

PLANT&FOREST

# Development of a SNP marker set related to crown gall disease in grapevines by a genome wide association study

Dae-Gyu Kim<sup>1</sup>, Hyun A Jang<sup>1</sup>, Dong Jun Lim<sup>2</sup>, Youn Young Hur<sup>2</sup>, Kyo-Sang Lee<sup>1</sup>, Jiyoung Min<sup>1</sup>, Sang-Keun Oh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

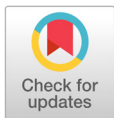
<sup>2</sup>National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

\*Corresponding Author: [sangkeun@cnu.ac.kr](mailto:sangkeun@cnu.ac.kr)

## Abstract

Grapes (*Vitis* spp. L.) are the third most produced fruit in the world. Crown gall disease caused by *Agrobacterium vitis* forms galls in the stems of the grapevines and reduces the vitality of the fruit trees, resulting in reduced yields. This pathogen has occurred in vineyards worldwide and caused serious economic losses. It is a soil-borne disease, so *Agrobacterium vitis* can survive for several years in vineyards and is difficult to control. Additionally, since there is no effective chemical control method, the most effective control method is the breeding of resistant varieties. To make the resistant variety, marker-assisted selection (MAS) enables fast breeding with low cost. In this study, we applied a genome-wide association study (GWAS), by combining phenotyping and genotyping-by-sequencing (GBS), for the development of a single nucleotide polymorphism (SNP) marker set related to crown gall disease using 350 grapevine varieties. As a result of the GBS based genotyping analysis, about 58,635 SNPs were obtained. In addition, the phenotypic analysis showed 35.2% resistance, 73% moderate susceptibility and 16.4% highly susceptibility. Moreover, after confirmation, two genes (*VvARF4* and *VvATL6*-like) were shown to be related to crown gall disease based on the results of GWAS analysis, using the phenotypic data, and GBS. High-resolution melting analysis (HRMA) was performed using the Luna<sup>®</sup> Universal Probe with real-time PCR to distinguish the melting peaks of the resistant and susceptible varieties. Our data show that these SNP markers are expected to be helpful in evaluating resistance against grapevine crown gall disease and in breeding.

**Keywords:** crown gall disease, genome-wide association study, genotyping-by-sequencing, grape, marker assisted selection



## OPEN ACCESS

**Citation:** Kim DG, Jang HA, Lim DJ, Hur YY, Lee KS, Min J, Oh SK. 2020. Development of a SNP marker set related to crown gall disease in grapevines by a genome wide association study. Korean Journal of Agricultural Science 47:693-705. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200057>

**Received:** August 10, 2020

**Revised:** August 20, 2020

**Accepted:** August 24, 2020

**Copyright:** © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Introduction

포도나무는 가장 오랫동안 재배되어 온 과수로(Pelsy et al., 2010) 현재 전세계 과일 중 세 번째로 많이 생산되고 있는 주요 과수이다(FAO, 2018). 우리나라에서도 포도는 중요한 과수이며 10 a당 표준 소득이 492만원으로 국내 과수 중 소득률이 가장 높아 농가소득에 큰 기여를 하고 있다(KOSTAT, 2019). 또한 최근 대립계 품종인 ‘샤인머스켓’의 수요가 급증하면서 소비시장이 크게 확대되었으며, 이로 인해 품질이 좋고 내병성이 뛰어난 품종 개발을 위한 육종 연구의 중요성이 대두되고 있다.

현재 많이 재배되고 있는 포도품종들은 대부분 유럽종(*Vitis vinifera*) 포도와 유럽종 포도를 이용한 교잡종으로 품질은 우수하나 내병성과 내한성이 약해 겨울철 온도가 낮은 우리나라에서 피해가 크다. 그 중에서도 국내에서 두 번째로 많이 재배되고 있는 대립계 품종 ‘거봉’의 경우 줄기혹병에 대해 감수성이며 내한성이 약해 그 피해가 심각하다(Park et al., 2000). 내한성이 약한 품종을 우리나라 중부지방과 같이 겨울철 온도가 낮은 지역에서 재배하면 동해로 생긴 상처로 인해 줄기혹병의 병원균인 *Agrobacterium vitis*가 침입하기 좋은 환경이 만들어져 발병률이 높아진다(Pearson and Goheen, 1988). 동해 방지를 위해 겨울철 온도가 낮은 지역에서 관행적으로 포도나무를 땅에 묻어주는 작업을 해주는데 이 과정에서 줄기에 상처가 발생하고 토양 속에 남아있던 병원균이 상처를 통해 침입하게 된다(Chamberlain, 1962; Lehoczy, 1968).

줄기혹병이 발병한 포장에서는 병원균이 이병잔재에서 수년간 생존하며 건전한 식물체 또한 감염될 수 있어 (Pu and Goodman, 1993; Burr and Otten, 1999) 효과적인 방제법이 요구된다. 하지만 효과적인 화학적 방제 방법이 개발되어 있지 않으며 50°C 온탕 처리(Bazzi et al., 1991; Burr et al., 1998), 정단 배양을 통한 건전 묘 생산(Burr et al., 1998) 및 건전토양에서의 재배(Burr et al., 1987) 등의 예방적 방법만이 시행되고 있다. 따라서 줄기혹병의 피해를 줄이기 위한 근본적인 해결방법은 저항성 또는 내성을 가진 품종의 육종이다.

효과적인 저항성 품종의 개발을 위해 분자표지(molecular marker)의 개발이 요구되는데, 분자 표지는 육종효율 증진에 큰 도움을 준다(Bernardo, 1998). 분자표지는 고품질 혹은 저항성 작물을 육종할 때 우수한 개체를 선발하는데 매우 중요하며(McCouch et al., 2002), 목표로 하는 형질과 관련된 유전자를 정확하고 빠르게 선발할 수 있다. 분자표지를 활용한 marker assisted selection (MAS)은 생육 단계, 환경적 요인에 구애받지 않으며 목표로 하는 유전자의 선발 효율성을 향상시킨다.

초기에는 restriction fragment length polymorphism (RFLP; Botstein et al., 1980), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD; Williams et al., 1990), amplified fragment length polymorphism (AFLP; Thomas et al., 1995), simple sequence repeat (SSR; Tautz, 1989) 등의 기술로 분자표지를 선발에 많이 활용되었으나, 최근 차세대 염기서열분석(next generation sequencing, NGS)기술의 발달로 염기서열 분석의 비용 및 시간이 효과적으로 줄어들어 차세대 염기서열분석을 기반으로 한 다양한 분석 방법들이 개발되고 있다(Poland and Rife, 2012). 차세대 염기서열 분석기술의 발달로 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 이용한 분자표지 개발이 많이 개발되고 있는데(Hyten et al., 2010; Trebbi et al., 2011; Chagne et al., 2012), 이 SNP는 DNA 다형성 중 가장 높은 빈도로 일어나며 안정적으로 이용할 수 있다는 장점이 있다(Gupta et al., 2001).

