최 종
보고서

고기능성 고추품종 육성을 위한 유전자지도 작성 및 분자육종 기술 개발

Construction of Molecular Linkage Map and Development of Molecular Breeding Techniques in Hot Pepper

세부과제명: RFLP **마커제작 및 유전자지도 작성**
FISH **및** Trisimic**을 이용한 유전자지도**

연 구 기 관

서 울 대 학 교

농 림 부

최 종 보 고 서

2000 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 고기능성 고추품종육성을 위한 유전자지도작성 및 분자육종 기술 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000년 12월 29일

주관연구기관 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 김병동 (인)

주관연구기관장 : 서울대학교 총장 직 인

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "고기능성 고추품종 육성을 위한 유전자 지도 작성 및 분자 육종 기술 개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12월 29일

주관연구기관명	서 울 대	협동연구기관명	흥농종묘
총괄연구책임자	김 병 동	협동연구책임자	이 문 환
세부연구책임자	김 병 동	연 구 원	유 재 형
연 구 원	남 석 현		장 인 석
	유 재 웅		전 진 원
	유 은 영		차 재 철
	허 진 회		

협동연구기관명	경 북 대	위탁연구기관명	기초과학 지원연구소
협동연구책임자	김 병 수		
연 구 원	황 희 숙	위탁연구책임자	하 권 수
연 구 원	김 수 현		김 성 우
			김 수 정

요 약 문

Ⅰ. 제 목

고기능성 고추품종 육성을 위한 유전자 지도 작성 및 분자육종 기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 고추 재배에 있어서 날로 심각해지는 노동력 부족을 해결하기 위해서는 재배의 생력화가 요구되며, 수확의 기계화를 이루는 것이 효과가 크다. 따라서 기계화 수확에 적합한 품종의 개발이 이루어져야 한다. 뿐만 아니라 고추에 있어 가장 문제가 되는 역병과 더뎅이병에 효과적인 저항성 품종의 개발이 필요하다. 그러나 농업적으로 유용한 많은 형질들이 양적형질이므로 관행 육종 방법만으로는 선발과 고정이 어려우며, 다중 내병성 품종과 같은 여러 형질을 포함하는 품종을 만들어야 할 경우 시간과 노력이 너무 많이 소요된다. 또한 목적 형질에 불량형질이 밀접하게 연관되어 있을 경우 linkage drag을 제거하기가 매우 힘들다.

본 연구에서는 이러한 문제를 극복하는 방법으로 분자유전학적인 기술을 작물 육종에 사용하고자 한다. 분자 유전학적인 기술은 목적형질에 밀접히 연관된 RFLP, RAPD, AFLP 등 분자표지(molecular marker)를 찾아내어 사용함으로써, 선발에 있어서 객관성과 목적성을 부여하고, 선발효율을 높이며, 선발에 소요되는 시간을 줄이는데 일차적인 목적이 있다. 궁극적으로는 작물의 유전자지도를 작성하고 표지들을 유전자 지도에 위치시키고, 특정형질과 세밀하게 연관된 표지를 지속적으로 찾아내거나, 양적형질인 경우 QTL mapping 등을 통해 종국에는 형질과 관련된 유전자를 map based cloning하고 이를 다시 목적 식물에 형질전환시켜, 목표로 하는 형질을 가지는 작물을 육성하기 위한 기초연구를 수행하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서는 분자육종 기술을 이용하여 우량한 고추품종 육성을 위한 기초연구를 수행하고자 다음과 같은 내용과 범위 내에서 연구를 추진하였다..

1) 고추의 RFLP, AFLP, SSLP 표지를 개발, 확보하고 이를 이용하여 유전자

지도를 작성한다.

2) 유전자지도를 이용하야여 고추의 매운맛과 카로티노이드 함량을 결정하는 유전자의 유전 양식을 알아보고, 이들 유전자와 연관된 분자표지 또는 유전자를 분리하고자 한다.
3) 육종에 직접 사용할 수 있는 세균성 점무늬병 저항성 유전자에 가깝게 연관된 AFLP 표지를 개발한다.
4) 고추 역병 및 세균성 점무늬병 저항성 유전자의 유전양식을 분석하고 이들 유전자를 분리하기 위해 필요한 식물재료인 Near Isogenic Line (NIL)을 작성한다.
5) 고추 기계화 수확 적합성 유전자의 유전양식을 분석하고 NIL을 작성한다.
5) 고추의 세포 유전학 연구를 진행시켜 핵형분석 체계를 확립하고, Trisomics line을 작성하여 유전자지도와 연결시키고, FISH 방법을 개발하여 유전자지도 작성에 활용한다.
6) Chemical fingerprinting 방법을 개발하여 고추 품질에 따른 품종 구분 체계를 확립하고, 품질 관련 형질의 유전분석을 실시하여 육종에 활용한다.
7) 지속적인 유전자 지도 작성 및 고밀도 지도 작성에 필수적인 Recombinant Inbred Line (RIL)을 작성한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1) 연구개발결과

- RFLP 표지 287개, AFLP 표지 136개, SSLP 표지 35개를 포함하는 고추 유전자지도를 제작하였다.
- 더뎅이병 저항성과 과탁분리 형질과 2cM 이내로 연관된 분자 표지를 선발 하였다
- 고추 매운맛을 결정하는 capsaicin 함량과 관련된 유전자들을 QTL mapping을 이용하여 유전분석 하였다.
- 고추의 과색을 결정하는 carotenoid 함량과 관련된 유전자를 분리하였다.
- 역병과 더뎅이병 저항성 저항성을 가지는 NIL, 기계화 수확 적합형질의 NIL, 지속적인 유전자 지도 작성에 필수적인 RIL을 육성하였다.
- 이수체를 육성하여 염색체를 동정하였고 이를 유전자지도와 연결시켰다.
- 고추 이차대사산물 분석의 자동화기술을 확립하였다.

