

PLANT&FOREST

Screening assay for tomato plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 using the expression of the *avr2* gene as a selection marker

Mi-Reu Kim, Jeong Jin Lee, Jiyoung Min, Sun Ha Kim, Dae-Gyu Kim, Sang-Keun Oh*

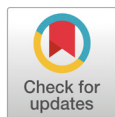
Department of Applied Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 34134, Korea

*Corresponding author: sangkeun@cnu.ac.kr

Abstract

Fusarium wilt disease of tomato plants caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL race2) is one of the most important diseases of tomatoes worldwide. In the competition between tomato and FOL, the FOL can win by overcoming the immune system of tomato plants. Resistant interaction between the FOL race2 and tomato plants is controlled by avirulence genes (AVR2) in FOL and the corresponding resistance genes (*I2*) in tomato plants. In this study, 7 FOL isolates (KACC) were used to test their pathogenicity, and FOL race2 was selected because it is a broad problem in Korea. The *Fol40044* isolates showed the most severe pathogenicity, and the *avr2* gene was also isolated and identified. Moreover, to select resistance, 20 tomato varieties were inoculated with the *Fol40044*, and the degree of pathogenicity was evaluated by analyzing the expression of the *avr2* gene. As a result, three resistant tomato varieties (PCNUF73, PCNUF101, PCNUF113) were selected, and the expression of the *avr2* gene was much lower than that of the control Heinz cultivar. This result shows that the screening assay is very efficient when the *avr2* gene is used as a marker to evaluate the expression level when selecting varieties resistant to tomato wilt disease. Based on these results, it is possible to isolate the *I2* gene, which exhibits resistance and molecular biological interactions with the AVR2 gene from the three tomato-resistant varieties. The *I2* gene provides breeders more opportunities for *Fusarium* disease resistance and may contribute to our understanding of their interactions with the FOL and host plant.

Keywords: avirulence gene, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, race2, resistance gene, tomato plant



 OPEN ACCESS

Citation: Kim MR, Lee JJ, Min J, Kim SH, Kim DG, Oh SK. 2021. Screening assay for tomato plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 using the expression of the *avr2* gene as a selection marker. Korean Journal of Agricultural Science 48:151-161. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20210009>

Received: January 20, 2021

Revised: February 4, 2021

Accepted: February 5, 2021

Copyright: © 2021 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

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) 균에 의한 토마토 시들음병은 전 세계적으로 가장 파괴적인 식물 병 중 하나이며(Amini and Sidovich, 2010; Di et al., 2016), 우리나라에서는 1958년 처음으로 보고되었다(Park, 1958). FOL은 대표적인 토양 매개 전염성 균으로 뿌리 또

는 자연적으로 생긴 상처를 통해 전염된다(Mes, 1999; Michielse and Rep, 2009). 또한 월동체인 후막포자를 형성하여 기주 없이도 토양 내에서 수년간 생존하기 때문에 방제가 매우 어렵다(RDA, 2020). 토마토 식물체의 모든 물관부(xylem) 조직은 *FOL*에 의해 감염될 수 있다(Huang and Lindhout, 1997; Houterman et al., 2007). 따라서 *FOL*에 감염된 식물체는 갈변, 시듦, 성장 저해 그리고 고사(blight)와 같은 전신병징을 보이기 때문에 토마토 재배 농가에 큰 경제적 피해를 준다(Davies, 1982; Simons et al., 1998; Li et al., 2018).

따라서, 친환경 농산물에 대한 소비자의 관심과 수요 그리고 효과적인 방제를 위해 화학적 방제를 대체할 수 있는 저항성 품종을 육성하는 것이 필요하며, 토마토가 가지고 있는 저항성 유전자와 토마토 시들음병균이 가지고 있는 병원성 유전자 사이의 상호작용과 그에 대한 면역반응 유도 등의 분자생물학적 기작을 밝히는 연구가 필요하다.

많은 연구에서 저항성(R) 유전자를 가진 토마토 품종에 침투하는 *FOL*의 병원성을 기준으로 3개의 다른 race가 동정되었다(Bohn and Tucker, 1939; Alexander and Tucker, 1945; McGrath et al., 1987; Park et al., 2013). 현재까지 구별된 *FOL*의 race1과 race2는 전 세계적으로 분포된 반면, race3의 분포는 오세아니아, 아메리카 대륙 등으로 좀 더 제한적이다(Rep et al., 2005; Li et al., 2018). 특히, 국내에서는 최근까지 race1과 race2에 의한 발병만이 보고되어 있으며, race3에 의한 발병 보고는 없다(Hur et al., 2012).

대부분의 식물 병원균은 기주 식물의 세포에 더 쉽고 빠르게 침투하여 병을 일으키기 위해 effector라고 불리는 병원성을 지닌 작은 단백질들을 분비한다(Houterman et al., 2009; Ma et al., 2013). Effector가 기주 식물 세포에 분비되면 기주 세포는 병원균에 대항하기 위해 저항성(resistance, R) 단백질을 생성하며(Takken et al., 2000; Gawehns et al., 2013), R 단백질은 이러한 effector의 존재를 인식하고 식물체 내에서 저항성 기능을 수행하게 된다(Jones and Dangl, 2006). R 단백질의 effector 인식은 식물 면역반응의 하나인 effector-triggered immunity (ETI) 활성화로 이어지고 감염된 기주 식물에서 과민성 세포사멸반응(hypersensitive cell death, HCD)을 일으킨다(Ma et al., 2013). R 단백질에 의해 인식되는 effector는 비병원성(avirulence) 단백질로 간주되고 HCD가 유도되면, R 단백질이 병원체의 전염과 병징 부위의 확산을 제한하게 된다(Jones and Dangl, 2006; Gururani et al., 2012; De Lamo et al., 2018). 따라서, 감염된 장소에서만 제한적인 세포 사멸이 일어나기 때문에 식물 전체는 살 수 있게 되는 것이다.

