Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30(3):286-293, 2012 DOI http://dx.doi.org/10.7235/hort.2012.12018

고추의 *Tobamovirus* 저항성 *L* 유전자좌와 연관된 대립유전자 특이적인 마커 세트

이준대 · 한정헌 · 윤재복*

㈜고추와육종 기업부설연구소

A Set of Allele-specific Markers Linked to *L* Locus Resistant to *Tobamovirus* in *Capsicum* spp.

Jundae Lee, Jung-Heon Han, and Jae Bok Yoon*

Research and Development Unit, Pepper and Breeding Institute, Business Incubator, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-853, Korea

Abstract. The resistance to *Tobamovirus* in *Capsicum* spp. has been known to be controlled by five different alleles (L^0, L^1, L^2, L^3, and L^4) of *L* locus on the telomere of long arm of pepper chromosome 11. To develop a set of molecular markers differentiating all the alleles of *L* locus, we used five pepper differential hosts including *Capsicum annuum* Early California Wonder (ECW, L^0L^0), *C. annuum* Tisana (L^1L^1), *C. annuum* Criollo de Morelos 334 (CM334, L^2L^2), *Capsicum chinense* PI 159236 (L^3L^3), and *Capsicum chacoense* PI 260429 (L^4L^4). Developing a series of CAPS or SCAR markers specifically linked to the alleles was allowed by the sequence comparison of PCR amplicons of the L^3-linked markers (189D23M, A339, and 253A1R) and BAC sequences (FJ597539 and FJ597541) in the pepper differentials. Genotypes deduced by these markers in 48 out of 53 F_1 hybrids of commercial pepper varieties were consistent with their phenotypes by bioassay using Tobamovirus pathotypes (P_0, P_1, and $P_{1,2}$). Consequently, these markers can be useful to differentiate *L* alleles and for breeding *Tobamovirus* resistance in pepper with marker-assisted selection.

Additional key words: CAPS, L^3, L^4, PMMoV, SCAR

서 언

우리나라에서 고추(*Capsicum annuum* L.) 재배 중에 주로 발생하는 바이러스 병으로는 *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Pepper mottle virus*(PepMoV), *Pepper mild mottle virus*(PMMoV), *Broad bean wilt virus 2*(BBWV2), *Tobacco mild green mosaic virus*(TMGMV) 및 *Tomato spot wilt virus*(TSWV) 등이 보고되고 있다(Choi et al., 2005). 그 중에서 바이러스 단독감염율을 보면, 세 번째로 많이 발생하는 바이러스는 PMMoV이며 이는 *Tobamovirus* 속(genus)에 속한다(Choi et al., 2005; Tsuda et al., 1998).

고추의 *Tobamovirus*에 대한 저항성은 *Tobamovirus* 병원형(pathotypes; P_0, P_1, $P_{1,2}$, and $P_{1,2,3}$)과 고추 *L* 대립유전자(alleles; L^0, L^1, L^2, L^3, and L^4)의 계층적 상호작용에 의해서 결정이 된다(Boukema, 1980, 1982, 1984; Tomita et al., 2011; Tsuda et al., 1998). 대립유전자 L^1은 *C. annuum* cv. Verbeterde Glas에서, L^2는 *C. frutescens* cv. Tabasco에서, L^3는 *C. chinense* PI 152225 및 PI 159236에서, L^4는 *C. chacoense* PI 260429에서 각각 동정되었다(Boukema, 1980; Tsuda et al., 1998). 국내 상용 품종에는 대부분 L^2 저항성 유전자가 들어있는데, 최근 PMMoV-$P_{1,2}$가 많이 퍼져 L^3나 L^4 저항성 유전자를 도입하는 육종이 수행되고 있다. 이를 효율적으로 수행하기 위해서는 L^3 또는 L^4 특이적 분자표지가 필요하다. 고추 *L* 유전자좌와 연관된 분자표지 개발에 관한 연구는 상당히 많이 진전되어 왔다. RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석 방법을 사용하여 고추

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

※ Received 7 February 2012; Revised 13 March 2012; Accepted 29 March 2012. 본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원에서 수행하는 작물 육종을 위한 품질분석 지원 사업단(과제번호: 609001-05)의 지원에 의해 수행되었음

L^4 저항성 유전자와 1.5cM 정도 떨어져 있는 WA31-1500 (SCAR, sequence characterized amplified region) 분자표지가 개발되었고(Matsunaga et al., 2003), L^3 유전자와 4.0cM 떨어져 있는 PMFR11(SCAR) 분자표지도 개발되었다(Sugita et al., 2004). BSA-AFLP(bulked segregantanalysis-amplified fragment length polymorphism) 분석 방법을 사용하여 L^4 유전자와 0.9-1.8cM 정도 떨어져 있는 L4SC340(SCAR) 분자표지 또한 개발되었다(Kim et al., 2008). 더 나아가 *L* 유전자좌의 유전체 비교 분석을 통하여 감자의 *R3a* 및 토마토의 *I2* 유전자의 homologs를 포함하고 있는 고추 BAC 염기서열이 확보되었고, 이를 이용하여 L^4 유전자와 1.5cM 떨어져 있는 087H03T7(SNP, single nucleotide polymorphism) 분자표지가 개발되었다(Yang et al., 2009). 그러나 이들 분자표지는 다양한 재료에 대해 적용되지 않는 문제점이 있었다. 따라서 더 가까운 분자표지를 개발하기 위해 L^3 유전자 클로닝에 관한 연구도 수행되었는데, Tomita et al.(2011)은 map-based cloning 방법을 통하여 L^3 유전자를 동정하였다. L^3 유전자는 다른 병 저항성 유전자와 마찬가지로 CC(coiled-coil), NB-ACR(nucleotide-binding-Apaf-1, R proteins, and CED-4) 및 LRR(leucin-richrepeat) domain으로 구성되어 있었고, homology-based PCR 방법을 사용하여 L^1, L^{1a}, L^{1c}, L^2, L^{2b} 및 L^4 후보 대립유전자를 분리해 담배(*Nicotiana benthamiana*)에서 이들 저항성 유전자와 각각의 *Tobamovirus* 병원형(P_0, P_1, $P_{1,2}$, $P_{1,2,3}$, 및 $P_{1,2,3,4}$)의 외피 단백질 간의 상호작용을 확인하였다(Tomita et al., 2011).

