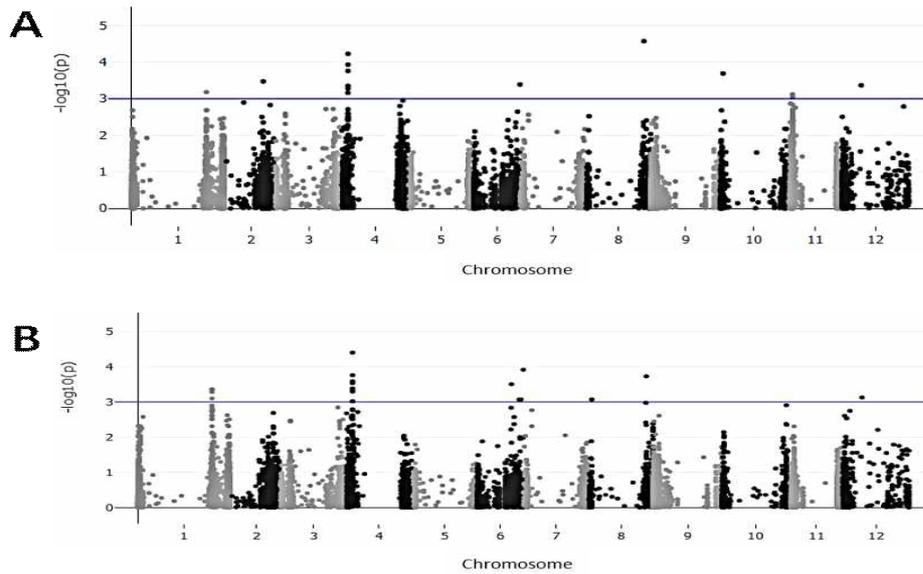


Fig. 6. Manhattan plot created by performing GWAS with mixed linear model (PC matrix + Kinship matrix) respectively in TASSEL (A) and GAPIT software (B); The blue horizontal line represents $-\log_{10}(P) = 3$, and the SNPs above the blue line were selected as significant SNPs with high correlation with powdery mildew resistance.

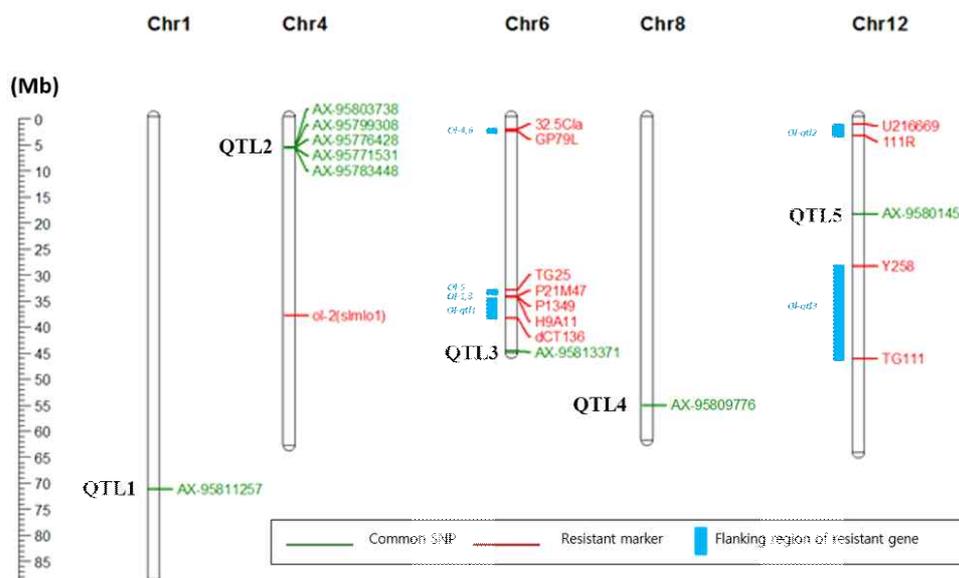


Fig. 7. A schematic diagram of tomato chromosomes showing genomic locations of 9 single nucleotide polymorphisms (SNPs) that were detected by a genome-wide from both GAPIT and TASSEL are shown in green and QTL regions. The PMR loci and DNA markers that were previously reported are shown in blue and red, respectively.

Table 12. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) selected for significant marker-trait association ($-\log_{10}(P) > 3$) in GAPIT and TASSEL softwares by a Genome-wide Association Study as significantly linked to the powdery mildew (*O. neolycopersici*) resistance in tomato.

SNP Marker ^a	SNP allele ^b (major /minor)	Position ^c		$-\log_{10}(P)$		Gene annotation ^d	
		Chr	bp	GAPI T	TASSE L	Gene ID	Gene function
AX-95811257	T/C	1	72,655,237	3.36	3.18	Solyc01g009700.3.1	NLOE
AX-95805394	C/T	1	72,661,165	3.29	-	Intergenic region	
AX-95777655	C/A	1	72,696,985	3.10	-	Solyc01g080870.3.1	Protein NRT1/ PTR FAMILY 7.3
AX-95779967	T/C	1	72,697,146	3.36	-	Solyc01g080870.3.1	Protein NRT1/ PTR FAMILY 7.3
AX-95804580	C/T	2	37,742,382	-	3.47	Intergenic region	
AX-95803738	C/T	4	5,920,027	3.54	3.16	Intergenic region	
AX-95788484	G/A	4	5,997,381	3.02	-	Solyc04g015690.4.1	Insulinase (Peptidase family M16) family protein
AX-95799308	A/G	4	6,001,287	3.39	3.35	Solyc04g015730.3.1	Hypothetical protein
AX-95776428	T/C	4	6,006,978	3.77	3.28	Intergenic region	
AX-95799144	C/T	4	6,007,262	3.35	-	Solyc04g015700.1.1	Hypothetical protein
AX-95773950	G/A	4	6,008,475	3.03	-	Solyc04g015705.1.1	Unknown protein

AX-95771531	T/C	4	6,009,028	4.41	3.93	Solyc04g015710.3.1	Dentin sialophosphoprotein-like protein
AX-95806639	G/T	4	6,009,194	3.59	-	Solyc04g015710.3.1	Dentin sialophosphoprotein-like protein
AX-95790579	C/G	4	6,022,767	-	4.23	Intergenic region	
AX-95783448	C/A	4	6,023,073	3.30	3.76	Solyc04g015730.3.1	Hypothetical protein
AX-95775687	G/C	6	34,025,307	3.51	-	Solyc06g059750.3.1	Transcriptional corepressor SEUSS
AX-95797861	A/C	6	41,603,822	3.07	-	Intergenic region	
AX-95786699	T/C	6	43,282,486	3.07	-	Intergenic region	
AX-95813371	G/A	6	45,685,033	3.92	3.39	Solyc06g084210.3.1	Sec24-like transport protein
AX-95790369	T/A	8	2,923,332	3.07	-	Intergenic region	
AX-95810925	A/G	8	56,274,173	3.73	4.57	Solyc08g074980.4.1	Receptor-like serine/threonine-protein kinase
AX-95789984	A/G	10	2,629,440	-	3.69	Solyc10g150103.1.1	Unknown protein
AX-95780990	T/C	11	5,353,985	-	3.12	Solyc11g012540.2.1	F-box/kelch-repeat protein Regulation of nuclear pre-mRNA
AX-95813498	A/G	11	5,505,866	-	3.04	Solyc11g012740.2.1	domain-containing protein 1B-like
AX-95801454	G/A	12	18,875,528	3.13	3.37	Intergenic region	

^aSNP markers highlighted in red are the common significant SNPs from TASSEL and GAPIT.

^bMinor alleles the allele favorable for the resistance.

^cPositions follow the cultivar tomato 'Heinz 1706' reference genome assembly SL2.40.

^dGene annotation follows the cultivar tomato 'Heinz 1706' reference genome assembly SL4.0 (ITAG4.0).

사. 흰가루병 저항성 후보 유전자 동정

- (1) 흰가루병 저항성 후보 유전자를 선정하고자 GWAS 결과에서 GAPIT과 TASSEL에서 각각 가장 표현형-유전자형간 유의성이 높은 것으로 나타난 SNP가 위치해 있는 QTL2 영역과 QTL4 영역 내 존재하는 유전자들과 annotation 정보를 SGN의 SL4.0 (ITAG4.0) assembly에서 확인하였다 (Table 13). 염색체 4번의 5.87-6.07Mbp에서 확인한 QTL2 영역에는 총 22개의 유전자가 존재하였으며, 염색체 8번의 57.17-57.27Mbp에서 확인한 QTL4 영역에는 9개의 유전자가 위치해 있었다. 이 중 병 저항성에 관여하는 대표적인 유전자로 알려져 있는 QTL2 영역 내 2개의 Nucleotide binding site-Leucine rich repeat (NBS-LRR) 유전자 (Solyc04g015630.2.1, Solyc04g015640.1.1)와 QTL4 영역 내 1개의 Receptor-like serine/threonine-protein kinase 유전자 (Solyc08g074980.4.1)를 흰가루병 저항성 후보 유전자로 선정하였으며, 각 유전자를 *PMR-NBS1* (Solyc04g015630.2.1), *PMR-NBS2* (Solyc04g015640.1.1),

SL-STPK (Solyc08g074980.4.1) 유전자로 명명하였다.

아. 후보유전자 기반 감수성-저항성 계통간 다형성 탐색

(1) 선정된 3개의 후보유전자(*PMR-NBS1*, *PMR-NBS2*, *SL-STPK*)를 기반으로, 병 저항성에 관여하는 단백질 산물을 암호화하여 저항성-감수성 표현형 차이에 가장 직접적 영향을 미칠 것으로 생각되었던 엑손 영역 내에서 변이를 탐색하고자 고도 저항성 재배종 2계통(A9, A45) 및 고도 감수성 재배종 2계통(A94, Moneymaker)에서 염기서열분석을 수행하였다 (Table 14). 그 결과 4계통간에 *PMR-NBS1* 유전자의 두 번째 exon에서 1개의 SNP, *PMR-NBS2* 유전자의 세 번째 엑손에서 1개의 1bp In/Del(Insertion/Deletion), 그리고 *SL-STPK* 유전자의 첫 번째와 여섯 번째 exon에서 각각 2개의 SNP로 총 6개의 염기다형성을 확인할 수 있었다 (Table 14). *SL-STPK* 유전자의 엑손 부위 내 발견된 총 4개의 SNP 중 3개는 Axiomtomo genotyping array에서 사용된 SNP (AX-95781031, AX-95809404, AX-95781958)와 일치하였으며, 그 외 3개의 SNP는 시퀀싱을 통해 찾은 새로운 SNP였다. 그러나 이들 변이 6개는 모두 각 2개의 저항성과 감수성 재배종계통 간에 뚜렷하게 차이를 보이지 않았다. 따라서 GWAS분석 집단 내 시퀀싱을 수행하지 않은 나머지 계통들에 대한 유전자형을 확인하고자 SNP chip 상에 존재하는 SNP에서의 유전자형을 우선적으로 재확인하였다. 이들 중 SNP chip 결과 검정(validation)을 위해 PCR기반 마커로 전환 가능했던 SNP는 AX-95809404와 AX-957819582개였으며, 검정 이후 CAPS마커로 전환된 유전자형과 표현형간 관계를 확인하였다 (Fig. 8). AX-95781958의 경우, TT, TC, CC 유전자형을 가졌을 때 각 PDI 평균은 35.68%, 50.66%, 67.90%이었으며(Fig. 8A) AX-95809404의 경우, AA, AG, GG 유전자형을 가질 때 PDI 평균 36.71%, 58.99%, 66.74%를 가지면서 저항성과 감수성 계통간 주로 보유하는 유전자형 빈도에 차이가 있는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 8B).

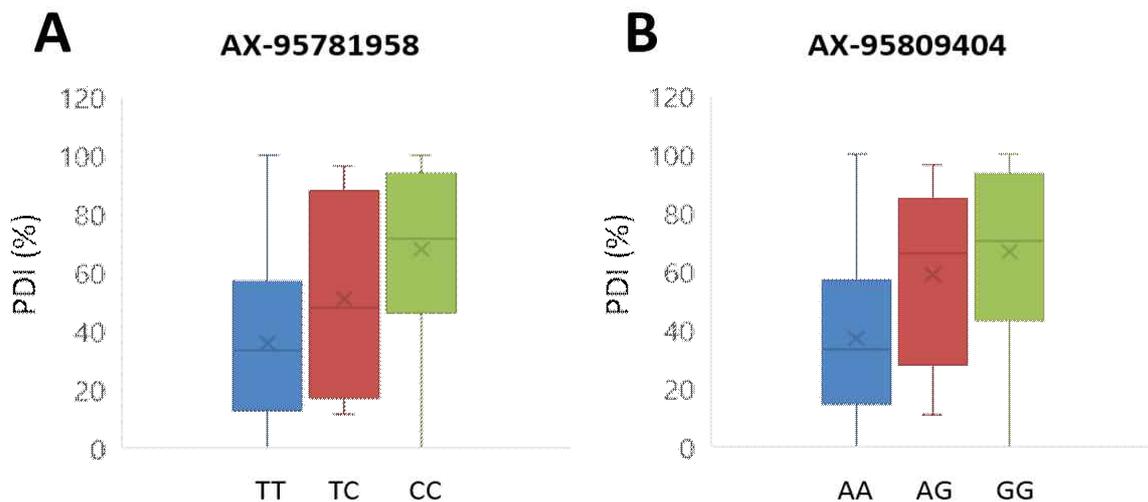


Fig. 8. Box plot showing phenotypic distribution in each genotype of the SNP AX-95781958 (A) and AX-95809404 (B). Blue and green represent the phenotypic distribution for the homozygosity genotype, and red represents the phenotypic distribution for the heterozygosity genotype.

제 7 절. 토마토 흑색잎곰팡이 내병성 마커 개발

1. 연구수행 내용

가. 토마토 흑색잎곰팡이병 발생 및 Marker-Assisted-Selection 시스템 개발

- (1) 흑색잎곰팡이 (Black Leaf Mold, BLM)은 *Pseudocercospora fuligena* 에 의하여 발생하는 토마토 곰팡이병의 일종임. BLM은 덥고 습한 기후의 열대 및 아열대 지역에서 발생하며 1936년 필리핀에서 처음 보고된 이후 아시아를 포함한 전 세계적으로 발병하였음. BLM의 주요 증상은 초기에 위쪽 또는 아래쪽 잎에 작은 백화반의 병변으로 발생하며 며칠 후에 병변이 확대되며 많은 포자가 형성되며 점차적으로 색상이 검은색으로 변함. 증상이 심화되면 병변이 잎의 양면에 나타나게 됨. BLM에 의해 심하게 감염된 식물은 최대 68%의 잎 손실이 발생하고 수확량은 최대 32%까지 감소함.
- (2) 한국에서는 충남에서 처음으로 BLM의 발생이 보고되었으며, 현재까지 막대한 경제적 피해는 보고되지 않았지만 아열대 기후의 변화로 인하여 BLM이 전국적으로 퍼질 가능성이 있음. 현재까지 BLM의 방제는 물리적, 화학적 방제에 의존하고 있음. 특히, 살균제의 사용은 재배 비용의 증가. 환경오염 발생 및 화학 물질에 대한 병원균 내성을 증가시킬 수 있기 때문에 지속 가능하지 않으며 BLM 저항성 품종의 개발이 매우 중요함.
- (3) 병 저항성 유전자 또는 QTL 연관 분자마커를 활용한 MAS는 저항성 품종 육종의 효율을 증가시킬 수 있으며, TYLCV, Fusarium wilt 등 토마토의 주요 병에 있어 활용되어왔음. BLM의 경우 2개의 열성 유전자에 의해 조절되는 것으로 보고되었지만 BLM 저항성과 관련된 후보 유전자 또는 QTL 등은 보고되지 않았음.
- (4) NGS 기술의 발달로 인하여 많은 수의 유전자원에 대한 유전체 전체의 SNP 유전자형 분석이 가능함. GWAS 분석의 경우 유전자원의 유전자형 데이터와 표현형 데이터를 결합하여 분석하며 다수의 원예 작물에서 복잡한 형질에 대한 유전자 및 QTL 영역을 탐색한 바 있음. 따라서 본 연구에서는 한국에서 분리한 BLM 병원균을 확인 및 다양한 계통에 대한 스크린 진행, GWAS를 활용한 BLM 저항성 연관 QTL 및 SNP 탐색을 목표로 함.

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료 및 병원균

- (1) 21개의 엘리트 inbred line, 16개 품종, 41개 introgression line 및 14가지의 종(*S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. pimpinellifolium*, *S. penellii*, *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chimielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagense*, *S. neorickii*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum*)의 107개 야생종으로 구성된 토마토 유전자원이 BLM 검정 및 GWAS에 사용했음. 토마토 유전자원은 토마토 유전자원 센터 (TGRC, UC-Davis, CA, USA), Germplasm Resources Information Network(GRIN, MD, USA), 국립원예분초과학원(NIHHS, 전주) 및 부산대학교 식물유전육종연구센터(PGBRC at PNU, 밀양, 한국)과 각종 종자 회사에서 수집했음.

- (2) *Pseudocercospora fuligena*에 대한 병원균 분리주는 원래 강릉원주대학교(GWNU, 한국 강릉)에서 얻었으며 병원체 동정 및 BLM 검정에 사용했음.

나. 병원균 동정

(1) 병원균 DNA 추출

- 균개(균사, 분생포자균 및 분생자)를 ddH₂O와 혼합하고 멸균 스포츠타로 PDA 한천에서 부드럽게 문질러 제거하여 수집된 균개를 1.5 mL 튜브로 옮기고 14,240 x g에서 2분 동안 원심분리했음. 그런 다음 상층액을 버리고 600 μ L의 DNA 추출 완충액을 각 튜브에 넣음. 튜브를 65°C에서 40분 동안 배양하고 200 μ L의 7.5M 암모늄 아세테이트를 용해물에 첨가한 다음 얼음에 15분 동안 둔 후 10분 동안 14,240 x g에서 원심분리했음. 상층액을 2.5 μ L의 10mg·mL⁻¹ 글리코젠 용액과 600 μ L 이소프로판올이 들어 있는 새로운 1.5mL 튜브로 옮겨 10분 동안 14,240 x g에서 원심분리한 후, 액체를 조심스럽게 빼내고 DNA 펠렛을 300 μ L의 70% 에탄올로 세척하고, 건조시키고, 50 μ L Tris-EDTA 완충액에 재현탁했음. Nanodrop 1000 Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 DNA 품질 및 농도를 측정했음.

(2) Internal transcribed spacer 영역의 염기서열분석

- PNU 균주(PNU_Pf-01, 02)의 ITS 영역은 ITS1(5'-CCGTAGGTGAACCTGGCGG-3') 및 ITS4(5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') PCR 프라이머 세트를 사용하여 증폭시켰다. PCR 혼합물은 2 μ L genomic DNA (20 ng· μ L⁻¹), 2 μ L 10X buffer SolgTM (SolGent, Daejeon, Korea), 0.4 μ L dNTPs (10 mM, SolGent), 각 프라이머의 1 μ L(10pmol) 및 0.2 μ L eTaq SolgTM Taq 중합효소(5U· μ L⁻¹, SolGent)를 포함하는 총 부피 20 μ L로 준비했음. PCR 증폭은 다음과 같은 조건 하에 T100TM thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 수행했음. 94°C에서 10분 동안 변성 후 94°C에서 1분 동안 변성, 55°C에서 1분간 결합, 72°C에서 1분간 연장을 40회 반복했음. PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동하고 ExpinTM Gel SV gel 추출 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 후 Genotech(대전, 한국)의 염료-중결기법을 사용하여 직접 염기서열분석을 했음.

(3) 계통발생학적 분석

- 이번 실험에서 분리 및 동정한 BLM 병원균의 ITS 염기서열을 분석하여 GenBank Nucleotide Sequence Database (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 얻은 다른 균의 ITS 서열과 비교, 분석하여 계통도를 제작했음. Maximum-Likelihood 방법에 기반한 Mega X 프로그램을 사용했음. 진화 거리는 Jukes-Cantor 매개변수 모델(Jukes and Cantor, 1969)에 따라 계산했음. 1,000개의 bootstrap에 의해 평가했음. *Cercospora capsici*(EF535687) 및 *Cladosporium fulvum*(AF393701)의 ITS를 외집단으로 사용했음.

다. BLM 병리검정

(1) 접종 준비 및 접종

- *P. fuligena* 분리주(PNU-Pf-01)는 4주 동안 26 \pm 2°C에서 potato dextrose agar (PDA)(Mersha, 2008)에서 배양했다. 균사는 지그재그 스트리킹 방법으로 유지 및 증식시킴. 병원체 접종을 위해 토마토 식물을 150mL 플러그 트레이에서 세 번째 본엽이 완전히

- 발달할 때까지 재배했음. 접종원을 얻기 위해 4주 된 병원균 배지를 멸균 증류수에 담그고 부드럽게 닦았음. 찌꺼기를 제거하기 위해 세 겹의 거즈로 현탁액을 걸러냈음. 병원체 현탁액에 0.1% Tween 20과 혼합하고 혈구계를 사용하여 농도를 mL당 1×10^5 로 측정했음.
- BLM 병리검정 경우, 병원균 혼탁액을 분무기로 토마토 잎의 양면을 덮을 만큼 충분히 분무했음. 접종된 식물은 PNU에서 설계한 폴리에틸렌 필름 습기 챔버에서 PG210 램프(Bissol LED, 서울, 한국) 및 $95 \pm 5\%$ 상대 습도(RH)에서 12시간 광주기로 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 배양했음.

(2) 병 진단

- 각 식물의 반응은 접종 후 2주 후에 평가했고 전체 잎 면적에서 BLM 증상이 있는 잎 면적(두 번째에서 네 번째 실제 잎)의 백분율을 시각적으로 판단했음. 시각적 척도 값은 1에서 4로 평가했으며, 여기서 1은 전체 잎 면적에서 병든 잎 면적의 비율이 0-25%이고; 2=26-50%; 3=51-75%; 4= 76% 이상임(그림 1). 병 민감도 지수(DSI) 값을 계산하여 식물의 반응은 DSI = 0-10%, 11-20%, 21-30%, 31-50% 및 DSI >51%일 때 각각 저항(R), 중간 저항(MR), 중간 감수성(MS), 감수성(S) 및 높은 감수성(HS)으로 결정했음.

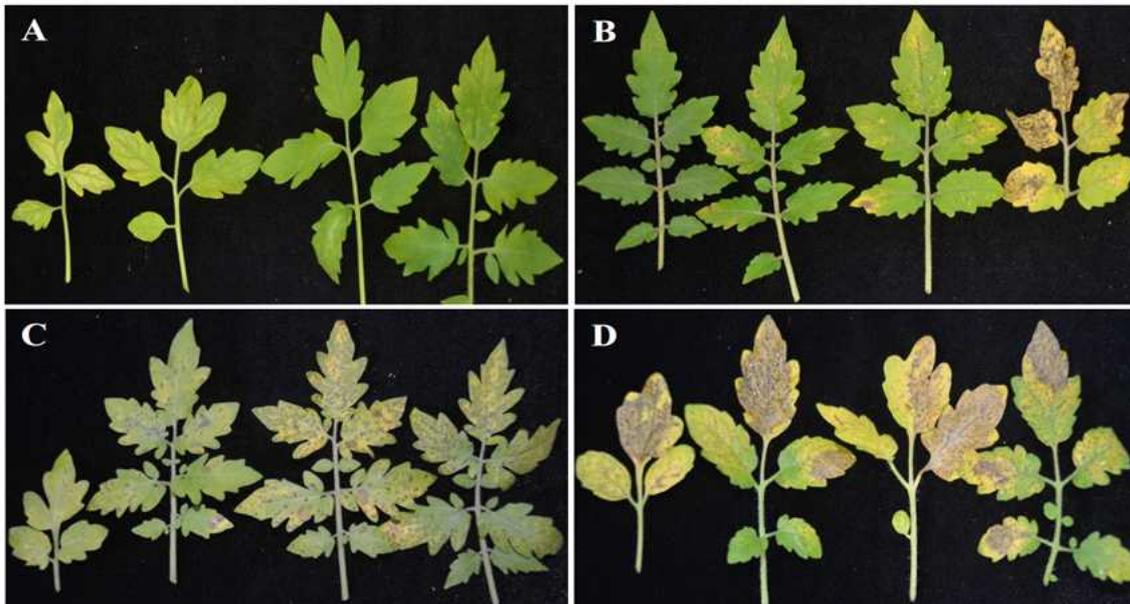


그림 1. 검은잎곰팡이(BLM) 증상의 시각적 척도. A) 1(0-25%), B) 2(26-50%), C) 3(51-75%), D) 4(76-100%)

라. SNP 유전형 분석 및 전장 유전체 연관 분석

(1) 식물 DNA 추출 및 SNP 유전형 분석

- 어린 잎 조직을 채취하여 GeneAll Plant SV Mini Kit(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 DNA를 추출했음. NanoDrop(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 DNA 농도 및 순도를 확인하고 SNP 유전형 분석을 위해 DNA 샘플을 $100\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 로 희석했음. SNP 유전형 분석을 위해 DNA Link, Inc.(서울, 한국)에서 55K Tomato Genotyping Array 이용했음. 총 185계통의 토마토 유전자원에 대하여 진행했음. SNP 데이터 필터는 missing data < 20% 및 minor allele frequency(MAF) > 5%의 기준을 적용하여 수행했음.

(2) 집단 구조 분석 및 계통 클러스터링

- 집단 구조는 STRUCTURE v2.3.4를 사용하여 분석했음. 최상의 K(집단의 수)를 찾기 위해 해당 분석은 K 범위 1-10에서 각 K 당 Burnin- period 10,000회, Morkov Chain Monte-Carlo (MCMC) 10,000회를 10번 반복했음. 최적의 K 값은 Structure Harvester v0.6.94을 이용하여 탐색했음. 그 후 집단 구조 matrix를 제작하기 위해 R 패키지를 사용하여 Euclidean의 유전적 거리를 기반으로 계통도를 작성했음.

(3) 전장 유전체 연관 분석 (GWAS)

- GWAS는 TASSEL 프로그램 v5.0 및 GAPIT 프로그램 v3.0을 이용하여 mixed linear model(MLM)을 수행했으며, 여기서 집단 구조(Q matrix)는 고정 효과로 설정되고 혈연 관계를 보여주는 Kinship matrix는 위양성을 제어하기 위한 랜덤 효과로 설정했음. MLM 모델의 위양성을 줄이기 위해 FEM(Fixed Effect Model)과 REM(Random Effect Model)을 사용하는 FarmCPU(Fixed and random model Circulating Probability Unification) 모델을 GAPIT 프로그램 분석에 추가로 사용했음. 유의한 SNP를 선택하기 위해 $P \leq 0.0001$ 기준으로 분석했음.

3. 내용 및 결과

가. PNU_Pf-01 isolate의 형태학적 특징

- (1) PDA 배지에서 26°C 4주간 배양 후, PNU_Pf-01 콜로니의 윗면은 옅은 갈색에서 갈색의 중간 정도의 aerial 균사체를 형성했으며 (그림 2A), 콜로니의 뒷면은 iron-grey색에서 암갈색으로 나타났고 (그림 2B) 직경은 최대 10-15mm에 도달했음. 분생포자는 단독형이고 원통형 내지 원통형-난원형이며 직선형 내지 적당히 굽은 20-100 μ m 길이이며, 끝 부분은 둥글고 기부 부분은 도톰하게 잘려 있음 (그림 2C). 명확한 격막은 관찰되지 않았지만, 격막의 얇은 흔적이 발견되었다. 이러한 형태적 특징은 선행연구에서 묘사된 것과 유사하였음.

나. 계통발생 분석

- (1) PNU_Pf-01 분리주의 ITS-5.8S rDNA 영역을 PCR 증폭하여 543bp 단편을 생성했다. 이 PCR 단편과 BLASTn의 염기서열분석은 분리물의 염기서열이 GenBank에 있는 *P. fuligena* (GU214675)의 염기서열과 99% 동일하게 나타났음 (그림 3). 총 16개의 *Pseudocercospora* 종의 ITS-5.8S rDNA 염기서열을 이용하여 계통수를 구성하였음 (Table 1). 계통도에서 모든 *P. fuligena* 분리주는 bootstrap support이 높은(90%) 두 군집(군집 I 및 군집 II)으로 분류되었음. PNU_Pf-01 분리주는 한국 (JX290079), 일본 (GU269712), 미국 (KF931141 및 MF990310)에서 분리된 *P. fuligena* 균주와 함께 군집 I에 위치했음. 군집 II에서는 터키 (MT803749), 태국 (GU269711, GU060636), 인도 (KF881898)에서 분리된 *P. fuligena*가 함께 그룹화 되었으며, *P. atromarginalis* (GU269657)와 *P. chengtzensis* (GU269)에서 분리된 두 종 *P. chengtzensis* (GU269657) 가지과 숙주도 포함되었음. 군집 III는 서로 다른 *Pseudosecopora* 종의 3주 (GU269675, GU269670, GU269728)로 구성되었으며, BLM과 유사한 증상을 유발하는 *Cladosporium fulvum* 및 *Cercospora capsica*의 2주를 outgroup으로 분리하였음. 그 결과 PNU_Pf-01 균주가 *P. fuligena*에 가장 가까웠고 *Pseudocercospora* 속의 다른 균주들과 명확하게 구별되는 것으로 나타났음.

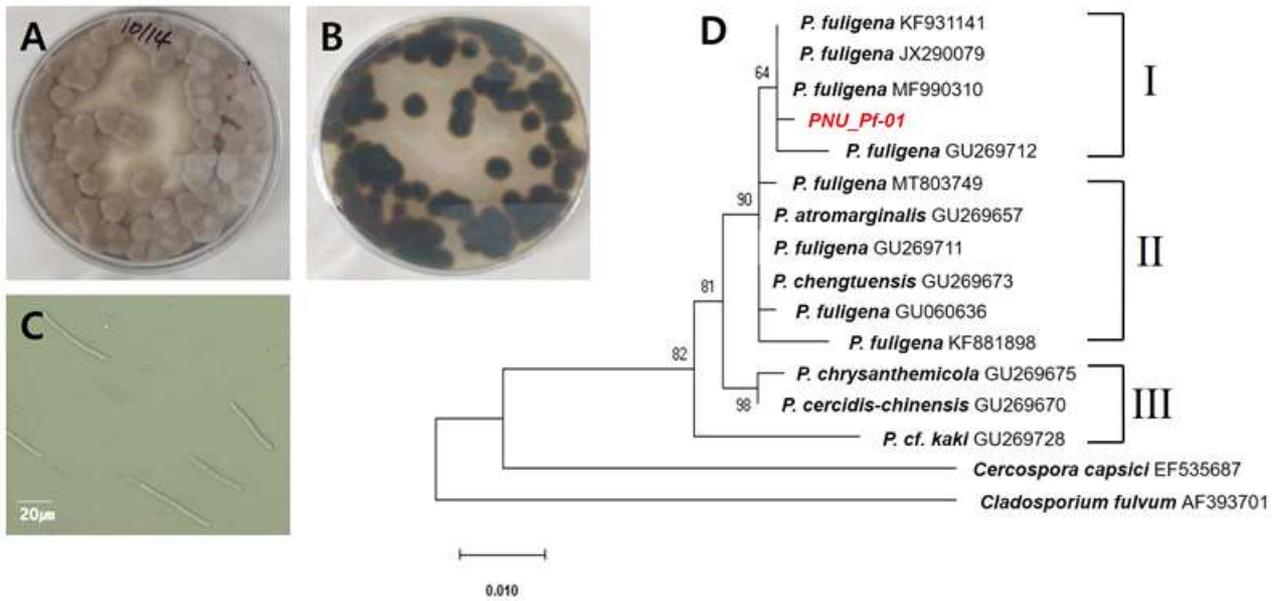


그림 2. Identification of PNU_Pf-01 isolate. A) Upper and B) reverse sides of colony grown on potato dextrose agar after incubation for four weeks. C) Conidia of *Pseudocercospora fuligena*. D) Phylogenetic tree of *P. fuligena* constructed based on the Interspace transcribed sequences (ITS1-5.8S-ITS2) by using the Maximum likelihood method of the MEGA-X program. The pairwise genetic distances were determined by the Jukes-Cantor model. The numbers on branches are bootstrap values (1,000 replicates; values < 50% are hidden). *Cercospora capsicum* and *Cladosporium fulvum* are used as an outgroup. The scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

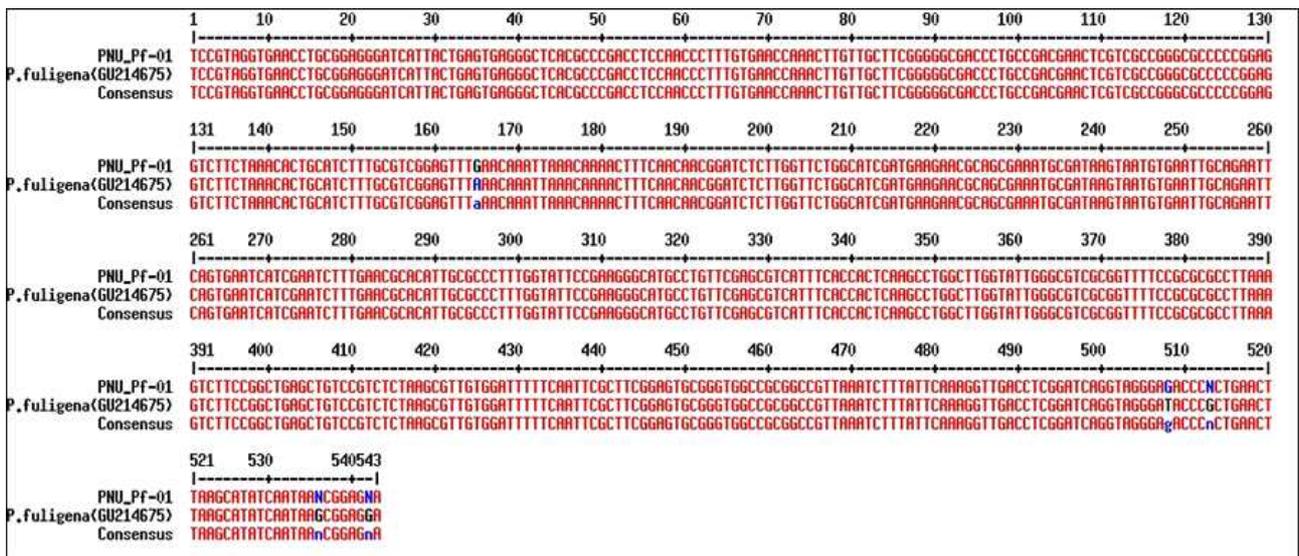


그림 3. The multiple sequence alignment of Interspace transcribed sequences (ITS-5.8S rDNA) region by using Multalin software (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) for comparing PNU_Pf-01 isolate with an isolate (GU214675) of *Pseudocercospora fuligena*.

다. 흑색잎곰팡이병의 bioassay

(1) 질병 screen을 위해 총 185개의 토마토 accessions을 *P. fuligena* 분리주 PNU_Pf-01으로 감염시켰다. 이러한 accessions은 높은 저항성에서 높은 감수성에 이르기까지 모든 수준의 숙주 반응을 나타냈다. 감염된 식물은 상부 또는 하부 잎에 작은 연한 갈색 또는 연한 흑색의 백화 반점 또는 검은 chlorotic 병변의 BLM 증상을 나타냈다. 접종 14일 후, 각 accessions에 대해 DSI 점수를 매겼고, accessions의 66.5%는 저항성 또는 중도 저항성을 보였고, 33.5%는 감수성을 보였다(그림 4). 대부분의 BLM 내성 수종은 *S. habrochaites*를 포함한 대부분의 야생종과 관련되었으며 8개의 *S. habrochaites* accessions 모두 BLM 내성을 보였다. 반면, BLM에 취약한 accessions은 50% 이상이 *S. lycopersicum*이었고, 여기에는 소수의 야생종도 포함되었음 (표 2).

라. SNP 유전자형의 평가 및 SNP filtering

(1) 55K Tomato SNP 칩 array 를 사용하여 185개의 토마토 accessions에 대해 총 51,912개의 genome-wide SNPs가 genotyping이 되었음. 그 중 missing 데이터 비율이 20% 미만인 SNP를 제거한 후 43,750개의 SNP가 선택되었음. 그런 다음, 39,808개의 SNP가 12개의 염색체에 걸쳐 1,727개(Chr. 8)-5,669(Chr. 1) 염색체당 SNP의 빈도로 분포된 5% 초과 minor allele 빈도로 SNP를 필터링하여 선택되었음 (표 3). 최종적으로, 고품질 SNP의 유전형 데이터는 차후의 집단 유전 분석 및 GWAS에 사용되었음.

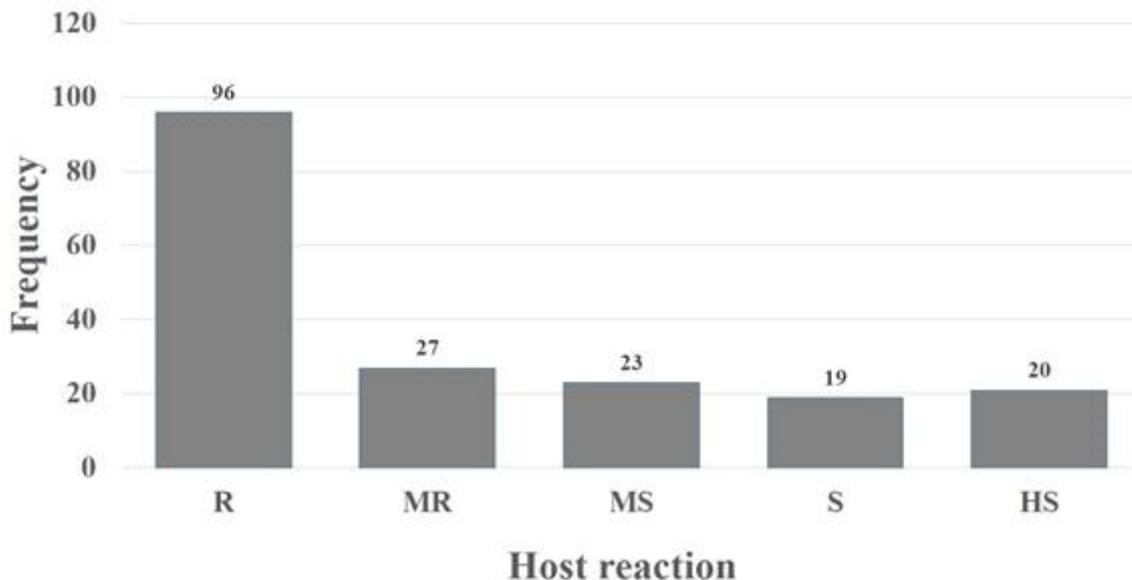


그림 4. Distribution of host reaction to Black leaf mold in 185 tomato accessions. R, resistance; MR, moderate resistance; MS, moderate susceptibility; S, susceptibility and HS, high susceptibility.

표 2. Disease severity index (DSI) and host reaction (HR) to Black leaf mold

determined for 185 tomato accessions

Plant No.	Mean of disease scoring (\pm SD ^a)	Disease severity	Host reaction ^b	Plant No.	Mean of disease scoring (\pm SD ^a)	Disease severity	Host reaction ^b
B1	1.15 \pm 0.7	28.8	MS	B32	0.34 \pm 0.3	8.6	R
B2	0.20 \pm 0.1	5.0	R	B33	2.70 \pm 1.2	67.5	HS
B3	0.23 \pm 0.1	5.6	R	B34	1.05 \pm 0.3	26.3	MS
B4	2.85 \pm 0.4	71.3	HS	B36	0.70 \pm 0.3	17.5	MR
B5	1.16 \pm 0.2	28.9	MR	B37	0.24 \pm 0.2	6.1	R
B6	1.90 \pm 0.0	47.5	S	B39	0.14 \pm 0.1	3.6	R
B7	0.30 \pm 0.2	7.5	R	B40	0.91 \pm 0.3	22.8	MS
B8	0.02 \pm 0.0	0.5	R	B42	1.54 \pm 0.6	38.5	S
B9	0.12 \pm 0.2	3.1	R	B44	0.12 \pm 0.0	3.0	R
B10	0.14 \pm 0.1	3.5	R	B45	0.06 \pm 0.1	1.5	R
B11	0.23 \pm 0.1	5.8	R	B46	2.30 \pm 0.2	57.5	HS
B12	0.50 \pm 0.2	12.5	MR	B47	0.82 \pm 0.5	20.5	MR
B13	1.49 \pm 0.3	37.3	S	B48	0.15 \pm 0.1	3.8	R
B14	0.18 \pm 0.1	4.5	R	B49	0.20 \pm 0.1	5.0	R
B15	2.13 \pm 1.5	53.3	HS	B50	0.33 \pm 0.3	8.3	R
B16	0.03 \pm 0.1	0.6	R	B51	0.05 \pm 0.1	1.3	R
B17	0.33 \pm 0.2	8.3	R	B52	0.44 \pm 0.2	11.1	MR
B18	0.34 \pm 0.2	8.5	R	B54	0.37 \pm 0.1	9.2	R
B19	0.30 \pm 0.2	7.5	R	B55	0.42 \pm 0.4	10.5	R
B20	1.30 \pm 0.6	32.5	S	B56	0.10 \pm 0.00	2.5	R
B21	0.34 \pm 0.2	8.6	R	B57	0.50 \pm 0.3	12.5	MR
B22	4.00 \pm 0.0	100	HS	B58	0.33 \pm 0.5	8.2	R
B23	0.06 \pm 0.1	1.6	R	B59	1.11 \pm 0.9	27.9	MR
B24	3.32 \pm 0.9	83.0	HS	B60	0.38 \pm 0.2	9.5	R
B25	3.80 \pm 0.4	95.0	HS	B61	0.34 \pm 0.3	8.5	R
B26	4.00 \pm 0.0	100	HS	B62	0.20 \pm 0.1	5.0	R
B27	0.29 \pm 0.2	7.3	R	B63	0.23 \pm 0.1	5.8	R
B28	0.35 \pm 0.2	8.8	R	B64	0.26 \pm 0.2	6.5	R
B29	0.16 \pm 0.1	4.0	R	B65	0.27 \pm 0.1	6.7	R
B30	0.37 \pm 0.5	9.2	R	B66	1.10 \pm 0.3	27.5	MS
B31	1.24 \pm 0.2	31.0	MS	B67	0.76 \pm 0.4	19.1	MR

2,

Plant No.	Mean of disease scoring (\pm SD ^a)	Disease severity	Host reaction ^b	Plant No.	Mean of disease scoring (\pm SD ^a)	Disease severity	Host reaction ^b
B68	0.25 \pm 0.2	6.4	R	B100	1.17 \pm 0.6	29.3	MS
B69	0.65 \pm 0.2	16.3	MR	B102	0.32 \pm 0.1	8.0	R
B70	0.30 \pm 0.4	7.5	R	B103	2.55 \pm 0.4	63.8	HS
B71	1.00 \pm 0.6	25.0	MS	B104	0.14 \pm 0.1	3.4	R
B72	4.00 \pm 0.0	100	HS	B105	0.40 \pm 0.2	10.0	R
B73	0.86 \pm 0.3	21.6	MS	B106	1.59 \pm 0.4	39.7	S
B74	0.24 \pm 0.1	5.9	R	B107	0.87 \pm 0.6	21.8	MS
B75	1.40 \pm 0.2	35.0	S	B108	0.58 \pm 0.5	14.4	MR
B76	0.13 \pm 0.1	3.2	R	B109	0.00 \pm 0.0	0.0	R
B77	0.36 \pm 0.3	9.0	R	B110	0.53 \pm 0.2	13.3	MR
B78	0.23 \pm 0.1	5.6	R	B111	1.19 \pm 0.6	29.8	MS
B79	0.15 \pm 0.1	3.8	R	B112	0.39 \pm 0.7	9.6	R

B80	0.63 ± 0.3	15.8	MR	B113	0.03 ± 0.1	0.8	R
B81	4.00 ± 0.0	100.0	HS	B114	0.09 ± 0.2	2.2	R
B82	0.11 ± 0.1	2.8	R	B115	0.86 ± 0.7	21.5	MS
B83	1.03 ± 0.3	25.6	MS	B116	0.09 ± 0.1	2.1	R
B84	0.02 ± 0.0	0.5	R	B117	0.13 ± 0.1	3.1	R
B85	0.09 ± 0.1	2.1	R	B118	0.00 ± 0.0	0.0	R
B86	0.45 ± 0.6	11.3	MR	B119	0.00 ± 0.0	0.0	R
B87	0.07 ± 0.1	1.7	R	B120	0.04 ± 0.1	1.1	R
B88	0.26 ± 0.3	6.6	R	B121	0.25 ± 0.1	6.3	R
B89	0.22 ± 0.6	5.6	R	B122	0.37 ± 0.2	9.2	R
B90	0.28 ± 0.3	7.0	R	B123	0.06 ± 0.1	1.5	R
B91	1.41 ± 0.9	35.3	S	B124	0.13 ± 0.1	3.3	R
B92	0.65 ± 0.6	16.3	MR	B125	0.16 ± 0.1	3.9	R
B93	0.44 ± 0.3	11.1	MR	B126	0.09 ± 0.1	2.2	R
B94	0.50 ± 0.7	12.5	MR	B127	1.39 ± 0.5	34.7	S
B95	0.26 ± 0.2	6.6	R	B128	0.50 ± 0.0	12.5	MR
B96	0.05 ± 0.1	1.3	R	B129	2.00 ± 0.3	50.0	S
B97	0.10 ± 0.0	2.5	R	B130	1.30 ± 0.5	32.5	S
B98	0.78 ± 0.6	19.4	MR	B131	0.40 ± 0.0	10.0	R
B99	0.86 ± 0.7	21.5	MS	B132	0.16 ± 0.2	3.9	R

2.

Plant No.	Mean of disease scoring (± SD ^a)	Disease severity	Host reaction ^b	Plant No.	Mean of disease scoring (± SD ^a)	Disease severity	Host reaction ^b
B133	1.06 ± 0.7	26.5	MS	B166	1.28 ± 0.8	32.0	S
B134	1.40 ± 1.2	35.0	S	B167	1.27 ± 0.6	31.7	S
B135	3.30 ± 0.5	82.5	HS	B169	0.52 ± 0.2	13.1	MR
B136	0.18 ± 0.0	4.4	R	B171	0.47 ± 0.3	11.7	MR
B137	1.30 ± 0.3	32.5	S	B172	0.38 ± 0.1	9.5	R
B138	0.52 ± 0.3	13.1	MR	B173	0.14 ± 0.1	3.5	R
B140	1.17 ± 0.6	29.2	MS	B174	0.79 ± 0.3	19.7	MR
B141	2.04 ± 0.3	51.0	HS	B175	1.65 ± 0.4	41.3	S
B142	1.68 ± 0.3	42.1	S	B176	2.42 ± 0.4	60.4	HS
B143	4.00 ± 0.0	100.0	HS	B177	0.10 ± 0.1	2.5	R
B144	0.83 ± 0.2	20.6	MR	B178	0.00 ± 0.0	0	R
B145	4.00 ± 0.0	100.0	HS	B179	0.35 ± 0.2	8.8	R
B146	2.61 ± 0.4	65.3	HS	B180	0.39 ± 0.2	9.6	R
B147	4.00 ± 0.0	100.0	HS	B181	0.40 ± 0.3	10.0	R
B148	0.33 ± 0.2	8.1	R	B182	0.05 ± 0.1	1.3	R
B149	1.12 ± 0.5	28.0	MS	B183	0.05 ± 0.1	1.3	R
B150	0.84 ± 0.6	21.1	MS	B184	0.30 ± 0.3	7.5	R
B151	1.87 ± 0.5	46.7	S	B185	0.19 ± 0.2	4.7	R
B152	1.74 ± 0.6	43.6	S	B186	1.18 ± 0.8	29.4	MS
B154	0.69 ± 0.4	17.2	MR	B187	0.68 ± 0.4	16.9	MR
B155	0.40 ± 0.3	10.0	R	B188	0.00 ± 0.0	0	R
B156	0.72 ± 0.9	17.9	MR	B189	0.07 ± 0.2	1.8	R
B157	1.01 ± 0.7	25.3	MS	B190	0.29 ± 0.3	7.3	R
B158	2.31 ± 0.7	57.8	HS	B191	0.16 ± 0.2	3.9	R
B159	2.73 ± 0.8	68.3	HS	B192	0.86 ± 0.7	21.5	MS
B160	1.00 ± 0.6	25.0	MS	B193	0.30 ± 0.4	7.5	R
B162	0.66 ± 0.4	16.4	MR	B194	0.79 ± 0.6	19.8	MR

B163	1.62 ± 0.7	40.5	S	B195	0.20 ± 0.2	5.0	R
B164	0.07 ± 0.10	1.8	R	B196	0.15 ± 0.3	3.8	R
B165	0.67 ± 0.5	16.7	MR				

^a Standard deviation.

^b R, resistance; MR, moderate resistance; MS, moderate susceptibility; S, susceptibility and HS, high susceptibility

마. 집단 구조 분석

(1) 185개 토마토 accession의 집단 구조는 39,808개의 SNP 세트를 사용하여 분석되었음. delta K method은 최상의 K(집단 수)가 6임을 나타냈다(그림 5A). 집단 정보를 기반으로 모든 액세스는 6개의 클러스터로 그룹화되었다. 이 6개 클러스터의 accessions 수는 10개(클러스터 2)에서 64개(클러스터 1) 범위였다. *S. lycopersicum*의 accessions은 품종 유형(주로 생식, 체리 및 생산 유형)에 따라 다른 클러스터로 그룹화되었다; 클러스터 1(16개 accessions), 클러스터 2(10), 클러스터 3(3), 클러스터 4(32) 및 클러스터 6(17). 대부분의 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* accessions (체리 토마토)은 클러스터 1(47)과 클러스터 3(3)으로 그룹화되었다. 모든 18개의 *S. pimpinellifolium* accessions (야생종과 밀접하게 연관됨)은 클러스터 1(1)과 클러스터 3(17)으로 그룹화되었다(그림 5B). *S. pimpinellifolium*을 제외한 대부분의 야생종 accessions은 클러스터 5(37)로 그룹화되었다(그림 4B 및 Supplementary 표 S2); *S. penellii* (10), *S. habrochaites* (8), *S. chilense* (6), *S. arcanum* (3), *S. Corneliomulleri* (3), *S. chimielewskii* (2), *S. neorickii* (2), *S. peruvianum* (2), *S. huaylasense* (1) (그림 5B).

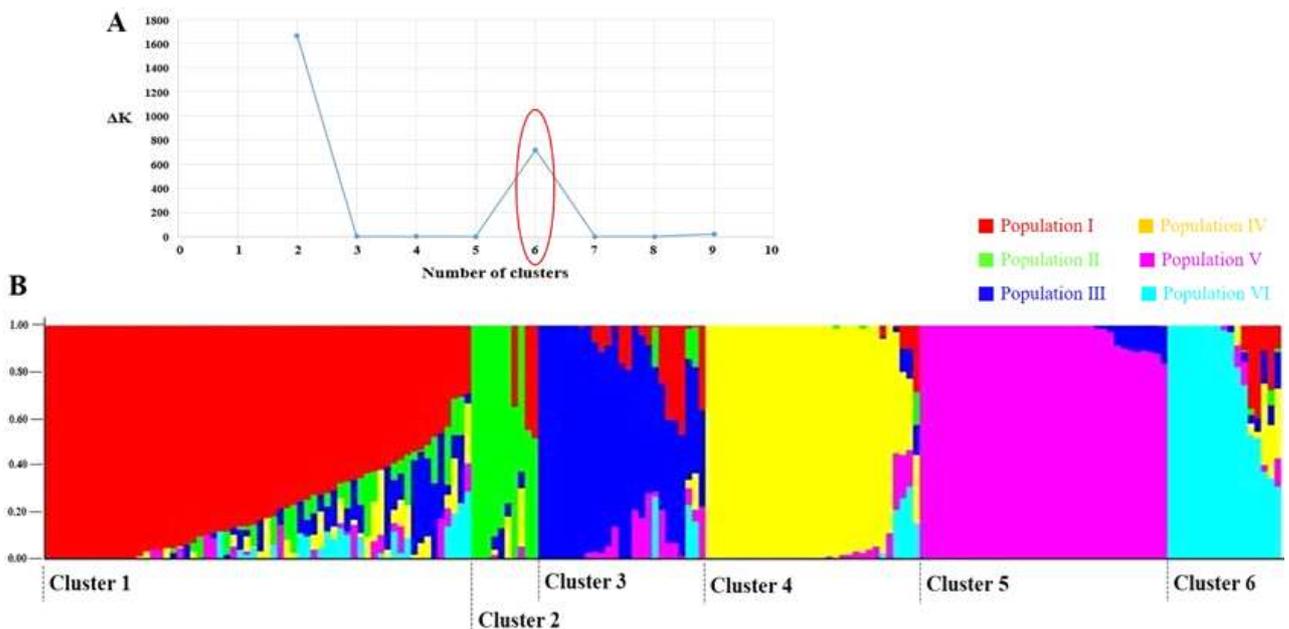


그림 5. Inferred population structure in a core collection of 185 tomato germplasms. (A) The best K (number of clusters) was determined by calculating the ad hoc

measured ΔK using two sets of burn-in/run length parameters. (B) Bar plot presenting the population structure at six clusters in the tomato collection. Each germplasm's genome is presented by a single vertical line, which is partitioned into colored segments in proportion to the estimated membership in the six clusters.

