

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001631-01

고추 육종 효율성 향상을 위한 기반기술 개발
Development of fundamental technologies to increase the
efficiency in pepper breeding

서 울 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부장관 귀하

이 보고서를 “고추 육종 효율성 향상을 위한 기반기술 개발” 프로젝트(세부프로젝트 “MAB 및 양적형질(흰가루병, 매운맛 등) MAS를 위한 분자마커 이용기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2017 년 02 월 14 일

프로젝트 연구기관명 :	서울대학교
프로젝트 책임자 :	강 병 철
세부프로젝트 연구기관명 :	서울대학교
세부프로젝트 책임자 :	강 병 철
위탁프로젝트 연구기관명 :	국립원예특작과학원
위탁프로젝트 책임자 :	양 은 영

보고서 요약서

과제고유번호	213004-04-1 -CG910	해 당 단 계 연 구 기 간	3년 6개월	단 계 구 분	1단계 / 2단계
연구사업명	단 위 사 업 명	채소 : 농식품기술개발(R&D)			
	세부 사업명	Golden Seed 프로젝트			
연구과제명	프 로젝트 명	고추 육종 효율성 향상을 위한 기반기술 개발			
	세부 프로젝트명 (주관 연구기관 /연구책임자)	MAB 및 양적형질(흰가루병, 매운맛 등) MAS를 위한 분자마커 이용 기술 개발			
연구책임자	강 병 철	해당단계 참 여 연구원 수	총: 13 명 내부: 13 명 외부: 0 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 280,000 천원 민간: 천원 계: 280,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 66 명 내부: 66 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 976,000 천원 민간: 천원 계: 976,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	서 울 대 학 교			참여기업명	
위탁연구	연구기관명: 국립원예특작과학원			연구책임자: 양은영	
요약				보고서 면수	
<ol style="list-style-type: none"> 1. MAGIC집단, ECW30R X CM334 RIL 집단, Long Sweet X AC2212 RIL 집단 등 구축. 2. 고추 및 파프리카의 신미 함량 및 역병 저항성 관련 QTL 분석과 분자마커 개발 수행. 흰가루병, 뿌리혹선충저항성 등 질적형질 연관 분자마커도 개발. 3. <i>Tsw</i> 유전자 클로닝을 통해 유전자 기반 분자마커 개발. <i>Rf</i>, <i>sy-2</i>의 경우 후보 유전자 탐색을 통해 0cM 분자마커 개발 4. GBS, DNA chip 기술을 이용한 고효율 유전자형 검정 시스템 개발 및 고추 육성 계통에 적용. 5. 고추 소포자 배양 기술 조건 확립 및 개선 				127 면	

요 약 문

I. 제 목

고추 육종 효율성 향상을 위한 기반 기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	품종개발			특허		논문		분자마커개발	유전자원		국내매출액	종자수출액	기술이전	마케팅전략수립보고서	인력양성
	생산수입판매신고	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
1단계 목표				3	0	5	2	25	100	20			0		4
1단계 실적				3	2	10	2	29	1158	109			3		10
달성율(%)				100	100	200	100	116	1158	545			100		250

성과목표	DB구축	DH계통개발	자원분양	서비스			
				성분분석	분자마커	병리검정	표현형검정
1단계 목표		15	30				
1단계 실적		73	572				
달성율(%)		486	1906				

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 고추 주요 병 저항성 형질 연구

- 고추의 다양한 주요 병 저항성 형질에 대해 연구 집단을 구축하고, 연관 분자마커 및 유전자 기반 분자마커를 개발하고자 함.

2. 고추 유용 형질 연구

- 고추의 신미와 같은 유용 형질을 유전 분석하여 연관 분자마커를 개발하고자 함.
- 비타민 및 색소와 같이 집단 구축이 필요한 경우 새로 집단을 구축하고, 다양한 형질을 하나의 집단에 집적하기 위해 MAGIC 집단을 구축하고자 함.

3. MAB 실용화

- 기개발된 분자마커 혹은 새로운 분자마커를 이용해 고추 육종 효율성을 향상시키고, MAB를 실용화하고자 함.

4. 고추 소포자 배양 기술 개발 (1, 2년차 세부과제, 제/3, 4년차 위탁과제)

- 고추의 육종 효율성 향상을 위해 소포자 유래의 식물체 생산 기술을 개발하여 고추의 품종 육성 효율 증진을 위한 반수체 육종기술을 확립하고자 함.

IV. 연구개발 내용 및 범위

- 역병저항성 major QTL 연관 분자마커를 개선하며, RIL 집단을 추가적으로 구축해 minor

QTL을 탐색하고자 함.

- TSWV 저항성 유전자를 동정하여 유전자 기반 분자마커를 개발하고자 함.
- 흰가루병 저항성 분리 집단을 구축하여 연관 분자마커를 개발하고자 함.
- Geminivirus 및 뿌리혹선충 저항성 검정을 위한 병리 검정법을 체계화하고자 함.
- 신미 관련 집단을 이용하여 캡사이시노이드 함량 조절 QTL을 탐색하고자 함.
- 임성회복유전자(*Rf*), 온도민감성 유전자(*sy-2*)의 유전자를 동정하여 유전자 기반 분자마커를 개발하고자 함.
- MAB 실용화를 위하여 DNA chip 기술을 고추에서 최적화하여 신속·대량 분석을 수행하고자 함.
- 유전자원 수집 및 특성 분석을 통해 주요 품종을 선발함.
- 반수체 육종법을 시행하기 위해 소포자 배양 기술을 확립함.

V. 연구개발 결과

- 고추 주요 병 저항성 형질에 대해 분리 집단(흰가루 병 CVMV, 청고병) 혹은 RIL 집단(역병, 선충병)을 구축하였고, 이를 이용해 연관 분자마커를 개발하였음. TSWV 저항성의 경우 유전자를 동정하여 유전자 기반 분자마커를 개발하였음.
- Geminivirus infectious clone을 구축하여 병리 검정법을 확립하고자 하였음.
- 신미와 관련된 두 집단을 이용해 유전 분석을 수행하여 캡사이시노이드 함량을 조절하는 QTL을 밝혔음.
- *Rf*, *sy-2* 유전자는 map-based cloning 방법으로 후보 유전자를 탐색하여, 0 cM 분자마커를 개발하였음.
- 비타민 및 색소 함량 QTL 분석을 위한 RIL 집단을 구축하였음.
- MAGIC 집단 구축을 위해 F1 간 4-way cross를 수행하여 각각 50립씩 종자를 확보하였음.
- 고추의 GBS 기법을 확립해 다양한 집단의 연관지도 작성 및 분자표지 개발에 활용하였음.
- DNA chip 기술을 고추에 최적화하여 MAB를 실용화하고, 다양한 형질의 분자마커를 신속 분석이 가능한 KASPar 마커로 전환하였음.
- 주요 병저항성, 착과력 우수 품종을 선발하여 유전자원을 확보하였음.
- 소포자 배양 기술을 위해 다양한 조건을 시험하고, 소포자 배양 기술을 확립하였음.

VI. 연구 성과 및 성과 활용 계획

- MAB 실용화를 위해 다양한 병 저항성 및 유용 형질의 연관 분자마커를 총 29종을 개발하고, 이를 기술실시하여 실용화하였음. 아우리 성분분석 및 분자마커 서비스 과제의 (충남대)의 위탁과제(서울대 권진경)에서 분석지원에 활용하도록 하였음. 관련 연구성과를 특허 출원하였고(출원 3건, 등록 2건) 논문을 출판(SCI 10건, 비SCI 2건) 하였음. 추후 연구를 통해 유전자 기반 분자마커를 이용해 적용성을 높일 계획임.
- 양적형질로 유전되는 연구의 경우 major 및 minor QTL을 탐색하여 육종 효율성을 향상시키며 기술실시, 특허 출원, 논문 출판을 계획 중임.
- 청고병, geminivirus의 경우 병리검정법을 체계화한 후, 구축된 분리 집단을 이용하여 저항성 연관 분자마커를 개발하고, 이를 실용화할 계획임.

- 비타민 및 색소 집단의 경우 비타민 및 색소 함량을 측정하여 QTL 분석을 수행할 계획임.
- MAGIC 집단을 구축하여 다양한 형질에 대한 분자마커 개발을 일시에 수행할 수 있도록 함.
- 고추 유전자원 수집 및 평가를 통해 신품종 개발에 활용하고자 함.
- 소포자 배양 방법을 확립하여 육종 연한 단축 및 생산비용 절감에 도움을 주고자 함.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of fundamental technologies to increase the efficiency of pepper breeding

II. Research achievement

Achievements goal	Patent		Research paper		Marker development	Germplasm	
	Application	Registration	SCI	No-SCI		Collection	Registration
1 st phase goal	3	0	5	2	25	100	20
1 st phase achievements	3	2	10	2	29	1158	109
Achievement rate(%)	100	100	200	100	116	1158	545

Technology transfer	Professional education	Achievements goal	DH line development	Resource furnishment
0	4	1 st phase goal	15	30
3	10	1 st phase achievements	73	572
100	250	Achievement rate(%)	486	1906

III. The purpose of the research and development

1. Studies on disease resistance in pepper

- The purpose of this research is to construct populations for various disease resistance and develop molecular markers linked to the traits.

2. Studies on horticultural traits in pepper

- The purpose of this research is to genetically analyze various horticultural traits including pungency and restorer-of-fertility for developing molecular markers.
- In order to find novel useful traits, RIL or MAGIC populations were constructed.

3. Practical application of MAB

- For practical application of MAB, we used already developed or new markers.

4. Development of microspore culture technology

- The purpose of study is to develop the microspore culture technology for haploid plant breeding program in hot pepper.

IV. Contents and scope of the research and development

- For *Phytophthora* resistance, molecular markers for the major QTL was improved and minor QTL was detected using a RIL population.
- The TSWV resistance gene was identified by map-based cloning and broadly applicable molecular markers for TSWV resistance were developed.
- For powdery mildew resistance, several molecular markers were developed.
- In order to develop molecular markers for resistance genes to geminivirus and root-knot nematode, disease screening systems were investigated.
- Using genotype-by-sequencing methods, pungency QTL of pepper was detected in two populations.
- Using map-based cloning approach, candidate genes were identified for *Rf* and *sy-2* genes to develop gene-based markers.
- Realtime-based DNA marker technology was optimized for high-throughput marker analyses.
- Useful genetic resources were selected by collecting and evaluating pepper germplasms.
- In order to shorten the breeding time of pepper, microspore and anther culture systems were secured.

V. Results of the research and development

- For major disease resistance trait (*Phytophthora*, powdery mildew, root-knot nematode), we constructed segregating or RIL populations, and developed molecular markers. For TSWV, we isolated the resistance gene and developed gene-based markers.
- We systematized disease screening method of geminivirus.
- By genetic analysis of pungency using two RIL populations, several QTL which contribute the capsaicinoid contents were detected.
- Combining chromosome walking and RNA-seq methods enabled to identify several candidate genes for *Rf* and *sy-2*.
- A RIL population was for genetic analysis of vitamin and pigment contents.
- To construct MAGIC population, 4-way crosses between F1 plants were performed, and about 50 seeds were harvested from each cross.
- GBS technology in pepper was established and used in various segregating populations to develop linkage maps and molecular markers.
- Developed markers were converted to KASPar assay for fast genotyping of target traits.
- Useful genetic resources containing disease resistance trait and superior traits.
- Microspore culture technique were developed by cultivating anther and microspore in different culture conditions.

VI. Research utilization plan and performance

- A variety of disease resistance and useful trait markers were developed and licensed to other institutions after paper publication and patent application. Further study is needed to develop gene-based markers for broadly-applicable markers.
- Major QTL and minor QTL was detected in case of quantitative traits. These studies were planned to be published soon.
- To geminivirus and bacterial wilt, segregating populations were constructed and molecular markers will be developed after setting up disease screening systems.
- In order to detect QTL of vitamin and pigments, genetic analysis of vitamin and pigment contents will be conducted.
- A MAGIC population will be constructed to study the inheritance of multiple traits in one population.
- Genetic resources with superior traits will help breeders to develop new cultivars in pepper
- Microspore culture system can shorten the time required for the development of new cultivars in the future.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1.	Overview of research and development (R&D) projects -----	13
	Section 1. Purpose of R&D projects -----	13
	Section 2. Needs for R&D projects -----	13
	Section 3. Research scope -----	14
	Section 4. Performance in comparison to goal -----	17
Chapter 2.	State of technology development in both domestic and abroad -	18
	Section 1. State of technology development in abroad -----	18
	Section 2. State of technology development in domestic -----	19
Chapter 3.	R&D contents and results -----	21
	Section 1. Development of molecular markers for pepper traits -----	21
	Section 2. Development of gene-based markers in pepper -----	39
	Section 3. Population construction for major pepper traits -----	45
	Section 4. MAB utilization via high-throughput genotyping system --	49
	Section 5. Microspore culture system development of hot pepper ----	54
Chapter 4.	Achievements and contribution to related fields -----	106
	Section 1. Achievements -----	106
	Section 2. Contribution to related fields -----	109

Chapter 5.	Application of R&D accomplishments -----	113
	Section 1. Commercialization -----	113
	Section 2. Patent and publication -----	114
	Section 3. Future plan -----	116
Chapter 6.	Global science and technology information -----	118
Chapter 7.	References -----	120
	Reports of patent, review, and market analysis -----	123

목 차

제 1 장	프로젝트의 개요 및 성과목표 -----	13
1 절	연구개발의 목적 -----	13
2 절	연구개발의 필요성 -----	13
3 절	연구개발의 범위 -----	14
4 절	연구성과 목표 대비 실적 -----	17
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	18
1 절	국외 기술개발 현황 -----	18
2 절	국내 기술개발 현황 -----	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	21
제 1 절	고추 주요 형질 연관 분자마커 개발 -----	21
제 2 절	고추 유용 형질 유전자 기반 분자마커 개발 -----	39
제 3 절	고추 유용 형질 관련 집단 구축 -----	45
제 4 절	고효율 유전자형 검정을 통한 MAB 실용화 -----	49
제 5 절	고추 소포자 배양 기술 개발 -----	54
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	106
제 1 절	연구개발목표의 달성도 -----	106
제 2 절	관련분야에의 기술발전 기여도 -----	109

제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	113
제 1 절	실용화 및 산업화 관련 -----	113
제 2 절	지적재산권 확보 관련 -----	114
제 3 절	추가연구, 타연구 활용 계획 -----	116
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	118
제 7 장	참고문헌 -----	120
	특히, 논문 및 시장분석 보고서 -----	123

제 1 장 프로젝트의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적

- 본 연구과제의 목적은 고추 및 파프리카의 육종 효율성 향상을 위한 종합적 분자유종 체계 및 육종 연한 단축을 위한 반수체 육종 기술 확립 및 다양한 육종 소재를 확보하는 것임. 따라서 종합적 분자유종 체계 확립을 위해 분자마커 개발용 집단을 작성하고, 차세대 유전체 분석 시스템을 적용하여 분자마커 개발의 효율성을 극대화하고자 함. 이를 이용하여 고추 주요 질적 및 양적형질에 대한 유전 분석 및 분자마커 개발을 수행하고, 이를 고효율 분자표지 시스템을 이용하여 고추 및 파프리카의 MAS·MAB 시스템을 구축하고자 함. 또한 고추 육성 효율 증진을 위한 고추 약 및 소포자 배양기술을 확립하고, 이외에 다양한 우수계통 개발을 이용하여 유전적 다양성을 증진시키고 우수계통을 보급하고자 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 고추는 우리나라 채소종자 수출액의 약 20%를 차지하여(2011년) 종자수출에서 차지하는 비중이 가장 큰 작물임. 그러나 다국적 기업의 국내 진출로 인한 유전자원 및 기술의 유출, 수출 현지 업체의 품종개발 능력 향상, 다국적 기업 간 경쟁 심화, 대규모 R&D 투자를 통한 다국적 기업에서의 육종 효율성 극대화 등으로 인해 지속적인 국제 경쟁력 유지가 크게 위협 받고 있는 상황임.
- 첨단 기술을 활용한 육종 기한 단축 및 효과적인 계통의 선발은 다국적 기업과의 경쟁을 위해 필수적이나 분자마커를 활용한 육종 기술은 다국적 기업에 비해 뒤쳐지는 수준이며 분자마커 개발을 통한 경쟁력 강화를 위해 구성되었던 고추분자마커사업단의 경우 연구 결과가 공개되지 않아 분자유종 기술의 광범위한 이용에는 기여도가 떨어졌음.
- 한편 수출시장 확대 및 종자수출액 증대를 추진하는 Golden Seed Project의 목표 달성을 위해서는 수출시장별 우수한 형질을 가진 자원 보유여부가 매우 중요하나 우리나라의 고추 육종 시 활용되어 온 유전자원의 변이의 폭이 매우 제한적임. 따라서 반수체 육종법 활용을 이용한 다양한 DH 계통 육성의 육성은 빠른 기간 내에 실제 품종육성 재료로 사용이 가능하므로 육종 소재 부족의 한계를 만회하기 위한 하나의 전략이 될 수 있음.
- 파프리카는 국내에서 재배되는 품종의 종자 전량이 네덜란드 등 해외의 선진 종자 회사에서 수입되는 실정임. 해외와 국내의 종자 회사 간 파프리카의 육종 기술 수준 차이는 현재까지 상당히 크다고 볼 수 있는데 네덜란드의 Enza Zaden 등 파프리카 종자 산업에서 두각을 나타내는 종자 회사들이 1980년 대 초중반에 이미 품종 육성을 개시한 반면 우리나라는 2008년도에 시작된 파프리카 연구 사업단에서의 연구에서부터 파프리카 종자 개발이 시작되었으므로 해외 선진 회사와의 격차가 30년 가량 벌어져 있다고 볼

수 있음.

- 특히 파프리카는 고부가가치 작물로서 종자 가격보다는 품종의 우수성에 의해 경쟁력이 결정되는 경향이 크기 때문에 이러한 격차는 상당부분 극복되어야 함. 즉 우수 특성을 지니는 육종 소재 및 중간 모본 개발, 우수 특성 도입을 위한 여교배 과정을 최단시간 내에 최고의 효율성으로 수행하는 것이 경쟁력 확보를 위한 주요 관건이라고 할 수 있음.
- 단순 단일 특성 검정을 뛰어넘어 육종 전 과정에 적용될 수 있는 효율적인 분자유종 시스템 개발, 반수체 육종 방법 적용을 통한 우수 계통 확보 및 육종 연한 단축은 파프리카 계통의 성공적 육성에 있어 결정적 역할을 할 수 있음.
- 해외 선진 종자회사들에서는 내부적으로 주요 형질에 대한 분자마커를 개발하여 보유하고 있을 뿐 아니라 SNP에 기반한 대규모 유전자형 분석 방법을 개발하여 여교잡의 효율성을 향상을 위해 이미 활용하고 있음.
- 또한 차세대 염기서열 분석 방법의 도입으로 염기서열 분석의 단가가 낮아지면서 다수의 주요 작물에 대한 전체 염기서열 분석이 완료되었으며 앞으로는 특정 형태의 분자마커 이용 방식을 뛰어넘어 분리 집단 각 개체의 염기 서열을 더욱 직접적으로 활용하는 형태로 분자유종이 진화되어 갈 것으로 전망됨.
- 특히 고추의 경우 최근 서울대학교 연구팀에 의해 유전체 전체 서열 분석이 완료 되어 (Kim et al., 2014) 분자유종을 위한 획기적인 전기가 마련되었으므로 유용 특성의 유전 분석을 위한 효율적인 집단 작성, 현재까지 연구 수준이 낮았던 QTL을 비롯한 주요 특성들에 대한 분자마커 개발, 대규모 분자마커 적용을 수행하기 위한 가장 효율적인 시스템 선정 등 분자유종 전반에 대한 경쟁이 본격화될 것으로 예측됨.
- 따라서 단일 유전자에 대한 분자마커 개발이 주를 이루었던 기존 연구 목표에서 벗어나 집단 작성, QTL 분석, 유용 유전자 분리 및 MAB를 위한 분자유종 플랫폼 개발 등 종합적 분자유종 시스템 개발을 위한 연구가 수행되어야 할 필요성이 매우 큼.

제 3절 연구개발의 범위

1. 고추 주요 특성에 대한 불변집단 및 분리집단 작성

- 역병 저항성의 경우 역병 저항성이 기존에 보고된 CM334를 저항성친으로 이용하여 교배한 ECW30R X CM334 RIL 집단을 이용하며, 유전자좌의 고정을 위해 추가로 세대진전을 수행함. 신미 정도의 경우 기존 연구진에서 보유한 Perennial X Dempsey RIL 집단을 이용한 분석을 수행함. 비타민 함량(비타민 C, 비타민 E) 및 색소 함량의 경우 기존 연구 그룹(Wahyuni et al., 2011)에서 평가된 후 본 연구진에 도입된 계통을 이용

하여 RIL 집단을 작성함.

- 질적 형질로 유전될 것으로 예측되는 특성에 한해 F2 혹은 F2:3 분리 집단을 작성하여 확인함. 예를 들어 뿌리혹선충 저항성의 경우 기존에 보고된 *Me7* 유전자 기반 분자표지를 개발하기 위해 ECW X CM334 F2 집단을 작성하고, 흰가루병의 경우 VK515R, VK515S F2 및 F2:3 집단을 작성함.
- 역병 저항성, 청고병 저항성, 흰가루병 저항성, 비타민 및 색소 고함유 계통을 포함하는 8개의 다양한 계통에 대해 8-way cross를 수행하고 자가수정을 통해 세대를 진전하여 8개 계통의 유전적 다양성을 모두 포함하는 MAGIC 집단을 작성함.

2. 고추 및 파프리카 주요 형질 관련 분자마커 기술 확립

- 역병 저항성의 경우 YCM334 X Tean RIL 집단 및 ECW X CM334 RIL과 차세대 염기서열분석 기법을 이용하여 major QTL (5번 염색체)과 유전적 거리가 가까운 분자표지를 개발함. 또한 그 외의 minor QTL에 대한 분석을 추가적으로 수행하여 다양한 유전적 배경의 육종 계통에 효율적으로 적용될 수 있는 분자표지를 개발함.
- 흰가루병 저항성에 대한 연구는 VK515R X VK515S를 이용하여 F2 및 F2:3 집단을 작성하여 유전분석을 수행한 후, BioMark HD system 및 고추 표준유전체 서열을 이용하여 저항성 유전자에 연관된 분자표지를 개발함.
- 뿌리혹선충 저항성에 대한 연구는 ECW X CM334를 이용하여 F2 집단을 작성하여 분리 검정을 통해 유전분석을 수행함. 이후, 고추 표준유전체 서열 및 CM334 bacterial artificial chromosome (BAC) 서열을 이용하여 저항성 유전자와 가깝게 연관된 분자표지를 개발함.
- TSWV 저항성에 대한 연구는 기존에 보고된 기존 분자표지로부터 유전적 거리를 좁히고 *Tsw* 유전자를 동정하기 위하여, CM334 BAC library를 이용하여 chromosome walking을 수행하여 fine mapping을 함. 이후, transient over-expression (TOE) 혹은 *Tsw* 형질전환 식물체를 만들어 *Tsw* 저항성 유전자를 동정하고 유전자 기반 분자마커를 개발하여 다양한 유전적 배경을 갖는 고추 집단 및 육종소재에 이용할 수 있도록 함.
- TSWV 저항성에 대한 연구는 기존에 보고된 기존 분자표지로부터 유전적 거리를 좁히고 CM334 BAC library를 이용하여 chromosome walking을 수행하여 fine mapping을 함. 이후 transient over-expression (TOE) 혹은 *Tsw* 형질전환 식물체를 만들어 *Tsw* 저항성 유전자를 동정하고 유전자 기반 분자마커를 개발하여 다양한 유전적 배경을 갖는 고추 집단 및 육종소재에 이용할 수 있도록 함.

3. 고효율 유전자형 검정 시스템 개발 및 적용

- 기존 연구에서 transcriptome 분석을 통해 SNP마커를 선발하였으며, 이는 바로 Bio-Mark HD system에 활용이 가능함. 이 중 412개의 SNP 분자마커를 선별함.
- 특성별 교배조합 작성에 활용한 계통에 대해 412개의 SNP 분자마커를 통한 다형성 분석을 수행

4. 고추 유전자원 수집 및 평가

- 고추 유전자원 수집 및 보유 계통을 이용하여 탄저병, 역병, 풋마름병 등 주요 병 저항성을 평가하여 병 저항성 계통을 선발함. 착과력과 수량이 우수한 계통을 선발하기 위하여 같은 방법을 이용하여 착과력 및 수량이 우수한 계통을 선발함.
- 중국 유전자원 도입 및 평가를 위해 F2집단 31 계통을 생육하여 초기생육 및 과실의 원예적 특성을 조사함. 평가된 유전자원 중 우수한 개체를 선발하여 형질 고정 및 종자를 확보하여 수출용 품종의 육성 재료로 제공함.
- 영양고추시험장에서 보유 중인 유전자원을 이용하여 생육 및 특성조사, 품질분석, 내병성 검정 등을 수행함. 중국, 멕시코, 인도, 르완다, 한국, 에티오피아 및 인도네시아 등 다양한 유전자원 및 평가 체계를 통해 신품종 육성에 활용함.

4. 고추 소포자 배양 조건 확립

- 약 배양, 나출 소포자 배양, shed-소포자 배양 등 다양한 배양 방법을 시도하여 고추의 소포자유래 식물체를 확보함. 다양한 배양 방법 중 다수의 배를 확보할 수 있는 방법을 이용하여 배양 방법을 확립함.
- 식물체의 품종, 배양조건(배지종류, 배양온도, 고온처리조건, 배양용기 등) 및 꽃봉오리 크기에 대한 검토 등 다양한 조건에서 배양을 실시하여 소포자 유래 식물체를 확보함. 다양한 배양 조건 중 다수의 배를 확보할 수 있는 조건을 최적화하여 배양 조건을 확립함.

제 4절 연구성과 목표 대비 실적1)

성과목표	품종개발			특허		논문		분자 마커 개발	유전 자원		국 내 매 출 액	종 자 수 출 액	기술 이전	마케팅 전략 및 보고 서	인 력 양 성
	생산수 입 신 고	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비 SCI		수집	등록					
최종목표				5	3	12	2	25	100	20			3		14
1차 년도	목표						1	1	50						1
	실적							1	1108						4
달성율(%)						100		100	2216						400
2차 년도	목표					2	1	3	50						1
	실적				1	1	3	2	3	50	53		1		1
달성율(%)					100	100	150	200	100	100			100		100
3차 년도	목표				2		1		4		10				1
	실적				1	1	2		5		45		2		2
달성율(%)					50	100	200		125		450		200		200
4차 년도	목표				1		2		1		10				1
	실적				1		3	1	20		11		1		3
달성율(%)					100		150	100	200		110		100		300

성과목표	DB구축	DH계통개발	자원분양	서비스			
				성분분석	분자마커	병리검정	표현형검정
최종목표		15	30				
1차 년도	목표						
	실적		90				
달성율(%)			100				
2차 년도	목표	5	10				
	실적	6	82				
달성율(%)		120	820				
3차 년도	목표	5	10				
	실적	6	50				
달성율(%)		120	500				
4차 년도	목표	5	10				
	실적	61	350				
달성율(%)		1220	350				

1) 1, 2차년도는 총괄 과제 내 제1세부 및 제2세부과제 실적 합산, 3차년도 이후는 제1세부 및 위탁과제 실적 합산.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

- 주요 종자 회사들의 경우 내부적으로 고추의 초고밀도 유전자 지도 또는 완성 단계 이전의 유전체 서열을 보유하고 있는 것으로 알려져 있음. 예컨대 네덜란드 Enza Zaden 과 Rijkzwaan, 프랑스의 Vilmorin & Cie, 일본의 Takii 등 4개의 세계적 종자 회사를 기술적으로 지원하는 네덜란드 키진(KeyGene)의 경우에는 초고밀도 유전자 지도, 3D BAC library, 각 BAC 클론에 대한 고밀도 sequence tag, 고추 유전체 draft 서열을 모두 보유하고 있음.
- 현재까지 19개 이상의 기능성, 내병성, 수량관련 형질들에 대한 분자마커가 보고되었으나 종자회사에서는 자체적으로 더 많은 수의 분자마커를 개발하여 지니고 있을 것으로 추정됨. 종자회사나 정부 연구기관에서는 MAS를 이용한 선발이 일상화되어 선발 효율을 극대화시키고 육종연한을 크게 단축하고 있음.
- 개발된 마커는 고효율 시스템을 이용해 대규모로 분석됨. 몬산토에서는 종자상태에서 DNA를 추출하고 유전자형을 분석할 수 있는 종자 칩퍼(Seed Chipper) 기술을 이용하여 하루 수천 개의 종자에 대한 분석을 수행하고 있음. 유전자형 분석의 경우 신젠타에서 주로 활용하고 있는 Arraytape을 이용하면 PCR 분자마커에 대해 연간 수천만 data point를 20명 이하의 노동력으로 생산해낼 수 있음.
- 해외 선진 육종 회사들은 여교잡 육종 연한을 획기적으로 단축할 수 있는 MAB 시스템을 확립하여 일부 이용하고 있음. 즉 기존 분자마커를 고효율에 사용할 수 있도록 전환하고 고효율 유전형 분석 플랫폼을 구입하여 육종 프로그램에 이를 활용하고 있음. 예를 들어 Enza Zaden 등의 종자 회사에서는 SNP 분자마커에 기반한 KBiosciences PCR SNP genotyping system (KASPar)를 이용하여 다수의 분리 계통 및 분자마커에 대한 자동화된 유전자형 분석을 수행함으로써 여교잡 시의 육종 연한을 단축시키고 있음.
- 한편 유전체 전체에 대하여 제한효소 처리 후 절단 부위 부근의 서열 만을 multiplex sequencing과정을 통해 시퀀싱하는 Genotyping By Sequencing (GBS) 기술의 경우 적은 비용으로 대량의 SNP를 확인할 수 있다는 강점으로 인해 Genome Wide Association Study(GWAS) 등에 널리 활용되고 있는데 서열 분석 단가가 점점 내려가고 유전체에 대한 정보가 축적됨에 따라 추후 분자마커 개발뿐만 아니라 MAB에 사용될 수 있을 것으로 전망됨.
- 국외 고추 소포자 배양관련 연구는 헝가리, 불가리아, 스페인 등을 중심으로 진행되고 있으며 배지별 식물체 획득 효율분석, 최적 성장조절제 조성, 온도처리 등에 대한 연구가 수행된바 있으며 모식물체에 따른 소포자 배양 성공률 분석 관련 연구도 일부 수행된 바 있음(Irikova et al, 2011; Nowaczyk et al., 2016; Parra-veag et al., 2013). 최근

에는 고추 shed-소포자 배양을 통한 반수체개발 연구가 활발히 진행중이며, 실제 관상용 품종을 재료로 소포자유래 식물체를 다수 확보한 사례도 보고되었음(Ari et al. 2016; Supena et al, 2006). 현재까지 고추의 반수체 육종은 약배양을 통해 생산된 배가 반수체를 이용하여 육종에 도입한 사례가 있으며 다양하게 활용되고 있음(Shmykova et al., 2014).

제 2 절 국내 기술개발 현황

- 유전체 분석 및 유전자 지도 작성은 본 연구실을 포함하는 서울대학교 연구 그룹들을 중심으로 진행되어 왔음. 최근 차세대 염기서열 분석 방식을 이용하여 CM334의 전체 염기서열이 분석되었으며(Kim et al., 2014) 병저항성, 과실 특성 등의 분석에 관련된 다양한 계통의 transcriptome 데이터를 보유하고 있음.
- 본 연구실에서는 Perennial X Dempsey의 F₇, F₈, F₉ 세대에 해당되는 Recombinant Isogenic Line(RIL)을 보유하고 있으며 각 계통에 대한 low depth 시퀀싱을 수행하여 유전체 전반에 걸쳐있는 다수의 분자마커를 발굴한 바 있음. 이 RIL 집단을 이용하여 single nucleotide polymorphism(SNP) 유전자 지도를 작성하여 약 15,000개의 유전자의 위치를 나타낸 초 고밀도 유전자 지도를 작성하였음.
- 또한 CM334의 BAC library를 PCR을 통한 스크리닝이 가능하도록 pooling하여 fine mapping에 이은 유전자 발굴에 활용하고 있음.
- 서울대학교 및 종자 회사를 통해 주로 내병성 및 옹성불임성을 중심으로 분자마커가 개발된 바 있음. 현재까지 주로 TMV, CMV, TSWV, potyvirus 등에 대한 바이러스 저항성 유전자, 세균성점무늬병 등 세균 병 저항성 유전자, 세포질 옹성불임 및 회복 유전자, 유전자적 옹성불임 유전자, 매운 맛 유무 결정 유전자 등 질적 형질에 대한 유전자들에 가깝게 연관되어 있는 분자마커가 개발되어 왔음.
- QTL 분석의 경우 역병, 탄저병, 매운 맛의 정도 등의 형질에서 분석되었으며 역병의 경우 major QTL에 대한 분자마커가 현재 활용되고 있음. 대부분의 회사에서는 AFLP 분자마커 개발 후 이를 SCAR 및 CAPS 형태의 PCR 기반 분자마커나 HRM 기반 SNP 분자마커로 전환하여 유전자형 분석에 활용함.
- 현재까지 주로 단일 특성 관련 유용 분자마커에 대한 육종 계통들의 유전자형을 분석하는 방식의 시스템이 이용되고 있음. 대부분의 회사에서는 PCR 및 agarose gel 분석, HRM을 이용한 분석 방식을 채택하고 있음. 개별 특성 연관 분자마커의 경우에는 농우, 동부한농 등 규모가 큰 종자회사에서 자체 분석 시스템을 통해 분석하고 있으며 자체 분석 시스템을 갖추지 못한 소규모 종자 회사에 대해서는 고추와 육종, F&P 등 사설 육종 지원 회사 및 서울대학교 병리검정사업단(본 연구실 과제)에서 분자마커 검정 서비스를 지원하고 있음.

- 반면 고효율 시스템을 이용한 MAB는 국내 종자 회사에서 전혀 이루어지지 않고 있음. 단 본 연구실에서는 Fluidigm 사의 BioMark 시스템을 이용하여 다수의 계통에 다수의 분자마커를 하나의 칩을 이용하여 한꺼번에 분석할 수 있는 Bio-Mark HD system을 활용, 약 4,000개의 고추 유전자원에 48개의 분자마커를 적용함으로써 최소의 계통 수로 최고의 다양성을 나타내는 core collection을 작성하는 연구를 진행하고 있으며 고추 Perennial X Dempsey의 RIL 집단 계통들에 대해 SGB 분석을 통해 유전자형을 분석하는 연구를 추진하는 등 차세대 유전자형 분석 기술을 활용한 연구를 진행해 나가고 있음.
- 품종 육성 연한 단축을 위한 반수체 육종법중 하나인 약배양 기술은 국립원예특작과학원 및 민간종묘회사에서 실제 품종육성과정에 중요한 단계로 자리매김 하고 있으며 각 연구기관 및 회사 자체 내에서 고유의 프로토콜을 보유하고 있음.
- 반수체 육종법 중 또 다른 하나인 소포자 배양은 약배양에 비해 배양노력 및 기술이 적게 필요한 장점을 가지고 있어 이미 국내에서는 배추과 채소 품종육성에 실용화된 기술임. 국내에서 개발된 나출 소포자 배양기술은 전처리 온도, 배지조성 및 조건, 기간, inducer chemical 처리, 재분화 환경조건 등 다양한 연구를 수행하였음(Park et al., 2005; Kim et al., 2008). 현재 소포자 배양이 다양한 작물에서 수행되고 있으나 효율은 매우 낮은 편임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 고추 주요 형질 연관 분자마커 개발

1. 역병 저항성 QTL 연관 분자표지 개발

전세계적으로 고추 생산량 감소에 가장 큰 요인이 되는 역병의 경우 5번 염색체에 주동 유전자가 존재하며 타 지역에는 minor QTL이 존재하는 형태의 QTL 유전 양상을 나타내는 것으로 분석되었으며 주동 유전자좌에 대한 분자마커가 개발된 바 있음. 그러나 다양한 계통에서 높은 정확도를 지닌 분자마커 개발이 이루어지지 않았으므로 주동 유전자 연관 분자마커를 추가적으로 개발할 필요가 있으며 보다 안정적인 저항성의 확립을 위해 필요한 기타 minor QTL에 대한 분자마커 개발도 추진되어야 함.

가. 역병 저항성 분자마커 개발을 위한 집단 육성

(1) 역병 저항성 분자마커 개발을 위한 기초 분리집단 육성(제 1차년도)

역병의 경우 기존 연구에서 육성한 YCM334 X Tean RIL 집단을 이용하여 5번 염색체에 위치한 major QTL 연관 분자마커를 개선하였음. 뿐만 아니라 역병 저항성에 대한 보다 정확한 예측을 위하여 다른 염색체에 위치한 minor QTL 연관 분자마커를 개발하고자 함. 이를 위하여 저항성 계통인 CM334와 이병성 계통인 ECW를 교배하여 F2 종자를 확보하였음(표 1).

표 1. 역병 저항성 연관 분자마커 분석 결과와 역병 집중 결과 비교

마커검정결과	Phyto-7.2		PhytoSNP5	
	저항성	이병성	저항성	이병성
저항성 (동형집합)	0	0	1	0
저항성 (이형집합)	56	2	56	1
이병성	5	37	4	38

음영된 값은 분자마커 분석 결과와 집중 결과가 일치하지 않는 품종의 개수. 발병률 50%이상을 저항성, 미만을 이병성으로 표기

(2) 역병 저항성 major QTL 연관마커 개발을 위한 NIL 집단 육성(제 2차년도)

1차년도 연구에서 개발한 major QTL 연관 마커 및 BioMark HD system을 활용하여 MAB를 수행함. Background 선발마커를 활용하여 (YCM334 x 태안 재래) x 태안 재래 BC1F1 중 역병 저항성 major QTL과 태안 재래의 유전적 배경을 지닌 near isogenic line (NIL)을 선발하여 육성 하였음(그림 1). NIL은 major QTL의 fine-mapping 수행을 통해 최종적으로 역병 저항성 유전자를 동정하는데 활용하고자 하였음.

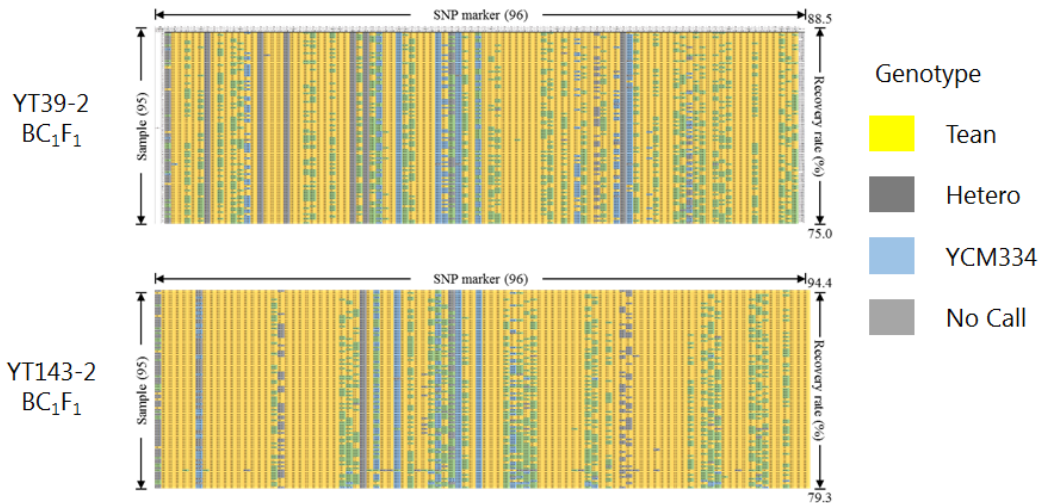


그림 1 MAB 분자마커를 활용하여 선발한 역병 저항성 BC1F1 계통의 유전형 분석 결과

(3) 역병 저항성 major QTL 연관마커 개발을 위한 NIL 집단 육성(제 3차년도)

기존 연구에서 육성된 YT RIL (YCM334 X Tean) 집단과 Tean을 부모로 하여 5번 염색체의 major QTL을 제외한 염색체 부분이 Tean으로 가장 많이 회복된 YT NIL 143-2 및 YT NIL 39-2, 두 개의 NIL 집단을 구축하였음(그림 3). 이 중 YT NIL 39-2는 현재 BC2F2 세대까지 진전되었으며, 추후 역병 검정을 통해 역병 저항성 major QTL의 정확한 위치를 탐색하고자 하였음.

또한 기존 역병 저항성 연구에 활용하였던 ECW30R X CM334 F2 집단을 RIL 집단 구축을 위해 F5 세대까지 진전시켰음. 고추 염색체 5번에 존재하는 분자마커를 이용해 ECW30R X CM334 F4 집단의 유전형 분석을 마치고, F5 집단의 역병 검정을 통해 major 및 minor QTL의 정확한 위치를 탐색하고자 하였음.

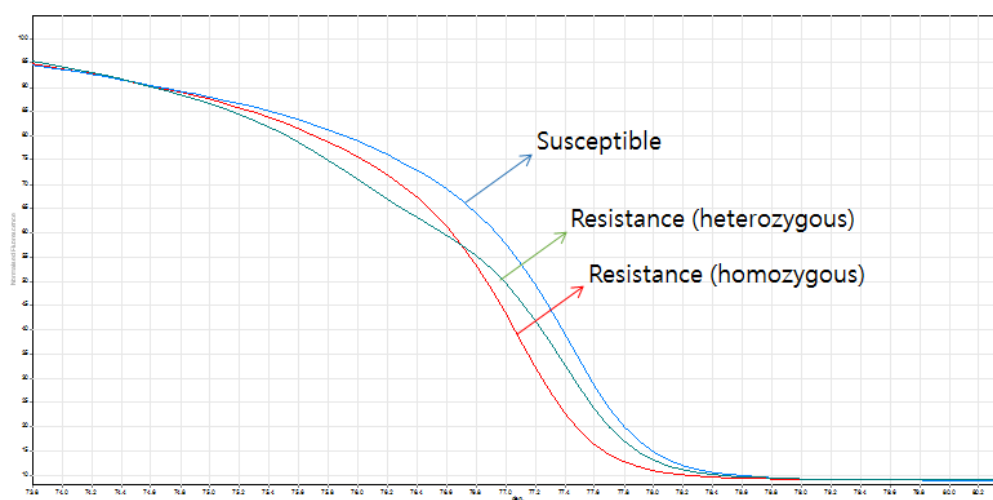


그림 2 새롭게 개발한 역병 major QTL 분자마커 검정 결과. 저항성 YCM334와 이병성 태안재래, 이형접합체의 HRM 분석 결과를 나타냄

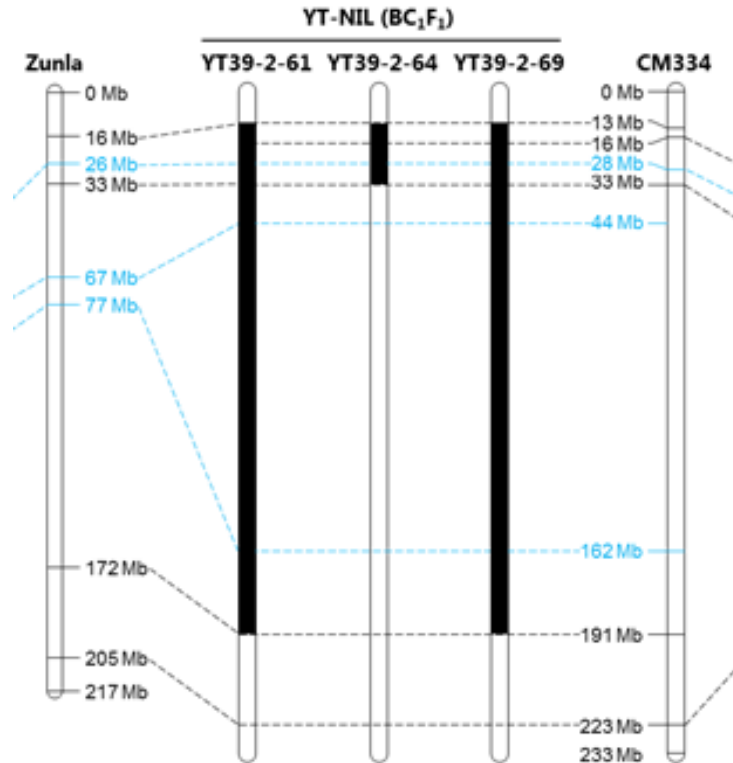


그림 3 YT NIL 39-2 BC1F1의 염색체 모식도 및 물리적 지도 상 위치. 검은색이 YCM334의 유전형, 흰색이 Tean의 유전형을 나타냄.