유전체 분석을 이용해 SNP를 발굴하기 위하여 유전체 전체를 해독하는 whole genome sequencing (WGS)은 정확한 데이터를 얻을 수 있다는 장점이 있어 우수 유전자원에 보편적으로 이용되고 있으나, 많은 시간과 비용이 소모되고 과도하게 많은 데이터로 인해 분석하는데 어려움이 있다. 하지만 코넬대학에서 처음 고안된 genotyping-by-sequencing (GBS)를 이용한 분석 기법은 제한효소를 이용해 절단된 DNA 단편의 염기서열만을 분석하여 시간과 비용절감 효과가 뛰어나며(Elshire et al., 2011), 또한 절단된 단편이 유전체 전체에 고르게 분포하도록 설계함으로써 효율성을 높였고 포도와 같이 이형접합성이 높은 작물에서 유용하게 사용되고 있다(Jang and Oh, 2017).

GBS 분석을 통해 얻은 SNP 데이터는 유전적인 변이를 연구하는데 많이 사용되고 있으며, 2002년 일본 이화학연구소에서 최초로 시도한 게놈전체연관분석(genome-wide association study, GWAS)을 이용해 표현형에 영향을 미치는 것으로 추정되는 SNP를 탐색할 수 있다(Ozaki et al., 2002). 게놈전체연관분석은 유전형과 표현형 사이의 연관성을 통계학적 접근방법을 이용하여 찾아내는 분석방법으로 GAPIT (genome association and prediction integrated tool)이나 TASSEL (trait analysis by association, evolution and linkage)과 같은 소프트웨어가 널리 사용되고 있다(Bradbury et al., 2007).

이러한 게놈전체연관분석을 통해 얻은 줄기혹병 저항성 관련 SNP 데이터를 Real-time PCR 기기를 사용한 high resolution melting analysis (HRMA) 방식의 루나 프로브(unlabeled probe)를 이용하여 분자표지를 개발하였다. 루나 프로브는 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 프로브 방식을 이용하며 3' 말단에 인산염(phosphate) 처리로 중합효소에 의한 뉴클레오타이드(nucleotide) 합성을 방지하였으며, Eva Green과 함께 사용하여 SNP의 결합 여부에 따른 melting peak의 Tm 값 차이로 SNP 타입을 구별할 수 있다(Zhou et al., 2004; Park et al., 2018). 루나 프로브는 기존에 많이 사용되던 CAPs marker나 SCAR marker와 같은 젤 기반의 유전자형 분석 방법에 비해 자동화가 가능하며 시간과 비용절감의 효과가 있어 대량의 샘플을 분석하는데 유용하다.

본 연구는 생물정보학(bioinformatics)을 기반으로 포도나무의 줄기혹병 관련 분자표지를 개발하여, 유전자원의 줄기혹병 저항성 평가 및 교배 집단에서 줄기혹병 저항성을 보유한 개체를 신속하고 정밀하게 대량으로 스크리닝하여 유전자원의 조기선발을 통해 육종 효율을 높이고자 수행하였다.

## Materials and Methods

### 식물 재료

시험 재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에 보존되고 있는 포도 유전자원 중 350 품종을 이용하였다. 시험에 사용된 품종들은 유럽종(*Vitis vinifera*), 미국종(*V. labrusca*)과 교잡종을 포함해 다양한 품종을 사용하였다. 유전형 분석을 위한 genomic DNA 추출은 5월에서 6월 사이에 채취한 어린 잎을 이용하였고, 표현형 분석을 위한 삽수는 11월 낙엽이 진 후 채취하여 4°C 냉장고에 보관하였다가 이듬해 온실에서 container pots에 삽목하여 저항성 검정을 진행하였다.

### 병원균

이병성 검정을 위해 사용된 균주는 충북대학교에서 분양 받은 *Agrobacterium vitis* '천안 493' 균주를 사용하였다. 80°C 초저온 냉동고에 보관중인 병원세균을 yeast-extract peptone (YEP) 액체배지에서 18시간동안 진탕 배양하고, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 배양액을 제거한 뒤  $10^9$  cfu·mL<sup>-1</sup> 농도로 희석하여 접종원으로 사용하였다(Yun et al., 2003).

### 표현형 분석

줄기혹병 병원세균은 주로 상처부위를 통해 침입하므로 병원균 현탁액을 메스에 묻혀 상처를 내주는 방식으로 접종하였다(Yun et al., 2003). 접종 부위가 마르지 않도록 파라필름으로 감싸준 뒤, 25°C에서 40일간 재배해 접종 부위에 생긴 혹의 크기를 측정하였다(Yun et al., 2003).

## 유전형 분석

### Genomic DNA (gDNA) 추출

포도 잎에서 고순도의 gDNA를 얻기 위해 먼저 샘플을 액체질소로 냉동시킨 뒤 마쇄봉(pestle)을 이용하여 분말 형태로 갈아준 다음, DNeasy plant mini kit (Qiagen, Maryland, USA)를 사용하여 gDNA를 추출하였다. 분말형태로 갈린 샘플에 AP1 buffer 400  $\mu$ L, RNase A 4  $\mu$ L를 넣고 vortexing한 후, 65°C 항온수조에 30분 반응시켰다. P3 buffer 130  $\mu$ L를 첨가하여 얼음 위에서 5분간 반응시킨 후, 4°C, 14,000 rpm, 20분간 원심분리 하였다. 상층액 750  $\mu$ L를 QIA shredder spin column에 옮기고 14,000 rpm으로 2분간 원심분리 하였다. 걸러진 용액의 상층액 300  $\mu$ L을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨주고 AW1 buffer 450  $\mu$ L를 첨가해 pipetting 한 뒤, DNeasy mini spin column에 옮겨 13,000 rpm에 1분간 원심분리 하였다. 걸러진 용액을 버리고 AW2 buffer 500  $\mu$ L를 첨가하는 washing 단계를 두 번 반복한 뒤, 40°C의 따뜻한 증류수 50  $\mu$ L를 넣어 추출하였다. 추출한 gDNA는 Simplinano™ spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 측정 및 정량 분석하였다.

