

<붙임 2> 프로젝트 최종실적보고서 및 연구결과 활용계획서  
**프로젝트 최종실적보고서**

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="177 1368 387 1485" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 100px;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div>	<p>2 1 3 0 0 3 0 4 4 C G G 0 0</p> <p>토마토 품종 육성을 위한 내병성 및 원예형질 분자표지 개발</p> <p>농림축산식품부 해양수산부 농촌진흥청 산림청</p>	<p>(앞면)</p> <div data-bbox="609 459 873 546" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 20px;"> <p><b>발간등록번호</b> 11-1543000-001672-01</p> </div> <p>토마토 품종육성을 위한 내병성 및 원예형질 분자표지 개발</p> <p>Development of molecular markers for tomato breeding program to improve disease resistance and horticultural traits</p> <p>안동대학교</p> <p>농 립 축 산 식 품 부 · 해양수산부 · 농 촌 진 흥 청 · 산 립 청</p>
--	---	--

## 제 출 문

농림축산식품부장관 . 해양수산부장관 . 농촌진흥청장 . 산림청장 귀하

이 보고서를 “토마토 품종육성을 위한 내병성 및 원예형질 분자표지 개발” 프로젝트의 보고서로 제출합니다.

제 1 세부과제: 국내용 토마토 청고병/흰가루병 및 과색 관련 분자표지 개발

제 2 세부과제: 수출용 토마토 TYLCV/역병/겉무늬병 및 저장성 관련 분자표지 개발

제 1 세부위탁과제: 토마토 과색 관련 분자표지 개발 및 유전체기반 형질 예측 분자육종 시스템 구축

제 2 세부위탁과제: 토마토 역병 저항성 분자표지 개발을 위한 병저항성 검정 시스템 구축

2017 년 2 월 13일

프로젝트 연구기관명 : 안동대학교

프로젝트 책임자 : 염 인 화

세부프로젝트 연구기관명 : 안동대학교

세부프로젝트 책임자 : 염 인 화

세부프로젝트 연구기관명 : 경희대학교

세부프로젝트 책임자 : 오 창 식

위탁프로젝트 연구기관명 : 경북대학교

위탁프로젝트 책임자 : 이 제 민

위탁프로젝트 연구기관명 : 강릉원주대

위탁프로젝트 책임자 : 김 병 섭

## 요 약 문

### I. 제 목

토마토 품종육성을 위한 내병성 및 원예형질 분자표지 개발

### II. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구는 1단계 연구기간 동안 병저항성 신규 분자표지 19점 개발을 목표로 시작되었으며, 4차년도 종료시점에서 총 28점의 신규 분자표지가 개발되었다. 기존개발 분자표지인 *Sw5*, *Cf4/9*, *Ve1*은 본 과제의 연구를 통하여 유전자 기반 분자표지로 신규 개발되었으며 이들은 HRM 마커나 functional maker의 형태로, SCI 논문에 발표되었거나 국내특허 출원중 또는 등록완료 되었다. 신규 병저항성에 대한 분자표지 개발은 TYLCV, 잎마름역병에 대하여 진행되었다. TYLCV 저항성 유전자인 *Ty1/3*, *Ty2*, *Ty4*, *ty5*에 대하여 대부분 유전자 기반 분자표지로 10점 이상 개발되었으며, 잎마름역병 저항성은 *Ph3* 저항성에 대하여 유전자 기반 분자표지로 2점 개발되었으며 HRM 마커로의 전환도 실시되었다. 해당 성과는 SCI 논문에 발표되었거나 국내특허 출원중 또는 등록완료 되었다. 신규 과색 판별용 분자표지는 흑색 판별용 2점, 핑크색 판별용 3점, 주황색 판별용 3점으로써 해당 성과는 국내특허 출원중이거나 등록완료 되었다. 열거된 결과들에 의해 얻어진 연구성과물은, SCI 논문 7편(목표 10편), 비SCI 논문 1편(목표 0편), 특허출원 11건(목표 2건), 특허등록 5건(목표 2건) 등으로 요약될 수 있으며, SCI논문을 제외한 대부분의 성과는 초과달성 되었다.

### III. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 주요 토마토병 정밀 검정 시스템 확립 및 유전자원 확보를 통해 국내 발병 환경에 적합한 복합내병성 육종에 기여하고자 수행되었다. 토마토는 원예작물에 있어서 경제성이 매우 높은 작물인 동시에 학문적인 연구가 심도있게 진행되어 있는 모델식물체라 할 수 있다. 토마토 유전체 염기서열 분석 완료로 인하여 분자육종은 MAS(marker-assisted selection)에서 GAS(Genome-assisted selection)로 분자육종의 패러다임 변화단계에 있으며 정밀분자표지 개발은 기술적으로 매우 용이해지고 있다. 그럼에도 불구하고 국내 토마토 분자육종은 저항성 형질 판별 역량 부족과 저항성 유전자원의 부재로 인해 상업육종에 있어서 유용한 분자표지 개발이 더디게 진행되고 있다. 본 과제에서는 토마토 전체 게놈 정보와 전사체 분석학, 그리고 근연관계에 있는 고추의 전체 게놈 정보를 융합 분석하여 효율과 정확도를 높이고 대량 분석 시스템 구축을 진행하는 동시에 토마토에서의 저항성유전자원의 탐색, 분리, 동정 및 고효율의 분자표지를 개발하고자 진행되었다. 토마토 품종육성에 있어서 주요 병저항성관련 분자표지들의 효율적인 도입을 통해 육성에 필요한 기간을 단축시킬 수 있고, 이를 통하여 외국종자회사와의 품종경쟁력을 제고할 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 관점에서 각 종자회사의 기술적인 여건에 따라 선택 사용이 가

능하도록 PCR-based 시스템과 SNP 시스템을 병행하면서 동시에 High-throughput (HT)-MAS 체계를 구축하는 방향으로 진행되었다. 또한 개발된 병저항성 마커의 형질판별 효율성의 체계적인 검증, 신규 저항성의 탐색, 신규 유전자원의 탐색 등을 위하여 주요 병에 대한 병저항성 정밀 검증 시스템 확보도 진행하였다. 본 연구의 궁극적인 목적은 육종가 밀착형 육종현장중심의 분자표지 개발을 통해 육종가 편이 표지 활용 시스템 구축이라 할 수 있다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 토마토 육종에 있어서 우선시되고 있는 다양한 병저항성 및 과실특성 향상을 위하여 육종가 편이 분자표지 개발을 실시하였으며, HRM 이나 array 기반으로 대단위 SNP분석이 가능한 시스템으로의 전환도 진행하였다. 현재 확보되어 사용 중이거나 사용예정중인 기개발 분자표지들의 국내 토마토 병저항성 분자표지선발(MAS)에의 도입 적합성 여부 판정을 국내 확보 저항성 유전자원과 국내 발병 균주를 사용하여 실시하여, 국내사용 부적합한 분자표지들에 대한 표지개발 및 보완을 진행하고 국내사용 적합한 분자표지들에 대해서는 SNP전환 및 유전자 동정을 시도하였다. 동시에 분자표지의 실제 품종 육성 프로그램에서의 활용도 및 정확도를 높이기 위하여, 신규 병저항성 분자표지의 개발 및 기존에 개발된 주요 저항성 형질 연관 분자표지를 유전자 기반 분자표지로 개발 및 전환을 실시하였다. 제 1 세부과제에서는 TSWV 저항성(*Sw5*) 및 잎곰팡이병 저항성(*Cf4/9*) 분자표지와 과색판별을 위한 흑색, 핑크색, 오렌지색 분자표지들의 개발이 실시되었으며, 청고병과 궤양병에 대한 병저항성 분석방법 확립 및 유전자 분석이 진행되었다. 제 2 세부과제에서는 TYLCV 저항성인 *Ty1/3*, *Ty2*, *Ty4*, *ty5* 각각에 대한 분자표지 개발을 통하여 TYLCV 저항성 유전자 판별이 가능한 시스템 및 TYLCV 대량 정밀 분석체계를 동시에 확립하였다. 또한 잎곰팡이 역병 저항성인 *Ph3*와 반신위조병 저항성인 *Ve1*에 대한 유전자 기반 분자표지를 개발하였다. 이와 같이 본 연구는 목표형질에 대한 유용유전자를 동정함과 동시에 품종육종을 수행할 수 있는 통합육종기술 구축을 목표로 수행되었다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통해 유전체기반 형질 예측 분자육종 시스템 구축하여 육종가 편이 유전체기반 분자표지 개발 매뉴얼 개발함과 동시에 분자육종의 장애요소로 지적되고 있었던 저항성 형질 판별 기술 및 저항성 유전자원의 부재를 적극적으로 보완함으로써 신속, 정확한 육종 소재 발굴을 실현가능하게 해주는 분자표지 시스템 확립을 가능케 하였다. 분자표지 개발 과정에서 구축된 분자 유전자 지도, 유전체정보, 발현체 정보등의 성과물들을 종합하여 저항성유전자원 탐색을 위한 분자표지 개발 및 분자표지기반 선발체계구축을 지원하기 위해 적극 활용 가능할 것으로 예상된다. 또한, 내병성품종 육성을 위한 저항성 유전자의 DB 구축, 병저항성 유전자 특성분석저항성육종자원, 병저항성관련 유전자 및 방어관련 항산화유전자의 발현 분석에서 얻어진 유용정보들 역시 토마토 분자육종 체계 확립과 서비스기반 구축을 위해 활용될 것이다. 이와 같은 결과들은 다양한 주요 토마토 병저항성 분석법 및 기능성 관련 형질 분석법 확립을 통해 Phenome과 Genome을 종합하여 정밀하게 신품종을 육성하는 통합육종기술 구축에 크게 기여할 것으로 예상된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an economically important crop worldwide. In addition, tomato serves as an excellent model system for plant genetics and biology, including fruit biology, abiotic stress tolerance, and plant-microbe interactions. Major tomato diseases causing economic losses include *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), verticillium wilt, fusarium wilt, late blight caused by *Phytophthora infestans*, leaf mold caused by *Cladosporium fulvum*, root-knot caused by *Meloidogyne* spp., bacterial spot caused by *Xanthomonas* spp., bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae*. and so on. Due to its commercial value and importance as a model crop, tomato has taken the lead in marker assisted selection (MAS) among the horticultural crops. Development and practical use of molecular markers have been actively pursued in molecular breeding programs for tomato, especially for disease resistance to allow selection of single resistance genes and combination of multiple resistance genes. Due to insufficient genetic variation in cultivated tomatoes, various wild relatives of tomato have been investigated and utilized as disease resistance sources. In order to pursue the resistance provided by these wild relatives in developing new tomato varieties, molecular markers have been developed and intensively utilized in tomato breeding programs.

Tomato yellow leaf curl virus, which is transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*), is a major threat to tomato production worldwide. The *Ty1* and *Ty3* resistance loci originated from *Solanum chilense* LA1969 and LA1932/LA2779, respectively. Recently, the gene responsible for *Ty1* resistance was identified as a DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerase and was demonstrated to be allelic with *Ty3* resistance. *Ty2* resistance originated from *S. habrochaites* B6013 (Hanson et al. 2000; Ji et al. 2009a; Yang et al. 2014) and was recently mapped to a 300 kb interval on chromosome 11 (Yang et al. 2014). Recessive resistance against TYLCV was identified in *S. peruvianum* and designated *ty5* (Friedmann et al. 1998; Anbinder et al. 2009). The *Ph3* resistance locus from *S. pimpinellifolium* (L3708), which confers incomplete resistance against a wide range of *Phytophthora infestans* isolates, is considered the most effective source of resistance against tomato late blight. A coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat gene on chromosome 9 was determined to be responsible for *Ph3* resistance. Resistance against verticillium wilt diseases in tomato is conferred by the *Ve* locus that contains two closely linked, inversely oriented

genes: *Ve1* and *Ve2*. The *Ve* locus provides resistance against *Verticillium albo-atrum* race 1 and encodes an extracellular leucine-rich repeat (LRR) receptor-like protein class of disease resistance proteins. TSWV is a virus belonging to the genus of negative RNA virus *Tospovirus* within the family *Bunyaviridae* and effectively transmitted by thrips. *Sw-5b* was reported as the resistance gene effective against TSWV. Resistance to leaf mold fungus in tomato caused by *Cladosporium fulvum* is conferred by dominant *Cf* genes, encoding receptor proteins carrying extracellular LRR domain. Bacterial wilt and canker diseases in tomato are caused by *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, respectively. So far, only some quantitative trait loci (QTL) conferring resistance to these bacterial pathogens have been reported, but their identities are still unknown.

Tomato is one of the plant accumulated abundant carotenoids in fruits and provides red color via lycopene synthesized at plastid. Recently, brown tomatoes spotlighted as functional trait for tomato, and *green flesh (gf)* gene is responsible for the black color. Brown color is determined when chlorophyll degradation is inhibited by *gf* mutation during fruit ripening. In the case of pink, *SIMYB12* gene, which is a character of peel color, controls the accumulation level of naringenin chalcone in the peel tissue. Orange tomatoes contained three groups of carotenoids;  $\delta$ -carotene,  $\beta$ -carotene, and polyycopene. In the meanwhile, yellow tomatoes showed low levels of carotenoid compared to red or orange tomatoes. Based on the HPLC profiles, genetic factors overproducing  $\delta$ -carotene and polyycopene were inferred as lycopene  $\epsilon$ -cyclase and lycopene isomerase, respectively.

In this study, we developed a series of allele-specific molecular markers for the *Ty1/3*, *Ty2*, *Ty4*, *ty5*, *Ph3*, *Ve1*, *Cf4/9*, *Sw-5b* resistance loci and functional markers for fruit-color determination based on the genic sequences responsible for each phenotypes. We converted the PCR-based CAPS, derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS), and sequence characterized amplified region (SCAR) markers into high-resolution melt (HRM) markers to facilitate high-throughput SNP detection. These gene-based DNA markers can be considered as functional markers since they were generated based on the SNPs or InDels directly responsible for the resistance phenotype. In addition, we have transferred information of our developed markers in this study to breeding companies for accelerating their breeding program. Overall, these markers are expected to contribute to expediting the efficiency and accuracy of MAS for disease resistance in tomato breeding programs.

## CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter 1: General introduction

Chapter 2: Overview of technical advances in domestica and worldwide

Chapter 3: Experimental strategies and results

Chapter 4: Achievements and contribution of the research

Chapter 5: Application and practical use of the results

Chapter 6: Current review of related scientific information

Chapter 7: References

## 목 차

- 제 1 장 프로젝트(세부프로젝트 포함)의 개요 및 성과목표
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌



## 본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부분은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.
- 차. <첨부>자료는 협약 시 연구계획서 별첨으로 제출한 특허, 논문 및 시장분석보고서를 기준으로 연구 완료 후 변동 내용을 작성하시기 바랍니다.

## 제 1 장 프로젝트(세부프로젝트 포함)의 개요 및 성과목표

토마토 유전체 염기서열 분석 완료로 인하여 정밀분자표지 개발은 매우 용이한 시대가 왔으나, 저항성 형질 판별 역량 및 저항성 유전자원의 부재가 정확도 높은 분자표지 개발에 큰 장애요소로 작용하고 있다. 본 연구는 주요 토마토병 정밀 검정 시스템 확립 및 유전자원 확보를 통해 국내 발병 환경에 적합한 복합내병성 육종에 기여하고자 수행되었다. 현재 확보되어 사용 중이거나 사용예정중인 기개발 분자표지들의 국내 토마토 병저항성 분자표지선발(MAS)에 의 도입 적합성 여부 판정을 국내 확보 저항성 유전자원과 국내 발병 균주를 사용하여 실시하여, 국내사용 부적합한 분자표지들에 대한 표지개발 및 보완을 진행하고 국내사용 적합한 분자표지들에 대해서는 SNP전환 및 유전자 동정을 시도하였다. 토마토 유전체 정보와 병저항성 및 원예형질 관련 유전자의 염색체 위치정보 확보가 용이한 토마토 야생종유래 염색체임계통(ILs)을 적극 활용하고 각종 분석 기법을 도입하여 정밀분자표지제작 및 후보유전자 탐색 실시하였다. 또한 표현형 분석방법 확립하여 목표형질에 대한 유용유전자를 동정함과 동시에 품종육종을 수행할 수 있는 통합육종기술을 어느 정도 수준에서 구축하였다. 본 연구의 궁극적인 목적은 육종가 밀착형 육종현장중심의 분자표지 개발을 통해 육종가 편이 표지 활용 시스템 구축이다.

주요 가지과 작물인 토마토에 발생하여 경제적으로 큰 피해를 주고 있으며, 전 세계적으로 토마토 내병성 품종 육성의 목표가 되고 있는 주요 병으로는 역병, 시들음병, 잎곰팡이병 등의 곰팡이류병과 꽃마름병, 세균성 점무늬병, 겹무늬병 등의 세균병 그리고 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), Tobacco mosaic virus (TMV) 등의 바이러스병과 뿌리혹선충병이 있다. 외국품종 도입 및 기후 온난화에 따른 지속적인 새로운 병해충 출현이 진행 중이므로 이에 대응할 수 있는 안정적인 강한 복합 내병성을 지닌 우수한 토마토 품종 개발이 우선적으로 해결되어야 할 과제이며, 육종가와 병리학자의 공동연구가 진행되어야만 한다. 기존에 개발되어 있는 TSWV(Sw-5), 잎곰팡이(Cf-9), 역병 (Ph1, Ph2, Ph3), 고구마뿌리혹선충병(Mi1, Mi2, Mi3), TYLCV(Ty1, Ty2, Ty3)의 상당부분 유전자 염기서열이 밝혀져 있는 상태인 동시에 유전자 내에 존재하는 SNP를 기반으로 표지보완이 필요한 시점에서 본 과제가 시작되었다. 또한, 육종가, 육종지원자 편이 분자표지 개발을 우선적으로 실시하였으며, HRM이나 array 기반으로 대단위 SNP분석이 가능한 시스템으로의 전환도 진행하였다.

국내 토마토 재배 시 최근 Tospovirus인 TSWV와 Geminivirus인 TYLCV에 의한 피해가 급증하고 있다. TSWV는 꽃노랑총채벌레 그리고 TYLCV는 담배가루이와 은잎가루이에 의하여 총매 전염되고 있으며, 최근 농가피해가 급증하고 있어 내병성 국내 계통 및 품종 개발이 필요한 시점이다. TYLCV 저항성의 경우 국내 종자회사에서도 Ty1 분자표지를 MAS에 도입하여 신품종 개발을 성공하여 시판중에 있으며 외국외사의 경우 Ty2 저항성이 도입된 품종을 국내에서 시판 중에 있다. 그러나, 이들 저항성 표지의 국내 발견 TYLCV 균주에 대한 저항성 실효성 여부가 제대로 검증되지 않은 채 MAS에 도입되고 있으며, resistance breaking strain 출현 시 대응방안 부재의 문제점 존재하고 있다. 토마토 잎마름역병과 감자 역병은 *Phytophthora infestans*에 의해 발생하는 역병으로, 일반적인 역병균이 토양병원 것과 달리 *P. infestans*에 의해 발생

하는 역병은 유주자낭이 바람을 타고 전파되어 토마토 및 감자의 지상부를 가해하는 공기전염성 병이다. 물론 심할 경우에는 토양 관계수를 타고 이동하여 괴경에도 병을 일으키기도 하며, 토마토 잎마름역병에 대한 저항성 인자는 3가지가 알려져 있는데, 새로운 race분화로 인해 저항성 gene들을 집적하여 내병성 품종을 개발하는 것이 요구되고 있다. 토마토 풋마름병(청고병)의 경우 *Ralstonia solanacearum*에 의하여 발병하며, 토마토의 에이즈라 불리울 정도로 국내에서도 남부지방의 토마토, 고추, 파프리카, 감자에서 심각한 피해를 유발하고 있다. 기후변화에 따른 발병 가능성 증가와 매우 넓은 기주범위로 토양에서 잔존확률이 높고, 효과적인 화학약제의 부재와 병발생지역의 확산 때문에 현재 주요 방제 전략은 풋마름병 저항성 대목을 활용하는 수준에 머물러 있으므로, 풋마름병 저항성 품종 육성이 시급한 실정이다. 국내에서 가지과 작물 풋마름병에 대한 저항성 자원의 탐색 및 발굴을 위한 연구가 진행되어 왔으나 실질적인 성과는 미비한 실정이다. 토마토 세균성 점무늬병은 아직 국내에서 큰 문제가 되고 있지 않으나, 다습한 상태의 시설재배나 장마철 노지 재배 시 발병할 수 있고 수출용 토마토 개발 시 세균성 점무늬병 저항성 품종의 육성이 시급하나, 이에 관련된 국내 연구는 미진한 실정이다. 미국의 경우 토마토 세균성 점무늬병 저항성 관련 연구가 많이 진전되어 있으며, 10가지 이상의 race 특이적 HR (hypersensitive response) 저항성 유전자 및 race non-specific 저항성 QTLs 에 대한 보고가 있으며 상당부분 분자표지 개발되어 MAS가 진행되고 있다. 토마토 과색 형질에 있어서는 현재 노란색, 주황색, 흑색 토마토가 국내 시장에 판매되고 있고 대부분의 생식용 대과종은 핑크색이다. 과색 관련 유전자들이 보고되어졌음에도 불구하고 국내에서는 관련 유전자원들을 육종소재로 사용하고 있으나 유전자들을 분자표지로 전환하여 marker-assisted breeding에 이용한 사례는 거의 없는 것으로 알려지고 있다. 과색 및 저장성을 개선하기 위한 육종은 형질을 보기까지 3 개월 이상 장기간 재배해야 하는 단점이 있어 분자표지의 개발이 토마토 육종효율증진에 절대적인 역할을 할 것으로 기대된다.

현재 대량의 유전체 정보를 확보하고 있는 작물이 많아지고 있고, 유전체 분석 기술이 급격하게 향상됨에 따라 이를 이용한 저항성유전자 확보가 좀 더 용이해지고 있으며, 유전체 정보에 기반한 분자표지 개발이 marker-assisted selection의 기본이 되고 있다. 이는 내병성 작물을 육종할 수 있는 소재의 발굴을 보다 용이하게 해주고, 신품종 개발에 많은 도움을 주고 있다. 본 과제에서는 토마토 전체 게놈 정보와 전사체 분석학, 그리고 근연관계에 있는 고추의 전체 게놈 정보를 융합 분석하여 효율과 정확도를 높이고, 대량 확보 체제 구축에 노력을 기울이면서 토마토에서의 저항성유전자원의 탐색, 분리, 동정 및 고효율의 분자표지 개발을 진행하였다. 분자표지의 실제 품종 육성 프로그램에서의 활용도 및 정확도를 높이기 위하여, 신규 병저항성 분자표지의 개발 및 기존에 개발된 주요 저항성 형질 연관 분자표지를 유전자 기반 분자표지로 개발 및 전환을 실시하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

토마토는 세계적으로 중요한 채소작물로, 국내의 경우 2011년 기준 총생산액이 7,000억 정도이다. 국내의 토마토 재배면적 및 종자시장이 크게 증가되고 있으나, 국산 종자의 시장 점유율은 30%대로 낮은 실정이다. 아직도 일본회사와 다국적기업에서 육성한 품종들이 많으며, 토마토 종자가격은 2000년 초반 50~100원에서 2012년 120~600원으로 2배 이상 상승하여 농가 경영에 매우 큰 부담을 주고 있다. 수입대체효과와 수출시장 개척을 위한 종자 산업에의 연구 투자가 요구된다. 토마토 육종의 가장 큰 핵심기술은 병저항성 육종이라 할 수 있으며, 국내 종자회사에서도 주요 병저항성 육종과정에 MAS의 활용도를 높이고 있는 추세이다. 현재 다국적 종자회사에서는 토마토와 같은 고부가가치 원예작물 품종 개발을 위해서 많은 예산과 인력을 꾸준히 투입하고 있어, 후발주자라 할 수 있는 국내 종자회사의 경쟁력 확보에 어려움이 있다. 국내에서는 토마토 품종 육성에 첨단생명공학기술을 적극 활용하여 병해충 저항성 선발 시 분자표지를 이용하여 선발 효율을 극대화시키고 육종연한을 단축하고 있는 단계이다. 효율적인 병저항성 개체 선발을 위한 정확도 높은 분자표지의 간편 분석 기술 개발이 요구된다. 국내 토마토 품종육종수준을 단기간에 선진국 수준 그 이상으로 발전시키기 위한 분자유종의 적용을 위해서 선진기술의 적극적인 벤치마킹의 필요성이 있으며, 급변하는 토마토 육종기술의 지속적인 이해와 습득이 가능한 토마토 분자유종 전문가의 육성도 절실하다.

토마토는 원예작물의 모델로 유전체 연구에 있어서 선두주자이며 작물 육종에 있어서는 MAS (marker-assisted selection)가 가장 먼저 적용되었고 가장 활발히 이용되고 있는 작물이다. 토마토에서 MAS는 코넬대학교의 Steven Tanksley 교수가 선도자이며 세계 최초의 병저항성 유전자를 분자표지 기반으로 동정하였으며 현재까지 많은 육종가들이 이용하고 있는 대부분의 토마토 유전자지도 및 분자표지들을 개발한 바 있다. 토마토 유전체는 국제 콘소시움을 구성하여 미국의 NSF의 지원 하에 Cornell 대학 연구팀의 주도로 이루어졌으며, 국내에는 서울대학교 최도일 교수 연구팀이 21세기 프로티어사업의 지원을 받아 염색체 2번의 염기서열을 분석을 완료하였다. 2012년 5월 재배종인 *S. lycopersicum* cv.Heinz와 야생종인 *S. pimpinellifolium* 게놈 프로젝트의 완료로 분자유종은 MAS에서 GAS (Genome-assisted selection)로 패러다임 변화단계에 있다(The Tomato Genome Consortium, Nature, 2012). 또한 유전체 정보를 기반으로 기능유전체학을 포함하는 각종 오믹스(-omics) 정보를 융합분석하는 시스템유전학이 확산되고 있으며, 이러한 유전체 정보를 활용을 통한 육종 효율 증진 방법은 선택이 아닌 필수임이 분명하다. 유전체, 기능유전체, 대사체 정보와 토마토 야생종에 있는 유전 변이 탐색을 통한 다각도의 분석 정보를 종합 분석하는 효율적인 시스템 구축도 고품질-복합내병성 토마토 종자개발을 목표로 하는 현 시점에서 절실하다. 병저항성, 고품질 관련 (기능성향상) 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 등 네덜란드 연구진을 중심으로 진행되었다. 이 프로젝트에 참여한 몬산토, 신젠타 같은 다국적 종자회사들이 데이터를 직접 분자표지 개발에 사용하고 있는바 국내 종자회사도 이에 대한 대비가 필요한 실정이다. 국내의 열악한 토마토 육종기술이 다국적 종자회사의 resequencing 프로젝트로 격차가 더 벌어질 것으로 예상되는바 국내 독자적

인 토마토 육종 지원 유전체 분석 프로젝트가 요구된다. 토마토의 경우, 타 작물에 비하여 다양한 분자표지들이 개발되어 있어 다국적 종자회사들의 육종프로그램에서 토마토의 분자표지 활용도는 다른 원예작물과보다 월등히 높은 상태이다. 현재 19개 이상의 복합내병성과 저장성에 관한 분자표지를 이용한 선발이 종자회사나 정부 연구기관에 의해 활용되고 있으며, 다국적 종자회사의 대부분의 토마토 내병성 품종은 최소한 5종 (Mi, Cf, Tm2, Ve, I 등) 이상의 내병성 유전자를 가지고 있다고 추정할 수 있다. 다국적 종자회사들을 중심으로 자체 표지 개발 기술과 High-throughput(HT)-MAS 체계확립에 많은 투자가 이루어지고 있다. 네덜란드의 경우에는 민간 육종회사들이 육종 효율을 극대화하기 위하여 Keygene이라는 분자표지 개발 전문회사가 설립되었고 성공적으로 운영되고 있으며, 프랑스와 일본의 육종회사들 역시 공동 투자 시스템을 확립하여 분자표지를 개발하고 활용하고 중에 있다.

미국 캘리포니아 Davis 대학에 위치한 Tomato Genetics Resource Center (tgrc.ucdavis.edu)에 방대한 양의 토마토 유전자원들이 분석 및 보존되어 있으며, 이는 전 세계 각국의 토마토 연구진에 의하여 활용되고 있다. 미국 오하이오 주립대학을 중심으로 SNP 표지 개발 및 association mapping이 추진 중이며 개발된 SNP 표지는 가지과 작물 게놈네트워크 홈페이지 (<http://solgenomics.net/>)에 공개되어 있다. 감자, 토마토 등 주요 가지과 작물의 분자육종 플랫폼 개발을 목적으로 미국 농무성 지원으로 “SolCAP (Solanaceae Coordinated Agricultural Project, <http://solcap.msu.edu>)”이 진행되었으며, 모든 결과는 코넬대학교의 SGN network (<http://solgenomics.net/>)에서 열람 가능하다. 토마토 관련 주된 데이터는 SNP인데 미국 재배 품종을 기반으로 한 결과이기 때문에 국내 품종 및 중국, 유럽 수출에 적합한지 검증이 필요하다. SNP 분석 플랫폼이 Illumina Infinite 기반이어서 다소 비용이 높고 국내 육종지원체계 현실과 동떨어진 단점이 있다. 향후 GSP 과제에서 실시될 SNP 분석 플랫폼은 모든 작물에 적용 가능하여야 하며 민간육종지원센터 (씨드벨리)와 연계가능성을 고려해야 하기 때문에 국가과제의 연속성차원에서 플랫폼이 결정될 것으로 예상된다.

토마토 재배종인 *Solanum lycopersicum*에 존재하는 유전적 다양성의 부족으로 인하여 발생한 저항성 자원 탐색의 한계를 야생종을 적극적으로 활용하여 극복하고 있다. 야생종 토마토에는 *S. pennellii* (LA0716), *S. habrochaites* (LA1777), *S. chilense* (LA1932 등), *S. chmielewskii* (LA2663), *S. cheesmaniae* (LA1037), *S. pimpinellifolium* (LA1589), *S. corneliomulleri* (LA1274), *S. huaylasense* (LA1982), *S. arcanum* (LA2150), *S. peruvianum* 등이 존재하며, 이들 야생종에서 발견된 다수의 저항성은 효과적으로 재배종 토마토에 도입되어 육종현장에 투입되어 왔다. 작물유전육종의 세계적인 석학인 이스라엘의 Hebrew University of Jerusalem의 Dani Zamir 교수는 1980년대부터 야생종을 직접 육종재료로 도입하였으며 세계최초로 동식물에서 이입집단 (introgression line; IL)의 개념을 토마토 야생종인 *S. pennellii*를 이용하여 확립하였다. ILs을 이용하는 경우 중요 저항성 형질 발견 시 염색체 위치 정보 파악이 용이하므로, 이를 토마토 유전체 염기서열정보 및 전사체 분석 정보 등과 종합분석을 실시할 경우 후보유전자 확보 및 정밀분자표지 개발이 쉽게 이루어 질 수 있다는 장점이 있다. 따라서, 야생종유래 염색체이입계통 ILs 유전자원을 신규 저항성 발굴, 복합저항성 신소재 개발, 저항성 관련 유전자 동정 등에 적극 활용하는 연구는 매우 긍정적인 성과를 거둘 수 있다. 해당 집단을 이용해 독일의 막스프랑크연구소의 대사체연구 선도그룹인 Alisdair Fernie 연구팀은 과실의 대사체를, 플로리아 대학의 Harry Klee 그룹은 다양한 과실 향미성분을, 코넬대학의 Jim Giovannoni 그룹은 NGS를 이용

한 과실전사체과 기능성물질을, 미시건 대학의 Rob Last 그룹은 trichome에 존재하는 다양한 해충성물질을, 캘리포니아주립대학 Neelima Sinha 그룹은 잎관련 형질을 분석하였다. 이 집단의 방대한 데이터를 직접 육종에 이용하면 수량증가 및 복합내병성, 고기능성 토마토 육종에 많은 역할을 할 것으로 기대된다. 토마토 야생종 *S. pennellii* LA716 이외에도, *S. habrochaites* LA1777, *S. habrochaites* LYC4, *S. lycopersicoides* LA2951 야생종유래 염색체이입계통 ILs (introgression lines)이 엘리트 품종에 도입, 작성되어, 전 세계적으로 우수한 토마토 연구진에 의하여 뚜렷한 연구 성과를 올리고 있다. Dani Zamir 교수는 이외에도 EMS을 이용한 돌연변이 집단을 작성 (<http://zamir.sgn.cornell.edu>) 하여 형질을 분석 데이터베이스화 하였으며 phenome 네트워크를 개발하여 육종에 필요한 다양한 웹기반 소프트웨어를 개발했다 (<http://www.phenome-networks.com>). 가까운 미래에 *in silico* breeding 개념이 도입될 것으로 예상되며 생물정보학 방법이 예측가능 육종에 도움이 될 것으로 기대된다.

토마토 과색은 카로티노이드에 의해 대부분 결정되며 그 외 플라보노이드와 엽록소가 추가적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 3가지 생합성경로의 유전연구결과 활용이 과색 형질 육종에 필수이다. 토마토 카로티노이드 연구는 이스라엘 Hebrew University of Jerusalem의 Joseph Hirschberg 교수가 선도그룹으로 노랑색, 주황색 과색을 결정하는 여러 카로티노이드 생합성 유전자를 map-based cloning 방법을 통해 동정하였다. 유전재료로는 *S. pennellii* 유래 introgression line과 동대학 Dani Zamir와의 공동연구를 통해 EMS 유기 돌연변이체를 이용했다. 핑크색 토마토를 결정짓는 유전자는 이스라엘의 Weizmann 연구소의 Asaph Aharoni 연구그룹이 동정하였고 흑색토마토는 코넬대학교 Jim Giovannoni와 미시건주립대학의 Cornelius Barry 연구팀에 의해 동정되었다. 현재 많은 유전자들이 알려짐에도 불구하고 국내에서는 관련 유전자원들을 육종소재로 사용하고 있으나 유전자들을 분자표지로 전환하여 marker-assisted breeding에 이용한 사례는 거의 없는 것으로 알려져 있다. 과색 및 저장성을 개선하기 위한 육종은 형질을 보기까지 3개월 이상 장기간 재배해야 하는 단점이 있어 분자표지의 개발이 토마토 육종효율증진에 절대적인 역할을 할 것으로 기대된다. 토마토의 저장성은 과실의 세포벽, 큐틴성분에 결정되며 이를 합성하는 유전자보다 전사인자, 에틸렌 신호전달관련 유전자가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 코넬대학교 Jim Giovannoni와 Jocelyn Rose 연구그룹이 토마토 저장성 연구에 독보적인 그룹으로 알려졌으며, rin (ripening inhibitor), nor (non ripening), DFD를 동정하였음. rin, nor는 열성형질임에도 불구하고 heterozygote 상태에서도 저장성을 증가시켜 대부분 토마토 F1 품종에 이 인자가 들어 있다. 그 외 다수의 에틸렌 신호전달체계관련 유전자를 map-based cloning 방법으로 동정하였고 다양한 유전자원을 보유하고 있다. 국내는 수확후 생리분야 연구만 진행되고 있으며 저장성 관련 유전육종연구는 미비하며 극소수 육종회사만이 rin, nor 분자표지를 이용하고 있는 것으로 알려져 있다.

토마토 유전체 염기서열 분석 완료로 인하여 정밀분자표지 개발은 매우 용이한 시대가 왔으나, 저항성 형질 판별 역량 및 저항성 유전자원의 부재가 정확도 높은 분자표지 개발에 큰 장애요소로 작용하고 있다. 고품질 관련 형질을 결정짓는 과색, 기능성, 저장성, 향미, 신미 성분분석에 필요한 대사물질 분석 역량 또한 요구된다. Genotyping기술이 염기서열 분석법의 급격한 발전으로 포화상태에 이를 것으로 예상되는 바 phenome 분석 전문가 육성 및 투자가 미래 종자시장 확대의 선도 기술이 될 것으로 전망된다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 토마토 청고병 저항성 분자마커 개발

### 1. 연구수행 내용

#### (1) 청고병 균주 선발 및 이병률 검정

- ① 청고병 병원세균 *Ralstonia solanacearum* race들 중에서 국내에 분포하면서 토마토에 청고병을 유발하는 race1 균주를 동아대 이선우 교수팀에서 분양받아 이용하였음. 특히, 청고병 저항성으로 알려진 품종들이 병원성이 강한 균주(SL341)에서 병저항성이 무너지는 현상이 뚜렷하여 다시 병원성이 약한 균주(SL882)를 이용하여 병저항성 검정에 이용함(Hendrick and Sequeira 1984). 균은 30°C의 균배양기 조건에서 2일동안 CPG(Casamino acide-Peptone-Glucose) 배지에서 배양하여 사용하였음.
- ② 토마토 품종별 이병률 검정을 위해 그림 1-1에서 보여주는 과정과 같이 식물생장상에서 키운 파종 4~5주정도된 토마토 개체당  $10^8$  cells ( $10^7$  cfu/ml 접종원 10ml)을 토양에 접종하는 방식으로 병원균을 접종하였음. 접종 후 온도를 28°C로, 습도를 60%이상으로 유지하여 병발생에 유리한 조건을 유지하였음. 이후에 이병률 관련 정량적 기준을 바탕으로 이병률 혹은 병저항성 정도를 분석함. 이병률은 접종 후 매일 병 진전을 관찰하여 정량적 기준에 따라 조사하였음(Kelman 1954).

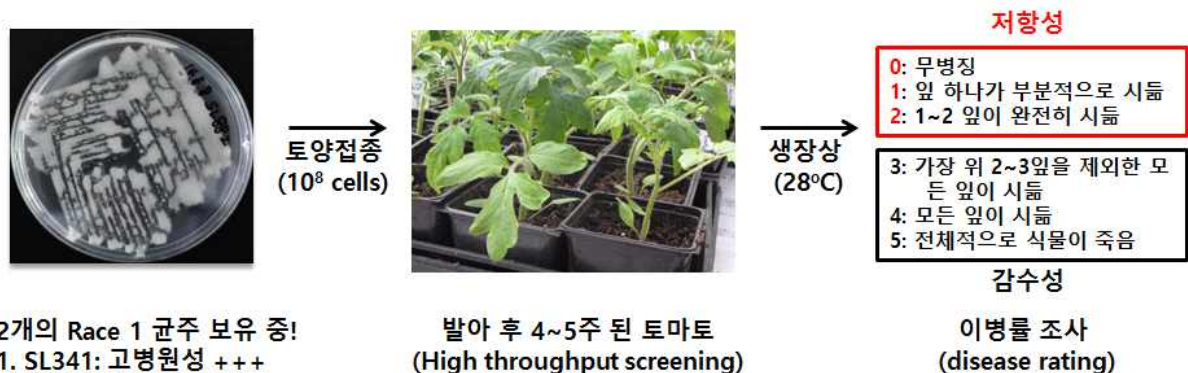


그림 1-1. 토마토 청고병 저항성 검정 과정 및 이병률 조사 기준

#### (2) 토마토 유전자원 확보 및 분리집단 구축

- ① 본 연구과제에서 사용된 토마토 품종/계통들은 기존의 논문 결과를 바탕으로 선발하여 부산대 박영훈 교수팀, 토마토생명공학연구소, 안동대 염인화 교수팀, 농업유전자원정보센터 등에서 종자를 분양받아 증식하여 사용하였음(Khan et al 2012). 종자 증식은 경희대학교 원예생명공학과 온실에서 진행하였음.
- ② 대표적인 청고병 저항성 품종들인 Hawaii 7996, 10-BA-3-33, 10-BA-4-24의 분리집단 구축을 위해 IL라인인 IL6-2와 IL12-2과 교배를 진행하였음.

#### (3) 기존의 청고병 병저항성 판별 분자마커 정보 확보

- ① 기존 논문에 보고된 토마토 청고병 병저항성 판별용 분자마커 정보들을 논문 분석을 통해 확보하였음. 이들을 정리하면 표 1-1와 같음.

표 1-1. 기존의 토마토 청고병 병저항성 판별용 분자마커 정보

Marker	Marker type	Marker ID	Tomato line (chromosome)	Reference
SCAR	Co-dominant	TSCAR <sub>AAT/CGA</sub>	T51A (6)	Miao et al., 2009
SCAR	Co-dominant	TSCAR <sub>AAG/CAT</sub>	T51A (6)	Miao et al., 2009
RFLP	Co-dominant	TG564	Hawaii 7996 (12)	Wang et al., 2000
RFLP	Co-dominant	TG230	L285 wild species (10)	Danesh et al., 1994
RFLP	Co-dominant	CT180	L285 wild species (6)	Danesh et al., 1994
SSR	Co-dominant	SLM12-10	Hawaii 7996 (12)	Geethanjali et al., 2010
SSR	Co-dominant	SLM12-2	Hawaii 7996 (12)	Geethanjali et al., 2010

(4) Genotyping을 위한 genomic DNA 분리 및 PCR

- ① 앞서 확보한 토마토 품종/계통들의 genomic DNA를 분리하기 위해 32구 트레이포트에 온도 26℃, 습도 60%, 14시간 light/ 10시간 dark cycle의 조건인 생장상에서 토마토 종자를 파종하였음. 토마토 품종/계통에 따라 4~5주후에 어린잎을 샘플링하여 조건에 맞게 보완한 cetyl-tri-methyl-ammonium bromide (CTAB) protocol (Murray and Thompson 1980)에 따라 토마토의 genomic DNA를 추출하였음.
- ② PCR반응은 T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)을 이용하여, 총 20μl 에 2X Taq PCR smart mix 2 (SolGent, Korea), primer set (10pmol), 10ng genomic DNA로 구성되며, 사용한 PCR Taq과 primer set의 melting temperature에 따라 수정된 PCR조건을 사용하였음. 기본적으로 94℃에서 3분, 94℃ 1분, 50~55℃ 1분 (primer set에 따라 다름), 72℃ 1분으로 35 cycles이며, 마지막 단계로 72℃ 10분의 조건으로 PCR반응을 진행하였음. PCR반응을 마친 최종 PCR product는 전기영동을 통해 1% agarose gel에서 확인하였음.