최근에는 앞에서 클로닝된 L^4 후보 유전자의 LRR 부분에서 L4segF&R(SNP) 분자표지를 개발하여 두 개의 F_2 분리집단에 적용하여 본 결과, 0.3cM 떨어져 있는 결과를 얻어 이 L^4 후보 유전자는 실제 L^4 유전자가 아닐 것이라고 제안하였다(Yang et al., 2011). 그리고 *L* 대립유전자 특이적 SNP(HRM, high resolution melting analysis) 분자표지(L4RP-3F/L4RP-3R)를 개발하였다(Yang et al., 2011). 그러나 L4RP-3F/L4RP-3R 분자표지는 고정된 계통에서 *L* 대립유전자의 구분은 용이하지만, 이형접합형(heterozygote) 개체의 *L* 대립유전자 구분은 쉽지 않다. 또한 HRM 분석방법은 전기영동 과정이 필요 없어 분석 시간을 줄일 수 있고, 데이터 해석의 자동화로 인해 결과 해석 작업이 간편한 장점이 있지만, 고가의 Real-time PCR 기계가 필요하고, 분석 시약의 가격이 기존 STS(SCAR 또는 CAPS) 분자표지 분석에 비해 비싼 단점이 있어, 글로벌 기업이 아닌 국내 종묘회사에서의 품종 개발 중의 계통 선발에는 아직도 STS 분자표지를 주로 사용하고 있다.

본 연구는 고추 *Tobamovirus* 저항성에 관여하는 *L* 유전자좌의 각각의 대립유전자(L^0, L^1, L^2, L^3 및 L^4)를 쉽게 구분하고 저렴하게 분석할 수 있는 공우성 SCAR 분자표지를 개발하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

고추 *L* 유전자좌와 연관된 분자표지를 개발하기 위해 *L* 유전자형(L^0, L^1, L^2, L^3 및 L^4)으로 알려진 다섯 개의 고추 유전자원을 사용하였다(Table 1). 본 연구에서 개발된 *L* 연관 분자표지의 효용성을 검정하기 위해 서로 다른 10개의 종묘회사에서 시판하고 있는 상용 F_1 고추 품종 53개를 사용하였다(Table 2).

바이러스 접종 및 저항성 평가

고추 *L* 유전자형을 분석하기 위하여 바이러스 접종원은 *Tobacco mosaic virus*(TMV; P_0), *Tomato mosaic virus* (ToMV; P_1) 및 *Pepper mild mottle virus*(PMMoV; $P_{1,2}$)를 사용하였다. 접종원의 준비, 접종방법 및 식물체 저항성 평가는 Han et al.(2001)의 방법대로 수행하였다.

마커 개발에 사용된 프라이머 조합 및 PCR 방법

각각의 대립유전자 특이 염기서열을 찾기 위해 Tomita et al.(2008)에 의해 개발된 분자표지의 프라이머 5개 조합(189D23M-NK, 189D23M-YB, A339-NK, A339-YB, and 253A1R-YB)을 사용하였고, Yang et al.(2009)에 의해 염기서열이 공개된 두 개의 BAC 클론 염기서열(GenBank accession

Table 1. Plant materials used in this study.

Capsicum accession	*L* allele	Reference
C. *annuum* Early California Wonder (ECW)	L^0L^0	Boukema, 1980
C. *annuum* Tisana	L^1L^1	Han et al., 2001
C. *annuum* Criollo de Morelos 334 (CM334)	L^2L^2	In this study
C. *chinense* PI 159236	L^3L^3	Boukema, 1980
C. *chacoense* PI 260429	L^4L^4	Boukema, 1984

Table 2. Comparison between phenotypes of resistance to *Tobamovirus* and putative genotypes deduced by six *L* allele-specific markers in 53 F_1 pepper cultivars.