바. Hierarchical clustering analysis

(1) Hierarchical clustering은 39,808 SNPs로 계산된 유클리드 유전 거리를 기반으로 하는 agglomerative clustering 알고리즘에 대한 UPGMA를 사용하여 수행되었음. 집단 구조 분석 결과로부터 K=6을 적용하여 UPGMA 덴드로그램을 도출하였음. 185개의 토마토 accessions은 크게 6개 그룹으로 구분되었음 (Group I: 116 accessions, Group II: 37 accessions, Group III: 16 accessions, Group IV: 11 accessions, Group V: 4 accessions, Group VI: 1 accessions). 그룹 I에는 집단 구조에서 군집 2, 4, 6으로 분류된 모든 accessions과 군집 1에서 분류된 대부분의 accessions이 포함되었음. 그룹 II는 군집 5에 나타난 accessions로 구성되었고, 그룹 III은 주로 *S. pimpinellifolium* accessions로 구성되었음. 그룹 IV와 V에서는 Cluster 1과 3의 accessions의 일부가 존재하였고, 그룹 VI는 1개의 accession으로 독립적으로 형성되었음. *S. galapagense*와 *S. cheesmaniae*는 *S. pimpinellifolium*의 그룹 II에 포함되었음 (그림 6). 집단 구조와 hierarchical clustering 분석에서 accessions의 그룹화 패턴이 일치하지 않았지만 두 분석 모두 *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* 및 기타 야생종에 대해 accessions을 크게 3개의 그룹으로 나누는 유사한 패턴을 나타냈음.

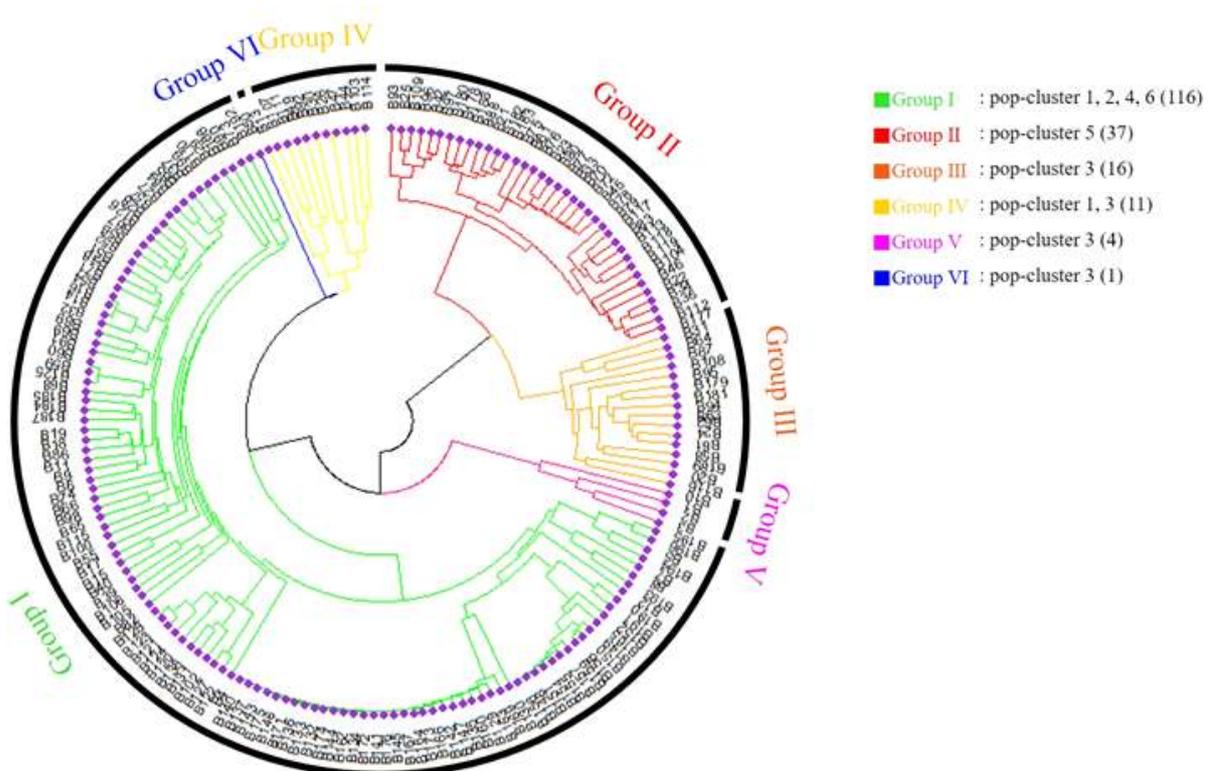


그림 6. The UPGMA dendrogram showing the association among the 185 tomato accessions based on Euclidean genetic distances calculated using the 39,808 SNPs

사. BLM 저항성의 Genome-wide association study

- (1) GWAS 수행을 통하여 BLM 저항성과 유의하게 연관된 총 13개의 SNP가 검출되었음. 이러한 SNP는 물리적 위치를 고려하여 8개의 QTL로 분류되었음. 9개의 SNP는 2번, 3번, 6번, 11번 염색체에서 threshold $P \leq 0.0001$ 에서 TASSEL 프로그램을 사용한 MLM 모델 기반 BLM 저항성과 유의하게 연관되어 있는 것으로 나타났으며 표현형 변이의 10.8-16.4%를 나타냄. 동일한 threshold에서 GAPIT 프로그램을 이용한 MLM 모델에 기초하여 11번 염색체에서 1개의 유의한 SNP가 검출되었고, 표현형 변이의 12.7%를 나타냄. BLM 저항성과 관련된 5개의 SNP는 동일한 threshold 값에서 GAPIT 프로그램을 사용하는 FarmCPU 모델을 기반으로 하여 염색체 2, 3, 4, 6 및 11에서 나타났으며 표현형 분산은 이 모델에서 제공되지 않았음 (그림 7 및 표 4).
- (2) 이들 SNP 중 2개의 경우 각각 2개의 공통 SNP가 검출되었음. AX-95769358은 threshold $P \leq 0.0001$ 에서 염색체 6번의 MLM-TASSEL 및 FarmCPU-GAPIT를 사용하여 발견되었음. AX-95805950은 동일한 threshold에서 11번 염색체에서 MLM-GAPIT 및 FarmCPU-GAPIT를 사용하여 검출되었음. 11번 염색체에서 모든 경우에 유의한 SNP가 나타났음 (그림 7 및 표 4).

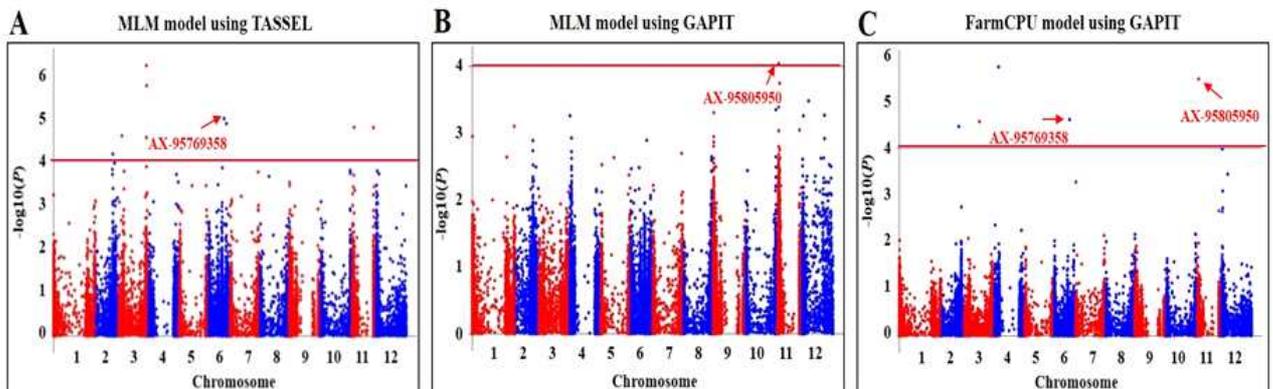


그림 7. Manhattan plots showing the associations between genome-wide SNPs and BLM resistance. The x-axis and y-axis represent the chromosome position and $-\log_{10} P$ -value of SNPs from GWAS, respectively. The red line indicates the $-\log_{10} P$ -value threshold for genome-wide significance at $P = 0.0001$. A. GWAS result of MLM model using TASSEL program. B. GWAS result of MLM model using GAPIT program. C. GWAS result of FarmCPU model using GAPIT program. The red arrows indicate the two common SNPs.

표 4. Summary of 8 QTL for BLM resistance detected from 13 significant SNPs using GWAS in tomato

QTL	SNP ^a	Chromosome	Position	P-value	R ² (%) ^c	Model-Program
-----	------------------	------------	----------	---------	---------------------------------	---------------

		(bp) ^b				
QTL2	AX-95810110	2	37315103	6.58E-05	10.8	MLM-TASSEL
	AX-95812055	2	37731254	3.55E-05	-	FarmCPU-GAPIT
QTL3-1	AX-95807890	3	6918723	2.61E-05	12.1	MLM-TASSEL
QTL3-2	AX-95794332	3	32106594	2.78E-05	-	FarmCPU-GAPIT
QTL3-3	AX-95814223	3	59474488	6.44E-07	16.4	MLM-TASSEL
	AX-95794575	3	59583127	2.87E-05	12.0	MLM-TASSEL
	AX-95811916	3	60034931	1.85E-06	16.1	MLM-TASSEL
QTL4	AX-95808969	4	9219241	1.91E-06	-	FarmCPU-GAPIT
QTL6	AX-95769358	6	33501709	1.06E-05, 2.53E-05	11.5, -	MLM-TASSEL, FarmCPU-GAPIT
	AX-95801154	6	38638499	1.38E-05	12.9	MLM-TASSEL
QTL11-1	AX-95805950	11	4406643	9.04E-05, 3.46E-06	12.7, -	MLM-GAPIT, FarmCPU-GAPIT
	AX-95818337	11	6321697	1.67E-05	12.6	MLM-TASSEL
QTL11-2	AX-95808689	11	47966901	1.69E-05	13.4	MLM-TASSEL

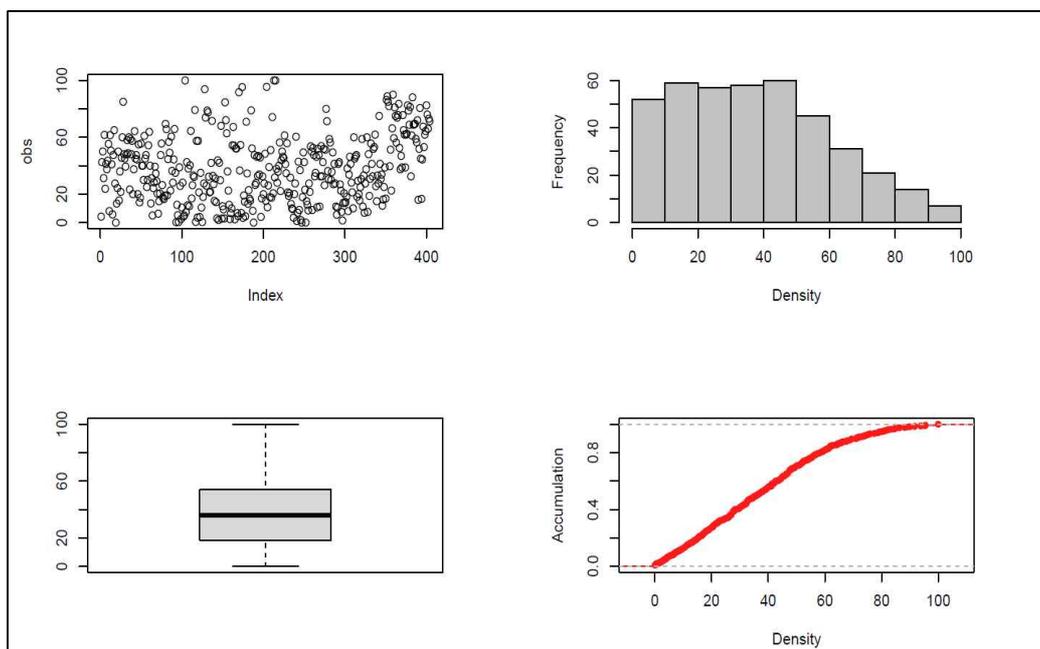
^a SNPs significantly associated with BLM resistance according to the threshold 4 ($P \leq 0.0001$)

^b Physical positions based on the tomato reference genome assembly v SL3.0 at the Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>)

^c Percentage of phenotypic variance explained by SNP.

아. 추가 계통을 이용한 BLM 저항성의 Genome-wide association study

5차년도 연구에서는 선행연구에서 저항성 및 감수성으로 보고된 계통과 종자회사 엘리트 계통 등을 포함하여 총 유전자원 404계통과 추가적으로 *S. habrochaites*의 IL(introgression line) 92계통에 대하여 병리검정을 진행하였다. 환경에 대한 영향과 scoring error를 줄이기 위해 병리검정을 수회차례 반복하였다. IL을 제외한 404계통의 해당 결과는 GWAS 분석 시 표현형 데이터로 사용하였다 (그림 8).



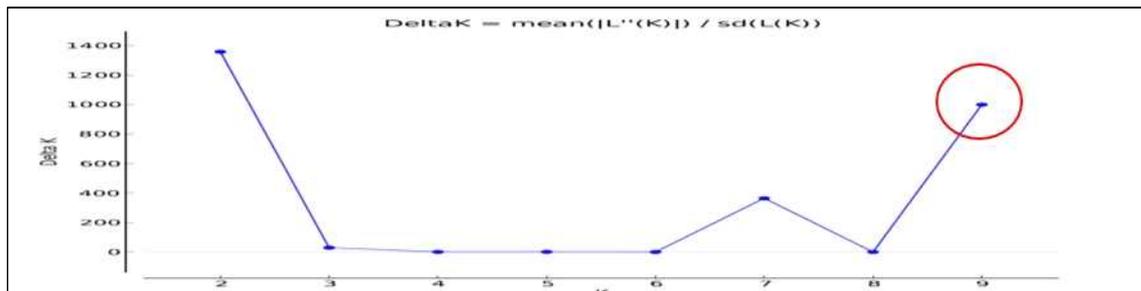
<그림 8. 병리검정 결과에 대한 표현형 분석 >

○ SNP chip 유전자형 분석

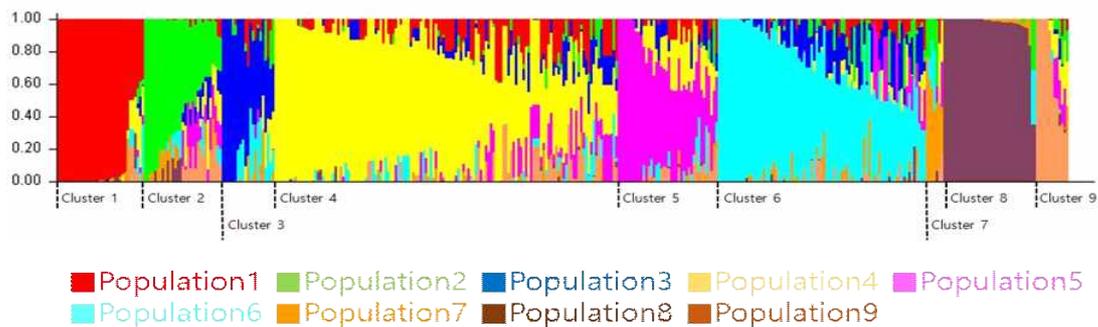
- Axiom Tomato SNP chip array를 이용하여 토마토 유전자원 404계통에 대한 51,214 개의 genotyping raw data를 얻었다. 이후 집단 구조화 분석과 GWAS 수행하고자 MAF(Major Allele Frequency) > 5%, Missing proportion <5%, Hetrozygosity proportion <5% 조건에서 SNPs를 filtering 하였다. 추가적으로 genotyping error 발생이 낮은 SNPs만을 선발하고자 야생종 내에서 Heterozygosity rate가 10%보다 낮은 SNPs만을 filtering하여 최종적으로 11,627개의 SNP를 선발하였다.

○ 집단 구조 분석 (STRUCTURE)

- STRUCTURE v2.3.4의 admixture model을 이용하여 K(집단 수) 1-10 범위에서 각 K 당 10회 반복하였다. 결과로 산출된 ΔK 값을 확인하여 최적의 K를 결정하였다. 그 결과 최적의 집단 수는 9로 나타났다 (그림 9).



<그림 2. STRUCTURE 프로그램을 통한 토마토 유전자원 404계통에 대한 Delta K값>



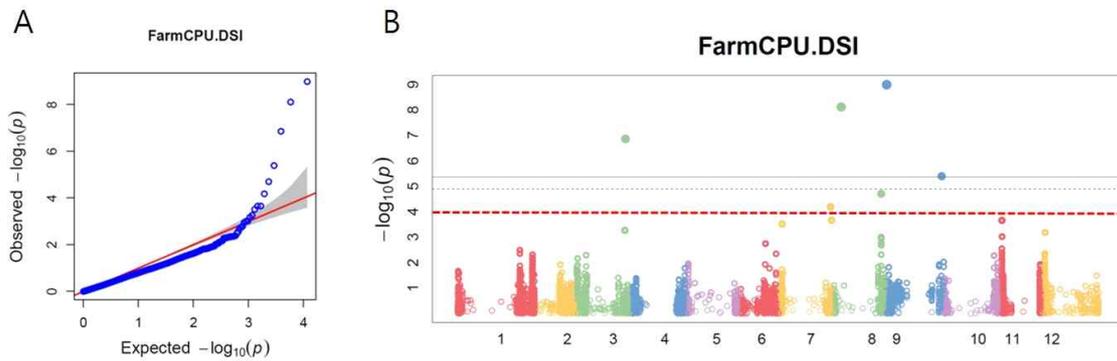
<그림 9. STRUCTURE 분석을 통한 population structure>

- 집단 2, 6, 7에 *S. pimpinellifolium*이 각각 11계통, 1계통, 1계통이 포함되었으며 그 외 야생종 계통은 집단 8에 포함되었다. 나머지 재배종 *S. lycopersicum*은 집단 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 9로 나누어져 분류되었다 (그림 3).

○ 전장유전체연관분석 (GWAS)

- 병리검정을 통해 얻은 404계통에 대한 표현형 데이터와 SNP filtering을 거친 최종 11,627개에 대한 유전자형 데이터로 GWAS를 수행하였다. GAPIT(3.0) 프로그램을 이용한 FarmCPU(Fixed and random model Circulating Probability Unification) 모델을 적용하여 분석하였다 (그림 10). $-\log_{10}(P) > 4$ 수준에서 유의한 SNP를 탐색하였을 때, 염색체 3, 7, 8, 9번에서 6개의 SNP를 발굴하였다 (표 5). 이 SNP들에 대하여 유전자형과 표현형 간 관계를 확인하였다 (그림 11). AX-95788327의 경우, 유전자형이 AA, AC, CC를 가질 때 각 PDI 평균은 48.6%, 40.7%, 35%이며 AX-95813758의 경우, 유전자형이 AA, AG, GG를 가질 때 각 PDI 평균은 17.1%, 26.5%, 40.8%를 가지면서 저항성과 감수성 계통 간 주로 보유하는 유전자형 빈도에 차이가 있는 것을 확인하였다.

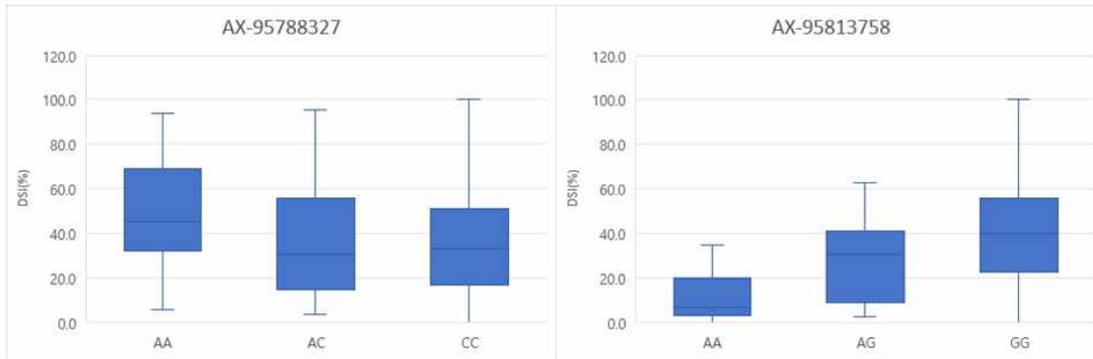


<그림 10. GAPIT 프로그램의 FarmCPU를 통한 GWAS 분석 결과
;QQ plot(A) 및 Manhattan plot(B) >

<표 5. $-\log_{10}(P) > 4$ 의 SNP 마커 정보>

SNP marker	SNP allele	chromosome	position(bp)	P.value
AX-95815945	G/A	9	54461	1.02E-09
AX-95792399	T/G	8	9484448	7.70E-09
AX-95774885	G/A	3	57421798	1.38E-07
AX-95788327	C/A	9	64804748	4.04E-06
AX-95787149	C/A	8	56622174	1.98E-05
AX-95813758	G/A	7	60857379	6.75E-05

<그림 11. 표 1의 SNP marker에 대한 각각의 box plot>

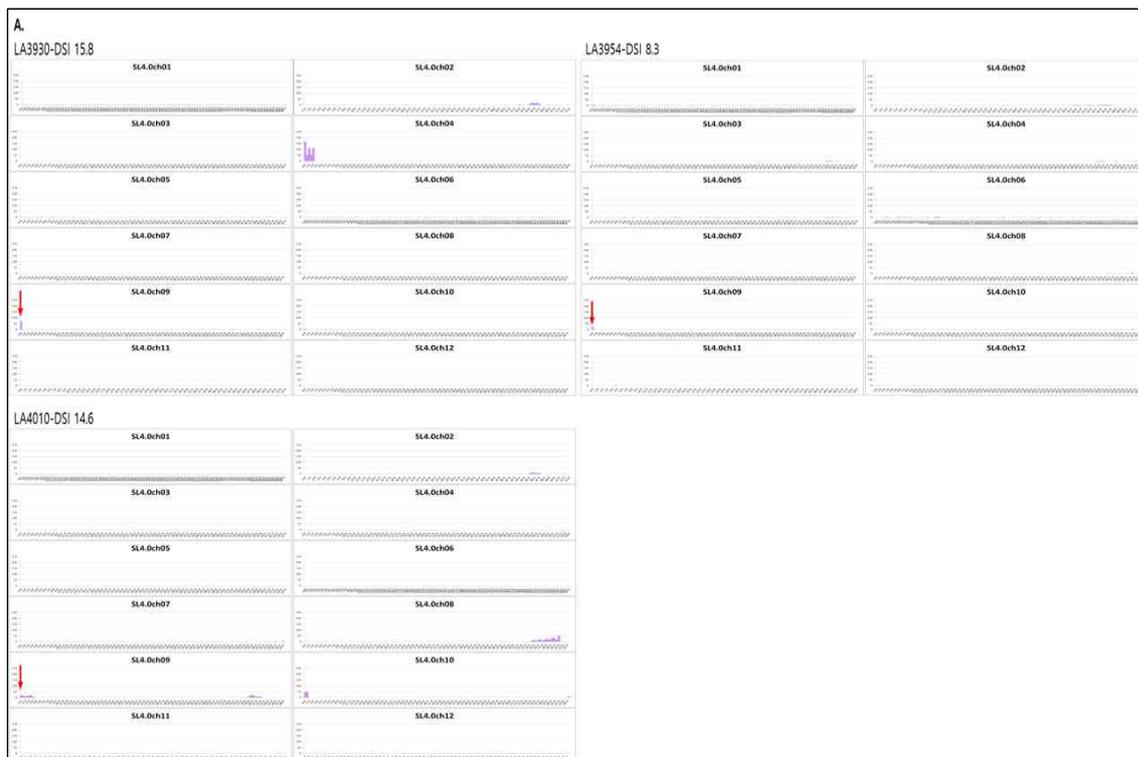


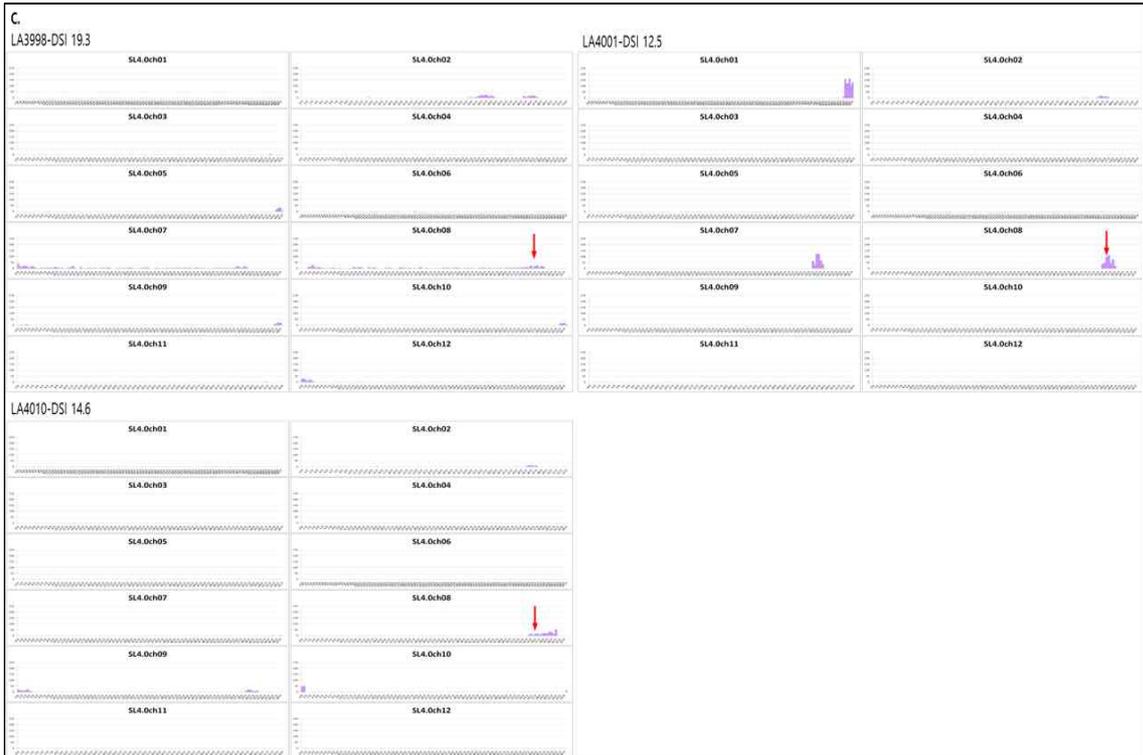
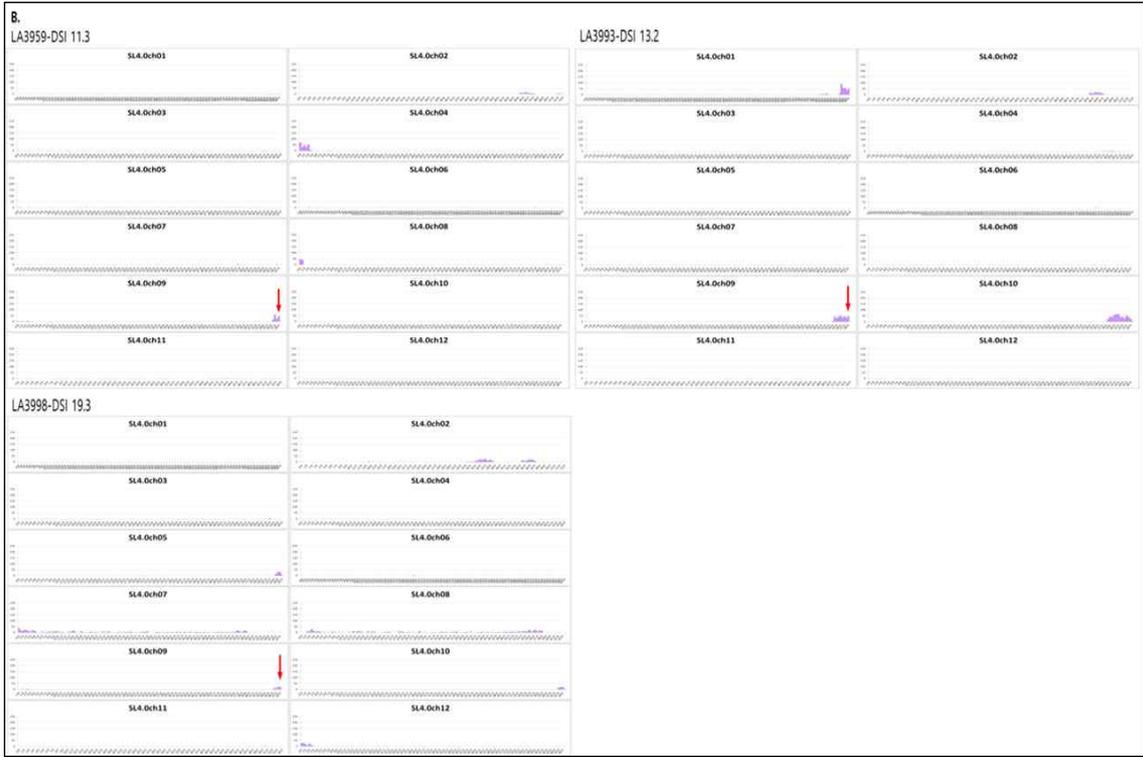
○

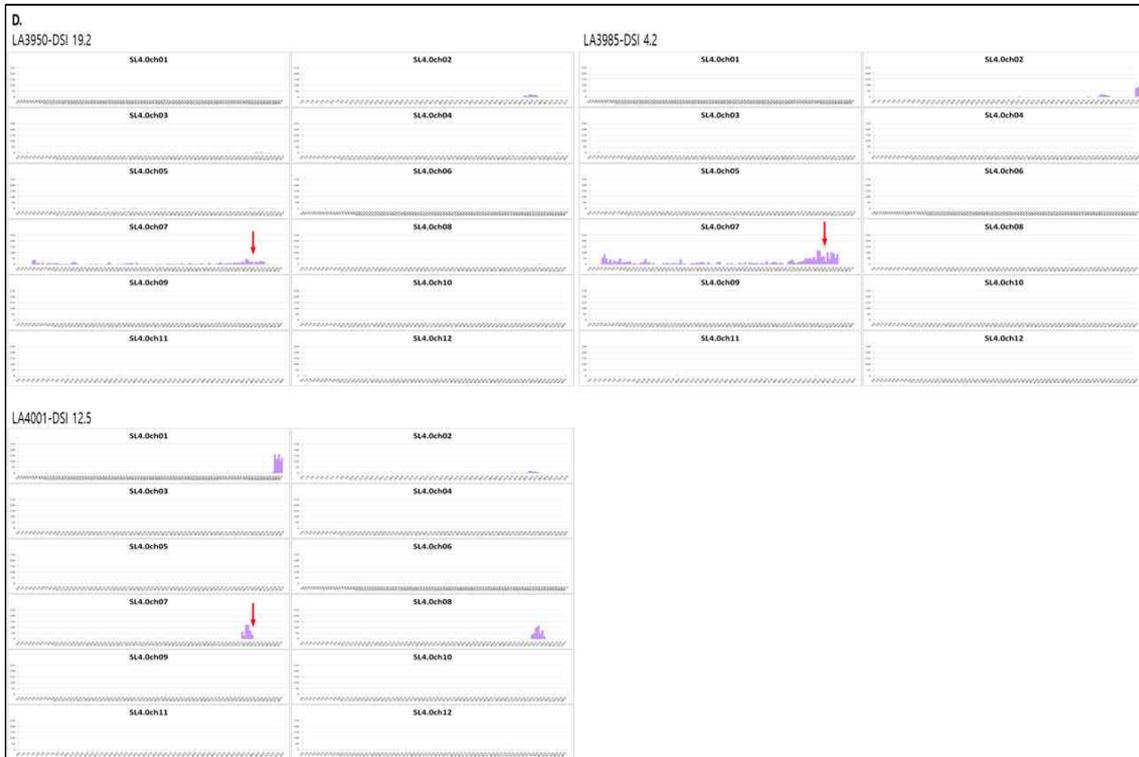
○

○ *S. habrochaites*의 IL의 GBS(Genotyping by sequencing)

- Monforte와 Tanksley(2000)이 RFLP(Restriction fragment length polymorphism) marker 를 이용하여 연관지도를 작성하였다. 이번 5차년도 연구에서는 각 계통의 introgression region이 기존의 map과 일치한지 NGS기반의 GBS 기술을 이용하여 확인하고자 하였다. 해당 결과물은 추가적으로 GWAS 결과의 유의한 SNP와 위치가 일치한지 확인하였다 (그림 12).







< 그림 12. 해당 계통별 GBS 결과 및 GWAS 결과에서 선발한 SNP 위치 (빨간 화살표)
;AX-95815945(A), AX-95788327(B), AX-95787149(C) ,AX-95813758(D) >

- GBS 분석 결과와 비교해 보았을 때, AX-95815945 경우 LA3930, LA3954, LA4010과 GBS SNP 위치와의 유사성이 있었고 AX-95788327 경우 LA3959, LA3993, LA3998과 유사성이 있음을 확인하였다, AX-95757149 경우 LA3998, LA4001, LA4010과, AX-95813758 경우 LA3950, LA3985, LA4001과 유사성이 있음을 확인하였다. 이 계통들의 DSI는 4.2-19.3으로 저항성 계통이다. 해당 SNP를 가진 계통들은 저항성을 보임을 알 수 있다.



< 그림 13. 해당 계통들의 RFLP map >

- GBS 결과의 introgression region과 RFLP map이 상응하지 않는다는 문제점이 있다. 예를 들어 LA3930 경우 RFLP map상에서 introgression이 4번 염색체 말단에만 있으

나 GBS 분석 결과 2번, 9번 염색체에서도 탐색되었다. 이에 대하여 GBS SNP를 CAPS 마커로 전환하여 GBS 분석의 신뢰성을 검증할 예정이다. 또한 GWAS 분석 결과의 유의한 SNP에 대하여 CAPS 마커를 제작하여 표현형과의 연관성을 확인할 예정이다.

제 8절. 토마토 풋마름병 내병성 마커 개발

1. 연구수행 내용

가. 풋마름병 발생과정 및 Marker-Assisted-Selection 시스템 개발

(1) 풋마름병은 *Ralstonia solanacearum* species complex(RSSC), 병원체에 속하며 가장 치명적인 식물성 세균병 중 하나임. 토양 전염성 세균에 의해 발생하며 증상이 빠르게 나타남. 병원체는 토양속에서 오랜기간 생존하며 넓은 범위로 퍼져 나갈 수 있음(Lopes and Rossato 2018). 병원체에 감염된 식물체는 시들음 현상으로 인해 과실을 수확 할 수 없게 만들며 경제적 손실을 일으킴(Hayward et al, 1991; Wang et al). 1924-1925년 남아프리카공화국 나탈 해안 지대에서 처음 발병하였음(Fegan 2005; McClean 1930). 발병경로는 병원체가 숙주의 뿌리로 이동을 해서 식물 표피에 붙고 피층을 통과해 물관에 증식하게 됨. 병원균의 점액질 부분과 세포벽 분해효소인 cellulase와 pectin lyase를 분비하여 물관을 폐색시켜 식물체를 시들게함. RSSC를 분류하는 방법은 숙주에 따라 분류하는 race 탄수화물 산화 능력에 따라 분류하는 biovar가 있고 유전적 차이에 의한 분류 방법인 phylotype을 사용함(Cho et al, 2018; Jeong et al, 2007; Hayward 1991). phylotype은 ITS(Internal transcribed spacer) 부위, egl 유전자, hrpB 유전자의 유무에 따라 4개의 phylotype으로 분류하였음. DNA 염기서열 부위로 이를 이용하면 생물종, 이름 서식지, 습성등을 쉽게 알 수 있음. phylotype은 유전적 차이가 분포지역과 일치하는 모습을 보였음. 지역에 따라 4가지로 나뉘는데 I은 아시아, II는 아메리카, III는 아프리카 IV는 호주 및 인도네시아로 분류됨(Prior et al. 2016). 풋마름병 방제방법은 미생물을 이용한 병 방제 방법이 있지만 풋마름병을 일으키는 다양한 병원체를 방제하는데 한계가 있음. 화학적 방제는 환경 파괴적이고 비용이 많이 들어가며 토양속에 넓게 퍼져있는 병원체를 완전하게 방제 할 수 없음(Aloyce et al. 2017; Alvarez and Biosca 2017; Hayward 1991). 내성을 가지는 병원체가 생길 수 있는 단점이 있음. 따라서 저항성 유전자를 이용한 저항성 품종 육종이 필수적임.

(2) 풋마름병에 저항성 유전자좌인 6번 염색체(*Bwr-6*)와 12번 염색체 (*Bwr-12*)와 연관된 두가지 주요 QTL은 *Solanum lycopersicum* 'Hawaii 7996'에 존재하는 것으로 널리 알려져 있음(Kim et al. 2018). Hawaii7996(저항성) 계통 과 E6203(이병성)계통을 교배한 F2 F3 분리집단을 풋마름병을 일으키는 다양한 strain을 이용해 집중함 그 후 Phenotype을 분자마커를 이용해 저항성 QTL을 분석해본 결과 다양한 염색체에서 풋마름병 저항성 QTL이 동정됨 염색체 4, 6, 11(Thoquet et al 1996a); 3, 4, 6, 8, 10번 (Thoquet et al 1996b); 6(Mangin et al 1999); 6, 8, 12(Wang et al 2000); 3, 4, 6(Carmeille et al 2006); 3, 6, 12(Wang et al 2013). 그 중 *Bwr-6*

QTL은 다양한 race biovar 에도 불구하고 strain은 race, biovar, phylotype과 상관없이 QTL이 동정 됨 따라서 broad spectrum을 가짐. *Bwr-12* QTL은 race1 phylotype I에 특이적으로 나타나는 경향을 보임. 선행연구에서 BWS-3 1개의 이병성과 Hawaii7996, Hawaii7998, 10-BA-3-33, 10-BA-4-34, BWR-1, BWR-22, BWR-23 7개의 저항성 계통을 Whole-genome sequencing 하여 저항성 그룹과 이병성 그룹 사이의 SNP들을 확인하였음. 이병성과 저항성을 비교했을 때 SNP 차이가 나타났으며 6번과 12번을 제외한 염색체에는 낮은 수의 SNP가 확인되었음(Kim et al 2018).

2. 재료 및 방법

가. 식물 집단

- (1) 고밀도 유전자 지도 작성을 위해 풋마름병 저항성 계통 Hawaii 7996과 이병성인 E6203 사용하여 F2 집단을 구축함. Recombination이 일어난 F2 개체들을 Indel 마커를 이용해 선발함. 병접종을 위한 종자 확보를 위해 세대 진전을 시켜 F4집단을 만듦

나. genomic DNA 추출

- (1) DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였음 (Kang et al, 2001). 토마토의 어린 잎 조직을 glass bead (6mm)를 이용하여 마쇄하였음. 613 μ L DNA extraction buffer (DNA extraction buffer, β -mercaptoethanol, L-ascorbic acid) 를 넣고 5분 간격으로 흔들여 주며 65°C에서 15분 처리 후, 200 μ L chloroform 을 넣고 vortexing 처리하여 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였음. 상층액 500 μ L 를 채취하여 1.5 μ L tube 로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었음. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였음. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 30 μ L RNase water에 5분간 녹여주었음.

다. PCR 및 enzyme cutting

- (1) PCR 용액 조성은 제조사의 지침에 따라 수행되었음. 1 μ L gDNA 300 ng, 2.5 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.5 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 1 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (RsR6-5, RsR12-1 F, R) 으로 조성되었음. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 95°C에서 3분간 초기 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 전기영동은 EtBr 이 포함된 1.6% agarose gel 에서 실시하였음. Enzyme cutting은 반응 혼합물 5 μ l PCR 제품, 1 μ l 반응으로 구성되었음. 완충액, 0.1 μ l 제한 효소, 3.9 μ l ddH₂O. 혼합물은 37°C에서 16시간 동안 반응시켰음. CAPS/dCAPS 마커 정보의 세부 정보는 표 3에 제시되어 있음.

라. 풋마름병 접종법

(1) 병 검정에 사용된 병원균은 *Ralstonia pseudosolanacearum* SL882'로 동아대 이선우 교수 연구팀이 분리한 것으로 race 1, biovar 4 그리고 phylotype I으로 분류됨(Lee et al., 2011). 병원균은 Casamino acid-Peptone Glucose (CPG) 배지(멸균수 1리터 당 Casamino acid 1g, peptone 10 g, glucose 5 g, 그리고 agar 15 g)에 28°C 인큐베이터에서 배양하였음(Kelman 1954). 48시간 배양한 병원균을 멸균수에 현탁하여 접종액을 만듦(그림 1-1). NanoDrop 2000/UV - Vis spectrophotometer를 이용하여 농도를 10⁸ CFU/ml (OD600=0.1)로 조절하였음.



그림 1-1. 풋마름병 저항성 검정을 위한 접종 과정

마. 풋마름병 병징의 판별 기준

(1) 토마토 종자를 펠트리디쉬에서 발아시킨 후 원예용상토(biomix, JM Bio사)를 채운 128구 트레이에 이식하였음. 향온향습실(온도=28°C; 습도=50 %; 광 조건 16시간/암 조건 8시간) 환경에서 1개월 키운 토마토 묘를 접종액에 침지하여 풋마름병균을 접종하였음. 접종한 묘는 50구 트레이에 이식한 후 식물생장상(온도=28 °C; 습도 =70 %; 광 조건 16시간/암 조건 8시간)에서 두고 병징을 관찰하였음. 병징의 정도는 0단계에서 4단계(0=증상 없음; 1=시든 잎 비율이 50% 이하; 2=시든 잎 비율이 50-75%; 3= 시든 잎 비율이 75% 이상; 4=식물체 고사)로 평가하였음(그림 1-2).

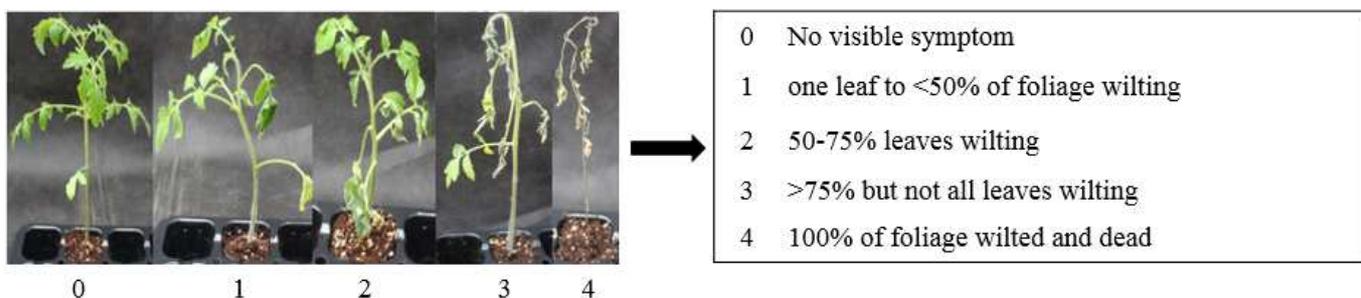


그림 1-2. 병징의 정도에 따른 5단계 분류

3. 내용 및 결과

가. 새로운 계통의 풋마름병 저항성 병리 검정

(1) 토마토 유전자원 센터(Tomato Genetics Resource Center, TGRC)에서 분양받은 7개 계통UC-134, A-1, Florida 8516, Anahu, Purple Calabash, Black Plum,

Gold nugget을 포함해서 27개 계통의 풋마름병 저항성 여부를 확인하기 위해 풋마름병 병원균인 *Ralstonia solanacearum* (SL882) 접종을 진행함(그림 1-3). Hawaii7996, B-Blocking, Shincheonggang, BWR-20, Spider, HighPower, 10-BA-3-33, 10-BA-4-24, IT201664, Hawaii 7998, Fighting 계통은 모두 발병도가 2 이하로 저항성으로 판별함. 반면 UC-134, LA1589, Purple Calabash, Florida8516, Heinz 1706, A-1, E6203, Moneymaker, Super Dotaerang, Anahu, Red Strong, Black Plum, Gold Nugget, VF-36, M82, and Dotaerang Red 는 발병도가 2 이상으로 이병성으로 판별함. 소재를 계속 확보하여 저항성 검정을 통해 저항성 계통 확보할 계획임(그림 1-3).

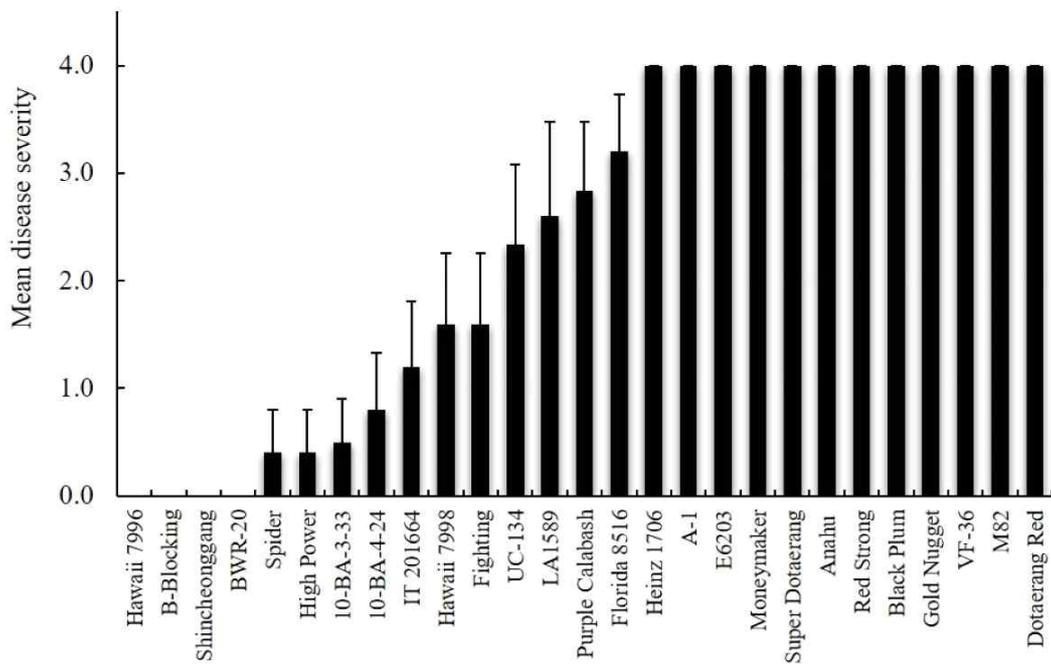


그림 1-3. 병원균 접종을 통한 각 계통들의 저항성 수준 검정

나. 계통을 이용한 풋마름병 저항성 마커 검정

(1) 6개의 이병성 품종(M82, E6203, UC-134, VF-36, Gold Nugget, Moneymaker)과 5개의 저항성 품종(Hawaii 7996, Hawaii 7998, 10-BA-3-33, 10-BA-4-24, and BWR-20)을 이용해 마커 테스트를 진행함. 그 결과 이병성 그룹(M82, E6203, UC-134, VF-36, Gold Nugget, Moneymaker). 저항성 그룹(Hawaii7996, Hawaii7998, 10-BA-3-33, 10-BA-4-24, BWR-20)에서 명확한 Polymorphism이 보임. 화살표는, 1 kb DNA 사이즈 마커를 의미함(그림 1-4).

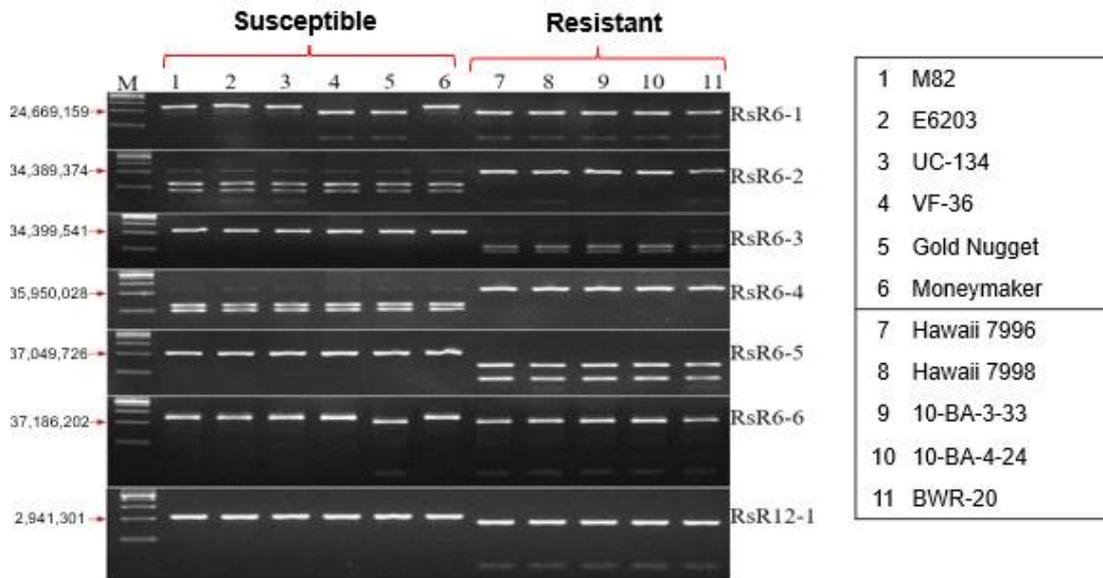


그림 1-4. 11개 토마토 계통을 이용하여 *Bwr-6* 지역에서 새롭게 개발된 CAPS/dCAPS 마커분석

다. 풋마름병 저항성 마커 검정

(1) 본 연구에서는 접종 실험을 통해 계통 17개와 시판종 F1 품종 100개에 대한 마커 테스트 저항성 마커를 검증하였음(표 1-1). 117개의 토마토 품종을 6개의 *Bwr-6* 마커와 1개의 *Bwr-12* 마커를 이용해 풋마름병 저항성 표현형과 비교(표 1-3; 표1-4). 결과적으로 RsR6-5와 RsR12-1 연관마커를 사용했을 때 표현형과 유전형이 모두 이병성으로 보여 100% 일치함. 표현형과 유전형 모두 저항성을 나타내는 확률은 94% 임(표 1-5). 따라서 RsR6-5와 RsR12-1 마커를 육종과정 중 사용시 저항성 품종과 이병성 계통을 가장 효과적으로 관별할 수 있음. 또한 선행 연구에서 Whole-genome sequencing을 진행함. 이병성 개통과 비교해 저항성 개통에 snp가 있고 아미노산 변화를 보이는 *Bwr-6* 와 *Bwr-12*에서 18개의 후보유전자를 찾음(표 1-2).