(5) NBS-LRR 저항성 유전자와 receptor-like kinase 유전자 분석

- ① 기존에 whole genome sequence가 존재하는 토마토 헤인즈 품종의 유전체 정보를 이용하여 서울대 최도일 교수팀에 의뢰하여 염색체 6번과 12번에 위치하는 NBS-LRR 유전자와 receptor-like kinase 유전자들의 위치와 종류를 확보하였음. 특히, 청고병 저항성 QTL 주변에 위치하는 유전자들을 위주로 총 51개를 선발하였음.

(6) 유전자 발현 분석을 위한 qRT-PCR

- ① 청고병 저항성 품종(Hawaii7996, Hawaii7998, BWR22, 10BA333, Divisoria)과 감수성 품종(BWS3, Ponderosa)에 *R. solanacearum* (SL882)를 접종을 한 후, 0일, 2일, 4일에 각각의 토마토 개체들의 뿌리를 샘플링하여 NucleoSpin RNA Plant kit(Macherey and Nagel, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였음. 분리된 total RNA에서 cDNA를 합성한 후, Quantitative Real-Time PCR을 진행하였음(그림 1-2).
- ② Real-Time System CFX Connect (Bio-rad, USA)를 이용하여 염색체 6번과 12번에 존재하는 putative *R* genes과 *RLK* genes의 유전자 발현을 분석하였음. 총 20μl에



Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Japan) 10 $\mu$ l, primer set (10pmol), cDNA을 포함되며, 제작한 primer set의 melting temperature에 따라 수정된 조건을 사용하였음. 기본적으로 95 $^{\circ}$ C 1분, 95 $^{\circ}$ C 10초와 55~60 $^{\circ}$ C(primer set에 따라 다름) 10초와 72 $^{\circ}$ C 20초로 45cycles을 진행하였음.

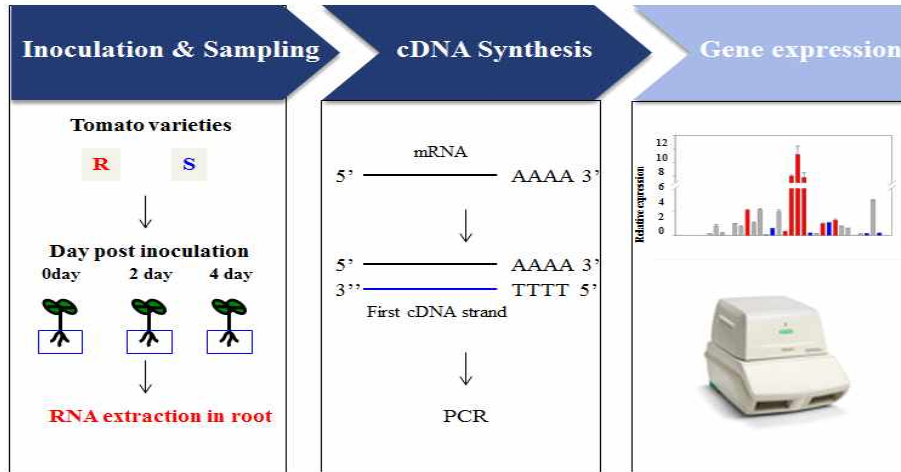


그림 1-2. qRT-PCR을 이용한 유전자발현 분석 과정

(7) 토마토 6개 품종의 whole genome resequencing을 통한 SNP/InDel 분석

- ① Hawaii7996을 포함한 총 6개의 저항성 품종과 2개의 감수성 품종의 genomic DNA를 분리하여 Macrogen으로 보내어 genome resequencing을 진행하였고, 품종당 25-30X 정도로 시퀀스를 확보하였음. 이후에 시퀀스를 (주)시더스에 보내어 감수성 품종 대비 Hawaii7998에 특이적인 SNP와 InDel을 탐색하였음.
- ② 청고병에 저항성을 보이는 품종(R6: Hawaii7996, Hawaii7996, 10BA333, 10BA424, BWR1, BWR22, BWR23)과 감수성인 품종(S2: Heinz1706, BWS3)을 그룹화하여 청고병 저항성에 관여할 것으로 추정되는 *Bwr12*와 *Bwr6* QTL주변에서 polymorphic SNP/Indel들의 탐색을 진행하였음. SGN에서 토마토 병 저항성에 관여할 것으로 추정되는 저항성유전자들을 위주로 실제로 coding에 관여하는 CDS에 존재하는 SNP/Indel을 중점적으로 분석하였음.
- ③ 탐색된 SNP와 InDel 정보에 NBS-LRR 저항성 유전자들 정보와 비교 분석하여 궤양병 저항성 후보 유전자탐색을 실시하였음.

2. 연구결과

(1) 청고병 저항성 유전자원 확보 및 저항성 검정

- ① 청고병 저항성 유전자원 확보를 위해 저병원성 균주인 SL882를 접종하여 품종/계통별로 청고병 저항성을 검정할 결과 기존 보고의 결과와 유사한 결과를 재확인하였음. SL882균주에 강한 저항성 혹은 감수성을 보이는 품종을 각각 R과 S로 표기(표 1-2). 그 결과 10-BA-3-33, BWR-23, BWR-1, BWR-22, Hawaii7998, DoctorQ, Hawaii7996, 10-BA-4-24가 SL882균주에 강한 저항성을 보이며, BWR-20은 중도저항성, BWS-3, Tiara, Bonneybest는 감수성을 보임(그림 1-3).

표 1-2. 토마토 품종/계통별 청고병 저항성(R)/감수성(S) 판별 결과

Bioassay I			Bioassay II		
Cultivar	Type	Bwr	Cultivar	Type	Bwr
10BA333	Cherry	R	AVTO9803	Cherry	R
10BA424	?	R	AVTO0102	Cherry	R
Hawaii7996	Cherry	R	AVTO0201	Cherry	R
Hawaii7998	Cherry	R	AVTO1015	Cherry	R
BWR1	Cherry	R	AVTO9601	Cherry	R
BWR20	Cherry	R	AVTO9001	Cherry	R
BWR22	Cherry	R	AVTO0101	Cherry	R
BWR23	Cherry	R	AVTO1219	Cherry	R
닥터큐	?	R	BWS3	Cherry	S
BWS3	Cherry	S	Hawaii7996	Cherry	R
티아라	Cherry	S			
Bonney best	?	S			

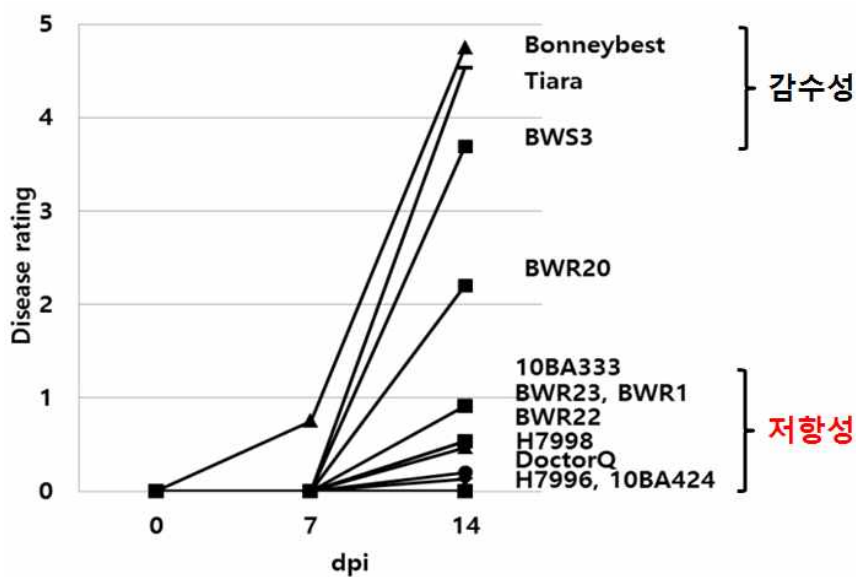


그림 1-3. 토마토 품종별 청고병 이병률의 정량적 분석 결과

② 청고병 저항성 유전자원과 IL간의 교배 및 분리집단 구축(위탁과제 연구팀과 공동으로 진행)을 진행하였는데, 총 5개의 조합(✓)으로 F1/F2종자를 확보하여 병리검정 실험과 Genotyping을 진행하였음(표 1-3).

표 1-3. 대표적인 청고병 저항성 품종의 교배 및 분리집단 구축

♀	♂	IL 6-2	IL 12-2
10-BA-3-33		✓	✓
10-BA-4-24		✓	✓
Hawaii 7996		✓	

③ 토마토생명공학연구소 육종회사로부터 청고병 저항성 유전자원을 확보하여 동일한 분석을 진행하였는데, 특히 저항성 계통인 10-BA-3-33와 감수성 Elite 계통과 교배 후 확보된 F1/F2 집단도 검정을 진행하였음. 품종 및 F1 개체당 20립씩 파종하여, SL341, SL882 두 균주로 병리검정 진행하였는데, 2개의 F1 종자 모두 저병원성 청고병균에 상당한 저항성 보임. 반면에 고병원성 청고병균의 경우 저항성이 10-BA-3-33과 유사하게 나타남. 10-BA-3-33과 교배한 모본(BW-Elite)도 일정 정도 저항성을 나타냄. (그림 1-4). 이러한 정보는 해당 육종회사에 제공되어 활용하도록 함.

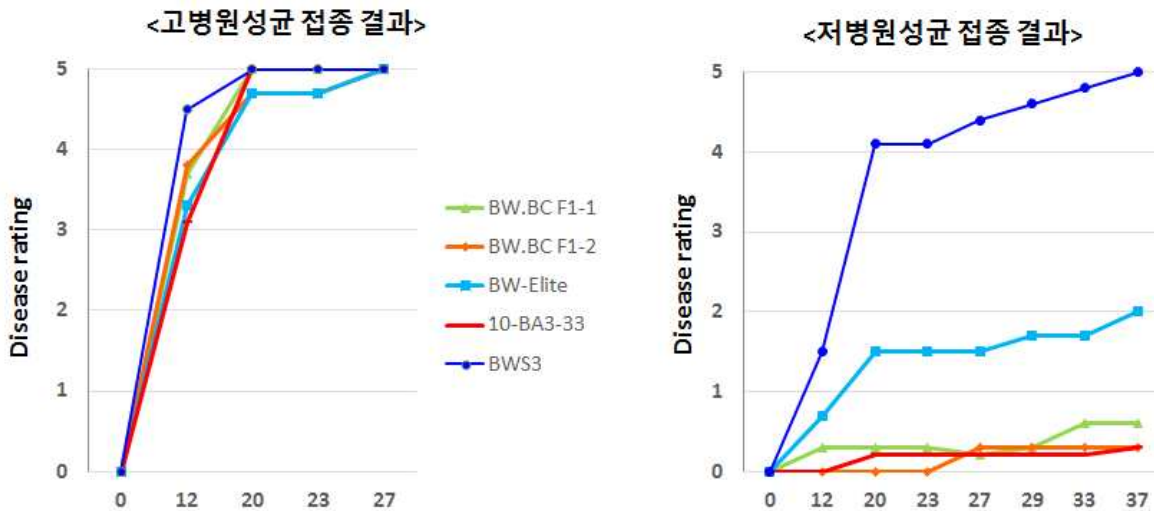


그림 1-4. 토마토생명공학연구소 계통 및 F1 종자의 청고병 저항성 검정 결과

## (2) 토마토 청고병 저항성 기존 분자표지 효용성 검정

① 확보된 청고병 저항성 유전자원들을 이용해 표1-1의 마커들 중 Foolad and Panthee (2014)에서 보고된 2개의 SCAR 마커와 3개의 RFLP 마커들의 효용성 검정을 진행하였음. 우선, 2개의 SCAR 마커 이용 검정 결과 저항성(R)과 감수성(S) 품종간 판별이 불가능하였음(그림 1-5). 또한, 기존의 RFLP 마커인 TG564의 경우 12번 염색체상의 *Bwr12* 유전자좌와 연관되어 있다고 보고되어 있는데, TG564 마커 정보를 이용하여 PCR 한 결과 밴드 형태로는 저항성(R)과 감수성(S) 품종간 구분이 불가능하였음(그림 1-6). 또한, PCR 밴드의 전체 염기서열 분석 결과 모든 밴드의 염기서열이 100% 동일하였음. 따라서 저항성과 감수성을 판별하는 마커로서의 효용성이 전혀 없었음. 따라서 신규 분자마커 개발이 필수적인 것으로 판단됨.

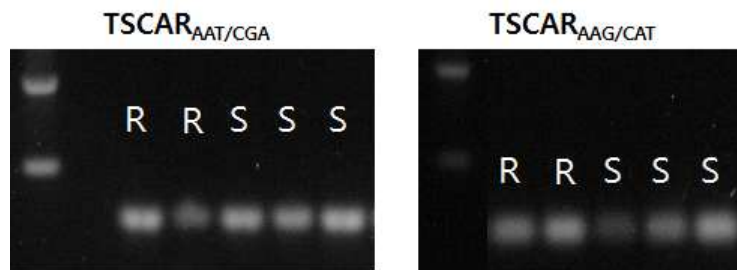


그림 1-5. 두 개의 SCAR 마커 효용성 검정 결과

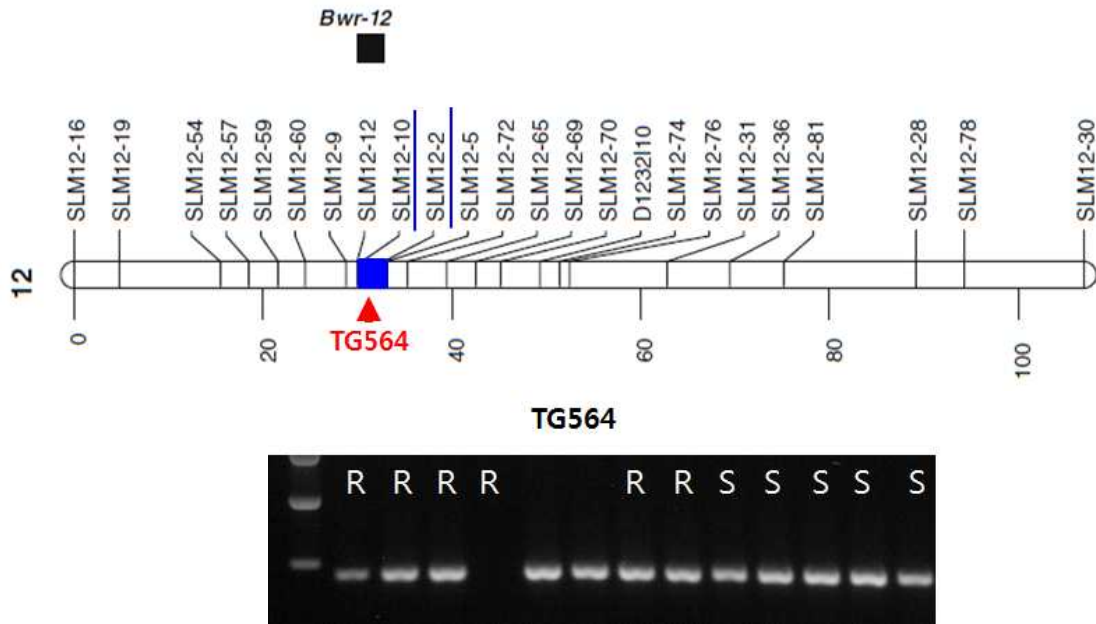


그림 1-6. TG564의 위치 및 PCR에 의한 효용성 검정 결과

② TG564와 비슷한 위치에 있는 또 다른 RFLP마커(T1668 & T1670)를 가지고 PCR과 염기서열분석을 진행하였는데, 모든 품종에서 PCR 밴드가 증폭되었음(그림 1-7). 이들 PCR 밴드의 염기서열을 분석한 결과 청고병 저항성 품종 대부분과 감수성 품종 사이에 2개의 SNP를 발견할 수 있었음(그림 1-8). 저항성인 10-BA-3-33와 감수성 Elite 계통과 교배 후 F2 교배 집단을 이용하여 탐색된 2개의 SNP 효용성 검정 결과 효용성이 없는 것으로 나타남.

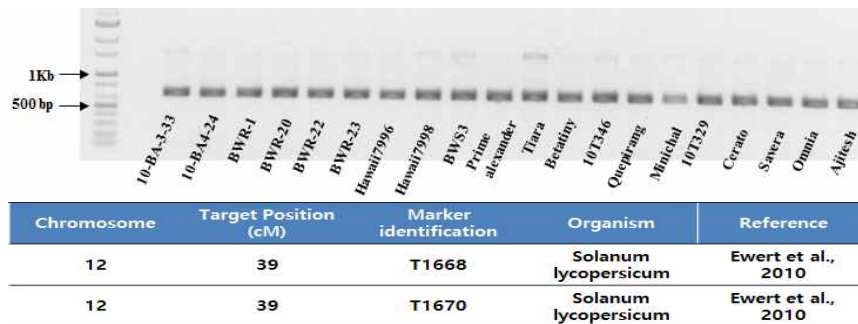


그림 1-7. 표기된 RFLP 마커를 이용한 PCR 결과

### (3) 청고병 저항성 *Bwr-12*와 *Bwr-6* QTL 주변 후보 저항성 유전자 분석

(가) *Bwr-12* 주변 후보 저항성유전자(NBS-LRR 유전자)들의 일에서의 발현 분석

① 전체 게놈분석이 이루어진 토마토 품종 Heinz1706 12번 염색체에 NBS-LRR 형태의 병 저항성 유전자(R gene)들이 있다고 알려져 있는데, 12번 염색체에서 청고병 저항성에 관여하는 QTL의 위치와 비슷한 6개의 R gene들을 발견하였음. 6개의 R gene에서 도메인 분석을 통하여 CC-NBS-LRR 도메인을 가지고 있는 3개의 R gene들로 후보유전자들을 선발하였음(그림 1-9).

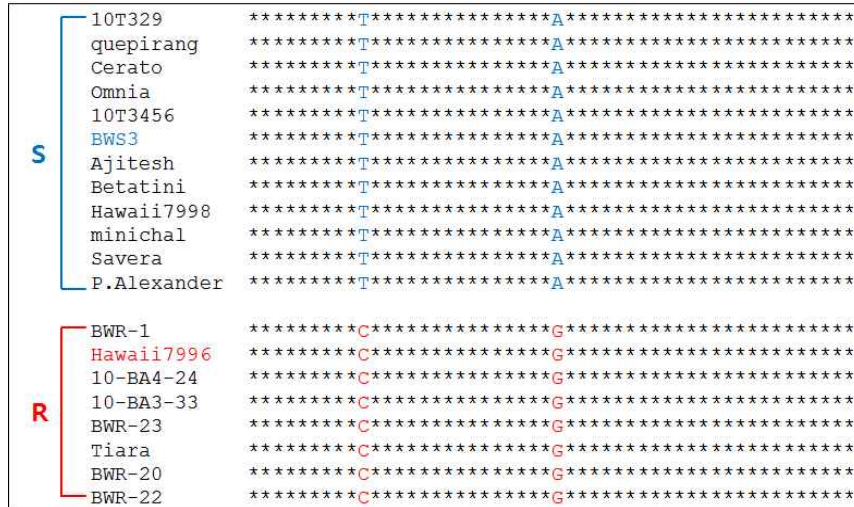


그림 1-8. PCR 밴드의 염기서열 분석 결과 저항성/감수성 구별 2개의 SNP 위치

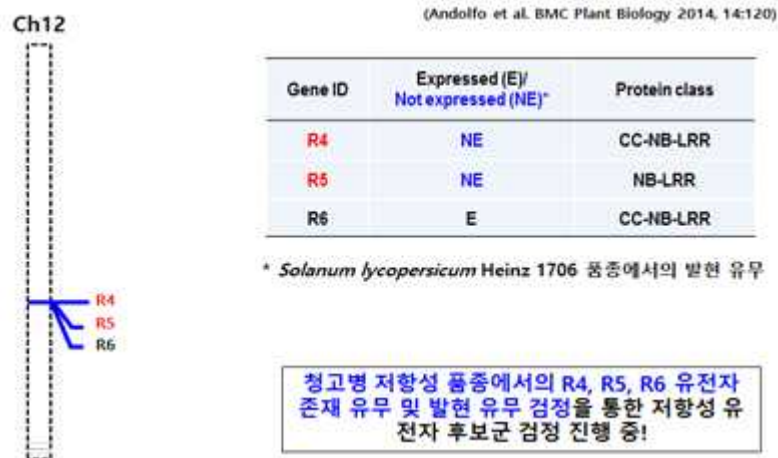


그림 1-9. 12번 염색체의 Bwr-12 QTL 주변 3개의 저항성 유전자 위치 및 발현 정보

② 도메인 분석을 통해 선출된 R4, R5, R6 유전자들의 qRT-PCR통해 발현 분석을 실시하였음. 유전자 발현 패턴과 앞서 실험한 청고병 검정에 대한 결과(그림 1-10), 저항성 품종과 감수성 품종에서 구별되는 두 개의 SNP결과를 모두 종합하여 분석을 해보니, 청고병 병검정에서 저항성을 보이는 품종에서 R gene 발현양도 상대적으로 많이 발현되었음을 알 수 있었음. 이를 통하여, 선출한 R gene들이 청고병 저항성에 연관되어 있을 수도 있다는 결론을 내림.

(나) *Bwr-12* 와 *Bwr-6* QTL 주변 후보 저항성 유전자들의 뿌리에서의 발현 분석

① 앞에서 언급된 저항성 유전자 후보군 외에 범위를 넓혀서 *Bwr-12* QTL 주변에서 2개의 SSR마커인 SLM12-12, SLM12-2의 위치 정보를 가지고 탐색하였음(표 1-4, 그림 1-11). 그 결과 4개의 NBS-LRR type 유전자와 18개의 Receptor-like kinase 유전자를 확보하였고, 뿌리에서 유전자 발현 유무 및 SNP 분석을 진행하였음. 또한, 염색체 6번에서의 *Bwr-6* QTL 주변에서 2개의 SSR마커인 SLM6-118, SLM6-17의 위치정보를 가지고 탐색하여 11개의 NBS-LRR type 유전자와 Receptor-like kinase 유전자를 확보하였고(표 1-4, 그림 1-11), 이들의 뿌리에서 유전자 발현유무 및 SNP 분석을 진행하였음.

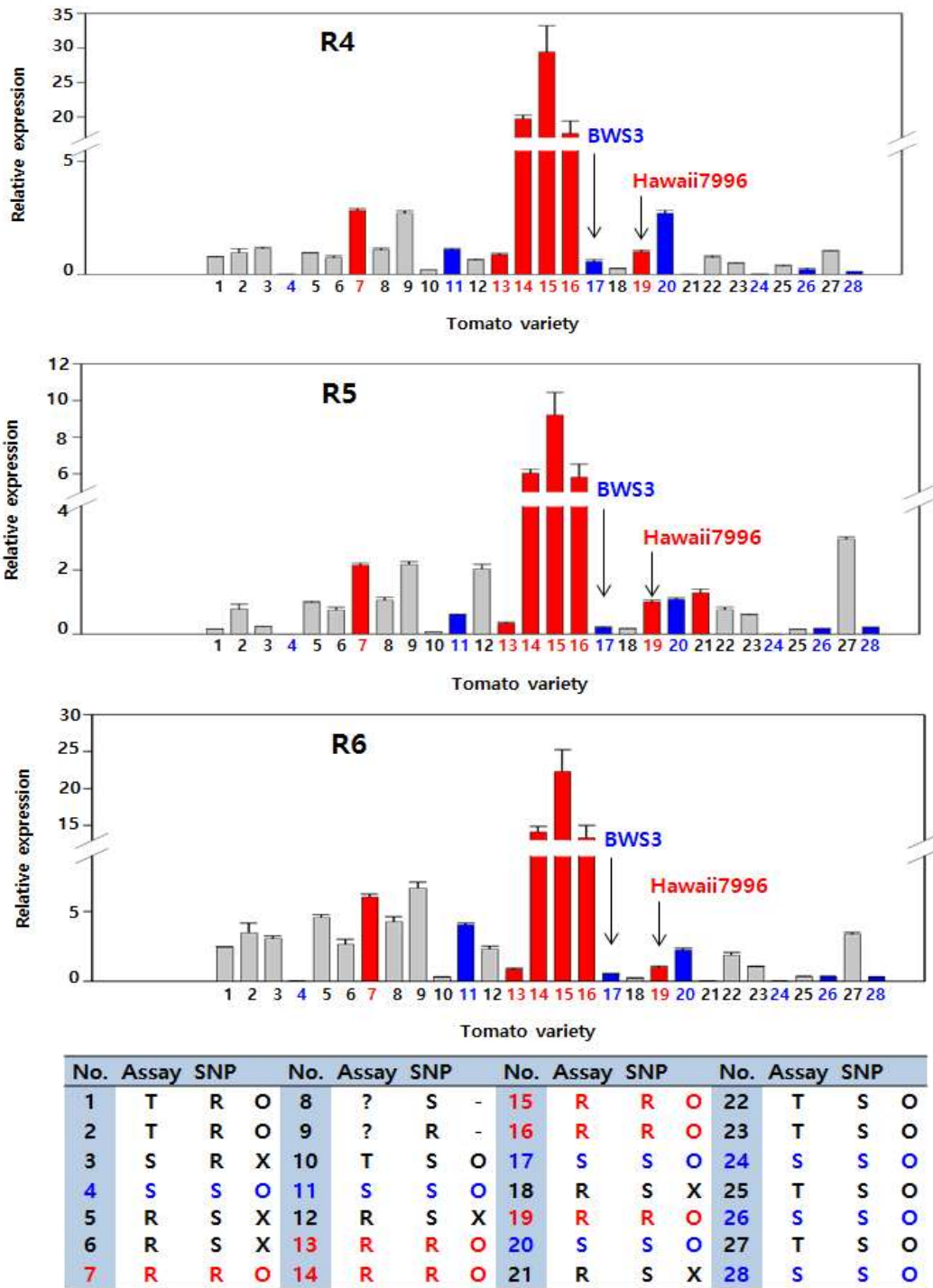
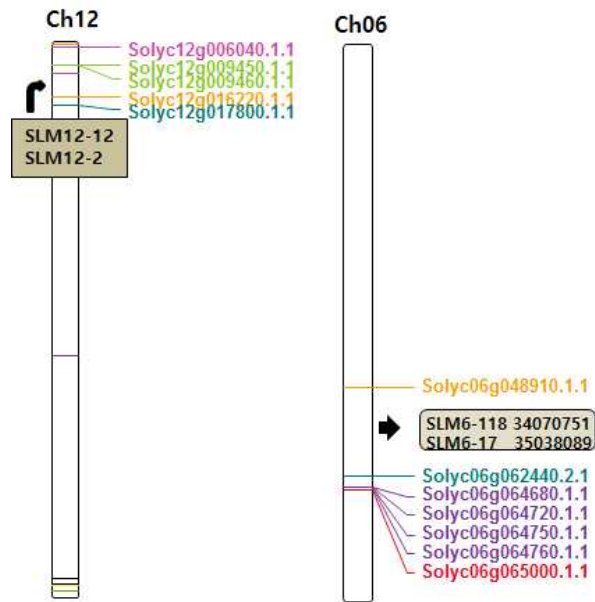


그림 1-10. R4, R5, R6 저항성 유전자들의 qRT-PCR 통한 발현 분석 결과

표 1-4. 6번과 12번 염색체에 위치한 QTL 주변 후부 저항성 유전자 정보와 발현 정보

Ch06				Ch12			
Gene ID	Read count value		Protein domain	Gene ID	Read count value		Protein domain
	Leaf	Root			Leaf	Root	
Solyc06g043250.2.1	0.6484	0.428	RLK	Solyc12g009350.1.1	0	0	Kinase family protein
Solyc06g048560.1.1	0	6.073	Kinase family protein	Solyc12g009360.1.1	0	0	Kinase family protein
Solyc06g048910.1.1	0	12.203	CC-NBS-LRR	Solyc12g009370.1.1	1.921	0.428	Kinase family protein
Solyc06g052000.1.1	0	0	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Solyc12g009450.1.1	12.199	57.242	CC-NBS-LRR
Solyc06g053730.1.1	75.708	0	Serine-threonine kinase	Solyc12g009460.1.1	0	2.164	CC-NBS-LRR
Solyc06g062440.2.1	165.705	77.683	CC-NBS-LRR	Solyc12g009510.1.1	3.218	1.306	RLP
Solyc06g062820.2.1	0.636	2.183	RLK	Solyc12g009530.1.1	9.053	0.877	RLP
Solyc06g063150.2.1	0	1.306	RLK	Solyc12g009550.1.1	27.017	0	RLP
Solyc06g064680.1.1	0	3.470	NBS-LRR	Solyc12g009690.1.1	0	0	RLP
Solyc06g064710.1.1	0	0	NBS-LRR	Solyc12g009720.1.1	0	0	RLP
Solyc06g064720.1.1	0.636	25.989	NBS-LRR	Solyc12g009730.1.1	0	0	RLP
Solyc06g064750.1.1	0	68.540	NBS-LRR	Solyc12g009740.1.1	0	0	RLP
Solyc06g064760.1.1	0	13.414	NBS-LRR	Solyc12g009750.1.1	0	0	RLP
Solyc06g064790.1.1	0	0.438	NBS-LRR	Solyc12g009770.1.1	3.206	21.270	RLP
				Solyc12g016220.1.1	102.821	88.818	CC-NBS-LRR
				Solyc12g017800.1.1	0	105.760	CC-NBS-LRR

\* *Solanum lycopersicum* Heinz 1706 (Susceptible)



\* *Solanum lycopersicum* Heinz 1706

그림 1-11. 6번과 12번 염색체에 위치한 QTL 주변 NBS-LRR type 후부 저항성 유전자 위치

② 이들 유전자들의 청고병에 감수성 품종인 Heinz1706의 뿌리와 잎조직에서의 발현수치를 확인하였고, *Bwr-6* 와 *Bwr-12* QTL 부위에 존재하는 유전자들 중 뿌리와 잎조직에서 발현수치가 적은 30개의 후보유전자들을 선발하였음(표 1-4). 선발된 30개의 후보 유전자들을 가지고 청고병 저항성 품종(Hawaii7996, Hawaii7998, 10-BA-3-33, Divisoria, BWR-20)과 감수성 (Ponderosa, BWS-3) 품종의 뿌리에서 qRT-PCR을 통한 발현 분석을 진행하였음. 각각의 샘플은 SL882균주를 접종한 뒤, 접종 후 2일째, 4일째 되는 날 뿌리를 샘플링하여 발현 분석을 진행하였음. 결과의 예로 염색체 6번에서는 SSR마커인 SLM6-118과 SLM6-17에 밀접하게 위치한 6-8, 6-14유전자에서 발현차이를 보였고, 염

색체 12번에서는 SSR마커인 SLM12-12와 SLM12-2에 밀접하게 위치한 12-7, 12-8, 12-9 유전자에서 발현차이를 보였음(그림 1-12). 다양한 저항성 품종과 감수성 품종에서의 발현 정도를 계속 분석 중에 있음.

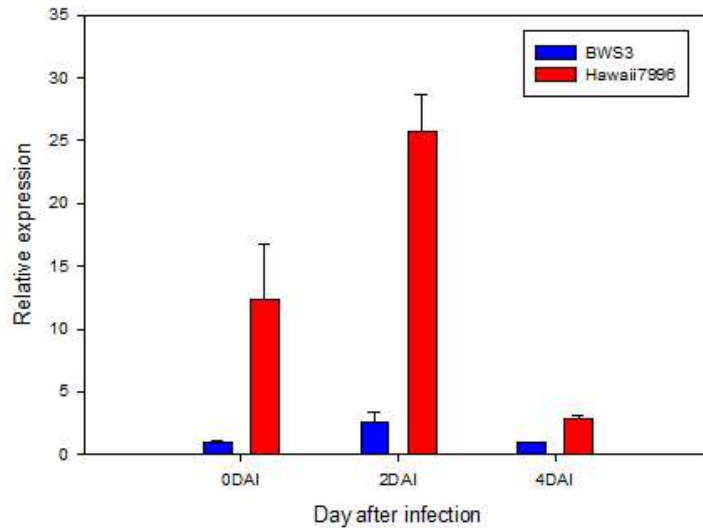


그림 1-12. 12-9번 유전자의 저항성/감수성 품종에서의 발현 분석 결과

#### (4) *Bwr-12*와 *Bwr-6* 청고병 저항성 QTL 주변 SNP와 InDel 분석

① 청고병 저항성 품종인 Hawaii7996, Hawaii7998, 10-BA-3-33, B10-BA-4-44, BWR-1, BWR-22, BWR-23과 감수성 품종인 Heinz1706, BWS3의 genome resequencing을 완료한 후 저항성/감수성 조합간 특이 SNP와 InDel을 분석하였음. Genome resequencing은 품종별로 25-32X 정도 하였고, 전체 유전체의 85-89% mapped region과 매치되는 정보를 확보하였음. 또한, Mapped region에서 청고병 저항성 품종들(BWR1, BWR22, BWR23, 10BA3-33, 10BA4-24, Hawaii7996, Hawaii7996)과 감수성 품종 (BWS3)에서 다수의 SNP를 확보했고, 그 중 heterozygous보다 더 정확하게 분석된 homozygous SNP를 중심으로 CDS에 존재하는 SNP만을 분석하였음(표 1-5). 그 결과 조합간 차이를 보이는 총 7,548개의 SNP를 확보하였음.

표 1-5. 비교조합 별 polymorphic SNP 탐색 결과

Group	common SNP loci	비교 조합	비교조합 간 분석 가능한 SNP loci	비교조합 간 Total polymorphic SNP	비교조합 간 polymorphic SNP (homo vs. homo)
R6	829,797	R6 vs. S2	679,922	9,856	7,548
R3	1,898,436	R3 vs. S2	1,543,973	189,577	166,826
R1	1,886,493	R1 vs. S8	670,004	451,470	400,686
S2	1,589,380				
S8	731,912				

② 이들 SNP들 중 청고병 저항성 품종들(G6: BWR1, BWR22, BWR23, 10BA3-33, 10BA4-24, Hawaii7996, Hawaii7996)과 감수성 품종 (S2: BWS3, Heinz1706)들의 비교조합분석을 통해서 토마토 청고병 저항성 품종에서만 특이적으로 보이는 SNP들을 확보하



였는데, 분석 결과 6번과 12번 염색체에서 가장 많은 수의 SNP들을 발견하였음(그림 1-13)

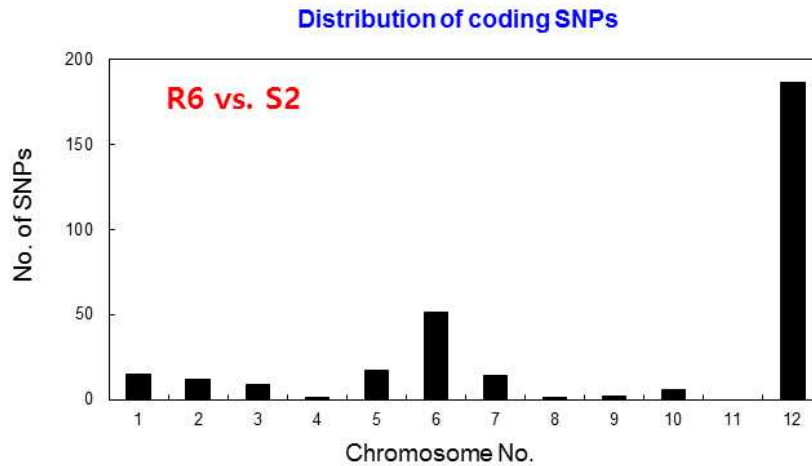


그림 1-13. 청고병 저항성 품종 특이적인 SNP들의 염색체별 분포

③ *Bwr-12* 와 *Bwr-6* QTL 주변에서 발현차이가 나는 후보 저항성 유전자들에서 SNP 존재 유무를 분석한 결과, 특히 12번 염색체의 기존 QTL과 연관된 것으로 생각되는 후보 저항성 유전자에서 SNP들을 발견하였고(그림 1-14), 이를 활용하여 SNP 분자마커로 전환 중에 있음. 발견한 SNP의 효용성 검정을 위해 토마토생명공학연구소에서 확보한 청고병 저항성 유전자원과 F1/F2 집단의 저항성 검정 결과를 바탕으로 마커의 효용성 검정 진행 중에 있음.

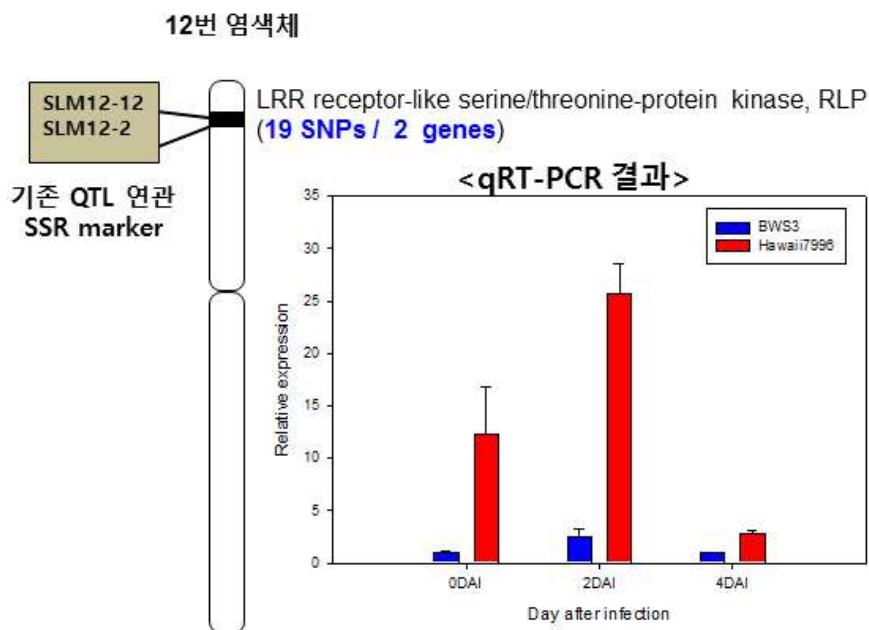


그림 1-14. 12번 염색체의 기존 QTL 주변 후보 저항성 유전자에서의 SNP 분석 결과

④ 청고병 저항성 품종들(G6: BWR1, BWR22, BWR23, 10BA3-33, 10BA4-24, Hawaii7996, Hawaii7996)과 감수성 품종 (S2: BWS3, Heinz1706)들의 비교조합 분석을 통해서 토마토 청고병 저항성 품종에서만 특이적으로 보이는 InDel들 또한 확보하였는데, 총 27개였음

(표 1-6).

표 1-6. 비교 조합별 polymorphic InDel 탐색 결과

Group	common In/Del loci	비교 조합	비교조합 간	비교조합 간	비교조합 간
			분석 가능한 In/Del loci	Total polymorphic In/Del	polymorphic In/Del (homo vs. homo)
R6	72,777	R6 vs. S2	40,088	1,085	27
R3	183,114	R3 vs. S2	128,654	18,192	796
R1	192,281	R1 vs. S8	38,825	36,183	7,313
S2	135,901				
S8	38,825				

## 제 2 절 토마토 궤양병 저항성 판별 분자마커 개발

### 1. 연구수행 내용

#### (1) 토마토 궤양병 저항성 병리 검정 방법

- ① 토마토와 고추 궤양증상에서 각각 분리된 2 종류의 궤양병 병원성 세균인 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm, 토마토균주)와 *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* (Cmc, 고추균주)를 각각 검정에 사용함(Sen et al., 2015; Oh et al. 2016). 토마토에 접종 시 병원세균( $2 \times 10^8$  cfu/ml)을 가위에 묻힌 후 토마토 잎을 자르는 방법으로 접종함.
- ② 토마토 종자를 파종을 한 후, 식물생장상에서 4주 정도 자란 식물에 개체 당 3개의 잎을 접종하여 4주간 식물생장상에서 병 발생을 관찰함. 접종 후 식물생장상 온도를 26℃로, 습도를 60%이상으로 유지하여 병발생에 유리한 조건을 유지하였음. 이병률은 아래의 그림 2-1과 같은 방법으로 정량화하였음.

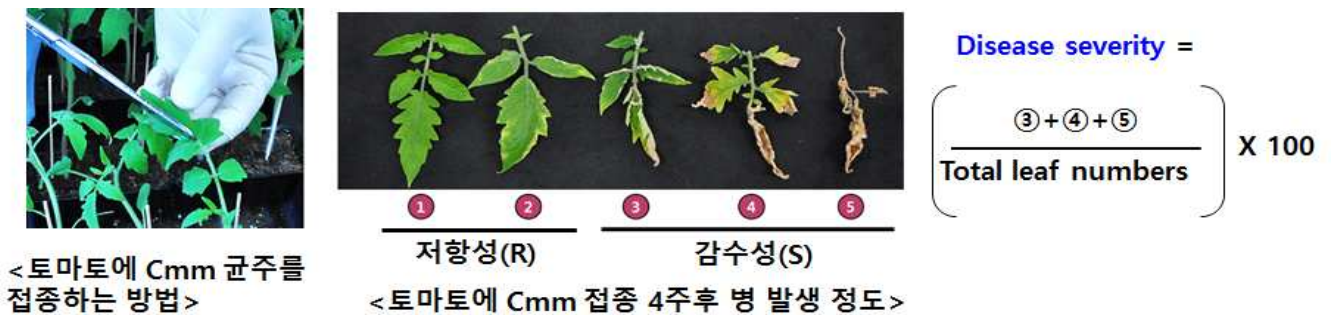


그림 2-1. 토마토 궤양병 저항성 검정방법 및 이병률 정량화

#### (2) 토마토 궤양병 저항성 유전자원 확보

- ① 농촌진흥청 아젠다 과제(제목: 토마토 궤양병균 기주특이성 분석과 새로운 병저항성 품종 육종 소재 개발, 2013-2015)와 연계하여 농업유전자원정보센터, 경북대 이제민 교수팀, 안동대 염인화 교수팀 등에서 다양한 유전자원을 분양받아 사용하였고, 종자 증식은 경희대학교 원예생명공학과 온실에서 진행하였음.
- ② 이 과정에서 선발된 토마토 궤양병 저항성 품종인 Hawaii7998을 주로 사용하여 유전분석을 진행하였음.