2) **연구성과 활용**

- **현재까지 개발된 유전자지도는** QTL mapping**과** marker assisted selection**에 이용하여 고추의 매운맛, 과색, 과형 등의 여러 형질에 대한 기초연구에 활용이 가능하다.**
- **더뎅이병 저항성과 과탁분리 형질에 연관된 분자 표지는 육종시 조기선발에 이용이 가능하다.**
- **고추의 이차대사산물 분석의 대량화, 자동화 기술 확립으로 고추품질의 평가기준을 마련할 수 있다.**
- **병 저항성과 기계화수확 적합성 형질을 가지는** NIL **계통들은 새로운 육종재료로 이용이 가능하다.**

SUMMARY
(영문요약문)

The basic chromosome number of pepper, like most Solanaceous species, is n=12, and haploid genome size is 2.7×10^{9}, which is much larger than other Solanaceous species. In contrast to tomato and potato, pepper genome research is being conducted by only small research groups and is in infant stage. The objectives of our research is: (1) to construct molecular linkage maps based on RFLP and AFLP, (2) to isolate DNA markers tightly linked to several major important traits, (3) to breed plant materials for genome research, and finally, (4) to isolate genes controlling major traits through map-based cloning.

We constructed a molecular linkage map of hot pepper using 103 F2 population of a cross between *Capsicum annuum* "TF68" and *Capsicum chinense* "Habanero". To perform RFLP analysis the survey filters were prepared from parental DNA digested with 5 different restriction enzymes, *Eco*RI, *Dra*I, *Eco*RV, *Hin*dIII, and *Xba*I. Up to now, approximately two hundreds polymorphic clones have been selected out of five hundreds pepper and tomato DNA clones. In addition to RFLP markers, we also developed AFLP and SSLP markers to construct a high density linkage map. The map currently contains 458 markers, including 287 RFLP markers, 136 AFLP markers and 35 SSLP markers. The map was constructed using software MAPMAKER (version 3.0) with minimum LOD score of 5.0 and maximum recombination fraction of 0.15. The combined map covered 2,185.5 cM with an average interval size between markers of 4.95cM. We are also trying to

convert molecular linkage map into chromosomal map using trisomic lines and fluorescence in situ hybridization . Presently, we aligned linkage group and chromosomes using tirsomic lines, and positioned 5S and 25S rDNAs on hot pepper chromosomes.

To assist efficient pepper breeding, we have also developed plant materials; near isogenic lines(NILs) for resistance against Phytophthora and bacterial spot disease, and for plant type suitable for mechanical harvest. We also developed recombinant inbred lines(RILs) as permanent mapping population (RILs). g sector which consists of Hung-Nong Joong-bu Breeding and Research Station and Kyung-pook National University is responsible for breeding NILs and RIL. Analytical Methods for secondary metabolite such as carotenoids and capsaicins were also established and used to identify genes related to biosynthesis of these chemicals.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

우리 나라에서 고추는 현재 벼 다음으로 중요한 경제 작물로 농가의 주된 소득원 중의 하나이다. 그러나 미국이나 다른 선진국에서는 고추가 다른 작물에 비해 상대적 중요도가 낮기 때문에 고추에 관해서는 연구가 취약하고 본격적인 투자도 이루어지지 않고 있다. 이러한 측면이 우리에게 다소 유리하게 작용할 수도 있지만, 현재의 기술 수준 및 투자 정도를 비교해 보면 이러한 경향이 계속된다고 보장하기 어렵다. 즉 우리의 고추 산업을 보호하고 국제 시장에서 우리 고추가 경쟁력을 갖도록 하기 위해서는 지금부터라도 품종 개발과 관련 기술 개발을 위한 적극적인 연구투자가 필요하다. 특히 지금 농림수산부 및 산업체에서 추진하고 있는 김치의 산업화 및 세계화가 성공할 경우를 예상할 때 고추 품질에 관련된 형질에 관한 체계적인 연구 및 육종에 의한 고품질 고추 육성의 잠재력을 키우는 것이 시급하게 요청된다. 그러나 현재 품질에 관해서는 과학적인 육종 기준이나 이에 대한 기초 연구가 거의 전무하며, 수량이나 품질에 관련된 형질들의 경우 대부분이 양적 형질로서 육종이 용이하지 않았고 따라서 연구도 미흡하였다. 이러한 문제를 극복하는 대안으로 분자유전학적인 기술을 사용하는 것이 제시되었다. 분자유전학적인 기술의 핵심은 RFLP, RAPD, AFLP 등의 분자 유전학적인 표지를 사용함으로써, 표현형질에만 의존하던 기존 육종의 한계를 극복하고 효과적이고 빠르게 작물을 개량하는 것이다. 이미 미국 등 선진국에서는 여러 작물에서 이러한 기술을 이용하여 많은 좋은 결과들을 내고 있으며, 이러한 문제를 해결하는 데 있어서 분자유전자 표지가 강력한 기술로 인정되고 있다. 특히 내병성 육종에 분자표지를 이용한 연구가 많이 이루어졌는데 병충해 저항성 유전자를 분자 표지로 이용하여 육종시 선발표지로 이용하고자 하는 노력이 진행중에 있다.

분자유전학적인 기술의 육종에의 응용은 목적형질에 밀접히 연관된 RFLP, RAPD, AFLP 등 분자표지(molecular marker)를 찾아내어 사용함으로써, 선발에 있어서 객관성과 목적성을 부여하고, 선발효율을 높이며, 선발에 소요되는 시간을 줄이는 실용적인 사용에서부터, 식물의 유전자지도를 작성하고 위의 표지들을 유전자 지도에 위치시키고, 세밀하게 연관된 표지를 지속적으로 찾아 들어가며 이러한 표지를 이용하여 종국에는 map based cloning하고 이를 다시 목적 작물에 형질전환함으로서 목표로 하는 형질을 가지는 식물을 다른 부작용 없이 얻게 되는 적극적인 사용에까지 다양하다. 현재 가장 앞선 미국의 경우 여러 작물의 병충해 저항성 유전자가 유전자 지도에 기반한 클로닝(map based cloning) 방법으로 분리되었으며, 이로 인하여 식물의 병원체에 대한 저항성에 대한 기초, 응용 양쪽의 연구가 활기를 띄고 있다.