표 1-1. 계통 17개와 시판종 F1 품종 100개에 대한 마커 테스트 이 연구에서 사용된 토마토 품종의 표현형 구성 요약

Phenotyping	Number of cultivars	Bacterial wilt phenotype	
		Resistant	Susceptible
This study	27	11	16
Previous report	12	4	8
Company/supplier	78	2	76
Total	117	17	100

표 1-2 *Bwr-6*와 *Bwr-12* QTL에 있는 아미노산 변화를 보이는 후보 유전자 리스트

Candidate gene	SNP position (bp)	Nucleotide change		Amino acid change		Gene annotation (ITAG2.4)
		Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant	
<i>Solyc06g035530.2</i>	24,482,686	T	C	F	L	Gibberellin 20-oxidase-2
<i>Solyc06g035620.2</i>	24,667,815	A	G	Y	C	Scarecrow-like 1 transcription factor
<i>Solyc06g035630.1</i>	24,669,159	T	C	L	P	GRAS family transcription factor
<i>Solyc06g036060.2</i>	25,438,944	A	G	I	V	Zinc finger family protein
<i>Solyc06g048580.1</i>	31,287,788	T	C	L	S	Unknown protein
<i>Solyc06g051110.1</i>	34,213,688	G	T	L	F	Unknown protein
<i>Solyc06g051110.1</i>	34,214,085	C	T	A	V	Unknown protein
<i>Solyc06g051140.2</i>	34,285,452	A	C	E	A	Ubiquitin-conjugating enzyme 22
<i>Solyc06g051140.2</i>	34,285,469	G	A	M	I	Ubiquitin-conjugating enzyme 22
<i>Solyc06g051140.2</i>	34,285,734	C	A	A	D	Ubiquitin-conjugating enzyme 22
<i>Solyc06g051150.1</i>	34,291,655	C	A	L	I	Pentatricopeptide repeat-containing protein
<i>Solyc06g051190.1</i>	34,389,374	A	G	T	A	RNA-dependent RNA polymerase family protein
<i>Solyc06g051210.2</i>	34,399,541	C	T	P	S	Bromodomain-containing protein
<i>Solyc06g053210.2</i>	35,950,028	T	C	X	Q	Ubiquitin Homeobox leucine zipper protein
<i>Solyc06g054000.1</i>	36,868,039	G	A	V	I	Unknown protein
<i>Solyc06g054200.1</i>	37,021,520	A	G	R	S	Calmodulin protein kinase
<i>Solyc06g054230.2</i>	37,049,726	T	G	D	E	Calmodulin protein kinase
<i>Solyc06g054400.2</i>	37,186,202	T	C	I	T	Translation initiation factor
<i>Solyc12g009690.1</i>	2,941,301	A	G	H	R	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase

표 1-3 연구에 사용된 DNA 마커

Marker name	SNP position (bp)	Marker type	Primer sequence (5'→3')	T _m (°C)	Restriction enzyme	Expected size (bp)	
						Susceptible	Resistant
RsR6-1	24,669,159	CAPS	F: GGAAATATTGGTTACAATCCAGTG	57.5	<i>Mnl</i> I	227	173, 54
			R: GAATACAACAAATCACTACCGGTC	59.3			
RsR6-2	34,389,374	CAPS	F: CTTCTTGATAGGACGACGTGATAT	59.3	<i>Rsa</i> I	87, 116	203
			R: CAATCAACGGATCACCCATTTTTC	59.3			
RsR6-3	34,399,541	CAPS	F: CTCTTTTTGCCAGATCTTGAATAG	57.5	<i>Mnl</i> I	214	116, 98
			R: CCATAGGTCAGCATCAAATTTCAA	57.5			
RsR6-4	35,950,028	CAPS	F: GTTTTCCTTGCAAATCATTTTGGC	57.5	<i>Mse</i> I	116, 97	213
			R: GTATATGTTGAGTTCACAATTCCC	57.5			
RsR6-5	37,049,726	CAPS	F: CTCAGAAACTGGATAAACTCGAAG	59.3	<i>Hmf</i> I	204	129, 75
			R: GGAGAAAGCAGCCAGCCATTTTT	60.6			
RsR6-6	37,186,202	dCAPS	F: CGGTGATGAGCAGGATTGATAAAA	59.3	<i>Hpy</i> CH4III	234	200, 34
			R: AGTCTTGGCCTTTGACGTGAAAGTGACACAAGAAG	60.6			
RsR12-1	2,941,301	dCAPS	F: GTTACACGAACAAGCTTAAATTTCTAGATTTATCCC	58.8	<i>Acl</i> I	203	168, 35
			R: GTAATCAATTCGAAGGACCTGTC	64.9			

No.	Tomato cultivar/line	Type	Company/Supplier ^d	SNP marker genotype						
				RsR6-1	RsR6-2	RsR6-3	RsR6-4	RsR6-5	RsR6-6	RsR12-1
Bacterial wilt resistant										
1	Hawaii 7996	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
2	Hawaii 7998	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
3	10-BA-3-33	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
4	10-BA-4-24	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
5	BWR-20	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
6	BWR-1	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
7	BWR-22	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
8	BWR-23	Inbred line	KHU	R	R	R	R	R	R	R
9	IT 201664	Inbred line	RDA	H	S	S	R	R	R	R
10	High Power	F ₁ hybrid	Dae Yeon seed co.	H	S	S	H	H	R	R
11	Super High	F ₁ hybrid	Dae Yeon seed co.	S	S	S	R	R	R	R
12	Spider	F ₁ hybrid	Takii Korea	S	S	S	R	R	R	R
13	B-Blocking	F ₁ hybrid	Takii Korea	H	H	H	R	R	R	H
14	Shincheonggang	F ₁ hybrid	Farm Hannong	H	H	H	R	R	R	H
15	Fighting	F ₁ hybrid	Takii Korea	H	H	H	R	R	R	H
16	SVTX6258	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	H	H	H	R	R	R	R
17	Geumgang	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	H	H	H	R	R	R	H
Bacterial wilt susceptible										
18	M82	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	S	S
19	E6203	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	S	S
20	VF36	Inbred line	TGRC	R	S	S	S	S	S	S
21	Moneymaker	Inbred line	TGRC	R	S	S	S	S	S	S
22	A-1	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	S	S
23	Anahu	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	R	S
24	Black Plum	Inbred line	TGRC	S	S	S	R	S	R	S
25	Florida 8516	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	S	S
26	Gold Nugget	Inbred line	TGRC	R	S	S	S	S	R	S
27	Purple Calabash	Inbred line	TGRC	H	H	S	H	S	R	S
28	UC-134	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	S	S
29	Heinz 1706	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	S	S
30	New Yorker	Inbred line	TGRC	S	S	S	S	S	R	S
31	Minheuksu	F ₁ hybrid	Asia Seed Co., Ltd	R	S	S	S	S	R	S
32	TY Unique	F ₁ hybrid	Asia Seed Co., Ltd	R	S	S	S	H	R	H
33	Shinsugar Yellow	F ₁ hybrid	Asia Seed Co., Ltd	H	H	H	H	H	R	H
34	Red Strong	F ₁ hybrid	Bunong Seed	R	S	R	R	S	R	R
35	Sun Star	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	S	S	S	H	S
36	Black Eagle	F ₁ hybrid	Bunong Seed	R	S	H	H	S	S	H
37	Tamla	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	H	H	S	H	S
38	Bntoskna	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	S	H	S	H	H
39	TY Izzang	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	H	H	S	R	S
40	Candy Plus	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	H	H	S	H	S
41	Super Star	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	S	S	S	H	H
42	Red Zenith	F ₁ hybrid	Bunong Seed	H	S	H	H	S	R	H
43	TY Hunter	F ₁ hybrid	Bunong Seed	R	S	H	H	S	H	H
44	TY One Top	F ₁ hybrid	Bunong Seed	S	S	S	H	S	H	H
45	Yureka	F ₁ hybrid	Bunong Seed	S	S	H	H	S	H	H
46	Black Ace	F ₁ hybrid	Bunong Seed	R	S	S	S	S	S	H
47	Oasis	F ₁ hybrid	Bunong Seed	S	S	H	S	S	H	S
48	TY Megaton	F ₁ hybrid	Bunong Seed	S	S	S	S	S	R	S
49	Gold Sugar	F ₁ hybrid	Bunong Seed	R	S	H	H	R	R	S
50	Dotaerang Red	F ₁ hybrid	Dong seo seed	H	H	S	S	S	R	S
51	Black Ball	F ₁ hybrid	Dongoh Seed	R	S	H	H	S	H	H
52	Kolmi	F ₁ hybrid	Dongoh Seed	S	S	H	R	H	R	S
53	Sky Ball	F ₁ hybrid	Dongoh Seed	R	S	H	H	S	R	R
54	Starbuck	F ₁ hybrid	Farm Hannong	R	S	S	S	S	S	S
55	Olleh TY	F ₁ hybrid	Farm Hannong	S	S	H	H	S	R	S
56	Rafito	F ₁ hybrid	Farm Hannong	H	S	S	S	S	H	R
57	Big Wonderful	F ₁ hybrid	Gonong Seed	R	S	H	H	S	H	S
58	TY Carnival	F ₁ hybrid	Gyeongwon	R	S	H	H	S	H	H
59	Legend Summer	F ₁ hybrid	Haesung Seed Plus	S	S	S	S	S	R	S
60	Daewang	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	S	S	S	S	S	S	S

표 1-4. 본 연구에 사용된 저항성과 이병성 토마토 품종 또는 계통의 개발된 CAPS/dCAPS 마커 유전자형(Continued)

No.	Tomato cultivar/line	Type	Company/Supplier ^a	SNP marker genotype						
				RsR6-1	RsR6-2	RsR6-3	RsR6-4	RsR6-5	RsR6-6	RsR12-1
Bacterial wilt susceptible										
61	Hongboseok	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	S	S	S	S	S	S	S
62	Jeilheukjinju	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	S	S	S	R	S	R	S
63	Dotaerang	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	S	S	S	S	S	S	S
64	Heukryong	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	S	S	S	S	S	S	H
65	Minjaok	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	S	S	S	R	S	R	S
66	Sinheukjinju	F ₁ hybrid	Jeil Seed Bio	H	R	S	R	R	R	S
67	Super Dotaerang	F ₁ hybrid	Koregon seed	H	H	S	S	S	R	S
68	Lezaforta F ₁	F ₁ hybrid	Mifko seed	S	S	S	S	S	H	S
69	Unicorn	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	H	S	S	S	S	R	S
70	SV 7160 TC	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	R	S	H	R	R	R	S
71	SV02444 TG	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	S	S	H	S	S	R	H
72	Bacchus	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	R	S	H	H	S	R	S
73	SV4224 TH	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	S	S	H	S	S	R	H
74	SV0339TG	F ₁ hybrid	Monsanto Korea	S	S	H	S	S	R	H
75	Tiara	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	H	S	S	S	S	R	S
76	TY SenseQ	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	H	H	S	R	S
77	Redpang	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	S	S	S	R	S
78	Titichal	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	H	H	S	R	S
79	TY Altorang	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	H	H	S	R	S
80	Beta Tiny	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	S	H	H	H	S
81	TY Tiny	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	H	H	S	H	S
82	Cupirang	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	S	S	S	R	S
83	Minichal	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	S	H	H	H	S
84	TY Sispen	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	S	S	H	H	S	R	S
85	Black Change	F ₁ hybrid	Nongwoo Bio Co., Ltd	H	S	H	H	S	H	H
86	Mulya	F ₁ hybrid	RDA	S	S	S	S	S	R	S
87	Sigyo 1 ho	F ₁ hybrid	RDA	S	S	S	S	S	R	S
88	Broadley	F ₁ hybrid	RDA	R	S	S	S	S	R	S
89	Yulwon	F ₁ hybrid	RDA	S	H	H	R	H	R	S
90	Hoyong	F ₁ hybrid	Sakata Korea	H	S	S	S	S	R	H
91	Tosama	F ₁ hybrid	Sakata Korea	S	S	S	H	S	H	S
92	Super Sun Road	F ₁ hybrid	Sakata Korea	H	S	S	H	S	H	H
93	Super Top	F ₁ hybrid	Sakata Korea	S	S	S	S	S	H	H
94	Lokousan Maru	F ₁ hybrid	Sakata Korea	S	S	S	S	S	H	S
95	Taiyau	F ₁ hybrid	Sakata Korea	S	S	S	S	S	H	H
96	Taihu	F ₁ hybrid	Sakata Korea	R	S	H	S	S	H	H
97	Super Top	F ₁ hybrid	Sakata Korea	S	S	S	S	S	H	H
98	Tiger	F ₁ hybrid	Samsung Seeds	H	S	S	S	S	R	S
99	Chalstone TY	F ₁ hybrid	Sky seed	S	S	H	H	S	R	H
100	TY Marathon	F ₁ hybrid	Sky seed	S	S	S	S	S	R	H
101	Rapsody	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	H	S	S	H	S	S	S
102	Madison	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	H	S	S	S	S	S	S
103	Ricophin-9	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	H	S	S	H	H	R	S
104	Duine	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	H	S	S	S	S	H	S
105	Dafnis	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	S	S	H	H	S	H	H
106	Komodo	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	S	S	H	H	S	H	H
107	Tory	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	S	S	H	H	S	H	H
108	Mamirio	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	R	S	H	H	S	H	H
109	European	F ₁ hybrid	Syngenta Korea	H	S	S	H	S	S	S
110	Trio Plus	F ₁ hybrid	Taeyang seed	R	S	H	H	S	R	H
111	Kang Jeok	F ₁ hybrid	Taeyang seed	R	S	H	H	S	H	S
112	Dotaerang TY	F ₁ hybrid	Takii Korea	S	S	H	S	S	R	S
113	Doterang Plus	F ₁ hybrid	Takii Korea	S	S	S	S	S	R	S
114	Dotaerang Solar	F ₁ hybrid	Takii Korea	S	S	S	S	S	R	H
115	Cuty	F ₁ hybrid	Takii Korea	S	H	H	H	H	R	S
116	Dotaerang	F ₁ hybrid	Takii Korea	S	S	S	S	S	R	S
117	LA1589	Wild species	TGRC	R	S	R	R	R	R	S

표 1-5. 풋마름병 저항성 마커 정확성 검정

QTL	Marker name	Diagnostic test result ^a							
		True positive	False negative	True negative	False positive	True positive rate (%)	False negative rate (%)	True negative rate (%)	False positive rate (%)
Bwr-6	RsR6-1	8	9	77	23	47.1	52.9	77.0	23.0
	RsR6-2	8	9	99	1	47.1	52.9	99.0	1.0
	RsR6-3	8	9	98	2	47.1	52.9	98.0	2.0
	RsR6-4	16	1	91	9	94.1	5.9	91.0	9.0
	RsR6-5	16	1	96	4	94.1	5.9	96.0	4.0
	RsR6-6	17	0	50	50	100.0	0.0	50.0	50.0
Bwr-12	RsR12-1	17	0	66	34	100.0	0.0	66.0	34.0
Bwr-6 + Bwr-12	RsR6-1 + RsR12-1	8	9	89	11	47.1	52.9	89.0	11.0
	RsR6-2 + RsR12-1	8	9	100	0	47.1	52.9	100.0	0.0
	RsR6-3 + RsR12-1	8	9	99	1	47.1	52.9	99.0	1.0
	RsR6-4 + RsR12-1	16	1	99	1	94.1	5.9	99.0	1.0
	RsR6-5 + RsR12-1	16	1	100	0	94.1	5.9	100.0	0.0
	RsR6-6 + RsR12-1	17	0	87	13	100.0	0.0	87.0	13.0

^a True positive=표현형과 유전자형 모두 저항성인 품종 False negative=표현형은 저항성 유전자형은 이병성인 품종 True negative=표현형과 유전자형 모두 이병성인 품종

라. 풋마름병에 대한 유전자형과 표현형의 MAS 효율성 검정

(1) 저항성 계통인 Hawaii 7998(Wang et al. 1998)과 이병성 계통인 E6203 F2 집단에서 RsR6-5, RsR12-1 마커를 이용하여(표1-2) 저항성(RR)과 이병성(SS)을 나타내는 F2 개체를 선발하고, F3 종자를 확보함. 저항성 판별 마커형에 따른 표현형을 확인하기 위해 F3 개체에 병원균 접종한 결과, 유전자형이 RR을 가지는 F3가 SS를 가지는 F3보다 저항성을 보임(그림 1-5, 그림 1-6).

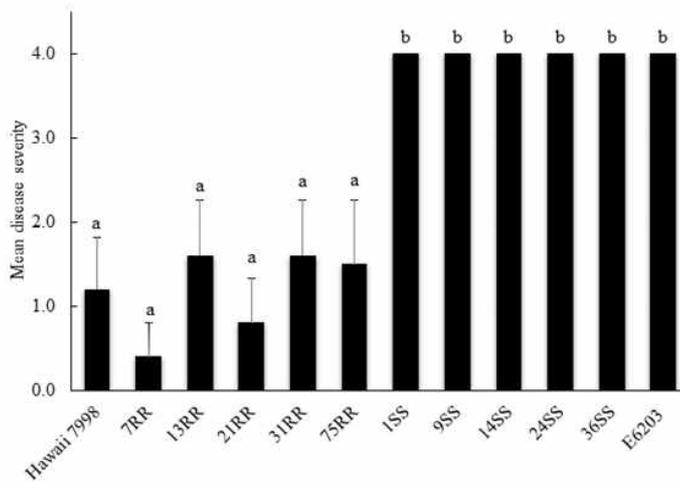


그림 1-5. F3 개체의 RsR6-5, RsR12-1 유전자형(RR, SS)에 따른 청고병 병징의 평가

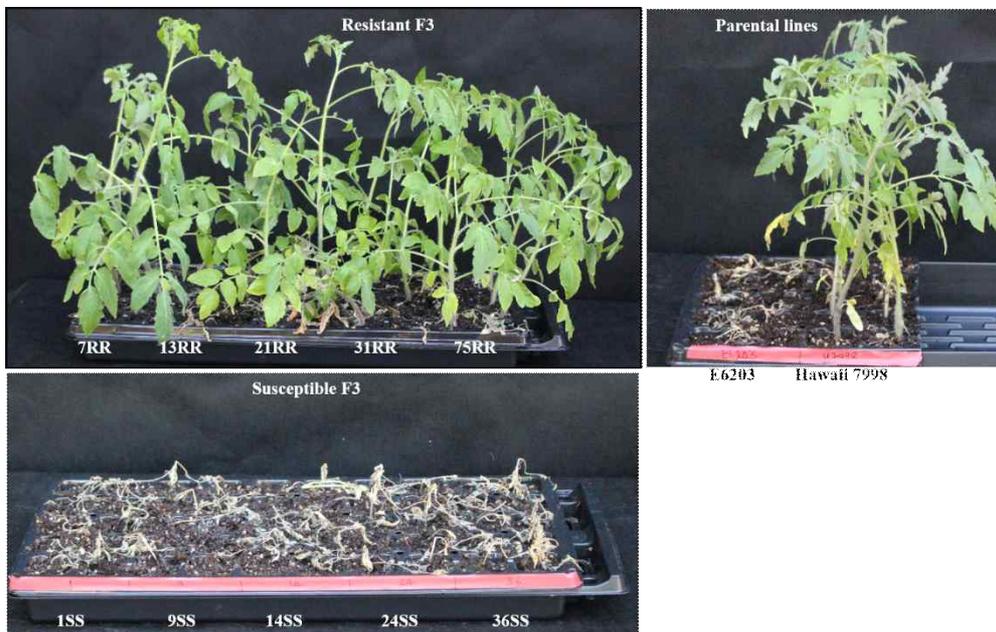


그림 1-6 풋마름병에 저항성을 보이는 F3 recombinant를 선발하기 위한 RsR6-5 및 RsR12-1 분자표지 검증

마. 풋마름병 저항성 연관 고밀도 유전자지도 작성

(1) 저항성 계통인 Hawaii7996과 이병성 계통인 E6203 F2 집단에서 저항성 QTL이 있을 것이라고 예상되는 부위를 설정함(RS6-1-Rs6-5). 그 부위 사이에 recombination이 일어났는지 확인. recombination 유무를 확인하기 위해서 Hawaii7996과 E6203의 염기서열 차이(Deletion)를 이용. Hawaii7996xE6203 F2 유전자형을 확인함. 또 recombination이 일어난 F2를 선발하였음. 하지만 유전자형이 헤테로인 부분이 많아 유전적으로 고정된 F3를 다시 선발함. 하와이의 유전자형을 가지고 있으면서 F4 세대에 풋마름병을 접종하여 얻은 데이터를 분석하여 QTL의 위

치를 파악할 계획임(그림 1-7).

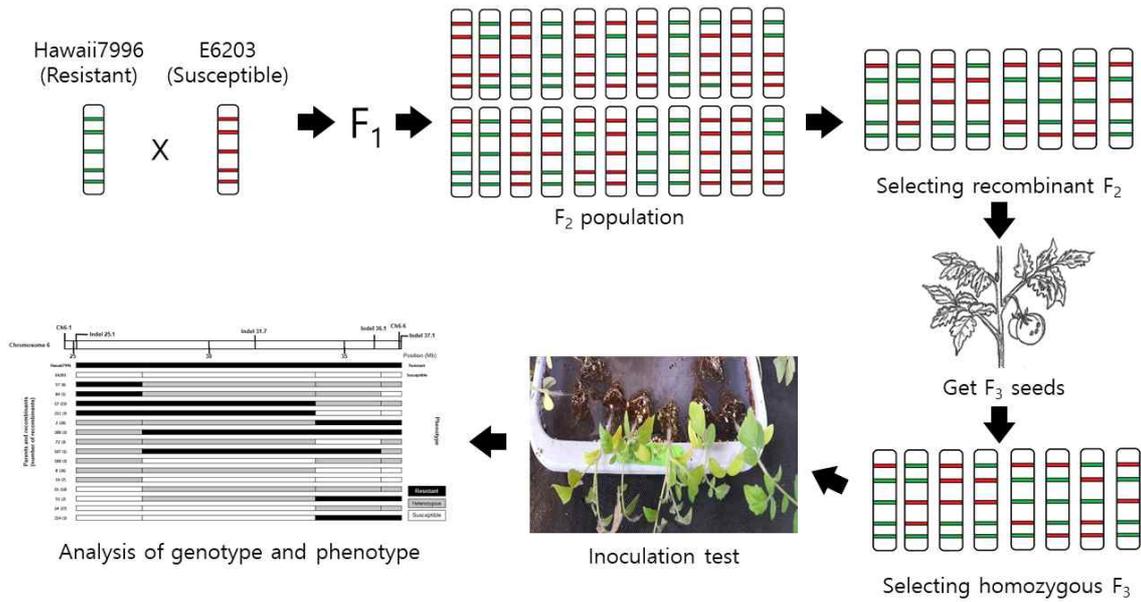


그림 1-7 풋마름병 저항성 QTL 고밀도 유전자 지도 작성을 위한 실험과정

(2) 총 514개의 Hawaii7996xE6203 F2의 유전자형을 확인하였음 유전자 재조합이 일어난 157개의 F2를 선발. 풋마름병 저항성 유전자(Bwr-6) 동정을 위해 Hawaii7996과 E6203의 염기서열 차이인 Deletion을 이용하여 풋마름병 저항성 QTL이 위치하고 있을 것으로 예상되는 구간에 일정한 간격으로 12개를 제작함. Hawaii7996으로부터 유전된 부위는 R로 표시하였으며 E6203으로부터 유전된 부위는 S로 표기함(그림 1-8).

F ₂	Indel 1	Indel 2	Indel 3	Indel 4	Indel 5	Indel 6	Indel 7	Indel 8	Indel 9	Indel 10	Indel 11	Indel 12
449	H	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
288	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R	R	R
118	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R	R
246	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R	R
146	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R
237	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R
10	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
121	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
352	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
461	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S
487	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S
83	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S
202	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S	S	S
155	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
197	S	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
208	S	S	S	S	H	H	H	H	H	R	R	R
374	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
491	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
280	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H
68	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H
191	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H
488	S	S	S	S	S	S	S	S	H	R	R	R
58	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
98	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
142	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
343	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
447	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
316	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H
267	R	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H
22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	S
65	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
115	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
120	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
180	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
235	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
260	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
289	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
18	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H
276	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H
395	R	R	R	R	R	R	H	H	S	S	S	S
71	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H
117	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H
470	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H
57	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H
198	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H
339	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H
441	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H	H
76	R	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

그림 1-8. 꽃마름병 저항성 유전자(*Bwr-6*) 동정을 위한 고밀도 유전자지도 작성 (F₂ 결과)

F ₂	Indel 1	Indel 2	Indel 3	Indel 4	Indel 5	Indel 6	Indel 7	Indel 8	Indel 9	Indel 10	Indel 11	Indel 12
465	H	H	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
107	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R	H	H
67	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R	R
27	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R
119	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R
109	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R
150	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R
2	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
147	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
471	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
66	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	H
123	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	H
222	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	H
268	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	H
91	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	S	H
240	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	S	H
87	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S
397	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S
478	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	H
82	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S
231	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S
315	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S
373	H	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S
327	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	H	H
8	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S	S
20	H	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S	S
188	H	H	H	H	S	S	S	S	S	H	H	H
303	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S	S	S
402	H	H	H	H	S	S	S	S	S	S	S	S
94	H	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
460	H	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H
51	S	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R
55	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
335	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
469	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H	R
407	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H	H
105	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
168	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
230	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
318	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
328	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H	H
214	S	S	S	S	S	S	H	R	R	R	R	R
167	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H
384	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H	H
97	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H	H
24	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	R
33	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
95	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
100	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
320	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
329	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
443	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
485	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H
354	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H

F ₂	Indel 1	Indel 2	Indel 3	Indel 4	Indel 5	Indel 6	Indel 7	Indel 8	Indel 9	Indel 10	Indel 11	Indel 12
226	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H
394	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H
54	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H
393	R	R	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H
310	R	R	R	R	R	R	R	H	S	S	S	S
211	R	R	R	R	R	R	H	H	S	S	S	S
304	R	R	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H

그림 1-8. 풋마름병 저항성 유전자(*Bwr-6*) 동정을 위한 고밀도 유전자지도 작성 (F₂ 결과) (Continued)

(3) 풋마름병 고밀도 유전자 지도 작성을 위한 고정된 F₃, F₄ 선발

Hawaii7996xE6203 F₂에서 Hetero인 부분이 있음. Heterozygous인 부분을 유전적으로 고정하기 위해 12개의 Indel 마커를 이용해 F₃ 선발. 그 결과 6번 염색체에서 61개의 고정된 F₃를 선발하였음. 24개의 재조합을 나타내면서 각기 다른 유전자형을 나타내는 F₃를 선발함(그림 1-9). 종자 수를 늘리기 위해 한번 더 세대 진전을 시켜 F₄ 종자를 받았음. 12번 염색체 또한 12개의 Indel마커를 이용해 F₃를 선발함. 그 결과 12번 염색체에서 14개의 고정된 F₃를 선발함. 3개의 재조합을 나타내면서 각기 다른 유전자형을 나타내는 F₃를 선발함. 종자 수를 늘리기 위해 한번 더 세대 진전을 시켜 F₄ 종자를 받음(그림 1-10).

No.	F ₄	Indel 1	Indel 2	Indel 3	Indel 4	Indel 5	Indel 6	Indel 7	Indel 8	Indel 9	Indel 10	Indel 11	Indel 12
1	18.3	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
2	20.2	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
3	20.5	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
4	65.3	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
5	240.4	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
6	310.1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
7	310.2	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
8	310.5	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
9	310.7	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
10	310.9	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
11	393.1	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
12	303.6	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
13	407.31	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
14	407.44	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
15	22.15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
16	22.23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
17	22.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
18	22.46	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
19	118.6	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
20	68.6	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
21	68.7	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
22	54.3	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
23	54.9	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
24	310.4	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
25	310.6	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
26	310.8	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
27	211.4	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
28	211.6	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
29	310.10	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
30	214.10	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
31	211.7	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
32	343.2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
33	105.13	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
34	71.12	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
35	71.16	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
36	97.6	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
37	97.16	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
38	97.40	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
39	91.9	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
40	91.24	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
41	91.45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
42	91.47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
43	167.4	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
44	167.44	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
45	168.45	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
46	230.6	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
47	230.36	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
48	320.26	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
49	320.36	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
50	384.8	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
51	97.92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
52	109.35	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
53	109.37	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
54	150.32	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
55	150.39	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
56	150.65	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
57	51.6	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
58	51.8	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
59	51.11	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
60	51.17	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
61	214.9	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R

그림 1-9 꽃마름병 저항성 유전자(*Bwr-6*) 동정을 위한 고밀도 유전자지도 작성 (F4 결과)

NO.	F ₄	Indel12-1	Indel12-2	Indel12-3
1	226-1	S	R	R
2	226-22	S	R	R
3	226-24	S	R	R
4	283-12	S	R	R
5	283-17	S	R	R
6	283-21	S	R	R
7	283-28	S	R	R
8	434-12	R	S	S
9	346-1	R	S	S
10	346-9	R	S	S
11	346-11	R	S	S
12	403-8	S	R	R
13	403-16	S	R	R
14	403-20	S	R	R

그림 1-10 풋마름병 저항성 유전자(*Bwr-12*) 동정을 위한 고밀도 유전자지도 작성 (F₄ 결과)

- (4) *Bwr-6* 및 *Bwr-12* 고밀도 유전자지도 작성을 위한 recombinant 선발: *Bwr-6* 와 *Bwr-12* 최종집단 선발 과정은 *Bwr-6*는 풋마름병 저항성 계통으로 널리 쓰이고 있는 Hawaii 7996과 이병성인 E6203 사이의 유전자상에서 재조합이 일어난 F₂ 집단을 Indel 마커를 이용해 선발. 그 후 연관 마커인 12-1의 genotype이 R 또는 Hetero인 113개 recombinant만 선발함. 다음으로 12-1 마커가 R genotype을 보이는 61개의 recombinant line을 선발하였음. 종자 수를 늘리기 위해서 세대 진전을 시켜 종자 수가 많은 58개 F₄집단을 만들음. *Bwr-12*는 514개의 F₂ 집단에서 연관 마커인 6-5가 R또는 Hetero genotype을 보이는 14개의 recombinant line만 선발하였음. 그 후 6-5 마커가 R genotype을 보이는 14개의 recombinant line을 선발함. 종자 수를 늘리기 위해 세대 진전을 시켜 F₄집단(그림 1-11)을 만들었음.

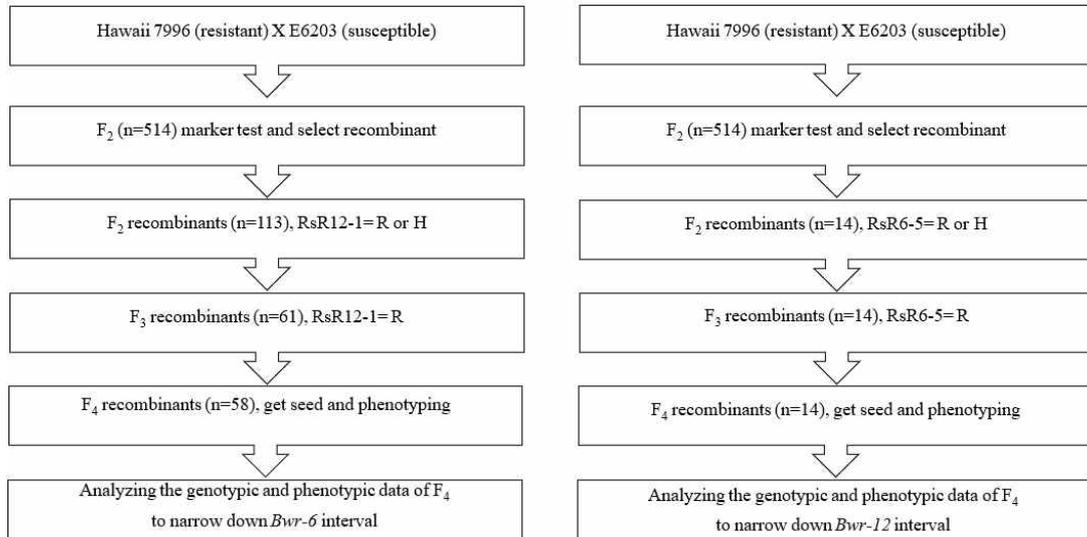


그림 1-11 풋마름병 저항성 QTL 고밀도지도 작성을 위한 실험 전략 모식도

(5) SL882 접종 4주 후 control 및 recombinant line의 phenotype

접종 한달 후 control과 recombinant line의 phenotype을 사진으로 나타내었음. 풋마름병에 이병성을 보이는 recombinant line, 저항성을 보이는 recombinant line, control에서 phenotype을 전부 확인 할 수 있었음(그림 1-12).

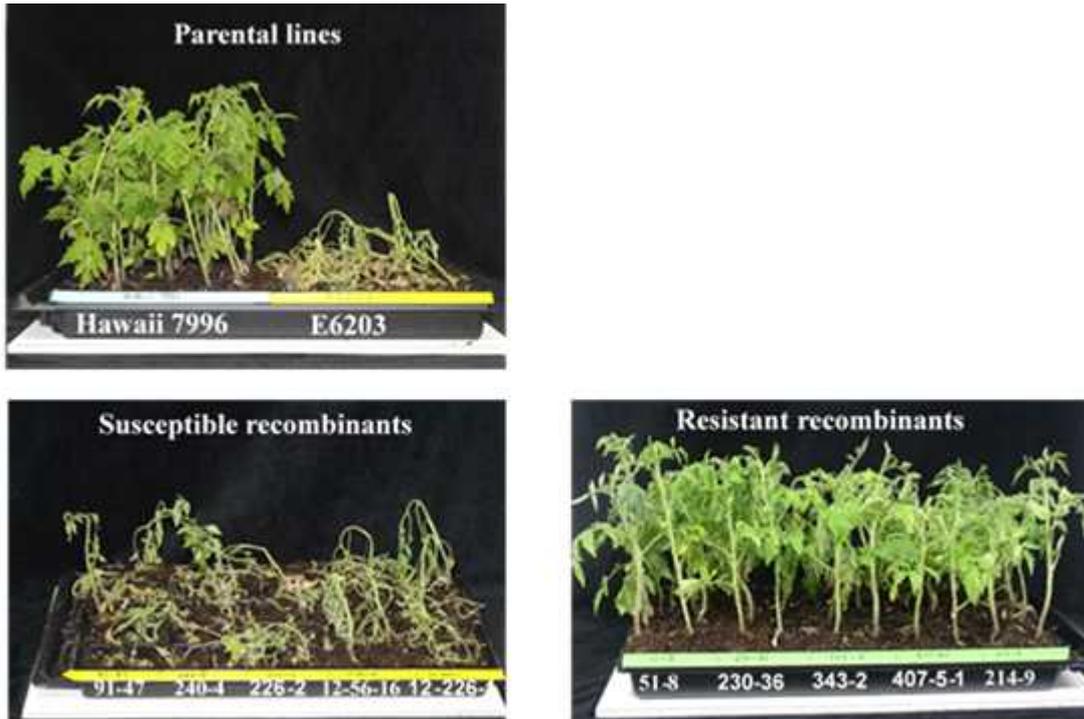


그림 1-12 SL882 접종 4주 후 Parental line과 저항성과 이병성 phenotype을 보이는 recombinant line 대표 사진.

제 9 절. 토마토 세균성 궤양병 저항성 연관 QTL mapping

1. 연구수행 내용

가. 토마토 궤양병이 미치는 영향 및 궤양병 저항성 QTL mapping

(1) *Clavibacter michiganensis*에 의해서 발생하는 토마토 궤양병은 물관 조직을 감염시키는 식물병으로 경제적으로 토마토 생산에 중요한 영향을 미침(Nandi et al. 2018; Bae et al. 2015). 1909년 미국에서 처음으로 발견되었음(Nandi et al. 2018; smith 1910). 감염된 식물체는 잎의 괴사, 줄기 궤양, 발육부진, 과실에 작고 어두운 반점을 보였음 (Sem et a.; 2015; Peritore=Galve et al. 2020). 상업적으로 유용한 궤양병 저항성 품종은 아직 보고된 바 없으며 Marker-assisted selection 을 통해 저항성 토마토 육종에 이용할 수 있을 것으로 기대됨. *Solanum lycopersicum* 'H7998'은 이전 연구에서 궤양병 저항성 유전자원으로 알려졌음(Kim et al., 2018). *Clavibacter michiganensis*는 종자에 감염을 일으키는 병원체로 토마토에서 물관과 과실에 감염을 일으킴 주로 감염된 종자나 남은 잔해에서 오랜 기간 생존하거나 토양에서 짧은 기간 생존할 수 있음.(Tsianotos 1987; Sen et al. 2015).(Sandbrick et al. 1995; van Heusden et al. 1999; Kabelka et al. 2002; Coaker and Fracis 2004; Sen 2014).

(2) 토마토 궤양병 유전자 분석은 *S. habrochaites*, *S. arcanum*, *S. pimpinellifolium*의 몇몇 접근에서 연구되어 왔음. *S. arcanum* 'LA2157'의 여교배 집단을 이용한 유전자 지도 작성결과 염색체 1, 6, 7, 8, 10에서 5개의 저항성 QTL 위치를 확인했음. *S. pimpinellifolium* 'GI1554'에서는 Recombinant inbred line을 사용하여 염색체 1, 2, 7, 8, 12에서 5개의 QTL을 확인했음(Sen 2014). *S. lycopersicum* 'Hawaii 7998', 'IRAT L3', and 'Okitsu Sozai I-20' 는 저항성 자원으로 알려짐 (Steeckelenburg 1985; Gardner et al. 1990). 그러나 *S. lycopersicum* 자원을 사용한 궤양병 저항성 QTL은 알려져 있지 않음.

숙주와 병원체의 상호작용을 이해하는 것은 분자생물학적 연구에서 이병성과 저항성을 판단하는데 필수적인 메카니즘임. 따라서 본 실험에서는 *S. lycopersicum* 'Hawaii 7998'에서 궤양병 저항성과 관련된 유전자 영역을 식별하기 위해 QTL-seq 접근법을 사용했으며, DNA 표지를 개발하고 검증하였음. 6번 염색체의 후보 유전자 좌는 *Rcm6*로 명명함. *Rcm6*에서 개발된 InDel 마커는 궤양병 저항성 토마토 육종 시 사용 할 수 있음. 게다가, 확인된 후보 유전자는 토마토 궤양병 저항성을 이해하기 위한 더 나은 통찰력을 제공할 것임.

2. 재료 및 방법

가. 식물 집단

(1) 식물체는 28 °C, 16/8 시간 명암 주기의 항온항습실에서 재배되었음. QTL-seq 분

석에 'E6203'(이병성)과 'Hawaii 7998'(저항성) 품종 교배로 도출된 F2 모집단이 사용되었음. 실험-I(n=250), II(n=340), III(n=319)의 F2 모집단과 모부분에 접종함. 표 1에 열거된 47개 토마토 계통, F2, F3 개체가 마커검증을 위해 사용되었음.

나. genomic DNA 추출

(1) DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였음 (Kang et al, 2001). 토마토의 어린 잎 조직을 glass bead(6mm) 를 이용하여 마쇄하였음. 613 μ L DNA extraction buffer (DNA extraction buffer, β -mercaptoethanol, L-ascorbic acid) 를 넣고 5분 간격으로 흔들며 주며 65°C에서 15분 처리 후, 200 μ L chloroform 을 넣고 vortexing 처리하여 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였음. 상층액 500 μ L 를 채취하여 1.5 μ L tube 로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었음. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였음. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 30 μ L RNase water에 5분간 녹여주었음.

다. PCR 및 enzyme cutting

(1) PCR 용액 조성은 제조사의 지침에 따라 수행되었음. 1 μ L gDNA 300 ng, 2.5 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.5 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 1 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (RsR6-5, RsR12-1 F, R) 으로 조성되었음. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 95°C에서 3분간 초기 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 전기영동은 EtBr 이 포함된 1.6% agarose gel 에서 실시하였음.

Enzyme cutting은 반응 혼합물 5 μ l PCR 제품, 1 μ l 반응으로 구성되었음. 완충액, 0.1 μ l 제한 효소, 3.9 μ l ddH₂O. 혼합물은 37°C에서 16시간 동안 반응시켰음.

라. 케양병 대량 접종법 구축

(1) 케양병을 유발하는 고병원성 세균인 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)을 사용하였음.. KB배지에 26°C의 환경에서 48시간 배양한 후 계대배양을 하여 순수하게 분리한 균을 MgCl₂로 희석하여 접종액을 제작하였음. 4주간 키운 토마토(5-6 잎단계)의 본엽 3개를 접종액이 묻은 가위로 절단하여 절단면에 접종액을 묻혀 접종을 진행함(Hwang et al 2020). 접종한 토마토는 온도=26°C, 습도=70%, 광조건 16시간과 암조건 8시간 환경의 식물생장실에 두고 병징을 관찰함(그림 2-1).

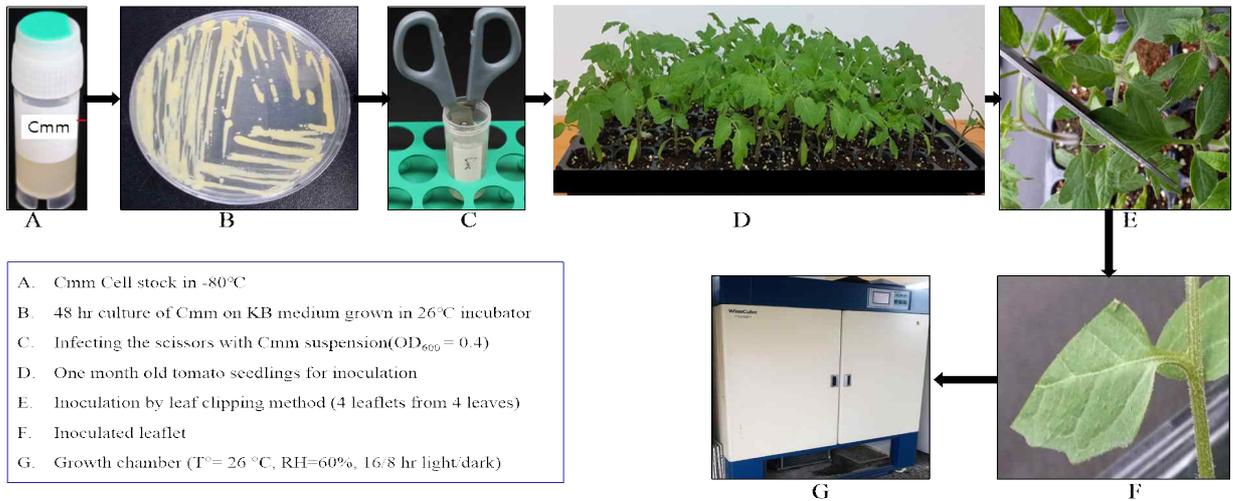
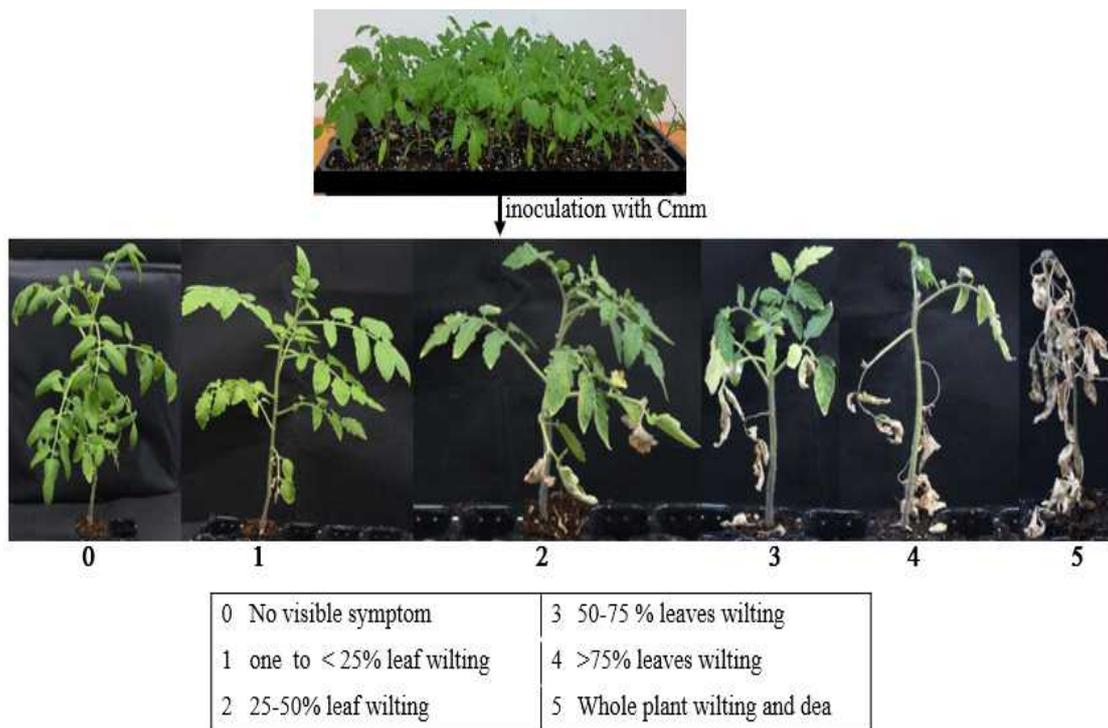


그림 2-1 궤양병 저항성 검정을 위한 접종 과정

마. 궤양병 병징의 판별 기준

(1) 토마토의 궤양병 저항성을 평가하기 위해 병징의 정도를 6단계로 분류하였음. 0은 증상없음, 1은 잎의 25% 이하가 고사, 2는 잎의 25-50%, 3은 50-75%, 4는 75%이상 이 고사 그리고 5는 식물전체가 고사로 분류함(Mohd Nadzir et al. 2019). 병징의 단계가 0-2는 궤양병에 대한 저항성으로 평가하였고 3-5는 이병성으로 평가하였음 (그림 2-2).



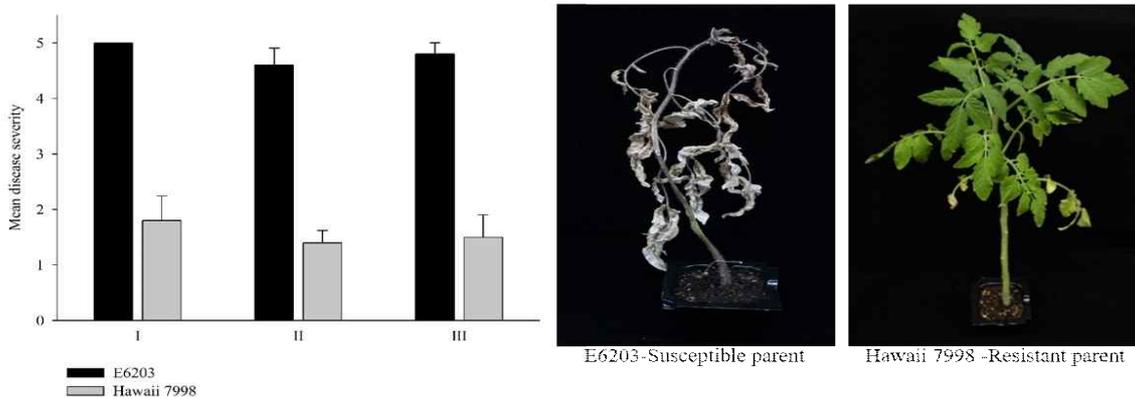


그림 2-2 각각의 독립된 궤양병 접종 실험을 통한 각 계통의 병징 평균값

바. 궤양병 저항성 QTL 동정을 위한 교배집단 구축

(1) 본 연구에서 궤양병에 대해 가장 강한 저항성 소재로 선발된 Hawaii7998과 가장 약한 이병성 소재인 E6203을 교배하여 F2 집단을 구성하였음. E6203을 모본으로 Hawaii7998을 부분으로 하는 F2 집단임.

사. F2 집단의 저항성과 이병성 분리

(1) E6203xHawaii7998 F2 개체들의 저항성 그룹과 이병성 그룹으로 나누기 위해 독립적인 3번의 궤양병 접종 실험을 하였음. 각 실험당 각 220 여개의 F2 개체를 사용하였음. 병징의 정도는 0은 증상 없음, 1은 잎의 25% 이하가 고사, 2는 잎의 25-50%, 3은 50-75%, 4는 75% 이상이 고사 그리고 5는 식물 전체가 고사로 구분하였음(그림 2-3).

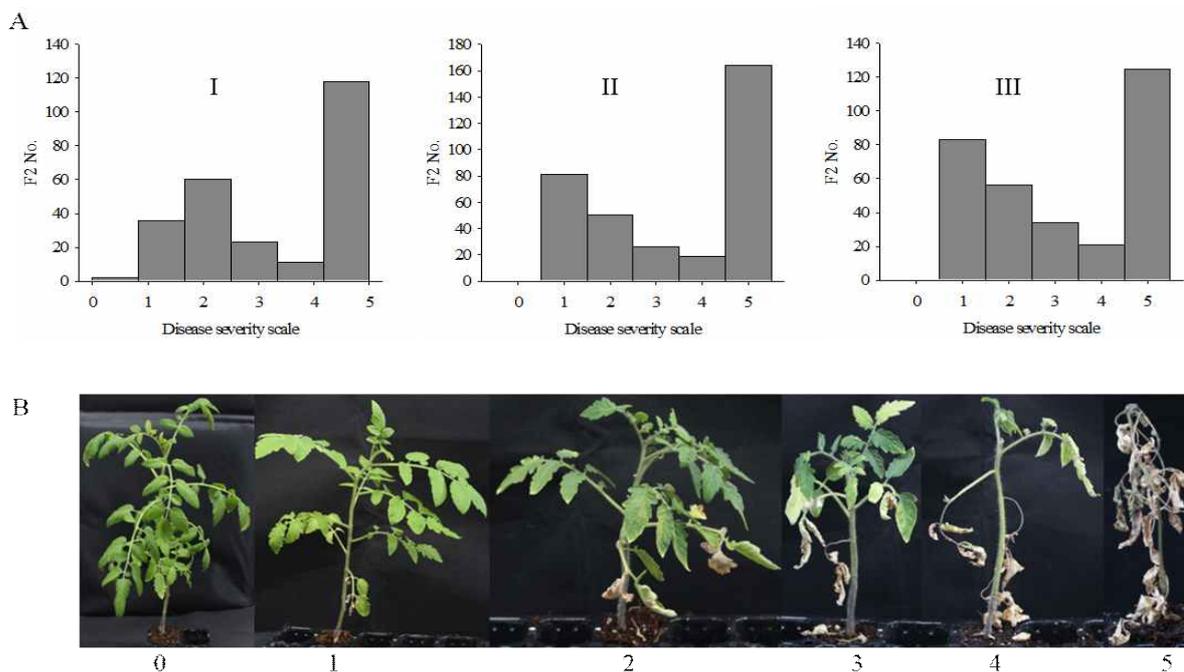


그림 2-3 F2 집단의 궤양병 저항성 정도에 따른 분리 양상

아. 궤양병 저항성 QTL-seq 분석을 위한 Whole-Genome Resequencing

(1) Illumina HiSeq4000을 사용하여 모부본과 선발된 F2 개체들을 pooling하여 resequencing 하였음. 총 70,055,398회, 213,327,144회의 판독이 이루어졌을때, 'E6203' 및 'Hawaii 7998'의 평균예상 판독 깊이는 약 11.75X 및 35.79X임. bulk sequencing결과 70,609,818 (S-bulk1), 68,848,412 (R-bulk1), 251,792,964 (S-bulk2), 235,851,694 (R-bulk2)로 판독되었음 평균 깊이는 각각 11.84X, 11.55X, 42.24X 그리고 39.57X로 유사하게 나타났음. Q30 값은 90.01-94.00% 사이로, 생성되어 시퀀스의 quality가 높다는 것을 알 수 있음(표2-1). QTL-seq 분석을 통해 추후 QTL-seq를 통해 선발된 SNP/indel를 이용한 궤양병 저항성 연관 QTL을 동정하고 그 안에 존재하는 SNP를 기반으로 마커를 제작하였음.

표 2-1 Parential line 및 F2 bulk에 대한 Whole-Genome-Resequencing

Sample ID	Before trimming		After trimming		Genome Coverage (X)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
	Total read bases (bp)	Total reads	Total read bases (bp)	Total reads				
H7998	32,212,398,744	213,327,144	26,477,998,840	186,352,986	35.79	35.81	94.82	90.01
E6203	10,578,365,098	70,055,398	9,179,782,168	63,832,968	11.75	35.1	96.04	91.21
S-bulk1	10,662,082,518	70,609,818	9,197,459,757	64,045,990	11.84	35.76	95.88	90.92
R-bulk1	10,396,110,212	68,848,412	8,977,452,657	62,533,046	11.55	35.88	95.88	90.96
S-bulk2	38,020,737,564	251,792,964	34,402,069,625	235,233,872	42.24	35.87	97.31	93.94
R-bulk2	35,613,605,794	235,851,694	32,249,143,490	220,468,580	39.57	35.83	97.33	94.00

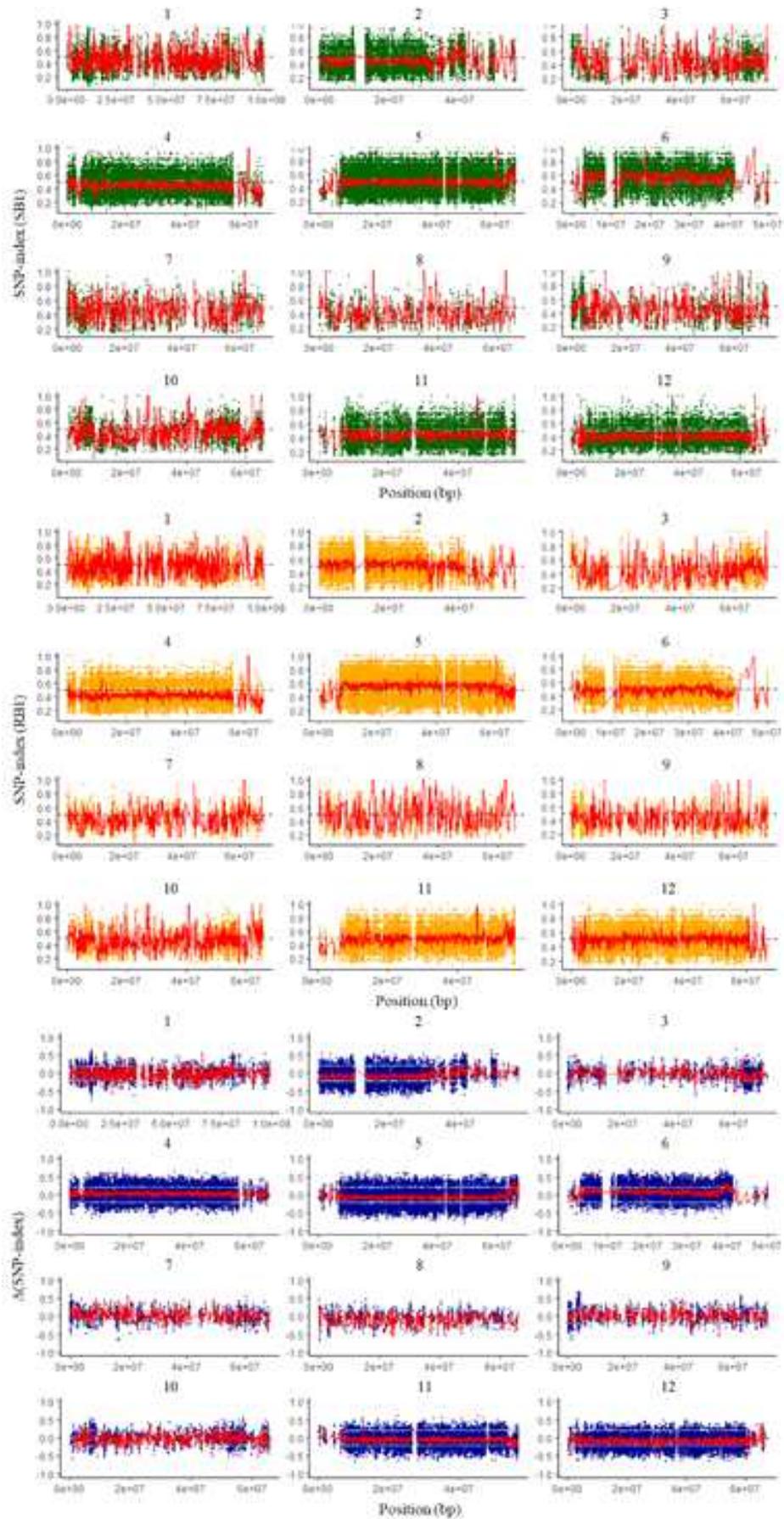
자. 토마토 F2 집단을 이용한 QTL-seq 분석

(1) 궤양병에 저항성 소재로 알려진 Hawaii7998과 이병성 품종인 E6203 사이의 F2 집단을 이용하였음 E6203 염기서열 기준으로 QTL 동정을 위해 SNP 지수를 비교해서 2회 반복실험진행함(그림 2-4 A,B). Hawaii 7998 염기서열 기준으로 QTL 동정을 위해 SNP 지수를 비교하고 2회 반복실험진행함(그림 2-4 C,D).저항성 그룹과 이병성 그룹의 SNP-index plot을 통한 저항성과 이병성을 비교분석함(그림 2-4 E). QTL-seq을 통해 선발된 SNP/indel를 이용한 궤양병 저항성 연관 QTL을 동정했음(그림 2-4 F). 그 안에 존재하는 SNP index를 통해 추측되는 궤양병 저항성 QTL에 존재하는 polymorphism을 기반으로 12개의 마커를 제작하였음. 제작한 마커의 위치를 나타냈음.