(3) Genome resequencing을 통한 SNP/InDel 분석

- ① Hawaii7998 품종과 감수성 품종 5개의 genomic DNA를 분리하여 MacroGen으로 보내어 genome resequencing을 진행하였고(청고병 연구내용 참조), 품종당 25-30X 정도로 시퀀스를 확보하였음. 이후에 시퀀스를 (주)시더스에 보내어 감수성 품종 대비 Hawaii7998에 특이적인 SNP와 InDel을 탐색하였음.
- ② 탐색된 SNP와 InDel 정보에 NBS-LRR 저항성 유전자들 정보와 비교 분석하여 궤양병 저항성 후보 유전자탐색을 실시하였음.

2. 연구결과

(1) Cmm에 의한 궤양병 저항성 유전자원 선발 및 유전 분석

- ① 확보된 토마토 품종들을 대상으로 Cmm 균주를 접종하여 병저항성 정도를 검정하였는데, 이들 중 중도저항성을 보이는 3개의 품종을 확보함(그림 2-2). 현재 분리집단 구축을 위해 Hawaii7998 품종(그림 2-2, \*)의 경우 F1, F2 집단 확보를 위해 교배를 진행함.

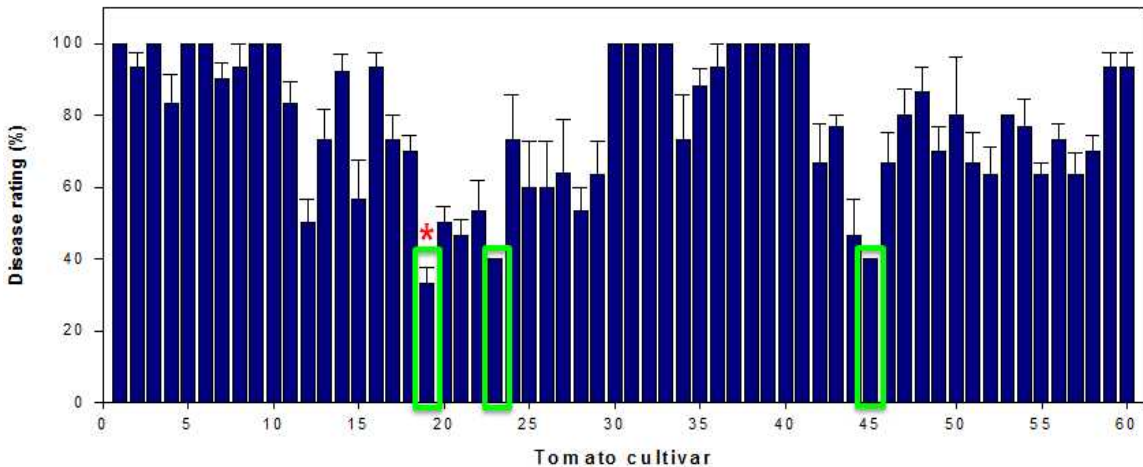


그림 2-2. Cmm균주에 대한 토마토 품종들의 이병률 분석 결과

- ② Genome resequencing을 통해 R1 group (Hawaii7998)와 S8 group (Heinz1706, BWS3, Hawaii7996, BWR1, BWR22, BWR23, 10BA3-33, 10BA4-24)의 SNP들의 분석을 진행하였고, 비교 조합간 총 400,686개의 SNP를 확보하였음(표 2-1). 이들 SNP들의 염색체별 분포를 분석한 결과 염색체 2, 4, 12번에서 SNP가 많이 분포하였음(그림 2-3).

표 2-1. 비교조합 별 polymorphic SNP 탐색 결과

Group	common SNP loci	비교 조합	비교조합 간 분석 가능한 SNP loci	비교조합 간 Total polymorphic SNP	비교조합 간 polymorphic SNP (homo vs. homo)
R6	829,797	R6 vs. S2	679,922	9,856	7,548
R3	1,898,436	R3 vs. S2	1,543,973	189,577	166,826
R1	1,886,493	R1 vs. S8	670,004	451,470	400,686
S2	1,589,380				
S8	731,912				

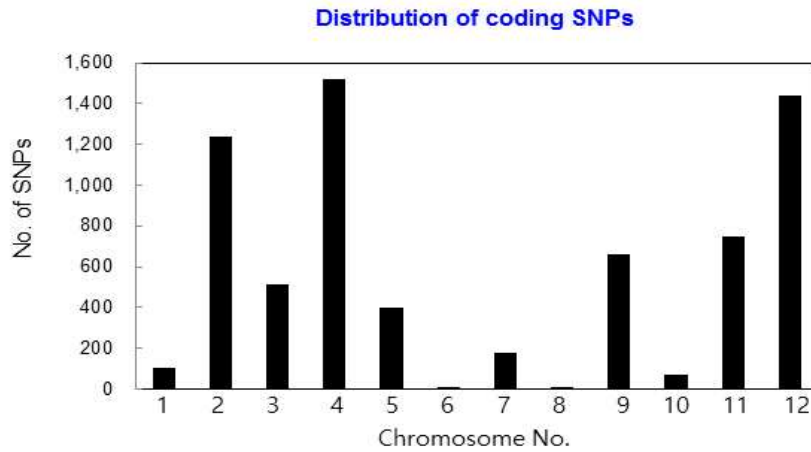


그림 2-3. 염색체별 SNP 분포 분석 결과

- ③ SNP뿐만 아니라 비교 조합간 InDel들도 비교 분석한 결과 Indel에서도 R1 group(저항성) 과 S8 group (감수성)에서 구별되는 InDel들 총 7,313개를 확보하였음(표 2-2).

표 2-2. 비교조합 별 polymorphic InDel 탐색 결과

Group	common In/Del loci	비교 조합	비교조합 간 분석 가능한 In/Del loci	비교조합 간 Total polymorphic In/Del	비교조합 간 polymorphic In/Del (homo vs. homo)
R6	72,777	R6 vs. S2	40,088	1,085	27
R3	183,114	R3 vs. S2	128,654	18,192	796
R1	192,281	R1 vs. S8	38,825	36,183	7,313
S2	135,901				
S8	38,825				

- ④ Genome resequencing을 통하여 토마토 궂양병 저항성 품종인 Hawaii7998에서 기존 QTL연관 마커들인 CT202, TG318의 주변에서 RNAseq에 의한 Cmm접종 후 후보저항성 유전자들의 발현을 분석하였고, 발현하는 후보 저항성유전자들 내에서 SNPs 과 InDels 을 발견하였음(그림 2-4).

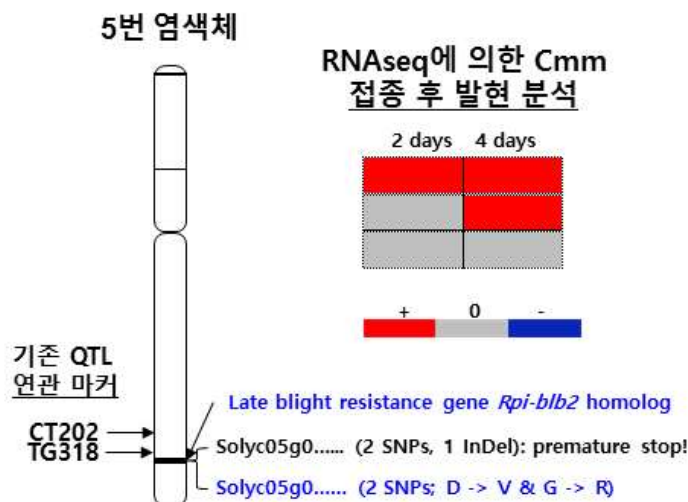


그림 2-4. 5번 염색체에 위치한 저항성 QTL 연관 마커정보와 후보 저항성 유전자내의 SNP

(2) Cmc에 의한 궤양병 저항성 유전자원 선발 및 유전 분석

- ① IL라인들 포함하여 확보된 토마토 품종들을 대상으로 Cmc 균주를 접종하여 병저항성 정도를 검정하였는데, Cmc 균주에 고도저항성을 보이는 3개의 품종과 2개의 IL라인(\*)을 확보하였음(그림 2-5). 특히, 선발된 IL라인의 염색체 공통부위 분석 결과 2번 염색체에서 공통부위가 발견되었고, 이곳에 3개의 NBS-LRR 후보 저항성 유전자가 존재함을 확인함(그림 2-6)

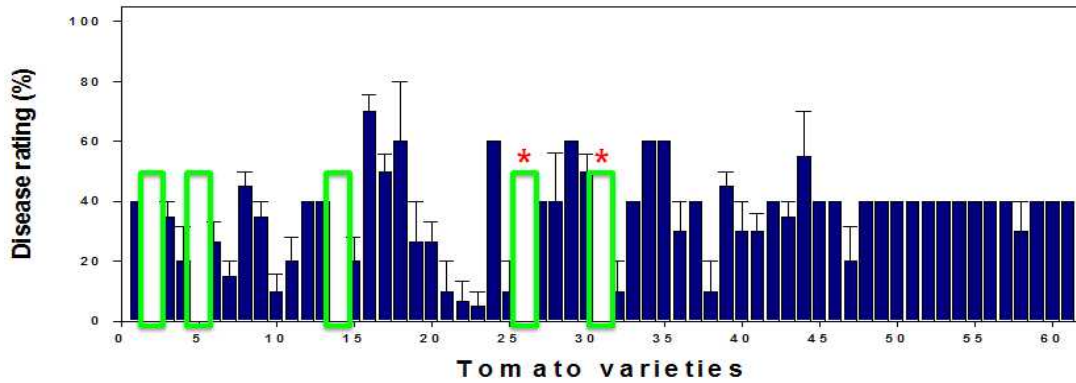


그림 2-5. Cmc 균주에 대한 토마토 품종들의 이병률 분석 결과

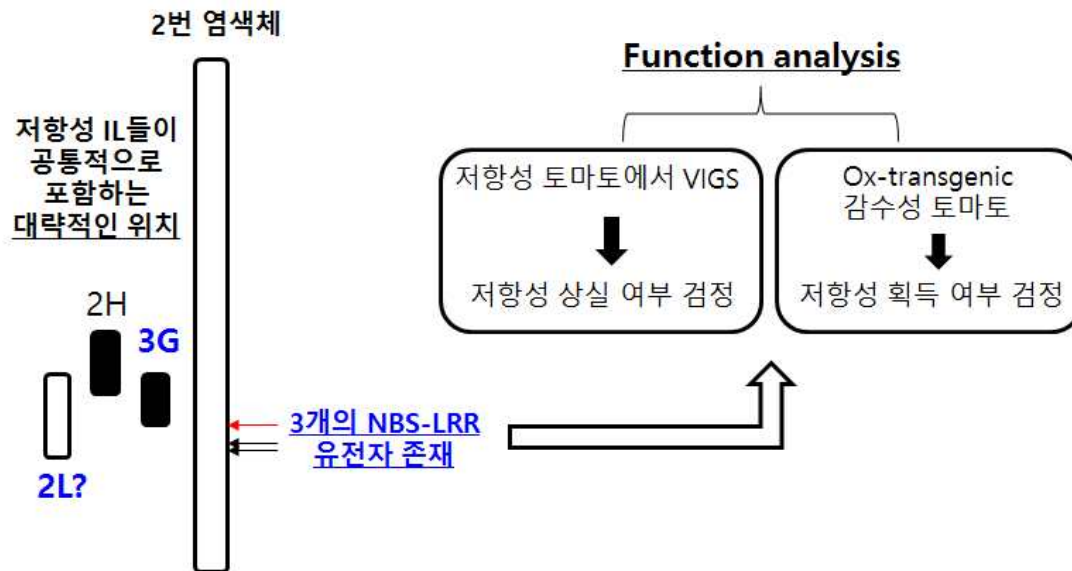


그림 2-6. 선발된 IL라인들의 공통부위 및 향후 연구내용

- ② 현재 총 5개의 IL라인들(KT101-KT123)의 sub-IL확보를 위해 모본 품종(KT2)과 교배하여 F2종자를 확보함(그림 2-7).

## IL 라인

*S. lycopersicum* "KT101" x *S. lycopersicum* "KT2"  
*S. lycopersicum* "KT104" x *S. lycopersicum* "KT2"  
*S. lycopersicum* "KT107" x *S. lycopersicum* "KT2"  
*S. lycopersicum* "KT112" x *S. lycopersicum* "KT2"  
*S. lycopersicum* "KT123" x *S. lycopersicum* "KT2"

그림 2-7. 교배 조합

### (3) 토마토생명공학연구소 계통 및 집단에서 Cmm 궤양병 병리 검정 결과

- ① 우선 2개의 F1집단을 검정한 결과 BwBc F1-2가 Hawaii7998 품종과 유사한 정도의 궤양병에 중도저항성을 보임(그림 2-8). 이후 F1 종자의 부모친 검정 결과 한쪽친이 유사한 정도의 중도저항성을 보임을 확인함(그림 2-9). 이 부모친과 F1/F2 집단을 이용한 유전분석 및 Cmm 궤양병 저항성 품종 육성 등의 연구는 GSP 2단계에서도 지속적으로 공동으로 진행할 계획임.

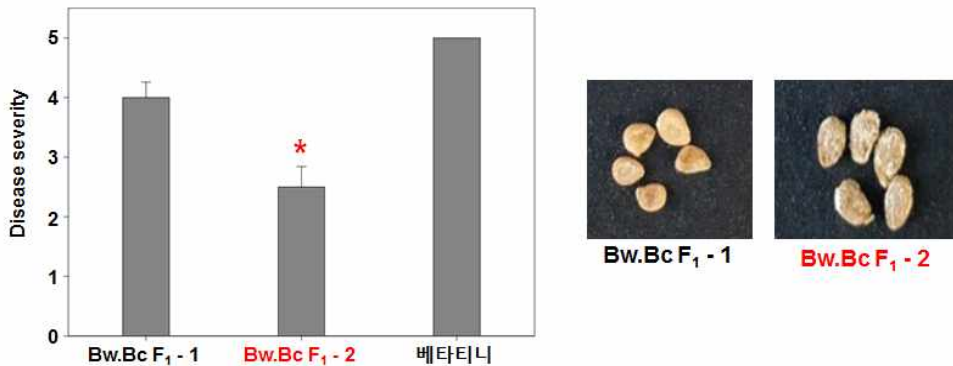


그림 2-8. 2개의 F1 집단의 Cmm 궤양병 검정 결과

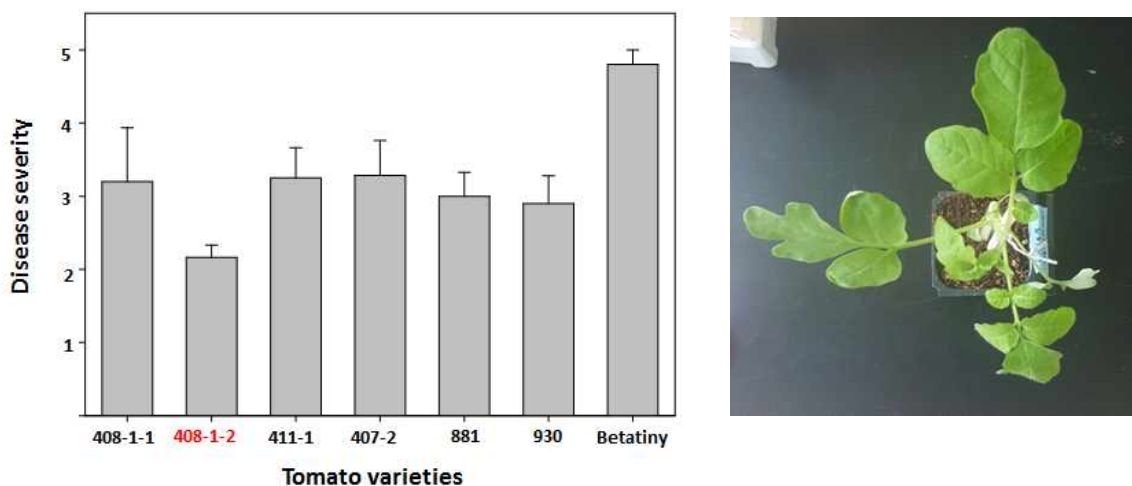


그림 2-9. F1집단의 부모친 대상 Cmm 궤양병 검정 결과

## 제 3 절 기존 개발 병저항성 분자표지의 SNP 분자표지로의 전환

### 1. 토마토 반신위조병(TSWV) 저항성 유전자인 *Sw-5b* 대상 SNP 분자표지 개발

#### 가. 연구수행 내용

##### (1) 토마토 시판품종 유전자원 확보 및 genomic DNA 분리

- ① 본 연구과제에서 사용된 토마토 시판품종들은 농우바이오, 안동대 염인화 교수팀 등에서 종자를 분양받아 사용하였음. 총 32개의 시판품종들로 농우바이오, 신젠타코리아, 몬산토 코리아, 아시아종묘, 타끼이코리아, 사카타코리아에서 육종된 품종된 토마토 품종들을 사용하였음. 대표적 TSWV 저항성 품종인 TYsenseQ 품종과 Titichal 품종을 사용하였고, 감수성품종으로는 Moneymaker 품종과 M82 품종을 사용하였음.
- ② 앞서 확보한 토마토 품종/계통들의 genomic DNA를 분리하기 위해 32구 트레이포트에 온도 26℃, 습도 60%, 14시간 light/ 10시간 dark cycle의 조건인 식물생장상에서 토마토 종자를 파종하였음. 토마토 품종/계통에 따라 4~5주후에 어린잎을 샘플링하여 조건에 맞게 보완한 cetyl-tri-methyl-ammonium bromide (CTAB) protocol (Murray and Thompson 1980)에 따라 토마토의 genomic DNA를 추출하였음.

##### (2) 개발한 SNP마커의 효용성 검정을 위한 HRM (High-resolution melting) 분석

- ① CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, USA)를 이용하여 HRM분석을 진행하였으며, 총 20 $\mu$ l 에 Solg 2X Real-Time PCR Smart Mix2 (SolGent, Korea), primer set (10pmol), 20X EvaGreen fluorescent dye, 10ng genomic DNA로 구성되었음. 95℃에서 15분, 95℃ 20초, 55℃ 40초, 72℃ 30초로 40 cycles이며, PCR반응을 한 후에, 15초마다 65℃에서 95℃로 온도를 증가시키면서 분석을 진행함.

#### 나. 연구결과

##### (1) 반신위조병(TSWV) 저항성과 감수성을 구별할 수 있는 SNP 확보

- ① 국내 시판되고 있는 품종 32개의 염기서열을 이용하여 TSWV에 대한 저항성과 이병성간 한개의 SNP를 발견하였으며, 이 SNP (A→G)는 non-synonymous substitution로 arginine에서 glutamine으로 변환됨(그림 3-1).

##### (2) SNP를 기준으로 HRM용 SNP marker를 제작하여 HRM 분석 진행

- ① 그림 3-1에서 저항성품종들(빨간색)과 감수성품종들(파란색)을 구별하는 SNP를 기준으로 HRM용 SNP 프라이머를 제작하고, HRM분석법으로 SNP의 효용성을 검정하였음. TSWV 저항성과 감수성 품종을 정확하게 구별할 수 있었으며, 이번에 개발한 HRM용 *Sw-5* SNP마커인 SNP-KHU가 기존에 개발된 SNP마커보다 더 정확하게 저항성 품종과 감수성 품종을 구별하였음(그림 3-2) (Shi et al 2011). 본 연구는 원예과학기술지에 게재 됨.

저항성

Stevens (R) AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Ty sense Q AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Titichal AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Savera AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 TY tiny AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Daylose AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Shinheuksu AAACGTATAATCGAGAGAGTTATTACAAGATATTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT

감수성

NY07-464(S) AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Moneymake AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 M82 AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Redpang AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 P.Alexander AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Minimaru AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 G.Minichal AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 TY altoarang AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 A.Delux AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Tiara AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Minichal AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Pinktop AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Rapsody AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Mamirio AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Medison AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 TP-7 plus AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Defnis AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Dunne AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 G.Plus AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Dotaerang AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Oyama AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Unicon AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Minihuksu AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Cadillac AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 TY250 AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Olle TY AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Stix TY AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Bacchus AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT  
 Rapito AAACGTATAATCAAGAGAGTTATTACAAGATATTTTTCAGTCAAGTTACAGGTTTCGACGCACAATGGAGCTACGGTTGATGTT

그림 3-1. SNP-KHU에 의해 중폭된 PCR product 염기서열의 부분과 TSWV 저항성품종과 감수성품종을 구별할 수 있는 SNP

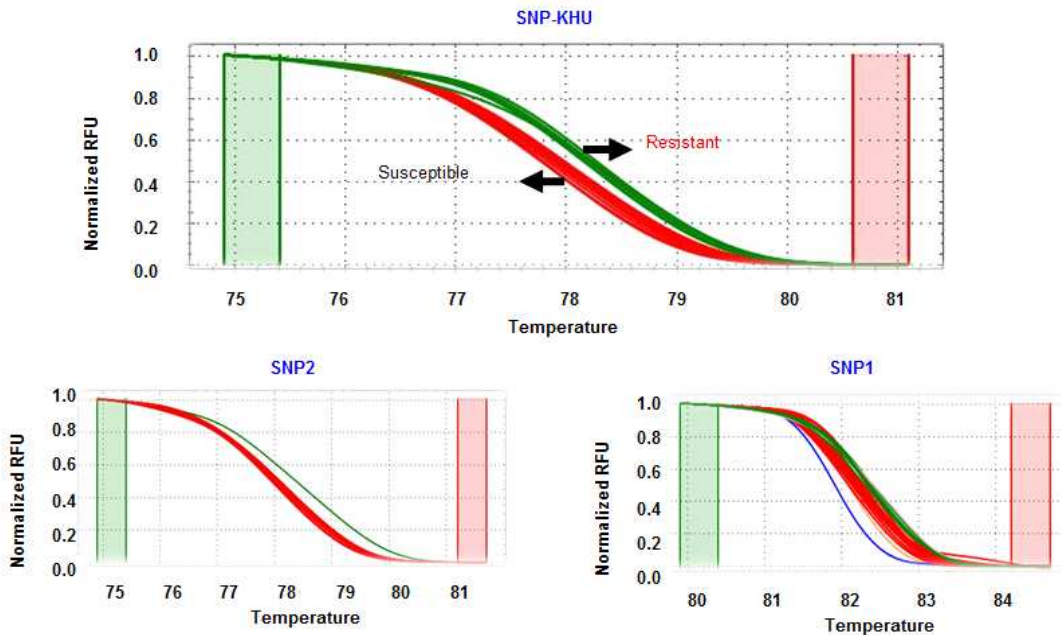


그림 3-2. SNP-KHU의 효용성 검정을 위해 실시한 HRM분석과 기준에 개발된 SNP마커의 한계점



## 2. 토마토 잎곰팡이병 저항성 유전자인 *Cf-9* 대상 SNP 분자표지 개발

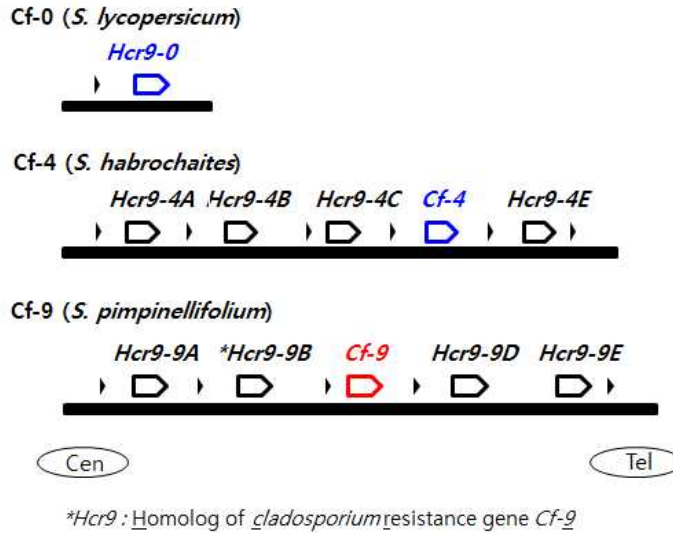
### 가. 연구수행 내용

- (1) 토마토 시판품종 유전자원 확보 및 genomic DNA 분리
  - ① 본 연구과제에서 사용된 토마토 시판품종들은 농우바이오, 안동대 염인화 교수팀 등에서 종자를 분양받아 사용하였음. 총 33개의 시판품종들로 농우바이오, 신젠타코리아, 아시아종묘, 타끼이코리아, 사카타코리아에서 육종된 품종된 토마토 품종들을 사용하였음. 대표적 토마토 잎곰팡이병 저항성 품종인 1134 품종을 사용하였고, 감수성품종으로는 Moneymaker 품종과 M82 품종을 사용하였음.
  - ② 앞서 확보한 토마토 품종/계통들의 genomic DNA를 분리하기 위해 32구 트레이포트에 온도 26°C, 습도 60%, 14시간 light/ 10시간 dark cycle의 조건인 식물생장상에서 토마토 종자를 파종하였음. 토마토 품종/계통에 따라 4~5주후에 어린잎을 샘플링하여 조건에 맞게 보완한 cetyl-tri-methyl-ammonium bromide (CTAB) protocol (Murray and Thompson 1980)에 따라 토마토의 genomic DNA를 추출하였음.
- (2) 개발한 SNP마커의 효용성 검정을 위한 HRM (High-resolution melting) 분석
  - ① CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, USA)를 이용하여 HRM분석을 진행하였으며, 총 20 $\mu$ l 에 Solg 2X Real-Time PCR Smart Mix2 (SolGent, Korea), primer set (10pmol), 20X EvaGreen fluorescent dye, 10ng genomic DNA로 구성되었음. 95°C에서 15분, 95°C 20초, 60°C 15초, 72°C 30초로 40 cycles이며, PCR반응을 한 후에, 10초마다 65°C에서 95°C로 온도를 증가시키면서 분석을 진행함.
- (3) *Cf-4* 유전자를 구별하기 위해 개발된 2개의 InDel마커의 PCR
  - ① T100 Thermal Cycler (Bio-rad, USA)를 이용하여 PCR반응을 진행하였음. 총 20 $\mu$ l 에 Solg 2X Taq PCR Smart Mix2 (SolGent, Korea), primer set (10pmol), 20-30ng genomic DNA로 구성되었음. 95°C에서 2분, 95°C 20초, 55-60°C 40초(primer set에 따라 다름), 72°C 2분로 30-35 cycles을 진행함.
- (4) SNP 마커에 의한 genotyping 결과 검정을 위한 *Agrobacterium*-mediated transient assay에 의한 phnotyping 검정
  - ① 토마토시판품종을 6주간 생장시킨 뒤, *Avr4*, *Avr9*, *GFP*, *Pto/AvrPto* 유전자를 가지고 있는 *A. tumefaciens*를 토마토 시판품종 잎에 접종시킴(Kang et al 2010; Oh and Martin 2011). 본 연구에서의 기준으로는 각각 positive control로 *Pto/AvrPto* 유전자를 발현시키는 *A. tumefaciens*를 사용하였고, negative control로 *GFP*유전자를 발현하는 *A. tumefaciens* 사용하였음. *Avr4*와 *Avr9*을 발현하는 *A. tumefaciens* 균주는 포항공과대학교 손기훈 교수팀으로부터 분양받았음.

### 나. 연구결과

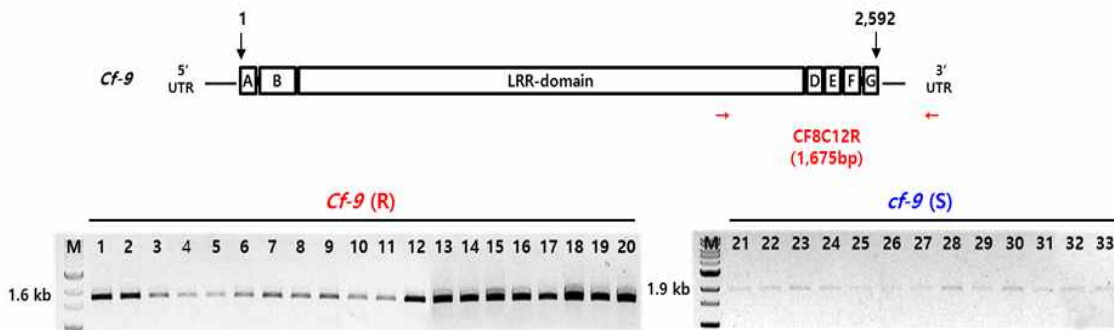
- (1) *Cf-9*유전자에 대한 기존에 개발된 gene-based 마커의 한계점
  - ① *Cf-9*은 *Solanum pimpinellifolium*(Spim)에서 *S. lycopersicum*(Slyc)으로 도입된 유전자이며, *S. habrochaites*(Shab)에도 유사한 기능을 하는 *Cf-9* ortholog가 있음. 이들 토마토 야생종뿐만 아니라 *S. chmielewskii*(Schm), *S. neorickii*(Sneo), *S. chilense*(Schi), *S. peruvianum*(Sper)에는 *Cf-4*라는 또 다른 저항성 유전자가 밝혀져 있는데, *Cf-9*과 매우

유사함 (그림 3-3) (Parniske et al 1997). 기존에 개발된 gene-based 마커로 증폭된 PCR product의 염기서열의 Sequencing결과, *Cf-9*과 homologs 유전자들인 *9DC*, *Cf-4* 유전자의 염기서열과 일치하였고, 이를 통해 *Cf-9*만은 특이적으로 구별할 수 없다는 사실을 알게 되었음(Truong et al 2011). 또한, 기존에 개발된 gene-based 마커가 co-dominant로 알려져 있으나 homozygous 와 heterozygous를 구별하지 못함(그림 3-4).



(Parniske et al. Cell press 1997)

그림 3-3. *Cf-0*, *Cf-4*와 *Cf-9* 유전자에 대한 개략적인 모식도



Gene	Marker	Marker type	Marker ID	Forward	Reverse	Reference
<i>Cf-9</i>	Gene-based	Co-dominant	CF8/C12R	TGGGAATTTACCCGAAAGAA	CCCAATCATTAGTGCCTTA	Truong et al. 2011



그림 3-4. 기존에 개발된 gene-based marker의 전기영동 결과와 한계점

(2) 잎곰팡이병 저항성과 감수성을 구별할 수 있는 SNP 확보

① NCBI(National Center for Biotechnology Information) GenBank database의 염기서열 정보를 이용하여 *Cf-4* 유전자, *cf-9* 감수성 유전자형과 구별되는 *Cf-9* 저항성 유전자 특이적인 SNP를 발견함. 이 두 개의 SNP(A→C와 G→A)는 non-synonymous substitution로 adenine에서 cytosine으로 변환되고 두 번째 SNP는 guanine에서 adenine으로 변환됨(그림 3-5).

```

Cf9-S.hab4 *****C*****
Cf9-S.pim *****C*****
Cf9-S.hab2 *****C*****
Cf9-S.hab3 *****C*****
Cf9-S.hab1 *****C*****

cf9 *****A*****
Cf4-S.hab *****A*****
Cf4-S.chi *****A*****
Cf4-S.per *****A*****
Cf4-S.par *****A*****
Cf4-S.chm *****A*****
Cf4-S.lyc *****A*****

Cf9-S.hab4 *****A*****
Cf9-S.pim *****A*****
Cf9-S.hab2 *****A*****
Cf9-S.hab3 *****A*****
Cf9-S.hab1 *****A*****

cf9 *****G*****
Cf4-S.hab *****G*****
Cf4-S.chi *****G*****
Cf4-S.per *****G*****
Cf4-S.par *****G*****
Cf4-S.chm *****G*****
Cf4-S.lyc *****G*****

```

그림 3-5. NCBI에서 얻은 *Cf-9* 유전자 염기서열의 일부를 나타냄  
(빨간색: *Cf-9* 특이적인 non-synonymous substitution SNP 2개를 표시함)

(3) 개발한 SNP 마커의 효용성 검정을 위한 HRM (High-resolution melting) 분석

- ① 2개의 SNP를 중심으로 HRM용 SNP 프라이머를 제작하고, HRM분석법으로 검정. *Cf-9* 저항성 품종(homozygous/heterozygous), *cf-9* 감수성 품종, 그리고 *Cf-4* 유전자형 저항성 품종 모두 구분하였음(그림 3-6). 세부적으로 *Cf-4* 유전자의 염기서열을 분석해 본 결과, A와 T 염기서열이 *Cf-9*보다 많아 melting curve가 더 안쪽으로 기울어지는 것으로 판단됨(그림 3-7).

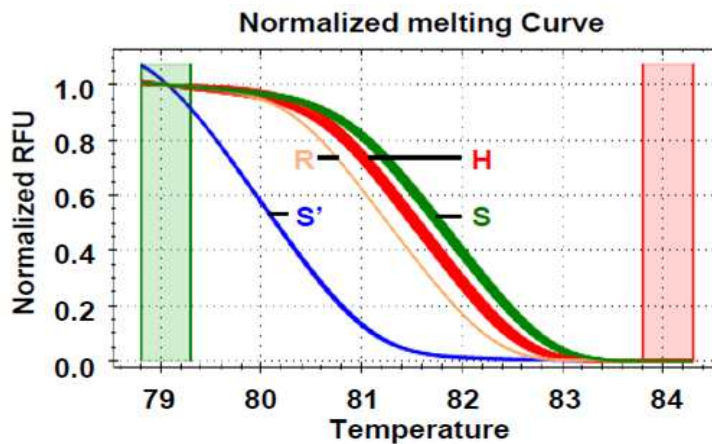


그림 3-6. HRM분석 결과 그래프

(R: *Cf-9* homozygous 품종, H: *Cf-9* heterozygous 품종, S': *Cf-4* 유전자, S: 감수성 품종)

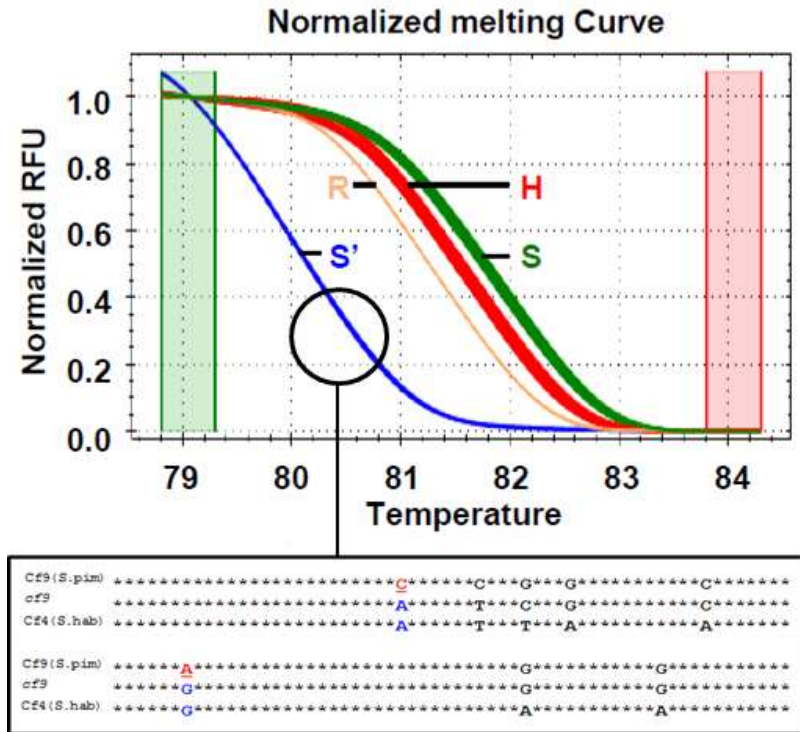


그림 3-7. *Cf-4* 유전자를 가지고 있을 것으로 추정되는 토마토포종의 염기서열 분석

(4) *Cf-4* 유전자를 가진 토마토 시판품종을 구별하기 위한 두 개의 InDel 마커 개발

① *Cf-4* 유전자를 가진 품종들을 선별하기 위해 PCR을 진행하였음. 프라이머는 *Cf-4* 유전자의 두 개의 InDel부분에서 디자인하였는데, InDel-1(174-204bp)에서 디자인된 Cf-9\_F4/R1 primer set를 이용한 PCR 결과가 Pinktop과 Cupirang이 *Cf-4* 유전자로 그룹화(S')되는 HRM결과와 일치한 결과로써 PCR product가 증폭되지 않아 *Cf-4* 유전자를 가짐을 확인함(그림 3-8).

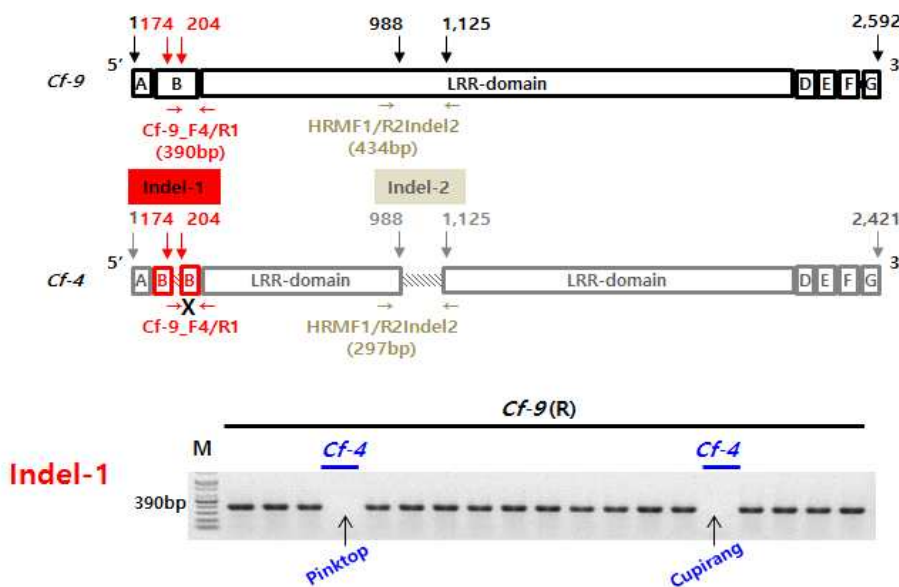


그림 3-8. InDel-1(174-204bp)에 primer제작위치와 전기영동 결과

- ② InDel-2(988-1,125bp)에서는 Pinktop과 Cupirang 품종이 297-bp로 증폭이 되어서 *Cf-4* 유전자를 가질 것으로 예상되었고, 그 외의 품종들의 경우 8번, 11번, 12번의 품종에서도 똑같은 사이즈로 증폭이 되어 이 세 가지 품종의 경우는 *Cf-9*과 *Cf-4* 유전자를 모두 가지고 있는 것으로 판단되었음(그림 3-9).

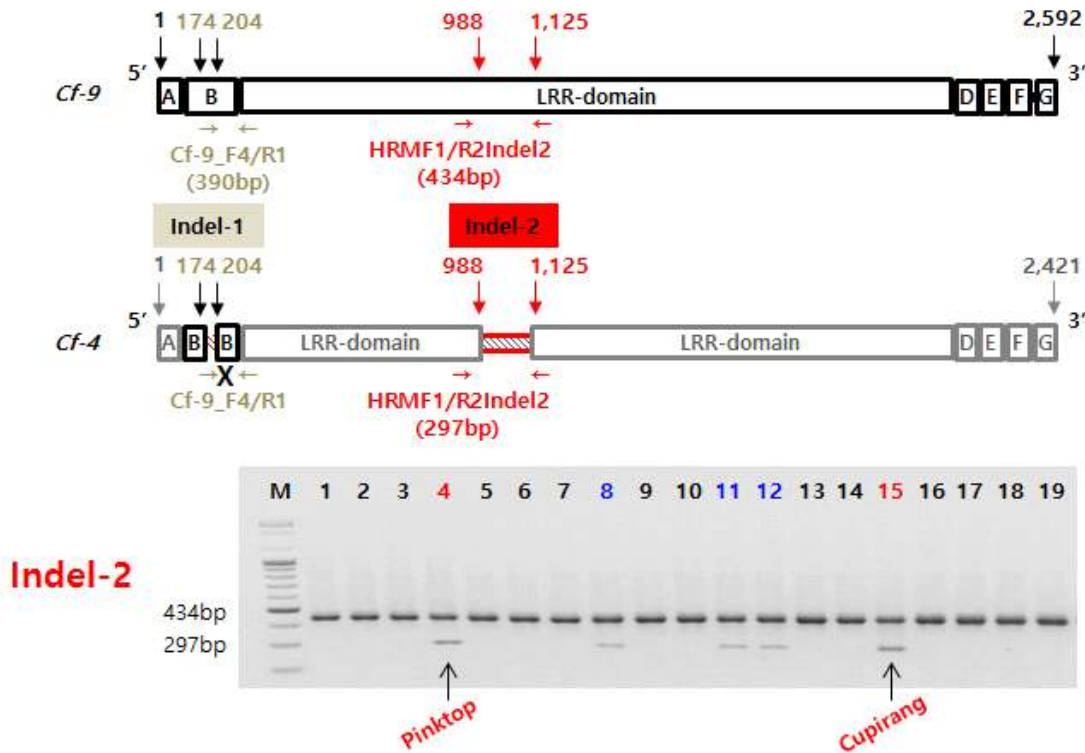


그림 3-9. InDel-1(988-1,125bp)에 primer 제작위치와 전기영동 결과

(5) *Agrobacterium*-mediated transient assay 검정

- ① Genotyping 결과를 검정하기 위해 Avr9 혹은 Avr4 발현을 이용한 HR(과민성 반응) phenotyping을 진행해 확인하였음. 그 결과 SNP 마커와 InDel 마커를 모두 이용한 genotyping 결과를 바탕으로 한 예상결과를 얻을 수 있었음(그림 3-10).

(6) *Cf-9* 유전자에 대한 새로운 SNP 마커와 2개의 InDel 마커의 genotyping 결과 요약

- ① 본 연구에서 개발한 HRM용 SNP 분자마커와 2개의 InDel 마커를 가지고 *Cf-9* 유전자에 대한 특이적인 genotyping 정확도가 기존의 분자마커보다 높은 결과를 얻을 수 있었음 (Table 3-1).
- ② 본 연구에서 개발한 SNP 마커의 경우 기존의 유전자 기반 마커보다 정확도가 매우 높았으며, 기존 품종의 *Cf-9* genotype 결과가 *Cf-4* genotype에 의해 오류가 발생할 수 있음을 확인하였음. 기존 육종회사의 F1 품종의 genotyping 결과를 본 과제에서 개발한 SNP 마커로 보정할 수 있었는데, phenotyping 결과를 통해 이를 확인할 수 있었음. 또한, 기존에 *Cf-9* 혹은 *Cf-4*만을 가지고 있는 품종의 경우 둘 다를 가지고 있는 품종과 구별이 불가능하였는데, 본 과제에서 개발한 InDel 마커들과 함께 검정이 진행된다면, 둘 다를 가지고 있는 품종들의 genotyping 정확도도 100%까지 높일 수 있었음.