현재 우리 나라의 경우 관행 육종은 어느 정도 수준에 도달하여, 실용적으로 이용하는데 문제가 없어 보인다. 그러나 실용적인 연구 외에 체계적인 유전연구는 거의 전무하며, 분자 유전학적인 육종연구 또한 걸음마 단계에 있다. 단적인 예로 앞으로의 분자 육종을 이용한 작물 개량에 가장 기초가 되는 유전자 지도가 만들어져 있는 채소 작물이 거의 없으며, 표현 형질에 의거한 연관 분석도 거의 실시되지 않았다. 이러한 현실에서는 여러 형질들을 다루는 체계적인 육종이나, 유전자 지도에 기반을 둔 분자육종 및 유전자 분리 등은 기대할 수도 없으며 이 점에서 관행 육종은 한계에 도달해 있다. 고추의 경우 이미 미국과 프랑스에서 시작 단계의 RFLP 유전자 지도를 만들었으나(Prince et al., 1993), 국민 일인당 고추 소비가 제일 많은 우리 나라의 경우 계획조차도 수립되어 있지 않았었다. 머지 않은 미래에 식물의 육종은 많은 부분은 분자유전학적 방법 의해서 이루어질 것이다. 이미 미국에서는 산업적으로 중요한 지방 성분을 (열대 수목류에서 분리) 유채 등의 식물에서 생산되게 하는 조작을 거쳐 연간 200억 달러의 이윤을 얻을 수 있는 체계를 구축하여 실용화 단계에 있으며 이와 비슷한 많은 연구들이 수행되고 있다.

표 1. 분자유전학적으로 분리된 병저항성 유전자

식물	유전자	대상병원체	클로닝 방식	비 고
옥수수	*Hm1*	*C.carbonum*	Transposon tagging	NADPH dependent HC-toxin reductase
토마토	*PTO*	*P. syringe*	Map based cloning	Serine threonine protein kinase
애기장대	*RPS2*	*P. syringe*	Map based cloning	Leucine rich repeat를 공통으로 가지는 유사한 단백질
담배	*N*	TMV	Transposon tagging	
토마토	*Cf-9*	*C. fulvum*	Transposon tagging	
아마	*L6*	*M. lini*	Transposon tagging	
귀리	Mlo	Broad fungi	Map based cloning	Membrane spanning domain, novel

오늘날에 이르러 농업은 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이르고 있을 뿐만 아니라 관행적인 영농방법에 의한 농업생산은 환경오염 문제를 초래하고 있다. 따라서 선진국에서는 차세대 기술농업으로의 기술전환이 급속하게 이루어지고 있으며, 이러한 기술농업의 핵심 기술로 분자육종 기술을 도입하게 되었다. 분자육종 기술은 고전 육종의 한계를 극복하고 첨단생명 공학 기술을 식물 관련 산업에 도입하려는 기술로, 유용유전자를 동식물에 직접 도입하여 신 기능성 동식물을 개발하는 기술과 분자유전학적 유전자지도를 이용하여 육종효율을 높이고 육종연한을 단축하는 기술로 크게 대별할 수 있다. 이미 선진 각국에서는 동식물의 게놈 및 유전자지도 작성 연구를 통하여 유전자원을 효율적으로 개발하

고 신품종을 육성하는 수준에 이르렀다. 미국의 경우 1985년부터 미국의 Rockefeller재단의 주도하에 수백 명에 달하는 세계 여러 나라의 학자들이 벼의 게놈연구를 진행시켜 왔으며, 농무성의 주도하에 옥수수, 토마토, 면화, 밀, 상추, 수수 등의 주요작물에 대해 게놈 연구가 진행되고 있다. 특히 이미 오래 전부터 연구가 진행되어온 벼, 토마토, 상추, 옥수수, 보리, 밀 등의 작물은 고밀도 유전자 지도가 작성되어 유전자지도를 이용한 특정 유전자를 분리해 내는 수준에까지 와 있다. 일본은 1991년 벼 게놈 project를 국가적 사업으로 진행시켜 왔으며, 그간의 연구를 통해 2,000여개의 DNA 표지가 포함된 고밀도 유전자지도를 작성하였고 50,000 여개의 cDNA 유전자의 염기서열을 결정하여 명실공히 벼 유전자 연구의 종주국으로 자리잡았다. 우리 나라의 경우는 벼 게놈 및 유전자 지도 작성 연구가 농업과학 기술원을 중심으로 진행되고 있는데 이미 오래 전부터 육성해 온 recombinant inbred line을 세계 유수의 연구진에 분양하는 등 국제적인 연구를 진행하고 있다. 이들 연구진은 분자유전학과 고전육종학을 잘 접목시키려는 연구를 시도하고 있어 국내외적으로 그 성과에 기대를 모으고 있다. 또한 국내에서 중요한 채소작물인 배추의 유전자지도 작성과 분자표지를 이용한 육종기술개발이 활발하게 진행되고 있어 머지 않아 원예작물에 있어서 분자육종기술의 응용이 크게 증가될 것으로 판단된다. 고추에 있어서 국내외 관련분야의 환경 변화를 알아보면 다음과 같다. 분석 부분의 연구를 크게 유전자지도 작성, 염색체 연구 및 이차대사산물 분석 연구로 나누어 살펴보면, 현재 고추의 유전자지도 작성 연구는 미국, 프랑스, 헝가리 등에서 진행되고 있으며, 미국과 프랑스에서는 유전자지도의 기본 골격은 완성하였고 더 많은 DNA 표지를 포함시키기 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 이러한 유전자지도와 분자유전학적 기술을 응용하여 병원성 바이러스와 세균, 곰팡이, 선충 등에 대한 저항성을 일으키는 유전자 주위의 표지를 탐색하는 연구와 직접 유전자를 분리하는 연구가 미국, 프랑스 등에서 활발히 진행되고 있다. 국내에서는 본격적으로 고추의 유전자 지도 작성 연

