토마토 MABC 육종에서 GBS(genotyping-by-sequencing)에 의한 RPG(recurrent parent genome) 회복률 분석

김종희 · 정유진 · 서훈교 · 김명권 · 노일섭 · 강권규

Recurrent parent genome (RPG) recovery analysis in a marker-assisted backcross breeding based on the genotyping-by-sequencing in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

Jong Hee Kim · Yu Jin Jung · Hoon Kyo Seo · Myong-Kwon Kim · Ill-Sup Nou · Kwon Kyoo Kang

Received: 7 June 2019 / Revised: 5 July 2019 / Accepted: 8 July 2019
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Marker-assisted backcrossing (MABC) is useful for selecting an offspring with a highly recovered genetic background for a recurrent parent at early generation to various crops. Moreover, marker-assisted backcrossing (MABC) along with marker-assisted selection (MAS) contributes immensely to overcome the main limitation of the conventional breeding and it accelerates recurrent parent genome (RPG) recovery. In this study, we were employed to incorporate *rin* gene(s) from the donor parent T13-1084, into the genetic background of HK13-1151, a popular high-yielding tomato elite inbred line that is a pink color fruit, in order to develop a *rin* HK13-1084 improved line. The recurrent parent genome recovery was analyzed in early

generations of backcrossing using SNP markers obtained from genotyping-by-sequencing analysis. From the BC₁F₁ and BC₂F₁ plants, 3,086 and 4868 polymorphic SNP markers were obtained via GBS analysis, respectively. These markers were present in all twelve chromosomes. The background analysis revealed that the extent of RPG recovery ranged from 56.7% to 84.5% and from 87.8% to 97.8% in BC₁F₁ and BC₂F₁ generations, respectively. In this study, No 5-1 with 97.8% RPG recovery rate among BC₂F₁ plants was similar to HK13-1151 strain in the fruit shape. Therefore, the selected plants were fixed in BC₂F₂ generation through selfing. MAS allowed identification of the plants that are more similar to the recurrent parent for the loci evaluated in the backcross generations. MABC can greatly reduce breeding time as compared to the conventional backcross breeding. For instance, MABC approach greatly shortened breeding time in tomato.

Keywords Background recovery, Molecular marker, *rin* tomato, Single nucleotide polymorphism (SNP), Tomato elite line

[†]These authors contributed equally to this work.

J. H. Kim[†] · Y. J. Jung[†] · H. K. Seo · K. K. Kang (✉)
한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Life Science, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

Y. J. Jung · K. K. Kang
한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)

M.-K. Kim
주)토마토연구소
(Tomato Research Center, Cheongju 28112, Korea)

I.-S. Nou
순천대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea)

서 언

분자 육종은 형질에서 유래한 표현형의 관찰 없이 DNA 염기서열의 차이를 보이는 분자 마커(Molecular marker)를 이용하여 원하는 형질의 유무를 판별하는 기법으로 전통적 선발 육종 방법에 비해 육종 연한을 단축시키고 우량 개체 선

발 효율을 극대화시킬 수 있는 장점을 지니고 있다(Edwards and Batley 2010).

최근 들어 가장 대표적인 분자마커 중의 하나인 단일 염기서열 다형성(Single nucleotide polymorphism: SNP)은 DNA 염기서열에서 일어나는 단일 염기의 변이로 유전체 전체적으로 가장 빈번하게 나타나며, 안정적으로 이용할 수 있는 장점이 있다. 이러한 장점 때문에 식물과 동물의 다양한 유전 연구와 응용이 가능하여 많은 연구가 이루어지고 있다(Gupta et al. 2001; Kim and Misra 2007). 인간은 평균 1,000개 염기서열 당 1개의 SNP가 1개씩 존재하는 것으로 알려져 있으며(Wang et al. 1998), 토마토에서는 1,647개의 염기서열 당 1개의 SNP가 존재하는 것으로 보고되었다(Van Deynze et al. 2007). 최근 여러 작물에서 NGS (Next generation sequencing)를 통해 해독된 유전체 정보를 기반으로 한 genome-wide SNPs 발굴로 대량의 분자마커를 확보하고 있다(Chagné et al. 2012; Hyten et al. 2010; Trebbi et al. 2011). 또한 SNP는 컴퓨터를 활용한 *in silico* 분석을 통해 의학분야와 농업분야에 중요한 유전자를 확인할 수 있는 유용한 MAB (Marker assisted backcrossing) 마커로 사용되는 등 그 활용 범위가 확대되고 있다(An et al. 2010; Cuesta-Marcos et al. 2010; Xu et al. 2012).

