

# 토마토반점위조바이러스(TSWV) 저항성 토마토 유전자원 탐색

한정현<sup>1</sup> · 최학순<sup>2</sup> · 이준대<sup>1</sup> · 김재덕<sup>3</sup> · 이원필<sup>1</sup> · 최홍수<sup>3</sup> · 김정수<sup>3</sup> · 윤재복<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(주)고추와 육종 기업부설연구소, <sup>2</sup>국립원예특작과학원 채소과, <sup>3</sup>국립농업과학원 작물보호과

## Screening of *Tomato Spotted Wilt Virus* Resistance in Tomato Accessions

Jung-Heon Han<sup>1</sup>, Hak-Soon Choi<sup>2</sup>, Jundae Lee<sup>1</sup>, Jae-Deok Kim<sup>3</sup>, Won Phil Lee<sup>1</sup>,  
Hong-Soo Choi<sup>3</sup>, Jung-Soo Kim<sup>3</sup>, and Jae Bok Yoon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research & Development Unit, Pepper & Breeding Institute, Business Incubator, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-853, Korea

<sup>2</sup>Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 440-706, Korea

<sup>3</sup>Crop Protection Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

**Abstract.** A total of 94 tomato accessions were evaluated for the resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV) using a Sw5-2 SCAR marker and bioassay. PCR products of the marker were approximately 574 bp, 500 bp, and 462 bp, among which the longest was linked to TSWV resistance allele of Sw5-b. This allele was only found in three accessions (09-438, 10-318, and 10-321) in which some individuals showed apparent recovery or stem necrosis symptom to a tomato isolate of TSWV-pb1. Thirty-five individuals (one per each accession) which were non-infected by ELISA were selected for further observation. Among these, 26 individuals that did not show any symptom at 5 months after inoculation were confirmed for viral infection by RT-PCR. TSWV-specific PCR amplicon was weakly detected in all 26 individuals including ‘Eureta’, a commercial F<sub>1</sub> possessing the resistance allele of Sw5-b. The resistant genes in the selected individuals may play an important role for reducing the viral concentration in tissues of inoculated tomato plants and seems to be quantitatively controlled by several factors including Sw5-b gene.

**Additional key words:** bioassay, molecular marker, Sw5, *Tospovirus*

### 서 언

*Bunyaviridae*와 *Tospovirus* 속의 구형 바이러스인 토마토 반점위조바이러스(*Tomato spotted wilt virus*; TSWV)는 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)에 의해 주로 전파된다(Whitfield et al., 2005). 약제살포에 의한 매개충 방제는 TSWV 발생을 현저히 감소시킬 수 있으나(Kim et al., 2009) 넓은 지역에 적용하기에는 다소 어려움이 있고, 근원적으로 TSWV 피해를 줄이기 위해서는 TSWV 저항성 상용 품종 개발이 필요하다. 지금까지 알려진 토마토의 TSWV 저항성 유전자 가운데 Sw5는 여러 가지 TSWV 분리주뿐만

아니라 *Tomato chlorotic spot virus*, *Groundnut ringspot virus* 같은 다른 *Tospovirus*에도 저항성을 보이는 것으로 알려져 있다(Boiteux et al., 1993). Sw5는 TSWV에 저항성인 ‘Stevens’라는 상용토마토에서 동정된 유전자로 *Lycopersicon peruvianum*에서 유래하였는데(Stevens et al., 1992), 유전자 좌 내 최소 5개의 homolog 가운데 Sw5-b가 실제 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Spassova et al., 2001). Sw5-b는 토마토 염색체 9번에 위치하며 positional cloning법에 의해 분리 동정되었고(Bromonshenkel et al. 2000; Spassova et al., 2001), 유전자 염기서열에 기초한 분자표지도 개발되어 있다(Dianese et al., 2010; Garland et al., 2005). Sw5 저항

\*Corresponding author: yoonjb2@snu.ac.kr

※ Received 17 November 2011; Revised 14 December 2011; Accepted 29 December 2011. 본 연구는 농촌진흥청 농업 R&D 15대 어젠다사업(과제번호: PJ006952042011)과 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 식물분자육종사업단(과제번호: PJ008056012011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

성을 극복할 수 있는 TSWV가 보고되고 있지만(Aramburu and Mart, 2003; Roggero et al., 2002), Sw5가 있는 식물체는 없는 것에 비해 포장에서 훨씬 높은 저항성을 가지며 우성으로 유전하기 때문에 Sw5는 상업용 토마토 육성에 지속적으로 활용되고 있다(Gordillo et al., 2008). 국내에서는 1981년에 안양의 토마토 재배농가에서 TSWV가 처음 보고되었고 이후 다양한 작물에서 발생하였다(Cho et al., 2007, 2010; Choi et al., 2010). TSWV는 국내에서 문제가 될 수 있는 중요한 병원체로 인식되고 있지만 토마토의 TSWV 저항성 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 Sw5 분자표지와 생물검정법을 이용하여 국내 토마토 유전자원의 TSWV 저항성과 관련된 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 토마토자원

TSWV 저항성 연구를 위해 농촌진흥청 농업유전자원정보센터로부터 총 69종의 토마토 유전자원을 분양 받았다. TSWV에 저항성으로 알려진 사용품종('Eureka'와 'Savera')을 포함한 국내시판토마토 29종과 국외시판토마토 19종을 수집하여 실험재료로 이용하였다.