### Genotyping-by-Sequencing (GBS)을 위한 라이브러리 제작

GBS 라이브러리는 Elshire et al. (2011)의 방법을 약간 변형하여 제작하였다(Jang and Oh, 2017). 균일한 GBS 라이브러리 제작을 위해 gDNA를 100 ng· $\mu$ L<sup>-1</sup>로 정량하고, ApeK I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 제한효소를 사용하여 각 gDNA를 짧은 단편으로 만들었다. 단편화된 DNA에 각 샘플을 구별할 수 있도록 barcode sequence가 포함된 barcode adapter와 common adapter를 1 : 1 비율로 섞은 혼합물을 넣어주고, T4 ligase (Takara, Shiga, Japan)를 처리하여 접합시킨다. 처리가 끝난 뒤 65°C에서 30분간 처리하여 효소의 활성을 억제하였다. 접합이 끝난 샘플들은 각 5  $\mu$ L씩 하나의 1.5 mL 튜브에 넣어 혼합한 후, 순도를 높이기 위하여 Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Maryland, USA)로 정제하였다. GBS 라이브러리를 증폭시키기 위해 Accupower® PCR premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였고, 정제한 DNA 5  $\mu$ L, forward 및 reverse 프라이머(10 pmol· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 각 1  $\mu$ L와 증류수 43  $\mu$ L를 혼합해 PCR 혼합물의 총량을 50  $\mu$ L로 하여 PCR 증폭하였다. PCR 조건은 72°C 5분; 98°C 30초; [98°C 30초; 65°C 30초; 72°C 20초](16 cycles); 72°C 5분으로 진행하였다. GBS 라이브러리의 순도를 높이기 위해 한 번 더 정제과정을 거쳐 완성된 GBS 라이브러리는 Illumina Hiseq2000 (Illumina, San Diego, USA)를 이용한 paired-end sequencing에 적합한 크기인 250 - 500 bp에 main peak가 유지되는지 확인하기 위하여 전기영동 및 전자전기영동장치를 이용해 quality control (QC)분석으로 적합성을 확인하였다(Hamblin and Rabbi, 2014; Schröder et al., 2016).

### SNP 추출을 위한 GBS 데이터 분석

적합성을 확인한 GBS 라이브러리의 염기서열을 Hiseq2000 (Illumina, San Diego, USA) 장비를 이용하여 분석하였다. GBS 라이브러리의 염기서열 분석 데이터는 barcode sequence를 이용하여 역다중화 과정을 수행하고, adapter의 염기서열을 제거하였다. SolexaQA (v.1.13) package의 DynamicTrim 프로그램(<http://solexaqa.sourceforge.net/>)을 이용해 phred score가 낮은 염기서열(phred score  $\geq$  20)을 잘라내고, LengthSorter 프로그램(<https://www.browserling.com/tools/line-length-sort>)을 이용하여 너무 많은 염기서열이 잘린 read (short read length  $\geq$  25 bp)를 제거하는 sequence quality trimming을 수행하였다. Trimming 과정을 거친 cleaned reads를 BWA (0.6.1-r104) 프로그램(<http://bio-bwa.sourceforge.net>)을 사용하여 *V. vinifera* (Phytozome, 2017) 표준 유전체에 mapping하고, SAMtools (0.1.16) 프로그램(<https://sourceforge.net/projects/samtools/files/samtools/>)을 사용하여 raw SNP를 탐색하였다. 샘플 간의 SNP 비교분석을 위해 SEEDERS in-house script (SEEDERS Inc., Daejeon, Korea)를 이용하여 통합 SNP matrix를 만들고, 게놈전체연관분석을 위해 다음의 SNP filtering 과정을 거쳤다(minimum depth  $\geq$  3, minor allele frequency (MAF)  $>$  5%, missing data  $<$  30%).



## 게놈전체연관분석(genome-wide association study; GWAS)

게놈전체연관분석은 TASSEL version 5.0 ([https://tassel.bitbucket.io/installer/TASSEL\\_5\\_windows.exe](https://tassel.bitbucket.io/installer/TASSEL_5_windows.exe); Bradbury et al., 2007) 프로그램으로 표현형(혹의 횡경)을 종속변수로 하고 유전형(filtered SNP)을 독립변수로 하는 일반선형회귀모형(general linear model)을 사용하였다. 계산된 p-값을 Q-Q plots와 Manhattan plots으로 시각화하였고, 연관분석으로 얻은 p-값에서 유의수준을 0.0000001로 설정하여  $-\log_{10}(p)$ 의 값이 7 이상인 SNP들을 선별하였다.

## 줄기혹병 저항성 후보 유전자 탐색 및 분석

게놈전체연관분석 결과  $-\log_{10}(p)$ 의 값이 7 이상인 SNP가 포함된 유전자들 중에서 병 저항성과 연관도가 높아 보이는 유전자를 탐색하였다. 또한, 줄기혹병 저항성과 같이 양적형질에 대한 연관분석은 통계모형의 설계방법에 따라 분석결과에 차이가 날 수 있으므로 연관분석에서 선별한 SNP 주변 약 2 Mb를 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 *V. vinifera* 유전체 정보에서 검색해 병 저항성과 관련 있는 것으로 추정되는 유전자를 탐색하였다.

탐색한 후보 유전자를 분석하기 위해 실험에 사용된 포도 품종 중 대표 품종 8종을 선별하여 사용하였다(Table 1). NCBI의 염기서열을 참고하여 탐색한 후보유전자에서 프라이머를 제작해 Accupower® PCR premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 PCR 증폭하고 전기영동 후, 밴드부분을 gel cut 하여 Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA)를 이용해 gel purification 하였다. 정제한 PCR 산물을 Mighty TA-cloning kit (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 T-vector에 넣어주고, *Escherichia coli*에 삽입하였다. 형질전환된 *E. coli*를 암피실린(ampicillin)을 첨가한 luria-bertani (LB) 액체배지에 37°C, 24시간 배양 후 25°C, 3,000 rpm, 20분간 원심분리하고 LaboPass™ Plasmid Mini Plasmid DNA Purification Kit (Cosmo Genetech, Daejeon, Korea)를 사용하여 plasmid DNA를 추출하였다. plasmid DNA의 염기서열을 마크로젠(Macrogen Inc., Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하고, CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)와 Bioedit 프로그램(v.7.2, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)을 이용해 alignment하여 저항성 품종과 감수성 품종 사이의 염기서열 차이를 비교 분석하였다.