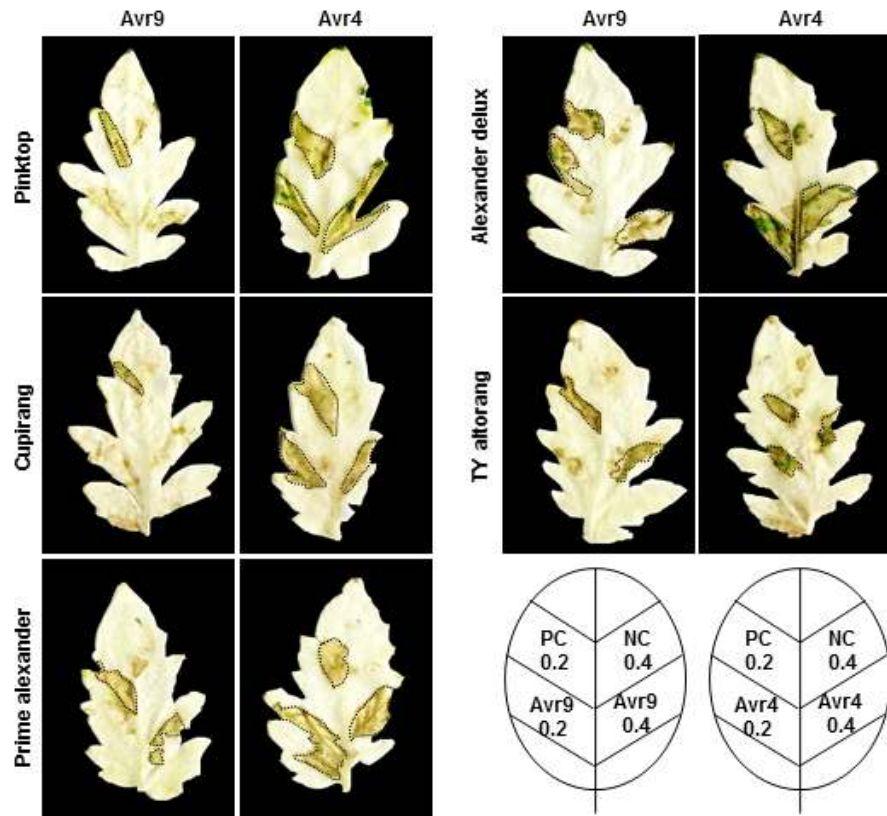


그림 3-10. 토마토 잎에서의 *Agrobacterium*-mediated transient assay 검정 결과 (PC, positive control, expressing Pto/AvrPto; NC, negative control, expressing GFP. 숫자는 접종 농도를 나타냄)

Table 3-1. 기존 개발된 유전자 기반 마커와 SNP-KHU SNP마커 결과 종합비교표

Cultivars	Genotype by a gene-based marker	Genotype by a SNP marker	Genotype by InDel markers	Genotype by phenotyping
Pinktop	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-4</i>	<i>Cf-4</i>	<i>Cf-4</i>
Cupirang	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-4</i>	<i>Cf-4</i>	<i>Cf-4</i>
Prime alexander	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-4, Cf-9</i>	<i>Cf-4, Cf-9</i>
Alexander delux	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-4, Cf-9</i>	<i>Cf-4, Cf-9</i>
TY altorang	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-9</i>	<i>Cf-4, Cf-9</i>	<i>Cf-4, Cf-9</i>

## 제 4 절 과색 판별용 유전자 기반 분자마커 개발(위탁과제)

### 1. 재료 및 방법

#### 가. Genomic DNA 추출

토마토 DNA추출은 생육 중 4-5엽기에 Stainless bead가 든 2ml 튜브에 어린 잎을 채취하여 액체질소(LN2)로 급속냉동을 시킨다. Vortex를 이용하여 곱게 마쇄한 다음, 0.2% Sodium bisulfite가 든 CTAB Buffer를 300 $\mu$ l를 넣어준 후 잘 섞어준다. 섭씨 65도 Water bath에서 30분 처리 후, Chloroform 150 $\mu$ l를 첨가 후 잘 섞어준다. 이후 섭씨 4도에서 15분간 원심분리하여 층 분리를 유도한다. 층 분리된 상층액 200 $\mu$ l을 새 튜브로 옮기고, Pre-chilling된 100% Isopropanol 200 $\mu$ l을 첨가한 후, 천천히 Inverting 시켜준다. 30초간 원심분리하여 DNA Pellet만 남기고, 튜브에 든 액체를 제거해준다. 70% Ethanol 750 $\mu$ l를 넣어준 후, 이전과 동일하게 Inverting 후 30초간 원심분리 한다. 이후 튜브의 액체를 완전히 제거한 후 DNA Pellet만 남은 튜브에 DNase-free water 100 $\mu$ l를 넣어 녹인 후 섭씨 영하 20도에 냉동 보관한다.

#### 나. PCR

PCR은 gDNA 1 $\mu$ l, 10mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20mM Tris-HCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% 0.2mM each dNTP, 0.4mM forward와 reverse Primer, 5units Taq polymerase(TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan), 총 25 $\mu$ l 맞춰주었다. PCR 반응을 위해 T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용하였으며, PCR 조건은 섭씨 94도에서 10분간 초기 변성시키고, 섭씨 94도에서 1분(denaturing), 섭씨 58도에서 1분(annealing), 72도에서 1분(extension) 과정을 35회 반복 후 섭씨 72도에서 10분간 반응시켰다.

#### 다. Cloning 및 DNA 염기서열 분석

증폭된 PCR산물을 이용하여, TOPO TA Cloning® Kit(Invitrogen, USA)을 사용하여 클로닝하고, Chemically Competent Cell(Invitrogen, USA)을 이용하여 heat-shock 방법으로 형질전환을 실시하였고, 실험방법은 제조회사에서 제공한 방법에 따라 수행하였다. Plasmid DNA 추출은 Plasmid DNA prep kit(SolGent, Korea)을 사용하여 DNA를 분리정제 하였으며, 인서트 존재 유무 확인 후 SolGent 사에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. Seqman program(DNASTAR Inc. Madison, Wisconsin, USA)을 이용하여 흑색 품종과 그 밖의 과색을 비교하여 염기서열상의 차이를 분석하였다. 발견된 SNP를 근거로 Sol Genomics Network(<http://solgenomics.net>)에서 제공하는 CAPS design tool을 이용하여 제한효소 종류 및 예상 사이즈를 확인하였다.

#### 라. 제한효소 처리

PCR Product 총 볼륨 25 $\mu$ l 중 10 $\mu$ l를 전기영동하고 PCR증폭 여부를 확인, PCR Product 15 $\mu$ l에 표 1에 기재된 제한효소 2 $\mu$ l, buffer 2 $\mu$ l, 3차 증류수 2 $\mu$ l 각각 넣어 혼합한 후 섭씨 37도에서 1시간 처리하였다.

#### 마. 전기영동

genomic DNA는 예상 단편 길이를 고려하여 2.5% agarose gel을 제조하였으며, gel은 전기영동 후 EtBr로 염색하고, Gel Doc 2000 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 통해 PCR 증폭 및 Genotyping을 실시하였다.

#### 바. 카로티노이드 추출

토마토는 액체질소로 급속 냉동시킨 후 막자사발을 이용하여 곱게 마쇄 한 다음 2ml tube에 sample powder 약100mg과 6mm glass bead 2개를 넣어 주었다. 이후 카로티노이드 추출과정은 광이 차단 된 조건에서 진행 하였으며 추출에 사용된 용매는 모두 HPLC grade를 사용하였다. Sample powder에 300ug 의 Mg-carbonate와 300ul tetrahydrofuran (THF) 를 첨가 한 후 FastPrep-24TM (MP Biomedicals, USA)를 이용하여 20초씩 3번 homogenization 하였다. 이후 4℃, 암조건 에서 10분 동안 incubation 한 후 위와 동일한 조건으로 homogenization을 실시하였다. 다시 한번 4℃, 암조건 에서 20분간 incubation 시킨 tube에 butylated hydroxyl-toluene (BHT)이 첨가된 methanol (MeOH) 을 300ul 넣고 동일한 조건으로 homogenization 한 후 4℃, 암조건에서 10분 동안 incubation을 실시하였다. Homogenate는 Spin-X centrifuge filter (0.45-mm nylon filter, Corning/Costar 8170, USA) 로 옮긴 후 4℃, 4,000rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 기존의 tube에 남아있는 homogenate에 150ul의 THF와 MeOH/BHT를 각각 첨가하고 vortex한 후 끝을 잘라낸 tip을이용하여 원심분리가 끝난 Spin-X centrifuge filter로 모두 옮겨 주었다. 이후 4℃, 4,000rpm 조건에서 원심분리 하여 filtering 된 추출물은 새로운 2ml tube로 옮겨 4℃, 암조건에서 incubation 하였다. 추가적인 extraction을 위해 sample powder가 남아있는 Spin-X tube filter에 350ul의 THF를 넣고 vortex 한 후 4℃, 암조건에서 10분간 incubation 하였다. 이후 4℃, 4,000rpm 조건에서 5분 동안 원심분리하고 다시 한번 150ul의 THF를 첨가하여 4℃, 암조건에서 15분동안 incubation 하였다. Incubation 후 4℃, 4,000rpm 조건에서 5분 동안 원심분리 하였으며 filtering 된 extract는 기존의 추출물이 담긴 2ml tube로 옮겨주었다. Aqueous 층과 carotenoid/nonpolar phase의 분리를 위해 375ul의 petroleum ether와 150ul의 25% NaCl을 첨가한 후 vortex 하여 4℃, 4,000rpm 조건에서 3분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 분리하여 새로운 2ml tube로 옮겨주었으며, 다시 한번 500ul의 petroleum ether를 넣은 후 3분 동안 4℃, 4,000rpm 조건에서 원심분리 하였다. 분리 된 상층액은 기존의 상층액을 담아두었던 2ml tube에 합쳐주었다. 추출물은 MICRO-CENVAC (NB-503CIR, N-BIOTEK)을 이용하여 45℃에 2시간 동안 건조하였다. 바로 HPLC 분석을 하지 않을 경우에 카로티노이드 추출물은 -80℃에 보관하였다.

#### 사. HPLC 분석

카로티노이드 추출물에 500ul의 methyl t-butyl ether를 첨가한 후 15분 동안 실온, 암조건 에서 incubation 하였다. 이후 vortex 후 485ul의 MeOH를 첨가하여 다시 vortex 하였다. 카로티노이드 현탁액은 0.45 syringe filter를 이용해 filtering 한 후 HPLC vial로 옮겨주었다. 카로티노이드 분석을 위해 Agilent HPLC (1260 infinity) 와 Chemstation 소프트웨어가 사용 되었다. 카로티노이드 분리를 위해 2종류의 이동상(0.1% ammonium acetate를 넣은 100% MeOH (A), methyl t-butyl ether (B))과 C<sub>30</sub>고정상(YMC Carotenoid S-5um, 250x4.6mm, Japan), 그리고 guard column (YMC Guard Cartridge, Japan)이 사용되었다. 두 이동상의 용매비율은 0분에서 6분까지는 100% A, 6분부터 26분까지는 4%A, 96% B가 되도록 gradient를 주었고 26분부터 36분까지는 다시100% A 가 되도록 gradient를 주었다. Diode Array Detector (DAD)를 이용해 5가지파장(286nm, 348nm, 434nm, 450nm, 471nm) 에서 관찰하였으며 각 카로티노이드는 maxima absorption spectrum을 통해 비교분석 되었다.



## 2. 내용 및 고찰

가. 흑색토마토 판별 CAPS 마커 개발

(1) 국내에서 시판되는 총 33개의 품종을 이용하였으며(표4-1), 2가지의 분자표지 조합 (Bl-RsaI + Bl-MseI) 으로 흑토마토와 비흑토마토의 판별이 가능하였음.

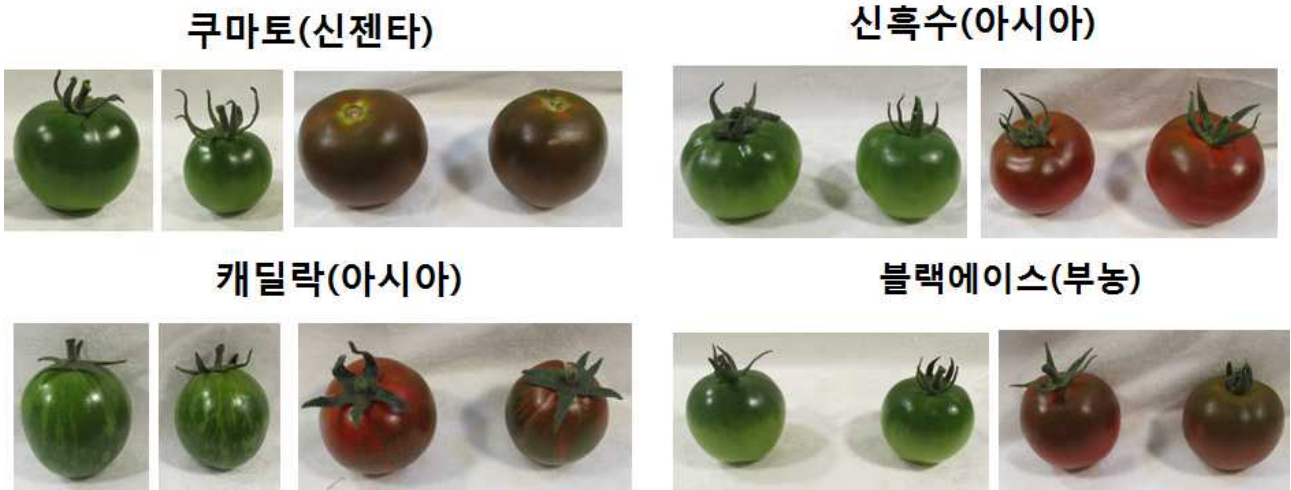


그림4-1. 흑토마토 판별 분자표지 개발에 사용한 흑토마토 대표 품종

표 4-1. 흑토마토 판별용 분자표지 개발에 사용된 토마토 품종 정보

번호	품종명	종자회사	번호	품종명	종자회사
1	오오야마	사카타코리아	18	슈가레드	아시아종묘
2	도태랑TY위너	다끼이코리아	19	슈가옐로우	아시아종묘
3	쿠마토	신젠타코리아	20	TY250	아시아종묘
4	A	신젠타코리아	21	BLACK A	부농종묘
5	B	신젠타코리아	22	BLACK B	부농종묘
6	C	신젠타코리아	23	NON BLACK A	부농종묘
7	D	신젠타코리아	24	NON BLACK B	부농종묘
8	E	신젠타코리아	25	NON BLACK C	부농종묘
9	F	신젠타코리아	26	BLACK1	토마토 생공원
10	G	신젠타코리아	27	BLACK2	토마토 생공원
11	H	신젠타코리아	28	BLACK3	토마토 생공원
12	I	신젠타코리아	29	BLACK4	토마토 생공원
13	티티찰	농우종묘	30	BLACK5	토마토 생공원
14	미니흑수	아시아종묘	31	NON BLACK1	토마토 생공원
15	신흑수	아시아종묘	32	NON BLACK2	토마토 생공원
16	캐딜락	아시아종묘	33	NON BLACK3	토마토 생공원
17	누리마루 2호	아시아종묘			

(2) 본 연구에서는 흑색토마토 유전자의 염기서열 정보(GenBank accession No. EU414632)를 활용하여 국내에서 시판되고 있는 흑토마토 품종들에서 BLACK 유전자를 증폭하여, genomic DNA 상에 존재하고 있는 SNP 정보를 탐색하고 분석함. 그 결과 흑토마토 형질 결정에 직접적으로 영향을 줄 것이라 예상되는 2가지 SNP 서열(TypeI 과 TypeII)을 기반으로 흑토마토 구분용 분자표지를 개발함. 흑색이 아닌 일반적인 토마토의 유전자와 흑색토마토의 염기서열을 비교해 보았을 때, 흑색결정유전자의 인자형이 2가지로 구분됨을 확인할 수 있었음. TypeI의 경우 143번째 아미노산 서열이 Arginine(R)에서 Serine(S)으로 변형됨을 확인할 수 있었고, 이러한 변이는 이미 Barry et al., (2008)에 의하여 보고됨. TypeII의 경우, 91번째 아미노산 서열인 Q 위치에서 premature stop codon이 형성됨으로써, 제대로 기능을 수행할 수 없는 단백질을 합성하게 됨. 이는 기존에 밝혀지지 않았던 새로운 변이에 해당함.

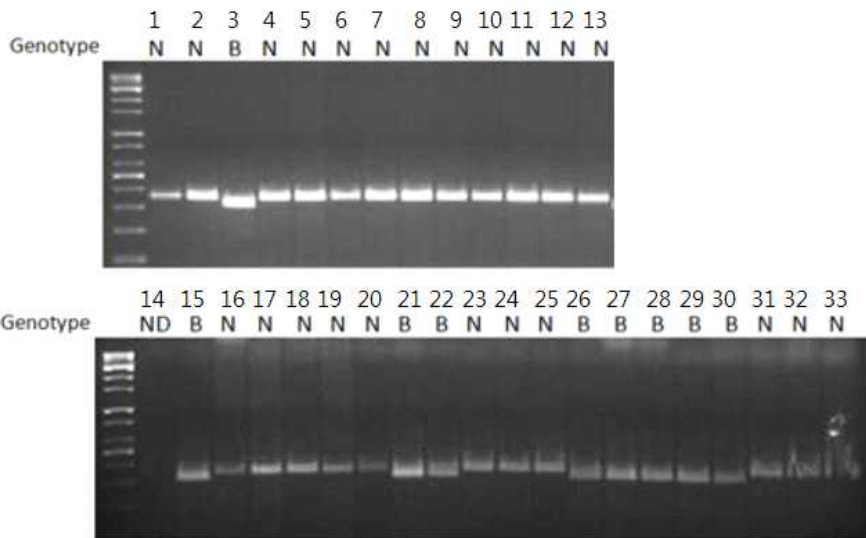


그림 4-2. 흑토마토 판별을 위한 페널테스트(type I marker: B1-RsaI)

N : Normal 의 약자로 과색이 흑색이 아닌 경우를 표기함

B : Black 의 약자로 과색이 흑색인 경우를 표기함

ND : Not Determined

(3) 국내 시판되는 대부분의 흑토마토 품종들을 대상으로 하였으며 이중 미니흑수와 캐딜락은 B1-MseI 분자표지에 그리고 나머지 흑토마토는 B1-RsaI에 의해 비흑토마토와 구분가능함. 따라서 본 과제에서 개발된 2종의 분자표지로 현재 국내 시판되는 흑토마토를 정확히 판별할 수 있을 것으로 예상됨. 앞으로 좀더 많은 국내외 시판되는 다양한 흑토마토 품종을 확보해 판별의 신뢰성을 높일 예정임.

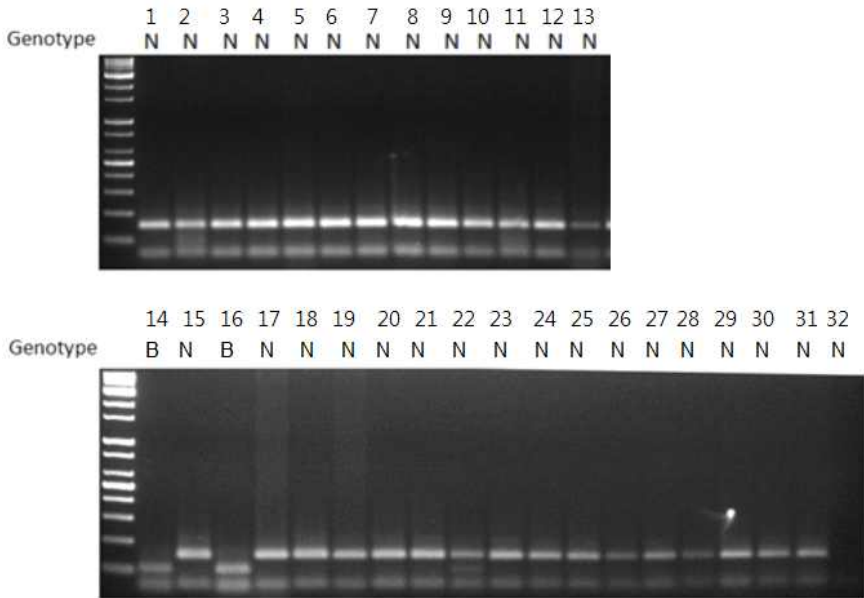


그림 4-3. 흑토마토 판별을 위한 페널테스트(type II marker: BI-MseI)  
 N : Normal 의 약자로 과색이 흑색이 아닌 경우를 표기함  
 B : Black 의 약자로 과색이 흑색인 경우를 표기함

나. 핑크토마토 판별 분자표지 개발

(1) 핑크색유전자의염기서열분석

① 핑크색을 결정하는 유전자인 *y* 유전자(Adato et al. 2009)의 염기서열을 확보하여, 핑크색 토마토와 비핑크색 토마토간의 염기서열차이를 분석하였음. 핑크색 유전자구조는 4개의 exon과 3개의 intron으로 이루어져 있다(그림4-4). 총길이는 3,138 bp 였으며, 이중 exon 길이는 1,017 bp로 확인되었음. 전체핑크색 유전자에서 확인된 SNP는 1,005 bp 위치에서 확인되었음.

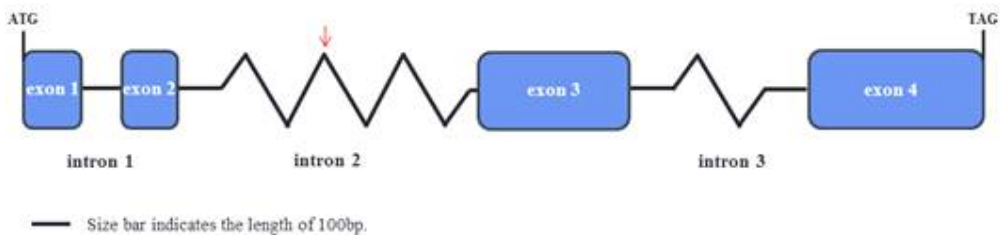


그림4-4. *y* 유전자 구조 및 마커개발에 사용된 SNP 위치(빨간 화살표)

(2) 핑크색판별용 dCAPS마커개발

① 핑크색유전자에서 핑크색 토마토와 비핑크색 토마토간의 염기서열차이를 가지고 dCAPS마커로 primer를 제작하였음. 마커는 2번째 intron에 위치한 SNP를 바탕으로 마커를 개발하였으며, 이 마커는 특정 제한효소에 절단되지 않아, 프라이머상에서 인위적으로 T를 A로 유도하였음. 마커는 intron에 위치한 SNP를 목표로 총길이 300 bp, PsiI제한효소를 사용하여 마커를 제작하였고, 핑크색토마토인 경우 300 bp, 비핑크색토마토는 44 bp, 256 bp의 밴드로 확인 할수 있게 제작되었음 (그림4-5).

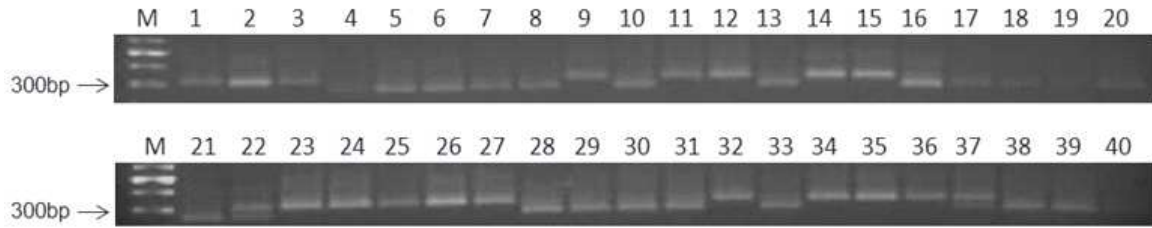


그림4-5. 핑크과색 판별용 dCAPS 마커를 통한 품종, 계통내의 페널테스트

(3) 핑크색판별용 dCAPS마커 페널테스트

- ① 개발된 마커에 다양한 과색으로 구성된 총 40개의 시관품종 및 육성계통을 대상으로 페널테스트를 실시하였음(표4-2).
- ② 핑크색토마토 20개의 시관품종 및육성 계통중 핑크색토마토인 오오야마, 호용, 도태랑TY위너, 마미리오, TP-7플러스, 가야찰플러스, 라피토, NW-pink1, NW-pink2, NW-pink3, NW-pink4, NW-pink5, TILS-pink2, TILS-pink4, TILS-pink5, TILS-pink6은 동형접합자로 선발 가능하였고, 핑크탑, TILS-pink7은 이형접합자상태로 판별 되었음.
- ③ 종자회사에서 붉은색 토마토라고 홍보하는 박커스도 최종적으로 핑크토마토로 확인이 되었고, TILS-pink1, TILS-pink3의 경우 표현형과 마커가 일치하지 않았음(표4-2).
- ④ 이로써 TILS-pink1, TILS-pink3를 제외한 19개의 시관품종 및 육성계통 핑크색토마토를 선발할 수 있었으며, TILS-pink1, TILS-pink3 에 대한 과피 형질의 재확인이 요구됨. 또한, 이 마커를 사용할 경우 현재 토마토 육종 프로그램에서 요구되는 핑크색 토마토의 대부분을 선발 할 수 있을 것이라 판단됨.
- ⑤ 현재 페널테스트에 사용된 계통들내의 핑크과색 F2 분리집단을 통해 마커로 검정된 유전자형과 핑크과색 및 peel 색의 형질이 일치하는지 여부를 확인 중에 있음.

표4-2. 핑크토마토 판별용 dCAPS 마커 적용을 위해 사용된 토마토 품종.

No.	Accession name	Phenotype	Genotype
1	Oyama	Pink	B
2	Hoyong	Pink	B
3	Dotaerangtywinner	Pink	B
4	Kumato	Black	A
5	Dafnis	Red	A
6	Daylos	Red	A
7	Dunne	Red	A
8	Rapsodie	Red	A
9	Mamirio	Pink	B
10	Madison	Red	A
11	TP-7 Plus	Pink	B
12	Gayachalplus	Pink	B
13	Lycopene-9	Red	A
14	Rafito	Pink	B
15	Bacchus*	Pink	B
16	Unicorn	Red	A

17	Shinheuksu	Black	A
18	Nurimaru2ho	Yellow	A
19	Sugarred	Red	A
20	Sugaryellow	Yellow	A
21	Titichal	Red	A
22	Pinktop	Pink	H
23	NW-pink1	Pink	B
24	NW-pink2	Pink	B
25	NW-pink3	Pink	B
26	NW-pink4	Pink	B
27	NW-pink5	Pink	B
28	NW-Red1	Red	A
29	NW-Orange1	Orange	A
30	NW-Balck1	Black	A
31	TILS-pink1	Pink	A
32	TILS-pink2	Pink	B
33	TILS-pink3	Pink	A
34	TILS-pink4	Pink	B
35	TILS-pink5	Pink	B
36	TILS-pink6	Pink	B
37	TILS-pink7	Pink	H
38	TILS-red1	Red	A
39	TILS-yellow1	Yellow	A
40	TILS-black1	Black	A

Genotype: A: not pink, B: pink

#### 다. 주황색 과색 판별 분자표지 개발

(1) 주황색 토마토를 결정하는 유전자좌는 다수로 보고되었음. 카로티노이드 분석결과 도입종인 KT0072는 주황색 카로티노이드인  $\delta$ -carotene의 함량이 증가해서 과색이 결정되는 것으로 사료된 바(그림 4-6) 후보유전자인 LCY-E의 유전자 서열을 탐색함.

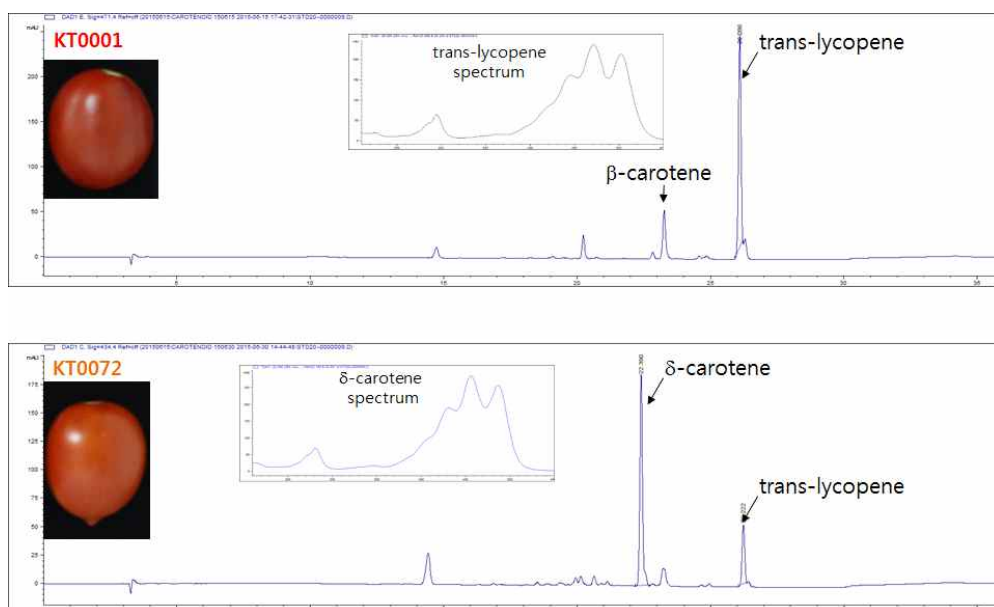


그림4-6. 빨간색 과실인 KT0001 과 오렌지색 과실인 KT0072의 과실 및 HPLC 비교 profile.

(2) 탐색된 염기서열을 기반으로 두 개의 INDEL 분자표지(orangeINDEL1, 2)를 개발함. 개발된 분자표지를 다양한 과색을 지니는 40개의 유전자원 및 품종에 적용결과 KT0072 에서만 다형성을 보임(그림4-7). 아직 국내에 도입되지 않는 계통으로 생각되는바 차후 육종프로그램으로의 적용이 필요할 것으로 예상됨.

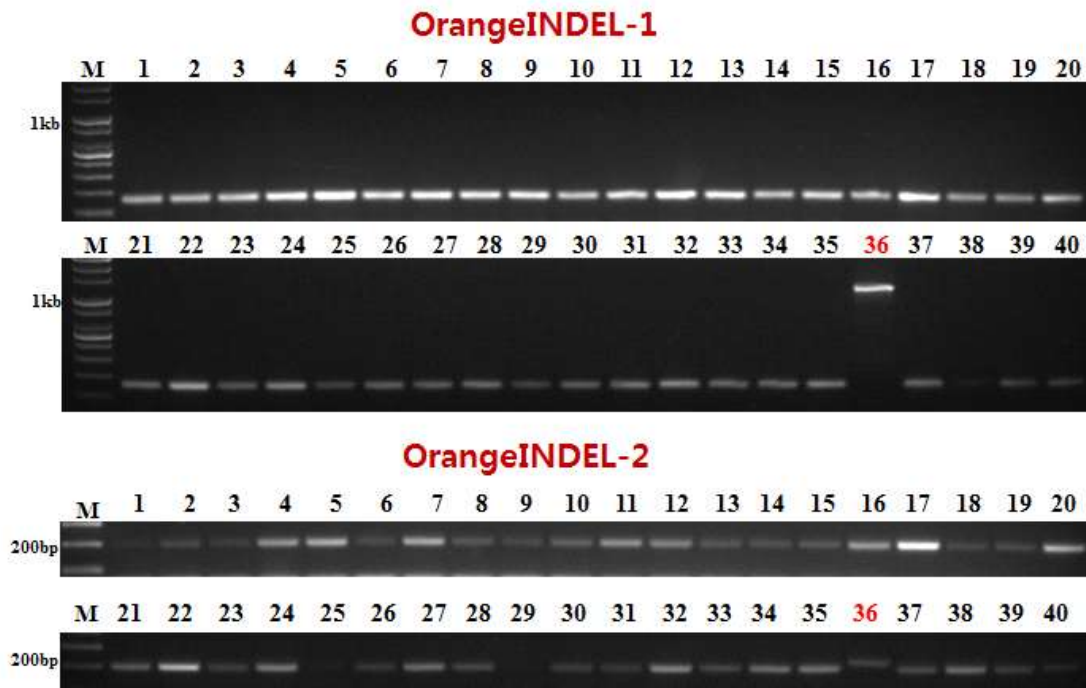


그림4-7. LCY-E기반 두 가지 InDEL 분자표지의 유전자원내의 다형성. 1~10: Red, 11~20: Pink, 21~30: Brown, 31~38: Orange(36: KT0072), 39~40: yellow

(3) 개발된 유전자표지가 주황색 과실 형질과 일치함을 확인하기 위해 KT0001과 KT0072를 모부분으로 하는 97개의 F2 집단을 작성하여 과색형질과 유전자형이 완전 일치함을 확인함(그림4-8).

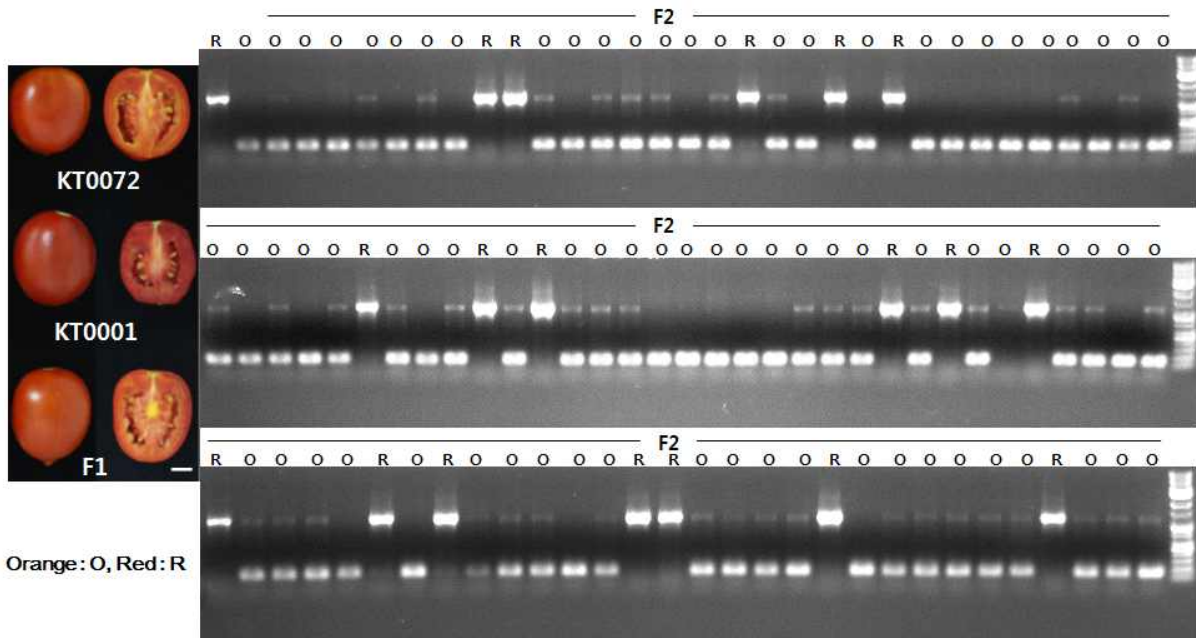


그림4-8. LCY-E 기반 InDel 분자표지와 과색형질간의 분리집단(KT0001 X KT0072 F2 97개) 내의 완전일치

라. HPLC 통한 토마토 과색 형질 판별 기술 확립

(1) 토마토 유전자원 중 빨간색 과색보이는 KT0001와 주황색 계통인 KT0072, BetaAC, 노란색 계통인 아시아종묘 시판 품종인 Sugar yellow 확보함(표4-3).

표4-3. 다양한 과색을 보이는 토마토 유전자원

	학명	자원명	과색
1	<i>Solanum lycopersicum</i>	KT0001	Red
2	<i>Solanum lycopersicum</i>	KT0072	Orange
3	<i>Solanum lycopersicum</i>	BetaAC	Orange
4	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sugar yellow	Yellow

(2) 수집한 토마토 유전자원의 Carotenoid 추출 및 HPLC 분석

① 토마토 유전자원의 과실에서 Carotenoid를 추출법과 HPLC 조건을 확립하고(그림4-9, 4-10), 5 종류 UV 파장 별로 추출된 카로티노이드 정성분석 실시함(표4-4).

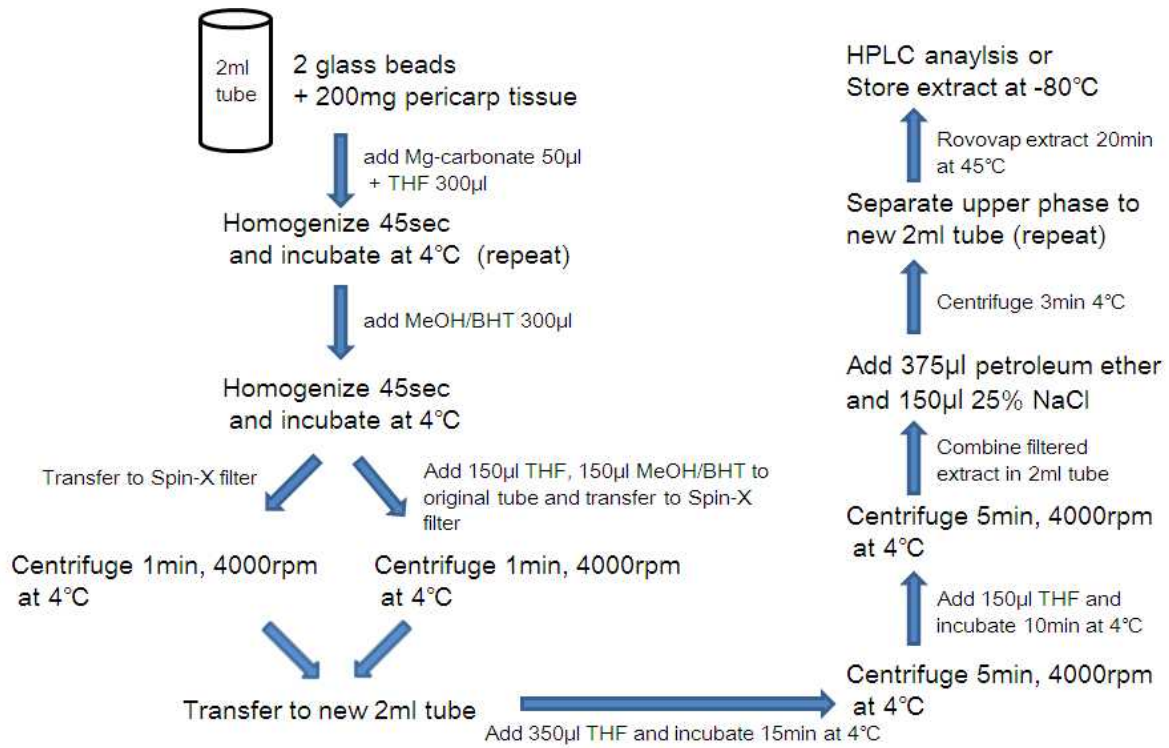


그림4-9. 토마토 과실에서 카로티노이드 추출 방법을 나타낸 모식도



그림4-10. 카로티노이드 분석에 사용된 Agilent DE/1260(UHPLC 급)

표4-4. 각 파장 별 검출되는 카로티노이드.

검출 파장	카로티노이드
286nm	phytoene
348nm	phytofluene
434nm	lutein, $\delta$ -carotene
450nm	$\beta$ -carotene
471nm	trans-lycopene, cis-lycopene

마. 유전자원의 HPLC profile과 spectrum을 통한 카로티노이드 정성분석

- (1) HPLC를 통해 토마토 과실에서 추출된 카로티노이드를 분석하고 각 토마토를 구성하고 있는 Carotenoid components와 함유량 확인함.
- (2) 빨간색 과색을 지닌 KT0001의 카로티노이드를 추출하고 통해 각 파장별 카로티노이드를



retention time과 spectrum을 통해 총 7종류의 카로티노이드를 동정함(그림 4-11).

