

RS-2021-
IP821012

고
품
질

중
합
내
병
성

건
고
추

및

고
기
능
성

자
색

푼
고
추

개
발

2024

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
기술사업화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004754-01

고품질 종합내병성 건고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발

2024.07.29.

주관연구기관 / 농업회사법인 (주)피피에스
공동연구기관 / 서울대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

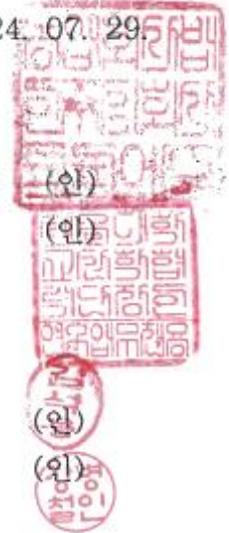
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고품질 종합내병성 건고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01 ~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 29

주관연구기관명 : (대표자) 농업회사법인(주)피피에스
공동연구기관명 : (대표자)서울대학교산학협력단

주관연구책임자 : 김 식 용
공동연구책임자 : 강 병 철



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		기술사업화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		공공기술 사업화 촉진			연구개발과제번호		821012-03
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB02022	50%	LB0206	30%	LB02021	20%
	농림식품 과학기술분류	AA0201	100%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		고품질 종합내병성 건고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발					
연구개발과제명		고품질 종합내병성 건고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발					
전체 연구개발기간		2021-04-01~2023-12-31(2년 9개월)					
총 연구개발비		총 1,035,000 천원 (정부지원연구개발비: 825,000천원, 기관부담연구개발비 : 210,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(5) 종료시점 목표(9)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		NGS 기술을 활용하여 종합 내병성 건고추 품종 및 건강 기능성 자색 풋고추 품종 개발				
	전체 내용		PPS-서울대 간 기술 연계를 통해 종합 내병성 건고추 품종 및 고기능 성 자색 풋고추 품종을 개발한다. 기 개발된 TSWV, CMV, 역병 등의 저항성 분자마커를 활용하여 복합내병성 고추 품종을 MABC를 활용하 여 개발한다. 또한 고추의 안토시아닌 축적에 연관된 유전자좌를 탐 색, 마커를 개발하고 유전자의 기능을 규명하며 이를 선발에 활용하여 안토시아닌이 풍부한 건강 기능성 자색 풋고추 품종을 개발한다.				
	1단계 (해당 시 작성)	목표	NGS 기술을 활용하여 종합 내병성 건고추 품종 및 건강 기능성 자색 풋고추 품종 개발				
		내용	공동연구기관(서울대)에서 기개발된 TSWV, CMV, 역병 등의 저항성 분자마커, 안토시아닌 관련 분자마커 및 MABC를 활용하여 복합내병 성 건고추, 기능성 자색 풋고추 개발을 위한 초기 집단을 개발한다.				
	2단계 (해당 시 작성)	목표	NGS 기술을 활용하여 종합 내병성 건고추 품종 및 건강 기능성 자색 풋고추 품종 개발				
내용		1단계에서 개발한 집단의 선발 및 고정을 진행하고 시판용 생산을 위 한 시교집단을 작성하여 자체 연구소 및 농가 실증 실험을 거쳐 종합 내병성 건고추 품종 및 고기능성 자색 풋고추 품종을 개발한다.					
연구개발성과		[주관과제] 복합내병성 및 자색 풋고추 품종의 개발 - 복합내병성 및 건강 기능성 자색 풋고추 품종 개발 - 기술 이전 받은 분자마커를 활용한 품종개발능력 획득 - MABC를 활용한 단기간에 품종개발능력 획득 [공동연구] 고추 안토시아닌 축적에 관여하는 유전인자 규명 및 분자마커 개발 - 다양한 고추 계통의 표현형 비교 및 안토시아닌 함량 측정 - 고추 안토시아닌 보유 계통을 활용한 F2 집단 구성 및 유전자지도 작성 완료 - 과실특이적 안토시아닌 생합성을 조절하는 후보유전자 특정					
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과		피피에스와 서울대학교는 본 연구개발과제 수행을 통해 농가 소득을 증대하며 최종 소비자 요구에 대응, 고추 시장 저변 확장에 기여한다. 종합내병성 및 고기능성 신품종으로 농가의 고추 생산력 향상과 수익 창출, 최종 소비자의 다양한 기능성 물질 함유 품종 소비를 통해 건강 증진 향상에 기여한다.					
연구개발성과의 비공개여부 및 사유							

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명		규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호		
국문핵심어 (5개 이내)	종합내병성			고기능성		고추		안토시아닌		분자마커		
영문핵심어 (5개 이내)	Multi disease resistance			High nutritional components		Hot pepper		Anthocyanin		Molecular marker		

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

최종보고서							보안등급		
							일반[√], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		기술사업화지원사업			
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)		공공기술 사업화 촉진			
공고번호		농림축산식품부 공고 제 농축2021-41호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
				연구개발과제번호		821012-03			
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB02022	50%	LB0206	30%	LB02021	20%		
	농림식품과학기술분류	AA0201	100%						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	고품질 종합내병성 건고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발						
		영문	Development of Multi-disease resistance hot pepper for high quality dry market and violet colored fresh hot pepper for high nutritional components						
연구개발과제명		국문	고품질 종합내병성 건고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발						
		영문	Development of Multi-disease resistance hot pepper for high quality dry market and violet colored fresh hot pepper for high nutritional components						
주관연구개발기관		기관명	농업회사법인 ㈜ 피피에스		사업자등록번호				
		주소			법인등록번호				
연구책임자		성명		김석용		직위		차장	
		연락처	직장전화				휴대전화		
			전자우편				국가연구자번호		
연구개발기간		전체		2021-04-01~2023-12-31(2년 9개월)					
		단계	1단계		2021-04-01~2022-12-31(1년 9개월)				
			2단계		2023-01-01~2023-12-31(1년)				
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()				연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계		825,000	22,000	188,000			847,000	188,000	1,035,000
1단계	1년차	225,000	6,000	54,000			231,000	54,000	285,000
	2년차	300,000	8,000	67,000			308,000	67,000	375,000
2단계	1년차	300,000	8,000	67,000			308,000	67,000	375,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고 역할		기관유형
공동연구개발기관		서울대학교 산학협력단	강병철	교수			공동	대학 (4년이상)	
연구개발담당자 실무담당자		성명		김석용		직위		차장	
		연락처	직장전화				휴대전화		
			전자우편				국가연구자번호		

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 02월 15일

연구책임자: 김 석 용



주관연구개발기관의 장: 농업회사법인㈜피피에스 대표이사 고교빈 (직인)
공동연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 (직인)

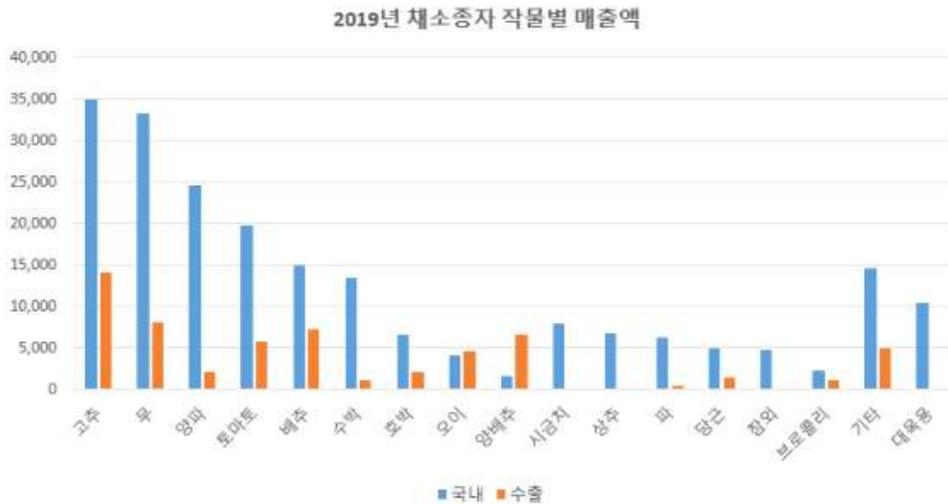
농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



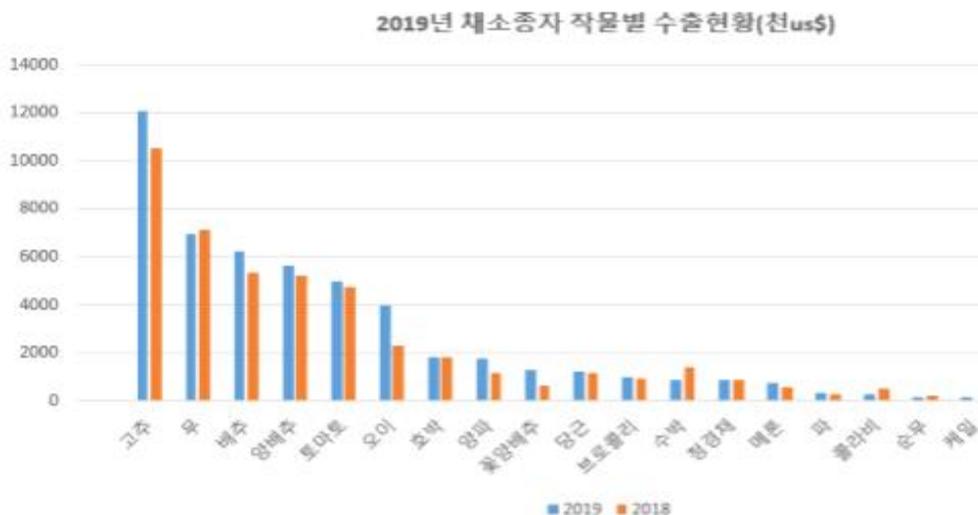
1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 필요성

□ 세계 고추 생과 생산은 38,027 천톤, 건과 생산은 4,255 천톤(2019년 기준)으로 추정되는 주요 채소작물이고, 아시아 지역 생산량이 전세계 60% 된다 (FAO statistics, 2019). 국내 고추 종자 시장은 2019년 기준 약 350억원이며, 채소종자 시장(2,113억원)의 17%를 차지하고 수출 규모는 141억원 수준으로 전체 종자 수출액(596억원)의 24% 비중을 차지한다.



□ 국내에서는 종자판매, 재배, 최종산물의 소비 등 단연 1위의 채소작물이며, 종자의 수출 또한 무, 배추를 넘어 단연 최고의 수출 품목으로 한국의 농업과 식문화에서 제일 중요한 작물이다. 따라서 채소육종 회사들이 큰 비용을 투자하여 개발에 몰두하고 있고, 판매 경쟁 또한 아주 심하여, 검증되지 않은 저품질 저단가의 품종이 많아 재배자 입장에서 품종의 선택에서도 아주 힘든 채소작물이다.



□ 고추는 노지에서 주로 재배하므로 다른 채소 작물에 비교하여 병, 바이러스 등으로 인해 작황감소, 품질 감소 등 피해가 아주크다. 고추를 기주로 하는 바이러스의 종류는 66종에 달하며, 우리나라에서 발생하는 대표적인 바이러스는 오이모자이크바이러스 (Cucumber mosaic virus, CMV), 토마토반점위조바이러스(Tomato spotted wilt virus,

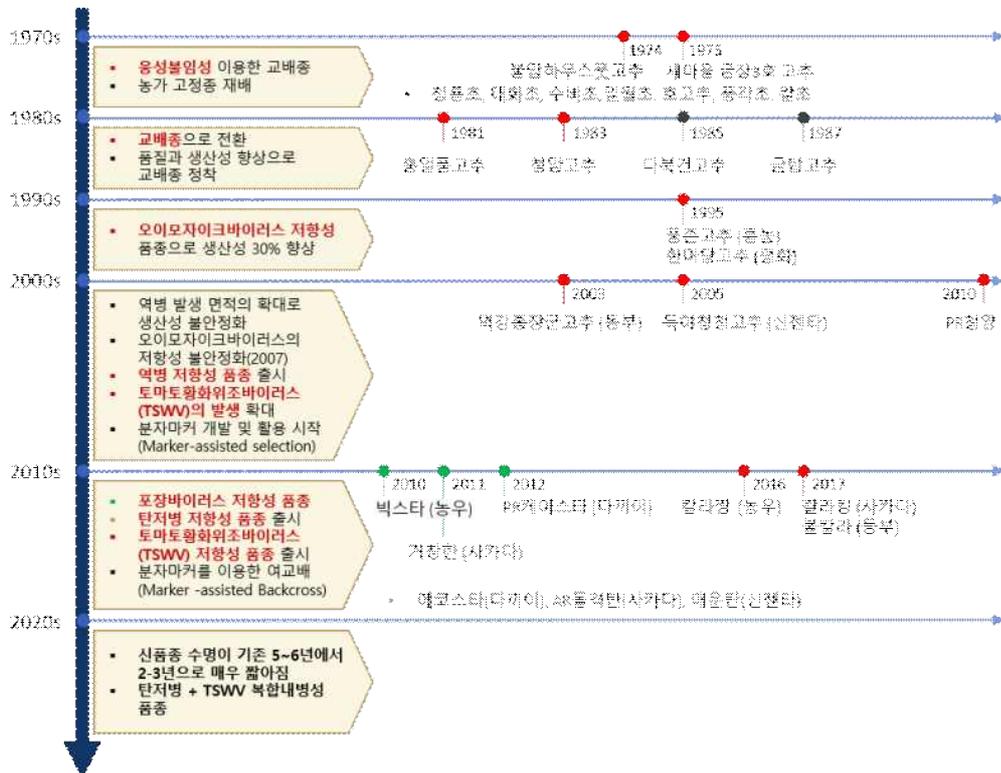
TSWV) 등을 포함하여 10종으로 보고되었다. 이뿐만 아니라 역병, 탄저병, 곰팡이병도 재배에 큰 피해를 유발한다. 더욱이 기후변화로 인하여 복합감염에 의한 피해가 증가하고 있어 근본적인 방제를 위해서는 복합 내병계고추 품종의 육성은 필수적이다.

- 최근에는 소득의 증가 및 고령화로 인하여 기능성 작물에 대한 소비자의 수요가 급격하게 증가하고 있다. 따라서 향후 고추 신품종 개발은 증가하는 병 발생 문제에 대응할 뿐만 아니라 기능성 성분이 향상된 품종을 개발하는 방향으로 발전할 것으로 판단된다. 기후변화로 인하여 증가하는 복합감염에 의한 농산물 피해를 방지하고, 기능성 품종에 대한 소비자의 요구를 충족시키기 위해서는 품종 개발 속도가 빨라져야 한다. 이를 위해서는 목표 형질을 조기에 선발할 수 있는 분자유종 기술의 실용화가 필요하다.
- 표현형에만 의존하던 육종방법은 80-90 년대를 거치면서 분자마커라는 새로운 기술의 개발로 선발육종의 효율성을 향상하는 방법을 통하여 분자유종의 기틀을 마련하였다. 분자마커 기술을 이용한 육종방식에서는 종자에서 추출한 DNA를 분석하여 유용한 개체를 바로 골라내어 육종 기간을 단축하고 소요 인력을 크게 줄일 수 있게 되었다.
- DNA 염기서열분석 방법의 비약적 발달은 90년대 말부터 식물의 전장유전체를 해독하는 국제 공동의 노력으로 식물의 모델인 아가장대(2000년) 및 작물에서 최초로 벼의 유전체 해독(2005년)이 이루어졌다. 이후 옥수수(2009년), 콩(2010년) 등의 주요 작물이 외국의 연구진들에 의해 차례로 해독되었다.
- 주요 농작물에 대한 표준유전체 완성 및 고도화가 완성됨으로서, 작물 유전체 해독 결과를 육종에 연결하려는 노력이 심화 되고 있으며, 이를 통한 육종 효율을 높이는 방법은 기존의 육종 기술에 비하여 유전력이 낮은 양적형질도 선발이 가능한 유전체 육종으로 육종방법이 급격하게 바뀌고 있다. 또한 다양한 유전분석 집단을 이용한 NGS 기반 SNP를 이용해 농업적 유용한 양적형질을 도입하려는 Genome-wide Association Study (GWAS) 연구도 활발히 진행하고 있다.
- 국내에서도 차세대바이오그린을 통해 고추 무, 야생 콩, 녹두, 인삼 등의 유전체 해독의 성과가 있었으며 농작물 생명정보 고도화 및 재분석을 통한 농업적 활용 증진, 생명정보 기반 대량유전자 분석 및 농업적 활용, 작물의 후성유전학적 연구 및 활용, 농업 미생물 연구 및 활용 연구를 추진하였다.
- 서울대 연구진은 표준유전체 서열을 이용하여 고추의 주요 형질인 신미(Han et al., 2018; Park et al., 2019), 병 저항성(Kim et al., 2017; Siddique et al., 2018), 과색(Jeong et al., 2019; Jang et al., 2020), 과실형태(Lee et al., 2020) 관련 유전자 단일자 형질에 대한 유전자 동정 및 양적형질에 대한 QTL/GWAS 분석하는 등 세계적 수준의 고추 분자유종 기술과 인프라를 갖추고 있다. 본 연구에서는 서울대가 개발한 TSWV, 역병, CMV 등에 대한 분자표지를 활용하여 복합 저항성을 가진 건고추 품종과 고기능성 풋고추 품종을 육성하는 것을 주된 목표이다. 아울러 안토시아닌 고함유 기능성 품종을 개발하기 위하여 미숙과의 안토시아닌 합성하는 유전자에 대한 분자표지를 개발하고 유전자를 동정하고자 한다.

2) 연구개발 대상의 국내외 현황

□ 고추 복합 병저항성 품종 현황

- 국내 고추 품종은 종전 이후 대부분 농가에서 고정종을 키우는 형식이었다. 1970년대 초 웅성불임성을 이용한 교배종이 출시되면서 80년대부터는 품질과 생산성이 향상되어 시장의 많은 품종이 교배종으로 전환되었다. 90년대부터는 바이러스 저항성 품종이 개발되기 시작하였으며, 95년도에 흥농종묘에서 오이모자이크바이러스(CMV) 저항성 품종인 풍촌고추와 평화종묘에서 한마당고추를 출시하면서 생산성이 30% 이상 향상되었다. 2000년대에 들어서는 역병이 발생하는 면적의 확대되어 생산성이 불안정해지면서 많은 역병 저항성 품종이 출시되었다. 더불어 CMV의 저항성이 불안정해지고, 토마토황화위조바이러스 (TSWV)의 발생이 확대되기 시작하였다. 병, 바이러스 내병계 품종을 개발하여 생산성을 안정화시키기 위해 분자마커를 활용하여 선발 육종하기 시작하였다. 2010년대에는 포장바이러스와 탄저병, TSWV 저항성 품종을 출시하였고, 차세대염기서열분석 기술의 발달로 분자마커를 이용한 여교배 (Marker-Assisted Backcrossing, MABC)를 시작하였다. 2020년대에 들어서는 탄저병과 TSWV 등의 복합 내병계 품종 개발이 필요해졌다. 다양한 바이러스 균주의 출몰과 피해를 막기 위한 육종가들의 노력으로 신품종의 수명은 기존 5~6년이던 것이 2~3년으로 매우 짧아졌다.



(그림) 우리나라 고추 병 저항성 품종 개발의 역사

- 현재 국내 고추의 “복합내병성” 품종은 통상적으로 크게 역병, TSWV, 탄저병에 대한 저항품종을 일컫는다. 대부분의 종자회사에서 2021년 복합내병성 품종이라는 브랜딩 명으로 출시하고 있다. 다만 복합내병계 품종들에 대한 과열된 시장 경쟁으로 내병성은 있으나, 그 품질이 일정 수준에 미치지 못한 품종이 많아 많은 농가에서 종자 선택에 어려움을 토로하고 있다. 현재 등록된 대부분의 고추 내병계 품종은 직접 육종

을 하는 경우보다는 대부분의 회사가 사입을 통하여 급하게 품종 시장 진입을 하고 있으므로, 품종의 내병성과 더불어 최종 산물의 품질에 대한 철저한 연구가 필요하다. 역병에 대한 내병성은 오랜 기간 연구가 되어왔으며, 그 내병성에 대한 레벨이 상당한 수준에 이른다. TSWV 역시 병저항성 마커가 개발되어 있고, 그 신뢰성 또한 매우 높아 일반적인 내병계 품종들은 필드에서 실제로 높은 저항성을 보인다. 하지만 탄저병은 단인자가 아니며 아주 복잡한 기작으로 저항성을 보이므로 종자회사에서 내병계 품종으로 출시를 하여도, 실험실의 데이터와 필드의 데이터가 다르게 나타나는 경우가 많다. 현재 복합내병계 품종 중 가장 앞서나가는 품종은 일본회사 사카타의 품종이며, 그 내병성 수준도 상당히 높은 수준이다. 다음으로 국내 농우바이오가 복합 내병계 품종으로 판매량으로는 국내 1위를 차지할 정도로 입지를 확고히 하고 있다.



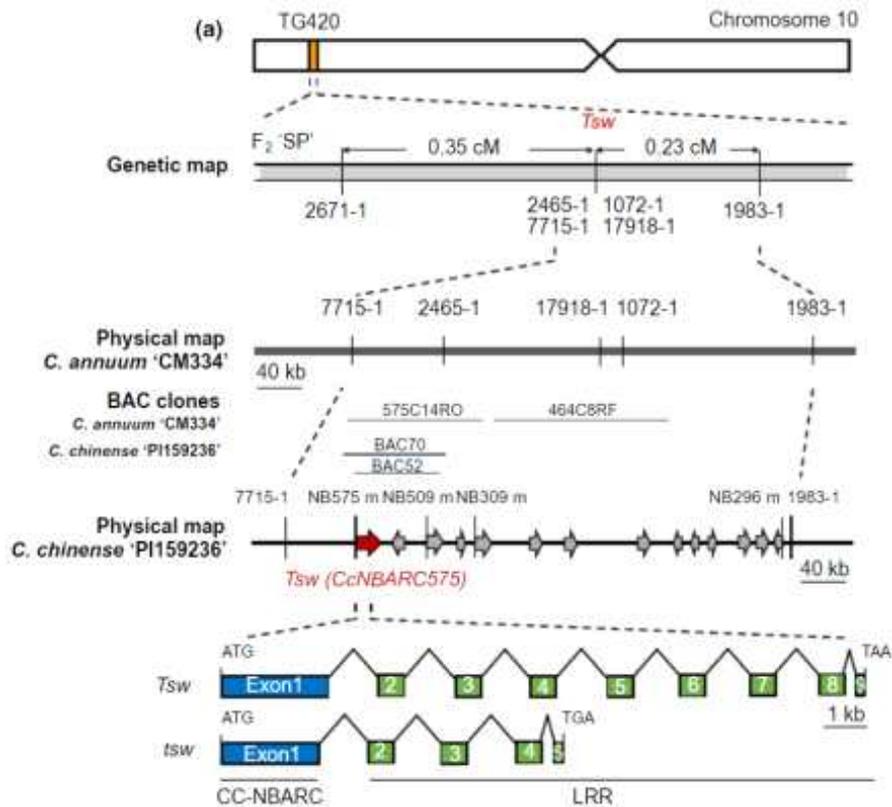
(그림)복합내병계 홍보문구 예

□ 바이러스, 병 저항성 연구 및 분자마커 개발 현황

- TSWV는 1200여 종의 식물체를 감염시키는 기주범위가 넓다. 고추밭 주변의 썩 등 다년생 잡초에서 바이러스가 월동하고 있다가 바이러스 매개충인 총채벌레에 의하여 고추를 감염시킨다. 병징은 생육 초기에 감염되면 순이 검게 고사하고, 앞에는 둥근 원형 무늬가 형성되고, 줄기는 검은색으로 변색되고 고사한다. 고추 열매에는 부정형의 둥근 무늬가 형성되고 착색이 되지 않아 농가에서는 칼라병이라고 부르기도 한다 (고추 병의 진단과 방제, 2015). 서울대 연구진은 *C. chinense* PI159236 유래 TSWV 단일 우성 유전자 *Tsw*에 대한 연관 마커를 개발하고 저항성 유전자가 NLR을 암호화하는 것을 밝혔다(Kim et al., 2016).