구를 진행하고 있는 연구진은 본 과제뿐이며 원예연구소, 서울대 박효근 교수의 연구실에서 병저항성형질과 연관된 RAPD와 AFLP 표지를 찾는 실험을 일부 진행하고 있으며, 서강대 김성룡 교수에 의해 특정 조직 내에서 발현되는 cDNA clone의 염기서열을 분석하여 기능을 분석하는 작업(Expressed Sequence Tags)이 수행된 바 있다. 염색체 연구는 아직까지 국내에서는 고추의 이수체 또는 배수체에 대한 보고가 없으며 외국에서는 프랑스의 연구자들에 의해서 보고된 바 있으나 이들로부터 이수체의 도입이 용이하지 않아서 국내에서 독자적으로 확보하는 것이 바람직하다고 생각된다. 또한 고추의 세포 유전학적인 연구는 1970년대에 고전적 육종방법에 의해 유럽에서 조금 연구가 진행되었지만 그 이후로는 이에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 이러한 상황에서 볼 때 본 과제는 고추에서의 분자유전학적이고 세포학적인 연구의 선도적인 역할을 수행하고 있다고 할 수 있겠다. 색소와 매운맛 등 이차대사산물에 대한 연구는 의학적인 측면에서 carotenoids나 vitamins, capsaicin, amino acids를 이용하려고 하는 시도가 있었으나, 이들 함량의 유전분석이나 이차대사산물들의 대량·신속 분석에 대한 연구는 전무한 실정이다. 미국의 유전자지도 작성 연구진들은 F2 집단이나 여교잡 진단을 사용하여 연구를 추진하였고 프랑스의 연구진들은 doubled haploid 집단을 이용하여 유전자지도 작성연구를 진행하였다. 특히 고추에서 NIL이나 RIL을 이용한 연구는 국제적인 수준에서도 본격적으로 진행되지 못하고 있다. 이러한 시점에서 본 과제에서는 고추의 유전자지도를 작성하고 아울러 주요 형질, 즉 병저항성이나 기계화적합성 형질 또는 이차대사산물 생합성과 연관된 분자표지를 선발함으로서 고추의 분자육종 기술을 국제적인 수준으로 높이고자 한다.

또한 본 과제의 협동연구진에서는 역병 및 더뎅이병 저항성 NIL 육성을 목표로 하고 있는데, 세계적으로 현재까지 육종 및 병리학자들이 찾아낸 재료 중에서 역병에 대하여는 PI201234 (B14-2-2-3), AC2258 (KC263), CM334 (KC294)가 가장 높은 수준의 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있기 때문에 이를 이용하여

전통적인 여교잡 방법으로 NIL을 육성하고자 한다. 더뎅이병의 경우는 특히 과민반응형(HR) 저항성 유전자 Bs1, Bs2, Bs3가 보고되어 있으며 세균에는 이들 유전자를 가진 식물에는 병을 일으킬 수 없는 비병원성 유전자(avirulence gene)가 있는 것으로 확인되었다. 이와 같이 병원균의 분자유전학적 연구는 진전되어 있으나 고추에서의 저항성 유전자 Bs1, Bs2, Bs3에 대한 분자유전학적 구명이 없는 실정이며 이를 위해서는 NIL의 작성이 필요하다. 국내에는 더뎅이병원 세균 race 1과 race 3까지만 있는 것으로 보고되어 있으나 세계적으로는 race 1에서 race 6까지 분화되어 있는 것으로 보고되어 있기 때문에 국내 균주의 race 검정이 필요하게 되어 NIL육성과 함께 국내 race 검정도 수행하고자 한다. 기계화 수확 적합형질의 육종에 관한 연구는 미국에서 시도된 바가 있으나 NIL 육성이나 이를 이용한 육종 연구는 찾아볼 수 없다. 이러한 이유로 분자육종의 기본 식물재료인 NIL을 제작하고 기계화 수확 적합성 유전자의 유전양식을 분석하고자 한다. 또한 지속적인 유전자 지도 작성 및 고밀도 지도 작성에 필수적인 Recombinant Inbred Line (RIL)을 작성한다.

또한 고추의 세포 유전학 연구를 진행시켜 염색체 핵형분석 체계를 확립하고, 이수체를 육성하여 유전자지도 작성에 활용하고자 한다. 본 과제에서 진행중인 고추의 유전적 지도작성에서 만들어진 연관군을 염색체와의 상호 관계를 밝히기 위해 trisomics 식물체를 이용하여 각 linkage group과 염색체와의 numbering뿐 만 아니라 15개의 linkage group들과의 상호 관계를 규명하고자 한다. 마지막으로, 고추의 다양한 이차 대사 산물중 품질에 직접적으로 기여하는 carotenoid, capsaicinoid, ascorbic acid, 그리고 유리 amino acid의 추출 및 전처리, 정량 분석법 (chemical finger printing)을 개발, 표준화하고 이를 이용하여 다양한 고추 품종 및 교배, 육종되는 F1들을 분석함으로써 품질 개선의 근거를 마련함과 동시에 고품질 고추품종 육종을 위한 소재개발에 기여하고자 하는 것이다.

제 2 장 고추 유전자지도 작성 및 주요 형질과 연관된 분자표지 선발

제1절 서론

고추(*Capsicum* sp.)는 16세기초 우리 나라에 소개된 이후로 우리의 음식 문화에 있어서 빼 놓을 수 없는 요소로 자리 잡았다. 이러한 이유로 고추의 시장 규모는 해마다 커지고 있으며, 작년 현재 1조 3천억원에 이르고 있는 것으로 조사되었다. 가지과에 속해 있는 고추의 우리 나라에서의 경제적인 비중은 같은 가지과 작물인 토마토의 미국에서의 비중과 같거나 아니면 크다. 이렇게 중요한 작물인 고추에 대한 분자유전학적 접근은 국내에서는 거의 이루어지지 않고 있었으며, 미국의 Cornell 대학과 프랑스의 INRA에서 분자유전학적인 접근이 이루어지고 있었다. 따라서 우리의 고추 산업을 보호하고 국제 시장에서 우리 고추가 경쟁력을 갖도록 하기 위해서는 품종 개발과 관련 기술 개발을 위해 적극적인 연구가 필요하다. 특히 지금 농림부 및 산업체에서 추진하고 있는 김치의 산업화 및 세계화가 성공 할 경우를 예상할 때 고추 품질에 관련된 형질에 관한 체계적인 연구 및 육종에 의한 고품질 고추 육성의 잠재력을 키우는 것이 시급하게 요청된다. 그러나 지금까지 품질에 관해서는 과학적인 육종 기준이나 이에 대한 기초 연구가 거의 전무하며, 수량이나 품질에 관련된 형질들의 경우 대부분이 양적 형질로서 육종이 용이하지 않았고 따라서 연구도 미흡하였다. 이러한 문제를 극복하는 대안으로 분자유전학적인 기술을 사용하는 것이 제시되었다. 분자 유전학적인 기술의 핵심은 RFLP, RAPD, AFLP 등의 분자 유전학적인 표지를 사용함으로써, 표현형질에만 의존하던 기존 육종의 한계를 극복하고 효과적이고 빠르게 작물을 개량하는 것이다. 이미 미국 등 선진국에서는 여러 작물에서 이러한 기술

을 이용하여 많은 좋은 결과들을 내고 있으며, 이러한 문제를 해결하는 데 있어서 분자유전자 표지가 강력한 기술로 인정되고 있다. 이러한 기술을 이용한 해외의 연구 동향을 간단히 살펴보면 다음과 같다. 최초의 고추 분자유전자 지도는 1988년 미국 Cornell 대학의 Tanksley교수 팀에 의해서 isozyme과 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 표지를 이용하여 이루어졌으며 (Tanksley *et al*., 1988), 그 이후 같은 그룹에서 더욱 많은 RFLP 표지를 포함하는 유전자지도가 작성되었다(Prince *et al*., 1992). 이 유전자 지도는 모두 19개의 연관군을 가지고 있으며, 모두 720 cM의 길이를 가지고 있다. 이 유전자 지도 작성에 쓰인 집단은 *C. annuum* 'CA133' X *C. chinense* 'CA133' 사이의 46개의 F2 집단이며, 모두 162개의 RFLP 표지가 포함되어 있다.