*FOL*의 침입 1단계는 식물의 뿌리 표면으로 침투, 포자 형성 및 증식 그리고 물관부 조직 점령 등의 과정이 포함된다(van der Does et al., 2018). 기주의 물관부 조직을 점령하는 동안 *FOL*은 effector로 예상되는 작은 병원성 단백질 입자들을 분비한다. 이러한 단백질 입자들을 secreted in xylem (Six) 이라고 하며, 이 중에서 기주의 R 단백질에 인식되어 저항성 면역 반응을 유도하는 입자들을 AVR 단백질이라고 한다(Takken and Rep, 2010; Schmidt et al., 2013). 지금까지 밝혀진 세 가지 race1, race2 그리고 race3의 *FOL* 균들은 각각 AVR1 (Six4), AVR2 (Six3) 그리고 AVR3 (Six1)을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Rep et al., 2004; Houterman et al., 2008; Houterman et al., 2009). 세 가지 AVR 단백질들은 토마토의 저항성 R 단백질인 I, I2 그리고 I3와 상호작용하여 저항성 면역 반응을 유도한다. 그 중에서도 AVR2는 I2와의 상호작용을 통한 저항성 반응 유도 뿐만 아니라 감수성 기주에서는 *FOL*의 완전한 병원성 유도에 필수적인 인자로 작용한다(Ma et al., 2013). 그러나 많은 연구에서 각 race 별 저항성 유전자를 도입한 저항성 품종과(Gabe, 1975; Jones et al., 1991), 마커 연관 선발 프로그램을 이용하여 다양한 병 저항성 유전자를 가진 우수한 품종을 만들려는 노력이 이어지고 있지만 아직 상용화된 품종은 없다(Kim et al., 2011; Part et al., 2018).

이에 본 연구에서는 국립농업과학원 농업 유전자 자원센터에서 분양받은 7개의 *FOL* 균주를 이용하여 병원성을 검정하고, *avr2* 유전자를 분리, 동정하여 국내에서 문제시 되는 *FOL* race2를 선별하는 데 이용하고자 하였다. 또한, 토마토의 저항성 품종을 선발하고자 *FOL* race2 (*avr2*)를 접종한 후 병원성 정도와 *avr2*유전자의 발현 여부를 통하여 저항성 여부를 구별할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

Materials and Methods

공시 균주 및 배양 조건

국립농업과학원 농업유전자자원센터(Korea Agricultural Culture Collection [KACC])로부터 7개의 토마토 시들음병균(*FOL*) 40038, 40043, 40044, 40045, 40046, 40047, 40048을 분양받아 실험에 이용하였다. 각각의 *FOL* 균주들의 토마토에 대한 병원성을 조사하기 위해 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종한 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 7일 동안 배양하여 사용하였다.

식물 재료

토마토시들음병 감수성 품종 *Solanum lycopersicum* L. cv. Heinz 및 128개의 토마토 품종(cv. PCNU) 종자를 표면 소독 후 암 조건에서 4일간 발아시킨 다음 90 mm 개별 화분에 옮겨 24°C (16/8 hr, 주/야) 항온 조건으로 14 - 21일간 육묘한 2엽기 토마토 유묘를 사용하여 병원성 검정에 사용하였다.

토마토 시들음병균의 병원성 검정

토마토 시들음병의 병원성을 검정하기 위해 *S. lycopersicum* L. cv. Heinz 품종에 뿌리침지접종(root dip inoculation) 방법을 통해 7개의 *Fol* 병원균을 접종하였다(Rep et al., 2004). 각각의 *FOL* 균주의 포자를 potato dextrose broth (PDB) 배지에서 7일간 진탕 배양한 후, 균사를 제거하고자 4겹의 거즈를 이용하여 포자가 들어 있는 배양액을 수집하였다. 수집된 포자는 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 멸균수로 현탁한 후 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 포자의 농도를 측정하였다. 15일간 육묘한 토마토 식물체 뿌리의 흙을 증류수로 제거한 후 1×10^7 conidia·mL⁻¹ 농도의 포자 현탁액에 30분간 침지하였다. 1×10^7 conidia·mL⁻¹ 농도의 포자 현탁액에 침지한 토마토 식물체는 90 mm 화분에 정식하여 1일 동안 25°C 습실상에서 배양한 후 25°C 생육상에 옮겨 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 3주 동안 시들음병 발생 정도를 관찰하면서 재배하였다. 토마토 시들음병 발병도 조사는 도관의 갈변, 생육 억제 정도에 따라 매우 강함(+++), 중간(++), 약함(+) 그리고 무증상(-)으로 나누어 표시하였다. 모든 실험은 3 반복 이상으로 3회 실시하였으며 SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($p = 0.05$)를 실시하였다.

