Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29(4):345-351, 2011

제초제 저항성 유전자와 기존 병 저항성 유전자가 연관된 형질전환 토마토 개체 선발 및 후대분석

안순영[1] · 강권규[2] · 윤해근[1*] · 박효근[3]

[1]영남대학교 원예생명과학과, [2]국립한경대학교 원예학과, [3](주)동부한농

Progeny Analysis and Selection of Tomato Transformants with *pat*II Gene linked to Inherent Disease Resistance Gene

Soon-Young Ahn[1], Kwon Kyoo Kang[2], Hae Keun Yun[1*], and Hyo Guen Park[3]

[1]Department of Horticultural Science, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea
[2]Department of Horticulture, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea
[3]Dongbu Hannong Co., Ltd, Ansung 456-933, Korea

Abstract. This study was carried out to develop a model system using selection method for disease resistant plant breeding programs using a herbicide bialaphos-resistant *pat*II gene as a gene-based marker. Spraying bialaphos could eliminate the susceptible plants from the segregating populations such as F_2's and thereafter. Tomato cv. Momotaro-yoke was transformed with *pat*II gene 60 independent transformants were acquired. Total 42 transformants were analyzed in transgene copy numbers by Southern blotting and the segregation ratios for the bialaphos resistance. Statistical analysis revealed that the transgene copy numbers and the segregation ratios were not always coincided, especially having the tendency of underestimating the real numbers of the transgenes in the multicopy lines. A two-stepwise screening method was applied to select T_1 tomato plants which linked the transgenic *pat*II to a disease resistance gene (*I2* and *Ve*). Based on the resistant to susceptible ratios, T-20 plant was finally selected due to the estimated linkage 12-13 cM between the *pat*II gene to the *I2* gene on chromosome 11. This newly developed system could be applied to any economical crop in breeding programs.

***Additional key words*:** fungal inoculation, segregation, two-stepwise screening method

서 언

원예작물의 육종은 여러 단계로 이루어져 있는데, 그 중에서 특히 선발과정은 가장 어렵고 중요한 단계로 시간이 많이 소요되며 육종 프로그램의 성패는 선발효율에 의해 좌우될 수 있다. 내병성 육종 과정에서 대부분의 종묘회사나 실험실에서 관행적으로 이용되는 선발방법은 분리세대에서 수많은 개체에 병원균을 인위적으로 살포하거나 그 접종 대상이 과실인 경우에는 모든 개체를 대상으로 인위적인 접종을 실시(Yoon et al., 2004) 한 후에 병 발생 여부를 개체마다 확인하여 저항성 개체를 선발하는 것이다. 이러한 경우, 대규모 포장, 막대한 시간, 노동력이 소요되고 숙련된 기술이 필요하며, 병 저항성 여부의 판정은 접종원 농도, 접종 방법, 접종 후 온도 및 습도(Atibalentja and Eastburn, 1997; Jung et al., 2008; Steventon et al., 2002; Yoon and Park, 2001) 등이나 자연 환경(du Toit and Pataky, 1999)등에 의해 영향을 받기 쉬우며, 유전적으로는 이병성인 개체를 저항성인 개체로 잘못 판정할 가능성(escape)도 큰 편이다. 지금까지 작물 육종 과정에서 이러한 escape을 줄이고 선발 효율을 높이기 위해 많은 분자표지들이 개발(Lee et al., 2008; Shin et al., 2006; Yu et al., 2000) 되었으며 이를 이용하려는 노력이 꾸준히 진행되어 왔으나, 대부분은 실제 육종현장에서 사용하기에는 여전히 많은 비용이 소요되고 사용이 불편하다. 제초제 저항성이라는 특성을 이용하여 분리세대에서 병 저항

***Corresponding author:** haekeun@ynu.ac.kr

※ Received 7 April 2011; Accepted 9 May 2011. 본 연구는 농림수산식품기술기획평가원에 의해 수행되었습니다.

성인 개체를 선발할 수 있는 방법을 개발하는 것은 상업 육종가들이 대면적의 분리세대를 다루는 실제 육종현장에서 저렴한 비용으로 간편하게 사용할 수 있다는 장점을 제공한다.