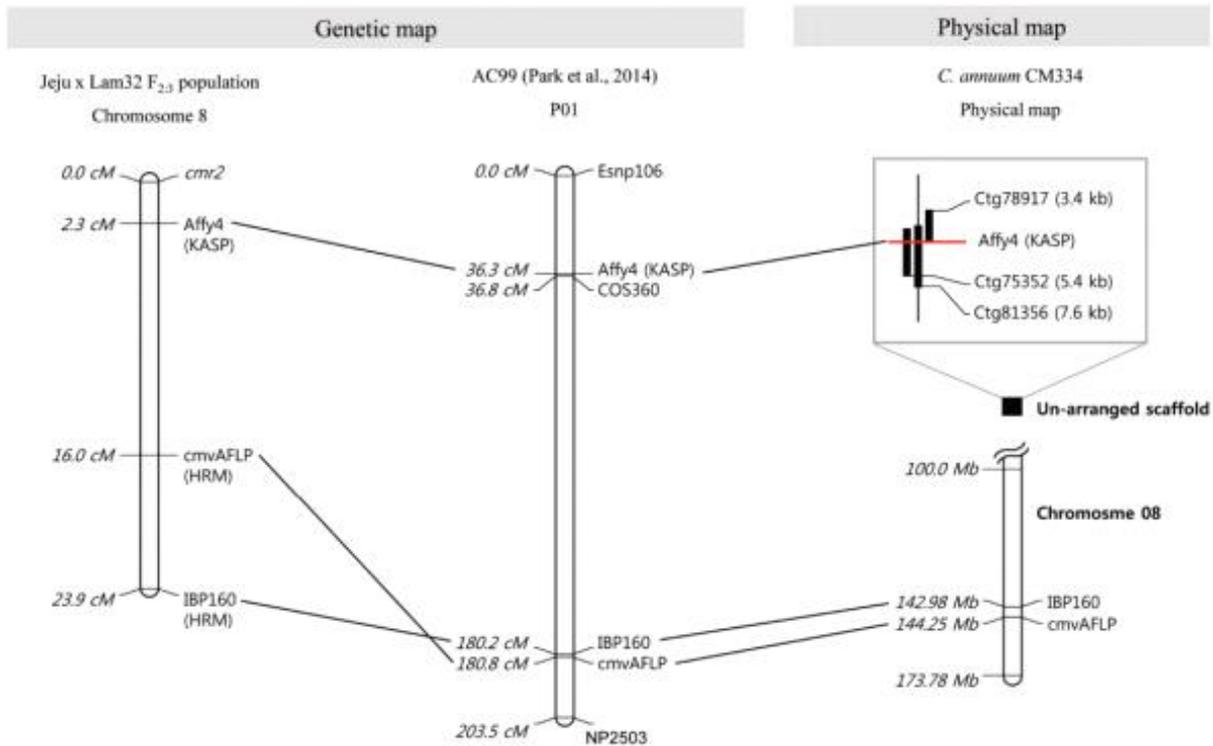


(그림) TSWV 병징. 좌측부터 잎, 과실, 식물 선단부에서 보이는 병징



(그림) TSWV 저항성 유전자 연관 분자마커 개발 및 *Tsw* 유전자의 동정

- CMV는 TSWV와 더불어 국내 고추 재배에 피해가 심한 바이러스 중 하나다. 다수의 일년생 및 숙근성 잡초를 포함하여 매우 넓은 기주범위를 가지면서 여러 진딧물이 전염된다. 일반적으로는 생장점 부근의 어린잎에서 그물무늬 모양의 모자이크 병반이 나타나는 증상을 가지고, 심하면 순마름하거나 풋고추에서는 선단 부위 줄기가 고사하기도 한다(고추 병의 진단과 방제, 2015). CMV 계통 중 CMV-P₀는 CMV-Korean과 CMV-Fny 병원체를 통틀어 일컫는다. CMV-P₀에 저항성을 가지는 유전자는 *Cmr1*이라 하고, 단일 우성이다. 서울대 연구진은 *Cmr1* 유전자는 토마토 염색체 2번의 토마토 모자이크 바이러스 (TMV, Tomato Mosaic Virus) 저항성 유전자 *Tm-1*과 동일한 염색체 상에 위치하고 있다는 사실을 토대로 고추 EST (Expressed Sequence Tags) 유사 서열을 이용하여 분자마커를 개발하였다(Kang et al., 2010). 그러나 *Cmr1*은 다른 CMV 계통인 CMV-P₁에 저항성을 가지지 않으며, CMV-P₁는 CMV-Korean과 CMV-Fny에 저항성을 가지는 품종에 병을 일으킬 수 있다. CMV-P₁에 저항성을 가지는 유전자는 *cmr2*이고, *Cmr1*과 달리 단일 열성이며 CMV-P₀뿐 만 아니라 CMV-P₁에도 저항성을 가진다. *cmr2*는 고추의 1번 염색체에 위치한 사실이 밝혀졌으며 저항성 고추를 선발하기 위한 SNP 마커를 개발하였다(Choi et al., 2018).



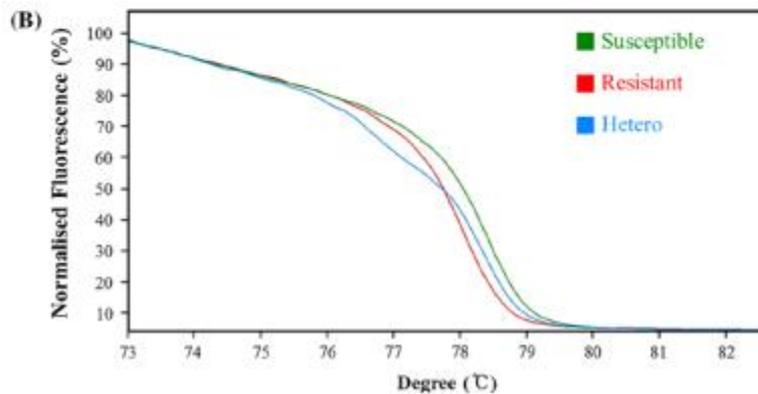
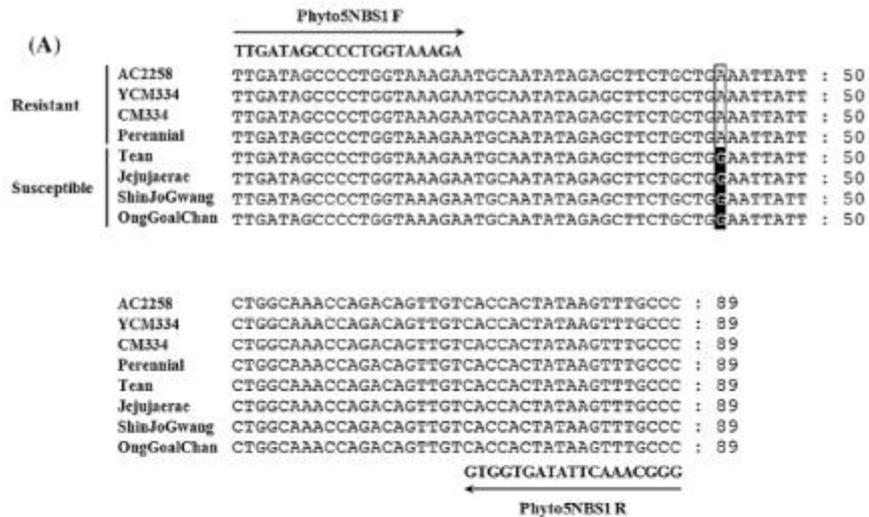
(그림) *cmr2* 연관 마커 개발 및 *cmr2*의 fine mapping (Choi et al., 2018)

- 고추 역병은 *Phytophthora capsici*라는 oomycete에 의해 발생하는 병이다. 전 생육기에 걸쳐서 뿌리부터 과실까지 식물체 모두에 발생할 수 있다. 역병균이 침입하면 뿌리가 썩고 식물이 말라 죽는 병징을 보인다. *P. capsici*의 저항성 메커니즘을 유전학적으로 분석하기 위해 균주에 따른 병원성을 고려해야 한다. 고추 역병 저항성 계통은 둘 이상의 유전자에 의해 유전되는 양적 형질 유전자좌(Quantitative trait Loci, QTL)를 가지고 있다. 역병 저항성 QTL 주동 유전자좌는 염색체 5번에 위치한다고 보고된 바 있다. 서울대 연구진은 microarray를 이용하여 BSA (Bulked Segregant Analysis)를 통해서 5번 염색체에 위치한 EST (Expressed Sequence Tags) 기반의 후보 unigene 서열을 얻었고, 여기에서 작성한 SPP (Single Position Polymorphism) 마커 중 QTL 유전자에 가장 가까운 'Phyto5SAR'를 개발하였다. 이 마커를 포함한 scaffold 서열(*C. annuum* genome database)에서 찾은 역병 저항성 후보 유전자 3개를 통해 SNP 마커를 작성하였는데 'Phyto5NBS1'이 역병 저항성 계통을 검정하는데 있어 가장 정확도가 높았다. 이 마커는 낮은 병원성을 보이는 역병 균주(MY-1)에 약 90%의 정확성으로 저항성을 보이고, 중간 병원성의 JHA11-7에는 73%의 정확성을 보였다(Liu et al., 2014).



Gerald Holmes, Strawberry Center, Cal Poly San Luis Obispo, Bugwood.org

(그림) 역병 병징. 좌측부터 과실 감염 증상, 우측은 식물체 전반의 증상

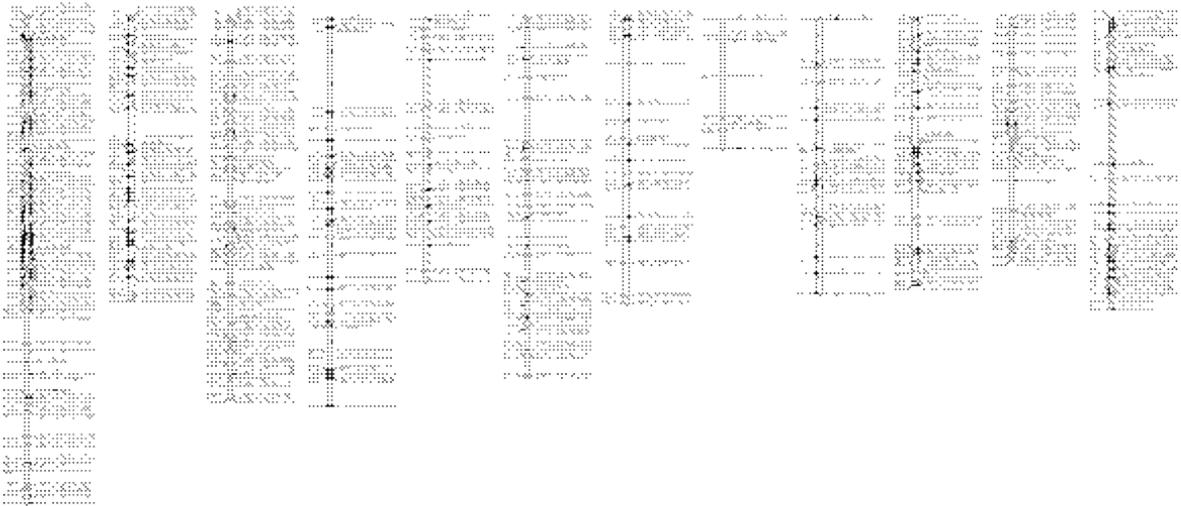


(그림) 역병 저항성 QTL 주동 유전자 연관 마커 Phyto5NBS1 (Liu et al., 2014)

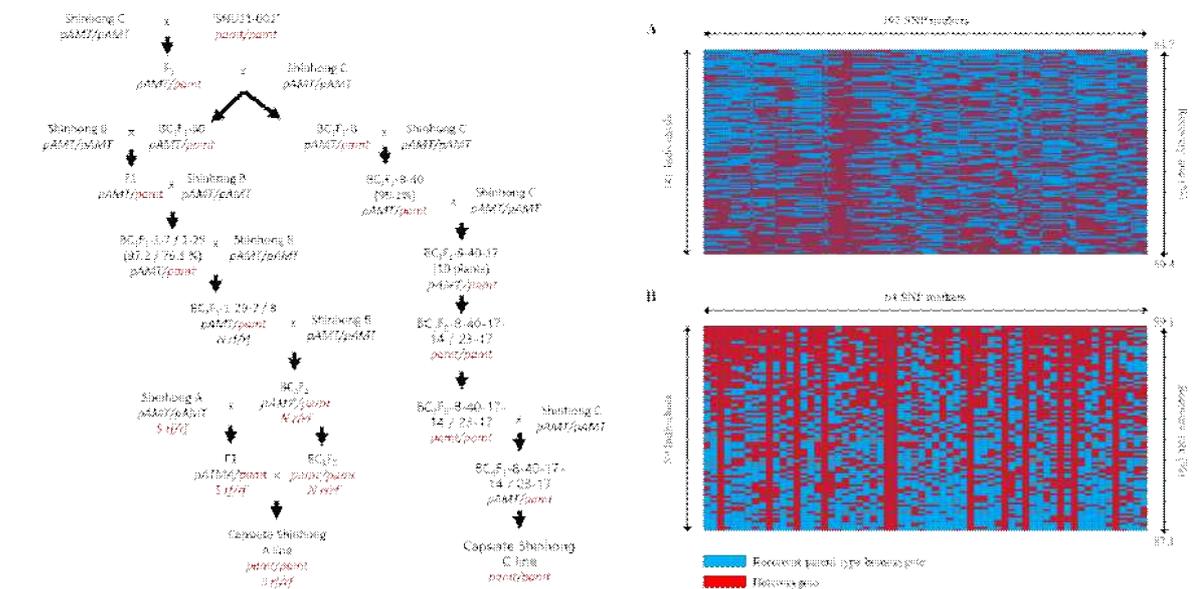
□ 여교배 기술의 발달 및 marker-assisted backcrossing (MABC) 용 마커 개발

- 유전자 집적 (gene pyramiding)은 병원체에서 병원성이 나타나지 않은 두 개 이상의 저항성 유전자를 도입하는 방법으로, 저항성 유전자들이 조합된 재배종 여러 개를 만들어 낼 수 있다. 자가수정 작물에서는 여교배를 통해 저항성 다중 계통을 육성한다.
- 저항성 계통 육종을 위해서는 단일 유전자에 의해 조절되는 과민 저항성의 경우나 양적으로 유전되는 저항성의 경우 모두 분자마커를 활용하면 직접적인 선발 과정을 거치지 않아도 간접적으로 효율적인 선발이 가능하다.

- Marker-assisted Backcrossing (MABC)는 회복친의 유전적 배경을 분자 마커를 사용하여 가장 높이 회복한 개체를 선발하는 여교배방법이다(Hospital and Charcosset 1997). MABC는 foreground selection과 background selection의 두 과정으로 이루어져 있다. Foreground selection은 목표 형질과 연관된 유전자를 포함한 개체를 선발하는 과정이고, background selection은 비교적 많은 수의 마커를 사용하여 회복친의 유전적 배경과 가까운 개체를 선발하는 과정이다(Hospital et al. 1992). 이와 같은 과정을 반복하면, 새로운 품종을 육성하는 데 있어 전통적인 방법보다 훨씬 시간이 적게 든다는 장점이 있다(Randhawa et al. 2009).
- 서울대 연구진은 고추의 MABC를 위하여 유전체 전반에서 expressed sequence tags (ESTs) 기반의 412개 SNPs을 활용하여 마커 세트를 개발하였다(Kang et al., 2015). 이 마커 세트는 Fluidigm과 GT-seq을 통하여 분석이 가능하며 여교배 3세대 진전으로 회복친의 99% 이상까지 세대 단축이 가능하다는 것을 확인하였다 (Jeong et al., 2015).



(그림) 고추 ESTs 기반으로 개발한 MABC용 412개 SNP 마커 세트



(그림) MABC를 이용한 품종의 육성 계통도(왼쪽)와 유전적 배경 회복에 대한 모식도(오른쪽)

□ 고추 고기능성 품종 현황

- 고기능성 품종은 식생활의 다변화와 빠른 트렌드 변화로 다양한 시장의 요구도 증대에 따라 새로 생겨난 시장이다. 일반적인 녹색 풋고추가 생식용 고추에서 주된 시장을 형성하였으나, 혈당을 낮춰주는 루테오닌 성분의 고함량으로 당 조절에 도움을 주는 기능성 고추가 인기를 끌고 있다. 또한 비타민 C 고함량과 오이맛을 가지는 오이맛 고추 역시 서구화된 식습관에 익숙한 젊은 소비층에 큰 판매를 이루고 있다.



(그림) 오이맛 풋고추(왼쪽), 당조 고추(오른쪽)

- 캡시에이트 또한 최근 대두되고 있는 기능성 물질 중 하나이다. 캡사이신과 비슷한 의학적 효능을 지니고 있으나 매운맛이 거의 없어 대체 물질로 사용할 수 있다. 대표적인 효과로 사람이 섭취하였을 때 신체에 발열을 일으켜 항비만 작용을 한다. 일본에서는 캡시에이트를 합성하는 품종 *C. annuum*의 ‘CH-19 Sweet’에서 추출한 물질로 ‘Capsiate Natura’라는 보조제를 판매하고 있다. 최근에는 서울대학교에서 캡시에이트를 합성하는 계통 *C. chinense* ‘SNU11-001’를 사용한 교배육종으로 신품종을 육성하였다. 매운 고추 *C. chinense* ‘Habanero’와 교배하여 캡시에이트 고함유 품종 SNU Wonder HO, SNU Wonder HR(출원번호 2018-0702, 2020-0251)을 개발하여 출원하였다.



(그림) 캡시에이트 고추를 활용한 사업화 A. capsiate 보조제 ‘capsiate Natura’, B. SNU wonder HO, C. SNU wonder HR.

- 고추가 함유한 색소 카로티노이드도 기능성 물질 중 하나이다. 미국에서는 2006년부터 파프리카의 카로티노이드 성분 중 하나인 zeaxanthin을 이용한 눈 건강용 기능식

품이 시장에 출시되었다. 칼세크(Kalsec)라는 회사에서 파프리카의 zeaxanthin 성분을 ‘ZeaGold’라는 이름으로 개발하였다. zeaxanthin은 lutein의 이웃사촌 격 성분으로, 노란색과 오렌지색을 띄며 각종 과일과 채소류 속에 함유되어 있다. 자외선이나 산화(酸化) 스트레스, 유해 활성산소(free radicals)로 인한 망막 손상을 예방하는 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다.



(그림) 파프리카의 zeaxanthin 물질을 활용한 Kalsec사의 ZeaGold

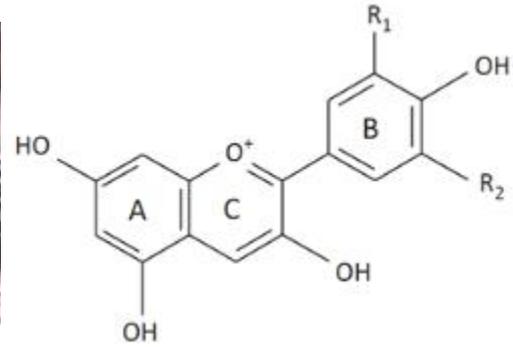
- 근래에는 전통적인 녹색 고추의 이미지를 벗어나 다양한 색의 시각적인 매력과 기능적인 안토시아닌 고함량 품종에 대한 시장 요구도가 점점 늘어나고 있다. 안토시아닌은 암예방에 큰 효능이 알려졌고, 항염증과 혈당 감소에 큰 영향을 주는 물질이다. 따라서 자색 채소에 많은 안토시아닌 연구가 활발히 진행되고 있고, 자색 고추에 대한 시장의 반응이 증가하고 있는 추세이다. 현재 자색에 대한 고추 품종은 아시아중요에서 ‘드셔보라’가 출시된 후 TSWV 내병성이 추가된 ‘미인보라’도 자색 풋고추가 판매되고 있으며, 대형마트 등을 통해 유통되고 있다.



(그림) 자색 풋고추의 예시

□ 과색 (안토시아닌) 연구 현황

- 안토시아닌은 수용성의 이차대사산물로 플라보노이드 생합성 경로를 통해 합성된다. 안토시아닌은 폴리페놀 계열의 화합물로서 식물체의 줄기, 잎, 과색 등에서 다양하게 축적되는데, 이때 나타나는 색은 불그스름한 빛깔에서부터 보라색, 파란색까지 다양하게 관찰된다(Koes et al., 2005; Tanaka et al., 2008). 안토시아닌은 병원체나 자외선 등의 스트레스로부터 식물체를 보호하는 역할을 하며, 수분의 매개가 되는 곤충을 유인하는 등 복합적인 기능을 갖는다. 또한 안토시아닌은 항산화 기능을 갖는 물질로써 사람이 섭취했을 때 이로운데, 심혈관질환, 퇴행성 질환, 그리고 일부 암에도 긍정적인 효과를 보이는 것으로 알려져 있다(De Pascual et al., 2010).



(그림) 안토시아닌 축적과 그 분자구조

- 식물에서의 안토시아닌 생합성 경로는 잘 알려져 있고 상대적으로 많은 연구가 진행되고 있다. 고추에서도 안토시아닌 생합성에 관여하는 유전자들이 다양하게 규명되어왔다. 안토시아닌 생합성 경로를 이루는 유전자들은 크게 그 생합성 경로를 구성하는 구조유전자(structural gene)와 조절유전자(regulatory gene)로 구분할 수 있으며 (Gonzali et al., 2009), 구조유전자의 경우 Dihydroflavonol까지의 합성에 관여하는 EBG (Early Biosynthesis Gene)와 이후 안토시아닌까지의 합성에 관여하는 LBG (Late Biosynthesis Gene)로 나누어볼 수 있다. 생합성 경로의 구조유전자는 대부분 규명되어왔으며, 최근 중국 연구진에 의해 생합성 경로의 말단에 위치하는 *Ca3GT* 유전자가 규명된 바 있다(Liu et al., 2020). 그러나 조절유전자의 경우 현재 상대적으로 다양한 연구가 이루어지지 않았다. *CaAN2* 유전자가 대표적으로 알려져 있고, 이 조절유전자는 이는 LBG에 속하는 구조유전자의 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 서울대 원예작물유전육종학연구실에서는 *CaAN2*의 기작 (Jeong et al., 2019)을 밝힌 바 있다.