(4) 역병 저항성 major QTL 연관마커 개발을 위한 NIL 집단 육성(제 4차년도)

ECW30R X CM334 F6 세대를 진전시켜 F7 세대를 확보하였으며, F7 세대의 종자는 태국에서 shuttle breeding을 통해 F8 세대로 진전시키는 중임. 고추 염색체 5번에 존재하는 분자마커를 이용하여 다시 F6 집단의 유전형 분석을 재검정하였으며, 이를 역병 저항성 연구 및 선충 저항성 연구에 추가적으로 사용할 수 있을 것으로 예상함.

나. 역병 저항성 QTL 연관 분자마커 개발

(1) 역병 저항성 major QTL 연관 분자마커 개발(제 1차년도)

선행 연구에서 고추 염색체 5번에 위치하는 major QTL 연관 마커가 개발된 바 있음. 그러나 이 마커는 HRM을 기반으로 분석이 가능한 마커로 반응조건에 따라 다소 변이가 있었음. 본 연구에서는 기존 연구에서 확인된 SNP 중 특이성이 가장 높은, 즉 하나의 단편만을 증폭시킬 수 있는 프라이머 조합을 작성하여 추가적으로 마커를 더 개발하였음(그림 2). YCM334 X 태안재래 RIL 집단에 적용한 결과 143개 계통 중 15개 계통을 제외하고 모두 유전형과 표현형이 일치하였음. 또한 이 마커를 상용화된 F1 품종에 적용해보았는데, 기 개발된 마커와 유사한 교차율을 보였음 (표 1). 즉, RIL 집단과 F1 품종 적용 결과 새롭게 개발된 분자마커는 기 개발 마커와 비교했을 때 QTL과의 거리를 좁히지는 못했지만 특이성이 높아졌기에 서비스 가능한 마커로 더욱 적합하다고 판단함. 차기 년도에는 본 연구에서

개발된 major QTL 마커들과 background 선발마커를 활용하여 NIL 계통을 육성하고 이들 간 교배를 통하여 보다 정확한 QTL의 위치를 밝히고자 하였음.

(2) 역병 저항성 유전분석을 위한 병저항성 검정(제 2차년도)

역병 저항성이 분리되는지를 알아보기 위하여 ECW30R, CM334 및 F2 집단의 병저항성 검정을 수행함. CM334는 저항성, ECW30R는 이병성, F2에서는 저항성, 중도저항성, 이병성이 분리되는 양상을 확인함(표 2). 따라서 제2세부과제와 협력하여 ECW x CM334 F1의 DH 집단을 구축하고 있음. 제2세부과제에서 정립한 약배양 기술을 활용할 예정이며, DH 집단을 구축한 후에는 GBS를 통해 유전형 분석을 수행할 것임. 이후 추가적인 QTL을 찾고, 분자마커를 개발할 하고자 하였음.

표 2 ECW x CM334 F2 집단의 역병 저항성 검정 결과

	반응	개체 수		
		ECW30R	CM334	F2
접종 후 7일	저항성(R)	0	3	88
	중도저항성(MR)	0	0	24
	이병성(S)	10	0	99
접종 후 16일	저항성(R)	0	3	76
	중도저항성(MR)	0	0	17
	이병성(S)	10	0	118
총 개체 수		10	3	211

(6) 역병 major QTL 연관 분자마커 개발(제 3차년도)

역병 저항성 고추 상용 품종 100개체에서 4개의 병원성이 다른 역병균을 통해 역병 검정을 수행한 결과, 병원균의 병원성 정도에 따라 각각 다른 분자마커의 유전형과 병 저항성 간 상관관계가 달라지는 것을 관찰함. 병원성이 낮은 MY-1 병원균의 경우 2차년도에 개발한 Phyto5NBS1의 유전형과 높은 상관관계를 보였지만, 병원성이 높은 KPC-7 병원균의 경우 5번 염색체에 위치한 다른 분자마커(PEPSNP-PH-05-028, PEPSNP-PH-05-005) 두 개의 유전형이 역병 저항성과 더 높은 상관관계를 갖는 것으로 관찰됨(표 3). 이는 2차년도에 실시된 ECW30R x CM334 F2 집단의 QTL 탐색 결과의 7일째, 16일째 역병 검정 결과 관찰되는 역병 저항성 표현형과 상관관계를 보임(그림 5). 따라서 이 분자마커 세 개를 기준으로 ECW X CM334 F5 RIL 집단을 분류하였고(그림 5), 이 분류를 기준으로 역병 저항성 검정 결과를 정리하여 역병 major 및 minor QTL을 탐색하고자 하였음.

표 3 100개의 역병 저항성 상용 품종에 대한 고추 염색체 5번 마커 검정 결과.

Marker name	% genotype matched with phenotype*			
	MY-1	KPC-1	JHAI-7	KPC-7
Phyto5NBS1	91	76	73	54
PEPSNP-PH-05-028	91	74	77	88
PEPSNP-PH-05-005	64	69	68	81

병원성 정도
Low
병원성 정도
High

*는 고추 염색체 5번 마커 검정 결과가 저항성으로 나온 %를 의미함.

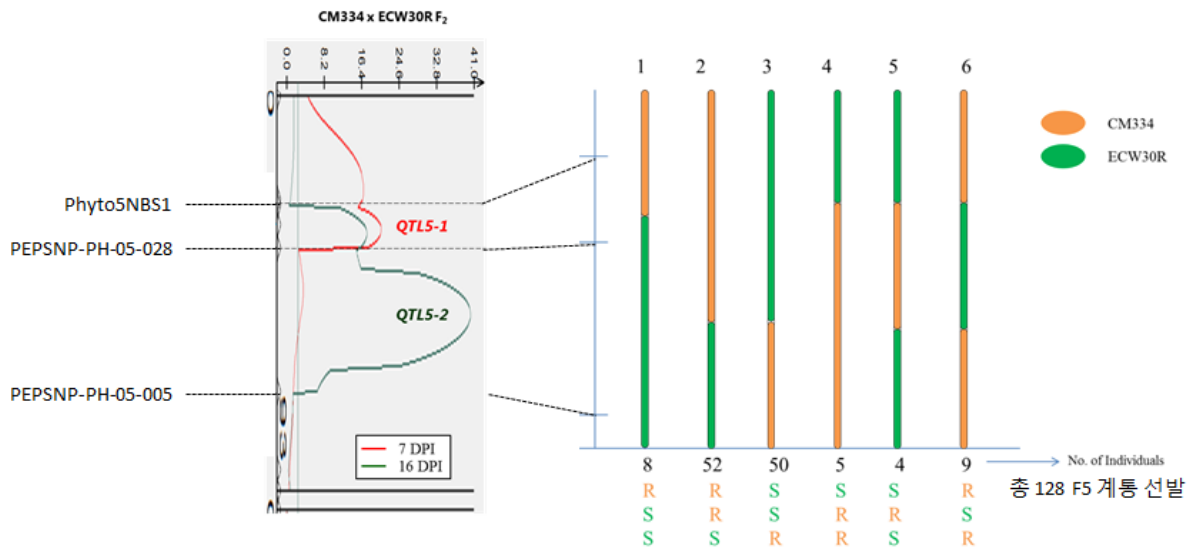


그림 5 고추 염색체 5번에 위치한 마커(Phyto5NBS1, PEPSNP-PH-05-028, PEPSNP-PH-05-005)와 ECW30R X CM334 F2 집단의 집종 후 7일째, 16일째 표현형 검정 결과. 이 QTL 분석을 이용하여 세 마커의 유전형 검정 결과 기준으로 분류한 128개의 ECW30R X CM334 F5 RIL 집단.

(7) 역병 major 및 minor QTL 연관 분자마커 개발(제 4차년도)

병원균의 병원성 정도에 따라 유전양상이 달라짐을 관찰하였으므로, 국내에서 발견된 병원성 정도가 강한 KPC-7 균주와 태국에서 발견된 중간 정도의 병원성을 갖는 PEP 균주 두 개를 이용해 ECW30R X CM334 RIL 집단에서 역병 저항성 검정을 수행하였음. ECW30R X CM334 RIL 집단의 경우 앞서 major QTL 부근 3개의 분자마커로 검정하여 분류된 128개의 개체를 사용하였고, GBS 방법을 이용하여 유전형을 분석하였음. 유전형 분석과 병 저항성 검정 결과를 합쳐 QTL을 분석한 결과 두 균주 모두에서 염색체 5번의 major QTL이 탐색되었으며, 유전적으로도 동일한 부분임이 확인되었음. 또한, 염색체 3번에서 두 균주 모두 minor QTL이 탐색되었으며, 강한 병원성을 가지는 KPC-7의 경우에 염색체 1번에서 minor QTL이 탐색되었음(표 4).

표 4 ECW30R X CM334 RIL 집단의 역병 저항성 QTL

<i>P. capsici</i> isolate	Chromosome	Position (cM)	LOD	R2 (%) ^c	Additive effect	Dominant effect
PEP	3	92.21	3	5	0.24	0
	5	27.21	9	32	0.7	0
KPC-7	1	87.31	5	8	0.34	0
	3	83.21	3.2	6	0.31	0
	5	32.31	15.2	44	1.04	0

2. 흰가루병 저항성 QTL 연관 분자표지 개발

시설 재배에서 큰 문제로 부각되는 병해로는 흰가루병이 있는데 병해의 원인이 되는 *Leveillula taurica*의 경우 순 활물기생균으로서 접촉에 의한 병의 유발과 저항성 검정이 힘들기 때문에 도입 시 분자마커 활용이 크게 요구된다는 특성이 있음.

가. 흰가루병 저항성 분자마커 개발을 위한 집단 육성

(1) 흰가루병 저항성 분자마커 개발을 위한 F1 교배 조합 확보(제 1차년도)

흰가루병은 선행연구로부터 major QTL에 연관된 분자마커가 개발된 바 있음. 본 연구진은 추가적인 minor QTL을 탐색하여 흰가루병 저항성 육종에 사용하기 위해 집단을 구축함. 먼저, 흰가루병 저항성 F1 상용품종인 PM신강을 자가교배한 F2 집단을 구축하고, 이 집단을 이용해 흰가루병 검정을 한국화학연구원(KRICT)에서 수행하였음. 하지만 부모 계통의 유전형 및 표현형 정보를 보유하고 있지 않아 유전자 탐색 및 연관 분자마커 개발에 한계를 지니므로 흰가루병 저항성 계통인 VK515R과 이병성 계통인 VK515S를 교배하여 VK515R X VK515S F1 종자 60립을 확보함.

(2) 흰가루병 저항성 분자마커 개발을 위한 F2 집단 확보(제 2차년도)

흰가루병 저항성 계통인 VK515R과 이병성 계통인 VK515S를 교배한 F1으로부터 F2 집단을 육성함. 부모 계통과 F1의 병저항성을 검정한 결과 VK515R과 VK515S는 각각 저항성, 이병성이었음(그림 6). 이 두 품종을 이용해 F1 개체를 자가수정하여 흰가루병 저항성이 분리되는 F2 집단을 구축하였음.

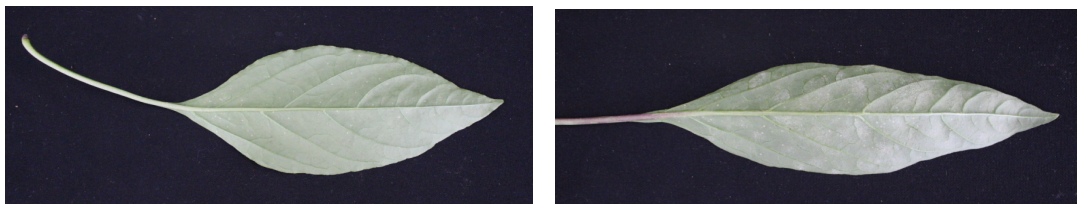


그림 6 VK515R(좌) 및 VK515S(우)의 흰가루병 저항성 검정 결과

나. 흰가루병 저항성 유전양식 구명 및 분자마커 개발

(1) 흰가루병 저항성 유전양식 구명(제 3차년도)

PM신강 F2 집단 83 개체 및 VK515R X VK515S F2 85 개체로부터 유래된 F2:3 집단을 최종적으로 확보하였음. 감염된 잎을 통해 자연발병을 유도함으로써 이 두 집단에서 흰가루병 검정을 수행하였음. 자연발병으로 유도된 결과와 2차년도에 한국화학연구원에서 관찰된 유전양상을 통해 PM신강 F2 집단과 VK515R X VK515S F2 집단에서 흰가루병 저항성 형질은 QTL이 아닌 단일 우성유전자에 의한 유전 양상을 확인하였음(표 5).

표 5 흰가루병 저항성 유전양식 구명 결과

	개체수	저항성	이병성
PM신강	21	21	0
부강	21	0	21
PM신강 F2	168	127	41
VK515R X VK515S F2*	85	62	23

* F2:3 85 계통 853 개체의 병리검정을 통해 F2 집단의 저항성 유전형질을 추정하였음

(2) 흰가루병 저항성 분자마커 개발(제 3차년도)

앞서 구축하였던 PM신강 F2 85개체와 VK515 F2 102 개체 및 이의 F3 집단을 유전자 지도 작성에 이용하였으며, 기개발된 고추 유전자 지도(Kang et al., 2014)를 Fluidigm®EP1™system (Fluidigm사, 샌프란시스코, 미국)을 사용하여 *PMR1* 유전자가 염색체 4번내에 존재하는 것으로 밝혀내었음(그림 7). *PMR1* 유전자는 KS21061G15와 CAPS_CONTIG.12621과 순서대로 연관되어있었고, 각각 0 cM과 24.8 cM의 유전적 거리를 가지고 있었으며, 추가적으로 표준유전체 정보 (CM334, Zunla)를 이용해 연관 분자마커 ZL1826, CZ2_11628 및 HZ1_11658을 개발하였음(그림 8).

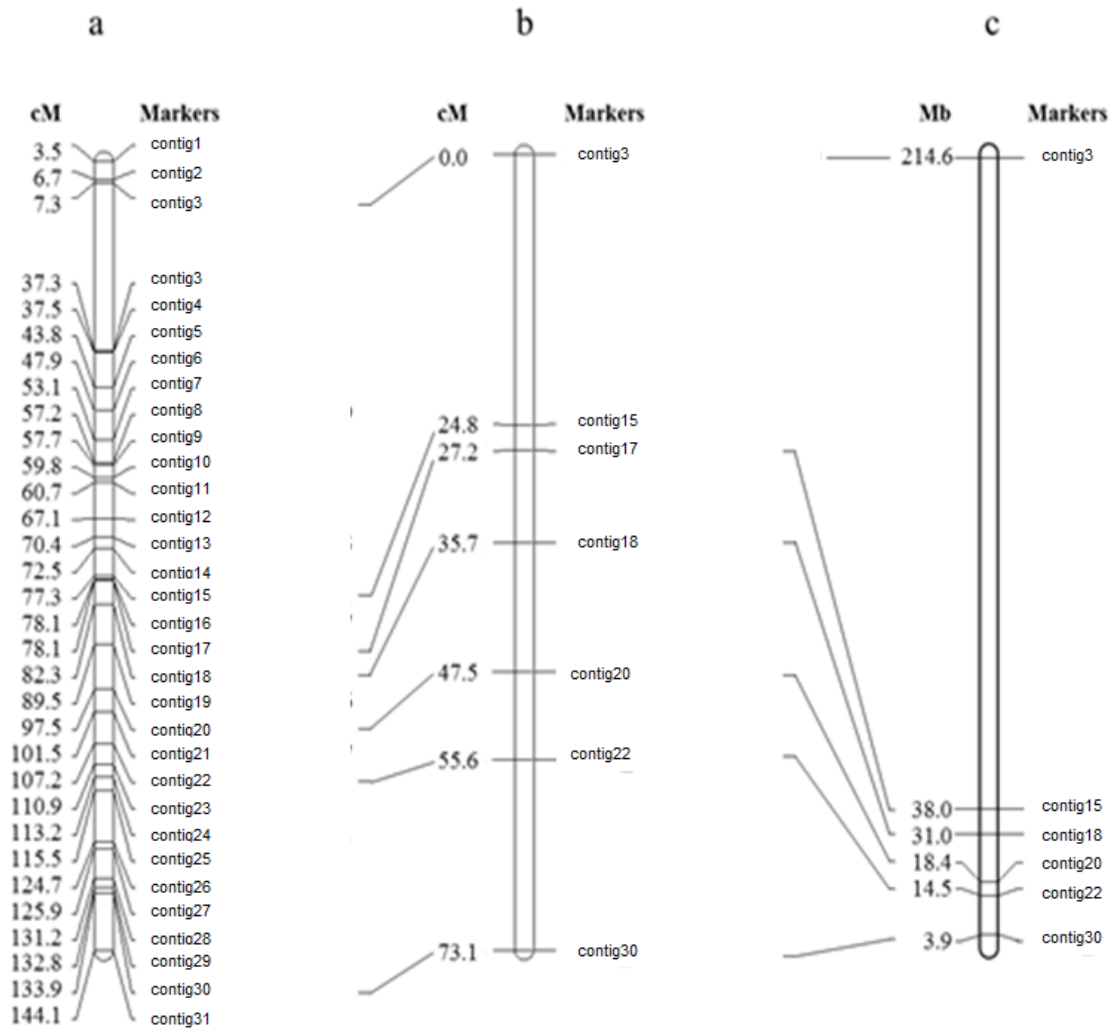


그림 7 Fluidigm EP1 system을 이용한 PMR1 유전자 지도

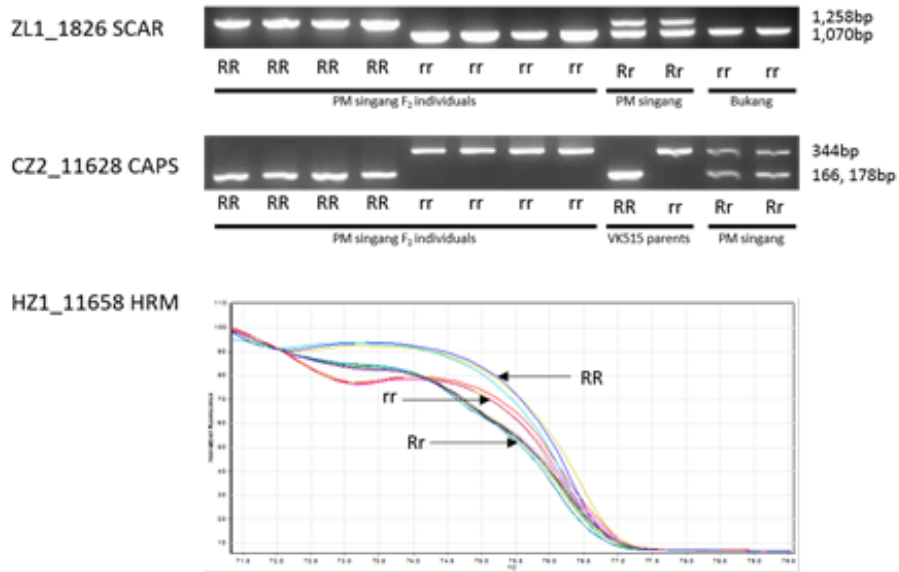


그림 8 흰가루병 저항성 유전자 연관 분자마커 분석 결과

(3) 흰가루병 저항성 분자마커 개발(제 4차년도)

고추 표준유전체 정보(CM334, Zunla)와 PM신강 F2 85개체와 VK515R X VK515S F2 102 개체 및 이의 F3 집단을 이용하여 물리적으로 PMR1 유전자 위치와 가까운 분자마커 6 개를 추가적으로 개발하였음(그림 9). 그러나 이 분자마커를 PM신강과 VK515R X VK515S F2 집단에 적용하였을 때 유전적 거리를 좁히지 못 하였음(그림 9).

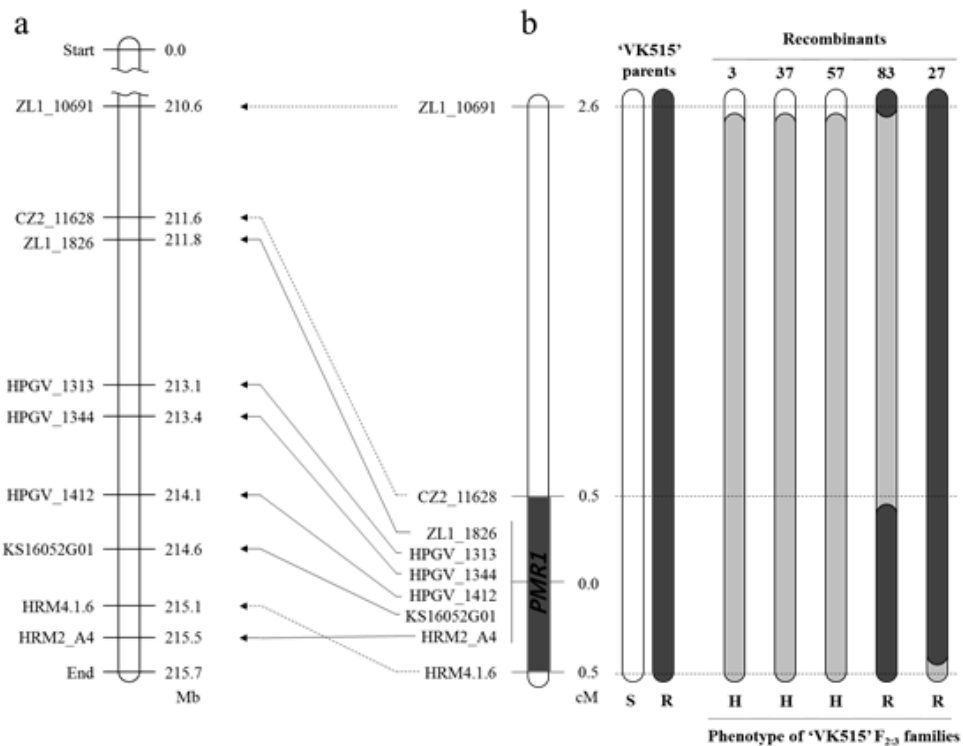


그림 9 VK515 집단 유전자 지도와 Zunla 물리적 지도의 비교

유전적 거리를 좁히기 어려운 이유를 알아보기 위하여 분자마커의 서열정보를 *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* 유전체 정보에 각각 BLAST를 수행하고, 여기서 얻은 SNP 정보를 이용하여 phylogenetic tree를 구축하였음. 그 결과 VK515R에 존재하는 *PMR1* 구간은 *C. baccatum*으로부터 유래되었을 것으로 추측되며, 이로 인해 *PMR1* 구간이 교차 현상이 억제됨으로써 유전적 거리를 좁히기 어려운 것으로 판단됨(그림 10).

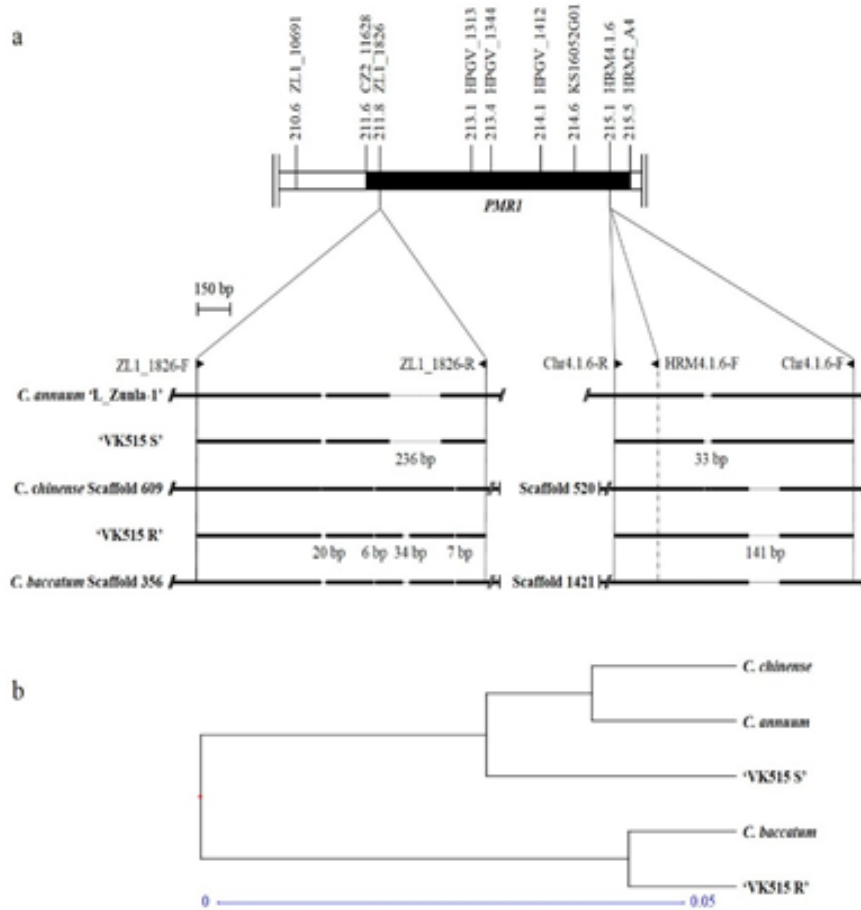


그림 10 VK515R, VK515S의 BLAST 결과와 이를 토대로 구축한 phylogenetic tree

3. 뿌리혹선충 저항성 유전자 연관 분자마커 개발

토양 연작 재배 시 큰 문제가 되는 뿌리혹선충 저항성에 연관되어 있는 분자마커도 해외 연구를 통해 개발된 바 있으나 국내에서 품종 육성에 활용되고 있지 않음. 또한 기개발된 해외 분자마커의 경우 약 3cM 이상으로 유전적 거리가 멀기 때문에, 이를 좁히기 위해 뿌리혹선충 저항성 유전자 연관 분자마커 개발이 필요함.

가. 뿌리혹선충 저항성 분리집단 작성 및 병리검정 수행

(1) 뿌리혹선충 저항성 분자마커 개발을 위한 분리집단 작성(제 1차년도)

뿌리혹선충의 경우 고추의 토양 재배 시 큰 피해를 입히는 병으로, 뿌리혹선충 저항성은 2개의 우성 유전자에 의해 조절되는 것으로 확인되었음. 본 연구실에서는 저항성 계통 CM334와 이병성 계통 ECW을 교배하여 500립 이상의 F2 종자를 확보하였음. 이 집단은 역병저항성 마커 개발에도 활용할 예정이며, MAGIC 집단 작성 시 두 개 계통으로 역병 및 뿌리혹선충 저항성 연구가 가능하다는 장점이 있음. 현재 부모 계통인 CM334, ECW 및 F2 개체의 뿌리혹선충 저항성을 검정 중임.

(2) 뿌리혹선충 저항성 분자마커 개발(제 2차년도)

부모 계통 및 F2 집단의 뿌리혹선충 저항성 검정을 수행하였음. 총 305 F2 개체의 검정을 수행한 결과 저항성, 이병성 개체가 230:75로 나타나 3:1의 분리비(P -value=0.87)로 단일 유전자에 의한 저항성 반응임을 확인함(표 6). *Me7* 유전자와 탐색을 위하여 기존에 다른 교배 조합으로부터 개발한 *Me7* 유전자와 1.5 cM, 4.8 cM 떨어진 분자마커를 활용하여 F2 집단의 유전형질을 분석함. 그 결과 *Me7*와 가깝게 연관된 것으로 알려졌던 SCAR_PM6a 분자마커의 경우 ECW x CM334 F2 집단에서는 2.7 cM, SCAR_CD 마커의 경우 19 cM이 떨어진 것으로 나와 기존 연구에서 개발한 분자마커가 집단 특이적으로 적용된다고 판단함. 추후에 연관된 scaffold 서열 정보 등을 바탕으로 추가적인 분자마커 개발을 수행하고, 유전자 지역의 fine-mapping을 진행할 예정임.

표 6 ECW x CM334 F2 집단의 뿌리혹선충 저항성 검정 결과

	ECW	CM334	F2
저항성 개체 (평균 난당수)	-	8 (0)	230 (0.2)
이병성 개체 (평균 난당수)	18 (132)	-	75 (127)

나. NGS 기반 뿌리혹선충 저항성 분자마커 개발

(1) NGS 기술 이용 뿌리혹선충 저항성 분자마커 개발(제 3차년도)

먼저 고추 9번 염색체 내 *Me7* 유전자 탐색을 위하여, 앞서 구축한 ECW30R X CM334 저항성 및 이병성 F2 bulk 집단, 부모 집단을 이용하여 resistance gene enrichment sequencing (RenSeq)을 수행하였음. RenSeq 수행을 위해 고추 표준 유전체로부터 예측된

755개의 NB-LRR 유전자를 reference로 삼았으며(<http://peppergenome.snu.ac.kr>), 이를 통해 120mer의 biat을 만들어 부모 집단 및 F2 bulk 집단에 annealing이 되는 NB-LRR 유전자만 선발한 후에 Illumina HiSeq 2000을 통해 염기서열 분석을 수행하였음. 그 결과 총 13개의 *Me7* 후보 유전자에서 저항성 및 이병성 간 SNP를 탐색할 수 있었음(표 7). 또한 고추 표준 유전체 정보를 활용하여 고추 염색체 9번 말단 지역에서 기개발 분자마커보다 유전적 거리가 가까운 SNP 마커 HRM_Me7-748b를 개발하였고, 이의 물리적 위치를 통해 표준 유전체 상에서 *Bs2* 유전자가 속한 고추 9번 염색체 말단 NB-LRR cluster 지역에 *Me7* 유전자가 위치하는 것을 확인하였음(그림 11).

표 7 RenSeq을 통해 탐색된 Me7 유전자 후보와 탐색된 SNP 정보

No.	Gene	POS	ID	REF	ALT
1	Gene 1	568	.	C	A
		703	.	G	A
		994	.	G	A
2	Gene 2	642	.	T	G
		715	.	G	A
3	Gene 3	691	.	G	A
4	Gene 4	2697	.	T	G
5	Gene 5	280	.	G	A
6	Gene 6	2116	.	A	G
7	Gene 7	234	.	T	G
		623	.	A	G
8	Gene 8	750	.	C	T
		29	.	G	T
9	Gene 9	30	.	T	G
		165	.	C	T
10	Gene 10	165	.	C	T
11	Gene 11	1037	.	G	A
12	Gene 12	432	.	A	C
		531	.	A	G
13	Gene 13	909	.	A	C

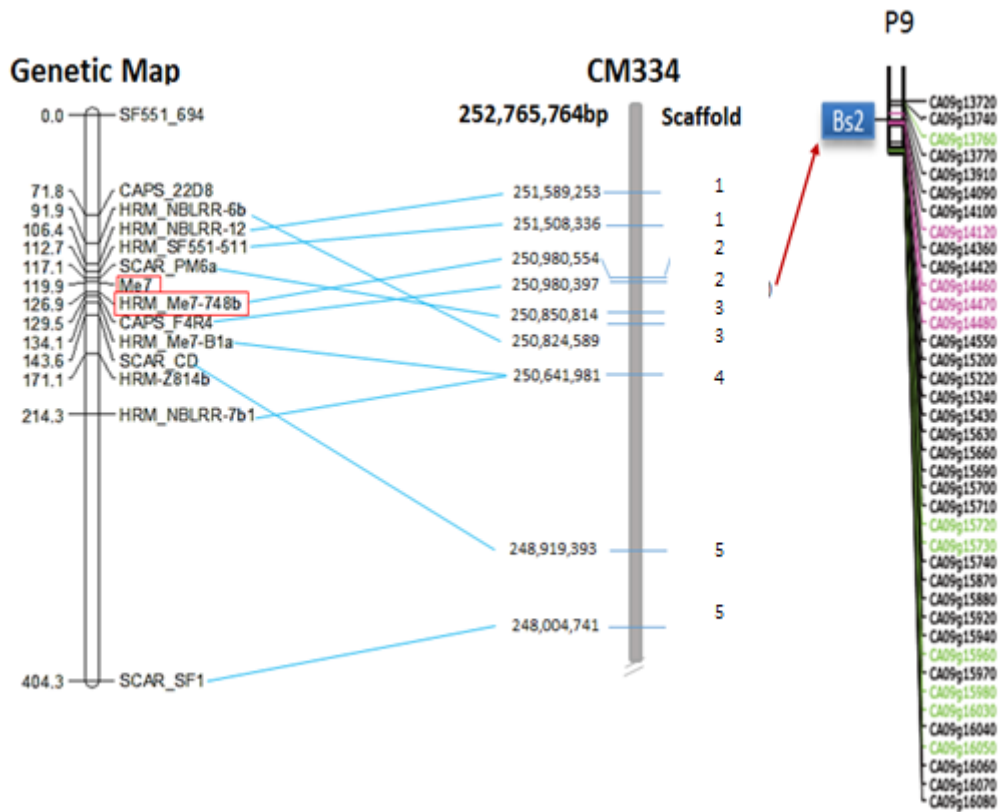


그림 11 고추 표준 유전체 정보를 활용하여 개발된 분자마커의 물리적, 유전자적 지도

(2) 뿌리혹선충 저항성 분자마커 개발(제 4차년도)

ECW30R X CM334 F2 집단 660 개체를 뿌리혹선충 검정을 통해 최종 12개의 재조합 개체를 선별하였고, 기개발된 분자마커(SCAR-SF15-1)와 고추 표준유전체지도(CM334), RenSeq 결과를 이용하여 연관된 분자마커를 개발하고(HRM-SF1-3, HRMCaM09, HRM_SF2-1, HRMSF2-1, HRM-NBLRR7), *Me7* 구간을 유전적으로 좁힐 수 있었음(그림 12).

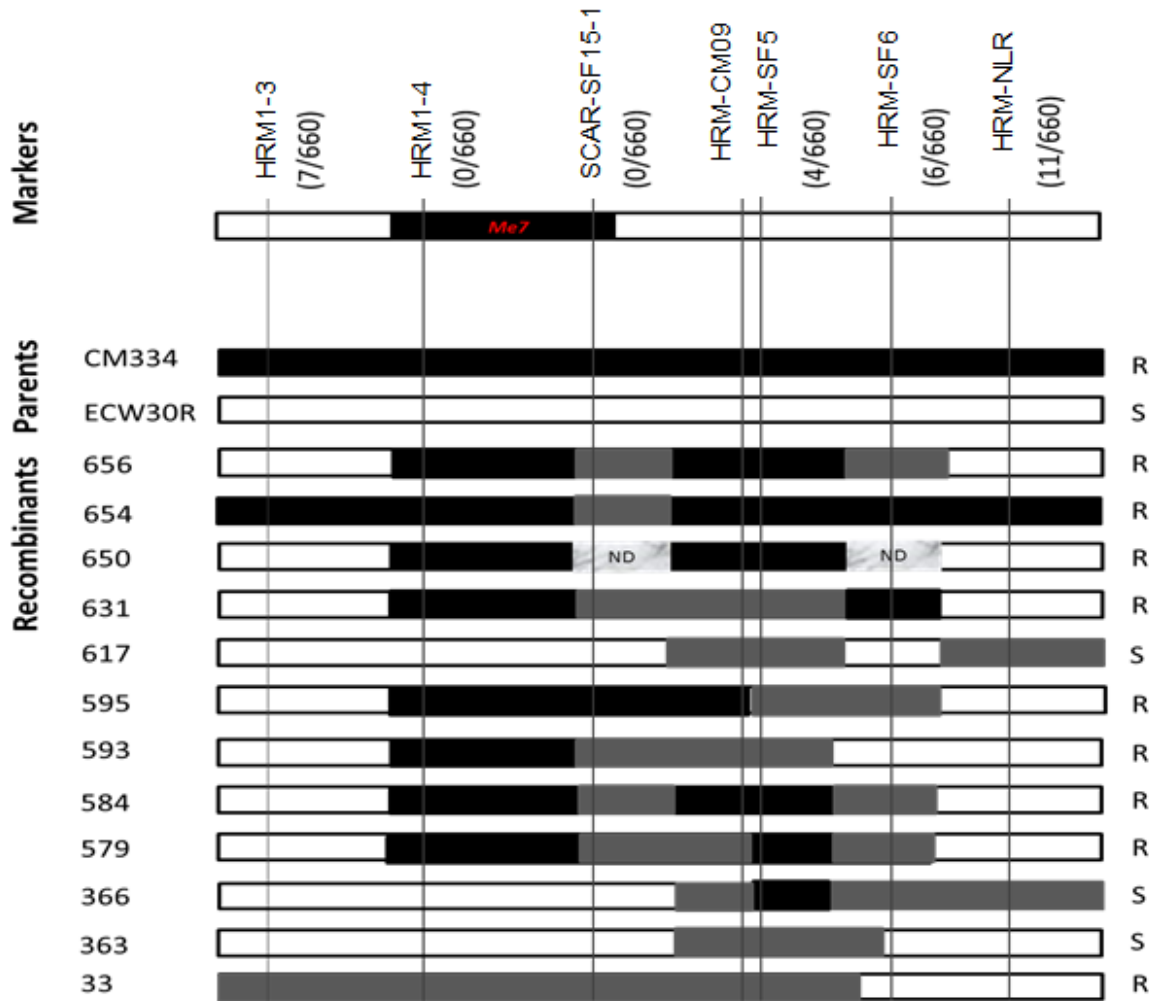


그림 12 뿌리혹선충 저항성 유전자 연관 분자마커의 유전자 지도와 재조합 개체

그러나 *Me7* 유전자가 고추 염색체 9번의 NB-LRR 밀집 지역에 위치하여 단일 PCR fragment를 갖는 분자마커 개발이 어려웠음. 이를 극복하기 위해 기존에 보유하고 있던 고추 CM334 BAC clone을 이용하여 chromosome walking을 수행하였음(그림 13)(Yoo et al., 2003). 총 11개의 BAC clone을 *Me7* 유전자 구간에서 탐색할 수 있었으며(그림 13), 이 BAC 통해 HRM-SF1-3 분자마커의 물리적 위치로부터 *Me7* 유전자와 더 가깝게 연관된 HRM-BAC1-4 분자마커를 개발하였음(그림 12). 이 중 *Me7* 지역을 포함한 3개의 BAC clone을 PacBio로 분석 중임.

4. 신미 함량 조절 QTL 연관 분자표지 개발

고추의 경우 기존 연구를 통해 신미 유무를 결정하는 유전자인 *CS*가 동정되었고 분자마커도 개발된 바 있으나 신미의 정도의 경우에는 QTL로 유전되는 것으로 알려져 있음. 고추의 신미의 정도는 고추의 상품성에 있어서 핵심적인 요소이므로 QTL에 대한 추가 연구 및 주요 QTL에 대한 분자마커 개발이 이루어질 필요성이 있음.

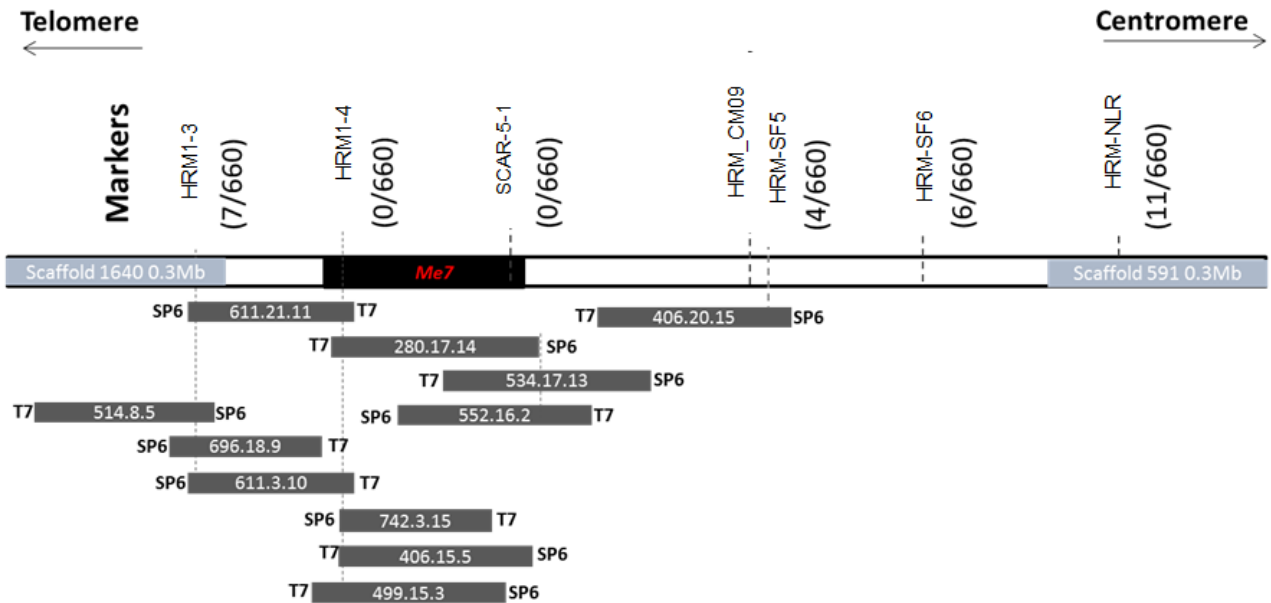


그림 13 Chromosome walking을 수행하여 탐색된 Me7 유전자 부근 11개 BAC clone의 물리적 위치

가. TF68 X Habanero RIL 집단 관련 연구

(1) TF68 X Habanero의 캡사이시노이드 함량 측정

고추의 신미는 캡사이시노이드 함량에 의해 조절되는 주요한 품질 결정 요인임. 양적 형질으로 다수의 QTL에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며, 본 연구진은 선행 연구를 통해 신미 함량이 분리되는 TF68 (*C. annuum*) x Habanero (*C. chinense*) RIL 집단을 육성하였음. 1차년도에는 TF68 x Habanero RIL 집단의 과실을 수확하고, 캡사이시노이드를 합성하는 태좌만을 분리하였음. 이후 태좌의 신미 함량을 HPLC 분석을 통해 측정함. RIL 집단의 캡사이시노이드 함량은 7-151,726 ug/gDW 에 분포하였으며, 고신미 계통인 Habanero보다 높은 함량을 지니는 초월분리현상을 보였음(그림 14).

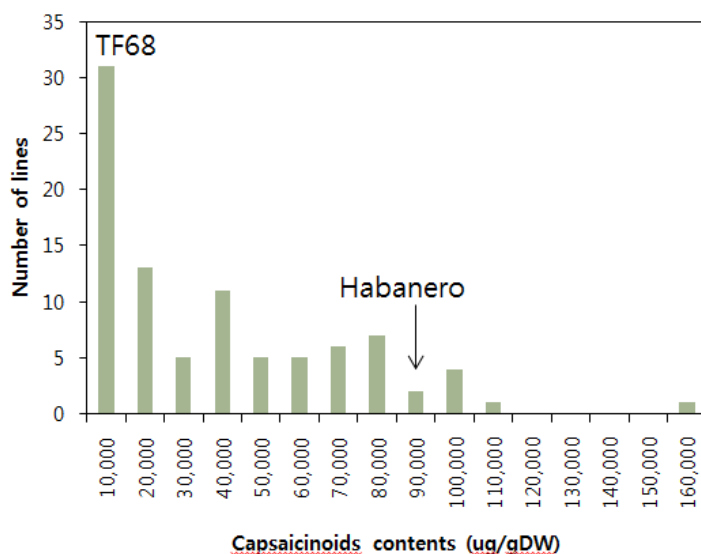


그림 14 TF68 x Habanero RIL집단의 캡사이시노이드 함량

(2) 신미 함량 조절 QTL 관련 유전형 분석 및 유전자 지도 작성(제 2차년도)

2차년도에는 RIL 집단의 유전형 분석 및 유전자 지도 작성을 수행함. TF68 x Habanero RIL 집단은 GBS를 통해 유전형을 분석함. Library 제작 시에는 염기서열 분석의 복잡성을 낮추고 신뢰도 높은 SNP를 충분히 확보하기 위하여 선발염기 GA가 결합된 *MseI* primer를 활용함. 선발염기의 사용은 library 제작 시 증폭되는 유전적 위치를 감소시킴으로써 염기서열 분석 심도(depth)를 높이는 것으로 알려져 있음(Sonah et al, 2013). RIL집단 적용에 앞서 총 7가지의 선발 염기(AG, CC, GA, GC, GT, TA, TC) 중 GA가 TF68과 Habanero 사이에 가장 많은 SNP를 도출한다는 것을 확인함. 선발염기 GA를 사용하여 library를 제작하고, Illumina Hiseq2000을 이용해 염기서열 분석을 수행한 이후, SNP 탐색은 당해에 구축한 pipeline을 활용하였음. TF68과 Habanero 사이에 다형성이 있으며, 96개 RIL 개체 중 87개 이상의 개체에서 염기서열 분석이 수행된 SNP만을 선발함. 그 결과 4,509개의 SNP를 탐색하였으며 이 SNP 정보를 활용하여 연관그룹을 작성 중(표 8). 유전자 지도가 작성된 이후에는 1차년도에 분석한 신미 함량 결과와 함께 신미 함량 조절 QTL 분석을 수행할 예정임.