## SNP marker 개발

SNP의 유전형을 구별하기 위하여 Real-time PCR을 이용한 high resolution melting analysis (HRMA) 방식의 루나 프

**Table 1.** Representative varieties used for gene analysis.

No.	Variety name	Gall length (mm)	Disease severity <sup>z</sup>
1	Emerald seedless	0.31	Resistance
2	Muscat Bailey A	0.00	
3	Cheongsoo	3.00	Moderate resistance
4	Chasselas Blanc	3.18	
5	Cabernet Sauvignon	4.17	Moderate susceptible
6	Merlot	5.48	
7	Pinot Noir	6.53	Susceptible
8	Ruby Okuyama	6.98	

<sup>z</sup> Resistance; gall length 0 - 2.0 mm, Moderate resistance; gall length 2.1 - 4.0 mm, Moderate susceptible; gall length 4.1 - 6.0 mm, Susceptible; gall length 6.1 ≤ mm.

로브(unlabeled probe)를 이용하였다. 포도 줄기혹병 저항성과 연관된 SNP를 구별하기 위해 사용한 프라이머는 PCR 산물이 SNP를 포함하며 산물의 길이가 150 bp 내외가 되도록 설계하였으며, 프로브는 SNP를 포함해 30 mer 내외로 하며 3'-말단부위에 인산염(phosphate) 처리를 하여 뉴클레오타이드(nucleotide)의 합성을 방지하였다(Cradic et al., 2004; Zhou et al., 2004; Montgomery et al., 2007; Zhong et al., 2016). 실험에 사용한 프라이머와 프로브 서열은 Table 2에 나타내었으며, PCR 혼합물은 gDNA (10 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , forward 프라이머(1 pmol· $\mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , reverse 프라이머(10 pmol· $\mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 5x HOT FIREPol® Evagreen® qPCR Supermix (Solis biodyne, Tartu, Estonia) 4  $\mu\text{L}$ , probe (10 pmol· $\mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 증류수 9  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 총량이 20  $\mu\text{L}$ 가 되도록 하였다. PCR 반응은 CFX96 real-time PCR system (Bio-rad, California, USA) 기기를 사용하여 95°C 5분; [95°C 20초; 60°C 20초; 72°C 20초](44 cycles)로 증폭시키고, melting peak의 차이를 분석하기 위해 95°C에서 15초, 40°C 30초 처리한 뒤 50°C에서 90°C까지 초당 0.5°C씩 증가시키며 SNP의 결합여부에 따라 나타나는 melting peaks의 차이로 SNP의 유전형을 구별하였다(Park et al., 2018).

## Results and Discussion

**Table 2.** Information of luna probe used for single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping.

Probe name	Chr	Allele	Luna probe (unlabeled probe)			
			Primer sequences (5' - 3')		Probe sequences (3'-phosphate)	Product size (bp)
			Forward	Reverse		
VvARF4-1	14	G/C	GTTGTTGCCTCCGCAGAG	GTGGCAAGAGAACTGAGAG	CAACCCATAAAAACGCCAAACCACCCC	195
VvARF4-3	14	G/C	GCCACTTCTCTCTCTCCTC	GATGCTTTGGCGCTTCTTG	GCCACCACTACTCGAAGGGTCAATCA	179
VvARF4-8	14	G/C	GGCATGAGCTTCCCTCAGA	AAGCTGGTCTTCAACAACATTC	GTGCCATTCTTTCGAAGTTCTCTATGCCA	158
VvATL6-1	14	G/C	CCGCGGAACCTGACTGA	CATCATCCGCACTCGAATC	GGAATCAGCCGGTGAATCCGATCATGA	152
VvATL6-2	14	A/C	GAGATCGGAGATCAACGCTG	TAGAGTGGACCGAGGAAAC	ACTGATGTCCAACAAGCGCTGATGTG	167
VvATL6-3	14	T/C	GATCAGGCGGTGCTCGAAA	ATACCGGGCACGTAACGTG	TGTGCTGAATGAGTTGAGGATAATGAAACTC	205

VvARF4, *Vitis vinifera* Auxin Response Factor 4; VvATL6, E3 ubiquitin ligases 6; Chr, chromosome.

### 표현형 분석 결과를 통한 저항성 및 감수성 품종선발

실험에 사용된 포도 유전자원 350점에 Yun et al. (2003)의 방법에 따라 포도나무 삽수에 *Agrobacterium vitis*를 접종하고 40일 후 생성된 흑의 횡경을 측정하였다. 표현형 분석 결과 흑의 횡경이 2 mm미만인 유전자원 24점, 2 - 4 mm인 유전자원 81점, 4 - 6 mm인 유전자원 84점, 6 mm이상의 큰 흑을 형성하는 유전자원 37점으로 품종별로 다양한 결과를 보였다(Fig. 1). 표현형 분석은 최소 3반복 이상 실험하였으며, 생성된 흑 횡경의 평균값을 나타내었고 이를 계통 전체연관분석에 사용하였다(Fig. 1).

### 최적화된 GBS 라이브러리 제작 및 GBS분석을 이용한 SNP 추출

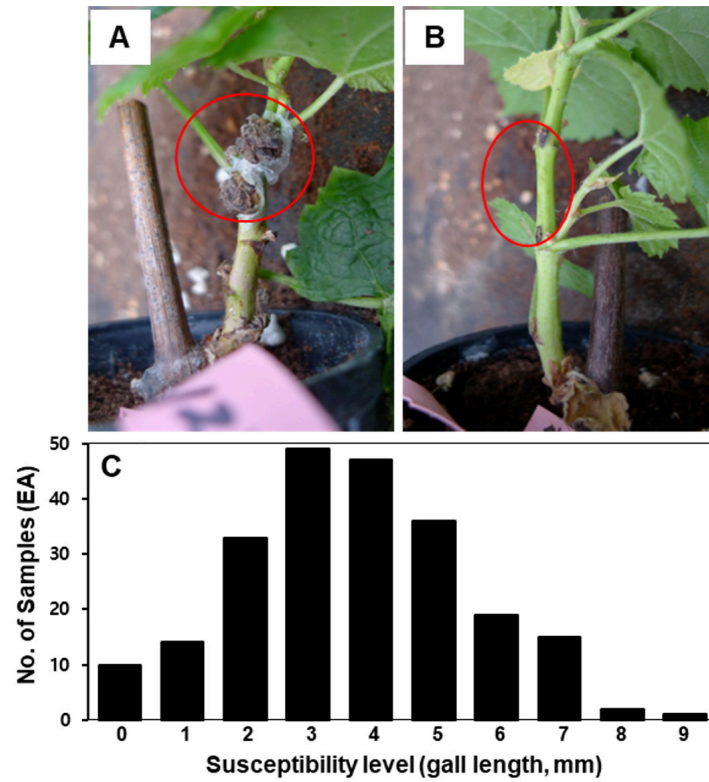
GBS분석을 위한 라이브러리 제작은 본 연구실에서 개발한 방법으로 하였고, 제작한 GBS 라이브러리가 분석에 적합한지 확인하기 위해 quality control (QC)분석을 하였고, QC분석 결과 250 - 500 bp 사이에 main peak가 보이는 것을 확인하였다(Jang and Oh, 2017).