### 바이러스원 및 접종

TSWV-pb1을 *Nicotiana rustica*에 접종하고 다중 원형반점 또는 괴저를 동반하는 심한 모자이크 증상이 나타난 잎을 접종원으로 사용하였다(Han et al., 2011). 접종액은 감염 잎 1g에 1% sodium sulfite가 함유된 3mL의 0.2M 인산완충액(pH 7.4)을 첨가한 다음, 막자사발로 고르게 분쇄하고 두루마리 화장지 4겹으로 여과하여 준비하였다. 바이러스 접종을 위해 본엽이 1-2매 전개되고 있는 토마토 떡잎에 Carborundum (600mesh)을 고르게 흩어 뿌린 다음 유희용 붓에 여과액을 묻혀 잎 표면을 가볍게 문질러주고, 접종액은 접종 후 곧바로 수세하였다. 접종된 개체는 온도, 광, 암 조건이 각각 28°C(± 3°C), 16시간, 8시간으로 설정된 조직배양실에서 1달간 재배한 다음 유리온실로 옮겨 2달 동안 더 재배하였고, 예외적으로 상용 F<sub>1</sub> 품종은 접종 후 곧바로 유리온실에서 재배하였다.

### 생물 검정

농업유전자원정보센터에서 분양 받은 토마토 계통과 수집한 상용 F<sub>1</sub> 품종의 저항성은 2010년과 2011년에 각각 조사하였다. 토마토 계통의 저항성 평가를 위해 72공 육묘포트에 계통 당 5개체씩 파종하였고, 접종 후 20일 까지 바이

러스 감염 유무를 육안으로 판독하였다. 저항성 개체 선발 효율을 높이기 위해 이들 가운데 바이러스에 모두 또는 일부가 감염된 IT 100500, IT 100501, IT 100503, IT 100504, IT 100505, IT 100509, IT 032918, IT 032919, IT 032923, IT 032933, IT 032936, IT 032942, IT 032951, IT 033055, IT 033057, IT 200232, IT 201644, IT 201666, IT 207240, IT 211837, IT 211844, IT 213135 및 IT 213137을 제외한 46 종에 대해 저항성 검사를 추가로 실시하였다. 추가 실험에서는 보유한 종자 2립을 제외한 모든 종자를 40공 육묘포트에 파종하였고, 접종 후 선발된 개체는 2010년 8월말까지 노지에서 재배하고 RT-PCR을 이용해 바이러스 감염 유무를 최종적으로 확인하였다. 한편, 상용 토마토 48종의 저항성 정도는 2011년 4월부터 7월말까지 수행하였는데, 품종당 바이러스 감염이 의심되는 개체는 1-2개 선발하고 비닐화분(직경 15cm, 높이 10cm)에 이식한 다음 노지에 조건에서 재배하면서 바이러스 병징 발현과 감염 유무를 확인하였다.

### 바이러스 검정

접종한 개체의 TSWV 감염유무는 효소면역항체법(ELISA)과 RT-PCR법을 이용하여 판독하였다. ELISA의 경우, TSWV 용 상용 진단 키트(AC Diagnostics Inc., Fayetteville, USA)를 사용하여 Han et al.(2011)의 방법에 따라 수행하였고, 바이러스 감염 유무는 건전한 잎 시료의 흡광도 값보다 2배 이상을 높은 시료를 양성으로 판독하였다. RT-PCR의 경우 TSWV S 유전체(small RNA)의 2,479bp와 2,971bp 사이에 위치한 N(nucleocapsid protein) 유전자 일부를 증폭할 수 있는 forward primer(5'-GAGATTCTCAGAATTCCCAGT-3')와 reverse primer(5'-AGAGCAATCGTGTCAATTTTATTC-3')를 제작하였다. Easy-spin RNA extraction Kit(Intron Co., Korea)를 이용하여 100mg 시료로부터 식물체 전체 RNA를 분리하였는데, 50μL의 용출액에 녹인 최종 산물 가운데 1μL를 주형으로 사용하였다. RT(reverse transcription) 반응액은 RNA 주형 1μL, 5 × RT 버퍼 1μL(ProMega, USA), 2.5mM dNTP mixture 0.5μL(Promega Co., USA), 10pmole·μL<sup>-1</sup>의 Reverse 프라이머 0.5μL, 0.5 unit의 AMV reverse transcriptase (Promega Co., USA), 그리고 멸균된 삼차중류수로 총 5μL로 맞추었다. Reverse transcription은 MyCycler™ thermal cycler(BioRad Co., USA) 모델을 이용하여 42°C에서 30분간 RT 반응을 수행하였다. PCR 반응액은 RT 반응을 통해 얻은 cDNA를 포함하는 RT 반응액 5μL, 5 × PCR 버퍼 5μL (Promega Co., USA), 25mM MgCl<sub>2</sub> 2.5μL, 2.5mM dNTP mixture 0.5μL(Promega Co., USA), 1 unit Go Taq polymerase (Promega Co., USA), 10pmole·μL<sup>-1</sup> Forward 프라이머 0.5