3) 연구개발의 중요성

□ 고추 종합 병저항성 품종 개발의 중요성

- 복합내병계 (TSWV, 탄저병, 역병)라는 브랜딩 이름으로 각사들이 다양한 내병계품종들을 매년 출시하고 있다. 하지만, 그 품질이 기존의 일반 품질계고추 (예 셋별고추, 빅스타 등)에 크게 미치지 못하는 실정이다. 그리고 오늘날 복합내병계 품종에 더하여 PMMoV 또는 CMV 등 필드바이러스에 강한 품종의 요구도 또한 늘어나고 있다. 따라서 여러 가지 병에 대한 내병성은 가지고 있으면서, 품질 또한 일반계 고추가 가지고 있는 건과의 품질을 유지하는 종합내병계 고품질 건과 고추의 개발이 필요하다.



(그림) 일반 비내병, 고품질계 품종 vs 시중 리딩품종. A: 일반종(비내병계), B: 복합내병계(품종 1) 홍초품질 저, 건과요철 심함, C: 복합내병계(품종2) 저품질 건과, D: 복합내병계(품종3) 홍초요철, 건과 착색불량

- 고품질계는 정량적 기준이 있지는 않지만, 건고추의 요철, 곡과 정도, 외피의 두께 등을 종합적으로 고려하여 판단되며, 정량적 기준으로는 ASTA 값이 많이 쓰인다. ASTA (American Spice Trade Association) index는 현재 널리 쓰이고 있는 고춧가루 색소에 대한 등급을 나타내며, 많은 육종회사에서 품질의 기준으로 쓴다. 김장용 건고추의 ASTA값이 높으면 높을수록 선명하고 진한 김치를 생산해 낼 수 있어 큰 장점이 있다. 고춧가루를 눈으로 보았을 때는 다 같은 붉은 색으로 보이지만, 실제로 색소의 함량이 미달한 고춧가루는 저품질의 김치를 만들어 내기 때문에 소비자의 입장에서 아주 큰 문제를 제기한다.



□ 고기능성(안토시아닌) 자색 풋고추 개발의 중요성

- 기능성 품종에 대한 요구도가 증가하고 있으며 실제로 판매되고 있는 고추의 5%는 특이형(동남아형), 기능성 고추(당조고추 등)이다. 특히 자색무, 자색파프리카, 자색당근 등 안토시아닌 고함유 식품에 대한 기능적인 측면이 대두됨에 따라 풋고추 시장에서 식미가 개선된 자색 풋고추 시장은 더욱 늘어날 것으로 예상된다.

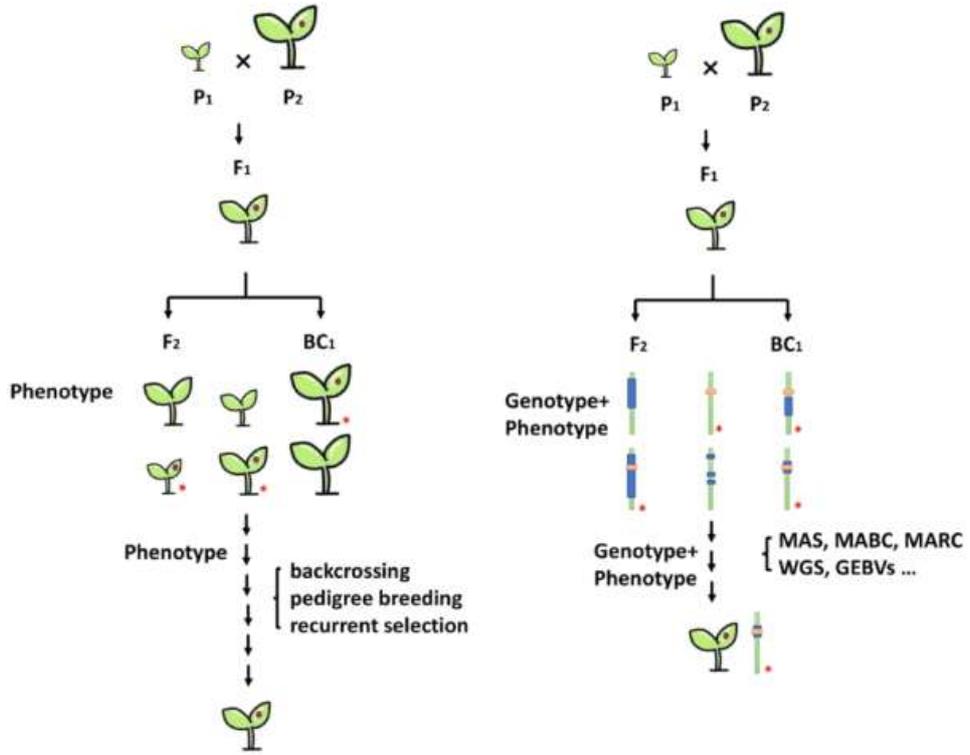


(그림) 자색 농산물 및 고추 품종 인기 방송 화면

- 안토시아닌은 대표적인 건강 기능성 항산화물질로, 고추에서도 과실에 안토시아닌을 축적한 품종이 다양하게 상용화되어 있으며 이는 미래 시장에서 그 가치를 더해갈 것이다. 현재까지 이루어진 연구에 따르면 고추에서 안토시아닌 생합성 경로를 구성하는 구조유전자의 발현을 조절하는 조절유전자는 두 가지 유형을 갖는다. 한 가지는 과실뿐만 아니라 모든 조직에서 자색 형질의 발현을 조절하는 유전자로, 대표적으로 *CaAN2* 유전자의 기능이 보고된 바 있다. 다른 한 가지는 줄기, 잎 등 다른 조직에서는 안토시아닌의 합성을 유의하게 조절하지는 않으나 과실 특이적으로 안토시아닌 축적을 유발하는 유전자이며, 아직 고추에서는 보고된 바 없다.
- 상용 품종에서는 과실 특이적인 형질 발현이 유리할 것으로 판단할 수 있는데, 고추는 그 과실을 주로 이용하는 작물이며, 줄기나 잎 등에서 안토시아닌이 합성되는 것은 일반적으로 스트레스에 저항하기 위한 것으로서 광합성 효율 감소 등 생장에 부정적인 영향을 초래할 가능성이 존재하기 때문이다. 본 과제에서 다루고자 하는 것은 과실 특이적인 안토시아닌 발현을 조절하는 인자와 그 기능을 규명하고, 마커로 개발하고 적용하여, 보다 효율적이고 효과적으로 품종을 개발하는 것으로, 국내외 고기능성 고추 품종 시장에서 역량을 강화하는 데 도움이 될 것이다.

□ 분자유종을 이용한 품종 개발의 중요성

- 우리나라 고추 품종의 수명은 기존 5~6년이던 것이 2~3년으로 매우 짧아지고 있으며, 표현형에만 의지하여 선발, 고정, 조합 등의 과정을 거치는 전통 육종법으로는 시장의 변화를 요구도 변화를 따라가기 어려울 뿐만 아니라 경쟁력을 확보하기도 어렵다. 따라서 분자마커를 이용한 MAS를 품종 개발에 도입하여야 절대적인 기술의 우위를 달성할 수 있다. 특히 TSWV, CMV, PMMoV 등에 대한 분자마커는 이미 서울대 연구진에서 개발되어 품종 개발에 적극 활용할 필요가 있다.



전통적 방법의 육종

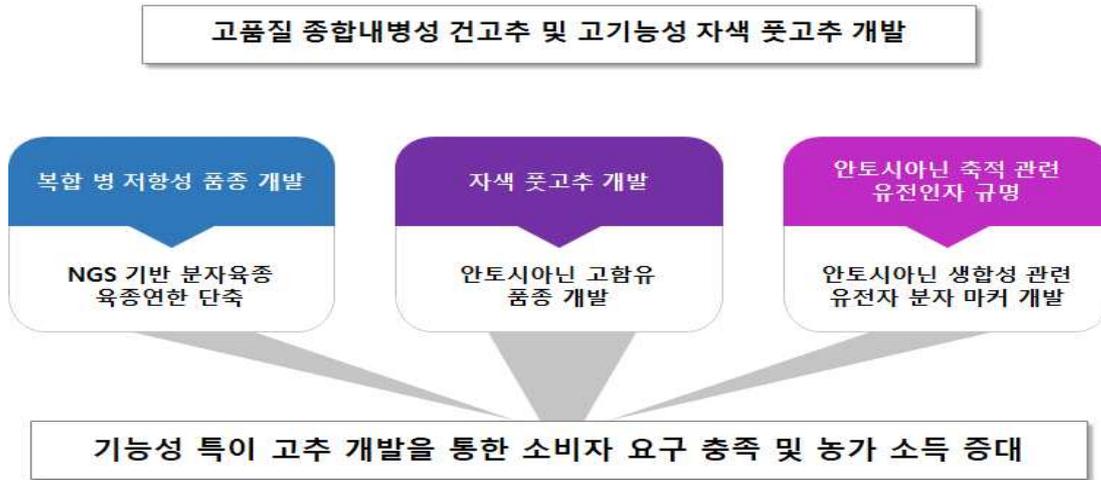
분자마커이용 육종(MAS, MABC)

(그림) 육종 방법의 비교

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발과제의 최종 목표

- 육종 연한 단축을 위한 분자마커를 활용한 복합 병 저항성 품종 개발
- 안토시아닌 고함유 자색 풋고추 품종 개발
- 고추 안토시아닌 축적에 관여하는 유전인자 규명 및 분자마커 개발



(그림) 최종목표

2) 연구개발과제의 단계별 목표

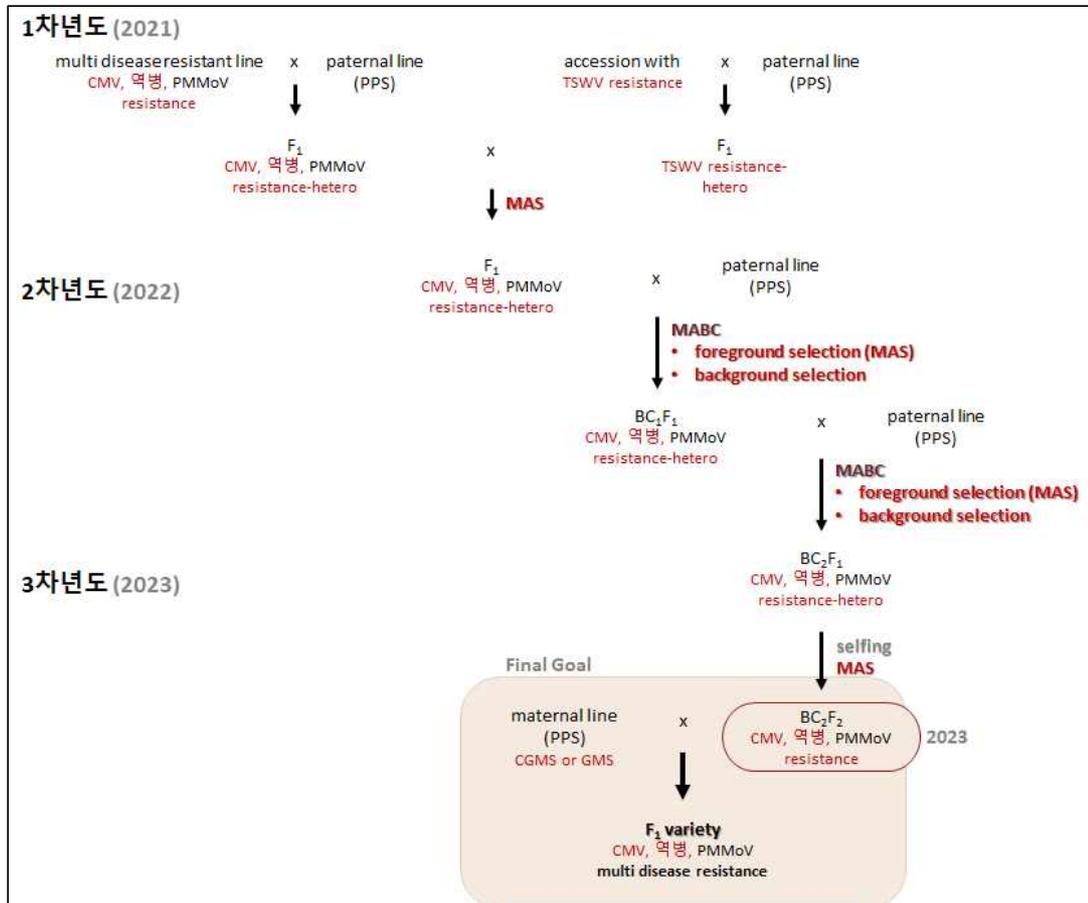
단계 (연차)	구분	목표
1단계 (1년차, 2021)	주관연구 (PPS)	엘리트 부계 집단 이용 내병성 및 고품질계 유전자 도입
		분리세대 MAS를 이용한 선발
	공동연구 (서울대)	여교배를 통한 내병성 및 고품질계통 고정화 1단계
		미숙과에서 자색 발현하는 고추 연구 집단 구축
1단계 (2년차, 2022)	주관연구 (PPS)	계통 간 표현형 비교 및 HPLC를 통한 후보 계통의 안토시아닌 함량 측정
		여교배를 통한 내병성 및 고품질 계통 고정화 2단계
		MABC를 이용한 조합 계통 선발
	공동연구 (서울대)	조합작성 및 1차 품종선발
2단계 (3년차, 2023)	주관연구 (PPS)	후보 조합 원원종 증식
		Bulked Segregant RNA Sequencing을 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 Transcriptome 분석
		육종 집단 생육 초기 자색 개체 선별을 위한 마커 개발
	공동연구 (서울대)	지역 시교 및 데이터수집
		2차선발 품종의 원종 증식 (국내 연구소) 및 생산력 검증 (해외 증식표 활용)
		고기능성 자색 풋고추 품종 출원 및 홍보화
		후보유전자 동정 및 VIGS를 통한 유전자 기능 및 기작 연구
		생합성 경로에서의 유전인자 간 상호작용 기작 규명

최 중	<ul style="list-style-type: none"> - 복합내병성 및 자색 풋고추 품종의 개발 - 고추 안토시아닌 축적에 관여하는 유전인자 규명, 분자마커 개발
-----	---

3) 연구개발과제의 단계별 수행 과정 계획

□ 복합 내병성 건고추 육종 및 개발

- PPS사 보유종인 고품질계(식미, 건고추 품질, 고춧가루 고품질) 모부분 계통 선발
 - 1) 현재 시장에서 리딩하고 있으며, 가장 소비자의 선호도가 높은 일반계(비역병, 비탄저, 비TSWV계) 품종의 모부분 이용
 - 고품질 건고추 모계(PS136 계통)
 - 고품질 높은 식미 건고추 부계(N758 계통)
 - 고품질 대과형 건고추 부계(CS435 계통)
 - 고품질 고춧가루 우수, 높은 ASTA색소 부계(PS32 계통)
 - 2) 특성이 확인된 내병성 계통
 - 저항성으로 알려진 내병성 계통 수집
 - 기 확보된 유전자원
 - 시판종 분리 계통 확보
- 복합 내병성 건고추 육성을 위한 여교배 집단 작성 및 품종개발
 - 자사가 확보한 엘리트라인(일반계 고품질 고추)에 저항성 유전자를 도입함
 - 서울대로부터 기술이전 받은 병 저항성 마커들을 이용하여, 다양한 병에 대한 저항성 유전자들을 도입하되, 육종의 연한을 단축하기 위하여, 여교배후 background selection을 통해 최대한 부계의 형질을 유지하면서 저항성 유전자를 포함하는 개체 고정함
 - 병 저항성 마커 및 자색 유전자 마커를 기술 이전 받아 품종개발 과정중 추가적으로 개발되는 마커들에 대해 신뢰성과 일반성 검증함
 - 1차년도: 복합 내병성 CMV, 역병, PMMoV 저항성 라인과 TSWV 저항성 품종과 각 PPS 본사 보유 모계라인을 이용하여 교배조합을 작성함. 서울대학교로부터 기술이전 받은 분자마커를 활용하여 저항성 유전자가 도입된 품종을 선발함(MAS).
 - 2차년도: 1차년도에서 선발된 저항성 품종에 본사의 모계라인을 여교배 함. MAS를 이용하여 저항성 유전자가 포함된 BC₁F₁을 선발함. 선발된 BC₁F₁에 다시 한번 MABC를 진행함
 - 3차년도: 선발된 BC₂F₁을 자가교배하여 BC₂F₂를 개발함. MAS를 이용하여 복합 내병성 저항성을 갖고 있는 품종을 선발하며, CGMS 또는 GMS를 이용하여 F₁ 품종을 개발함
 - 기술 이전 받은 저항성 마커와 자색 마커를 활용하여 순도 및 동일성 검사에 활용함



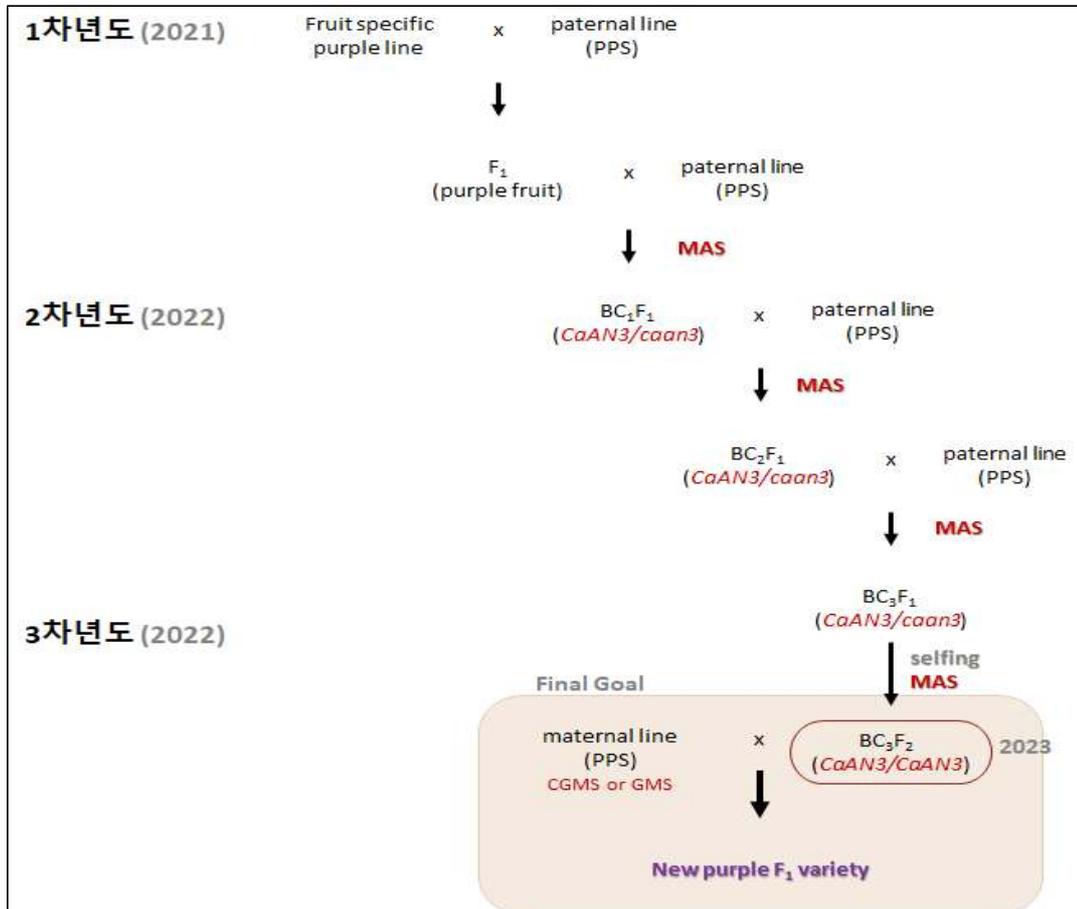
(그림) 복합 내병성 건고추를 육성하기 위한 계통도

□ 고기능성 자색 풋고추 개발

○ 소재 확보 및 분류

- 1) 자사의 아삭이계 품종 중 소비자의 선호도가 높은 계통 이용
 - AS76 (부계),
 - N23 (모계)
 - 안토시아닌 F1 품종은 현재 시판중인 보라색 고추 제품과, 자색파프리카 F1을 고정여부 상관없이 엘리트라인과 교배함
- 2) 특성이 확인된 내병성 계통
 - 안토시아닌 함유 품종 재료 확보
 - 시판종 분리 계통 확보함
- 3) MAS를 활용한 자색 풋고추 개발
 - 서울대 보유 자색 유전자 마커를 기술이전 받아 품종개발 과정 중 MAS를 이용한 자색 고탍유 풋고추 선발함.
 - 1~3년차 기존 밝혀진 자색 마커를 활용하여 F1 품종을 선발, 여교배에 활용함. 3년차 BC3F2에서 CGMS 또는 GMS를 이용하여 F1 품종을 개발함.
 - 또한 개발된 품종의 순도 및 동일성 검사에도 분자마커를 활용함.
 - 식감과 식미를 개선하기 위하여, 자사 우수 계통을 사용한 육종을 진행하며 식미는 블라인드 테스트를 거친 가장 선호도가 높은 엘리트라인의 모부계통에서 진행함.

○ 고기능성 자색 풋고추 육종과정 계통도



(그림) 자색 우수 품종을 육성하기 위한 계통도

□ 원원종 및 원종 증식 계획(3차년도)

- 원원종 (Breeder's Seed) 증식은 경기도 이천시 율면 본사 연구소에서 이루어지며, 분리된 길이 30m x 넓이 5m 단동 Nursery House에서 진행. 다른 계통들의 모부분과 함께 증식에정하므로, 따로 격리된 탐핑하우스가 아닌 육종가의 연구동에서 진행. 각 개체별로 20주 내외 진행. 네트를 설치후 충의 유입을 차단함. 토경, 관주재배



[그림] 하우스 예상 조감

- 원종은 (경기도 안산시 상록구 자사 연구소에서 진행되며, 연구소 증식팀의 자사 프로토콜에 맞추어 생산 진행됨 대량 생산을 위한 원종 증식(생산)과 동시에 생산력 검증을 위한 시교 생산도 진행함. (평당 수확량 계산).