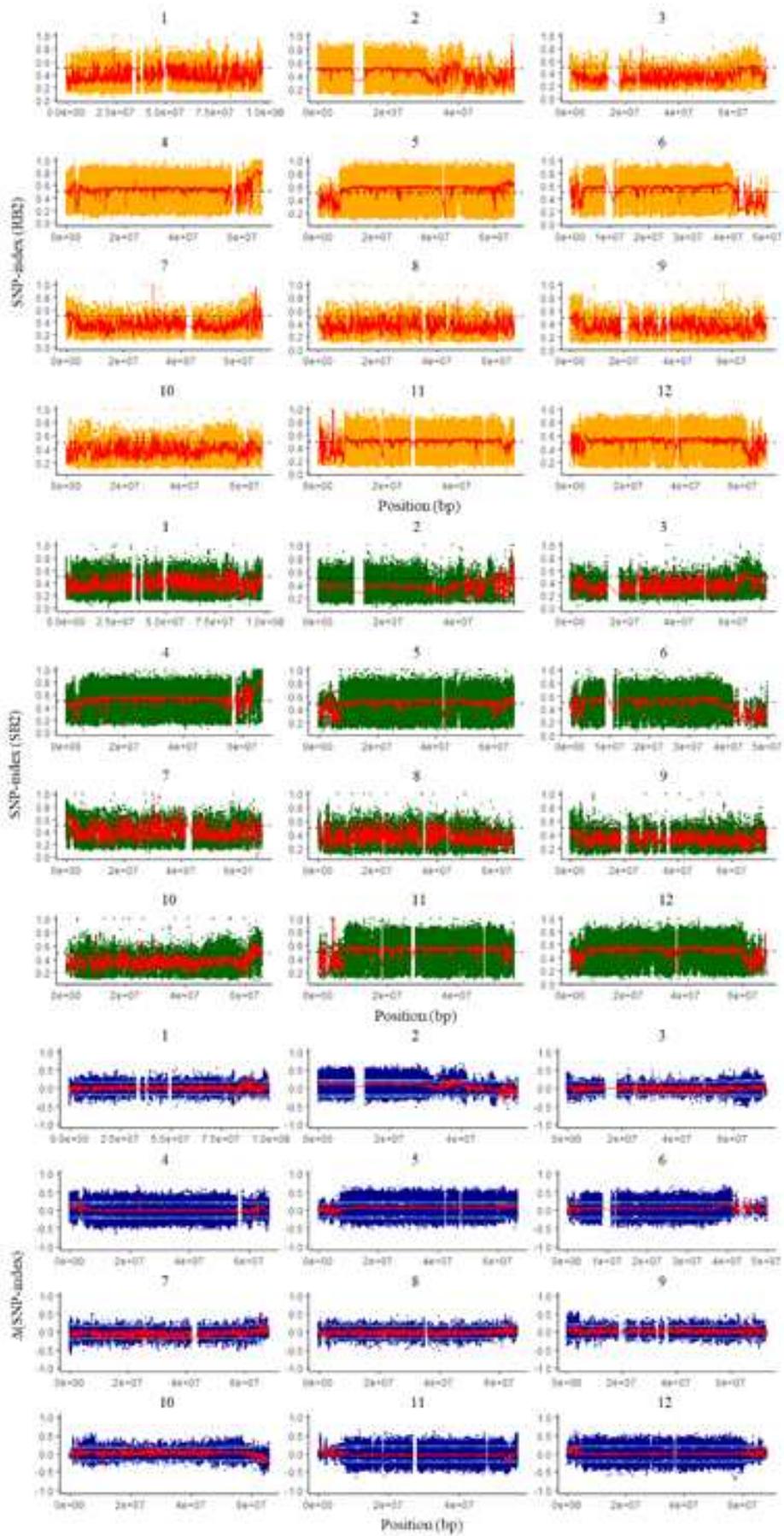
(2) 궤양병에 저항성 소재로 알려진 Hawaii7998과 이병성 품종인 E6203 사이의 F2 집단을 이용하였음. F2 집단을 궤양병 집종을 통해 저항성 집단과 이병성 집단을 분

리하여 염기서열을 비교하였음(그림 2-4 E,F). 12개 마커를 이용하였고 오렌지는 저항성 집단 녹색은 이병성 집단 파란색은 SNP 지수를 나타내며 Snp 지수는 저항성 집단에서 이병성 집단을 뺀 수치임. 첫 번째 실험은 E6203 염기서열 기준 두 번째 실험은 H7998기준으로 반복 실험을 진행하였음 결론적으로 왼쪽은 첫 번째 실험 오른쪽은 두 번째 실험 윗부분은 E6203기준 아랫부분은 H7998기준으로 나타남.

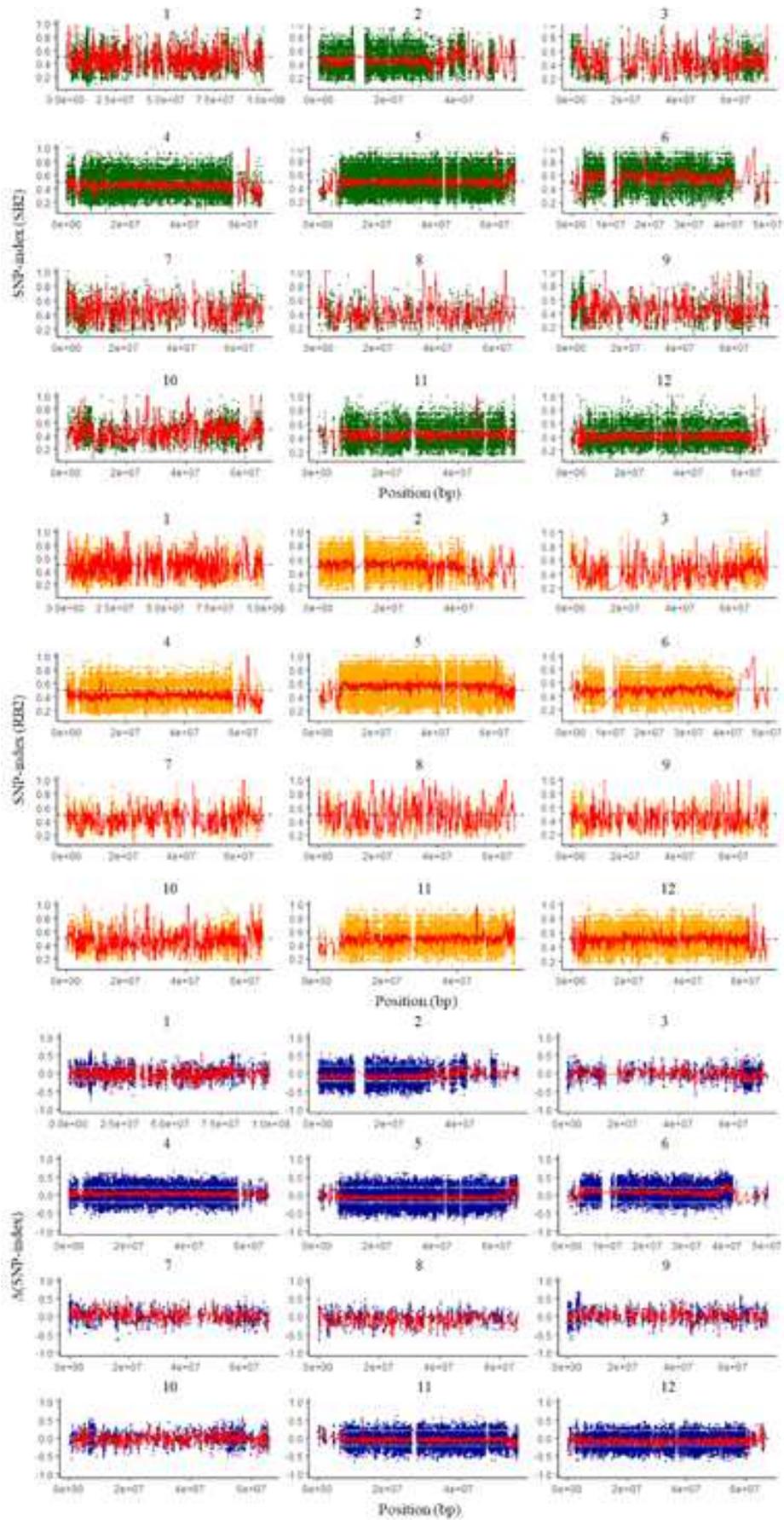
A



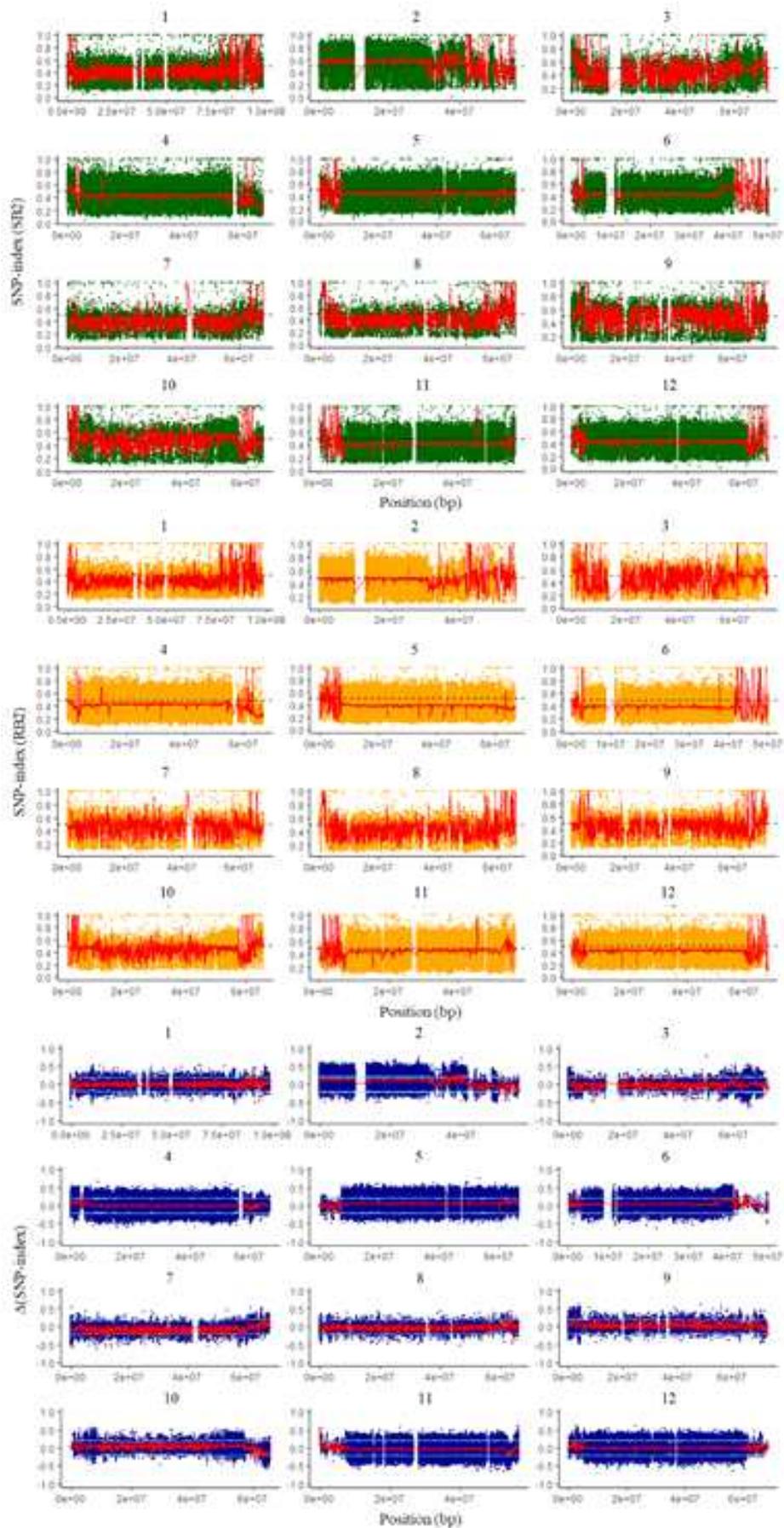
B



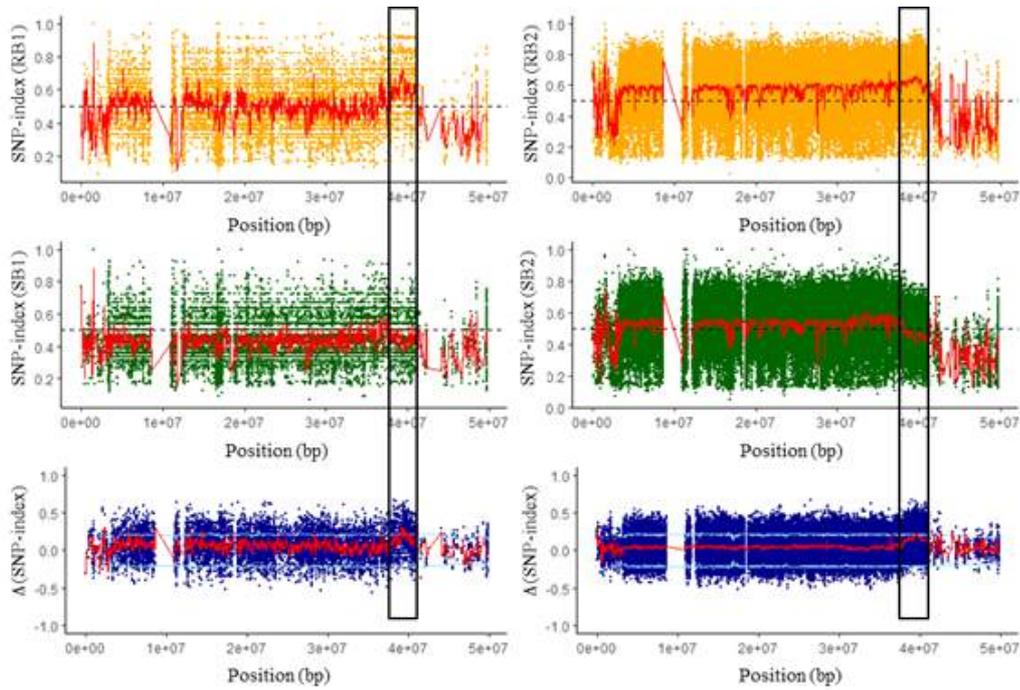
C



D



E



F

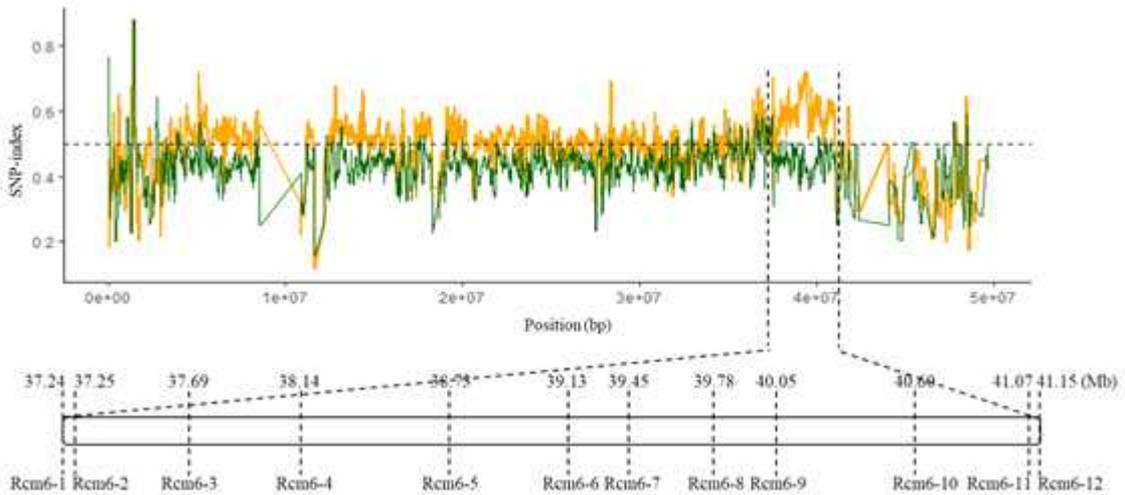


그림 2-4 SNP index를 통한 QTL 동정

차. *Rcm 6* 궤양병 저항성 유전자좌 연관 마커 검정

(1) SNP index를 통해 추측되는 궤양병 저항성 QTL(37.24-41.15 Mb, 염색체 6번)에 존재하는 polymorphism을 기반으로 12개의 마커를 제작하였음. 47개의 토마토 계통을 이용하여 제작한 12개의 마커 중 가장 효과적인 마커를 다시 선발하였음. 선발 방법은 각 계통 및 품종들의 표현형과 유전자형을 비교분석하여 마커를 선발함 계통들의 표현형은 집종을 통해 저항성과 이병성을 구별하였음. 47개의 계통들을 12개의 마커를 이용하여 유전자형을 확인하였고 표현형과 유전자형을 비교 분석하였음. 그

결과 Rcm6-9가 가장 효과적인 마커로 판별되었음.

표 2-2 토마토 47계통을 이용한 궤양병 저항성 마커 후보의 유전자형 결과

Cultivar	Disease severity ^a	Phenotype	Marker genotype ^b											
			Rcm6-1	Rcm6-2	Rcm6-3	Rcm6-4	Rcm6-5	Rcm6-6	Rcm6-7	Rcm6-8	Rcm6-9	Rcm6-10	Rcm6-11	Rcm6-12
Super High Power	1.1±0.13 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Hawaii 7998	1.2±0.13 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Hawaii 7996	1.3±0.17 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B-Blocking	1.4±0.16 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
High Power	1.4±0.16 a	Resistant	H	H	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IRAT L3	1.4±0.22 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BWR-20	1.5±0.40 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Shincheonggang	1.6±0.16 a	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Spider	2.0±0.39 ab	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	H	H	R
SVTX6258	2.0±0.47 ab	Resistant	R	R	H	H	H	S	R	H	R	R	R	R
Fighting	2.0±0.53 ab	Resistant	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10-BA-3-33	3.0±0.15 bc	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Florida 7481	3.2±0.92 cd	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10-BA-4-24	3.3±0.15 c-e	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
UC-134	3.3±0.68 c-e	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Miniheuksu	3.6±0.52 c-f	Susceptible	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
C-5	3.6±0.68 c-f	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Santa Cruz B	3.8±0.58 c-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Anahu	4.0±0.55 c-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Angela	4.0±0.55 c-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AVT-2	4.0±0.51 c-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Motelle	4.2±0.80 d-g	Susceptible	H	S	S	S	H	S	S	S	S	H	R	R
New Yorker	4.2±0.49 d-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Yellow Peach	4.2±0.58 d-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Dotaerang Red	4.3±0.39 e-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
M82	4.4±0.24 e-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Black Plum	4.4±0.60 e-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gold Nugget	4.4±0.60 e-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Indigo Rose	4.4±0.26 e-g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Heinz 1350	4.5±0.34 fg	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Cultivar	Disease severity ^a	Phenotype	Marker genotype ^b											
			Rcm6-1	Rcm6-2	Rcm6-3	Rcm6-4	Rcm6-5	Rcm6-6	Rcm6-7	Rcm6-8	Rcm6-9	Rcm6-10	Rcm6-11	Rcm6-12
Dafnis	4.6±0.40 fg	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	R
Black Cherry	4.6±0.31 fg	Susceptible	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A-1	4.8±0.20 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S	S	S
Rowpac	4.8±0.20 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Super Dotaerang	4.8±0.20 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VF36	4.9±0.10 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KN009	5.0±0.00 g	Susceptible	R	S	S	S	H	R	H	S	S	R	R	R
E6203	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Heinz 1706	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ailsa Craig	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Money maker	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Purple 1	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Purple 2	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
YT2359	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R
CP-2	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Florida 8516	5.0±0.00 g	Susceptible	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Pinkie	5.0±0.00 g	Susceptible	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R

아. Rcm6-9 마커로 선발한 F2, F3 개체를 이용한 MAS 효율성 검증

- (1) E6203 X Hawaii 7998 F2 집단에서 유전자형과 병 발병도를 비교하는 실험을 3반복 하였음(그림 2-5). E6203와 Hawaii7998 사이의 F3 집단을 이용하여 마커의 효용성을 검증함. 유전자형 내에서 각 발병도를 가진 F2의 백분율(그림 2-6). Rcm9 마커를 이용하여 F3 집단을 저항성 유전자형 집단과 이병성 유전자형 집단으로 분류하였음(표2-2). 그 결과 저항성 11종과 이병성 토마토 품종 36종이 분명하게

차이를 보였음(그림2-7). Rcm6-9의 경우 마커 정확도 검정을 했을 때 Phenotype이 저항성이면서 genotype도 저항성인 확률이 100% Phenotype이 이병성이면서 genotype이 이병성인 확률도 100%로 나옴으로써 가장 효과적인 마커로 판별됨(표 2-3).

표 2-3 퀘양병 저항성 마커 후보의 유전자형 결과 InDel 마커를 이용한 11개의 저항성 품종 및 36개의 이병성 품종 내 퀘양병 정확도 판단

Marker Name	Diagnostic test result ^a							
	Number of true positives	Number of false negative	Number of true negative	Number of False positive	True positive rate (%)	False negative rate (%)	True negative rate (%)	False positive rate (%)
Rcm6-1	10	1	33	3	90.9	9.1	91.7	8.3
Rcm6-2	10	1	36	0	90.9	9.1	100.0	0.0
Rcm6-3	10	1	36	0	90.9	9.1	100.0	0.0
Rcm6-4	10	1	36	0	90.9	9.1	100.0	0.0
Rcm6-5	10	1	33	3	90.9	9.1	91.7	8.3
Rcm6-6	10	1	34	2	90.9	9.1	94.4	5.6
Rcm6-7	11	0	31	5	100.0	0.0	86.1	13.9
Rcm6-8	10	1	36	0	90.9	9.1	100.0	0.0
Rcm6-9	11	0	36	0	100.0	0.0	100.0	0.0
Rcm6-10	10	1	34	2	90.9	9.1	94.4	5.6
Rcm6-11	9	2	30	6	81.8	18.2	83.3	16.7
Rcm6-12	10	1	30	6	90.9	9.1	83.3	16.7

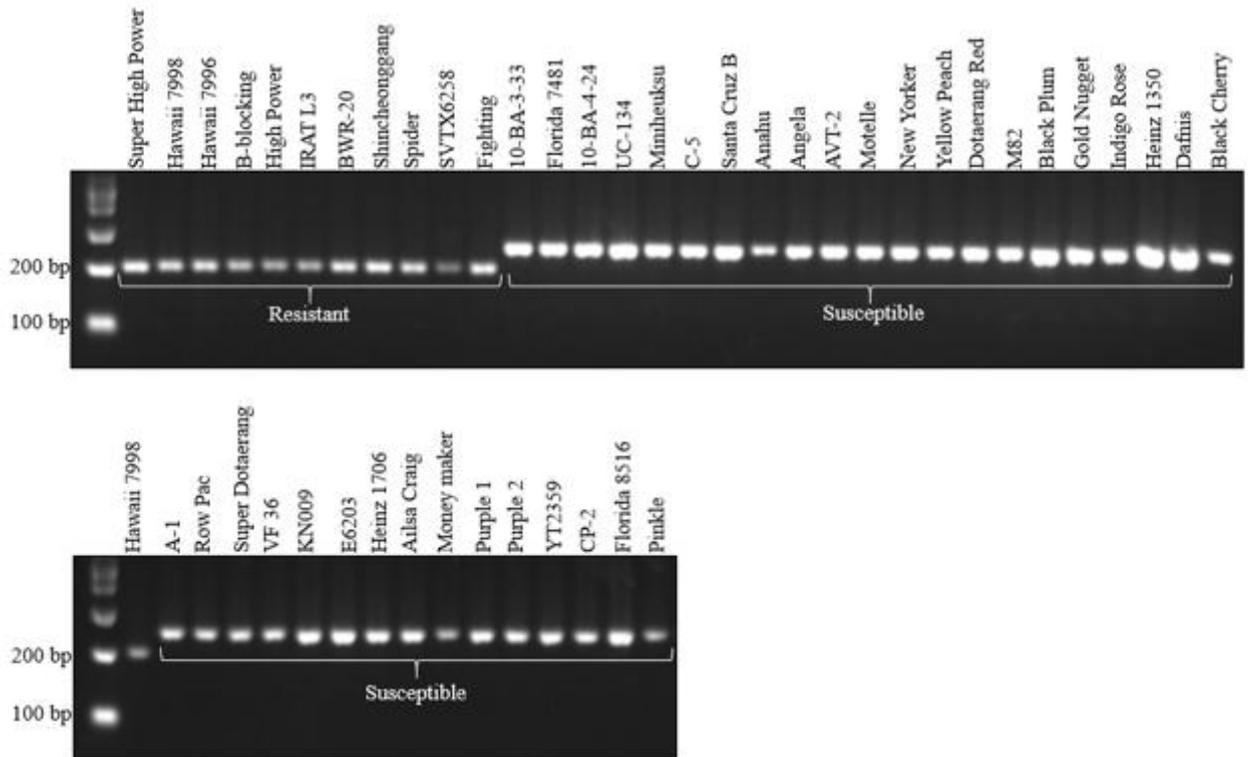


그림 2-5 Rcm9 마커를 이용한 47개의 토마토 계통 유전자형 마커를 통해 효과적으로 11개의 저항성과 36개의 이병성 계통을 구분

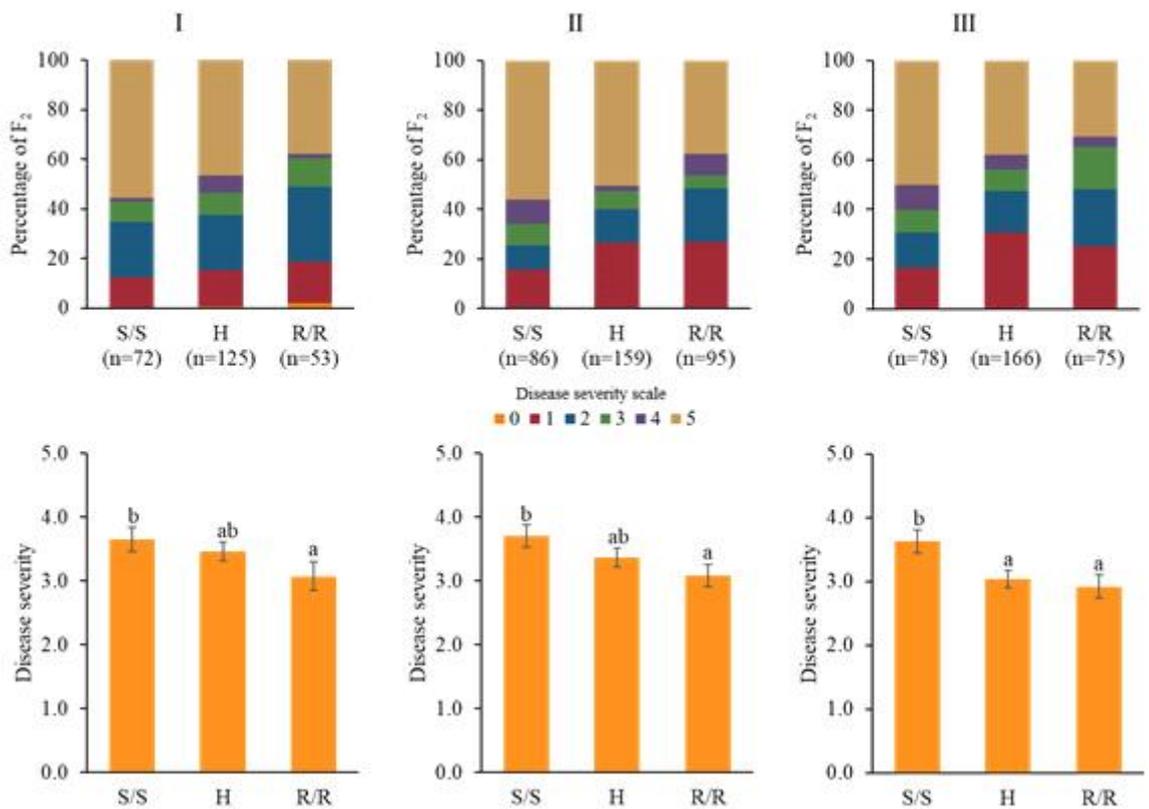


그림 2-6 6203 X Hawaii 7998 F₂ 집단에서 유전자형과 병 발병도를 비교하는 실험을 3반복 하였을때 RCM6-9 마커의 효율

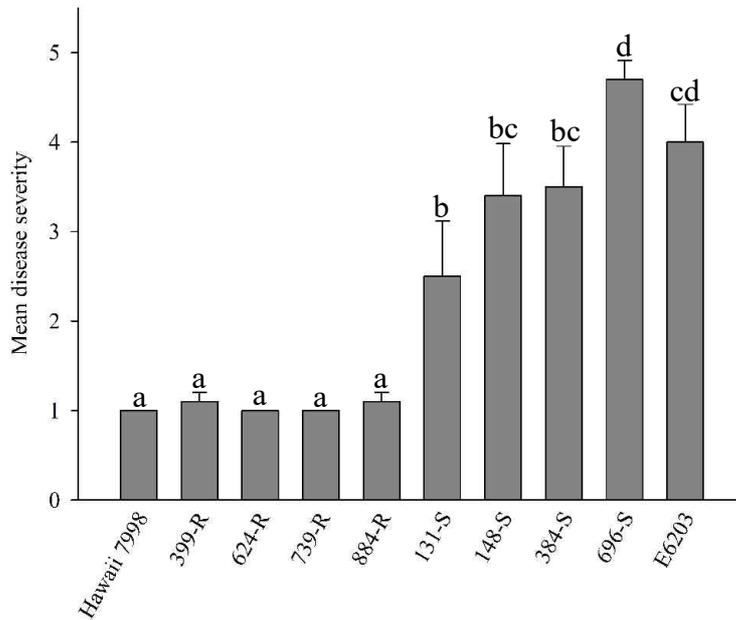


그림 2-7 Rcm9의 저항성과 이병성 유전자형을 보이는 F3 집종을 통한 병징의 평균값

카. Rcm6 마커를 이용한 저항성 후보유전자 선발

- (1) 후보 유전자 식별을 위한 Rcm6 마커 분석은 유전자원, F2집단, F3집단에서 케양병 저항성과 높은 연관성을 보였음. Rcm6(Rcm6-1 - Rcm6-12) 범위에는 tomato reference genome annotation에 따라 463개의 유전자가 포함됨. 후보 유전자들을 각각의 잠재적인 기능에 따라 살펴봄(표2-4; 표2-5). nucleotide-binding domain 과leucine-rich repeat (NLR), receptor-like kinases (RLK), receptor-like proteins (RLP) 도메인들은 Rcm6 지역에서 발견된 R-gene의 대부분을 차지함. 이 유전자들은 5개의 이병성 품종(E6203, Heinz 1706, Moneymaker, Ailsa Craig, Black Cherry)과 2개의 저항성 품종(하와이 7998, 하와이 7996)의 시퀀스를 사용하여 염기서열 변이를 분석하였음. 17개의 저항성 후보 유전자가 확인됐고 9개의 후보 유전자에서 아미노산 변이가 일어났음.

표 2-4 *Rcm6* 궤양병 저항성 후보 유전자

Candidate gene	Position (bp)	Nucleotide change ^a		Amino acid change		Description
		Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant	
Solyc06g060680.2.1	38824367	TGGAGGTAAT	-	L	frameshift	Receptor-like kinase (RLK)
Solyc06g060690.2.1	38828575	C	T	P	S	Receptor-like kinase (RLK)
	38828983	T	A	S	T	
Solyc06g060700.1.1	38835047	TCTCCTCTGCTTG	G-	L	frameshift	Protein kinase
Solyc06g062440.3.1	39509899	A	G	S	G	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
Solyc06g062450.3.1	39521478	C	T	L	F	Receptor-like kinase (RLK)
Solyc06g063150.3.1	40008352	G	A	C	Y	Receptor-like kinase (RLK)
	40008545	A	G	T	A	
Solyc06g064680.1.1	40431793	G	A	V	I	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40431861	A	T	E	D	
	40433251	T	G	F	V	
	40433446	T	G	S	A	
Solyc06g064710.1.1	40448680	C	G	T	R	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40448908	T	A	F	Y	
	40448943	A	G	N	D	
Solyc06g064720.1.1	40452607	T	A	N	K	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40452614	C	G	Q	E	
	40452627	A	T	K	M	
	40452739	T	A	N	K	
	40452755	A	G	T	A	
	40452776	G	T	A	S	
	40452824	GAC	TAT	D	Y	
	40452828	A	G	D	G	
	40452876	A	G	K	R	
	40453238	A	G	K	E	
	40453500	C	T	A	V	
	40454342	G	T	D	Y	
	40454355	T	G	F	C	

표 2-4 Continued

Candidate gene	Position (bp)	Nucleotide change ^a		Amino acid change		Description ^b
		Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant	
Solyc06g064750.1.1	40466829	ATA	GTG	I	V	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40466835	AGCATCTTC	-	HLQ	-	
	40466892	G	A	E	K	
	40466902	G	A	G	E	
	40466919	A	G	I	V	
	40467213	TT	CA	L	Q	
Solyc06g064760.1.1	40480599	G	C	E	D	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40481125	C	G	H	D	
	40481243	T	A	L	Q	
	40481247	C	A	H	Q	
	40481302	A	G	K	E	
	40481380	A	T	I	L	
	40481395	C	G	H	D	
	40481406	T	A	D	E	
	40481473	G	C	D	H	
	40481480	TC	AG	L	Q	
	40481556	G	C	L	F	
	40481561	G	A	G	D	
	40481573	A	G	K	R	
	40481586	G	A	M	I	
	40481590	TA	GT	Y	V	
	40481593	GGA	TCC	G	S	
	40481596	A	G	R	G	
40481598	-	AATGA	N	frameshift		
Solyc06g064790.1.1	40494375	G	C	L	F	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40495272	G	A	D	N	

표 2-5 Rcm6 재양병 저항성 후보 유전자

Candidate gene	Position (bp)	Nucleotide change ^a		Amino acid change		Description
		Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant	
Solyc06g065000.2.1	40652563	T	A	K	M	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
	40652692	T	C	E	G	
	40652563	T	A	K	M	
	40652692	T	C	E	G	
Solyc06g065120.1.1	40740430	-	T	*	I	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
Solyc06g065130.1.1	40742553	ATCCTCATCC	-	Y	*	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)
Solyc06g065150.1.1	40746042	C	T	L	F	Receptor-like protein (RLP)
	40746148	A	G	K	R	
	40746508	A	G	N	S	
	40746513	-	A	Y	*	
Solyc06g065260.3.1	40819050	A	C	E	D	Receptor-like kinase (RLK)

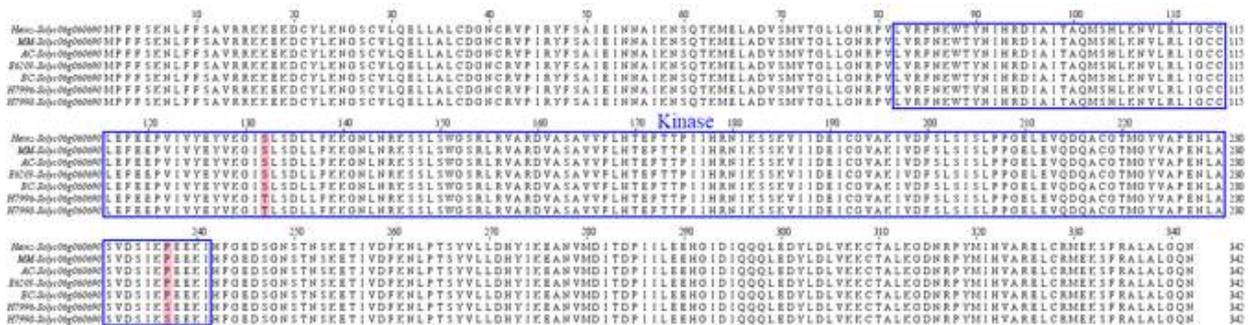
타. 아미노산 염기서열 변화를 보이며 functional Domain을 가지고 있는 9개의 저항성 후보 유전자.

(1) 5개의 이병성 품종 Heinz 1706 (Heinz), Moneymaker (MM), Ailsa Craig (AC), E6203, Black Cherry (BC) 와 2개의 저항성 품종 Hawaii 7996 (H7996) 과 Hawaii 7998 (H7998)를 alignment에 사용하였음 저항성 품종과 이병성 품종 사이 Polymorphism을 보이는 곳에 빨간색으로 표시하였음(그림 2-8). 도메인은 파란색 상자로 표시하였음.

Solyc06g060680.2.1 - Receptor-like kinase (RLK)



Solyc06g060690.2.1- Receptor-like kinase (RLK)



Solyc06g064750.1.1 - Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110
Hsnc-Solyc06g064750 MEVVTGCKRKTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
MM-Solyc06g064750 MEVVTGCKRKTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
AC-Solyc06g064750 MEVVTGCKRKTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
Ect01-Solyc06g064750 MEVVTGCKRKTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
BC-Solyc06g064750 MEVVTGCKRKTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
H7996-Solyc06g064750 MEVVTGCKRKTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115

120     130     140     150     160     170     180     190     200     210     220
Hsnc-Solyc06g064750 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPQOECOSRVMVTRIEQIAKHLQHSDPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
MM-Solyc06g064750 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPQOECOSRVMVTRIEQIAKHLQHSDPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
AC-Solyc06g064750 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPQOECOSRVMVTRIEQIAKHLQHSDPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
Ect01-Solyc06g064750 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPQOECOSRVMVTRIEQIAKHLQHSDPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
BC-Solyc06g064750 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPQOECOSRVMVTRIEQIAKHLQHSDPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
H7996-Solyc06g064750 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPQOECOSRVMVTRIEQIAKHLQHSDPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230

240     250     260     270     280     290     300     310     320     330     340
Hsnc-Solyc06g064750 TVYLIAGILOKTEREASLWLEVAADLSLALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEACRVCLLDNLNRSILMVSOMRFFYC 345
MM-Solyc06g064750 TVYLIAGILOKTEREASLWLEVAADLSLALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEACRVCLLDNLNRSILMVSOMRFFYC 345
AC-Solyc06g064750 TVYLIAGILOKTEREASLWLEVAADLSLALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEACRVCLLDNLNRSILMVSOMRFFYC 345
Ect01-Solyc06g064750 TVYLIAGILOKTEREASLWLEVAADLSLALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEACRVCLLDNLNRSILMVSOMRFFYC 345
BC-Solyc06g064750 TVYLIAGILOKTEREASLWLEVAADLSLALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEACRVCLLDNLNRSILMVSOMRFFYC 345
H7996-Solyc06g064750 TVYLIAGILOKTEREASLWLEVAADLSLALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEACRVCLLDNLNRSILMVSOMRFFYC 345

350     360     370     380     390     400     410     420     430     440     450
Hsnc-Solyc06g064750 DVQYYSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLAFFNFPYQHLHSTISRLYIYIHDDLVLQDLHNSYQLDQIPMLDFEETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
MM-Solyc06g064750 DVQYYSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLAFFNFPYQHLHSTISRLYIYIHDDLVLQDLHNSYQLDQIPMLDFEETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
AC-Solyc06g064750 DVQYYSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLAFFNFPYQHLHSTISRLYIYIHDDLVLQDLHNSYQLDQIPMLDFEETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
Ect01-Solyc06g064750 DVQYYSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLAFFNFPYQHLHSTISRLYIYIHDDLVLQDLHNSYQLDQIPMLDFEETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
BC-Solyc06g064750 DVQYYSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLAFFNFPYQHLHSTISRLYIYIHDDLVLQDLHNSYQLDQIPMLDFEETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
H7996-Solyc06g064750 DVQYYSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLAFFNFPYQHLHSTISRLYIYIHDDLVLQDLHNSYQLDQIPMLDFEETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460

460     470     480     490     500     510     520     530     540     550     560
Hsnc-Solyc06g064750 PDSWATAIQSLTELYRALCVKQFLKWIISHLHHLQTLWLSSEKRLRAATLWEMMKLRHVNIDCFSAWEDNEQESSPTLLENMKSFGOTCNIFDNMNAARFWRFFNLEELC 575
MM-Solyc06g064750 PDSWATAIQSLTELYRALCVKQFLKWIISHLHHLQTLWLSSEKRLRAATLWEMMKLRHVNIDCFSAWEDNEQESSPTLLENMKSFGOTCNIFDNMNAARFWRFFNLEELC 575
AC-Solyc06g064750 PDSWATAIQSLTELYRALCVKQFLKWIISHLHHLQTLWLSSEKRLRAATLWEMMKLRHVNIDCFSAWEDNEQESSPTLLENMKSFGOTCNIFDNMNAARFWRFFNLEELC 575
Ect01-Solyc06g064750 PDSWATAIQSLTELYRALCVKQFLKWIISHLHHLQTLWLSSEKRLRAATLWEMMKLRHVNIDCFSAWEDNEQESSPTLLENMKSFGOTCNIFDNMNAARFWRFFNLEELC 575
BC-Solyc06g064750 PDSWATAIQSLTELYRALCVKQFLKWIISHLHHLQTLWLSSEKRLRAATLWEMMKLRHVNIDCFSAWEDNEQESSPTLLENMKSFGOTCNIFDNMNAARFWRFFNLEELC 575
H7996-Solyc06g064750 PDSWATAIQSLTELYRALCVKQFLKWIISHLHHLQTLWLSSEKRLRAATLWEMMKLRHVNIDCFSAWEDNEQESSPTLLENMKSFGOTCNIFDNMNAARFWRFFNLEELC 575

580     590     600     610     620     630     640     650     660     670     680
Hsnc-Solyc06g064750 LSKVDVPEFFYFPIAEVHSHLHFLSLEFFLMEFLDSFGWERFCVPSNLRHLDLAKCLLTEMVNLARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLFFMQIEEWA 690
MM-Solyc06g064750 LSKVDVPEFFYFPIAEVHSHLHFLSLEFFLMEFLDSFGWERFCVPSNLRHLDLAKCLLTEMVNLARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLFFMQIEEWA 690
AC-Solyc06g064750 LSKVDVPEFFYFPIAEVHSHLHFLSLEFFLMEFLDSFGWERFCVPSNLRHLDLAKCLLTEMVNLARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLFFMQIEEWA 690
Ect01-Solyc06g064750 LSKVDVPEFFYFPIAEVHSHLHFLSLEFFLMEFLDSFGWERFCVPSNLRHLDLAKCLLTEMVNLARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLFFMQIEEWA 690
BC-Solyc06g064750 LSKVDVPEFFYFPIAEVHSHLHFLSLEFFLMEFLDSFGWERFCVPSNLRHLDLAKCLLTEMVNLARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLFFMQIEEWA 690
H7996-Solyc06g064750 LSKVDVPEFFYFPIAEVHSHLHFLSLEFFLMEFLDSFGWERFCVPSNLRHLDLAKCLLTEMVNLARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLFFMQIEEWA 690

690     700     710     720     730     740     750     760
Hsnc-Solyc06g064750 SEESFPVLEKLVISAWPQFRIKIEIPPSFADILTLRRIELFDCTDSLQVSAAMNMRREIENTCODSLOVVYIQ 763
MM-Solyc06g064750 SEESFPVLEKLVISAWPQFRIKIEIPPSFADILTLRRIELFDCTDSLQVSAAMNMRREIENTCODSLOVVYIQ 763
AC-Solyc06g064750 SEESFPVLEKLVISAWPQFRIKIEIPPSFADILTLRRIELFDCTDSLQVSAAMNMRREIENTCODSLOVVYIQ 763
Ect01-Solyc06g064750 SEESFPVLEKLVISAWPQFRIKIEIPPSFADILTLRRIELFDCTDSLQVSAAMNMRREIENTCODSLOVVYIQ 763
BC-Solyc06g064750 SEESFPVLEKLVISAWPQFRIKIEIPPSFADILTLRRIELFDCTDSLQVSAAMNMRREIENTCODSLOVVYIQ 763
H7996-Solyc06g064750 SEESFPVLEKLVISAWPQFRIKIEIPPSFADILTLRRIELFDCTDSLQVSAAMNMRREIENTCODSLOVVYIQ 763

```

Solyc06g064760.1.1 - Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR)

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110
Hsnc-Solyc06g064760 MEVVECTGKRTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
MM-Solyc06g064760 MEVVECTGKRTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
AC-Solyc06g064760 MEVVECTGKRTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
Ect01-Solyc06g064760 MEVVECTGKRTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
BC-Solyc06g064760 MEVVECTGKRTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115
H7996-Solyc06g064760 MEVVECTGKRTSSOHTSNFSPNITSYDDDDVVQVGFENHAQIIVNKLIRGTEERNVSIYOMPOLOKTTLARKVYNNPFIILNYPDVKAWCAVSQAYNRRTLLVEIFQOATSNK 115

120     130     140     150     160     170     180     190     200     210     220
Hsnc-Solyc06g064760 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPLOEYSRVMVTRIEQVTEHLQHSHSPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
MM-Solyc06g064760 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPLOEYSRVMVTRIEQVTEHLQHSHSPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
AC-Solyc06g064760 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPLOEYSRVMVTRIEQVTEHLQHSHSPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
Ect01-Solyc06g064760 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPLOEYSRVMVTRIEQVTEHLQHSHSPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
BC-Solyc06g064760 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPLOEYSRVMVTRIEQVTEHLQHSHSPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230
H7996-Solyc06g064760 IKEDDDVADMLRKLQKRYLIVLDDIWDVEAWEDLQICFPLOEYSRVMVTRIEQVTEHLQHSHSPPYSLFSLTSEESWGLEKKIFRQESCFFDLVEAQLQVALHCGQLP 230

240     250     260     270     280     290     300     310     320     330     340
Hsnc-Solyc06g064760 IAGIIAKMREASLWVEVANDLSFALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEASRNCCLLHSLVIMHYORNDHRDVR 345
MM-Solyc06g064760 IAGIIAKMREASLWVEVANDLSFALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEASRNCCLLHSLVIMHYORNDHRDVR 345
AC-Solyc06g064760 IAGIIAKMREASLWVEVANDLSFALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEASRNCCLLHSLVIMHYORNDHRDVR 345
Ect01-Solyc06g064760 IAGIIAKMREASLWVEVANDLSFALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEASRNCCLLHSLVIMHYORNDHRDVR 345
BC-Solyc06g064760 IAGIIAKMREASLWVEVANDLSFALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEASRNCCLLHSLVIMHYORNDHRDVR 345
H7996-Solyc06g064760 IAGIIAKMREASLWVEVANDLSFALQOQSMKVIQSSYDHLDELHLPCLLYMALFPEDHKIPVDHLKLVIAEEFVLSNAIENMEEASRNCCLLHSLVIMHYORNDHRDVR 345

350     360     370     380     390     400     410     420     430     440     450
Hsnc-Solyc06g064760 YCSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLIYVYFQHLHSTESRLCIYIHDDFFQSDHDPYQLDQIPMLNFKETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
MM-Solyc06g064760 YCSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLIYVYFQHLHSTESRLCIYIHDDFFQSDHDPYQLDQIPMLNFKETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
AC-Solyc06g064760 YCSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLIYVYFQHLHSTESRLCIYIHDDFFQSDHDPYQLDQIPMLNFKETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
Ect01-Solyc06g064760 YCSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLIYVYFQHLHSTESRLCIYIHDDFFQSDHDPYQLDQIPMLNFKETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
BC-Solyc06g064760 YCSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLIYVYFQHLHSTESRLCIYIHDDFFQSDHDPYQLDQIPMLNFKETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460
H7996-Solyc06g064760 YCSLHDVYRREFCRLRLTEDEYMQLIYVYFQHLHSTESRLCIYIHDDFFQSDHDPYQLDQIPMLNFKETNSLEFIAHPKLNVTWNNQSNFPLDLVVKLRFVRLDLMDEL 460

460     470     480     490     500     510     520     530     540     550     560
Hsnc-Solyc06g064760 WATAIQSLSLRYLAICVRFQLEWISHLHHLQTLQVSSNKEIKLRAATLWEMMKLRHVNISYFQVWVEDINDEOQFETSMLENMKTPTSNVRLDNMNAARLWRRFFNLEELC 575
MM-Solyc06g064760 WATAIQSLSLRYLAICVRFQLEWISHLHHLQTLQVSSNKEIKLRAATLWEMMKLRHVNISYFQVWVEDINDEOQFETSMLENMKTPTSNVRLDNMNAARLWRRFFNLEELC 575
AC-Solyc06g064760 WATAIQSLSLRYLAICVRFQLEWISHLHHLQTLQVSSNKEIKLRAATLWEMMKLRHVNISYFQVWVEDINDEOQFETSMLENMKTPTSNVRLDNMNAARLWRRFFNLEELC 575
Ect01-Solyc06g064760 WATAIQSLSLRYLAICVRFQLEWISHLHHLQTLQVSSNKEIKLRAATLWEMMKLRHVNISYFQVWVEDINDEOQFETSMLENMKTPTSNVRLDNMNAARLWRRFFNLEELC 575
BC-Solyc06g064760 WATAIQSLSLRYLAICVRFQLEWISHLHHLQTLQVSSNKEIKLRAATLWEMMKLRHVNISYFQVWVEDINDEOQFETSMLENMKTPTSNVRLDNMNAARLWRRFFNLEELC 575
H7996-Solyc06g064760 WATAIQSLSLRYLAICVRFQLEWISHLHHLQTLQVSSNKEIKLRAATLWEMMKLRHVNISYFQVWVEDINDEOQFETSMLENMKTPTSNVRLDNMNAARLWRRFFNLEELC 575

580     590     600     610     620     630     640     650     660     670     680
Hsnc-Solyc06g064760 KYEDEFKPLFPFVPEVHTRISLSLSMKFLDSVOWERVYFPPSNIRHLDLQOCLLTEMALNARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLTLCRWKMEWE 690
MM-Solyc06g064760 KYEDEFKPLFPFVPEVHTRISLSLSMKFLDSVOWERVYFPPSNIRHLDLQOCLLTEMALNARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLTLCRWKMEWE 690
AC-Solyc06g064760 KYEDEFKPLFPFVPEVHTRISLSLSMKFLDSVOWERVYFPPSNIRHLDLQOCLLTEMALNARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLTLCRWKMEWE 690
Ect01-Solyc06g064760 KYEDEFKPLFPFVPEVHTRISLSLSMKFLDSVOWERVYFPPSNIRHLDLQOCLLTEMALNARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLTLCRWKMEWE 690
BC-Solyc06g064760 KYEDEFKPLFPFVPEVHTRISLSLSMKFLDSVOWERVYFPPSNIRHLDLQOCLLTEMALNARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLTLCRWKMEWE 690
H7996-Solyc06g064760 KYEDEFKPLFPFVPEVHTRISLSLSMKFLDSVOWERVYFPPSNIRHLDLQOCLLTEMALNARLKLKESLKLQMGFPMRSCYCDVNTNVEFPALKYGLTLCRWKMEWE 690

690     700     710     720     730     740     750     760
Hsnc-Solyc06g064760 ASESFPVLEKLVIOOPIETMPPSFADIPTLQIQIDDCDLSQVSAAMNMRREIENTCODNLRVLMKMK 763
MM-Solyc06g064760 ASESFPVLEKLVIOOPIETMPPSFADIPTLQIQIDDCDLSQVSAAMNMRREIENTCODNLRVLMKMK 763
AC-Solyc06g064760 ASESFPVLEKLVIOOPIETMPPSFADIPTLQIQIDDCDLSQVSAAMNMRREIENTCODNLRVLMKMK 763
Ect01-Solyc06g064760 ASESFPVLEKLVIOOPIETMPPSFADIPTLQIQIDDCDLSQVSAAMNMRREIENTCODNLRVLMKMK 763
BC-Solyc06g064760 ASESFPVLEKLVIOOPIETMPPSFADIPTLQIQIDDCDLSQVSAAMNMRREIENTCODNLRVLMKMK 763
H7996-Solyc06g064760 ASESFPVLEKLVIOOPIETMPPSFADIPTLQIQIDDCDLSQVSAAMNMRREIENTCODNLRVLMKMK 763

```

Solyc06g065150.1.1 - Receptor-like protein (RLP)

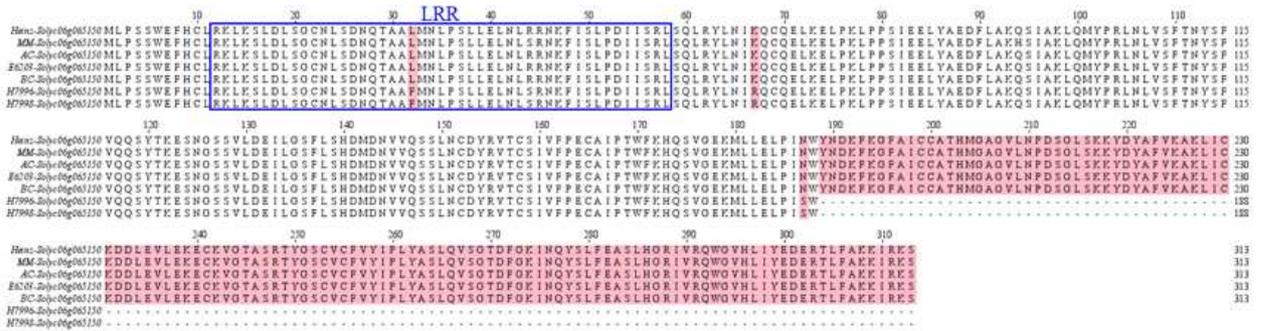


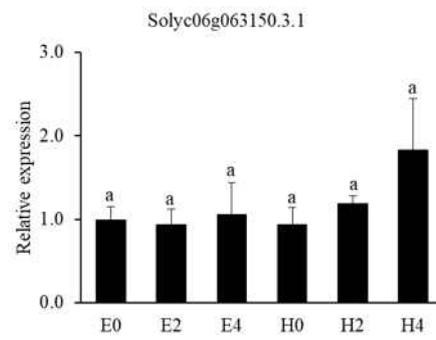
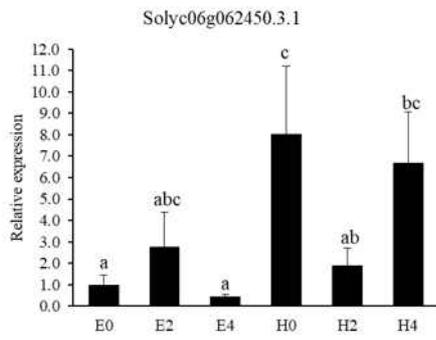
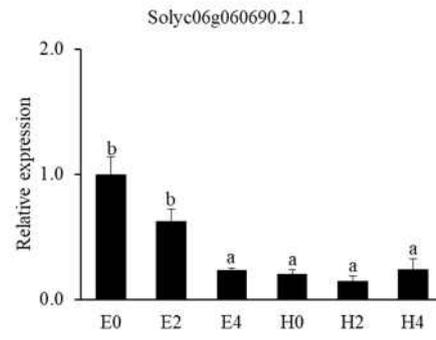
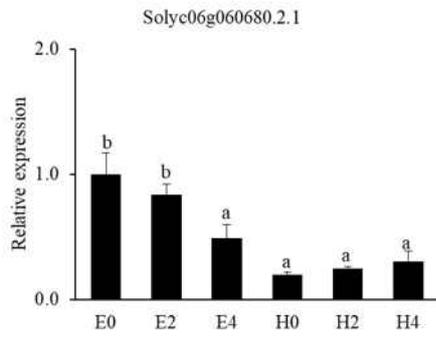
그림 2-8 도메인을 포함하고 있는 궤양병 저항성 후보유전자의 아미노산 염기서열 alignment

TM, transmembrane; NB-ARC, nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins, and CED-4; LRR, leucine-rich repeat.