μL, 그리고 멸균된 삼차증류수로 총 25μL 맞추었다. PCR 반응은 MyCycler™ thermal cycler(BioRad Co., USA) 모델을 이용하여 95°C에서 3분간 denaturation을 수행한 뒤, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 10분 동안 full extension 반응을 시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하고 EtBr로 염색하여 PCR 산물의 증폭여부를 관찰하였다.

### Sw5-2 유전형 분석

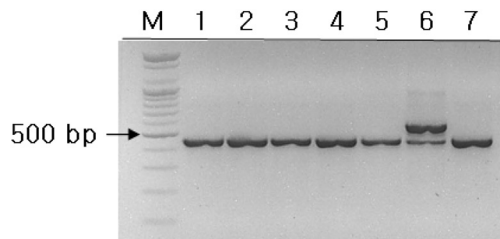
각 개체의 어린잎으로부터 genomic DNA 추출은 Prince et al.(1997)의 방법을 이용하였고, 추출된 DNA는 1.5% 아가로스젤에서 확인 후 10ng·μL<sup>-1</sup>농도로 맞추어 사용하였다.

Sw5-2 분자표지용 primer(forward primer:5'-AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT-3', reverse primer:5'-TTCCGCA TCAGCCAATAGTGT-3')는 Dianese et al.(2010)의 논문에 따라 제작하였고, PCR 반응액은 genomic DNA 10ng, 10 × PCR 버퍼 2μL(CoreBio, Korea), 10mM dNTP mixture 1μL (CoreBio, Korea), 0.5 unit Top-Taq polymerase(CoreBio, Korea), 각각의 10pmole·μL<sup>-1</sup> 프라이머 1μL, 그리고 멸균된 삼차증류수로 총 20μL로 맞추었다. PCR 반응은 T1 thermal cycler(Biometra Co., Germany)을 이용하여 95°C에서 3분간 denaturation을 수행한 뒤, 95°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분 동안 full extension 반응을 시켰다.

PCR 산물은 EtBr를 포함한 1.5% 아가로스젤 상에서 250V로 1시간 전기영동을 실시한 후, 자외선 투과기(UV transilluminator)를 이용하여 다형성 밴드를 구별하였다.

### PCR 증폭산물의 염기서열

염기서열을 분석하고자 QIAquick gel extraction kit(QIAGEN



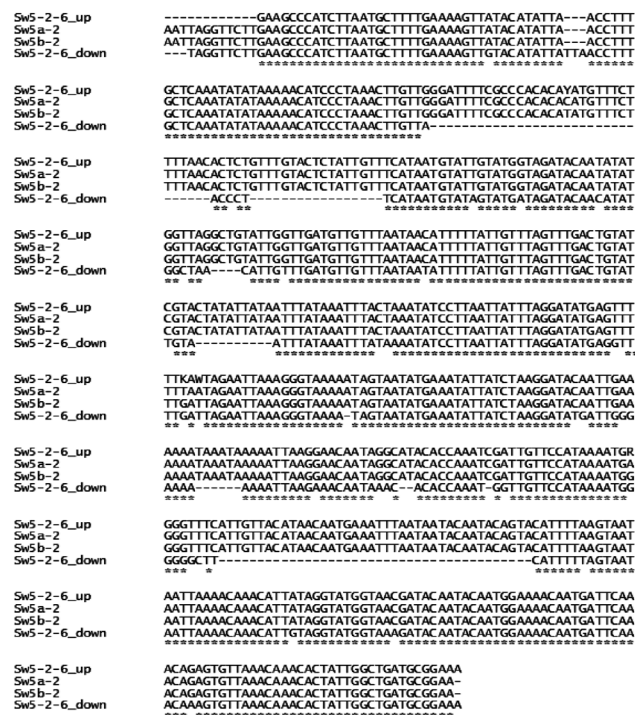
**Fig. 1.** PCR amplicons of Sw5-2 SCAR marker in tomato accessions. M to 7 indicate a size marker (100 bp ladder, Bioneer, Korea), IT 033054, IT 033063, IT 033072, IT 033196, IT 033226, 09-483 ('Eureta'), and 09-484 ('Savera'), respectively. All plants showed resistance to TSWV-pb1. In lane 6, two amplicons of Sw5-2 SCAR marker were named respective Sw5-2-6\_up and Sw5-2-6\_down for further study.