표 8 TF68 x Habanero RIL 집단의 GBS를 이용한 유전형 분석 결과

	TF68 x Habanero RIL
Number of reads	504,065,362
Number of SNPs	4,509
Number of A genotype	251,024
Number of B genotype	160,023
Number of H genotype	20,514

신미 함량은 경우 전체 표현형 변이의 20-30%를 설명할 수 있는 여러 개의 QTL에 의해 조절되며, 환경 및 집단에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있음. 따라서 신미 함량 예측을 위한 분자마커 개발을 위해서는 여러 집단에서 확인한 QTL을 비교하고, 주요한 QTL을 찾을 필요가 있음. 이를 위하여 선행 연구를 통해 확보한 Perennial x Dempsey RIL 집단의 유전형 및 표현형 정보를 활용하고자 함. 캡사이시노이드 함량은 성숙 과실의 태좌를 분리한 후 HPLC를 통해 측정하였으며, 총 세 개의 환경(2011, 2012a, 2012b)에서 반복 측정하여 좀 더 정확한 QTL 분석이 가능함(그림 15).

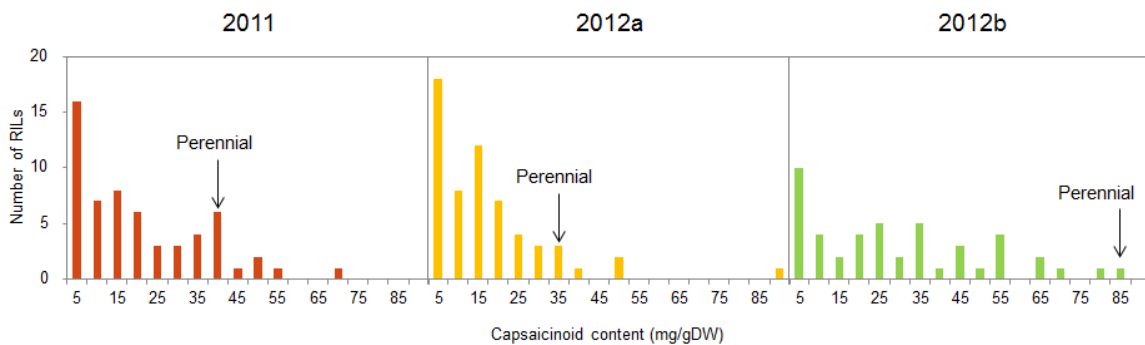


그림 15 선행 연구를 통해 측정한 Perennial x Dempsey RIL 집단의 캡사이시노이드 함량

(3) 신미 함량 조절 QTL 분석(제 3차년도)

전년도 연구를 통해 TF68 (*C. annuum*)과 Habanero (*C. chinense*)를 교배하여 육성한 RIL집단의 GBS를 수행함. 부모와 RIL집단에서 다형성을 보이는 SNP 중 minimum read depth 3 이상이고, QUAL 60 이상인 high-quality SNP 5,829개를 최종 선발함. GBS는 여러 개체에서 제한효소 처리를 통해 확보한 library를 pooling하여 시퀀싱하는 기술로, 전체 개체 SNP가 calling되지 않고 일부 개체에서는 missing data를 갖는 것이 한계로 제시되어 왔음. 따라서 본 연구에서는 sliding window approach(Huang et al., 2009)를 활용하여 missing data가 있는 지역의 유전형을 예측하고, missing data에 의한 오류를 줄일 수 있는 bin map을 작성함. Sliding window approach는 연속되는 15개의 SNP를 하나의 window로 보고, 그 안에서의 모계 및 부계 유전형을 따르는 SNP 비율을 통해 window 내의 유전형을 결정하는 방법임. Window가 계속 옮겨감에 따라 비율이 변하게 되고, 특정 기준을 넘어가는 경우 recombination이 일어나는 지점, 즉 recombination breakpoint로 정의함. 두 개의 recombination breakpoints 사이의 같은 유전형을 지니는 지역을 bin이라 하며, TF68 x Habanero RIL 집단의 유전자 지도는 이와 같은 방식으로 bin map으로 구축함.

나. Perennial X Dempsey RIL 집단 관련 연구

(1) 신미 함량 조절 QTL 관련 유전형 분석 및 유전자 지도 작성(제 2차년도)

Perennial x Dempsey RIL 집단에 대한 3,300개의 SNP를 이용한 초고밀도 유전자 지도를 보유하고 있음. 초고밀도 유전자 지도의 경우 QTL 위치를 정확하게 파악할 수 있다는 장점이 있지만 분석 시간이 길다는 단점이 있음. 따라서 본 과제에서는 분석에 사용하는 분자마커 수를 줄이면서 각 개체의 유전형 정보를 충분히 담고 있는 bin map을 작성함. Sliding window 방법(Huang et al., 2009)을 활용하여 12개 염색체에 대해 총 976개의 bin으로 이루어진 bin map을 구축하였음(그림 16). 각각의 bin은 연관된 여러 개의 SNP 유전형을 대표하는 하나의 분자마커로 활용할 수 있음.

Bin map과 캡사이시노이드 함량 분석 결과를 바탕으로 QTL 분석을 수행함. WinQTLCartographer 2.5의 composite interval mapping (CIM) 기능을 이용하였으며, LOD 2.5 이상인 경우 QTL로 보았음. 분석 결과 총 29개의 QTL이 확인되었으나, 이 중 두 개 이상의 환경에서 공통적으로 확인되는 주요한 QTL은 염색체 6번에 분포하는 것을 확인함. 특히 염색체 6번의 bin 586, bin 591의 경우 각각 전체 표현형 변이의 10-27%, 9-40%를 설명하는 것으로 나타남(표 9).

표 9 Perennial x Dempsey RIL 집단의 bin map 이용 캡사이시노이드 함량 조절 QTL

Chromosome	Position (cM)	Trait	LOD	R ² (%)
1	170.01	CAP11	4.6	20.2
		DICAP11	3.2	13.3
		TOTAL11	3.5	14.6
2	31.01	CAP12a	2.7	9.0
		DICAP12a	2.7	10.0
4	9.01	CAP12a	3.4	11.7
		DICAP12a	4.4	18.0
		TOTAL12a	4.3	16.4
6	123.01	CAP11	2.8	10.5
		CAP12a	5.0	27.2
		CAP12b	3.3	14.5
		DICAP12a	4.3	25.6
		TOTAL12a	3.8	19.0
		TOTAL12b	3.1	10.7
	131.01	CAP12a	8.6	39.8
		DICAP12a	7.9	40.1
		DICAP12b	2.6	9.0
		TOTAL12a	6.6	29.2
		TOTAL12b	3.7	12.4
		TOTAL12b	4.0	13.2
10	15.01	CAP12b	6.0	23.5
		DICAP11	4.8	21.0
		DICAP12b	5.1	19.3
		TOTAL11	5.0	21.1
		TOTAL12b	6.1	23.4

CAP capsacidin, DICAP dihydrocapsaicin, TOTAL total capsaicinoids
11, 12a, 12b capsaicinoid 함량을 측정 한 세 개의 환경

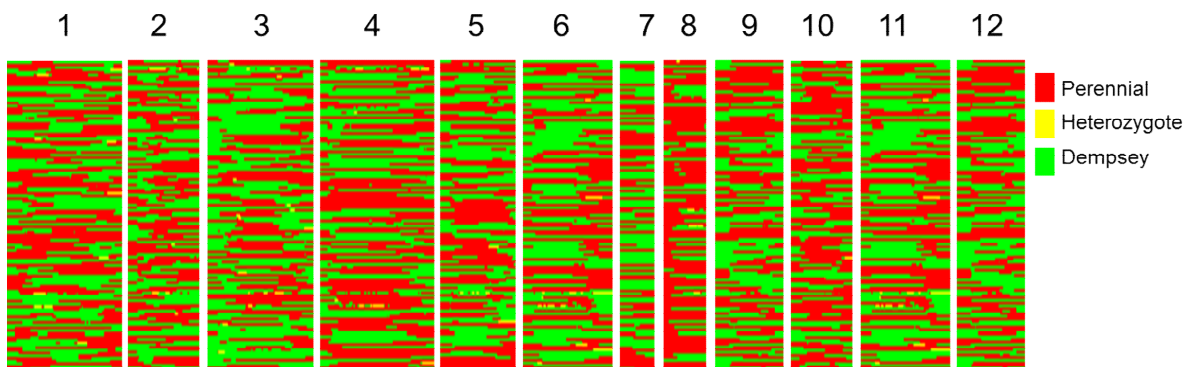


그림 16 신미 함량 조절 QTL 분석을 위해 구축한 Perennial x Dempsey RIL 집단의 bin map

다. TF68 X Habnaero RIL 집단 및 Perennial X Dempsey RIL 집단 비교 분석

(1) Major QTL과 기존 캡사이시노이드 합성 관여 유전자 물리적 위치 비교(제 4차년도)

C. annuum 'Perennial' x *C. annuum* 'Dempsey' RIL 집단(PD RIL)과 *C. annuum* 'TF68' x *C. chinense* 'Habanero' RIL 집단(TH RIL)에서 각각 resequencing 및 GBS를 이용해 작

성된 고밀도 유전자 지도를 상호 비교함. 고추 CM334 표준유전체 서열을 기반으로, 두 집단에서 공통적으로 확인된 QTL을 탐색하고, 이를 major QTL이라 명명함. Major QTL과 기존에 보고된 캡사이시노이드 합성 경로 상에 위치한 유전자의 물리적 위치를 비교함으로써 QTL 분석 결과를 검증함.

(2) 두 집단 간 신미 함량 조절 QTL 분석(제 4차년도)

C. annuum 'Perennial' x *C. annuum* 'Dempsey' RIL 집단(PD RIL)과 *C. annuum* 'TF68' x *C. chinense* 'Habanero' RIL 집단(TH RIL)에서 공통적으로 확인된 QTL은 염색체 1, 2, 3, 10번에 위치함(그림 17). 각 QTL은 전체 캡사이시노이드 함량 변이의 7-29%를 설명할 수 있었으며, 특히 3번 염색체에 위치한 QTL 지역에는 캡사이시노이드 합성에 관여하는 NADH-GOGATc, KasIIIa 유전자가 확인되었음(Mazourek, 2009). 또한 이 QTL은 다른 연구집단에서 확인된 QTL과 같은 물리적 위치에 있어, 다양한 집단에서 공통적으로 확인되는 주요한 QTL임을 알 수 있었음(Ben-Chaim, 2006; Lee, 2016)

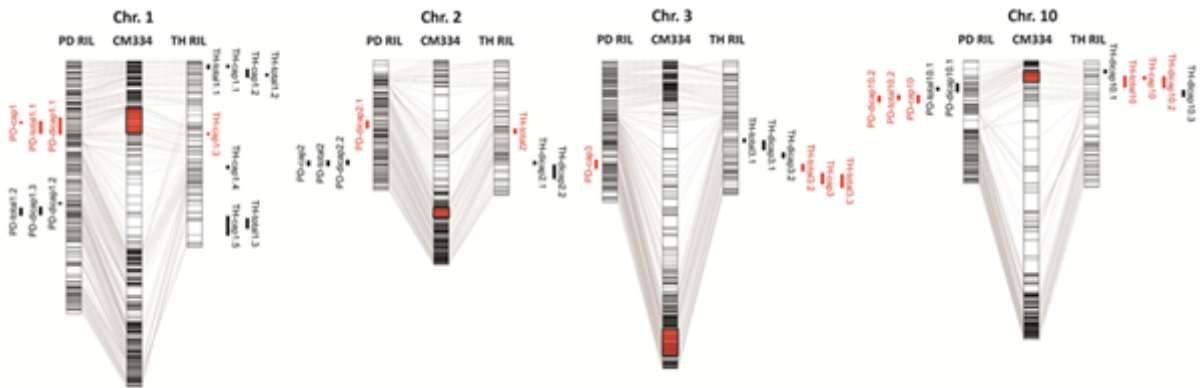


그림 17 PD RIL과 TH RIL에서 공통적으로 확인된 QTL 지역

제 2 절 고추 주요 형질 유전자 기반 분자마커 개발

1. TSWV 저항성 유전자 분자마커 개발

우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 발생지역이 확대되어 나가고 있는 TSWV의 경우 유전자로부터 약 0.9cM의 거리를 나타내는 분자마커가 개발되었음에도 불구하고 이 분자마커를 다양한 저항성 계통에 적용하였을 경우 다형성이 나타나지 않아 적용이 불가능한 경우가 발생하는 것으로 보고된 바 있음. 따라서 유전자 자체 서열의 클로닝 및 이로부터의 분자마커 개발이 요구됨.

가. TSWV 저항성 유전자 *Tsw* 동정

(1) TSWV 저항성 후보 유전자 선별(제 1차년도)

본 연구실에서 수행한 선행 연구를 통해 *Tsw* 저항성 유전자와 0.0cM 거리에 있는 분자마커를 개발하였으며 이를 통해 유전자 위치를 약 295kb로 좁힐 수 있었음. 이 연구는 TSWV 이병성인 Special과 저항성인 PI152225의 중간 교배를 통해 구축한 F2 개체의 스크리닝, CM334의 BAC 염기서열 정보 등을 이용하여 진행하였음. 하지만 CM334 고추의 서열은 *C. annuum*의 서열이고 저항성 유전자는 *C. chinense*인 PI152225에서 유래했기 때문에 금년도 연구에서는 동일한 *C. chinense*에 속하면서 TSWV 저항성을 갖고 있는 *C.*

chinense 'PI159236'의 전장유전체 염기서열을 분석하였음. PI159236의 WGS와 전사체를 이용하여 8개의 NBS-LRR로 예측된 유전자의 유무를 조사함. 8개 NBS-LRR 가운데 7개는 PI159236에서 염기서열이 확인됨(그림 18).

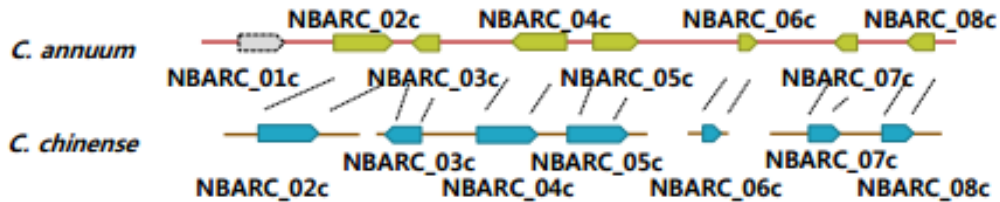


그림 18 *C. annuum* 'CM334'와 *C. chinense* 'PI159236' 사이의 NBS-LRR 상호 비교. 7개의 NBS-LRR 서열이 *C. chinense*에서 확인됨

*C. chinense*의 *Tsw* target 염기서열에 존재하는 7개의 NBS-LRR 유전자의 도메인을 분석한 결과 총 3개의 유전자만이 truncated되지 않고 온전히 모든 도메인을 포함하는 것을 확인함. 하지만 이들 3개의 유전자 NBARC_03c, NBARC_04c, NBARC_05c를 포함한 7개 NBS-LRR 유전자 모두가 *Tsw* 유전자일 가능성이 있다고 보고 TSWV 저항성이 있는 지 검증하기 위하여 차년도에는 *Nicotiana benthamiana* 시스템에서 transient 분석을 수행하고자 하였음.

(2) TSWV 저항성 후보 유전자 기능 분석(제 2차년도)

7개 *Tsw* 후보 유전자를 서열 정보를 활용하여 2차년도에는 *Nicotiana benthamiana* 시스템에서 co-expression 실험을 수행함. Co-expression 실험은 TSWV effector와 유전자를 함께 발현시켰을 때 서로 interaction을 하는 경우, 즉 후보 유전자가 TSWV 저항성 유전자인 경우 형광을 발함. NBARC-C 유전자만이 TSWV의 effector(NS)와 interaction하여 positive control (R3a + Avr3a)과 같이 형광을 발하였으며, 이를 통해 최종 *Tsw* 유전자로 동정하였음. 추가적으로 TSWV 이병성 고추가 갖는 *Tsw* 대립유전자인 *tsw*를 동정하였으며, *Tsw*, *tsw* 두 유전자를 *Nicotiana benthamiana*에 과발현 시켰을 때 *Tsw* 유전자를 과발현 시킨 경우에만 TSWV 증식이 억제되는 것을 확인하였음. 따라서 *Tsw* 유전자는 *C. chinense* 고추의 염색체 10번에 위치하는 NBARC-C임을 최종 동정하였으며 유전자 기반의 분자마커 Tsw-SNP1을 개발함. Tsw-SNP1은 HRM 기반의 분자마커로 저항성, 이병성 및 이형접합성 유전형질을 모두 구분할 수 있도록 제작함.

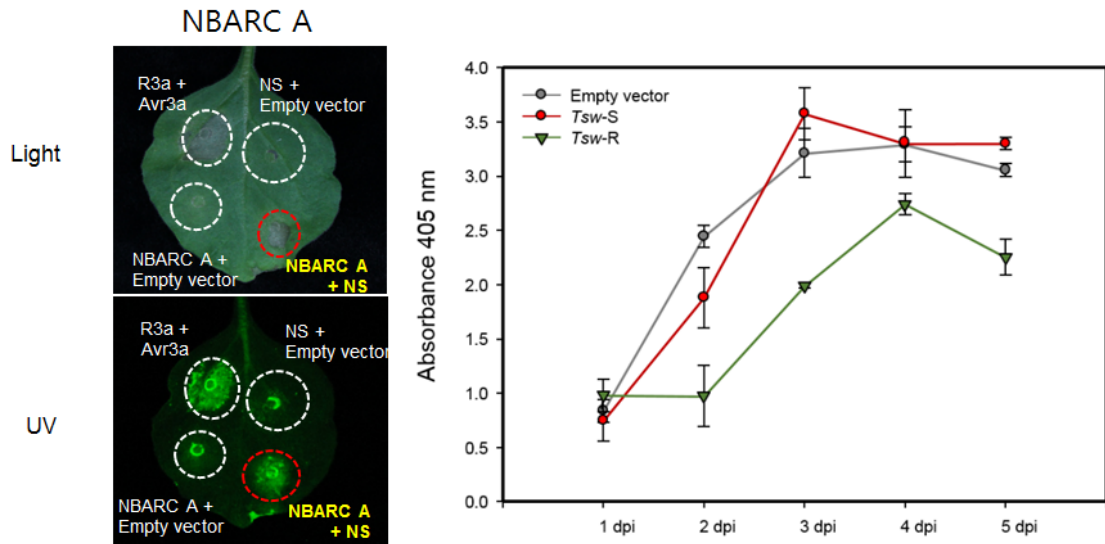


그림 19 Tsw 유전자의 co-expression 결과(좌) 및 Tsw, tsw 유전자 과발현 담배의 TSWV 증식 확인(우)

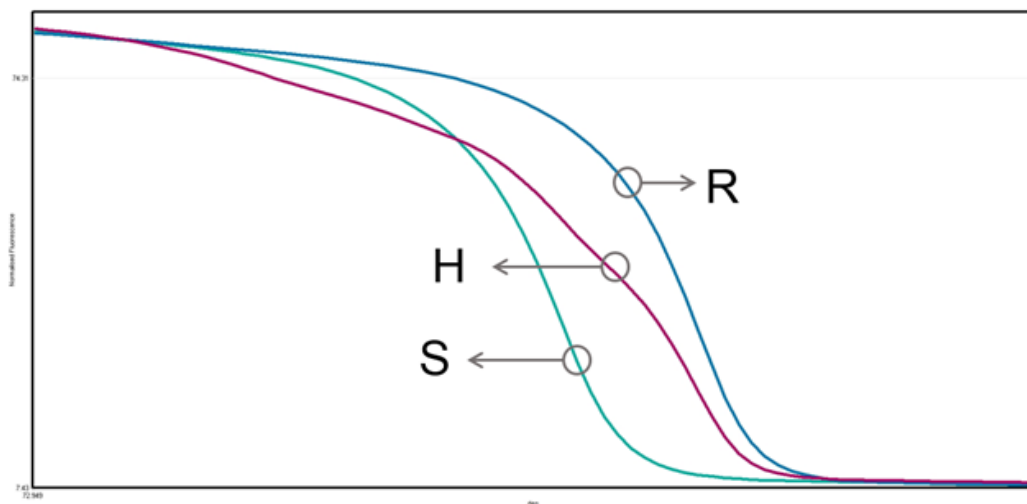


그림 20 TSWV 저항성 유전자 기반으로 개발한 Tsw-SNP1 분자마커 검정 결과

2. Rf 후보 유전자 기반 분자표지 개발

경제적 채종, 품종 보안, 종자 순도 향상을 위해 널리 활용되고 있는 세포질 응성불임 체계의 핵심 유전자인 응성불임 회복 유전자의 경우 분자마커 개발 집단 내에서 1cM 이내의 거리를 나타내는 분자마커들이 개발된 바 있으나 이러한 분자마커들을 다양한 육종 계통에 적용할 시에는 각 계통의 유전자형 판별이 불가능한 경우가 발생하고 있음. 특히 세포질 응성불임 체계의 적용범위를 상당히 제한시키는 요인인 응성불임 불안정성 관련 유전자가 회복유전자와 가깝게 위치하거나 대립유전자 관계를 갖는다는 보고가 있으므로 회복 유전자 자체를 동정하는 것이 이 특성에 대한 유전적·기능적 분석을 가능케 하는 데 도움이 될 것으로 판단됨.

(1) *Rf* 후보 유전자 선별(제 3차년도)

선행 연구를 통해 부강 및 청양 F2 집단을 이용하여 *Rf* 후보 유전자와 0cM의 유전적 거리를 갖는 분자마커를 개발하였으며, BAC chromosome walking 기법을 통해 *Rf* 후보 유전자를 포함한 BAC library 서열을 확보할 수 있었음. 이 BAC 서열 내 존재하는 ORF 탐색을 통해서 ORF가 온전히 보존되어 있으며, PPR 모티프를 가지는 PPR6 유전자가 *Rf* 후보 유전자일 것이라 예측하였음(그림 21). 이후 부강 C와 A의 RNA-seq data 분석을 통해서 PPR6 유전자 3'-UTR에 존재하는 indel을 발견하였고, PCR을 통해 이 indel을 부강과 청양 계통에서 찾을 수 있었음. 현재, 이 *PPR6* 유전자 내 여러 서열 부분을 특이적으로 silencing하여 VIGS 실험을 통해 *PPR6* 유전자가 고추의 웅성불임 회복에 영향을 미치는지 여부를 확인하였음.

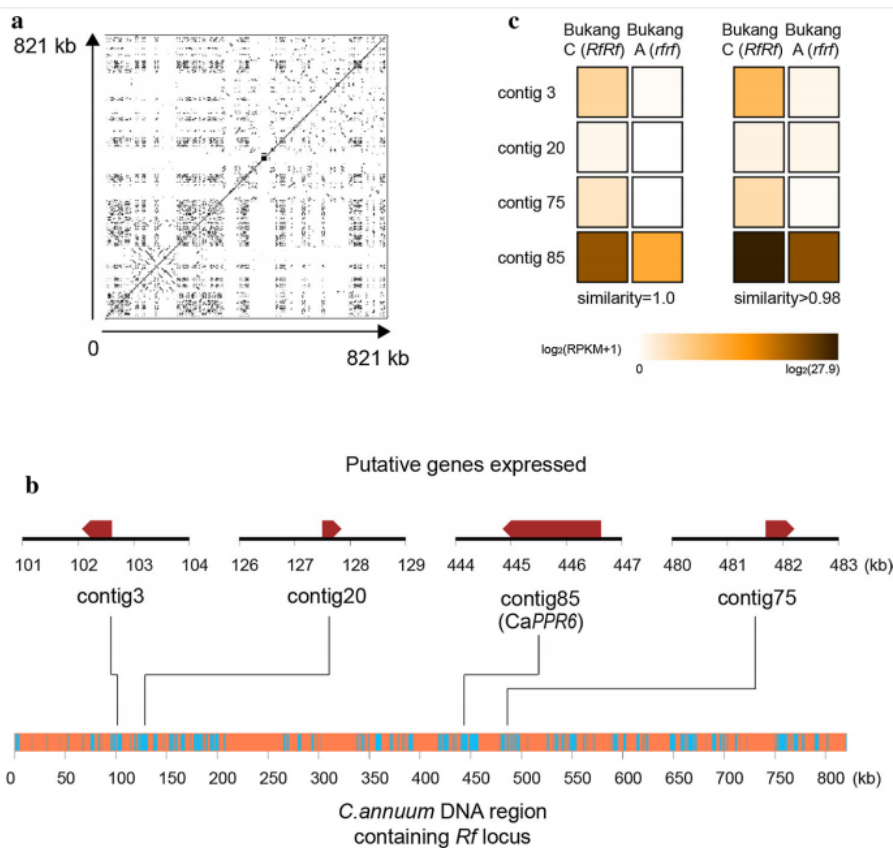


그림 21 *Rf* 유전자를 포함하는 BAC clone 내 RNA-seq 발현량 분석 결과와 예측된 4개의 후보 유전자

(2) *Rf* 후보 유전자를 이용한 분자마커 개발(제 4차년도)

기존에 밝혀진 *PPR6* 유전자를 *CaPPR6*라 명명하고, RNA-seq 결과를 비교하여 0cM 내 BAC clone 서열 내에서 부강 C와 부강 A에서 발현량 차이를 보이는 3개의 *Rf* 후보유전자 (*Rf-CDS1*, *Rf-CDS2*, *Rf-CDS3*)를 추가로 선별함(그림 22). 이 중 *Rf-CDS3*만이 부강 및 청양 계통에서 C line 특이적인 발현 양상 및 염기서열을 보였으므로, 이 *Rf-CDS3*에서 연관된 마커를 개발하여 이를 청양 F2 분리집단과 Enza Zaden의 고추 계통에 적용함.

*Rf-CDS3*는 청양 F2 분리집단에서는 유전형이 표현형과 100% 일치하는 양상을 보였고, 해외 종자회사의 고추 육종 계통에서는 88%의 일치율로 CaPPR6로 개발된 마커에 비해 높은 연관성을 보임(표 10).

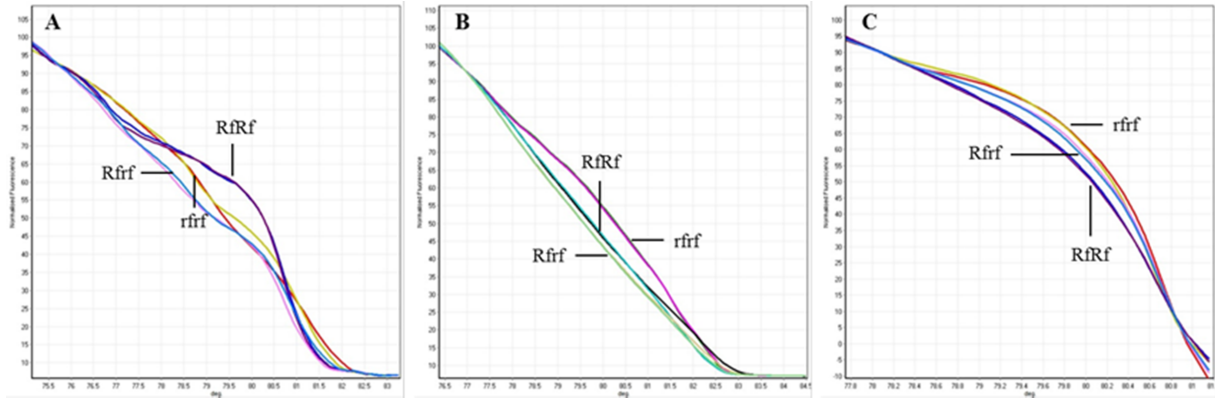


그림 22 *Rf* 0cM 지역에서 개발한 CDS1, CDS2, CDS3 분자마커 유전형 분석 결과

표 10 Enza Zaden의 고추 육종 계통에 분자마커를 적용하여 얻은 유전형 분석 결과

Markers	Marker haplotypes	Number of lines classified as <i>RfRf</i> (total 24 lines)	Number of lines classified as <i>Rf/rf</i> (total 12 lines)	Number of lines classified as <i>rf/rf</i> (total 14 lines)	Ratio of successful genotyping (%)
CDS1_HRM	<i>RfRf</i>	14	1	6	60
	<i>Rf/rf</i>	2	2	1	
	<i>rf/rf</i>	8	2	7	
CDS2_HRM2	<i>RfRf</i>	14	2	6	52
	<i>Rf/rf</i>	0	6	2	
	<i>rf/rf</i>	10	4	6	
CDS3_pro_HRM1	<i>RfRf</i>	24	0	5	88
	<i>Rf/rf</i>	0	12	1	
	<i>rf/rf</i>	0	0	8	
ColMod1-CAPS	<i>RfRf</i>	12	1	1	80
	<i>Rf/rf</i>	2	8	0	
	<i>rf/rf</i>	3	3	16	

3. *sy-2* 후보 유전자 기반 분자표지 개발

본 연구에서는 임계온도(24°C) 이하에서 잎의 정상적 발육이 저하되는 돌연변이체를 활용하여 온도 민감성 관련 유전자에 대한 분자마커 개발을 수행하였는데 추가 연구를 통해 해당 유전자(*Sy-2*)를 발굴하고 기작을 연구할 경우 지구온난화에 대한 고추 및 파프리카의 적응성을 향상시키는 데 활용될 수 있을 것으로 예측하였음.

(1) *sy-2* 후보 유전자 선별(제 3차년도)

선행 연구를 통해 *sy-2* 유전자는 임계온도(24°C) 이하에서 잎 모양이 비정상적으로 변하게 하며, 고추 1번 염색체에 존재하여 단일열성으로 유전되는 것이 알려져 있었음(An et al., 2011). 따라서 No.3341 X *Sy-2* F2 집단을 구축하고, 이 F2 집단을 이용해 분자마커 개

발 및 유전자 지도 작성을 수행하였음. 연관 분석과 chromosome walking을 통해서 *sy-2* 유전자가 SNP5-5와 SNP3-8 두 SNP 분자마커 사이에 연관되어 있음을 확인하였음(그림 23).

이후 SNP5-5와 SNP3-8 두 분자마커 사이 138.8kb 지역 내 유전자 중 *sy-2* 후보 유전자를 선별하기 위해 SNP5-5와 SNP3-8의 유전형이 동형접합(*Sy-2/Sy-2* 혹은 *sy-2/sy-2*)인 F2 개체를 선별하여 pooling한 뒤 RNA-seq을 수행하였음. 그 결과 *sy-2* 후보 지역 내 두 개의 F-box coding 유전자에서 SNP를 탐색할 수 있었으며(그림 24), 이를 포함해 총 6개의 *sy-2* 후보 유전자를 선별하였음.

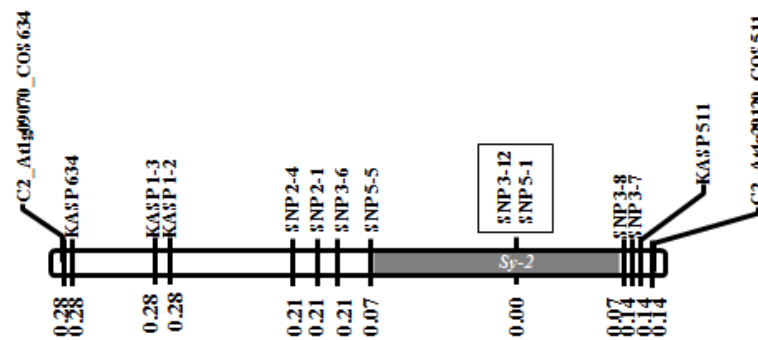


그림 23 *sy-2* 유전자의 유전자 지도와 연관 마커. 숫자는 유전자적 거리(cM)을 나타냄.

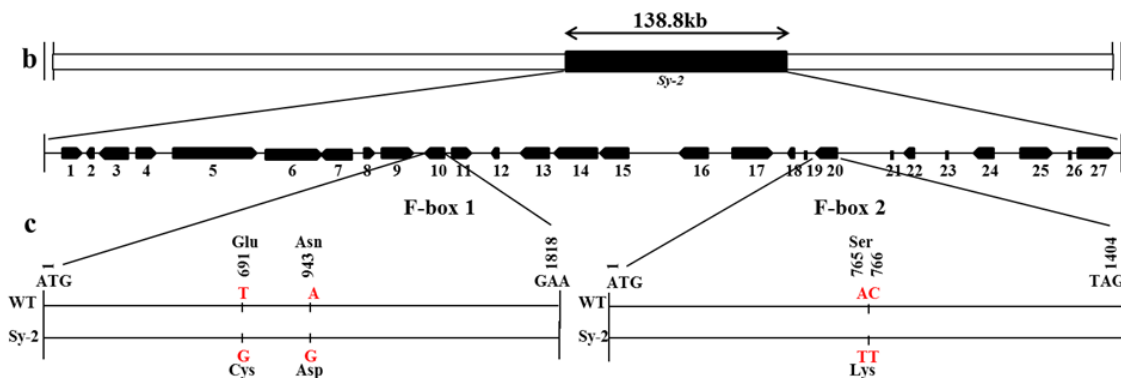


그림 24 RNA-seq을 통해 확인된 두 개의 F-box coding 유전자 내 SNP 위치 및 특징

(2) 후보 유전자 기능 분석을 통한 *sy-2* 유전자 동정(제 4차년도)

sy-2 0cM 지역 내 F-box coding 유전자 두 개(*Orf10*, *Orf20*)를 후보 유전자로 하여 virus-induced gene silencing (VIGS) 실험을 수행함. VIGS 실험을 통해 *Orf10*, *Orf20* 두 개의 유전자를 silencing한 후, 임계온도 조건에서 잎 모양의 변화를 관찰하였음. 그 결과 *Orf10*과 *Orf20* 두 개를 동시에 silencing하였을 때 임계온도 조건 이하에서 매우 잎 모양이 비정상적으로 확인되었음(그림 25).

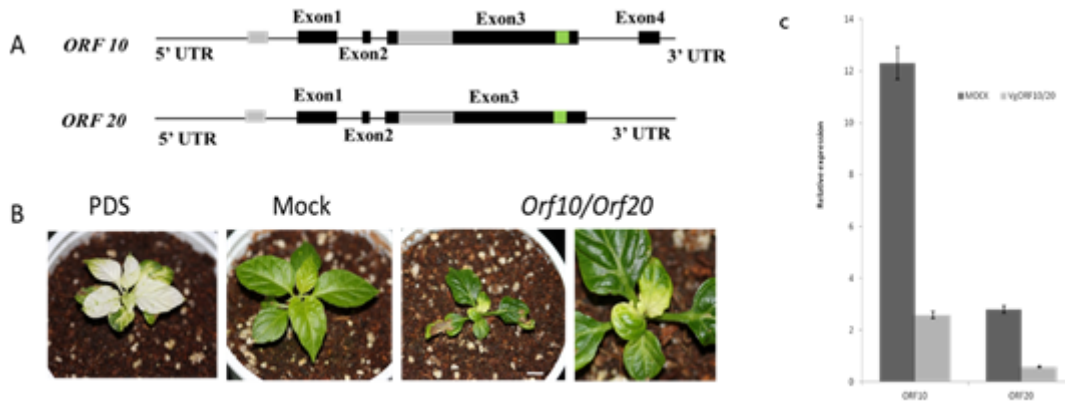


그림 25 VIGS를 수행한 *Orf10*, *Orf20* 유전자 구조와 두 유전자를 이용하여 VIGS를 수행한 결과

제 3 절 고추 유용 형질 관련 집단 구축

1. 고추 유용 형질 관련 고추 집단 작성

국내 및 해외 수출지역에서 요구되는 다수의 병 저항성은 양적 유전하는 것으로 알려져 있음. 특히 역병, 흰가루병, 청고병은 그 필요성에도 불구하고 유전자에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았거나 추가 연구가 필요한 상황임. 따라서 병 저항성 QTL 탐색을 위하여 recombinant inbred line(RIL), doubled haploid(DH) 등의 불변집단을 육성하고자 함. 구축된 집단을 이용하면 QTL 및 유전자를 탐색하고 각 병 저항성에 연관된 분자마커를 개발할 예정임. 개발한 분자마커는 국내 고추 수확량 및 품질에 큰 영향을 미치는 주요 병에 대한 강한 저항성 품종을 빠르게 개발하는 데에 활용함. 또한 병 접종 실험을 통해 저항성을 확인 하던 기존 방법과 달리 별도의 포장이나 접종을 하는데 드는 노동력을 절감할 수 있을 것으로 기대함. 현재까지 구축된 집단은 표 11에 정리하였음.

가. 색소 및 비타민 함량

(1) 색소 및 비타민 함량 유전분석을 위한 집단 구축(제 1차년도)

고추 과실은 붉은 색을 내는 대표적인 물질인 캡산틴(capsanthin)을 포함하여 주황색을 띄는 베타 카로틴(β -carotene), 제아잔틴(zeaxanthin), 노란색을 띄는 비올라잔틴(violaxanthin) 등의 색소를 함유하고 있음. 본 연구실에서 보유하고 있는 유전자원 중 기존 연구그룹(Wahyuni 등, 2011)의 연구 결과를 바탕으로 캡산틴에 비해 다른 색소의 함량은 낮은 계통과 캡산틴, 제아잔틴, 비올라잔틴 등의 색소 함량이 월등히 높은 계통을 선발함(그림 27). 두 계통을 교배하여 F1 및 F2 분리집단을 육성함. 또한 양친인 두 계통은 비타민 E 함량에 큰 차이를 보였기에 비타민 함량을 조절하는 분자마커 개발에 활용. 비타민 C 함량은 두 계통 모두 높게 나타났으며, MAGIC 집단 구축에 활용하고자 하였음.

(2) 색소 및 비타민 함량 관련 집단 세대 진전(제 2차년도)

2차년도에는 최종 RIL 집단 육성을 위하여 서울대학교 수원 부속 농장 및 태국에서의 재배를 통해 총 257계통이 육성되었으며, F4세대까지 진전하였음. 향후 F5-F6 세대에는 색소, 비타민 E 함량을 측정하고, 유전자 지도를 작성함으로써 색소 및 비타민 함량을 조절하는

분자마커 개발에 활용할 예정이다. 이는 새로운 고추 육종 목표를 설정하고 고품질 품종을 개발하는데 도움이 될 것으로 기대하고 있음.

(3) 색소 및 비타민 함량 관련 집단 세대 진전(제 3차년도)

고추 과실의 붉은색을 띠는 주요 물질인 캡산틴에 비해 다른 색소의 함량은 낮은 계통 (AC2212)과 캡산틴, 제아잔틴, 비올라잔틴 등의 색소 함량이 월등히 높은 계통(Long sweet)을 교배하여 F5 세대를 육성함. 총 275계통을 육성하였으며, 겨울 동안 추가적인 세대 진전을 통해 고정된 F6 집단을 확보함.

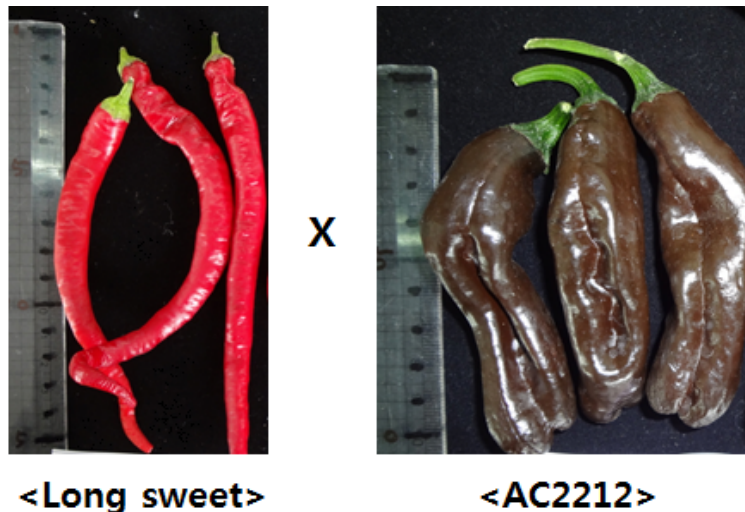


그림 27 색소 및 비타민 함량 분자마커 개발을 위해 교배한 양친 계통. Long sweet은 저색소, 저비타민 함유 계통이며 AC2212는 고색소, 고비타민 함유 계통

(4) 색소 및 비타민 함량 관련 집단 RIL 집단 구축(제 4차년도)

C. annuum 'Long sweet' x *C. annuum* 'AC2212' 을 교배한 집단은 F6:7 세대로 RIL 집단으로 고정되었음. 총 207 계통으로 육성되었으며, 미숙과색을 조사하였을 때 유전적으로 RIL 집단이 잘 고정되었음을 확인함.

표 11 분자마커 개발을 위한 집단 육성

특성	유전 양식	집단		교배조합	소재 출처	개체수
		최종 집단	작성 현재 육성된 집단			
역병 저항성	QTL	RIL, NIL	RIL	YCM334(R) X 태안재래(S)	원예원	170
흰가루병 저항성	QTL	DH	F3	VK515R(R) X VK515S(S)	삼성종묘	200
청고병 저항성	QTL	DH	F1	RS205(R) X RS202(S)	삼성종묘	90
		DH	F2	RS202(S) X RS205(R)	삼성종묘	300
		DH	F2	RS203(S) X RS205(R)	삼성종묘	1,000
Geminivirus 저항성	질적	F2	-	저항성 10계통	AVRDC	-
뿌리혹선충 저항성	질적	F2	RIL(F7)	ECW(S) X CM334(R)	상용종자	500
색소/비타민 함량	QTL	RIL	RIL(F7)	Long sweet(고) X AC2212(저)	CGN	300
신미 정도	QTL	RIL	RIL(F8)	Perennial(고) X Dempsey(무)	본 연구실	162
		RIL	RIL(F10)	TF68(저) X Habanero(고)	Prof. 김병동	100

교배조합의 (R)은 저항성, (S)는 이병성을 의미하며 (고)는 고탍유, (저)는 저합유를 의미

2. MAGIC 집단 작성

우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 발생지역이 확대되어 나가고 있는 TSWV의 경우 유전자로부터 약 0.9cM의 거리를 나타내는 분자마커가 개발되었음에도 불구하고 이 분자마커를 다양한 저항성 계통에 적용하였을 경우 다형성이 나타나지 않아 적용이 불가능한 경우가 발생하는 것으로 보고된 바 있음. 따라서 유전자 자체 서열의 클로닝 및 이로부터의 분자마커 개발이 요구됨.

가. MAGIC 집단 교배 조합 작성 및 전략 구축(제 1차년도)

Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) 집단은 다수의 양적 형질에 대한 서로 다른 표현형을 갖는 여러 계통 간 교배를 통해 유전적, 표현형적 다양성을 극대화한 집단임. 기존의 MAGIC 집단을 구축하던 방법은 8개 계통을 모든 조합으로 교배를 수행함으로써 모든 계통이 8개 계통의 유전 정보를 지닐 수 있도록 하여 양적 형질 연구에 매우 효율적이라고 연구됨. 하지만 교배 및 집단 유지의 어려움이 있어 연구실 단위에서 구축할 수 있는 방법을 탐색하고자 함(그림 28). 1차년도에는 기존 MAGIC 구축 방법보다 교배를 간소화 하여 최소한의 집단수로 최대한의 유전적 다양성을 유지할 수 있는 방법을 찾고, 집단 구축에 활용할 일부 계통을 선발함.