파. qRT-PCR를 이용한 9개 궤양병 저항성 후보 유전자의 발현 검증

(1) 9개 후보 유전자의 발현 수준을 qRT-PCR이 'E6203'과 'Hawaii 7998'의 잎 조직에서 0 dpi(접종 후 0일), 2 dpi(접종 후 2일), 4 dpi(접종 후 4일)에서 Cm 감염 정도를 분석했음. Solyc06g060680.2.1, Solyc06g060690.2.1, Solyc06g064750.1.1의 발현이 줄어든 반면, Solyc06g064720.1.1, Solyc06g0660.1.1, Solyc06g0651.1의 발현 변화를 보임(그림 2-9).

두 품종 모두 감염 후에도 Solyc06g063150.3.1과 Solyc06g064680.1의 발현은 크게 변하지 않았음. Solyc06g062450.3.1은 'Hawaii 7998'에서 Cm 감염 이후 다른 후보 유전자의 발현에 변화가 없는 동안 발현이 줄어듬.



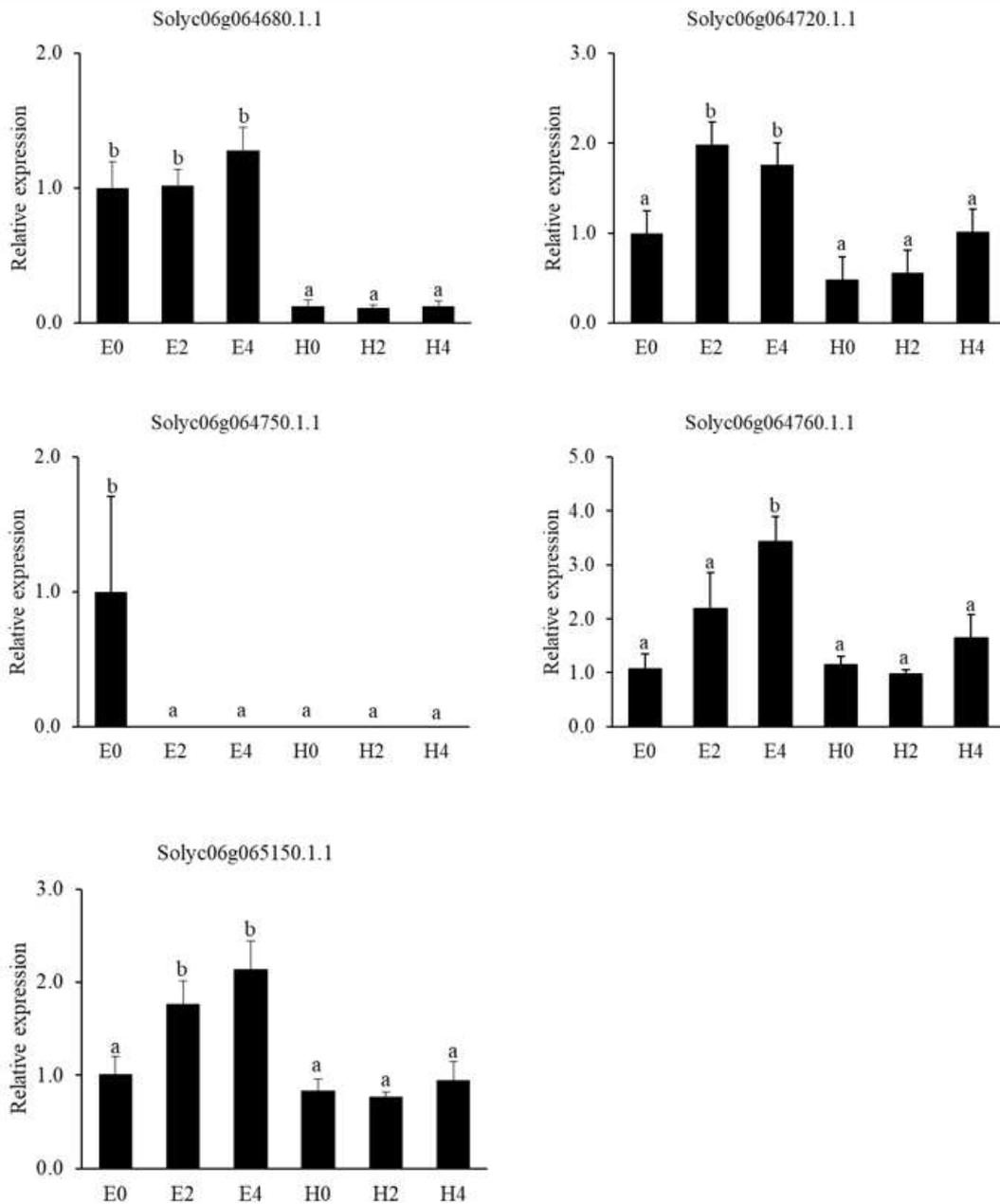


그림 2-9 qRT-PCR E6203(E)과 하와이 7998(H)의 잎 조직에서 접종 후 0 dpi, 2 dpi, 4 dpi에서 후보 유전자의 상대적 발현 수준. 평균 ± 표준 오차(n=6)를 나타냄. 그래프의 a,b는 던컨의 다중 범위 테스트에 따른 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

하. 토마토 궤양병 저항성을 위한 Introgression Line 스크리닝.

(1) 토마토 introgression line은 궤양병 균주를 이용해 신규 토마토 저항성 계통을 선발하기 위해 야생 종에서 계통으로 원하는 유전자가 도입된 라인을 의미함. IL은 마커를 이용해 도입된 유전자의 영역을 인지할 수 있음. 해당 유전자들을 IL 집단에서 찾아내는 것이 연구 목표임. 본 실험에서는 *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides* 세 가지 introgression line에서 계통에 비해 낮은 발병도를 나타내는 ILline을 확인함(그림 2-10). *S. pennellii* introgression line에서 IL-6과

IL-28은 기존 품종 M82보다 발병도가 낮았으며, 대부분의 병저항성 유전자는 야생 종에 동정됨. 본 연구는 선택된 Introgression line에서 후보 유전자를 식별하기 위해 추가 실험을 진행하고 있음. 신규 퀘양병 저항성 계통 선발은 토마토에서 농업적으로 중요한 특성을 제어하는 유전자의 식별 및 특성화를 촉진할 것임(Zamir, 2001).

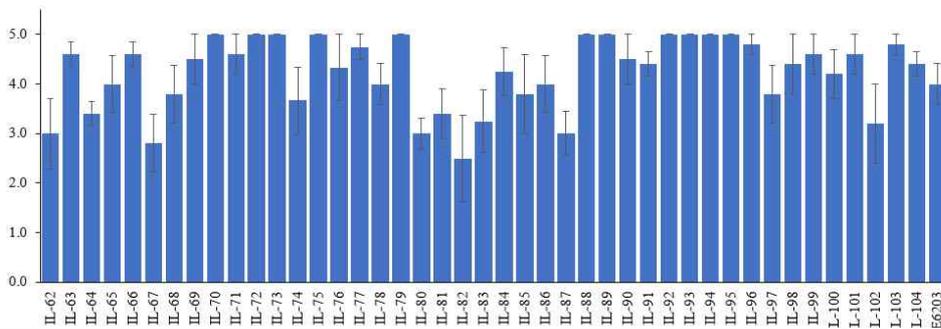
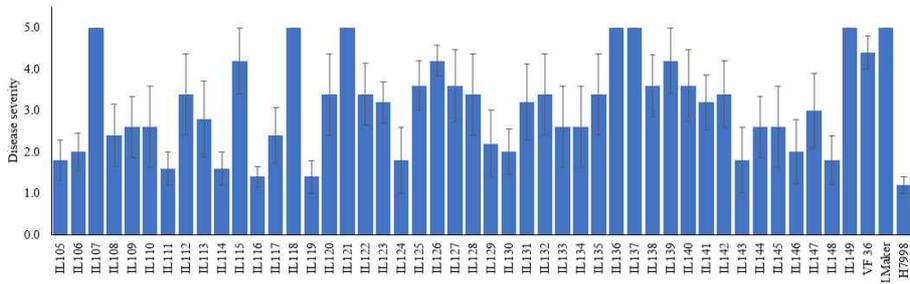
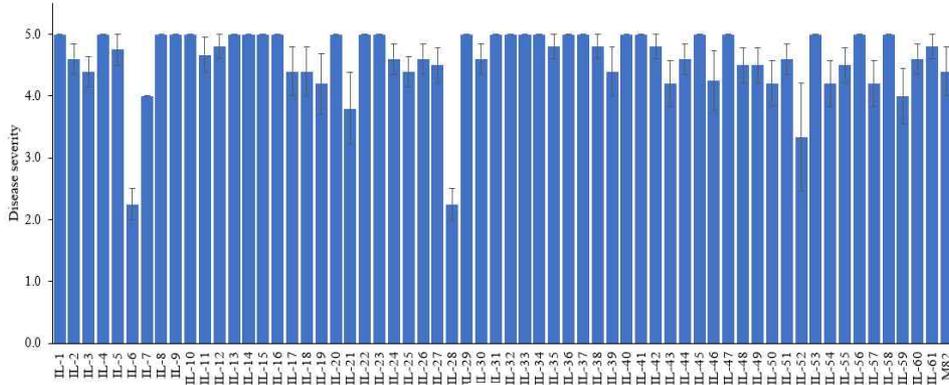


그림 2-10 *S. pennellii* IL에서 IL-6 과 IL-28에서 퀘양병 저항성이 보임. 집중 후 *S. lycopersicoides* IL의 퀘양병 저항성 평가 집중 후 *S. habrochaites* IL의 퀘양병 저항성 평가

제 10 절. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 저항성 분자마커 개발

1. 연구수행 내용

가. TYLCV 저항성 유전자 탐색

(1) 토마토황화잎말림바이러스(Tomato yellow leaf curl virus; TYLCV)는 Geminiviridae과 Begomovirus속에 속하는 circular single stranded DNA genome(ssDNA) 2.7 kb의 식물바이러스이며(Brunt and Cohen, 1998), 담배가루이(white fly)에 의해 매개되는 병입(Cohen and Nitzany, 1966). 1960년 중동지역에서 처음 보고된 이후로 현재는 미국, 남미, 유럽, 동남아, 일본, 중국 등 확산되어 있으며(Czosnek et al, 1997), 우리나라에서는 2008년에 경남 통영 시설 재배 지역에서 처음 보고되었음. 현재는 전국적으로 확산되어 있으며 국가 관리 대상 바이러스로 지정되어 있음(Cho et al, 2008). 발병 초기에는 생장점을 중심으로 잎이 황색으로 변하고 말리는 증상을 나타나게 되는데 시간이 지나게 되면 잎의 손상으로 인한 생장점 성장이 멈추게 되고, 광합성 장애 등으로 인한 착과율이 떨어져 과실 생산량이 큰 손실을 초래하게 됨(Cohen and Harpaz, 1964; Moriones and Navas-Castillo, 2000).

(2) TYLCV 저항성 유전자로는 *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *ty-5* 그리고 *Ty-6* 가 보고되어 있음(Zamir et al, 1994; Hanson et al, 2006; Ji et al, 2007; Ji et al, 2009; Anbinder et al, 2009; Hutton et al, 2014). *Ty-1* 과 *Ty-3* 는 6번 염색체에 위치하며 야생종인 *S. chilense* 로 LA1932, LA1969, LA2779 에서 유래하였으며 *RNA-dependent RNA polymerase(RDRP)*을 암호화하고 있는 것으로 보고되었음(Hoogstraten et al, 2005; Ji et al, 2007, Ji and Scott, 2006). 최근 보고에 따르면 *Ty-1* 과 *Ty-3* 가 동일한 유전자 좌의 대립유전자임이 밝혀졌음(Verlaan et al, 2011). *Ty-2* 는 염색체 11번에 위치하며 *S. habochaites* 계통인 B6013 에서 유래하였으며 최근 *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing(NB-LRR)*을 암호화하고 있는 것으로 보고되었음(Hanson et al, 2006; Yamaguchi et al, 2018), *Ty-4* 는 염색체 3번에 위치하며 *S. chilense* 계통인 LA1932 에서 유래하였으며 암호화하고 있는 유전자는 밝혀지지 않았으나 염색체의 550 kb 구역내에 65개의 유전자가 밝혀져 있음(Ji et al, 2009). *ty-5* 는 열성저항성 유전자로 염색체 4 번에 위치하며 야생종인 *S. peruvianum* 에서 유래하였으며 재배종인 TY172 에 도입되어 있고 *Pelota* 유전자를 암호화 하고 있는 것으로 보고되어있음(Anbinder et al, 2009; Levin et al, 2013). *Ty-6* 는 염색체 10번에 위치하며 *S. chilense* 계통인 LA1938, LA2779 에서 유래하였으며 암호화하고 있는 유전자를 밝혀지지 않았으나 *Ty-3*, *ty-5* 에 의해 부여된 저항성을 더욱 보완하는데 효과적이며 토마토반점바이러스(ToMoV) 에도 저항을 보임(Gill et al, 2019)(표 3-1). 현재까지 상업 육종에 많이 사용된 TYLCV 저항성으로는 *Ty-1/3* 저항성이 대부분이며 일부 해외 품종에서 *Ty-2* 저항성 유전자를 사용하였음. 하지만 시간이 지날수록 다양한 TYLCV isolate 의 출현으로 저항성이 무너지게 되어 심각한 피해를 입을 수

있음(Ohnishi et al, 2016). 본 연구에서는 *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* 유전자를 바탕으로 분자마커를 개발하였음. 이후에 다양한 토마토 유전자원에 TYLCV 자연 발생 및 TYLCV 대량 접종법을 통해 병징을 Phenotype 과 Genotype 을 비교하였으며, TYLCV 단일 저항성과 복합 저항성의 차이를 비교하여 저항성 유전자 구성의 중요성을 연구하였음.

표 3-1. TYLCV 저항성 유전자 정보

Locus	Accession	Species	Coding gene	Chromosome	Reference
<i>Ty-1/3</i>	LA1969	<i>S. chilense</i>	<i>RNA-dependent RNA polymerase (RDRP)</i>	Ch. 6	Zamir et al., 1994 Ji et al., 2007 Verlaan et al., 2013
<i>Ty-2</i>	B6013	<i>S. habrochaites</i>	<i>Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeatcontaining (NB-LRR)</i>	Ch. 11	Hanson et al., 2006 Yamaguchi et al., 2018
<i>Ty-4</i>	LA1932 / LA4440	<i>S. chilense</i>	Unknown	Ch. 3	Ji et al., 2009
<i>ty-5</i>	TY172	<i>S. peruvianum</i>	<i>Pelota</i>	Ch. 4	Anbinder et al., 2009
<i>Ty-6</i>	LA2779 / LA1938	<i>S. chilense</i>	Unknown	Ch. 10	Hutton & Scott, 2014

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료

(1) 본 연구에 사용된 토마토는 38여개의 시판품종 및 육성계통이며, 토마토유전자원센터 ‘TGRC (Tomato Genetics Resource Center, USA.)’와 ‘AVRDC (The World Vegetable Center, Taiwan)’, 농업연구기구 ‘Volcani Center(이스라엘)’에서 다양한 TYLCV 저항성 유전자원을 분양받았음. *Ty-2* 저항성 유전자 기반 분자마커 제작을 위해 사용된 유전자원으로는 LA0386, LA1777 이 되겠으며 *Ty-4* 후보 유전자 기반 저항성 판별용 분자마커 개발에는 LA1932, LA2779, LA4440 이 사용되었음. *ty-5* 저항성 유전자 기반 분자마커 제작을 위해 사용된 유전자원으로는 TY172 가 사용되었음. TYLCV 이병성 유전자원으로는 ‘TGRC’ 에서 분양 받은 M82, E6203, Ailsa Craig, Hawaii7998, Heinz 1706, LA1589, Black Cherry, Money Maker 가 사용되었으며 TYLCV 복합 저항성에 따른 병징 평가를 위해 ‘AVRDC’에서 분양받은 12AVT-2, 12AVT-4, 12AVT-5, 12AVT-7, 12AVT-9, 12AVT-10, 12AVT-17, 12AVT-19 가 사용되었음. 시판품종에서 *Ty-1/3* 저항성을 보유하고 있는 ‘Benekia220 (Bunong seed, Korea)’, ‘TYEndolphin (Bunong seed, Korea)’, ‘Dafnis (Syngenta, Swiss)’. ‘Dotaerang TY Winner (Takii seed, Korea)’, ‘TitiChal (Nongwoo bio, Korea)’, ‘TYAltorang (Nongwoo bio, Korea)’, ‘TYSenseQ (Nongwoo bio, Korea)’ 사용되었음. 시판품종에서 *Ty-2* 저항성을 보유하고 있는 ‘Oyama (Sakata seed, Korea)’ 가 사용되었음. 시판품종에서 TYLCV 이병성 품종으로는 ‘Miniheuksu (Asia seed, Korea)’, ‘Shinchunggang (Farm Hannong, Korea)’, ‘Super Dotaerang (Koregon, Korea)’, ‘Dotaerang Red (Sakata seed, Korea)’, ‘B Blocking (Takii seed, Korea)’, ‘Dotaerang Dia

(Takii seed, Korea)' 가 사용되어 TYLCV 저항성 유전자 분포에 따른 병징 평가를 실시하였음(표 3-2).

나. genomic DNA 추출

- (1) DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였음 (Kang et al, 2001). 토마토의 어린 잎 조직을 glass bead(6mm) 를 이용하여 마쇄하였음. 613 μ L DNA extraction buffer (DNA extraction buffer, β -mercaptoethanol, L-ascorbic acid) 를 넣고 5분 간격으로 흔들며 주며 65 $^{\circ}$ C에서 15분 처리 후, 200 μ L chloroform 을 넣고 vortexing 처리하여 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였음. 상층액 500 μ L 를 채취하여 1.5 μ L tube 로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었음. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였음. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 30 μ L RNase water에 5분간 녹여주었음.

표 3-2, TYLCV 병징 평가에 사용된 토마토 계통 리스트

No.	Plant Information			
	Name	Type	Species	Source
1	M82		<i>S. lycopersicum</i>	
2	Ailsa Craig		<i>S. lycopersicum</i>	
3	E6203		<i>S. lycopersicum</i>	
4	Hawaii7998		<i>S. lycopersicum</i>	
5	Heinz 1706		<i>S. lycopersicum</i>	
6	LA1589		<i>S. pimpinellifolium</i>	
7	Black Cherry		<i>S. lycopersicum</i>	
8	Money Maker	Accession	<i>S. lycopersicum</i>	TGRC
9	LA0386		<i>S. habrochaites</i>	
10	LA1589		<i>S. pimpinellifolium</i>	
11	LA1777		<i>S. habrochaites</i>	
12	LA1932		<i>S. chilense</i>	
13	LA2779		<i>S. chilense</i>	
14	LA3473		<i>S. lycopersicum</i>	
15	LA4440		<i>S. chilense</i>	
16	TY172		<i>S. peruvianum</i>	Volcani center
17	12AVT-2		<i>S. lycopersicum</i>	
18	12AVT-4		<i>S. lycopersicum</i>	
19	12AVT-5		<i>S. lycopersicum</i>	
20	12AVT-7	Accession	<i>S. lycopersicum</i>	AVRDC
21	12AVT-9		<i>S. lycopersicum</i>	
22	12AVT-10		<i>S. lycopersicum</i>	
23	12AVT-17		<i>S. lycopersicum</i>	
24	12AVT-19		<i>S. lycopersicum</i>	
25	Miniheuksu		<i>S. lycopersicum</i>	Asia seed
26	Benekia220		<i>S. lycopersicum</i>	Bunong seed
27	TYEndolphin		<i>S. lycopersicum</i>	Bunong seed
28	Shinchunggang		<i>S. lycopersicum</i>	Farm Hannong
29	Super Dotaerang		<i>S. lycopersicum</i>	Koregon
30	TitiChal		<i>S. lycopersicum</i>	Nongwoo bio
31	TYAltorang	Commercial	<i>S. lycopersicum</i>	Nongwoo bio
32	TYSenseQ	cultivar	<i>S. lycopersicum</i>	Nongwoo bio
33	Dotaerang Red		<i>S. lycopersicum</i>	Sakata seed
34	Oyama		<i>S. lycopersicum</i>	Sakata seed
35	Dafnis		<i>S. lycopersicum</i>	Syngenta
36	B Blocking		<i>S. lycopersicum</i>	Takii seed
37	Dotaerang Dia		<i>S. lycopersicum</i>	Takii seed
38	Dotaerang TY Winner		<i>S. lycopersicum</i>	Takii seed

다. *Ty-1/3, Ty-2, Ty-4, ty-5* 저항성 분자마커 분석

(1) TYLCV 저항성 유전자원에 대한 *Ty-1/3, Ty-2, Ty-4, ty-5* 저항성 유전자 조성 분석을 하기 위해 *Ty-1/3* 저항성은 기존에 개발된 분자표지를 사용하였으며, *Ty-2, Ty-4, ty-5* 저항성은 본 연구에서 개발한 분자표지를 사용하였다(표 3-3).

라. *Ty-2, Ty-4, ty-5* 저항성 분자마커 제작 및 적용

(1) *Ty-2* 저항성 유전자 *TYNBS1* 은 *Nucleotide-binding domain and a leucine-rich repeat-containing (NB-LRR)* 을 암호화하고 있는 것으로 보고되어 있음(Yamaguchi et al, 2018). sol genomics network blast (Solyc11g069660)의

정보를 활용하여 1개 set 의 primer 를 제작하였음. 유전자 내 3bp, 138bp 의 insertion 을 활용하여 738bp 크기의 insertion or deletion (indel) 마커 20IY10 을 제작하였음(표 3-3). PCR 용액 조성은 1 μ L gDNA 300 ng, 2.5 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.5 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 1 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (20IY10 F, R) 으로 조성되었음. PCR 은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰음. 전기영동은 EtBr 이 포함된 1.6% agarose gel 에서 실시하였음.

- (2) *Ty-4* 유전자는 Ji et al, 2009 논문 에 게시된 550 kb 지역안에 65개 유전자 중 *Serin/threonine protein phosphatase* 유전자와 *Myb-like protein* 유전자의 염기 서열 정보를 sol genomics network blast (Solyc03g019800, Solyc03g019900) 를 활용하여 2개 sets 의 primer 를 제작하였음. *Serin/threonine protein phosphatase* 유전자 내 304 bp 크기의 derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) 마커 18IY23 와 *Myb-like protein* 유전자 내 228 bp 의 indel 마커 18IY13을 제작하였음(표 3-3). PCR 용액 조성은 1 μ L gDNA 300 ng, 2.5 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.5 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 1 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (18IY23 and 18IY13 F, R) 으로 조성되었음. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰음. 제한효소 처리는 5 μ L PCR 산물에, 1 μ L *StuI* 제한효소, 0.1 μ L buffer (NEB, England), 3.9 μ L ddH₂O, 을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 처리하였음. 전기영동은 EtBr 이 포함된 1.6% agarose gel 에서 실시하였음.
- (3) 열성유전자인 *ty-5* 는 *Pelota* 로 재배종인 TY172 에 도입되어있음. sol genomics network blast (Solyc04g009810.2)의 정보를 활용하여 1개 set 의 primer 를 제작 하였음. *Pelota* 유전자 내 300 bp 크기의 derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) 마커 14IY5 를 제작하였음(표 3-3). PCR 용액 조성은 1 μ L gDNA 300 ng, 2.5 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.5 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 1 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (14IY5 F, R) 으로 조성되었음. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰음. 제한효소 처리는 5 μ L PCR 산물에, 1 μ L *RsaI* 제한효소, 0.1 μ L buffer (NEB, England), 3.9 μ L ddH₂O, 을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 처리하였음. 전기영동은 EtBr 이 포함된 1.6% agarose gel 에서 실시하였음.

표 3-3, TYLCV 저항성 유전자 유래 분자마커 list

Locus	Primer Name		Sequence (5'-3')	Annealing Temp (°C)	Product Size (bp)	Type (Enzyme)	Reference
Ty-1/3	14IY218	F	ATG AAG ACA AAA ACT GCT TC	55	R : 383, 226 S : 609	CAPS (<i>SspI</i>)	Jung et al., 2015
		R	TCA GGG TTT CAC TTC TAT GAA T				
Ty-2	20IY10	F	GTT CTA TCA CAA GAC TTG CCA	55	R : 738 S : 600	Indel	In this assay
		R	TGC ATT CAC CAT TGA TGT ATA AGA				
Ty-4	18IY23	F	AGA AGA AAT CCA AGA AAA GCA ATA	55	R : 304 S : 269, 35	dCAPS (<i>StuI</i>)	In this assay
		R	AGA ATG AGG CC CTT GTA ATC ACG TCC ACA ACG				
	18IY13	F	CTT CTG TTC TAT GCA GGT GTG	55	R : 228 S : 200	Indel	
		R	GGA TAC AAC TGT CAA CGC AC				
ty-5	14IY5	F	TTC AAG TCC TTC TTC AAC	55	R : 300 S : 260, 40	dCAPS (<i>RsaI</i>)	In this assay
		R	ATA GAT TTA AAC AAC AAT TAT AGA GAT AAA AAA GTT ACC TGT				

마. TYLCV 접종 및 병 검정 방법

(1) TYLCV 접종은 자연 발생과 인공 접종 두가지 방법으로 진행하였음. TYLCV 자연 발생은 매개충인 담배가루이를 통해 TYLCV 를 발생시켰음. 과종 후 5주가 지난 토마토 사용하였음. 경북대학교의 실험실습장 노지에 18개의 토마토를 각각 3개씩 정식하였으며 정식 위치는 랜덤하게 배치하여 약 42일동안 관찰하였음. TYLCV 인공 접종은 *Agrobacterium tumefaciens* 분리주 GV3101 을 pCAMBIA3301-TYLCV 로 형질전환된 것을 사용하였음(성균관대학교, 이석찬교수 분양). TYLCV infectious clone 을 Kanamycin 50 µg·mL⁻¹, Rifampicin 100 µg·mL⁻¹ 을 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배지에서 28 °C, 200 rpm 진동항온기에서 48시간 배양하여 OD₆₀₀값을 0.5로 조정 한 후 pin-prick 방법을 통하여 접종하였음. 토마토의 정단부를 insect pin 1호를 사용하여 반복적으로 5~10회 찔러 미세한 상처낸 후, 이에 배양액을 100 µL 흡수 시키는 방법으로 접종을 진행하였음. 과종 후 5주가 지난 32개의 토마토에 TYLCV 인공 접종을 실시하였으며 식물생장상에 온도 28 °C, 습도 70% 에 주야시간 16/8 시간으로 설정하여 약 5주간 관찰하였음.

(2) TYLCV 검증 방법으로는 Phenotype 과 Genotype 을 통하여 실시하였음. Phenotype 검정은 TYLCV 의 병징을 관찰한 것으로 TYLCV 자연 발생 은 42일차에 Phenotype 평가를 실시하였으며, TYLCV 인공 접종은 5주차에 Phenotype 평가를 실시하였음. 평가 시 신초를 기준으로 잎의 말림 정도와 색의 변화를 관찰하였고, TYLCV 자연 발생은 증상 등급을 0부터 3까지 4단계로 구분하였음. 0단계(증상 없음), 1단계(가벼운 증상, 잎의 색 변화 없음), 2단계(가벼운 위축, 잎의 가벼운 색 변화), 3단계(심한 위축, 잎의 색 변화)으로 평가를 하였음. 0단계, 1단계는 저항성 토마토로 평가하였으며 2단계, 3단계는 이병성 토마토로 평가하였음(그림 3-8A, 3-9A).

(3) Genotype 검정은 quantitative real-time PCR (qPCR) 방법을 사용하였음. Forward primer 는 TYLCV-IS 1678F, Reverse primer 는 TYLCV-CONS 1756R 을 사용하였음(Powell et al, 2012). DNA 는 50 ng/µL 로 희석하여 사용하였음. qPCR 을 진행하기 위해 Power SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham,MA, USA) 를 사용하였으며 Bio-Rad CFX connect (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 의 기계에 three-step protocol 을 통하여 진행하

였음. TYLCV DNA 의 양은 delta-delta Ct method 를 사용하여 계산되었음.

3. 내용 및 결과

가. *Ty-2*, *Ty-4* 및 *ty-5* 저항성에 대한 유전자 특이적 마커 개발

(1) 확인된 6개의 TYLCV 저항성 유전자 좌(*Ty-1* ~ *Ty-6*) 중 *Ty-2*, *Ty-4* 및 *ty-5* 저항성에 대한 분자마커가 개발되어 본 연구에서 활용되었음. 11번 염색체와 4번 염색체에 위치한 *Ty-2* 와 *ty-5* 저항성 유전자 염기서열을 기반으로 하여 분자마커의 개발이 가능하도록 하였음. *Ty-4* 의 경우 3번 염색체의 550 kb 내에 위치한 후보 유전자에 집중하여 연관분자마커를 제작했음(그림 3-1).

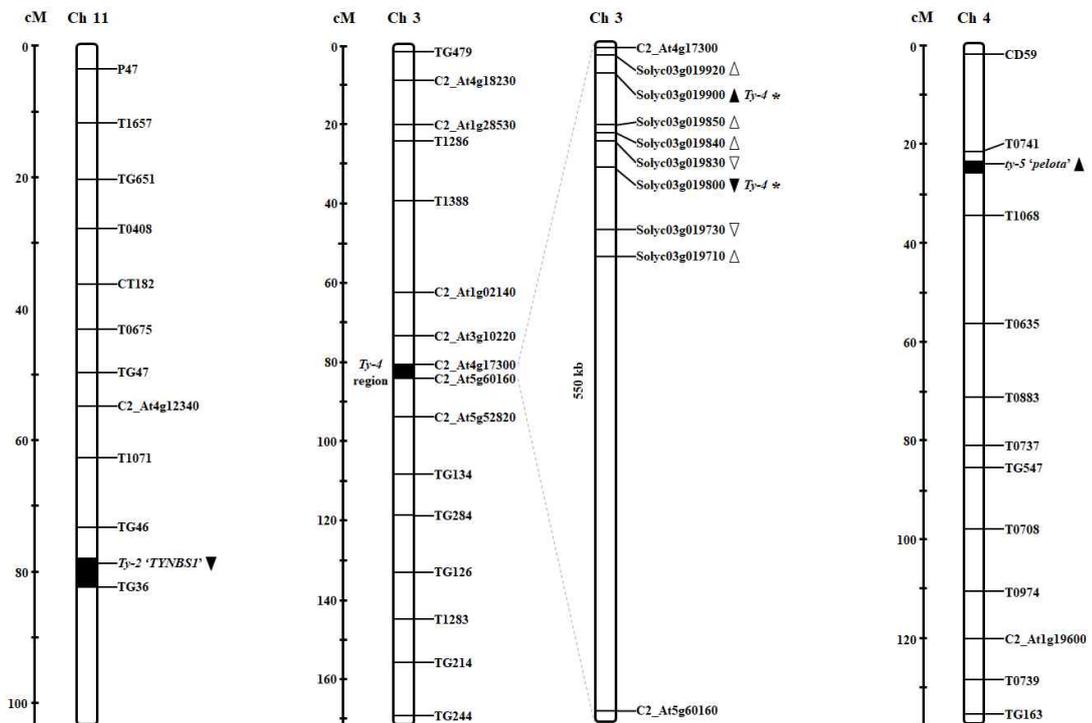


그림 3-1. 토마토 염색체 내 *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* genetic map

(2) *TYNBS1* 이라고 알려진 *Ty-2* 유전자는 *Nucleotide-binding domain and a leucine-rich repeat-containing (NB-LRR)* 을 암호화하는 것으로 보고됨 (Yamaguchi et al, 2018). *TYNBS1* 은 Solyc11g069660 의 upstream 위치에 있다고 보고됨. *Ty-2* 유전자에서 이병성 및 저항성 대립유전자의 염기서열을 비교분석 하였을 때 47개의 single nucleotide polymorphisms (SNPs) 와 2개의 insertions 을 확인했음. Insertion or deletion (indel) 마커는 유전자 지역 내의 3 bp, 138 bp insertions 을 기반으로 개발되었음(그림 3-2).

(3) *Ty-4* 저항성 유전자는 3번 염색체 C2_At4g17300 와 C2_At5g60160 의 사이 550 kb 영역에 존재하는 것으로 보고됨(Ji et al, 2009). *Ty-4* 저항성에 대한 효율적인 분자마커를 제작하기 위해 본 연구에서는 550 kb 영역의 질병, 저항성 관련 유전자

인 Solyc03g019710, Solyc03g019730, Solyc03g019800, Solyc03g019830, Solyc03g019840, Solyc03g019850, Solyc03g019900, Solyc03g019920 8개 유전자에 초점을 맞춤. 그 중 Solyc03g019800, Solyc03g019900 2개의 유전자에서 연관분자마커를 개발하였음. Solyc03g019800 유전자에서 이병성 및 저항성 대립유전자의 염기서열을 비교분석 하였을 때 10개의 SNPs를 확인하였음(그림 3-3). 확인된 SNPs 중 1번 엑손의 79 에 위치한 SNP (T/A) 를 기반으로하여 derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) 분자마커를 개발하였음(그림 3-4A). Solyc03g019900 유전자에서 이병성 및 저항성 대립유전자의 염기서열을 비교분석 하였을 때 13개의 SNPs, 2개의 insrtion 과 1개의 deletion 을 확인하였음. 9번 인트론의 4503에 위치한 28 bp 의 deletion을 기반으로 indel 분자마커를 개발하였음(그림 3-4B).



그림 3-2. *Ty-2* (*TYNBS1*) 유전자 기반 분자마커 개발을 위한 indel 정보 표시 및 유전자 구조 모식도

(4) 열성유전자인 *ty-5* 는 *S. peruvianum* 이 introgression 되어있는 재배종 TY172 에서 유래되었음. Messenger RNA surveillance factor 인 *Pelota* 를 암호화하고 있음(Lapidot et al, 2015). *Pelota* 전자에서 이병성 및 저항성 대립유전자의 염기서열을 비교분석 하였고 그 중 1번 엑손의 47에 위치한 SNP (T/G) 를 기반으로하여 derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) 분자마커를 개발하

였음(그림 3-5).

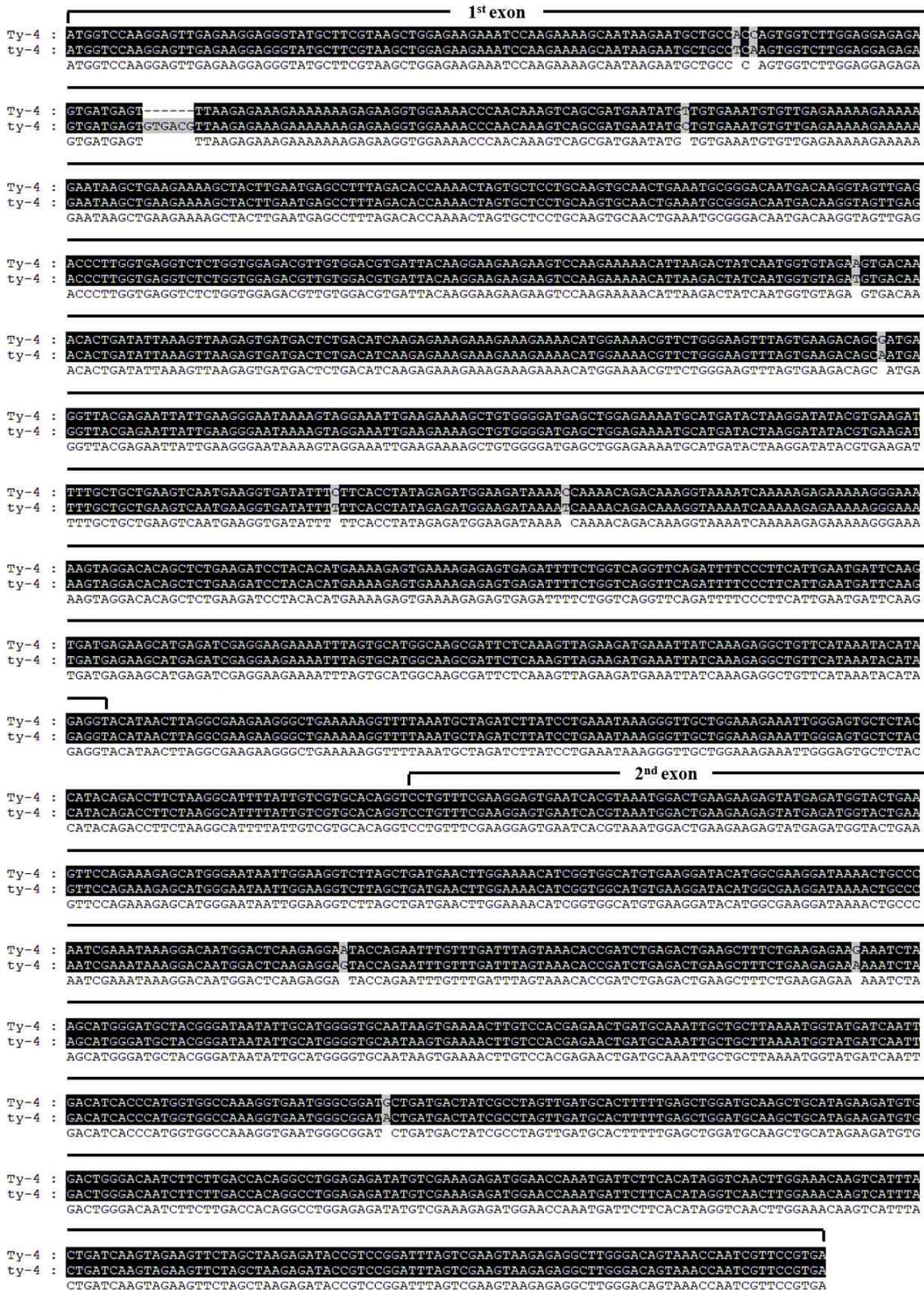


그림 3-3. Solyc11g019800 의 이병성 및 저항성 대립유전자 염기서열 비교

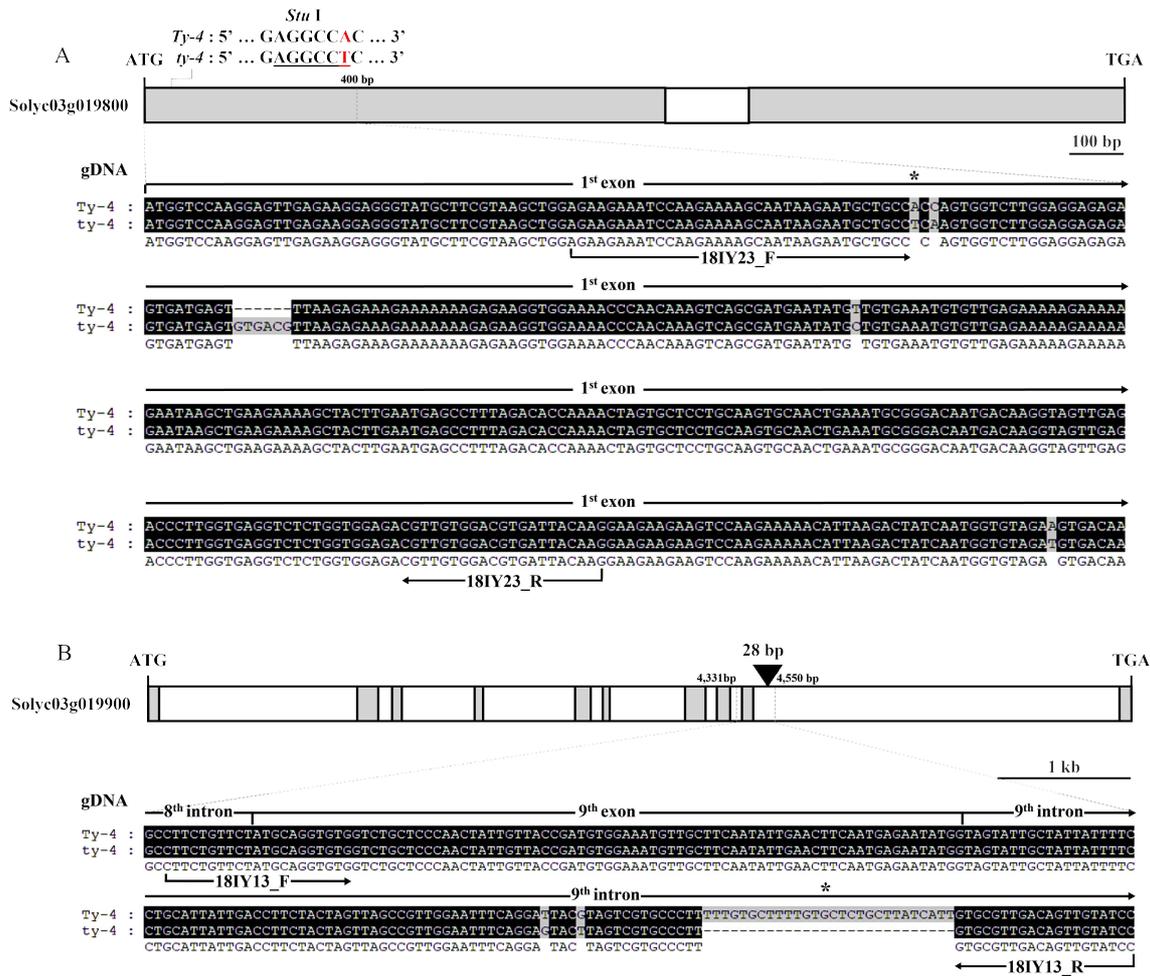


그림 3-4. *Ty-4* 유전자 기반 연관분자마커 개발을 위한 SNPs, indel 정보 표시 및 유전자 구조 모식도

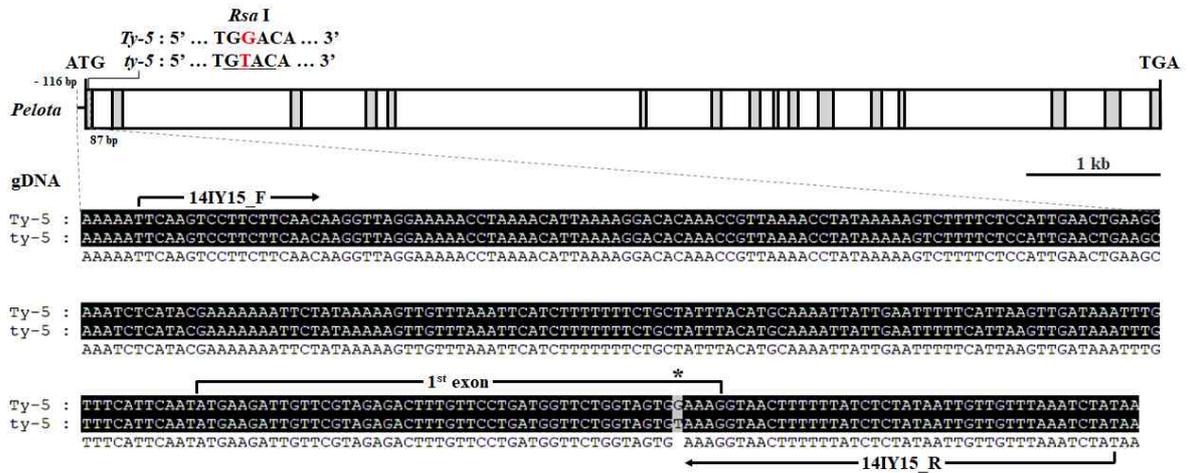


그림 3-5. *ty-5* 유전자 기반 분자마커 개발을 위한 SNP 정보 표시 및 유전자 구조 모식도

(5) 본 연구에서 개발된 분자마커가 이미 밝혀진 TYLCV 저항성 유전자원에 적용 가능한지 평가를 진행하였음. *Ty-2* 저항성 유전자 기반 분자마커 제작을 위해 사용된 유전자원으로는 LA0386, LA1777 이 되겠으며 *Ty-2* 저항성 유전자를 가진 유전자원만 특이적으로 판별할 수 있었음(그림 3-6A). *Ty-4* 후보 유전자 기반 저항성 판별용 분자마커 개발에는 LA1932, LA2779, LA4440 이 사용되었으며 2개의 분자마커 모두 *Ty-4* 저항성 유전자를 가진 유전자원만 특이적으로 판별할 수 있었음(그림 3-6B). *ty-5* 저항성 유전자 기반 분자마커 제작을 위해 사용된 유전자원으로는 TY172 가 사용되었으며 *ty-5* 저항성 유전자를 가진 유전자원만 특이적으로 판별할 수 있었음(그림 3-6C).

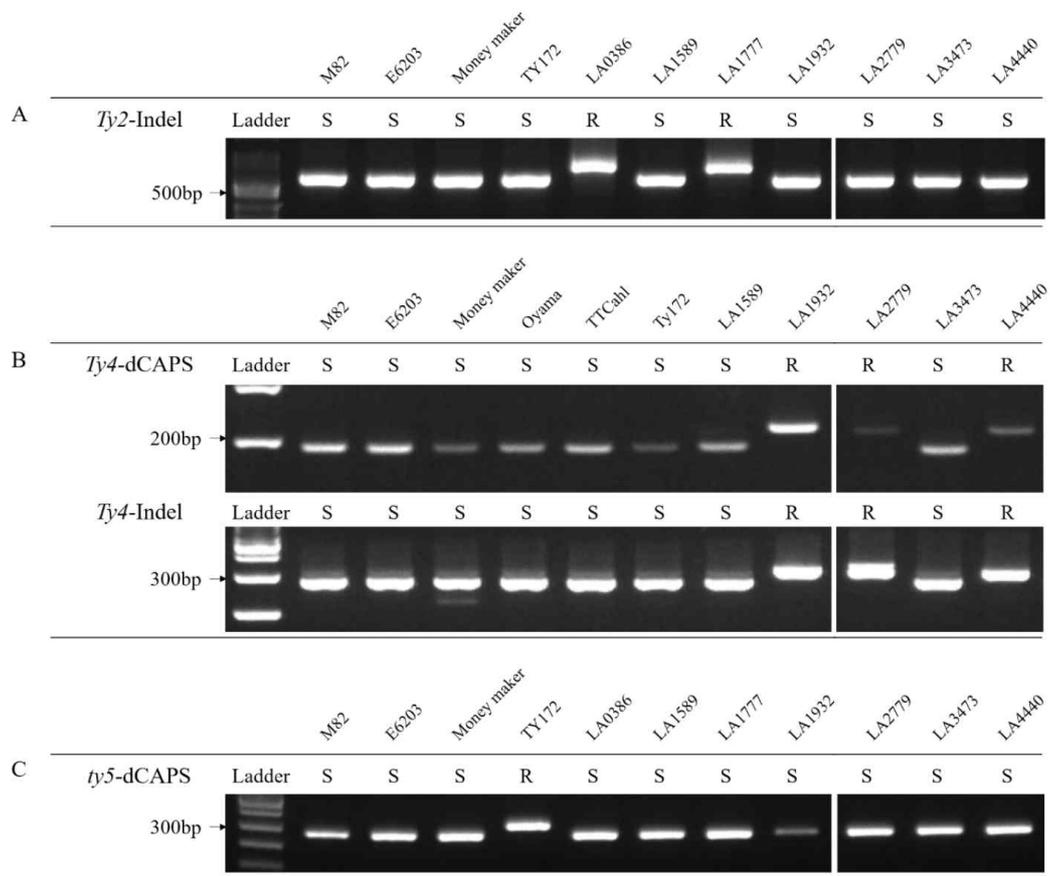


그림 3-6. 본 연구에서 개발된 TYLCV 저항성 유전자 특이적 분자마커 적용

나. TYLCV 저항성 유전자 기반 분자마커 응용

(1) 32개의 토마토에 TYLCV 저항성을 확인하기 위해 *Ty-1/3*, *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* 저항성 유전자 기반 분자마커를 적용하였음. TYLCV 이병성으로 예상되는 토마토에서는 TYLCV 저항성을 보유하고 있지 않았음. ‘AVRDC’에서 분양받은 토마토 중에서는 12AVT-17, 12AVT-19 를 제외한 나머지 토마토에서는 *Ty-1/3*, *Ty-2* 저항성 유전자를 모두 보유하고 있었음. 종자회사에서 공개한 TYLCV 저항성을 보유하고 있는 시판품종에서는 *Ty-2* 저항성을 보유하고 있는 Oyama를 제외하고 *Ty-1/3* 저항성에 대하여 Hetero 하게 보유하고 있는 것으로 확인됨. *Ty-4* 후보 유전자 기반 2개의 연관분자마커에서는 *Ty-4* 저항성 유전자를 보유하고 있는 LA4440 을 식별하는데 효과적인 것이 확인됨. 열성저항성인 *ty-5* 저항성 유전자 기반 분자마커에서도 *ty-5* 저항성 유전자를 보유하고 있는 TY172 를 식별하는데 효과적인 것이 확인됨(그림 3-7).

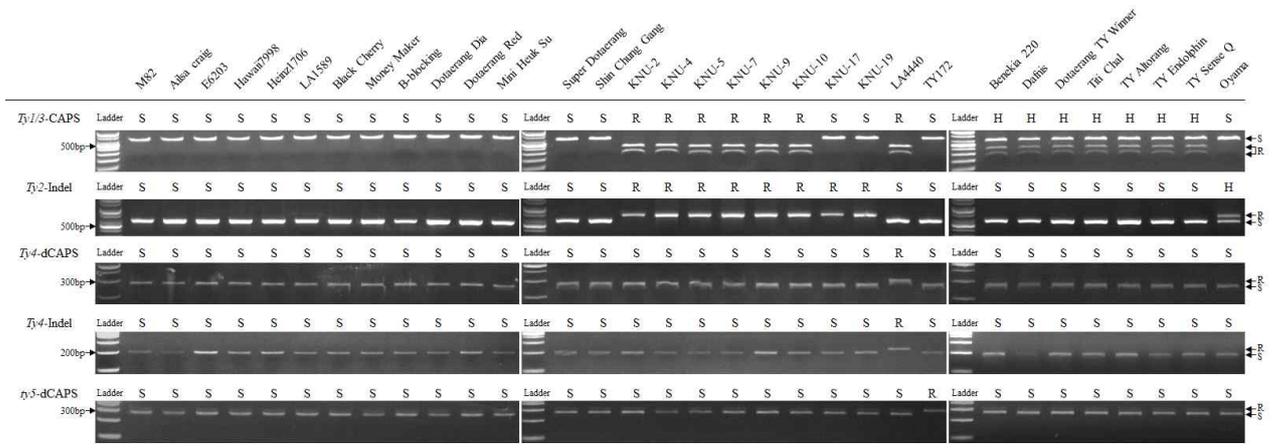


그림 3-7. 다양한 토마토에 TYLCV 저항성에 대한 유전자 특이적 분자마커 분석

다. TYLCV 자연 발생을 이용한 병징 평가

(1) 경북대학교 (Deagu, Korea) 의 실험실습장 노지에 TYLCV 자연 발생을 실시하였음. 이식 후 6주동안 Phenotype 을 관찰하고 평가하였음. TYLCV 자연 발생 후 병징 중증도는 0 ~ 3으로 범위를 정하여 평가하였음(그림 3-8A). TYLCV 자연 발생을 이용한 Phenotype 평가에 따르면 저항성 유전자를 보유하고 있는 것으로 확인된 토마토와 이병성 토마토가 명확하게 구별되는 것을 확인함(그림 3-8B). TYLCV DNA 양을 측정하기 위해 qPCR을 사용하여 바이러스의 상대적인 양을 검출하였음(그림 3-8C). 3개의 이병성 토마토인 M82, E6203, Hawaii7998 는 높은 수준의 TYLCV DNA 축적을 보여주었음. *Ty-1/3*, *Ty-2* 유전자를 하나 혹은 두 개 모두 Homozygous 하게 포함하는 저항성 토마토에서는 TYLCV DNA 가 가장 적은 양으로 검출되지 않은 것을 확인함. TY172 는 Phenotype 평가에서 TYLCV 에 강한 것으로 확인되고 있지만 Genotype 결과에서는 이병성 토마토와 비슷한 수준의 발현을 확인할 수 있었음(그림 3-8C). qPCR 에 의해 평가된 TYLCV DNA 의 양은 대부분의 경우 Phenotype 결과와 일치하는 것으로 밝혀짐. 이러한 결과는 TYLCV DNA 의 양이 이병성 유전자형과 저항성 유전자형을 명확하게 구별할 수 있음을 보여주고 있음.