Co., USA)를 사용하여 아가로스젤에서 원하는 PCR 증폭 산물을 회수하였다. 회수한 증폭 DNA는 CoreBio사에 의뢰하여 PCR 산물의 염기서열을 해독하였고, CLUSTALX v. 1.83 프로그램(Thompson et al., 1997)을 사용하여 서열간 염기서열 차이를 비교하였다.

## 결 과

### Sw5-2 분자표지 특성 조사

Sw5 유전자의 haplotype 가운데 Sw5-b 유전자 부위에 특이적인 분자표지(Sw5-2)는 기존의 분자표지와는 다르게 저항성 표현형과 재조합이 없는 것으로 알려졌다(Dianese et al., 2010). 이는 Sw5-2 분자표지를 이용할 경우 Sw5-b 유전자를 보다 쉽게 원하는 개체로 도입 가능성을 의미한다. 그러나 국내에서는 Sw5-2를 이용한 TSWV 저항성 육성에 관한 보고가 아직까지 없고 다양한 토마토 자원에서 Sw5-2가 어떻게 활용될 수 있는지에 대한 연구가 없었다. 따라서 Sw5-2의 활용성을 조사하고자 TSWV에 저항성으로 알려진 상용품종('Eureta'와 'Savera')과 예비실험에서 TSWV-pb1에 저항성을 보인 5개체에 Sw5-2를 적용하였다. 모두 2종류의 PCR 산물이 증폭되었는데, 크기가 큰 것(R 밴드, Sw5-2-6\_up)



**Fig. 2.** Sequence comparison of PCR products amplified from genomic DNA of an 'Eureta' plant using Sw5-2 primer pairs. The sequences of Sw5a-2 and Sw5b-2 were achieved from Sw5 cluster (accession No. AY007366.1). The abbreviation K, R, W, and Y indicates nucleotides of TG, AG, AT, and CT, respectively.

**Table 1.** Resistance of tomato accessions to tomato spotted wilt virus-pb1.

Code <sup>z</sup>	Description	No. of plants <sup>y</sup>		Sw5-2 <sup>x</sup>	Code	Description	No. of plants		Sw5-2
		Tested	Infected				Tested	Infected	
IT 100502	Seog Kwang	28	12	S	IT 211836	Dotaerang	26	8	S
IT 100507	Dae Pung Dae Hyeong	32	3	S	IT 213136	Pum Beon1 Ho	25	6	S
IT 100508	ManSuDaeHyeong	32	6	S	09-471	Ri Ko Pin_9	5	2	S
IT 100510	Bok Su 2 Ho	34	9	S	09-472	Kko Kko	5	2	S
IT 032943	CL122-0-1-15-0-0-1	23	3	S	09-473	San Cherry 250	5	1	S
IT 032944	CL123-4-1-0-0	27	6	S	09-476	Bo YakI Heuk Chal	5	1	S
IT 032952	CL143-0-4B-1-0-0	31	11	S	09-477	Mascara	5	1	S
IT 032953	CL143-0-6-9-0-0-0	21	1	S	09-479	Super Dotaerang	5	2	S
IT 032959	CL170-0-3B-4-2	24	5	S	09-480	Rapido	5	2	S
IT 032960	CL170-0-3B-4-4	25	2	S	09-481	Zeus42	5	0	S
IT 032972	Cold set	28	1	S	09-482	Poseidon	5	3	S
IT 032994	Floradel Tm-2nv	33	1	S	09-483	'Eureta'	20	0	H
IT 033039	Goh Nong 8 Ho	31	3	S	09-484	'Savera'	20	0	S
IT 033054	LA279-78L-1263-1	24	0	S	10-289	Compari	5	0	S
IT 033055	LA329-78L-828-2	37	6	S	10-290	Nanta	5	1	S
IT 033063	LA1500-72L-979-4	25	0	S	10-291	Olmeca	10	5	S
IT 033072	Manapal Tm-2nv	25	0	S	10-292	Medison	5	1	S
IT 033175	Dong Buk 6 Ho	24	1	S	10-293	Legend	5	1	S
IT 033196	VC8-1-2-d	20	0	S	10-294	Macarena	5	1	S
IT 033199	VC48-1GS	25	4	S	10-295	Lapsodi	5	1	S
IT 033224	VC11-1-2-1a	34	2	S	10-296	Bacchus	5	1	S
IT 033226	VC11-2-5	23	0	S	10-297	TP-7	5	2	S
IT 033227	VC-2-5A	23	5	S	10-298	Sun Red	5	2	S
IT 116977	Florida,MH-1	28	6	S	10-299	Dotaerang Red	5	2	S
IT 116981	Tree Tomato	26	5	S	10-300	Yoyo captain	5	3	S
IT 136575	Pusa Early Dwarf	25	1	S	10-301	Dundee	5	1	S
IT 136597	Pusaearly Dwarf	33	5	S	10-302	Orangino	5	4	S
IT 160385	Jo Pung Gacho	29	5	S	10-303	Ho Yong	10	1	S
IT 191047	Po Hong 7 Ho	25	4	S	10-304	Ten Ten	5	4	S
IT 199431	Local, KRYM	33	5	S	10-306	08-9-1	5	2	S
IT 199450	Local	21	4	S	10-307	08-9-2	5	0	S
IT 199455	Peelo, Volgograd	24	4	S	10-308	08-9-3	5	3	S
IT 199459	Local, MAIKOP	30	1	S	10-309	08-9-4	5	1	S
IT 199578	Local, MAIKOP	36	1	S	10-310	08-9-5	5	1	S
IT 033174	(TK70 × Florida MH-1) F8	15	3	S	10-311	08-9-6	5	3	S
IT 100504	Man Su Jo Saeng	16	3	S	10-312	08-9-7	5	2	S
IT 033056	LA875-78L-1144	14	1	S	10-313	08-9-8	5	4	S
IT 033061	LA1443-71L-475-1	18	3	S	10-314	08-9-9	5	3	S
IT 033051	L386-8 Dwarf	25	8	S	10-315	08-9-10	5	2	S
IT 160382	Jo Pung Beon Ga	21	6	S	10-316	08-9-11	5	0	S
IT 32916	CL-7-0-5-1-0-0	23	12	S	10-317	08-9-12	5	5	S
IT 201643	(64) Local collection	23	8	S	10-318	08-9-39	5	3	H
IT 201656	Local collection	12	7	S	10-319	08-9-41	5	5	S
IT 201663	Local collection	21	5	S	10-320	08-9-49	5	5	S
IT 203472	Russian collection	24	10	S	10-321	08-9-50	5	1	H