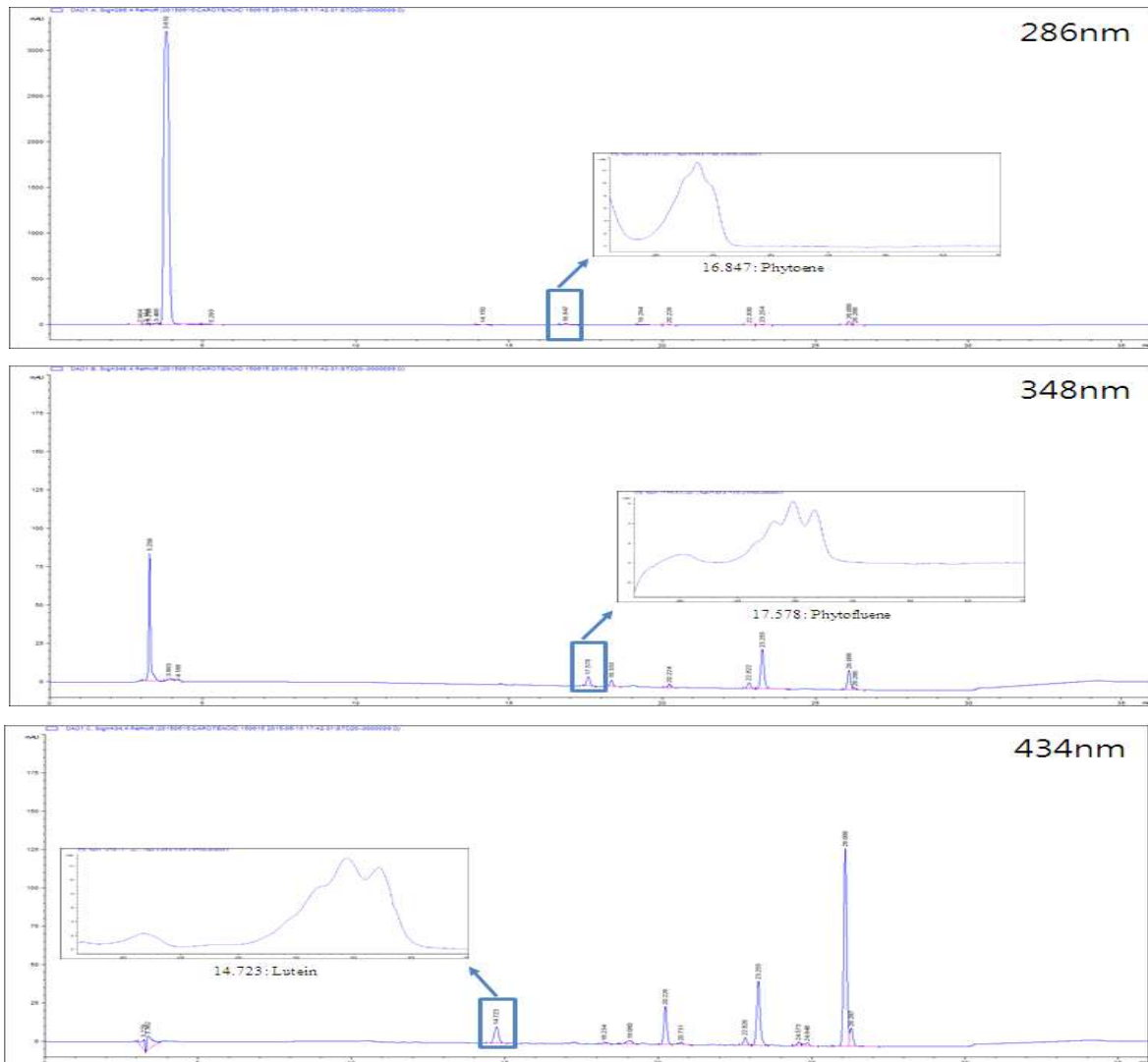
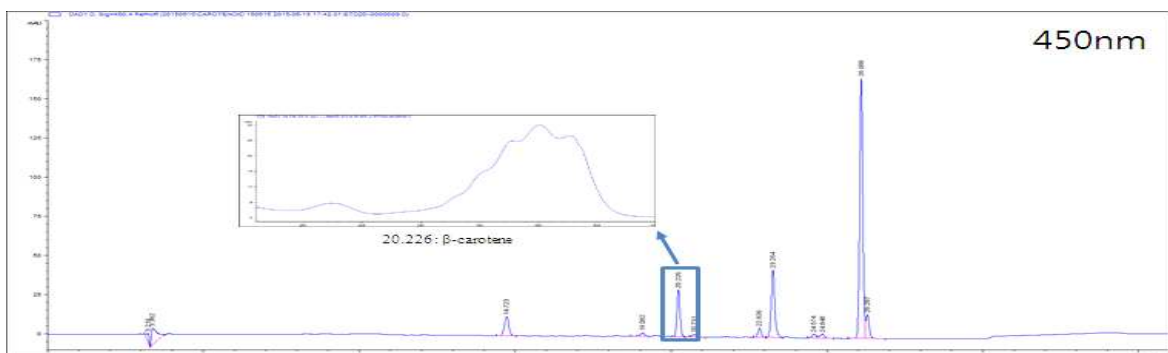


그림4-11. 빨간색 과색을 지닌 KT0001에서의 HPLC profiles과 카로티노이드의 spectrum.

(3) 다양한 과색을 갖는 토마토 유전자원의 HPLC 분석을 통해 과색에 결정적인 영향을 미치는 trans-lycopene과  $\beta$ -carotene의 함량 비교 분석 및 유전자원 특이적인 카로티노이드 정성분석함(그림4-12, 4-13, 4-14).



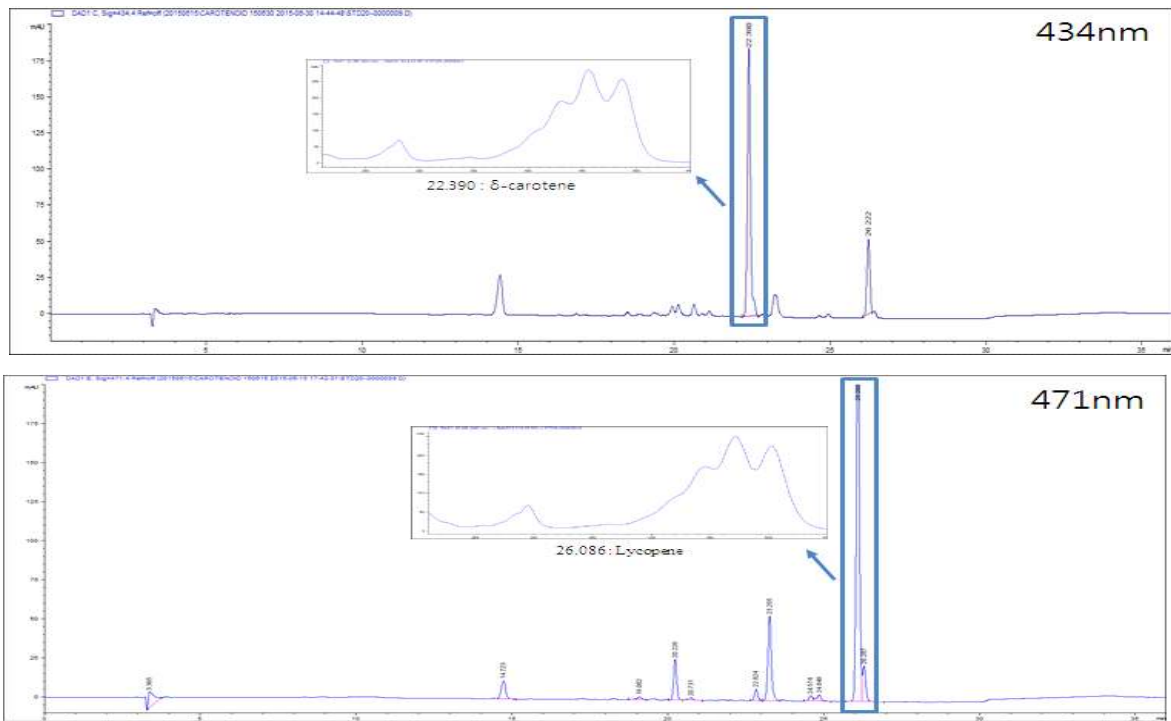


그림4-12. 오렌지 과색을 지닌 KT00072에서의 HPLC profiles과  $\delta$ -carotene의 spectrum.

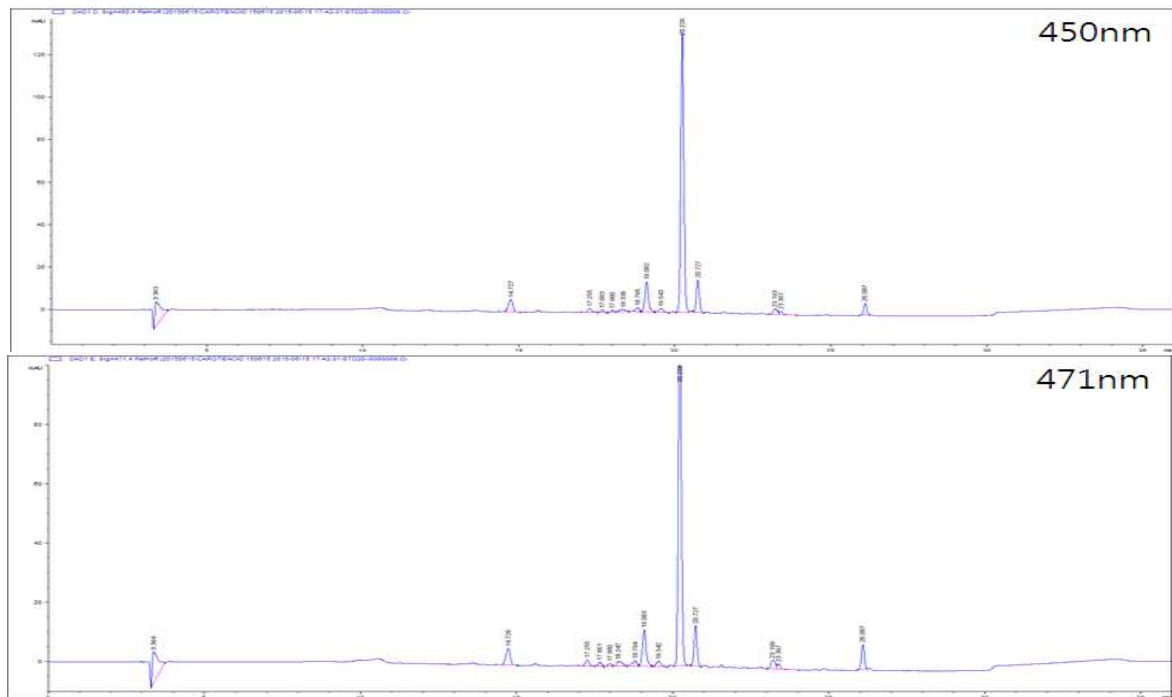


그림4-13. 오렌지 과색을 지닌 BetaAC에서의 HPLC profiles

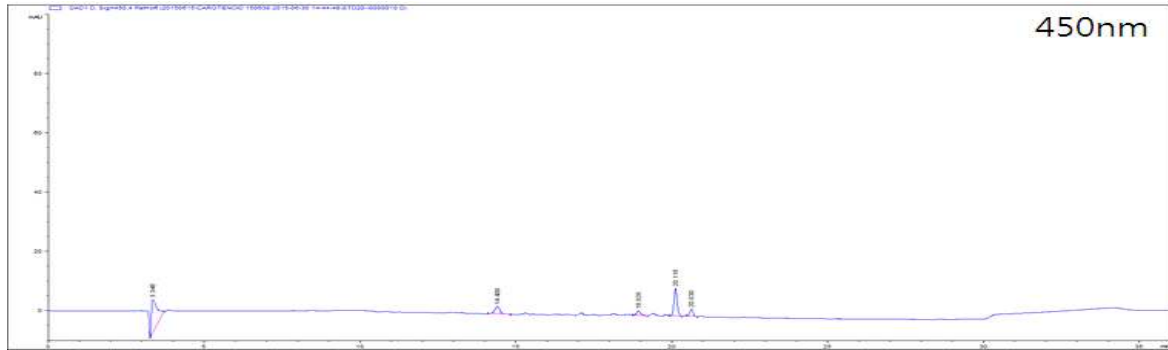


그림4-14. 노란색 과색을 지닌 Sugar yellow에서의 HPLC profiles.

(4) 수집된 토마토 유전자원의 과색은 Carotenoid는 생합성 과정 중 다양한 기작에 의해 결정됨. 일반적인 red fruit인 KT0001의 경우 Lycopene이 과다 축적되어 빨간색 과색을 나타냄, 반면 Beta AC와 KT00072는 Lycopene을 기질로 각각  $\beta$ -carotene과  $\delta$ -carotene 합성유전자인을 LCY-B와 LCY-E의 발현이 증가하여 Lycopene의 함량은 줄어들고  $\beta$ -carotene과  $\delta$ -carotene의 함량이 증가함에 따라 주황색 과색을 나타내는 것으로 사료됨. Sugar yellow는 카로티노이드 생합성 상위 단계 유전자 발현이 억제되어 노란색을 사료됨.

## 제 5 절 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 병저항성 분자표지 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 식물재료

본 연구에 사용된 토마토는 50여개의 시판품종 및 육성계통이며, 토마토유전자원센터 'TGRC (Tomato Genetics Resource Center, USA.)'와 'AVRDC (The World Vegetable Center, Taiwan)', 농업연구기구 'Volcani Center(이스라엘)', '농촌진흥청 유전자원센터', 'Cornell university'에서 다양한 TYLCV 저항성 유전자원을 분양 받았다. Tomato Genetics Resource Center (TGRC) 에서 분양 받은 LA1932, LA1938, LA1969, LA2779, LA3473, LA3474 와 Cornell University (USA) 에서 분양 받은 E6203, 농우바이오에서 분양 받은 TT찰(농우바이오)을 사용하였다. 사용한 식물자원은 TYLCV 대하여 저항성과 이병성을 나타낸다. *Ty1* 저항성 유전자를 보유한 것으로 보고된 LA1969, LA3473 와 *Ty1* 저항성으로 알려진 시판품종인 TT찰을 이형접합체로 사용되었다. *Ty3* 저항성 유전자로 보고된 토마토 자원은 LA1932, LA1938, LA2779을 사용하였으며, 이병성으로는 LA3474, E6203을 사용하였다. 시판품종 'Ooyama (SAKATA, Korea)'와 *Ty2* 유전자가 위치 한 것으로 알려진 introgression line 'IL11C'와 이병성 자원 M82를 교배하여 작성한 F1 세대 등 다양한 자원을 본 실험에 사용하였다.

#### 나. genomic DNA 추출

DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였다(Kang *et al.*, 2001). 토마토의 어린 잎조직을 stainless bead와 LN<sub>2</sub>를 이용하여 마쇄하였다. 300  $\mu$ l CTAB (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol) buffer를 넣고 10분 간격으로 흔들어 주며 65°C에서 30분 처리 후, 150  $\mu$ l chloroform을 넣고 vortexing 처리하여 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 200  $\mu$ l 를 채취하여 1.5 ml tube로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었다. 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였다. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 100  $\mu$ l DNase-free water에 42°C에서 5분간 녹여주었다.

#### 다. TYLCV접종 및 병검정 방법

TYLCV 접종은 *Agrobacterium tumefaciens* 분리주 GV3101을 pCAMBIA3301-TYLCV로 형질전환된 것을 사용하였다(성균관대학교, 이석찬교수 분양). 형질전환된 *A. tumefaciens*을 Kanamycin 50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, Rifampicin 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, Gentamycin 25  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>을 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배지에서 28 °C, 200 rpm 진동항온기에서 30~36시간 배양하여 OD<sub>600</sub> 값을 1.8로 조정 한 후 pin-prick 방법을 통하여 접종하였다. 토마토의 정단부를 insect pin 1호를 사용하여 반복적으로 20회 찔러 미세한 상처낸 후, 이에 배양액을 100  $\mu$ l 흡수 시키는 방법으로 접종을 진행하였다. TYLCV의 접종은 각각의 계통 및 품종에 대하여 3-5개체 실시하였다.

TYLCV 병저항성 검정은 유전자형과 표현형 두 가지를 비교하여 실시하였다. 유전자형 검정은 접종된 토마토에서 추출된 gDNA내의 viral DNA 존재여부를 PCR 기법으로 판정하여 수행하였다. Cork borer(11 mm)를 이용하여 DNA 추출에 사용되는 잎의 면적을 정량화 하였고, TYLCV가 접종된 위치에서 위쪽과 아래쪽의 곁가지와 신초에서 채취된 의 잎 조직이 viral DNA 검출에 사용되었다. 채취된 토마토 잎 조직은 CTAB 방법을 사용하여 gDNA 추출이 실행되었으며, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 total DNA 농도를 130 ng/ $\mu$ l 으로 정량하여 사용하였다. Control로 tomato-Actin primer을 이용한 PCR을 진행하였고, TYLCV-C1 primer을 활용한 PCR 진행을 통해 조직내에서의 TYLCV viral DNA 존재여부를 통해 감염 여부를 판정하였다. PCR 조성으로는 정량한 gDNA 1  $\mu$ l, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 % 0.2 mM each dNTP, 0.4 uM forward와 reverse primer, 5 units Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 총 25  $\mu$ l하였으며, T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)을 이용하여 PCR을 진행 하였다. PCR 조건은 처음 94 °C에서 10분을 하며, 94 °C 30초, 55 °C 30초, 72 °C 30초의 순서로 30반복하고, 마지막으로 72 °C에서 10분 실시하였고, 전기영동은 EtBr이 포함된 1.2 % Agarose gel로 실시하였으며, Gel Doc XR+System(BIO-RAD, USA)으로 확인하였다. TYLCV 접종된 토마토의 표현형을 판단하기 위하여 토마토의 병징이 관찰되었다. TYLCV 에 감염된 토마토의 병징으로는 잎이 황화되며, 생장이 활발한 신초에서 위축현상과 생장억제가 있다. TYLCV 를 접종한 후 생성된 곁가지를 대상으로 5주째에 증상등급을 0부터 3까지 4단계로 구분하였다. A 단계(증상 없음), B 단계(약한 증상, 생장 지연), C 단계(약한 위축), D 단계(심한 위축)으로 저항성 정도를 측정하였다.

#### 라. *Ty1/3* 유전자 Cloning 및 염기서열 분석

*Ty1/3* 유전자와 증폭을 위한 프라이머는 Sol Genomics Network의 정보의 Solyc06g051180을 활용하여 제작되었으며, 염기서열 분석을 위해 gDNA 와 cDNA 를 활용하여 PCR이 진행되었다 (표5-1). PCR 조건은 처음 94 °C 에서 10분을 하며, 94 °C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분의 순서로 30반복하고, 마지막으로 72°C 에서 10분 실시하였고, EtBr 이 포함된 1.2 % Agarose gel 을 통하여 단일밴드 형성을 확인하였으며, cloning에는 TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, USA)와 Chemically Competent Cell (SolGent, Korea) 또는 Electro-Cell(TaKaRa, Japan)이 사용되었다. 형질전환은 heat-shock 또는 electronic-shock 방법으로 진행되었으며, 제조회사에서 제공한 방법에 따라 실시되었다. Plasmid DNA 추출은 Plasmid DNA prep kit (SolGent, Korea) 을 사용하여 실시하였고, *EcoRI* 제한 효소를 통하여 인서트 존재를 확인 후 SolGent 사에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. 해독된 염기서열은 6Kb 이며, *Ty1/3* 저항성 토마토와 이병성 토마토의 염기서열 차이는 SeqMan program (DNASTAR, USA) 을 통해 확인하였다.

표 5-1. *Ty1* cloning 및 CAPS 마커에 사용된 프라이머 정보

프라이머 명칭	서열 (5' → 3' )	서열번호
Ty1-IY F	ATG AAG ACA AAA ACT GCT TC	1
Ty1-IY R	TCA GGG TTT CAC TTC TAT GAA T	2

#### 마. *Ty2* 후보유전자 활용 분자마커 제작 및 적용

*Ty2* mapping에 관한 Yang 등(2014)의 논문에 게시된 35개의 후보유전자 중 ‘CC-NBS-LRR, resistance protein’, ‘Elongation factor 1-alpha’, ‘Transcription factor MADS-box’, ‘Arsenite ATPase transporter (Eurofung)’, ‘Telomere repeat-binding protein 4’, ‘DNA-directed RNA polymerase II subunit J’, ‘Disease resistance protein R3a-like protein’ 7개의 유전자를 PCR 기법을 활용하여 분석하였다. 그 중 ‘DNA-directed RNA polymerase II subunit J’의 경우에는 sol genomics network blast (Solyc11g069910.1)의 정보를 활용하여 2 sets의 primer를 제작하였다. 개시코돈 부터 1.3 kb 크기의 primer (표5-1:14IY181 and 14IY182)와 개시코돈 부터 종결코돈 까지의 2.4 kb 크기의 primer (14IY181 and 14IY184)를 제작하였다. PCR 용액 조성은 2  $\mu$ l gDNA, 2.5  $\mu$ l 10xPCR buffer, 2  $\mu$ l dNTP mixture, 0.1  $\mu$ l 5 unit rTaq polymerase (Takara, Japan), 각 1  $\mu$ l 10 pmol  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> primer (14IY181 and 14IY182)으로 조성되었다. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)을 이용하였다. PCR조건은 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72°C에서 10분간 반응시켰다. 전기영동은 EtBr이 포함된 1.6% agarose gel에서 실시하였으며, Gel Doc 2000 (BIO-RAD, USA)을 통해 genotyping을 실시하였다. Cloning은 T-Blunt™ PCR Cloning Kit (Solgent, Korea), T-Blunt™ Chemically Competent Cell (Solgent, Korea)를 사용하였고 heat-shock 방법으로 *E.coli*에 형질전환 하였으며, 메뉴얼에 따라 실시하였다. 클로닝 후 colony PCR을 통해 인서트를 확인하였으며, 인서트가 확인된 클론을 선발하여 활용하였다. Plasmid DNA 추출은 Plasmid mini prep kit (Solgent, korea)를 사용하여 pDNA를 분리하고, 인서트 확인 후 Solgent사에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. 확보된 염기서열 및 아미노산 서열 분석에는 SeqMan, EditSeq, MegAlign (DNASTAR, USA)을 활용하였다.

표 5-2. Primer sequences used for *Ty2* candidate gene.

Name	Primer sequence (5' to 3')	Reference
14IY181	F : ATGAATGCTCCAGATCGTTACGAAC	
14IY182	R : GATCCACCAAAGGCAGCTAGCTTCT	Solyc11g069910.1
14IY184	R : TTAGTAGTCCCTCGTGTGCTTGGCCA	

#### 바. *Ty2* 후보유전자 RT-PCR

식물재료는 *Ty2* 이병성 자원 ‘M82’, ‘E6203’과 저항성 자원인 ‘IL11C’, ‘LA0386’, ‘LA1777’을 사용하였다. RNA 추출은 RNeasy Plant Mini Kit (50) (Qiagen, USA)를 사용하였으며 cDNA 합성은 SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA)을 사용하고 메뉴얼에 따라 실시하였다. PCR은 T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. PCR 용액 조성은 1  $\mu$ l cDNA, 2.5  $\mu$ l 10xPCR buffer, 2  $\mu$ l dNTP mixture, 0.1  $\mu$ l 5 unit rTaq polymerase (Takara, Japan), 각 1  $\mu$ l 10 pmol  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> primer (표5-2). T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하였으며, PCR 조건은 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 30회 반복 후 72°C에서 10분간 반응시켰다. 전기

영동은 EtBr이 포함된 1.6% agarose gel에서 실시하였으며, Gel Doc 2000 (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. Control으로 사용된 토마토 Actin primer set의 PCR 용액조성은 2  $\mu$ l gDNA, 2.5  $\mu$ l 10xPCR buffer, 2  $\mu$ l dNTP mixture, 0.1  $\mu$ l 5 unit rTaq polymerase (Takara, Japan), 각 1  $\mu$ l 10 pmol  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> primer이다.

#### 사. *ty5* 유전자기반 분자마커 제작 및 적용

열성유전자인 *ty5*는 *PELOTA*로 재배종인 ‘TY172’에 도입되어있다. *ty5* 저항성 유전자원 ‘TY172’와 이병성 자원 ‘M82’의 *PELOTA* 유전자 염기서열 정보를 활용하여 dCAPS 마커를 제작하였다. 염기서열 정보는 Levin 등(2013)의 자료와 SGN 데이터베이스(Sol Genomics Network; <http://solgenomics.net/>)에서 확보하였다(Solyc04g009810.2). 염기서열 분석 및 분자마커 제작에는 SeqMan, EditSeq (DNASTAR, USA)을 활용하였다. PCR 용액 조성은 2  $\mu$ l gDNA, 2.5  $\mu$ l 10x PCR buffer, 2  $\mu$ l dNTP mixture, 0.15  $\mu$ l 5 unit rTaq polymerase, 각 1  $\mu$ l 10 pmol  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> primer 이다. PCR 조건은 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 94°C에서 1분, 55°C 에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복 후 72°C에서 10분간 반응시켰다. 제한효소 처리는 15  $\mu$ l PCR 산물 에, 2  $\mu$ l *Rsa*I 제한효소, 2  $\mu$ l buffer (NEB, England), 2  $\mu$ l 증류수, 을 넣은 후 37°C에서 1시간 처리하였다. 전기영동은 EtBr이 포함된 1.6% agarose gel에서 실시하였으며, Gel Doc 2000 (Bio-Rad, USA)을 통해 genotyping을 실시하였다.

#### 아. CAPS 마커 제작 및 분석조건

Ty1/3 저항성 구분을 위한 3개의 CAPS 마커(Ty1-SspI, Ty1-BglIII, Ty1-TaqI)의 PCR 조건은 모두 동일하게 진행되었다(표5-2). 정량한 gDNA 1  $\mu$ l, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% 0.2 mM each dNTP, 0.4 uM forward와 reverse primer, 5 units Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 총 25 ul 맞춰주었다. PCR 반응을 위해 T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) 을 이용하였다, PCR 온도조건은 섭씨 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 섭씨 94°C에서 1분(denaturing), 섭씨 55°C에서 1분(annealing), 섭씨 72°C에서 1분(extension) 과정을 35회 반복 후 섭씨 72°C에서 10분간 반응시켰다. 제한효소 처리는 Ty1-SspI 마커의 경우 *Ssp*I 제한효소를 사용하며, PCR product 15  $\mu$ l, *Ssp*I 2  $\mu$ l, *Ssp*I buffer 2  $\mu$ l, 증류수로 총 20  $\mu$ l 맞춰주었다. 반응조건은 섭씨 37°C에서 1시간 처리 후 2.5% agarose gel을 EtBr로 염색하고 전기영동 후 Gel Doc 2000 (BIO-RAD, USA)을 통해 밴드를 확인하였다. 두 번째 Ty1-BglIII 마커는 *Bg*III 제한효소를 사용했으며, PCR product 15  $\mu$ l, *Bg*III 2  $\mu$ l, NEB 3 Buffer 2  $\mu$ l, 증류수로 총 20  $\mu$ l 맞춰주었다. 반응 조건 및 전기영동은 위의 방법과 동일하였다. Ty1-TaqI 마커는 *Taq*I 제한효소를 사용하였다. PCR product 15  $\mu$ l, *Taq*I 2  $\mu$ l, 10 x T Buffer 2  $\mu$ l, BSA 0.1  $\mu$ l, 증류수로 총 20  $\mu$ l 맞춰주었으며 반응 조건 및 전기영동은 위의 방법과 동일하였다. Ty4 CAPS 분자표지의 경우 C2\_At4g17300 사용 시 제한효소 처리는 PCR 산물 15  $\mu$ l에 2  $\mu$ l *A*III 제한효소, 2  $\mu$ l NEBuffer (NEB, England), 증류수 2  $\mu$ l 을 넣은 후 37°C에서 1시간 처리. 전기영동은 EtBr이 포함된 1.6% agarose gel에서 실시하였으며, Gel Doc 을 통해 genotyping을 실시하였다.

## 2. 내용 및 결과

### 가. Infectious clone 활용한 TYLCV 병검정 체계 최적화

(1) TYLCV 감염성 clone 활용한 pinprick접종방법 실시를 통한 대량접종시스템을 확립하였고, 유전자 형과 표현형 두 가지를 비교하여 병저항성 검정체계를 확립.

(2) Infectious clone을 활용한 TYLCV 접종법은 담배가루이를 매개충으로 활용한 접종법에 비하여 고농도 접종에 해당하므로, 균일하게 저농도 접종을 실시하는 것이 집단 검정의 핵심이며, 이를 위하여 Agrobacterium의 induction 조건 및 Agrobacterium 균주 농도의 희석 조건을 최적화 함.

(3) 담배와 토마토에서의 비교 평가를 통해 접종조건 최적화를 진행하였다 (그림 5-1, 그림 5-2). Infectious clone 활용한 병저항성 검정 결과와 온실에서 발생한 자연발병상황에서 얻은 병저항성 검정 결과를 비교 평가하여, 결과의 신뢰도를 높임.



[그림 5-1] 담배에서의 TYLCV 접종 체계 확립



[그림5-2] 시판 토마토 품종에서의 TYLCV 접종 체계 확립



Ty1/T, Ty2 저항성유전자도입 자원



TYLCV 이병성 자원

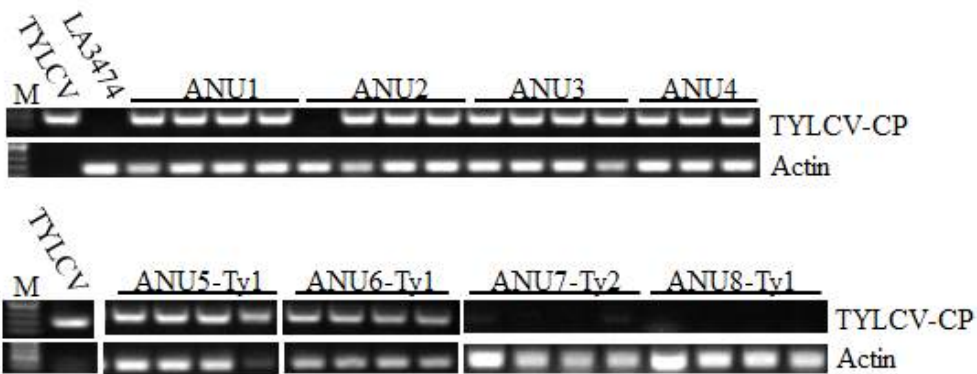
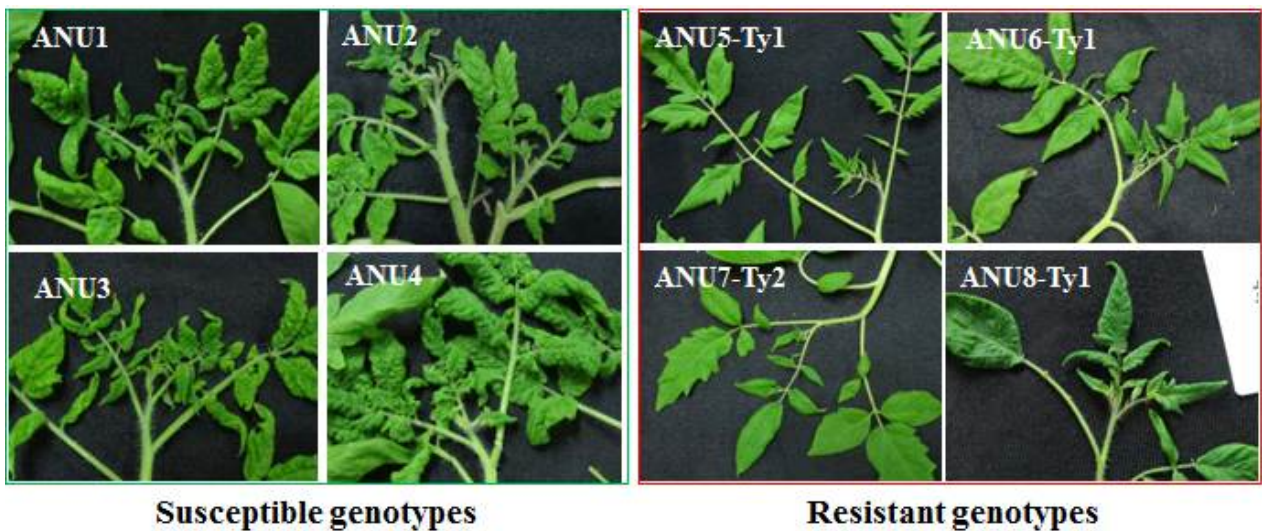
[그림 5-3] 온실내의 패널들에서 TYLCV 저항성 유전자 집적을 통한 저항성 강화 효과 확인

(4) 대부분의 TYLCV 저항성 유전자는 완전저항성이 아닌 불완전저항성을 부여하므로, 불완전저항성과



이병성 개체를 확연하게 구분할 수 있는 최적 접종 조건 및 병저항성 판별 기준의 확립이 필수적임 (그림 5-3).

(5) 병징관찰시에는 식물체의 부위와 시기에 따라 다른 증상이 나타날 수 있으므로, 주기적인 관찰을 요함. 토마토 유전자원에 따라 신초의 생육이 억제되거나 신초에서 잎말림증상이 강하게 나타나는 등의 차이를 보이기도 하였고, 성묘에서도 증상의 차이가 발견됨 (그림 5-4). 때문에 병징관찰과 더불어 viral DNA의 존재 및 정량분석을 병행하는 것이 보다 이병도 측정에 있어서 보다 정확한 정보를 제공한다는 것이 확인됨. 또한 병징의 출현이 관찰되지 않은 자원에서도 viral DNA의 존재를 반복적으로 보이는 계통들에 대해서는 반드시 DNA 수준에서의 검사가 선행되어야 함을 확인.



A:Gayachal plus, B :Dotaerang dia C: TP-7 plus D:Rapsodie  
E: Dotaerang tywinner F : TY G : Oyama H : Titichal

[그림 5-4] 온실내의 유전자원에서의 다양한 TYLCV 저항성 및 이병성 반응 관찰

나. Ty1 유전자 기반 CAPS 및 HRM 분자표지 개발

(1) Solyc06g05118의 염기서열 정보를 기반으로 하여, Ty1 유전자좌의 게놈 DNA 절편 증폭용 프라이머 제작 하여 저항성/이병성 대립유전자 간의 염기서열 비교 분석 실시.

(2) Ty1에 대한 저항성 및 이병성으로 알려진 유전자원에서 유전자의 게놈DNA 절편 확보하여 SNP 분석을 진행. 발견된 8개의 SNP 및 InDel 중 2곳에서 생성된 SNP와 1곳에서 생성된 InDel을 목표로 마커제작 실시. 첫 번째 InDel은 226 bp의 위치인 첫 번째 intron에서 확인되었으며(R: A, S: -), 첫 번째와 두 번째 SNP는 280-282 bp (R: GTG, S: ACA), 312 bp (R: C, S: T) 위치인 두 번째 exon에서 변이가 각각 확인됨 (표 5-3).

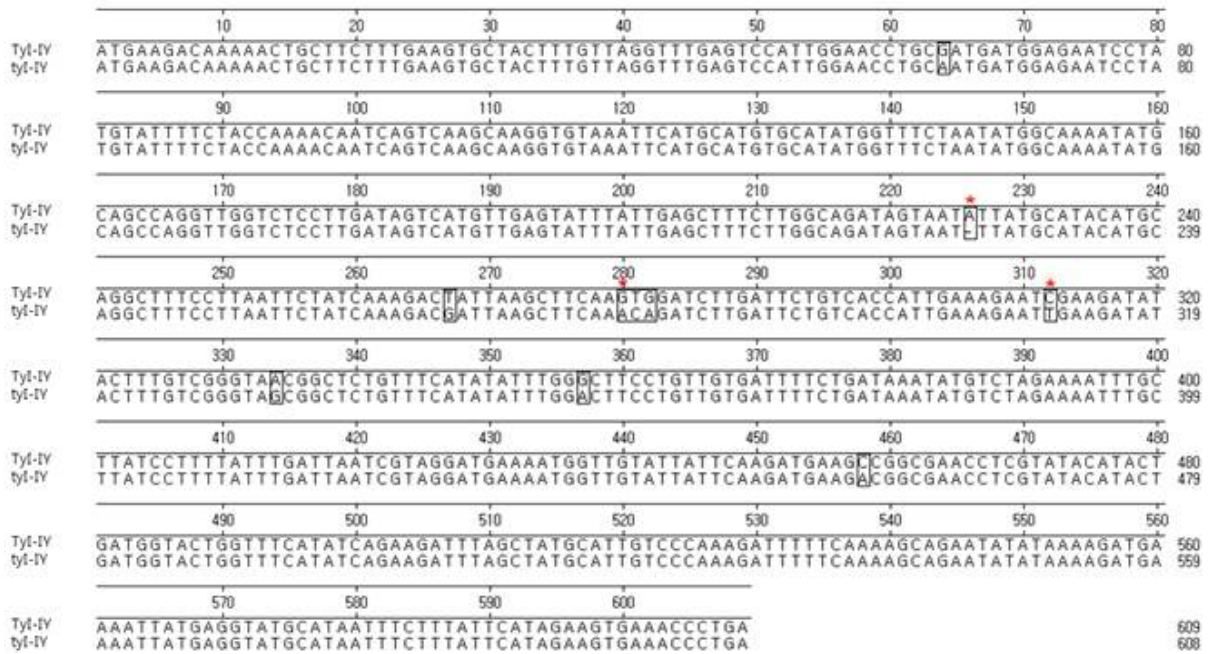
(3) 3개의 SNP를 각각 CAPS 마커로 전환하여 마커 개발을 진행하였고, 패널 테스트를 통해 효용성을 확인. 1, 2차년도에 Ty1 과 Ty3 alleles의 유전자 염기서열을 비교분석한 결과 Ty1 저항성 특이적이거나 Ty3 저항성 특이적인 유의미한 차이는 발견되지 않았으나, 4차년도에 이에 대한 재평가가 진행됨.

(4) Ty1-BglIII 마커는 아미노산 치환 변이가 확인하였고, 이런 변이로 인해 RNA에서 단백질로 번역을 하지 못해 저항성 획득을 못한 것으로 추측됨.

표 5-3. Ty1/3 저항성 유전자 내에 존재하는 SNP 확보

No	Accession name	TYLCV resistance	Positions of sequence							
			64	226	267	280	312	334	357	458
1	M82	NA	A	- <sup>z</sup>	G	ACA	T	G	A	A
2	LA1932	R	G	A	T	GCG	C	A	G	A
3	LA1938	R	G	A	T	GTG	C	G	G	A
4	LA2779	R	G	A	T	GTG	C	G	G	C
5	Dafnis	R	A	-	G	ACA	T	G	A	A
6	Daylos	R	A/G	-/A	G/T	ACA/GTG	C/T	G	A/G	A
7	Oyama	R	A	-	G	ACA	T	G	A	A
8	Titichal	R	A/G	-/A	G/T	ACA/GTG	C/T	G	A/G	A
9	Ty250	R	A/G	-/A	G/T	ACA/GTG/GTG	C/T	G	A/G	A
10	Tywinner	R	A/G	-/A	G/T	ACA/GTG	C/T	G	A/G	A

<sup>z</sup>-: deletion, NA: not available

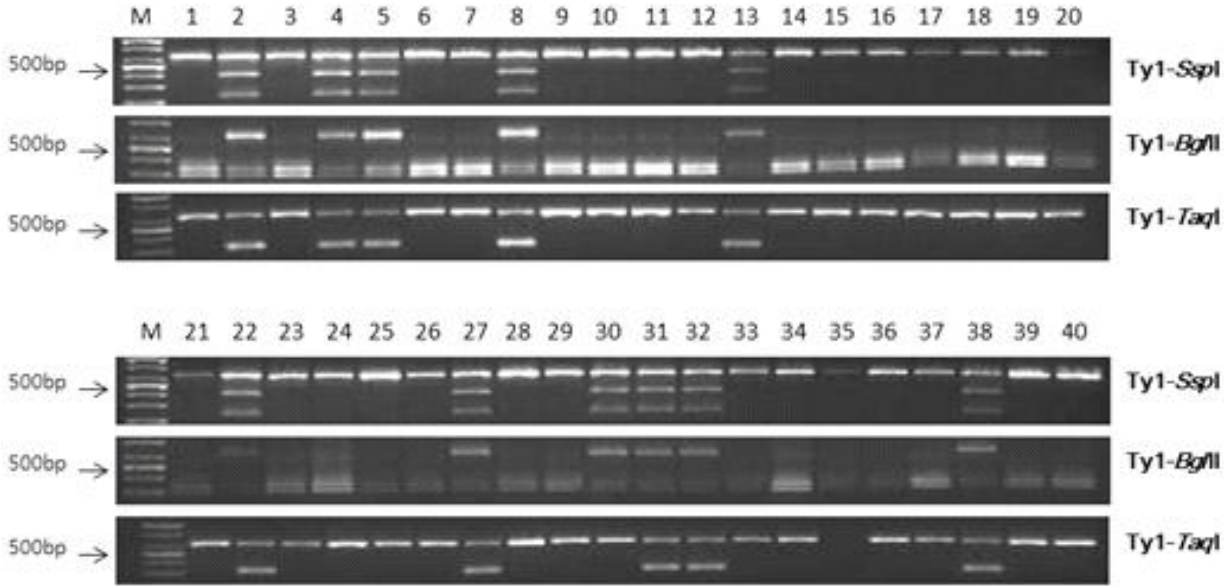


[그림 5-5] Ty1/3 저항성 유전자 내의 SNP 활용한 CAPS 마커 제작 정보

표5-4 . Ty1 유전자 기반 CAPS markers 정보

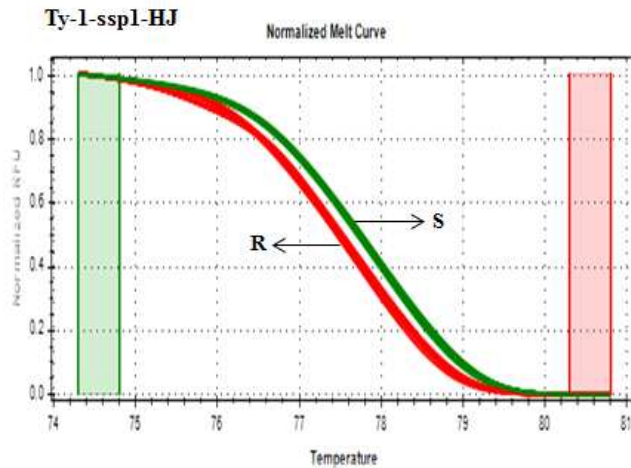
Marker name	Primer name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (bp)	Enzyme
Ty1-SspI	14IY218 F	ATG AAG ACA AAA ACT GCT TC	55	609	SspI
	14IY219 R	TCA GGG TTT CAC TTC TAT GAA T			
Ty1-BglIII	14IY218 F	ATG AAG ACA AAA ACT GCT TC	55	609	BglIII
	14IY219 R	CA GGG TTT CAC TTC TAT GAA T			
Ty1-TaqI	14IY218 F	ATG AAG ACA AAA ACT GCT TC	55	609	TaqI
	14IY219 R	CA GGG TTT CAC TTC TAT GAA T			

(5) *Ty-1* 유전자 상에서 첫 번째 intron에서 확인된 InDel을 목표로 제작된 Ty1-SspI 마커와, 두 번째 exon에서 확인된 SNP를 목표로 제작된 Ty1-BglIII 마커, Ty1-TaqI 마커, 총 세 가지 마커에 토마토 40개의 시판품종 및 육성계통을 대상으로 패널 테스트 실시하여 Ty1 저항성 선발의 효율성 검정을 실시함.



[그림 5-6] Ty1구분용 CAPS 마커의 genotyping 이미지

(6) 대량분석을 위해 Ty1-CAPS 마커를 Ty1-HRM 마커로 전환하여 패널테스트 실시한 결과, (product size: 118 bp. T<sub>m</sub>: 55°C, Ty1-HRM F:GGTTGGTCTCCTTGATAGTCATGT. Ty1-HRM R: TCCACTTGAAGCTTAATAGTCTTTGA) 저항성과 이병성이 명확하게 구분 가능하였음 (그림 5-7).