이 밖에 INRA 그룹의 Lefebvre에 의해서 1995년에 종내 교잡에 의한 유도된 DH (doubled haploid) 집단을 이용하여 RFLP 와 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 표지를 이용하여 작성되었다. 이 유전자 지도에서 특이할 점은 처음으로 DH 집단을 유전자지도 작성에 이용하였다는 것이다. 이 유전자지도에는 모두 52개의 RFLP와 27개의 RAPD 및 45S rDNA와 표현형질과 연관된 세 개의 표지가 사용되어 모두 85개의 표지가 이 유전자지도에 올려져 있다. 이 유전자 지도는 822.9cM에 해당되는 유전체를 포함하며 14개의 연관군으로 이루어져 있으며, 이 유전자 지도는 고추 유전체를 36-57%를 표시하는 것으로 알려져 있다

1995년에 Cornell 대학의 Molly Kyle 그룹에서 고밀도 유전자지도 작성이 보고되었는데, 이 유전자지도는 11개의 큰 연관군(76.2-192.3cM)과 2개의 작은 연관군(19.1과 12.5)으로 이루어져 있으며, 1245.7cM에 이르는 유전체를 표시하고 있다. 이 유전자 지도에는 7개의 isozyme 표지를 비롯하여 RFLP, RAPD 및 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)를 포함하여 모두 667개의 표지들로 구성되어 있다. 이 유전자 지도에서 특기할 만한 점은, 이 유전자지도에는 약200

여개의 토마토 표지들이 토마토와 고추사이의 비교유전체학을 수행하기 위하여 유전자 지도에 포함되었다. 하지만, AFLP 표지들이 dominant가 아닌 codominant 방식으로 각 개체의 유전형질이 분석 되어 있어서, 많은 수의 표지들이 연관군에서 특정한 곳에 몰리는 (clustering) 현상이 발견되었다. 그러나, 이 유전자 지도는 고추에 있어서 첫 번째로 보고된 고밀도 유전자지도라는 의의를 갖고 있다.

2000년 6월에 셀레라(Celera Genomics)와 HGP (Human Genome Project)에 의해서 약97%에 해당하는 인간 유전체(genome)의 염기 서열이 밝혀진 바 있다. 이 밖에도 2000년 3월에 Stanford 대학과 셀레라에 의해서 초파리의 전체 염기서열 또한 밝혀졌다. 그리고 AGI (Arabidopsis Genome Initiative)에 의해서 애기장대의 전체 염기 서열 또한 곧 밝혀 질 것이다. 이 밖에도 RGP (Rice Genome Project)에 의해서 현재 벼의 전체 염기서열 분석작업도 진행중이다. 이런 일련의 구조유전체학(structural genomics)의 연구 결과를 토대로 밝혀진 유전자들의 기능을 탐구하는 학문이 기능유전체학(functional genomics)이다. 이런 기능유전체학에는 희망의 배열이라고 불리우는 DNA chip을 이용한 연구가 가장 대표적이며, 이 밖에도 SAGE 및 대규모의 EST 사업도 포함이 된다. 하지만, 이러한 일련의 기술들이 모든 작물에 바로 적용될 수는 없다. 이러한 기능유전체학의 태동이 바로 구조유전체학의 연구로부터 시작되었기 때문이다. 특히 물리적 지도를 이용한 유전자 동정의 경우에는 고밀도 유전자지도가 필수적으로 있어야 한다. 벼의 경우에도 1994년에 고밀도 유전자 지도가 보고되었기 때문에 가능하였다. 이 후에도 총 2275개의 RFLP 표지를 포함하는 고밀도 유전자지도가 보고되었으며, 이를 토대로 현재 염기서열의 해독작업이 진행되고 있다.

현재의 추세로는 앞으로 중요한 식량 작물의 염기 서열 해독 작업은 소요경비가 너무 많이 들기 때문에 국가적인 사업보다는 일부 다국적 종묘회사에 의해서 진행될 확률이 높다. 따라서, 앞으로 이런 다국적 기업에 의해서 얻어진 식량 작

물의 염기서열 정보는 기업에 의해 독점될 가능성이 높다. 따라서, 앞으로의 연구 추세에 맞추어 가려면, 이러한 상황을 인식을 하고 미래에 대비 해야 할 것이다.

현재 우리 나라에서 차지하고 있는 고추의 경제적 중요성으로 볼 때, 고추에 대한 전반적인 연구가 필요하며, 그 중에서도 미래에 있어서 가장 중요한 것이 될 유전자에 대한 연구가 필수적이라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구는 이러한 목적을 가지고 시작되었으며, 연구 결과 모두 467개의 유전자 표지를 갖는 유전자 지도를 작성할 수 있었다. 분자유전학적인 기술의 육종에의 응용은 목적형질에 밀접히 연관된 RFLP, RAPD, AFLP 등 분자표지(molecular marker)를 찾아내어 사용함으로써, 선발에 있어서 객관성과 목적성을 부여하고, 선발효율을 높이며, 선발에 소요되는 시간을 줄이는 실용적인 사용에서부터, 식물의 유전자지도를 작성하고 위의 표지들을 유전자 지도에 위치시키고, 세밀하게 연관된 표지를 지속적으로 찾아 들어가며 이러한 표지를 이용하여 종국에는 map based cloning하고 이를 다시 목적 식물에 형질전환시켜 목표로 하는 형질을 가지는 식물을 다른 부작용 없이 얻게 되는 적극적인 사용에까지 다양하다. 현재 가장 앞선 미국의 경우 여러 작물의 병충해 저항성 유전자가 유전자 지도에 기반한 클로닝(map based cloning) 방법으로 분리되었으며, 이로 인하여 식물의 병원체에 대한 저항성에 대한 기초, 응용 양쪽의 연구가 활기를 띄고 있다. 아울러서 이러한 유전자 지도를 이용하여 병저항성과 관련된 유전자 표지 및 고추의 형질과 관련된 유전자 표지를 찾는 실험도 같이 진행되었다. 연구 결과 고추의 과색 중에서 빨간색과 오렌지색을 결정짓는 유전자인 *psy* 유전자가 동정되었으며, 매운맛과 관련된 생합성 경로에 있는 다수의 후보유전자들도 동정되었다. 그리고, 더뎅이병의 저항성과 관련되어 Bs3 저항성과 관련된 두 개의 AFLP 표지를 선발해 낼 수 있었다.