Code[z]	Name of cultivar	Company	*Tobamovirus* inoculation[y]				Marker type of allele-specific markers[x]						Putative genotype
			P_0	P_1	$P_{1,2}$	Phenotype	L^{4w}	L^{3v}	L^{2u}	L^{1t}	L^{0cs}	L^{0nur}	
CF1	Dokyacheongcheong	Syngenta	1	1	0	L^2	S	S	R	H	U	H	L^2/L^1
CF2	Kiripbaksu	Syngenta	1	1	0	L^2	S	S	R	H	U	H	L^2/L^1
CF3	Muhanjilju	Syngenta	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF4	Mansahyungtong	Syngenta	1	1	0	L^2	S	S	R	H	U	H	L^2/L^1
CF5	Super-bigarim	Syngenta	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF6	PR-Manita	Nongwoo	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF7	Daechon	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	H	S	R	S	U	U	L^4/L^2
CF8	Super-Manita	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	H	S	R	S	U	U	L^4/L^2
CF9	Manita	Nongwoo	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF10	Taesan	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	R	S	R	S	H	U	L^4/L^0
CF11	PR-daechon	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	H	S	R	S	H	U	L^4/L^0
CF12	Kangryukjosaenggun	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	H	S	R	S	H	U	L^4/L^0
CF13	Hongchowang	Nongwoo	1	1	0	L^2	H	S	R	S	H	U	L^4/L^0
CF14	Kanggun	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	R	S	R	S	U	U	L^4/L^4
CF15	Dangchan	Nongwoo	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF16	Boeungun	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	H	S	R	S	H	U	L^4/L^0
CF17	Kangryuktaeyang	Nongwoo	1	1	1	L^3 or L^4	H	S	R	S	U	U	L^4/L^2
CF18	Chammani	Nongwoo	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF19	Hongbosuk	Monsanto	1	1	1	L^3 or L^4	S	H	R	S	U	H	L^3/L^2
CF20	Myungjak	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	H	U	L^2/L^0
CF21	Cheonhajeil	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF22	Buchon	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF23	Cheonhatongil	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF24	Wangdaebak	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF25	Janggochu	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF26	Hongiljeom	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF27	Igudongsung	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	H	U	L^2/L^0
CF28	Cheonggwang	Monsanto	1	1	0	L^2(U)[q]	S	S	S	S	U	U	L^0/L^0
CF29	Bugang	Monsanto	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF30	Himchan	Nonghyup	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF31	Hanminjok	Nonghyup	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF32	PR mujeok	Nonghyup	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF33	Balitta	Dongbu Hitec	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF34	Daecheong	Dongbu Hitec	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF35	Buhong	Dongbu Hitec	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF36	Cheonhajanggun	Dongbu Hitec	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF37	Dokbulwang	Sakata	1	1	0	L^2	S	S	R	S	H	U	L^2/L^0
CF38	Joara	Sakata	1	1	0	L^2	S	H	R	S	U	H	L^3/L^2
CF39	Jodae	Sakata	1	1	1	L^3 or L^4	S	H	S	S	U	C	L^3/L^0
CF40	Yeokkanghongjanggun	Koregon	1	1	1	L^3 or L^4	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF41	Onggolchan	Koregon	1	1	1	L^3 or L^4	S	S	R	S	H	U	L^2/L^0
CF42	Hot	Koregon	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF43	PR-manjangilchi	Koregon	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF44	Wanggun	Koregon	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF45	Daedeulbo	Takii	1	1	1	L^3 or L^4	S	H	S	S	U	C	L^3/L^0
CF46	Taechon	Daenong	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF47	PR bulsajo	Daenong	1	1	0	L^2	S	S	R	S	H	U	L^2/L^0
CF48	Albuja	Daenong	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF49	Umcheongna	Asia seed	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF50	Dokjuyeokkang	Asia seed	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF51	Yeokkangsumunjang	Asia seed	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF52	Ddaddabul	Asia seed	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2
CF53	Dolpung	Asia seed	1	1	0	L^2	S	S	R	S	U	U	L^2/L^2

[z]CF means commercial F_1.
[y]P_0, *Tobacco mosaic virus*(TMV); P_1, *Tomato mosaic virus*(ToMV); $P_{1,2}$, *Pepper mild mottle virus*(PMMoV); 1, resistant ; 0, susceptible.
[x]L^4, L4-SCAR; L^3, L3-SCAR; L^2, L2-CAPS; L^1, L1-SCAR; L^{0c}, L0c-SCAR; L^{0nu}, L0nu-CAPS.
[w]S, none of L^4; H, heterozygous(L^4/-); R, L^4/L^4.
[v]S, none of L^3; H, heterozygous(L^3/-).
[u]L2-CAPS is a dominant marker; R, L^2/L^2 or L^2/-; S, none of L^2.
[t]S, none of L^1; H, heterozygous(L^1/-).
[s]U, upper band(L^{0n}, L^{0u}, L^1, L^2, or L^3); H, heterozygous(L^0/-).
[r]U, uncut band(L^2 or L^{0c}); C, cut band(L^{0n}, L^{0u}, L^1, or L^3); H, heterozygous(L^2/- or L^{0c}/-).
[q]U, unstable resistance.

Table 3. Primer sequences used in this study.

Name (restriction enzyme)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Tm (℃)	Reference
189D23M-NK	ATTGTCAGAGTCGGGAAGCA	TACTATGCACAGGGTCTAGG	58	Tomita et al., 2008
189D23M-YB	ATTGTCAGAGTCGGGAAGCA	AACGACAAGGGTTTATTGTATGC	58	Tomita et al., 2008
A339-NK	TCTCGGTAGGCCATTTTGCT	GTAAGTTGCTATGCCCACCA	58	Tomita et al., 2008
A339-YB	GTTTTACATGAAACGCGTTC	GAAGATAGTGGTGGAGAAAA	58	Tomita et al., 2008
253A1R-YB	GCTTCTCCCCAAATGTAGCA	CTCAAACGAGTCATGGCTGA	58	Tomita et al., 2008
L-V0-2	GTTATGTCCAAAACGACCCGCTAA	ACCTTTCACGATTGAAGTGAAGGA	64	In this study
L-V0-3	TCCTTCACTTCAATCGTGAAAGGT	TCAGATCTTGAAAGGAAAAGGAATG	64	In this study
L-V0-4	TATCGATGCACCCCTCGTTTTAAT	ATCTACCACAATGGCAGTGACGAA	64	In this study
L-V0-5	TCTGCAACAAGTTTGGGATAGCTT	CCCTCAAATCTTGCAGACGAGAAT	64	In this study
L-V0-6	ATTGCAGGTACACCCAACCAATCT	CCCGCAAAGATATGTGTACCAACA	64	In this study
L-V1-3K	CTGGTGGTATGGGGTATCCGTTAT	ATTGCACTCACAAAACATGTGGAA	66	In this study
L-V1-45K	CGTGCACCAAAGGGTGTAGAGTAG	TTTGGCACACGTCAACTAAATCAA	66	In this study
L-V1-71K	TTGGAGTTGGAGGACGTACATTTT	GCTGGAGGGTTTAACTAGGCCATT	62	In this study
L1-SCAR	AATAGGCAAGCAAAGGCTAAGTTG	TCGGACACTTCAAAAATGTCTACG	60	In this study
L2-CAPS (*Hae*III)	ATTGTCAGAGTCGGGAAGCA	TACTATGCACAGGGTCTAGG	58	In this study
L3-SCAR	AACAATTTACAAATAATACACAAGGC	TTGGGAAGGAAAGACATCAT	56	In this study
L4-SCAR	ATCGATGCACCCCTCGTTTTAATC	GAGCAGTGTGGAGTGTCTATTGCTCA	64	In this study
L0c-SCAR	CCATCTATTATTCCAGCCTTCGTC	CGGTACAACATGTTTGGAAGATCA	64	In this study
L0nu-CAPS (*Bcl*I)	CTGGTGGTATGGGGTATCCGTTAT	ATTGCACTCACAAAACATGTGGAA	64	In this study