탐핑하우스 재원: 3m (넓이) x 15m (길이) x 3.5m (높이)

□ 외부 시교(농가 실증시험)

- 각 지점과 마케팅 팀을 통한 전국단위의 실증시험
 - 시교사업은 각 지역을 중심으로 농가에서 직접 진행함
 - 대비종과의 비교를 위해 파종시 대비종 포함 진행
 - 정식시기에 대비종 포함 일괄 정식하며, 재배는 농가 각자의 관행재배 따름
 - 3반복 각 10주 이상을 원칙으로 하며, 각 반복당 5주 이상 수확 조사함

조사항목표

Plant growth habit 생육특징	Stem	줄기
	Internode	마디길이
	Attitude	초형
Leaf Character 잎특징	Color	잎색
	Length	잎길이
	Width	잎폭
Fruit Character 과특징	Color	풋고추색
	Crack	열과
	Cacium def.	칼슘결핍
	Curvature	곡과정도
	Texture	표면
	Pungency	매운맛
	ASTA	홍초색
Maturity	숙기	
Setting type 착과형태		연속착과
		집중착과
		과장변이
		마디 건너뛰기
Fruit Diameter (cm)		직경
Fruit Length (cm)		길이
Yield per Plot (Kg.)		수량
Dry Fruit Weight (gm)		건과무게
Virus Infection %		바이러스 감염율
Per Plant Yield		수확량/본
Dry Fruit Quality 건초품질	Color	건과색
	Surface	요철
	Shape	형태
	Shine	광택

□ 자체 생산, 품질보증(QA), 가공 판매

- 자체생산
 - 자사 생산팀을 통한 자체 생산진행
 - 국내: 연구소 및 청양지역 벤더를 통한 생산
 - 국외: 태국 콘캔 계약 벤터 통한 생산
- 품질보증

- 생산종자는 병리 순도검사를 필수 거치며 순도검사시 동일성검사는 PCR 진행함
진행 순서

1. 고추 gDNA 추출

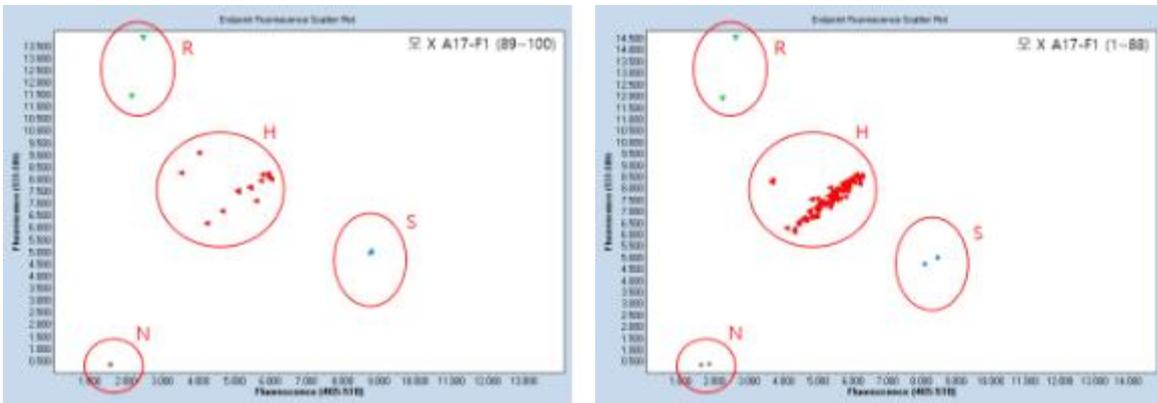
각 생산된 F1 품종의 고추 식물체 잎 사용
잎 샘플 샘플링하여 CTAB method 이용 DNA extraction 수행
gDNA stock은 TDW 50 ul에 녹여 -20℃에 보관

2. 순도 검정을 위한 분자마커 선발

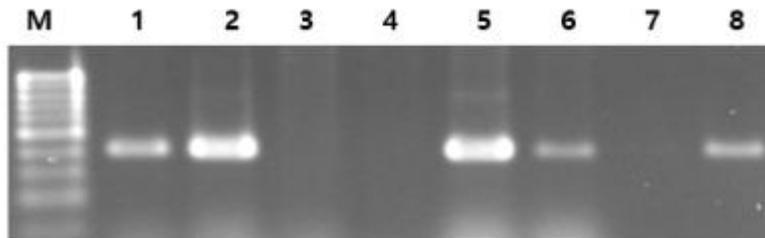
KASP 마커를 이용한 부,모, F1 구별 가능한 마커 screening
여러 마커를 사용하여, 부, 모, F1(hetero)으로 나타나는 마커 선정

3. 분자마커를 이용한 순도 검정

모든 샘플의 gDNA는 50 ng/ul로 희석하여 동일 농도로 사용
선정된 순도 검정용 마커 각 집단의 순도 검사를 실시
자사 보유 LightCycler 480 Real-Time PCR system 이용하여 PCR을 수행



KASP 분석 예시



(그림) 병검증 진행 PCR 예



(그림) 발아검사: 상토 트레이 및 인큐베이터 기내발아 (종이치상)

종자발아 보고서														
품종명	기내출현율%			상토출현율%				비정 상 %	작은묘 %	불발 아 %	발아 세 %	발아율 %	병리	동일성
	3일차	5일차	12일차	6일차	7일차	8일차	9일차							
TAP324	29	89	94	74	86.5	88.5	89	7.5	2.5	11	76.5	79	적합	적합

(표) 발아시험 보고서 내용 예시

○ 가공 판매

모든 공정은 본사 자체 가공센터에서 이루어지며, 종자정선, 코팅등의 수확후 과정포함, 포장, 라벨링등 모든 과정을 자체진행함. 연간 생산/가공능력 120톤

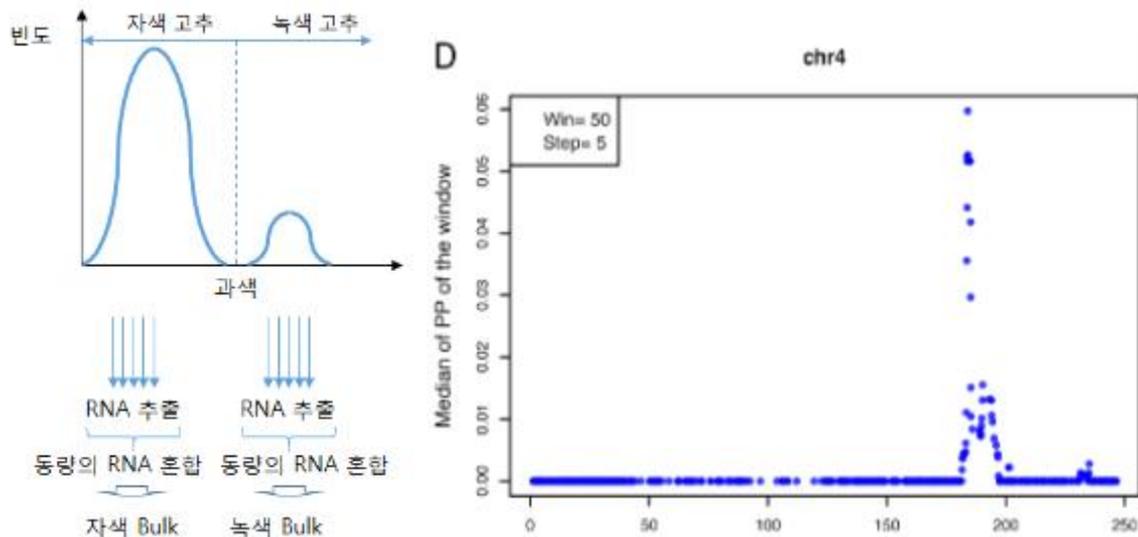


(그림)정선 가공 공장 내외부 전경

(2) 공동연구과제: 고추 안토시아닌 축적에 관여하는 유전인자 규명 및 분자 마커 개발(서울대학교, 강병철)

□ 고추 안토시아닌 보유 계통을 활용한 F2 집단 구성 및 마커 개발

- 본 과제에서는 과실 특이적인 자색, 즉 안토시아닌 축적에 관여하는 조절 요인을 규명하고 분자마커를 개발하여 같은 표현형을 지닌 서로 다른 계통에 공통적으로 적용 가능한지 검증한 다음 육종에 활용함.
- 과실 특이적인 안토시아닌 축적을 나타내는 계통과 식물체 전체에서 안토시아닌 축적이 관찰되지 않은 계통을 각각 모, 부계로 삼아 F1을 얻고 F2에서 이를 분리시켜 재조합 탐색 및 안토시아닌 합성 유전자를 규명하기 위한 연구 집단을 작성함. 집단 규모는 300 ~ 500 개체를 육성하고 자색 표현형을 조사함.
- 착과 후 미숙과 단계에서 RNA를 샘플링하는 것은 미숙과에서 자색 착색이 이루어지고 있는 과피의 일부분, 즉 전사 과정이 가장 활발하게 이루어지는 것으로 짐작할 수 있는 부분을 샘플링해 추출함. 이후 샘플링한 RNA를 표현형에 따라 각각 풀링(pooling)하는데, 이때 각 표현형(착색, 미착색)에 따른 RNA 풀은 그 규격을 15 ~ 20 사이로 설정함.
- 유전자 효율적으로 매핑하고 마커를 개발하며 그 기능을 분석하기 위해 본 과제에서는 BSR-Seq (Bulked Segregant RNA Sequencing) 방법활용함. BSR-Seq 방식은, 어떤 분리 집단 내에서 특정 형질이 서로 다른 두 개체군이 있을 때, 동일한 형질을 갖는 각각의 개체들의 RNA를 풀링(Pooling)하여 하나의 분석 단위로 만들고 이를 시퀀싱하여 두 그룹이 갖는 차이를 확인할 수 있도록 하는 기법임. 이 방식은 기본적으로 BSA (Bulked Segregant Analysis), 즉 서로 같은 특성을 지닌 개체들을 대단위로 모아 서로 다른 단위 사이에서 다형성을 보이는 부분을 찾아내고자 하는 분석 방식을 기본으로 하여 이를 RNA 시퀀싱에 적용함. 이를 통해 유전체 서열상의 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)를 확보함.



- BSR-Seq을 통하여 SNP가 확보되면 이를 SNP 마커로 전환하여 F2의 표현형과 SNP 마커의 유전형을 조사하여 안토시아닌 합성 유전자의 범위를 조사함. 안토시아닌 합성 유전자의 범위가 확정되면 표준유전체 서열에서 후보유전자를 탐색함.

□ 고추 안토시아닌 축적에 관여하는 유전인자 기능 분석

- Fine mapping을 통하여 후보유전자가 확보되면 식물유전자의 기능 분석을 위해 VIGS (Virus-induced Gene Silencing) 사용하여 후보유전자의 선발함. VIGS 기술은 바이러스를 통해 식물에 유전자 서열 일부를 인위적으로 주입하여 유전자를 일시적으로 침묵시킴으로써 유전자의 기능을 분석하는 방법 중 하나임. 이 방법은 유전자의 기능을 상대적으로 짧은 시간 안에 확인할 수 있는 장점을 가지고 있음. 서울대학교에서는 VIGS 기술을 이용하여 식물 번역인자 중 하나인 eEF1B가 PVX의 증식에 관여한다는 것을 보였으며(Hwang et al., 2015), 또한 CMV-P1의 증식에 관여하는 두 개의 유전자(C3P, FDH)를 밝혀냄(Choi et al., 2016). 최근에는 고추 안토시아닌 관련 유전자를 리포터 유전자로 활용함으로써 고추 과실 수준에서 VIGS를 확인할 수 있는 방법이 보고된 바 있음(Kim et al., 2017). VIGS 연구 방법은 단시간에 유전자 기능 분석을 할 수 있는 매우 효율적인 방법으로, 본 과제에서는 이를 활용하여 과실 특이적인 안토시아닌 축적을 유도하는 유전자에 대한 기능을 분석하고 유용 계통을 선별하는 것을 그 내용함.
- 한편, 자색 형질이 과실 특이적으로 발현하는 데에는 두 가지 경우가 있을 수 있는데, 한 가지는 프로모터의 구조적 변이가 존재하는 경우이며, 다른 한 가지는 유전자의 기능이 상실되어 있음. 두 가설을 검증하기 위해 먼저 유전자와 프로모터 구간의 전체 서열을 확보함. 우선 프로모터 구간의 구조적 차이가 존재한다면 Transient GUS Expression 실험을 통해 프로모터의 활성화 여부를 검증함. GUS 시스템은 대표적인 형광 리포터유전자(reporter gene) 시스템으로, 모델 식물체에서 형광이 발현하는지 여부에 따라 관심 있는 서열이 실제로 유전자 전사를 진행하게 할 수 있는지, 즉 제대로 기능을 하는지 검증하는 데 자주 사용되는 방식이며 일반적으로 상용화되어 있어 활용이 유리함.
- 이와 더불어 여러 다양한 자색 계통의 실제 안토시아닌 함량을 측정, 고품량인 계통과 상대적으로 저함량인 계통의 유전적 특성을 비교함. 이를 통해 안토시아닌 생합성 기작에 대해 보다 구체적으로 분석할 수 있을 것임. 뿐만 아니라 자색 풋고추 품종의 육종 재료로 활용할 수 있는 후보 계통들의 안토시아닌 함량을 각각 측정 비교함으로써 다른 형질적인 특성들에 더하여 후보 계통을 선정하는 의사결정 기준으로 삼을 수 있음. 안토시아닌 함량 측정은 고성능 액체 크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) 방법을 활용할 것임. 미숙과에서 주로 착색이 일어나는 부위인 과피를 각 계통별로 샘플링하는데, 계통의 생육 특성에 따라 개약 후 5~10일 간격으로 반복해서 샘플링하고, 각 개체 당 3개의 과실을 샘플링할 것임. 이때 샘플링한 과실은 수확 후 바로 동결건조하여 과피 건물중 0.1g씩을 HPLC 측정 기준으로 삼음. 시점에 따른 유전자 발현 정도와 실제 안토시아닌 함량 간의 차이 혹은 변동 추이를 분석해봄으로써 안토시아닌 생합성의 유전적인 기작뿐만 아니라 어떤 발달 단계에서 축적이 가장 촉진되며 육종의 재료로서 어떤 특성을 가진 계통이 유리할지 판단할 수 있을 것으로 기대함.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

단 계 (연차)	구분	목표	결과	달성도 (%)
1단계 (1년차, 2021)	주관연구 (PPS)	엘리트 부계 집단 이용 내 병성 및 고품질계 유전자 도입	유전자원 및 내병성 시판종을 조사 선별하여 신규집단작성	100
		분리세대 MAS를 이용한 선발	작성된 신규집단을 MAS를 이용하여 목표형질을 보유한 개체를 선발	100
		여교배를 통한 내병성 및 고품질계통 고정화 1단계	선발된 개체와 반복친을 정식 후 여교배 진행	100
	공동연구 (서울대)	미숙과에서 자색 발현하는 고추 연구 집단 구축	과실 특이적 자색 발현 계통 입수 및 세대 진전을 통해 유전자지도 작성을 위한 F2 분리집단 구축	100
		계통 간 표현형 비교 및 HPLC를 통한 후보 계통의 안토시아닌 함량 측정	다양한 자색 계통에 대한 표현형 조사 및 HPLC를 통한 안토시아닌 함량 측정 분석 및 특성 파악	100
1단계 (2년차, 2022)	주관연구 (PPS)	여교배를 통한 내병성 및 고품질 계통 고정화 2단계	2차례 여교배를 통한 도입유전자 확인	100
		MABC를 이용한 조합 계통 선발	마커를 이용하여 회복률 확인 및 조합작성 및 계통고정	100
		조합작성 및 1차 품종 선발	노지 및 하우스 내 조합력 확인 및 데이터 수집	100
		후보 조합 원원종 증식	차년도 생산을 위한 원원종 증식	100
	공동연구 (서울대)	Bulked Segregant RNA Sequencing을 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 Transcriptome 분석	Bulked Segregant RNA Sequencing을 통해서 후보유전자 구간을 탐색하고 추가 마커 개발을 통해 미세유전자 지도를 작성	100
	육종 집단 생육 초기 자색 개체 선별을 위한 마커 개발	Transcriptome 분석 결과와 미세 유전자지도를 바탕으로 후보 유전자의 시퀀싱을 통해 안토시아닌 생합성 관련 유전자 In/Del 마커세트 개발	100	
2단계 (3년차, 2023)	주관연구 (PPS)	지역 시교 및 데이터수집	자사 육종연구소 및 고추 주요 산지에 유·무상으로 시교를 진행하여 재배안정성 및 품종 성능 확인	100
		2차선발 품종의 원종 증식 (국내 연구소) 및	판매계획에 맞게 원종을 증식하고 적시에 생산하여 종자	100

		생산력 검증 (해외 증식포 활용)	전염병, 순도, 발아력을 검증하여 제품판매 준비를 함	
		고기능성 자색 풋고추 품종 출원 및 홍보화	고기능성 자색 풋고추 품종을 개발함	100
	공동연구 (서울대)	후보유전자 동정 및 VIGS를 통한 유전자 기능 및 기작 연구	일시적 과발현 분석 및 유전자 침묵효과 분석(Virus Induced Gene Silencing)을 통한 후보 유전자 기능 연구 및 동정	100
생합성 경로에서의 유전자 간 상호작용 기작 규명		MAB1과 MAB2 계통들의 <i>CaAN3</i> 프로모터 지역에서 전사인자 (Transcription Factor)들의 결합 위치 분석(In silico) 및 Y1H (Yeast One Hybrid)를 이용한 <i>CaAN3</i> 프로모터 활성도 검사	100	

□ 연구개발과제의 수행을 위한 재배 경종 개요 및 작부 방법

- 2월 초순경 50구 tray에 시판 상토를 사용하여 30℃로 약 1주일 유지 후 발아가 되면 15-20℃로 육묘하고 육묘일 수는 60-65일 정도로 하여 본밭에 정식 후 활착이 용이하게 관리함



(그림) 파종 전경



(그림) 잘목병 방제 약제 처리

- 육묘 후 5월 초순경 중부지방 만상일 경과 후 어린 묘를 자사 연구소 격리하우스에 정식함. 재식간격은 40cm*1.5m로 여유 있게 정식하여 교배가 용이하게 배치함
- 비배관리는 교배 및 착과 후 낙과를 방지하고 안정적인 등숙 및 수확을 유도하기 위해 고추전용 비료와 칼슘제의 살포를 적절히 조절함
- 하우스 내 매개충 혼입 및 총채벌레, 담배나방 등의 해충 방제를 위해서 정기적으로 농약을 살포함
- 정식 후 6월 초순 ~ 8월 말까지 교배하며, 세대 진정용으로 태국에서 재배 시 12월 초순 ~ 1월까지 교배를 진행함



(그림) 약제 살포



(그림) 교배

- 재배 중 공시재료의 원예적 형질 및 내병성 검정을 통해 주요 특성을 파악함

조 사 항 목	
원예적 형질	초형, 분지발생, 절간, 숙기, 숙과색(관능검정), 신미도(관능검정), 과장, 과경, 재배 안정성, 기타
내병성	역병, 탄저병, CMV, TSWV, PMMoV

- 교배 후 착색된 과실을 수확하여 탈종 및 종자정선을 통해서 다음세대 파종용 종자를 준비함



(그림) 탈종



(그림) 탈종



(그림) 종자소독

- 빠른 계통 고정 및 제품 개발을 위한 연 2회 육종 프로그램을 진행함(하절기 피피에스 자사 육종연구소, 하절기 태국 세대진전포 활용)

□ (1년차)2021년 전반기 연구 수행 내역 및 결과

- 2021년 5월 31일 당사 보유계통 및 시판종 포함 총 40품종을 안산 소재 당사 연구소에 정식하여 신규집단작성을 위한 후보군을 탐색하였다.

(표) 2021년 전반기 연구개발과제 수행을 위한 파종내역

정식번호	타입	계통특성
3002	푹고추	아삭이 타입 MS B-Line
3003	푹고추	아삭이 타입 MS C-Line
3005	건고추	품질계 건고추 MS B-Line

3006	건고추	역병 저항성 건고추 MS C-Line
3010	건고추	품질계 건고추 MS B-Line
3022	풋고추	아삭이 타입 MS S-Line
3030	건고추	품질계 건고추 MS S-Line
3040	풋고추	자색소 도입을 위한 시판종(드셔보라)
3041	건고추	PMMoV 저항성 시판종(GT-5)
4006	건고추	복합저항성 시판종
4007	건고추	복합저항성 시판종
4008	건고추	복합저항성 시판종

○ 연구개발과제 수행을 위해 정식된 유전자원의 특성을 조사하였다.

(표) 주요 유전자원의 특성 조사 결과

정식 번호	초형	분지수	절간	숙기	숙과색	신미	과장(cm)	과경	기타
3002	주지형	적음	단간	중		미약	13.3	3.5	식미성 좋음
3003	분지형	많음	단간	중		미약	18	2	Crack
3005	주지형	적음	장간	중	중간	강함	16	3	
3006	분지형	많음	단간	중조	진함	강함	18.5	2	숙과색 진함
3010	주지형	적음	장간	중	중간	강함	13.5	3	
3022	주지형	중간	단간	중		미약	15	2.5	
3030	주지형	중간	장간	중	진함	중간	14	2	
3040	주지형	중간	중간	중			12	3.5	Crack
3041	주지형	많음	장간	중조	중간	중간	16	2	
4006	주지형	많음	중간	조	중간	중간	16.5	2.5	
4007	주지형	많음	장간	중조	중간	중간	17	2	
4008	주지형	많음	중간	중조	중간	중간	16	2	

○ 식미성이 좋은 3002, 3003, 3022과 자색 풋고추 시판종인 3040을 연구개발과제 수행을 위한 신규집단 작성용 재료로 선정하였다.

○ 3023, 3024, 3024도 신미도가 약하고 과 특성이 우수하지만 식미검정 결과 이물감이 느껴지고 아삭거림이 없어서 과제수행을 위한 후보자원에서 제외하였다.

○ 신미가 강하고 숙과색이 진한 3005, 3006, 3030과 착과성이 우수한 3010 및 시판종 중 PMMoV, 역병, TSWV 저항성인 3041을 연구개발과제 수행을 위한 신규집단 작성용 재료로 선정하였다.



(그림) 주요 유전자원

○ 연구개발과제 수행을 위해 주요 유전자원의 역병 저항성을 병리 검정하였다.

(표) 주요 유전자원의 역병 접종 결과

개체 품종	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	종합
R Check	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	R
S Check	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	S
3002	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	S
3003	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	S
3005	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	S
3006	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	R
3010	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	S
3022	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	S

*1=병징없음 2=병징은 보이지만 생존 3=고사 R=저항성 S=감수성



(그림) 역병 접종 생존주



(그림) 역병 접종 고사주

- 연구개발과제 수행을 위해 주요 유전자원의 TSWV, CMV 저항성을 분자마커로 검정하였다.

(표) TSWV, CMV 마커 검정 결과

정식번호	개체번호	마커분석결과		정식번호	개체번호	마커분석결과	
		CMV	TSWV			CMV	TSWV
3002	1-3	S	S	3003	1-3	S	S
3005	1-3	S	S	3006	1-3	S	S
3010	1-3	S	S	3022	1-3	S	
3030	1-3	R	S				

- 마커검정과 역병 병리검정 결과를 통해 복합 내병계 건고추 및 자색 풋고추 개발에 사용할 계통군이 대부분 역병, TSWV, CMV에 감수성임이 확인되어 신규집단작성 후 여교배 과정에서 헤테로(H)를 선발하여 내병성 도입에 이용 하였다.
- 원예적 형질 및 내병성 검정을 통해서 신규집단 작성을 위한 교배 조합을 작성하였다.