GBS 라이브러리의 염기서열분석 결과를 전리과정 거쳐 총 2백만여개의 SNP matrix가 생성되었으며, 이를 filtering 과정을 거쳐 58,635 여개의 SNP를 얻었고, 이를 계통전체연관분석에 사용하였다(Jang et al., 2020). 연관분석에 사용된 58,635 여개의 SNP를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 이를 통해 GBS 분석으로 추출된 SNP가 포도나무의 19개 염색체에

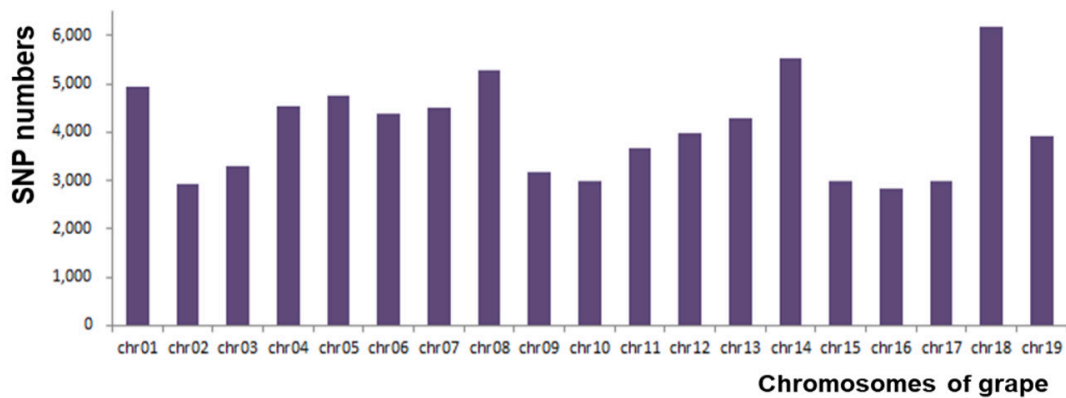
고르게 분포해 있는 것을 확인하였다(Fig. 2).

### 게놈전체연관분석(genome-wide association study; GWAS)

TASSEL version 5.0 (<https://tassel.bitbucket.io/>; Bradbury et al., 2007) 프로그램을 사용하여 GBS 분석을 통해 얻은



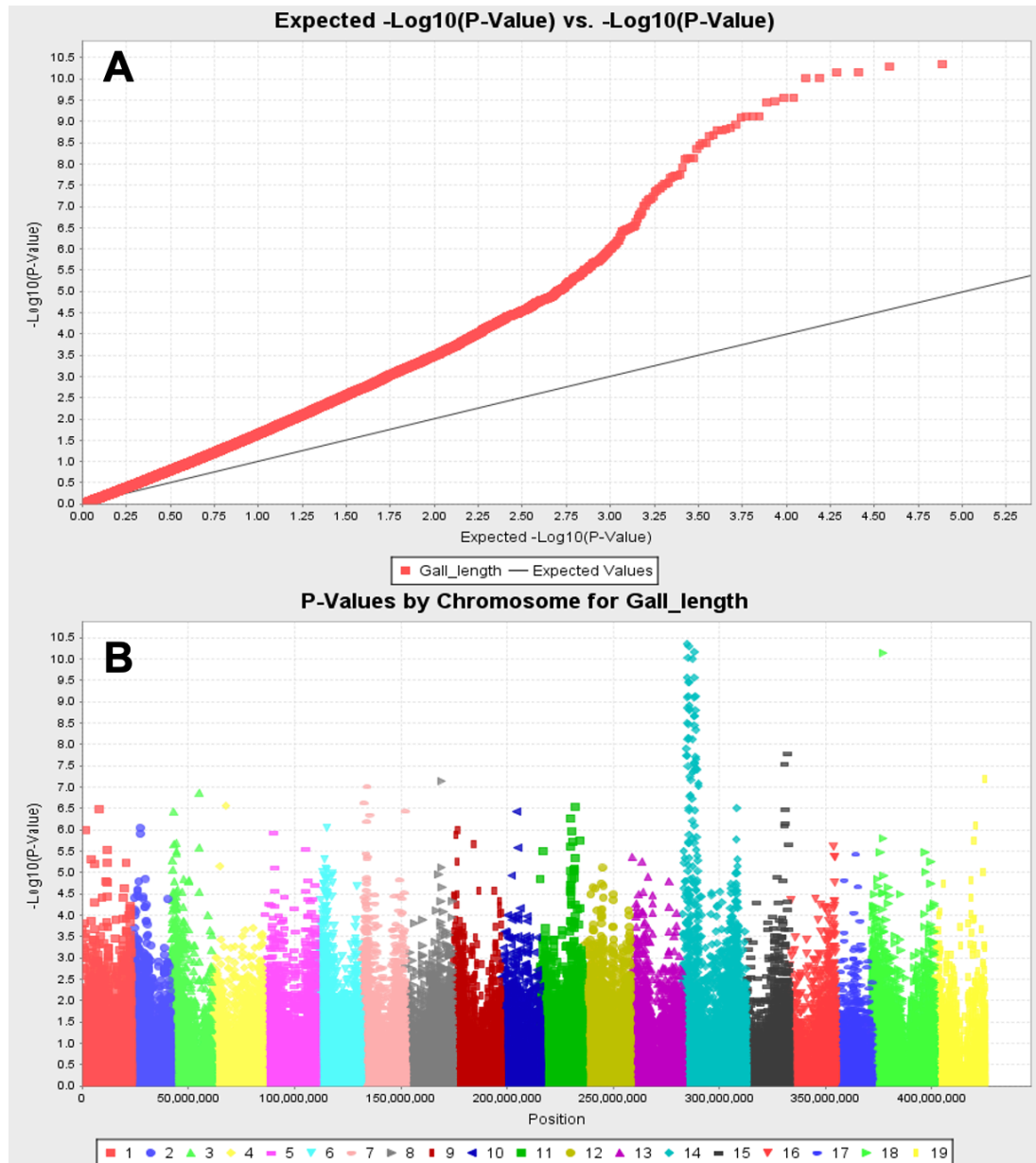
**Fig. 1.** Phenotyping assay of 350 grapevines by *Agrobacterium vitis*. (A) Resistant varieties, (B) susceptible varieties, (C) distribution of the susceptibility level (indicated by the gall length, mm). Red circles indicate gall symptoms. Susceptibility level: gall length 0 - 2.0 mm, Resistance; gall length 2.1 - 4.0 mm, Moderate resistance; gall length 4.1 - 6.0 mm, Moderate susceptible; gall length 6.1 ≤ mm, Susceptible.



