토마토 숙성저해 유전자의 SCAR 분자표지 개발

김현정¹ · 이흥렬¹ · 현지영¹ · 홍동오² · 원동찬² · 한지학^{1*}

¹농우바이오 생명공학연구소, ²농우바이오 육종연구소

A SCAR Marker Linked to *RIPENING-INHIBITOR* in Tomato

Hyoun-Joung Kim¹, Heung-Ryul Lee¹, Ji Young Hyun¹, Dong Oh Hong², Dong-Chan Won²,
and Chee Hark Ham^{1*}

¹Biotechnology Institute

²Breeding Institute, Nongwoo Bio. Co., Ltd., Yeosu, Gyeonggi 469-885, Korea

Abstract : Tomato shelf-life is important for its fresh market usage especially for exporting and transporting tomato in tropical climate. To increase the shelf-life, delaying maturity is one of the powerful methods. A ripening gene related to the fruit maturity delaying was previously known through tomato mutation. *RIPENING-INHIBITOR* (*Rin*) from the recessive mutation effectively blocks the ripening process, and when the hybrid (*Rin/rin*) was formed it shows slow-ripening and long shelf-life. Since breeders need the long shelf-life character in the tomato breeding program, we had set out a series of experiments to develop a *Rin* related DNA marker. We searched for the proper primer sequences in the deletion region between *Rin* and *rin* mRNA sequences, and also in the intron region of *rin*. Primers that simultaneously amplified two bands with a co-dominant pattern were selected and converted to the Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker. As a preliminary data, the SCAR marker clearly distinguished genotypes between heterozygote (*Rin/rin*) and homozygote (*Rin/Rin*, *rin/rin*), and this would help select the tomato lines that have a characteristic of long shelf-life.

Keywords : *Rin*, Ripening, Shelf-life, SCAR marker, Tomato

서 언

토마토는 세계적으로 재배되고 소비되는 가지과의 대표적인 채소이다. 다양한 종류의 요리, 소스, 음료의 원료로 사용될 뿐만 아니라, 건강에 유용한 라이코펜과 같은 항산화물질을 함유하고 있어, 건강식품으로 인기가 높다(Shi & Maguer 2000). 또한, 칼로리가 낮고 섭취방법이 편리하여 현대인의 웰빙식품으로 각광받고 있다.

토마토는 대체로 후숙을 통하여 숙성되는데, 이러한 숙성 기간은 과실의 운송기간과 배송거리, 시장에서의 신선도 유지와 관련이 깊다. 특히, 고온저장에 수출하는 토마토 품종은 고온에 의한 조기숙성 때문에 유통상의 어려움이 있어, 숙성기

간을 반드시 고려해야 한다.

저장기간 및 유통기간을 늘리는 효과적인 방법으로써, *Green-ripe*와 *Never-ripe* 2와 같은 과실의 숙성을 저해하는 유전자(Barry et al. 2005)와 *LeETR4*와 *LeETR6*과 같은 ethylene receptors (Kevany et al. 2007)를 이용할 수 있다. 열성인자인 *RIPENING-INHIBITOR* (*Rin*)은 과실숙성을 크게 저해하는 유전자로 보고되었는데(Robinson & Tones 1968), Giovannoni (1995)가 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 분자표지를 이용하여 고밀도 유전자 지도를 작성하고 토마토 염색체 5번에서 *rin* 유전자의 위치를 밝혀냈다. Vrebalov et al. (2002)은 positional cloning 방법을 통해 찾아낸 *rin* 유전자가 과실숙성과 거대화락에 관련된 MADS-box 유전자(*LeMADS-RIN* and *LeMADS-MC*)와 관련이 있다고 보고했다. 또한, 두 MADS-box 유전자가 근접한 위치에 있기 때문에 *rin* 토마토는 일반적으로 거대화락을 갖는다. MADS-box 유전자는 꽃눈의 분화와 발달, 그리고 과

*Corresponding author (E-mail: chham@nongwoobio.co.kr, Tel: +82-31-887-6540, Fax: +82-31-884-7065)

(Received on November 7, 2012. Revised on May 21, 2013.
Accepted on May 27, 2013.)

실의 숙성에 주로 관여한다(Alvarez-Buyella et al. 2000). 돌연변이체인 *rin* 토마토는 과실의 비대, 종자의 성숙은 진행되지만, 토마토가 숙성될 때 반드시 발생하는 에틸렌 가스가 발생하지 않으며(Lincoln & Fischer 1988) 따라서 에틸렌 관련 유전자가 발현하지 않고, 숙성이 진행되지 않는 것으로 보고되었다(Adams-Phillips et al. 2004).