numbers: FJ597539 and FJ597541)을 분석하여 8개 조합(L-V0-2, L-V0-3, L-V0-4, L-V0-5, L-V0-6, L-V1-3K, L-V1-45K, and L-V1-71K)의 프라이머를 새로 디자인하여 사용하였다(Table 3).

PCR 분석은 다음과 같이 수행되었다. PCR 반응액은 genomic DNA 10ng, 10× PCR 버퍼 2μL(CoreBio, Korea), 10mM dNTP mixture 1μL(CoreBio), 0.5 unit Top-Taq polymerase(CoreBio), 각각의 10pmole·μL^{-1} 프라이머 1μL, 그리고 멸균된 삼차증류수로 총 20μL로 맞추었다. PCR 반응은 T1 thermal cycler(Biometra Co., Germany) 모델을 이용하여 95℃에서 3분 동안 초기 변성(denaturation)을 수행한 뒤, 95℃에서 30초 동안 변성(denaturation), 각 분자표지에 따른 Tm(Table 3)에서 30초 동안 가열냉각(annealing), 72℃에서 1분 동안 길이 확장(extension) 과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72℃에서 5분 동안 완전한 길이 확장(full extension) 반응을 시켰다. PCR 산물은 EtBr을 포함한 1.5% 아가로스젤 상에서 250V로 1시간 전기영동을 실시한 후, 자외선 투과기(UV transilluminator)를 이용하여 밴드의 증폭 여부를 확인하고, 증폭된 밴드를 잘라내어 direct sequencing을 수행하였다.

염기서열 분석 및 분자표지 개발

분석된 염기서열은 CLUSTALX v. 1.83 프로그램(Thompson et al., 1997)을 이용하여 다중서열정리(multiple sequence alignment)를 수행하여 In/Del(insertion/deletion)이나 SNP를 탐색하였다. 25bp 이상의 In/Del이 나타난 것은 SCAR 분자표지로 개발하였고, 제한효소 인식 염기서열 상의 SNP는 CAPS Designer 프로그램(http://soldb.cit.cornell.edu/tools/caps_designer/caps_input.pl)을 이용하여 CAPS 분자표지로 개발하였다.

L1-, L3-, L4- 및 L0c-SCAR 분자표지 분석 방법은 다음과 같다. PCR 반응액은 앞에서 제시했던 방법 그대로 만들어 사용하였고, 프라이머만 대립유전자 특이 프라이머를 사용하였다(Table 3). PCR 반응 또한 앞에서 제시한 방법 그대로 사용하였고, 다만 가열냉각(annealing) 온도(Tm)만 Table 3에 제시한 대로 사용하였다. PCR 산물은 EtBr을 포함한 2.0% 아가로스젤 상에서 250V로 1시간 전기영동을 실시한 후, 자외선 투과기(UV transilluminator)를 이용하여 밴드의 크기 차이를 확인하였다.

L2-와 L0nu-CAPS 분자표지 분석 방법은 위의 SCAR 분석 방법과 동일한 PCR 반응액과 PCR 조건으로 수행하였고, PCR 산물은 각각의 특이적 제한효소(Table 3, New England Biolabs Inc., USA)로 37℃에서 2시간 동안 반응한 후, EtBr을 포함한 1.8% 아가로스젤 상에서 250V로 1시간 전기영동을 실시한 후, 자외선 투과기를 이용하여 다형성 밴드를 구별하였다.

결과 및 고찰

L 유전자좌 연관 염기서열 분석 및 *L* 대립유전자 특이 분자표지 개발

고추에서 *Tobamovirus*에 대한 저항성을 보이는 *L* 유전자의 다양한 대립유전자(L^0, L^1, L^2, L^3, and L^4)를 구분할 수 있는 분자표지를 개발하기 위해서 우선 5가지 대립유전자를 각각 가지고 있는 유전자원과 *L* 유전자와 연관된 염기서열을 확보하여 이들의 염기서열을 비교 분석하였다(Table 1 and 3). 특히 Tisana(L^1/L^1), PI 159236(L^3/L^3) 및 PI 260423(L^4/L^4)에서 각각의 특이 부위인 28bp, 32bp 및 34bp deletion을 발견하여 이 부위를 이용하여 SCAR 분자표지를 개발하였다(Fig. 1). L1-SCAR 분자표지는 L-V0-6 프라이머 조합으로 분석한 염기서열 내에서 Tisana(L^1/L^1)에서만 나타난 25bp와 3bp의 두 deletions을 이용하여 개발되었다(Figs. 1A and 2A). Tisana(L^1/L^1)는 100bp DNA 밴드가, 나머지 {ECW(L^0/L^0), CM334(L^2/L^2), PI 159236(L^3/L^3), and PI 260423(L^4/L^4)}는 128bp DNA 밴드가 나타나도록 프라이머를 디자인하였다(Fig. 2A and Table 3). L3-SCAR 분자표지는 A339-NK 프라이머 조합으로 분석한 염기서열 내에서 PI 159236(L^3/L^3)에서만 나타난 32bp deletion으로부터 개발되었는데, PI 159236(L^3/L^3)은 141bp DNA 밴드를, 나머지