라. TYLCV 인공 접종을 이용한 병징 평가

(1) Agro-mediated 를 사용하여 감염성 TYLCV 클론 접종을 하였으며 5주 후 TYLCV 병징 평가를 실시하였음. TYLCV 자연 발생에서 보였던 성장저하가 TYLCV 인공 접종에서는 관찰되지 않았음. TYLCV 인공 접종 후 병징 중증도는 0 ~ 3으로 범위를 정하여 평가하였음(그림 3-9A). 이병성 토마토와 저항성 토마토에서 Phenotype 결과가 차이가 나는 것을 확인함. 14개의 이병성 토마토에서는 대부분 중증도 2 혹은 3을 확인할 수 있었지만 Hawaii7998, LA1589 에서는 중증도 1을 확인할 수 있었음. 18개의 저항성 토마토에서는 중증도 0 혹은 1이 관찰되었음. 'AVRDC' 에서 분양받은 토마토 중에서는 바이러스 중증도 0으로 확인되었음. TYLCV 저항성 유전자를 Homozygous 하게 보유하고 있는 LA4440, TY172 는 통계적으로 유의한 차이는 없지만 비교적 약한 증상을 보였음. *Ty-1/3* 저항성 유전자를 Heterozygous 하게 보유하고 있는 시판품종에서는 대부분 TYLCV 에 저항을 보이고 있지만 일부 시판품종

에서는 약한 증상을 보였음. *Ty-2* 저항성을 보유하고 있는 Oyama 는 중증도 0으로 확인됨(그림 3-9B). qPCR 에 의해 평가된 TYLCV DNA 의 양은 대부분의 경우 Phenotype 결과와 일치하는 것으로 밝혀짐(그림 3-9C). 이러한 결과는 TYLCV DNA 의 양이 이병성 유전자형과 저항성 유전자형을 명확하게 구별할 수 있음을 보여주고 있음.

A



B



C

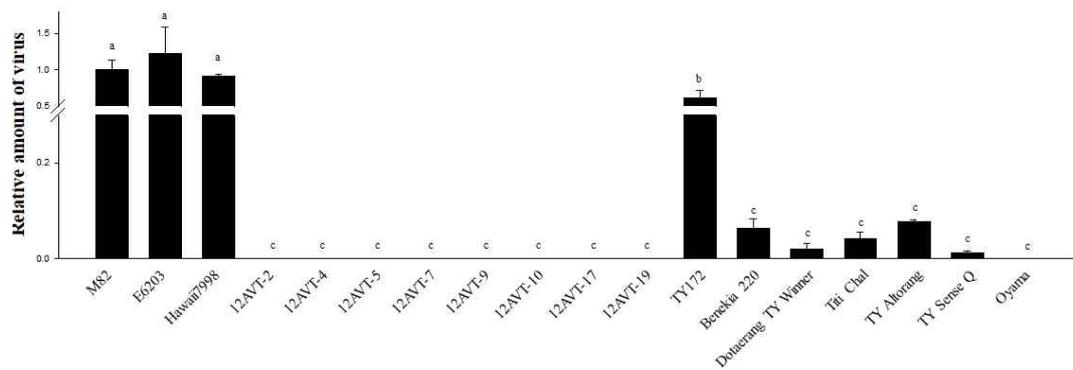


그림 3-8. TYLCV 자연 발생 후 Phenotype, Genotype 평가

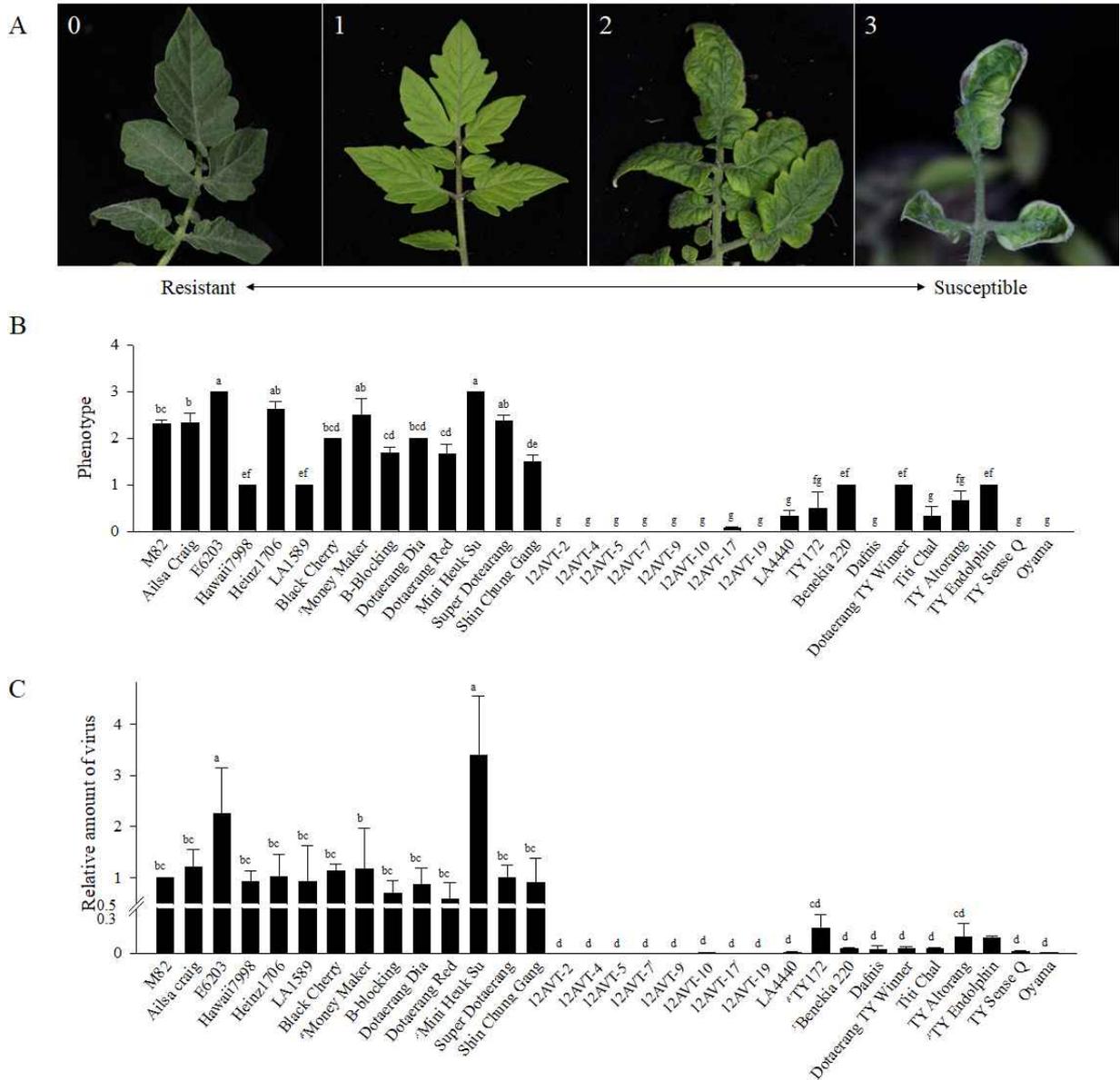


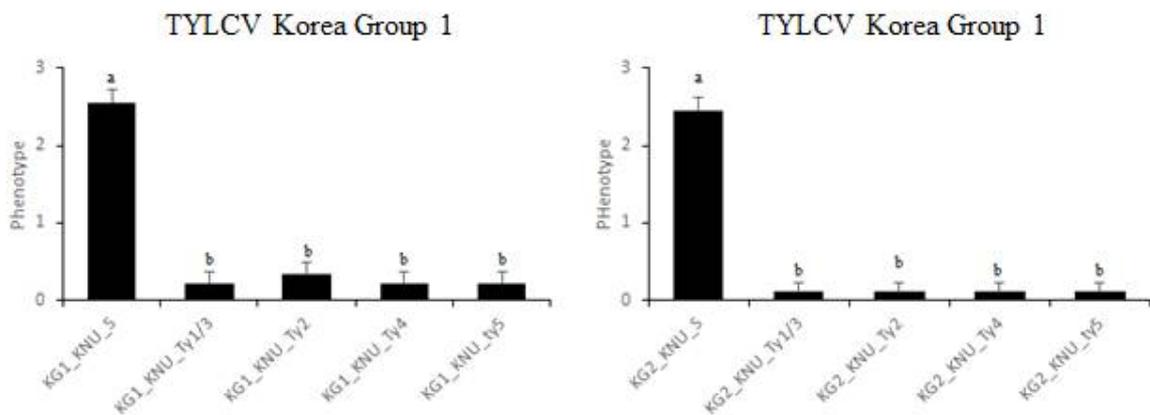
그림 3-9. TYLCV 인공 접종 후 Phenotype, Genotype 평가

마. TYLCV 저항성 유전자 구성과 TYLCV strain 에 따른 병 증상 확인

(1) TYLCV 는 1960년 중동지역에서 처음 보고된 이후로 현재는 미국, 남미, 유럽, 동남아, 일본, 중국 등 확산되어 있음(Czosnek et al, 1997), 우리나라에서는 2008년에 경남 통영 시설 재배 지역에서 처음 보고되었으며 현재는 전국적으로 확산되어 국가 관리 대상 바이러스로 지정되어 있음(Cho et al, 2008). 이처럼 전 세계적으로 확산되어있는 TYLCV 는 국가별로 다양한 TYLCV strain 을 가지고 있음. 최근 보고된 연구에 따르면 상업 육종에 많이 도입이 된 TYLCV 저항성 유전자 중 하나인 *Ty-2* 저항성은 TYLCV-Israel 에는 높은 수준의 저항을 가지고 있으나 TYLCV-Mild 에서는 TYLCV 에 감염된 증상이 확인되었음(X Shen et al, 2020). 이처럼 TYLCV 저항성 유전자를 보유하고 있더라도 모든 TYLCV 에 저항을 보이는 것이 아닌 다양한 TYLCV strain 에 따라 저항성이 무너지는 현상이 있음. 이에 본 연구에서는 6가지

TYLCV strain 을 *Ty-1/3*, *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* 저항성을 단일로 가지고 있는 토마토에 접종을 하여 병 증상을 관찰하였음.

- (2) 본 연구실에서는 TYLCV-Korea Group 1, TYLCV-Korea Group 2, TYLCV-Israel, TYLCV-Jordan, TYLCV-Spain, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* 6가지 TYLCV strain 을 보유하고 있으며 *Ty-1/3* 저항성을 가지고 있는 KNU-Ty1/3, *Ty-2* 저항성은 KNU-Ty2, *Ty-4* 저항성은 KNU-Ty4, *ty-5* 저항성은 KNU-ty5 토마토를 사용하였으며 이병성 토마토는 KNU-S 를 사용하였음.
- (3) 이병성 토마토 KNU-S 에서는 모든 TYLCV strain 에서 Phenotype 과 Genotype 모두 높은 수준의 병 증상과 TYLCV DNA 축적을 확인할 수 있었음(그림 3-10)(그림 3-11). *Ty-1/3*, *Ty-4*, *ty-5* 저항성을 보유하고 있는 KNU-Ty1/3, KNU-Ty4, KNU-ty5 는 Phenotype 에서 중증도 0 ~ 1 으로 병 증상이 보이지 않았으며(그림 3-10) Genotype 은 모든 TYLCV strain 에서 TYLCV DNA 가 낮은 수준으로 측정되었음(그림 3-11). *Ty-2* 저항성을 가지고 있는 KNU-Ty2 는 TYLCV-Korea Group 1, TYLCV-Korea Group 2, TYLCV-Israel, TYLCV-Spain, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* 에서 *Ty-1/3*, *Ty-4*, *ty-5* 저항성을 보유하고 있는 토마토와 같이 Phenotype 과 Genotype 에서 높은 수준의 저항성을 보여주고 있지만 TYLCV-Jordan 에서는 Phenotype 에서 중증도 1 으로 다른 TYLCV 저항성보다 높은 것을 확인할 수 있었으며(그림 3-10) Genotype 에서도 TYLCV DNA 축적이 더 높은 것을 확인할 수 있었음(그림 3-11). Phenotype 에서 중증도 1 은 저항성에 포함 되어 있지만 다른 TYLCV strain 에 비해 약한 저항성을 가지고 있는 것으로 확인됨.



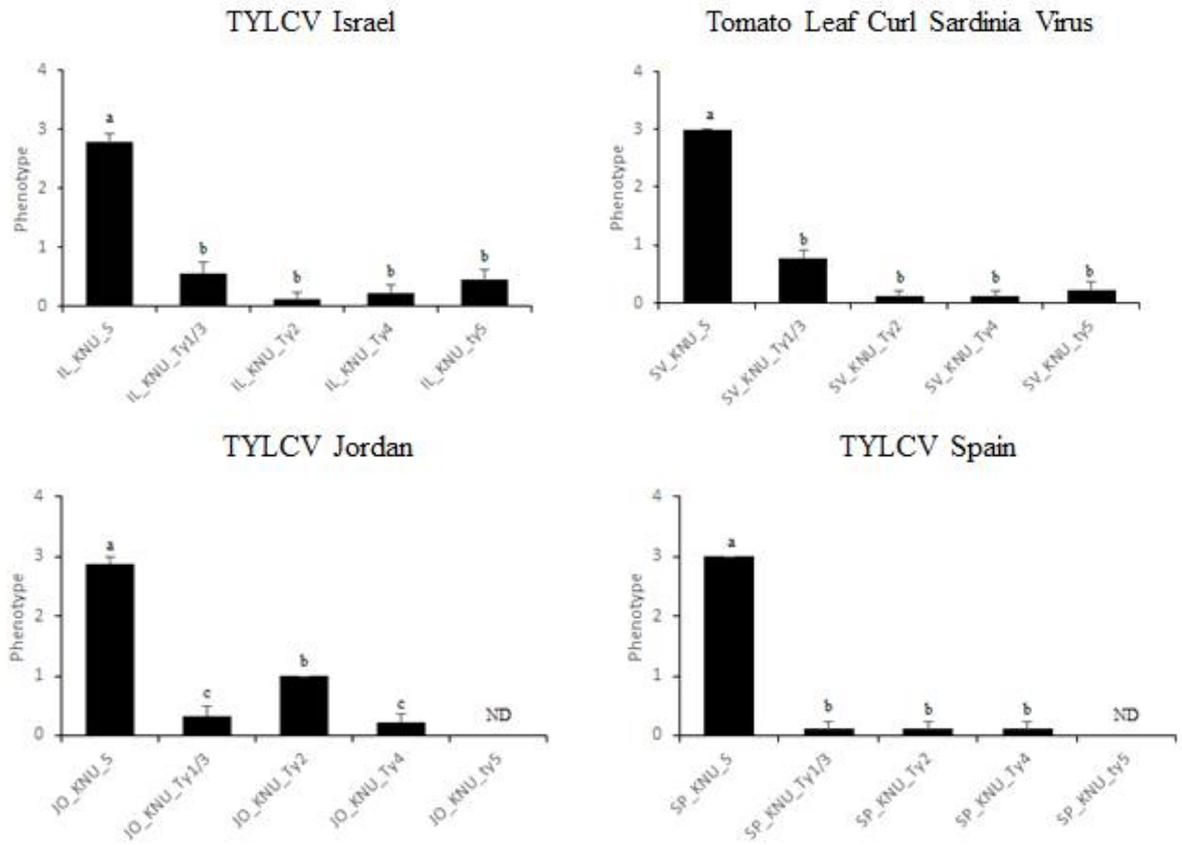
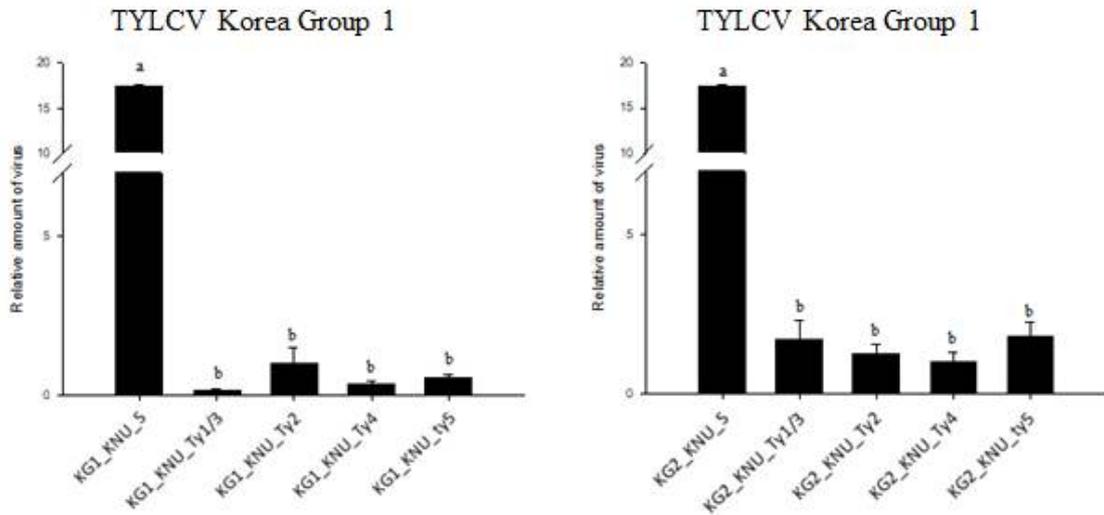


그림 3-10. TYLCV 저항성 유전자 구성과 TYLCV strain 에 따른 표현형 비교



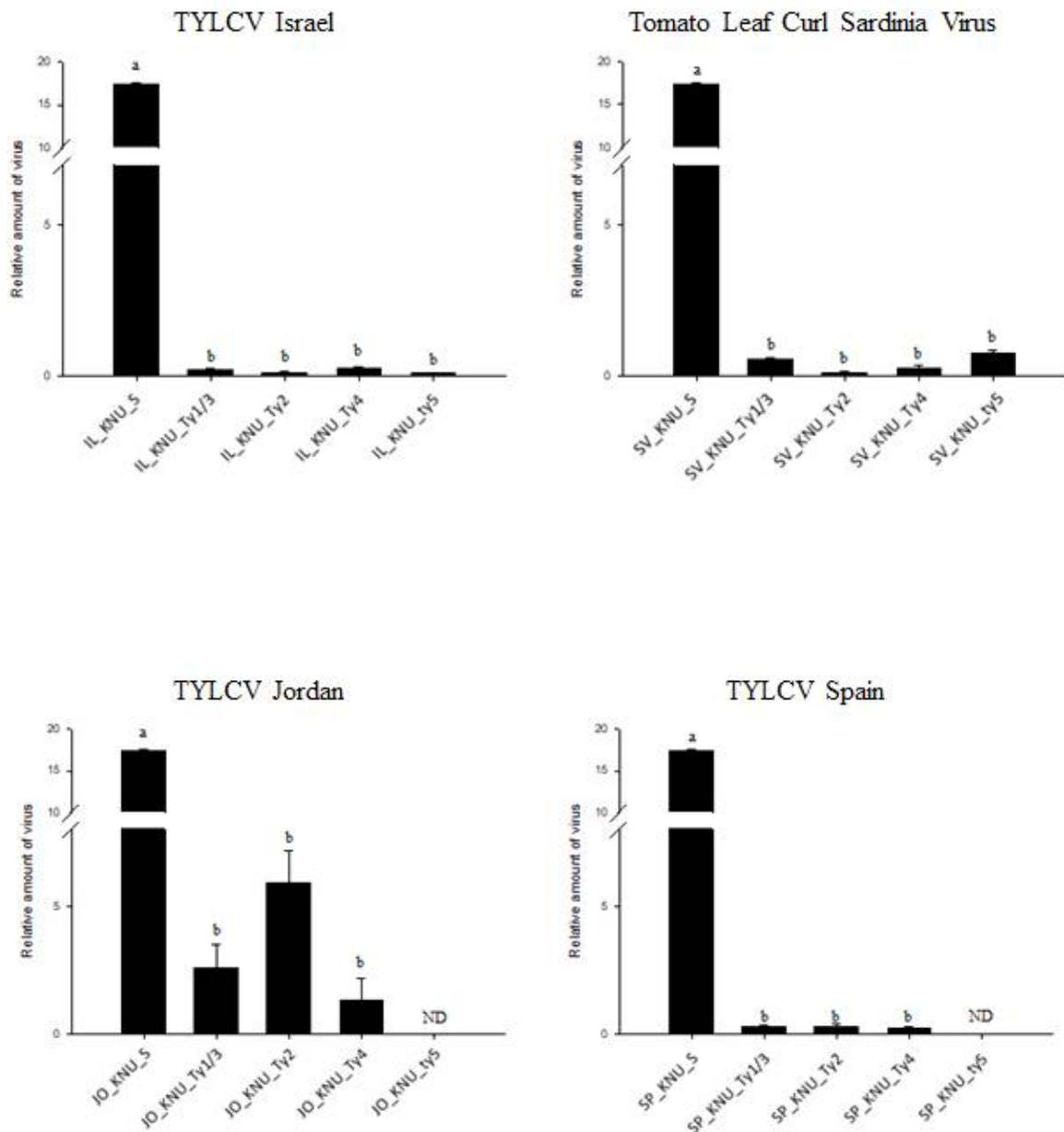


그림 3-11. TYLCV 저항성 유전자 구성과 TYLCV strain 에 따른 qRT=PCR 을 통한 바이러스 비교

바. TYLCV 저항성 유전자 피라미딩에 따른 TYLCV 증상 확인

(1) TYLCV 저항성 유전자를 단일로 보유하고 있을 때 TYLCV-Jordan 에서 *Ty-2* 저항성 유전자를 보유하고 있는 토마토가 Phenotype, Genotype에서 다른 저항성 유전자에 비해 높은 수치를 확인할 수 있었음. 이에 본 연구실에서 보유하고 있는 TYLCV 복합 저항성을 가지고 있는 토마토 KNU-Ty1/3,Ty2 와 KNU-Ty1/3,Ty4 를 교배하여 KNU-Ty1/3,Ty2,Ty4 3개 저항성이 피라미딩 된 토마토를 확보하였으며 TYLCV 저항성 유전자 3개, 2개 1개의 구성에 따른 TYLCV 병 증상을 확인하였음(그림 3-12).

(2) TYLCV 저항성 유전자 피라미딩에 따른 TYLCV 증상을 확인하기 위해 경북대학교

실험실습장에서 TYLCV 자연 발생과 연구실에서 보유하고 있는 TYLCV-Israel strain 의 인공 접종을 통한 방법으로 TYLCV 증상을 확인하였음. TYLCV 자연 발생과 TYLCV 인공 접종에서 모두 TYLCV S 토마토는 Phenotype 에서 중증도 4 로 확실한 병 증상을 보여주었으며 TYLCV 저항성 유전자를 3개, 2개 보유하고 있는 토마토에서는 중증도 1 로 TYLCV 에 강한 저항성을 보였음. TYLCV 저항성 유전자를 1개 가지고 있는 토마토에서는 *Ty-1/3*, *Ty-2*, *Ty-4* 순서로 점차 증가하는 양상을 보였지만 TYLCV 에 강한 저항성을 보였음(그림 3-13). Genotype 에서 TYLCV S 토마토는 TYLCV 저항성 유전자를 보유하고 있는 토마토에 비해 많은 양의 TYLCV 가 축적되어 있었으며 TYLCV 저항성 유전자를 3개, 2개 보유하고 있는 토마토는 TYLCV 발현이 가장 낮은 것을 확인할 수 있었음. TYLCV 저항성 유전자를 1개 보유하고 있는 토마토에서는 *Ty-1/3*, *Ty-2*, *Ty-4* 순서로 점차 증가하는 양상을 보였으며 그 중 *Ty-4* 저항성 토마토가 가장 많은 양의 TYLCV 발현이 확인되었음(그림 3-14). TYLCV 자연 발생과 인공 접종에서 비슷한 양상의 결과를 확인할 수 있었으며 TYLCV 저항성 유전자를 1개 가지고 있는 토마토와 2개, 3개 가지고 있는 토마토를 비교해 보았을 때 Phenotype 에서는 큰 차이를 보이지 않았지만 Genotype 에서는 차이를 확인할 수 있었으며 이는 TYLCV 저항성 유전자 피라미딩의 효과를 확인할 수 있었음.

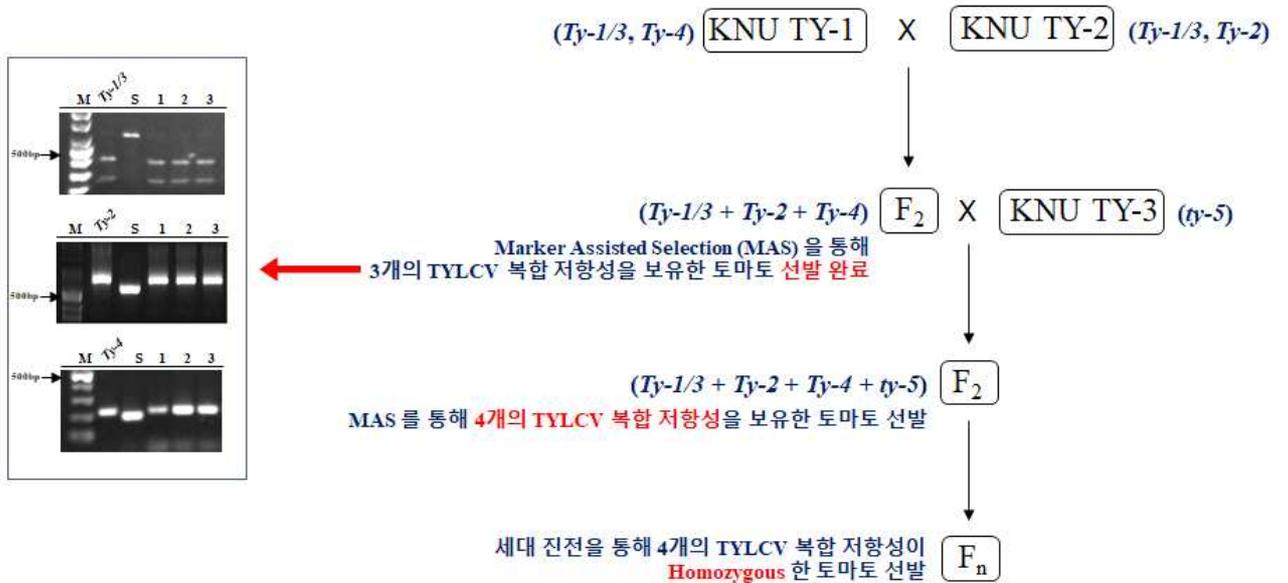


그림 3-12. TYLCV 저항성 유전자 피라미딩 모식도

TYLCV 자연 발생

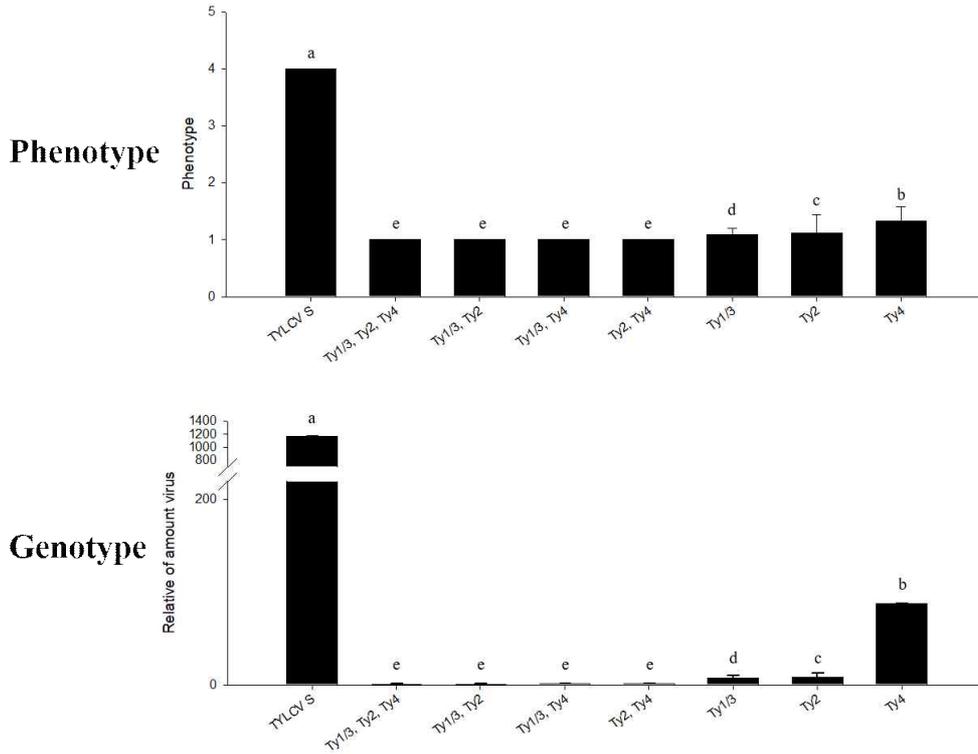


그림 3-13. TYLCV 자연 발생 후 TYLCV 저항성 유전자 피라미딩에 따른 Phenotype과 Genotype 확인

TYLCV 인공 접종

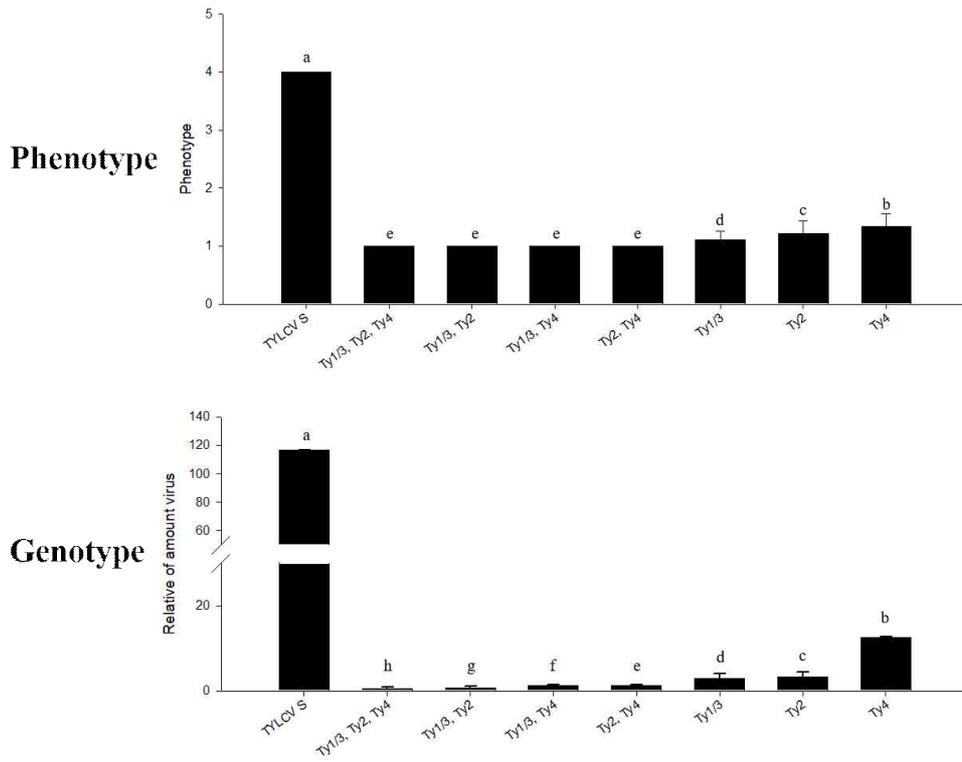


그림 3-14. TYLCV 인공 접종 후 TYLCV 저항성 유전자 피라미딩에 따른 Phenotype과 Genotype 확인

제 11 절. 토마토퇴록바이러스(ToCV) 접종법 확립 및 저항성 유전 자원선발

1. 연구수행 내용

가. ToCV 저항성 유전자원 탐색

(1) 토마토퇴록바이러스(ToCV)는 *Closteroviridae*과 *Crinivirus* 속에 속하는 RNA 바이러스로 RNA1 과 RNA2 2개의 positive-sense single-stranded RNA를 가지는 식물바이러스로 알려짐. 1996년 미국에서부터 발생하여 현재는 전 세계적으로 발생되고 있으며 국내에서는 2013년 전북 익산에서 처음 보고되었음(Fiallo Olivé & Navas Castillo, 2019). 바이러스에 감염된 식물은 하단부 잎에 퇴록 현상이 발생하게 되며 약 5 - 6주 후 식물 전체로 퍼짐. 감염된 식물은 광합성 장애로 인한 식물 생장 저하가 일어나게 되며 그로 인해 수확물에 영향을 미칠 수 있음(그림 4-1). 또한 ToCV는 25개 식물군과 85개의 쌍떡잎 식물중에 바이러스 영향을 미칠 수 있으며 주요 재배 작물로는 토마토, 고추, 감자 등이 있음(Fiallo Olivé & Navas Castillo, 2019)(그림 4-2). 현재까지 발견된 저항성 유전자는 없으며 일부 토마토 유전자원에 ToCV 접종 시 저항성을 보이는 것이 확인됨.

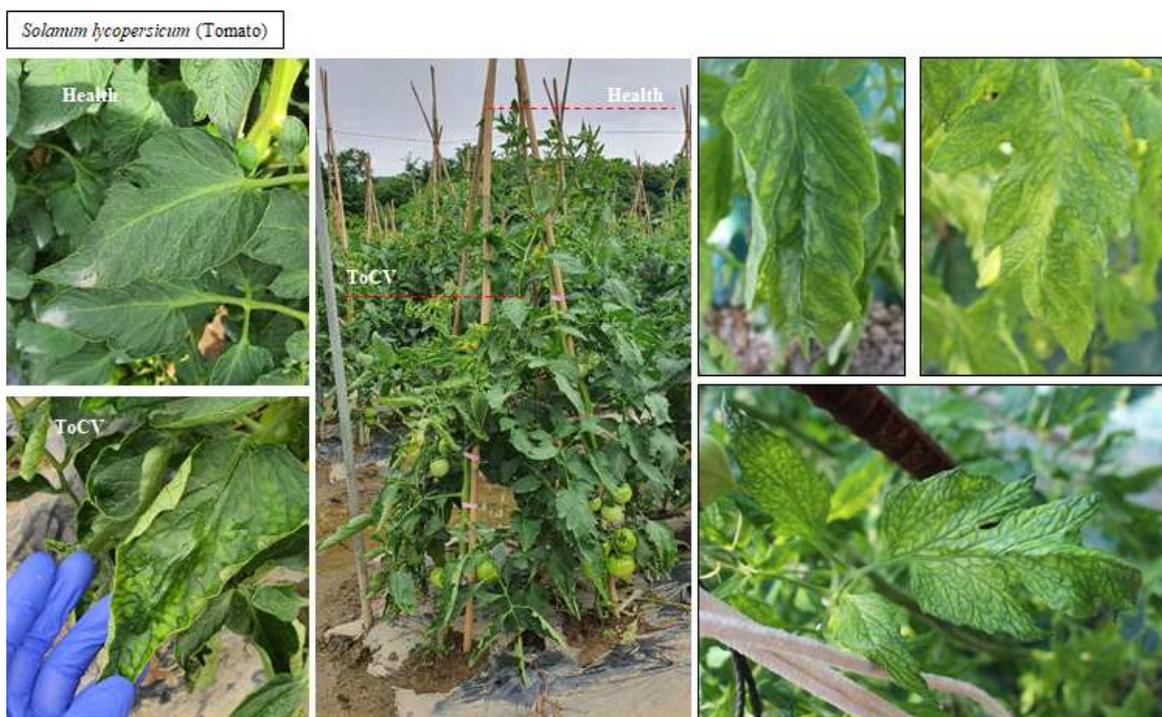


그림 4-1. 토마토 ToCV 병 증상

(2) 현재까지 ToCV 저항성 유전자를 밝혀진 것이 없으며 일부 선행연구에서 다양한 토마토 유전자원에 ToCV 접종을 실시하였을 때 일부 토마토에서 저항을 보이는 것으로 보고가 되어 있습니다. 이에 본 연구실에서는 ToCV 저항이 보이는 토마토를 분

양하여 확보한 뒤 ToCV 저항성 유전자 좌를 탐색하기 위한 소재로 사용될 예정이
 음. 또한 ToCV 저항을 보이는 시판 품종도 확보하여 ToCV 저항성 집단을 만들기
 위한 소재로 사용될 예정이다(표 4-1).

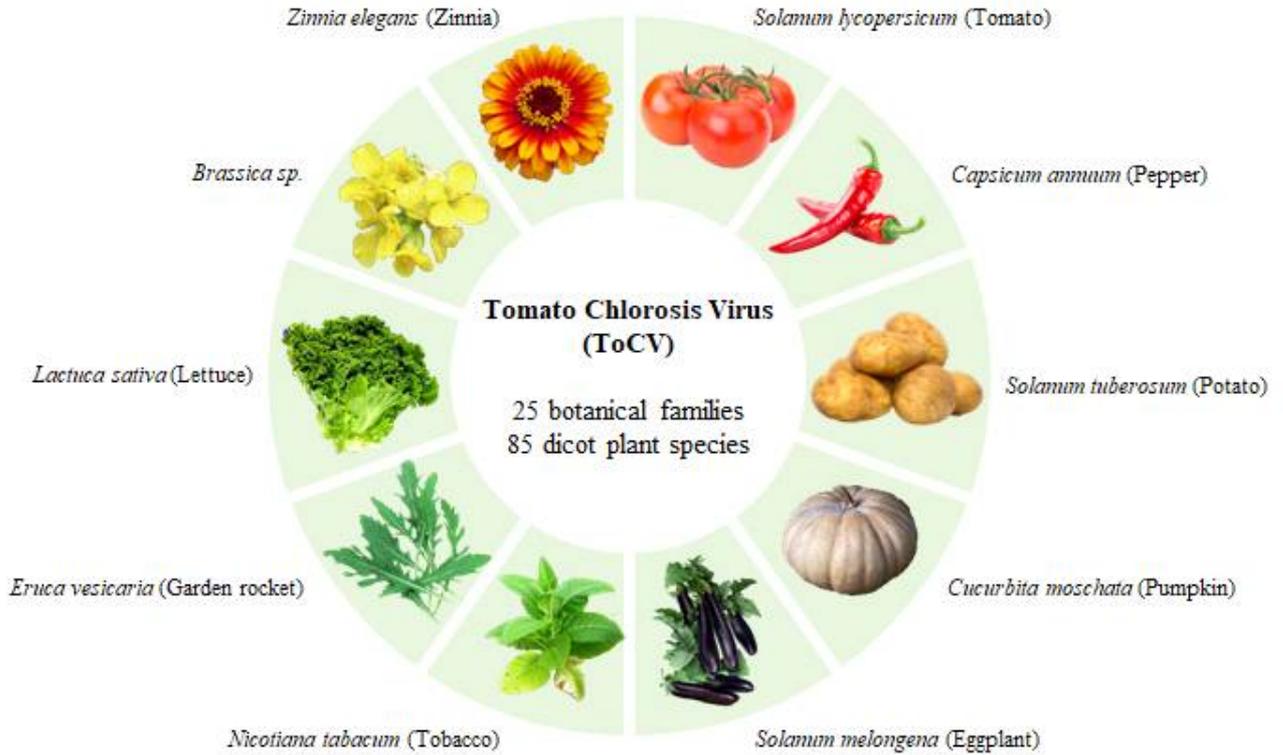


그림 4-2. ToCV 발생 가능 식물군(Fiallo liv é & Navas astillo, 2019)

표 4-1. ToCV 저항성 유전자원 리스트

Resistance source	Species	Population	Hybridization	Origin	Reference
KNU-Wild 1	<i>S. chmielewskii</i>	F ₁	ToCV S2 x KNU-Wild 1	Wild	García-Cano et al. 2010
KNU-Wild 2	<i>S. habrochaites</i>	BC ₁ F ₁	ToCV S2 x F ₁	Wild (USDA-GRIN)	Mansilla-Córdova et al., 2018
KNU-Wild 3	<i>S. habrochaites</i>	F ₁	ToCV S2 x KNU-Wild 3	Wild (USDA-GRIN)	Mansilla-Córdova et al., 2018
'KNU-H 1'	<i>S. lycopersicum</i>	F ₃	Selfing	F ₁ hybrid	-
		F ₁	KNU-H 1 x ToCV S3		
'KNU-H 2'	<i>S. lycopersicum</i>	F ₃	Selfing	F ₁ hybrid	-
		F ₁	KNU-H 2 F ₂ X ToCV S3		
'KNU-H 3'	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	F ₁ hybrid	-

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료

- (1) 본 연구에 사용된 토마토는 12여개의 시판품종 및 야생종 토마토이며, 토마토유전자원센터 'TGRC (Tomato Genetics Resource Center, USA.)'와 'USDA (United States Department of Agriculture, USA)' 에서 다양한 ToCV 저항성 유전자원을 분양받았음. ToCV 저항성 유전자 좌 탐색을 위해 사용된 유전자원으로는 KNU-Wild 1, KNU-Wild 2, KNU-Wild 3이 되겠으며 ToCV 저항성 집단을 만들기 위해 시판 품종 KNU-H 1, KNU-H 2, KNU-H 3을 확보하였음. ToCV 이병성 자원으로는 야생종 토마토와 시판 품종으로 구성하였으며 ToCV S1, ToCV S2, ToCV S3, ToCV S4, ToCV S5, ToCV S6 을 사용하였음.

나. genomic DNA 추출

- (1) DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였음 (Kang et al, 2001). 토마토의 어린 잎 조직을 glass bead(6mm) 를 이용하여 마쇄하였음. 613 μ L DNA extraction buffer (DNA extraction buffer, β -mercaptoethanol, L-ascorbic acid) 를 넣고 5분 간격으로 흔들어 주며 65°C에서 15분 처리 후, 200 μ L chloroform 을 넣고 vortexing 처리하여 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였음. 상층액 500 μ L 를 채취하여 1.5 μ L tube 로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었음. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였음. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 30 μ L RNase water에 5분간 녹여주었음.

음. RNA 추출

- (1) RNA 추출은 TRIzol법을 변형하여 사용하였음. 토마토의 어린 잎 조직을 1 mL TRIzol이 들어있는 2 mL Tube와 glass bead(6mm)를 이용하여 마쇄하였음. 그 후 5분 간격으로 흔들어 주며 65°C에서 15분 처리 후, 13,000 rpm 15분간 원심분리하였음. 200 μ L chloroform 을 넣고 vortexing 처리하여 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였음. 상층액 350 μ L 를 채취하여 1.5 μ L tube 로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었음. 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 RNA pellet을 70% RNA용 ethanol로 세척하였음. 세척 후 RNA pellet을 완전히 건조하고 30 μ L DEPC water에 5분간 녹여주었음.

라. ToCV 특이적 primer 제작 및 RT-PCR 방법

- (1) ToCV의 병징 특징으로는 토마토 하단부 잎을 기준으로 하여 잎 전체적으로 퇴록 증상이 보이고 또한 잎이 두꺼워지며 말림 증상이 보이는 것이 특징임. 하지만 이와 비슷한 퇴록 증상이 보이는 마그네슘 결핍과 농약해와 육안으로 판별하기가 어려운 부분이 있음. 이에 육안으로만 판별하는 어려움을 극복하기 위해 National Center for Biotechnology Information(NCBI) 에서 ToCV 유전자 염기서열 정보를 토대로 하여 ToCV 유전자를 이용한 특이적인 primer를 제작함. ToCV는 RNA 1, RNA 2로 구성되어 있으며 RNA 1의 RdRp 유전자와 RNA 2의 Hsp70 유전자를 사용하여 ToCV만 특이적으로 검출할 수 있는 primer를 제작하여 본 연구에 활용함.

(2) RNA를 cDNA로 합성하기 위해 RT-PCR을 진행하였으며 RT-PCR 용액 조성은 2 μ L RNA, 4 μ L Random primer를 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시키고 1 μ L 10x RT-PCR buffer, 1 μ L 10 nM dNTP mixture, 1 μ L RT-PCR polymerase, 8 μ L ddH₂O를 혼합하여 조성하였음. 그 후 RT-PCR을 진행하기 위해 42°C에서 1시간, 65°C에서 10분간 반응시킴. PCR 용액 조성은 1 μ L gDNA 300 ng, 2.5 μ L 10x *e-Taq* buffer, 0.5 μ L 10 nM dNTP mixture, 0.1 μ L *e-Taq* DNA polymerase, 18.875 μ L ddH₂O, 각 1 μ L 10 pmol \cdot μ L⁻¹ primer (RdRp, Hsp70 F, R) 으로 조성되었음. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) 을 이용하였음. PCR 조건은 94°C에서 3분간 초기 변성시키고, 94°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 20초 과정을 29회 반복 후 72°C에서 10분간 반응시켰음. 전기영동은 EtBr 이 포함된 11% agarose gel 에서 실시하였음.

마. ToCV 접목 접종법

(1) ToCV 바이러스 접종방법으로 접목을 활용한 접종이 있음. A : 과종 후 5주 된 식물에서 ToCV 병징 특징상 가장 하단부 잎부터 병이 발생하기에 가장 하단부에 있는 잎줄기를 제거해줌. B : 잎줄기가 제거된 부위에 약 0.5 - 0.7 cm 길이의 흠집을 내줌. C : ToCV 에 감염된 식물 잎, 줄기 등에서 흠집 길이에 맞춰 얇게 Patch 를 만들어줌. D : 흠집이 난 곳에 Patch 를 끼워줌. E : 수분 및 공기가 통하지 않도록 감아줌. F : 접종 후 약 5주 뒤부터 ToCV 증상이 가장 하단부 잎부터 발생하는지 관찰함(그림 4-3).

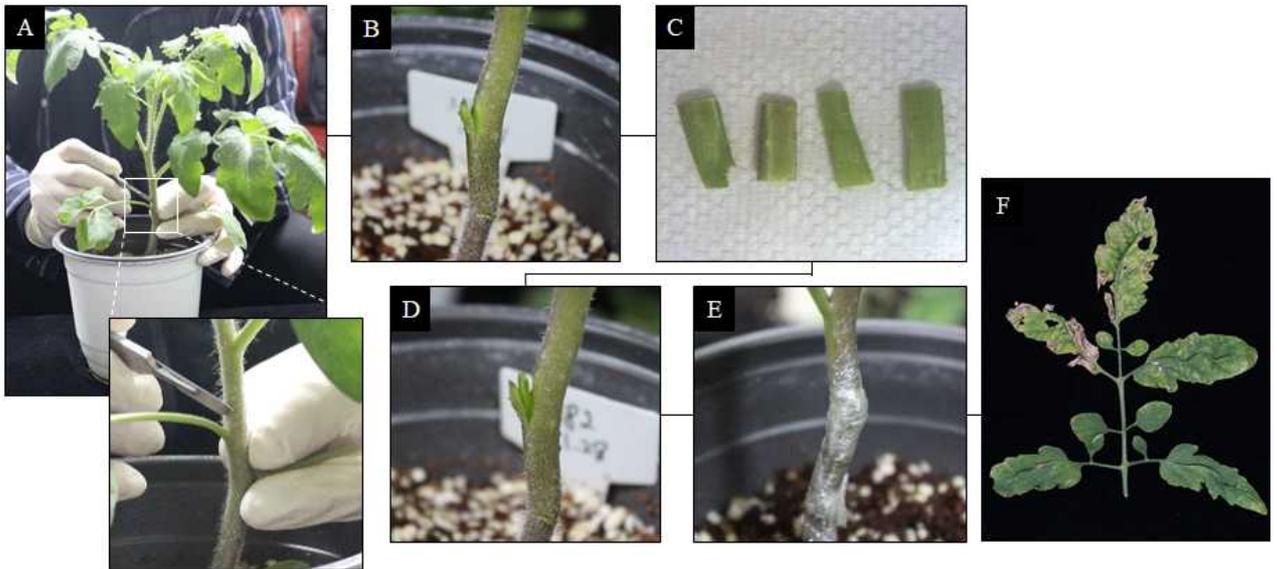


그림 4-3. ToCV 접목 접종법

마. ToCV Carborundum dust 접종법

(1) ToCV 바이러스 접종방법으로 Carborundum dust 를 활용한 접종있음. ToCV 에

감염된 토마토 잎 1 ~ 3g 을 준비함. 막자사발에 ToCV 에 감염된 잎과 함께 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) 100ml 와 Carborundum dust 0.1g 과 함께 섞은 후 곱게 갈아 Carborundum buffer 를 만들어줌. 과중 후 2주가 지난 접종할 토마토 잎에 Carborundum dust 를 적당량 뿌려준 후 솜에 Carborundum buffer 를 묻힌 후 3 ~ 5회 곱게 퍼듯이 발라주며 접종함. 접종 후 1시간 뒤 잎에 묻어있는 Carborundum dust 를 중류수로 씻어줌. 접종 후 약 25일 뒤부터 ToCV 증상이 발생하는지 관찰함.

바. ToCV 접종 후 병징 판별 수준

(1) ToCV 접목 접종과 ToCV Carborundum dust 을 활용하여 접종을 실시하였으며 병징 판별 수준은 Phenotype 과 Genotype 을 함께 비교하여 총 6가지 단계로 나누었음. 0단계는 잎 퇴락 현상이 일어나지 않고 건강한 상태로 Genotype 에서도 밴드가 확인되지 않은 저항성에 속하며, 2단계는 잎 퇴락 현상이 10% 미만이며 밴드 확인되지 않은 0단계와 같이 저항성에 속함. 2단계부터는 잎 퇴락 현상이 20~40% 보이며, 3단계는 잎 퇴락 현상이 40~60%이고 Genotype 에서 연한 밴드가 확인됨. 4 단계는 잎 퇴락 현상이 60~80%이고 Genotype 에서 밴드가 확인되어 이병성에 속하며, 5단계는 잎 퇴락 현상이 100%이며 Genotype 에서도 밴드가 명확하게 확인되어 이병성에 속함(그림 4-4).

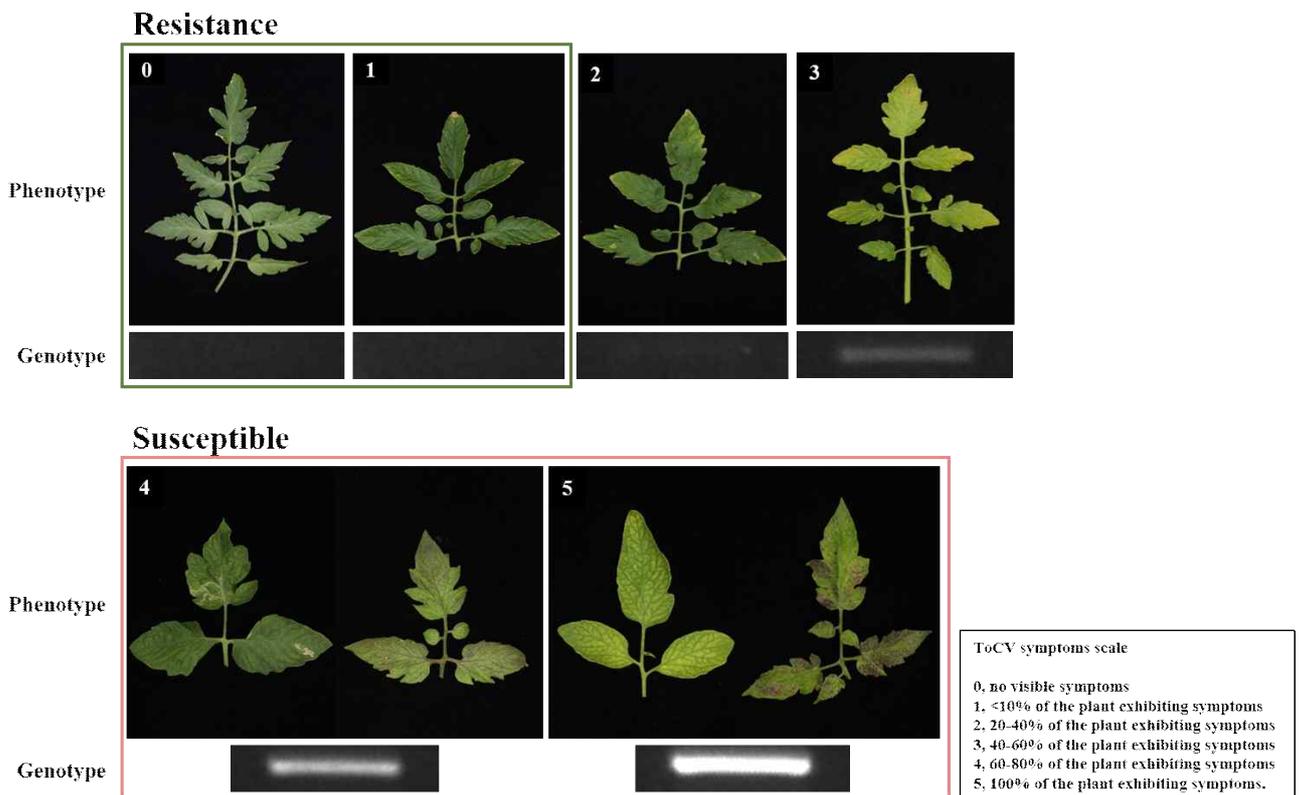


그림 4-3. ToCV 접종 후 병징 판별 수준

3. 내용 및 결과

가. ToCV 감염 토마토 확보

(1) 전북 익산에 위치한 토마토 제배 농가(그림 4-4)와 충북 청주에 위치한 토마토 연구소(그림 4-5)에서 ToCV 가 발견되었으며, ToCV 접목 접종에 필요한 ToCV 에 감염되어 있는 토마토 자원을 구하기 위해 RT-PCR을 진행하였음. 전북 익산에서 확보한 토마토에서 Iksan 1 토마토를 선발하였으며(그림 4-6), 충북 청주시에 위치한 토마토 연구소에서 확보한 토마토는 940-1 토마토를 제외한 모든 토마토를 선발하였음(그림 4-7). 선발된 토마토를 활용하여 ToCV 저항성 유전자 좌를 탐색하기 위한 실험에 사용될 예정임.