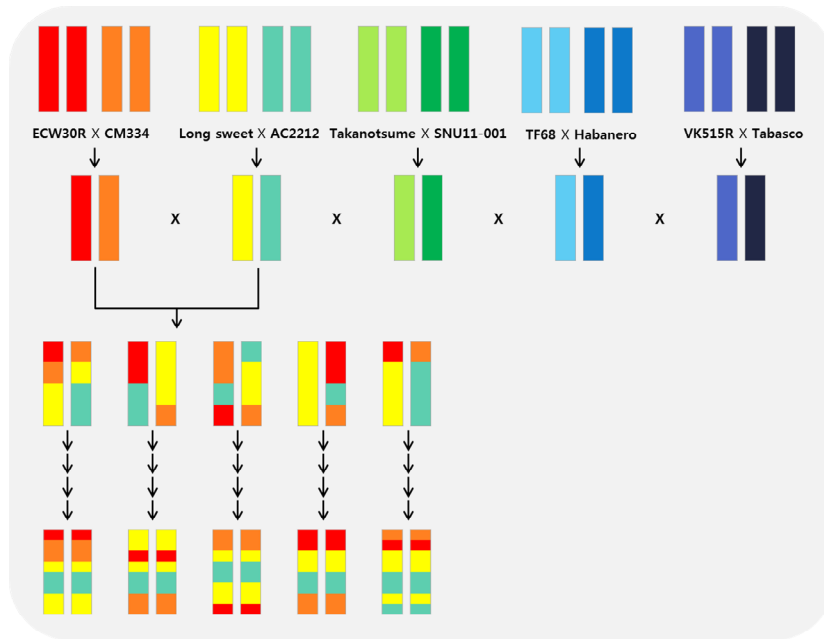


그림 28 MAGIC 집단 구축에 활용할 계통 및 구축 방법

나. MAGIC 집단 세대 진전(제 2차년도)

2차년도에는 최종적으로 선발한 ECW(*Capsicum annuum*), CM334(*C. annuum*), Long sweet(*C. annuum*), AC2212(*C. annuum*), Takanotsume(*C. annuum*), SNU11-001(*C. chinense*), TF68(*C. annuum*), Habanero(*C. chinense*), VK515R(*C. annuum*), Tabasco green leaf(*C. frutescens*) 계통을 활용하여 총 5개 조합으로 교배를 수행함. 각 교배 조합은 각각 병저항성, 색소 및 비타민, 신미 함량의 다양성을 지닐 수 있도록 설계하였음. 또한 *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* 종을 활용하여 유전적 다양성을 높이고자 함. 현재 5개 조합의 F1 종자는 모두 확보하였으며 F1간의 4-way cross를 수행하고 있음. 현재 (Takanotsume X SNU11-001) x (long sweet x AC2212) F1* 및 (Takanotsume X SNU11-001) x (ECW30R X CM334) F1*을 채종함. 다른 조합 간의 교배를 수행하여 F1 x F1 개체 (F1*)를 모두 확보한 이후에는 분리집단을 육성하고, 자가교배를 통해 최종적으로 MAGIC 집단을 구축할 예정임. 이 방법을 활용하면 빠르게 세대를 진전함으로써 양적 형질 조절 유전자 탐색 연구에 활용할 수 있을 것으로 예상함.

다. MAGIC 집단 세대 진전(제 3, 4차년도)

총 5개 조합의 F1* (F1 x F1) 종자를 50 계통씩 정식하였음. *C. chinense* 계통이 사용된 F1* 조합은 2-9개 계통의 종자만을 확보할 수 있었으며, *C. annuum* 만이 활용된 (*C. annuum* 'Long sweet' x *C. annuum* 'AC2212') x (*C. annuum* 'ECW30R' x *C. annuum* 'CM334') F1* 조합(LA x EC)이 50계통 모두에서 종자를 확보하였음. 중간 교배를 통한 MAGIC 집단 육성이 세대 진전이 어려웠기 때문에 (LA x EC) 조합을 추가로 증식하여 역병, 선충 저항성, 신미, 비타민, 과색 연구 등에 활용할 수 있을 것으로 예상함.

또한 MAGIC 집단에 활용하기 위해 야생종 고추인 *C. chacoense* 'PI260433' 과 재래종 고추인 *C. annuum* 'Jeju'를 교배하여 F1을 육성하였음. F1의 생육이 매우 좋고, 착과가 잘 되

었으며, 다른 F1 조합과의 교배가 잘 수행됨. 따라서 이 조합을 MAGIC 집단에 활용하기 위한 교배를 지속적으로 수행하고 있음.

제 4 절 고효율 유전자형 검정을 통한 MAB 실용화

세계적으로 널리 활용되고 있는 Bio-Mark HD system 및 GBS 방법은 MAS를 위한 유용 분자마커의 일괄적 적용 및 MAB를 위한 background selection용 유전자형 분석에 적용할 수 있는 좋은 후보 전략으로 볼 수 있음. 뿐만 아니라 Bio-Mark HD system을 활용하여 고추 유용 형질에 연관된 분자마커를 일괄적으로 적용할 수 있는 kit를 개발할 경우 육종가가 계통의 특성을 한 번에 파악할 수 있는 유용한 육종 도구가 될 수 있을 것으로 판단됨.

1. GBS browser 구축

가. GBS 분석 방법 정립(제 2차년도)

GBS는 제한효소로 자른 유전체 단편에 adapter를 붙여 염기서열분석을 수행함으로써 다량 시료의 유전체 서열 분석 및 유전형 분석에 적합한 방법임. 본 연구에서는 제한효소로 rare-cutter인 *Pst*I과 frequent-cutter인 *Mse*I을 사용하였으며, 서로 다른 5bp의 barcode 서열을 지니는 *Pst*I adapter를 활용하였음. 총 96개의 시료의 library를 제작한 이후 Illumina HiSeq2000의 2 lane에서 single-end sequencing을 진행하였음. 생성된 read는 phred score 20이상으로 filtering하고, barcode 서열을 바탕으로 demultiplexing 하였음. 96개 시료 별로 나누어진 read는 BWA mem을 사용해 고추의 표준유전체염기서열인 CM334 scaffold 및 chromosome에 align함. 이후 GATK, SAMtools를 활용하여 SNP를 탐색하는 pipeline을 구축하였음. 신뢰도 높은 SNP 만들 선별하기 위하여 filtering 기준은 minimum depth 5, SNP의 Quality score 60이상으로 설정하였으며 최종 SNP 정보는 각 SNP의 depth, quality score, 유전형 정보와 함께 .vcf 파일로 도출함. 본 pipeline은 추후 병저항성 연구 집단 및 양적 형질 연구 집단의 SNP를 찾고, 이를 이용한 유전자 지도를 작성하는데 활용할 예정임.

나. GBS 분석 방법 정립(제 3차년도)

GBS browser 구축을 통해 GBS 분석 결과를 시각화하였으며, filtering 기능을 통해 신뢰도 높은 SNP 선별 및 유전형 분석이 용이해졌음(그림 29). 이를 이용해 1, 2차년도에 GBS 분석을 수행한 TF68 X Habanero RIL 집단 및 Perennial X Dempsey RIL 집단의 GBS 결과를 관찰할 수 있었음. 또한 CM334의 물리적 지도와 호환성을 가지기 때문에 물리적 지도와 GBS로 만든 유전자 지도 간에 비교에 유용하게 사용될 수 있음.

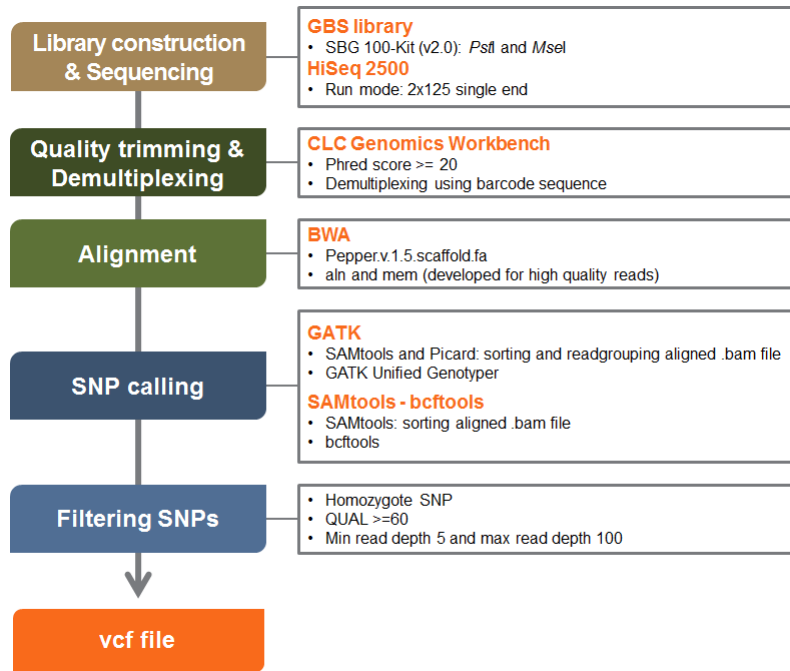


그림 29 GBS library 염기서열 분석결과를 활용한 SNP 탐색 pipeline

다. GBS 분석 방법 개선(제 4차년도)

전년도 연구를 통해 *PstI/MseI* double-digestion을 통한 GBS library 제작 방법과, 데이터 분석, GBS browser 등을 세팅하였음. 하지만 *PstI* 제한효소가 작용하는 유전적 지역이 너무 드물어 유전자의 fine-mapping 등에 활용하기 어려운 경우가 있었으며, 작물에 따라 제한효소가 제대로 작용하지 않는 경우가 확인됨. 따라서 *in silico* digestion을 통해 다른 제한효소가 작용하는 지역의 수를 확인해 봄.

기존에 사용한 *PstI/MseI* 조합과 *EcoRI/MseI*, *HindIII/MseI* 조합을 활용해 ‘CM334’ 표준유전체 서열을 자른다고 가정했을 때에 cut site의 수를 계산함. *EcoRI/MseI*, *HindIII/MseI* 조합 모두 *PstI/MseI* 조합에 비해 3배 이상의 cut site가 있는 것을 알 수 있었음(표 12).

표 12 In silico digestion을 이용해 예상한 GBS library 제작 가능한 단편 수

Chr.	Number of effective fragments		
	<i>PstI/MseI</i>	<i>EcoRI/MseI</i>	<i>HindIII/MseI</i>
1	21,262	73,361	68,385
2	14,482	45,015	43,661
3	20,664	68,215	65,932
4	16,650	60,735	57,165
5	17,125	64,060	58,254
6	18,278	63,491	60,623
7	17,451	62,623	59,402
8	11,179	38,525	37,400
9	18,088	67,286	63,759
10	16,887	62,916	59,142
11	19,318	70,106	66,640
12	17,315	63,692	60,325
Total	208,699	740,025	700,688

2. MAB 실용화

가. 유전 분석 대상 계통의 MAB용 SNP 분자마커 선별

기존에 본 연구실에서 수행한 8가지 고추 계통의 transcriptome 분석 결과를 바탕으로 다형성 비교를 수행하여 12개의 염색체에 분포하는 412개의 SNP 분자마커를 선별한 바 있음. 염색체 하나 당 8개에서 69개의 SNP 마커가 분포하였고, 마커 간 평균 거리는 3.55 cM 임. SNP 분자마커는 모두 BioMark HD System을 사용할 수 있도록 개발되었기 때문에 향후 중요 특성 연구를 위한 집단에 대해 빠르게 유전형 분석을 수행할 수 있음. 추가적으로 마커의 수를 늘리고, 염색체에 분포하는 마커의 수를 균등하게하기 위하여 기 개발된 특성 연관 분자마커를 BioMark HD System에 적용할 수 있도록 개발하고자 하였음.

(1) 집단 교배친에 대한 SNP마커 선별(제 1차년도)

역병 저항성, 흰가루병 저항성, 청고병 저항성, Geminivirus 저항성, 비타민 및 색소 고함유, 신미 정도 등을 연구하기 위해 사용하는 계통들 간의 다형성 정도를 확인하기 위하여 기 개발된 SNP마커를 이용해 BioMark HD System에 적용하고자 함. 이는 각 특성 별 집단의 유전형 분석뿐만 아니라 MAGIC 집단 구축에도 활용할 계획임. 따라서 집단 구축에 활용되고 있거나 향후 활용 가능성이 있는 계통 간의 다형성을 갖는 SNP 분자마커를 선별하였음 (그림 30).

현재 집단 육성에 활용되고 있는 조합 중 청고병 저항성 계통인 RS203과 RS205는 412개 중 42개의 SNP 마커만이 다형성을 보였으며 역병 QTL을 연구하기 위해 RIL 집단을 구축하였던 YCM334와 태안재래는 195개의 마커가 다형성을 보였음. 각 조합마다 다형성을 지닌 마커의 수는 다양했으며 역병 저항성 minor QTL 탐색을 위해 새롭게 집단을 구축하는데 활용하고 있는 CM334와 ECW간의 다형성을 보이는 마커를 염색체에 나타내면 그림 31과 같음.



그림 30 주요 특성을 연구하기 위한 계통간 다형성이 있는 마커의 수. 괄호 안의 숫자는 전체 마커 중 다형성이 있는 마커의 비율. 붉은색으로 음영이 된 조합에서는 낮은 다형성을 보임.

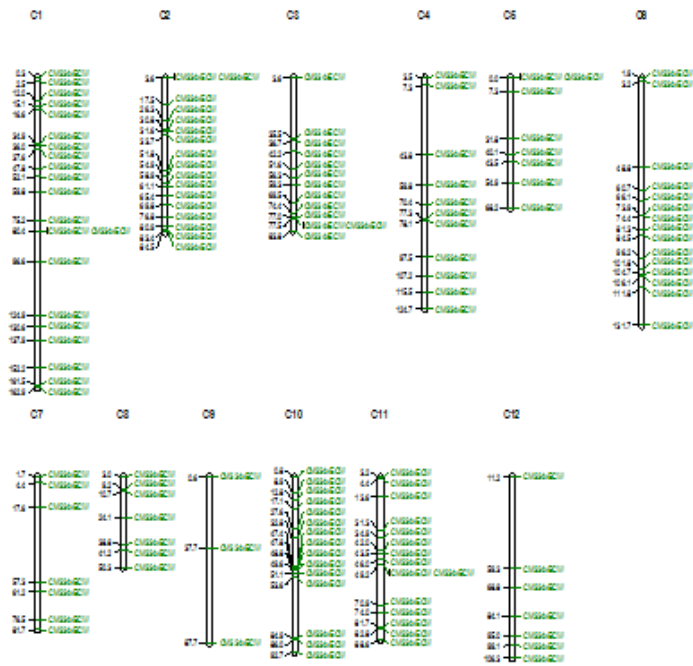


그림 31 CM334와 ECW 사이에 다형성을 보이는 SNP
분자마커의 염색체 상의 위치

(2) MAB 실용화(제 2차년도)

선발한 BioMark HD system의 SNP 마커는 종자회사의 육성계통 선발 위한 단축을 위한 MAB에 활용 가능함. A 종자회사가 지닌 육성계통에 활용 가능한 SNP 마커를 선별하기 위하여 76개 육성계통과 412개 SNP마커를 이용하여 BioMark HD system 분석을 진행함. 그 결과 각 계통간 다형성을 보이는 분자마커의 수는 0개에서 172개였으며, 평균적으로 100개의 SNP를 나타냈었음. 최종적으로 412개 분자마커 중 407개의 분자마커가 A 종자회사의 MAB에 활용 가능한 것으로 나타나 추후 우량 계통 선발을 위한 MAB 분석에 마커를 제공 하였음.

(3) Bio-Mark HD system 분석용 SNP 분자마커 개발(제 3차년도)

Bio-Mark HD system 분석용 분자마커 개발을 위해 그 원리가 비슷해 Bio-Mark HD system과 호환 가능하며 대량 유전형 분석에 용이한 KASPar assay 마커로 기개발된 분자 마커를 전환하였음. 현재 역병 저항성, CMV 저항성, TMV 저항성, TSWV 저항성 및 potyvirus 저항성 (TEV, PVMV 및 PVY) 연관 분자마커를 KASPar array 마커로 전환하여 사용 중임(그림 32). 이외에도 흰가루병, 선충저항성, 신미 형질에 대한 연관 분자마커도 KASPar assay 마커 개발 혹은 전환 중임.

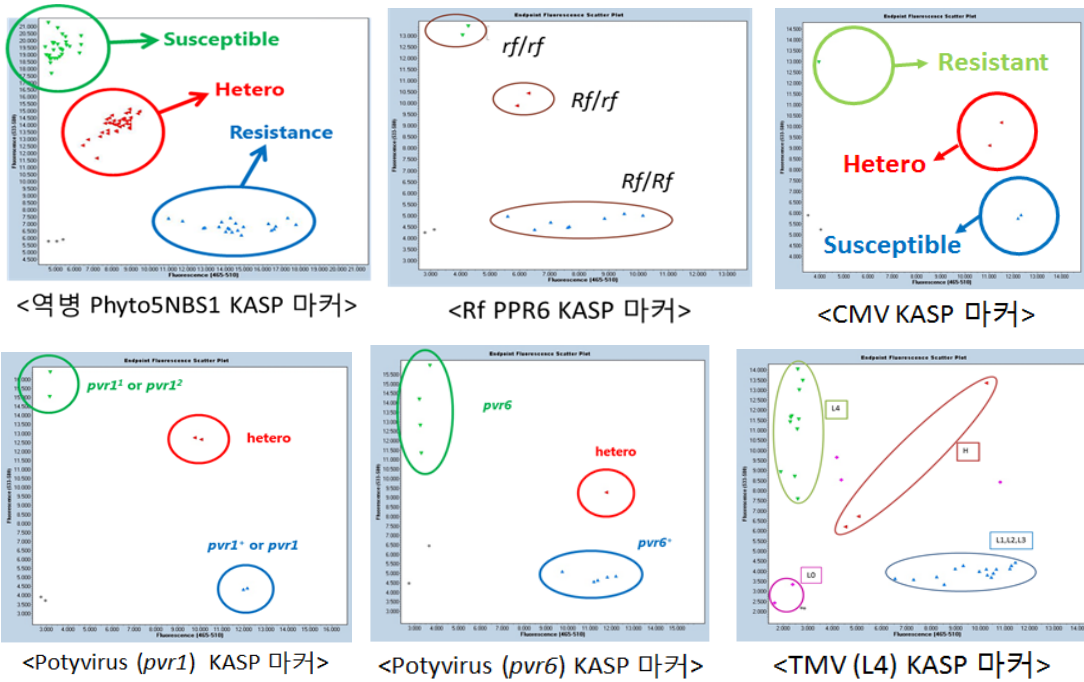


그림 32 KASPar array로 전환하여 사용 중인 주요 형질 연관 분자 마커

(4) KASPar 분자마커 및 MAB 실용화를 통한 Breeder's tool box kit 개발(제 4차년도)

KASPar array 마커로 기개발된 분자마커를 추가로 전환하였음. ChiVMV 및 선충 저항성의 경우 동남아시아 등 수출지역에 중요한 병 저항성 유전자이지만, 관련 KASPar array 마커가 보고되지 않았음. 따라서 추가적으로 필요한 두 개의 병 저항성 SNP 마커를 이용 및 제작하여 KASPar array 마커로 전환하였음(그림 33).

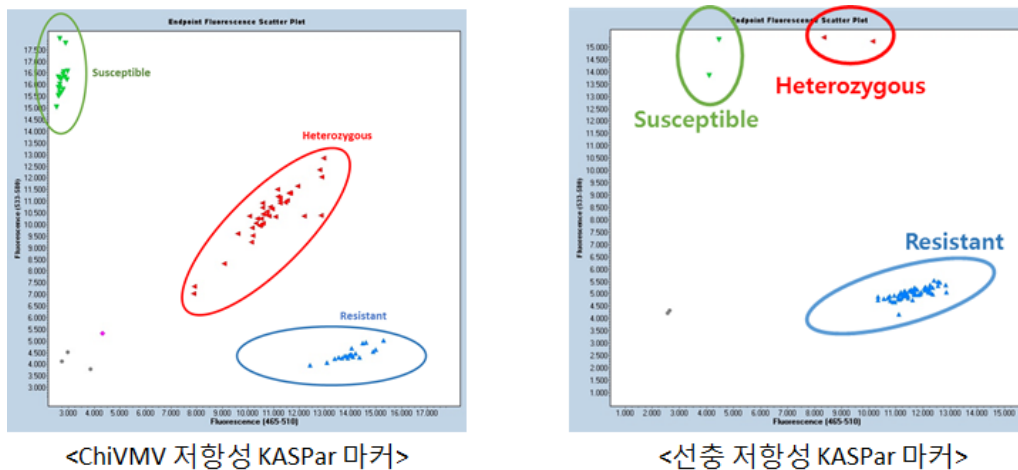


그림 33 4차년도에 추가적으로 전환한 KASPar 마커

제 5 절. 고추 소포자 배양 기술 개발

1. 고추 유전자원 수집, 평가 및 선발

가. 고추 유전자원 병저항성, 수량성 등 주요형질 평가 및 선발 (1차년도)

(1) 고추 탄저병, 역병, 풋마름병 등 주요 병 저항성 평가

총 934점의 고추 유전자원 및 보유 계통을 이용하여 탄저병 무상처 접종 및 포장검정을 실시하였음. 무상처 분무접종 결과 강한 저항성은 13A101('KAR') 등 15점이었으며, 그 외 13A1 등은 다소의 차이를 보였지만 감수성으로 판단됨. 포장검정 결과도 무상처 분무접종과 유사한 결과를 보였으며, 저항성(R)은 13A37 등 20점, 중도저항성(MR) 13A2 등 18점이었고, 13A79 등 6점은 SR로 평가하고, 그 외 13A1 등은 감수성으로 확인됨(표13).

표 13. 유전자원들의 인공접종과 포장검정의 저항성 정도

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A1	100.0	5	S	13A18	100.0	5	S
13A2	40.0	1	MR	13A19	100.0	5	S
13A3	100.0	5	S	13A20	100.0	5	S
13A4	100.0	5	S	13A21	100.0	5	S
13A5	100.0	5	S	13A22	100.0	5	S
13A6	100.0	5	S	13A23	100.0	5	S
13A7	100.0	5	S	13A24	100.0	5	S
13A8	100.0	5	S	13A25	100.0	5	S
13A9	100.0	5	S	13A26	100.0	5	S
13A10	100.0	5	S	13A27	100.0	5	S
13A11	100.0	3	S	13A28	100.0	5	S
13A12	100.0	5	S	13A29	90.0	2	S
13A13	100.0	5	S	13A30	100.0	5	S
13A14	100.0	5	S	13A31	100.0	5	S
13A15	100.0	5	S	13A32	100.0	5	S
13A16	100.0	5	S	13A33	100.0	5	S
13A17	100.0	5	S	13A34	100.0	5	S
13A35	100.0	5	S	13A83	100.0	5	S
13A36	100.0	4	S	13A84	100.0	5	S
13A37	30.0	1	R	13A85	100.0	5	S
13A38	20.0	1	R	13A86	100.0	5	S
13A39	100.0	5	S	13A87	100.0	5	S
13A40	100.0	2	S	13A88	100.0	5	S
13A41	100.0	5	S	13A89	100.0	5	S
13A42	100.0	5	S	13A90	100.0	5	S
13A43	100.0	4	S	13A91	100.0	5	S
13A44	100.0	5	S	13A92	100.0	5	S
13A45	100.0	5	S	13A93	100.0	5	S
13A46	100.0	5	S	13A94	100.0	5	S
13A47	100.0	5	S	13A95	100.0	5	S
13A48	100.0	5	S	13A96	100.0	5	S
13A49	100.0	5	S	13A97	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A50	100.0	5	S	13A98	100.0	5	S
13A51	100.0	5	S	13A99	100.0	5	S
13A52	100.0	5	S	13A100	100.0	5	S
13A53	100.0	5	S	13A101	0.0	0	MR
13A54	100.0	5	S	13A102	100.0	5	S
13A55	100.0	5	S	13A103	100.0	5	S
13A56	100.0	5	S	13A104	100.0	5	S
13A57	100.0	5	S	13A105	100.0	5	S
13A58	100.0	5	S	13A106	100.0	5	S
13A59	100.0	5	S	13A107	100.0	5	S
13A60	100.0	5	S	13A108	100.0	5	S
13A61	100.0	5	S	13A109	100.0	5	S
13A62	100.0	5	S	13A110	100.0	5	S
13A63	100.0	5	S	13A111	100.0	5	S
13A64	100.0	5	S	13A112	100.0	5	S
13A65	100.0	5	S	13A113	100.0	5	S
13A66	100.0	5	S	13A114	100.0	5	S
13A67	100.0	5	S	13A115	100.0	5	S
13A68	100.0	5	S	13A116	100.0	5	S
13A69	60.0	2	S	13A117	100.0	5	S
13A70	100.0	5	S	13A118	100.0	5	S
13A71	100.0	5	S	13A119	100.0	5	S
13A72	100.0	5	S	13A120	100.0	5	S
13A73	100.0	5	S	13A121	100.0	5	S
13A74	100.0	5	S	13A122	100.0	5	S
13A75	100.0	5	S	13A123	100.0	5	S
13A76	100.0	5	S	13A124	100.0	5	S
13A77	100.0	5	S	13A125	100.0	5	S
13A78	100.0	5	S	13A126	100.0	5	S
13A79	60.0	5	SR	13A127	100.0	5	S
13A80	30.0	3	MR	13A128	100.0	5	S
13A81	100.0	5	S	13A129	100.0	5	S
13A82	100.0	5	S	13A130	100.0	5	S
13A131	100.0	5	S	13A179	100.0	5	S
13A132	100.0	5	S	13A180	100.0	5	S
13A133	100.0	5	S	13A181	100.0	5	S
13A134	100.0	5	S	13A182	100.0	5	S
13A135	100.0	5	S	13A183	100.0	5	S
13A136	100.0	5	S	13A184	100.0	5	S
13A137	100.0	5	S	13A185	100.0	5	S
13A138	100.0	5	S	13A186	100.0	5	S
13A139	100.0	5	S	13A187	100.0	5	S
13A140	100.0	5	S	13A188	100.0	5	S
13A141	100.0	5	S	13A189	100.0	5	S
13A142	100.0	5	S	13A190	100.0	5	S
13A143	100.0	5	S	13A191	100.0	5	S
13A144	100.0	5	S	13A192	100.0	5	S
13A145	100.0	5	S	13A193	100.0	5	S
13A146	100.0	5	S	13A194	100.0	5	S
13A147	100.0	5	S	13A195	100.0	5	S
13A148	100.0	5	S	13A196	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A149	100.0	5	S	13A197	100.0	5	S
13A150	100.0	5	S	13A198	100.0	5	S
13A151	100.0	5	S	13A199	100.0	5	S
13A152	100.0	5	S	13A200	100.0	5	S
13A153	100.0	5	S	13A201	46.2	5	S
13A154	100.0	5	S	13A202	100.0	5	S
13A155	100.0	5	S	13A203	54.5	5	S
13A156	100.0	5	S	13A204	100.0	5	S
13A157	100.0	5	S	13A205	100.0	5	S
13A158	100.0	5	S	13A206	100.0	5	S
13A159	100.0	5	S	13A207	100.0	5	S
13A160	100.0	5	S	13A208	50.0	2	R
13A161	100.0	5	S	13A209	100.0	5	S
13A162	100.0	5	S	13A210	100.0	5	S
13A163	100.0	5	S	13A211	100.0	5	S
13A164	100.0	5	S	13A212	100.0	5	S
13A165	100.0	5	S	13A213	100.0	5	S
13A166	100.0	5	S	13A214	100.0	5	S
13A167	100.0	5	S	13A215	100.0	5	S
13A168	100.0	5	S	13A216	100.0	5	S
13A169	100.0	5	S	13A217	100.0	5	S
13A170	100.0	5	S	13A218	100.0	5	S
13A171	100.0	5	S	13A219	100.0	5	S
13A172	100.0	5	S	13A220	100.0	5	S
13A173	100.0	5	S	13A221	100.0	5	S
13A174	100.0	5	S	13A222	100.0	5	S
13A175	100.0	5	S	13A223	100.0	5	S
13A176	100.0	5	S	13A224	100.0	5	S
13A177	100.0	5	S	13A225	100.0	5	S
13A178	100.0	5	S	13A226	100.0	5	S
13A227	100.0	5	S	13A275	40.0	2	R
13A228	100.0	5	S	13A276	30.0	2	R
13A229	100.0	5	S	13A277	30.0	2	R
13A230	100.0	5	S	13A278	100.0	5	S
13A231	100.0	5	S	13A279	100.0	5	S
13A232	60.0	1	R	13A280	100.0	5	S
13A233	100.0	5	S	13A281	100.0	5	S
13A234	100.0	5	S	13A282	100.0	5	S
13A235	100.0	5	S	13A283	100.0	5	S
13A236	100.0	5	S	13A284	100.0	5	S
13A237	100.0	5	S	13A285	100.0	5	S
13A238	100.0	5	S	13A286	100.0	5	S
13A239	100.0	5	S	13A287	100.0	5	S
13A240	100.0	5	S	13A288	100.0	5	S
13A241	100.0	5	S	13A289	100.0	5	S
13A242	100.0	5	S	13A290	100.0	5	S
13A243	100.0	5	S	13A291	100.0	5	S
13A244	100.0	5	S	13A292	60.0	2	R
13A245	100.0	5	S	13A293	100.0	5	S
13A246	100.0	5	S	13A294	50.0	1	R
13A247	0.0	5	MR	13A295	50.0	1	R
13A248	100.0	5	S	13A296	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A249	100.0	5	S	13A297	100.0	5	S
13A250	100.0	5	S	13A298	100.0	5	S
13A251	100.0	5	S	13A299	100.0	5	S
13A252	100.0	5	S	13A300	100.0	5	S
13A253	100.0	5	S	13A301	100.0	5	S
13A254	100.0	5	S	13A302	100.0	5	S
13A255	100.0	5	S	13A303	100.0	5	S
13A256	100.0	5	S	13A304	100.0	5	S
13A257	100.0	5	S	13A305	100.0	5	S
13A258	100.0	5	S	13A306	100.0	5	S
13A259	100.0	5	S	13A307	100.0	5	S
13A260	0.0	1	MR	13A308	100.0	5	S
13A261	100.0	5	S	13A309	100.0	5	S
13A262	100.0	5	S	13A310	100.0	5	S
13A263	0.0	1	R	13A311	100.0	5	S
13A264	0.0	1	R	13A312	100.0	5	S
13A265	100.0	5	S	13A313	100.0	5	S
13A266	100.0	5	S	13A314	100.0	5	S
13A267	100.0	5	S	13A315	100.0	5	S
13A268	100.0	5	S	13A316	100.0	5	S
13A269	100.0	5	S	13A317	70.0	3	MR
13A270	100.0	5	S	13A318	100.0	5	S
13A271	100.0	5	S	13A319	100.0	4	S
13A272	100.0	5	S	13A320	100.0	5	S
13A273	100.0	5	S	13A321	100.0	5	S
13A274	100.0	5	S	13A322	100.0	5	S
13A323	100.0	5	S	13A371	90.0	3	S
13A324	100.0	5	S	13A372	100.0	3	S
13A325	100.0	5	S	13A373	100.0	5	S
13A326	100.0	5	S	13A374	80.0	3	S
13A327	100.0	5	S	13A375	88.9	3	S
13A328	100.0	5	S	13A376	100.0	5	S
13A329	100.0	5	S	13A377	100.0	4	S
13A330	100.0	5	S	13A378	100.0	5	S
13A331	100.0	3	S	13A379	100.0	3	S
13A332	100.0	5	S	13A380	100.0	4	S
13A333	100.0	5	S	13A381	100.0	5	S
13A334	100.0	5	S	13A382	0.0	0	R
13A335	100.0	3	S	13A383	0.0	0	R
13A336	100.0	5	S	13A384	100.0	5	S
13A337	100.0	3	S	13A385	100.0	5	S
13A338	100.0	5	S	13A386	100.0	5	S
13A339	100.0	5	S	13A387	100.0	5	S
13A340	100.0	5	S	13A388	100.0	5	S
13A341	100.0	5	S	13A389	100.0	2	S
13A342	100.0	5	S	13A390	100.0	5	S
13A343	100.0	5	S	13A391	70.0	3	SR
13A344	100.0	5	S	13A392	100.0	3	S
13A345	100.0	5	S	13A393	100.0	5	S
13A346	100.0	5	S	13A394	100.0	5	S
13A347	100.0	5	S	13A395	100.0	5	S
13A348	100.0	5	S	13A396	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A349	100.0	5	S	13A397	100.0	5	S
13A350	100.0	5	S	13A398	100.0	5	S
13A351	100.0	5	S	13A399	100.0	5	S
13A352	0.0	5	R	13A400	100.0	5	S
13A353	100.0	5	S	13A401	100.0	5	S
13A354	100.0	5	S	13A402	100.0	5	S
13A355	100.0	5	S	13A403	100.0	5	S
13A356	100.0	5	S	13A404	100.0	5	S
13A357	100.0	5	S	13A405	100.0	5	S
13A358	100.0	5	S	13A406	100.0	5	S
13A359	100.0	5	S	13A407	100.0	5	S
13A360	100.0	5	S	13A408	100.0	5	S
13A361	100.0	5	S	13A409	100.0	5	S
13A362	100.0	5	S	13A410	100.0	5	S
13A363	100.0	5	S	13A411	100.0	5	S
13A364	100.0	5	S	13A412	100.0	5	S
13A365	70.0	3	S	13A413	100.0	5	S
13A366	80.0	4	S	13A414	100.0	5	S
13A367	100.0	3	S	13A415	100.0	5	S
13A368	100.0	3	S	13A416	100.0	5	S
13A369	100.0	5	S	13A417	100.0	5	S
13A370	100.0	3	S	13A418	100.0	5	S
13A419	100.0	5	S	13A467	100.0	5	S
13A420	100.0	5	S	13A468	100.0	5	S
13A421	100.0	5	S	13A469	100.0	5	S
13A422	100.0	5	S	13A470	100.0	5	S
13A423	100.0	5	S	13A471	100.0	5	S
13A424	100.0	5	S	13A472	100.0	5	S
13A425	100.0	5	S	13A473	100.0	5	S
13A426	100.0	5	S	13A474	100.0	5	S
13A427	100.0	5	S	13A475	100.0	5	S
13A428	100.0	5	S	13A476	100.0	5	S
13A429	40.0	5	R	13A477	100.0	5	S
13A430	100.0	5	S	13A478	100.0	5	S
13A431	100.0	5	S	13A479	100.0	5	S
13A432	100.0	5	S	13A480	100.0	5	S
13A433	100.0	5	S	13A481	100.0	5	S
13A434	100.0	5	S	13A482	100.0	5	S
13A435	100.0	5	S	13A483	100.0	5	S
13A436	100.0	5	S	13A484	100.0	5	S
13A437	10.0	1	S	13A485	100.0	5	S
13A438	100.0	4	S	13A486	100.0	5	S
13A439	100.0	5	S	13A487	100.0	5	S
13A440	100.0	5	S	13A488	100.0	5	S
13A441	90.0	3	S	13A489	100.0	5	S
13A442	100.0	5	S	13A490	100.0	5	S
13A443	100.0	5	S	13A491	100.0	5	S
13A444	100.0	5	S	13A492	100.0	5	S
13A445	100.0	5	S	13A493	100.0	5	S
13A446	100.0	5	S	13A494	100.0	5	S
13A447	100.0	5	S	13A495	100.0	5	S
13A448	100.0	5	S	13A496	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A449	60.0	4	SR	13A497	100.0	5	S
13A450	63.6	1	SR	13A498	100.0	5	S
13A451	100.0	5	S	13A499	100.0	5	S
13A452	100.0	4	S	13A500	100.0	5	S
13A453	100.0	5	S	13A501	100.0	5	S
13A454	100.0	2	S	13A502	100.0	5	S
13A455	100.0	5	S	13A503	100.0	5	S
13A456	100.0	5	S	13A504	100.0	5	S
13A457	100.0	5	S	13A505	100.0	5	S
13A458	100.0	5	S	13A506	100.0	5	S
13A459	100.0	5	S	13A507	100.0	5	S
13A460	100.0	5	S	13A508	100.0	5	S
13A461	100.0	5	S	13A509	100.0	5	S
13A462	100.0	5	S	13A510	100.0	5	S
13A463	100.0	5	S	13A511	100.0	5	S
13A464	100.0	5	S	13A512	100.0	5	S
13A465	100.0	5	S	13A513	100.0	5	S
13A466	100.0	5	S	13A514	100.0	5	S
13A515	100.0	5	S	13A563	100.0	5	S
13A516	100.0	5	S	13A564	100.0	5	S
13A517	100.0	5	S	13A565	100.0	5	S
13A518	100.0	5	S	13A566	100.0	5	S
13A519	100.0	5	S	13A567	100.0	5	S
13A520	100.0	5	S	13A568	100.0	5	S
13A521	100.0	5	S	13A569	100.0	5	S
13A522	100.0	5	S	13A570	100.0	5	S
13A523	100.0	0	S	13A571	100.0	5	S
13A524	61.5	3	MR	13A572	100.0	5	S
13A525	100.0	5	S	13A573	100.0	5	S
13A526	100.0	5	S	13A574	100.0	5	S
13A527	100.0	5	S	13A575	100.0	5	S
13A528	100.0	5	S	13A576	100.0	5	S
13A529	100.0	5	S	13A577	100.0	5	S
13A530	100.0	5	S	13A578	100.0	5	S
13A531	100.0	5	S	13A579	100.0	5	S
13A532	100.0	5	S	13A580	100.0	5	S
13A533	100.0	3	S	13A581	100.0	5	S
13A534	100.0	3	S	13A582	100.0	5	S
13A535	100.0	5	S	13A583	100.0	5	S
13A536	100.0	5	S	13A584	100.0	5	S
13A537	100.0	5	S	13A585	100.0	5	S
13A538	100.0	5	S	13A586	100.0	5	S
13A539	100.0	5	S	13A587	100.0	5	S
13A540	100.0	5	S	13A588	100.0	5	S
13A541	100.0	5	S	13A589	100.0	5	S
13A542	100.0	5	S	13A590	100.0	5	S
13A543	100.0	5	S	13A591	100.0	5	S
13A544	100.0	5	S	13A592	100.0	5	S
13A545	100.0	5	S	13A593	100.0	5	S
13A546	100.0	5	S	13A594	100.0	5	S
13A547	100.0	5	S	13A595	100.0	5	S
13A548	100.0	5	S	13A596	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A549	100.0	5	S	13A597	100.0	5	S
13A550	100.0	5	S	13A598	100.0	5	S
13A551	100.0	5	S	13A599	100.0	5	S
13A552	100.0	5	S	13A600	100.0	5	S
13A553	100.0	5	S	13A601	100.0	5	S
13A554	100.0	5	S	13A602	100.0	5	S
13A555	100.0	5	S	13A603	100.0	5	S
13A556	100.0	5	S	13A604	100.0	5	S
13A557	100.0	5	S	13A605	100.0	5	S
13A558	100.0	5	S	13A606	100.0	5	S
13A559	100.0	5	S	13A607	100.0	5	S
13A560	100.0	5	S	13A608	100.0	5	S
13A561	100.0	5	S	13A609	100.0	5	S
13A562	100.0	5	S	13A610	100.0	5	S
13A611	100.0	5	S	13A659	100.0	5	S
13A612	100.0	5	S	13A660	100.0	5	S
13A613	100.0	5	S	13A661	100.0	5	S
13A614	100.0	5	S	13A662	100.0	5	S
13A615	100.0	5	S	13A663	100.0	5	S
13A616	100.0	5	S	13A664	100.0	5	S
13A617	100.0	5	S	13A665	100.0	5	S
13A618	100.0	5	S	13A666	100.0	5	S
13A619	100.0	5	S	13A667	100.0	5	S
13A620	100.0	5	S	13A668	100.0	5	S
13A621	100.0	5	S	13A669	100.0	5	S
13A622	100.0	5	S	13A670	100.0	5	S
13A623	100.0	5	S	13A671	100.0	5	S
13A624	100.0	5	S	13A672	100.0	5	S
13A625	100.0	5	S	13A673	100.0	5	S
13A626	100.0	5	S	13A674	100.0	5	S
13A627	100.0	5	S	13A675	100.0	5	S
13A628	100.0	5	S	13A676	100.0	5	S
13A629	100.0	5	S	13A677	100.0	5	S
13A630	100.0	5	S	13A678	100.0	5	S
13A631	100.0	5	S	13A679	100.0	5	S
13A632	100.0	5	S	13A680	100.0	5	S
13A633	100.0	5	S	13A681	100.0	5	S
13A634	100.0	5	S	13A682	100.0	5	S
13A635	100.0	5	S	13A683	100.0	5	S
13A636	100.0	5	S	13A684	100.0	5	S
13A637	100.0	5	S	13A685	100.0	5	S
13A638	100.0	5	S	13A686	100.0	5	S
13A639	100.0	5	S	13A687	0.0	0	MR
13A640	100.0	5	S	13A688	100.0	5	S
13A641	100.0	5	S	13A689	100.0	5	S
13A642	100.0	5	S	13A690	100.0	5	S
13A643	100.0	5	S	13A691	0.0	3	R
13A644	100.0	5	S	13A692	50.0	2	SR
13A645	100.0	5	S	13A693	100.0	5	S
13A646	100.0	3	S	13A694	100.0	5	S
13A647	30.0	2	MR	13A695	100.0	5	S
13A648	100.0	5	S	13A696	15.4	3	R

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A649	100.0	5	S	13A697	100.0	5	S
13A650	30.0	3	MR	13A698	100.0	5	S
13A651	100.0	5	S	13A699	0.0	0	R
13A652	10.0	3	MR	13A700	11.1	3	MR
13A653	75.0	4	SR	13A701	100.0	5	S
13A654	0.0	0	R	13A702	100.0	5	S
13A655	9.1	1	MR	13A703	100.0	5	S
13A656	100.0	5	S	13A704	100.0	5	S
13A657	100.0	5	S	13A705	100.0	5	S
13A658	100.0	5	S	13A706	100.0	5	S
13A707	100.0	5	S	13A755	100.0	5	S
13A708	100.0	5	S	13A756	100.0	5	S
13A709	100.0	5	S	13A757	100.0	5	S
13A710	100.0	5	S	13A758	100.0	5	S
13A711	100.0	5	S	13A759	100.0	5	S
13A712	100.0	5	S	13A760	100.0	5	S
13A713	100.0	5	S	13A761	100.0	5	S
13A714	100.0	5	S	13A762	100.0	5	S
13A715	100.0	5	S	13A763	100.0	5	S
13A716	20.0	4	MR	13A764	100.0	5	S
13A717	100.0	5	S	13A765	100.0	5	S
13A718	100.0	5	S	13A766	100.0	5	S
13A719	100.0	5	S	13A767	100.0	5	S
13A720	100.0	5	S	13A768	100.0	5	S
13A721	100.0	5	S	13A769	100.0	5	S
13A722	100.0	5	S	13A770	100.0	5	S
13A723	100.0	5	S	13A771	100.0	5	S
13A724	100.0	5	S	13A772	100.0	5	S
13A725	100.0	5	S	13A773	100.0	5	S
13A726	100.0	5	S	13A774	100.0	3	S
13A727	100.0	5	S	13A775	100.0	5	S
13A728	100.0	5	S	13A776	100.0	5	S
13A729	100.0	5	S	13A777	100.0	5	S
13A730	100.0	5	S	13A778	100.0	5	S
13A731	100.0	5	S	13A779	100.0	5	S
13A732	100.0	5	S	13A780	100.0	5	S
13A733	100.0	5	S	13A781	100.0	5	S
13A734	100.0	5	S	13A782	100.0	5	S
13A735	100.0	5	S	13A783	100.0	5	S
13A736	100.0	5	S	13A784	100.0	5	S
13A737	100.0	5	S	13A785	100.0	5	S
13A738	100.0	5	S	13A786	100.0	5	S
13A739	100.0	5	S	13A787	100.0	5	S
13A740	100.0	5	S	13A788	100.0	5	S
13A741	100.0	5	S	13A789	100.0	5	S
13A742	100.0	5	S	13A790	100.0	5	S
13A743	100.0	5	S	13A791	100.0	5	S
13A744	100.0	5	S	13A792	100.0	5	S
13A745	100.0	5	S	13A793	100.0	5	S
13A746	100.0	5	S	13A794	100.0	5	S
13A747	100.0	5	S	13A795	100.0	5	S
13A748	100.0	5	S	13A796	100.0	5	S

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A749	100.0	5	S	13A797	100.0	5	S
13A750	100.0	5	S	13A798	100.0	5	S
13A751	100.0	5	S	13A799	100.0	5	S
13A752	100.0	5	S	13A800	100.0	5	S
13A753	100.0	5	S	13A801	100.0	5	S
13A754	100.0	5	S	13A802	100.0	5	S
13A803	100.0	5	S	13A851	100.0	5	S
13A804	100.0	5	S	13A852	100.0	5	S
13A805	100.0	5	S	13A853	100.0	5	S
13A806	100.0	5	S	13A854	100.0	5	S
13A807	100.0	5	S	13A855	100.0	5	S
13A808	100.0	5	S	13A856	100.0	5	S
13A809	100.0	5	S	13A857	100.0	5	S
13A810	100.0	5	S	13A858	100.0	5	S
13A811	100.0	5	S	13A859	100.0	5	S
13A812	100.0	5	S	13A860	100.0	5	S
13A813	100.0	5	S	13A861	100.0	5	S
13A814	100.0	5	S	13A862	100.0	5	S
13A815	100.0	5	S	13A863	100.0	5	S
13A816	100.0	5	S	13A864	100.0	5	S
13A817	100.0	5	S	13A865	100.0	5	S
13A818	100.0	5	S	13A866	100.0	5	S
13A819	100.0	5	S	13A867	100.0	5	S
13A820	100.0	5	S	13A868	100.0	5	S
13A821	100.0	5	S	13A869	100.0	5	S
13A822	100.0	5	S	13A870	100.0	5	S
13A823	100.0	5	S	13A871	0.0	0	MR
13A824	100.0	5	S	13A872	100.0	5	S
13A825	100.0	5	S	13A873	100.0	5	S
13A826	100.0	5	S	13A874	100.0	5	S
13A827	100.0	5	S	13A875	100.0	5	S
13A828	100.0	5	S	13A876	100.0	5	S
13A829	100.0	5	S	13A877	100.0	5	S
13A830	100.0	5	S	13A878	100.0	5	S
13A831	100.0	5	S	13A879	100.0	5	S
13A832	100.0	5	S	13A880	100.0	5	S
13A833	100.0	5	S	13A881	100.0	5	S
13A834	100.0	5	S	13A882	100.0	5	S
13A835	100.0	5	S	13A883	100.0	5	S
13A836	100.0	5	S	13A884	100.0	5	S
13A837	100.0	5	S	13A885	27.3	4	MR
13A838	100.0	5	S	13A886	100.0	5	S
13A839	100.0	5	S	13A887	100.0	5	S
13A840	0.0	0	S	13A888	100.0	5	S
13A841	100.0	5	S	13A889	100.0	5	S
13A842	100.0	5	S	13A890	100.0	5	S
13A843	100.0	5	S	13A891	100.0	5	S
13A844	100.0	5	S	13A892	100.0	5	S
13A845	100.0	5	S	13A893	100.0	5	S
13A846	0.0	0	MR	13A894	100.0	5	S
13A847	100.0	5	S	13A895	100.0	5	S
13A848	100.0	5	S	13A896	18.2	4	MR

BN.	인공접종		포장검정	BN.	인공접종		포장검정
	이병과율	감염정도			이병과율	감염정도	
13A849	100.0	5	S	13A897	100.0	5	S
13A850	100.0	5	S	13A898	100.0	5	S
13A899	100.0	5	S	13A916	100.0	5	S
13A900	100.0	5	S	13A917	100.0	5	S
13A901	100.0	5	S	13A918	100.0	5	S
13A902	100.0	5	S	13A919	100.0	5	S
13A903	100.0	5	S	13A920	100.0	5	S
13A904	100.0	5	S	13A921	100.0	5	S
13A905	100.0	5	S	13A922	100.0	5	S
13A906	100.0	5	S	13A923	100.0	5	S
13A907	100.0	5	S	13A924	100.0	5	S
13A908	100.0	5	S	13A925	100.0	3	S
13A909	100.0	5	S	13A926	100.0	5	S
13A910	100.0	5	S	13A927	100.0	5	S
13A911	100.0	5	S	13A928	100.0	5	S
13A912	100.0	5	S	13A929	100.0	5	S
13A913	100.0	5	S	13A930	100.0	5	S
13A914	100.0	5	S	13A931	100.0	5	S
13A915	100.0	5	S	13A932	100.0	5	S

기존 역병 수집균주 3종 및 신규 수집균주 1종 이상에 대한 유묘기 역병검정을 실시하여 '12년 수집균주(12-75, 원환과 분양)를 이용한 역병저항성 평가 결과 강한 병원성을 보임. 13YT145가 가장 강한 저항성을 보였고 12년 선발한 13YT176은 12-75에 대해 중도 저항성을 나타내었다. RIL을 이용한 균주의 특성평가에서는 12-75는 10-196과 유사한 병 반응을 보였으며 KACC40158, 10-197 보다 감수성의 비율이 높게 나타났음. 12-75에 대한 저항성은 열성일 가능성 확인하였고 차후 집단작성 후 확인 필요할 것으로 생각됨(그림 34, 표 14).