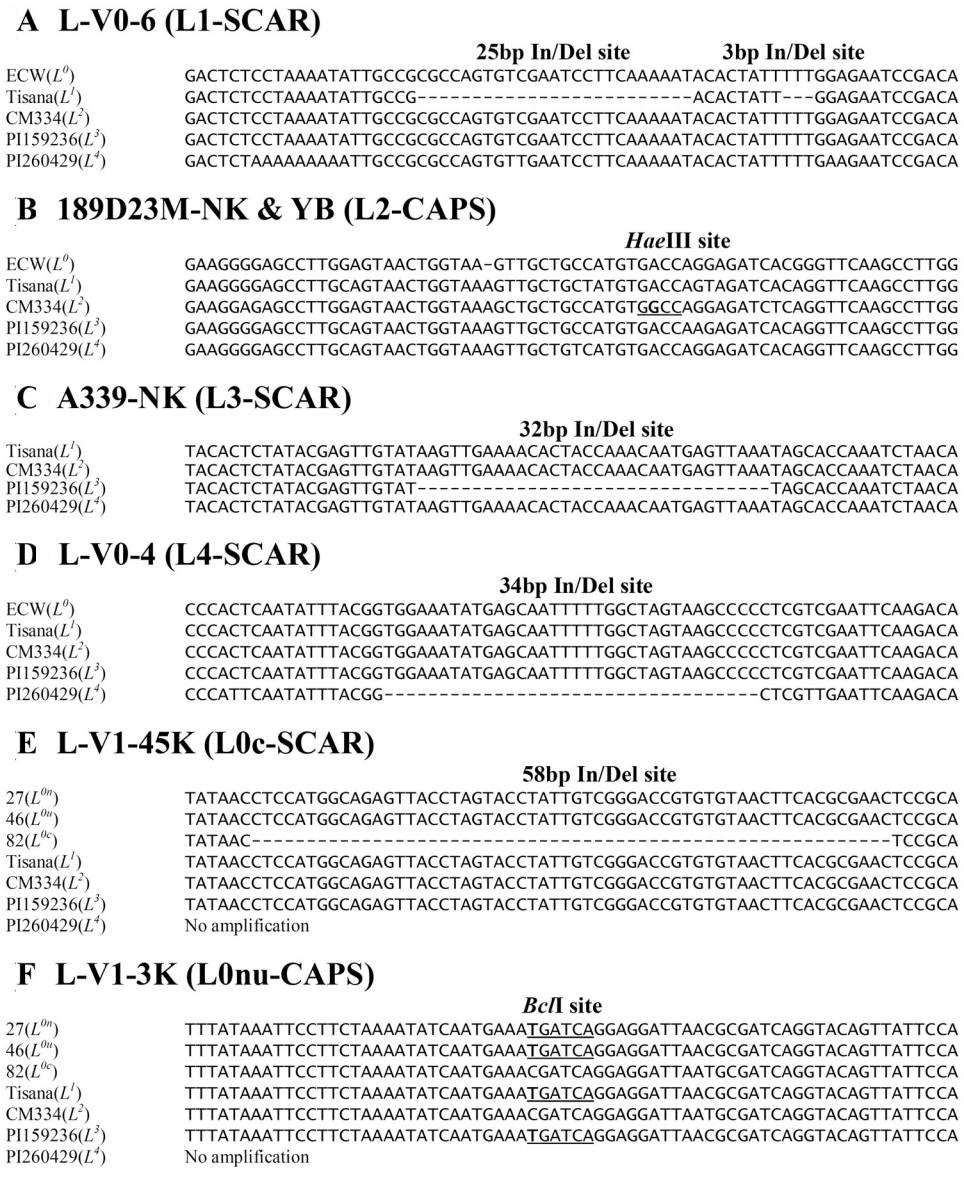

Fig. 1. Four In/Del and two SNP sites detected by comparison of internal sequences of *L*-linked markers {L-V0-6 (A), 189D23 (B), A339 (C), L-V0-4 (D) , L-V1-45K (E), and L-V1-3K (F)} in five differential materials {*C. annuum* ECW (L^0/L^0), *C. annuum* Tisana (L^1/L^1), *C. annuum* CM334 (L^2/L^2), *C. chinense* PI 159236 (L^3/L^3), and *C. chacoense* PI 260429 (L^4/L^4)} and three susceptible materials {*C. annuum* 27 (L^{0n}/L^{0n}), 46 (L^{0u}/L^{0u}), and 82 (L^{0c}/L^{0c})}. Underline, restriction site; Bold, polymorphic nucleotide.