토마토 시들음병균 genomic DNA 추출

PDB 배지에서 2주 동안 배양한 *FOL* 균주의 균사체로부터 gDNA를 추출 방법을 modification하여 수행하였다(Saitoh et al., 2006). 각각의 *FOL* 균사체를 eppendorf tube (1.5 mL)에 약 10 mg씩 담아 액체질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄된 균사체 시료는 200 mM Tris HCl (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS를 포함하는 extraction buffer를 이용하여 gDNA를 분리하였다. 추출한 gDNA는 Simpliciano™ spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 측정 및 정량하고 최종 농도가 20 ng·μL⁻¹가 되도록 희석하였다.

avr2 유전자 증폭 및 클로닝

avr2 유전자를 클로닝 하기 위해 NCBI GenBank에서 *avr2* 염기서열을 이용하여 forward primer: 5'-TACATCGAT ACCACTATGCGTTTCCTTCTGC-3', reverse primer: 5'-TATGCGGCCGCTGCCACAGAATCAATCCTCTGA-3'를 제작하였다(Table 1). PCR 수행 조건은 pre-denaturation 과정으로 95°C에서 5분 반응을 1회, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 58°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초간 28 cycles를 연속 수행하였고, post-extension 과정은 72°C에서 5분간 반응을 1회 수행하였다. PCR 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였고 gel purification kit를 이용하여 정제한 뒤, TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 T-vector에 cloning 하였고, 염기서열을 분석하였다(Macrogen Inc., Seoul, Korea).

RT-PCR 분석

감염된 토마토 식물의 뿌리 또는 줄기를 채취한 후 즉시 액체 질소로 냉동한 후 실험에 이용하였다. 접종된 식물로부터 Trizol 시약 사용하여 전체 RNA를 추출하였다(Invitrogen, CA, USA). 또한 cDNA synthesis Master Mix 키트 (LeGene, CA, USA)를 사용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라 cDNA를 합성한 후, *avr2*-특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 토마토의 *LeEF1a* 유전자는 전사 수준을 모니터링하기 위한 대조군으로 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Primers used in this study.

Primer names	Sequences (5' - 3')
<i>avr2</i> F	TACATCGATACCACTATGCGTTTCCTTCTGC
<i>avr2</i> R	TATGCGGCCGCTGCCACAGAATCAATCCTCTGA
<i>LeEF1a</i> F ^z	GCTGCTGTAACAAGGTTTGCTTTAATTCG
<i>LeEF1a</i> R	CCAGCATCACACTGCACAGTTCACTTC

avr2, avirunce2.

^z *LeEF1a*, tomato elongation factor 1a.

Results and Discussion

avr2 유전자의 분리 및 동정

이 연구에서 이용된 7개의 *FOL* 균은 국립농업과학원 농업유전자 자원센터(KACC)로부터 분양받았다. 상기 7가지 *Fol* 균주로부터 *race2*를 분자적으로 판별하기 위하여 *avr2* 유전자를 분리하고 동정하고자 하였다. 7개의 *FOL* 균주에서 각각 gDNA를 추출하고 *avr2* 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 *avr2* 유전자 부위를 증폭시켰다(Table 1; Fig. 1A). 그중 4개의 균주(*Fol40038*, *Fol40043*, *Fol40044*, *Fol40045*)에서 492 bp의 크기의 유전자 단편이 분리되었고, 염기서열을 분석한 결과 기존에 알려진 *FOL* *race2*의 *avr2* 유전자와 100% 상동성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 나머지 3균주(*Fol40046*, *Fol40047*, *Fol40048*)는 *race1*으로 확인되었다. 분리된 *avr2*의 아미노산은 163개이고, PI 값은 6.4이며 분자량은 17.85이고 N-말단 부위에 21개의 signal peptide가 관찰되었다. 이는 식물체 감염 시에 단백질이 외부로 분비된다는 것을 보여주는 결과이다(Houterman et al., 2007). 또한, 이와 같은 결과는 다양한 *FOL* 균주에서 *avr2* 유전자의 존재 여부를 이용하여 *race2* 판별에도 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