따라서, 본 연구에서는 원예작물의 내병성 육종 프로그램 과정인 선발단계의 분리세대에서 활용할 수 있는 선발방법의 모델 시스템을 개발하고자 하였으며, 이를 위하여 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환 토마토의 후대분석과 two-stepwise screening을 실시하여 제초제 저항성 유전자와 기존 병 저항성 유전자가 가깝게 연관된 개체를 선발하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 후대분석

7 종류의 병(위조병 race 1과 2, 근부위조병, 반신위조병, 선충, 잎곰팡이병, 반점병, TMV)에 대해 저항성이 있는 토마토(cv. 모모따로 요크)에 제초제 저항성 유전자를 도입하여 얻어진 형질전환체(T_0 = F_1 세대)의 종자를 받아 후대분석을 실시하였다. 총 60여 개의 형질전환체 중에서 종자가 확보된 42개체의 종자 80-200여 개를 50공 육묘상에 파종하고, 발아 4주 후에 0.3%의 glufosinate ammonium 용액을 살포하였다. 제초제 처리 5일 후에 제초제에 대한 분리비를 분석하였다.

토마토 형질전환체의 Southern blot 분석

Genomic DNA는 Murray and Thompson(1980)의 방법을 수정하여 추출하였다. DNA 20μg을 제한효소 *Eco*RV로 절단하여 1% agarose gel에서 확인하고 capillary transfer 방법(Sambrook and Russell, 1989)에 따라 nylon membrane으로 전이하였다. Membrane은 prehybridization한 다음 [α-^{32}P]로 표지한 *pat*II DNA를 첨가하여 다시 혼성화 반응을 수행하고 세척한 후 X-ray 필름에 노출하여 밴드를 분석하였다.

Two-stepwise screening 방법

후대 분리세대에서 기존 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 가깝게 연관된 개체를 찾기 위해서 two-stepwise screening 방법을 실시하였다. 형질전환체(T_0) 중에서 제초제 저항성 유전자가 single copy로 삽입된 개체의 종자 200여 개를 50공 육묘상에 파종하고, 3-5매의 본엽이 출현하였을 때 실험에 이용하였다. 분리세대(T_1 = F_2 세대)에 0.3%의 glufosinate ammonium을 살포하고 5일 후에 제초제에 대한 저항성과 감수성을 확인하였다. 제초제에 대하여 저항성을 나타낸 개체에 대해서는 다시 위조병과 반신위조병을 각각 접종하고, 두 가지 병에 대한 분리비를 작성하여 대략적인 연관 정도를 추정하였다.

균주는 세미니스-코리아 종묘회사에서 분양 받은 위조병균(*Fusarium oxysporum lycopersici*) race 2와 반신위조병균(*Verticillium dahlia*) race 1을 접종에 사용하였다. 접종은 문구용 칼을 이용하여 유묘의 뿌리 부분에 상처를 주고 현탁액을 관부에 6mL씩 접종하였고, 접종 농도는 10^5conidia·mL^{-1} 이었으며, 병 저항성 판별은 4-5주 후에 실시하였다.

결과 및 고찰

토마토 형질전환체의 도입 유전자 수 분석 및 제초제 저항성 유전자의 후대분석

제초제 저항성 유전자의 도입 유전자 수를 확인하기 위하여 총 60여 개의 토마토 형질전환체 중에서 T_1 종자가 확보된 42개체에 대하여 genomic DNA를 추출하고 *pat*II DNA 단편을 탐침으로 하여 Southern blot을 실시하였다(Figs. 1 and 2).

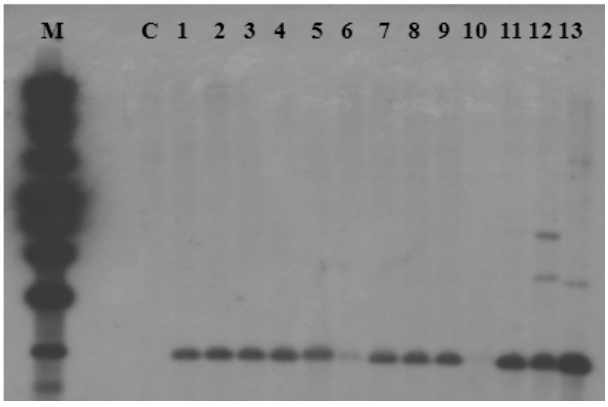

Fig. 1. Southern analysis for the *pat*II gene in independent transgenic lines of tomato cv. Momotaro-yoke. M, 1 kb DNA ladder; C, non-transformed control; No. 1-13, DNA samples from T_0 transformed plants.