(표) 조합(신규집단)작성 내역

타입	웅성불임성	모계친		부계친	비고
풋고추	CGMS 모계	3002	x	3040	아삭이 타입 풋고추 + 자색
	부계	3003			
	GMS 모계	3022			
건고추	부계	3006	x	4006	고품질 건고추(역병저항성) + TSWV 저항성
				4007	
				4008	
	CGMS 모계	3005	x	3041	고품질 건고추 + PMMoV 저항성
CGMS 모계	3010				
GMS 모계	3030				

□ (1년차) 2021년 하반기 연구 수행 내역 및 결과

- 2021년 전반기 작성된 신규집단의 교배 및 수확 완료 후 안산 소재 당사 연구소에서 여교배를 위해서 하우스에서 정식을 진행하였다.

(표) MABC를 위한 파종 내역

정식번호	조합번호	세대	타입	비고
7004	3002-1	Fn		반복친
7005	3002-0 x 4036-0	F1	자색 풋고추	MAS 선발용 F1
7006	3003-1	Fn		반복친
7007	3003-0 x 4036-0	F1	자색 풋고추	MAS 선발용 F1
7008	3022-0 x 3022-0	F1		반복친
7009	3022-0 x 3040-0	F1	자색 풋고추	MAS 선발용 F1
7010	3005-1	Fn		반복친
7011	3006-3	Fn		반복친

7012	3010-1	Fn		반복친
7013	3030-0 x 3030-0	Fn		반복친
7014	3034-1 x 3034-3&4	Fn		반복친
7015	3035-1	Fn		반복친
7101	3032-0 x 3041-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7102	3032-0 x 4007-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7105	3033-0 x 4006-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7106	3033-0 x 4008-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7108	3010-0 x 4006-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7109	3010-0 x 4008-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7110	3010-0 x 3041-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7111	3030-0 x 3041-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1
7115	3005-2	Fn		반복친
7116	3032-0 x 4012-0	F1	건고추	MAS 선발용 F1

- 정식 전 유묘 상에서 MAS를 진행하여 목표형질을 보유한 개체를 선발 및 정식하여 여교배의 화분친으로 사용하였다.
- 정식 전 유묘 상에서 MAS를 진행하여 목표형질을 보유한 개체를 선발 및 정식하여 여교배의 화분친으로 사용하였다.

(표) 신규작성집단(F₁)의 MAS 분석 결과

정식 번호	마커분석결과				개체번호
	TSWV	CMV	자색	L4	
7005	-	H	P	-	1,2,3,4,7.8.10
7007	-	H	P	-	1,5,6
7101	H	H		H	5,11,16,34,36,38,42,47
7102	H	H			2,10,12,23,35,51,61,62,63,73,75
7105	H	H			21,26,46,47,49,52,67,78,96,97
7106	H	H			16,18,32,34,68,70,75,93
7108	H	H			28,32,33,42,43,55,56,59,62,76,82,89,92
7109	H	H			6,9,19,21,25,68,76,83,98
7110	H	H		H	3,8,17,21,27,29,34,49,53,56,64
7111	H	R		H	3,17,19,24,27,28,30,31,34,36,43
7116	H	H			5,21,41,43,54,79,80,86



(그림) MAS 선발 개체



(그림) 선발개체 포트정식



(그림) 정식 후 전경

○ 선발된 개체와 반복친과의 교배를 통해서 BC1F1종자 생산하였다.

(표) 여교배용 조합 작성 내역

타입	목적	모계친		부계친	비고
풋고추	MABC를 위한 BC1F1종자생산	7004	x	7005	반복친 x F1(아삭이타입+자색)
		7006		7007	
		7008		7009	
건고추	MABC를 위한 BC1F1종자생산	7010	x	7101	반복친 x F1(품질계+내병성)
		7010		7102	
		7011		7105	
		7011		7106	
		7014		7108	
		7012		7109	
		7012		7110	
		7013		7111	
	7115		7116		

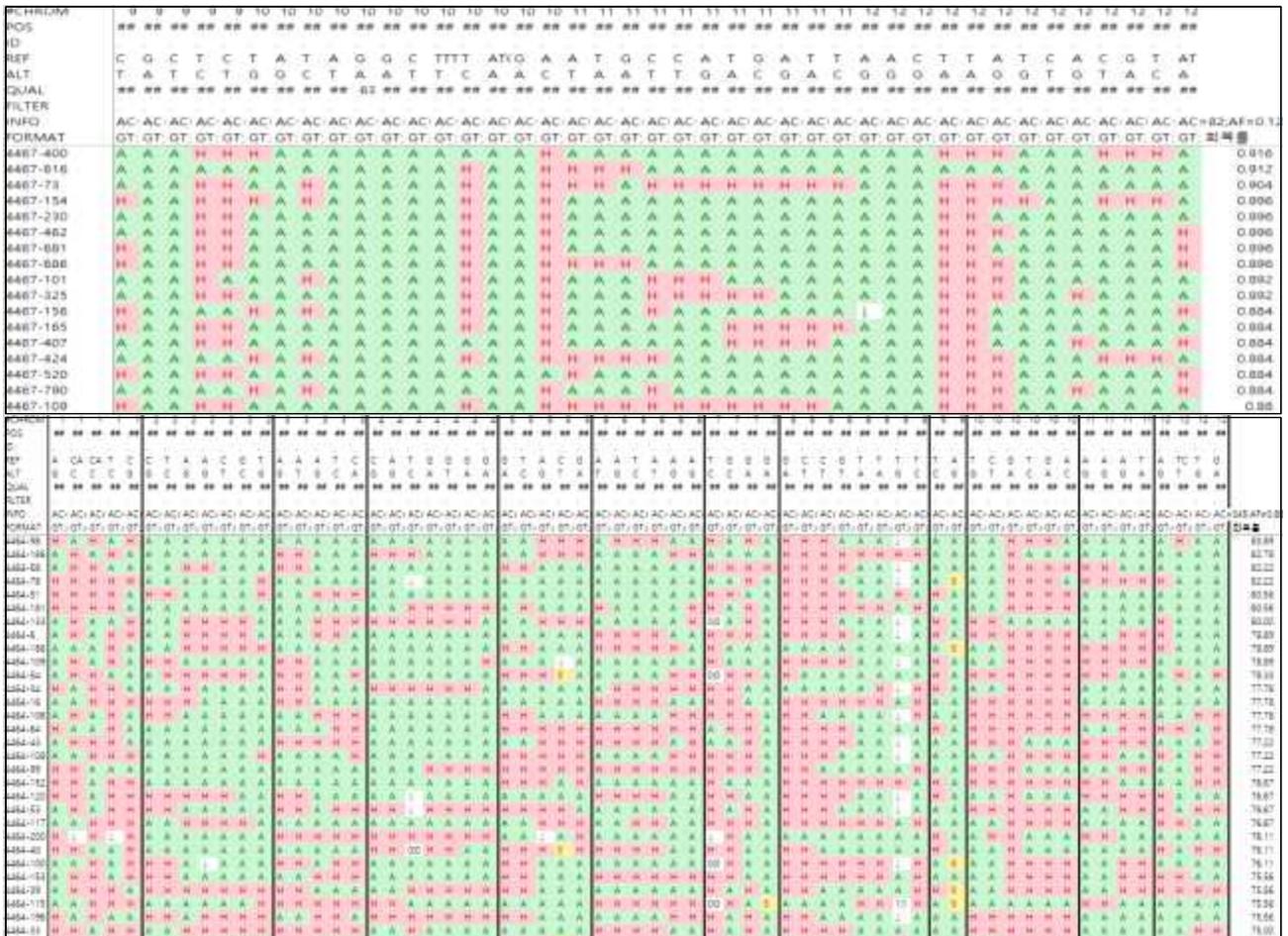
□ (2년차)2022년 전반기 연구수행내역 및 결과

- 서울대에서 고추의 MABC를 위하여 유전체 전반에서 expressed sequence tags (ESTs) 기반의 412개 SNPs 중 다형성을 보이는 SNP를 주요 계통의 다형성 실험을 통해 선발하였다.
- MABC를 하기 전에 목표형질(CMV, TSWV, PMMoV, 자색)이 Hetero상태인 개체를 우선 선발하였다.
- 선발된 개체를 GT-Seq으로 시퀀싱하여 회복률을 확인하였다.

(표) MABC를 위한 파종내역

정식번호	타입	조합번호	세대	목표형질
4463	자색꽃고추	7004-0 x 7005-0	BC1F1	자색
4464	자색꽃고추	7008-0 x 7009-0	BC1F1	자색
4465	자색꽃고추	7006-0 x 7007-0	BC1F1	자색
4466	복합내병성 건고추	7010-0 x 7101-0	BC1F1	TSWV, PMMoV, CMV
4467	복합내병성 건고추	7010-0 x 7102-0	BC1F1	TSWV, CMV
4468	복합내병성 건고추	7012-0 x 7109-0	BC1F1	TSWV, CMV
4469	복합내병성 건고추	7012-0 x 7110-0	BC1F1	TSWV, PMMoV, CMV
4471	복합내병성 건고추	7011-0 x 7105-0	BC1F1	TSWV, CMV

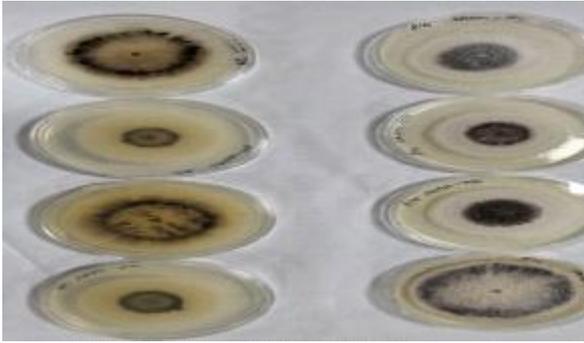
○ BC1F1에서 반복친으로 회복될 기대값은 75%이며 MABC결과 개체별 또는 집단에 따라 회복률이 차이를 보이지만, 최고 91%이상 회복된 개체도 있었다. 또한 회복률에 따라 실제 포장에서 표현형을 통해서 확인해 본 결과도 반복친으로 많이 회귀한 것을 확인할 수 있었다.



(그림)MABC를 통한 개체가 회복률 차이

○ 종합내병성 건고추에서 중요한 형질이지만 현재 마커를 통해서 선발할 수 없는 탄저병 내병성은 실제 병원균을 배양하여 포장에 살포하여 발병을 유도하여 저항성

정도를 확인하는 무상처접종법을 통해서 확인하였다.



(그림) 배양 증식된 탄저병균



(그림) 탄저병 발병개체



(그림) 증식된 탄저병균 포장 살포

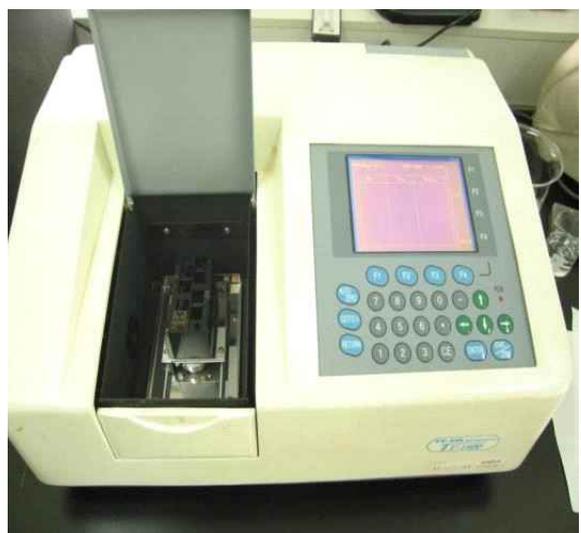
○ 최종적으로 회복률이 높고 내병성이 강한 개체를 선발하였다.





(그림) 선발 개체 사진

○ 고품질 종합내병성 건고추 선발을 위해서 ASTA값이 높은 개체도 선별하였다.



(그림) 흡광도를 이용한 선발개체의 ASTA값 측정

□ 2022년 하반기 연구개발과제 수행을 위한 파종 및 정식 세부 내역(2년차)

○ MABC와 내병성 검정을 통해서 최종선발된 개체를 기존에 보유중인 계통과 검정교배

를 하여 시교 종자를 생산하였다.

- 정식 전 묘상에서 마커검정을 통해서 TSWV, CMV, PMMoV, 역병에 호모한 저항성 개체를 선발하여 정식하였으며, 시교 후 선발 개체의 생산에 대비하여 원종 증식도 하였다.

□ 2023년 전반기 연구개발과제 수행을 위한 파종 및 정식 세부 내역(3년차)

- 검정교배를 통해서 생산된 시교종자를 시판종과 같이 정식하여 성능검정을 수행하였다.
- 시교는 이천소재 피피에스 자사 연구소 외에 고추 주산지인 경북 안동, 영주, 전남 해남, 전북 임실, 충북 제천 등지에서 수행 하였다. 정식주수는 품종수 및 면적 등을 고려해서 품종 당 20주-100주씩 2반복으로 조사하였다.
- 시교 검정 중 주요 조사형질은 과장, 과경, 수확량, 건과품질, 숙기, 내병성, 재배안정성 등을 조사하였다.



(그림) 경북 영주군 문수면 시교포장



(그림) 충북 제천 금성면 시교포장

(표) 피피에스 연구소 시교 결과

번호	시교지	과장	과경	초기 수확량	후기 수확량	건과 품질	총 평
시교#1	자사 연구소	14	2.1	366	4614	상	수확량이 많지만 과 크기가 작음
시교#2		16	2.3	484	4330	상	과 특성 및 수확량 좋음 초기 수확량 많음
시교#3		18	2.5	164	2844	중상	대과이지만 수확량 떨어짐
대비종#1		16	2.3	546	3666	상	초기 수확량 많고, 건과 품질 좋음
대비종#2		15	2.3	176	5150	상	중대과에 수확량 많음
대비종#3		17	2.5	505	4864	중	초기수확량 많고 후기까지 초세 강함
대비종#4		15	2.1	202	4454	상	중대과에 수확량 좋음
시교#1	경북 영주	15	1.9	299	4432	중상	과크기 작음 바이러스 약함
시교#2		17	2.4	443	4882	상	재배안정적이 초기 수확량 좋음
시교#3		17	2.3	202	3033	상	바이러스 약함
대비종#1		15	2.4	489	3003	상	초기 수확량 좋음 후기 바이러스 증상 보임
대비종#2		16	2.4	236	4823	중상	착과량 많음 칼슘 결핍으로 인한 낙과
대비종#3		18	2.5	444	4562	중	초기 수확량 많은데 후기 초세도 강함 바이러스 강해보임
시교#1	충북 제천	11	1.9	108	3003	중	산간지 척박지 시교 사업으로 과장 및 수확량 매우 적음
시교#2		14	2.3	189	3654	중	시교지 재배 좋지 않지만 대비종 대비 수확량 좋음
시교#3		15	2.5	108	2993	중하	비배관리가 좋지 않아 수확량 나쁨
대비종#1		14	2.4	300	2836	중	1차 수확 후 초세확보가 안 되서 후기수확 없음
대비종#2		13	2.3	202	4003	중	석회 결핍 심함 착과력은 좋음
대비종#3		16	2.4	334	3896	중하	재배에 비해서 수확량 좋지만 건과품질 나쁨
대비종#4		14	2.3	250	3830	중	척박지에도 재배 상대적으로 안정적

○ 최종적으로 재배안정성이 좋고 초기 수확량 및 후기 수확량이 좋은 시교#2번을 선발하였다.



○ 시교 선발 후 당해 출시를 위해서 시교공시 전 자사 연구소 및 소량 생산이 가능한 태국 업체를 통해서 생산을 진행하였다.



(그림) 태국 생산지 전경



(그림) 모계 임성 검정

□ 2023년 하반기 연구개발과제 수행을 위한 파종 및 정식 세부 내역(3년차)

- 제품 홍보를 위해서 농가 품평회 진행



(그림) 농가 품평회 진행

- 제품 홍보를 위해서 국제종자박람회 참석



(그림) 2023 국제종자박람회

- 제품의 판매를 위해서 생산 판매 신고를 진행함



□ 과제 종료 후 사업화 계획

○ 사업화 전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 고추 종자의 판매 (소매:1200립/봉, 도매:70,000립/포) ○ 수요처 : 국내 일반 농가 및 대규모 공정육묘장 ○ 예상 단가 : 소매가 15만원 내외 (종합내병계) ○ 개발 투입인력 및 기간 : 주관연구기관 정직원 (연구소 육종연구원 2명, 생산팀 2명, 증식팀 2명, 실험실 2명, 보조인력 6명 및 연구관리 행정 3명) 및 2년 9개월 프로젝트

○ 생산 계획

- 대량판매를 위한 해외채종(태국/중국 벤더를 활용한 대량 해외채종)

고품질 종합내병계 건고추

구분		(2024년) 개발 종료 후 1년	(2025년) 개발 종료 후 2년	(2026년) 개발 종료 후 3년
국내	시장점유율(%)	0.85% *국내 고추시장 전체합산 350억 기준 (건고추)	1.28% *국내 고추시장 전체합산 350억 기준 (건고추)	2.14% *국내 고추시장 전체합산 350억 기준(건고추)
	판매량(단위:1,200립/봉)	2,000	3,000	5,000
	판매단가(원)	150,000	150,000	150,000
	국내매출액(백만원)	300	450	750
당사 생산능력*		20kg (1.200립/1봉=10g 기준)	30kg (1.200립/1봉=10g 기준)	50kg (1.200립/1봉=10g 기준)

*생산 능력은 판매계획을 기준으로 작성됨

고기능성 자색 풋고추

구분		(2024년) 개발 종료 후 1년	(2025년) 개발 종료 후 2년	(2026년) 개발 종료 후 3년
국내	시장점유율(%)	2% *국내 고추시장 전체합산 30억 기준 (기능성풋고추)	3% *국내 고추시장 전체합산 30억 기준 (기능성풋고추)	5% *국내 고추시장 전체합산 30억 기준(기능성풋고추)
	판매량(단위:1,200립/봉)	200	300	500
	판매단가(원)	300,000	300,000	300,000
	국내매출액(백만원)	60	90	150
당사 생산능력		2kg (1.200립/1봉=10g 기준)	3kg (1.200립/1봉=10g 기준)	5kg (1.200립/1봉=10g 기준)

*생산 능력은 판매계획을 기준으로 작성됨

공동연구(서울대) 고추 안토시아닌 축적 관련 유전인자 규명 및 분자마커 개발

(1년차) 고추 안토시아닌 보유 계통을 활용한 F2 집단 구성 및 유전자지도 작성

- 안토시아닌 생합성 계통 수집 및 육성, 표현형에 따른 특성 비교
- 기존 연구 결과 검토 및 연구 가설 수립

- 과실특이적 안토시아닌 축적에 관여하는 유전인자 탐색 및 유전자지도 작성을 위한 품종 육성 및 F2 분리집단 육성
- 표현형 분리 확인 및 *CaAN2* 유전자에 대한 유전형 검정
- Bulk segregant RNA sequencing (BSR-Seq) 분석 수행
- 과실특이적 안토시아닌 생합성 유전자좌의 후보구간 추정

(2년차) Bulk Segregant RNA Sequencing을 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 Transcriptome 분석

- Bulk Segregant RNA Sequencing을 통한 후보유전자 지역 탐색
- 후보유전자에 대한 미세유전자지도 작성
- 후보유전자 List-up 및 DEG 분석을 통한 *CaAN3* 후보유전자 특정

(2년차) 육종 집단 생육 초기 자색 개체 선별을 위한 마커 개발

- *CaAN3* 후보유전자의 구조적 변이 탐색을 통한 SNP 또는 In/Del을 활용한 마커세트 제작

(3년차) 후보유전자 동정 및 VIGS를 통한 유전자 기능 및 기작 연구

- *Dem.v1.00043895 (CaAN3)* 유전자 침묵 효과(Virus Induced Gene Silencing) 분석 수행
- *N. benthamiana* 앞에서의 *Dem.v1.00043895 (CaAN3)* 일시적 과발현 분석

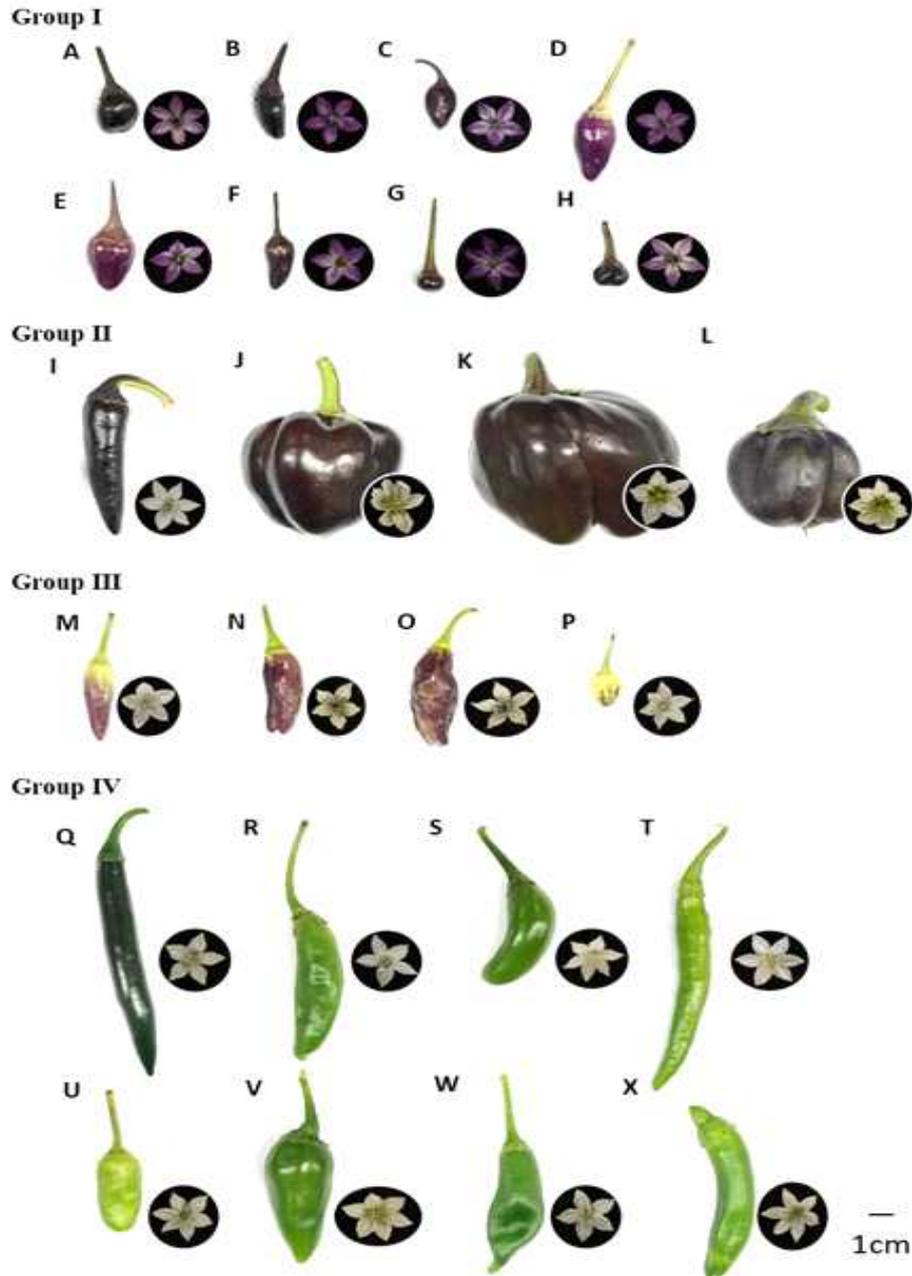
(3년차) 생합성 경로에서의 유전인자 간 상호작용 기작 규명

- MAB1과 MAB2 계통들의 *CaAN3* 프로모터 지역에서 전사인자(Transcription factor)들의 결합 위치 분석 (In silico)
- Y1H (Yeast One Hybrid)를 이용한 *CaAN3* 프로모터 활성화도 검사

□ 다양한 고추 계통의 표현형 비교 및 안토시아닌 함량 측정

- 안토시아닌 고함유 계통의 품종 육성을 위해 본 연구에서는 우선 다양한 유전자원을 평가함으로써 실제로 어떤 표현형적 특징을 가진 고추 계통이 안토시아닌을 효과적으로 축적하는지 살펴보고자 하였으며, 이를 위해 다양한 표현형 패턴을 갖는 유전자원들을 수집하여 분석하였다. 먼저, 고추를 포함한 안토시아닌을 축적하는 가지과 작물이 대체로 자색을 나타낸다는 점을 고려하여, 과색을 포함한 다양한 조직에서 자색이 착색되는지 여부에 대해 표현형 조사를 수행하였다. 표현형 조사 결과, 고추는 크게 네 가지 패턴의 자색 착색을 보인다는 점을 확인할 수 있었다.
- 첫째로, 과실을 포함한 잎, 줄기, 꽃 등 여러 조직에서 동시에 자색을 축적하는 경우를 분류할 수 있었다. 이 분류에 속하는 고추 계통들은 그 정도의 차이를 보였으나 모두 보라색 꽃을 가지고 있다는 특징이 있었다. 수집할 수 있었던 자원 중 이렇듯 자색 꽃을 보이는 계통은 모두 일반적으로 재배되거나 상용화된 고추의 과실보다는 상대적으로 작은 과실을 가지고 있었다는 점 또한 특징적이다. 한편, 수집한 자원 중 네 개의 *C. annuum* 계통은 잎, 줄기 등에서 자색 착색을 찾아보기 어렵고 과실 특이적으로만 자색을 발현하였다. 이 중 한 계통은 일반적으로 한국에서 일반적으로 재배하는 중간 크기의 길쭉한 형태를 보였으며, 나머지 세 계통은 파프리카라고 하는 벨 타입 과실을 나타내었다. 이 네 계통은 과실특이적 자색 축적 계통들로 분류할 수 있었다. 세 번째 분류로는 두 *C. chinense* 계통을 포함한, 노란색 과피에 열린 자색을 착색하는 고추들로 구분할 수 있었으며, 이 중 일부는 하나의 개체에서 자색, 주황색, 노란색 등 다양한 미숙과 색을 동시에 보였다는 점이 특징적이다. 마지막 네 번째 분류는 흔히 한국에서 재배되는 녹색 미숙과의 과피를 갖고 있는 고추들로, 안

토시아닌 축적이 이루어지지 않는 계통들로 구분하였다.