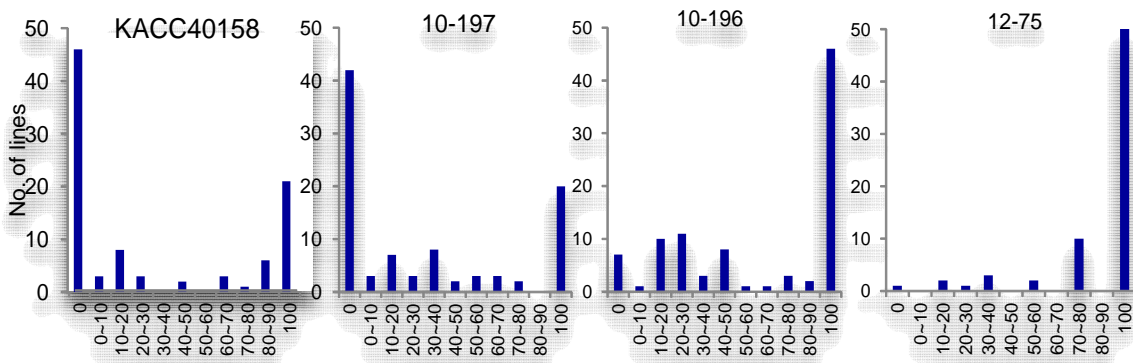


그림 34 RIL을 이용한 고추 역병 수집균주의 특성평가

표 14 수집균주 (12-75)의 특성 평가 및 저항성 계통 선발

YTBN.	이병주율		YTBN.	이병주율	
	KACC40158	12-75		KACC40158	12-75
7	100	100	121	100	100
8	62.5	100	122	0.0	25.0

YTBN.	이병주율		YTBN.	이병주율	
	KACC40158	12-75		KACC40158	12-75
11	100	100	124	0.0	100
12	80.0	100	125	12.5	100
16	100	100	127	0.0	20.0
19	100	100	129	100	100
22	70.0	100	131	0.0	100
25	0.0	75.0	132	100	100
26	0.0	100	138	0.0	100
27	14.3	100	140	12.5	33.3
28	20.0	100	141	28.6	100
31	90.0	100	142	0.0	100
33	87.5	100	145	0.0	0.0
35	0.0	75.0	146	0.0	80.0
38	100	100	147	0.0	100
50	0.0	80.0	150	12.5	100
51	0.0	80.0	157	100	100
55	0.0	100	159	100	100
57	0.0	80	161	0.0	100
60	0.0	100	163	0.0	75.0
78	100	100	167	0.0	80.0
80	0.0	100	168	90.0	100
81	0.0	75.0	171	0.0	100
82	100	100	172	88.9	100
83	100	100	174	0.0	100
86	100	100	175	22.2	100
87	100	100	176	0.0	33.3
89	0.0	60.0	177	0.0	100
90	0.0	20.0	183	10.0	100
92	90.0	100	192	50.0	100
93	0.0	100	193	100	100
94	14.3	80	195	22.2	100
97	50.0	100	201	0.0	100
100	0.0	100	205	20.0	100
104	0.0	40.0	211	0.0	100
109	100	100	212	100	100
110	0.0	100	214	100	100
115	0.0	60.0	101	10.0	100
116	9.1	100	106	0.0	100

채소과 보유품종 23계통을 대상으로 과종 후 30일경 본엽 4~6매 단계의 유묘기에 풋마름병 (*Ralstonia solanacearum*, 10^{7-8} cfu/ml, WR-1)을 접종하여 최종적으로 13RR 등 4계통을 선발 하였음(표 15, 그림 35).

표 15. 고추 풋마름병 접종결과

번호	B.N.	조제번호	등 급(이병개체수)					이병지수	비고
			←강		→약				
			1 ^z	2	3	4	5		
1	홍연	35024-131(08)	6	3				2.3	육성계통
2	적영	35027-54	2	2			6	4.0	육성계통
3	홍선	35052-62	5	1	1	3		3.2	육성계통
4	생력 211	8NS 1	1	1	1	7		4.4	육성계통
5	생력 213	8NS 15	5	3		2		2.9	육성계통
6	생력 214	8NS 31	3	1	1	5		3.8	육성계통
7	생력 216	8NS 39	1		4	5		4.3	육성계통
8	원강 3호	8NS 112	1	5	3		1	2.5	육성계통
9	원강 4호	11NHS 4		4	4		1	2.8	육성계통
10	13RR 1	82PR9	4		3		3	2.8	육성계통
11	13RR 2	82PR 27			2	6	2	4.0	육성계통
12	13RR 3	82PR 31			6	1	3	3.7	육성계통
13	13RR 4	82PR 48			4	1		3.2	육성계통
14	13RR 6	82PR 54		1	6	2	1	3.3	육성계통
15	13RR 7	82PR 94		1	7	1	1	3.2	육성계통
16	13RR 8	82PR 115		8		1		2.2	육성계통
17	13RR 9	82PR 120			7	1	2	3.5	육성계통
18	13RR 11	82PR 37			5	1	4	3.9	육성계통
19	13RR 13	82PR 66		1	8		1	3.1	육성계통
20	13RR 14	82PR 74			7	3		3.3	육성계통
21	13RR 15	82PR 90		1	8	1		3.0	육성계통
22	13RR 16	82PR 102	4		3	1	2	2.7	육성계통
23	-	82PR 46			5	3	1	3.6	육성계통
24	시판대비	이병성대비					10	5.0	시판대비
25	시판대비	저항성대비		7	3			2.3	시판대비

^z 1 : 증상 없음, 2 : 1~2개의 잎이 시듦, 부분적으로 잎이 시듦, 3 : 2~3개의 잎이 시듦, 4 : 전체 잎이 시들거나 줄기 일부 갈변, 5:모든 잎이 시들고, 줄기가 꺾이거나, 갈변 고사



그림 35 평가 계통들의 접종 후 10일 후 모습

(2) 착과력 및 수량이 우수한 계통선발

총 34점의 고추 유전자원 및 보유 계통의 착과력 및 수확량 및 포장병해 저항성을 평가하여 8점의 우수자원을 선발하였음(표 16, 그림 36).

표 16 평가자원들의 수확량 및 포장병해조사

계통명	수확량(10a/kg)			Powdery midewz	Virus
13RS 1	1244.2	±	867.1	중	중
13RS 2	940.7	±	410.1	중강	중
13RS 3	1624.4	±	1215.7	중강	중
13RS 4	1853.1	±	159.2	중	중
13RS 5	1694.2	±	396.1	중	중
13RS 6	681.9	±	119.1	중약	중
13RS 7	1110.7	±	73.8	중강	중
13RS 8	1444.8	±	189.7	중약	중
13RS 9	276.3	±	174.3	중약	약
13RS 10	482.9	±	85.8	중약	중
13RS 11	504.1	±	80.4	중약	중약
13RS 12	730.1	±	46.2	중강	중강
13RS 13	393.8	±	46.1	중	중강
13RS 14	1101.6	±	331.1	중약	중
13RS 15	1739.3	±	514.5	중약	중약
13RS 16	696.1	±	488.2	중약	약
13RS 17	1073.5	±	209.6	중약	중강
13RS 18	1412.3	±	86.0	중약	중
13RS 19	1456.7	±	385.7	중약	중약
13RS 20	318.8	±	97.0	중약	중약
13RS 21	735.7	±	90.3	중	중강
13RS 22	591.7	±	285.9	중약	중약
13RS 23	508.6	±	225.0	중약	중약
13RS 24	448.5	±	168.9	중약	중강
13RS 25	467.6	±	142.0	약	중약
13RS 26	569.4	±	124.4	약	약
13RS 27	661.2	±	49.9	중약	약
13RS 28	785.3	±	307.3	중약	약
13RS 29	647.1	±	286.9	중약	중약
13RS 30	1164.5	±	133.7	중약	약
13RS 31	882.4	±	104.2	중약	중약
13RS 32	2645.9	±	786.0	중약	중약
13RS 33	7.0	±	4.6	중강	약
13RS 34	15.6	±	18.5	중강	극약
슈퍼비가립	1404.1	±	190.7	중약	중약
슈퍼마니파	512.2	±	119.5	중약	중약



그림 36 선발된 8자원의 원예적 특성

(3) 불량환경(저온)에 저항성인 계통 수집, 평가 및 선발(1차년도)

유묘 내저온성 평가 결과 13GF7(Zhelty, 러시아 도입)이 자엽낙엽율이 20% (5℃), 0% (10℃)로 가장 강하게 나타남(표 17).

표 17 고추 계통 및 유전자원, 시판종의 내저온성 평가 결과(5℃, 10℃)

BN.	자원 및 품종명	자엽낙엽율(%)		본엽잎마름율(%)	
		5℃	10℃	5℃	10℃
13GF1	바르가르스키타쉬켄트	100.0	77.8	100.0	44.4
13GF2	디르미아이	100.0	100.0	80.0	66.7
13GF3	디르미아이	100.0	100.0	100.0	77.8
13GF4	우즈벡(SP)	100.0	90.0	70.0	20.0
13GF5	미상	100.0	80.0	75.0	20.0
13GF6	66	100.0	20.0	100.0	100.0
13GF7	Zhelty	20.0	0.0	100.0	20.0
13GF8	Sweet	100.0	60.0	80.0	80.0
13GF9	Hot Piman	100.0	66.7	100.0	100.0
13GF10	Oranjevyi kvadrat	50.0	20.0	100.0	100.0
13GF11	Shokoladnyi	100.0	0.0	100.0	75.0
13GF12	Osh-kosh	60.0	0.0	100.0	50.0
13GF13	Solnyshko	100.0	50.0	100.0	100.0
13GF14	Rubinobyi	100.0	0.0	100.0	80.0
13GF15	Oranjevyi rannii	66.7	66.7	100.0	100.0

13GF16	Indalo	100.0	66.7	100.0	100.0
13GF17	Rubinovy	100.0	90.0	100.0	100.0
13GF18	RPK-211	100.0	66.7	100.0	100.0
13GF19	C00873	100.0	66.7	100.0	100.0
13GF20	Samotsvet	100.0	90.0	100.0	100.0
13GF23	YT176	100.0	60.0	100.0	100.0
13GF24	녹광	100.0	40.0	100.0	80.0
13GF25	탄탄대목	100.0	12.5	100.0	100.0
13GF26	무한질주	100.0	75.0	100.0	100.0
13GF27	생력211	100.0	44.4	100.0	88.9
13GF28	생력213	100.0	12.5	90.0	0.0

나. 다양한 고추 도입 유전자원 평가 및 선발 (2차년도)

(1) 중국 도입유전자원에 대한 역병 및 풋마름병 저항성 평가

1차년도에 이어 새로운 역병 및 풋마름병 자원 탐색을 위해 2014년 중국도입 유전자원 47점 및 이병성, 저항성 대조품종을 대상으로 유묘기 역병, 풋마름병 인공접종을 실시한 결과 발병지수는 1.6(강)~5.0(약) 사이에 다양하게 분포하였음(표18). 풋마름병 유묘검정결과 발병지수가 2.1이하이면서 포장 원예적 특성평가 결과가 양호하였던 15FS22등 6계통, 역병 접종결과 발병지수가 2.3 이하이면서 포장 원예적 특성평가 결과가 양호하였던 15FS29등 7계통을 선발하였음(표 18, 19, 20, 그림 37, 38). 선발된 자원들은 병저항성 및 원예적 특성을 고정, 세대진전하여 고추 역병 및 풋마름병 저항성 재료로 사용하고자 함.

표 18 평가자원들의 유묘기 풋마름병, 역병 접종 결과

B. N.	cultivar	Disease Index ^z	
		풋마름병	역병
15FS 21	傲雪40	2.5	4.4
15FS 22	傲雪八号	1.8	4.4
15FS 23	香辣28	2.5	2.9
15FS 24	傲雪19	2.8	4.4
15FS 25	魔味	3.6	4.6
15FS 26	傲雪綠美	2.7	4.6
15FS 27	傲雪119F1	3.4	4.8
15FS 28	超8号	4.2	4.1
15FS 29	傲雪118	2.4	2.1
15FS 30	傲雪114	4.4	2.2
15FS 31	辣美人	3.8	2.6
15FS 32	黄帥	4.4	5.0
15FS 33	好又多	4.2	4.6
15FS 34	傲雪139 F1	4.0	4.2
15FS 35	傲雪椒美	3.3	5.0

15FS 36	靑龍318	3.7	4.9
15FS 37	荷蘭牛角椒	3.1	5.0
15FS 38	超越巨椒	4.8	4.8
15FS 39	陝甘螺絲王	3.0	4.9
15FS 40	巨星薄皮	3.6	5.0
15FS 41	超級辣旋風	4.2	1.8
15FS 42	龍主角	3.3	5.0
15FS 43	Bao8歐	4.5	2.3
15FS 44	維納斯	4.7	5.0
15FS 45	黃金216	4.2	4.9
15FS 46	貢品港椒	3.6	1.6
15FS 47	超級麻辣	4.8	4.9
15FS 48	南韓朝天椒	4.0	4.9
15FS 49	至尊紅	4.5	4.8
15FS 50	大聖牛椒	3.2	5.0
15FS 51	雄亮美人椒	2.6	2.0
15FS 52	華爲8호	5.0	4.9
15FS 53	香胞白米椒	1.9	3.5
15FS 54	單生香辣F1	2.4	3.3
15FS 55	曉春五号	4.8	5.0
15FS 56	芙湖椒霸	5.0	5.0
15FS 57	千里紅	2.0	5.0
15FS 58	精品喜洋洋	2.0	4.9
15FS 59	威獅1号	2.1	5.0
15FS 60	中椒107号	4.2	5.0
15FS 61	方正一号	3.1	5.0
15FS 62	中椒7号	3.5	2.9
15FS 63	湘辣17号	1.6	2.1
15FS 64	杭椒一号	4.1	4.8
15FS 67	傲雪斯特	2.8	4.9
15FS 68	S con.(긴초왕)	4.0	3.1
15FS 69	R con.(코네시안햇)	1.0	-
15FS 70	mR con.(원강3호)	2.2	1.0
15FS 71	R con.(무한질주)	-	1.0

^z disease index : 1(저항성)-5(감수성)1.9

표 19 풋마름병 저항성 자원의 원예적 특성

과종명	초형	꽃색	청과색	숙과색	숙기	피저바스	바이스	세균성 세점무늬 병	과중 (g)	과장 (cm)	과폭 (mm)
15FS 22	반개장	흰색	녹색	적색	중만생	중약	중약	중	18.4	21.8	14.2
15FS 53	반개장	흰색	연황색	적색	중만생	중강	중강	중강	2.9	5.4	11.3

15FS 57	반개장	흰색	진녹색	적색	중만생	중약	중강	중약	2.9	6.4	8.3
15FS 58	반개장	흰색	연녹색	적색	중생	약	약	약	35.4	17.6	30.4
15FS 59	반개장	흰색	녹색	적색	중생	약	약	약	50.1	14.8	30.4
15FS 61	반개장	흰색	녹색	적색	중만생	중약	약	약	146.8	7.2	75.9
15FS 62	반개장	흰색	녹색	적색	중	약	약	약	85.3	5.8	73.0
15FS 63	반개장	흰색	녹색	적색	중만생	중약	약	중강	14.1	15.4	12.2



그림 37 풋마름병 저항성 선발계통들의 생육 상황 및 착과모습

표 20 역병 저항성 자원의 원예적 특성

과종명	초형	꽃색	청과색	숙과색	숙기	괴저바 이러스	바이 러스	세균성 점무늬병	과중 (g)	과장 (cm)	과폭 (mm)
15FS 29	반개장	흰색	녹색	적색	중생	중	중강	강	11.5	16.9	12.4
15FS 30	반개장	흰색	녹색	적색	중생	중약	중약	중강	16.5	18.2	14.2
15FS 41	반개장	흰색	진녹색	적색	중생	중	약	중강	32.2	8.0	30.6
15FS 43	반개장	흰색	녹색	적색	중만	약	약	약	49.0	6.1	58.9
15FS 46	반개장	흰색	진녹색	적색	중생	중	중강	약	14.6	5.8	24.6
15FS 51	반개장	흰색	진녹색	적색	중만생	중약	약	중강	5.2	9.7	9.7
15FS 63	반개장	흰색	녹색	적색	중만생	중약	약	중강	14.1	15.4	12.2



그림 38 역병 저항성 선발계통들의 생육 상황 및 착과모습

(2) 다양한 유전자원 도입 및 평가 (영양고추연구소)

중국과 멕시코에서 수집한 일반종을 비롯해 인도, 르완다, 한국, 에티오피아, 인도네시아로부터의 고추 90점의 유전자원을 대상으로 평가함(표 21). 경북 영양지역에서 비가림 재배로 1열재배하여 유전자원의 증식 및 특성평가를 수행하였음. 주요 원예적 형질에 대해 고추 유전자원 특성조사요령 (국립농업유전자원센터)기준에 따라 생육단계별로 특성평가. 형태적 특성 이외에 자원의 활용성을 높이고자 매운맛, 색도 등의 품질특성과 포장바이러스 내병성을 비롯해 선발된 자원의 고추 주요병에 대한 유전자형을 검정하였음(그림 39).

이미지 정보는 생육단계별로 식물체, 착과상태, 과실모양으로 작성하였다. 종자 증식은 자원당 6000립을 기준으로 채종하였음.

○ 경종개요

과종	정식	수확	비고
2/6	4/23	8/25 (1차), 9/19 (2차)	1열 재배, 100*40 cm

○ 시험내용

시험내용	비고
원예적 형질조사	15건 (양적형질 4건, 질적형질 11건)
이용성 평가	품질특성 (매운맛, 색도, 당함량), 내병성 (바이러스, 역병 등)
이미지 정보작성	3건 (식물체, 착과상태, 과실모양)
종자 채종	6000립/자원 기준



그림 39 육단계별 특성평가 및 이미지 정보작성

표 21 평가를 수행한 고추유전자원 목록 (영양)

자원명(기타명)	수집지	자원명(기타명)	수집지	자원명(기타명)	수집지
-(울릉도1)	한국	47#	중국	괴산3	한국
-(울릉도2)	한국	19#	중국	괴산4	한국
-(멕시코 A)	멕시코	L392	중국	괴산5	한국
-(멕시코 B)	멕시코	한국소미라	중국	괴산6	한국
-(멕시코 C)	멕시코	남한미라방	중국	-(운남성고색도)	중국
-(멕시코 D)	멕시코	재부초	중국	-(관상)	중국
-(멕시코 E)	멕시코	풍수6호	중국	290-2-S	중국
-(멕시코 F)	멕시코	풍수5호	중국	0303324-3-S	중국
-(멕시코 G)	멕시코	천하무적	중국	0305353-2	중국
-(멕시코 H)	멕시코	궁기	중국	399169	중국
-(멕시코 I)	멕시코	신풍5호	중국	1399154	중국
10-2	중국	신여운관군	중국	0399163-s	중국
-(멕시코 청)	멕시코	야본1호	중국	399231	중국
yun dried chili no.4	중국	중화대초	중국	0399237-s	중국
SWEET PEPPER YELO WONDER	에티오피아	329S-2-S	중국	310599	중국
운남성 주주	중국	303313	중국	310600	중국
-(르완다 1)	르완다	305353	중국	310653	중국
-(르완다 2)	르완다	305432	중국	311734	중국
LONG SLIM CAYENNE	르완다	305433	중국	311742	중국
CAP TUGU JOGJA CABE	인도네시아	-(운남성재래종)	중국	311744	중국

MARAH GANTARI					
0303309	중국	-(운남성재래종)	중국	311745	중국
0303319	중국	-(운남성재배종)	중국	311746	중국
0303324	중국	-(인도1)	인도	311747	중국
0303325	중국	-(인도2)	인도	311753	중국
0304345	중국	-(인도3)	인도	311754	중국
0305346	중국	-(운남성재래종)	중국	311755	중국
0305347	중국	-(재래종)	중국	311756	중국
0305426	중국	-(시판종)	중국	311759	중국
L002	중국	-(괴산1)	한국	0399060-1	중국
77#	중국	-(괴산2)	한국	0307489-2	중국

유전자원 90점을 재료로 미발아 5점을 착과불량 1점을 제외, 분리자원 4점을 포함하여 총 88점을 증식 및 특성 평가함(표 22). 종을 구분하였을 때 *C. annuum* 79점, *C. chinense* 1점, *C. frutescens* 4점, *C. baccatum* 1점으로 분류되었음. 이 중에서 가공용, 건과용, 생과용, 관상용으로 구분하여 11점을 선발하였음(표 22-27, 그림 40).

표 22 유전자원의 구분

자원수	원산지	종구분	발아여부	균일성
90점	멕시코 : 10점 르완다 : 3점 중국 : 64점 한국 : 8점 인도 : 3점 에티오피아 : 1점 인도네시아 : 1점	<i>C. annuum</i> : 79점 <i>C. chinense</i> : 1점 <i>C. baccatum</i> : 1점 <i>C. frutescens</i> : 4점	미발아 : 5점 발아: 65점 미착과:1점	혼종 : 7점 균일 : 78점

표 23 유전자원의 생육 및 식물체 특성

자원수	생장습성	초장	수술색	화색
88점	직립 : 50점 반개장 : 30점 개장 : 8점	100cm이하 :8점 101-150cm : 39점 151-200cm : 39점 200cm이상: 1점	자색 : 37점 황색 : 4점 청색 : 47점	흰색 : 79점 담녹 : 4점 자색 : 3점 황색 : 1점 황색점 : 1점

표 24 유전자원의 과실특성

자원수	과장	과형	착과방향	미숙과색	숙과색
88점	0-2 cm: 6점 2-5 cm: 8점 5-10 cm: 16점 10 cm이상:58점	원추형 : 18점 장원추형 : 52점 종형 : 1점 편구형 : 8점 기타 : 9점	상향 : 12점 하향 : 69점 상향+하향 : 9점	담녹 : 13점 농녹 : 3점 녹색: 68점 자색 : 3점 황색 : 1점	적색 : 88점

표 25 유전자원의 품질분석

자원수	색도 (ASTA)	매운맛 함량 (mg/100g)
88점	100미만 : 58점 100-130 : 15점 130-160 : 10점 160 이상 : 3	0-30미만 : 68점 30-60 : 5점 60-90 : 6점 90이상 : 8

자원번호	자원명	색도(ASTA)	매운맛(mg/100g)	당함량(%)
14YA005	310599	191	13	-
14YA008	311734	157	66	-
14YA009	311742	192	7	-
14GR034	한국소미라	52	199	6.9
14GR035	남한미라방	54	223	6.4
14GR036	재부초	48	252	5.0

표 26 주요 유전자원의 내병성 검정

자원번호	자원명	포장바이러스	기타 내병성
14GR057	중국재래종	강함	CMV, ChiVMV, Phyto, BS3
14GR041	신평5호	강함	TMV, BS3
14GR043	야본1호	강함	CMV, TMV, BS3
14YA012	311746	약함	Phyto
14YA014	311753	약함	Phyto, BS3

표 27 선발 유전자원의 특성

자원번호	자원명 (기타명)	자원 구분	과크기 (cm×mm×mm)	주요특성	용도
14GR018	르와다2	유전자원	4.9×4.0×2.5	신미강, 풍미 우수 C.c, 중간색 : 살구색	가공용
14GR036	재부초	F1	15.0×3.0×2.5	착과 및 풍미우수, Cf	가공용
14GR005	멕시코C	유전자원	15.0×3.1×2.5	매운맛 강	건과용
14GR006	멕시코D	유전자원	14.6×1.6×1.8	신미강, 고색도	건과용
14GR010	멕시코H	유전자원	11.1×8.6×1.1	매운맛, 고색도	건과용
14GR032	19#	유전자원	8.5×2.8×3.1	식미감 우수, 수분함량 많음	생과용
14GR039	천하무적	유전자원	22×1.2×2.1	매운맛	생과용
14YA005	13150	유전자원	18×1.4×1.6	매운맛, 고색도, 착과우수	생과용
14YA014	13159	유전자원	12×1.2×1.6	매운맛, 고색도	생과용
14GR057	중국재래종	유전자원	18.6×1.3×1.5	바이러스강, 매운맛, 착과우수	생과용
14GR001	관상1	유전자원	1.1×1.5×1.7	과형원형, 화색흰색	관상용



14GR018



14GR036



14GR005



14GR006



14GR010



14GR057



14YA005



14YA014



14GR032



14GR039

그림 40 주요 선발유전자원

다. 내서성, 내습성 등 환경저항성 평가 및 선발(위탁 1차년도)

AVRDC 도입 내서성 자원 9점 및 시판품종 30점을 대상으로 고온내성을 평가하였음. 고온 시설 내 낮 최고온도 평균은 35.5℃로 일평균 25.9℃에 비해 10℃정도 높게 유지되었음(그림 41). 고온 시설 내에서 재배한 평가계통들의 10 a당 수확량은 내서성 선발자원 9점 중 15HT3번이 2,034kg/10a로 가장 높았으며 시판품종 30점 중 15HT38 (NW비가림)이 2,741 kg /10 a로 가장 높은 수확량을 보였음(표 28).

같은 공시재료를 노지에서 관행적으로 재배한 결과 대부분 시설에서 재배하였을 때 수확량이 높았으나 15HT5, 16, 17의 경우 상대지수 (시설내수확량/노지수확량*100)을 평가한 결과 각각 31.6, 72.5, 42.0으로 노지수확량 보다 시설내 수확량이 크게 떨어지는 것을 확인하였으며 (표 28, 그림 42, 43), 15HT5번은 지난해 시설에서 수확량이 높아 선발한 품종이었으나, 올해 시설 내 특히 물빠짐이 불량한 곳에 재식한 것이 영향을 미칠 수 있었을 것으로 판단됨.

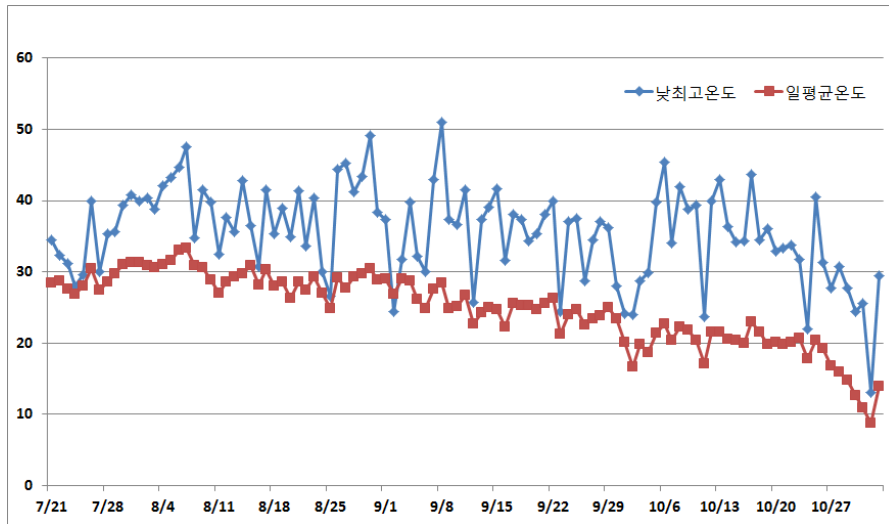


그림 41 고온시설 내 낮 최고온도와 일평균 온도

표 28 내서성 평가 자원 및 시판품종의 과실특성 및 수량성 평가

품종명	과중 (g)	과장 (cm)	과경 (mm)	수확량 (kg/10a)	ASTA value	비고
15HT 1	25.9	17.8	21.0	1,045.0	83.5	
15HT 2	14.7	11.3	18.6	1,894.3	65.7	
15HT 3	14.2	11.3	17.6	2,034.0	97.3	
15HT 4	12.9	14.4	15.1	762.9	42.2	
15HT 5	8.6	11.6	12.9	585.2	89.0	내서성 선발자원
15HT 6	14.8	16.1	15.2	1,116.3	92.7	
15HT 7	12.8	13.6	14.7	925.3	39.1	
15HT 8	17.1	14.7	15.8	1,155.2	1.6	
15HT 9	15.6	16.5	14.7	783.8	24.5	
15HT 10	9.6	10.1	15.6	741.0	74.1	시판품종

15HT 11	17.7	12.4	19.9	1,108.7	103.8
15HT 12	22.8	15.2	19.7	1,329.1	77.4
15HT 13	15.8	11.6	21.1	1,443.1	74.6
15HT 14	20.6	14.4	22.1	1,844.0	110.5
15HT 15	15.4	11.6	17.6	957.6	90.1
15HT 16	9.6	11.2	16.9	933.9	117.1
15HT 17	14.1	13.2	17.4	1,238.8	71.5
15HT 18	14.6	12.7	19.1	1,297.7	110.7
15HT 19	16.6	12.3	20.4	1,412.7	99.4
15HT 20	12.1	11.1	18.3	1,637.8	100.0
15HT 21	13.0	10.7	19.2	1,193.2	102.7
15HT 22	17.2	13.4	20.5	1,153.3	110.0
15HT 23	9.0	11.4	14.5	1,292.0	67.4
15HT 24	15.5	14.0	19.5	976.6	105.5
15HT 25	16.4	12.0	18.7	960.5	90.0
15HT 26	16.5	12.1	17.6	1,140.0	93.8
15HT 27	13.9	12.0	17.8	1,503.9	122.2
15HT 28	22.3	12.5	25.5	2,046.3	92.3
15HT 29	44.7	16.8	32.6	1,426.9	69.2
15HT 30	18.6	11.8	20.9	1,162.8	98.7
15HT 31	9.7	10.1	17.0	1,331.9	92.5
15HT 32	31.9	17.0	20.3	1,613.1	96.3
15HT 33	18.8	6.5	25.5	1,320.5	92.1
15HT 34	7.8	8.5	16.2	439.9	105.0
15HT 35	6.6	8.8	14.3	1,216.0	67.8
15HT 36	20.1	12.5	19.4	1,660.6	92.8
15HT 37	28.2	15.2	20.6	1,740.4	88.0
15HT 38	30.5	15.3	26.6	2,741.7	92.2
15HT 39	12.6	12.3	16.2	743.9	121.3

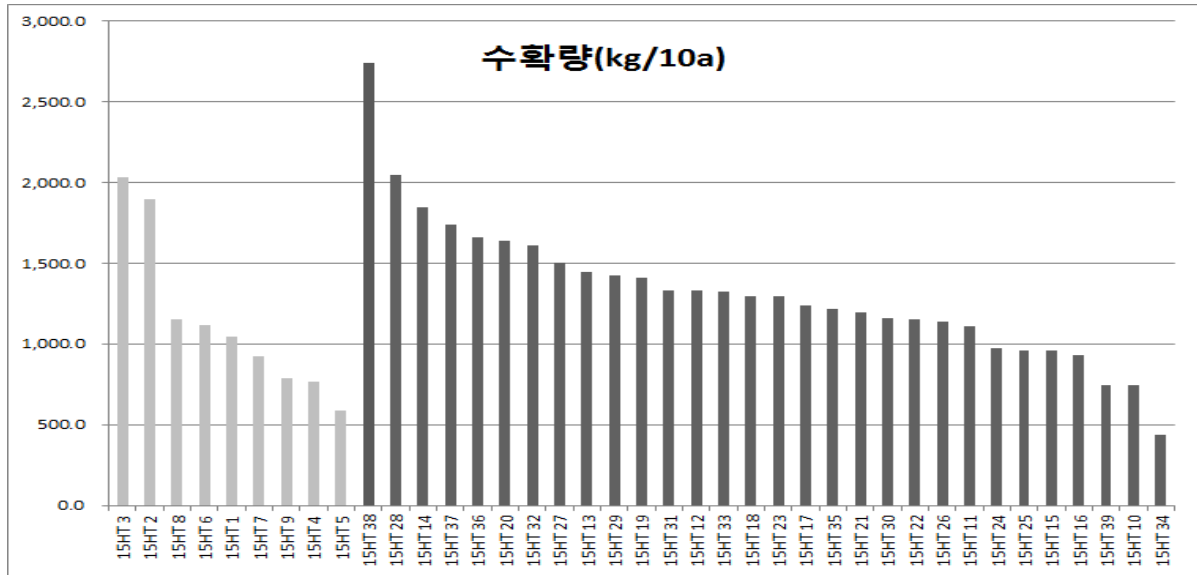


그림 42 고온조건 재배시 평가계통들의 수확량(kg/10a)



그림 43 선발계통들의 착과모습

내습성 고추 유전자원 선발을 위해 신규도입 유전자원 15FS21등 45점을 대상으로 유묘기 침수처리를 실시한 후 7일째 조사한 결과 신초고사 정도, 낙엽정도, 뿌리갈변정도 및 엽록소 수치 (SPAD)가 무처리구에 비해 감소율이 적었던 15FS21, 22, 38, 39, 57, 61등 6점을 유망자원으로 1차 선발하였음(표 29, 그림 44).

표 29 고추 유전자원의 유묘기 침수처리 결과(침수처리 1주일 후)

BN	신초 고사	낙엽 정도	뿌리 갈변정도	엽록소(SPAD)			비고	
				침수처리(A)	대조구(B)	A/B*100		
15FS 21	1	1	1	35.5	41.3	86.0	신규도입 자원	
15FS 22	1	1	1	29.8	34.3	86.9		
15FS 23	1	3	2	19.9	25.7	77.4		
15FS 24	1	3	2	12.6	22.5	56.2		
15FS 25	1	3	2	18.0	22.7	79.2		
15FS 26	1	2	2	18.0	18.6	96.6		
15FS 27	1	2	2	14.6	16.7	87.7		
15FS 28	1	2	2	20.6	19.0	108.4		
15FS 29	1	1	2	23.6	28.9	81.5		
15FS 30	1	1	1	25.5	30.6	83.3		
15FS 31	1	2	3	21.2	33.7	63.0		
15FS 32	1	3	4	20.2	23.3	86.7		
15FS 33	2	3	2	13.0	18.5	70.5		
15FS 34	3	3	2	17.5	24.0	72.7		
15FS 35	2	3	3	15.4	21.0	73.4		
15FS 36	2	2	3	16.7	19.7	85.0		
15FS 37	1	2	2	17.1	19.6	87.1		
15FS 38	1	1	1	18.8	19.9	94.4		
15FS 39	1	1	1	22.2	28.7	77.5		
15FS 40	1	1	2	22.5	23.0	97.8		
15FS 41	1	2	2	18.9	23.3	80.9		
15FS 42	1	2	3	18.8	23.7	79.2		
15FS 43	1	2	2	19.8	22.1	89.9		
15FS 44	1	2	2	16.5	20.4	81.0		
15FS 45	1	2	2	13.6	24.6	55.1		
15FS 46	1	2	2	20.1	17.6	114.6		
15FS 47	1	3	2	16.8	17.5	95.9		
15FS 48	1	3	3	13.7	21.5	63.7		
15FS 49	1	2	2	24.1	28.5	84.5		
15FS 50	1	2	2	14.8	20.5	72.3		
15FS 51	1	2	2	21.0	22.7	92.5		
15FS 52	2	2	2	9.2	21.1	43.6		
15FS 53	1	2	2	20.8	21.4	97.2		
15FS 54	1	2	2	22.0	23.3	94.4		
15FS 55	1	2	2	17.9	23.1	77.7		
15FS 56	1	2	3	21.0	34.5	60.9		
15FS 57	1	1	1	31.1	33.9	91.7		
15FS 58	2	2	2	13.9	18.6	74.9		
15FS 59	1	3	2	19.8	18.9	104.4		
15FS 60	1	2	2	19.2	19.5	98.4		
15FS 61	1	1	2	19.9	19.5	102.0		
15FS 62	1	1	2	19.3	20.1	95.9		
15FS 63	1	2	2	17.2	17.8	96.9		
15FS 64	1	2	2	16.8	18.4	90.9		
15FS 67	1	1	2	13.5	17.9	75.3		
PG14	1	1	1	33.0	33.5	98.4		저항성
PG17	1	3	2	11.9	33.8	35.1		이병성



그림 44 유묘기 침수처리 후 선발자원(처리 1주일 후)

라. 중국 도입 유전자원 F2세대 특성평가(위탁 2차년도)

중국 도입 F2집단 31계통을 3월 19일 파종 후 원예원 하우스에 5월 8일 정식하여 특성평가를 실시하였음(초기생육조사는 7월 8일에 실시).

중국 도입 품종들의 원예적 특성을 조사한 결과 식물체의 주간의 길이는 18.0~64.0 cm, 초장은 77.0~151.0 cm, 그리고 식물체의 하배축의 줄기 직경은 5.7~20.9 mm로 다양한 분포를 나타내었음. 중국 도입 F2집단의 과실의 주요 원예적 특성을 2014년 7월 8일경 조사하였음. 착과된 과실의 과중은 2.0~100.0 g, 과장은 1.9~24. cm, 과폭은 5.6~43.2 mm까지 다양한 과실 특성을 나타내었음(표 30-33, 그림 45-49).