일반 토마토와 *rin* 토마토를 교배하여 얻은 교잡후대(*Rin/rin*)는 서서히 숙성되어 저장기간이 상당히 늘어나므로 저장기간이 긴 새로운 토마토 품종을 개발하는데 적합한 소재가 된다. 다만, 이형접합 유전형으로 만들어진 토마토 F₁후대 등은 육성라인에 따라 거대화락을 수반하지 않는 경우가 생겨, 거대화락만으로는 육성하고자 하는 후대의 *rin* 유전자형을 예측하기가 힘이 든다. 과실의 숙성정도를 확인하기 위해서는 발아에서부터 수개월의 시간이 소요되는 물론이고, 동형과 이형의 유전자형을 알기 위해서는 후대검정을 진행해야 하므로, 육종에 소요되는 시간과 경비, 노고는 상당한 것이다. 따라서, 이러한 육종과정의 어려움을 경감시키면서 저장기간이 긴 수출용 토마토 품종개발에 도움이 될 수 있도록, 본 연구에서는 *Rin/rin* 유전자 특이적 염기서열을 갖는 분자 표지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 genomic DNA 추출

Rin/rin 관련 분자표지를 개발하기 위해, 토마토 계통 NW1 (*rr*)과 NW2 (*RR*), 그리고 헤테로 육종라인 2개(*Rr*)를 사용하였다. 개발된 분자표지는 24개의 육종라인을 통해 밴드양상과 표현형과의 관계를 확인하였고, 과실의 숙성기간은 숙련된 육종가가 2개월 가량 관찰하여 기록하였다. 1차적으로 식물체에서 과실이 익어가는 속도를 비교하였으며, 2차적으로는 과실을 수확 후 수확기가 유사한 과실들을 실온에서 매일 조사하였다. NW2 (*RR*)은 수확 후 1달 정도 지나면 과육이 완전 숙성되어 병이 발생하지만, NW1 (*rr*)은 거의 익지 않은 상태이며, 헤테로 라인은 그 중간 형태로 천천히 숙성된다.

Genomic DNA 추출은 Retsch MM301 ball mill (Daigger, USA)를 사용하여 어린 토마토 잎을 5분동안 분쇄한 후, Kang et al. (2001) 방법대로 수행하였다. Micro-volume spectrophotometer, ASP-2680 (Avans Biotechnology, Taiwan)으로 genomic DNA의 농도를 측정하였고, 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

Intron 염기서열 정보

LeMADS-*Rin* (AF448522), LeMADS-*rin* (AF448523)의 mRNA 염기서열 정보를 서로 비교하여 결실된 부분의 염기서열을 확인하는 한편, Sol Genomics Network (<http://solgenomics.wur.nl>)의 blast와 genome walking 방법을 이용하여 intron 염기서열 정보를 확보하였다. Genome walking에는 Rin-gwR1: 5'-GGGGGTCCTACTTGTGAGGT-3', Rin-gwR2: 5'-TGTTGTGTATTGATTGTGCCTTA-3', Rin-gwF1: 5'-GAGTATATGGAGAGAAGAAATCCT-3', Rin-gwF2: 5'-TTT TAGCTAGCAAACACTTTGGA-3', Rin-gwF3: 5'-GTGAT ATATTTATTGTCAAGAAGAGTATGG-3' 프라이머 조합과 DNA Walking SpeedUpTM Premix Kit (Seegene, Korea)를 사용하였다. 사용한 모든 프라이머는 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)을 이용하여 작성하였고, Macrogen (Korea)에서 합성하였다.

SCAR 분석

PCR 반응 조성액은 10 × buffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM forward (Rin-F: 5'-AAGTGTACAATATAGACATGAACAG CTTCT-3'), reverse primers (Rin-R1: 5'-CCATACTCTTCT TGACAATAAATATATCACAAT-3', Rin-R2: 5'-AAAGCAAC TTGAGCATCACA-3'), 40 ng genomic DNA, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Genet Bio Inc., Korea)를 혼합하여 20 µl로 조정하여 사용하였다. PCR 증폭반응은 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)를 이용하였고, 프로그램은 다음과 같다. 94℃에서 2분 denaturation 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분의 세 과정을 35회 반복 수행하였다. 그리고, 72℃에서 10분 elongation을 마지막 단계로 진행하였다. PCR 산물은 EtBr 로 염색한 1% agarose gel상에서 200 V로 40분 전기영동하였다. 다형성은 UV transilluminator에서 분석하였다.