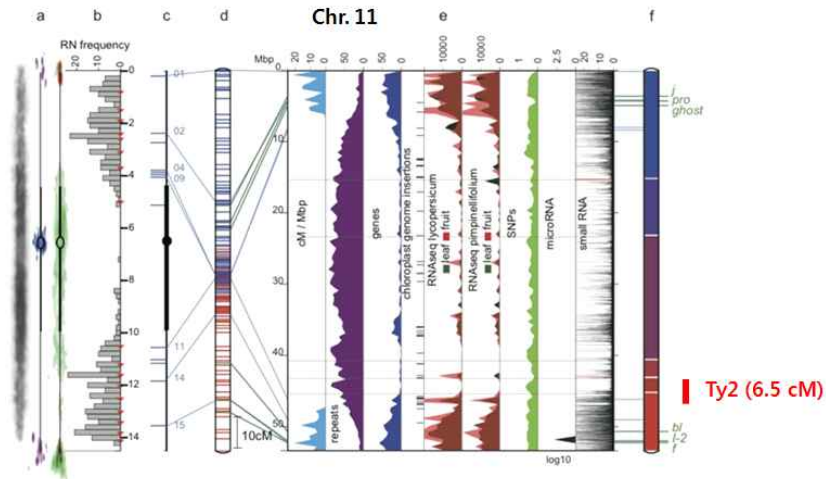


[그림 5-7] Ty1-IY-SspI CAPS 마커의 HRM 마커로의 전환 완료

### 다. Ty2 저항성 SCAR 분자표지 개발

(1) Ty2가 위치한 *S. habrochaites* 의 염색체 11번이 이입된 IL을 활용하여, 해당 부위를 세분화하기 위하여 재배종 계통과의 sub-IL 제작.

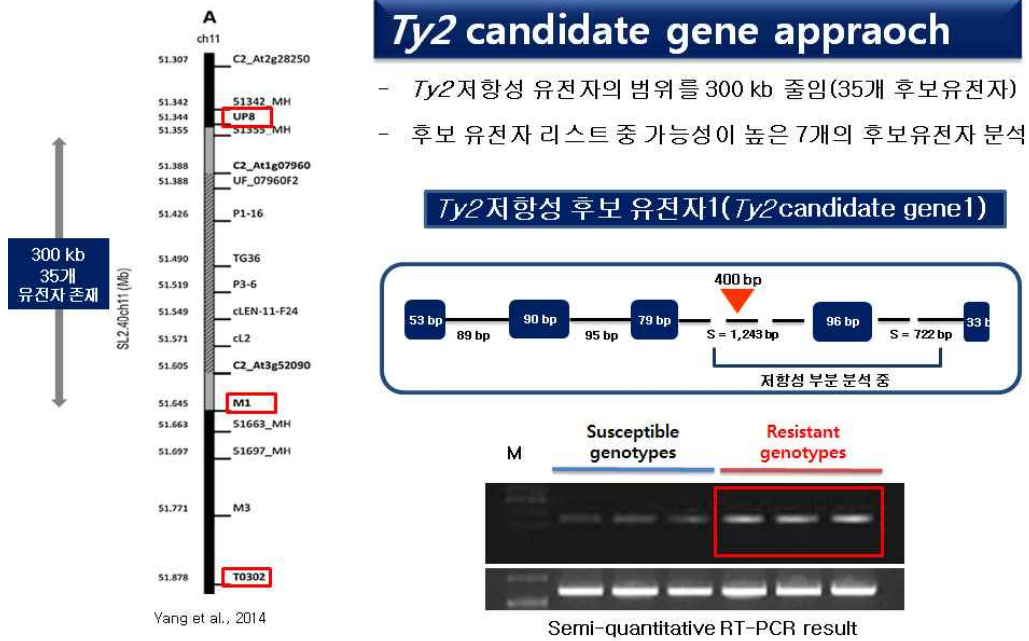
(2) 염색체 11번 Ty2 위치 부위의 SNP 및 후보유전자 탐색을 위한 RNA seq 분석 진행



[그림 5-8] Ty2의 염색체상의 위치

(3) Ty2 fine mapping (Yang et al., 2014) 과 관련된 최신 발표내용을 참고하여, 10여개의 후보유전자 탐색 실시함. 가능성 높은 후보유전자들에 대한 후보 In/Del 서열 확보함.

(4) TYLCV는 DNA virus로 DNA virus는 일반적으로 DNA복제와 RNA 전사에 필요한 DNA dependent DNA polymerase (DdDp), DNA directed RNA polymerase (DdRp)를 기주식물에 있는 것을 탈취하여 사용하므로, 후보유전자 중 ‘DNA-directed RNA polymerase (DdRp)’의 경우 DNA virus의 전사에 관여할 가능성이 매우 높기 때문에 이에 집중함 (그림 5-9). Genomic DNA 상의 InDel을 확보하여 SCAR 마커로 전환함. 후보유전자의 Ty2 저항성자원과 이병성자원의 cDNA 상 염기서열의 차이를 확인하기 위하여 개시코돈 부터 종결코돈 까지 제작한 primer를 사용하여 cDNA를 PCR 하여 증폭한 결과 Ty2 이병성자원과 저항성자원에서 cDNA sequence 상 In-Del은 없었으며 동일하게 약 350 bp의 PCR product를 확보. Ty2 이병성자원과 저항성자원에서 염기서열상의 차이를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 실시하여 분석 결과 2개의 SNP를 발견하였으나, 단백질 서열상 변화를 초래하지 않음. 이병성자원과 저항성자원에서 유전자의 발현양 차이를 확인 하기 위하여 cDNA semi qRT-PCR을 실행한 결과 Ty2 저항성자원인 ‘IL11C’, ‘LA0328’, ‘LA1777’에서 이병성자원인 ‘M82’, ‘E6203’, ‘Ailsa craig’보다 유전자의 발현양이 많은 것을 확인함.



[그림 5-9] Ty2 fine mapping 결과 활용을 통한 후보유전자1 확보 및 염기서열 분석

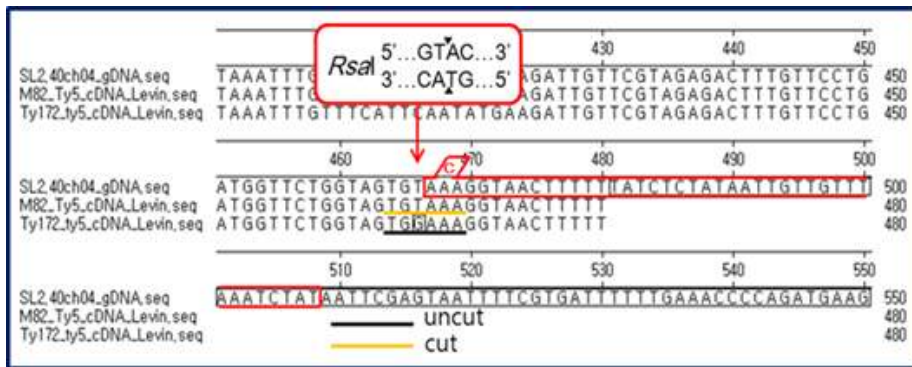
(4) Ty2 후보유전자 1, 2에 대해 제작된 SCAR, CAPS 마커를 활용하여 패넬테스트 실시 및 Ty2-NIL 제작 보조 (그림 5-10). 특히, SCAR 마커는 사용이 간편할 뿐만 아니라 정확하게 Ty2 저항성을 선발해 낼 수 있었음.



[그림 5-10] Ty2 후보유전자 1 내의 In/Del을 활용한 SCAR 마커의 개발 및 Ty2-NIL 집단 분석

라. ty5 유전자 기반 CAPS 분자표지 개발

- (1) ty5 유전자는 TYLCV에 대한 열성저항성을 부여하는 유전자로, 아직 논문으로는 정보가 공개되어 있지는 않지만 단백질 합성에 관여하는 PELOTA를 암호화하는 유전자로써 ribosome recycling에 관여하며, 이는 fine-mapping 및 transgenic approach를 통해 학회에서 발표된 자료를 근거로 함.
- (2) ty5를 동정한 이스라엘의 실험실과 직접 연계하여 ty5 저항성을 가지고 있는 유전자원 TY172를 분양받아 실험에 사용.
- (3) ty5 유전자를 TY172 및 국내유전자원에서 분리하여 염기서열 분석을 재실시하여, 그 결과를 근거로 ty5 분별용 CAPS 마커를 제작.
- (4) 확보된 SNP를 활용한CAPS 마커 전환의 기술적인 어려움으로 인하여, 변형된 형태인 dCAPS마커로 제작하였다. 466번째 염기서열의 SNP (T↔G) 뒤인 467번째 염기서열에서부터 42 mer의 reverse primer를 제작 진행. 제작 시 염기서열상 인위적인 돌연변이를 만들었으며 이로 인하여 제한효소 *RsaI* (5'...GT/AC...3')에 의하여 466 bp의 SNP가 'T'인 개체를 선택적으로 잘라주어서 DNA 단편 분석 시 개체간 size의 차이를 보이도록 디자인 함(그림 5-11).
- (5) ty5 용 CAPS 마커를 사용하여 40여개의 F1 품종 및 국내 육성 계통 검정을 실시한 결과, 패널테스트에 사용된 유전자원 중에는 오직 TY172 만이 ty5 저항성을 가지고 있다는 것을 확인함(그림 5-12).
- (6) ty5는 TYLCV에 대한 완전저항성을 부여하는 것이 아니라, 병의 진전 속도를 늦추는 데에 효과가 있다고 알려져 있으며, 이는 인도를 비롯한 동남아 수출용 토마토에의 도입이 실효성 있을 것으로 판단 됨.



[그림 5-11] ty5 CAPS 마커 design에 활용한 SNP 정보



[그림 5-12] ty5 CAPS 마커 분석 이미지

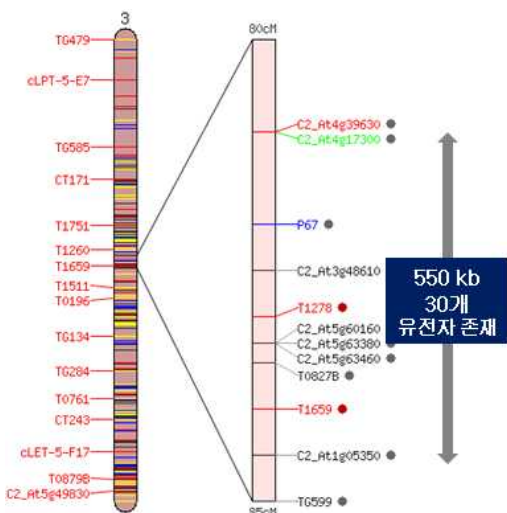
마. Ty4 저항성 SCAR 분자표지 개발

- (1) Ty4 저항성은 Ty3 저항성 유전자원인 LA1932, LA2779에 존재하는 저항성을 20% 가량 증대시키는데 기여하는 저항성 향상 인자임 (Ji et al., 2009)
- (2) Ty4 저항성 유전자원 확보 및 기존에 보고된 C2-At4g17300 마커로 유전자원 screening 진행(그림 5-13)하였으나, 결과 해석이 난해함. 패널테스트 결과 기존에 보고된 Ty4 선발용 분자표지는 활용도가 낮은 것으로 평가됨. 육종프로그램에 도입 실효성은 매우 낮은 것으로 판단됨.



[그림 5-13] 기존의 Ty4 마커인 C2-At4g17300 마커를 사용한 genotyping 결과

- (3) 확보된 유전자원 활용하여 Ty4 마커의 연관도 개선 및 후보유전자 탐색을 위한 fine mapping 진행하여, Ty4 저항성 유전자의 존재 범위를 550kb 이내로 줄임(30개 후보유전자 존재). 바이러스병 저항성과 연관성 있는 후보유전자군을 탐색하여 염기서열 비교분석 실시한 결과, 후보유전자 2개에서 마커활용 가능성 있는 InDel이 탐색됨(그림 5-14).

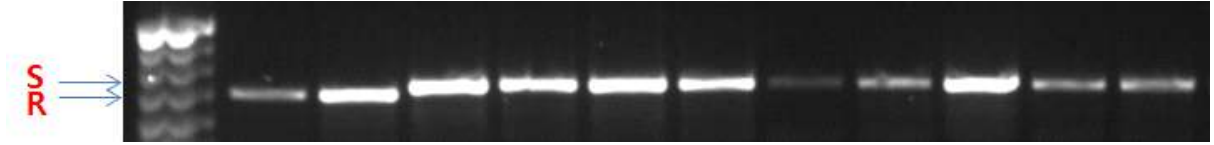


8 candidate genes

1. MADS-box transcription factor
2. Sumo activating enzyme
3. Myb-like protein
4. Receptor like kinase
5. Serine/threonine protein kinase
6. DNA-binding protein
7. Serine/threonine-protein phosphatase
8. Harpin-induced protein-like



(4) Ty4 후보유전자 7인 Serine/threonine protein phosphatase에서 InDel 발견하여 SCAR 마커로 전환하여 패널테스트 실시한 결과 기존의 Ty4 저항성만 저항성 자원으로 판별됨을 확인하였음(그림 5-14). 또한 Ty4 저항성 신규 SCAR 마커로 다양한 자원을 screening해본 결과, 시판 F1 품종에서는 Ty4가 도입되어 있지 않음을 확인함.



[그림 5-14]Ty4 마커로 패널 테스트한 이미지 중 일부

### 바. TYLCV 저항성 유전자원 확보 및 마커 패널테스트 진행

(1) TYLCV 저항성 육종에 투입 가능한 저항성 판별용 분자표지 셋트 확보(표5-5)

표 5-5. TYLCV 저항성 육종에 투입 가능한 저항성 판별용 분자표지 셋트의 정보 요약

Resistant locus (chromosome)	Marker information		References
<i>Ty1/3</i> (ch 6)	F: ATGAAGACAAAACTGCTTC R: TCAGGGTTTCACTTCTATGAAT ( <i>SspI</i> , <i>BgII</i> , or <i>TaqI</i> )	CAPS (gene-based)	Jung et al. 2015
	F: GGTGGTCTCCTTGATAGTCATGT R: TCCACTTGAAGCTTAATAGTCTTTGA	HRM	Jung et al. 2015
<i>Ty1</i> (ch 6)	TAA TCC GTC GTT ACC TCT CCT CGGATGACTTCAATAGCAATGA3' ( <i>TaqI</i> )	CAPS (closely linked)	Hoogstraten et al. 2005
<i>Ty3</i> (ch 6)	P6-25 F: GGTAGTGGAAATGATGCTGCTC R: GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC	SCAR (closely linked)	Ji et al. 2007
<i>Ty2</i> (ch 11)	T0302 F: TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC R: AGTGTACATCCTTGCCATTGACT	SCAR (linked)	Yang et al. 014
	IY181F: ATGAATGCTCCAGATCGTTACGAAC IY182_R: GATCCACCAAAGGCAGCTAGCTTCT	SCAR (후보유전자기반)	Kim et al. unpublished
<i>Ty4</i> (ch 3)	C2_At4g17300 ( <i>AflI</i> ) F: ATTTAACCGTGTCTGGGCAACTCAATGG R: GCTCACTTTGCAAATCACATCCCCATTTACC	CAPS (linked)	Ji et al. 2009
	IY F: CCTTTAGTGCCTCGAGGCTCG IY R: ATTAGCAGAGAGGCTATCGAC	SCAR (후보유전자기반)	Lee et al. unpublished
<i>ty5</i> (ch 4)	F : TTCAAGTCCTTCTTCAAC R : ATAGATTTAAACAACAATTATAGAGATAAAA AAGTTACCTGT ( <i>RsaI</i> )	dCAPS (gene-based)	Lapidot et al. 2015; In this study

\*파란색: 본 과제를 통해 개발된 신규 분자표지임.

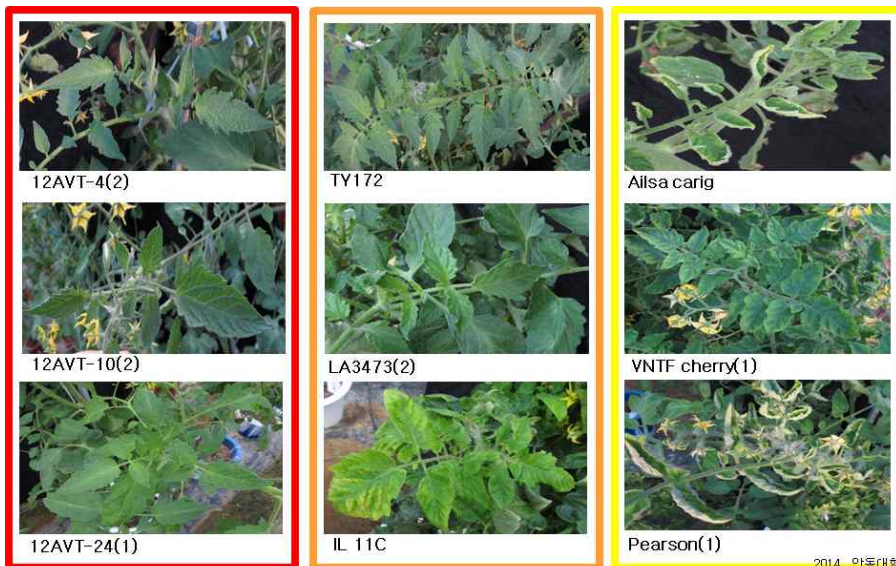
(2) 본 과제를 통하여 *Ty1/3*, *Ty2*, *Ty4*, *ty5* 저항성 판별 마커가 신규개발됨. 기존의 저항성/이병성 유전자원, 종자회사에서 육성중인 육종계통, 시판품종 등의 다양한 유전자원들을

활용한 패널테스트를 실시해본 결과(표5-6), 본 과제에서 신규개발된 TYLCV 저항성 판별용 분자표지들의 정확도 및 간편도가 매우 높을 것으로 판단됨.

표 5-6. 다양한 유전자원의 TYLCV 저항성 마커 셋트 적용을 통한 저항성 유전자 판별 사례

No.	유전자원		Ty1/3		Ty2		Ty4		ty5
	ID	Species	분양 정보	Ty1-CAPS (P226 SNP)	분양 정보	Ty2-T302 (연관마커)	Ty2-candi1 SCAR	분양정보	Marker test C2_Atq17300_ (AfIII)
1	TGRC-ANU1	<i>S. habrochaites</i>	-	R	R	R	R	S	S
2	TGRC-ANU2	<i>S. pimpinellifolium</i>	S	-	S	S	S	R	S
3	TGRC-ANU3	<i>S. habrochaites</i>	-	-	R	R	R	S	S
4	TGRC-ANU4	<i>S. chilense</i>	R	R	S	S	R	H	S
5	TGRC-ANU5	<i>S. chilense</i>	R	R	H	R	R	H	S
6	TGRC-ANU6	<i>S. chilense</i>	R	R	R	R	R	H	-
7	TGRC-ANU7	<i>S. lycopersicum</i> cv. New Yorker	S	S	S	S	S	R	S
8	TGRC-ANU8	<i>S. chilense</i>	R	R	R	R	R	R	-
9	TGRC-ANU9	<i>S. lycopersicum</i> cv. Mecline	S	S	S	S	S	R	S
10	TGRC-ANU10	<i>S. lycopersicum</i> cv. Moboline	S	S	S	S	S	R	S
11	TGRC-ANU11	<i>S. lycopersicum</i>	R	R	S	S	S	R	S
12	TGRC-ANU12	<i>S. lycopersicum</i>	S	S	S	S	S	R	S
13	TGRC-ANU13	<i>S. lycopersicum</i> cv. CLN2264F	S	S	S	S	S	R	S
14	TGRC-ANU14	<i>S. lycopersicum</i> cv. CLN2264G	S	S	S	S	S	R	S
15	TGRC-ANU15	<i>S. lycopersicum</i>	H	H	S	S	S	R	S
16	AVRDC-ANU1		R	R	R	R	R	S	S
17	AVRDC-ANU2		R	R	R	R	R	S	S
18	AVRDC-ANU3		S	R	R	R	R	S	S
19	AVRDC-ANU4		S	R	R	R	R	S	S
20	AVRDC-ANU5		S	R	R	R	R	S	S
21	AVRDC-ANU6		S	R	R	R	R	S	S
22	AVRDC-ANU7		S	R	R	R	R	S	S
23	AVRDC-ANU8		S	S	R	R	R	S	S
24	AVRDC-ANU9		S	S	R	R	R	S	-
25	AVRDC-ANU10		R	R	R	R	R	S	S
26	AVRDC-ANU11		S	R	R	R	R	S	S
27	Ty172								R

(3) 온실내에서의 자연발병조건 활용하여 다양한 유전자원에서의 저항성 정도 평가(그림 5-15, 표 5-7).



2014. 안동대학교

[그림 5-15] 온실내에서의 저항성 효과 판별을 위한 병징 조사

(3) 저항성 정도의 판별을 위해 PCR 기법을 활용한 TYLCV viral DNA detection 실시하였으며, 저항성 정도에 따라 virus particle의 분포에 차이가 있기 때문에, 생육시기별, 조직별 분석 결과를 종합하여 저항성 정도를 판단. 저항성 정도의 양정평가 기준을 위해 세분화된 저항성 검정 분석 진행함.

표 5-7. TYLCV 저항성 유전자 pyramiding을 통한 저항성 집적 효과의 분석 (TYLCV 자연발병은실활용 결과)

No.	Name	TYLCV C1	Genotyping				Source
			Ty1/Ty3	Ty2	Ty4	ty5	
1	12AVT-2	1	R	R			AVRDC (Taiwan)
2	12AVT-4	1	R	R			
3	12AVT-5	1	R	R			
4	12AVT-7	1	R	R			
5	12AVT-9	1	R	R			
6	12AVT-10	1	R	R			
7	12AVT-17	1	S	R			
8	12AVT-19	1	S	R			
9	12AVT-24	1	R	R			
10	12AVT-25	1	R	R			
11	LA1932	1	R	R	R		TGRC (USA)
12	LA3473	2	R	S			
13	LA3474	2	S	S	S		
14	IL11C	2	S	R			Volcani center (Israel)
15	TY172	2	S	S		R	
16	Campari	3	S	S			RDA
17	Ailsa craig	3	S	S			
18	VNTF cherry	4	S	S			
19	Pearson	4	S	S			
20	Hawaii 7998	5	S	S			KHU

**Marker test**

- Ty1/Ty3
- Ty2
- Ty4
- ty5

**Disease scoring**

- 1     R
- 2     ↑
- 3     S
- 4
- 5

(4) Ty1/3, Ty2, Ty4, ty5 저항성 집적을 위한 교배조합 작성 및 집단 육성 진행 중이며, 1단계에서 본 과제외 성과물로 육성된 TYLCV 저항성 관련 집단은 2단계에서도 지속적으로 육성되고, 연구에 활용될 예정임.

표 5-8. TYLCV 저항성 유전자 pyramiding을 위한 다양한 교배조합의 일부 사례

저항성 조합	Ty1/3 + Ty2	Ty1/3 + Ty4	Ty1/3 + ty5	Ty2 + Ty4	Ty2 + ty5
교배조합	LA1932+LA386	LA1932	LA1932+Ty172	LA1932+LA386	LA1777+Ty172
	LA1938+LA386	LA2779	LA1938+Ty172	LA2779+LA386	LA386+Ty172
	LA1969+LA386		LA1969+Ty172		
	TY250				

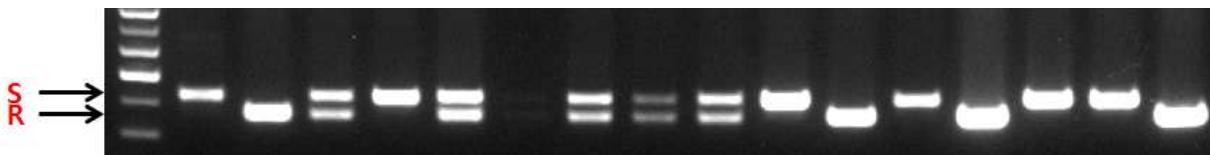
사. TYLCV 매개충인 담배가루이 저항성 도입을 통한 TYLCV 저항성 강화

(1) TYLCV는 매개충인 담배가루이를 통해서만 감염이 이루어지므로, 담배가루이 저항성의 도입은 결과적으로 TYLCV 초기감염을 제어해주는 효과가 기대됨.

(2) 선충저항성 유전자로 알려져 있는 Mi-1 저항성 유전자는 담배가루이 저항성도 부여하는 것으로 보고어 있으므로, 시판 품종에서 Mi-1 저항성 보유 여부를 확인하여 이를 TYLCV 저항성과 연계하여 분석 진행.

표 5-9. Mi-1저항성 분자표지 요약

Resistant alleles	Marker information	References
<i>Mi 1 (Rex)</i>	F: AACCGTGGACTTTGCTTTGACT R: TAAGAACAGGGACTCAGAGGATGA ( <i>TaqI</i> )	CAPS (closely linked) Hoogstraten et al. 2005
<i>Mi-J</i>	F:CTACGGAGGATGCAAATAGAA R:AATCATTATTGTCACACTTCCCC ( <i>NsiI</i> )	CAPS (gene-based) Hoogstraten et al. 2005
<i>Mi-1.2</i>	F: TGG AAA AAT GTT GAA TTT CTT TTG R: GCA TAC TAT ATG GCT TGT TTA CCC	SCAR (gene-based) Seah et al. 2007



[그림 5-16] Mi-1,2 용 SCAR 분자표지 활용하여 다양한 시판품종들을 패널테스트한 결과 이미지.

(4) *S. penellii* Introgression lines (ILs)활용한 신규 담배가루이 저항성 유전자좌 정보 확보: Acyl sugar 함량과 담배가루이저항성의 상관관계 분석 진행 중. Acylsugar 함량 증대로 인한 담배가루이 기피 효과에 기인한 TYLCV 초기 감염 억제 효과 분석 진행 중

(5) 담배가루이 저항성 유전자원을 활용하여 TYLCV 초기 접촉 억제를 통한 TYLCV 방제 효과 기대. 신규 분자표지 및 신규 저항성 육종 자원 활용 가능성 모색.

## 제 6절. 역병 저항성 Ph3 유전자 기반 분자표지 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 식물재료

본 연구에 사용된 토마토는 30여개의 시판품종 및 육성계통이며, 토마토유전자원센터 ‘TGRC (Tomato Genetics Resource Center, USA.)’, ‘농촌진흥청 유전자원센터’, ‘Cornell university’에서 다양한 TYLCV 저항성 유전자원을 분양 받아 사용하였다.

표 6-1. 역병 저항성 분자표지 개발에 사용된 식물재료

No.	Accession name (Genotype)	Seed Company (Nationality)
1	M82 <sup>z</sup>	Tomato Genetics Resource Center (United States)
2	E6203 <sup>z</sup>	Tomato Genetics Resource Center (United States)
3	LA0716	Tomato Genetics Resource Center (United States)
4	LA1932	Tomato Genetics Resource Center (United States)
5	LA1938	Tomato Genetics Resource Center (United States)
6	LA1969	Tomato Genetics Resource Center (United States)
7	LA2779	Tomato Genetics Resource Center (United States)
8	LA3473	Tomato Genetics Resource Center (United States)
9	LA3474	Tomato Genetics Resource Center (United States)
10	LA4285 <sup>z</sup>	Tomato Genetics Resource Center (United States)
11	LA4286	Tomato Genetics Resource Center (United States)
12	LA1269 <sup>z</sup>	Tomato Genetics Resource Center (United States)
13	IT229371	National Agrobiodiversity Center (Korea)
14	IT229370	National Agrobiodiversity Center (Korea)
15	IT236514	National Agrobiodiversity Center (Korea)
16	IT236513	National Agrobiodiversity Center (Korea)
17	Oyama	Sakata seed (Japan)
18	Dotaerangtywinner	Takii seed (Japan)
19	Dafnis	Syngenta seed (Switzerland)
20	Dunne	Syngenta seed (Switzerland)
21	Mamirio	Syngenta seed (Switzerland)
22	Ollety	Montanto (United States)
23	Rapito	Montanto (United States)
24	Unicorn	Montanto (United States)
25	Shinheuksu	Asia seed (Korea)
26	Ty250	Asia seed (Korea)
27	Tystar	Bunong seed (Korea)
28	Titichal	Nongwoo bio (Korea)
29	Pink top	Nongwoo bio (Korea)
30	Tyaltorang	Nongwoo bio (Korea)

#### 나. genomic DNA 추출

DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였다(Kang *et al.*, 2001). 토마토의 어린 잎조직을 stainless bead와 LN<sub>2</sub>를 이용하여 마쇄하였다. 300  $\mu$ l CTAB (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% (v/v)

2-mercaptoethanol) buffer를 넣고 10분 간격으로 흔들어 주며 65°C에서 30분 처리 후, 150  $\mu$ l chloroform을 넣고 vortexing 처리하여 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 200  $\mu$ l를 채취하여 1.5 ml tube로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었다. 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였다. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 100  $\mu$ l DNase-free water에 42°C에서 5분간 녹여주었다.

#### 다. *Ph3* 유전자 Cloning 및 염기서열 분석

Primer 제작은 *Ph3* 유전자의 염기서열 정보(Sol Genomics Network, Solyc09g092310)을 활용하여, genomic DNA에서 *Ph3* 유전자 증폭이 가능한 프라이머를 제작하였다. 프라이머는 Table 2에 기재되어 있으며, 제작한 primer와 genomic DNA를 사용해서 *Ph3* 유전자 증폭에 사용되었다. 프라이머로 사용된 DNA oligomer는 Bioneer사에 의뢰하여 합성되었다(Bioneer, Korea). PCR은 정량한 gDNA 1  $\mu$ l, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% 0.2 mM each dNTP, 0.4 uM forward와 reverse primer, 5 units Taq polymerase(TaKaRa, Japan), 총 25 ul 맞춰주었다. PCR 반응을 위해 T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)을 이용하였으며, *Ph3* 유전자 클로닝시 PCR 조건은 섭씨 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 섭씨 94°C에서 1분(denaturing), 섭씨 55°C에서 1분(annealing), 섭씨 72°C에서 1분(extension) 과정을 35회 반복 후 섭씨 72°C에서 10분간 반응시켰다. Topo® Kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 클로닝하고, Chemically Competent Cell (Invitrogen, USA)을 이용하여 heat-shock 방법으로 형질전환을 실시하였으며, 실험방법은 제조회사에서 제공한 방법에 따라 수행하였다.

*Ph3*에 대한 저항성 토마토와 이병성 토마토 간의 유전자 시작코돈에서부터 정지코돈까지의 염기서열 상의 차이를 SeqMan program (DNASTAR, USA)을 통해 분석하였다. 단백질 분석은 염기서열 상에서 intron을 제거하고 EditSeq program (DNASTAR, USA)을 이용하여 번역하였으며, 번역된 아미노산 서열은 MegAlign program (DNASTAR, USA)을 이용하여 비교 분석하였다.

#### 다. *Ph3* 유전자 기반 CAPS 마커 및 SCAR 마커 제작

*Ph3* 저항성토마토와 이병성토마토 간의 염기서열 상 차이를 이용하여 2개의 마커를 제작하였다. 첫 번째로 InDel을 이용하여 SCAR 마커를 제작하였고, 두 번째는 서열상 SNP를 이용하여 CAPS 마커를 제작하였다. CAPS 마커 제작은 SeqBuilder program (DNASTAR, USA)을 이용하여 *Ph3* 저항성토마토와 이병성토마토 간의 비교 분석하여 제작하였다.

PCR은 조건은 다음과 같이 실시하였다. InDel과 SNP를 이용하여 만든 두 마커의 PCR 조건은 동일하게 진행되었으며, 정량한 gDNA 1  $\mu$ l, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% 0.2 mM each dNTP, 0.4 uM forward와 reverse primer, 5 units Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 총 25 ul 맞춰주었다. PCR 반응을 위해 T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)을 이용하였다, PCR 온도조건은 섭씨 94°C에서 10분간 초기 변성시키고, 섭씨 94°C에서 1분(denaturing), 섭씨 55°C에서 1분(annealing), 섭씨 72°C에서 1분(extension) 과정을 35회 반복 후 섭씨 72°C에서 10분간 반응시켰다. SCAR 마커인 Ph3-Scar

마커는 증폭된 PCR 산물의 확인은 3% agarose gel을 전기영동 후 Gel Doc 2000 (BIO-RAD, USA)을 통해 확인하였다. Ph3-MspI 마커는 *MspI* 제한효소 첨가하여 섭씨 37°C에서 1시간 처리 후 2.5% agarose gel에 전기영동하여 Gel Doc 2000 (BIO-RAD, USA)을 통해 확인하였다.

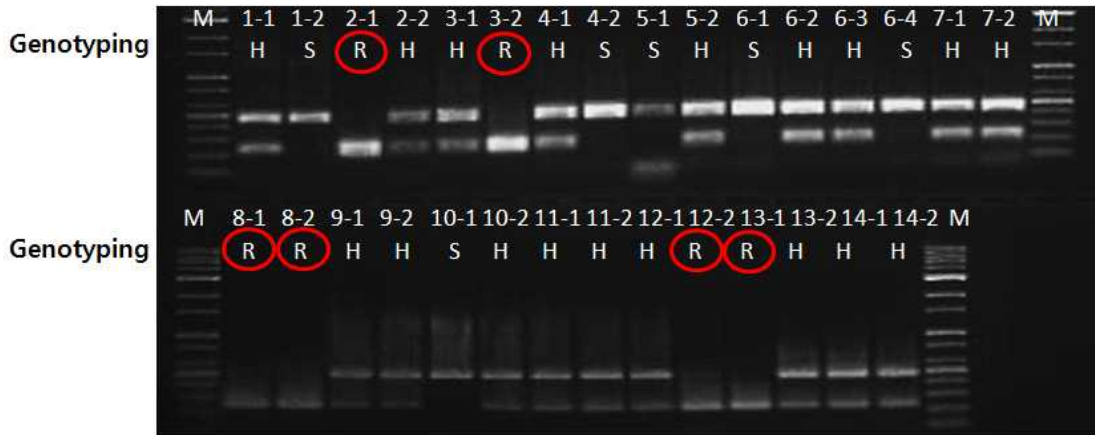
## 라. 역병저항성 검정

본 실험에서는 토마토 *S. habrochaites* IL 집단, *S. pennellii* IL 집단과 역병 저항성 수준을 비교하기 위해 wild type 1품종을 함께 공시하여 50공 연결 포트10립씩 과중하여 4-6엽기의 유묘를 실험에 사용하였다. 공시 균주는 강릉원주대학교에서 보관 실험중인 *Phytophthora infestans* 균주를 사용하였으며, *P. infestans* 균주는 V8 juice agar(V8 Juice 200ml, CaCO<sub>3</sub> 3g, Agar 20g, Distilled Water 800ml)에 계대배양하면서 사용하였다. V8J 배지에서 계대 배양된 역병균 균사를 V8J에 치상한 후 20°C에서 14일동안 배양한 후에 유주자낭이 형성된 배지 표면을 긁어낸 후 멸균수를 첨가하여 유주자낭 현탁액을 만들었다. 3겹 거즈로 여과한 후 4°C에서 1시간 동안 냉장 보관후 실온에서 1시간 동안 항온을 유지시켜 유주자가 방출되도록 하였다. 유주자 현탁액을 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여  $1 \times 10^6$  zoospores/ml이 되도록 접종 농도를 조정하였다. 접종방법은 식물체의 잎에 충분히 적시도록 spray 하였다. 접종 후에 충분한 습도 관리를 위해 간이하우스를 만들어서 높은 습도를 유지하였고, 열풍기, 묘상 전열기 등을 이용하여 20±5°C를 유지하였다. 잎마름 역병에 대한 저항성 평가는 *P. infestans*를 접종 후 7일부터 7일 간격으로 조사하면서 28일에 최종 판정하였다. 발병도는 0-4까지(5단계) 나누었으며, 0=병징이 없음, 1=극히 일부에 잎에 발병, 2=1/4정도 잎에 발병, 3=1/2정도 잎에 발병, 4=3/4정도 잎에 발병으로 조사하였다. 각각의 품종들은 다음과 같이 저항성 정도가 기록되었으며 발병도 0은 Immune, 발병도 0.01-10%은 Highly resistant, 발병도 10.01~25%은 Resistant, 발병도 25.01~40%은 Tolerant, 발병도 40.01~60%은 Susceptible, 발병도 60.1은 Highly susceptible로 표기하였다(Saleem et al., 2011).

## 2. 내용 및 결과

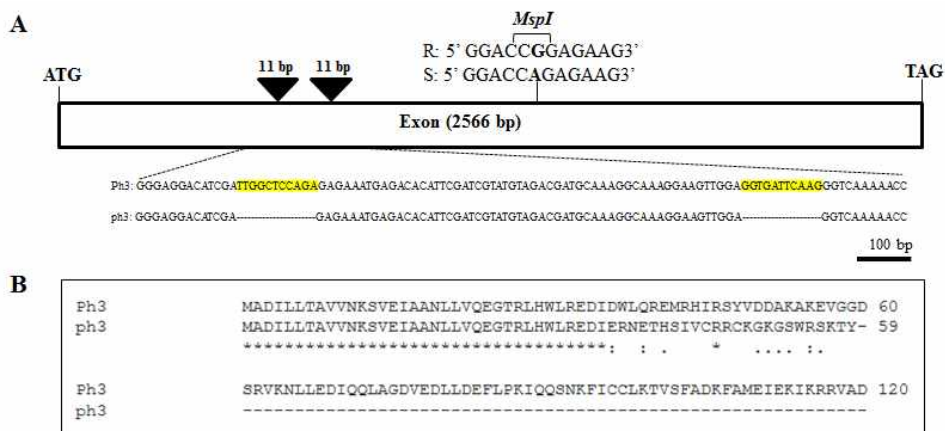
### 가. *Ph3* 유전자의 염기서열 분석

- (1) *Ph3* 저항성을 야생종 *S. pimpinellifolium* L3708 에서 재배종으로 도입하기 위하여 다양한 조합의 교배 실시하여, 집단작성 추진.
- (2) 강릉원주대에서 진행된 위탁과제(1-2년차)를 통해 역병균 접종을 실시하여 *Ph3* 유래 저항성 재검정 및 원예형질 (과형, 과중, 당도 등) 분석이 진행됨. *Ph3* 저항성 분자표지를 활용한 유전자형 검정과 역병균 접종을 통한 표현형과의 비교분석을 통하여 *Ph3* 저항성 분자표지가 역병 저항성에 실제로 크게 기여하고 있음을 확인.
- (3) *Ph3*-NIL을 활용한 마커 연관도 개선 및 gene-cloning 추진 및 병검정 실험 실시를 진행하던 중, *Ph3* 유전자 동정 완료에 대한 내용이 논문으로 발표되어(Zhang et al., 2014) 이를 통해 *Ph3* 유전자 정보 확보.



[그림 6-1] Ph3-NIL 작성 진행 집단 내에서의 Ph3 genotyping 분석 결과

(4) Ph3 유전자좌의 염기서열 분석을 실시하여 저항성/이병성 대립유전자간의 염기서열상의 차이 확보. 염기서열 상 108-118 bp, 175-185 bp 위치에서 각기 11 bp씩의 2개의 InDel과 434 bp 위치에서의 SNP가 확보됨.



[그림 6-2] Ph3 저항성 유전자 기반 SCAR, CAPS 마커 제작 정보

나. *Ph3* 저항성 판별용 CAPS 및 SCAR 마커 개발

(1) Ph3-SCAR 마커는 염기서열 상 108-118 bp, 175-185 bp 위치에서 각기 11 bp의 InDel 2개를 목표로 제작. 본 마커 사용하여 PCR 진행 시, *Ph3* 저항성인 경우 176 bp로 확인되며, 이병성인 경우 154 bp로 구분되어 저항성과 이병성 간에 22 bp 차이를 쉽게 구별할 수 있게 제작됨.

(2) Ph3-*MspI* 마커는 434 bp 위치의 SNP를 목표로 *MspI* 제한효소를 사용하게 마커를 제작함. 본 마커 사용 시, *Ph3* 저항성인 경우엔 300 bp과 100 bp로 구분되며, 이병성인 경우 400 bp의 단일 밴드로 구분되어 저항성과 이병성을 구별할 수 있음.