**Fig. 2.** The single nucleotide polymorphism (SNP) distribution and density of mapped reads in chromosomes.

58,635여개의 SNP와 유전자원 350점의 줄기혹병에 대한 표현형을 분석한 데이터간의 연관분석을 수행하였다. 연관분석 결과를 Q-Q plots과 Manhattan plots으로 나타내었다(Fig. 3). 줄기혹병 저항성과 연관성이 높은 SNP를 찾기 위해  $-\log_{10}(p)$ 의 값이 7 이상인 SNP만을 선별하여 총 50개의 SNP 데이터를 얻었고 14번 염색체에 줄기혹병 관련 SNP가 많은 것을 확인하였다. 50개의 SNP 중 gene description이 없는 것을 제외하고 같은 유전자에 위치한 경우  $-\log_{10}(p)$ 의 값이 높은 SNP만을 선별하여 총 24개의 SNP 데이터를 얻었다(Table 3).

### 줄기혹병 저항성 후보 유전자 ARF4와 ATL6 탐색 및 SNP marker 개발



**Fig. 3.** Manhattan plot and Q-Q plot displaying the results of genome-wide association study (GWAS) mapping for crown gall resistance in 350 grapevines. (A) Q-Q plot, (B) Manhattan plot.



**Table 3.** Most significant single nucleotide polymorphism (SNPs) associated with crown gall resistance in 350 grapevine.

Chr	Position	Reference seq.	Gene name <sup>z</sup>	Description <sup>z</sup>	p-value	-log <sub>10</sub> (p)
14	1953083	T	ATKRS-1	Lysyl-tRNA synthetase 1	1.25E-08	7.9040987
14	2815406	C	ATL6	RING/U-box superfamily protein	9.32E-11	10.030621
14	3053090	T	MIR01	MIR0-related GTPase 1	3.44E-10	9.4629495
14	3100427	T	elf3-like	Translation initiation factor elf3 subunit	7.24E-09	8.1404774
14	3290361	C	AXR4	Alpha/beta hydrolases superfamily protein	5.19E-11	10.284707
14	3456127	C	Zinc-Finger	CW-type Zinc finger	3.52E-10	9.4538647
14	4921244	T	Frigida-like	Frigida-like protein	9.78E-11	10.0094479
14	5772120	T	HST	ARM repeat superfamily protein	2.21E-09	8.6561386
14	5808521	T	DRB3	dsRNA-binding protein 3	8.05E-10	9.0942365
14	5910038	C	Esterase	Esterase/lipase/thioesterase family portein	2.91E-08	7.5363459
14	6306691	A	AIN1	Exoribonuclease 4	1.96E-08	7.7085867
14	6600576	A	ZDS	Zeta-carotene desaturase	4.51E-09	8.345679
14	7200297	A	ATPase	ATPase E1-E2 type family	3.83E-08	7.4164272
14	7842215	A	AN3	SSXT family protein	8.07E-08	7.0930135
19	23625522	C	EMB1135	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	6.60E-08	7.1804692

Chr, chromosome.

<sup>z</sup> Gene names and descriptions are provided by National Center for Biotechnology Information (NCBI).

연관분석 결과로 얻은 SNP 중에서 줄기혹병 저항성과 관련성이 높아 보이는 auxin response factor 4 (*ARF4*)와 E3 Ubiquitin-protein ligase ATL6-like (*ATL6*) 유전자를 대표 품종에서 분석하였다.

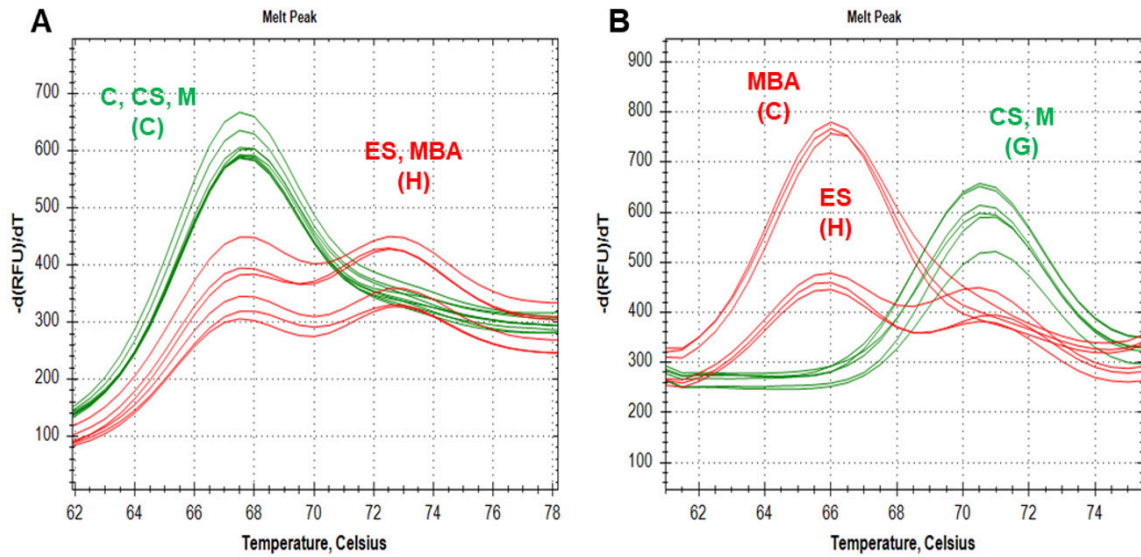
*ARF4*는 식물호르몬인 옥신(auxin)에 의해 발현이 조절되는 유전자로 아직 정확한 역할이 밝혀지지 않았으나, 하지만 토마토에 여러 병원균을 접종하고 *ARF* 유전자들의 발현량을 조사하였을 때 다른 병원균에는 반응하지 않았으나 뿌리혹병의 병원균인 *A. tumefaciens*를 접종했을 때는 *ARF4*의 발현량이 증가한 결과가 있으며, 비생물학적 스트레스를 가했을 때도 발현량이 증가하였다(Bouzroud et al., 2018).