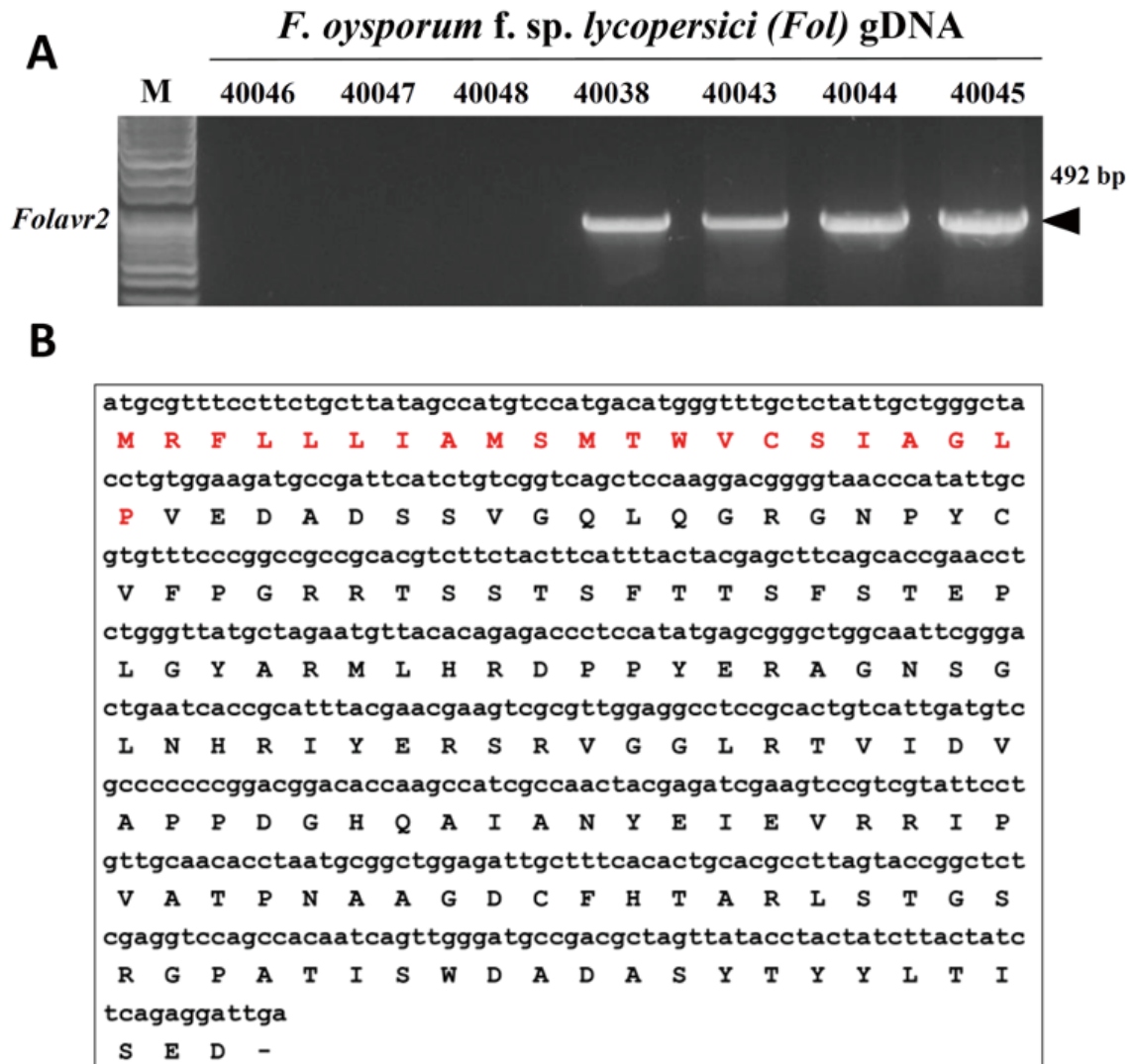


Fig. 1. Isolation and characterization of the *Folavr2* gene from 4 different *FOL* race2 isolates. (A) Specific primers were used to confirm *avr2* gene by PCR. 492 bp bands were detected in all 4 strains of *FOL* race2. (B) Nucleotide and amino acid sequence of the *avr2* gene. The signal peptide sequence is indicated with red letters.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) 균의 배양적 특성 및 병원성 검정

본 실험에 공시한 7개의 *FOL* 균은 국립농업과학원 농업유전자 자원센터(KACC)로부터 분양받았으며, 공시된 균주의 병원성 검정을 위해 재료 및 방법에 기술한 대로 PDA 배지와 PDB 배지에 배양 후 사용하였다. 특히, 본 실험에서는 *FOL* race2를 선발하여 *avr2* 유전자가 병원성에 영향을 주는지 확인하기 위해 앞서 그림 1에서 확인된 4개의 균주를 대상으로 배양적 특성 및 병원성 여부를 조사하였다(Fig. 2). 선발된 *FOL* race2 균주 중, *Fol*40043과 *Fol*40045균주의 경우에는 균일한 원형 모양으로 흰색의 균사가 퍼져나가 자란 모습을 확인할 수 있었다(Fig. 2B and 2D). 또한, *Fol*40044 균주의 균사는 중심부에서 가까운 쪽은 흰색, 먼 쪽은 보라색을 띠었으며(Fig. 2C),

*Fol*40038 균주의 균사는 짙은 보라색과 흰색의 균사 덩어리가 뭉쳐진 형태를 보였다(Fig. 2A). 포자를 형성시키기 위해 액체 배양한 결과, 4 균주 모두 짙은 보라색의 색소를 보였지만 색소 농도의 차이가 병원성에 영향을 미치지 않는 것으로 보였다(Fig. 2). 또한, 4개 균주의 포자는 모두 소형 분생 포자로 무색의 계란 모양이거나 타원형의 형태를 보였으며, 포자가 발아한 후 균사 성장에는 큰 차이가 없었다.