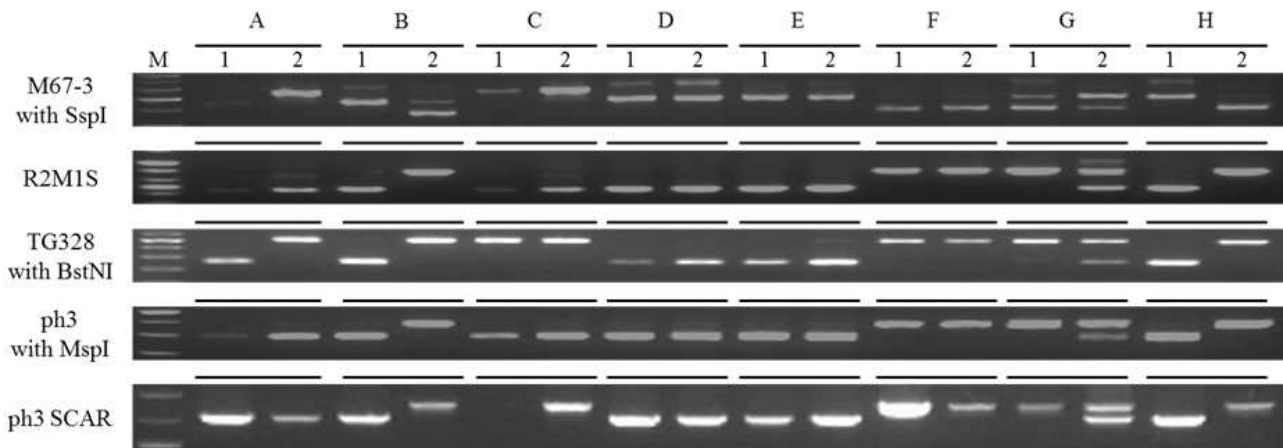


표 6-2. 잎마름 역병 저항성 관련 분자표지 요약

Resistant locus (chromosome)	Marker information	References
<i>Ph2</i> (ch 10)	dTG63 ( <i>HinfI</i> ) F: CTACTCTTTCTATGCAATTTGAATTG R: AATAATTTTCAACCATAGAATGATT	CAPS Panthee et al. 2012
	F: TCG ATC GTA TGT AGA CGA TG R: AGG CAA ATC TTG AAG AAG CA ( <i>MspI</i> )	CAPS* (gene-based) Jung et al. 2015
<i>Ph3</i> (ch 9)	F: CTACTCGTGCAAGAAGGTAC R: TCCACATCACCTGCCAGTTG	SCAR* (gene-based) Jung et al. 2015
	F: CAACATCACGGATACAAGTAACAA R: CATGATCCAAACCGATGACC	HRM* Jung et al. 2015
	TG328 F: AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC TG328 R: AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC	CAPS ( <i>BstNI</i> ) Robbins et al., 2010
	M67-3 F: TGCGAATCCTTGTGGTAT M67-3 R: CTTACTGTGGACTGTGGG R2M1S F: GGAAATCCTCCGCCTTACTT R2M1S R: CGAGTTGCAACCTCTAGACTCA	CAPS ( <i>SspI</i> ) SCAR Zhang et al., 2014

\*본 과제에서 개발된 유전자 기반 역병저항성 분자표지

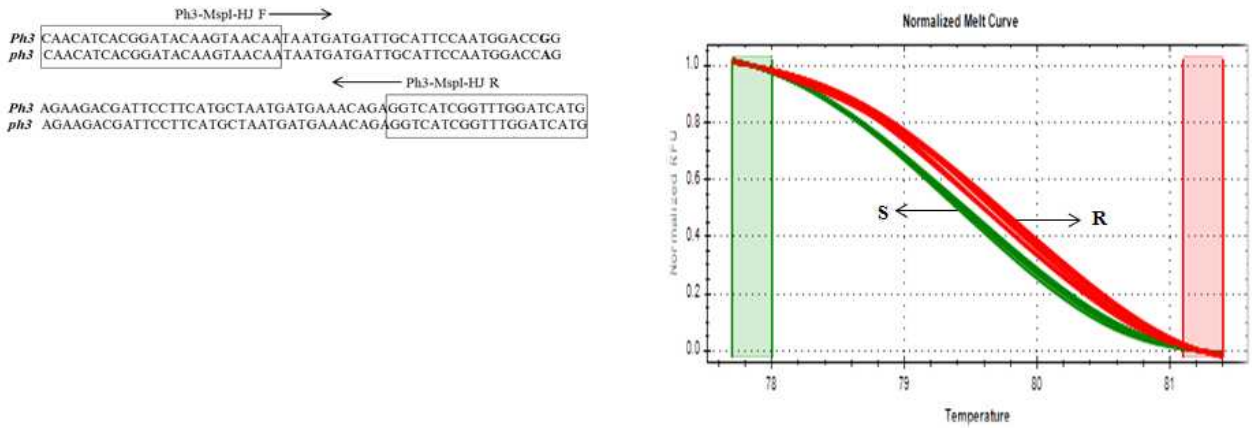
(3) Ph3 유전자 염기서열 초기에 이병성에서 22 bp InDel로 인하여 아미노산 치환 변이(조기종 결코돈)가 확인하였고, 이런 변이로 인해 RNA에서 단백질로 번역을 하지 못해 저항성 획득을 번역을 하지 못해 저항성 획득을 못한 것으로 추측됨.



[그림 6-3] 연관마커인 M67-3, R2M1S, TG328 표지들과 신규개발된 유전자 기반 분자표지들의 성능평가

(4) Ph3 관련 육종집단을 활용하여 본 과제에서 개발된 2개의 유전자기반 CAPS 및 SCAR 분자표지들과 기개발되어 있던, Ph3 연관 분자표지들의 성능 비교 분석을 실시. 신규 개발된 분자표지들의 재현성 및 간편성이 우수하였고, 유전자 기반 분자표지이므로 정확도가 우수할 것으로 추정됨. 연관마커인 M67-3, R2M1S, TG328 표지들의 경우 부분적으로 recombinant를 구분하지 못하는 경우가 발견되었음.

(5) SNP기반 Ph3 CAPS 분자표지의 HRM 마커 전환으로 대량 분석 체계 확립. 대량분석체제 확립을 위하여 CAPS 분자표지를 HRM 마커 시스템으로 전환을 실시하였으며, 저항성과 이병성이 명확하게 구분됨을 확인할 수 있었음.

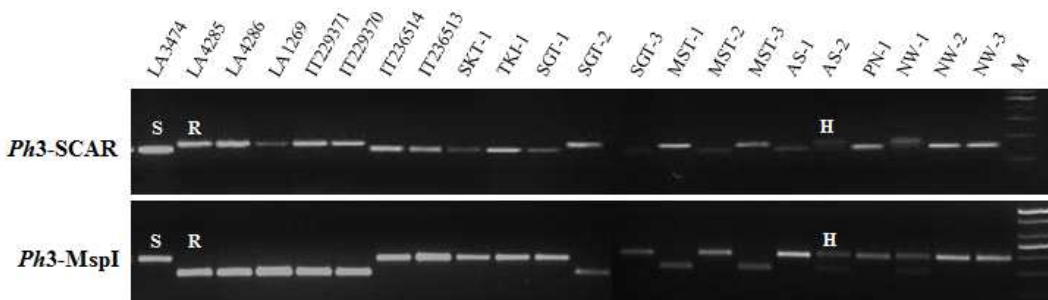


[그림 6-4] 대량분석을 위한 Ph3 유전자 기반 CAPS 마커의 HRM 마커로의 전환

#### 다. Ph3 저항성 판별용 CAPS 마커 및 SCAR 마커 패널 테스트

(1) Ph3 유전자 기반으로 만든 CAPS 마커와 SCAR 마커를 활용하여 토마토 30개의 시판품종 및 육성계통을 대상으로 패널 테스트 실시한 결과 Ph3-SCAR 마커는 총 12개의 저항성 토마토와 2개의 이형접합상태인 토마토를 선발할 수 있었음(그림 6-5).

(2) 저항성으로 선발된 토마토는 LA1932, LA1938, LA1969, LA2779, LA4285, LA4286, LA1269, IT229371, IT229370, Dunne, OlleTy, Unicorn이었고, Ty250, Titichal은 이형접합상태인 것으로 확인됨. Ph3 유전자가 우성이므로 이형접합상태로 선발된 Ty250과 Titichal은 저항성으로 분류할 수 있어, 최종적으로 Ph3-MspI 마커는 30개의 토마토 시판품종 및 육성계통 중 14개의 토마토를 선발가능했음.



[그림 6-5] Ph3 유전자 기반 SCAR 마커와 CAPS 마커의 패널 테스트 결과 일부

라. *S. pennellii* 유래 염색체이입계통집단과 *S. habrochaites* 유래 염색체이입계통집단의 역병저항성 분석 (앞마름 역병 생물검정은 1-2년차 위탁과제로 강릉원주대학 김병섭 교수 실험실 진행)

(1) 집단내에서의 저항성 QTL에 의해 부여되는 역병 저항성을 정확하게 진단하기 위해서는 병저항성 대량 검정 시스템의 확립이 가장 중요함. 이를 해결하기 위해 해당 분야 전문가인 강릉원주대학 김병섭 교수님팀이 위탁과제로 이를 수행함.

(2) *S. pennellii* LA716 및 *S. habrochaites* 은 기존에 역병 저항성 QTL을 가지고 있는 야생 종으로 알려져 있음. 이에서 유래한 염색체이입집단을 활용하여 QTL을 분리시켜 각 QTL의 단독 effect를 분석하고자 실시함(표 6-3, 그림 6-6, 그림 6-7). 1차 집중 실험에서 *S. pennellii* 유래 ILs와 *S. habrochaites* 유래 ILs 모두에서 병에 완전히 걸리지 않는 강한 저항성을 보이는 계통들은 각 집단의 2-4% 정도에 해당하였고, 어느 정도 저항성을 보이는 계통들은 각 집단에서 21.6%와 31.4%에 해당됨. 이병성과 강한 이병성을 보이는 계통들이 각 집단에서 차지하는 비율은 40-50%에 해당되므로 이병성 계통들이 확연히 많거나, 집중 강도가 강한 편이었던 것으로 추정됨.

표 6-3. *S. pennellii*과 *S. habrochaites*계통의 저항성 정도 비교(1차 집중결과)

Disease reaction	<i>S. pennellii</i>	<i>S.habrochaites</i>
Immune	0(0.0%)	0(0.0%)
Highly resistant	2 (2.7%)	2(3.9%)
Resistant	16(21.6%)	16(31.4%)
Tolerant	19(25.7%)	13(25.5%)
Susceptible	15(20.3%)	6(11.8%)
Highly susceptible	22(29.7)	14(27.5%)
Total	74(100%)	51(100%)



[그림 6-6] *S. pennellii* 유래 74 ILs 집단의 역병저항성 평가의 일부(1차 집중결과)



[그림 6-7] *S. habrochaites* 유래 60 ILs 집단의 역병저항성 검정 평가의 일부(1차 접종결과)

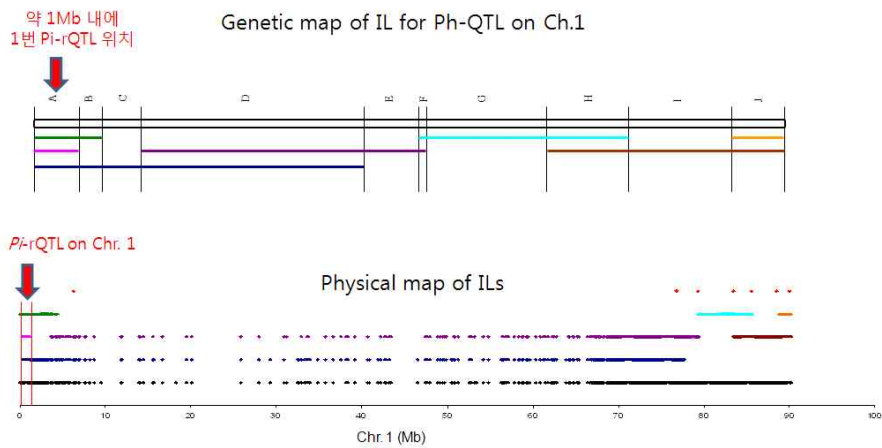
(3) 1차 접종 실험에서 *S. pennellii* 유래 ILs와 *S. habrochaites* 유래 ILs 사용되었던 계통들이 모두에서 2차 접종 실험에서 재평가되었으나, 1차 저항성 평가 결과와 판이한 결과를 얻게 됨. 사용되었던 *S. pennellii* 유래 ILs와 *S. habrochaites* 유래 ILs 중 일부를 활용하여 3차 접종 실험을 실시하였으나, 1차 실험과 2차 실험 결과들과 비교 평가를 진행해 본 결과, 유의성있게 해석 가능한 결과를 얻지 못함.

마. *S. pennellii* LA716 염색체이입계통집단 활용한 Pi-rQTLs 분석

(앞마름 역병 생물검정은 1-2년차 위탁과제로 강릉원주대학 김병섭 교수 실험실 진행)

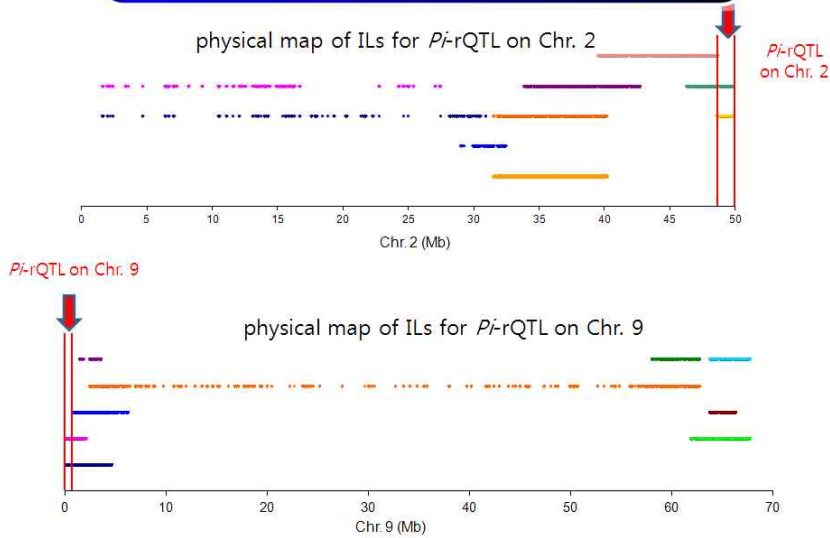
(1) 총 9개의 Pi-rQTLs 동정결과와 각 IL의 physical map 비교 분석을 진행하였음. 총 9개의 Pi-rQTLs 중 3개에 해당하는 염색체 1번, 2번, 9번 상의 Pi-rQTLs 는 1 Mbp 내에 위치하고 있으므로 유전자 동정이 용이함.

**염색체 1번 Pi-rQTLs**



[그림] 염색체 1번상의 Pi-rQTL

**염색체 2번과 9번 Pi-rQTLs**



[그림]염색체 2번과 9번 상의 Pi-rQTL

(2) 2차, 3차 병검정을 통한 Pi-rQTLs 위치 재검정을 실시하여, 선행연구에서 확보된 SNP와 종합분석을 통해 분자표지 개발 및 QTL-NIL 제작을 추진하고자 하였으나, 앞서 언급된 바와 같이 병검정 결과의 일치도가 낮아 QTL 분석이 난관을 겪게 됨. 이는 Major QTL의 부재, 또는 병검정시 환경요인의 높은 기여도 등의 원인 때문으로 추정되나, 역병균 접종에 의한 phenotyping에 의지하여 QTL 분석을 진행하기에는 어려움이 있다는 판단.

(3) 역병균 접종에 의한 phenotyping을 대체할 차선책으로 역병균 effector를 활용한 hypersensitive response (HR) 반응 분석을 통한 저항성 탐색을 시도하였으나 transient expression용 viral vector가 자체적으로 토마토에서 강한 병징을 유발하여, HR 분석이 기술적으로 어려움을 겪게 됨. 본 연구에 사용된 벡터 시스템은 감자와 담배에서 최적화된 시스템이므로, 토마토에서의 체계적인 분석을 위하여는 viral vector construction.을 재시도하여야 할 것으로 판단됨.

표. Ph3 저항성 유도용 역병균 effector 탐색 및 신규 역병 저항성 탐색에 활용될 다양한 역병균 effectors 활용 (Sainsbury Laboratory, 영국)

Effector names	PITG gene ID	RXLR			
PexRD1	PITG_15287	RQLR	PexRD16	PITG_06087	RSLR
PexRD2	PITG_21422, PITG_11350, PITG_11383, PITG_11384, PITG_22935	RLLR	PexRD17	PITG_08599	RVLR
PexRD3	PITG_09160	RFLR	PexRD21	PITG_13452	RLLR
PexRD4	NA	RFLR	PexRD22	PITG_13306	RFLR
PexRD6, ipiO, Avrblb1	PITG_21388	RSLR	PexRD24	PITG_04314	RSLR
PexRD7, Avr3a	PITG_14371	RLLR	PexRD26	PITG_07947	RVLR
Pex147-2, Avr3a paralog		RLLR	PexRD27	PITG_13628	RLLR
Pex147-3, Avr3a paralog		RFLR	PexRD28	PITG_03192	RSLR
PexRD8	PITG_14739	RLLR	PexRD31	PITG_16402	RSLR
PexRD10	PITG_23206	RKLR	PexRD36	PITG_23132	RHLR
PexRD11	PITG_23206	RLLR	PexRD39/40, Avrblb2	PITG_20300	RSLR
PexRD12	PITG_16233, PITG_16240	RSLR	PexRD41	PITG_04089	RSLR
PexRD13	PITG_08812	RQLR	PexRD44	PITG_17063	RFLR
PexRD14	PITG_14961, PITG_14962, PITG_14954, PITG_14959	RLLR	PexRD45	PITG_09632	RSLR
			PexRD46	PITG_18685	RSLR
			PexRD49	PITG_05750	RLLR
			PexRD50	PITG_06099	RLLR
			PexRD51		RFLR

## 제 7절. Ve1 유전자 기반 CAPS 분자표지 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 식물재료

본 연구에 사용된 토마토는 40여개의 시판품종 및 육성계통이며, 토마토유전자원센터 ‘TGRC (Tomato Genetics Resource Center, USA.)’, ‘Cornell university’에서 다양한 TYLCV 저항성 유전자원을 분양 받았다. 품종이 26개, 계통이 14개이다. 또한, 외국계 품종이 13개이며, 나머지는 국내에서 개발된 시판품종 및 육성계통을 사용되었다(그림 7-1).

표 7-1. Ve1 분자표지 개발을 위해 활용된 식물재료

No.	Accession name (Genotype)	Seed Company (Nationality)
1	Oyama	Sakata seed (Japan)
2	Dotaerangtywinner	Takii seed (Japan)
3	Kumato	Syngenta seed (Switzerland)
4	Dafnis	Syngenta seed (Switzerland)
5	Daylos	Syngenta seed (Switzerland)
6	Dunne	Syngenta seed (Switzerland)
7	Rapsodie	Syngenta seed (Switzerland)
8	Mamirio	Syngenta seed (Switzerland)
9	Madison	Syngenta seed (Switzerland)
10	TP-7 Plus	Syngenta seed (Switzerland)
11	Gayachalplus	Syngenta seed (Switzerland)
12	Lycopene-9	Syngenta seed (Switzerland)
13	Titichal	Nongwoo bio (Korea)
14	NW-black1	Nongwoo bio (Korea)
15	NW-black2	Nongwoo bio (Korea)
16	NW-black3	Nongwoo bio (Korea)
17	NW-red1	Nongwoo bio (Korea)
18	NW-orangel	Nongwoo bio (Korea)
19	NW-pink1	Nongwoo bio (Korea)
20	Ty172	Volcani center (Israel)
21	Shinheuksu	Asia seed (Korea)
22	Kaedilrak	Asia seed (Korea)
23	Nurimaru2ho	Asia seed (Korea)
24	Sugarred	Asia seed (Korea)
25	Sugaryellow	Asia seed (Korea)
26	Ty250	Asia seed (Korea)
27	Blackace	Bunong seed (Korea)
28	Combiblack	Bunong seed (Korea)
29	Tystar	Bunong seed (Korea)
30	Tyescort	Bunong seed (Korea)
31	Tyendorphin	Bunong seed (Korea)
32	TILS-black1	Tomato Institute of Life Science (Korea)
33	TILS-black2	Tomato Institute of Life Science (Korea)
34	TILS-black4	Tomato Institute of Life Science (Korea)
35	TILS-black5	Tomato Institute of Life Science (Korea)
36	TILS-red1	Tomato Institute of Life Science (Korea)
37	TILS-pink1	Tomato Institute of Life Science (Korea)
38	TILS-yellow1	Tomato Institute of Life Science (Korea)
39	Miniheuksu	Asia seed (Korea)
40	TILSblack3	Tomato Institute of Life Science (Korea)

#### 나. genomic DNA 추출

DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)법을 변형하여 사용하였다(Kang *et al.*, 2001). 토마토의 어린 잎조직을 stainless bead와 LN<sub>2</sub>를 이용하여 마쇄하였다. 300  $\mu$ l CTAB (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol) buffer를 넣고 10분 간격으로 흔들어 주며 65°C에서 30분 처리 후, 150  $\mu$ l chloroform을 넣고 vortexing 처리하여 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 200  $\mu$ l를 채취하여 1.5 ml tube로 옮겨 주어 동량의 isopropanol과 함께 서서히 섞어주었다. 12,000

rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남겨진 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하였다. 세척 후 DNA pellet을 완전히 건조하고 100  $\mu$ l DNase-free water에 42°C에서 5분간 녹여주었다.

#### 다. *Ve1* CAPS 마커 제작 및 분석조건

CAPS 마커 design을 위해 2009년 발표된 Fradin et al., 논문에 기재되어 있는 *Ve1* 저항성 유전자의 염기서열 정보를 활용하였으며, 토마토 반신위조 저항성 유전자인 *Ve1*(GenBank accession no. AF272367)과 이병성 유전자인 *ve1*의 염기서열상의 차이를 분석하였다. Primer 제작은 *Ve1* 유전자의 염기서열 정보(Solyc09g005090)을 활용하여, genomic DNA에서 *Ve1* 유전자 증폭이 가능한 프라이머를 제작하였다(Table 5-2). PCR은 정량한 gDNA 1  $\mu$ l, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% 0.2 mM each dNTP, 0.4 uM forward와 reverse primer, 5 units Taq polymerase(TaKaRa, Japan), 총 25 ul 맞춰주었다. PCR 반응을 위해 T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용하였으며, PCR 온도조건은 섭씨 94도에서 10분간 초기 변성시키고, 섭씨 94°C에서 1분(denaturing), 섭씨 55°C에서 1분(annealing), 섭씨 72°C에서 1분(extension) 과정을 35회 반복 후 섭씨 72°C에서 10분간 반응시켰다. 제한효소 처리 방법은 *Xba*I 제한효소를 사용하며, PCR product 15  $\mu$ l, *Xba*I 2  $\mu$ l, 10x M buffer 2  $\mu$ l, BSA 0.1  $\mu$ l, 증류수로 총 20.1  $\mu$ l 맞춰주었다. 반응조건은 섭씨 37°C에서 1시간 처리 후 2.5% agarose gel을 EtBr로 염색하고 전기영동 후 Gel Doc 2000(BIO-RAD, USA)을 통해 밴드를 확인하였다.

## 2. 내용 및 결과

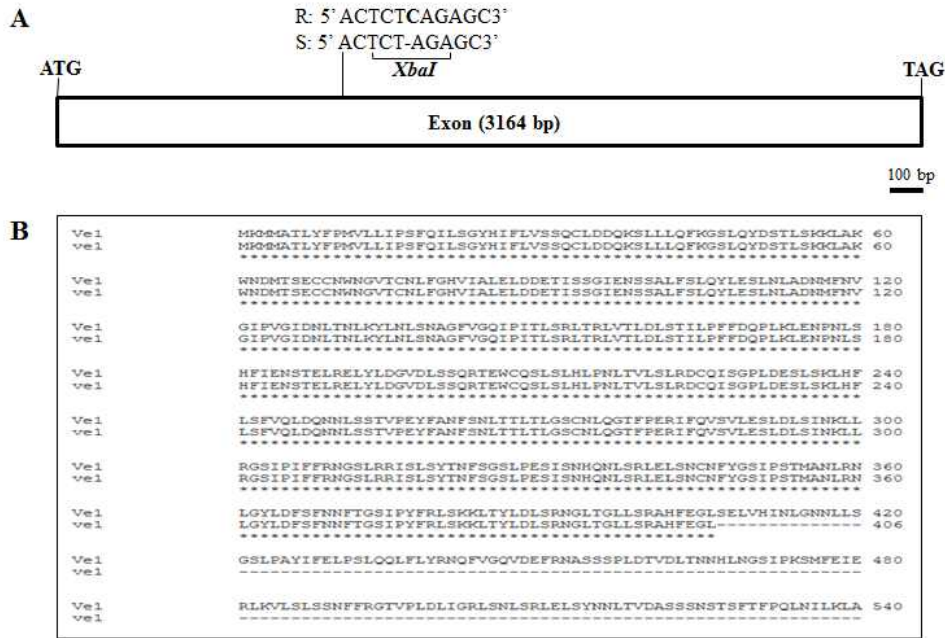
### 가. *Ve1* 유전자 염기서열분석 및 *Ve1* 저항성 판별용 CAPS 마커 개발

(1) 토마토 반신위조 저항성 유전자인 *Ve1*(GenBank accession no. AF272367)과 이병성 유전자인 *ve1*의 염기서열 비교 분석을 통해 *Ve1* 유전자는 intron이 존재하지 않는 하나의 큰 exon으로 존재함을 확인. 저항성 *Ve1*과 이병성 *ve1*에서 여러가지의 다형성이 탐색되었으나, 기능적으로 저항성과 이병성의 차이를 직접적으로 초래하는(pre-mature stop codon 유도) 1bp deletion change(TCAGAG  $\rightarrow$  TAGAG)를 타겟으로 하여 CAPS 마커 디자인 실시. 1220 bp위치에서 저항성 *Ve1*에서는 시토신(C)이 존재하고 이병성 *ve1*에서는 그 위치에 1 bp의 결실이 생김으로써, 아미노산 서열에서 치환변이가 유도됨. 그로 인해 이병성 *ve1*에서는 아미노산 서열 상 407 위치에서 조기종결코돈이 생성되어 더 이상 단백질 번역이 이루어 지지 않는 것이 확인되었고, 이로 인해 저항성과 이병성의 형질차이를 나타내게 되는 것으로 추정됨.

표7-2. *Ve1* 유전자 기반 CAPS 마커 정보

Resistant locus	Marker information	References	
<i>Ve</i>	F: CCATGAACAGATGTGACTTGTGTG VeR1:AAGTTTCTTATTTTCCTTCTCC veR2:CTCTTAGGATTTTGGACGTGATA	SCAR (linked marker, 0.6 cM) 1998	Kawchuk et al.
	F: CGAACTTGAC TACATTGACC CTG R: CAGTCTTGAAAGGTTGCTCAGCC ( <i>Xba</i> I)	CAPS (gene-based)	Jung et al. 2015



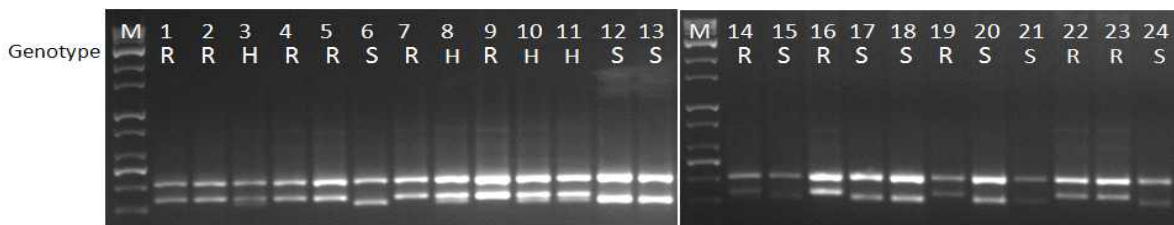


[그림7-1] Ve1 유전자 기반 분자표지 제작 정보

(2) *Ve1* 유전자에서 저항성과 이병성 간의 염기서열 상 1220 bp 위치에서 차이를 가지는 SNP 를 목표로 *Ve1*-*XbaI* 마커를 제작함 (표 7-2) . *Ve1*-*XbaI* 마커는 총 길이 743 bp의 PCR amplicon을 형성하고 C/- 변화로 인하여 *XbaI* 절단유무의 차이로 구분됨. TCTAGA 부위를 인식하여 절단하는 *XbaI* 처리 시, 저항성인 경우 그 인식부위가 1곳이 존재하여 335 bp와 408 bp로 구분되고, 이병성인 경우 *XbaI* 인식부위가 2곳이 존재하여 22 bp, 313 bp, 408 bp로 구분 됨. Agarose gel 상에서 저항성은 335 bp, 이병성은 313 bp로, 22 bp의 차이로 구별가능함.

#### 다. *Ve1* 저항성 구별용 CAPS 마커 패널 테스트

(1) 단백질로 번역시 조기종결코돈이 생성된 14IY236 마커와 14IY6 마커를 이용하여 총 40개의 시판품종 및 육성계통을 패널 테스트 실시. 저항성토마토로 선발된 품종으로는 오오야마, 도태랑TY위너, 쿠마토, 대프니스, 데이로스, 램소디, 마미리오, 메디슨, TP-7플러스, 가야찰플러스, TY172, 신희수, 누리마루2호, TY250, TY스타, TY에스코트 16개였으며, 저항성 계통으로는 NW-black1, NW-pink1, NW-pink1 3개를 선발하여 총 19품종 및 계통을 선발할 수 있었음. 시판품종 중 저항성으로 표기 되었으나 이 마커로 선발되지 않은 캐딜락, 블랙에이스 두 품종은 *Ve1* 이외의 다른 저항성을 가질 수도 있는 것으로 추정됨. 본 마커는 저항성, 이형접합자, 이병성을 모두 선발할 수 있는 마커로 대부분의 *Ve1* 저항성 재료를 선발할 수 있을 것으로 판단됨. 국내 및 외국계 종자회사 모두에서 시판하고 있는 품종들의 많은 경우 이미 *Ve1* 저항성이 육종과정에서 선발되고 있는 것이 확인됨.



[그림 7-2] *Ve1* 유전자 기반 functional 마커 분석 결과

## 제 8절. 과실 원예특성관련 분자표지 개발을 위한 기반확립

### 1. 연구수행 내용

#### 가. 과실 저장성 연구를 위한 과실 세포벽 분해 인자 탐색 및 분석

(1) 저장성 향상 관련 인자 탐색을 위하여 과실구성 조직의 세포벽 관련 후보 유전자 탐색을 진행함. 토마토와 유연관계에 있는 고추 과실 cDNA 활용한 secretome assay를 통하여 80여개의 세포벽 관련 후보 유전자 확보하여 고추-토마토 세포벽 관련 인자의 비교분석 실시.

(2) DFD (Delayed Fruit Deterioration)는 원예형질은 그대로 유지하면서 큐티클층의 보존에 의한 수분 함량 유지가 주원인이 되어 저장성 향상을 유도하는 유전자임. 코넬대학교 (Prof. Jocelyn Rose)에서 DFD 자원 분양받아 연구 진행.

#### 나. 과형 판별용 분자표지 개발 기반 확보

(1) 다양한 과형 유전자원 확보 및 특성 분석 진행함. 과형의 정량분석을 객관화하기 위하여 Tomato analyzer를 활용하여 토마토 과형 분석.

(2) 다양한 교배 조합 작성과 분리세대 육성을 통해 분자표지 개발을 위한 집단 작성.

(3) 과형결정에 관여하는 구조유전자 및 과형 조절 인자들에 대한 분자표지 개발을 위한 유전분석 및 유전자의 염기서열 비교 분석 실시.

### 2. 연구수행 결과

#### 가. Secretome assay 를 통한 과실 세포벽 관련 후보 유전자 탐색

(1) 큐티클층의 수분함량 유지로 인해 과실의 저장성 향상을 유도하는 유전자인 DFD 유전자원 확보 및 형질 분석을 진행함(그림 8-1). 재배하여 형질분석 결과, 저장성에 대하여는 향상효과가 다소 있었으나, 수량감소, 과실의 원예특성 저하 등의 부수적인 문제들이 다수 존재하여, 상업 육종의 육종소재로 활용하기에는 어려움이 존재한다는 판단.



[그림 8-1] DFD (Delayed Fruit Deterioration) 과실의 저장 후 4개월 상태

(2) 과실조직의 세포의 물리화학적 조성 변화에 있어서 세포벽이 크게 관여하며, 이는 저장성과 직결되는 형질이라는 기존 결과 및 판단에 근거하여, 세포벽 관련 후보 유전자 탐색을 진행함. 토마토와 근연관

계에 있는 고추의 과실숙성단계에서 발현되는 유전자들을 종합하여, 이를 secretome assay 분석을 실시함. secretome assay 분석을 통하여는 세포내에서 합성되어 세포벽으로 분비되는 단백질 합성 유전자를 효과적으로 선별 가능함. 이 과정을 통해 과실 숙성시에 세포벽으로 분비되는 단백질 합성 유전자군을 확보함 (표 8-1)

표 8-1. 과실 cDNA 활용한 secretome assay를 통하여 확보한 세포벽 후보 유전자 목록

Clone Name	Functional Annotation		
	Protein Name	SGN No.	GenBank No.
CaPFR1	Lipid transfer protein	U202925	NP_849837
CaPFR2	Prohibitin	U196766	T03843
CaPFR3	Non-specific lipid transfer protein	U196359	AAF23460
CaPFR4	Germin homolog	U199898	T07004
CaPFR5	Osmotin precursor	U196407	P12670
CaPFR6	Unknown	U198877	NP_564256
CaPFR7	Putative protein disulfide isomerase	U197846	NP_849696
CaPFR8	Thaumatococcus-like protein	U196408	AAK97184
CaPFR9	Defensin J1-1 precursor	No	Q43413
CaPFR10	Putative expansin	U198800	AAM12782
CaPFR11	Unknown	No	NP_566460
CaPFR12	Hypothetical protein	KS12074E11	No
CaPFR13	Hypothetical protein	No	No
CaPFR14	Unknown	U196529	NP_911279
CaPFR15	Pistil-specific protein sts15	KS18039D08	T07677
CaPFR16	Wound-induced protein WIN1 precursor	U196300	P09762
CaPFR17	Antifungal protein	U196085	AAL73184
CaPFR18	Allergen-like protein BRSn20	U196250	AAF16869
CaPFR19	Defensin J1-2 precursor	U198096	O65740
CaPFR20	Unknown	U196911	NP_910312
CaPFR21	Expressed protein	KS13013H01	No
CaPFR22	Putative miraculin	U196573	CAC40756
CaPFR23	emp24/gp25L/p24 family	KS26034B01	NP_172429
CaPFR24	Arabinogalactan-protein	U196664	AAA66362
CaPFR25	Proteinase inhibitor I-B	U196517	Q03199
CaPFR26	HR7	U196169	BAA76516
CaPFR27	Subtilisin-like proteinase	U200656	NP_569048
CaPFR28	Expressed protein	KS18006B09	No
CaPFR29	Endo-beta-1,4-glucanase	U204800	CAA65827
CaPFR30	Putative endomembrane protein 70	No	NP_172919
CaPFR31	Lipid transfer protein	U196357	AAE07486
CaPFR32	Unknown	KS20064H09	G86378
CaPFR33	Expressed protein	U198336	No
CaPFR34	Invertase inhibitor precursor	No	T07380
CaPFR35	Fruit-ripening protein	No	J04099 AAF02299
CaPFR36	Chitinase	U196233	JQ2342
CaPFR37	Putative nonspecific lipid transfer protein	U196205	Q40114
CaPFR38	Endochitinase precursor	U196327	AAD29084
CaPFR39	Putative precysteine proteinase	U196350	AAF16413
CaPFR40	Thionin-like protein	U196050	Q05540
CaPFR41	Acidic endochitinase Q precursor	U196327	NP_913279
CaPFR42	SOLU-related protein	U197351	No
CaPFR43	Expressed protein	U197385	CAE12163
CaPFR44	Expansin-like protein	U196809	No
CaPFR45	Hypothetical protein	No	No
CaPFR46	Hypothetical protein	KS15056G11	NP_917957
CaPFR47	Aleurone ribonuclease	U198622	No
CaPFR48	Hypothetical protein	No	NP_177697
CaPFR49	Glycosyl hydrolase family	U199561	No
CaPFR50	Hypothetical protein	No	NP_564669
CaPFR51	Unknown	No	T07381
CaPFR52	Glycine-rich protein Tfm5	U196044	AAR83883
CaPFR53	U-Lim protein	U196077	No
CaPFR54	Hypothetical protein	No	No
CaPFR55	Hypothetical protein	KS17012B06	T04501
CaPFR56	Unknown	KS01074H03	AAE83840
CaPFR57	Glycine-rich protein TomR2	No	No
CaPFR58	Expressed protein	U196025	No
CaPFR59	Hypothetical protein	No	No
CaPFR60	Hypothetical protein	No	No
CaPFR61	Hypothetical protein	No	P27057
CaPFR62	GAST1 protein precursor	U196364	CAC42086
CaPFR63	Putative peroxidase	U196574	S14977
CaPFR64	Glycine-rich protein	KS26031H11	NP_174162
CaPFR65	Unknown	U197679	BAE09534
CaPFR66	Pectin methylesterase-like protein	U198423	Q96372
CaPFR67	Cell division cycle protein 48 homolog	U202536	No
CaPFR68	Hypothetical protein	KS15055F04	No
CaPFR69	Hypothetical protein	No	Q43413
CaPFR70	Defensin J1-1 precursor	KS18062B04	AAL73184
CaPFR71	Antifungal protein	KS18042A09	Q09134
CaPFR72	ABA and stress inducible protein	KS18038H03	AAF63514
CaPFR73	Cell wall protein	U196110	No
CaPFR74	Hypothetical protein	No	P09799 Q40585
CaPFR75	Vicilin precursor	No	CAA32235
CaPFR76	Vacuolar ATP synthase	U197192	AAL35366
CaPFR77	Polygalacturonase	KS17025B08	AAM12784
CaPFR78	Defensin protein precursor	U196271	NP_564318
CaPFR79	Putative pectate-lyase	U203014	No
CaPFR80	Unknown	U197590	No

(3) 표8-1에서 얻은 후보 유전자군을 토마토 유전자들과 비교분석을 통해 저장성 향상 관련 연구를 진행하였으나, 국내 토마토 상업육종에 있어서 이를 적용하는 것에 대한 실현 가능성이 매우 낮다는 판단 하에 연구 범위를 축소함.

**나. 과형 판별용 분자표지 개발을 위한 기반 확보**

(1) 다양한 과형 유전자원을 확보하여 과실 특성 분석 진행. 확보된 유전자원들을 과형, 과색, 과중, 과고 등의 과실형질에 대한 분석을 실시한 결과, 매우 다양한 유적적 변이를 포함하고 있음이 확인됨.



[그림 8-2] 확보된 다양한 과형관련 유전자원들의 과실 이미지

(2) 객관적인 과형의 정량분석시스템 정립을 위하여 Tomato analyzer를 도입. Tomato analyzer를 활용하여 효율적 토마토 과형 분석 프로토콜 확립(그림 8-3).

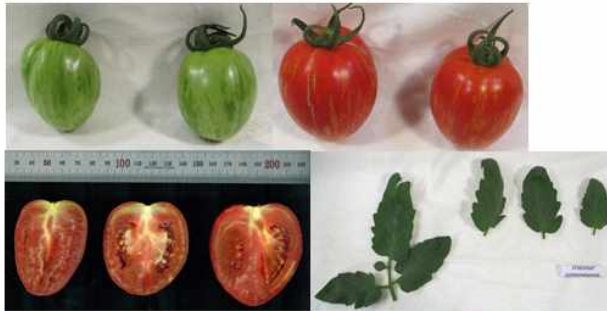
(3) 확립된 과형분석 기준으로 다양한 유전자원 및 시판품종들의 과형을 분석해본 결과, 시판 품종내에서는 변이의 폭이 비교적 적음이 확인되었음. 다양한 육종재료에 존재하고 있는 과형 관련 변이를 육종소재로 활용하여 새로운 시장 개척의 가능성이 충분하다고 판단되나, 육종과정에서 과형변이의 선발에의 어려움이 존재한다는 기술적인 어려움이 존재. 주요 과형결정인자들의 우선도입을 통해서 기반을 마련하고, 과형 QTL 분석을 통해 미세인자 선발도 가능한 종합적인 분자표지 선발시스템의 개발이 요구됨.

### Campari



과색	과형	가로	세로	FSI	어깨색
RED	Round	494.375	447.875	0.9064	X

### IT2034507



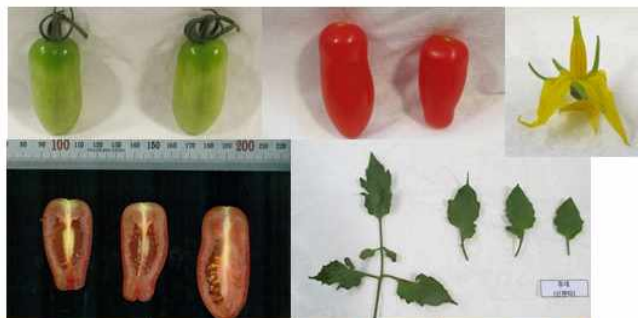
과색	과형	가로	세로	FSI	어깨색
Red	Oxheart	654.25	687.625	1.0604	X

### IT203285



과색	과형	가로	세로	FSI	어깨색
Black	Flat	1028	992	0.9626	○

### 시판품종



과색	과형	가로	세로	FSI	어깨색
선홍색	long	301.875	566.5	1.8823	○

[그림 8-3] Tomato analyzer를 활용한 과형 분석 결과의 일부

표 8-3. 시판품종들의 과형분석 결과

Name	Fruit category	Fruit shape index	Name	Fruit category	Fruit shape index
시판품종1	Round	0.8926	시판품종16	Flat	0.8412
시판품종2	Flat	0.8146	시판품종17	Round	0.8603
시판품종3	Flat	0.8043	시판품종18	Round	0.8361
시판품종4	Ellipsoid	1.4393	시판품종19	Round	0.9116
시판품종5	Round	1.0457	시판품종20	Ellipsoid	1.3581
시판품종6	Round	0.8612	시판품종21	Ellipsoid	1.513
시판품종7	Ellipsoid	1.3334	시판품종22	Round	0.9112
시판품종8	Round	0.9102	시판품종23	Round	0.918
시판품종9	Round	0.8847	시판품종24	Round	0.8813
시판품종10	Round	0.8409	시판품종25	Round	0.8216
시판품종11	Ellipsoid	1.2938	시판품종26	Flat	0.631
시판품종12	Round	0.9971	시판품종27	Round	0.8771
시판품종13	Ellipsoid	1.3025	시판품종28	Ellipsoid	1.4841
시판품종14	Flat	0.8212	시판품종29	Round	0.9263
시판품종15	Flat	0.6068	시판품종30	long	1.8823

(4) 과형결정에 관여하는 대표유전자인 ovate와 sundp 대한 유전분석 및 염기서열 비교분석 완료. 염기서열 비교분석 결과, 다형성이 발견됨. 해당 다형성 분석 결과과형 결정에의 기여도가 그리 크지 않다고 판단되어 분자표지 전환 보류됨.

(5) 체계적인 토마토 과형의 분자유육종을 위하여 변이체 작성 및 유전집단이 우선적으로 요구되므로, 다양한 방향의 교배조합을 통해 집단 작성 시행 (표8-4).