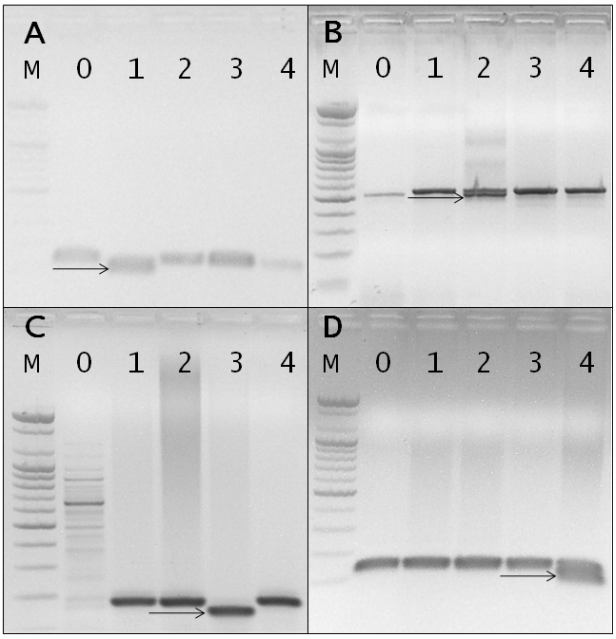

Fig. 2. A marker set including L1-SCAR (A), L2-CAPS (B), L3-SCAR (C), and L4-SCAR (D) for discrimination of *L* alleles in *Capsicum* spp. M, 100 bp DNA size marker (Bioneer Co., Korea); 0, *C. annuum* ECW (L^0/L^0); 1, *C. annuum* Tisana (L^1/L^1); 2, *C. annuum* CM334 (L^2/L^2); 3, *C. chinense* PI 159236 (L^3/L^3); 4, *C. chacoense* PI 260429 (L^4/L^4).

는 173bp DNA 밴드를 나타내도록 프라이머를 디자인하였다(Figs. 1C, 2C, and Table 3). 그러나 L3-SCAR 프라이머로 ECW(L^0/L^0)는 PCR 증폭이 되지 않았다(Fig. 2C). L4-SCAR 분자표지는 L-V0-4 프라이머 조합으로 분석한 염기서열 내에 존재하는 34bp deletion을 이용하여 개발하였는데(Fig. 1D), PI 260423(L^4/L^4)에서만 102bp DNA 밴드를, 나머지에서는 136bp DNA 밴드를 보이도록 개발하였다(Fig. 2D and Table 3).

CM334(L^2/L^2) 특이 분자표지인 L2-CAPS는 189D23M-NK 프라이머 조합으로 분석한 염기서열로부터 개발되었는데, CM334(L^2/L^2)에서만 *Hae*III 제한효소에 특이적으로 잘려진 500bp 밴드와 원래 PCR 산물 크기인 525bp 밴드가 동시에 나타났고, 나머지는 전혀 잘려지지 않은 525bp 밴드만 나타났다(Figs. 1B and 2B). L2-CAPS 분자표지를 L^0/L^0와 L^2/L^2 유전자형을 가지고 있는 여러 계통에 적용하여 보았는데(Fig. 3), L^2/L^2 유전자형을 가지고 있는 계통은 모두 윗밴드(525bp)와 아랫밴드(500bp)를 동시에 가지고 있었고, L^0/L^0 유전자형을 가지고 있는 계통은 윗밴드(525bp, U in Fig. 3, L^{0u} named)만 나타나거나, 아랫밴드(500bp, C in Fig. 3, L^c)만 나타나거나, 또는 PCR 증폭이 안 되었다(N in Fig. 3, L^{0n}). 이는 L2-CAPS 프라이머로 증폭되는 부분이 L^2 대립유전자 주위 염기서열에는 2 copy이고, L^0 주위에는 1 copy 이하이기 때문에 나타나는 현상으로 생각된다. 그리고, L2-CAPS

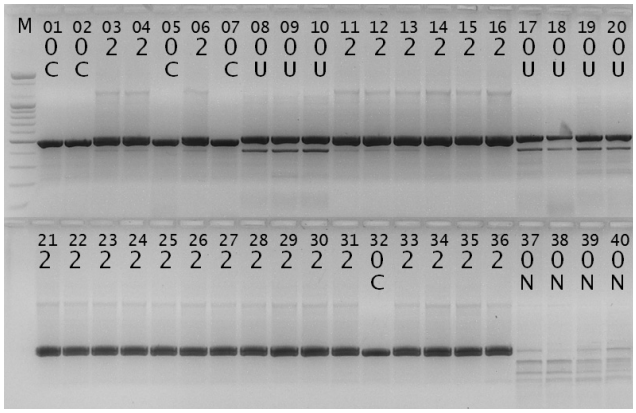

Fig. 3. Screening of L2-CAPS marker for 24 homozygous L^2 and 16 homozygous L^0 peppers. M, 100 bp DNA size marker (Bioneer Co., Korea); 01-40, pepper No.; 0, L^0/L^0 genotype; 2, L^2/L^2 genotype; C, cut band; U, uncut band; N, no amplification.

분자표지 다형성 패턴에 따르면 L^0 감수성 대립유전자가 최소한 3개(L^{0u}, L^{0c} 및 L^{0n}) 이상은 있을 것으로 추정된다. 이는 온도에 영향을 받는 저항성 대립유전자인 L^{1a}의 존재를 보고한 것과 유사한 결과이다(Sawada et al., 2004). *C. annuum* cv. Oonatsume(L^{1a})는 P_0에 대해서는 온도에 상관없이 모두 저항성을 보이나, P_1에 대해서 24℃에서는 저항성을 나타내는 반면 26℃에서는 감수성이 되었다(Sawada et al., 2004).

L2-CAPS는 L^2 특이적이긴 하지만 우성 분자표지이다. 따라서 L^0와 L^2를 구분할 수 있는 공우성 분자표지를 개발하기 위해 L-V1-3K, L-V1-45K 및 L-V1-71K 프라이머 조합을 사용해서 염기서열 분석을 추가적으로 수행하였다. 그 결과, L-V1-45K와 L-V1-3K 염기서열 분석에서 L0c-SCAR와 L0nu-CAPS 분자표지를 각각 개발할 수 있었다(Figs. 1E, 1F, and 4). L0c-SCAR는 L^{0c}와 L^2 대립유전자를 구분할 수 있는 공우성 분자표지인데. L^{0c} 계통에서는 305bp 밴드가, 나머지 계통에서는 363bp 밴드가 나타났고, PI 260423(L^4/L^4)에서는 PCR 증폭이 안 되었다(Figs. 1E and 4A). L0nu-CAPS는 L^{0u} 및 L^{0n}과 L^2를 구분할 수 있는 공우성 분자표지인데, L^{0c}와 L^2 계통에서는 *Bcl*I 제한효소에 의해 전혀 잘려지지 않은 919bp 밴드가, 나머지 계통에서는 807bp 밴드가 나타났고, PI 260423(L^4/L^4)에서는 PCR 증폭이 전혀 되지 않았다(Figs. 1F and 4B).