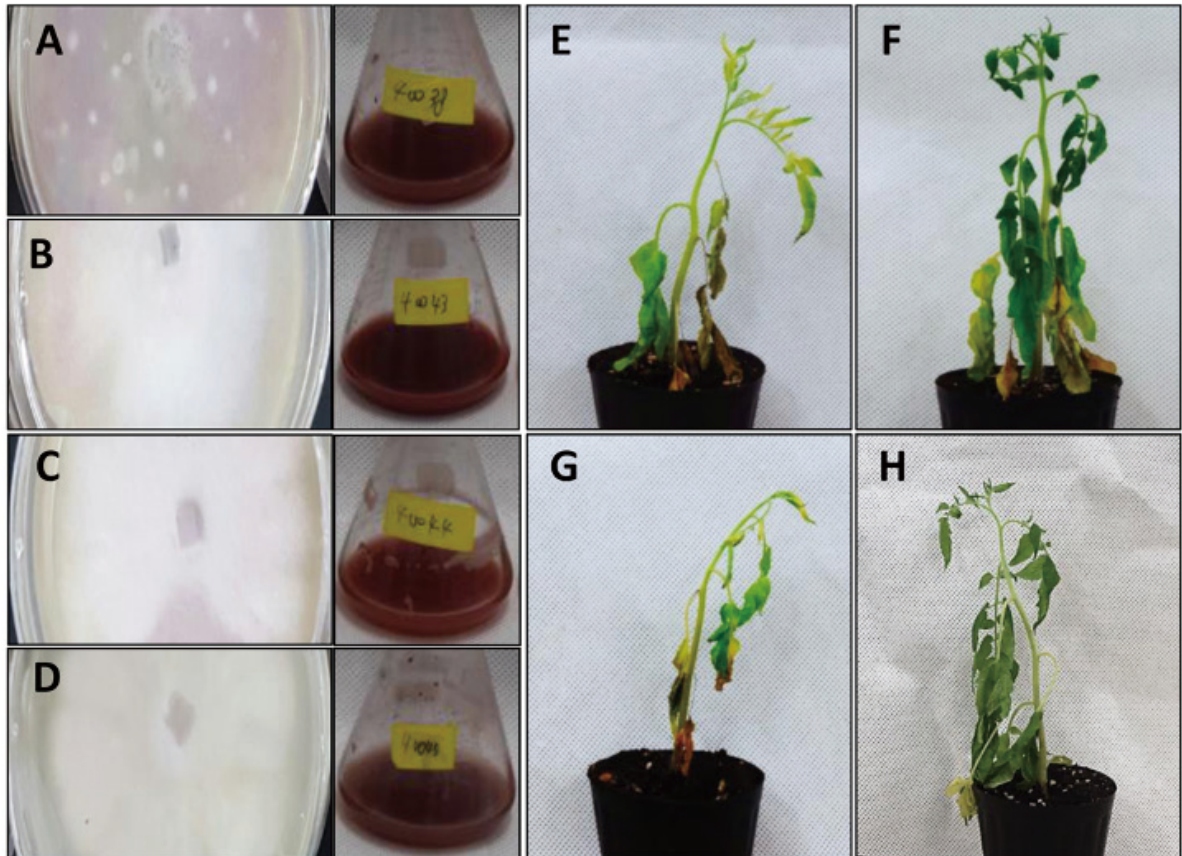


Fig. 2. Colony morphology and symptoms on tomato plants after 4 selected *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*) race2. Colonies on potato dextrose agar (PDA) (A - D). Pathogenicity test of 4 *FOL* isolates on tomato seedlings (cv. Heinz). Two-week-old tomato cv. Heinz plants were inoculated with 1×10^7 conidia·mL⁻¹ by root-dip inoculation method for 30 min. Typical disease symptoms after inoculation of tomato plants with 4 *FOL* isolates(E - H). These photographs were taken 21 days after inoculation (A, E) *Fol* 40038 (B, F) *Fol* 40043 (C, G) *Fol* 40044, (D, F) *Fol* 40045.

FOL 균이 기주 식물에 침투하게 되면 잎의 색이 갈색으로 변하고, 잎이 시들다가 점차 식물체가 전체적으로 시들게 되며 결국은 고사한다(Houterman et al., 2009). 그러나 저항성 유전자(*I* gene)를 가지고 있는 토마토 품종은 *FOL*의 감염에도 발병하지 않는 것으로 알려져 있다. 토마토 I 단백질은 *FOL* 균이 가지고 있는 비병원성(*AVR*) 단백질을 인식하여 저항성 면역 반응을 유도하게 하는 것이다. 그 중에서도 토마토의 *I2* 저항성 유전자는 *FOL* race2에서 분비하는 *AVR2* 단백질을 인식하여 저항성 반응을 일으키지만, *I2* 유전자가 없는 감수성 기주에서는 *avr2*가 병을 일으키는 병원성 요소로 알려져 있다(Ma et al., 2013).

본 실험에서는 공시한 7개의 *FOL* 균주를 이용하여 토마토 시들음병의 병원성 정도를 조사하고, race2에 해당하는 대표 균주를 선별하고자 하였다. 병원성 조사를 위해 감수성 토마토 품종인 *S. lycopersicum* L. cv. Heinz를 이용하여 뿌리침지접종(root-dip inoculation)법을 통해 병원성을 검정하였다. 병 발생 정도는 3단계 ([+] = slightly bent hypocotyl and yellowing; [++] = strong bending of the stem and yellowing; and [+++] = plant either dead or wilted)로 나누어 표로 나타내었다(Table 2).

그 결과, 표2에 나타난 것과 같이, *Fol40048*균주는 약한 병원성을 보였고 *Fol40043*, *Fol40045*, *Fol40046*과 *Fol40047*균주는 중간 정도의 병원성을 보여주었으며, 강한 병원성을 보여주는 것은 *Fol40038*과 *Fol40044* 균주로 확인되었다.

Table 2. Results of the pathogenicity test of 7 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) strains using the susceptible tomato cultivar (*Solanum lycopersicum*).

<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> isolates (KACC No.)	Race	Disease index ²
<i>Fol</i> 40046	Race 1	++
<i>Fol</i> 40047	Race 1	++
<i>Fol</i> 40048	Race 1	+
<i>Fol</i> 40038	Race 2	+++
<i>Fol</i> 40043	Race 2	++
<i>Fol</i> 40044	Race 2	+++
<i>Fol</i> 40045	Race 2	++

KACC, Korea Agricultural Culture Collection.

² Disease index was scored on a scale of (+) to (+++), where (+) = slightly bent hypocotyl and yellowing; (++) = strong bending of the stem and yellowing; and (+++) = plant either dead or wilted.