표 30 중국도입 F2집단의 초기 원예적 특성조사 (14CH 1, 14CH10)

(14CH 1)				(14CH 10)			
번호	주간길이 (cm)	초장 (cm)	경경 (mm)	번호	주간길이 (cm)	초장 (cm)	경경 (mm)
1	30	105	13.7	1	30	125	15.1
2	29	112	17.0	2	39	132	12.6
3	47	142	15.3	3	28	120	13.7
4	30	131	15.4	4	32	118	14.5
5	37	133	15.0	5	40	124	13.4
6	64	125	18.6	6	35	128	10.0
7	30	136	15.1	7	38	145	13.1
8	46	122	13.5	8	29	116	12.5
9	36	127	14.6	9	39	147	16.6
10	44	110	14.5	10	28	137	10.8

11	20	129	13.2	11	36	128	11.3
12	49	133	17.0	12	33	109	15.0
13	28	132	14.3	13	36	129	12.8
14	34	103	13.3	14	38	127	12.4
15	24	119	13.9	15	33	128	14.4
16	33	132	19.1	16	35	117	12.8
17	28	129	10.6	17	33	138	14.0
18	25	141	13.8	18	30	133	12.9
19	29	128	18.7	19	27	111	7.2
20	33	130	12.1	20	35	109	14.8
21	31	136	15.9	21	33	128	13.7
22	28	147	13.3	22	34	106	12.2
23	42	135	13.1	23	40	143	14.1
24	29	125	16.0	24	31	125	13.7
25	26	134	14.8	25	27	119	13.8
26	28	145	14.4	26	28	130	6.9
27	37	147	16.6	27	32	133	13.9
28	40	146	12.0	28	36	113	14.3
29	42	145	16.7	29	32	131	12.1
30	25	129	17.3	30	27	126	13.5

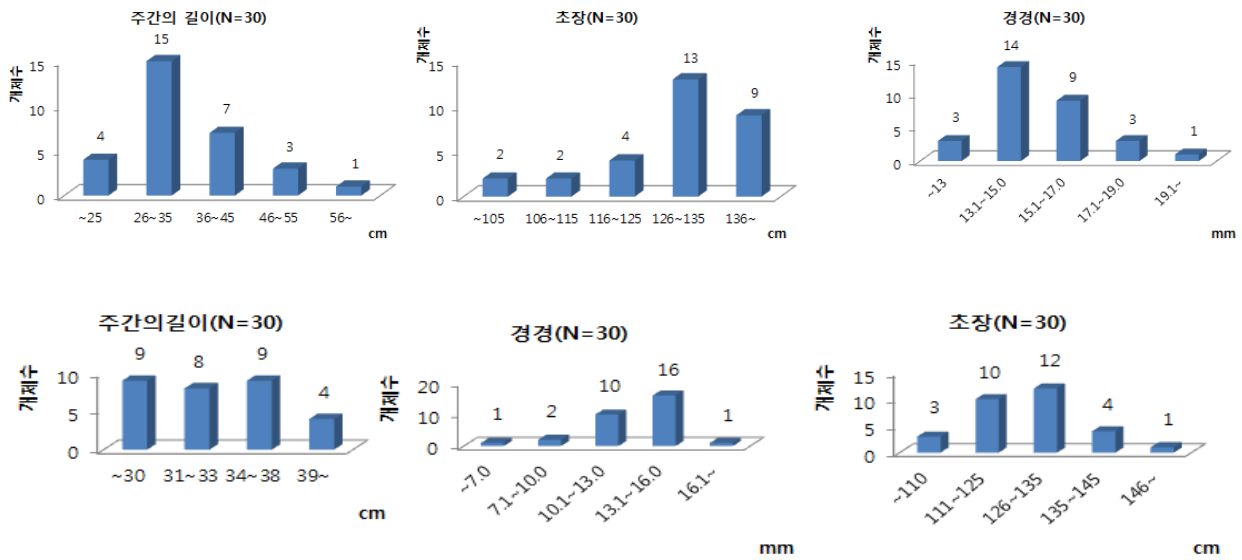


그림 45 중국도입 F2집단의 초기 원예적 특성조사 (14CH 1, 14CH10)

표 31 중국도입 F2집단의 초기 원예적 특성조사 (14CH 15, 14CH22)

(14CH 15)			(14CH 22)				
번호	주간길이 (cm)	초장 (cm)	경경 (mm)	번호	주간길이 (cm)	초장 (cm)	경경 (mm)
1	33	123	15.3	1	29	144	17.5
2	31	129	14.7	2	31	128	17.8
3	28	122	13.4	3	37	146	15.8
4	35	134	16.5	4	47	151	17.1
5	40	135	16.7	5	42	151	16.1
6	31	134	16.0	6	37	144	13.3

7	33	119	16.4	7	35	138	15.3
8	39	126	7.0	8	38	146	18.1
9	37	139	17.3	9	34	137	19.2
10	29	125	15.4	10	33	136	14.3
11	33	124	15.2	11	28	139	16.7
12	36	127	16.3	12	34	134	16.1
13	32	137	16.0	13	26	149	17.6
14	36	134	18.0	14	31	142	14.3
15	30	141	15.9	15	29	132	14.2
16	37	132	16.6	16	27	126	18.4
17	32	119	14.5	17	26	136	18.7
18	41	124	14.6	18	25	133	19.9
19	42	128	12.0	19	39	120	15.7
20	37	134	15.4	20	33	133	18.4
21	32	124	14.4	21	27	144	18.9
22	36	138	13.1	22	40	137	18.1
23	34	133	15.4	23	31	132	14.1
24	38	130	12.9	24	32	127	17.0
25	27	125	15.5	25	30	138	15.7
26	35	122	15.4	26	37	144	17.6
27	31	118	12.0	27	36	147	15.5
28	41	126	14.4	28	40	138	16.6
29	37	124	15.7	29	28	131	16.7
30	44	116	12.5	30	32	129	18.6

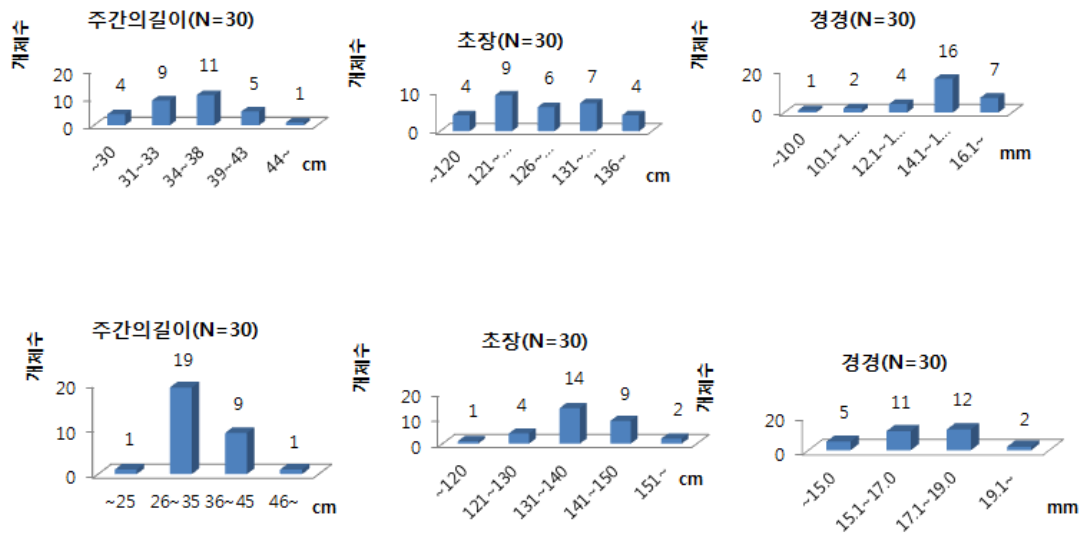


그림 46 중국도입 F2집단의 초기 원예적 특성조사 (14CH 15, 14CH22)

표 32 중국도입 F2집단의 초기 원예적 특성조사 (14CH 25, 14CH30)

(14CH 25)	(14CH 30)
-----------	-----------

번호	주간길이 (cm)	초장 (cm)	경경 (mm)	번호	주간길이 (cm)	초장 (cm)	경경 (mm)
1	23	92	14.5	1	18	119	20.0
2	24	88	12.8	2	31	100	15.6
3	29	98	14.4	3	34	118	14.7
4	36	109	14.4	4	40	120	18.4
5	28	101	12.9	5	18	128	18.8
6	39	90	14.4	6	26	120	16.9
7	23	86	14.4	7	27	102	15.6
8	31	87	15.0	8	32	120	17.1
9	28	98	12.8	9	28	124	18.8
10	26	110	17.5	10	34	129	15.7
11	26	87	10.6	11	35	117	15.0
12	33	77	18.1	12	40	126	20.0
13	24	89	13.5	13	23	119	17.6
14	25	95	11.0	14	31	125	15.8
15	22	98	19.0	15	35	118	19.0
16	41	109	12.7	16	30	106	19.5
17	32	82	11.6	17	33	115	19.8
18	26	88	15.0	18	39	122	13.1
19	28	87	14.0	19	28	121	13.4
20	29	83	10.5	20	49	112	20.0
21	23	95	12.5	21	24	125	5.7
22	32	98	18.4	22	29	115	20.9
23	30	107	13.3	23	23	136	16.2
24	33	93	10.8	24	27	129	19.1

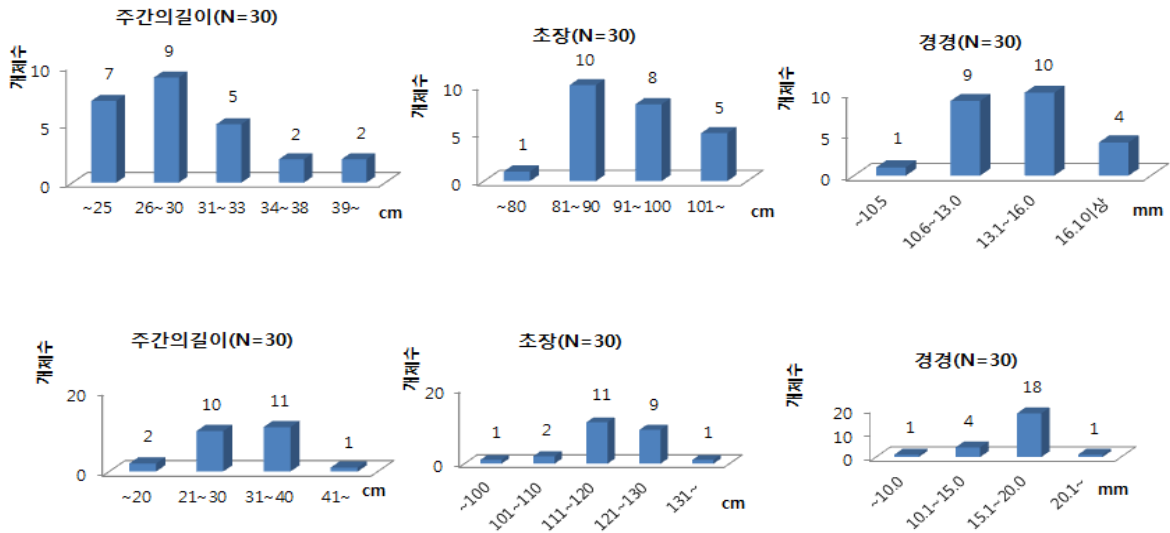


그림 47 중국도입 F2집단의 초기 원예적 특성조사 (14CH 25, 14CH30)

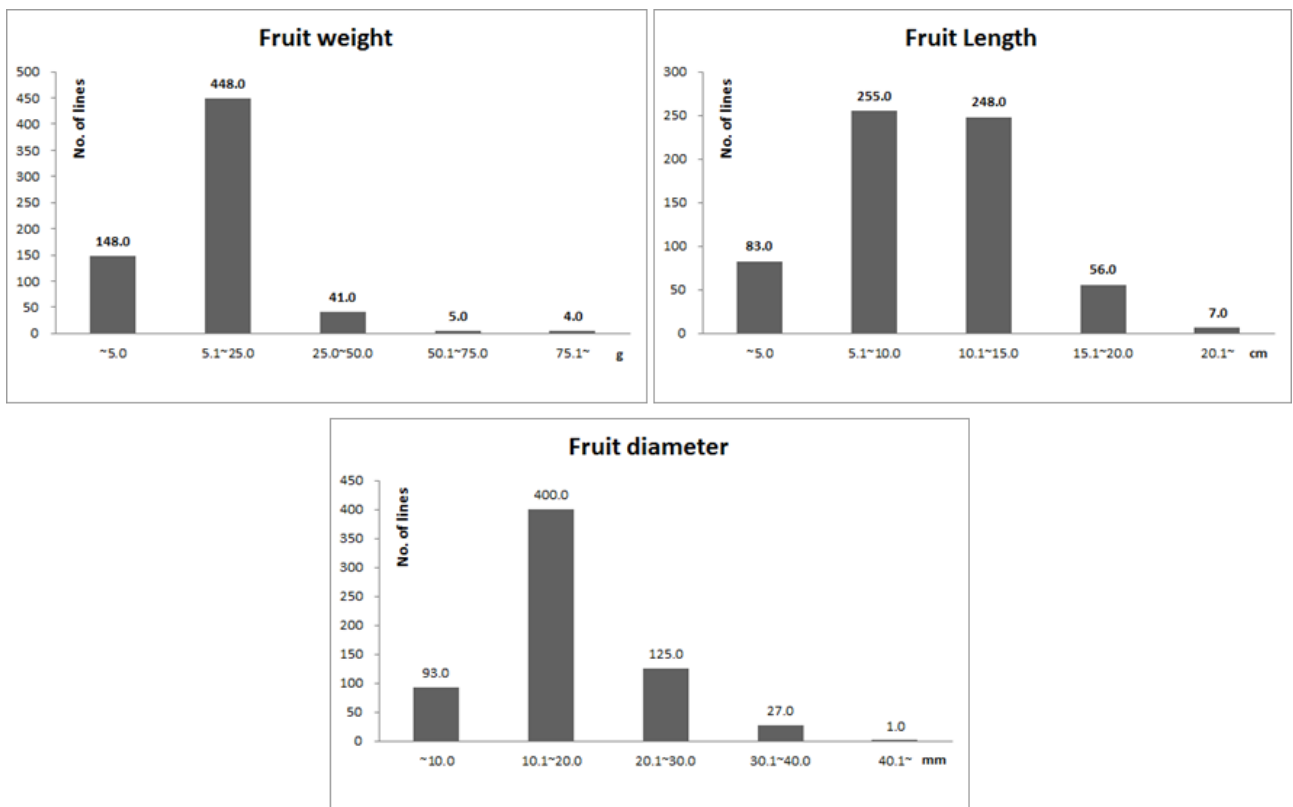


그림 48 중국 도입 F2 집단 of 과실의 원예적 특성

표 33 중국 도입 F2 집단의 주요 원예적 형질 비교

N.	Cultivar	No. of	Fruit direction			Immature color				Mature color			Flower color
			Down-right	Up-right	Inter-mediate	G	pG	dG	pY	R	Y	Or	W

		plant										
1	조천초16호	30		30		29	1			30		30
2	Huogu T JT86 Wans	30	30						30	30		30
3	Jim Tqi	30		30				30		30		30
4	DTHP 647	30		30		30				30		30
5	이서 고색소	28	24	2	2	28				28		28
6	BN 7337	28	28					28		28		28
7	H 11-19	30	20	10					30	24	6	30
8	BN 3047	30		30		30				30		30
9	8128	30	30			30				30		30
10	BN 3138	30	30					30		30		30
11	233	5	4		1	5				1	4	5
12	LS08	50	50			50				50		50
13	SLT	30	28	2		25	4	1		30		30
14	HOT 11	30	30					30		30		30
15	BF 885	30	30			30				30		30
16	H11-01	30		30		28	1		1	30		30
17	AP 102	28	28			28				28		28
18	대홍옥 바이러스	28	28			28				28		28
19	LS 02	30	30			30				30		30
20	취향	30	30			15	15			30		30
21	미인초	29	29			27		2		29		29
22	404	30	30			26		4		30		30
23	신시 3호	28	28				24		4	28		28
24	장복 12호	28	28			28				28		28
25	YYP 12	24		24		21		3		24		24
26	초왕	24		24		14	2	8		24		24
27	색소용	24	17	7		24				24		24
28	湘紅(상홍)404	24	24			22		2		24		24
29	仙女(신녀)	24		24		24				24		24
30	Ding Hong	24	24			24				24		24
31	IL 10	22		22		22				22		22

*G : Green, pG : pale Green, dG : dark Green, pY : pale Yellow, R : Red, Y : Yellow, Or : Orange, W : White



그림 49 중국 도입 F2 집단의 과실모양

표 34 수집된 유전자원의 주요 원예적 형질

전체주수	착과방향			청과색				숙과색			꽃색
	하	상	수평	녹색	연녹	진녹	연황	적색	황색	주황색	흰색
868	600	265	3	618	47	138	65	858	0	10	868
비율(%)	69.1	30.5	0.3	71.2	5.4	15.9	7.5	98.8	0.0	1.2	100.0

수집된 유전자원의 F2의 868주의 착과방향, 미숙과색, 숙과색, 꽃색을 조사하였음. 수집된 자원의 착과방향은 하향착과가 전체의 69.1%, 상향 30.5%, 수평 0.3%로 이었으며 미숙과색은 녹색이 전체의 71.2%, 진녹색 15.9%, 연녹색 5.4%, 연황색 7.5%로 나타났음(표 34). 숙과색은 98.8%가 적색, 주황색이 1.2%, 꽃색은 모두 흰색이었음. 우수한 분리계통은 형질고정 및 종자 확보 후 수출용 품종육성 재료로 사용하고자 하였음.

2. 고추 반수체 배양 기술 확립

가. 고추 약배양 기술 정립

(1) 고추 약배양 체계 확립(세부 1차년도)

국립원예특작과학원 보유 다양한 특성을 지닌 유전자원 및 F1 조합 91점을 대상으로 약배양을 진행하였으며 1차년도에 약치상수 30,300여개를 실시하여 배상체 계대배양수 2,394개를 획득하였음(그림 50, 51).

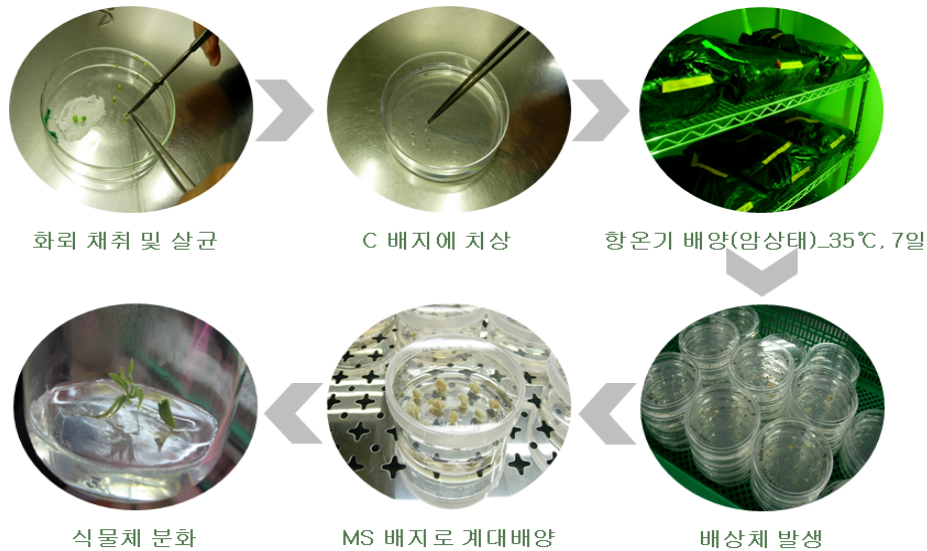


그림 50 고추 약배양 체계도

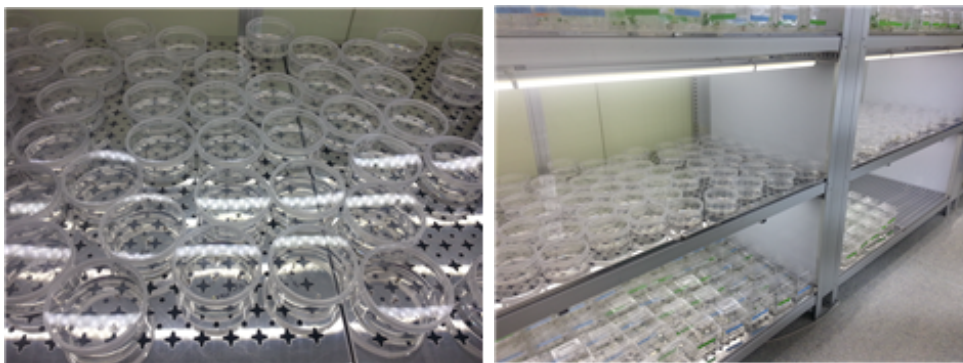


그림 51 고추 약배양

약배양시 배발생 유도에 사용되는 C medium은 배발생율은 좋으나 배지 조제에 많은 시간이 소요되어 효율을 높이기 위해 Medium C solution을 사용하여 배양 효율성을 증진하였음. 원예원 보유 다양한 특성을 지닌 유전자원 및 F1 조합 91점 대상으로 약배양을 진행하였음. 1차년도 수행한 약치상 30,300개중 주요 형질별 획득한 계통별 배발생 현황은 표 35와 같음.

표 35 주요 형질별 계통 배발생 현황

BN	치상약수	배발생수	배발생율(%)	비고
13AA1	2165	58	2.68	탄저병 저항성
13YT2	865	66	7.63	역병 저항성
13YT85	1099	235	21.38	"
13YT106	988	49	4.96	"
13RR1	688	172	25.0	꽃마름병 저항성
13RR16	1193	138	19.95	"
13RS3	1111	178	16.02	집중착과형
13RS4	1218	118	9.69	"
13RS15	1816	93	5.12	"
13C4	1278	206	16.12	시관중
13C8	619	9	1.45	"

(2) 고추 약배양을 통한 DH 계통 개발(세부 2차년도)

2차년도에는 시관중을 중심으로 약배양을 수행하였으며, 배발생을 거쳐 순화된 식물체를 14CV1 유래 등 총 6개체였음(표 36, 그림 52).

표 36 계통별 약치상 현황 및 식물체 획득수

계통명	총치상갯수	총켈러스발생율	총배발생	총배발생율	순화
14CV 1	213	11.9	3	1.4	1
14CV 2	255	4.8	0	0.0	
14CV 3	294	8.5	1	0.3	
14CV 4	287	1.3	0	0.0	
14CV 5	260	8.1	5	2.1	2
14CV 6	212	6.1	0	0.0	
14CV 7	209	15.4	5	2.1	2
14CV 8	221	11.3	0	0.0	
14CV 9	185	15.7	0	0.0	
14CV 10	233	11.8	0	0.0	
14CV 11	256	18.5	1	0.3	
14CV 12	299	11.5	0	0.0	
14CV 13	301	15.1	1	0.3	
14CV 14	274	7.1	2	0.5	1
14CV 15	242	12.6	0	0.0	
14CV 16	314	21.0	0	0.0	

14CV 17	298	19.3	0	0.0	
14CV 18	209	32.8	2	0.9	
14CV 19	140	6.2	0	0.0	
14CV 20	179	20.0	0	0.0	
14CV 21	184	10.9	0	0.0	
14CV 22	228	20.9	0	0.0	
14CV 27	269	18.4	3	1.1	
14CV 28	206	10.1	0	0.0	
14CV 29	227	6.7	0	0.0	
14CV 30	194	8.0	0	0.0	
14CV 31	155	10.1	0	0.0	
14CV 32	159	10.2	0	0.0	

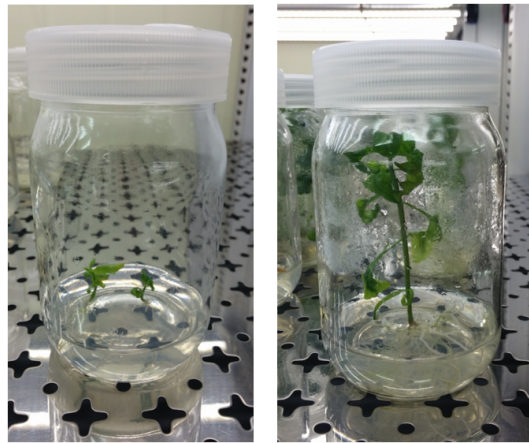


그림 52 약배양을 통해 획득한 반수체 식물

나. 고추 소포자 배양 기술 확립

(1) 고추 소포자 배양 시도 및 기술습득(세부 2차년도)

기존에 발표된 논문 및 특허를 참고로 하여 소포자 배양 기술을 정립하여 다음의 방법으로 계통별 소포자 배양 실시하였음(그림 53). 고추 탄저병 저항성 F3세대 10집단 및 시판품종 9점을 재료로 하여 소포자 배양을 실시하였으나, 겨울철 화분의 활력이 상대적으로 낮아 최종적으로 배양된 plate는 적었음(표 37). 기관이전에 의한 모식물의 생육조건 변화 등 다양한 변수가 소포자 배양의 발생효율에 영향을 미쳤을 것으로 예상됨.

1. 꽃봉오리:
1/4-3/4 보라색 약, 길이 2-3mm
2. 멸균:
2% NaOCl 10분 → 멸균수로 3분씩 4회 수세
3. 소포자 나출:
30-35개의 flower bud를 10mL의 전처리 배지에 넣고, 20mL의 waring microblender의 고속(약 18,000rpm)으로 5초씩 2회 → 50mL centrifuge tube에 옮긴 후, vortexing(high speed, 5,000rpm에서 15/20초씩 2회 실시)
*전처리 배지: 0.37M mannitol+ NLNS
4. 수확 및 수세: 75와 38 μ m체로 체세포 조직 파편들과 소포자 분리
*소포자의 분리: 700rpm에서 7분, 15 $^{\circ}$ C
소포자의 수세: 전처리 배지로 700rpm에서 7분씩 2회 실시
5. 전처리: 소포자 농도 $18 \times 20 \times 10^4$ (200,000개)/mL
*90x20mm petri dish에 9-10mL씩 분주, 파라필름 밀봉 후 → 건조 막기 위해 멸균된 적신 filter paper가 들어있는 140*20mm petri dish에 넣어 다시 파라필름으로 밀봉 후 → 31 \pm 1 $^{\circ}$ C, 암배양 3일 실시
6. 소포자 배양:
50mL centrifuge tube에 모아 1000rpm 5분 → NLNS 액체배지에 소포자의 밀도 8-10 $\times 10^4$ (약100,000개)/mL → 고체배지가 들어있는 petri dish에 1.5mL씩 분주
*하층 고체배지: 1/2NLNS + 2% sucrose + 0.4% phytigel → 고압멸균 후 7mL
상층 액체배지: NLN + 10% sucrose → 필터멸균 후 1.5mL
*액체-2층 배양 방법
① 60*15mm 배양접시에 1.5mL씩 치상하고 배양 5일 후, 동량의 새배지 첨가 +2일 더 배양(25 $^{\circ}$ C, 암배양)
② 배양 초기 1주간은 액체배지 배양, 이후에는 고체배지가 있는 배양 접시에 옮겨 3주간 2층 배양(액체2층배양) → 새배지 1mL 추가하여 60rpm에서 12주간 진탕하고, 2주 정지배양
7. 식물체의 재분화:
소포자 배양 4주 후 발생한 정상 자엽배들을 2% sucrose, 0.35% phytigel이 첨가된 B5 배지에 치상 (25 $^{\circ}$ C, 명배양)

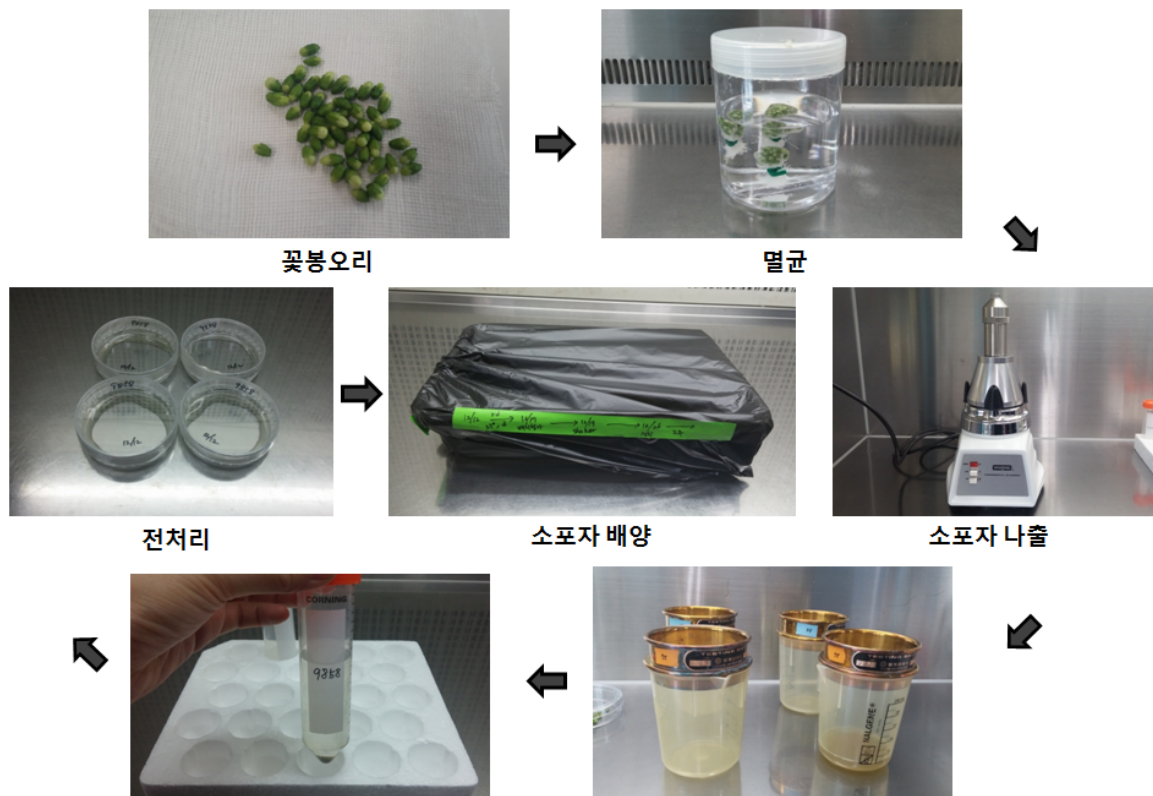


그림 53 고추 소포자 배양 방법 개선 및 배양 체계도

표 37 고추 소포자 배양에 사용된 계통, 소요 화뢰 및 최종 petri dish 개수

계통명	개체수	실험봉오리 (개)	최종p/d (개)	비고
9851	4			탄저병 저항성 F3
9852	44			
9853	17			
9854	12	146	16	
9855	11	18	2	
9856	19			
9857	20	25	2	
9858	15	27	4	
9859	24			
9860	15	32	4	
14PMS1	20	160	18	시판 F1 품종
14PMS2	20	122	14	
14PMS3	20	155	18	
14PMS4	20	222	26	
14PMS5	20	180	20	
14PMS6	20	169	18	
14PMS7	20	260	30	
14PMS8	20	293	34	
14PMS9	20	208	24	

(2) 소포자 배양 개선(위탁 1차년도)

기존에 수행하던 소포자 배양기술을 개선하여 다음의 방법으로 계통별 소포자 배양 실시하였음. 그 결과 질소수준별 배발생율은 2수준으로 높였을때 1수준으로 모식물체를 관리했을 때보다 배발생율이 높았음(그림 54).

이층배양 배지를 셰이킹 할 경우 정치하여 배양할 경우보다 배발생율 증가 하였음. 개선된 소포자 배양을 통해 14PMS2, 4, 5 모식물체에서 4개의 식물체 획득하였으며 식물체분화율 0.8%였음. 배발생율은 모식물체별 로 가장 높은 계통이 9.2%이나 식물체순화율이 낮아 배 발생 후 식물체분화에는 배지 및 배양조건이 영향을 미치는 것으로 나타났음(그림 55).

역병저항성/선충저항성 F1 집단을 모식물체로 하여 총 582개의 페트리 디쉬에 치상하여 약 및 소포자 배양을 진행한 결과 배발생 효율이 매우 낮으며 소포자유래 식물체를 획득하지는 못하였음(표 38).

개선된 배양 방법을 통해서 배양이 잘되는 품종을 이용해 이층배양을 시도하여 소포자 유래의 완전한 정상식물체를 생산하였음(그림 56).

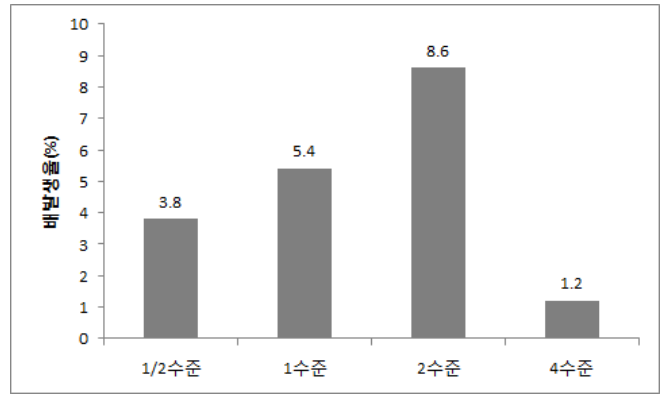


그림 54 질소질 비료 수준별 배양효율 비교(모식물체 : 14PM5, 시판종)

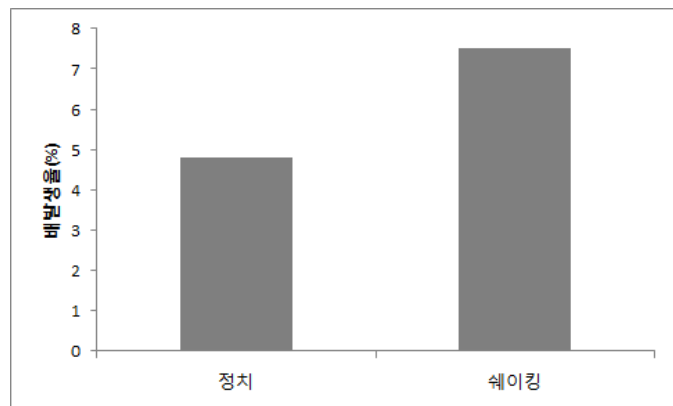


그림 55 이층배양 배지 쉐이킹 여부에 따른 배발생 비교(모식물체 : 14PM5, 시판종)

표 38 모식물체별 소포자 배양 현황

BN	약(소포자)치상수	배발생수	배발생율(%)	비고
14PMS1	673	8	1.2	시판종
14PMS2	842	29	3.5	시판종
14PMS3	333	19	5.8	시판종
14PMS4	895	82	9.2	시판종
14PMS5	963	72	7.5	시판종
14PMS6	399	10	2.5	시판종
14PMS7	458	5	1.2	시판종
14PMS8	118	1	0.8	시판종
14PMS9	138	2	1.8	시판종
14PMS10	168	2	1.2	시판종
14PMS11	690	22	3.3	시판종

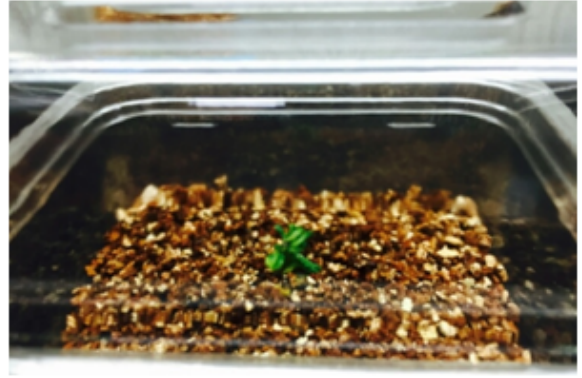
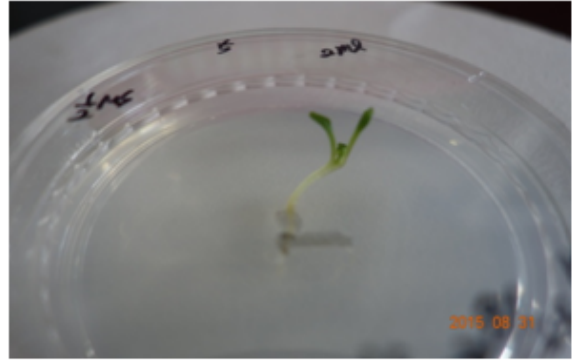
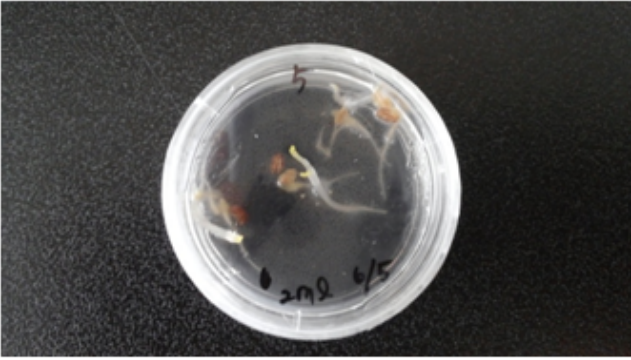


그림 56 개선된 소포자 배양을 통해 획득한 식물체 (14PMS3)

(3) 소포자 배양 기술 확립(위탁 2차년도)

(가) 고추의 나출 소포자 배양 과정 및 소포자배의 종류

① 고추의 나출 소포자 배양 과정 조사

고추 육종에 사용가능한 다양한 배가반수체 계통 개발을 목적으로 다수의 배와 식물체를 생산하고, 안정적인 소포자 배양 시스템을 확립하기 위해서 나출 소포자 배양을 시도하였음. 고추의 나출 소포자 배양 적기로 알려진 후기1핵성 소포자~초기2핵성 화분이 포함된 꽃봉오리만 수확하여 소포자만을 나출함. 소포자는 기아처리와 저온 또는 고온처리를 통해서 배우체 성 발달방향을 조포체성 발달방향으로 전환시켜 화분이 아닌 배로 발달하도록 하였음. Sucrose가 포함된 NLN 배양배지에 옮겨 배양 시 배양 7일 후 다세포체가 발생하며, 배양 3주 후에는 정상자엽배를 포함한 소포자배가 발생하였음. 소포자유래 정상자엽배는 재분화배지에 옮겨 광배양 시 1주 후 자엽이 완전 전개되고 배축이 기립하고, 재분화 3주 후에는 본엽이 2~3매 전개됨(그림 57).

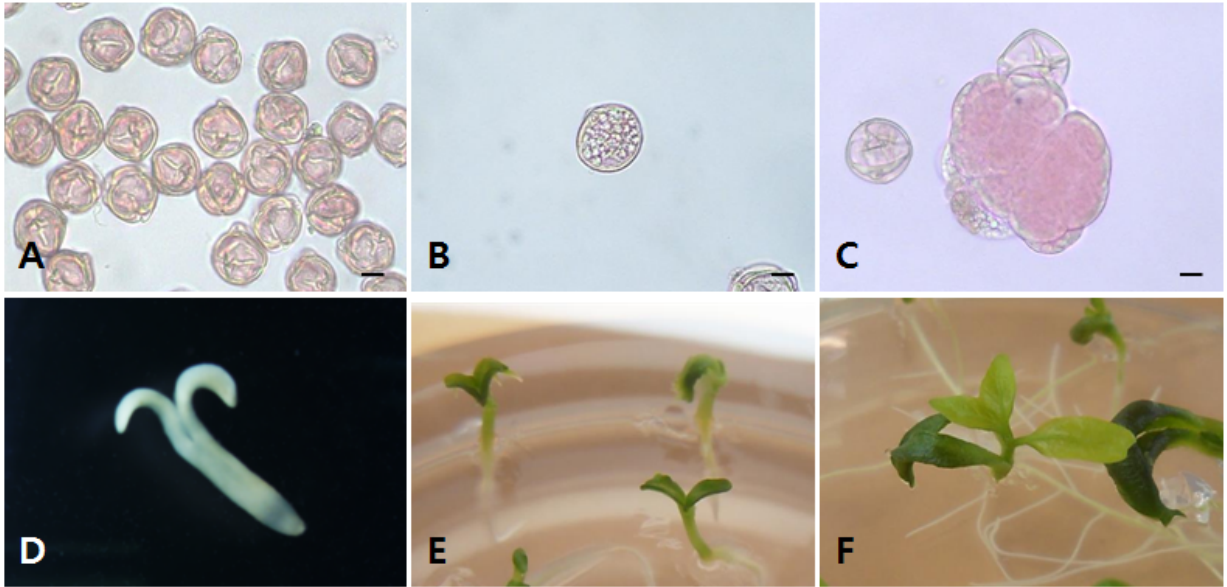


그림 57 고추 나출 소포자 배양 과정. A. 나출소포자, B. 배발생 소포자, C. 다세포체, D. 정상자엽배, E. 자엽 전개된 배, F. 본엽이 발생한 유식물체 (Bar = 10 μ m).

② 소포자배의 종류 및 배발달 과정

전처리가 끝난 소포자를 배양배지에 옮겨 25°C에서 3주 동안 배양 시 구형-심장형배, 어뢰형-자엽배, 비정상배 (ELS, Embryo Like Structure)가 발생하였음(그림 58). 배양 3주 후 모든 종류의 배가 혼재되어 발생함. 액체배양 시에는 발달 초기 배인 구형-심장형배가 대부분이며, 이층배양 시에는 발달 후기 배인 어뢰형-자엽배가 다수 발생하였음. 자엽이 2개인 배는 자엽배로 계수하고, 외자엽배 및 다자엽배는 비정상 배로 분류하였음. 정상자엽배는 재분화배지로 옮겨 유식물체로 발달시켰다. 비정상 자엽배도 재분화 배지에 옮기면 정상식물체로 발달하나 그 비율이 현저히 낮아졌음.



그림 58 나출 소포자 유래 배의 종류. A. 구형 및 심장형 배, B. 어뢰형 및 자엽배, C. 비정상 배 (Bar = 1 mm).

(나) 나출 소포자 배양 시 전처리 조건이 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

① 전처리 온도가 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

배우체성 발달을 조포체성 발달로 전환시키기 위해서는 스트레스가 반드시 필요함. 고추의 나출 소포자 배양 시에는 기아처리와 고온처리를 동시에 가하는 복합스트레스 처리가 이용됨. 고추 약배양 관련 기존 연구결과에 따르면 저온처리가 소포자배 발생에 적합하다는 결과가 다수여서, 고추의 나출 소포자 배양 시 적합한 전처리 온도조건을 확립하고자 하였음.

밀양재래 품종을 대상으로 나출 소포자 배양을 실시한 결과 전처리 기간과 상관없이 9°C 저온처리 시 가장 많은 배가 발생하는 것을 확인하였고, 4~31°C 처리 시에는 배발생 효율이 어느정도 유지되는데 반해 38°C 처리 시에는 배발생이 거의 없었음(표 39). 이전의 연구에 따르면 전처리 온도가 높고 기간이 길수록 소포자는 활력을 잃고 발생하는 배 또한 감소하는 것으로 알려져 있음. 본 연구에서도 31°C 이상의 고온처리 시 배로 발달할 수 있는 배발생가능성 소포자 (embryogenic microsopre)의 수가 감소되어 최종적으로 발생한 배의 수가 적은 것으로 예상됨.

발생한 배의 대부분은 구형-심장형 배, 구형배 또는 심장형 배들이 결합된 비정상 배였음(그림 59). 이와 같이 이른 시기의 배가 대부분인 이유는 온도에 따른 배발생 효율을 조사하기 위해서 액체배양을 시도하였기 때문이라고 생각됨.

표 39 전처리 기간과 온도에 따른 소포자배 발생 및 발달

Pre-treatment		No. of embryos/plate			
Period (days)	Temp. (°C)	Globular & Heart	Torpedo & Cotyledonary	ELS	Total
1	4	121.8±20.4	-	39.9±10.3	161.7±19.8
	9	111.8±22.3	-	33.6±6.9	152.4±21.2
	25	92.3±18.0	0.7±0.5	25.3±4.4	118.3±17.6
	28	59.9±13.8	0.8±0.6	19.7±6.6	80.4±16.5
	31	69.9±13.6	0.5±0.2	24.0±8.8	94.4±11.8
	38	-	-	-	-
3	4	162.1±29.8	-	47.4±10.0	209.5±32.5
	9	178.8±19.5	-	51.5±9.4	230.3±20.8
	25	130.6±18.6	0.3±0.1	33.3±10.3	164.2±22.6
	28	120.5±13.5	0.3±0.2	32.4±7.2	153.2±17.2
	31	85.2±13.3	-	28.1±7.7	113.3±16.3
	38	-	-	0.2±0.1	0.2±0.1

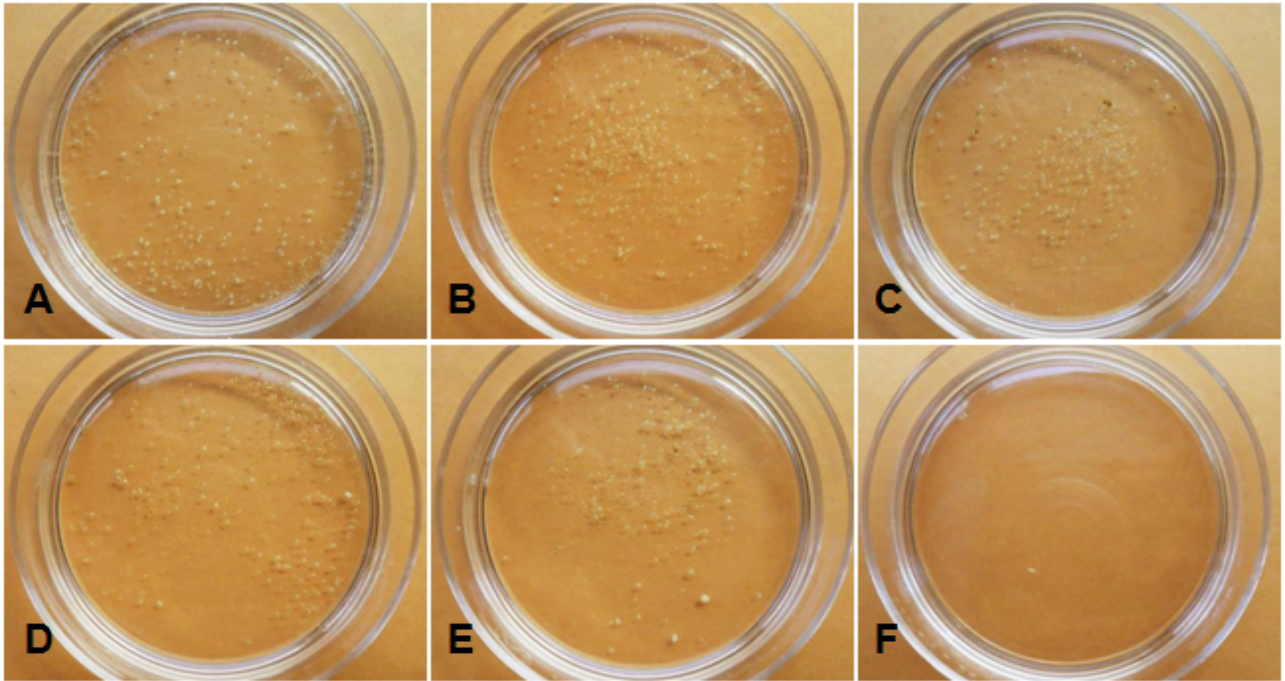


그림 59 전처리 온도에 따른 소포자 배발생 조사. A) 4°C, B) 9°C, C) 25°C, D) 28°C, E) 31°C, F) 38°C에서 3일 동안 처리 후 배발생 조사.