(그림) 과색에 따른 고추의 분류. 과실을 포함한 전체 조직이 자색 (A-H), 과실 특이적 자색(I-L), 노란색 과피에 열린 자색(M-P), 자색 축적 없음(Q-X)의 4가지 경우로 구분됨

- 네 가지 서로 다른 표현형 패턴을 가진 고추 계통들에 대해, 표현형 상 대표성을 가지고 있으며 수확량이 충분한 계통들을 대상으로 과피를 샘플링하여 HPLC 분석을 수행하였다. 안토시아닌 전구체인 안토시아니딘에 대해 측정을 진행하였고, 보다 세부적인 분석을 위해 cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin 등 5가지의 안토시아니딘을 모두 측정하였다. 측정 결과 모든 측정된 안토시아니딘 중 대부분은 delphinidin으로 밝혀졌고, 그 중에서도 위 (그림)의 B 계통, I 계통에서 특히 많은 건중량 당 delphinidin이 측정되었다. J, K, L의 세 벨 타입 고추(파프리카)에서는 육안으로 확인할 수 있는 자색의 정도에 비해 상대적으로 낮은 수준의 delphinidin이 측정되었는데, 이는 안토시아닌이 과피의 가장 바깥쪽 부분에 주로 축적된다는 성질

을 고려할 때 과피의 두께가 다른 계통에 비해 두꺼운 파프리카의 특성 상 과피 단위중량 당 함량이 낮게 측정된 것으로 추정된다.

(표) HPLC를 통한 안토시아닌 함량 분석 결과

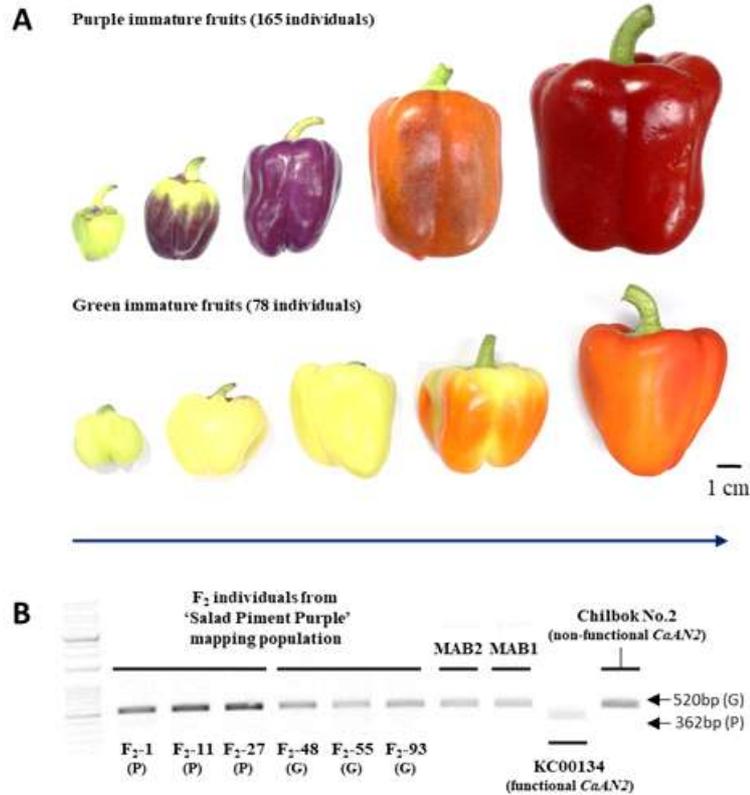
Accession	Species	Total anthocyanidin ($\mu\text{g/g DW}$)
A	<i>C. frutescens</i>	721.6
B	<i>C. annuum</i>	3630.7
C	<i>C. annuum</i>	844.0
D	<i>C. annuum</i>	1058.2
E	<i>C. annuum</i>	1104.5
G	<i>C. frutescens</i>	791.4
H	<i>C. annuum</i>	380.1
I	<i>C. annuum</i>	3086.0
J	<i>C. annuum</i>	378.0
K	<i>C. annuum</i>	578.7
L	<i>C. annuum</i>	253.6
M	<i>C. annuum</i>	31.0
O	<i>C. chinense</i>	42.8
P	<i>C. annuum</i>	36.6
Q	<i>C. annuum</i>	10.6
R	<i>C. annuum</i>	5.3
T	<i>C. annuum</i>	0.0
V	<i>C. annuum</i>	0.0
X	<i>C. annuum</i>	10.7

- 표현형 분석 결과 및 HPLC 분석 결과를 검토하여 고탐유 품종 육성이라는 과제 목표를 달성할 수 있는 육종 효율을 고려했을 때, 형태적으로 목표 형질과 가깝고 과피 단위중량 당 안토시아닌을 가장 많이 축적할 수 있는, 과실풍이적으로 안토시아닌을 축적하는 I 계통과 같은 표현형을 가진 계통을 육종 소재로 삼는 것이 효율적이라는 결론을 내릴 수 있었다. 그 원인이 밝혀진 바는 없지만 꽃을 포함한 조직 전반에 걸쳐 자색을 발현하는 계통들은 대체로 그 과실이 2cm 미만으로 작다는 표현형 적 특징을 보였다. 반대로 수집할 수 있었던 계통들 중 과실풍이적으로 안토시아닌을 합성하는 계통들은 상대적으로 큰 과실을 보였으며, 따라서 현재 수준에서 안토시아닌 고탐유 고추를 육종하기 위한 소재를 탐색할 때에는 일반적으로 과실풍이적 자색을 보이는 고추 계통이 효율적이라는 판단이 가능하다.

□ 고추 안토시아닌 보유 계통을 활용한 F2 집단 구성 및 유전자지도 작성

- 본 과제에서는 과실 특이적인 자색, 즉 안토시아닌 축적에 관여하는 조절 요인을 규명하고 유전형 검사에 활용할 수 있는 분자마커를 개발하여 표현형 조기선발 등 육종 과정에서 효율적으로 활용하고자 하였다. 이를 위해 과실풍이적으로 안토시아닌이 축적되는 하이브리드 품종을 입수하여 자가교배를 통해 세대를 진전한 뒤 F2 세대에서 표현형의 분리가 일어나는지 확인하였다. 이후 유전자지도 작성을 통해 해당 유전자를 동정하고 표현형에 따른 그 구조적인 특성을 비교 분석하여 분자마커 개발의 가능성을 살펴보고자 하였다.

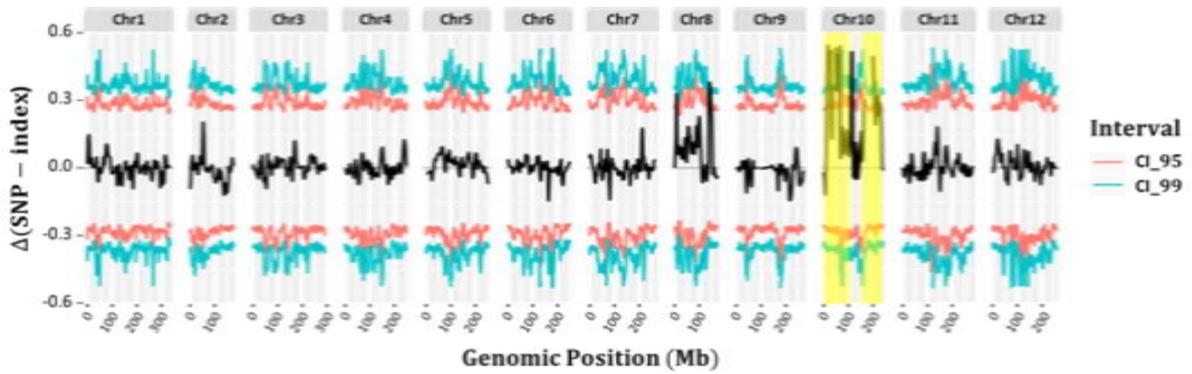
- 고추에서는 R2R3 MYB 전사인자를 암호화하는 *CaAN2* 유전자가 다양한 조직에서 안토시아닌 생합성을 유도하여 자색으로의 착색을 일으킨다는 점이 기 보고되었는데, 종전의 연구에서 비기능성 *CaAN2* 대립유전자를 보유하고 있음에도 과실이 자색으로 착색되는 계통을 발견한 바 있다. 그러나 기능성 *CaAN2*를 보유해 식물체 전체적으로 안토시아닌이 축적되는 계통과는 다르게, 이 예외적인 계통은 잎, 줄기, 꽃 등 다른 조직에서는 안토시아닌 합성이 거의 이루어지지 않는 반면 미숙과 단계에서 과실 특이적으로만 안토시아닌이 합성되었다. 이 계통을 일반적인 녹색 미숙과를 갖는 고추 계통과 교배하여 F2 세대의 표현형 분리를 확인한 결과 3(자색):1(녹색)의 분리비를 나타내 과실특이적으로 안토시아닌을 축적하도록 하는 단일 우성 유전자좌가 존재한다는 점을 제안할 수 있었고, 이 유전자좌를 *CaAN3*라 명명하였던 바 있다.
- 과실특이적인 안토시아닌 생합성을 조절하는 *CaAN3* 유전자좌의 유전자지도 작성을 위해 일본 다끼이종묘(주)에서 판매 중인 하이브리드 품종인 ‘샐러드피망:퍼플(サラダピーマン:パープル)’의 종자를 시장에서 구매하여 생육, 발달 단계에 따른 표현형을 확인한 결과 과실특이적으로 안토시아닌 축적이 일어난다는 점을 확인할 수 있었다. 기존에 밝혀진 기능성 *CaAN2* 대립유전자를 가지고 있는 계통과는 다르게 잎, 줄기, 꽃 등 다른 조직에서는 자색으로의 착색을 거의 관찰할 수 없었다.
- ‘샐러드피망:퍼플’ 품종으로부터 243개체로 이루어진 F2 집단을 구성하였으며, 미숙 과실에서 자색-녹색의 표현형 분리가 일어나는 것을 확인하였다. 또한 해당 품종의 미숙과실 표현형이 기존에 밝혀진 *CaAN2* 유전자에 의한 것이 아님을 확인하기 위해 기존에 서울대학교에서 연구개발한 SCAR(sequence characterized amplified region) 마커를 적용하였으며, 검증 결과 자색, 녹색 표현형과 관계없이 모든 개체가 비기능성 *CaAN2* 대립유전자를 가지고 있는 것을 확인하였다. 이러한 과정을 거쳐, 해당 집단이 과실특이적인 안토시아닌 생합성을 조절하는 *CaAN3* 유전자좌의 유전자지도 작성이라는 목적에 부합한다는 것을 확인하고 연구를 진행할 수 있었다.



(그림) 유전자지도 작성 집단의 표현형 분리(A). *CaAN2* 유전자에 대한 유전형 검증 결과(B). ‘MAB2’ - 과실특이적 자색 발현 계통(대조군). ‘MAB1’, ‘Chilbok No.2’ - 녹색 미숙과 계통(대조군). ‘KC00134’ - 기능성 *CaAN2* 계통(대조군)

□ BSR-Seq(bulked segregant RNA sequencing)을 활용한 후보유전자 지역 탐색

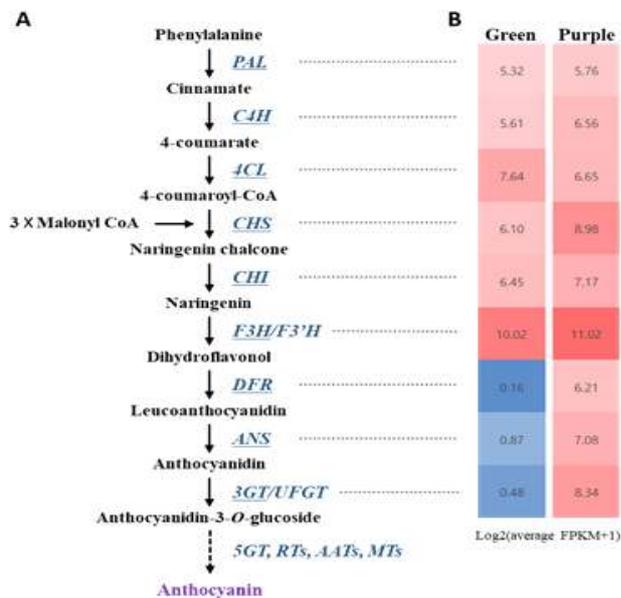
- BSR-Seq(bulked segregant RNA sequencing) 방법을 활용하여 유전자지도를 작성하기 위해, 유전자지도 작성 집단에서 자색, 녹색의 각 표현형별로 18개의 서로 다른 개체의 과피 총 RNA를 샘플링하였다. 이를 6샘플씩 풀링(pooling)하여 표현형별로 각각 3개씩의 RNA 풀(pool)을 구성하였다. 그런 다음 Illumina 플랫폼을 사용하여 해당 RNA 풀들의 염기서열을 분석하였다. BSR-Seq에 의해 각 풀에서는 평균 121,311,533개의 염기 판독값이 생성되었으며, 자색 표현형 풀에서는 약 33.6Gbp, 녹색 표현형 풀에서는 약 39.9Gbp 크기의 서열이 최종적으로 판독되었다. 최초 판독값이 표준유전체 Dempsey(v1.0)를 기준으로 정렬되었을 때 표현형 당 평균 3억 4천만 개의 판독값이 정렬될 수 있었고, 이는 전체 암호영역의 96%를 차지하는 수준이었다. 여기에서 311,679개의 SNP가 호출되었으며, 다형성이 없는 경우와 퀄리티가 너무 낮은 경우를 필터링하여 63,316개의 SNP를 얻었다. 필터링된 SNP들을 두 표현형 풀 사이에서 비교하여 그 편차를 의미하는 $\Delta(\text{SNP-index})$ 값을 계산하였다.
- 이후 *CaAN3* 유전자좌가 위치하고 있을 후보 구간을 특정하기 위해 99% 신뢰 수준보다 높은 $\Delta(\text{SNP-index})$ 값만을 선별하여 6,672개의 유의한 SNP를 얻을 수 있었고, 이 SNP를 분석하여 5개의 후보 구간을 도출하였다. 후보 구간은 1, 8, 10번 염색체에서 발견되었으며, 그 중 $\Delta(\text{SNP-index})$ 값이 가장 높은 경우는 10번 염색체에서 발견되었다. 따라서 염색체 10번에 있는 후보구간을 최우선적으로 살펴보기로 결정하였다. 여기에는 두 개의 후보구간이 포함되는데, 하나는 10번 염색체의 0.15 - 108.8Mbp 구간, 다른 하나는 121.7 - 239.8Mbp 구간으로 분석되었다.



(그림) 10번 염색체에서의 *CaAN3* 후보 구간 추정 결과

□ 표현형에 따른 안토시아닌 생합성 유전자 발현량 비교 분석

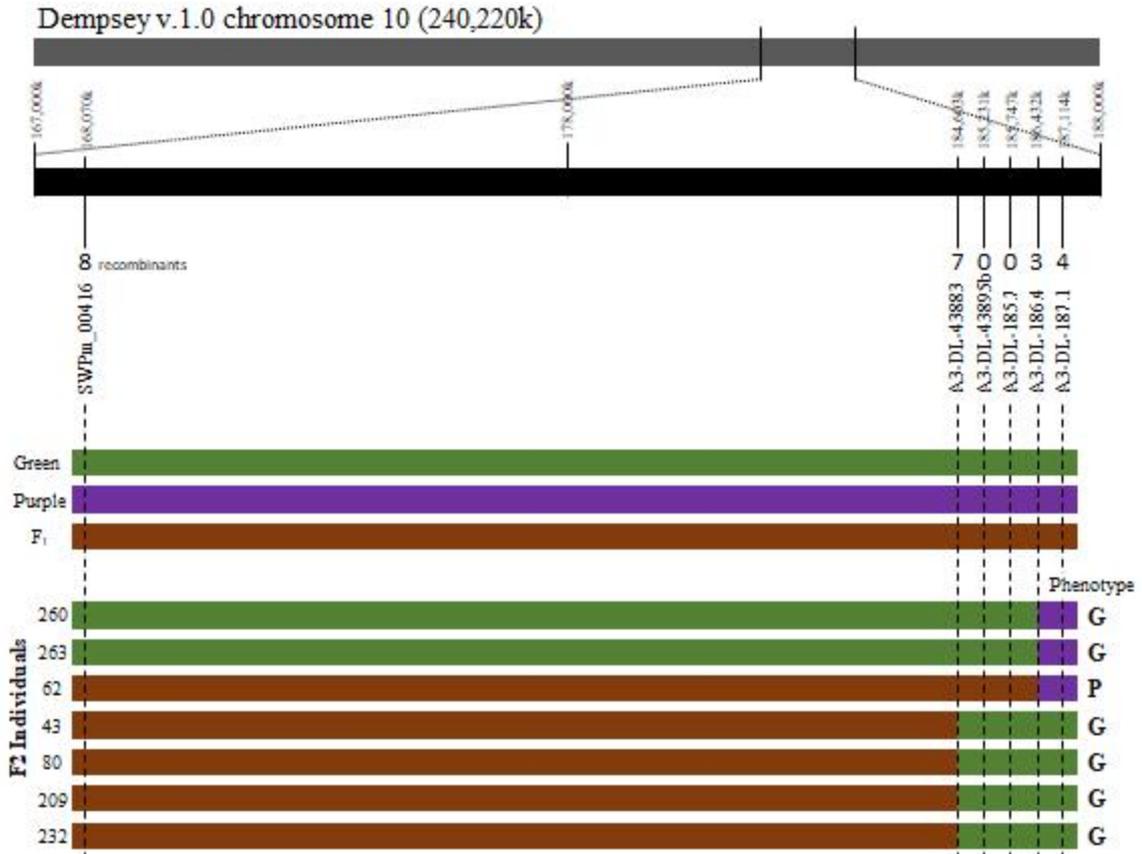
○ BSR-Seq 결과로부터 도출한 SNP 값을 분석하여 후보 구간을 특정할 수는 있었으나 보다 정밀하게 *CaAN3*의 위치를 특정할 수는 없었기 때문에, BSR-Seq으로부터 얻은 자색 표현형 풀과 녹색 표현형 풀의 전사체 데이터를 비교하여 차등 발현 유전자 (differentially expressed gene, DEG)를 분석하였고 그 결과 총 2,175개의 유의한 DEG가 발견되었다. 이 2,175개의 DEG를 통해 고추에서 이미 알려져 있는 안토시아닌 생합성 구조유전자의 발현 수준의 차이를 조사하였다(Borovsky et al. 2004; Zhang et al. 2015). 페닐알라닌(phenylalanine)을 시작으로 생합성 경로를 구성하는 구조유전자들의 발현량을 분석한 결과, 초기 생합성 유전자(EBG)로 분류되는 PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI 및 F3H는 자색과 녹색 표현형 풀 사이에서 유의한 발현량의 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 이와는 대조적으로, 후기 생합성 유전자(LBG)로 분류되는 DFR, ANS, 그리고 3GT의 발현 수준은 자색과 녹색 표현형 풀 사이에서 유의한 차이를 보였다. 이 결과를 통해 과실특이적 안토시아닌 생합성을 조절하는 조절유전자가 실제로 존재하며, 이는 후기 생합성 유전자를 직접적으로 조절할 가능성이 높다는 점을 추정할 수 있었다.



(그림) 미숙과 표현형에 따른 안토시아닌 생합성 구조유전자의 발현량 비교

□ 과실특이적 안토시아닌 생합성을 조절하는 *CaAN3* 후보유전자 미세유전자지도 작성

- ‘샬러드피망:퍼플’ 품종으로부터 얻은 F2 유전자지도 작성 집단에 종전 연구에서 개발된 마커를 무작위로 적용해 유전형 분석한 결과, 후보 구간이 168.1Mbp 구간 뒤쪽으로 설정될 것을 지시하는 재조합 개체가 발견되었다. 이 결과와 BSR-Seq 분석을 통해 얻은 SNP 정보를 바탕으로 5개의 분자 마커를 추가로 개발하여 정밀 유전자지도를 작성하였다. 이 마커들을 적용했을 때 나타나는 재조합 유전형 패턴을 분석하여 ‘Dempsey(v1.0)’ 표준유전체의 184.6 - 186.4Mbp 구간 안에 *CaAN3* 유전자가 위치할 수 있음을 밝힐 수 있었다.