FOL 균주를 접종 시킨 감수성 품종인 Heinz는 모두 잎이 갈색으로 변하였고, 전형적인 토마토 시들음 증상을 보여주었으며, 병원균의 재분리를 통해서 감염 여부를 확인할 수 있었다(Fig. 2E - 2H). 그 중에서도 *FOL* race2 균주 중 *Fol40044*를 접종한 토마토에서 잎이 갈색으로 변한 정도와 잎이 시들어 있는 정도가 가장 심각하였고, 잎이 시들면서 밑으로 떨어져서 가지에 남아 있는 잎의 수가 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있다(Fig. 2G). 이러한 병원성 검정 실험 결과를 통해, 우리는 *FOL*의 race2가 race1보다 좀 더 강한 병원성을 가지고 있으며 그 중에서도 *Fol40044* 균이 좀 더 강하게 병을 유발하게 시킬 수 있다고 결론을 내렸다(Fig. 2G). 그러나 공시한 7가지 균주는 배양적, 형태학적으로는 뚜렷하게 구분되지 않지만, 병원력에는 다소 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 2; Table 2).

***FOL* *avr2* 유전자 발현을 이용한 토마토 저항성 품종 선별**

FOL 균에서 분비한 effector 단백질은 I2와 상호작용하여 저항성 면역 반응을 유도하는데(Houterman et al., 2008), 그 과정에는 SIX5 (secreted in xylem5, AVR2) 단백질이 필요하다는 사실이 밝혀져 있다(Ma et al., 2015; Cao et al., 2018). SIX5 단백질은 *FOL* 균이 기주에 침입할 때, 관 조직에서 분비하는 다양한 effector 중 하나로, AVR2가 세포와 세포 사이를 이동하는 것에 관여하기 때문에 I2와의 상호작용을 통한 저항성 면역 반응 유도에 중요한 역할을 한다. 이러한 *avr2*는 I2 유전자가 없는 감수성 식물에서는 병을 유발하는 병원성 인자로 역할을 하므로, 본 실험에서는 race2로 확인된 *Fol40044*균주를 토마토에 접종한 후 감염 여부를 확인하기 위한 표지로 사용하고자 하였다. 뿌리침지접종방법을 사용하여 *Fol40044*균주를 128개 서로 다른 토마토품종에 접종하였고, 그중 4품종에 대한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. *FOL* 균에 대한 대조품종으로는 감수성 품종인 Heinz를 사용하였다. 결과를 종합해 볼