<sup>z</sup>At 14 days after inoculation with TSWV-pb1, ELISA was performed for the virus infection on non inoculated upper leaf.<sup>y</sup>Three plants per each accession were genotyped by screening with Sw5-2 SCAR marker.<sup>x</sup>S, rr (homozygous susceptible); H, Rr (heterozygous).

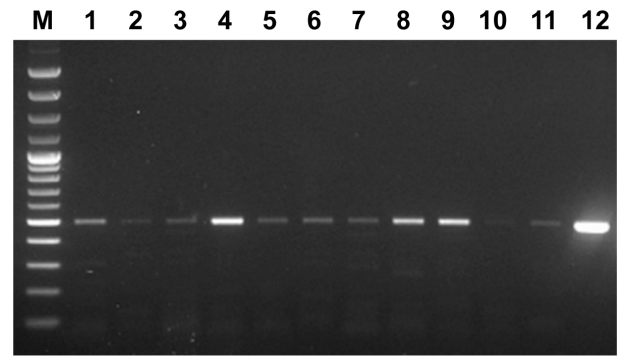
과 작은 것(S 밴드, Sw5-2-6\_down)은 Sw5-b에 각각 저항성 특이적, 또는 감수성 특이적 산물로 판단되었다(Fig. 1). 보다 정확한 결과를 위해 8개 PCR 산물의 염기서열을 분석하였는데, Sw5-2-6\_up은 574bp였고, Sw5-2-6\_down과 나머지 감수성 PCR 산물은 462bp로 크기가 동일하였다. 감수성 PCR 산물 7개체 염기서열은 모두 동일하였으나(자료 미제시), 저항성 PCR 산물과 비교했을 때 Diances et al.(2010)이 보고한 것처럼 크게 두 곳에서 염기서열 결손부위가 관찰되었다(Fig. 2). 추가적으로 저항성 PCR 산물(Sw5-2-6\_up)에는 Sw5-a와 Sw5-b 염기서열이 둘 다 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