토마토(*Solanum lycopersicum* L.)는 세계적으로 채소 작물 중 가장 많이 생산되고 소비되는 경제적 가치가 높은 채소일 뿐만 아니라, 가지과 작물의 육종 모델로 이용되고 있다(Foolad 2007). 2003년부터 시작된 국제 ‘가지과 유전체 컨소시엄’을 통해 토마토의 유전체 해독이 완료되었고, 뿐만 아니라 다양한 유전체 정보(Consortium 2012)와 주요 육종 형질 관련 분자마커, 유전자 지도 등 유전적 정보를 제공 받을 수 있게 되었다(Fulton et al. 2002; Shirasawa et al. 2010). 국내 토마토 산업은 2007년을 정점으로 현재까지 신종 병충해, 외래 도입 품종, 고유가로 인한 경영비 상승과 소비정체로 침체를 겪고 있는 상황이다. 최근 출범한 ‘골든씨드 프로젝트’를 통해 국내산 토마토 품종의 점유율을 높이고 종자 수출 확대를 도모하고자 다양한 유전자원을 확보하고, 평가를 통해 유용 육종 소재를 확충하고자 노력하고 있으며, 최근에는 NGS를 이용한 대용량 시퀀스 생산이 가속화되면서 다양한 육종 소재에 대한 sequencing을 통해 유전적 다형성을 탐색하고, 유용 육종 소재로 이용하기 위한 연구의 중요성이 대두되고 있다(Chagné et al. 2012; Hyten et al. 2010; Lin et al. 2014; Shirasawa et al. 2013; Trebbi et al. 2011; Xu et al. 2013). 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS)의 끊임없는 발전에 따라 GBS (genotyping by sequencing) 분석은 SNP 검증 방법에 이용되고 있다. GBS는 유전자 연관지도 작성, 유전체연관분석(Genome-wide association study, GWAS)을 통한 형질연관 유전자 탐색, MAS와 MABC용 분자마커 선발, 그리고 유전적 다양성 분석을 통한 유전집단 구조 분석 및 품종식별용 마커 개발 등 다양한 분야에서 활발히 사용되고 있다(Elshire et al. 2011; Glaubitz et al. 2014; He et al. 2014).

본 연구에서는 저장성이 강한 *rin*계 대과종 품종 육성을 위해 반복친 HK13-1151과 donor친 T13-1084을 사용하여 BC₁F₁ 및 BC₂F₁ 세대를 육성하여 *rin* 유전자를 가진 HK13-1151 엘리트 계통을 육성하고자한다. 따라서 MABC 육종 과정에서 GBS를 이용하여 반복친 계통(RPG) 회복률, 선발 효과 및 유용성 등에 대해 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 민간육종회사 주)토마토연구소의 토마토 육종프로그램으로 개발된 엘리트 계통 HK13-1151과 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 저장성이 강한 *rin* 유전자를 가진 T13-1084 계통을 사용하였다. F₁식물은 HK13-1151 계통(recurrent parent)을 모친으로 T13-1084 계통(donor parent)을 화분친으로 교배하였다. 그리고 BC₁F₁ 종자는 F₁ 식물을 HK13-1151과 여교배 하였다. BC₁F₁ 세대에서 유전자를 위한 foreground 선발은 Kim 등(2013)이 보고한 ripening inhibitor 유전자내 SCAR 분자 마커를 이용하였다. BC₁F₁ 세대에서 목표 유전자 (Rr)을 가지며, 반복친 계통이 가장 높게 background 마커가 회복되고, 표현형적으로 가장 유사한 식물체를 선발하여 HK13-1151으로 여교배하고, BC₂F₁ 종자를 육성하였다. 각각의 여교배 세대에서는 엘리트 계통과 함께 foreground, background 및 표현형 선발을 수행하였다. 또한 BC₂F₁에서 선발한 개체는 BC₂F₂ 및 BC₂F₃ 세대를 진전시켜 최종 육종소재로 이용하였다. 모든 토마토 육묘는 50공 트레이에 멸균한 토양을 이용하여 27°C에서 18시간 명조조건 및 18°C에서 6시간 암조건의 생장상에서 생육시킨 후, 8매 잎 상태일 때 한경대학교 원예생명과학과 온실에 옮겨 생장시켰다.