제2절 재료 및 방법

1) 식물재료

협동연구 기관인 흥농종묘로부터 분양받은 TF68(*C. annuum*)과 Habanero (*C. chinense*), 그리고 이들을 교배해서 육성한 F1 개체, F2 103 개체를 유전자지도 작성과 매운맛, 과색분석을 위해 사용하였다.

고추 더뎅이병 저항성 형질과 연관된 DNA 표지를 찾기 위한 식물재료는 협동연구 기관인 경북대에서 분양받았다. AC271322(저항성)와 풍각(감수성)의 F2 집단 56 개체를 이용하였다.

과탁분리 형질과 연관된 DNA 표지를 찾기 위한 식물재료는 협동연구 기관인 흥농종묘로부터 분양받은 식물재료를 이용하였다.

2) 연구방법

가) RFLP 표지 선발 및 유전자지도 작성

효과적인 RFLP 유전자 지도를 작성하기 위해서는 유전자지도 작성용 교배모본간 polymorphism을 보이는 probe를 선발하는 것이 중요하다. Polymorphism을 보이는 정도는 교배 모본의 유전적 변이와 사용한 제한효소의 종류에 따라 다르게 나타난다. cDNA 혹은 genomic DNA library에서 무작위로 선발한 clone이 유전자지도 작성용 F2 집단에서 모두 polymorphism을 보이는 것은 이론적으로 불가능하기 때문에, 미리 교배 모본을 대상으로 polymorphism을 나타내는 clone과 제한효소의 조합을 선발함으로써 유전자지도 작성 사업의 효율을 높일 수 있다. 유전자지도 작성용 집단의 교배 모본인 TF68 (*C. annuum*)과 Habanero (*C. chinense*)로부터 genomic DNA를 분리하여 blot을 준비하였고, RFLP 표지를 선발하기 위한 probe를 준비하기 위하여 전년도에

고추의 cDNA library와 genomic DNA library를 작성하였다. 또한 이미 토마토에서 작성된 RFLP linkage map의 linkage group에 분포되어 있는 RFLP표지 (토마토 clone)를 고추의 유전자 지도에 위치시킴으로써 작성된 유전자 지도의 정확성을 부여하고, 더 나아가서는 토마토의 linkage group과 비교·분석함으로써 가지과 작물에 있어서 염색체의 organization과 종분화과정을 알아보고자 미국 Cornell 대학으로부터 토마토 clone을 수집하여 probe로 사용하였다. RFLP 표지선발을 위해 사용한 제한효소로는 *Dra* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hin*dIII, *Xba* I 5종류를 사용하였다. 유전자지도 작성용 F2집단 103개체를 유전자지도 작성용 집단으로 사용하였다.

나) AFLP를 이용한 표지선발 및 유전자지도의 작성

DNA 표지를 이용한 유전자 지도 작성 연구는 주로 RFLP를 중심으로 이루어져 왔으나 RFLP 기술을 이용한 유전자 지도 작성은 시간과 노력을 많이 필요로 하고, 이를 육종에 이용하는 데도 한계가 있다. AFLP 분석 기술은 RFLP와 RAPD의 장점을 취한 새로운 게놈분석 기술로 1994년 처음 소개된 이래로 지금까지 이를 이용한 DNA 표지선발 및 유전자 지도 작성 연구에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 본과제에서는 RFLP 유전자지도 작성과 더불어 AFLP를 이용한 유전자지도 작성을 위한 식물 재료는 앞서 RFLP 유전자지도 작성에서 사용한 재료와 동일한 F2 집단 86 개체를 이용하였다. Prince 등의 방법에 따라 DNA를 분리하였고, AFLP 분석은 Vos 등의 방법에 따라 수행하였다. DNA 절단에 사용한 restriction enzyme은 *Pst*I과 *Mse*I 조합, *Eco*RI과 *Mse*I 조합을 이용하였다. *Taq* DNA polymerase, T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase는 Promega사의 제품을 사용하였다. *Pst*I primer 3종류, *Eco*RI primer 3종류, 그리고 *Mse*I primer 8 종류를 이용하여 총 28개의 primer 조합으로 AFLP 분석을 수행하였다. 연관군 지도 작성을 위하여 양친간에

polymorphism을 보이는 표지 중 멘델의 유전법칙에 따라 3 : 1의 분리비를 보이는 표지만을 선택하여 표지의 유무를 A, B로 scoring하여 data matrix를 작성하였고 MAPMAKER version 3.0 program을 이용하여 연관군 지도를 작성하였다.

다) SSLP를 이용한 표지선발 및 유전자지도의 작성

Microsatellite는 genome 내에 1-6 bp의 DNA 염기서열이 100 bp 이내에서 반복되는 특징을 나타내며 SSR (Simple Sequence Repeat)이라고도 명명한다. 이러한 microsatellite의 반복 단위의 차이를 분석하는 기술을 SSLP라고 한다. Microsatellite의 특징은 보통 식물에서 50kb 마다 1번 존재할 정도로 genome 내에 다수로 그리고 균등하게 분포되어 있다. 가장 중요한 특징 중 하나가 개체간에 microsatellite의 반복되는 수의 차이가 많이 관찰되어 표지로서의 가져야 될 정보력을 가장 많이 지닌 분자표지로 평가받고 있다. 보리, 쌀, 밀, 콩, 감자 등 주요 작물에서 이미 400-500개의 SSR 표지가 이미 개발되어 있고 이를 이용하여 유전자지도작성, 육종선발, 식물분류 등의 적용을 통해 그 유용성이 널리 알려진 상태이다.