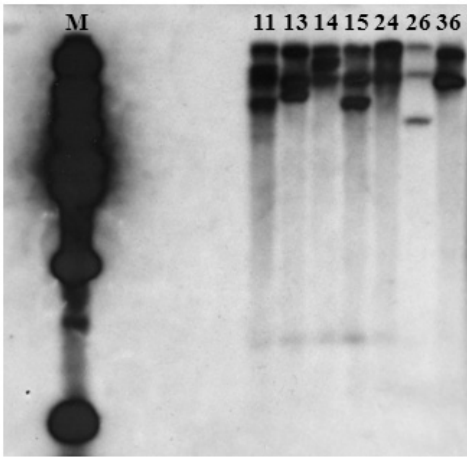

Fig. 2. Southern blot for the analysis of integration sites in transgenic tomato cv. Momotaro-yoke. M, 1 kb DNA ladder; No. 11, 13, 14, 15, 24, 26, and 36, DNA samples from T_0 transformed plants.

대조구에서는 band가 확인되지 않았으며(Fig. 1) Southern 분석을 실시한 42개체 중 36개체에서 band가 검출되어 *pat*II 유전자가 토마토 형질전환체 genomic DNA내로 도입되었음을 확인하였다. Southern 분석에 따른 band의 intensity는 개체마다 차이가 있었고 강한 signal을 보이는 band는 1copy 이상일 것으로 생각되었다(Fig. 2). Vain et al.(2003)과 Viss et

Table 1. Segregation ratios of self-pollinated T_1 generation tomato plants transformed with the *pat*II gene.

T_1 No.	Copy No.	Total No.	Observed No.[z]		Expected ratio	*P* value
			$Herb^R$	$Herb^S$		
T-1	2	190	178	12	15:1	0.970
T-2	2	160	120	40	3:1	1.000
T-3	2	158	116	42	3:1	0.646
T-4	1	79	58	21	3:1	0.745
T-5	5	173	163	10	15:1	0.798
T-6	2	100	82	18	3:1	0.105
T-7	1	100	74	26	3:1	0.817
T-8	1	100	77	23	3:1	0.644
T-9	-	99	73	26	3:1	0.771
T-10	1	91	68	23	3:1	0.951
T-11	4	148	138	10	15:1	0.798
T-13	3	98	68	22	3:1	0.903
T-14	3	100	81	19	3:1	0.615
T-15	3	99	77	22	3:1	0.523
T-16	-	96	69	27	3:1	0.479
T-17	4	175	162	13	15:1	0.519
T-18	-	133	95	38	3:1	0.341
T-19	1	100	70	30	3:1	0.248
T-20	1	199	155	44	3:1	0.346
T-21	4	174	165	9	15:1	0.557
T-22	1	200	148	52	3:1	0.743
T-24	2	100	92	8	15:1	0.469
T-25	1	200	151	49	3:1	0.870
T-26	3	100	70	30	3:1	0.248
T-32	3	100	76	24	3:1	0.817
T-34	4	90	90	0	63:1	0.231
T-35	4	100	100	0	63:1	0.207
T-36	2	100	77	23	3:1	0.644
T-37	1	95	82	13	-	-
T-39	1	95	79	16	3:1	0.394
T-41	2	98	89	9	15:1	0.230
T-42	-	98	79	19	3:1	0.199
T-44	-	100	79	21	3:1	0.355
T-46	2	100	74	26	3:1	0.817
T-47	3	99	77	22	3:1	0.523
T-52	2	100	81	19	3:1	0.165
T-53	-	100	65	35	3:1	0.057
T-54	4	100	100	0	63:1	0.207
T-55	2	100	73	27	3:1	0.644
T-56	3	99	98	1	63:1	0.657
T-58	1	100	0	100	-	-
T-59	1	86	67	19	3:1	0.533

[z]$Herb^R$, herbicide resistant; $Herb^S$, herbicide susceptible.

al.(2003)은 이러한 band 간의 intensity 차이는 삽입된 insert가 여러 개이거나 재배열되면서 생기는 현상에 의한 것으로 보고하였으며, 본 연구에서도 그와 같은 결과가 나온 것으로 생각된다.