Foreground 선발

Rin/rin 관련 유전자형을 동정하기 위하여 Kim 등(2013) 보고한 SCAR 마커를 이용하였다. DNA 추출을 위한 잎 샘플링은 발아 후 21일 육묘로부터 수행하였다. 계통 DNA는 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)법을 사용하여 추출하였다(Saghai-Marroof et al. 1984). DNA 농도는 Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)으로 측정하였으며, 최종농도는 TE buffer (pH 7.0)을 이용하여 20ng μ l⁻¹로 조정하여 사용하였다. DNA의 순도 및 양의 체크를 위해 1% agarose 겔에서 전기영동을 통해 확인한 후에 수행하였다. PCR 반응 조성액은 10 × buffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM forward primer (Rin-F: 5'-AAGTGTACAATATAGACATGAACAGCCTTCT-3'), reverse primers (Rin-R1: 5'-CCATACT

CTTCTTGACAATAAATATATCACAAT-3', Rin-R2: 5'-AAAGCAACTTCAGCATCACA-3'), 40ng genomic DNA, and 0.5U Taq DNA polymerase (Genet Bio Inc., Korea)를 혼합하여 20 µl로 조정하여 사용하였다. PCR 증폭반응은 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)를 이용하였고, 반응 조건은 94°C에서 2분 denaturation 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분의 세 과정을 35회 반복 수행하였다. 그리고, 72°C에서 10분 elongation을 마지막 단계로 진행하였다. PCR 산물은 EtBr로 염색한 1% agarose gel상에서 200 V로 40분 전기영동하였다. 다형성은 UV transilluminator에서 분석하였다.

GBS를 통한 NGS 데이터 생산

양친, F₁, F₂, BC₁, BC₂ 세대의 유묘로부터 얻어진 본엽 3~4매를 액체질소 처리후 막자사발로 마쇄한 뒤, GeneAll@Gene Ex^{TM} Plant kit (GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea)를 이용하여, 농도 100µg/µl, 순도 260/280=1.8~2.0, 260/230=1.6 이상인 genomic DNA를 추출하여, 정량화 하였다. 추출된 DNA sample의 adapter ligation을 위해, 제한효소 ApeKI을 이용하여 75°C에서 2시간 동안 digestion 하였다. 이후 96-well plate에 1.66 x ligase buffer, ATP와 T4 ligase가 포함된 solution을 처리하여 adapter ligation을 수행하였고, DNA sample들을 pooling한 후 QIAquick PCR Purification kit로 clean up 하고, PCR을 95°C에서 2분간 반응 후, 98°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초 (18 cycles), 72°C에서 5분의 조건으로 수행하였다. GBS library의 염기서열 분석은 Hiseq2000 (Illumina Inc, San Diego, CA, USA)을 이용하여 수행하였다.

SNP 탐색 및 background 분석

Barcode sequence 정보를 이용하여 demultiplexing 후, adapter sequence 제거 및 sequence quality trimming을 하였다. Cutadapt (v.1.8.3) 프로그램을 이용하여 adapter trimming을 수행하였고, SolexaQA (v.1.13) package의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 이용하여 trimming 및 quality control을 다음의 조건에 따라 수행하였다 1) Probability value ≥ 0.05 , 2) Phred score ≥ 20 , 3) minimum length of reads ≥ 25 bp. 전처리 과정을 거친 read들의 mapping은 BWA (0.6.1-r104) 프로그램을 이용하여 ICuGi에서 얻은 표준유전체 정보(Cirullus lanatus cv. 97103)를 바탕으로 수행한 후 SNP 탐색을 위한 SAM format file을 제작하였다. SEEDERS in-house script를 이용하여 SNP validation을 수행한 후, SAMtools (v.0.1.16)을 이용하여 SNP filtering (min.depth ≥ 3 , MAF>5%, missing data<30%)을 한 후 SNP matrix를 작성하였다. 이후 SEEDERS in-house script를 활용하여, reference gene position (ICuGi)을 기반으로 SNP annotation을 수행하고, SNP filtering과 genotyping 조건(reference

sequence와 동일한 homozygous -'A' 다른 homozygous -'B', heterozygous -'B', missing -'-')에 부합하는 genotype 데이터를 완성하였다.