### 토마토 유전자원의 TSWV 저항성 탐색

수집유전자원에서 TSWV 저항성을 조사하고자 Sw5-2 분자표지와 생물검정을 수행하였다. Sw5-2 유전형을 조사한 결과 저항성 특이 PCR 산물은 양성 대조구로 사용된 'Eureta'와 해외에서 도입한 상용토마토 품종인 10-318과 10-321에서만 관찰되었다. TSWV-pb1에 대해 'Eureta'는 접종한 개체 모두가 저항성이었으나, 10-318과 10-321에서는 접종개체의 일부만이 저항성을 보였다(Table 1). Sw5-b는 TSWV 이동을 억제하는 것과 관련되어 있다고 알려져 있는데(Brommonschenkel et al., 2000), TSWV-pb1을 'Eureta'에 접종했을 때, 비접종 상업에서 엽맥 투명과 약한 모자이크 증상이 관찰되었다. 이후 개화기 성묘에서는 바이러스 병징이 완전히 사라졌고, 효소면역항체법을 이용하여 상업의 바이러스 감염 여부를 조사한 결과 바이러스가 검출이 되지 않았다(자료 미제시). 생물검정은 2009년과 2011년에 수행하였는데, 형질 고정 비교적 많이 진행된 것으로 판단되는 IT 유전자원에서는 바이러스 저항성 정도가 다양하였고, 동일 수집 종 내에서도 저항성과 감수성 정도가 다르게 나타나는 경향을 보였다. 이들 가운데 IT 033054, IT 033063, IT 033072, IT 033196 및 IT 033226는 Sw5-2 분자표지에 대한 유전형이 감수성 형으로 고정되어 있음에도 불구하고 접종한 모든 개체에서 강한 저항성을 나타내었다. 한편, 2011년에는 국내외에서 시판되는 상용품종을 대상으로 바이러스 저항성 여부를 조사하였는데, F1 품종임에도 불구하고 동일 품종 내에서 개체에 따른 저항성에 차이가 있었다(Table 1).

### TSWV 저항성 선발개체의 접종 후기 반응

육종에 이용할 수 있는 저항성 개체를 선발하고자 접종 후 5개월까지 선발 개체의 저항성 지속 여부를 조사하였다. 접종 후 41일까지 병징이 나타나지 않은 개체를 총 35 계통(IT 100507, IT 100508, IT 100510, IT 032944, IT 032952,



**Fig. 3.** RT-PCR detection for TSWV infection in representative individuals with no symptom (1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, and 11 lanes) and mild mosaic (4, 8, and 9 lanes). RT-PCR was performed at five months after inoculation with a primer pair that allows specific amplification of 450 bp fragment of TSWV N genome. M is an abbreviation of molecular marker (100 bp ladder, Bioneer, Korea). Lane 1 to 11 indicates a representative for IT 100508, IT 100510, IT 0232953, IT 033054, IT 033055, IT 033196, IT 033199, IT 160385, IT191047, 09-483 ('Eureta'), and Subicho, respectively. The Subicho of lane 12 is a pepper infected with TSWV-pb1 and used as a positive control for RT-PCR detection.

IT 032953, IT 032959, IT 032960, IT 032972, IT 032994, IT 033054, IT 033055, IT 033061, IT 033175, IT 033196, IT 033199, IT 033224, IT 033226, IT 116977, IT 116981, IT 136575, IT 136597, IT 160385, IT 191047, IT 199431, IT 199450, IT 199455, IT 199459, IT 199578, IT 201643, IT 201656, IT 201663, IT 203472, IT 211836 및 IT 213136)에서 각각 한 개체씩 선발하고 접종 후 5개월까지 병징 발현 유무와 RT-PCR에서의 바이러스 검정 유무를 조사하였다. IT 033059, IT 033061, IT033199, IT 033224, IT 033226, IT160385, IT 136575, IT 160385 및 IT 199459 선발 개체에서는 접종 5개월 이후에 모자이크 병징이나 줄기괴사 혹은 둘 다를 관찰할 수 있었으나, 나머지 개체에서는 병징을 관찰할 수 없었다(자료 미제시). 최종적으로 이들 개체의 바이러스 감염 여부를 RT-PCR로 조사하였는데, 모든 개체에서 감염 시 예상되는 PCR 산물이 관찰되었다. IT 100510, IT 032953, IT 033054, IT 033055, IT 033196 및 IT 191047에서는 'Eureta'처럼 PCR 산물이 약하게 증폭되었고(Fig. 3), IT 116977, IT 136597, IT 199431, IT 199455, IT 203472 및 IT 211836도 비슷한 결과를 보였다(자료 미제시). 이들을 제외한 나머지 개체에서는 모자이크 병징이 나타난 IT 032959와 비슷한 수준으로 바이러스 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 3).