② 전처리 기간이 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

고추 나출 소포자 배양 시 전처리 기간에 따른 소포자배 발생 효율을 조사하기 위해서 1, 3일 처리 후 배양하여 발생된 배의 수를 계수함. 3일 전처리 시 소포자배 발생이 더 많으며, 9°C에서 3일 처리한 경우 발생한 배의 수는 230.3개로 가장 많았음(표 40).

조포체성 발달로 방향 전환을 위해서 시도한 스트레스는 저온처리가 일반적이임. 본 연구결과 온도 뿐만아니라 적정기간 (3일) 동안 스트레스처리 하는 것이 소포자배의 발생에 적합한 것으로 나타났음.

(다) 나출 소포자 배양 시 배양조건이 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

① 배양배지의 pH가 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

배양배지의 pH에 따른 소포자배 발생을 조사한 결과 4°C 저온 전처리 시 배양배지의 pH가 5.0인 경우 137.9개의 배가 발생하였으며, 31°C 고온 전처리 시에는 배양배지의 pH가 6.0일 때 82.2개의 배가 발생하였음. 저온-고온 전처리 모두 배양배지의 pH가 7.0이상인 경우 배의 발생이 크게 감소하였음(표 40).

고추의 나출 소포자 배양 시 배양배지의 적합한 pH는 5.0~6.0이며, 전처리 온도 스트레스에 따라서 소포자배 발생 효율이 달라짐. 액체배양을 시도하여 발생한 배의 대부분은 구형-심장형 배 등 이른시기의 배가 대부분이었으나 배양배지의 pH가 5.0인 경우 어뢰형-심장형배가 발생한 것으로 보아 배의 발달에 적합한 pH는 5.0인 것으로 나타남(그림 60).

표 40 전처리 온도와 배양배지의 pH에 따른 소포자배 발생 및 발달

Pre-treatment Temp. (°C)	pH of culture medium	No. of embryos/plate			
		Globular & Heart	Torpedo & Cotyledonary	ELS	Total
4	4.0	3.8±3.3	-	0.7±0.5	4.6±3.8
	5.0	105.9±16.8	0.7±0.4	31.3±5.5	137.9±16.2
	6.0	50.3±10.2	-	14.7±3.6	65.0±9.0
	7.0	0.8±0.5	-	-	0.8±0.5
	8.0	1.7±1.0	-	0.5±0.3	2.2±0.8
31	4.0	3.5±2.3	-	1.5±1.2	5.0±3.1
	5.0	45.0±14.3	1.5±0.8	15.0±5.3	61.5±10.9
	6.0	61.5±14.7	-	25.7±6.1	87.2±18.7
	7.0	0.8±0.5	-	0.3±0.2	1.2±0.7
	8.0	1.0±0.8	-	0.7±0.5	1.7±1.3

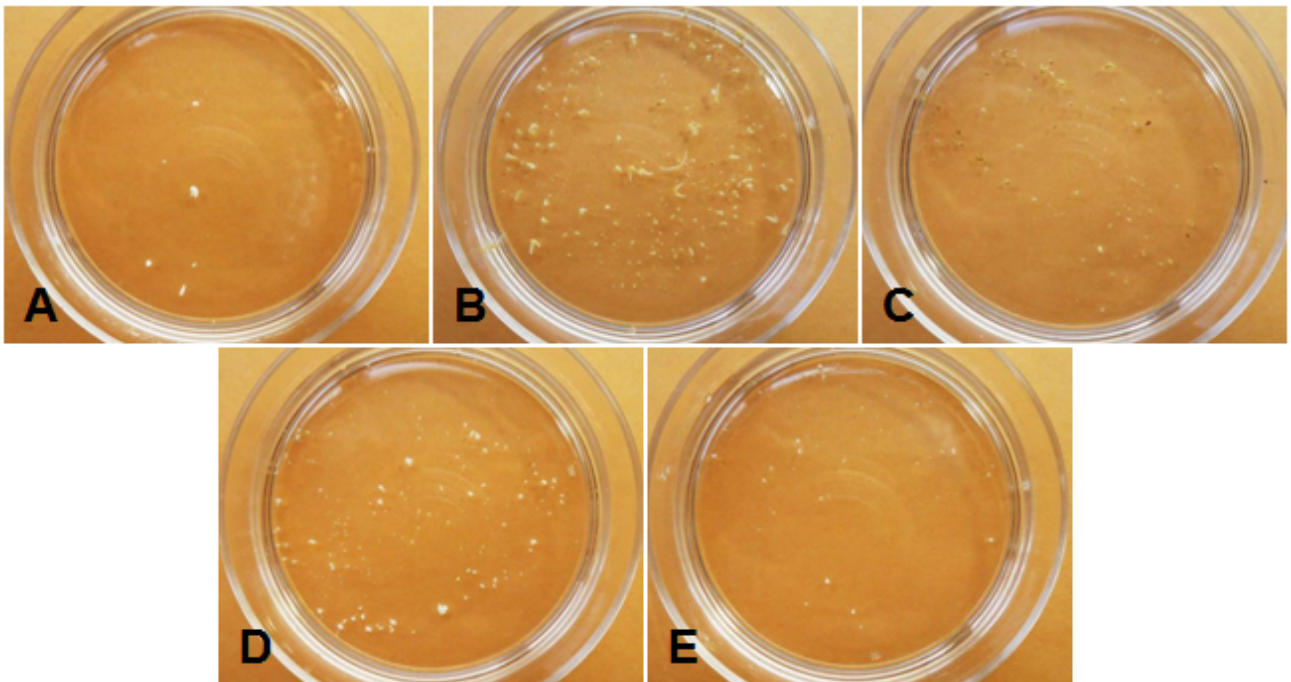


그림 60 31°C에서 고온처리 후 배양 시 배양배지의 pH가 소포자배 발생에 미치는 영향. 배양배지의 pH A) 4.0, B) 5.0, C) 6.0, D) 7.0, E) 8.0.

② 품종에 따른 배양방법이 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

고추 소포자 배양 시 정상자엽배의 발생을 증가시키기 위한 방법을 확립하기 위해서 배양 조건을 액체배양, 이층배양, 이단배양을 시도한 결과 이층배양 시 가장 많은 자엽배가 발생되었음.

밀양재래 품종의 경우 액체배양 시 95.6개의 배가 발생하였고, 이층배양 시에는 발생한 33.0개의 72%인 23.8개가 정상 자엽배로 발달하였음. 이와 같은 결과로 보아 배의 발생에는 액체배양, 발달에는 이층배양이 적합하다는 것으로 밝혀졌음. 액체배양 시에는 구형-심장형배, 이층배양 시에는 어뢰형-자엽배가 다수 발생하였음. 반면 액체배양 1주 후 이층배양을 시도한 이단배양의 경우에는 구형-심장형배와 어뢰형-자엽배가 혼재되어 발생 및 발달하였음(표 41, 그림 61). 이와 같은 결과로 보아 연구 방향에 따라서 적합한 배양방법을 선택 할 수 있음. 발생학 및 배발달 연구에는 발생한 배의 수가 많은 액체배양을 시도하여 다수의 배로부터 세포 변화 및 발달과정을 확인하고, 전통육종 및 반수체 육종 연구에는 정상 자엽배를 다수 획득할 수 있는 이층배양과 이단배양을 실시하여 많은 수의 식물체를 획득하는 것이 유리함.

품종에 따른 소포자배 발생 효율을 조사하기 위해 밀양재래, LV2319, SNU2 품종을 배양한 결과 밀양재래와 LV2319 품종의 경우 다수의 배와 정상자엽배를 확보하였음. 그에 반해 SNU2 품종의 경우에는 배의 발생 및 발달이 미미하였다. 이와같은 결과는 모든 작물에서 품종에 따른 소포자 배양 효율이 다르다는 보고와 일치하였음.

표 41 품종과 배양방법에 따른 소포자배 발생 및 발달

Genotype	Culture method	No. of embryos/plate			
		Globular & Heart	Torpedo & Cotyledonary	ELS	Total
Milyang-jare	Liquid	76.6±18.3	-	19.0±5.1	95.6±21.6
	Double layer	4.5±1.3	23.8±4.4	4.8±1.5	33.0±4.2
	2-step culture	24.0±6.1	14.0±3.9	13.3±4.4	51.3±7.8
LV2319	Liquid	14.1±4.5	8.0±4.5	33.7±10.1	55.9±13.4
	Double layer	4.5±3.1	17.0±3.2	14.3±4.2	35.8±7.1
	2-step culture	6.0±2.3	12.8±3.3	11.8±3.9	30.5±7.0
SNU2	Liquid	0.3±0.2	-	0.2±0.1	0.5±0.3
	Double layer	0.8±0.6	-	-	0.8±0.6
	2-step culture	-	-	0.3±0.2	0.3±0.2

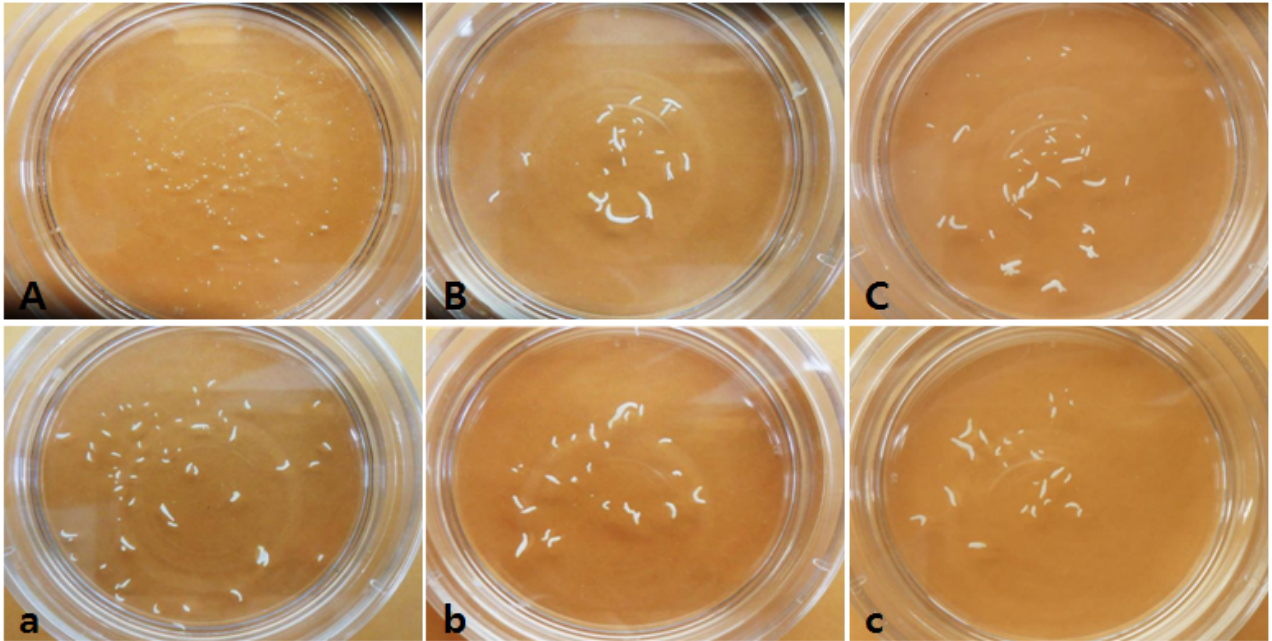


그림 61 배양방법 및 품종에 따른 소포자배 발생 효율 조사. 품종 A-C. 밀양재래, a-c. LV2319. 배양방법 A, a. 액체배양, B, b. 이층배양, C, c. 2단계 배양.

③ 품종에 따른 charcoal 농도가 소포자배 발생 및 발달에 미치는 영향

고추의 약배양 시 배지 내 charcoal을 첨가한 경우 배의 발생이 증가하였다는 보고가 있음. 이에 따라 나출 소포자 배양 시 고체배지에 charcoal 0, 0.1, 0.5, 1 %를 첨가하여 배양 후 소포자배의 발생 및 발달을 조사하였다. 그 결과 charcoal 농도가 높아짐에 따라 배의 발생이 감소되었으며, 모든 품종에서 동일한 경향을 보였음(표 42, 그림 62).

고추의 약배양 시에는 과잉의 식물생장조절제와 약이 갈변되면서 발생하는 여러 가지 물질들이 배발생을 억제하는데 charcoal은 이러한 유해물질들을 흡착하여 배발생에 좋은 영향을 주는 것으로 알려져 있음. 반면 나출 소포자 배양의 경우에는 식물생장조절제를 사용하지 않을 뿐만 아니라 약벽조직이 제거된 순수한 소포자만을 배양하므로 체세포에 따른 배발생 억제물질이 발생하지 않은 것으로 예상됨. 본 연구결과 나출 소포자 배양 시에는 charcoal의 유해물질 흡착 효과가 없었으며, 오히려 소포자배의 발생 및 발달이 저해된 것으로 확인됨.

표 42 품종과 charcoal 농도에 따른 소포자배 발생 및 발달

Genotype	Charcoal Con. (%)	No. of embryos/plate			
		Globular & Heart	Torpedo & Cotyledonary	ELS	Total
Milyang-jare	0	1.0±0.7	8.8±6.3	4.4±2.2	14.2±6.7
	0.1	2.2±1.9	1.0±0.7	2.0±1.9	5.0±2.6
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
LV2319	0	1.4±1.1	1.4±0.9	3.8±1.3	6.6±2.4
	0.1	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
SNU2	0	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-

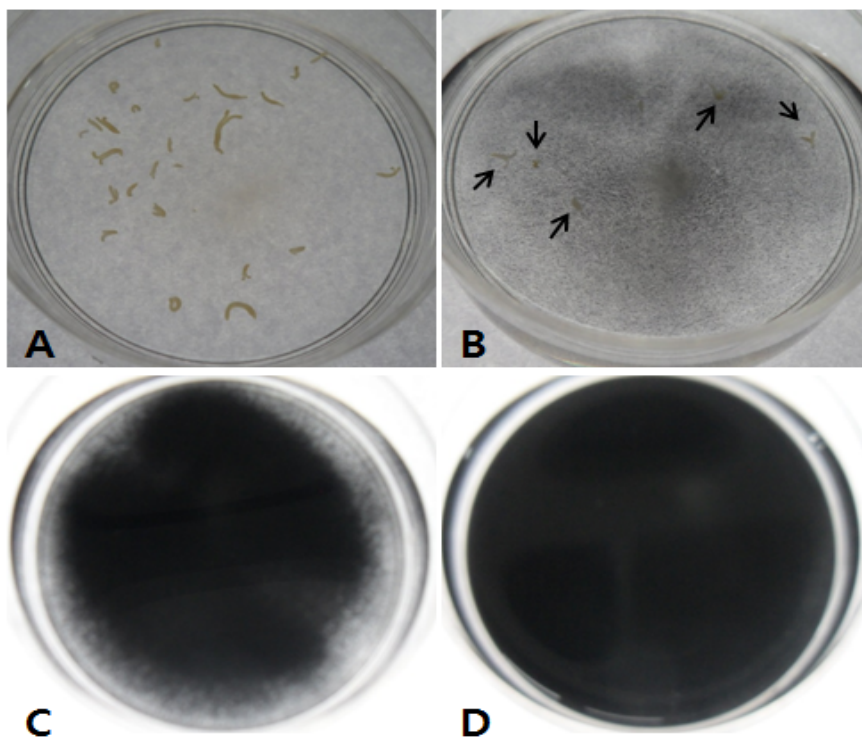


그림 62 나출 소포자 배양 시 charcoal 농도가 소포자배 발생에 미치는 영향. 처리 당 charcoal 농도 A. 0%, B. 0.1%, C. 0.5%, D. 1%.

(라) 소포자유래 식물체 생산

① 소포자유래 식물체 발달과정

배양 3주 후 발생한 정상자엽배를 재분화배지로 옮겨 배양하여 소포자유래 식물체로 발달

시켰시켰음. 정상자엽배 이식 시 95% 이상이 정상식물체로 발달하였음. 재분화 배지로 이식 1주 후 자엽이 완전히 전개되고 배는 극성에 따라 정확하게 기립하였음. 재분화 4주 후 본엽은 3~4매가 전개되었으며, 뿌리의 발달 또한 정상적으로 이루어진다. 재분화 8주 후에는 본엽 7~8매가 전개된 유식물체로 발달하였음(그림 63).

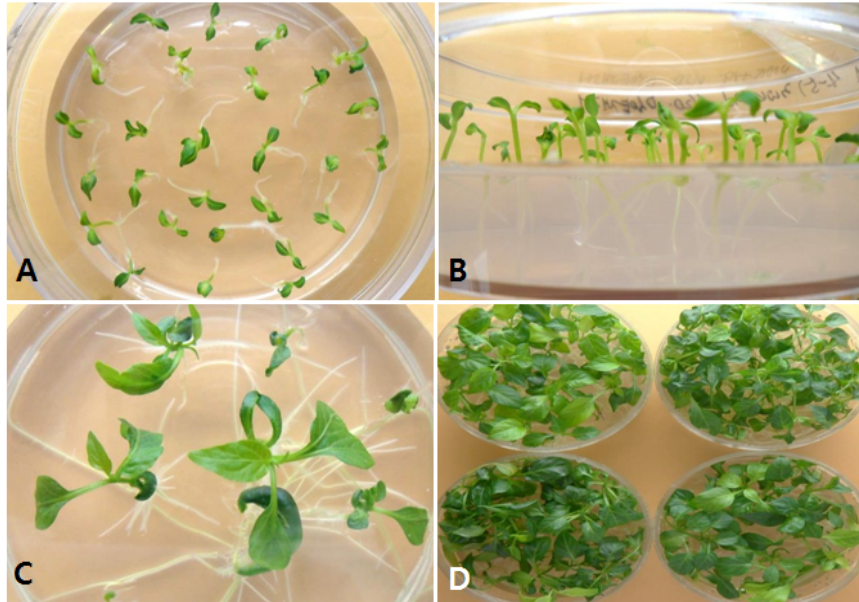


그림 63 소포자 유래 재분화 식물체 발달과정. 배양 기간 A, B. 1주, C. 4주, D. 8주.

② 반수체/배가반수체 생육

본엽이 정상적으로 전개된 소포자유래 식물체는 멸균된 상토에 정식하여 순화시켰음. 상토에 옮긴 1주 후부터 공기와 접촉을 시도하여 최대 4주까지 25℃, 광배양 조건에서 생육시켰음. 순화가 완료된 소포자유래 식물체는 20 cm 이상의 화분에 정식하여 온실에서 생육하였음. 염색체가 자연적으로 배가된 배가반수체는 정상적인 열매가 맺혔음(그림 64). 고추의 경우 소포자유래 식물체 중 약 30%가 자연적으로 배가되는 것으로 알려져 있음. 본 연구를 통해 생산된 소포자유래 반수체/배가반수체는 원예특작과학원 온실에서 생육 중이며, 이중 일부 (61 line)는 열매가 맺히는 것으로 보아 자연적인 배가반수체로 확인되었음. 향후 염색체 및 표현형 분석을 통해 배수성 검증을 시행할 계획임.



그림 64 원예특작과학원 온실에서 소포자유래 식물체 생육. A. 순화 후의 소포자유래 식물체, B. 온실에서 생육중인 반수체/배가반수체, C. 나출 소포자 유래 배가반수체.

다. 고추 shed-소포자 배양 기술 개발(위탁 2차년도)

(1) Shed-소포자 배양 방법의 특징

기존에 보고된 고추 소포자 배 생산 방법은 약배양, 나출 소포자 배양 방법 등이 알려져 있는데 2006년 네덜란드 Supena 그룹에서 새로운 방법인 shed-소포자 배양 방법을 발표하였음. Shed-소포자 배양 방법은 약을 나출하여 이층배양을 시도하는 방법으로 정확하게는 이층배양을 시도한 약배양이라 할 수 있음.

Shed-소포자 배양 시에도 약이 열리면서 터져나온 소포자들이 배로 발달하기 때문에 소포자유래 식물체를 확보할 수 있을 뿐만 아니라 약벽조직의 영향으로 배발생 증가가 가능함(그림 65).

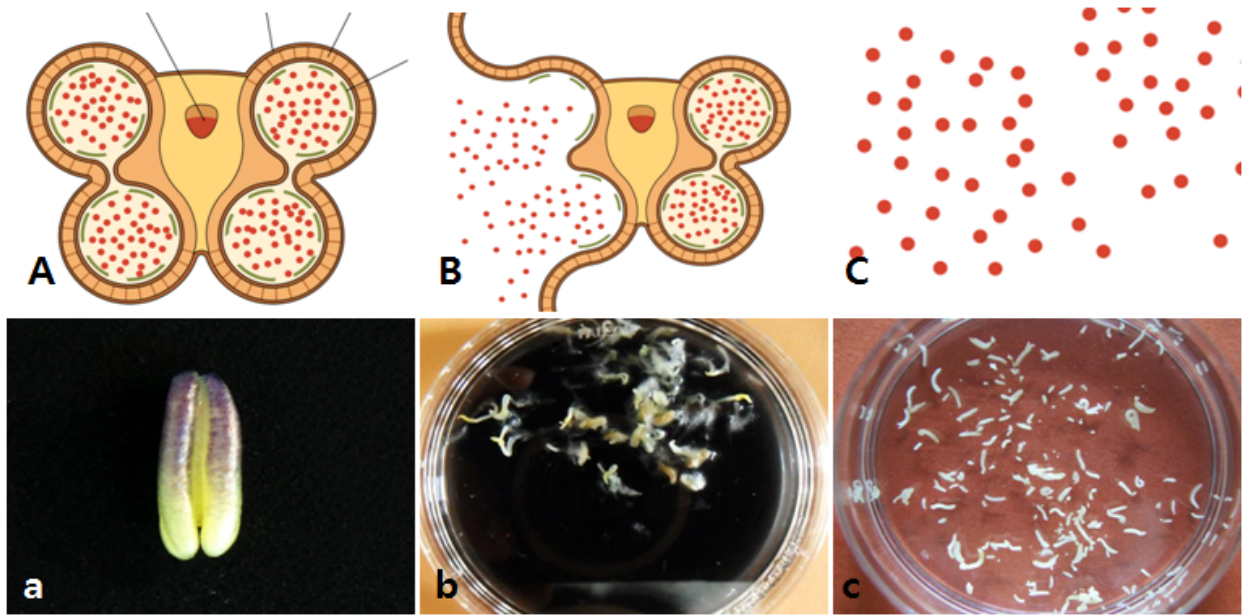


그림 65 고추 소포자 유래 식물체 생산 방법. A-C, 배양 중 약과 소포자의 형태. A, 약배양, a, 적기의 약, B, b. Shed-소포자 배양, C, c. 나출 소포자 배양.

(2) Shed-소포자 배양 방법

고추의 shed-소포자 배양을 시도하여 소포자유래의 배를 다수 확보하는데 성공하였다. 배는 약이 열리지 않은 상태에서 발생하기도 하고, 약으로부터 완전히 분리된 후 발생/발달하기도 함(그림 66, 67). 약배양과 소포자 배양의 장점을 동시에 가진 shed-소포자 배양 방법을 확립할 필요가 있음.

약배양과 shed-소포자 배양을 통해 얻어진 배는 약벽이 아닌 소포자로부터 발생한 배인지에 대한 확실한 검증이 필요하며, 완전한 동형접합자를 선발하기 위해서는 약으로부터 떨어져 나온 배를 선택하는 것이 옳은 방법임.

Shed-소포자 배양과 나출 소포자 배양 결과를 비교하면 나출 소포자 배양 시 배발생 효율이 높고, 배양 기간이 3주 이상 단축되었을 뿐만 아니라 나출 소포자 배양 시에는 배양 용기 또는 실험 간에 유의성이 있는 차이를 보임.

반면 shed-소포자 배양 방법은 동일한 조건에도 각기 다른 배양 효율을 보여 shed-소포자 배양 방법을 확립하기 위해서는 일정한 효율로 배를 확보할 수 있는 실험이 선행되어야 할 것으로 판단됨.

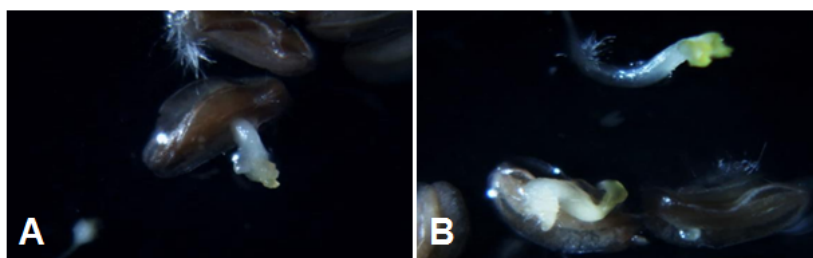


그림 66 Shed-소포자 배양을 통해 생산된 소포자배

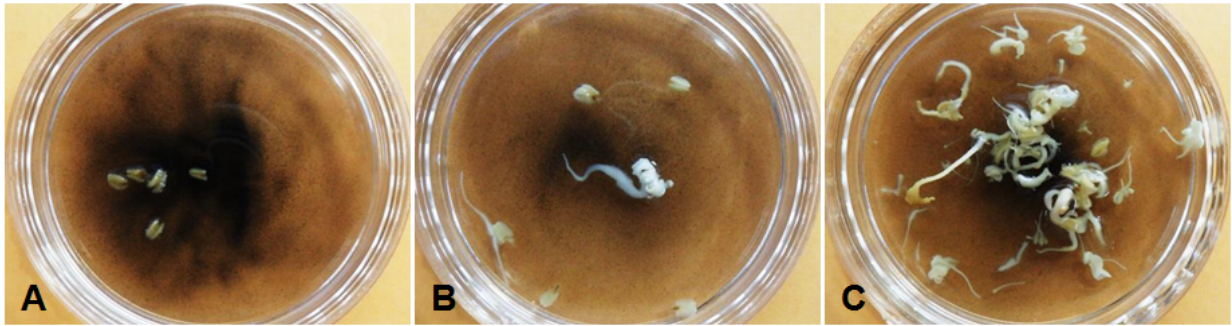
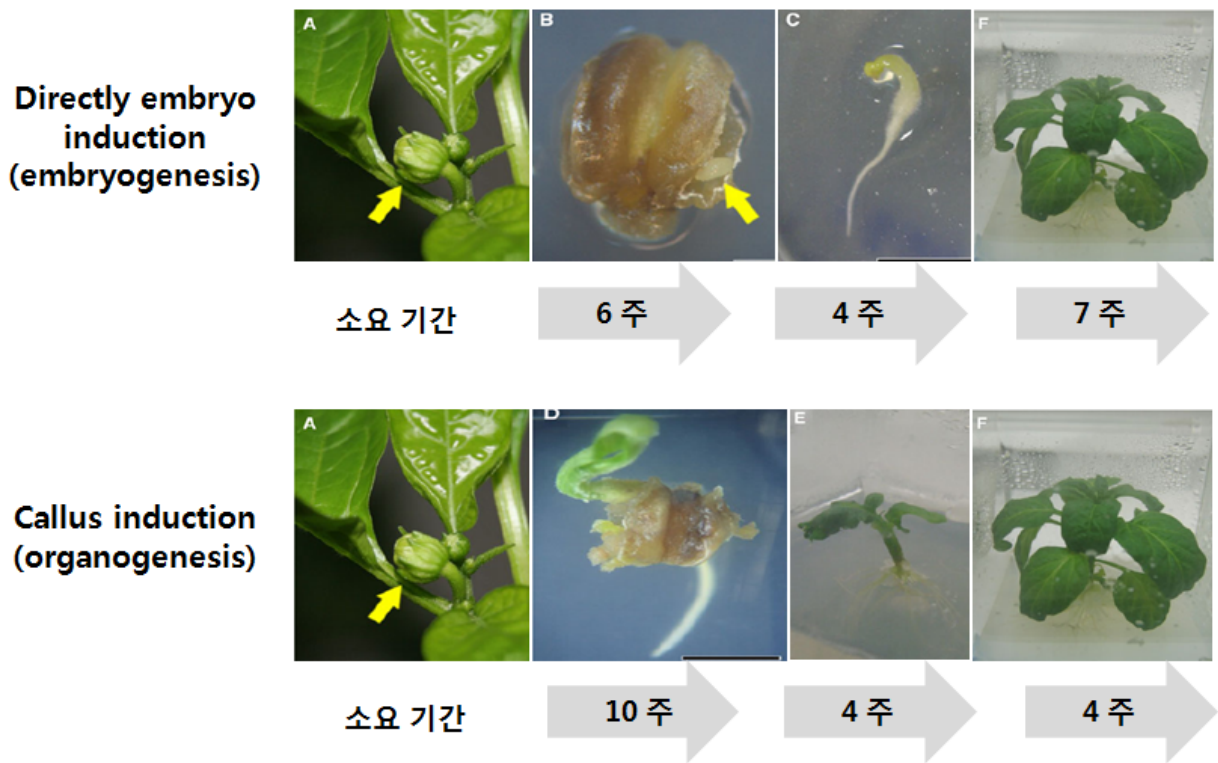


그림 67 Shed-소포자 배양을 통해 생산된 소포자배의 형태 및 소포자배 발생 효율.

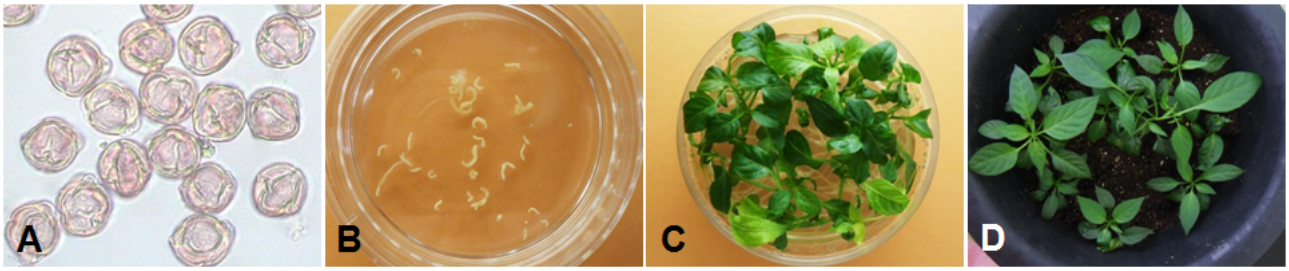
라. 소포자유래 식물체 생산 과정 및 소요기간 비교(위탁 2차년도)

고추 약배양은 약 치상에서 배발생까지 평균 6~8주, 캘러스에서 식물체 재분화까지 12주 이상 소요됨(그림 68). 나출 소포자 배양 방법을 이용할 경우 반수체/배가반수체를 생산하기까지 최소 14주가 소요되는 것으로 확인됨(그림 69). 이는 약배양 방법에 비해 4~12주 배양기간이 단축된 결과로 육종연한 단축 및 DH계통 개발에 소요되는 생산비 절감에 큰 효과가 있을 것으로 판단됨.



Dumas de Vaulx et al. protocol, Segui-Simarro et al. 2011

그림 68 고추의 약배양시 재분화 식물체 생산과정 및 소요 기간.



소요 기간

4 주

8 주

2 주

그림 69 나출세포자 유래 식물체 생산 과정 및 소요 기간.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연차	연구계획서상의 연구목표	연구 결과	달성도 (%)
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> - MAGIC 집단 작성, 주요 특성 유전분석, MAB 체계 확립을 위한 재료 확보 및 기초 분석 - 목표 시장별 선도 품종 수집 및 약배양 기술 정립 	<ul style="list-style-type: none"> - 집단 작성을 위한 계통들을 종자 회사 및 연구 기관으로부터 수집(흰가루병, 청고병, 색소 및 비타민 함량) - 양적 형질 분석을 위한 불변집단 작성 기반 마련(역병 저항성 minor QTL F2, 흰가루병 저항성 F2, 청고병 저항성 F2, 색소 및 비타민 함량 F2) - 질적 형질 분석을 위한 분리 집단 작성(선충 저항성 F2) - 기 선발한 412개 SNP 분자마커를 이용하여 BioMark HD system으로 다형성 분석 후 계통별로 다형성을 보이는 SNP 선발 - MAGIC 집단 작성을 위해 특성 별로 교배에 활용할 부모 계통을 선발하고 각 계통간 다형성을 SNP 분자마커로 확인 후, 추가 분양 및 계통 간 교배 수행 - 기개발 마커가 위치한 scaffold 서열 정보를 바탕으로 새로운 SNP를 탐색하여 특이성이 높은 HRM 기반 분자마커를 개발 후 상업품종에 적용하여 연관도가 기존 마커보다 높음을 확인 - F2 집단의 bulked segregant analysis를 통해 7개의 NB-LRR 도메인을 가지는 후보 유전자를 선발 - 양친 간 다형성을 보이는 SNP 마커가 Bio-Mark HD system에 적합하다는 것을 확인하였고, 각 형질에 따라 40여개~190여개의 SNP 마커를 선발 - 탄저병, 역병, 풋마름병 등 주요 병 저항성 자원 평가 및 선발 - 착과력 우수 및 내저온성 자원 평가 및 선발 - 고추 약배양 기술을 이용한 DH계통 개발 	100
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 주요 병해에 대한 QTL 	<ul style="list-style-type: none"> - 양적 형질 분석을 위한 집단의 세대 진전(역 	100

	<p>분석 및 Bio-Mark HD system 분석에 활용할 MAB 분자마커 set 구성</p> <p>- 우수 육종 소재 선발 및 소포자 배양 조건 확립</p>	<p>병 minor QTL F4, 색소 및 비타민 함량 F4)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 청고병 저항성 계통의 저항성 분리가 확인되어 유전자좌 고정을 수행 - 흰가루병 저항성, 이병성 계통 및 F1 병리검정 수행 - 흰가루병 저항성 F2 분리 집단(VK515R X VK515S) 500립 이상 확보 - 연구실 단위에서 구축 가능한 MAGIC 집단 교배조합 작성 및 F1 종자 확보(ECW30R x CM334, long sweet x AC2212, Takanotsume x SNU11-001, TF68 x Habanero, VK515R x Tabasco green leaf 다섯 조합) - MAGIC 집단 구축을 위한 4-way cross 수행 - Transient over expression(TOE)을 통해 7개의 후보 유전자 중 <i>Tsw</i> 유전자 동정 - <i>Tsw</i>의 이병성 대립유전자(<i>tsw</i>) 동정 후 <i>Tsw</i> 유전자 기반 분자마커 개발 - Bin map 작성을 통한 Perennial X Dempsey RIL 집단의 신미 함량 QTL 분석 수행 - TF68 X Habanero RIL 집단의 캡사이시노이드 함량 분석 및 GBS 이용 유전형 분석 - GSP 참여 종자 회사의 육성 계통에 Bio-Mark HD system을 적용하여 다형성이 높고 염색체 상에 고르게 분포하는 407개 SNP 분자마커 선별 <p>- 원예원 및 영양고추시험장 보유 유전자원 특성 평가 및 선발</p> <p>- 다양한 형질을 보유한 우수계통 선발</p> <p>- 고추 소포자 배양 정립 및 식물체 배양</p>	
3차년도	<p>- 주요 병해에 대한 QTL 분석 및 MAGIC 집단 세대 진전</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 원예특작과학원 연계 ECW30R X CM334 F1 약배양 중 - ECW30R x CM334 (EC), Long sweet x AC2212 (LA), Takanotsume x SNU 11-001 (TS), TF68 x Habanero (TH), VK515R x Tabasco green leaf (VT) 다섯 조합의 F1 집단 간 4-way cross 수행을 통해 100립 이상의 종자 확보 - GBS 분석 시각화를 위한 GBS browser를 구축하고, 다양한 집단의 GBS browser를 이용하여 유전형 분석 - 흰가루병 저항성 유전자를 고추 염색체 4번에서 탐색하고, 연관된 두 개의 분자마커 개발 - TF68 X Habanero RIL 집단에서 sliding 	80

	<ul style="list-style-type: none"> - 우량계통 육성을 위한 유전자원 선발·교잡 및 소포자 배양 기술 확립 	<p>window approach를 통해 5,829개의 SNP를 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chromosome walking 및 RNA-seq을 통해 <i>Rf</i> 후보유전자로써 <i>PPR6</i> 유전자 선별 및 VIGS 실험을 통한 유전자 확인 - Chromosome walking 및 BSA RNA-seq을 통해 6개의 <i>sy-2</i> 후보 유전자 선별 - TMV 저항성, CMV 저항성, 역병 저항성, TSWV 저항성, potyvirus 저항성 연관 분자 마커 개발 및 KASPar array system 구축 - 신규 도입 및 보유 유전자원 특성 평가 및 선별 - 고추 소포자 배양 기술 정립 및 식물체 배양 	
4차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 주요 병해에 대한 QTL 분석 및 주요 형질에 대한 분자 마커를 집적한 'Breeder's toolbox' kit 개발 - 우량계통 육성을 위한 유전자원 선발 및 교잡 - 고추 약 및 소포자 배양 기술 체계화 및 분리세대 육종소재화 	<ul style="list-style-type: none"> - MAGIC 집단 다섯 조합에서 F1 X F1 교배 조합 50계통 모두에서 종자 확보 - (Long sweet X AC2212) X (ECW30R X CM334) 조합을 추가로 증식 - PI260433 X Jeju F1을 육성하여 MAGIC 집단에 추가적으로 활용함 - ECW30R X CM334 RIL 집단 구축을 통한 major QTL 개선 및 minor QTL 탐색 - Geminivirus 병리검정을 위한 infectious clone 구축 - 뿌리혹선충 저항성 검정 기반 마련 및 Me7 유전자 지도 작성 - <i>Rf</i> 후보유전자군을 이용하여 다양한 고추 계통에 적용되는 분자마커 개발 - <i>sy-2</i> 후보유전자를 이용한 VIGS 실험 및 interaction 실험을 통해 <i>sy-2</i> 유전자 선별 작업 진행 중 - 구축된 KASPar 마커와 MAB를 이용하여 신미 함량 및 흰가루병 저항성 분자마커 기술 이전 실시 및 종자회사의 육성계통에 적용 - 고추 주요 목표 수출시장별 선도 품종 수집 및 특성 평가 - 중국에서 도입된 F2 집단 31 계통의 원예적 특성 조사 및 형질 고정 - 우량계통 육성을 위한 유전자원 선발 - 고추 약배양, 나출소포자 배양 및 shed-소포자 배양조건 확립 	100

제 2 절 관련분야에의 기술발전 기여도

1. 고추 및 파프리카의 주요 병 저항성 형질 분자마커 개발

- 고추 및 파프리카의 TSWV 저항성을 갖는 *Tsw*의 후보유전자를 F2 분리집단을 이용한 유전적인 거리를 좁히는 방법과 고추 CM334 BAC clone을 이용한 물리적인 거리를 좁히는 방법 두 가지를 이용하여 동정하였음. 이 후, TOE와 형질전환 기법을 이용하여 *Tsw* 유전자를 동정하였고, 유전자 기반 분자마커를 개발하였음. 이를 통하여 기존 TSWV 저항성 분자마커보다 유전적 거리를 개선할 수 있었고, 넓은 범위의 계통에 적용이 가능한 분자마커를 제작할 수 있었음. 이러한 유전자 기반 분자마커는 신품종 개발 경쟁력을 강화하고 이를 이용한 품종 육성을 통해 국내 종자회사가 국제 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 기대됨.
- 역병의 경우 기존 YCM334 X Tean RIL 집단을 이용하여 고추 염색체 5번의 major QTL 연관 분자마커를 개선하였음. 또한, ECW30R X CM334 RIL 집단을 구축하여 역병 저항성 QTL 탐색 재료로 사용하였음. 이 집단과 GBS 기법을 이용하여 역병 저항성 major QTL의 유전적 거리를 좁힐 수 있었음. QTL 탐색 시, 역병 저항성 검정을 위해 다양한 역병균주를 사용함으로써 넓은 범위의 역병 저항성에 통용될 수 있는 QTL을 탐색하고자 하였고, 따라서 고추 염색체 5번에서 major QTL이, 염색체 3번에서 minor QTL이 두 균주에서 공통적으로 탐색되었음. 뿐만 아니라, 강한 병원성을 갖는 역병균주에 대해서는 염색체 1번에서 minor QTL이 탐색되었음. 역병이 고추 육종에 매우 주요한 병이기 때문에, major QTL 분자마커 개선 및 minor QTL 분자마커 개발을 역병 저항성 품종 개발 및 육종에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.
- 흰가루병은 DH 집단을 작성하여 QTL을 탐색하는 대신에 PM신강 F2 및 VK515R X VK515S F2:3 집단을 구축하여 유전분석을 수행하였음. 이를 통해 흰가루병 저항성 유전자가 단일우성으로 유전양상을 띠는 것을 확인하였고, 이 유전자를 *PMR1*이라 명명하였음. 고추 표준유전체 정보를 이용하여 *PMR1*이 고추 염색체 4번에 위치하는 것을 확인하였고, 분자마커 염기서열 비교 결과 이 *PMR1* 구간이 *C. baccatum*에서 유래했을 것으로 판단하였음. 흰가루병 저항성 분자마커의 개발 및 개선은 고추 시설재배시 문제가 되는 흰가루병에 저항성인 고추 품종 육성에 도움을 줌으로써 신품종 개발을 촉진하고, 유전자의 기원을 파악함으로써 흰가루병 저항성 육종 시 다양한 유전자원을 이용할 수 있도록 기여하였음.
- 뿌리혹선충 저항성 분자마커 개발을 위해 ECW30R X CM334 RIL 집단을 구축하였음. 개발된 분자마커의 개선을 위해 RenSeq이라는 NGS 기법을 이용하여 ECW30R, CM334 및 F2 집단에서 SNP를 관찰하였고, 염색체 정보를 이용하여 분자마커를 개선한 후에는 CM334 BAC clone을 이용하여 chromosome walking을 수행하였음. 660개의 F2 집단에서 0cM 분자마커를 개발하였으며, 이 분자마커를 포함하는 3개의 BAC clone을 PacBio 기술을 이용하여 염기서열 분석 후에 *Me7* 유전자 동정을 수행할 수 있음. 뿌리혹선충 저항성의 경우 동남아시아 등 수출 지역에 문제가 되고 있는 병 저항성 형질이기에 때문에 수출용 고추 품종 육성 시 국내 종자회사의 경쟁력 강화에 도움이 될 것으로 기대됨.