통계분석

Foreground 선발에서 rin 마커로 분석하여 얻어진 결과는 HK13-1151 유래 RR형, T13-1084 유래 rr형, 이종접합체 Rr형으로 표시하였다. 카이자승 분석은 공식, $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$, 여기에서 O는 관찰치, E는 기대치 값으로 계산 하였다. Background 선발에서 마커로 부터 얻어진 데이터는 Graphical Genotyper (GGT 2.0) 소프트웨어에 의해 분석하였다. 반복친과 같은 homo 대립 유전자, donor친과 같은 homo 대립유전자 그리고 헤테로 대립유전자는 각각 A, B 및 H로 각각 표시하였다. 이들 데이터는 Microsoft Excel file에 넣어 GGT 2.0 소프트웨어에 의해 분석하여, 반복친 호모마커 페센트(% RR), donor 대립유전자 페센트(% rr), 헤테로 페센트(% Rr)를 계산하였으며, 반복친 HK13-1151 계통과 여교배에 의해 선발된 rin 계통들 사이의 표현형 데이터를 수치화 하였다.

결과 및 고찰

토마토 반복친 엘리트 HK13-1151 계통의 특성

저장성이 강한 대과종 토마토 육성을 위해 사용한 엘리트 계통은 2014년부터 주)토마토연구소에서 육성한 것을 이용하였다. 또한 HK13-1151은 pink계 편구형 토마토이며 평균 과중은 260 g이고 토마토황화잎말림 바이러스(TYLCV)의 Ty1, Ty3 유전자, 토마토모자이크 바이러스(ToMV)의 Tm2a 유전자, 시들음병(*Fusarium*)의 F₂ 유전자, 근부위조병(*Fusarium radialis*)의 Fr 유전자, 뿌리혹선충(Nematode)의 N 유전자, 반신위조병(*Verticillium*)의 Ve 유전자, 잎곰팡이병(*Cladosporium*)의 Cf 유전자, 토마토 앞마름 역병(*phytophthora infestans*)의 Ph3 유전자 및 토마토 반점시들병(*spotted wilt virus*)의 Sw5 유전자 등을 지니고 있는 복합내병성 계통이다 (Table 1).

rin 유전자를 이용한 foreground 선발

F₁ 종자는 HK13-1151 계통과 T13-1084 계통 간 교배를 통해 생산하였으며, F₁ 식물체는 selfing에 의해 F₂종자를 육성하여 이용하였다. F₁ 및 F₂세대에서 Rin SCAR 마커를 이용하여 foreground 선발을 위한 유효성분석을 조사하였다. Rin SCAR 마커의 경우, 이 프라이머를 PCR에 적용한 결과는 Rin-F와 Rin-R1은 800 bp, Rin-F와 Rin-R2는 1500 bp 밴드를 도

Table 1 Morphological character and disease resistance of HK13-1151 and T13-1084 inbred line used for the tomato marker assisted backcrossing program

Line	Growth habit	Maturity days	Fruit shape	Av. fruit weight (g)	Fruit color	Shoulder color*	Firmness**	Brix°	Disease resistance***
HK13-1151	Indeterminate	100-110	Cylindrical	300.5	Pink	G	F	6.0	Ty1, Ty3, Tm2a, F2, F3, Fr, Ve, N, Cf, Ph3, Sw5
T13-1084	Indeterminate	90-110	Cylindrical	201.3	rin	U	FF	5.0	Tm2a, F2, N, Cf, Sw5

*Shoulder color: U (uniform), G (green), **Firmness : MF (medium firm), F (firm), FF (very firm), ***Disease resistance : Ty1 and Ty3 (Tomato yellow leaf curl virus), Tm2a (Tomato mosaic virus), F2 (*Fusarium* race 2), F3 (*Fusarium* race 3), Fr (*Fusarium radialis*), Ve (*Verticillium*), N (Nematode), Cf (*Cadosporium*), Ph3 (*Phytophthora infestans*), Sw5 (Tomato spotted wilt virus)