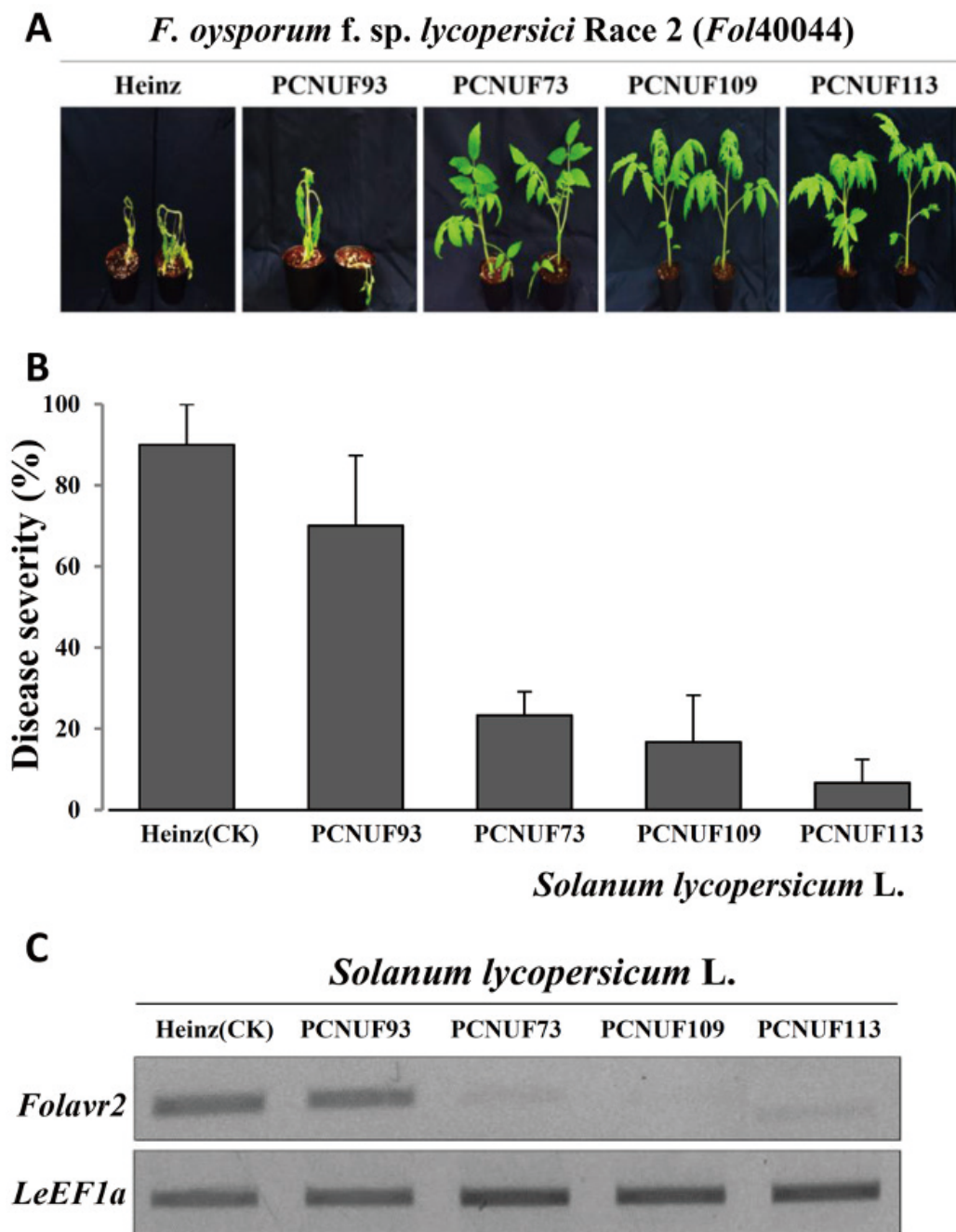


Fig. 3. Validation of Fusarium wilt disease by *FOL* race2 infection in tomato plants. (A) Two-week-old 4 tomato cultivars were inoculated with *Fol40044* (race2). Susceptible cultivar, Heinz, was used as a control. Typical disease symptoms after inoculation of tomato plants with *FOL* race2. Three resistant and one susceptible tomato plants were shown. Photograph of symptoms were taken 21 days after inoculation (DAI). (B) Disease severity was scored by the mean percentage of ten plants of each cultivar. The error bar indicates a standard deviation. (C) Semi-RT-PCR of *Fol40044* (race2) colonization levels in tomato plants. Total RNA isolated from infected plants of tomato at 21 DAI. *LeEF1a* was used to confirm equal total RNA amounts among samples. *LeEF1a*, Tomato *Elongation Factor 1a*.

때 PCNUF93 품종이 감수성으로 밝혀져 있는 Heinz와 유사한 정도의 병징을 보여주었고, 접종 후 21일째 식물체가 전체가 고사하였다(Fig. 3A). 반면에 PCNUF73, PCNUF109 및 PCNUF113 품종은 접종 후 21일이 지난 후에도 병징이 없이 접종하기 전의 건전한 상태를 그대로 유지하였다(Fig. 3A). 이러한 결과로 PCNUF93이 가장 감수성이었으며, PCNUF113 품종이 *FOL* race2의 접종에 대하여 가장 저항성이 높은 것으로 판단하였다(Fig. 3B).

마지막으로 *Fol40044* 균주가 토마토 식물 체내에 침입 및 정착이 되었는지를 확인하기 위해 접종된 토마토 품종의 지체부 부근 줄기와 하엽에서 *avr2* 유전자 발현 여부를 조사하였다. 그 결과 감수성 품종인 Heinz 및 PCNUF93에서는 *avr2* 유전자가 매우 강하게 발현되었고 나머지 3개의 품종에서는 매우 약하게 발현되는 것으로 확인되었고 특히 *Fol40044* 균주를 접종한 결과 저항성 품종으로 확인된 PCNUF73, PCNUF109와 PCNUF113에 저항성 유전자인 *I-2*가 존재할 것으로 추정할 수 있다(Fig. 3C). 이는 AVR2와 *I-2* 유전자와의 상호 작용에 의해 병원균의 증식과 확산이 제한되는 것으로 알려져 있기 때문이다(van der Does et al., 2018). 따라서, 본 연구결과는 토마토시들병에 대한 저항성 품종을 선발할 때 *avr2* 유전자의 발현을 표지로 이용하여 선발이 가능할 것으로 기대된다. 또한 저항성을 보인 3개의 품종(PCNUF73, PCNUF101, PCNUF113)으로부터 *I2* 유전자를 발굴하고 AVR2 유전자와의 분자생물학적 상호작용 연구를 통해 저항성 기작을 규명할 수 있을 것으로 생각된다.

Conclusion

본 연구에서는 국립농업과학원 농업유전자자원센터(KACC)로부터 분양받은 7개의 *FOL* 균주를 이용하여 병원성을 검정하고 *FOL* race2를 선별하는 데 이용하고자 하였다. *FOL*에 대한 감수성 품종 *Solanum lycopersicum* L. cv. Heinz를 이용하여 병원성이 가장 큰 *Fol40038*과 *Fol40044* 균주를 선발하였고 *avr2* 유전자를 분리, 동정하였다. 20개의 토마토 품종을 이용하여 *Fol40044*를 접종하고 *avr2* 유전자의 발현 여부를 분석하여 병원성 정도를 평가하였고 그 중 총 3개의 저항성 토마토 품종(PCNUF73, PCNUF101, PCNUF113)을 선발하였다. 3개의 저항성 토마토에서 *avr2* 유전자의 발현을 조사한 결과, 대조구인 Heinz 품종보다 훨씬 낮은 발현을 보였다. 본 연구결과는 토마토시들음병에 대한 저항성 품종을 선발할 때 *avr2* 유전자를 표지로 하여 발현 정도를 평가하게 되면 매우 효율적인 것으로 판단되며, 또한 저항성을 보인 3개의 품종으로부터 *I2* 유전자를 발굴하고 AVR2 유전자와의 분자생물학적 상호작용 연구를 통해 저항성 기작을 규명할 수 있는 기초연구가 될 수 있을 것으로 사료된다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

이 연구는 충남대학교 연구우수장학금에 의해 지원되었음.