그림 4-5. 전북 익산 토마토 농가 ToCV 자연발생



126-1

126-2



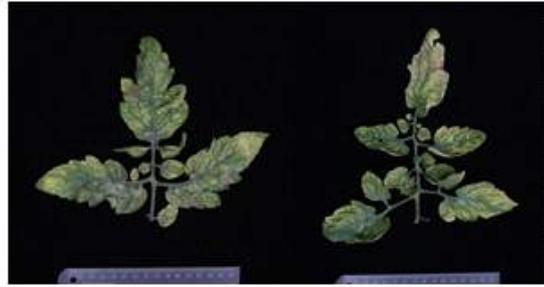
936-1

936-2



937-1

937-2



940-1

940-2



943-1

943-2

그림 4-6. 충북 청주 토마토 연구소 ToCV 자연발생

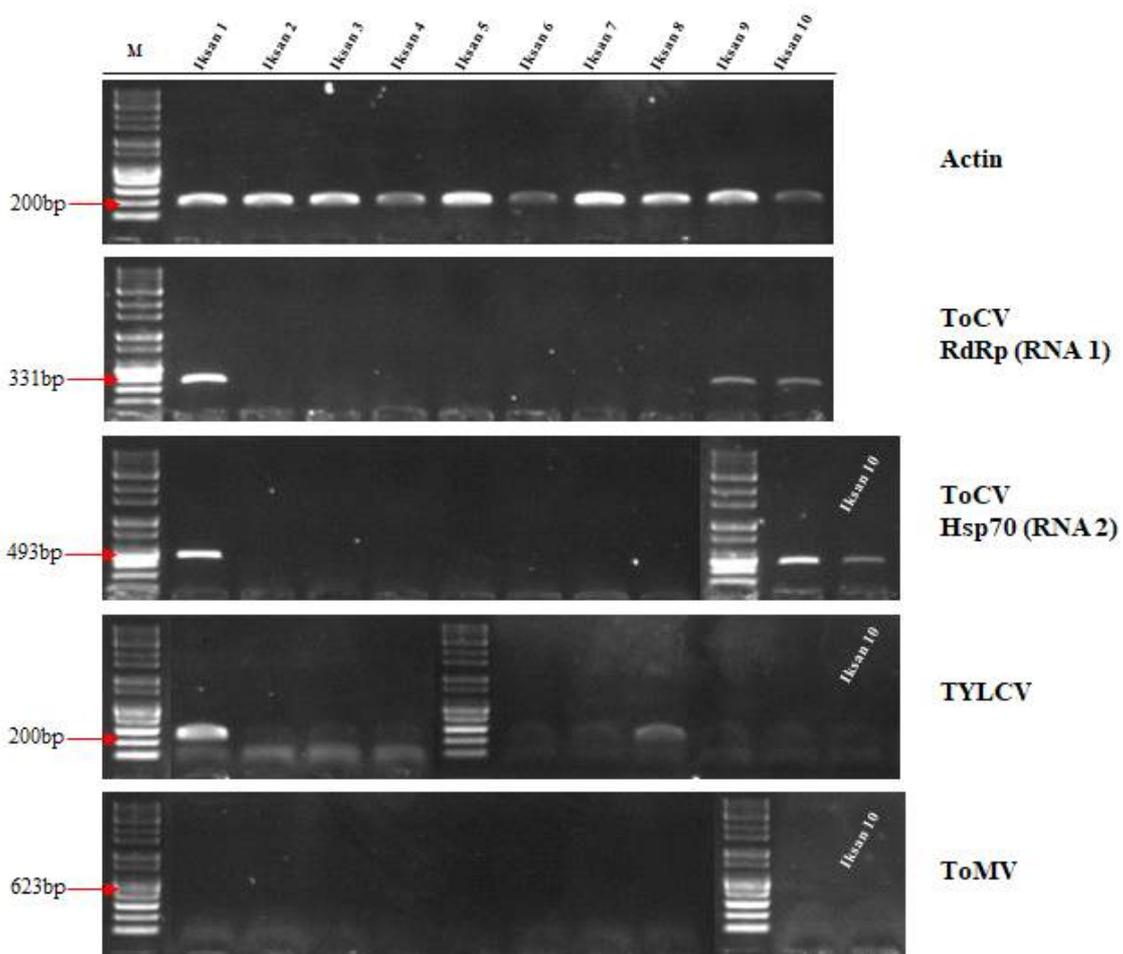


그림 4-7. 전북 익산 토마토 농가 ToCV RT-PCR 테스트

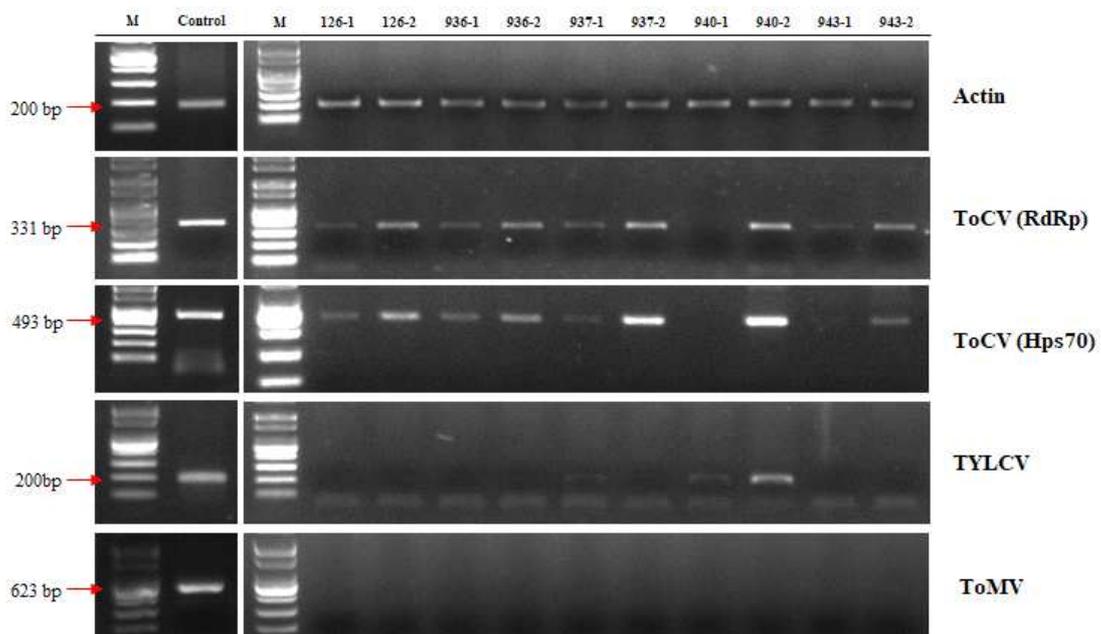


그림 4-8. 충북 청주 토마토 연구소 ToCV RT-PCR 테스트

나. ToCV 접목 접종 효율 확인

- (1) 전북 익산 토마토 농가에서 ToCV 에 감염된 토마토를 선발 후 잎 과 줄기를 사용하여 접목 접종을 실시하였음. 접목 접종에는 ToCV 이병성 토마토는 ToCV S1, ToCV S2, ToCV S3 가 사용되었으며 ToCV 저항성 토마토는 KNU-Wild 1, KNU-Wild 2, KNU-H 1, KNU-H 1 F₂, KNU-H 2, KNU-H 2 F₂, KNU-H 3 이 사용되었음. Positive control 에는 ToCV 가 발생한 선발된 토마토를 사용하였으며 Negative control 에는 ToCV 접목 접종을 실시하지 않은 ToCV S2 가 사용되었음. 과종 후 5주가 지난 토마토에 접목 접종하였으며 접종 후 5주차에 ToCV 가 발생하는 하단에 위치한 잎을 샘플링 하여 Phenotype과 Genotype을 확인하였음.
- (2) 접종 후 5주 뒤 ToCV 이병성 토마토의 Phenotype 과 Genotype 을 비교하여 중증도를 확인해본 결과 ToCV S1 에서 0-1 이 5개, 4-5 가 26개로 확인되었으며, ToCV S2 에서 0-1 이 6개, 4-5 가 24개, ToCV S3 에서 4-5 가 7개로 확인되어 이병성 토마토임이 확인되었음(그림 4-9). ToCV 저항성 토마토의 Phenotype 과 Genotype 을 비교하여 score 를 확인해본 결과 KNU-Wild 1, KNU-Wild 2 에서 모두 0-1 이 20개로 선행연구에서 보고된 것과 같이 저항을 보이는 것으로 확인되었으며 KNU-H 1, KNU-H 2, KNU-H 3 에서 모두 0-1 이 각각 18, 19, 7개로 ToCV 에 저항을 보이는 hybrid 품종으로 확인되었음. KNU-H 1 F₂ 에서 0-1 이 44개, 4-5 가 6개로 분리가 일어난 것을 확인할 수 있었고, KNU-H 2 F₂ 에서는 0-1 이 43개, 4-5 가 7개로 확인되어 저항을 보이는 토마토를 선발하여 ToCV 저항을 고정하고 있음(그림 4-10).

ToCV susceptible

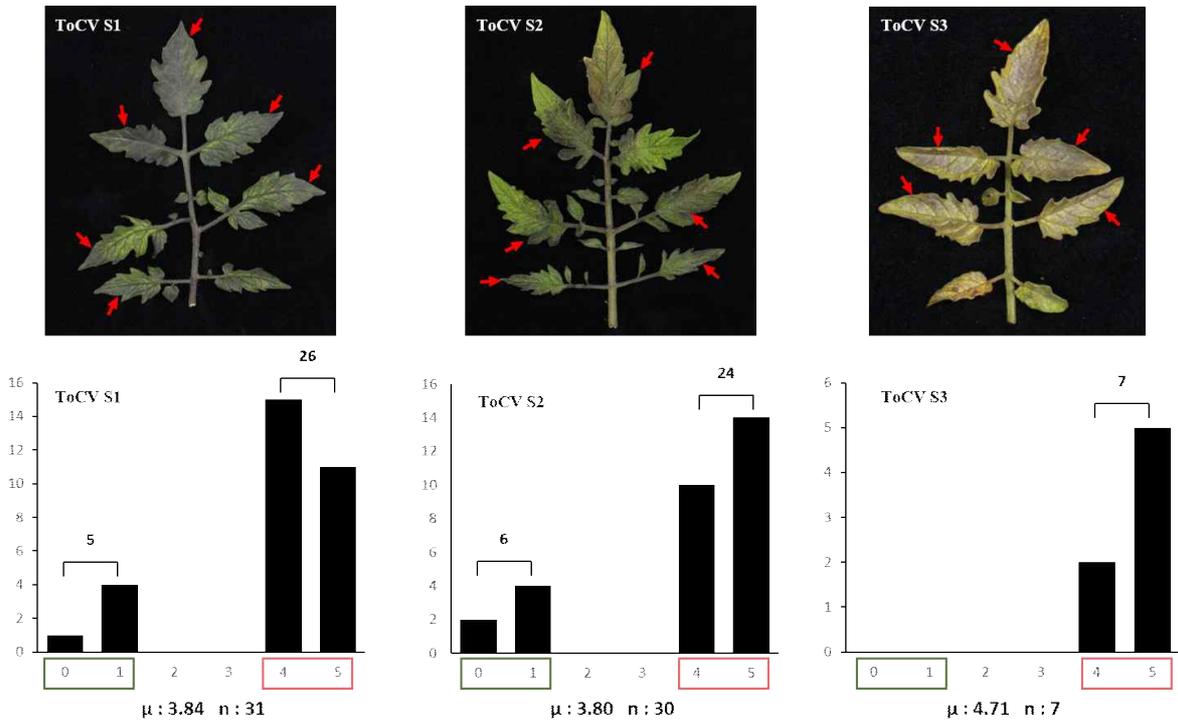
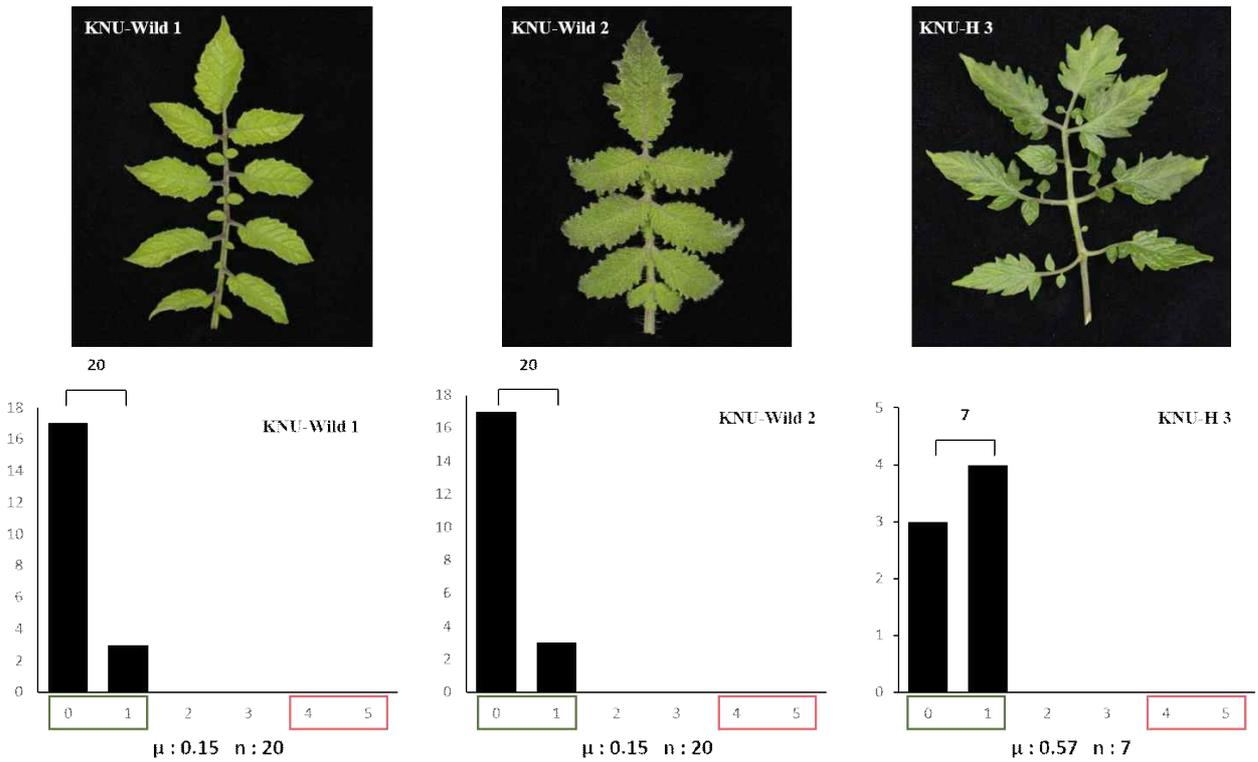


그림 4-9. ToCV 접목 집중을 활용한 ToCV 이병성 토마토의 병징 평가

ToCV resistance



ToCV resistance

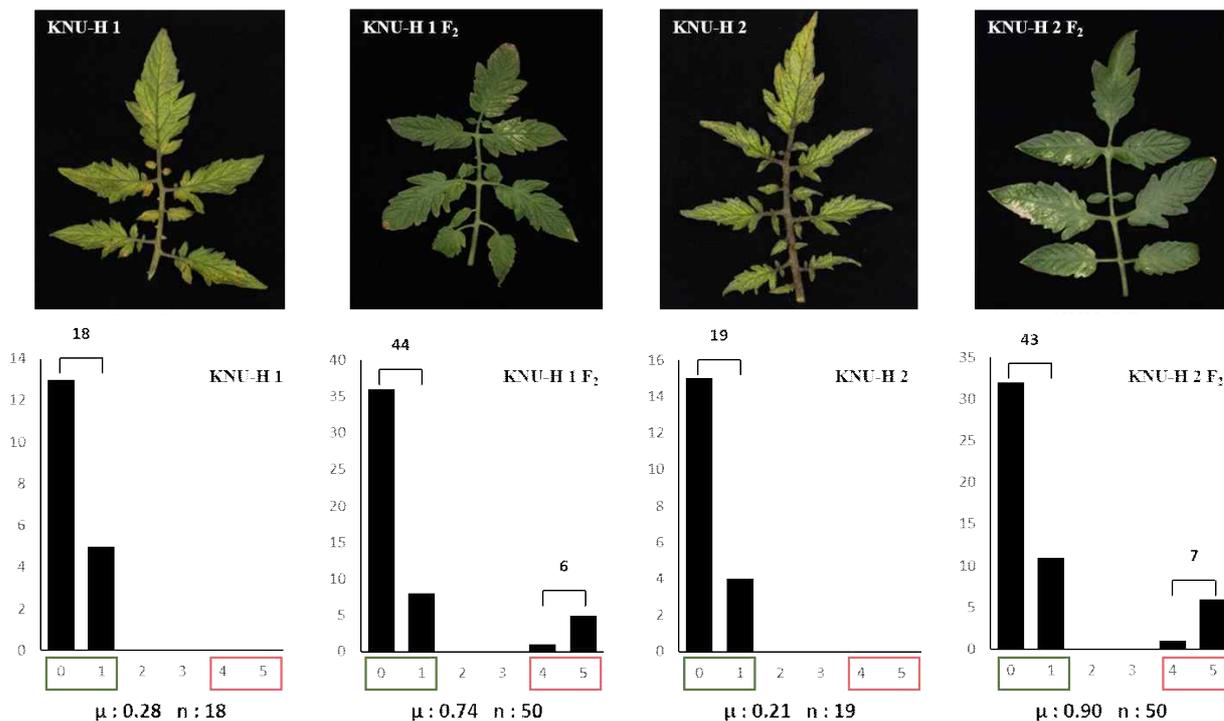


그림 4-10. ToCV 접목 집종을 활용한 ToCV 저항성 토마토의 병징 평가

다. ToCV Carborundum dust 접종 효율 확인

- 전북 익산 토마토 농가에서 ToCV 에 감염된 토마토를 선발 후 잎 과 줄기를 사용하여 접목 접종을 실시하였음. Carborundum dust 접종에서 ToCV 이병성 토마토는 ToCV S1, ToCV S2, ToCV S3, ToCV S4, ToCV S5, ToCV S6 가 사용되었으며 ToCV 저항성 토마토는 KNU-H 3, ToCV S2 x F₁ (BC₁F₁) 이 사용되었음. Positive control 에는 ToCV 가 발생한 선발된 토마토를 사용하였으며 Negative control 에는 ToCV 접목 접종을 실시하지 않은 ToCV S2 가 사용되었음. 파종 후 2 주가 지난 토마토에 접종하였으며 접종 후 45주차에 ToCV 가 발생하는 잎을 샘플링 하여 Phenotype 과 Genotype 을 확인하였음.
- 접종 후 25일 뒤 ToCV 이병성 토마토의 Phenotype 과 Genotype 을 비교하여 중증도를 확인해본 결과 ToCV S1에서 score 4-5 가 5개로 확인되었으며, ToCV S2 에서 중증도 1 이 1개, 4-5 가 19개, ToCV S3 에서 중증도 4-5 가 5개, ToCV S4 에서 중증도 1 이 2개, 중증도 4 가 3개, ToCV S5에서 중증도 1 이 1개, 중증도 4-5 가 4개, ToCV S6에서 중증도 1 이 2개, 중증도 4 가 3개로 확인되어 이병성 토마토임이 확인되었다(그림 4-11). ToCV 저항성 토마토의 Phenotype 과 Genotype 을 비교하여 중증도를 확인해본 결과 KNU-H 3에서 중증도 0-1 이 5개로 ToCV 에 저항을 보이는 hybrid 품종으로 확인되었음. ToCV 이병성 토마토 ToCV

S2 와 ToCV 저항성 토마토 KNU-Wild 2 를 교배한 F₁ 과 다시 ToCV S2 에 여교배하여 확보한 ToCV S2 x F₁ (BC₁F₁) 에서는 중증도 0-1 이 8개, 중증도 4-5 가 30개로 확인됨(그림 4-12).

ToCV susceptible

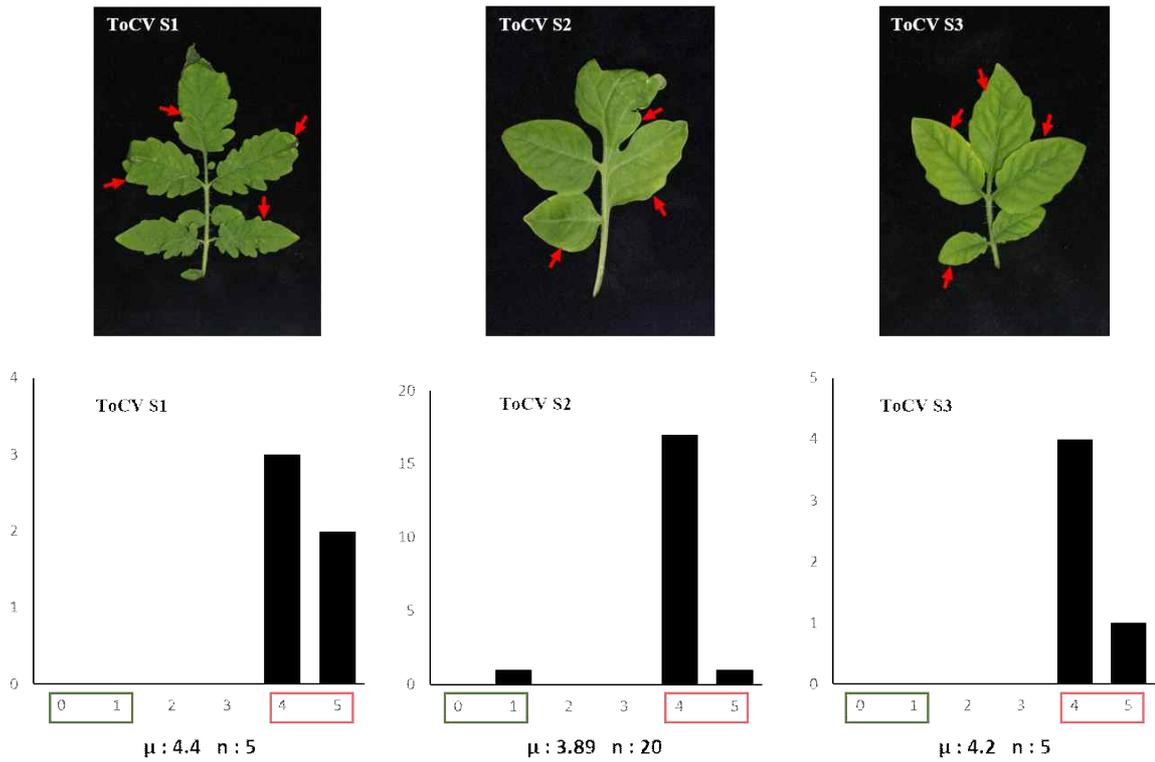
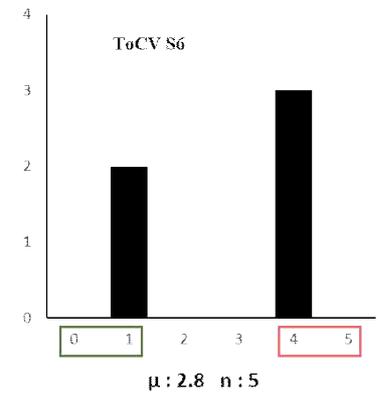
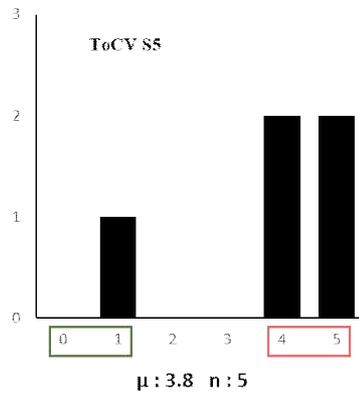
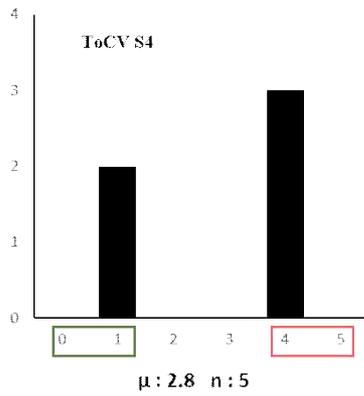


그림 4-11. ToCV Carborundum dust 를 활용한 ToCV 이병성 토마토의 병징 평가

ToCV susceptible



ToCV resistance

ToCV S2 x F₁ (BC₁F₁)

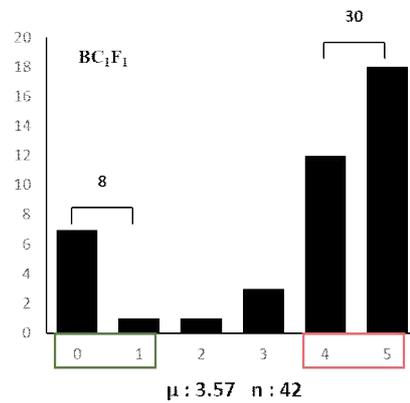
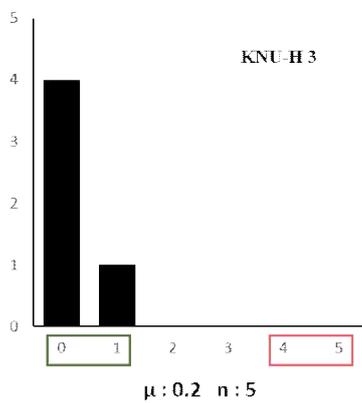


그림 4-12. ToCV Carborundum dust 를 활용한 ToCV 저항성 토마토의 병징 평가

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 목표

(1) 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발

- 곰팡이병(흑색잎곰팡이병, 회색잎점무늬병, 근부위조병, 꺾무늬병), 세균병(세균성 점무늬병, 궤양병, 줄기썩음병), 바이러스병(TYLCOV, TSWV, ToCV, ToTV), 선충병 병리검정 시스템 구축, 저항성 유전자원 확보, 마커개발용 집단양성
- 기 개발된 관련 분자표지 정보탐색 및 국내 육종소재 적용성 검정
- NGS-GBS, SNP array 등을 이용한 저항성 연관 신규 분자표지 탐색

(2) 내병성 유전자 도입, 집적을 위한 분자표지이용육종(MAB) 기술 고도화

- 마커분석 서비스 적정기술 개발(Fluidime, multiplex PCR, KASPar 등)
- 유전자 도입 효율성 극대화를 위한 정밀 MAS/MABC 시스템 설계 및 적용

2. 목표 달성여부

가. 정성적 목표 달성여부

(1) 1차년도 (2017)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
- 곰팡이병, 선충에 대한 토마토 유전자원 확보	- 내병성과 이병성계 (야생종, 국내외 육성계통, 도입재래종, F1 품종)와 이병성 우수원에형질계통 대량 수집	100
- 곰팡이병, 선충에 대한 병원균주 및 병리검정 기술 확보	- 시들음병, 잎곰팡이, 근부위조병, 선충 등 병원균주가 확보된 병에 대한 병리검정 체계확립 - 회색잎점무늬, 흑색잎곰팡이 등 신규로 분리, 확보하여야 하는 병에 대한 병원균 확보(분리동정, 균주배양) 및 병리검정 체계 확립	100
- 기 보고된 곰팡이 내병성 마커 정보 수집 및 적용성 검정	- 문헌서치를 통한 곰팡이 내병성 분자마커 정보수집 - PCR, 전기영동 등 마커유전자형 대량 분석 - 수집된 내병성 품종의 내병성과 기존 보고된 마커간 일치성 검정	100
- 신규 내병성 분자표지 개발	- 흰가루저항성 분자마커 개발 완료 - 기존 회색점무늬병 CT55 마커의 실효설검정 - 선충 저항성 마커의 실효성 및 신규병원성 race 출현 검정	100
- 궤양병 저항성의 분자표지개발 기반구축	- 궤양병 대량 접종법 구축 - 저병원성 및 고병원성 궤양병 균주 이용 신규 토	100

	<ul style="list-style-type: none"> 마토 저항성 계통 선발 - 저병원성 퀘양병 저항성 계통 피라미딩 및 선발 - 저병원성 퀘양병 저항성 분자표지 개발 - 고병원성 퀘양병 저항성 분자표지 개발을 위한 분리집단 구축 - 상용 F1 품종의 퀘양병 저항성 병리검정 	
- 청고병 저항성 분자표지 개발 기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 청고병 대량 집중법 구축 - 청고병 저항성 신규 계통 선발 - 청고병 저항성 분자표지 개발을 위한 분리집단 작성 - 상용 F1 품종의 퀘양병 저항성 병리검정 	100
- 세균성점무늬병 저항성 분자표지 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 세균성 점무늬병원균 수집 및 집중법 구축 - 세균성 점무늬병 저항성 유전자원 수집 - 수집된 유전자원 기반 <i>RXopJ4</i> 유전자 기반 분자표지 개발 	100
- TYLCV 저항성 분자표지 개발 및 저항성 유전자좌 피라미딩 기반 확립	- Ty1, 2, 3, 4 각각의 조합에 따른 TYLCV 저항성 수준 정량을 위한 계통선발	100

(2) 2차년도 (2018)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
- 곰팡이 내병성 마커의 MAS 적용성 검정	신규 F1 100 품종에 대해 14종 마커 검정 -마커/표현형(상보)간 불일치하는 품종들에 대해 검정기술이 확보된 병종(Cf, J3, N, Ph-3, F, Sm)에 대한 병리검정 실시	100
- 선충 저항성 신규 마커개발을 위한 저항성 소재 발굴	- 유전자원 200점 이상에 대한 선충((Uni-S) 병리검정 및 저항성 자원 발굴	100
- 흰가루(PM) 저항성 마커의 MAS 활용	- 선발된 저항성 계통의 F2 집단 작성 및 신규 분자표지 개발 기반 확충 - 마커를 사업단 기술이전 MABC와 연계한 저항성 계통 MAS 지원	100
- 회색잎점무늬병(GLS) 마커 개발	- 저항성/감수성 소재 Bulked DNA GBS -집중후 유전자 발현 분석마	100
- 고병원성 퀘양병 저항성 연관 분자표지 개발	- BSA-QTLseq을 통한 퀘양병 저항성 연관 분자표지 개발	100
- 저병원성 퀘양병 저항성 유전자좌 피라미딩 기반 퀘양병 저항성 증진	- 저항성 유전자원 MAS를 통한 피라미딩	100
- 퀘양병 및 청고병 저항성 신규 유전자원 지속 선발 및 이를 이용한 분리집단 작성	- 야생종 유래 신규 저항성 유전자원 선발	100
- 세균성점무늬병 <i>Rx4</i> 분자표지개발	- <i>S. pimpinellifolium</i> 유래 세균성 점무늬병 저항성 유전자 후보 기반 분자표지 개발	100
- <i>Ty4</i> 유전자기반 분자표지	- <i>S. chilense</i> 유래 TYLCV 저항성 신규 유전자좌	100

개발 및 실용화	<i>Ty4</i> 연관 분자표지 개발	
- TYLCV 유전자좌 피라미딩 효과 검증	- <i>Ty1/3</i> , <i>Ty2</i> 유전자좌 조합에 따른 TYLCV 저항성 수준 판별	100
- 풋마름병 저항성 판별 분자표지 개발	- <i>Bwr6</i> , <i>Bwr12</i> 연관 INDEL 분자표지 개발	100

(3) 3차년도 (2019)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
- 흰가루병(Lv) 저항성 선발용 분자마커 개발	Lv 유전자위 양측 RFLP 마커를 SNP 기반의 CAPS 마커로 전환 -Lv 유전자위 양측마커내 계놈영역의 유전자들 중 NBS-LRR class의 유전자들로부터 마커들을 개발하여 양측마커들과 함께 활용함으로써 선발의 정확성 제고 기술 개발	100
-회색잎곰팡이(GLS) 저항성 선발용 분자마커 개발	-저항성/감수성 유전자원 20계통에 대한 tomato Axiom SNP chip (55K) genotyping -SNP-chip 결과로부터 저항성 야생종 계통의 저항성 재배종 내 introgression 영역을 탐색하고 기존 보고된 저항성 연관 마커 영역과의 일치성 확인 -최근 보고된 연관 마커의 국내 MAS 실효성 검증하고 이 마커 영역내 존재하는 후보유전자 염기서열로부터 마커개발 진행 -현재까지 보고된 마커들과 본 연구진에서 개발한 마커들간 성능을 검증하고 국내 MAS에 가장 적합한 마커 선발	100
-흑색잎곰팡이(BLM) 저항성 선발용 분자마커 개발	-지난년도까지 내병성을 검정한 토마토 유전자원 180개 계통에 대한 tomato Axiom SNP chip (55K) genotyping -SNP genotype 결과를 기반으로 180 계통의 Structure, PCA, Hierarchical clustering 분석 -180 계통의표현형과 SNP 정보를 이용한 GWAS 분석을 통한 BLM 연관 SNP 후보 탐색	100
-근부위조병(FORR) 저항성 선발용 분자마커 개발	-최근 논문에 발표된 <i>Frl</i> 유전자 연관 마커의 실효성 검증 -본 연구진이 개발한 마커와의 비교검정	100
-MABC를 이용한 복합내병성, 단위결과성의 융성불임 계통 개발	복교배 집단으로부터 forward selection -BC1 집단의 GBS 분석 및 반복친 계놈 고회복물의 개체 선발 -BC2 집단의 GBS 분석 및 반복친 계놈 고회복물의 개체 선발	100
-궤양병 저항성 분자표지개발 기반구축	-궤양병 접종법 구축 -궤양병 병징의 단계 구축 -계통 및 F1 품종의 궤양병 저항성 병리검정 -궤양병 저항성과 이병성 집단 분리	100

	<ul style="list-style-type: none"> - SNP index를 통한 케양병 저항성 QTL 예측 - 저항성 연관 마커 검정 - 마커를 이용한 계통 및 품종의 유전자형과 표현형 비교분석 - 선발한 F2를 이용한 추가적인 마커 검정 - 마커를 통한 표현형 예측 - 마커를 통한 F2 집단 분리비 	
- 청고병 저항성 분자표지 개발 기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 풋마름병 집중법 구축 - 풋마름병 병징의 단계 구축 - 새로운 계통의 풋마름병 저항성 병리검정 - 풋마름병 저항성 마커 검정 - F2 집단을 통한 두 개의 마커의 분리양상 - 풋마름병에 대한 유전자형과 표현형의 연관성 검정 - 풋마름병 저항성 연관 QTL mapping 	100
- <i>Ty-2</i> 유전자기반 분자표지 개발 및 실용화	- <i>S. habrochaites</i> 유래 TYLCV 저항성 <i>Ty-2</i> 분자표지 개발	100
- TYLCV 저항성 유전자좌 분포에 따른 효과 검증	- TYLCV 자연 발생 및 대량 집중법에 따라 TYLCV 저항성 유전자좌 조합에서 저항성 수준 판별	100
- ToCV 저항성 분자표지 개발 기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> - ToCV 집목 집중법 구축 - ToCV 저항성 신규 계통 선발 - ToCV 저항성 분자표지 개발을 위한 분리집단 작성 	100

(4) 4차년도 (2020)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○ 흰가루병(Lv) 저항성 선발용 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> • Lv 유전자위 양측 RFLP 마커를 SNP 기반의 CAPS 마커로 전환 • Lv 유전자위 양측마커 내 게놈 영역 의 유전자들 중 NBS-LRR class 유전자들로부터 마커개발 	100
○ 회색잎곰팡이(GLS) 저항성 선발용 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 저항성/감수성 유전자원 20계통에 대한 tomato Axiom SNP chip (55K) genotyping • SNP-chip 결과로부터 저항성 야 생종 계통의 저항성 재배종 내 introgression 영역을 탐색하고 기존 보고된 저항성 연관 마커 영역과의 일치성 확인 • 최근 보고된 연관 마커의 국내 MAS 실효성 검증을 하고 이 마커 영역내 존재하는 후보 유전자 염기 서열로부터 마커 개발 진행 • 현재까지 보고된 마커들과 본 연구진에서 개발한 마커들간 성능을 검정하고 국내 MAS에 가장 적합한 마커 선발 	100
○ 흑색잎곰팡이(BLM) 저항성 선발용 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 지난년도까지 내병성을 검정한 토마토 유전자원 180개 계통에 대한 Axiom SNP chip genotyping • SNP genotype 결과를 기반으로 180 계통의 Structure, PCA, Hierarchical clustering 분석 • 180 계통의 표현형과 SNP 정보를 이용한 GWAS 분석을 통한 BLM 연관 SNP 후보 탐색 	100
○ 근부위조병(FORR) 저항성 선발용	<ul style="list-style-type: none"> • 최근 논문에 발표된 <i>Frl</i> 유전자 연관 마커의 실효성 	100

분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> 검증 본 연구진이 개발한 마커와의 비교 검증 	
○ MABC를 이용한 복합내병성, 단위결과 음성불임 계통 개발	<ul style="list-style-type: none"> 기존 보고된 단위결과, 음성불임 유전자로부터 CAPS, SCAR 마커개발 복교배 집단으로부터 forward selection BC1 집단의 GBS 분석 및 반복친 계놈 고회복률의 개체 선발 	100
- 케양병 저항성 마커 정밀화 및 실용화	<ul style="list-style-type: none"> 케양병 저항성 마커 정밀화를 대량 계통 분석 및 다양한 집단의 적용 QTL-BSA seq결과 기반 신규 저항성 유전자와 연관 마커 개발 신규 저항성 유전자원을 활용한 마커 개발 기반 확립 개발된 마커 F2-F3 집단 적용을 통한 케양병 MAS 시스템 구축 	100
- 청고병 저항성 마커 정밀화 및 실용화	<ul style="list-style-type: none"> 유전자 기반 수준의 청고병 저항성 마커 정밀화를 대량 계통 분석 및 다양한 F2-F3 집단의 적용을 통한 MAS 시스템 확립 	100
- 청고병 저항성 유전자 기반 마커 개발을 위한 고밀도 유전자지도 작성	<ul style="list-style-type: none"> 염색체 6, 12번에 위치한 저항성 유전자와 고밀도 유전자지도 작성 선발된 recombinant F3 종자 확보 	100
- TYLCV 저항성 유전자와 피라미딩 및 신규 유전자와 Ty4, Ty6 연관 분자표지 개발 및 실용화	<ul style="list-style-type: none"> 유전자 기반 Ty-2 마커 상용 품종 적용을 통한 정밀화 및 실용화 TYLCV 저항성 유전자와 피라미딩을 통한 저항성 수준 판별을 위한 집단 작성 및 MAS 실시 Ty-4 유전자원 도입 및 연관 마커 개발 Ty-6 유전자원 도입 및 연관 마커 개발 다양한 바이러스 strain의 감염클론 접종 및 계통간 병징 차이 구분 	100
- ToCV 신규 마커 개발을 위한 기반 확립	<ul style="list-style-type: none"> 바이러스 접종법 확립 저항성 유전자원 도입 마커 정보 수집 저항성 유전자원의 F2 분리집단 작성 분리집단 내의 저항성 유전양상 분석 	100

(3) 5차년도 (2021)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
- 흰가루병(OI) 저항성 선발용 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> 350개 계통 핵심집단에 대한 2차 병리검정 GWAS 2차 분석 1차분석 결과와 통합하여 저항성 QTL 연관 SNP 발굴 및 HT-MAS용 마커 개발 	
- 염색체 이입계통(IL) 집단을 이용한 BLM 저항성 유전자좌 분석	<ul style="list-style-type: none"> 90개 IL 계통에 대한 BLM 병리검정 90개 IL 계통에 대한 GBS 분석 및 SNP 탐색 SNP 기반 염색체 이입영역 추적 	100
-GWAS를 통한 BLM QTL분석	<ul style="list-style-type: none"> 추가 품종에 대한 (총 404 품종) BLM 병리검정 추가 품종에 대한 SNP chip 분석 총 404 품종에 대한 GWAS 분석 및 QTL 영역 	100

	확인	
- IL과 GWAS 통합 분석	- BLM 저항성 IL의 염색체 이입영역과 GWAS결과 탐색된 SNP 위치간 상호 연관성 분석	100
○ <i>Bw6</i> , <i>Bw12</i> 저항성 유전자좌 고밀도 유전자지도 작성을 통한 청고병 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발	- 고밀도 유전자지도 작성 과정 중 선발된 recombinant F3, F4 계통의 청고병 저항성 수준 검정 - recombinant 스크리닝을 통한 저항성 유전자좌 고도화 및 후보저항성 유전자 선발	100
○ <i>Rcm</i> 저항성 유전자좌 정밀화를 통한 케양병 저항성 후보 유전자기반 마커 개발	- 고밀도 유전자 지도 작성을 통한 저항성 유전자좌 후보 지역 정밀화 - 후보 저항성 유전자 선발을 통한 유전자 기반 마커 개발	100
○ ToCV 신규 마커 개발을 위한 분리 집단 작성 및 QTL-seq 기반 확립	- 바이러스 저항성 대단위 판별을 위한 집중법 개선 - 저항성 유전자원 지속적 도입 - 마커 정보 수집 - 분리집단 내의 저항성 유전양상 분석 - 효율적 QTL-seq 수행을 위한 연구방법 최적화	100
○ TYLCV 저항성 유전자좌 조합과 바이러스strain간의 상호작용 확립을 통한 저항성 유전자좌 최적 조합 선발	- TYLCV 저항성 유전자좌 피라미딩 지속 실시 - 저항성 유전자좌 조합과 바이러스strain간의 상호작용 확립을 통한 저항성 유전자좌 최적 조합 선발	100

나. 정량적 달성여부

성과지표구분	단위	최종			1차년도			2차년도			3차년도			4차년도			5차년도		
		실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률
제품경력	논문 SCI	15	10	150	3	2	150	3	2	150	2	2	100	4	2	200	3	2	150
	논문 비SCI																		
	품종 지역 적응성 검정																		
	유전자원등록	10	10	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100
	계통선발																		
	저장성검증																		
	마커분석																		
	분자마커개발	26	0	2600	5	0	500	8	0	800	5	0	500	4	0	400	4	0	400
	RT-PCR 바이러스 검정																		
권리	품종출원	건																	

확보	품종등록																			
	특허출원	8	5	160	3	1	300	1	1	100	1	0	100	2	2	100	1	1	100	
	특허등록	8	4	200	1	0	100	2	1	200	1	1	100	2	0	200	2	0	200	
생산역량강화	종자생산수량	kg																		
	국내외 생산기지 구축	개소																		
	인력양성		24	10	240	4	2	200	5	2	250	3	2	150	5	2	250	7	2	350
	중간모본육성																			
	종자맡아력검정	건																		
	기술이전																			
	생산량검정																			
	종구보급	만구																		
	무병묘품종수(원원종)	건																		
유통경쟁력강화	품종생산 판매신고																			
	유통채널구축	건																		
	MOU체결																			
홍보역량강화	국내외 전시포/시범포 개설	개소																		
	국내외 전시포/시범포 운영																			
	홍보물 제작	건																		
	품종평가회/설명회 개최																			
목표고객	판매국가																			
	판매국가(누적)																			
	해외 판매	건																		
	국내판매업체																			
	국내판매업체(누적)																			
	판매업체																			

	판매업체(누적)																		
	품종인지도	점수																	
	무병묘보급율	%																	
매출 및 수출	국내 매출액	백만원																	
	종자수출액	만불																	

3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

- 해당사항 없음

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 마커기술의 활용 및 연구결과의 홍보

- 기 개발된 토마토 내병성 MAS용 분자마커에 대한 성능을 검증하였으며 마커-표현형 정보와 일치하지 않는 마커에 대한 보완사항에 대해 파악하고 개선을 진행함.
- 근부위조병, 회색잎점무늬병(GLS) 마커의 경우 기존 보고된 마커보다 성능이 우수한 마커를 개발하였으며 대목 등 저항성 품종 육성을 위한 MAS에 활용되고 있음
- 흰가루병 저항성 마커는 *ol-2* 유전자 마커의 경우 열성으로서 다수 병원균주 레이스에 동시 저항성을 보이는 것으로 알려져 있어 수평저항성 품종 육성에 활용 될수 있음
- 흑색잎곰팡이(BLM) 저항성 마커는 본 연구에서 세계 최초로 개발되었으며 아직 MAS 적용 가능성 검토가 남아 있으나, 향후 MAS 프로그램에 활용이 가능하리라고 봄
- 연구성과는 과제종료 후 2년 내 SCI 논문 2편을 추가 달성하여 홍보하고자 함

2. 마커기술의 기술이전 및 범용화

- 개발된 곰팡이병 저항성 마커들에 대한 국가 기관(중자원, 실용화재단)으로의 기술이전을 추진하겠음
- 토마토 궤양병 저항성 토마토 판별용 SNP 마커를 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 청고병 저항성 토마토를 확보하는데 활용할 수 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음
- 풋마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 풋마름병 저항성 토마토 선발방법을 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 풋마름병 저항성 토마토를 확보하는데 활용할 수 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음
- TYLCV 저항성 유전자들인 *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* 각각에 대한 마커 개발내용과 이들 저항성 집적에 따른 저항성 범위 및 정도 증가 효과 분석결과를 종합하여 특히 출원을 계획하고 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음

4.3. 향후 지속적 연구에 활용

- 흰가루병 저항성 및 흑색잎곰팡이 저항성 마커의 경우 개발된 마커의 MAS 적용성과 범용성 확

인을 위해 과제종료 후에도 지속적인 연구를 할 것이며, 기술이전, 논문 등 연구성과에 대해서도 GSP의 추가 연구성과로 등록하고자 함

- ToCV 저항성 유전자원을 이용한 ToCV 저항성 유전자 좌를 탐색하여 연관 마커 개발을 계획 중임.

붙임. 참고문헌

2장 3절. 토마토 근부위조병 저항성 분자마커 개발

- Alexander, L.J. 1963. Transfer of a dominant type resistance to the four known Ohio pathogenic strains of tobacco mosaic virus (TMV), from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum*. *Phytopathol.* 61: 611-617.
- Berry, S., and Oakes, G. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato. *HortScience.* 22(1): 110-111.
- Can, C., Yucel, S., Korolev, N., and Katan, T. 2004. First report of fusarium crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Turkey. *Plant Pathol.* 53(6): 814-814. Chen, X., Shang, J., Chen, D., Lei, C., Zou, Y., Zhai, W., et al. 2006. AB-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J.* 46(5): 794-804. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02739.x
- De Ceuster, T.J., and Hoitink, H.A. 1999. Prospects for composts and biocontrol agents as substitutes for methyl bromide in biological control of plant diseases. *Compost Sci. Util.* 7(3): 6-15.
- Diener, A.C., and Ausubel, F.M. 2005. Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genet.* 171(1): 305-321.
- Elkind, Y., Kedar, N., Katan, Y., Couteaudier, Y., and Latterrot, H. 1988. Linkage between *Tm-2* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance (FORL). *Rep.Tomato Genet.Coop.* 38: 22.
- Fazio, G., Stevens, M.R., and Scott, J.W. 1999. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato. *Euphytica.* 105(3): 205-210.
- Frery, A., Presting, G.G., and Tanksley, S.D. 1996. Molecular mapping of the centromeres of tomato chromosomes 7 and 9. *Mol. Gen. Genet.* 250(3): 295-304.
- Ganal, M.W., Young, N.D., and Tanksley, S.D. 1989. Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the *Tm-2a* region of chromosome 9 in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 215(3): 395-400.
- Huang, C.H., Roberts, P.D., Gale, L.R., Elmer, W.H., and Datnoff, L.E. 2013. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Florida inferred from vegetative compatibility groups and microsatellites. *European J. Plant Pathol.* 136(3): 509-521.
- Kim, J.T., Park, I.H., Hahm, Y.I., and Yu, S.H. 2001. Crown and root rot of greenhouse tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. *Plant Pathol. J.* 17(5): 290-294.
- Kim, S.H., Kim, J.T., Jang, C.S., Yoo, S.J., and Kim, H.G. 2005. Vegetative Compatibility Group of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. *Plant Pathol. J.* 21(3): 214-220.
- Kouki, S., Saidi, N., Rajeb, A.B., Brahmi, M., Bellila, A., Fumio, M. et al. 2012. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* using mixture of vegetable and *Posidonia oceanica* compost [online]. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012(2012) Article ID: 239639: 1-11. doi:10.1155/2012/239639.
- Laterrot, H., and Couteaudier, Y. 1989. Linkage between TMV and FORL resistance. *Tomato Genet. Coop. Rep.* 39: 21.
- Laterrot, H., and Moretti, A. 1991. Allelism of various FORL resistance sources. *Tomato Genet. Coop. Rep.* 41: 28-30.
- Laterrot, H., and Pecaut, P. 1969. Gene *Tm-2*: new source. *Tomato Genet. Coop. Rep.* 19: 13-14.
- Lee, C.S., Park, E.W., and Lee, C.I. 1994. *Fusarium* crown rot of tomatoes on a rockwool culture system. *Kor. J. Plant Pathol.* 10(1): 64-67. doi: 10.3923/ppj.2004.9.18
- Ma, J., and Bennetzen, J.L. 2006. Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a centromeric region of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2): 383-388. doi: 10.1073/pnas.0509810102
- Olivain, C., and Alabouvette, C. 1997. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* 137(3): 481-494. doi: 10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006

- Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S.D., Zamir, D., and Fluhr, R. 1997. The I2C family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell*. 9(4): 521-532. doi: 10.1105/tpc.9.4.521
- Pan, Q., Liu, Y.S., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren, L., Zamir, D., and Fluhr, R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. *Genet*. 155(1): 309-322. PMID: 10790405
- Park, Y.H., Hwang, J.H., Kim, K.H., Kang, J.S., Kim, B.S., Xu, S.J., and Ahn, Y.K. 2013. Development of the gene-based SCARs for the *Ph-3* locus, which confers late blight resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*. 164(3): 9-16. doi: 10.1016/j.scienta.2013.08.013
- Pillen, K., Ganal, M., and Tanksley, S.D. 1996. Construction of a high-resolution genetic map and YAC-contigs in the tomato *Tm-2a* region. *Theor. Appl. Genet*. 93(1-2): 228-233. doi: 10.1007/BF00225750
- Recorbet, G., Steinberg, C., Olivain, C., Edel, V., Trouvelot, S., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., and Alabouvette, C. 2003. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytol*. 159(1): 73-92. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00795.x
- Ristaino, J.B., and Thomas, W. 1997. Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can I fill the gaps? *Plant Dis*. 81(9): 964-977. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.9.964
- Rowe, R. 1980. Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-grown tomatoes in North America and Japan. *Phytopathol*. 70(12): 1143-1148.
- Scott, J., and Farley, J. 1983. Ohio CR-6 Tomato. *HortScience*. 18(1): 114-115.
- Sidhu, D., and Gill, K.S. 2005. Distribution of genes and recombination in wheat and other eukaryotes. *Plant cell, tissue and organ culture*. 79(3): 257-270.
- Sim, S.C., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganal, M.W., Deynze, A.V., Hamilton, J.P. et al. 2012a. Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. *PLoS One*. 7(7): e40563. doi: 10.1371/journal.pone.0040563
- Sim, S.C., Deynze, A.V., Stoffel, K., Douches, D.S., Zarka, D., Ganal, M.W. et al. 2012b. High-density SNP genotyping of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of genetic variation due to breeding. *PLoS One*. 7(9): e45520. doi: 10.1371/journal.pone.0045520
- Simons, G. et al. 1998. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell*. 10(6): 1055-1068.
- Sivan, A., and Chet, I. 1993. Integrated control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. *Crop Protection*. 12(5): 380-386.
- Vakalounakis, D. 1988. The genetic analysis of resistance to fusarium crown and root rot of tomato. *Plant Pathol*. 37(1): 71-73.
- Vakalounakis, D.J., Laterrot, H., Moretti, A., Ligoixigakis, E.K., and Smardas, K. 1997. Linkage between *Frl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance) and *Tm-2* (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ann. Appl. Biol*. 130(2): 319-323.
- Wu, F., and Tanksley, S.D. 2010. Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics*. 11(182): 182.
- Yamakawa, K., and Nagata, N. 1975. Three tomato lines obtained by the use of chronic gamma radiation with combined resistance to TMV and *Fusarium* race J-3. *Tech. News. Inst. Radit. Breed*. 16: 2-95.
- Yan, H., Jin, W., Nagaki, K., Tian, S., Ouyang, S., Buell, C.R., Talbert, P.B., Henikoff, S., and Jiang, J. 2005. Transcription and histone modifications in the recombination-free region spanning a rice centromere. *Plant Cell*. 17(12): 3227-3238.
- Young, N.D., and Tanksley, S.D. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet*. 77(3): 353-359.