(그림) *CaAN3* 유전자에 대한 정밀 유전자지도 작성

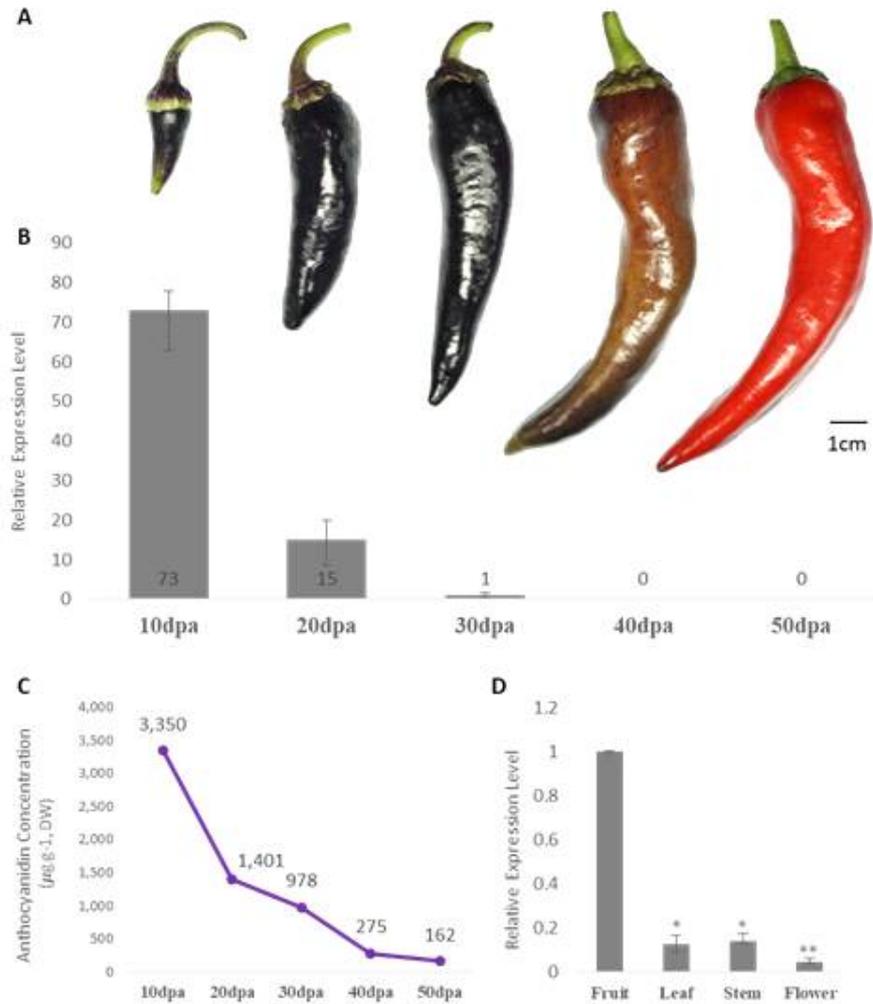
- 후보 구간 내에는 총 15개의 유전자가 주석 처리되어 있음을 확인하였다. 이 15개 후보유전자에 대한 DEG 분석 결과를 통해 두 표현형 풀 사이의 발현량 차이를 조사하였다. 그 결과, 그 중 8개의 후보유전자가 자색, 녹색의 두 표현형 풀 모두에서 발현하지 않는 것으로 확인되었고, 다른 3개의 후보유전자(*Dem.v1.00043888*, *43915*, *43916*)는 0.01 - 0.41 Log₂(Average FPKM+1) 값 범위에서 미미한 발현을 보임을 확인하였다. 또 다른 3개의 후보유전자(*Dem.v1.00043885*, *43901*, *43918*)는 상대적으로 높은 발현 수준을 나타냈지만 자색과 녹색 표현형 풀 사이의 발현량에는 유의한 차이를 확인할 수 없었다. 그런데, MYB 전사인자로 추정된 *Dem.v1.00043895* 유전자는 녹색 표현형 풀에서는 발현량이 관측할 수 없는 수준으로 낮게 나타났지만 자색 표현형 풀에서는 유의하게 높은 양의 발현량을 나타냈다. 이에 여기에서는 *Dem.v1.00043895*를 *CaAN3*의 가장 유력한 후보유전자로 선정할 수 있었다.

(표) 후보구간 내 존재하는 *CaAN3* 후보유전자 목록

Gene	Physical Location (mb)	Annotation	Relative Gene Expression Log ₂ (Average FPKM+1)	
			Green	Purple
<i>DEM.v1.00043883</i>	184.6	Similar to MYB1:Transcription factor MYB1 (Actinidia chinensis var. chinensis)	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043884</i>	184.7	Protein of unknown function	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043885</i>	184.8	Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 6 (Arabidopsis thaliana)	6.72	6.69
<i>DEM.v1.00043888</i>	185.0	Protein of unknown function	0.00	0.41
<i>DEM.v1.00043895</i>	185.2	Similar to MYB1:Transcription factor MYB1 (Actinidia chinensis var. chinensis)	0.00	6.10
<i>DEM.v1.00043899</i>	185.6	Similar to MYB113:Transcription factor MYB113 (Arabidopsis thaliana)	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043901</i>	185.7	Similar to ABC1K1:Protein ACTIVITY of BC1 complex kinase (Arabidopsis thaliana)	4.33	4.23
<i>DEM.v1.00043902</i>	185.9	Similar to ALS3:Protein ALUMINUM SENSITIVE 3 (Arabidopsis thaliana)	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043903</i>	186.0	Similar to HD1:Homeobox protein HD1 (Brassica napus)	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043908</i>	186.1	Protein of unknown function	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043909</i>	186.1	Protein of unknown function	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043910</i>	186.1	Similar to MYB1:Transcription factor MYB1 (Actinidia chinensis var. chinensis)	0.00	0.00
<i>DEM.v1.00043915</i>	186.2	Protein of unknown function	0.00	0.06
<i>DEM.v1.00043916</i>	186.2	Similar to NAC078:NAC domain-containing protein 78 (Arabidopsis thaliana)	0.01	0.03
<i>DEM.v1.00043918</i>	186.4	Similar to UGT86A1:UDP-glycosyltransferase 86A1 (Arabidopsis thaliana)	9.53	10.41

□ 후보유전자의 고추 조직별 발현 특성 분석

- 앞선 연구 과정을 통해 *CaAN3*의 가장 유력한 후보유전자로서 *Dem.v1.00043895*를 추정하였다. 이 유전자는 과실특이적인 안토시아닌 생합성을 조절할 것으로 기대된 바, 실제 식물체에서는 이 유전자가 어떠한 발현상의 특성을 갖는지 살펴보고자 하였다. 이를 위해 먼저 ‘MAB2’ 계통의 과실을 발달 단계별로 샘플링하고, 그 과피 조직을 추출하여 발현량 분석을 수행하였다. 분석 결과, 이 후보 유전자는 과실 발달 초기, 즉 자색 착색이 시작되는 단계에서 상대적으로 가장 높은 발현 수준을 나타냈다. 이후 과실이 발달해감에 따라 자색이 사라지면서 유전자의 발현량도 따라서 감소하다가 수분 후 40일이 경과한 시점, 자색이 대부분 사라지고 붉은 성숙과로 변할 시점부터는 거의 발현하지 않았다. HPLC 분석으로 측정한 안토시아닌 농도는 과피의 표현형 변화 패턴과 유사한 추이를 보였다. 한편, 후보 유전자는 연구 가설과 같이 미숙과에서만 특이적으로 발현한다는 점을 확인할 수 있었는데, 개약 후 20일의 미숙과피에서의 발현량과 비교하였을 때, *Dem.v1.00043895*는 잎, 줄기, 꽃 등 다른 조직에서는 거의 발현되지 않음을 발현량 분석을 통해 밝혀내었다.

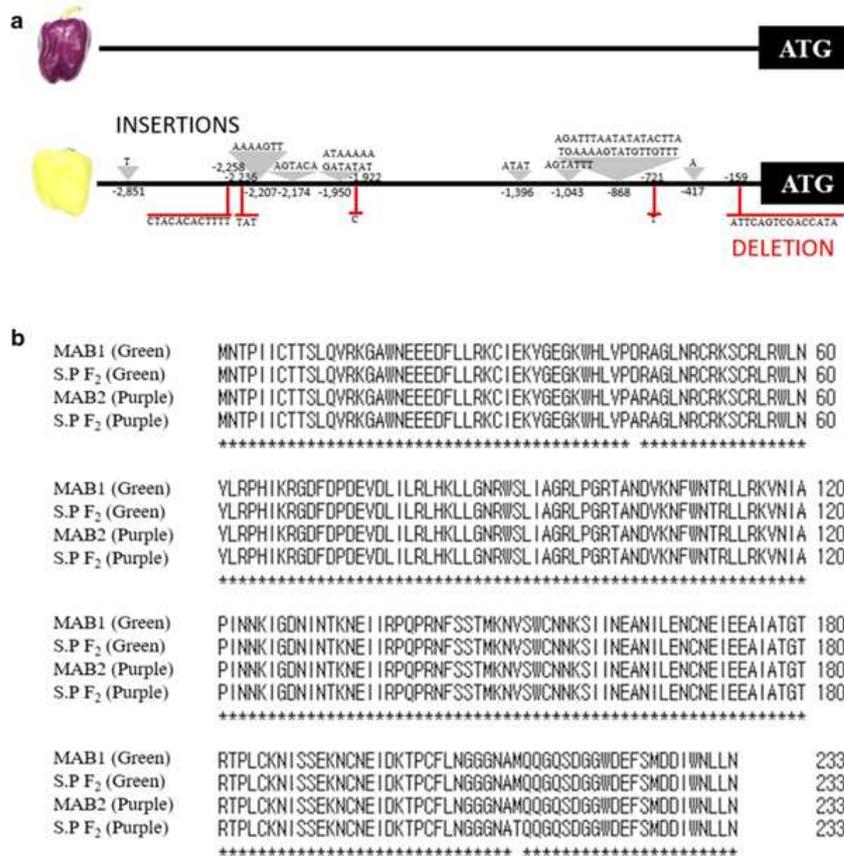


(그림) 발달 단계에 따른 'MAB2' 과실의 표현형 변화(A). 발달 단계에 따른 과피에서의 *Dem.v1.00043895* 유전자 발현량 변화(B). 발달 단계에 따른 과피 안토시아닌 측정 결과(C). 과실(개약 후 20일), 잎, 줄기, 꽃 등 조직별 *Dem.v1.00043895* 발현량 분석(D)

□ 후보 유전자의 구조적 변이 탐색 및 분자 마커 개발

- BSR-Seq을 통해 후보 유전자로서 특정한 *Dem.v1.00043895* 유전자는 앞서 수행한 분석 및 정밀 유전자지도 작성을 통해 강력한 후보유전자로 선발할 수 있었다. 이에, 유전자지도 작성 집단에서 분자마커 검정 결과 후보유전자 구간에서 동형접합으로 확인된 개체들의 gDNA를 추출하여 자색 미숙과를 갖는 개체들과 녹색 미숙과를 갖는 개체들 사이에 후보 유전자에서 어떤 구조적 변이가 있을지 확인하고자 하였다. 또한 대조군으로 사용된 자색 미숙과의 'MAB2', 녹색 미숙과의 'MAB1' 계통에서도 염기서열을 확인하여 그 구조가 일치하는지 검증하고자 하였다. 먼저, *CaAN3*의 프로모터 영역에서 자색과 녹색 *CaAN3* 대립유전자 사이에 몇 가지 구조적 변이를 발견하였다.
- 녹색 *CaAN3* 대립유전자의 프로모터 구간 3Kb를 시퀀싱할 결과 8개의 삽입(Insertion)과 5개의 결실(Deletion)이 발견되었다. 한편, 암호영역의 단백질 서열 분석 결과 43번째 아미노산에서 자색과 녹색 사이에 A - D 변이가 있음이 밝혀졌다. 211번째 아미노산에서도 다형성이 존재했지만, 유전자지도 작성 집단의 자색 개체와

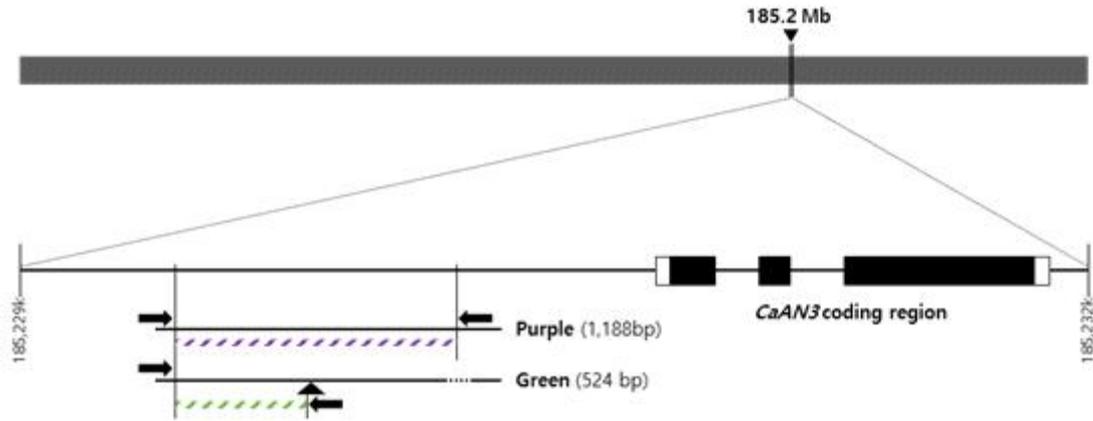
‘MAB2’의 서열 사이에 일관성이 존재하지 않았다. 단백질 조기 종결은 두 표현형 모두에서 발견되지 않았다. 유전자 발현 패턴과 관련하여 이러한 서열 상 차이를 고려한다면 녹색 *CaAN3* 대립유전자가 가지고 있는 프로모터 구간의 구조적 변이가 식물체 내에서 정상적인 발현을 유도할 수 없다는 가설을 수립할 수 있을 것이다. 다시 말해, 자색 *CaAN3* 대립유전자는 기능성이지만 녹색 대립유전자는 프로모터 구간의 삽입-결실 변이로 인해 비기능성일 수 있다.



(그림) *CaAN3* 프로모터 구간 염기서열 비교(a). *CaAN3* 암호 영역 단백질 서열 비교(b).

- 이에 여기에서는 프로모터 영역의 삽입-결실 변이를 표적으로 하는 SCAR 마커 세트를 개발하였다. 이 마커 세트는 하나의 순방향 프라이머, 두 개의 역방향 프라이머로 구성된다. 순방향 프라이머는 자색, 녹색 대립유전자의 염기서열이 동일하게 가지고 있는 서열을 표적으로 하여 대립유전자의 종류에 관계없이 DNA에 결합할 수 있도록 제작되었으며 역방향 프라이머는 녹색 대립유전자에서 발견된 삽입과 결실 구간의 서열을 각각 표적으로 하여 두 개가 제작되었는데, 삽입 구간에서 제작된 역방향 프라이머는 녹색 대립유전자일 경우에만 DNA에 결합하여 증폭될 수 있고 결실 구간에서 제작된 역방향 프라이머는 자색 대립유전자일 경우에만 DNA에 결합하여 증폭될 수 있다.

Dempsey v1.0 chromosome 10 (240.2 Mb)

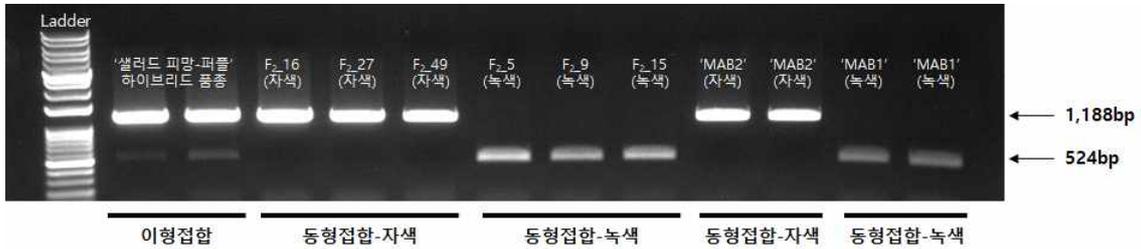


(그림) SCAR 마커의 유전체 상 위치 및 표적 구간

(표) SCAR 마커 세트 구성

Primer	Sequence (5'-3')	Product Size (bp)
AN3_IDEL_F	GCGGATCAGATTCATCTTTCATCTAG	
AN3_INS_R	ATTGAAAACAACATACTTTCATAAGTATA TATTAAATCT	Purple: 1,188 Green: 524
AN3_DEL_R	GGTATGGTCGACTGAATATCCTCA	

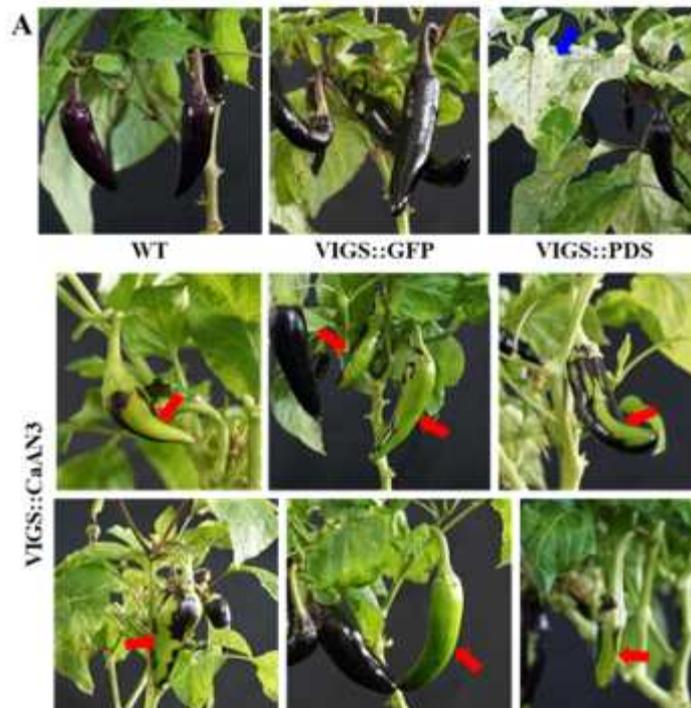
- 이 마커 세트를 적용해 PCR 분석을 수행하면 자색 대립유전자인 경우 1,188bp 크기의 PCR 앰플리콘을, 녹색 대립유전자인 경우 524bp 크기의 PCR 앰플리콘을 나타내게 된다. 이 마커를 실제로 '샬러드 피망-퍼플' 하이브리드 품종, 그로부터 얻은 F2 분리집단의 자색/녹색 동형접합 개체, 그리고 대조군으로 사용한 과실향이적 자색 계통인 'MAB2', 녹색 미숙과 계통인 'MAB1'에 대해 적용해 본 결과 예상과 같은 PCR 앰플리콘이 나타남을 확인하였다.



(그림) 개발한 마커를 실제로 각각의 유전형에 대해 적용한 결과

□ *Dem.v1.00043895* 유전자 침묵 효과(Virus Induced Gene Silencing) 분석

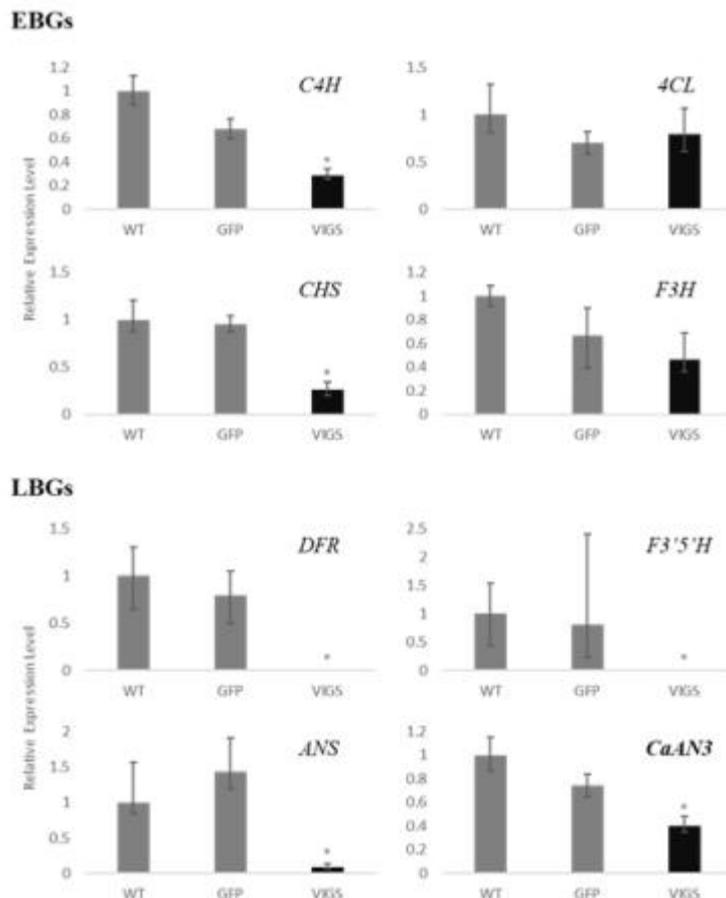
○ 후보 유전자가 *CaAN3*로 기능하는지 검증하기 위해 본과제에서는 유전자 침묵 효과 (Virus Induced Gene Silencing) 분석 방법을 적용하였다. *Dem.v1.00043895*의 암호영역 일부분을 유전자 침묵 벡터인 TRV2 벡터에 클로닝하여 *Agrobacterium*에 도입하였고, 마찬가지로 GFP 및 PDS 유전자 암호영역 일부분이 클로닝 된 벡터는 각각 음성 및 양성 대조군으로서 도입되었다. 'MAB2' 계통에 대해 유전자 침묵 실험을 수행한 결과, 두 대조군 접종 계통 모두에서는 미숙과의 색깔 변화가 관찰되지 않았고, 야생형 'MAB2'와 동일한 표현형의 과실을 확인할 수 있었다. 이때, PDS 침묵 실험체에서는 잎이 백화하는 표현형을 보이면서 PDS 유전자가 적절하게 침묵 되었다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 *Dem.v1.00043895*가 침묵된 실험체에서는 적어도 한 개 이상의 녹색 미숙과, 다시 말해 안토시아닌이 과피에 축적되지 않는 표현형의 변화가 관찰되었다. 일부 과실은 미숙 단계에서 과피의 거의 전부가 녹색으로 나타났고, 어떤 과실에서는 부분적으로 자색이 착색되는 표현형을 관찰할 수 있었다. 특징적으로 과피 상 자색과 녹색 부분은 유전자 침묵된 경우 그 경계가 뚜렷하게 구분되는 경향을 확인할 수 있었다. 무작위로 샘플링한 서로 다른 과실에서 HPLC를 통해 안토시아닌 함량을 분석한 결과, 마찬가지로 녹색 과피 부분에서는 안토시아닌이 축적되지 않음을 확인할 수 있었다.





(그림) 유전자 침묵 실험체에서의 미숙과 과색 변화
(A). 다양한 과실 샘플링과 안토시아닌 함량 분석 결과(B).