*ATL6*는 기질 단백질을 유비퀴틴화(ubiquitination)하는 세 가지 과정 중 마지막인 연결 과정에 사용되는 E3 효소 중 하나이며, 기질단백질과 유비퀴틴 접합효소(ubiquitin conjugating enzyme, E2)의 상호작용에 관여한다. 기질단백질은 유비퀴틴화에 따라 프로테아좀에 의한 분해(proteasomal degradation) 혹은 활성화(activity)에 영향을 받으며, 세포 내 위치가 변경되거나, 단백질 상호작용(protein interaction)이 촉진되기도, 저해되기도 한다(Sato et al., 2009; Morreale and Walden, 2016). Maekawa et al. (2012)의 실험에서 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000를 접종하였을 때, *ATL6*를 과발현한 경우에는 저항성이 증가하였으나, 유전자 침묵(gene silencing)시켰을 때는 발병이 증가한 결과를 보아 병 저항성과 연관성이 있는 것으로 보인다.

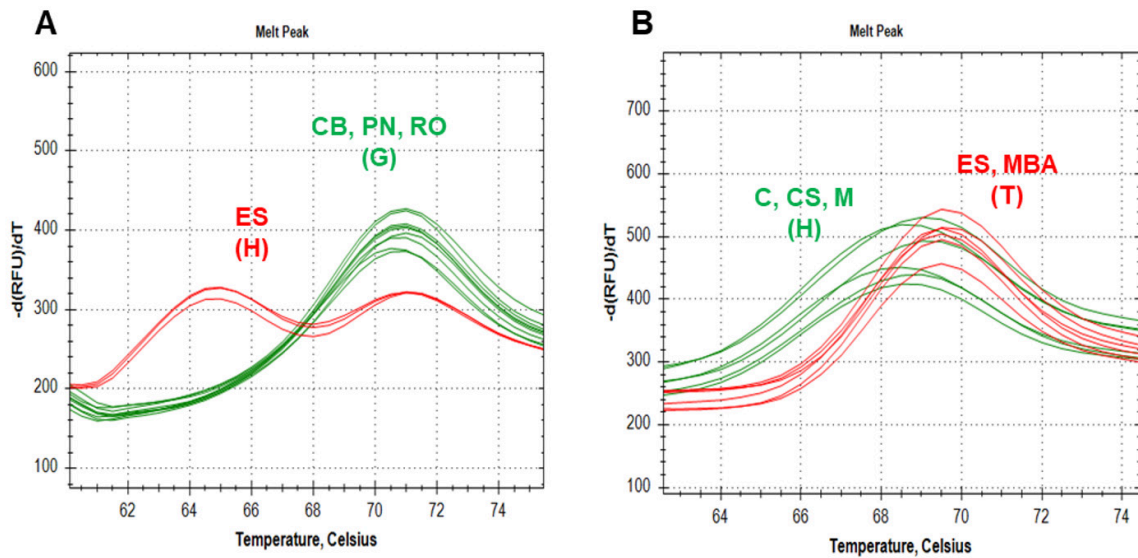
감수성 정도에 따라 선발한 대표 품종 8 종에서 게놈전체 연관분석을 통해 선별한 세 개의 유전자(*ARF4*, *ATL6*)를 *E. coli*에 클로닝하여 plasmid DNA를 이용해 염기서열을 분석하였고, 저항성 품종과 감수성 품종 사이에 차이가 나타나는 SNP를 확인하였다. 그 결과 *ARF4* 8개, *ATL6* 5개가 SNP에서 유의미한 차이를 보였다.

*ARF4*의 8개 SNP는 과오 돌연변이(missense mutation) 3개, 침묵돌연변이(silent mutation) 4개, 비번역 부위(untranslated region) 1개였으며, *ATL6*의 6개 SNP는 과오 돌연변이 2개, 침묵돌연변이 3개로 나타났다(Fig. 4 and Fig. 5).

두 유전자인 *ARF4*와 *ATL6*에서 선별된 SNP중 각각 2개의 SNP에서 루나 프로브를 설계하고 유전형의 차이가 구별되는 것을 확인하여, 루나 프로브를 이용한 SNP marker가 염기서열 분석결과와 일치하는 것을 확인해 분자표지로서의 정확성을 검증하였다(Fig. 4 and Fig. 5).



**Fig. 4.** *WARF4* single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping using luna probes. Normalized melting peaks of SNP in each probe region. Each color represents a different SNP genotype with three replicates; resistance, red; susceptible, green. (A) *WVARF4-3*, (B) *WVARF4-8*. ES, emerald seedless; MBA, muscat bailey A; C, Cheongsoo; CB, chasselas blanc; CS, cabernet sauvignon.



**Fig. 5.** *WATL6* single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping using luna probes. Normalized melting peaks of SNP in each probe region. Each color represents a different SNP genotype with three replicates; resistance, red; susceptible, green. (A) *WATL6-1*, (B) *WATL6-3*. ES, emerald seedless; MBA, muscat bailey; C, Cheongsoo; CB, chasselas blanc; CS, cabernet sauvignon; PN, pinot noir; RO, ruby okayama.

## Conclusion

Marker-assisted selection (MAS)은 유묘기에 저항성을 가진 개체를 선발 가능하게 함으로써 생육이 오래 걸리는 포도의 육종에서 육종 기간, 비용 및 노동력을 효율적으로 줄일 수 있다. 본 연구에서는 병 저항성과 관련된 분자표지의 연구가 미흡한 포도에서 GBS를 이용해 350 품종의 포도에서 유전형을 분석하고 게놈전체연관분석(GWAS)를 통해 줄기혹병 저항성과 연관된 유전자를 발굴하고 선발하였다. 이렇게 찾아낸 줄기혹병 저항성과 관련된 유전자들을 분석하고 루나 프로브를 이용하여 real-time PCR 분석을 수행하여, 염기서열 분석 결과와 루나 프로브를 이용한 결과가 일치하는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구결과를 통해 개발된 SNP marker set는 실제 육종 현장에 적용되어 MAS를 이용한 포도나무 육종에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보이며, 이는 병 저항성 포도 품종 육종 기술 발전에 크게 이바지할 것으로 기대된다.