Table 1은 Southern 분석에 따른 형질전환체의 제초제 저항성 유전자 copy 수 결과와 후대에서 제초제 저항성 유전자에 대한 표현형의 분리비를 나타낸 것이다. Southern 분석 결과에서 1copy의 유전자가 도입된 형질전환체는 33.3%(12개체), 2copy의 유전자가 도입된 것은 27.7%(10개체), 3copy의 유전자가 도입된 것은 19.4%(7개체), 4copy 이상의 *pat*II 유전자가 도입된 것은 총 19.4%(7개체)로 나타났다. T-DNA copy 수가 2개 이상이 도입된 경우에는 운반체의 backbone DNA가 삽입되는 경우가 더 많았는데(결과 미제시) 이는 Lim et al.(2008)과 Kuraya et al.(2004)의 보고와 일치하였다.

선발된 형질전환체 60개체에서 종자를 받아 T_1 종자가 확보된 42개체의 총 4,932 T_1 식물체에 대하여 제초제 저항성 유전자에 대한 표현형 분리비를 확인하였다(Table 1). Single copy가 도입된 대부분의 개체(10/12)는 멘델의 법칙에 따라 3:1로 분리되었으며, 2개 이상의 유전자가 도입된 경우에는 3:1, 15:1이나 63:1의 분리비를 나타내었다. Vain et al.(2003)은 Southern 분석에서 3개의 도입 유전자가 확인된 개체가 3:1로 분리되었으며, 이런 경향은 여러 개의 유전자가 도입된 경우 더 많이 나타난다고 보고하였는데, 본 실험에서도 이러한 multicopy line에서 대체적으로 도입된 유전자 수보다 더 적은 수의 유전자가 도입된 것처럼 보이는 경우가 많았다(Table 2).

벼의 경우에서도 multiloci인 개체의 후대가 발현되지 않는 것은 T_1 식물체에서 silencing이 일어난 것(James et al., 2002; Vain et al., 2002)이거나 이미 T_0 식물체에서 분리된 유전자좌가 발현되지 않는 것이며 또한 도입된 유전자의 수가 많은 것이 transgene의 발현을 향상시키지는 않는다(Vain et al., 2003)고 보고하였다. Spencer et al.(1992)과 Walters et al.(1992)도 transgene의 후대분리에서 이러한 distortion은 단순히 transgene만의 inactivation에 의한 것이 아니라 transgene들 간의 incorporation, 삽입위치가 배우자의 viability에 영향을 주는 경우, 도입 DNA가 불안정하게 integration되어 배우자 세대에서 transgene이 사라지는 등의 여러 요인들이 있다고 보고하였다.

이러한 보고들과 유사하게 본 실험에서도 도입된 유전자의 copy 수 분석을 위한 Southern 분석 결과와 후대에서 도입된 유전자의 표현형 분리비가 일치하지 않는 경우가 있었으며, 단순히 표현형의 분리비만으로 transgene의 유전양상을 판단할 수는 없을 것으로 생각된다.

Two-stepwise screening 방법을 이용한 연관개체 선발

토마토에 도입된 제초제 저항성 유전자와 기존 병 저항성 유전자가 가깝게 연관된 개체를 찾기 위하여 제초제 생물검정과 위조병 및 반신위조병에 대하여 two-stepwise screening을 실시하였다. 형질전환 개체 중에서 제초제 저항성 유전자가 1개 도입된 것이 확인된 개체들의 후대를 파종하고 0.3%의 glufosinate ammonium 용액을 살포하여 살아남은 개체에 대하여 위조병 및 반신위조병을 각각 접종한 후 살아남은 개체의 두 가지 병에 대한 분리비를 조사하였다.