Table 2 Genotyping results of the foreground selection in backcross population of HK13-1151 x T13-1084

Population	Generation	Number of plant				Expected ratio	χ^2	P-value
		Total	RR	Rr	rr			
HK13-1151 x T13-1084	BC ₁ F ₁	100	58	42	-	1:1	0.75	0.25<P<0.50
	BC ₂ F ₁	192	90	102	-	1:1	2.56	0.10<P<0.25

출하면서 RR, Rr, rr 계통을 구별하는 공우성 분자표지가 확보되었으며 F₂ 집단에서 1: 2: 1로 분리되었다(Table 2). 또한 분리된 식물체의 성숙한 과일을 조사하였을 경우, rr의 유전자형은 그린의 과실을 가진 것으로 미루어 볼 때, 저장성을 가진 토마토육성을 위한 여교배용 foreground 선발 마커로 활용 가능하다고 판단되었다.

BC₁F₁ 세대의 유전자형분석

Foreground 선발을 위해 헤테로 집합체를 가진 F₁ 식물은 HK13-1151 계통과 여교배하여 100개의 BC₁F₁ 식물체를 육성하였다. BC₁F₁ 세대에서 *rin* 마커를 이용하여 foreground 선발한 결과 카이자승 실험을 통해 BC₁F₁ 세대에서 1:1으로 잘 분리되었다(Table 2). 조사한 100개의 BC₁F₁ 식물체 중에서 *Rinrin* 형은 42개였다. 선발한 42개 식물체들을 포장에 옮겨 표현형을 조사한 결과 모두 pink계 과실을 보였다. 이들 계통들의 total DNA를 추출하여 *ApeKI*로 소화한 후 GBS library를 구축하고, NGS에 의해 sequencing 데이터를 얻었다. BC₁F₁ 세대에서 GBS를 통해 총 3086개의 SNP가 다형을 보였다(Table 3, Fig. 1). 이를 토대로 각각의 계통에서 dornor친 유래의 게놈이라고 생각되는 heterozygote SNP를 데이터화 하였다. 그 결과 BC₁F₁ 세대에서 반복친(RPG) 회복 비율은 56.7%에서 84.5%의 범위를 보였으며, 평균 70.8%였다(Fig. 2). 이들 수치는 멘델의 법칙에 따른 반복친 게놈의 회복률의 이론치 75%에 미달되었다. Randhawa 등(2009)의 보고에 의하면 여교배 후대의 background 마커는 염색체상의 거의 동등한 거리로 약 20cM가 적당하며, BC₁F₁세대에서 91.5%의 RPG회복률을 가진 개체를 선발했다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 3086개의 GBS 유래 SNP의 genotyping 결과로 마커 수가

Table 3 Number of polymorphic SNP per 12 chromosome obtained from GBS experiments according to the individual plants of each generation

Chromosome	BC ₁ F ₁	BC ₂ F ₁
	No. of polymorphic SNP	No. of polymorphic SNP
chr00	30	64
chr01	139	396
chr02	193	523
chr03	187	42
chr04	149	216
chr05	233	772
chr06	896	787
chr07	220	357
chr08	129	238
chr09	171	939
chr10	126	218
chr11	168	86
chr12	245	330
Total	3,086	4,868

Randhawa 등(2009)이 사용 한 것보다 많아 BC₁F₁ 세대에서 평균 RPG 회복률이 낮게 나타난 것으로 생각된다. 또한 MABC 프로그램의 효율을 결정하는 또 다른 중요한 요인은 도입하려고 하는 표적유전자수, 마커 지도, 교차율 및 적용되는 선발 전략 등 이라고 하였다(Servin and Hospital 2002; Collard and Mackill 2008) 따라서 본 연구 결과를 토대로 BC₁F₁ 세대에서 RPG 회복률이 75% 보다 높은 82.5% 개체를 이용하여 BC₂F₁ 세대를 육성하였다.