따라서 고추의 분자육종에 있어서 microsatellite 표지의 파급효과는 매우 크다고 생각되며 이에 많은 노동력과 고비용 및 시간이 요구되는 단점에도 불구하고 실험에 착수하였다. 본 실험은 작은 단편의 genomic DNA library의 작성을 통해 microsatellite sequence의 분리에 이용하고 선발된 clone의 sequencing과 이에 근거한 PCR primer를 작성하여 표지로 이용하였으며 유전자 지도 작성 및 고추 line간의 적용을 통해 그 유용성을 검정하였다.

먼저 *Hind*III와 *Mbo*I/*Pst*I으로 자른 400-600 bp 정도의 작은 단편의 genomic DNA library를 microsatellite가 있는 clone의 선발에 이용하였다. *E. coli* transformation을 하여 colony hybridization 작업을 거쳐 positive clone을

분리하였고 이용된 탐침으로는 (AT)15, (GA)15, (GT)15, (ATT)10, (TTG)10로 합성된 oligonucleotide이었다.

좀더 많은 microsatellite primer의 개발을 위해 미국 NCBI GenBank에 등록된 고추의 DNA sequence를 조사하여 microsatellite가 존재하는 sequence를 확보하였다.

Library로부터 분리한 SSLP 표지는 5개의 *Capsicum* spp.를 포함하는 11개 line의 PCR 증폭을 통해 마커로서의 정보력의 척도가 되는 PIC (polymorphic information content) value 측정에 사용되었다. 다음과 같은 수식에 의해 그 값을 정하였다.

$$\textbf{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^{n}(P_i)^2$$

Pi는 i번째 allele의 빈도를 나타내며 n은 allele의 수를 나타낸다.

라) 더뎅이병 저항성 형질연관 DNA 표지 탐색

먼저 더뎅이병 저항성 형질연관 DNA 표지를 찾기 위하여 식물재료는 협동연구 기관인 경북대에서 분양받았다. AC271322 (저항성)와 풍각(감수성)의 F2 집단 56 개체에 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race 1을 접종한 후 72 시간 후에 HR 반응에 의해 형질의 특성을 조사하여 저항성과 이병성 특성을 갖는 개체를 10 개체씩 임의 선택하였다. 각각의 DNA를 pooling하여 AFLP 분석에 이용하였다.

마) 낙과형질연관 표지의 선발

과탁분리 검정결과 과탁분리 형질을 나타낸 것과 과탁비분리 형질을 나타낸 backcross 개체를 각각 5개씩 임의로 선택하여 bulked segregant analysis를

이용하여 AFLP를 수행하였다.

바) 고추 매운맛과 관련된 형질의 유전분석

본 연구과제에서 위탁과제를 맡고 있는 대전 기초과학지원연구소에서 분석한 고추 유전자지도 작성용 분리집단과 교배모본에서의 매운맛 결과와 현재까지 작성된 유전자지도를 이용하여 매운맛의 양적형질 유전분석을 실시하였다. 매운맛을 결정하는 요소로는 total capsaicinoid 함량, capsaicin 함량, dihydrocapsaicin 함량을 이용하였다.

사) Carotenoid 합성관련 유전자의 분리 및 고추 과색형질의 유전분석

C. annuum 'TF68'의 과실은 빨간색을 나타내며, *C. chinense*의 과실은 주황색을 나타낸다. 이의 종간 교잡에서 나온 F2를 이용하여 고추의 과색을 결정하는 유전자를 탐색하고자 하였다. F1에서는 과실이 빨간색으로 나타나며, 이를 통하여 빨간색이 주황색에 대하여 우성으로 작용함을 알 수 있었고, F2 세대에서는 약간의 변이의 정도는 있으나 빨간색과 주황색의 분리비가 약 3 : 1 정도로 단일유전자에 의해 조절되는 형질임을 추정할 수 있었다. 이를 보다 정확히 동정하기 위하여 HPLC를 통하여 각각의 색소에 대한 성분 함량을 조사하고, 이를 QTL 분석하고자 하였다. 또한 고추의 색깔과 카로티노이드의 함량과는 밀접한 관계가 있으므로, 카로티노이드의 생합성 과정에 관련된 유전자들에 의해 색깔이 결정될 수 있음을 가정하고, 몇가지 유전자들을 클로닝하여 유전자 지도에 위치시킨 후 과색과의 연관 정도를 분석하였다. 그 결과 카로티노이드 생합성 과정의 초기 단계에 관여하는 효소인 phytoene synthase의 유전형이 과색의 표현형과 정확히 일치함을 보였으며, 이를 통하여 phytoene synthase가 고추의 과색에 매우 중요한 역할을 하는 효소로 확인되었다. 이를 더욱 확인하기 위하여 유전자의 발현 정도를 분석하고, sequencing을 통하여 유전자의 구조를 밝히는 연구를 계획 중이며, 최종적으로는 고추의 형질전환을 통하여 확인하는 것을 목표로 하고 있다.

제3절 연구결과

1) 유전자지도 작성

유전자지도를 작성하기 위한 교배 모본을 선정하기 위해 15계통 (표1)의 유전적 다양성을 95개의 RFLP 표지와 114개의 AFLP를 이용하여 분석한 결과 *C. annuum*인 TF68과 *C. chinense* 계통인 Habanero가 어느 정도의 높은 유전적 다양성을 보였고 (그림 1) 계통간에 임성도 높은 것으로 나타났다. 이들 교배모본간의 표현형의 차이를 관찰한 결과는 표2와 같다.

가) RFLP 분자표지 선발

RFLP 분석의 경우 총 953개의 DNA probe를 양친간에서 검정하였으며, 이 중에서 약 45%에 해당하는 457개의 클론이 다섯 가지 제한 효소에 대하여 하나 이상의 다형화 현상을 보이는 것이 관찰되었다(그림2). 다시 이들을 F2 개체에서 검정한 결과 287개의 probe가 F2에서 유전형이 검정되었으며(그림3), 총 267개의 클론에 분자유전자 지도에 포함되었다. 이들의 종류별 결과는 아래 표3과 같다.