Authors Information

Mi-Reu Kim, Chungnam National University, Applied Biology, Master

Jeong Jin Lee, Chungnam National University, Applied Biology, Master student

Jiyoung Min, Chungnam National University, Applied Biology, Research Professor

Sun Ha Kim, Chungnam National University, Applied Biology, Doctor of Philosophy
Dae-Gyu Kim, Chungnam National University, Applied Biology, Master
Sang-Keun Oh, <https://orcid.org/0000-0002-6538-9200>

References

- Alexander LJ, Tucker CM. 1945. Physiological specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Agricultural Research* 70:303-313.
- Amini J, Sidovich D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50:172-178.
- Bohn GW, Tucker CM. 1939. Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. *Science* 89:603-604.
- Cao L, Blekemolen MC, Tintor N, Cornelissen BJC, Takken FLW. 2018. The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 effector pair alters plasmodesmatal exclusion selectivity to facilitate cell-to-cell movement of Avr2. *Molecular Plant* 11:691-705.
- Davies JML, 1982. *Verticillium* and *Fusarium* wilt of tomato. p. 6. Ministry of Agriculture, Fishery and Food, Northumberland, UK.
- De Lamo FJ, Constantin ME, Fresno DH, Boeren S, Rep M, Takken FLW. 2018. Xylem sap proteomics reveals distinct differences Between R gene- and Endophyte-mediated resistance Against *Fusarium* wilt disease in tomato. *Frontiers in Microbiology* 9:2977.
- Di X, Gomila J, Ma L, van den Burg HA, Takken FLW. 2016. Uptake of the *Fusarium* effector Avr2 by tomato is not a cell autonomous event. *Front Plant Science* 7:1915.
- Gabe HL. 1975. Standardization of nomenclature for pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Transactions of the British Mycological Society* 64:156-159.
- Gawehns F, Cornelissen BJ, Takken FLW. 2013. The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microbe Biotechnology* 6:223-229.
- Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78:51-65.
- Houterman PM, Cornelissen BJ, Rep M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens* 4:e1000061.
- Houterman PM, Ma L, van Ooijen G, de Vroomen MJ, Cornelissen BJ, Takken FLW, Rep M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant Journal* 58:970-978.
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, de Koster CG, Cornelissen BJ, Rep M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology* 8:215-221.
- Huang CC, Lindhout P. 1997. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica* 93:145-153.
- Hur OS, Ro NY, Ko HC, Kim SG, Rhee JH, Gwag JG, Oh SJ. 2012. Screening for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 using molecular marker in tomato germplasm. *Research in Plant Disease* 18:304-309. [in Korean]
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. 1991. Compendium of tomato diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kim HJ, Lee HR, Hyun JY, Won DC, Hong DO, Cho H, Lee KA, Her NH, Lee JH, Harn CH. 2011. Application of disease resistance markers for developing elite tomato varieties and lines. *Horticultural Science & Technology* 29:336-344. [in Korean]
- Li J, Chitwood J, Menda N, Mueller L, Hutton SF. 2018. Linkage between the I-3 gene for resistance to *Fusarium* wilt race 3 and increased sensitivity to bacterial spot in tomato. *Theory Apply Genetics* 131:145-155.

- Ma L, Cornelissen BJ, Takken FLW. 2013. A nuclear localization for *Avr2* from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. *Front Plant Science* 4:94.
- Ma L, Houterman PM, Gawehns F, Cao L, Sillio F, Richter H. 2015. The *AVR2-SIX5* gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytology* 208:507-518.
- McGrath DJ, Gillespie D, Vawdrey L. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Australian Journal of Agricultural Research* 38:729-733.
- Mes JJ. 1999. Molecular aspects of the interaction between tomato and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands.
- Michielse CB, Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10:311-324.
- Park GR, 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 JS. 1958. Fungus disease of plants in Korea (I). *College of Agric., Chungnam National University Bulletin* 1:62. [In Korean]
- Park MS, Jang KS, Choi YH, Kim JC, Choi GJ. 2013. Simple mass-screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Horticultural Science and Technology* 31:110-116. [in Korean]
- RDA (Rural Development Administration). 2020. Tomato. RDA, Suwon, Korea. [in Korean]
- Rep M, Meijer M, Houterman PM, van der Does HC, Cornelissen BJ. 2005. *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant Microbe Interaction* 18:15-23.
- Rep M, van der Does HC, Meijer M, van Wijk R, Houterman PM. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol* 53:1373-1383.
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T. 2006. A simple method for a mini preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology* 72:348-350.
- Schmidt SM, Houterman PM, Schreiber I, Ma L, Amyotte S, Chellappan B, Boeren S, Takken FLW, Rep M. 2013. MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* 14:119.
- Simons G, Groenendijk J, Wijbrandi J, Reijans M, Groenen J, Diergaarde P, Van der Lee T, Bleeker M, Onstenk J, de Both M. 1998. Dissection of the fusarium I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10:1055-1068.
- Takken FLW, Suzan RL, GabrieÈls HEJ, Westerink N, Lu R, de Wit PJGM, Joosten MHJ. 2000. A functional cloning strategy, based on a binary PVX-expression vector, to isolate HR-inducing cDNAs of plant pathogens. *The Plant Journal* 24:275-283.
- Takken F, Rep M. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 11:309-314.
- van der Does M, Knippertz P, Zschenderlein P, Giles Harrison R, Stuuft JBW. 2018. The mysterious long-range transport of giant mineral dust particles. *Science Advances* 4:eaau2768.