결과 및 고찰

mRNA와 intron 염기서열

일반 형질인 *Rin*과 돌연변이 형질인 *rin*의 mRNA 염기서열은 LeMADS-*RIN*과 LeMADS-*MC* 사이의 2.6 Kb 결실로 구별되는데(Vrebalov et al. 2002), 이러한 mRNA상의 차이는 genomic DNA 상의 intron까지 포함하면 PCR 분자표지로 사용하기에는 한계가 있다. 분자 표지는 일반적으로 genomic

Fig. 1. Schematic diagram of MADS-box genes at the *Rin/rin*. The arrows indicate primer orientations, which are used to amplify genomic DNA. The line represents intron region of *Rin* and the dotted line indicates a deletion region of *rin*. The gray and black boxes correspond to the exons of *LeMADS-RIN* and *LeMADS-MC*, respectively.

DNA를 대상으로 하여 특정 프라이머로 증폭한 PCR 산물의 다형성을 이용하는 것이므로(Lee et al. 2011), 본 실험에서는 genomic DNA 수준인 intron 염기서열의 정보수집을 선행하였다. 우선, *Rin*과 *rin*의 mRNA 염기서열에서 결실을 보이는 *LeMADS-RIN*의 끝 부분 염기서열을 이용하여 genome walking용 프라이머를 제작하였고, genome walking을 수행하였다. 그 결과로서, *LeMADS-RIN*의 3' 중간부분에서 415 bp를, *LeMADS-RIN*의 3' 끝부분에서 517 bp의 intron 염기서열을 알아내었다. 또한, 이들 intron 염기서열을 이용하여 Sol Genomics Network에서 유사한 BAC (bacterial artificial chromosome) 염기서열을 확보하였다. Fig. 1은 *Rin*과 *rin*의 mRNA와 intron 염기서열 정보를 비교하여 간략히 모식화한 것이다.

SCAR 분자표지 개발

*Rin*과 *rin*의 공통된 mRNA 염기서열에서 Rin-F를 작성하였으며, Rin-R1은 *rin*에서는 결실된 *Rin*의 mRNA부분을 이용한 것이다. 이 프라이머 조합을 통해 *Rin* 특이적 밴드를 증폭할 수 있었다(약 800 bp). Intron의 어느 부분에서 결실이 일어났는지 알아보기 위해 여러 조합의 프라이머가 작성되었으나, *rin*에서는 전혀 밴드가 나타나지 않았다. 그러나, 확보한 BAC clone의 염기서열을 이용하여 *rin* 특이적 밴드를 찾을 수 있었고(약 1500 bp), 가까운 분자표지를 개발하기 위해서, *LeMADS-RIN* 가까이 위치하도록 프라이머 부위를 조정하였다. *Rin/rin* 특이적인 밴드가 각각 증폭되었지만, PCR 반응 시간이 길어지고 *Rin*에서 보는 밴드가 다소 약하게 관찰되

Fig. 2. Band patterns of the PCR fragments amplified with primers of the co-dominant marker. RR, homozygous *Rin/Rin* line; Rr, heterozygous *Rin/rin* line; rr, homozygous *rin/rin* line.

므로, BAC clone에서 얻어진 밴드는 *rin* 특이 밴드만을 사용하였다.

공우성 분자표지 선발

토마토 육종과정에 MAS (Marker assisted selection)을 적용하기 위해서는 시간과 비용, 노동의 절감과 같은 효율성을 고려해야 한다(Gu et al. 1995). 따라서, 분자 표지를 개발할 때는 분자 표지의 적용방법이 단순하면서 세대감축의 효과가 있는 동형/이형의 유전자형 정보가 제공되는 공우성 분자 표지가 우선된다. 본 연구에서는 *Rin/rin* 각각을 구별할 수 있는 예비 프라이머 조합을 선발한 후, 프라이머를 함께 PCR 반응에 사용하여, 특이적인 밴드가 증폭되는지, 사이즈 차이에 따라 이들 밴드가 쉽게 구별가능한지를 판단하여 Rin-F, Rin-R1, Rin-R2 프라이머 조합(SCAR-marker)를 선발하였다(Fig. 2). 이 프라이머를 PCR에 적용하면 Rin-F와 Rin-R1은 800 bp, Rin-F와 Rin-R2는 1500 bp 밴드를 도출하면서 RR, Rr, rr 계통을 구별하는 공우성 분자표지가 확보되었다. 선발한 공우성 분자표지를 24개의 육종라인에 적용한 후, PCR 밴드 패턴과 적용할 표현형과의 관계를 조사하였고(Table 1), 이들이 모두 일치하는 것을 확인하였다. SCAR-marker는 열대지방에 수출용 품종 혹은 숙성기간이 긴 내수용 품종의 개발에 도움이 될 것으로 기대한다.

Table 1. Phenotypes and genotypes detected by the SCAR marker from 24 tomato breeding lines.