양성잡종의 F_2(본 실험의 경우 T_1 세대) 분리세대에서 나타날 수 있는 표현형의 비는 Table 3에 나타내었는데, 두 가지 형질이 완전 연관인 경우(교차율 0%) 유전양상은 12:0:0:4 이며, 독립인 경우(교차율 50%) 9:3:3:1로 나타난다. 이를 토대로 교차율과 분리비를 확인하고 저항성/감수성(R/S) 비율을 계산할 수 있으며, two-stepwise 실험에 의한 결과를 적용하여 대략적인 연관 정도를 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 기존 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 10cM 정도 이내로 가깝게 연관이 되어야 실제 내병성 품종 육성

Table 2. Transgene expression in T_1 tomato plants[z] transformed with *pat*II gene.

Copy No. (*pat*II)	No. of plant lines studied	No. of T_1 plants analyzed	Segregation of transgene phenotype[y]		
			3:1 (1 locus suggested)	15:1 (2 loci suggested)	63:1 (3 loci suggested)
1	12	1,445		0	0
2	10	1,206	7	3	0
3	7	695	6	0	1
4	6	787	0	3	3
5	1	173	0	1	0
Nd[x]	6	626	6	0	0

[z]Observed segregation ratios were compared to Mendelian 3:1 or 15:1 ratios using Chi-square test ($P < 0.05$).
[y]Based on the expression of the *pat*II gene in T_1 plants.
[x]Not determined.

과정에서 분리되지 않고 활용할 수 있을 것으로 생각하였으며, 이러한 개체를 찾고자 하였다. 병 저항성 유전자를 R, 제초제 저항성 유전자를 H로 나타낼 때, T_0 (F_1)인 RrHh를 여교잡 하면 RH와 rh, 그리고 2개의 재조합형(recombinant, 100개 파종 시 10개 생김)인 Rh와 rH가 만들어진다. 여기에 제초제를 처리하면 Rh와 rh는 고사하게 되며 RH와 rH가 남게 되는데, rH는 병에는 이병성이지만 실제로는 선발이 된다. 이러한 개체를 escape 이라고 하는데, 10cM은 100개의 종자를 파종하여 실제 육종 시 생길 수 있는 오차, 즉 실제로는 이병성 개체이나 저항성 개체로 오인될 가능성의 범위를 100개체 중에서 5개체로 하여 결정한 것이다.

Table 4와 Table 5는 0.3% glufosinate ammonium 용액을

Table 3. Estimation of recombination rate according to phenotypic segregation ratio of F_2 progeny.

Crossing over (%)	Segregation ratio (coupling)[z]				
	RRHH	rrHH	RRhh	rrhh	R/r
0 (Complete linkage)	12.00	0.00	0.00	4.00	∞
10	11.24	0.76	0.76	3.24	14.78
11	11.16	0.83	0.83	3.16	13.44
12	11.10	0.90	0.90	3.10	12.33
13	11.03	0.97	0.97	3.03	11.37
14	10.95	1.04	1.04	2.95	10.52
15	10.89	1.11	1.11	2.89	9.81
20	10.56	1.44	1.44	2.56	7.33
30	9.96	2.04	2.04	1.96	4.88
40	9.44	2.56	2.56	1.44	3.68
50 (Independent assortment)	9.00	3.00	3.00	1.00	3.00

[z]R, disease resistant; H, herbicide resistant; r, disease susceptible; h, herbicide susceptible.

Table 4. Segregation ratios of bialaphos resistance and Fusarium wilt in the T_1 progenies of the transformed tomato.

T_0 No.	Copy No.	Herbicides resistance		F. wilt resistance (race 2)		R/S
		Total	R:S[z]	Total	R:S	
T-1	2	190	178:12	178	126:52	2.42
T-2	2	160	120:40	120	65:55	1.18
T-3	2	158	116:42	116	96:20	4.8
T-7	1	200	155:45	155	98:57	1.71
T-8	1	100	79:21	79	56:23	2.43
T-10	1	100	81:19	81	58:23	2.52
T-18	-	135	95:40	95	83:12	6.91
T-20	1	199	155:44	155	143:12	11.9
T-22	1	200	148:52	148	125:23	5.43

[z]Resistant:Susceptible.