표 8-4. F2 집단 육성중인 교배조합의 일부 내용

과형	Long x Round	Obovoid x Round	Flat x Round	Oxhert x Round
교배조합	IT203482 x LA1231	LA0791 x LA1215	LA1312 x LA1311	LA2294 x LA1334
		LA1705 x LA1215	LA1311 x LA1311	
		LA2375 x LA1215		

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 국내용 토마토 청고병/흰가루병 및 과색관련 분자표지 개발

#### 1. 최종연구목표

- (1) TSWV, 잎곰팡이병, 반신위조병 저항성 기존개발 분자마커 SNP화
- (2) 토마토병 정밀 검정 시스템 확립
- (3) 청고병/퀘양병 저항성 관련 신규 분자마커 개발
- (4) 흰가루병 저항성 관련 신규 분자마커 개발
- (5) 과색 관련 신규 분자마커 개발

#### 2. 연도별 세부연구내용 및 목표대비달성도

##### (1) 1차년도 (2013)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
기존 개발 병저항성 분자 마커 2개 SNP마커로의 전환 진행	-토마토 TSWV 저항성 유전자인 <i>Sw5</i> 대상 SNP 마커 개발 진행 -토마토 잎곰팡이병 저항성 유전자인 <i>Cf-9</i> 대상 SNP 표지 개발 진행	100
청고병 저항성 검정체계 최적화	-토마토에서 청고병 저항성 검정을 위해 세균 농도, 작물의 생장단계 등을 확립함.	100
청고병 저항성 유전자인 <i>Bwr12</i> 와 <i>Bwr6</i> 기반 분자마커 개발 기반 조성	- <i>Bwr12</i> 와 <i>Bwr6</i> 청고병 저항성 QTL을 가지는 토마토 Hawaii7996 품종 및 유전자원 10 여점 확보 - 기존 청고병 저항성 분자마커 정보 확보 및 효용성 검정 진행 - TG564 RFLP 마커의 CAPS 마커 전환 진행	100
퀘양병 병저항성 관련 분자마커 개발 기반 조성	- 퀘양병 저항성 유전자원 및 기존 보고된 분자마커 정보 확보 - 확보된 분자표지 효용성 검정 - 확보된 저항성 품종의 분리집단 작성	신규 추가 내용
과색판별용 유전자 기반 분자마커 개발 기반 조성	- 흑색토마토 판별 CAPS 마커 개발 - 노란색, 오렌지색 판별용 결정 유전자 SNP 분석 진행	100

(2) 2차년도 (2014)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<i>Sw5, Cf9</i> 분자표지의 SNP 표지로의 전환	-저항성/감수성 F1 시판 품종들을 이용하여 <i>Sw5</i> 와 <i>Cf9</i> 의 SNP 분석 및 SNP 마커 개발 완료	100
청고병 저항성 sub-IL 제작 및 저항성 인자 분석	-IL6-2 포함 총 4개의 IL들의 sub-IL제작 진행 중	100
청고병 저항성 QTL <i>Bwr12</i> 유전자 기반 분자표지 신규 개발	- <i>Bwr12</i> 유전자와 연관 마커 분석 및 SNP 발굴 - <i>Bwr12</i> 주변의 NB-LRR 형태의 저항성 유전자 분포 및 발현 분석	100
신규 청고병 병저항성 QTL 발굴	- AVDRC, 국립원예특작과학원 등에서 신규 청고병 저항성 유전자원 확보 및 분석 - 기존 개발 마커 효용성 검정	100
궤양병 저항성 품종 특성 분석	- 선별된 궤양병 저항성 품종의 분리집단 작성 및 유전형질 분석 진행 중 - 신규 궤양병 저항성 유전자원 검정 계속 진행	100
과색 결정 유전자좌용 CAPS 혹은 SNP 표지 개발	- 핑크색 과색 결정 유전자 기반 CAPS 혹은 SNP 표지 개발 완료 - 노란색, 오렌지색 과색 결정 유전자 기반 분자표지 개발 진행 중	100

(3) 3차년도 (2015)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<i>Cf-9/Cf-4</i> 분자마커 개발	- 33개의 토마토 시판품종들에서 <i>Cf-4</i> 와 <i>Cf-9</i> 유전자를 가진 품종을 구별하기 위한 추가적인 분석중 (Phenotyping분석)	100
청고병 저항성 sub-IL 제작 및 저항성 인자 분석	- IL6-2 포함 총 4개의 IL들의 sub-IL제작 진행 중	100
청고병 저항성 QTL <i>Bwr6</i> 와 <i>Bwr12</i> 유전자 기반 분자표지 신규 개발	- <i>Bwr6</i> 과 <i>Bwr12</i> 유전자와 연관 마커 분석 및 SNP 발굴 - <i>Bwr6</i> 과 <i>Bwr12</i> 주변의 NB-LRR, RLK 형태의 저항성 유전자 분포 및 뿌리에서 발현 분석	100
신규 청고병 병저항성 QTL 발굴	- 저병원균인 SL882로 청고병 저항성 유전자원 후보군 Phenotyping 계속 진행 - 육종회사, 토마토생명공학연구소 등에서 신규 청고병 저항성 유전자원 확보 및 분석 - 기존 개발 마커 효용성 검정 - 신규 확보된 SNP 효용성 검정	90
궤양병 저항성 품종 특성	- 선별된 궤양병 저항성 품종의 분리집단 작성 및 유전형질 분석 진행 - 확보된 궤양병 저항성 Introgression line들의 유전분석	100
과색판별용 유전자 기반 CAPS 혹은 SNP 표지 개발	- 노란색과 오렌지색 과색 결정 유전자 기반 CAPS 혹은 SNP 표지 개발 완료	100



(4) 4차년도 (2016)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
기존 청고병 저항성 QTL <i>Bwr12</i> 와 <i>Bwr6</i> 유전자좌 연관 분자표지 개발	- 10-BA-333과 Hawaii 7996 품종의 분리집단 작성, 병리 검정 및 신규 확보된 SNP 효용성 검정 - <i>Bwr12</i> 와 <i>Bwr6</i> QTL 주변 후보 유전자군 발현 분석 및 SNP, InDel 분석	90
신규 발굴된 국내 청고병 병저항성 토마토 유전자원 유전 분석 및 분자표지 개발	- 청고병 저항성 유전자원 후보군들의 genome resequencing 결과 분석을 통한 SNP 및 InDel 탐색 - 육종회사의 청고병 저항성 유전자원 확보, 병리검정 및 신규 확보된 SNP 효용성 검정	90
신규 발굴된 국내 궤양병 저항성 토마토 유전자원 유전 분석 및 분자표지 개발	- 선별된 궤양병 저항성 품종의 분리집단 작성 및 유전형질 분석 - 확보된 궤양병 저항성 Introgression line들의 유전분석 - 육종회사의 궤양병 저항성 유전자원 병리검정	100
노란색, 주황색 과색 과색 판별용 분자표지 개발	- 노란색과 주황색 과색 결정 유전자 기반 CAPS 혹은 SNP 표지 개발 완료	100

3. 정량적 성과 (논문게재, 특허출원, 기타)

성과지표 구분			단위	1년차		2년차		3년차		4년차		1단계 목표 (총합)	1단계 실적 (총합)	달성도 (%)	
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적				
과학기술적 목표	품종개발	국내 출원	건												
		국내 등록													
		국외 출원													
		품종생산수입 판매신고													
	국내 특허	출원		0	2	0	3	1	0			1	5	500	
		등록						0	2	1	1	1	3	300	
	국제 특허	출원													
		등록													
	논문	SCI		1	0	1	0	2	2	2	2	6	4	67	
		비SCI													
	학회 발표	국내				0	1	1	2	1	1	2	4	200	
		국제		0	1	1	1	0	1	0	1	1	4	400	
	품종 지역적응성 검정														
무독묘 품종생산															
무독묘 원종주수															

반수체 유래계통												
계통선발												
계통세대단축	점											
생산량 검정	건											
중간모본 육성												
원종탐색												
분자마커 개발		2	2	2	3	3	2	3	7	10	14	140
마커분석			0	20	0	30	0	96	0	146		
분자마커 지원	점											
bioassay 건수	건				0	4	0	4	0	8		
유전자원 등록	건											
유전체정보 등록												
유전자지도집단 등록												
유전자원수집 및 분양		0	14							0	14	
primer 탐색												
기반구축												
분리집단 육성								0	5	0	5	
분리집단 적용												
DB 구축												
핵심집단 구축												
협력관계 구축												
현장평가회												
전시포 개설 수												
전시포 설명 횟수												
품종특성설명회, 평가회												
조직배양 민간서비스(batch)												
비대칭세포융합체 민간제공												
우수교배친 동질사배체 양성												
유전자원도입 격리재배												
병리검정			0	1	0	1				0	2	
기본식물 생산	만구											
자구 생산												
중구 생산												
개화구 생산												
중구증식	천구											

	원균 종균 관리		건										
	종균 용기 개발												
	종균 배지 개발												
	종균배양 환경관리시스템												
	기능성평가												
	성분검정												
	성과관리시스템												
산업 경제 적 목표	수입 대 체 효 과	품명	%										
		국내종자매출 액	백만 원										
	종자수출액		만 불										
환경 적 목표	시장조사보고서		건										
	정책조사보고서												
	인력양성					0	1	0	2			0	3

## 제 2 절 수출용 토마토 TYLCV/역병/겉무늬병 및 저장성 관련 분자표지 개발

### 1. 최종연구목표

- (1) TYLCV 저항성 유전자 Ty1/3, Ty2, Ty4, ty5 판별용 신규 분자표지 개발
- (2) 토마토병 정밀 검정 시스템 확립
- (3) 역병 저항성 판별용 신규 분자마커 개발
- (4) 반신위조병 저항성 관련 신규 분자마커 개발
- (5) 과실 원예특성 관련 신규 분자마커 개발

### 2. 연도별 세부연구내용 및 목표대비달성도

#### (1) 1차년도 (2013)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
- TYLCV 저항성 Ty2 유전자 동정 기반 조성	- infectious clone 활용한 TYLCV 저항성 검정조건 최적화 - <i>S. habrochaites</i> 기반 Ty2-NIL 작성	100
- TYLCV 저항성 분자표지 개발 기반 조성	- Ty1 유전자 기반 CAPS 마커 개발 및 적용 - ty5 유전자 기반 CAPS 마커 개발 및 적용 - Ty4/6 분자표지 개발을 위한 핵심 유전자원 확보	100
- 역병저항성 Ph4, Ph5-1, Ph5-2 분자표지 개발 기반 조성	- Ph4, Ph5-1, Ph5-2 분자표지 개발을 위한 핵심 유전자원 확보 및 판별균주 확보 ( <i>S. pinpinellifolium</i> 과의 교배조합작성을 통해 분리집단작성)	100
- <i>S. pennellii</i> 유래 역병 저항성 major QTL 분자표지 개발 기반 조성	- 국내 역병 균주로 <i>S. pennellii</i> 유래 IL 집단 저항성 검정 실시 (위탁과제) - Pi-rQTLs 동정 및 Pi-rQTL-NILs 제작 - RNA-seq 진행	100
- <i>S. habrochaites</i> 유래 역병 저항성 major QTL 분자표지 개발 기반 조성	- 국내 역병 균주로 <i>S. habrochaitesi</i> 유래 IL 집단 저항성 검정 실시 (위탁과제) - 역병저항성 Pi-rQTLs 위치 동정 진행 - Pi-rQTL-NILs 제작 추진	신규추가
- 역병 저항성 Ph3 유전자 기반 분자표지 개발 기반 조성	- Ph3-NIL 작성 추진 - Ph3 분자표지 적용 및 연관도 증진을 위한 실험 추진	신규추가
- 저장성 조절 유전자 기반 분자표지 개발	- DFD 유전자원 확보 - DFD 유전자기반 표지 개발 진행	90
- 저장성 조절 신규 유전자 탐색	- 과실 세포벽 관련 유전자들에 대한 비교 분석을 통한 후보유전자 탐색	신규추가
- 반신위조병 저항성 분자표지 개량	- Ve1 유전자 기반 CAPS 마커 개발 및 적용	신규추가
- 세균성 점무늬병 저항성 분자표지 개발 기반 조성	- Xa4 동정을 위한 균주 확보 - 병저항성 검정 시스템 확립 진행 중	신규추가

(2) 2차년도 (2014)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
- TYLCV 대량검정시스템 확립	- 토마토에서의 infectious clone활용한 대량 검정 시스템 확립 - Agrobacterium induction 조건 변화를 통한 균일한 접종 및 검정 조건 확립	90
- Ty2 유전자 fine mapping	- <i>S. habrochaites</i> IL 사용한 sub IL 작성을 통하여 11번 염색체의 Ty2 인접부위 세분화 - RNA seq 결과 정밀 분석을 통한 후보 유전자 및 후보 SNP 탐색	150
- Ty4, Ty6 fine mapping 위한 SNP 확보 및 분석	- 저항성 pre-breeding line 활용 - RNA seq 결과 분석	90
- Ph3 유전자기반 분자표지 개발 및 적용	- Ph3 인접 부위 염색체 세분화를 통한 Ph3-NIL 작성 - Ph3-NIL작성 집단의 역병 저항성 및 원예관련 형질 분석 - Ph3 유전자 내의 SNP/ InDel 활용 CAPS/SCAR 마커 개발	150
- <i>S. pennellii</i> 유래 역병 major QTL 동정을 위한 분석	- <i>S. pennellii</i> 유래 IL 집단 저항성 재검정을 통한 QTL 위치 재확인 - 역병저항성 Pi-rQTLs 후보 SNP 확보 - Pi-rQTL NILs 제작 추진 - RNA seq 분석 결과에 따른 역병저항성 Pi-rQTLs 위치 상의 후보 유전자 확보	100
- <i>S. habrochaites</i> 유래 역병 major QTL 동정을 위한 분석	- 국내 역병 균주로 IL 집단 저항성 재검정을 통한 QTL 위치 재확인 - 역병저항성 Pi-rQTLs 후보 SNP 확보 - Pi-rQTL NILs 제작 추진 - RNA seq 분석 결과에 따른 역병저항성 Pi-rQTLs 위치 상의 후보 유전자 확보	100
- 저장성 향상 SNP 표지 개발	- DFD 분자표지 개발 및 적용 - 국내 자원에서의 DFD 확보 자원 스크리닝 - 세포벽 관련 유전자 풀에서의 저장성 향상 후보유전자 탐색	90
- 과형 관련 유전자원 확보 및 SNP 탐색	- 과형 관련 유전자원 확보 및 과형분석 정량화 - 과형 관련 유전자 비교분석 및 과형분리집단 작성	신규추가

(3) 3차년도 (2015)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
Ty1/3 HRM 마커 전환	- 대량분석을 위해 기존의 CAPS 마커를 SNP 분석시스템으로 전환	신규추가
Ty2 유전자 클로닝 및 유전자 기반 분자표지 제작	- Ty2 후보유전자 기능분석 - 형질전환체 확보 진행 - 1,000여 개체의 Ty2-subIL을 활용한 300kb 구간 분석 - SCAR 마커 개발 및 적용	90
Ty4 분자표지 개발	- Ty4 fine mapping을 통한 연관도 개선 마커	150

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ty4 저항성 후보유전자 분석</li> <li>- 유전자기반 분자표지 확보를 위한 추가분석</li> </ul>	
TYLCV 저항성 pyramiding 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TYLCV 저항성 정량분석을 통한 저항성 정도 및 스펙트럼 분석(자연발병환경활용)</li> <li>- Ty1/3, Ty2, Ty4, ty5 저항성 자원간의 교배 조합 작성을 통한 집단 육성진행 중</li> </ul>	90
담배가루이 저항성 추가로 인한 TYLCV 방제 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선충저항성 Mi1의 담배가루이 저항성 분석</li> <li>- Acylsugar 함량 증가된 IL 8-1 (염색체이입계통) 활용을 통한 병발생 억제효과 확인</li> <li>- TYLCV 저항성과 담배가루이 저항성 접목을 통한 durable resistance 소재 육성</li> </ul>	신규추가
Ph3 HRM 마커 전환	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량분석을 위해 기존의 CAPS 마커를 SNP 분석시스템으로 전환</li> </ul>	신규추가
토마토잎마름역병 신규 저항성 탐색 및 QTL 활용 가능성 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 역병균 effectors 사용한 HR분석체계 확립</li> <li>- 역병균 토마토 잎 접종법 체계 확립</li> <li>- QTL 저항성 도입 가능성 분석</li> </ul>	80
세균성 점무늬병 저항성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AvrXv4 활용한 HR 분석 체계 확립 및 저항성 유전자원 확보</li> <li>- 토마토 잎 접종법 확립</li> </ul>	신규추가
과형 결정 분자표지 개발 기반 조성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tomato analyzer 분석으로 과형 분석 정량화</li> <li>- 유전자원 및 분리집단 내에서의 과형 결정 유전자 염기서열 확보 및 다형성 탐색</li> <li>- ovate, sun, fas, lc SNP, InDel 확보</li> <li>- 분리집단 작성 및 유전분석 계속 진행</li> </ul>	100

(4) 4차년도 (2016)

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
Ty2 와 Ty4 유전자 클로닝 및 유전자 기반 분자표지 적용	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ty2, Ty4 후보유전자 기능 확인을 위한 형질 전환체 확보 및 분석</li> <li>- 후보유전자 기능분석</li> <li>- SNP/InDel 확보 및 SCAR마커 전환</li> </ul>	100
TYLCV 저항성 pyramiding 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ty1/3, Ty2, Ty4, ty5 저항성 집적에 따른 저항성 범위 및 정도 증가 효과 분석</li> <li>- 다양한 조합의 집단 육성</li> </ul>	100
담배가루이저항성의 TYLCV 방제 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 담배가루이 저항성과 TYLCV 저항성 집적에 따른 방제효과 분석</li> <li>- 담배가루이 저항성 신규 분자표지 개발</li> <li>- RNA seq 분석을 통한 인자 탐색</li> </ul>	100
토마토잎마름역병 신규 저항성 및 major QTL 분자표지 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA seq 분석을 통한 역병저항성 인자 탐색</li> <li>- effector활용한 HR 반응 분석</li> </ul>	80
과형판별 분자표지 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제작된 분리집단 활용하여 과형 마커의 집단 검정 실시</li> <li>- ovate, sun 판별 분자표지 개발</li> </ul>	90

3. 정량적 성과 (논문게제, 특허출원, 기타)

성과지표 구분			단위	1년차		2년차		3년차		4년차		1단계 목표 (총합)	1단계 실적 (총합)	달성도 (%)	
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적				
과학기술적 목표	품종개발	국내 출원	건												
		국내 등록													
		국외 출원													
		품종생산수입 판매신고													
	국내 특허	출원		0	2	0	2	1	2			1	6	600	
		등록									1	2	1	2	200
	국제 특허	출원													
		등록													
	논문	SCI		1	1	1	1	1	0	1	1	4	3	75	
		비SCI						0	1			0	1		
	학회 발표	국내		0	0	1	3	1	6	1	2	3	11	367	
		국제		0	1	0	1					1	2	200	
		품종 지역적응성 검정													
		무독묘 품종생산													
		무독묘 원종주수													
		반수체 유래계통													
		계통선발													
		계통세대단축		점											
		생산량 검정		건											
		중간모본 육성													
		원종탐색													
		분자마커 개발		2	3	2	5	2	4	3	2	9	14	155	
		마커분석				0	20	0	20			0	40		
		분자마커 지원		점											
		bioassay 건수		건											
		유전자원 등록		건											
		유전체정보 등록													
	유전자지도집단 등록														
	유전자원수집 및 분양	0	2		0	8	0	8			0	18			
	primer 탐색														
	기반구축														
	분리집단 육성				0	1	0	7	0	2	0	10			
	분리집단 적용														

	DB 구축													
	핵심집단 구축													
	협력관계 구축													
	현장평가회													
	전시포 개설 수													
	전시포 설명 횟수													
	품종특성설명회, 평가회													
	조직배양 민간서비스(batch)													
	비대칭세포융합체 민간제공													
	우수교배친 동질사배체 양성													
	유전자원도입 격리재배													
	병리검정		0	2	0	2					0	4		
	기본식물 생산	만 구												
	자구 생산													
	종구 생산													
	개화구 생산													
	종구증식	천 구												
	원균 종균 관리	건												
	종균 용기 개발													
	종균 배지 개발													
	종균배양 환경관리시스템													
	기능성평가													
	성분검정													
	성과관리시스템													
산업 경제 적 목표	수입 대 체 효 과	품명	%											
		국내종자매출 액	백만 원											
	종자수출액	만 불												
환경 적 목표	시장조사보고서	건												
	정책조사보고서													
	인력양성		0	1	0	3	0	2	0	2	0	10		



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 논문 게재

#### 1. 출판된 논문

- 1차년도에 과실의 저장성연구와 관련하여 ‘Mining secreted proteins that function in pepper fruit development and ripening via yeast secretion trap (YST)’란 제목으로 Biochemistry, Biophysics, Research Communication 저널(SCI 저널)에 출판하였음.
- 2차년도에 토마토의 황화잎말림바이러스, 역병, 반점위조병 저항성 분자표지 개발 내용으로 ‘Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against tomato yellow leaf curl virus, late blight and verticillium wilt’란 제목으로 Euphytica 저널(SCI 저널)에 출판하였음.
- 3차년도에 본 연구과제의 주제인 청고병과 궤양병 관련하여 ‘Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops’ 제목의 리뷰 논문 1편을 Theoretical and Applied Genetics 저널(SCI 저널)에 출판하였음.
- 3차년도에 본 연구과제에서 개발된 토마토 반점위조바이러스에 대한 저항성 검정용 SNP 마커의 경우 ‘Development of a single-nucleotide polymorphism marker for the *Sw-5b* gene conferring disease resistance to *Tomato spotted wilt virus* in tomato’란 제목으로 원예과학기술지 저널(SCIE 저널)에 출판하였음.
- 3차년도에 토마토의 저항성 분자표지 개발 내용으로 ‘Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs’란 제목으로 Plant Breeding and Biotechnology 저널(SCIE 저널)에 출판하였음.
- 4차년도에 본 연구과제에서 궤양병 검정용으로 사용된 균주의 재분류에 관련된 ‘*Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov, causing bacterial canker disease in pepper’란 제목의 논문을 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 저널(SCI 저널)에 출판하였음.
- 4차년도에 토마토의 병저항성과 관련된 ‘Ser<sup>360</sup> and Ser<sup>364</sup> in the kinase domain of tomato SIMAPKKKa are critical for programmed cell death associated with plant immunity’라 제목의 논문을 Plant Pathology Journal(SCIE 저널)에 출판하였음.
- 4차년도에 바이러스 저항성 분자표지 내용으로 ‘Current advances and prospectus of viral resistance in horticultural crops’란 제목으로 Horticulture, Environment, and Biotechnology 저널(SCIE 저널)에 출판하였음.

## 2. 출판 준비 중인 논문

- 본 연구 과정에서 잎곰팡이병 저항성 유전자인 *Cf-9*에 관련하여 “Combination of newly developed SNP and InDel markers to genotype *Cf-9/Cf-4* loci conferring disease resistance to leaf mold disease in tomato”란 제목으로 Molecular Breeding 저널(SCI 저널)에 논문이 투고되어 현재 revision중에 있음.
- 본 연구에 사용된 청고병 저항성 품종 6개의 Genome resequencing을 통한 SNPs/InDels 결과는 현재 논문을 작성 중에 있으며, 향후에 적절한 저널에 투고할 계획임.
- 카로티노이드 분석을 위한 HPLC 방법 및 과색 마커 개발 결과는 현재 논문 완성 중에 있으며 2017년 출판 목표를 계획중임.
- 과색판별 분자표지는 본 과제의 2단계 사업에서 육종회사들에게 지속적으로 기술 이전을 계획 중임.
- TYLCV 저항성 유전자들인 Ty1/3, Ty2, Ty4, ty5 각각에 대한 분자표지 개발 내용과 이들 저항성 집적에 따른 저항성 범위 및 정도 증가 효과 분석결과를 종합하여 2017년도 출판을 목표로 적절한 저널에 투고할 계획임.

## 제 2 절 특허출원 및 등록

구 분	지식재산권 등 명칭	국 명	출원			등 록		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
발명특허	흑토마토 선별용 프라이머 세트, 흑토마토 선별방법, 및 흑토마토 선별키트	대한민국	경북대학교 산학협력단	2014.03.25	10-2014-0034743			
발명특허	흑토마토 선별용 프라이머 세트, 흑토마토 선별방법, 및 흑토마토 선별키트	대한민국	경북대학교 산학협력단	2014.03.25	10-2014-0034739			
발명특허	토마토에서 잎곰팡이병 저항성 판별 SNP 분자마커	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.02.27	10-2015-0028394			
발명특허	토마토에서 반신위조병(TSWV) 병저항성 판별 SNP 분자마커	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.02.27	10-2015-0028370			
발명특허	핑크토마토 선별용 프라이머 세트, 핑크토마토 선별방법, 및 핑크토마토 선별키트	대한민국	경북대학교 산학협력단	2015.03.06	10-2015-0031566			
발명등록	흑토마토 선별용 프라이머 세트, 흑토마토 선별방법, 및 흑토마토 선별키트	대한민국				경북대학교 산학협력단	2015.7.28	10-1541331
발명등록	흑토마토 선별용 프라이머 세트, 흑토마토 선별방법, 및 흑토마토 선별키트	대한민국				경북대학교 산학협력단	2015.7.28	10-1541502
발명등록	핑크토마토 선별용 프라이머 세트, 핑크토마토 선별방법, 및 핑크토마토 선별키트	대한민국				경북대학교 산학협력단	2016.12.28	10-1692612

(계속)

구분	지식재산권 등 명칭	국명	출원			등록		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
발명특허	황화잎말림병 저항성 토마토 판단용 프라이머 세트, 황화잎말림병 저항성 토마토 판단방법, 및 황화잎말림병 저항성 토마토 판단키트	대한민국	안동대학교	2014.03.24	10-2014-0034067			
발명특허	반신위조병 내병성 토마토 판단용 프라이머 세트, 그를 이용한 반신위조병 내병성 토마토 판단방법, 및 그를 이용한 반신위조병 내병성 토마토 판단키트	대한민국	안동대학교	2014.03.24	10-2014-0034066			
발명특허	잎마름역병 저항성 토마토 판단용 프라이머 세트, 잎마름역병 저항성 토마토 판단방법, 및 잎마름역병 저항성 토마토 판단키트	대한민국	안동대학교	2015.02.11	10-2015-0021140			
발명특허	잎마름역병 이병성 토마토 선별 방법	대한민국	안동대학교	2015.03.09	10-2015-0032556			
발명특허	황화잎말림병 저항성 토마토 판단용 프라이머 세트, 황화잎말림병 저항성 토마토 판단방법, 및 황화잎말림병 저항성 토마토 판단키트	대한민국	안동대학교	2015.05.27	10-2015-0074481			
발명특허	토마토황화잎말림병바이러스 저항성 토마토 선별방법	대한민국	안동대학교	2015.12.31	10-2015-0191365			
발명특허	황화잎말림병 저항성 토마토 판단용 프라이머 세트, 황화잎말림병 저항성 토마토 판단방법, 및 황화잎말림병 저항성 토마토 판단키트	대한민국				안동대학교	2016.03.14	10-1604831
발명특허	반신위조병 내병성 토마토 판단용 프라이머 세트, 그를 이용한 반신위조병 내병성 토마토 판단방법, 및 그를 이용한 반신위조병 내병성 토마토 판단키트	대한민국				안동대학교	2016.03.14	10-1604832

### 제 3 절 실용화 계획 (기술실시 포함)

- 본 과제에서 개발된 토마토 반점위조바이러스 저항성 품종 판별 SNP 마커와 토마토 잎곰팡이병 저항성 품종 판별 SNP 마커를 ‘농업기술실용화재단’에 유상으로 기술이전을 하였음.
- 본 과제에서 개발된 토마토 황화잎말림바이러스 저항성 품종 판별 CAPS 마커와 토마토 잎마름역병 저항성 품종 판별 SNP 마커를 ‘농업기술실용화재단’에 유상으로 기술이전을 하였음.
- 본 과제에서 개발된 토마토 황화잎말림바이러스 저항성 품종 판별 CAPS 마커와 토마토 잎마름역병 저항성 품종 판별 SNP 마커를 무상으로 ‘(주)농우바이오’, (주) 동부팜한농에 기술이전하여 병저항성 검정에 사용할 수 있도록 실용화함.
- 본 과제의 과색 판별 분자마커의 경우 무상으로 ‘(주)농우바이오’에 기술이전하여 과색 판별에 사용할 수 있도록 실용화함.
- 본 과제에서 개발된 SNP 마커들의 경우 일반 마커검정 전문 회사에도 기술이전을 추진하고 있음.

### 제 4 절 향후 연구과제 발굴

- 본 연구과제의 주요 연구주제인 토마토황화잎말림바이러스와 토마토 궤양병 저항성관련 연구결과의 경우 GSP 2단계 연구사업 신청 및 선정에 선행결과로 사용되어 ‘토마토 내병성 분자표지 개발 및 MAB 이용기술 고도화’ 프로젝트내의 ‘토마토 세균 및 바이러스병 저항성분자표지 개발(책임: 경북대학교 이제민 교수)’ 과제 수주에 활용됨.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Andolfo et al. (2014)은 cDNA Renseq을 통해서 밝혀진 토마토 병 저항성에 관련된 NB-LRR 유전자들의 대한 정보를 얻을 수 있었음.
- Danesh et al. (1994)은 토마토에서 청고병 저항성에 관여할 것으로 추정되는 염색체 12번에서 RFLP/CAPS, co-dominant 분자표지인 TG230에 대한 염기서열정보를 제공함.
- Ewert et al. (2010)은 Hawaii7996의 염색체 6번과 12번에서 토마토 청고병 저항성에 관련되었을 것으로 추정되는 QTL에 유전자유입이 발생되었을 것으로 추정하며, 청고병 저항성에 연관되어 있을 것으로 예상하는 위치를 PCR로 확일 할 수 있는 Primers 정보를 제공함.
- Foolad M. R. and Panthee D. R. (2014)은 현재 이슈화되고 있는 토마토병에 대한 개략적인 정보들과 토마토 내병성 유전 형질에 연관된 개발된 기존 분자마커에 대한 전반적인 정보를 제공함.
- Geethanjali et al. (2010)은 청고병저항성에 효과적으로 관여할 것으로 추정되는 염색체 12번에서 개발된 SSR 마커인 SLM12-10, SLM12-2를 개발하였음.
- Hendrick C. A. and Sequeira L. (1984)은 *Ralstonia solanacearum* 에 대해서 병검정에 대한 정보를 획득 할 수 있었고, 균배양시 CPG배지를 이용한다는 정보를 얻을 수 있었음.
- Kang H.-G. et al. (2010)은 AvrPto와 AvrPtoB<sub>1-387</sub>에서 hypersensitive response가 일어나기 위해서는 CRT1이 중요한 요소임을 밝혀낸 논문으로써, 본 연구에서 개발한 SNP와 InDel 마커들의 Genotyping결과를 확인하기위해 실행한 *A. tumefaciens*-mediated transient assay에 대한 전반적인 정보를 제공함.
- Kelman A. (1954)은 청고병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*이 병징을 일으켰을 때, 0: 무병징부터 5:고사까지 disease range를 측정하는 방법에 대해 서술하였으며, 후에 병검정시 연구에 적용할 수 있었음.
- Khan N. et al. (2012)은 토마토 종자증식시에 처리방법에 대한 정보를 제공하였으며, 조건에 맞게 수정하여 적용할 수 있음.
- Miao et al. (2009)은 청고병 저항성에 관련된 2개의 AFLP마커를 개발하였으며, SCAR마커로의 전환에 대한 연구를 진행함. 이에 마커들의 염기서열에 대한 정보를 얻을 수 있었음.
- Murray M. and Thompson W. F. (1980)은 식물에서 genomicDNA 추출하는 방법에 대한 연구로써, 본 연구에서 토마토잎에서 genomicDNA를 추출하는데 정보를 제공하였음.
- Oh C-S, Martin G. B. (2011)에서는 *A. tumefaciens*-mediated transient assay진행시 positive control이었던 Pto/AvrPto에 대한 정보를 얻을 수 있었음.
- Oh E. J. et al. (2016)은 고추재양 유발 균주의 분석을 진행한 연구로 기존에 밝혀진 *Cm* subsp. *capsici* type strain PF008이 biochemical, physiologica 그리고 genetic characteristics 방법으로 새로운 *Cm* subsp. *capsici* 로 규명한 연구임.

- Parniske et al. (1997)에서는 잎곰팡이병 저항성에 관련된 *Cf* genes에 대한 연구로 intergenic region들 사이에서의 염기서열의 exchange가 발생하며, 이는 sequence diversity을 유발함을 보여줌.
- Sen Y. et al. (2015)은 토마토 껍질병에 대한 발견, 방제법 그리고 저항성과 상호작용에 대한 전반적인 연구를 진행함.
- Shi A. et al. (2011)은 *Sw-5*유전자에 대해서 기존에 개발된 SNP마커에 대한 정보를 제공하였으나, 본 연구에서 개발한 *Sw-5b*유전자 SNP마커가 기존마커의 한계점을 밝혀냄.
- Truong et al. (2011)은 토마토 잎곰팡이병 저항성 유전자인 *Cf-9*에 대한 유전자 기반 분자마커를 개발하였으며, 기존에 개발된 dominant 분자표지를 보완한 co-dominant 분자마커들에 대한 정보를 수집하였음.
- Wang et al. (2000)은 청고병 저항성에 관여할 것으로 추정되는 염색체 12번에서 RFLP/CAPS, co-dominant 분자표지인 TG564를 밝혀냈으며 이에 대한 염기서열정보를 제공함.
- Adato et al. (2009)는 map-based cloning을 통해 토마토 peel의 주색소인 nalingenin chalcone의 생합성을 조절하는 SIMYB12유전자를 동정함. 이 유전자는 핑크토마토 과색을 판별하는 분자표지의 염기서열 정보의 기초가 됨.
- Barry et al. (2008)은 토마토 과실이 익어도 엽록소가 분해되지 않는 green flesh 를 결정하는 유전자를 동정함. 이 유전자는 흑토마토 과색을 판별하는 분자표지의 염기서열 정보의 기초가 됨.
- Ronen et al.(2000)은 베타카로틴 합성유전자인 lycopene b-cyclase가 과다발현되는 야생유전자원을 통해 베타케로틴 고함유 유전자원을 발굴하고 이 유전자의 기능을 동정함. 이 유전자 정보는 오렌지 과색 판별 분자표지 중 하나로 사용됨.
- Perez et al. (2013)은 가지과작물에서의 저항성 유전자들과 포티바이러스의 병원성 인자간의 상호작용을 연구함으로써 저항성 기작을 밝히는데 기여함.
- Verlaan et al. (2013)은 map-based cloning을 통해 TYLCV 저항성 유전자좌인 *Ty1* 이 DFDGD-class RNAdependent RNA polymerase임을 동정하고 또 다른 저항성 유전자좌인 *Ty3* 와 allelic하다는 것을 밝힘. 이 유전자는 현재까지 TYLCV 저항성 판별에 가장 중요한 분자표지 개발의 기초가 됨.
- Butterbach et al. (2014)는 TYLCV 저항성 유전자 *Ty1* 이 TYLCV의 viral DNA의 cytosine methylation에 관여한다는 사실을 밝혀냄.
- Yang et al. (2014)은 유전자 정밀지도작성을 통해 TYLCV 저항성 유전자좌인 *Ty2* 가 염색체 11번 지역의 300 kb 후보 지역을 동정하였음. 이 지역의 후보유전자들 정보는 *Ty2* 저항성 판별 분자표지 개발의 기초가 됨.
- Ji et al. (2009)은 유전자 지도작성을 통해 TYLCV 저항성 유전자좌인 *Ty4* 가 염색체 3번

지역의 2.4 cM 지역을 동정함. Ty4 저항성 연관 분자표지 개발의 기초가 됨.

- Lapidot et al. (2015)은 map-based cloning을 통해 염색체 4번에 위치하는 TYLCV 저항성 유전자좌인 *ty-5*가 messenger RNA surveillance factor Pelota로 동정됨. 이 저항성 유전자는 *ty-5* 판별 분자표지 개발에 염기서열 정보로 사용됨.
- Fradin et al. (2009)는 토마토 반신위조병 저항성 Ve1 유전자의 저항성 기작을 분석하였으며, 해당내용은 Kawchuk et al. (2001) 의 정보와 함께 본 과제에서 Ve1 저항성에 대한 유전자 기반 분자표지 작성의 기초가 됨.
- Zhang et al., (2014)는 토마토 잎마름역병 저항성 유전자인 Ph3 유전자를 동정하여 역병 저항성 유전자를 기능적으로 분석하였고, 해당 정보는 본 과제에서 Ph3 저항성에 대한 유전자기반 분자표지 작성의 기초가 됨.



## 제 7 장 참고문헌

- Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Domínguez E, Wang Z, De Vos RC, Jetter R, Schreiber L, Heredia A, Rogachev I, Aharoni A (2009) Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genet.* 5:e1000777
- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M, Levin I (2009) Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor Appl Genet* 119:519-530
- Andolfo G., F. Jupe, K. Witek, G. J. Etherington, M. R. Ercolano, J. D. Jones (2014) Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. *BMC Plant Biology* 14:120
- Barry CS, McQuinn RP, Chung MY, Besuden A, Giovannoni JJ (2008) Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiol* 147:179-187
- Butterbach P, Verlaan MG, Dulleman A, Lohuis D, Visser RG, Bai Y, Kormelink R (2014) Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:12942-12947
- Danesh D, Aarons S, McGill GE and Young ND (2014) Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 7:464-471
- Ewert E, Maxwell DP (2010) Identifying and locating length and position of introgression on chromosome 6 influencing resistance to bacterial wilt and identifying markers for bacterial wilt resistance on chromosome 12. Thesis
- Foolad MR, Panthee DR (2014) Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant science* 31: 93-123
- Fradin EF, Zhang Z, Ayala JCJ, Castroverde CDM, Nazar RN, Robb J, Liu C, Thomma BPHJ (2009) Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiol* 150: 320-332
- Geethanjali S, Chen KT, Pastrana DV and Wang JF (2010) Development and characterization of tomato SSR markers from genomic sequences of anchored BAC clones on chromosome 6. *Euphytica* 173:85-97
- Hendrick CA, Sequeira L (1984) Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Am Soc Microbiol* 48(1):94-101
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ (2009) Toward Fine Mapping of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene Ty-2 on Chromosome 11 of Tomato. *HortScience* 44: 614 - 618
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ, Maxwell DP (2009) Molecular mapping of Ty-4, a new Tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *J Amer Soc Hort Sci* 134:281-288

- Jung J, Kim HJ, Lee JM, Oh CS, Lee HJ, Yeam I (2015) Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against tomato yellow leaf curl virus, late blight, and verticillium wilt. *Euphytica* 205: 599-513
- Kang H-G, C-S Oh, M Sato, F Katagiri, J Glazebrook, H Takahashi, P Kachroo, GB Martin, DF Klessig (2010) Endosome-associated CRT1 functions early in resistance gene-mediated defense signaling in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22:918-936
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, Fischer R, Pruffer D (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *PNAS* 98: 6511-6515
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-95
- Khan N, RH Kazmi, LA Willems, AWV Heusden, W Ligterink, HWM Hilhorst (2012) Exploring the natural variation for seedling traits and their link with seed dimensions in tomato. *PLoS ONE* 7(8):e43991
- Kuklev MY, Fesenko IA, Karlov GI (2009) Development of a CAPS marker for the Verticillium wilt resistance in tomatoes. *Russian J Genet* 45: 575 - 579
- Lapidot M, Karniel U, Gelbart D, Fogel D, Evenor D, Kutsher Y, Makhbash Z, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Reuveni M, Levin I (2015) A novel route controlling Begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota. *PLoS Genet* 11: e1005538
- Li J, Liu L, Bai Y, Finkers R, Wang F, Du Y, Yang Y, Xie B, Visser RGF, van Heusden AW (2011) Identification and mapping of quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in *Solanum habrochaites* LA1777. *Euphytica* 179: 427-437
- Miao L, S Shou, J Cai, F Jiang, Z Zhu, H Li (2009) Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Mol Biol Rep* 36:479-486
- Moreau P, Thoquet P, Olivier J, Laterrot H, Grimsley N (1998) Genetic mapping of Ph-2, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 259 - 269
- Murray M and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res* 8:4321-4326
- Oh C-S, Martin GB (2011) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci* 16:132-140
- Oh EJ, C Bae, HB Lee, IS Hwang, HI Lee, MC Yea, KO Yim, S Lee, S Heu, JS Cha, C-S Oh (2016) *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:4065-4070
- Parniske M, KE Hammond-Kosack, C Golstein, CM Thomas, DA Jones, K Harrison, BB Wulff and JD Jones (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. *Cell* 91:821-832
- Perez K, Yeam I, Kang BC, Ripoll DR, Kim J, Murphy JF, Jahn MM (2013) Tobacco etch virus Infectivity in *Capsicum* spp. Is Determined by a Maximum of Three Amino Acids in the Viral Virulence Determinant VPg. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1562-1573
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000) An alternative pathway to beta

- carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 7:11102–11107
- Sen Y, VDJ Wolf, RG Visser, VS Heusden (2015) Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Disease* 99:4–13
  - Shi A., R. Vierling, R. Grazzini, P. Chen, H. Caton, and D. Panthee (2011) Identification of molecular markers for *Sw-5* gene of tomato spotted wilt virus resistance. *Am J Biotechnol Mol Sci* 1:8–16
  - Smart CD, Tanksley SD, Mayton H, Fry WE (2007) Resistance to *Phytophthora infestans* in *Lycopersicon pennellii*. *Plant Dis* 91: 1045 - 1049
  - Truong H. T. H, H. Choi, M. C. Cho, H. E. Lee, and J. H. Kim (2011) Use of *Cf-9* gene-based markers in marker-assisted selection to screen tomato cultivars with resistance to *Cladosporium fulvum*. *Hortic Environ Biotechnol* 52:204–210
  - Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW, Edwards JD, Bai Y (2013) The Tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genet* 9:e1003399
  - Wang J-F, J Olivier, P Thoquet, B Mangin, L Sauviac, NH 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
  - Yang X, Caro M, Hutton SF, Scott JW, Guo Y, Wang X, Rashid MH, Szinay D, de Jong H, Visser RG, Bai Y, Du Y (2014) Fine mapping of the Tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-2 on chromosome 11 of tomato. *Mol. Breed.* 34:749–760
  - Zhang C, Liu L, Zheng Z, Sun Y, Zhou L, Yang Y, Cheng F, Zhang Z, Wang X, Huang S, Xie B, Du Y, Bai Y, Li J (2013) Fine mapping of the Ph-3 gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato. *Theor Appl Genet* 126: 2643–2653
  - Zhang C, Liu L, Wang X, Vossen J, Li G, Li T, Zheng Z, Gao J, Guo Y, Visser RG, Li J, Bai Y, Du Y (2014) The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. *Theor Appl Genet* 127:1353–1364

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 GSP 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 GSP 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.