## 고 찰

토마토의 TSWV 저항성 육성에 있어 Sw5-b는 매우 유용

한 유전자임에 틀림없다. 본 연구에 의하면 Sw5-b를 TSWV 저항성 품종 육성에 활용하기 위해서는 몇 가지 추가 조사가 필요할 것으로 판단된다. Sw5-2 분자표지를 이용해 유전자원에서 Sw5-b 유무를 조사했을 때 IT 재료에서 관찰된 PCR 산물은 크기가 574bp인 Sw5-2-6\_up과 462bp인 Sw5-2-6\_down 두 종류뿐이었으나, 상용 F1에서는 09-471(‘리코핀 9 미니’), 09-473(‘산체리 250 미니’), 10-300(‘요요캡틴’), 08-9-2, 08-9-3, 08-9-4 08-9-5 및 08-9-1110-290(‘난타’)에서 대략 500bp 크기의 PCR 산물을 확인할 수 있었다(자료 미제시). 이것은 *Tospovirus*에 감수성인 ‘Nemonetta’ 유래 육성 계통과 ‘Ohio 8245’ 재배종 토마토에서 보고되었는데(Dianese et al., 2010), 저항성 산물 Sw5-2-6\_up와 대략 70bp 정도 밖에 차이가 나지 않기 때문에 유전형 분석 시 주의가 필요하며, 정확한 조사를 위해서는 차후에 이들을 구별할 수 있는 분자표지를 개발할 필요가 있을 것으로 판단되었다.

한편, Sw5-2 PCR 산물의 염기서열을 보면 Sw5-a와 Sw5-b 서열이 함께 존재하고 있는데, 본 연구에서 사용된 재료의 저항성 조사에는 문제없이 적용되었다. 그러나 이들이 매우 가깝게 연관되어 있어 두 유전자의 차이가 쉽게 나타내지 않는다 해도 이들을 구분할 수 있는 분자표지 개발도 추후에 필요할 것으로 사료된다.

수집한 유전자원에 대한 생물검정에서 TSWV에 대한 바이러스 저항성 정도는 알려지지 않은 유전적 요인이나 식물의 나이, 온도 등과 같은 환경 변화에 영향을 받는 것으로 판단되었다. 가장 일반적으로 관찰된 반응은 접종된 개체에서 병징이 늦게 나타나거나 회복되는 것이었다. 바이러스 병징이 늦게 나타나는 현상은 TSWV Arkansas 85-9 분리주에 대한 *Lycopersicon esculentum* Mill과 *L. pimpinellifolium* 유전자원의 저항성 반응 연구에서도 보고되었다(Paterson et al., 1989). Paterson et al.(1989)의 보고에 따르면, ELISA로 바이러스 감염유무를 조사했을 때 병징이 나타나지 않는 개체에서 바이러스 감염을 확인할 수 있었으며, 동일 수집종 내에서 저항성을 보인 일부 개체를 동일 바이러스로 다시 접종했을 경우 궁극적으로 바이러스에 감염되지 않았다고 한다. 본 연구에서도 같은 계통과 품종 내에서 바이러스 저항성 정도에 차이는 보이는 유전자원이 다수 존재하였다. TSWV에 감염된 개체 가운데 병징이 회복(recovery)되는 현상은 *L. chilense* 유래 육성 계통인 ‘Y118’ 토마토에서 알려진 것과 매우 유사하였는데(Canady et al., 2001), 아직까지 이와 관련된 유전학적 연구가 알려져 있지 않아 보다 명확한 자료를 얻기 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

또한 ‘Eureta’ 가운데 일부 개체에서는 TSWV 병징이 일정기간 나타났다 사라지거나 TSWV PCR 산물이 약하게 증

폭되었는데, 이는 Sw5-b 이외에 저항성에 관여하는 다른 인자가 존재하거나 본 연구에서 사용된 TSWV-pb1이 Sw5-b 저항성을 극복할 가능성 둘 다로 해석할 수 있지만 명확한 해답을 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 판단되었다. 오랫동안 고정되어온 계통인 IT 수집종에서는 Sw5-b가 감수성 형임에도 불구하고 저항성 정도가 다양하게 나타났다. 유전적 다양성을 유지하기 위해 여러 개체에서 합으로 종자를 받기 때문에 IT 수집종 내에서 저항성이 분리된다고 해석할 수 있으나, 저항성 유전자가 다양하여 쉽게 고정하기 힘든 것에서 기인했을 가능성도 있다. 이와 같은 이유 때문에 ‘Eureta’처럼 TSWV PCR 산물이 약하게 증폭되었던 IT 213136과 IT 100510 등에 관한 저항성 연구가 필요하다.