Fig. 1 Genotyping results of the background selection in backcross populations. (A) Genotyping results for the BC₁F₁ population of a total of 42 individuals and 3,086 SNP markers were used. The highest recovery rate was 84.5% and the lowest recovery rate was 56.7%. (B) Genotyping results of BC₂F₁ population of a total of 88 individuals and 4,868 SNP markers were used. The highest recovery rate was 97.8%, while the lowest recovery rate was 87.8%

Fig. 2 Frequency distribution of the recurrent parent genome recovery (%) in BC₁F₁ population

BC₂F₁ 세대의 유전자형분석

BC₁F₁ 세대에서 선발한 RPG 회복률이 82.5%인 식물체로부터 얻어진 BC₂F₁ 세대에서는 RR : Rr 분리비가 1:1로 잘 분리되었으며, 총 192개 중 102개 식물체는 Rr으로 확인되었다 (Table 2). Background 선발을 위해 BC₂F₁ 세대에서 foreground 선발을 통해 얻어진 102개중에서 88개 BC₂F₁ 식물체를 대상으로 RPG 회복 정도를 확인하기 위해 GBS 분석을 수행하였

Fig. 3 Frequency distribution of the recurrent parent genome recovery (%) in BC₂F₁ population

다(Fig. 1). 그 결과 88개 BC₂F₁ 식물들간 다형 SNP는 4,868개를 얻었으며 RPG 회복정도를 조사한 결과는 87.8%에서 97.8% 범위를 보였다(Table 3, Fig. 3). Collard and Mackill (2008) 등의 보고에 의하면 BC₂F₁ 세대에서 개체수를 200개 가까이 조사한 결과, 거의 99%의 RPG 회복 개체수가 출현한다고 하였다. 본 연구에서는 BC₁F₁의 Rr형 개체수가 42개로 background 선발을 위해 비교적 적은 수를 이용하였기 때문에 BC₂F₁ 세대에서는 Rr형 개체수를 192개로 하여 background을

Table 4 Agro-morphological trait performance of improved lines in comparison with recurrent parent HK13-1151

Plants	Fruit weight (g)	Fruit height (mm)	Fruit width (mm)	Fruit hardness (kg)	Brix	Plants	Fruit weight (g)	Fruit height (mm)	Fruit width (mm)	Fruit hardness (kg)	Brix
HK13-1151	260.7	122.2	134.8	13	6.0	31-1	254.2	122.0	140.9	1.3	6.0
2-2	239.4	124.1	139.1	1.5	4.8	32-3	220.9	127.8	145.4	0.9	5.8
3-2	239.3	131.2	147.6	1.2	5.2	33-2	309.4	148.4	132.0	1.0	6.0
4-4	209.5	124.7	130.9	1.0	5.3	36-4	234.8	130.5	147.3	1.9	5.0
5-1	260.9	132.2	137.8	1.2	6.1	38-1	228.9	146.0	137.7	1.4	5.5
6-3	238.9	129.1	120.5	1.0	5.4	39-1	232.4	133.1	138.8	1.0	5.5
7-4	268.0	134.1	130.7	0.95	6.0	40-1	263.1	133.6	149.0	0.8	5.9
8-4	264.0	125.5	131.1	1.7	5.0	41-2	257.0	144.3	131.6	1.2	5.5
9-1	211.1	120.3	125.1	1.0	5.0	42-2	196.5	147.2	138.1	1.0	5.5
12-1	216.5	134.8	139.9	1.0	4.9	43-2	258.5	145.8	138.5	1.65	5.9
13-2	243.9	140.9	149.8	1.3	4.8	44-1	222.5	140.5	130.7	0.835	5.4
15-1	240.3	127.7	130.6	1.0	5.0	45-1	228.3	149.5	125.3	1.3	5.4
17-2	217.8	137.0	137.7	1.1	5.0	46-1	197.2	146.7	139.8	0.92	5.3
19-4	232.9	124.0	133.0	0.8	5.5	47-2	216.4	148.5	121.9	1.01	5.1
20-7	237.5	123.8	146.3	1.0	4.9	49-3	200.9	145.1	130.4	1.045	5.0
21-2	211.2	130.3	132.0	1.5	6.0	50-1	221.7	130.4	129.7	0.98	5.5
22-2	188.9	136.7	130.3	1.3	5.0	51-1	227.6	132.2	124.0	1.3	5.9
23-3	213.8	123.4	122.7	0.9	5.1	53-1	197.0	146.2	137.5	1.45	5.8
25-4	188.4	127.8	136.6	0.9	5.1	56-3	180.5	133	132.8	0.87	5.3
27-6	197.7	139.2	120.3	1.6	5.9	58-1	184.4	141.5	121.5	1.7	5.5
28-5	164.2	125.1	132.7	0.4	5.0	61-1	195.1	148.6	136.7	0.9	5.9
29-3	164.5	121.3	130.8	1.1	6.0	62-1	218.0	135.4	134.4	1.8	5.3
30-3	176.0	127.2	134.4	1.4	6.0	63-1	215.5	122.3	130.6	1.45	6.0