## Acknowledgements

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(PJ013141012020) 지원에 의해 이루어진 것임.

## Authors Informaion

Dae-Gyu Kim, Dept. of Applied Biology, Chungnam National University, Master

Hyun A Jang, Dept. of Applied Biology, Chungnam National University, Researcher

Dong Jun Lim, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Agricultural researcher

Youn Young Hur, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Agricultural researcher

Kyo-Sang Lee, Dept. of Applied Biology, Chungnam National University, Master

Jiyong Min, Dept. of Applied Biology, Chungnam National University, Research professor

Sang-Keun Oh, <https://orcid.org/0000-0002-6538-9200>

## References

- Bazzi C, Stefani E, Gozzi R, Burr T. 1991. Hot-water treatment of grape propagation material: Its effects on *Agrobacterium* and on vine growth. *Vitis* 30:177-187.
- Bernardo R. 1998. A model for marker-assisted selection among single crosses with multiple genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97:473-478.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Bouzroud S, Gouiaa S, Hu N, Bernadac A, Mila I, Bendaou N, Zouine M. 2018. Auxin response factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE* 13:e0193517.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635.

- Burr T, Bishop A, Katz B, Blanchard L, Bazzi C. 1987. A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. *Phytopathology* 77:1424-1427.
- Burr TJ, Bazzi C, Süle S, Otten L. 1998. Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant disease* 82:1288-1297.
- Burr TJ, Otten L. 1999. Crown gall of grape: Biology and disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37:53-80.
- Chagne D, Crowhurst RN, Troggio M, Davey MW, Gilmore B, Lawley C, Cestaro A. 2012. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE* 7:e31745.
- Chamberlain GC. 1962. The occurrence of aerial crown gall of grapevines in the Niagara peninsular of Ontario. *Canadian Plant Disease Survey* 42:208-211.
- Cradic KW, Wells JE, Allen L, Kruckeberg KE, Singh RJ, Grebe SK. 2004. Substitution of 3'-phosphate cap with a carbon-based blocker reduces the possibility of fluorescence resonance energy transfer probe failure in real-time PCR assays. *Clinical Chemistry* 50:1080-1082.
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6:e19379.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2018. Food and agricultural commodities production. Accessed in <http://faostat.fao.org> on 23 July 2020.
- Gupta P, Roy J, Prasad M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* 80:524-535.
- Hamblin MT, Rabbi IY. 2014. The effects of restriction-enzyme choice on properties of genotyping-by-sequencing libraries: A study in cassava (*Manihot esculenta*). *Crop Science* 54:2603-2608.
- Hyten DL, Song Q, Fickus EW, Quigley CV, Lim JS, Choi IY, Cregan PB. 2010. High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC genomics* 11:475.
- Jang HA, Oh SK. 2017. Development of an efficient genotyping-by-sequencing (GBS) library construction method for genomic analysis of grapevine. *Korean Journal of Agricultural Science* 44:495-503. [in Korean]
- Jang HA, Oo MM, Lee KS, Kim DG, Yoon HY, Kim MR, Thinn KSZ, Arif S, Jia GG, Min J, Lim DJ, Hur YY, Oh SK. 2020. CC-NBS-LRR, a set of VvCRP markers, can distinguish cultivars with ripe rot resistance to *Colletotrichum* pathogens in grapevine. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-020-00290-2>
- KOSTAT. 2019. Changes in major crop production. Accessed in <http://kostat.go.kr/portal/korea/kor> on 23 July 2020.
- Lehoczyk J. 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *Phytopathologische Zeitschrift* 63:239-246.
- Maekawa S, Sato T, Asada Y, Yasuda S, Yoshida M, Chiba Y, Yamaguchi J. 2012. The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. *Plant Molecular Biology* 79:217-227.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9:199-207.
- Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols* 2:59-66.
- Morreale FE, Walden H. 2016. Types of ubiquitin ligases. *Cell* 165:248-248.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Nakamura Y. 2002. Functional SNPs in the lymphotoxin- $\alpha$  gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics* 32:650-654.
- Park G, Jang HA, Jo SH, Park Y, Oh SK, Nam M. 2018. Development of SNP marker set for marker assisted backcrossing (MABC) in cultivating tomato varieties. *Korean Journal of Agricultural Science* 45:385-400. [in Korean]
- Park KH, Jeong KS, Cha JS. 2000. Incidence of severe crown gall disease on tetraploid cultivars of grape in Korea. *The Plant Pathology Journal* 16:290-293.

- Pearson RC, Goheen AC. 1988. Compendium of grape diseases. 1<sup>st</sup> Edited by Pearson and Goheen. pp. 1-121. Publishing by American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Pelsy F, Hocquigny S, Moncada X, Barbeau G, Forget D, Hinrichsen P, Merdinoglu D. 2010. An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. *Theoretical and Applied Genetics* 120:1219-1231.
- Poland JA, Rife TW. 2012. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome* 5:92-102.
- PU XA, Goodman RN. 1993. Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants. *American Journal of Enology and Viticulture* 44:249-254.
- Sato T, Maekawa S, Yasuda S, Sonoda Y, Katoh E, Ichikawa T, Matsui M. 2009. CNI1/ATL31, a RING - type ubiquitin ligase that functions in the carbon/nitrogen response for growth phase transition in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 60:852-864.
- Schröder S, Mamidi S, Lee R, McKain MR, McClean PE, Osorno JM. 2016. Optimization of genotyping by sequencing (GBS) data in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding* 36:6.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.
- Thomas CM, Vos P, Zabeau M, Jones DA, Norcott KA, Chadwick BP, Jones JD. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf - 9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8:785-794.
- Trebbi D, Maccaferri M, de Heer P, Sørensen A, Giuliani S, Salvi S, Tuberosa R. 2011. High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics* 123:555-569.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Yun HK, Roh JH, Park KS, Cha JS, Jeong SB. 2003. Screening system for crown gall resistance by pathogen inoculation in grapes. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 21:325-328. [in Korean]
- Zhong WL, Wang L, Wu X, Zhang J, Chen XF, Zhang W, Yu B. 2016. Development of unlabeled probe based high - resolution melting analysis for detection of filaggrin gene mutation c. 3321del. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 30:892-896.
- Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT. 2004. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clinical Chemistry* 50:1328-1335.