상용 F_1 품종에서 *L* 대립유전자 특이 분자표지의 효용성 검정

본 연구에서 개발된 L4-SCAR, L3-SCAR, L2-CAPS, L1-SCAR, L0c-SCAR 및 L0nu-CAPS 분자표지의 효용성을 검정하기 위해 국내 고추 상용 품종 53개에 대해 TMV P_0, P_1 및 $P_{1,2}$ 균주를 접종하여 표현형을 얻고, 본 연구에서

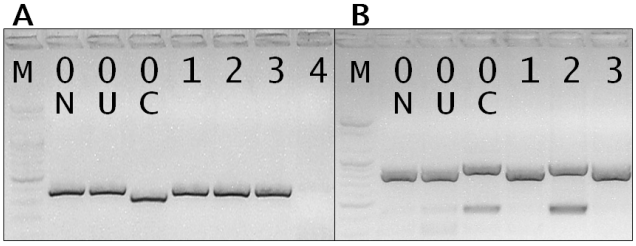

Fig. 4. L0c-SCAR (A) and L0nu-CAPS (B) markers that can distinguish between L^0 and L^2 alleles. M, 100 bp DNA size marker (Bioneer Co., Korea); 0, L^0/L^0 plants; 1, C. *annuum Tisana* (L^1/L^1); 2, *C. annuum* CM334 (L2/L2); 3, *C. chinense* PI 159236 (L^3/L^3); 4, *C. chacoense* PI 260429 (L^4/L^4);N, *C. annuum* 27 (L^{0n}); U, *C. annuum* 46 (L^{0u}); C, *C. annuum* 82 (L^{0c}).

개발된 6개의 분자표지를 사용하여 추정 유전자형을 얻어 이를 비교 분석하였다(Table 2). TMV 접종 결과를 보면, 최소 L^2 이상의 저항성을 모두 보유하고 있었으며, L^3 이상의 저항성은 13개의 품종(CF7, CF8, CF10, CF11, CF12, CF14, CF16, CF17, CF19, CF39, CF40, CF41, CF45)이 있었다(Table 2). CF28 품종은 L^2 저항성을 보유하고 있으나 저항성이 불안정하게 나타나는 현상이 있었다. 이는 Tomita et al.(2011)이 제시한 L^{2b} 대립유전자와 유사한 것으로 생각된다. 6개의 분자표지를 분석한 결과를 보면, CF28을 제외한 모든 품종에서 L^2 이상의 대립유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 2). L^4는 농우 품종에서만 나타났고, L^3는 몬산토, 사카다 및 다끼이 품종에서 나타났다(Table 2). 총 53개 품종 중 표현형과 추정 유전자형에서 차이가 나는 것은 5개(CF13, CF28, CF38, CF40, and CF41)였다(Table 2). CF13은 표현형은 L^2이나 추정 유전자형은 L^4/L^0였다. 이는 계통 육성 중 일어난 재조환에 의해 실제 L^4 유전자는 소실되었으나 L4-SCAR 분자표지 염기서열은 남아 있는 것으로 생각된다. CF28은 앞에서 언급하였듯이 불안정 L^2 유전자(L^{2b})를 가지고 있는 것으로 생각되고, 본 연구에서 개발된 분자표지는 아직 이를 구별할 수 없는 것으로 판단된다. CF38은 표현형은 L^2이나 추정 유전자형은 L^3/L^2였다. 이것도 마찬가지로 실제 유전자(L^3)와 분자표지(L3-SCAR)에 재조환이 일어난 것으로 판단된다. 앞의 경우와 반대로 CF40 및 CF41은 표현형은 L^3 또는 L^4이나 추정 유전자형은 각각 L^2/L^2 및 L^2/L^0였다. 이는 실제 유전자(L^3 or L^4)와 분자표지(L3-SCAR or L4-SCAR) 간의 재조환에 의해 일어난 것으로 생각된다.

본 연구에서 개발한 분자표지의 효용성 분석 결과, 53개의 품종 중 48개(90.6%)에서 표현형과 분자표지로 추정한 유전자형이 일치하였다(Table 2). 이는 고추 계통 육성에 있어서 TMV 저항성 도입에 본 연구에서 개발한 분자표지를 충분히 활용할 수 있음을 의미한다. *L* 유전자좌에 대한 정보가 전혀 없는 고추 자원에 대해 본 연구에서 개발한 6개의 분자표지를 분석하면 바이러스 접종 없이도 유전자형을 바로 추정할 수 있고, 또한 유전자형을 알아낸 후 교잡을 통한 계통 육성 과정에서는 유전자형에 맞는 한 개의 분자표지만 사용하여 선발할 수 있을 것이다. 하지만 표현형과 분자표지 간에 재조환이 일어난 것이 나타나는 것으로 보아 더 가까운 분자표지를 개발할 필요성이 있겠으나, 이를 수행하기 위해서는 *L* 유전자 클로닝이 선행되어야 할 것이다. Tomita et al.(2011)이 L^3 유전자를 클로닝하였다고 보고하였으나, 아직 유전학적인 증명이 완벽히 이뤄지지 않았고, *L* 유전자좌의 저항성 대립유전자(L^1, L^2, L^3, and L^4)가 같은 유전자인지 서로 다른 유전자인지도 아직 불명확하다(Yang et al., 2011). 또한 기존에 보고된 저항성 대립유전자(L^1, L^2, L^3, and L^4)보다 더 다양한 대립유전자(example: L^{1a}, L^{1c}, and L^{2b})가 있을 것으로 생각되고 이에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다(Sawada et al., 2004; Tomita et al., 2011). 이에 더하여 새로운 균주($P_{1,2,3,4}$)의 출현으로 인해 이에 대한 저항성 유전자원을 탐색하는 것도 필요할 것으로 생각된다(Genda et al., 2007).