수행한 결과, Collard and Mackill (2008)가 보고한 결과와 일치하였다. 본 실험에서 BC₂F₁ 세대의 개체들에서 *rin* 마커에 의해 선발한 donor 친 유래 단편은 염색체 5번에 속해 있었으며, 4번, 6번, 8번 12번 염색체의 segment를 제외하고 선발된 식물체들에서 거의 대부분이 회복되었다(Fig. 1). 따라서 반복친 HK13-1151 계통과 RPG 회복 정도가 높은 3개체를 대상으로 표현형을 조사한 결과 No. 5-1 식물체가 표현형이 가장 유사하여 자가수정을 통해 BC₂F₂ 종자를 육성하였다(Table 4). 본 연구에서 개발된 GBS분석을 이용한 MABC 적용은 반복친 계놈 회복률 높일 수 있는 방법으로 생각되고, NGS 분석 및 SNP 정보를 원활하게 이용 한다면 비교적 손쉽게 사용가능하다고 생각된다. 그러나 매번 GBS library 구축 등의 기술적인 문제점이 야기될 수 있다. 따라서 GBS 분석을 통해 개발된 SNP 마커들의 fluidigm chip (EP1 system)이나 array와 같은 SNP 자동화 분석 플랫폼(Thomson 2014; Wang et al. 2009)에 적합한 형태로의 마커전환과 이를 이용하여 보다 폭 넓은 여교잡 육종용 background chip 개발이 절실한 상태이다.

적 요

Marker-assisted backcrossing (MABC)은 marker-assisted selection

(MAS)와 함께 다양한 작물에서 여교배 초기세대에서 반복친 계놈의 회복률이 높은 개체선발을 위한 분자육종 기술로 매우 유용하게 사용하고 있다. 본 연구에서는 토마토 MABC 육종 프로그램의 일환으로 저장성이 강한 *rin* 유전자를 주)토마토연구소에서 육성한 핑크계 엘리트 토마토계통에 도입하고자 수행하였다. foreground 선발은 RIN SCAR 분자 마커를 이용하여 100개 BC₁F₁ 식물체에서 Rr 유전자형 가진 42개체를 선발하였다. 그리고 이를 이용하여 GBS 분석을 이용하여 background 선발을 하였다. 총 3,086개 SNP를 대상으로 반복친 HK13-1151과 계놈 회복률을 조사한 결과, 56.7%에서 84.5%를 보여 평균 70.5%로 나타났다. 이 중 87.2%를 보인 BC₁F₁ 개체를 이용하여 192개 BC₂F₁ 식물체를 육성하여 foreground 선발을 하였다. 선발된 102개 중 88개 식물체를 이용하여 GBS 분석을 수행한 결과 4,868개의 다형 SNP 마커를 얻었으며, 이를 이용하여 RPG 회복률을 조사하였다. BC₂F₁ 식물체들에서 HK13-1151 반복친 계놈과 87.8%에서 97.8% 유사하였다. 본 연구에서 BC₂F₁ 식물 중 RPG 회복률이 97.8%인 5-1 개체는 반복친인 HK13-1151과 과일특성에서 매우 유사하였다. 따라서 선발된 5-1 개체는 BC₂F₂ 세대를 육성하여 계통화 하고자 한다. 본 연구를 통해 MABC는 전통 여교배 육종에 비해 육종연한을 획기적으로 줄일 수 있으며, 원하는 육종모델을 완수할 수 있는 첨단육종 기술로 평가할 수 있다.

사 사

본 연구는 농림식품기술기획평가원에서 시행하는 골든씨드 프로젝트(원예종자 사업단: 213007-05-3-SBD30)과 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 중견연구사업(과제번호: 2017R1A2B4007473)에 의해 이루어진 것임.