Table 5. Segregation ratios of bialaphos resistance and Verticillium wilt in the T_1 progenies of the transformed tomato.

T_0 No.	Copy No.	Herbicides resistance		V. wilt resistance (race 1)		R/S
		Total	R:S[z]	Total	R:S	
T-1	2	107	102:6	101	55:46	1.19
T-2	2	166	130:36	1330	92:38	2.42
T-3	2	200	157:43	157	120:37	3.24
T-7	1	135	103:32	103	66:37	1.78
T-18	-	133	95:38	95	46:49	0.93
T-20	1	199	172:27	172	136:36	3.77
T-32	3	200	162:38	162	109:58	1.87

[z]Resistant:Susceptible.

처리한 후 살아남은 개체에 대해 각각 위조병과 반신위조병을 접종한 결과이다. 위조병을 접종한 결과(Table 4)에서 총 9개체 중 T-20이 최종 R/S의 비율이 11.2를 나타내었으며, 이를 Table 3에서 확인한 결과 교차율이 12-13% 사이로 나타난 것을 알 수 있었다. 이로써 T-20 개체는 11번 염색체에 존재하는 위조병 저항성 *I2* 유전자와 제초제 저항성 *pat*II 유전자가 대략 12-13cM 정도 연관된 개체인 것으로 확인되었다. 반신위조병을 접종한 경우에서는 가깝게 연관된 개체를 찾을 수가 없었다(Table 5).

본 연구에서 진행된 실험은 제초제 저항성 유전자를 형질전환 방법으로 병 저항성 유전자가 heterozygous한 상태로 있는 상용 품종으로 도입한 후에, T_1 이후 세대에서 삽입된 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 한 염색체상에 가까이 연관된 식물체를 찾고, 이를 이용하여 F_2 및 그 이후 분리 세대에서 단순히 제초제만을 살포한 후 살아남는 개체(내병성 유전자를 갖고 있는 개체)를 선발하는 것이다. 이러한 방법은 내병성 육종의 선발 시스템에 있어서 간편성, 경제성 및 효율성(유묘기에 검정 가능)을 획기적으로 높일 수 있으며 escape율도 최소화할 수 있다. 이와 같은 선발 시스템을 개발하기 위한 전제 조건으로는 single copy가 도입된 형질전환체를 많이 확보하는 것과 다수의 병 저항성 유전자를 가지고 있는 품종을 선택하는 것이다. 형질전환에 의한 외래 유전자의 도입은 무작위로 발생하므로 최대한 많이 single copy로 형질전환체를 만들고, 또한 여러 가지 병에 대해 검정방법이 개발되어 있는 경우(DNA marker 이용시 더 간편함)라면 원하는 연관개체를 찾을 수 있는 확률이 높아질 것으로 생각되며, 본 연구에서는 내병성 육종에 있어서 제초제 저항성 유전자를 이용한 간접 선발 시스템의 가능성을 제시하고자 하였다.

본 연구에서 개발된 시스템은 다른 유용 작물에서도 이용될 수 있으며, 내병성 육종 이외에도 품질, 숙기, 내도복성 등 다른 육종 program에도 응용할 수 있을 것으로 생각되며, 개발된 연관 개체는 종묘회사의 여러 계통들과 여교잡을 통해 육종 재료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

초 록

원예작물의 내병성 육종에 있어 F_2와 그 이후 분리 세대에서 유용하게 사용할 수 있는 선발방법의 모델 시스템을 개발하고자 하였다. 상용 토마토 품종인 '모모따로 요크'에 제초제 저항성 유전자를 도입한 후 획득된 형질전환체의 도입 유전자 수와 후대 분리비를 분석하고, 제초제 저항성 유전자와 기존 병 저항성 유전자가 연관된 개체를 선발하였다. 총 60개의 형질전환체 중에서 42개체에 Southern blot을 실시하여 도입 유전자 수를 확인하고, 제초제 저항성 유전자에 대한 분리비를 비교 분석하여 Southern 결과와 도입된 유전자의 표현형의 분리비가 일치하지 않으며 여러 개의 copy가 삽입된 대부분의 경우, 실제 도입된 copy 수보다 더 적은 copy 수를 가지는 것처럼 분리비를 나타내는 것을 알 수 있었다. 삽입된 제초제 저항성 유전자와 기존 병 저항성 유전자가 가깝게 연관된 개체를 찾기 위해 $T_1(F_2)$세대 개체에 대하여 two-stepwise screening 방법을 실시하여 위조병 저항성 *I2* 유전자(11번 염색체)와 제초제 저항성 *pat*II 유전자가 대략 12-13cM으로 가깝게 연관된 개체(T-20)를 선발하였다.