Line no.	Phenotype	Marker	Line no.	Phenotype	Marker
1	M ^z	RR ^y	13	M	RR
2	M	RR	14	I	Rr
3	I	rr	15	IM	Rr
4	I	rr	16	IM	Rr
5	I	rr	17	I	Rr
6	I	rr	18	M	RR
7	I	rr	19	M	RR
8	I	rr	20	M	RR
9	I	Rr	21	M	RR
10	I	rr	22	M	RR
11	I	rr	23	M	RR
12	M	RR	24	M	RR

^zM : Mature, IM: Intermediate mature, I: Immature

^yRR : homozygous *Rin/Rin* line, Rr: heterozygous *Rin/rin* line, rr: homozygous *rin/rin* line

적 요

인 용 문 헌

토마토 과실의 숙성기간은 운송기간과 상품성에 상당한 영향을 미친다. 특히, 고온에서는 과실숙성이 빨라지므로, 숙성기간은 열대지방에 수출하는 토마토 품종에서 반드시 고려되어야 한다. 토마토 과실숙성을 효과적으로 차단하는 *RIPENING-INHIBITOR (Rin)* 유전자는 열성 유전하는 돌연변이체에서 보고되었고, 교잡후대(*Rin/rin*)에서는 숙성이 느리게 진행되어 저장성이 상당히 향상된다고 알려졌다. 따라서, 본 연구에서는 수출용 토마토 품종의 육성을 위해, 과실숙성의 저해와 관련한 *Rin* 유전자 특이적인 분자 표지를 개발하고자 하였다. *Rin*과 *rin*유전자의 mRNA와 genomic DNA의 염기서열 정보를 확보하고 다형성을 나타내는 프라이머 조합을 선별하여, 공우성 SCAR 분자표지로 개발하였다. 토마토 육성 라인 24주에서 과실숙성 정도와 PCR밴드를 비교한 결과, 공우성 마커는 동형(*Rin/Rin*, *rin/rin*)과 이형(*Rin/rin*)의 유전자형을 구별하기에 적합하였으며 이를 이용하여 저장성이 좋은 토마토 품종개발에 도움이 될 것으로 기대한다.

사 사

본 논문은 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원(308002-05-5-SB020)의 지원에 의해 이루어진 것임.

1. Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J. 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci* 9: 331-338.
2. Alvarez-Buyella ER, Alvarez-Buyella ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF. 2000. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* 24: 457-466.
3. Barry CS, McQuinn RP, Thompson AJ, Seymour GB, Grierson D, Giovannoni JJ. 2005. Ethylene insensitivity conferred by the *Green-ripe* and *Never-ripe 2* ripening mutants of tomato. *Plant Physiol* 138: 267-275.
4. Chang C, Shockey, J. 1999. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* 2: 352-358.
5. Giovannoni JJ, Noensie EN, Ruezinsky DM, Lu X, Tracy SL, Ganai MW, Martin GB, Pillen K, Alpert K, Tanksley SD. 1995. Molecular genetic analysis of the *ripening-inhibitor* and *non-ripening loci* of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol Gen Genet* 248: 195-206.
6. Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170-S180.
7. Giovannoni JJ. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol* 10: 283-289.

8. Gu WK, Weeden NF, Yu J, Wallace DH. 1995. Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker assisted selection applications. *Theor Appl Genet* 91: 465-470.
9. Kang BC, Nahm SH, Huh JH, Yoo HS, Yu JW, Lee MH, Kim BD. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 102: 531-539.
10. Kevany BM, Tieman DM, Taylor MG, Cin VD, Klee HJ. 2007. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant J* 51: 458-467.
11. Lee JH, Yeo US, Cho JH, Lee JY, Song YC, Shin MS, Kang HW, Sohn JK. 2011. Marker assisted selection of brown planthopper resistance and development of multi-resistance to insect and diseases in rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J. Breed. Sci.* 43: 413-421.
12. Lincoln JE, Fischer RL. 1988. Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Mol Gen Genet* 212: 71-75.
13. Matas AJ, Gapper NE, Chung MY, Giovannoni JJ, Rose JKC. 2009. Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Curr Opin Biotechnol* 20: 197-203.
14. Moore S, Vrebalov J, Payton P, Giovannoni J. 2002. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J Exp Bot* 53: 2023-2030.
15. Robinson RW, Tomes ML. 1968. Ripening-inhibitor: a gene with multiple effects on ripening. *Rep Tomato Genet Coop* 18: 36.
16. Shi J, Le Maguer M. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Biotechnol* 20(4): 293-334.
17. Vrebalov J, Ruezinsky D, van Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *Ripening-inhibitor (Rin)* locus. *Science* 296: 343-346.