References

- An SJ, Kwon JK, Yang HB, Choi HJ, Jeong HJ, Kim YJ, Choi GJ, Kang BC (2010) SNP marker development for purity test of oriental melon and melon. *Korean J Breed Sci* 42(4):397–406
- Chagné D, Crowhurst RN, Troggio M, Davey MW, Gilmore B, Lawley C, Vanderzande S, Hellens RP, Kumar S, Cestaro A (2012) Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS One* 7(2):e31745
- Collard BC, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363:557–5
- Consortium TG (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485(7400):635–641
- Cuesta-Marcos A, Szűcs P, Close TJ, Filichkin T, Muehlbauer GJ, Smith KP, Hayes PM (2010) Genome-wide SNPs and re-sequencing of growth habit and inflorescence genes in barley: implications for association mapping in germplasm arrays varying in size and structure. *BMC Genomics* 11(1):707
- Edwards D, Batley J (2010) Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnol J* 8(1):2–9
- 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(5):e19379
- Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics Article* 2007: 64358
- Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell* 14(7):1457–1467
- Glaubitz JC, Casstevens TM, Lu F, Harriman J, Elshire RJ, Sun Q, Buckler ES (2014) TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS ONE* 28;9(2):e90346
- Gupta P, Roy J, Prasad M (2001) Single nucleotide polymorphisms (SNPs): a new paradigm in molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* 80(4):524–535
- He J, Zhao X, Laroche A, Lu ZX, Lou H, Li Z (2014) Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Front Plant Sci* 30;5:484
- Hyten DL, Song Q, Fickus EW, Quigley CV, Lim JS, Choi IY, Hwang EY, Pastor Corrales M, Cregan PB (2010) High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC Genomics* 11(1):475
- Kim HJ, Lee HR, Hyun JY, Hong DO, Won DC, Han CH (2013) A SCAR Marker Linked to *RIPENING-INHIBITOR* in Tomato. *Korean J Breed Sci* 45(2):104–108
- Kim S, Misra A (2007) SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 9:289–320
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zhen, Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genet* 46:1220–1226
- Randhawa HS, Mutti JS, Kidwell K, Morris CF, Chen X, Gill KS (2009) Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection. *PLoS One* 4:e5752
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81:8014–8019
- Servin B, Hospital F (2002) Optimal positioning of markers to control genetic background in marker assisted backcrossing. *Journal of Heredity* 93:214–217
- Shirasawa K, Fukuoka H, Matsunaga H, Kobayashi Y, Kobayashi I, Hirakawa H, Isobe S, Tabata S (2013) Genome-wide association studies using single nucleotide polymorphism markers developed by re-sequencing of the genomes of cultivated tomato DNA. *Res* 20(6):593–603
- Shirasawa K, Isobe S, Hirakawa H, Asamizu E, Fukuoka H, Just D, Rothan C, Sasamoto S, Fujishiro T, Kishida Y (2010) SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato DNA. *Res* 17(6):381–391
- Thomson MJ (2014) High-Throughput SNP Genotyping to Accelerate Crop Improvement. *Plant Breed Biotech* 2(3):195–212
- Trebbi D, Maccaferri M de Heer P, Sørensen A, Giuliani S, Salvi S, Sanguineti MC, Massi A van der Vossen EAG, Tuberosa, R (2011) High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf). *Theor Appl Genet* 123(4):555–569
- Van Deynze A, Stoffel K, Buell CR, Kozik A, Liu J van der Knaap E, Francis D (2007) Diversity in conserved genes in tomato. *BMC Genomics* 8(1):465
- Wang DG, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280(5366):1077–1082
- Xu J, Ranc N, Muñoz S, Rolland S, Bouchet JP, Desplat N, Le Paslier MC, Liang Y, Brunel D, Causse M (2013) Phenotypic diversity and association mapping for fruit quality traits in cultivated tomato and related species. *Theor Appl Genet* 126(3):567–581
- Xu X, Liu X, Ge S, Jensen JD, Hu F, Li X, Dong Y, Gutenkunst RN, Fang L, Huang L (2012) Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. *Nat Biotechnol* 30(1):105–111