초 록

고추에 있어서 *Tobamovirus* 저항성은 고추 염색체 11번 긴 팔 끝부분에 위치한 *L* 유전자좌의 다섯 개 대립유전자(L^0, L^1, L^2, L^3, and L^4)에 의해 조절된다고 알려져 있다. 표현형 분석 없이 *L* 대립유전자를 구분할 수 있는 분자표지를 개발하기 위해서 다섯 개의 고추 판별 계통{*Capsicum annuum* Early California Wonder(ECW, L^0L^0), *C. annuum* Tisana(L^1L^1), *C. annuum* Criollo de Morelos 334(CM334, L^2L^2), *Capsicum chinense* PI 159236(L^3L^3), and *Capsicum chacoense* PI 260429(L^4L^4)}을 식물재료로 사용하였다. 대립유전자 특이적 분자표지는 고추 판별 계통에 대해 L^3 연관 분자표지(189D23M, A339, and 253A1R)와 BAC 염기서열(FJ597539 and FJ597541)의 PCR 증폭산물 염기서열을 비교 분석하여 개발되었다. 총 53개의 상용 고추 품종 중 48개에서 분자표지에 의한 추정 유전자형과 *Tobamovirus* {*Tobacco mosaic virus*(pathotype 0, P_0), *Tomato mosaic virus*(P_1), and *Pepper mild mottle virus*($P_{1,2}$)} 접종 표현형과 일치했다. 결과적으로 본 연구에서 개발된 분자표지는 고추 육종에 있어서 TMV 저항성 도입에 필요한 선발마커로 충분히 활용될 수 있을 것이다.

추가 주요어 : CAPS, L^3, L^4, PMMoV, SCAR

인용문헌

Boukema, I.W. 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. Euphytica 29:433-439.

Boukema, I.W. 1982. Resistance to a new strain of TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. Capsicum Newslett. 1:49-51.

Boukema, I.W. 1984. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz is governed by an allele of the *L*-locus. Capsicum Newslett. 3:47-48.

Choi, G.S., J.H. Kim, D.H. Lee, J.S. Kim, and K.H. Ryu. 2005. Occurrence and distribution of viruses infecting pepper in Korea. Plant Pathol. J. 21:258-261.

Genda, Y., A. Kanda, H. Hamada, K. Sato, J. Ohnishi, and S. Tsuda. 2007. Two amino acid substitutions in the coat protein of pepper mild mottle virus are responsible for overcoming the L^4 gene-mediated resistance in *Capsicum* spp. Phytopathol. 97:787-793.

Han, J.H., C.H. Lee, and Y.J. La. 2001. Pathotype of *Tobamovirus* isolates from commercial red pepper seeds. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 19:530-534.

Kim, H.J., J.H. Han, J.H. Yoo, H.J. Cho, and B.D. Kim. 2008. Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the L^4 locus conferring broad spectrum resistance to Tobamoviruses in pepper plants. Mol. Cells 25:205-210.

Matsunaga, H., T. Saito, M. Hirai, T. Nunome, and T. Yoshida. 2003. DNA markers linked to Pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus(L^4) in *Capsicum*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 72:218-220.

Sawada, H., S. Takeuchi, H. Kamada, A. Kiba, M. Matsumoto, and Y. Hikichi. 2004. A new Tobamovirus-resistance gene, L^{1a}, of sweet pepper(*Capsicum annuum* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73:552-557.

Sugita, T., K. Yamaguchi, Y. Sugimura, R. Nagata, K. Yuji, T. Kinishita, and A. Todoroki. 2004. Development of SCAR markers linked to L^3 gene in *Capsicum*. Breed. Sci. 54:111-115.

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.

Tomita, R., J. Murai, Y. Miura, H. Ishihara, S. Liu, Y. Kubotera, A. Honda, R. Hatta, T. Kuroda, H. Hamada, M. Sakamoto, I. Munemura, O. Nunomura, K. Ishikawa, Y. Genda, S. Kawasaki, K. Suzuki, K. Meksem, and K. Kobauashi. 2008. Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L^3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. Theor. Appl. Genet. 117:1107-1118.

Tomita, R., K.T. Sekine, H. Mizumoto, M. Sakamoto, J. Murai, A. Kiba, Y. Hikichi, K. Suzuki, and K. Kobayashi. 2011. Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus* spp. and *L* resistance gene alleles from different pepper species. Mol. Plant-Microbe Interactions 24:108-117.

Tsuda, S., M. Kirita, and Y. Watanabe. 1998. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L_3 gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:327-331.

Yang, H.B., W.Y. Liu, W.H. Kang, J.H. Kim, H.J. Cho, J.H. Yoo, and B.C. Kang. 2011. Development and validation of *L* allele-specific markers in *Capsicum*. Mol. Breeding DOI:10.1007/s11032-011-9666-7.

Yang, H.B., W.Y. Liu, W.H. Kang, M. Jahn, and B.C. Kang. 2009. Development of SNP markers linked to the *L* locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis. Mol. Breeding 24:433-446.