2. 고추 및 파프리카의 주요 형질 분자마커 개발

- 고추 및 파프리카에서 캡사이시노이드 함량에 관여하는 QTL을 탐색하기 위해 Perennial X Dempsey RIL 및 TF68 X habanero RIL 집단 두 개를 구축하였음. 이를 각각 CM334 물리적 지도 기반의 resequencing (Perennial X Dempsey RIL)과 GBS (TF68 X Habanero)를 수행하여 유전자 지도를 작성하였고, 각 집단 당 2개 이상의 환경에서 재배 및 캡사이시노이드 함량을 측정하였음. 그 결과, 염색체 1번, 2번, 3번 및 10번에서 신미 함량에 관여하는 QTL을 탐색할 수 있었고, 이들이 캡사이시노이드 함량에 주요하게 작용하여 고추의 신미 함량을 조절할 것으로 예상됨. 신미함량을 조절하는 QTL로부터 개발된 분자마커들은 관행적으로 양적형질이어서 육종이 어려운 신미함량을 신품종 개량에 이용할 수 있게 함으로써 국내 종자회사의 국제 경쟁력 강화에 기여함.
- 고추 *Rf* 유전자를 동정하기 위하여 기존에 구축된 청양F2 집단과 연관분자마커를 이용하여 CM334 BAC clone에서 chromosome walking을 수행하였으며, 이를 이용하여 0cM에 연관된 BAC 염기서열을 확보하였음. 이 구간에서 부강C와 부강A의 RNA-seq을 C line 특이적으로 발현되는 4개의 후보유전자를 확보하였음. 이 중 *CaPPR6*의 경우 기존에 다른 종에서 보고된 *Rf* 유전자들과 유사성을 지니므로 강력한 후보유전자라 예측하고 VIGS 실험 등 다른 실험을 기획하여 후보 유전자 확인을 수행함. 또한, 4개의 후보유전자에서 각각 분자마커를 개발하고, 이를 다른 회사의 육종계통에 적용하였는데, 이 중 *Rf-CDS3* 후보유전자에서 개발된 마커가 88%의 유전형 예측으로 가장 높은 정확도를 보이는 것으로 확인됨. 이러한 고추 *Rf* 후보유전자 기반 분자마커 개발은 고추 F1 종자 생산 시 필수적으로 필요한 *Rf* system을 적극적으로 육종에 활용할 수 있도록 도움을 제공하며, 유전자 기반 분자마커 개발을 통해 다양한 육종 소재에 *Rf* 분자마커를 활용할 수 있을 것으로 예측됨.
- *sy-2* 후보유전자 동정을 위해 기존에 구축된 *sy-2* X No.3341 F2 집단에서 bulked segregant analysis (BSA) RNA-seq을 수행하였으며, 0cM 지역에 연관된 BAC 염기서열을 chromosome walking을 통해 확보하였음. 이를 이용해 *sy-2* 후보 유전자 2개를 선별하였으며, 후보유전자 VIGS 실험 및 interaction 실험을 통하여 *sy-2* 유전자를 검정 중에 있음. 이러한 *sy-2* 유전자 동정은 지구 온난화 등의 기후 변화로 인한 고추 육종의 어려움을 해결할 수 있을 것으로 기대됨.

3. 고추 주요 형질 분석에 필요한 집단 및 재료 구축

- 비타민 C 및 A의 함량 차이를 보이는 Long Sweet X AC2212 RIL 집단 207 계통을 구축함으로써 양적형질로 유전됨으로써 유전분석이 어려웠던 비타민 함량에 대한 분석이 가능할 것으로 생각됨. 이러한 비타민 함량의 QTL 분석은 최근들어 관심이 높아진 기능성 고추 품종 육성에 도움을 줄 수 있는 육종소재로 활용됨과 동시에 육성을 촉진시킬 수 있을 것으로 기대됨.
- 역병 및 선충 연구집단(ECW30R X CM334), 색소 및 비타민 연구집단(Long Sweet X AC2212), Capsicin 및 capsiate 연구집단(Takanotsume X SNU11-001), Capsaicin 및 색소 연구집단(TF68 X Habanero), Capsaicin 연구집단(PI260433 X Jeju) 5가지의 집단을 이용하여 각 F1 간 4-way cross가 진행된 F1*종자를 50립씩 확보하였음. 8개 다양한 계통에 대한 8-way cross가 작성되어 8개 계통의 유전적 다양성을 모두 포함하는 MAGIC 집단

을 만들게 된다면 Genome-wide association study (GWAS) 등의 유전 정보를 활용하여 다양한 특성에 대한 일시적 분자마커 개발이 가능함으로써 고추 육종 효율성 향상에 한 단계 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

4. MAB 실용화

- 고추의 병 저항성 및 주요 형질(역병 저항성, TSWV 저항성, 캡사이시노이드 함량, Rf 등)에 대해 신속 정확한 분석을 위해 Bio-Mark HD system DNA chip 기술을 고추에 최적화하여 고추 염색체상 고르게 분포하는 SNP 마커에 대해 다형성 조사 및 분자마커를 선별하였음.
- 추가적으로 바이러스 저항성 연관 마커 등을 KASPar array로 전환하여 Bio-Mark HD system에 적용할 수 있도록 하였으며, 이들을 이용해 종자회사 계통 및 MAB 선별에 적용하여 그 신속하고 정확하게 대량의 분자마커 set를 MAB에 이용할 수 있음을 확인하였음. 이는 고추 육종에 있어 MAB를 활용한 육종 선발 과정에 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

5. 고추 소포자 배양 기술 개발

- 중국에서 도입된 F2 집단 31 계통을 대상으로 원예적 특성을 조사하였으며, 우수한 분리 계통은 형질고정 및 종자확보 후 수출용 품종육성 재료로 사용하고자 함. 중국과 멕시코에서 수집한 일반종과 인도, 르완다, 한국, 에티오피아, 인도네시아로부터 수집된 90점의 유전자원을 대상으로 증식 및 특성평가를 수행하여 원예적 특성과 병저항성, 유전자형 등을 조사하였음. *C. annuum* 79점, *C. chinense* 1점, *C. frutescens* 4점, *C. baccatum* 1점으로 분류되어 이중 가공용, 건과용, 생과용, 관상용으로 구분하여 11점을 선발하였음. 이와 같은 방법들을 통해서 선발된 다양한 유전자원들은 반수체육종을 통해서 우수 유전자원 고정을 통한 계통육성 및 목표시장에 적합한 신품종개발에 재료로 이용하고자 함.
- 국립원예특작과학원이 보유하고있는 고추 유전자원과 계통 중 934점을 이용하여 탄저병, 역병, 풋마름병 등 병 저항성 평가를 실시하여 각 유전자원의 병저항성 정도와 특성 등을 평가하였다. 그 결과 저항성을 나타내는 13A37 등 20점을 선발하였다. 채소과에서 보유한 23계통을 대상으로 병저항성 평가를 실시하여 4계통의 저항성품종을 선발하였다. 또한 중국도입 유전자원 47점을 대상으로 역병, 풋마름병에 대한 이병성, 저항성 품종을 대상으로 저항성평가를 실시하여 원예적 특성평가가 양호한 15FS29 등 7 계통을 선발하였음. 착과력과 생산 수량이 우수한 계통 선발을 위해서 43점의 유전자원 및 고유계통의 원예적 특성을 조사하여 8점의 자원을 선발하였다. 불량환경 (저온) 저항성 계통을 확보하기 위해서 보유계통, 유전자원 및 시판종의 내저온성 평가를 실시하여 13GF7 (Zhelyty, 러시아 도입)의 형질이 가장 우수한 것으로 밝혀졌다. 신규도입 유전자원 45점을 대상으로 내서성, 내습성 등 환경저항성 평가를 실시하여 6점의 유망자원을 선발하였음. 병저항성, 원예적 특성, 고생산 등 유용형질을 보유한 품종과 계통은 향후 육종재료로 유용하게 이용될 것이며, 고품질의 품종을 생산하는데 있어서 반드시 필요한 자원이 될 것으로 기대됨.
- 소포자 유래의 식물체를 생산하기 위해서 약배양, 나출 소포자 배양, shed-소포자 배양을

시도하여 응성배우체 유래의 반수체/배가반수체를 확보하는데 성공하였음. 특히 나출 소포자 배양을 통해서 식물체로 발달하는 과정을 추적하였으며, 소포자 유래의 식물체를 12주 만에 완전한 식물체를 확보할 수 있었음. 나출 소포자 배양의 결과는 약배양과 shed-소포자 배양 방법에 비해 6주 이상 감소시킬 수 있어 향후 반수체 육종방법 확립 시 매우 유용하게 이용될 수 있음. 소포자는 반수성이면서 단세포성 기관이기 때문에 화분발달과정, 배발생 과정 등 발생학적인 연구에 널리 이용될 수 있으며, 소포자 배양 방법과 결과는 고추 이외 작물의 소포자 배양 및 반수체육종 방법 확립에 기초 자료가 될 것임.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 및 산업화 관련

1. 고추 주요 병저항성 형질 관련 실용화 및 산업화

- TSWV 저항성, 역병 저항성 및 흰가루병 저항성과 관련된 분자마커 set를 농업기술실용화 재단, 하나종묘 등에 기술이전을 실시하였음. 이를 통해 고추 육종에 효율적으로 활용될 수 있는 분자마커 set를 마련하였음.
- 역병 저항성과 같이 양적형질로 유전되는 경우, minor QTL과도 연관된 다양한 SNP 마커 set를 확인한 후, 기술 이전이 가능할 것으로 생각됨.
- 이 외에도 흰가루병 저항성, 뿌리혹선충 저항성과 같은 병 저항성 형질의 경우 유전자 연관 분자마커를 개선하여 이를 다양한 자원에 적용하여 넓은 범위의 저항성을 갖음을 확인한다면, 유전자 기반 분자마커 set의 기술 실시가 가능할 것으로 생각됨.
- Geminivirus, 청고병 저항성과 같은 경우도 유전 분석이 가능한 집단 및 병리 검정에 필요한 기초 재료를 마련함으로써 이후, 저항성 형질 연관 분자마커를 개발하여 기술 실시가 가능할 것으로 예상됨.
- 앞서 언급한 병 저항성 형질 외에도 Potyvirus, 뿌리혹선충 저항성 등 추가적으로 병 저항성 형질에 대한 KASPar assay 분자마커 전환 및 분자마커 개선이 이루어지고 있음. 이를 추가적으로 기술실시를 수행하여 국내 고추 육종 시 수출용 고추 육성에 보다 효율적으로 사용할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 고추 유용 형질 연관 실용화 및 산업화

- 캡사이시노이드 함량에 관한 분자마커 set를 개발하여 기술이전을 실시하였음. 이를 통해 고추의 매운맛 육성에 필요한 분자마커를 실용화하였음.
- 비타민 및 색소 함량과 관련해서도 RIL 집단을 구축하였으며, 이를 이용해 비타민 및 색소 함량을 측정하고, 연관 QTL을 개발한다면 비타민 및 색소 함량과 관련된 분자마커 개발 및 기술실시가 가능할 것으로 생각됨.
- 고추 응성불임 회복 유전자와 연관된 분자마커를 개발함으로써, 이를 고추 응성불임 체계에 이용 가능하도록 함. 유전자 기반 분자마커를 개발하고, 이 분자마커를 다양한 고추 육성 계통에 적용함으로써 그 적용성을 확인하면 특허 출원 및 기술 이전이 가능할 것으로 예상됨.
- sy-2 후보유전자를 탐색함으로써 온도민감성 유전자 돌연변이를 개발해 지구 온난화와 같은 온도 변화 현상에 대비할 수 있도록 함. 이는 이후 수출 고추 품종 육성 시 온도 차이와 같은 현상을 고려할 때 좋은 육종 소재로써 활용될 수 있을 것으로 예상됨.
- MAGIC 집단을 활용하여 다양한 대립유전자의 형질을 하나의 집단에 집적시킨다면, 이후 분자마커 개발과 같은 기술 개발에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 생각되며 이를 이용하여 국내 고추 육종에 활용할 수 있는 기술 이전이 가능할 것으로 예상됨.
- MAB 실용화를 통해서 국내 종자 회사의 다양한 고추 관련 형질에 분자마커 적용을 신속하고 정확하게 수행할 수 있게 함으로써 이 MAB 분자마커 set를 기술이전하였고, 이를

앞으로도 지속적으로 고추 육종에 활용 가능할 것으로 생각됨.

3. 고추 소포자 배양 기술 관련 실용화 및 산업화

- 본 연구를 통해 개선 및 확립한 고추 소포자 배양 시스템은 소포자 유래 반수체를 생산할 수 있는 매우 유용한 기술임. 웅성 배우체인 소포자유래 배발생 및 재분화 식물체 생산 시스템은 다양한 작물에서의 소포자유래 반수체/배가반수체 생산을 위한 기초자료로 이용될 수 있음. 또한 웅성배우체 발달과정, 식물체 분화과정 등 식물발생학적 연구와 형질전환, 유전자 발현 검증 등 식물생명공학 연구에 널리 이용될 수 있음.
- 고추 소포자 배양을 통해 생산된 반수체/배가반수체는 유용형질고정 및 계통 생산을 통해서 신품종 육성에 널리 이용될 수 있음. 소포자유래 식물체는 반수성 또는 배가반수성이기 때문에 동형접합성 식물체이므로 유전자 고정 및 열성형질 고정 등에 널리 이용될 수 있음. 우수한 형질 (병저항성, 환경내성, 유용형질)을 보유한 개체의 유전자를 당대에 고정할 수 있는 장점을 이용하여 육종재료를 신속하게 확보할 수 있음.
- 연수 수행을 통해 확보한 중국, 인도, 르완다, 에티오피아, 인도네시아 등으로부터 수집된 유전자원들은 향후 목표 수출시장을 선도할 수 있는 신품종 개발 시 주요한 자원이 될 것임. 또한 병저항성, 환경내성, 우수 형질 등을 보유한 유전자원들은 신품종 육성의 재료로 사용되어질 것이며, 본 연구를 통해 수행된 병저항성 품종 선발 방법, 원예적 특성 분석 방법 등 유전자원 선발 방법들은 향후 개발된 신품종의 특성분석 시 기초자료로 이용될 수 있을 것임.

제 2 절 지식재산권 확보 관련

1. 고추 주요 병저항성 형질 관련 지식재산권 확보

- TSWV 저항성의 경우 그 유전자를 동정하고 분자마커를 개발하여 SCI 논문을 출판하였음. 또한 유전자 기반 분자마커를 개발하여 특허 출원 및 등록을 완료하였고, 이를 종자회사의 고추 육종에 활용하여 TSWV 저항성을 포함한 MAB를 수행 중임.
- 역병 저항성의 경우 major QTL 연관 분자마커를 개선하였고, 다양한 역병 균주를 집중하여 시판 품종의 역병 저항성에 대한 반응을 조사하여 SCI 논문을 출판하였음. Major QTL 연관 분자마커를 개선하여 이를 종자회사의 MAB에 제공하여 역병 저항성을 포함한 고추 육종을 수행 중임.
- 흰가루병 저항성의 경우 유전자 위치를 유전적 및 물리적 지도에서 확인하였고, 이를 이용하여 연관 분자마커를 개발하였음. 개발된 분자마커를 이용하여 특허 출원을 수행하였고, SCI 논문을 준비 중임. 흰가루병 저항성 연관 분자마커도 종자회사의 MAB에 제공하여 이를 이용한 고추 육종을 수행 중에 있음.
- 뿌리혹선충 저항성의 경우 유전자 위치를 유전적 및 물리적 지도에서 확보하여 이를 이용하여 유전자 동정을 준비 중에 있음. 유전자 동정 중에 개발된 분자마커를 이용하여 SCI 논문을 준비 중에 있으며 연관 특허 출원도 수행 예정임.
- 역병 저항성의 경우 다양한 역병 균주를 이용하여 major QTL을 개선함과 동시에 minor

QTL을 탐색하고 있으며, minor QTL을 탐색하여 이와 연관된 분자마커를 개발하여 역병 저항성에 강력하게 대비가 가능한 major QTL 및 minor QTL 연관 분자마커를 특허 출원할 수 있을 것으로 예상됨. 또한 역병 저항성 QTL 탐색에 관련하여 논문을 준비 중임.

- 흰가루병 저항성, 뿌리혹선충 저항성의 경우 유전자 연관 분자마커를 개발하였으므로, 기존 데이터를 이용하여 유전자를 확보하여 유전자 기반 분자마커로 개선할 계획임. 유전자 기반 분자마커를 개발하여 다양한 계통에 적용하여 적용성을 확인한다면, 이를 특허 출원 및 등록이 가능할 것으로 예상되며, 논문을 준비할 수 있을 것으로 기대됨.
- Geminivirus, 청고병 저항성의 경우 연관된 유전자 혹은 QTL을 확보한다면, 아직까지 고추에서 두 병 저항성에 관한 논문이 보고된 적 없으므로 논문을 준비할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 고추 유용 형질 관련 지식재산권 확보

- 고추 캡사이시노이드 함량의 경우 TF68 X Habanero RIL 집단, Perennial X Dempsey RIL 집단에서 공통적으로 확보된 캡사이시노이드 함량 관련 유전자 지역을 이용하여 좀 더 정확히 고추의 신미를 측정할 수 있는 분자마커를 개발하여 특허 출원 및 논문 준비가 가능할 것으로 예상됨. 또한, 본 연구진에서 확보한 고추 핵심집단에서 캡사이시노이드 함량 측정 결과와 비교한다면 캡사이시노이드 함량에 대한 다양한 분자마커 개발 및 이를 이용한 논문 준비가 가능할 것으로 생각됨.
- 비타민 및 색소 함량 집단의 경우 Long Sweet X AC2212 RIL 집단을 구축하였으므로, 비타민 및 색소 함량을 측정하여 연관 QTL을 확보할 수 있을 것으로 예상됨. 이를 이용하여 고추 기능성 품종 육성에 이용 가능한 분자마커 set를 개발하고, 이를 이용하여 특허 출원 및 논문 준비가 가능할 것으로 생각됨.
- *Rf* 및 *sy-2* 유전자의 경우 후보 유전자를 chromosome walking, RNA-seq 기법을 이용하여 탐색함으로써 SCI 논문을 출판하였음. 이 후보 유전자의 기능 확인을 수행하여 유전자를 확보한다면 유전자 기반 분자마커를 이용한 특허 출원 및 기능 분석을 통한 논문 준비가 가능할 것으로 생각됨.
- 앞서 소개하였던 병 저항성 형질 및 유용 형질을 이용하여 고추 MAB에 활용가능한 분자마커 set를 확보하였으며 이를 이용하여 특허를 출원하였음. 앞서 계획한 대로 분자마커의 개선이 가능하다면 이후 MAB에 활용 가능한 분자마커 set를 추가 혹은 개선이 가능할 것으로 생각되며 이를 이용해 특허 준비가 가능할 것으로 예상됨.

3. 고추 소포자 배양 기술 관련 지식재산권 확보

- 본 연구팀은 향후 계속된 연구를 통해서 나출 소포자 배양 방법을 개선하여 소포자배 생산 및 재분화 효율을 크게 증가시킬 수 있는 방법을 찾고자 함. 계속된 연구를 통해 확보된 결과들을 특허 출원 및 등록을 수행할 예정임.
- 본 연구팀은 현재까지 개선된 소포자 배양 방법을 통해 병저항성, 환경내성, 원예적 특성 등이 우수한 품종을 대상으로 소포자유래 식물체를 생산하고자 함. 현재 몇몇 품종을 대상으로 나출 소포자 배양을 시도한 결과 우수형질을 보유하고 있는 품종으로부터 다수의 배

를 확보함. 과제 종료후에도 지속적으로 실험하여 완전한 식물체로 생육시켜 유전자의 발현 정도를 확인하고 개체간 차이를 분석하여 최상의 형질을 보유한 배가반수체를 식물특허 출원, 유전자원 등록하여 보호받고자 함.

- 연구 수행 결과 고추 나출 소포자 배양 시 배양 방법, charcoal 첨가 여부, 배양배지의 pH 등의 효과를 검증하였음. 이러한 결과들은 향후 소포자 유래의 식물체 생산방법을 확립하는데 기초자료로 이용될 것이며, 향후 논문으로 발표할 예정임.

제 3절 추가연구, 타연구 활용 계획

1. 고추 주요 병저항성 관련 연구 활용 계획

- 역병 저항성의 경우 major QTL 구간의 유전적 및 물리적 거리를 좁혀 major QTL과 연관된 유전자를 확보하고, minor QTL 구간도 동시에 탐색함으로써 더 강력하게 역병 저항성 고추 품종 육성에 이용하고자 함.
- 흰가루병 저항성, 뿌리혹선충 저항성의 경우 차세대 염기서열 분석법 및 다양한 방법을 이용하여 후보 유전자를 확보하고, 최종적으로는 TOE 혹은 형질전환체를 통하여 저항성 유전자를 확보함으로써 다양한 고추 육성 계통에 적용 가능한 분자마커를 개발할 계획임.
- Geminivirus 저항성, 청고병 저항성 등은 육종 재료를 확보하여 분리 집단을 구축하고, 이를 이용하여 저항성 유전자 연관 분자마커를 우선적으로 개발할 계획임. 또한 GSP 1단계 프로젝트에는 포함되지 않았지만 CMV 저항성 및 ChiVMV 저항성 등 다른 중요한 병저항성 형질에 대해서도 유전 분석을 통한 분자마커를 개발할 계획임.

2. 고추 유용 형질 관련 연구 활용 계획

- 고추 캡사이시노이드 함량의 경우 고추 핵심집단의 캡사이시노이드 함량을 분석하여 GSP 프로젝트의 Perennial X Dempsey 및 TF68 X Habanero RIL 집단에서 분석한 캡사이시노이드 함량과 비교 분석을 수행할 예정임. 이를 통해 좀 더 다양한 유전자원으로부터 캡사이시노이드 함량 연관 QTL을 분석할 수 있을 것으로 생각됨.
- 비타민 및 색소 함량의 경우 HPLC 분석 기법을 이용하여 비타민과 색소 함량을 분석하고, RIL 집단의 유전형질을 resequencing 혹은 GBS 기법을 이용해 분석함으로써 비타민 및 색소와 관련된 QTL을 분석할 수 있을 것으로 생각됨.
- *Rf*와 *sy-2*의 경우 현재 silencing 등의 기법을 이용해 후보 유전자를 탐색하여 유전자를 찾고자 함. 따라서 후보유전자를 탐색한 후 형질전환 등의 기법을 이용해 유전자를 동정함으로써 유전자 기반 분자마커 개발을 통한 다양한 육종 계통으로의 적용이 가능할 것으로 생각됨.

3. 고추 소포자 배양 기술 관련 지식재산권 확보

- 본 나출 소포자 배양 방법은 고추 품종 중 일부 품종에 한정되어 연구가 진행중에 있음. 향후에는 다양한 품종을 대상으로 연구를 진행할 것이며, 이때 본 연구를 통해 도출된 결과들이 중요한 자료로 이용될 것임. 고추 뿐만 아니라 가지과 작물의 반수체/배가반수체 생산을 위한 연구에서도 널리 이용될 것으로 예상됨.

- 본 과제의 연구결과 생산된 고추 소포자 유래의 반수체/배가반수체는 현재 국립원예특작과학원 온실에서 생육 중임. 계속된 연구를 통해서 소포자유래 식물체의 배수성 검증을 통해 배가반수체의 생산 효율을 조사할 예정임.
- 본 연구에서 소포자를 나출하기 위해 사용한 방법 (micro blender 사용)은 고추 이외의 작물에서는 널리 이용되지 않고 있음. Blender를 사용할 경우 소포자에 스트레스를 적게 주어 활력 있는 소포자를 확보할 수 있는 가능성이 크게 높아짐. 또한 일정한 연구결과를 도출할 수 있는 방법이 됨. 이러한 장점을 가진 고추 소포자 배양방법을 타 작물에 적용하여 소포자 배양을 시도하고자 하는 많은 작물에 배양 방법을 교육 및 보급하여 소포자를 이용한 생명공학 분야의 연구에 기여하고자 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 최근 고추의 표준유전체염기서열(reference genome) 정보를 기반으로 한 QTL 분석과 RNA-seq 등이 활발히 진행되고 있음(Nimmakayala, 2016; Sarpras, 2016; Zhang, 2016). 특히 NGS 기술을 기반으로 하여 빠르게 후보 유전자를 찾을 수 있다는 점에서 장점을 지님. 하지만 여전히 이러한 연구를 진행하기 위한 집단 육성에는 시간이 많이 소요되기 때문에 목표 형질을 연구하기 위한 알맞은 집단을 육성하는 것이 가장 필수적임을 알 수 있음.
- 집단 육성에 소요되는 시간을 단축하고, NGS 기술을 기반으로 빠르게 후보 유전자를 찾기 위해서 bulked segregant analysis (BSA) 방법을 NGS와 결합한 방법이 최근 많이 보고되고 있음(Magwene et al., 2011; Win et al., 2017). BSA 방법을 이용하면 집단 육성에 소요되는 시간을 최소로 줄이며, 유전 분석을 수행할 때 LD 값을 상대적으로 높일 수 있으므로 매우 효율적인 방법으로 생각됨. 이를 위해서는 실험실 내에 BSA 기법을 NGS 기술과 응용할 수 있게 해당 소프트웨어 설치 및 pipeline 구축 작업이 필요할 것으로 생각됨.
- 최근 병 저항성 유전자를 동정하기 위한 빠른 방법으로써 RenSeq이라는 방법이 소개되고 있음(Andolfo et al., 2014; Jupe et al., 2013, Witek et al., 2016). RenSeq은 target enrichment sequencing과 Illumina 혹은 PacBio 기술을 결합하여 NB-LRR 도메인을 갖는 저항성 유전자를 빠르게 선별한 후, 이를 assembly하여 저항성 유전자를 찾는 방법임. 이를 연구하기 위해 RenSeq을 이용한 NB-LRR 분석 방법을 고추에도 적용할 수 있는 pipeline을 구축해야 할 것으로 생각되며, PacBio 등 기술을 이용하면 최대 10kb 정도의 contig를 얻을 수 있으므로 이를 이용하여 고추의 NB-LRR 도메인을 갖는 저항성 유전자를 확보할 수 있을 것으로 생각됨.
- 최근 CRISPR-Cas9 system을 이용한 genome editing이 가능해짐으로써 이를 이용한 연구 사례가 증가하는 추세임(Sander JD and Joung, 2014). 이는 저항성 유전자를 확보하면 이를 이용한 gene editing 기법을 통해 형질전환 혹은 loss-of-function study를 고추에 직접 실현 가능하게 함으로써, 추후 프로젝트를 통해 밝혀진 유전자의 동정 단계를 가속화할 것으로 예상됨. 하지만, 아직 고추에서는 protoplast를 이용한 CRISPR-Cas9 system이 진행 중에 있으며, 이 기법을 실험실 조건에 최적화하는 단계가 관건일 것으로 생각됨.
- 고추의 반수체 생산은 현재까지도 약배양이 널리 이용되고 있음. 2016년에 보고된 Popova 그룹은 식물육종 프로그램을 위한 순수 계통을 빠르게 만드는 가장 중요하고 유용한 도구는 약배양이라고 발표했음(Popova et al., 2016). 이와 같이 현재까지도 고추의 경우에는 나출 소포자 배양에 대한 연구발표는 소수이며, 배양조건을 확립하기 위해 인용할 수 있는 정보 수집에 어려움이 많은 실정임. 고추의 반수체 생산을 위해 시도되는 방법 중 약배양 방법이 개선된 shed-소포자 배양법이 있음. 이 방법은 2006년 Supena 그룹에서 성공사례를 소개하면서 알려지게 되었음(Supena et al., 2006). Shed-소포자 배양 방법은 나출한 고체배지와 액체배지를 동시에 이용하는 이중배양 방법을 이용하여 나출한 약을 배양 하는 것으로써 약벽조직의 효과를 누림과 동시에 터져나온 소포자 유래의 배를 확보할 수 있음. 2011년 발표된 논문을 통해서 shed-소포자 배양에 의해 생산되는 소포자배의 질을 향상시키고자 성장조절물질의 효과, 배양 온도의 변화, activated charcoal의 효과 등을 조사하

였음(Supena et al., 2011).

- 소포자 배양은 작물의 특성에 따라서 성공여부가 크게 달라질 수 있음. 유채, 밀, 보리 등의 작물은 소포자 배양에 성공하여 현재는 반수체 육종에까지 널리 이용되고 있는 실정임. 유채의 경우 1975년에 최초로 소포자 배양을 시도한 이후 많은 연구가 진행되고 있으며, 다양한 조건에서의 실험 결과들이 축적되어있음. 현재 나출 소포자 배양은 반수체육종 뿐만 아니라 유전자연구, 유전자 지도작성, 마커개발, QTL 위치, 유전자 변형 연구등에 이용되고 있는 실정임(Rahman et al., 2016).
- 고추에서의 반수체 육종은 현재까지는 널리 이용되지 못하고 있음. 그러나 최근 연구에 따르면 품종의 형질을 고정하기위한 방법으로 소포자 배양을 시도하는 사례가 증가하고 있는 상황임. 2014년 Shmykova 그룹의 연구에 의하면 *C. annum* L.와 *C. chinense* Jacq 교배종의 형질을 고정하기 위해서 shed-소포자 배양을 시도되었음. F1, F2 품종의 배가반수체를 개발하여 특성평가 결과까지 발표하였음(Shmykova et al., 2014). 파프리카를 대상으로한 반수체 육종이 2012년 보고된바 있음. Lantose 그룹에서 파프리카의 F1 hybrid 품종을 대상으로 소포자 배양을 시도하여 1개의 배양용기에서 20-100개의 ELS (Embryo Like Structure)를 얻었다는 논문을 발표하였음(Lantose et al., 2012).
- 십자화과 작물의 경우 소포자 배양 방법이 1980년대에 확립된 이후 활발한 연구가 이루어져서 현재는 반수체 육종에도 소포자 배양의 활용이 일반적인 현상이 되었음. 2015년 중국의 Zeng 그룹은 브로콜리와 흰양배추의 교배종 육종에 소포자 배양을 활용한 논문을 발표하였음. 교배종의 유전자를 고정하기 위한 도구로 나출 소포자 배양법을 활용하였으며, 교배품종에 적합한 배양 조건을 확립하기위해 배지 농도, 고온-저온처리, 삼투압 조절제 처리 등 다양한 조건을 규명하였음. 이보다 전인 2012년 국립원예특작과학원에서는 브로콜리의 신품종 육성을 위해서 소포자 배양을 시도한 보고가 있음(Kwak et al., 2012).

제 7 장 참고문헌

- Andolfo G., Jupe F., Witek K., Etherington GJ., Ercolano MR., Jones JDG. 2014. Defining the full tomato *NB-LRR* resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. *BMC Plant Biol* 14.
- Ari E, Yildirim T, Mutlu N, Büyükalaca S, Gökmen Ü, Akman E. 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant 2 production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk J Biol* 40:944 - 954.
- Ben-Chaim A., Borovsky Y., Falise M., Mazourek M., Kang BC., Paran I., Jahn MM. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 113.8: 1481-1490.
- Irikova T, Grozeva S, Popov P, Rodeva V, Todorovska E. 2011. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype, culture medium and duration of cultivation. *Biotechnol Biotech Eq* 25:2604-2609.
- Jupe F., Witek K., Verweij W., Sliwka J., Pritchard L., Etherington GJ., Maclean D., Cock PJ., Leggett RM., Bryan GJ., Cardle L., Hein I., Jones JDG. 2013. Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. *Plant J* 76(3):530-544.
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of Hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425-434.
- Kim S., Park M., Yeom S.I., Kim Y.M., Lee J.M., Lee H.A., Seo E., Choi J., Cheong K., Kim K.T., Jung K., Lee G.W., Oh S.K., Bae C., Kim S.B., Lee H.Y., Kim S.Y., Kim M.S., Kang B.C., Jo Y.D., Yang H.B., Jeong H.J., Kang W.H., Kwon J.K., Shin C., Lim J.Y., Park J.H., Huh J.H., Kim J.S., Kim B.D., Cohen O., Paran I., Suh M.C., Lee S.B., Kim Y.K., Shin Y., Noh S.J., Park J., Seo Y.S., Kwon S.Y., Kim H.A., Park J.M., Kim H.J., Choi S.B., Bosland P.W., Reeves G., Jo S.H., Lee B.W., Cho H.T., Choi H.S., Lee M.S., Yu Y., Do Choi Y., Park B.S., van Deynze A., Ashrafi H., Hill T., Kim W.T., Pai H.S., Ahn H.K., Yeam I., Giovannoni J.J., Rose J.K.C., Sorensen I., Lee S.J., Kim R.W., Choi I.Y., Choi B.S., Lim J.S., Lee Y.H., Choi D. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat Genet* 46:270-278.
- Kwak JH, Park M, Lee JG, Park S, Kim DY, Lim YP, Yoon MK. 2012. Development of new broccoli varieties from elite lines obtained by microspore cultivation method. *CNU J Agri Sci* 39(4) 497-502.
- Lee J., Park SJ., Hong SC., Han JH., Choi D., Yoon JB. 2016. QTL mapping for capsaicin and dihydrocapsaicin content in a population of *Capsicum annuum* 'NB1' × *Capsicum chinense* 'Bhut Jolokia'. *Plant Breed* 135.3: 376-383.
- Magwene PM., Willis JH., Kelly JK. 2011. The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLoS Comput Biol* 7(11):e1002255.

- Mazourek M., Pujar A., Borovsky Y., Paran I., Mueller L., Jahn MM. 2009. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant physiol* 150.4: 1806–1821.
- Nimmakayala P., Aburrie V., Saminathan T., Alaparathi S.B., Almeida A., Davenport B., Nadimi M., Davidson J., Tonapi K., Yadav L., Malkaram S., Vajja G., Hankins G., Harris R., Park M., Choi D., Stommel J., Reddy U.K. 2016. Genome-wide diversity and association mapping for capsaicinoids and fruit weight in *Capsicum annuum* L. *Scientific Reports* 6.
- Nowaczyk L., Nowaczyk P., Olszewska D. 2016. Treating donor plants with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid can increase the effectiveness of induced androgenesis in *Capsicum* spp. *Sci Hortic* 205(23):1–6.
- Park EJ, Kim JA, Lee JS, Jang IC, Yoon M, Chung SH, Kim M. 2005. The influence of pretreatment period, 2-Hydroxynicotinic acid and co-pretreatment on embryo induction in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. *Kor J Plant Biotechnol* 32(1):37–44.
- Parra-Vega V, Renau-Morata B, Sifres A, Seguí-Simarro JM. 2013. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 112:353–360.
- Rahman M, Michalak de Jiménez M. 2016. Behind the scenes of microspore-based double haploid development in *Brassica napus*: A review. *Journal of plant Science & Molecular Breeding* 5:1.
- Sander JD., Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32(4):347–55.
- Sarpras, M., Vineet S., Sushil S.C., Jharna D., Ajay K., Satish K.Y., Mukesh N., Vijaya B., Suresh K.A., Nirala R. 2016. Comparative analysis of fruit metabolites and pungency candidate genes expression between Bhut Jolokia and other *Capsicum* species. *PLoS ONE* 11.12: e0167791.
- Shmykova NA, Pyshnaya ON, Shumilina DV, Dzhos EA. 2014. Morphological characteristics of doubled haploid plants of pepper produced using microspore/anther in vitro culture of the interspecies hybrids of *Capsicum annum* L. and *C. chinense* Jacq. *Russ Agric Sci* 40: 417–421
- Supena EDJ, Custers JBM. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Hortic* 130:769–774
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25:1–10
- Win KT., Vegas J., Zhang C., Song K., Lee S. 2017. QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber via bulked segregant analysis using next-generation sequencing and conventional methods. *Theor Appl Genet* 130(1):199–211

- Witek K., Jupe F., Witek AI., Baker D., Clark MD., Jones JDG. 2016. Accelerated cloning of a potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing. *Nat Biotechnol* 34(6):656-660.
- Yoo EY, Kim S, Kim YH, Lee CJ, Kim BD. 2003. Construction of a deep coverage BAC library from *Capsicum annuum*, 'CM334'. *Theor Appl Genet* 107:540-543.
- Zhang, Z., Zhao S., Liu G., Huang Z., Cao Z., Cheng S., Lin S. 2016. Discovery of putative capsaicin biosynthetic genes by RNA-Seq and digital gene expression analysis of pepper. *Scientific reports* 6:34121.
- Zeng A, Yan J, Song L, Gao B, Zhang Y, Li J, Liu H, Hou X, Li Y. 2015. Induction and development of microspore-derived embryos in broccoli x white-headed cabbage hybrids microspore culture. *Euphytica* 203:261-272.

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

프로젝트명	고추 육종 효율성 향상을 위한 기반 기술 개발		
프로젝트 책임자	강병철	프로젝트 연구기관	서울대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
고추 분자표지 개발 및 활용 기술	미국, 네덜란드 등	40	60	80	
고추 반수체 육종기술	헝가리, 캐나다 등	50	40	80	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	WIPS 데이터 베이스, 특허정보검색서비스(www.kipris.or.kr), 포커스트(focust.wisdomain.net) ISI Web of Knowledge, 국가과학기술정보센터(www.ndsl.kr), 구글 검색(www.google.com)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 청구항

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		고추 분자표지 개발 및 활용 기술	고추 소포자 배양 기술 (국내)
Keyword		pepper, paprika, genotyping, marker	고추, 소포자 배양, 약배양
검색건수		207	10건 이상
유효특허건수		57	3건
핵심특허 및 관련성	특허명	PMMoV 저항성 고추 품종을 선별하기 위한 프라이머 세트, 방법 및 키트 (Primer set, method and kit for selecting PMMoV-resistant pepper cultivar)	고추의 소포자배양에 의해 얻어진 배로부터 식물체를 생산하는 방법
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2011	2010
	관련성(%)	80%	80%
	유사점	SNP 분자표지를 활용하여 육종 계통에서 해당 특성의 다양한 대립유전자를 일괄적으로 분석하기 위한 키트 개발	소포자배양기술
차이점	최신의 유전자형 분석 방식들에 비해 일시 분석 가능 sample 수가 떨어지는 HRM 분석 방식을 이용하였으며 단일 형질에 대해서만 분석이 가능한 키트를 개발	소포자배양으로부터 얻어진 성숙 또는 미성숙 자엽배(cotyledonary embryo)를 특정 재분화 배지에 이식하여 배양	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽, 국내
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), google, DBpia
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목 및 초록

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		고추 분자표지 개발 및 활용 기술	고추 소포자 배양
Keyword		pepper, paprika, genotyping, marker	고추, 소포자 배양, 약배양, pepper microspore culture, pepper anther culture
검색건수		212	3,163
유효논문건수		157	37
핵심논문 및 관련성	논문명	Characterization of Capsicum annuum genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene Pepper GeneChip	High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)
	학술지명	Plos One (2013)	Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) February 2013, Volume 112, Issue 2, pp 191-201
	저자	Theresa A. Hill 외 8명	Moonza Kim 외 3명
	게재년도	8(2):e56200	2013
	관련성(%)	80	80
	유사점	High-throughput 분석 방법을 활용하여 다수의 계통의 유전자형을 상세 분석	liquid, double-layer, and two-step culture 등 다양한 고추 소포자 배양 조건 적용 및 최적 배양 조건 구명
	차이점	MAS나 MAB의 목적이 아닌 유전자원에 대한 corecollection을 위해 기술을 활용	다양한 유전자원 및 계통으로 고추 소포자 배양 가능성 확대 모식물체에 대한 최적조건 구명

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

- 1) 국내 제품생산 및 시장 현황
 - 분자표지 개발 및 적용의 경우 현재 대규모 종자 회사의 경우 자체 분석 시스템을 갖추고 있으나 중소기업 및 개인육종가의 경우 (주)고추과 육종, 채소병리검정지원사업단, (주)에프앤피 등 분자유종 관련 회사 및 기관의 분자표지 검정 시스템을 이용함.
 - 활용되고 있는 분자표지 검정 시스템의 경우 주로 질적 형질 또는 일부 major QTL 각각에 대한 CAPS, SCAR 및 HRM 기반 분자 표지를 활용하며 MAB를 위한 background selection에 대한 서비스는 지원하지 않음.

- (주)고추과 육종에서는 각종 바이러스 저항성, 역병 저항성, 탄저병 저항성, 흰가루병 저항성, 세포질 옹성불임성 회복, 유전자적 옹성불임성 회복 등에 연관되어 있는 분자표지를 개발하였고 이들 중 일부에 대한 유전자형 검정을 상업화하였음(www.고추와육종.kr).
- 채소병리검정지원사업단에서는 고추의 경우 pvr1 및 pvr4 저항성, TSWV 저항성, TMV(L3, L4) 저항성, CMV 저항성(Cmr1), 세균성반점병 저항성(Bs2) 연관 분자표지를 이용한 유전자형 검정 및 종자 순도 검정을 지원함(www.scdr.re.kr).

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 국외 분자 육종 시스템의 경우 단일 형질에 대한 겔 분석용 분자표지 상업화의 수준에서 벗어나 차세대 염기서열 분석 기법을 바탕으로 한 대규모 SNP 분자표지 생산 서비스, 다양한 유용 형질에 대한 분자표지를 집적한 칩 분석 서비스를 제공하는 등 대형화·자동화된 분자 육종 기술을 상업화가 하고 있음.
- 국제미작연구소(IRRI)의 경우 Fluidigm SNPtype 분석 기술을 활용해 다양한 유용 특성 도입 여부를 다수의 계통에서 동시에 분석할 수 있는 foreground selection용 chip(192 X 24) 및 유전체 상 전반적인 유전자형을 다수의 계통에서 분석하여 MAB 또는 유전적 다양성 분석에 활용할 수 있는 background selection용 chip(96 X 96)을 개발하여 'breeder's chip'이라는 이름의 kit로 상용화함(pag.confex.com/pag/asia2013/webprogram/Paper8814.html).
- 중국의 Beijing Genomics Institute(BGI)의 경우 자체적으로 주요 작물의 전체 염기서열 또는 초고밀도 유전자 지도를 개발하여 보유하고 있으며 이를 바탕으로 다수의 특성에 대한 분자표지 개발 및 활용을 동시에 수행하는 'whole genome molecular breeding' 서비스를 제공함. 또한 집단 각 개체의 DNA 제공 시 GBS 분석을 통해 유전체 전반에 분포하는 대량의 SNP를 발굴하여 공급하는 서비스도 가능함(www.genomics.cn).

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 본 연구를 통해서 개발될 각종 유용특성 연관 신규 분자표지는 고추 및 파프리카 육종 시 MAS를 수행하여 육종 과정에서 소모되는 시간, 노동력 및 비용을 감축하는 효과를 나타낼 수 있으므로 민간 기업에의 기술 이전 또는 지원 기관에 의한 서비스 제공을 통해 상업화가 가능함.
- 또한 유용 형질 연관 분자표지를 집적하는 형태의 분자표지 세트 및 효과적인 MAB를 위해 선별된 분자표지 세트는 유용 특성의 도입 및 여교잡 과정 시 집단 내 다수의 계통에 반복적으로 활용되어 육종 효율성을 크게 높일 수 있으므로 경제적 가치가 매우 크다고 볼 수 있으며 역시 기술 이전 및 서비스 지원 등을 통한 상업화가 가능함.
- GSP 목표시장의 효율적인 선점을 위해서는 단기간 내 목표시장에서 요구하는 특정 형질이 우수한 계통육성이 필요하므로 고추 반수체 육종 기술은 필요성이 높음.
- 개발된 고추 반수체 육종 기술을 관련 고추 GSP 프로젝트 수행단 및 기술이전 의향이

- 있는 민간회사에 기술이전하여 품종육성 연한 단축 기술지원 기반 구축 가능
- 본 GSP 과제 종료 후에도 개발기술을 기반으로 자립이 가능한 민간 서비스 회사 육성 가능

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	200	300	300		900
경제적 파급효과	300	600	1000	1000		2900
부가가치 창출액	500	1000	2000	2000		5500
합 계	900	1800	3300	3300		9300

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 단일 유전자에 대한 분자표지 검정용 마커 세트 개발분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 High-throughput 기술에 기반한 분자표지 개발 및 유전자형 검정용 키트 개발 방향으로 연구를 추진하여 개발된 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.
- 기존 특허는 소포자 배양시 식물체 채취 단계 및 사용배지에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 최적 모식물체 생육조건, 약 및 소포자 배양 기술 정립 및 소포자 배양을 통한 우수계통 육성 방향으로 연구를 추진하여 개발된 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임.

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 질적 형질에 대한 단일 분자 표지 개발 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 양적 형질에 대한 분자 표지 개발 및 고추에서의 high-throughput 유전자형 검정 시스템 개발 방향으로 연구를 추진하여 관련 논문을 Theoretical And Applied science, Plos one, Molecular breeding 등의 학술지에 게재할 계획임.
- 기존 논문은 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 최적 모식물체 생육조건, 약 및 소포자 배양 기술 정립 및 소포자 배양을 통한 우수계통 육성 방향 연구를 추진하여

관련 논문을 한국식물조직배양학회지, 한국원예학회지, 한국종자연구회지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 시장 분석결과 단일 유전자에 대한 MAS를 위한 겔 분석 또는 HRM 분석용 분자표지의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 유용 형질 연관 분자표지를 집약하고 MAB용 분자표지를 선별하는 방향으로 연구를 추진하여 고추 및 파프리카의 MAS 및 MAB용 칩 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 “고추 육종 효율성 향상을 위한 기반 기술 개발” 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 “고추 육종 효율성 향상을 위한 기반 기술 개발” 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.