2장 4절. 토마토 회색잎점무늬병 내병성 마커 개발

- Andersen EJ, Ali S, Byamukama E, Yen Y, Nepal MP (2018) Disease resistance mechanisms in plants. *Genes* 9:339. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Andrus CF, Reynard GB, Wade BL (1942) Relative resistance of tomato varieties, selections,

- and crosses to defoliation by *Alternaria* and *Stemphylium*. US Department of Agriculture Circular 652
- Behare J, Laterrot H, Sarfatti M, Zamir D (1991) Restriction fragment length polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:489 - 492
- Berbee M, Pirseyedi M, Hubbard S (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91:964 - 977. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>
- Devran Z, Kahveci E, Hong Y, Studholme DJ, Tör M (2018) Identifying molecular markers suitable for Frl selection in tomato breeding. *Theor Appl Genet* 131:2099 - 2105. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3136-0>
- Grieneisen ML, Aegerter BJ, Stoddard CS, Zhang M (2018) Yield and fruit quality of grafted tomatoes, and their potential for soil fumigant use reduction. A meta-analysis. *Agron Sustain Dev* 38:29. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0507-5>
- Hannon C, Weber G (1955) A leaf spot of tomato caused by *Stemphylium floridanum* sp. nov. *Phytopathology* 45
- Hanson P, Lu S-F, Wang J-F, Chen W, Kenyon L, Tan C-W, Tee KL, Wang Y-Y, Hsu Y-C, Schafleitner R, Ledesma D, Yang RY (2016) Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Sci Hortic* 201:346 - 354. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>
- Hendrix JW, Frazier WA (1949) Studies on the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes. Hawaii Agricultural Experiment Station, technical bulletin no. 8, pp 24. <http://hdl.handle.net/10125/35662>
- Huang C-J, Tsai W-S (2017) Occurrence and identification of *Stemphylium lycopersici* causing *Stemphylium* leaf spot disease on tomato in Taiwan. *Eur J Plant Pathol* 148:35 - 44. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1066-8>
- Ji Y, Scott J (2009) A CAPS marker linked to the tomato gray leaf spot (*Stemphylium* sp.) resistance gene Sm. *TGC Rep* 59:29 - 31
- Jin Y, Statler G, Franckowiak J, Steffenson B (1993) Linkage between leaf rust resistance genes and morphological markers in barley. *Phytopathology* 83:230 - 233
- Kim B-S, Cho H-J, Hwang H-S, Cha Y-S (1999) Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*. *Plant Pathol J* 15:348 - 350
- Kim B, Kim N, Kim JY, Kim BS, Jung H-J, Hwang I, Noua I-S, Sim S-C, Park Y (2016) Development of a high-resolution melting marker for selecting *Fusarium* crown and root rot resistance in tomato. *Genome* 59:173 - 183. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0115>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547 - 1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee JM, Oh C-S, Yeam I (2015) Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breeding and Biotechnology* 3:308 - 322. <https://doi.org/10.9787/PBB.2015.3.4.308>
- Min J, Kim B, Cho K, Yu S (1995) Grey leaf spot caused by *Stemphylium lycopersici* on tomato plants. *Korean J Plant Pathol* (Korea Republic)
- Pandey KK, Pandey PK, Kalloo G, Banerjee MK (2003) Resistance to early blight of tomato with respect to various parameters of disease epidemics. *J Gen Plant Pathol* 69:364 - 371. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0074-7>
- Porta-Puglia A (1981) *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmonson tomato in the marches. *Ann Istit Sper Patol Veg Roma* 7:39 - 46
- Rotem J, Cohen Y, Wahl I (1966) A new tomato foliage disease in Israel caused by *Stemphylium botryosum*. *Can J Plant Sci* 46:265 - 270
- Singh RP, Hodson DP, Jin Y, Huerta-Espino J, Kinyua MG, Wanyera R, Njau P, Ward RW (2006) Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Reviews* 1:504. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20061054>
- Stam R, McDonald BA (2018) When resistance gene pyramids are not durable—the role of pathogen diversity. *Mol Plant Pathol* 19:521 - 524. <https://doi.org/10.1111/mpp.12636>
- Su X, Zhu G, Huang Z, Wang X, Guo Y, Li B, Du Y, Yang W, Gao J (2019) Fine mapping and molecular marker development of the Sm gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. *Theor Appl Genet* 132:871 - 882. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3242-z>
- Walker J (1930) Inheritance of *Fusarium* resistance in cabbage. *J Agric Res* 40:721 - 745

- Weber GF (1930) Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*, sp. nov. *Phytopathology* 20
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18:315 - 322
- Witsenboer H, Van de Griend E, Tiersma J, Nijkamp H, Hille J (1989) Tomato resistance to *Alternaria* stem canker: localization in host genotypes and functional expression compared to non-host resistance. *Theor Appl Genet* 78:457 - 462. <https://doi.org/10.1007/BF00290828>
- Yang H, Zhao T, Jiang J, Wang S, Wang A, Li J, Xu X (2017) Mapping and screening of the tomato *Stemphylium lycopersici* resistance gene, Sm, based on bulked segregant analysis in combination with genome resequencing. *BMC Plant Biol* 17:266. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1215-z>

2장 8절. 토마토 풋마름병 내병성 마커 개발 참고문헌

- Abebe, A.M., K.P.P. Wai, M.I. Siddique, H.-S. Mo, H.J. Yoo, Y. Jegal, S.-E. Byeon, K.-S. Jang, S.-G. Jeon, J.-E. Hwang, *et al.* (2016) Evaluation of *Phytophthora* root rot- and bacterial wilt-resistant inbred lines and their crosses for use as rootstocks in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Hort. Environ. Biotechnol.* 57: 598-605.
- Bae, C., S.W. Han, Y.R. Song, B.Y. Kim, H.J. Lee, J.M. Lee, I. Yeom, S. Heu and C.S. Oh (2015) Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1219-29.
- Caldwell, D., B.S. Kim and A.S. Iyer-Pascuzzi (2017) *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology* 107: 528-536.
- Carmeille, A., C. Caranta, J. Dintinger, P. Prior, J. Luisetti and P. Besse (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyloptype II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113: 110-21.
- Cheval, C., D. Aldon, J.-P. Galaud and B. Ranty (2013) Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 1766-1771.
- Cho, H., E.S. Song, Y.K. Lee, S. Lee, S.W. Lee, A. Jo, B.M. Lee, J.G. Kim and I. Hwang (2018) Analysis of genetic and pathogenic diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Korea. *Plant Pathol. J.* 34: 23-34.
- Dariush, D., A. Sharon, M. Gail E. and D.Y. Nevin (1994) Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 464-471.
- Daunay, M.C., H. Laterrot, J.W. Scott, P. Hanson and J.-F. Wang (2010) Tomato resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith: ancestry and peculiarities. *In*: Scott, J.W. (ed.) Report of the Tomato Genetics Cooperative, University of Florida, Wimauma, FL 33598 USA.
- Deslandes, L., J. Olivier, F. Theulieres, J. Hirsch, D.X. Feng, P. Bittner-Eddy, J. Beynon and Y. Marco (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 2404-9.
- Fegan, M. and P. Prior (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. *In*: C. Allen, P.P.a.A.C.H. (ed.) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*, APS Press, Saint Paul.
- Geethanjali, S., K.-Y. Chen, D.V. Pastrana and J.-F. Wang (2010) Development and characterization of tomato SSR markers from genomic sequences of anchored BAC clones on chromosome 6. *Euphytica* 173: 85-97.
- Han, Y.-k., J.-s. Min, J.-h. Park, K.s. Han, D.-h. Kim, J.-s. Lee and H.-h. Kim (2009) Screening of tomato cultivars resistant to bacterial wilt. *Res. Plant Dis.* 15: 198-201.
- Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathology* 29: 65-87.
- Huang, Q., X. Yan and J.-F. Wang (2012) Improved biovar test for *Ralstonia solanacearum*. *J. Microbiol. Methods.* 88: 271-274.
- Huet, G. (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 5.
- Ishihara, T., I. Mitsuhashi, H. Takahashi and K. Nakaho (2012) Transcriptome analysis of quantitative resistance-specific response upon *Ralstonia solanacearum* infection in tomato. *PLoS One* 7: e46763.
- Jeong, Y., J. Kim, Y. Kang, S. Lee and I. Hwang (2007) Genetic diversity and distribution of

- Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 91: 1277-1287.
- Jung, E.J., H.J. Joo, S.Y. Choi, S.Y. Lee, Y.H. Jung, M.H. Lee, H.G. Kong and S.-W. Lee (2014) Resistance evaluation of tomato germplasm against bacterial wilt by *Ralstonia solanacearum*. *Res. Plant Dis.* 20: 253-258.
- Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
- Kim, B., I.S. Hwang, H.J. Lee, J.M. Lee, E. Seo, D. Choi and C.S. Oh (2018) Identification of a molecular marker tightly linked to bacterial wilt resistance in tomato by genome-wide SNP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 131: 1017-1030.
- Kim, S.-M. (2018) Identification of novel recessive gene xa44(t) conferring resistance to bacterial blight races in rice by QTL linkage analysis using an SNP chip. *Theor. Appl. Genet.* 131: 2733-2743.
- Kwak, M.J., H.G. Kong, K. Choi, S.K. Kwon, J.Y. Song, J. Lee, P.A. Lee, S.Y. Choi, M. Seo, H.J. Lee, *et al.* (2018) Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nat. Biotechnol.* 36: 1100 - 1109.
- Lebeau, A., M.C. Daunay, A. Frary, A. Palloix, J.F. Wang, J. Dintinger, F. Chiroleu, E. Wicker and P. Prior (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101: 154-65.
- Lee, H.-J., E.-J. Jo, N.-H. Kim, Y. Chae and S.-W. Lee (2011) Disease responses of tomato pure lines against *Ralstonia solanacearum* strains from Korea and susceptibility at high temperature. *Res. Plant Dis.* 17: 326-333.
- Li, S., Y. Liu, J. Wang, L. Yang, S. Zhang, C. Xu and W. Ding (2017) Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in South China. *Front. Microbiol.* 8: 703-703.
- Lin, T., G. Zhu, J. Zhang, X. Xu, Q. Yu, Z. Zheng, Z. Zhang, Y. Lun, S. Li, X. Wang, *et al.* (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat. Genet* 46: 1220-6.
- Lopes, C.A. and M. Rossato (2018) History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. *Front. Microbiol.* 9: 1228-1228.
- Lowe Power, T.M., C.G. Hendrich, E.v. Roepenack Lahaye, B. Li, D. Wu, R. Mitra, B.L. Dalsing, P. Ricca, J. Naidoo, D. Cook, *et al.* (2018) Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environ. Microbiol.* 20: 1330-1349.
- Mangin, B., p. Thoquet, J. Olivier and N.H. Grimsley (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151: 1165 - 1172.
- McHale, L., X. Tan, P. Koehl and R.W. Michelmore (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol* 7: 212-212.
- Miao, C., J. Fang, D. Li, P. Liang, X. Zhang, J. Yang, J.C. Schnable and H. Tang (2018) Genotype-Corrector: improved genotype calls for genetic mapping in F2 and RIL populations. *Sci. Rep.* 8: 10088.
- Morel, A., N. Peeters, F. Vaillau, P. Barberis, G. Jiang, R. Berthomé and A. Guidot (2018) Plant Pathogenicity Phenotyping of *Ralstonia solanacearum* Strains. *In: Medina, C. and F.J. López-Baena (eds.) Host-Pathogen Interactions: Methods in Molecular Biology*, Springer, New York, NY.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Neff, M.M., E. Turk and M. Kalishman (2002) Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 18: 613-615.
- Niewohner, J., F. Salamini and C. Gebhardt (1995) Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to Gro1 and H1, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol. Breed.* 1: 65-78.
- Pascual, L., E. Albert, C. Sauvage, J. Duangjit, J.-P. Bouchet, F. Bitton, N. Desplat, D. Brunel, M.-C. Le Paslier, N. Ranc, *et al.* (2016) Dissecting quantitative trait variation in the resequencing era: complementarity of bi-parental, multi-parental and association panels. *Plant Sci.* 242: 120-130.
- Prior, P., F. Ailloud, B.L. Dalsing, B. Remenant, B. Sanchez and C. Allen (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17: 90.
- Salgon, S., M. Raynal, S. Lebon, J.M. Baptiste, M.C. Daunay, J. Dintinger and C. Jourda (2018) Genotyping by sequencing highlights a polygenic resistance to *Ralstonia*

- pseudosolanacearum in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Schell, M.A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia Solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathology* 38: 262-292.
- Scott, J.W., W. J-F. and P.M. Hanson (2005) Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. *Acta Hort.* 695: 161-172.
- Shutt, V.M., G. Shin, J.E. van der Waals, T. Goszczynska and T.A. Coutinho (2018) Characterization of *Ralstonia* strains infecting tomato plants in South Africa. *Crop Prot.* 112: 56-62.
- The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium, S. Aflitos, E. Schijlen, H. de Jong, D. de Ridder, S. Smit, R. Finkers, J. Wang, G. Zhang, N. Li, *et al.* (2014) Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J.* 80: 136-148.
- Thera, A.T., B.J. Jacobsen and O.T. Neher (2010) Bacterial Wilt of Solanaceae Caused by *Ralstonia solanacearum* Race 1 Biovar 3 in Mali. *Plant Dis.* 94: 372-372.
- Thoquet, P., J. Olivier, C. Sperisen, P. Rogowsky, L. Henri and N. Grimsley (1996) Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9: 826-836.
- Thoquet, P., J. Olivier, C. Sperisen, P. Rogowsky, P. Prior, G. Anais and N. Grimsley (1996) Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9: 837-842.
- Tomato Genome, C. (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-41.
- Tran, N.H. and B.-S. Kim (2010) Influence of Temperature, Pathogen Strain, Inoculum Density, Seedling Age, Inoculation Method and Varietal Resistance on Infection of Pepper Seedlings by *Ralstonia solanacearum*. *Hort. Environ. Biotechnol.* 51: 95-100.
- Vikal, Y. and D. Bhatia (2017) Genetics and Genomics of Bacterial Blight Resistance in Rice. *In: Li, J.Q. (ed.) Advances in International Rice Research*, Intechopen.
- Vincze, T., J. Posfai and R.J. Roberts (2003) NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691.
- Wang, J.-F., P. Hanson and J.A. Barnes (1998) Worldwide Evaluation of an International Set of Resistance Sources to Bacterial Wilt in Tomato. *In: Prior, P., C. Allen and J. Elphinstone (eds.) Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wang, J.-F., Jocelyne Olivier, Philippe Thoquet, Brigitte Mangin, Laurent Sauviac and N.H. Grimsley (2000) Resistance of Tomato Line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan Is Controlled Mainly by a Major Strain-Specific Locus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 6-13.
- Wang, J.-F., F.-I. Ho, H.T.H. Truong, S.-M. Huang, C.H. Balatero, V. Dittapongpitch and N. Hidayati (2013) Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190: 241-252.
- Wang, Y., Y. Zhang, Z. Gao and W. Yang (2018) Breeding for Resistance to Tomato Bacterial Diseases in China: Challenges and Prospects. *Horticultural Plant Journal* 4: 193-207.
- Wei, C., J. Liu, A.N. Maina, F.B. Mwaura, J. Yu, C. Yan, R. Zhang and H. Wei (2017) Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virol. Sin.* 32: 476-484.
- Yuliar, Y.A. Nion and K. Toyota (2015) Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 30: 1-11.
- Zeng, H., L. Xu, A. Singh, H. Wang, L. Du and B.W. Poovaiah (2015) Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 6.
- Zhao, Y., W. Liu, Y.-P. Xu, J.-Y. Cao, J. Braam and X.-Z. Cai (2013) Genome-wide identification and functional analyses of calmodulin genes in Solanaceousspecies. *BMC Plant Biol.* 13: 70.

2장 9절. 토마토 세균성 궤양병 저항성 연관 QTL mapping

- Abebe, A. M., Choi, J., Kim, Y., Oh, C.-S., Yeam, I., Nou, I.-S., *et al.* (2020) Development of diagnostic molecular markers for marker-assisted breeding against bacterial wilt in tomato. *Breed Sci* 70, 462-473. doi: 10.1270/jsbbs.20027

- Bae, C., Han, S. W., Song, Y. R., Kim, B. Y., Lee, H. J., Lee, J. M., *et al.* (2015) Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor. Appl. Genet.* 128, 1219-1229. doi: 10.1007/s00122-015-2521-1
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., *et al.* (2008) Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.* 146, 1797-1809. doi: 10.1104/pp.107.115188
- Bartkiewicz, A., Chilla, F., Terefe-Ayana, D., Lübeck, J., Strahwald, J., Tacke, E., *et al.* (2018) Improved genetic resolution for linkage mapping of resistance to potato wart in monoparental dihaploids with potential diagnostic value in tetraploid potato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 131, 2555-2566. doi: 10.1007/s00122-018-3172-9
- Basim, H., Basim, E., Tombuloglu, H., Unver, T. (2021) Comparative transcriptome analysis of resistant and cultivated tomato lines in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Genomics* 113, 2455-2467. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.05.033
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data *Bioinformatics* 30, 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Chalupowicz, L., Zellermaun, E. M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., *et al.* (2012) Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102, 23-31. doi: 10.1094/PHYTO-05-11-0135
- Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K. (1992) Reductions in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Dis.* 76, 805-809. doi: 10.1094/PD-76-0805
- Coaker, G. L., Francis, D. M. (2004) Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1047-1055. doi: 10.1007/s00122-003-1531-6
- Coaker, G. L., Willard, B., Kinter, M., Stockinger, E. J., Francis, D. M. (2004) Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 1019-1028. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.9.1019
- Core Team, R. (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna.
- Crino, P., Veronese, P., Stamigna, C., Saccardo, F., Chiaretti, D., Lai, A., *et al.* (1995) Breeding for resistance to bacterial canker in Italian tomatoes for fresh market. *Acta Hort.* 412, 539-545. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.412.65
- Dempewolf, H., Baute, G., Anderson, J., Kilian, B., Smith, C., Guarino, L. (2017) Past and future use of wild relatives in crop breeding. *Crop Sci.* 57, 1070-1082. doi: 10.2135/cropsci2016.10.0885
- Deng, Y., Ning, Y., Yang, D. L., Zhai, K., Wang, G. L., He, Z. (2020) Molecular basis of disease resistance and perspectives on breeding strategies for resistance improvement in crops. *Mol. Plant* 13, 1402-1419. doi: 10.1016/j.molp.2020.09.018
- DeYoung, B. J., Innes, R. W. (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* 7, 1243-1249. doi: 10.1038/ni1410
- Forster, R. L., Echandi, E. (1973) Relation of age of plants, temperature and inoculum concentration to bacterial canker development in resistant and susceptible *lycopersicon* spp. *Phytopathology* 63, 773-777. doi: 10.1094/Phyto-63-773
- Francis, D. M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., Clair, D. S. (2001) Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis.* 85, 1171-1176. doi: 10.1094/PDIS.2001.85.11.1171
- Gardner, R. G., Shoemaker, P. B., Echandi, E. (1990) Evaluation of tomato lines for resistance to bacterial canker in North Carolina. TGC report 40, 10-12.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., *et al.* (2008) The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190, 2138-2149. doi: 10.1128/jb.01595-07
- Gupta, P., Dholaniya, P. S., Devulapalli, S., Tawari, N. R., Sreelakshmi, Y., Sharma, R. (2020) Reanalysis of genome sequences of tomato accessions and its wild relatives: development of Tomato Genomic Variation (TGV) database integrating SNPs and INDELS polymorphisms. *Bioinformatics* 36, 4984-4990. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa617
- Hausbeck, M. K., J. Bell, C. Medina-Mora, R. Podolsky, Fulbright, D. W. (2000) Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in

- the field. *Phytopathology* 90, 38-44. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.1.38
- Hwang, I. S., Oh, E. J., Lee, H. B., Oh, C. S. (2019) Functional characterization of two cellulase genes in the gram-positive pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* for wilting in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32, 491-501. doi: 10.1094/MPMI-08-18-0227-R
- Hwang, I. S., Oh, E. J., Oh, C. S. (2020) Transcriptional changes of plant defense-related genes in response to *Clavibacter* infection in pepper and tomato. *Plant Pathol. J.* 36, 450-458. doi: 10.5423/PPJ.OA.07.2020.0124
- Illa-Berenguer, E., Van Houten, J., Huang, Z., van der Knaap, E. (2015) Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theor. Appl. Genet.* 128, 1329-1342. doi: 10.1007/s00122-015-2509-x
- Kabelka, E., Franchino, B., Francis, D. M. (2002) Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 92, 504-510. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.5.504
- Kim, B., Hwang, I. S., Lee, H. J., Lee, J. M., Seo, E., Choi, D., *et al.* (2018) Identification of a molecular marker tightly linked to bacterial wilt resistance in tomato by genome-wide SNP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 131, 1017-1030. doi: 10.1007/s00122-018-3054-1
- Knaus, B. J., Grünwald, N. J. (2017) vcfR: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Mol. Eco. Resour.* 17, 44-53. doi: 10.1111/1755-0998.12549
- Kourelis, J., van der Hoorn, R. A. L. (2018) Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell* 30, 285-299. doi: 10.1105/tpc.17.00579
- Lara-Avila, J. P., Isordia-Jasso, M. I., Castillo-Collazo, R., Simpson, J., Alpuche-Solís, Á. G. (2012) Gene expression analysis during interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 498-511. doi: 10.1007/s11105-011-0348-8
- Lee, J. M., Oh, C. S., Yeom, I. (2015) Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breed. Biotech.* 3, 308-322. doi: 10.9787/pbb.2015.3.4.308
- Li, H., Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, J. B., Sun, Y. D., Liu, H., Wang, Y. Y., Jia, Y. L., Xu, M. H. (2015) Natural variation of rice blast resistance gene Pi-d2. *Genet. Mol. Res.* 14, 1235-1249. doi: 10.4238/2015.February.13.2
- Li, T.-G., Wang, B.-L., Yin, C.-M., Zhang, D.-D., Wang, D., Song, J., *et al.* (2019) The *Gossypium hirsutum* TIR-NBS-LRR gene GhDSC1 mediates resistance against verticillium wilt. *Mol. Plant Pathol.* 20, 857-876. doi: 10.1111/mpp.12797
- Liang, X., Zhou, J.-M. (2018) Receptor-like cytoplasmic kinases: central players in plant receptor kinase - mediated signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 267-299. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040540
- Luo, H., Pandey, M. K., Khan, A. W., Wu, B., Guo, J., Ren, X., *et al.* (2019) Next-generation sequencing identified genomic region and diagnostic markers for resistance to bacterial wilt on chromosome B02 in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Biotechnol. J.* 17, 2356 - 2369 doi: 10.1111/pbi.13153
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., *et al.* (2010) The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297-1303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- Michelmore, R. W., Paran, I., Kassel, R. V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9828-9832. doi: 10.1073/pnas.88.21.9828
- Mohd Nadzir, M. M., Vieira Lelis, F. M., Thapa, B., Ali, A., Visser, R. G. F., van Heusden, A. W., *et al.* (2019) Development of an in vitro protocol to screen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pathogenicity in different *Solanum* species. *Plant Pathol.* 68, 42-48. doi: 10.1111/ppa.12923
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325. doi: 10.1093/nar/8.19.4321
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., Yuan, Z. C. (2018) *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2036-2050. doi: 10.1111/mpp.12678
- Peritore-Galve, F. C., Miller, C., Smart, C. D. (2020) Characterizing colonization patterns of *Clavibacter michiganensis* during infection of tolerant wild *Solanum* species. *Phytopathology*

- 110, 574-581. doi: 10.1094/phyto-09-19-0329-r
- Poysa, V. (1993) Evaluation of tomato breeding lines resistant to bacterial canker. *Canadian J. Plant Pathol.* 15, 301-304. doi: 10.1080/07060669309501927
- Rao, Y., Ran, J., Sheng, W., Xianmei, W., Hanfei, Y., Chenyang, P., *et al.* (2021) SPL36 encodes a receptor-like protein kinase that regulates programmed cell death and defense responses in rice. *Rice* 14, 34-47. doi: 10.1186/s12284-021-00475-y
- Ruangrak, E., Su, X., Huang, Z., Wang, W., Gua, Y., Du, Y., *et al.* (2018) Fine mapping of a major QTL controlling early flowering in tomato using QTL-seq. *Canadian J. Plant Sci.* 98, 672-682. doi: 10.1139/cjps-2016-0398
- Sandbrink, J. M., van Ooijen, J. W., Purimahua, C. C., Vrieling, M., Verkerk, R., Zabel, P., *et al.* (1995) Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 90, 444-450. doi: 10.1007/BF00221988
- Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., *et al.* (2012) The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *J. Proteome Res.* 11, 736-750. doi: 10.1021/pr200646a
- Sen, Y. (2014) Bacterial canker resistance in tomato. Dissertation. Wageningen: Wageningen University
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Visser, R. G. F., van Heusden, A. W. (2013) Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* 190, 309-317. doi: 10.1007/s10681-012-0802-1
- Sen, Y., van der Wolf, J., Visser, R. G. F., van Heusden, S. (2015) Bacterial canker of tomato: Current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Dis.* 99, 4-13. doi: 10.1094/pdis-05-14-0499-fe
- Smith, E. F. (1910) A new tomato disease of economic importance. *Science* 31, 794-796.
- Sotirova, V., Bogatsevska, N., Stamova, L. (1994) Sources of resistance to bacterial disease in tomato wild species. *Acta Hort.* 376, 353-359. doi: 10.17660/ActaHortic.1994.376.49
- Steekelenburg, V. (1985) Resistance to *Corynebacterium michiganensis* in tomato genotypes. *Euphytica* 34, 245-250. doi: 10.1007/BF00022916
- Stüwe, B., von Tiedemann, A. (2013) Bacterial canker of tomatoes – histological characterization of cultivar resistance and seed transmission. *J. Plant Dis. Protect.* 120, 194-200. doi: 10.1007/bf03356474
- Sueldo, D. J., Shimels, M., Spiridon, L. N., Caldararu, O., Petrescu, A. J., Joosten, M. H., *et al.* (2015) Random mutagenesis of the nucleotide-binding domain of NRC1 (NB-LRR Required for Hypersensitive Response-Associated Cell Death-1), a downstream signalling nucleotide-binding, leucine-rich repeat (NB-LRR) protein, identifies gain-of-function mutations in the nucleotide-binding pocket. *New Phytol.* 208, 210-223. doi: 10.1111/nph.13459
- Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., *et al.* (2013) QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J.* 74, 174-183. doi: 10.1111/tbj.12105
- Takishita, Y., Charron, J.-B., Smith, D. L. (2018) Biocontrol rhizobacterium *Pseudomonas* sp. 23S induces systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) against bacterial canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Front. Microbiol.* 9, 2119-2132. doi: 10.3389/fmicb.2018.02119
- Takken, F. L. W., Albrecht, M., Tameling, W. I. L. (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 383-390. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.009
- Tameling, W. I. L., Elzinga, S. D. J., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L. W., Haring, M. A., *et al.* (2002) The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14, 2929-2939. doi: 10.1105/tpc.005793
- Tameling, W. I. L., Vossen, J. H., Albrecht, M., Lengauer, T., Berden, J. A., Haring, M. A., *et al.* (2006) Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant Physiol.* 140, 1233-1245. doi: 10.1104/pp.105.073510
- Tang, D., Wang, G., Zhou, J.-M. (2017) Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *Plant Cell* 29, 618-637. doi: 10.1105/tpc.16.00891
- Tang, J., Wang, Y., Yin, W., Dong, G., Sun, K., Teng, Z., *et al.* (2019) Mutation of a nucleotide-binding leucine-rich repeat immune receptor-type protein disrupts immunity to bacterial blight. *Plant Physiol.* 181, 1295-1313. doi: 10.1104/pp.19.00686
- Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635-641. doi: 10.1038/nature11119
- Tsiantos, J. (1987) Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J. Phytopathol.* 119, 142-146. doi: 10.1111/j.1439-0434.1987.tb00476.x

- van Heusden, A. W., Koornneef, M., Voorrips, R. E., Brüggemann, W., Pet, G., Ginkel, R. V.-v., *et al.* (1999) Three different QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* 99, 1068 - 1074. doi: 10.1007/s001220051416
- van Ooijen, G., Mayr, G., Albrecht, M., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W. (2008) Transcomplementation, but not physical association of the CC-NB-ARC and LRR domains of tomato R protein Mi-1.2 is altered by mutations in the ARC2 subdomain. *Mol Plant* 1, 401-410. doi: 10.1093/mp/ssn009
- van Ooijen, G., van den Burg, H. A., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W. (2007) Structure and function of resistance proteins in Solanaceous plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 43-72. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094430
- Wang, Y., Zhang, Y., Gao, Z., Yang, W. (2018) Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Hortic. Plant J.* 4, 193-207. doi: 10.1016/j.hpj.2018.08.004
- Wen, J., Jiang, F., Weng, Y., Sun, M., Shi, X., Zhou, Y., *et al.* (2019) Identification of heat-tolerance QTLs and high-temperature stress-responsive genes through conventional QTL mapping, QTL-seq and RNA-seq in tomato. *BMC Plant Biol.* 19, 398-414. doi: 10.1186/s12870-019-2008-3
- Wu, S., Qiu, J., Gao, Q. (2019) QTL-BSA: A bulked segregant analysis and visualization pipeline for QTL-seq. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 11, 730 - 737. doi: 10.1007/s12539-019-00344-9
- Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Wang, S., Wang, A., Li, J., *et al.* (2017) Mapping and screening of the tomato *Stemphylium lycopersici* resistance gene, Sm, based on bulked segregant analysis in combination with genome resequencing. *BMC Plant Biol.* 17, 266-275. doi: 10.1186/s12870-017-1215-z
- Yang, X., Deng, F., Ramonell, K. M. (2012) Receptor-like kinases and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Front. Biol.* 7, 155-166. doi: 10.1007/s11515-011-1185-8
- Zhang, M., Wang, S., Yuan, M. (2019) An update on molecular mechanism of disease resistance genes and their application for genetic improvement of rice. *Mol. Breed.* 39, 154-166. doi: 10.1007/s11032-019-1056-6
- Zou, C., Wang, P., Xu, Y. (2016) Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1941-1955. doi: 10.1111/pbi.12559

2장 10절. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 저항성 분자마커 개발

- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M and Levin I (2009) Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119:519-530
- Brunt AA and Cohen S (1988) Tomato yellow leaf curl virus bigeminivirus. *Plant viruses online. Descriptions and lists from the VIDE database.*
- Cho JD, Kim TS, Kim JH, Choi GS, Chung BN, Choi HS and Kim JS (2008) Convenient virion capture (VC)/PCR for Tomato yellow leaf curl geminivirus Occurring on Tomato in Korea. *Research in Plant Disease* 14:233-237
- Cohen S and Antignus Y (1994) Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in Disease Vector Research* 10:259-288
- Cohen S and Harpaz I (1964) Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci gennadous*) 1. *Entomologia experimentalis et Applicata* 7:155-166
- Cohen S and Nitzany FE (1966) Transmission and host range of the Tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56:1127-1131
- Cooke RJ, Bredemeijer GMM, Ganai MW, Peeters R, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Areshchenkova T, Dijcks M, Laborie D, Bertrand L and Vosman B (2003) Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci. *Euphytica* 132:331-341
- Czosnek H and Laterrot H (1997) A worldwide survey of Tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142:1391-1406
- Friedman M, Levin CE, Lee SU, Kim HJ, Lee IS, Byun JO and Kozukue N (2009) Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5727-5733

- Hanson P, Green S and Kuo G (2006) Ty2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetic Cooperative Report* 56:17-18
- He C, Poysa V and Yu K (2003) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 106:363-373
- Hoogstraten JGJ and Braun C (2005) Methods for coupling resistance alleles in tomato. Patent WO/2005/079342
- Hutton S. F, Scott J. W (2014) Ty-6, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. *Rept. Tomato Genet. Coop.* 64 14 - 18.
- Ji Y and Scott JW (2006) Ty-3, a begomovirus resistance locus linked to Ty-1 on chromosome 6. *Rpt. Tomato Genet. Coop.* 56:22-25.
- Ji Y, Schuster DJ and Scott JW (2007) Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20:271-284
- Ji Y, Scott JW, David J and Schuster J (2009) Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. *The American Society for Horticultural Science* 134:281 - 288
- Konieczny A and Ausubel FM (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 4:403-410
- Lapidot M and Friedmann M (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140:467-476
- Levin I, Karniel U, Fogel D, Reuveni M, Gelbart D, Evenor D, Chen L, Nahon S, Shlomo H, Machbosh Z and Lapidot M (2013) Cloning and analysis of the Tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-5. In: *Proceedings of the tomato breeders roundtable, Chaing-Mai, Thailand.*
- Moriones E and Navas-Castillo J (2000) Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71:123-134
- Murray MG and Thomson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325.
- Park JI, Kim HT, Kim JG, Shin JK and Nou IS. (2000) Identification of species using phenotypic traits and RAPD analysis in introduced tomato allies. *The Korean Society of Breeding Science* 32:64-73
- Park YH, West MA and St Clair DA (2004) Evaluation of AFLPs for germplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome / National Research Council Canada* 47:510518
- Seller M and Bechmann JS (1983) Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 67:25-3
- Stevens MR, Lamb EM and Rhoads DD (1995) Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 90:451-456
- van Ooijen JW, Sandbrink JM, Vrieling M, Verkerk R, Zabel P and Lindhout P (1994) An RFLP linkage map of *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:1007-1013
- Verlaan MG, Szinay D, Hutton SF, de Jong H, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW and Bai YL (2011) Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene Ty-1. *The Plant Journal* 68:1093-1103
- Yamaguchi H, Ohnishi J, Saito A, Ohyama A, Nunome T, Miyatake K (2018) An NB-LRR gene, TYNBS1, is responsible for resistance mediated by the Ty2 Begomovirus resistance locus of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 131:1345 - 1362
- Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfati M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD and Czosnek H (1994) Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. *Theoretical and Applied Genetics* 88:141-146
- Zhang YP, and Stommel JR (1997) Development of SCAR and CAPS markers linked to the beta gene in tomato. *Crop Science* 41:1602-1608

2장 11절. 토마토틱록바이러스(ToCV) 접종법 확립 및 저항성 유전자원 확보

Fiallo-Olivé, E., and Navas-Castillo, J. (2019) Tomato chlorosis virus, an emergent plant virus

still expanding its geographical and host ranges. *Mol. Plant Pathol.* 20:1307-1320.
Mansilla-Córdova, P.J., Bampi, D., Rondinel-Mendoza, N.V., Melo, P.C.T., Lourenção,
A.L. and Rezende, J.A.M. (2018) Screening tomato genotypes for resistance and tolerance
to *Tomato chlorosis virus*. *Plant Pathol.* 67, 1231 - 1237.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

프로젝트명	(국문) 토마토 내병성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화				
	(영문) Development of disease resistance molecular markers and acceleration of the Marker-assisted breeding(MAB) technology in tomatoes				
프로젝트 연구기관	부산대학교		프로젝트 연구책임자	(소속) 부산대학교	
참여기업				(성명) 박영훈	
총연구개발비 (1,258,000천원)	계	1,258,000천원	총 연구 기간	2017.01.01.~2021.12.31.(5년)	
	정부출연 연구개발비	1,258,000천원	총 참여 연구원 수	총 인원	113
	기업부담금			내부인원	80
	연구기관부담금			외부인원	33

○ 연구개발 목표 및 성과

- 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발
 - 선충, 곰팡이저항성 유전자 연관 분자표지 개발
 - 세균 및 바이러스저항성 유전자 연관 분자표지 개발
 - 저항성 유전자원 수집, 평가 및 등록
- 복합내병성 분자표지이용육종 기술 고도화 시스템 구축
 - 내병성 유전자 도입 및 집적 효율성 제고
- 토마토 내병성 선발용 분자표지 개발
 - 선충저항성 품종 병리검정 및 기 보고된 마커-저항성 연관 분석
 - 곰팡이병 (흰가루, 근부위조병, 회색잎점무늬병, 흑색잎곰팡이병) 병리검정 시스템 구축, 저항성 유전자원 확보, 마커개발용 유전 집단양성
 - 세균병(세균성 점무늬병, 궤양병, 줄기썩음병), 바이러스병(TYLCV, TSWV, ToCV), 병리검정 시스템 구축, 저항성 유전자원 확보, 마커개발용 유전 집단양성
 - 기 개발된 관련 분자표지 정보탐색 및 국내 육종소재 적용성 검정
 - NGS-GBS, BSA, RNA-seq, SNP array 등을 이용한 저항성 연관 신규 분자표지 탐색
- 내병성 유전자 도입, 집적을 위한 분자표지이용육종 기술 고도화
 - 유전자 도입 효율성 극대화를 위한 정밀 MAS 시스템 설계 및 적용
 - 집적된 복합내병성 계통의 육종 중간 모본화 전략 수립
 - 내병성 마커와 GBS 기반 MABC를 통한 복합내병성, 응성불임-단위결과성 우량계통 육성

○ 연구내용 및 결과

- 기 개발된 토마토 내병성 MAS용 분자마커에 대한 성능을 검증하였으며 마커-표현형 정보와 일치하지 않는 마커에 대한 보완사항에 대해 파악하고 개선을 진행함
- 근부위조병(FCRR) F2 분리집단 양성 및 저항성 유전자위(*Fr1*) 연관 분자마커 개발
- 회색잎점무늬병(GLS) 저항성 유전자원 확보 및 기존 품종들의 병리검정 후 저항성 연관 염색체 영역 으로부터 분자마커 개발
- 흰가루병 저항성 마커로 *ol-2* 유전자 기반 마커 개발 및 핵심집단의 GWAS 분석을 통해 QTL 연관 SNP 분자마커 개발
- 흑색잎곰팡이(BLM) 저항성 유전자원을 확보하고, 핵심집단의 GWAS와 저항성 야생종 염색체 이입계 통을 이용하여 SNP 분자마커를 개발
- *Bwr6*, *Bwr12* 저항성 유전자좌 고밀도 유전자지도 작성을 통한 풋마름병 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발
- *Rcm* 저항성 유전자좌 정밀화를 통한 궤양병 저항성후보 유전자기반 마커 개발
- TYLCV 저항성 유전자좌 조합과 바이러스 strain간의 상호작용 확립을 통한 저항성 유전자좌 최적 조합 선발
- TYLCV 저항성 유전자(*Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5*) 기반 마커 개발
- ToCV 신규 마커 개발을 위한 유전자원 확보 및 검증법 확립

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 근부위조병 저항성 유전자 선발용 마커를 개발하여 육종회사의 MAS에 활용하고 있으며, 2017년에 특허출원 하였음.
- 흰가루 저항성 유전자 *ol-2*의 신규 대립유전자를 가진 유전자원을 선발 하였으며, 이를 토대로 개발된 마커를 2017년에 특허출원, 2018년에 특허등록 하였음. 이 저항성 계통과 마커를 세트로 하여 MAS에 적용하고 있음.
- *ol-2* 마커에 대한 연구결과는 ‘Development of DNA markers for *Slmlol1.1*, a new mutant allele of the powdery mildew resistance gene *SlMlo1* in tomato (*Solanum lycopersicum*)’의 제목으로 2018에 Genome 저널에 발표 되었음.
- 토마토 흰가루병 저항성 QTL 연관 단일염기서열변이(SNP) 분자표지에 대해 2020년에 특허출원, 2021년에 특허등록 하였음. 향후 마커 검증을 재 확인 후 MAS에 활용할 계획임.
- 회색잎점무늬병 저항성 마커개발의 결과는 ‘Host reactin of tomato varieties and applicability of sm-linked DNA markers to *Stemphylium lycopersici*’의 제목으로 Mole. Breeding 저널에 2020에 출판되었으며, 현재 육종회사의 MAS에 활용되고 있음
- 4차년도에 본 연구과제의 주제인 풋마름병 관련하여 ‘Development of diagnostic molecular markers for marker-assisted breeding against bacterial wilt in tomato’ 제목으로 Breeding Science(SCIE 저널)에 출판하였음.
- 5차년도에 본 연구과제의 주제인 TYLCV 관련하여 ‘Development and Application of Gene-Specific Markers for Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in Both Field and Artificial Infections’ 제목으로 Plants(SCIE 저널)에 출판하였음.
- 5차년도에 본 연구과제의 주제인 궤양병 관련하여 ‘QTL-Seq Analysis for Identification of Resistance Loci to Bacterial Canker in Tomato’ 제목으로 Front in Plant Science(SCIE 저널)에 출판하였음.

- 5차년도에 본 연구과제의 주제인 풋마름병 관련하여 ‘풋마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 풋마름병 저항성 토마토 선발 방법’ 명칭으로 지식재산권 등록하였음.
- 5차년도에 본 연구과제의 주제인 궤양병 관련하여 ‘궤양병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 궤양병 저항성 토마토 선발 방법’ 명칭으로 지식재산권 출원하였음.
- 토마토 궤양병 저항성 토마토 판별용 SNP 마커를 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 청고병저항성 토마토를 확보하는데 활용할 수 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음.
- 풋마름병 저항성 토마토 선발을 위한 프라이머 세트 및 풋마름병 저항성 토마토 선발방법을 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 풋마름병 저항성 토마토를 확보하는데 활용할 수 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음.
- TYLCV 저항성 유전자들인 *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* 각각에 대한 마커 개발내용과 이들 저항성 집적에 따른 저항성 범위 및 정도 증가 효과 분석결과를 종합하여 특허 출원을 계획하고 있으며 이러한 기술을 국내 관련 종자회사 및 국가 연구기관에 기술이전 하겠음.
- ToCV 저항성 유전자를 이용한 ToCV 저항성 유전자 좌를 탐색하여 후보 유전자를 선발하고 후보 유전자 기반 마커를 개발 계획 중임.

[별첨 2]

자체평가보고서

사업단명	GSP원예종자사업단	과제번호	213007055CGF00		
프로젝트명	토마토 내병성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화				
프로젝트연구기관	부산대학교				
연구담당자	프로젝트 연구책임자	박영훈			
	세부프로젝트 연구책임자	기관(부서)	경북대학교	성명	이제민
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
연구기간	총기간	2017.01.01.~2021.12.31	당해연도기간	2021.01.01.~12.31	
연구비(천원)	총규모	1,258,000	당해연도규모	257,000	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 어느 정도 얻음 얻지 못함

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내매 출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 추진 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비SCI		수 집	등 록					
최종목표			5	4	10		0		10					10

연구기간 내 달성실적			8	8	15		12		10					24
달성율(%)			160	200	150		120 0		100					240

3. 연구개발 성과 세부 내용

3-1 기술적 성과

- 토마토 내병성 형질 선발용 분자마커 기술 개발 및 실용화
- 토마토 병 저항성 병리검정 기술 구축
- 토마토 분자마커이용여교잡 기술 구현

3-2 과학적 성과

- 국제 SCI 논문 다수 게재
- 국내외 학회 발표 및 성과 홍보

3-3 경제적 성과

- 민간육종회사 MAS/MABC 기술 지원 및 육종비용 저감효과
- 내병성 품종육종을 통한 병방제 비용 저감 효과

3-4 사회적 성과

- 저농약 재배를 유도함으로써 환경오염 방지 및 국민 건강에 기여
- 민간육종회사에 분자마커 기술 보급

3-5 인프라 성과

- 분자육종 전문인력 양성
- 분자육종기술 인프라 구축

4. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

5. 경제적인 측면에서 종자산업의 수출증대와 수입대체에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

6. 얻어진 성과와 발표상황

6-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익 수 익 :
- 기업 등에의 기술이전 기업명 :
- 기술지도 등 기업명 :

6-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록 출원 8건, 등록 8건
- 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

6-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재 2건
- 해외 학술지 게재 13건
- 국내 학·협회 발표 5건
- 국내 세미나 발표 건
- 기 타 건

6-4 인력양성효과

- 석 사 22명
- 박 사 2명
- 기 타 명

6-5 수상 등

- 있다 상 명칭 및 일시 :
 한국원예학회 우수논문상, 2021년 5월
 제 31회 한국과학기술단체총연합회 과학기술우수논문상, 2021년 9월
 제 29회 화농상, 2021년 12월
- 없다

6-6 마스크 등의 PR

- 있다 건
- 없다

7. 연구개발 착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오.

8. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

9. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡
(근거 : _____)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구 성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구 성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는? (※중간·단계평가에 한함)

충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는? (※중간·단계평가에 한함)

확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
프로젝트 책임자	부산대학교	교수	박영훈 (인)

[별첨 3]

연구성과 활용계획서 (2017~2021)

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
프로젝트명	토마토 내병성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화			
프로젝트 연구기관	부산대학교	프로젝트연구책임자	박영훈	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,258,000,000			1,258,000,000
연구개발기간	2017.01.01. ~ 2021.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
F2 분리집단 맵핑을 통한 근부위조병 저항성 분자마커 개발	저항성 유전자와 근접한 마커를 개발하였으며 현재 MAS에 활용되고 있음
GLS 병리검정 체계구축 및 내병성 자원선발	병리검정 기술확립을 통해 다수 저항성 품종을 확보
GLS 저항성 분자마커 개발	기존 보고된 마커보다 정교한 마커를 개발
F2 분리집단을 이용한 흰가루 저항성 분자마커 개발	ol-2 유전자 기반 마커를 개발함
GWAS를 이용한 흰가루 저항성 QTL 분석	4개의 주요 QTL 및 연관 SNP를 개발
GWAS 및 IL을 이용한 BLM QTL 분석	4개의 염색체로부터 연관 SNP를 개발
<i>Bw6</i> , <i>Bw12</i> 저항성 유전자좌 고밀도 유전자지도 작성을 통한 청고병 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발	<i>Bw6</i> , <i>Bw12</i> 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발
<i>Rcm</i> 저항성 유전자좌 정밀화를 통한 궤양병 저항성 후보 유전자기반 마커 개발	<i>Rcm 6</i> 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발
TYLCV 저항성 유전자좌 조합과 바이러스 strain간의 상호작용 확립을 통한 저항성 유전자좌 최적 조합 선발	TYLCV 저항성 최적 유전자 조합 확립
TYLCV 저항성 유전자(<i>Ty-2</i> , <i>Ty-4</i> , <i>ty-5</i>) 기반 마커 개발	TYLCV 저항성 유전자(<i>Ty-2</i> , <i>Ty-4</i> , <i>ty-5</i>) 기반 마커 개발
ToCV 신규 마커 개발을 위한 유전자원 확보 및 접종법 확립	ToCV 저항성 유전자원 확보 및 접종법 확립

3. 연구비 집행실적 (2017~2021)

구분	세부프로젝트명	금액		잔액	비고
		계획금액	사용액		
1차년도	1세부: 토마토 곰팡이, 선충병 저항성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화	140,000,000	140,000,000	0	이자 포함
	2세부: 토마토 세균 및 바이러스병 저항성 분자표지 개발	120,000,000	120,023,700	0	이자 포함
2차년도	1세부: 토마토 곰팡이, 선충병 저항성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화	133,000,000	133,000,000	0	이자 포함
	2세부: 토마토 세균 및 바이러스병 저항성 분자표지 개발	114,000,000	116,791,720	0	이자, 이월금 포함
3차년도	1세부: 토마토 곰팡이, 선충병 저항성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화	133,000,000	133,000,000	0	이자 포함
	2세부: 토마토 세균 및 바이러스병 저항성 분자표지 개발	114,000,000	114,643,920	0	이자, 이월금 포함
4차년도	1세부: 토마토 곰팡이, 선충병 저항성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화	133,000,000	133,000,000	0	이자 포함
	2세부: 토마토 세균 및 바이러스병 저항성 분자표지 개발	114,000,000	115,059,220	0	이자, 이월금 포함
5차년도	1세부: 토마토 곰팡이, 선충병 저항성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화	138,000,000	138,000,000	0	이자 포함
	2세부: 토마토 세균 및 바이러스병 저항성 분자표지 개발	119,000,000	94,922,598	24,077,402	이자 포함
총계		1,258,000,000	1,238,441,158	24,077,402	

4. 연구목표 대비 성과

성과지표구분	단위	최종			1차년도			2차년도			3차년도			4차년도			5차년도		
		실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률	실적	목표	달성률
		제품경쟁력	건	15	10	150	3	2	150	3	2	150	2	2	100	4	2	200	3
논문 SCI																			
논문 비SCI																			
품종 지역 적응성 검정																			

	유전자원등록		10	10	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	
	계통선발																				
	저장성검증																				
	마커분석																				
	분자마커개발		26	0	260 0	5	0	500	8	0	800	5	0	500	4	0	400	4	0	400	
	RT-PCR 바이러스 검정																				
권리 확보	품종출원	건																			
	품종등록																				
	특허출원		8	5	160	3	1	300	1	1	100	1	0	100	2	2	100	1	1	100	
	특허등록		8	4	200	1	0	100	2	1	200	1	1	100	2	0	200	2	0	200	
생산 역량 강화	종자생산수량	kg																			
	국내외 생산기지 구축	개소																			
	인력양성	건	24	10	240	4	2	200	5	2	250	3	2	150	5	2	250	7	2	350	
	중간모본육성																				
	종자발아력 검정																				
	기술이전																				
	생산량검정																				
	종구보급	만구																			
	무병묘품종수 (원월종)	건																			
유통 경력 강화	품종생산 판매신고	건																			
	유통채널구축																				
	MOU체결																				
홍보 역량 강화	국내외 전시포/시범 포 개설	개소																			
	국내외 전시포/시범포 운영	건																			
	홍보물 제작																				

	품종평가회/ 설명회 개최																			
목표 고객	판매국가	건																		
	판매국가(누적)																			
	해외 판매																			
	국내판매업체																			
	국내판매업체 (누적)																			
	판매업체																			
	판매업체(누적)																			
	품종인지도	점수																		
	무병묘보급율	%																		
매출 및 수출	국내매출액	백만 원																		
	종자수출액	만불																		

5. 핵심기술

구분	핵심기술 명
1	F2 분리집단 맵핑을 통한 근부위조병 저항성 분자마커 개발
2	GLS 병리검정 체계구축 및 내병성 자원선발
3	GLS 저항성 분자마커 개발
4	F2 분리집단을 이용한 흰가루 저항성 분자마커 개발
5	GWAS를 이용한 흰가루 저항성 QTL 분석 및 SNP 마커 개발
6	GWAS 및 IL을 이용한 BLM QTL 분석 및 SNP 마커 개발
	MAS와 GBS-기반 MABC를 통한 복합내병성 품종 개발
7	<i>Bw6</i> , <i>Bw12</i> 저항성 유전자와 고밀도 유전자지도 작성을 통한 풋마름병 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발
8	<i>Rcm</i> 저항성 유전자와 정밀화를 통한 케양병 저항성후보 유전자기반 마커 개발
9	TYLCV 저항성 유전자와 조합과 바이러스 strain간의 상호작용 확립을 통한 저항성 유전자와 최적 조합 선발
10	TYLCV 저항성 유전자(<i>Ty-2</i> , <i>Ty-4</i> , <i>ty-5</i>) 기반 마커 개발
11	ToCV 신규 마커 개발을 위한 유전자원 확보 및 접종법 확립

6. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
F2 분리집단 맵핑을 통한 근부위조병 저항성 분자마커 개발		v			v	v				
GLS 병리검정 체계구축 및 내병성 자원선발		v		v				v		
GLS 저항성 분자마커 개발		v			v					
F2 분리집단을 이용한 흰가루 저항성 분자마커 개발		v			v	v				
GWAS를 이용한 흰가루 저항성 QTL 분석 및 SNP 마커 개발	v					v				
GWAS 및 IL을 이용한 BLM QTL 분석 및 SNP 마커 개발	v									

<i>Bw6, Bw12</i> 저항성 유전자좌 고밀도 유전자 지도 작성을 통한 풋마름병 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발	v						v			
<i>Rcm 6</i> 저항성 유전자좌 정밀화를 통한 궤양병 저항성후보 유전자기반 마커 개발	v						v			
TYLCV 저항성 유전자좌 조합과 바이러스 strain간의 상호작용 확립을 통한 저항성 유전자좌 최적 조합 선발		v								
TYLCV 저항성 유전자 (<i>Ty-2, Ty-4, ty-5</i>) 기반 마커 개발		v								
ToCV 신규 마커 개발을 위한 유전자원 확보 및 접종법 확립		v								

7. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술 명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
F2 분리집단 맵핑을 통한 근부위조병 저항성 분자마커 개발	근부위조병 저항성 유전자 연관 마커를 이용하여 다양한 토마토의 내병성 MAS 적용하고, 복합내병성 토마토 및 대목 육성에 도움을 주고 있음
GLS 병리검정 체계구축 및 내병성 자원선발	다양한 GLS 저항성 품종을 판별하는 기술로 활용 될 것이며, 저항성 육종소재 탐색 및 품종개발에 도움이 될 것임
GLS 저항성 분자마커 개발	GLS 저항성 유전자 연관 마커를 이용하여 다양한 토마토의 내병성 MAS 적용하고, 복합내병성 토마토 및 대목 육성에 도움을 주고 있음
F2 분리집단을 이용한 흰가루 저항성 분자마커 개발	흰가루 저항성 유전자 기반 마커로서 다양한 토마토의 내병성 MAS 적용하고, 복합내병성 토마토 및 대목 육성에 도움을 줄 것임
GWAS를 이용한 흰가루 저항성 QTL 분석 및 SNP 마커 개발	개발된 SNP 마커의 신뢰성 검증을 거친후 MAS에 활용될 수 있는 가치를 지니고 있음
GWAS 및 IL을 이용한 BLM QTL 분석 및 SNP 마커 개발	개발된 SNP 마커의 신뢰성 검증을 거친후 MAS에 활용될 수 있는 가치를 지니고 있음
<i>Bw6</i> , <i>Bw12</i> 저항성 유전자좌 고밀도 유전자지도 작성을 통한 풋마름병 저항성 후보 유전자 기반 마커 개발	청고병 저항성 후보 유전자 기반 마커를 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 청고병 저항성 토마토를 확보하여 청고병 저항성을 보유한 토마토 육종에 활용할 수 있으며 청고병 저항성을 가진 토마토를 육종함으로써 토마토 품질 향상에 도움을 줄 것으로 기대함.
<i>Rcm 6</i> 저항성 유전자좌 정밀화를 통한 궤양병 저항성후보 유전자기반 마커 개발	궤양병 저항성 후보 유전자 기반 마커를 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 궤양병 저항성 토마토를 확보하여 궤양병 저항성을 보유한 토마토 육종에 활용할 수 있으며 궤양병 저항성을 가진 토마토를 육종함으로써 토마토 품질 향상에 도움을 줄 것으로 기대함.
TYLCV 저항성 유전자좌 조합과 바이러스 strain	TYLCV 저항성 유전자 조합에 따른 TYLCV strain별 병 증상을 확인함으로써 TYLCV strain에 따른 TYLCV 저항성 유전자 조합을 결정 할 수 있으며 이에 전 세계적으로 확산되어 있는 TYLCV 방제 전략을 수립할 수 있음. 다양한 조합의 TYLCV 저항성 유전자 조합을 작성하여 최적의 조건을 확립하고 고품질 토마토 육종에 도움을 줄 것으로 기대함.

TYLCV 저항성 유전자 (<i>Ty-2</i> , <i>Ty-4</i> , <i>ty-5</i>) 기반 마커 개발	TYLCV 저항성 유전자(<i>Ty-2</i> , <i>Ty-4</i> , <i>ty-5</i>) 기반 마커를 이용하여 다양한 토마토에 적용하고 이에 TYLCV 저항성 토마토를 확보하여 TYLCV 저항성을 보유한 토마토 육종에 활용할 수 있으며 TYLCV 저항성을 가진 토마토를 육종함으로써 토마토 품질 향상에 도움을 줄 것으로 기대함.
ToCV 신규 마커 개발을 위한 유전자원 확보 및 집중법 확립	확보된 ToCV 저항성 유전자원을 통해 ToCV 저항성 유전자 좌 탐색에 유용하게 사용할 수 있으며 ToCV 집중법 확립을 통해 대량의 토마토 유전자원에 적용할 수 있음. ToCV 저항성 유전자 좌 탐색을 위한 연구에 도움을 줄 것으로 기대함.

8. 연구종류 후 성과창출 계획

구분	품종개발		특허		논문		분자마커	유전자원		국내매출액	종자수출액	기술이전	마케팅 전략 수립 보고서	인력양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표					2									
연구기간 내 달성실적														
연구종료 후 성과창출 계획					2									

9. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술 명			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기	
기술이전 시 선행조건			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 Golden Seed프로젝트 사업 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 Golden Seed프로젝트 사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.