이상의 결과를 종합해 보면 토마토의 TSWV 저항성은 Sw5-b 뿐만 아니라 수 개의 인자에 의해 조절되는 것으로 판단되며, 앞에서 언급한 몇 가지 문제가 해결된다면 Sw5-2 분자표지는 TSWV 저항성 육성에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## 초 록

Sw5-2 SCAR 분자표지와 생물검정법을 이용하여 토마토 유전자원 94종의 *Tomato spotted wilt virus*(TSWV) 저항성을 조사하였다. Sw5-2 SCAR 분자표지의 PCR 산물은 대략 574bp, 500bp, 462bp였는데, 크기가 가장 큰 PCR 산물이 Sw5-b 저항성 대립유전자와 연관되어 있었다. Sw5-b 저항성 대립유전자는 3개 수집종(‘Eureta’, 10-318, 10-321)에서 관찰되었는데, 접종한 개체 가운데 이들 가운데 일부는 TSWV-pb1(토마토 분리주)에 일시적으로 감염되어 회복되거나 줄기에 괴사 병징을 보였다. ELISA 검사에서 음성으로 판명된 수집종 당 1개체씩 총 35개체를 선발하여 병징 발현 및 바이러스 감염 유무를 추가로 조사하였다. 접종 5개월 이후에 병징이 나타나지 않은 26개체를 대상으로 RT-PCR을 이용하여 TSWV 감염유무를 조사한 결과, 모든 개체에서 TSWV의 RT-PCR 산물이 약하게 증폭되었고, 이들 PCR 산물의 증폭 수준은 ‘Eureta’와 비슷하였다. 선발된 유전자원의 저항성은 조직 내 TSWV의 농도를 낮게 하는데 중요한 역할을 하고 이들은 Sw5를 포함한 여러 가지 유전자들에 의해 양적으로 조절되는 것으로 판단된다.

추가 주요어 : 생물검정, 분자표지, Sw5, 토스포바이러스

## 인용문헌

Aramburu, J. and M. Mart. 2003. The occurrence in north-east

- Spain of a variant of *tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathol.* 52:407.
- Boiteux, L.S. and L.B. Giordano. 1993. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71:151-154.
- Brommonschenkel, S.H., A. Frary, and S.D. Tanksley. 2000. The broad-spectrum *Tospovirus* resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1130-1138.
- Canady, M.A., M.R. Stevens, M.S. Barineau, and J.W. Scott. 2001. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica* 117:19-25.
- Cho, J.D., J.S. Kim, S.H. Lee, G.S. Choi, and B.N. Chung. 2007. Viruses and symptoms on peppers, and their infection types in Korea. *Res. Plant Dis.* 13:75-81.
- Cho, J.D., J.Y. Kim, J.S. Kim, H.S. Choi, and G.S. Choi. 2010. Occurrence and symptoms of *tomato spotted wilt virus* on eggplant, whole radish and sugar loaf in Korea. *Res. Plant Dis.* 16:232-237.
- Choi, H.S., S.H. Lee, M.K. Kim, H.R. Kwak, J.S. Kim, J.D. Cho, and G.S. Choi. 2010. Occurrence of virus diseases on major crops in 2009. *Res. Plant Dis.* 16:1-9.
- Dianese E.C., M.E.N. Fonseca, R. Goldbach, R. Kormelink, A.K. Inoue-Nagata, R.O. Resende, and L.S. Boiteux. 2010. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Mol. Breeding* 25:133-142.
- Garland S., M. Sharman, D. Persley, and D. Mcgrath. 2005. The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5, an important TSWV resistance gene of tomato. *Aust. J. Agr. Res.* 56:285-289.
- Gordillo, L.F., M.R. Stevens, M.A. Millard, and B. Geary. 2008. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis.* 92:694-704.
- Han J.H., W.P. Lee, J. Lee, M.K. Kim, H.S. Choi, and J.B. Yoon. 2011. Symptom and resistance of cultivated and wild *Capsicum* accessions to *tomato spotted wilt virus*. *Res. Plant Dis.* 17:59-65.
- Kim, J.Y., J.D. Cho, J.S. Kim, S.S. Hong, J.G. Lee, G.S. Choi, and J.W. Lim. 2009. Reduction of *tomato spotted wilt virus* on table tomatoes in greenhouses by soil fumigation. *Plant Pathol. J.* 25:151-156.
- Paterson, R.G., S.J. Scott, and R.C. Gergerich. 1989. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *tomato spotted wilt virus*. *Euphytica* 43:173-178.
- Prince J.P., Y. Zhang, E.R. Radwanski, and M.M. Kyle. 1997. A versatile and high-yielding protocol for the preparation of genomic DNA from *Capsicum* spp. (pepper). *Hortscience* 32: 937-939.
- Roggero, P., V. Masenga, and L. Tavella. 2002. Field isolates of *tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Dis.* 86:950-954.
- Spasova, M.I., T.W. Prins, R.T. Folkertsma, R.M. Klein-Lankhorst, J. Hille, R.W. Goldbach, and M. Prins 2001. The tomato gene SW5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance gene and confers resistance to TSWV in tobacco. *Mol. Breeding* 7:151-161.
- Stevens, M.R., S.J. Scott, and R.C. Gergerich. 1992. Inheritance of a gene for resistance to *tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum*. *Euphytica* 59:9-17.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.J. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
- Whitefield, A.E., D.E. Ullman, and T.L. German. 2005. *Tospovirus-Thrips* interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:1-31.