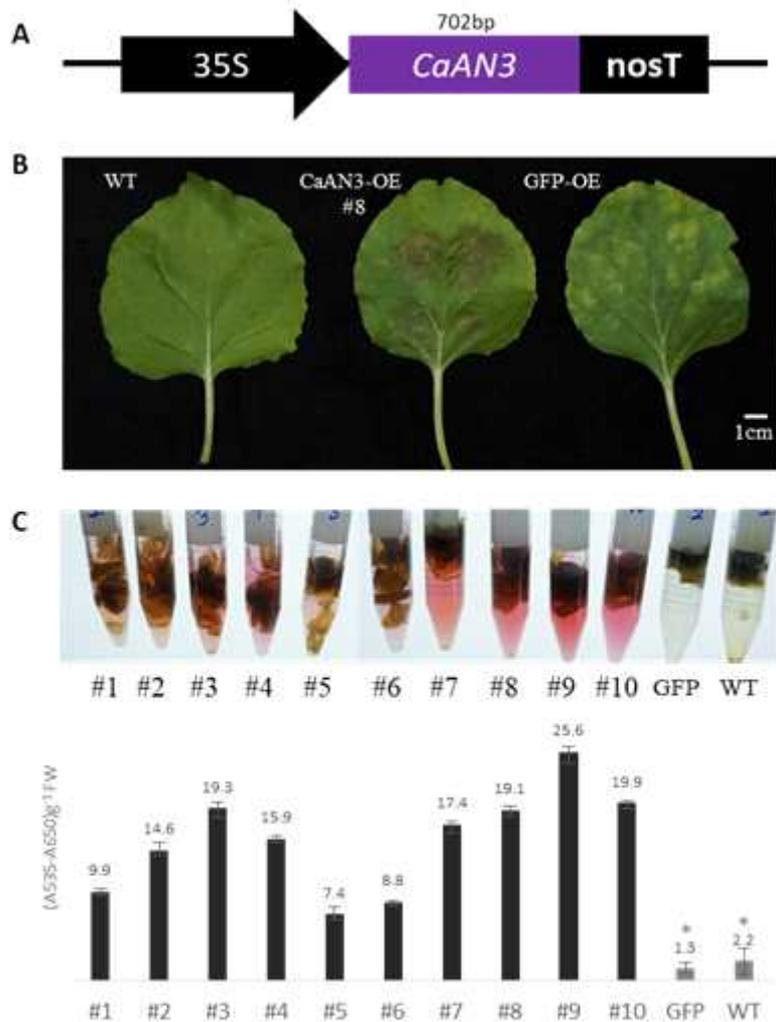
- 유전자가 제대로 침묵된 과실의 과피에서 안토시아닌 생합성 유전자들의 발현량을 분석한 결과 *Dem.v.1.00043895*가 침묵된 경우 여러 구조유전자의 발현이 유의하게 감소함을 밝혀낼 수 있었다. EBG와 LBG에서 모두 유의하게 하향조절된 발현량을 확인할 수 있었다. 그러나 EBG의 일부 유전자는 유전자 침묵된 과실과 대조군 사이에 유의한 발현량의 차이를 확인할 수 없는 경우도 있었다. 이에 반해, LBG의 경우 확연한 차이를 보였는데, LBG로 분류되는 *DFR*, *F3'5'H*, *ANS* 유전자는 모두 *Dem.v.1.00043895*가 침묵되었을 때 모두 발현량에서 유의한 차이를 보였으며, 특히 *DFR*과 *F3'5'H*의 발현량은 거의 확인할 수 없는 수준으로 분석되었다. 이 결과를 바탕으로 *Dem.v.1.00043895* 유전자는 안토시아닌 생합성 경로상 LBG와 상호작용하고 LBG를 조절한다고 가정할 수 있었다.



(그림) 유전자 침묵된 미숙과피에서의 안토시아닌 생합성 유전자 발현량 변화

□ *N. benthamiana* 앞에서의 일시적 과발현 분석

○ *CaAN3* 후보 유전자의 기능을 추가로 검증하기 위해 *N. benthamiana* 앞에서 일시적 과발현 실험을 수행하였다. *Dem.v1.00043895*의 암호영역 전체를 35S 과발현 프로모터가 삽입된 pCAMBIA2300 벡터에 클로닝하고 *Agrobacterium*에 도입한 후 어린 잎에 접종하였다. 앞선 유전자 침묵 효과 (Virus Induced Gene Silencing) 분석 실험과 마찬가지로 GFP의 암호영역 전체를 포함한 과발현 벡터가 음성 대조군으로 활용되었다. 접종 약 10일 후 잎의 표현형 변화를 관찰한 결과, *Dem.v1.00043895* 유전자의 과발현 벡터를 접종한 잎에서 접종 부위 주위로 선명한 자색 착색을 확인할 수 있었다. 반대로 음성 대조군은 야생형과 마찬가지로 색 변화를 나타내지 않았다. 잎에서 변색 된 부위를 샘플링 진행하여 안토시아닌 추출한 결과, 추출 용액에서 선명한 자색을 확인할 수 있었으며 음성 대조군과 야생형 잎에서는 어떠한 것도 추출되지 않았다. 분광광도계를 통한 흡광도 측정 결과, 과발현 잎에서는 과발현의 강도에 따라 (A535-A650)/g 값이 과발현 강도에 따라서 7.4 - 25.6까지 측정되었고, 이는 음성 대조군과 야생형에 비해 유의하게 높은 안토시아닌 함량이라는 점을 확인하였다.

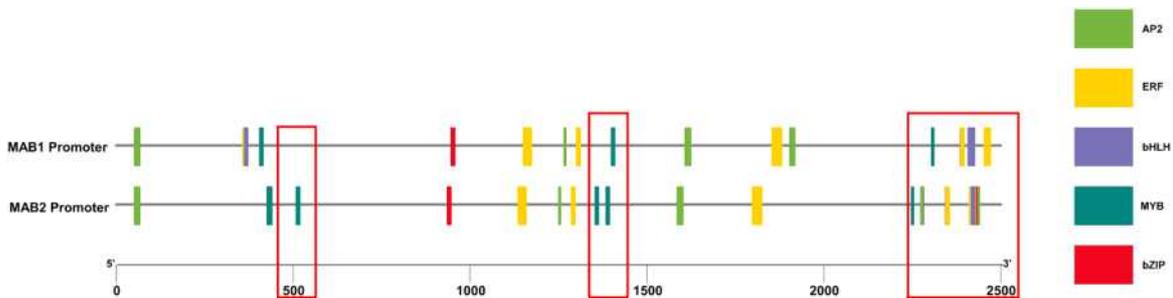


(그림) *N. benthamiana* 앞에서 *CaAN3*의 일시적인 과발현. 일시적 과발현을 위한 벡터 구성(A). *CaAN3* 후보유전자가 과발현된 잎의 표현형 변화(B). 잎 샘플 별 함량 측정 결과(C).

□ *CaAN3* 프로모터 지역에서 전사인자(Transcription factor)들의 결합 위치 스크리닝

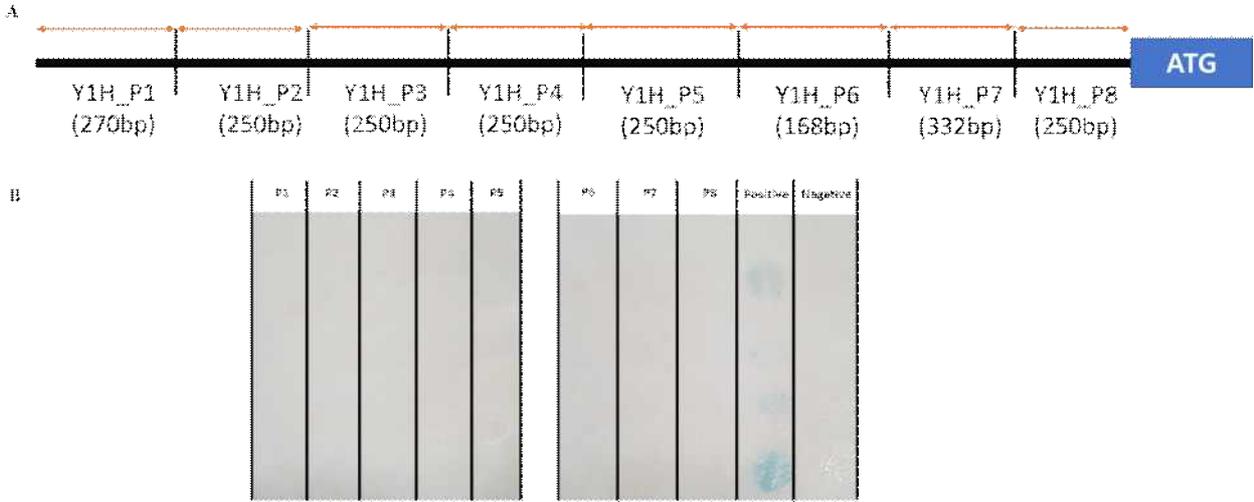
및 Y1H (Yeast One Hybrid) 분석을 이용한 *CaAN3* 프로모터 활성화도 검사

- *CaAN3*의 발현을 조절하는 핵심 프로모터 지역을 확인하고자, MAB1(초록과실)과 MAB2(자색과실) 계통의 In/Del을 포함한 2500bp의 *CaAN3* 프로모터 지역 서열을 이용하여 예측 분석 툴(Tool)인 전사인자(Transcription) 결합 위치 스크리닝(In silico) 분석을 시행하였다. 전사인자(Transcription) 결합 위치 스크리닝(In silico) 분석 결과, 두 계통 프로모터에 대한 AP2, ERF, bHLH, MYB, bZIP의 결합 위치를 예측하였고 프로모터 서열 시작 기준(0bp)을 순방향(5'→3')으로 하였을 때, 500bp-600bp, 1300-1400bp, 2300bp-2400bp 총 3개의 지역에서 두 계통 간 유의한 전사인자(Transcription) 결합 위치 차이를 확인하였다. MAB2(자색과실)와 다르게 MAB1(초록과실) 프로모터 3개 지역(빨간 상자)의 전사인자(Transcription) 결합 위치 결실은 In/Del에 의한 서열의 차이에 기인한 것으로 확인하였다.



(그림) MAB1과 MAB2 계통들의 *CaAN3* 프로모터 지역에서 전사인자(Transcription factor)들의 결합 위치 스크리닝. 빨간 상자: 전사인자(Transcription factor)들의 유의한 결합 차이를 보이는 위치

- *CaAN3* 프로모터의 활성화도 분석 및 핵심 프로모터 지역을 검증하고자 Y1H (Yeast One Hybrid) 실험을 수행하였다. 정상적인 활성을 보이는 MAB2(자색과실)의 *CaAN3* 프로모터 2020bp 길이 서열을 바탕으로 8개(Y1H_P1-Y1H_P8)의 분할된 단편들을 제작하였으며, 8개 중 3개의 단편(Y1H_P1, Y1H_P5, Y1H_P8)들은 종전 연구를 통해 예측 분석한 유의한 3개 지역을 각각 포함하여 제작하였다. 완성된 8개의 분할 단편 증폭산물들을 pLacZ에 클로닝을 진행하여 Yeast (YM4271)에 도입하였고 마찬가지로, 선행연구 *CaAN2*에 사용되었던 *CaAN2_Y3.2* 벡터 및 공 벡터를 양성대조군과 음성대조군으로서 Yeast (YM4271)에 도입하였다. Yeast colony-lift filter 기법을 통해 Y1H(Yeast One Hybrid)를 확인한 결과, 양성 대조군(*CaAN2_Y3.2*)에서는 LacZ 리포터 활성으로 인한 청색 군집이 관찰되었고 음성 대조군(공벡터)에서는 LacZ 리포터 비활성에 기인한 백색 군집이 관찰되었다. 양성 대조군과 음성대조군의 적합한 군집 색 변화로 인해 실험 결과의 적절성은 확인되었지만, 8개의 단편 프로모터 서열을 포함한 Yeast 개체(Y1H_P1-Y1H_P8)들에서는 LacZ 리포터 활성을 통한 청색 군집이 관찰되지 않았다. 이 결과를 바탕으로, *CaAN3* 발현을 조절하는 핵심 프로모터 지역은 2500bp 보다 상위 서열에 존재할 수 있다는 것과 *CaAN3* 과실 특이적 프로모터 서열은 Yeast(YM4271) 내 활성 문제를 유도할 수 있고 추가적으로 상호작용하는 전사인자의 Yeast 내 부재는 LacZ 리포터 비활성을 유발할 가능성이 있다는 것을 고찰해 볼 수 있었다.



(그림) *CaAN3* 핵심 프로모터 지역을 밝히기 위한 Y1H (Yeast One Hybrid) 분석.
CaAN3 프로모터 지역을 8개의 단편(Y1H_P1-Y1H_P8)들로 분할 한 모식도(A).
 Yeast colony-lift filter 분석을 이용한 LacZ 리포터 활성 결과(B). Positive: *CaAN2*_Y3.2 벡터, Negative: pLacZi 공벡터

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

(주관기관)고품질 종합대병성 견고추 및 고기능성 자색 풋고추 개발

1단계(1차년도, 2021년)

- 기술이전 1건
- 기술료 납부 1,000만원
- 고용창출 9건
- 사업화 3건

2단계(2차년도, 2022년)

- 매출실적 3,700만원

3단계(3차년도, 2023년)

- 사업화 1건
- 매출실적 6,500만원
- 홍보실적 2건

(공동연구)고추의 과실향이적 안토시아닌 축적을 선별할 수 있는 마커 개발

1단계 (1차년도, 2021년)

- 학술 발표 1건

1단계 (2차년도, 2022년)

- 마커 개발 특허 출원 1건
- 학술 발표 3건
- 논문 출판 1건
- 인력 양성 4건

2단계 (3차년도, 2023년)

- 학술발표 1건
- 논문 출판 1건
- 인력 양성 2건

< 정량적 연구개발성과표 >

[과학적 성과]

연차	논문	생명자원 (생물자원)	화합물	기술요약	보고서원문	학술대회	생명자원 (생명정보)
1년차	계획	-	-	-	-	-	-
	실적	0	0	0	0	1	0
	달성률	0%	0%	0%	0%	100%	0%
2년차	계획	1	-	-	-	-	-
	실적	1	0	0	0	3	0
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%
1단계	계획	0	0	0	0	0	0
	실적	1	0	0	0	4	0
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%
3년차	계획	1	-	-	-	-	-
	실적	1	0	0	0	1	0
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%
2단계	계획	0	0	0	0	0	0
	실적	1	0	0	0	1	0
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%
합계	계획	2	-	-	-	5	-
	실적	2	0	0	0	5	0
	달성률	100%	0%	0%	0%	100%	0%
가중치	0	0	0	0	0	0	0

[경제적 성과]

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	기술실시	기술이전(통상실시) 계약서	(주)피피에스	2021-11-30	0	10,000
2	기술실시	기술이전(통상실시) 계약서, 고추의 안토시아닌 생합성을 조절하는 Ca4N3 유전자 및 그의 용도	(주)피피에스	2023-11-20	0	11,000

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술(직접)실시	상품화	국내	고추 품종 개발	고추 품종 개발 (올카바)	(주)피피에스	37,000		2022	
2	기술(직접)실시	상품화	국내	고추 품종 개발	고추 품종 개발 (칼탄천하)	(주)피피에스				
3	기술(직접)실시	상품화	국내	고추 품종 개발	고추 품종 개발 (투스타)	(주)피피에스	65,000		2023	
4	기술(직접)실시	상품화	국내	고추 품종 개발	고추 품종 개발 (탑스피드)	(주)피피에스				

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
고추 품종 개발	2022	37,000			
고추 품종 개발	2023	65,000			
합계		102,000			

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2021.04.01. - 2023.12.31. (총 2년 9개월)			
	소요예산(천원)	총 825,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		102,000	700,000	100,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0.26	1.84	2.63
국외		0	0	0	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 기술이전 받은 마커를 기반으로 내병성 계통 육성에 활용할 계획임 - MABC를 통한 품종개발역량을 통해서 급변하는 시장요구에 맞는 품종을 발빠르게 출시할 계획임			
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		0	0	0	
	수출	0	0	0	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
			9	0	9
합계			9	0	9

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	변진영	2022	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
2	이시은	2022	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3	장시영	2022	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
4	조진관	2022	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
5	이세영	2023	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
6	최하영	2023	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기타	칼탄천하	경북지역 관내 고추 품평회	2023-08-17
2	기타	올카바, 칼탄천하, 투스타	2023년 국제종자박람회	2023-10-05

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함), <u>품종인 경우 품종보호권 등록증 또는 생산·판매 신고증명서</u>
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회 를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
0 엘리트 부계 집단 이용 내병성 및 고품질계 유전자 도입	0 유전자원 및 내병성 시판종을 조사 선별하여 신규집단작성	100
0 분리세대 MAS를 이용한 선발	0 작성된 신규집단을 MAS를 이용하여 목표형질을 보유한 개체를 선발	100
0 여교배를 통한 내병성 및 고품질계통 고정화 1단계	0 현재 선발된 개체와 반복친을 정식 후 여교배 진행중	100
0 미숙과에서 자색 발현하는 고추 연구 집단 구축	0 과실특이적 자색 발현 계통 입수 및 세대 진전을 통해 유전자지도 작성을 위한 F2 분리집단 구축	100
0 계통 간 표현형 비교 및 HPLC를 통한 후보 계통의 안토시아닌 함량 측정	0 다양한 자색 계통에 대한 표현형 조사 및 HPLC를 통한 안토시아닌 함량 측정 분석 및 특성 파악	100
0 여교배를 통한 내병성 및 고품질계통 고정화 2단계	0 1차/2차 여교배를 통한 도입유전자 확인	100
0 MABC를 이용한 조합 계통 선발	0 마커를 이용하여 고정을 확인 및 조합작성 및 계통선발	100
0 조합작성 및 1차 품종선발	0 노지 및 하우스내 조합력 확인 및 데이터 수집	100
0 후보 조합 원원종 증식	0 차년도 생산을 위한 원원종 증식 (하우스내)	100
0 Bulk Segregant RNA Sequencing을 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 Transcriptome 분석	0 Bulk Segregant RNA Sequencing을 통해서 후보유전자 구간을 탐색하고 추가 마커 개발을 통해 미세유전자 지도를 작성	100
0 육종 집단 생육 초기 자색 개체 선별을 위한 마커 개발	0 Transcriptome 분석 결과와 미세 유전자지도를 바탕으로 후보 유전자의 시퀀싱을 통해 안토시아닌 생합성 관련 유전자 In/Del 마커세트 개발	100
0 지역 시교 및 데이터수집	0 자사 육종연구소 및 고추 주요 산지에 유무상으로 시교를 진행하여 재배안정성 및 품종 특성 확인	100
0 2차선발 품종의 원종 증식 (국내 연구소) 및 생산력 검증 (해외 증식포 활용)	0 판매계획에 맞게 원종을 증식하고 적시에 생산하여 제품판매 전 종자 전염병 및 순도검정을 완료함	100
0 고기능성 자색 풋고추 품종 출원 및 홍보화	0 고기능성 자색 풋고추 품종을 개발함	95
0 후보유전자 동정 및 VIGS를 통한 유전자 기능 및 기작 연구	0 일시적 과발현 분석 및 유전자 침묵효과 분석(Virus Induced Gene Silencing)을 통한 후보 유전자 기능 연구 및 동정	100
0 생합성 경로에서의 유전인자 간 상호작용 기작 규명	0 MAB1과 MAB2 계통들의 <i>CaAN3</i> 프로모터 지역에서 전사인자(Transcription Factor)들의 결합 위치 분석(In silico) 및 Y1H (Yeast One Hybrid)를 이용한 <i>CaAN3</i> 프로모터 활성도 검사	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

특허출원 성과의 경우 1단계 1차년도에 계획되어 있었으나, 특허 신청 및 출원 준비에 있어 조금 더 상세한 검토가 필요하여 1단계 2차년도로 옮겨 성과달성이 진행되었음. 따라서 예상보다 늦게 특허등록이 진행되었고, 특허청에서 특허심사 및 등록에 필요한 소요 시간이 과제종료 시점을 넘어 2단계 3차년도까지 특허등록을 완료하지 못함.

2) 자체 보완활동

신속한 특허등록 진행을 위해, 특허등록에 필요한 추가 자료를 첨부하고 내용을 보완하여 특허청에 제출하였음. 현재 특허등록 심사 진행 중이며, 24년 4~6월 사이 특허등록이 완료될 것으로 예상함.

3) 연구개발 과정의 성실성

연구 개발 과정에서 주관기관과 공동연구기관간의 유기적인 소통으로 마커개발, 품종개발을 원활히 이루어냄. 계획서에 따라 주관기관은 조합력 검증, 원종 등의 생산을 하였으며, 공동연구기관은 개발된 마커를 활용하여 품종의 조기선발에 크게 기여함

전자 연구노트 (hwp)를 활용하여 연구수행과정을 투명하게 관리하였으며, 원종, 계통등을 Doriane 프로그램을 활용하여 꾸밈없이 관리함

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

농사를 지을 인력 부족 및 인건비, 농자재 등의 비용이 상승 등으로 농업의 환경은 점점 더 안 좋아지고 있다. 더불어 국민 소득 향상 및 기후 변화로 인해 시장은 다양한 품종을 원하고 있다. 본 연구과제를 통해서 다변화하는 시장에 MABC를 활용하여 빠르게 품종 개발을 할 수 있는 역량을 개발 하였으며, 고기능성 자색 풋고추는 현재 시장 내에서 판매되고 있는 1-2개 품종에 의해 소비자의 선택권이 제약될 수 있는 문제를 해결함은 물론 기능성 물질을 함유한 제품군의 지속적인 출시를 통해서 고추 제품군의 다양성을 유지하는 계기가 되었다.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

□ 경제적 측면, 산업적 측면

- 복합내병성의 고품질 품종으로 재배자의 요구도에 빠르게 만족시켜, 농가의 소득증대와 지역경제 활성화에 기대를 할 수 있음
- 고 기능성 품종의 보급으로 다양한 소비자의 선택권을 만족시킬 수 있으며, 식품을 통한 기능성 물질의 섭취 등 새로운 시장을 제안할 수 있음.
- 복합 내병계 고추 육종으로 농가에서 병해충에 대한 저항성으로 인해 생산성이 크게 증가 할 것으로 기대하며, 이에 따른 소득증대의 안정화에 기여할 것임

□ 기술적 측면

- 우리나라 고추의 육종은 세계적으로도 제일 선진화 되어있으며, 육종 기술의 노하우가 잘 축적되어있음. 여기에 마커를 이용한 단순한 표현형 Screening이 아닌 여교배 후 Background 선발까지 좀 더 최신의 기술적용으로 육종 연한을 더욱더 단축하고, 도입하고자 하는 대상 유전자의 정밀한 핀셋 도입으로 기술적 우위를 점할 수 있음
- 채소의 기능성 성분 유전자를 활용하여, 같은 가지과 작물인 토마토 등으로 저변 확대하여 적용할 수 있음

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	매년 목표치	
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1 (종료 1차년도)	
	국외		
	계		
인력양성	학사	1 (종료 1차년도)	
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보		2 (종료 1차년도)	
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.