추가 주요어 : 병원균 접종, 분리세대, 2단계 선발 방법

인용문헌

Atibalentja, N. and D.M. Eastburn. 1997. Evaluation of inoculation methods for screening horseradish cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. Plant Dis. 81:356-362.

du Toit, L.J. and J.K. Pataky. 1999. Variation associated with silk channel inoculation for common smut of Sweet Corn. Plant Dis. 83:727-732.

James, V.A., C. Avart, B. Worland, J.W. Snape, and P. Vain. 2002. The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. Theor. Appl. Genet. 104:533-561.

Jung, S.M., H.K. Yun, K.B. Ma, G.C. Song, S.J. Park, and J.B. Kim. 2008. Influential factors for identifying levels of resistance and in vitro screening system against gray mold in grapevines. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 26:432-439.

Kuraya, Y., S. Ohta, M. Fukuda, Y. Hiei, N. Murai, K. Hamada, J. Ueki, H. Imaseki, and T. Komari. 2004. Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Breed. 14:309-320.

Lee, J.D., J.B. Yoon, and H.G. Park. 2008. A CAPS marker associated with the partial restoration of cytoplasmic male sterility in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Mol. Breeding 21:95-104.

Lim, S.H, S.H. Park, J.H. Kim, N.Y. Kim, S.Y. Won, S.M. Lee, K.S. Shin, H.J. Woo, D.H. Kim, and H.S. Cho. 2008. Analysis of junction between T-DNA and plant genome in insect resistance GM Chinese cabbage. K. J. Plant Biotech. 35:101-108.

Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 1989. Analysis of genomic DNA by southern hybridization. p. 9.31-9.46. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Shin, W.C., S.H. Baek, C.S. Seo, H.J. Kang, C.G. Kim, M.S. Shin, G.S. Lee, J.H. Harn, and H.S. Kim. 2006. Improvement

of selection efficiency for bacterial blight resistance using SNP marker in rice. J. Plant Biotechnol. 33:309-313.

Spencer, T.M., J.V. O'Brien, W.G. Start, T.R. Adams, W.J. Gordon-Kamm, and P.G. Lemaux. 1992. Segregation of transgenes in maize. Plant Mol. Biol. 18:201-210.

Steventon, L.A., I. Happstadius, P. Okori, and C. Dixelius. 2002. Development of a rapid technique for the evaluation of the response of *Brassica napus* to Verticillium wilt. Plant Dis. 86:854-858.

Vain, P., A.S. Afolabi, B. Worland, and J.W. Snape. 2003. Transgene behavior in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup. Theor. Appl. Genet. 107:210-217.

Vain, P., V.A. James, B. Worland, and J.W. Snape. 2002. Transgene behavior across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. Theor. Appl. Genet. 105:878-889.

Viss, W.J., J. Pitrak, J. Humann, M. Cook, J. Driver, and W. Ream. 2003. Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. Mol. Breed. 12:283-295.

Walters, D.A., C.S. Vetsch, D.E. Potts, and R.C. Lundquist. 1992. Transformation and inheritance of a *hygromycin phosphotransferase* gene in maize plants. Plant Mol. Biol. 18:189-200.

Yoon, J.B. and H.G. Park. 2001. Screening method for resistance to pepper fruit Anthracnose: Pathogen sporulation, inoculation methods related to inoculum concentrations and post-inoculation environment. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:365-482.

Yoon, J.B., D.C. Yang, W.P. Lee, S.Y. Ahn, and H.G. Park. 2004. Genetic resources resistant to anthracnose in the genus *capsicum*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 45:318-323.

Yu, K., S.J. Park, and V. Poysa. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: Efficiency and economics. Plant Breeding 119:411-415.