표1. 고추 유전자지도를 작성하기 위한 교배 모본을 선정하기 위해 사용한 후보 15계통

Accessions	Species	Characteristics
TF68	*C. annuum*	Indeterminate, pendent single
Habanero	*C. chinense*	Indeterminate, pendent single
풍 각	*C. annuum*	Resistant to *Phytophthora capsici* L.
해화3호	*C. annuum*	Susceptible to *Phytophthora capsici* L.
T-988-3-183	*C. annuum*	Determinate, elect cluster
서 중	*C. annuum*	Indeterminate, pendent single
CJM	*C. annuum*	Nondeciduous
P. sirrono	*C. annuum*	Deciduous
LV2319	*C. annuum*	Wild species, single harvest
pubscense.	*C. pubscense*	Not determined
YCM334	*C. annuum*	Resistant to *P. capsici* L.
perenial	*C. perennial*	Introduced, single harvest
baccatum.	*C. baccatum*	Not determined
Rss	*C. annuum*	Resistant to *X. campestris pv. vesicatoria*
3-25-27	*C. annuum*	Resistant to *X. campestris pv. vesicatoria*

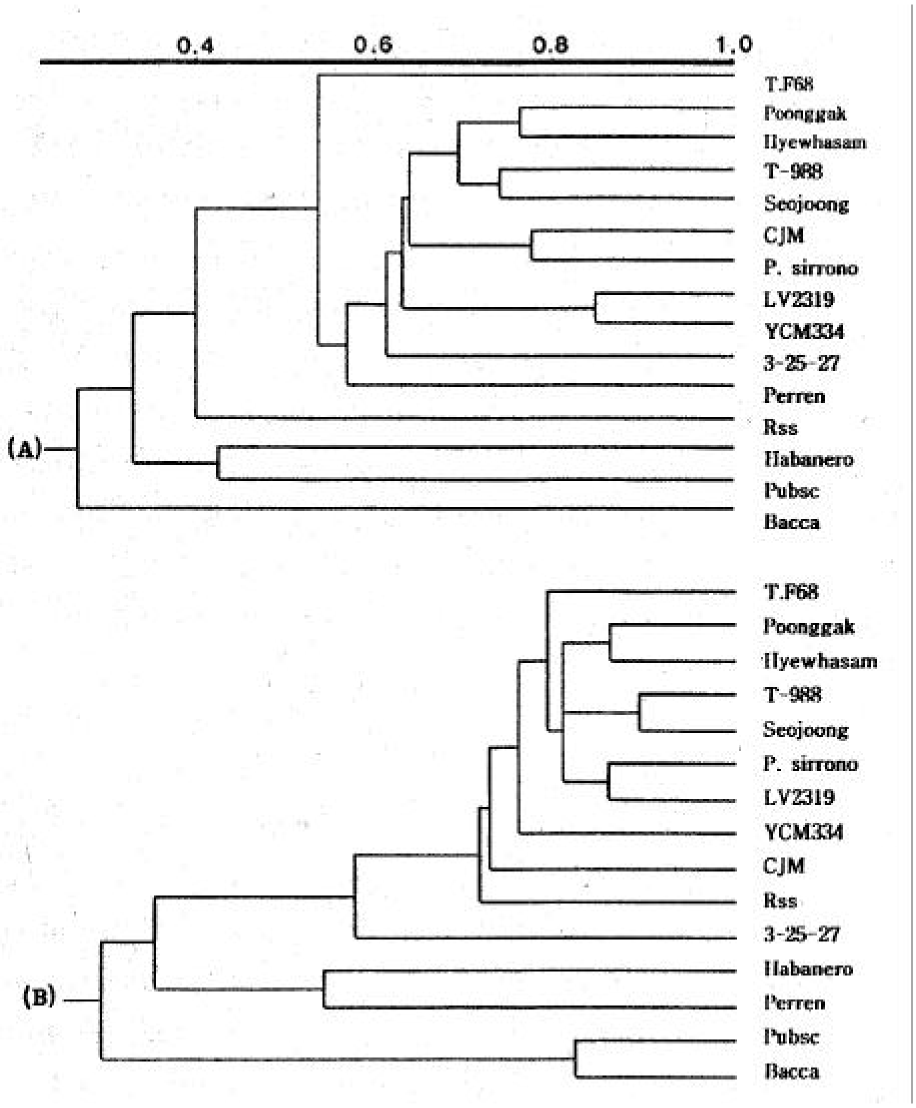


그림1. **유전자지도를 작성하기 위한 교배 모본을 선정하기 위해 고추** 15**계통에서 유전적 다양성을** RFLP (A)**와** AFLP(B)**를 이용하여 분석한 결과**

표2. **유전자지도 작성에 사용된 교배 모본간 표현형의 차이**

Traits	*C. annuum*	*C. chinense*
Plant growth habit	erect	compact
Leaf surface shape	smooth	wrinkled
Leaf pubescence	glabrous	abundant
Stem color	purple	green
Stem pubescence	abundant	glabrous
Flower / node	1	>2
Petal shape	sickled	straight
Stigma length	long	short
Fruit setting temp.	medium	high
Fruit shape	long/slim	campanulate
Fruit color (immature)	dense green	light green
Fruit color (mature)	red	orange
Fruit pungency	mild	hot

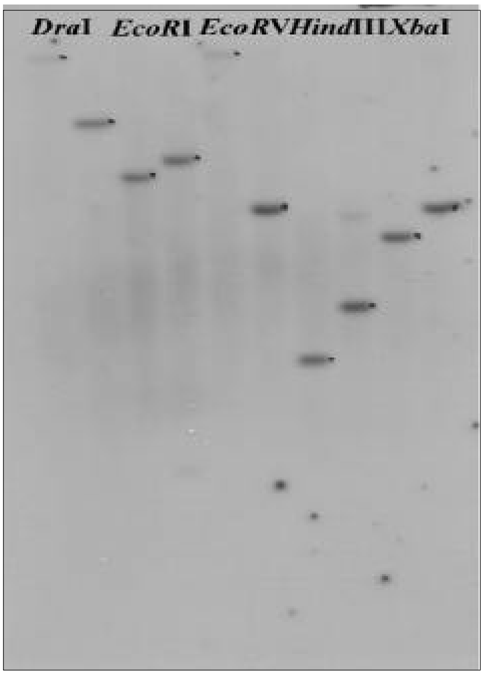


그림1. **교배 모본 사이의** RFLP**현상**

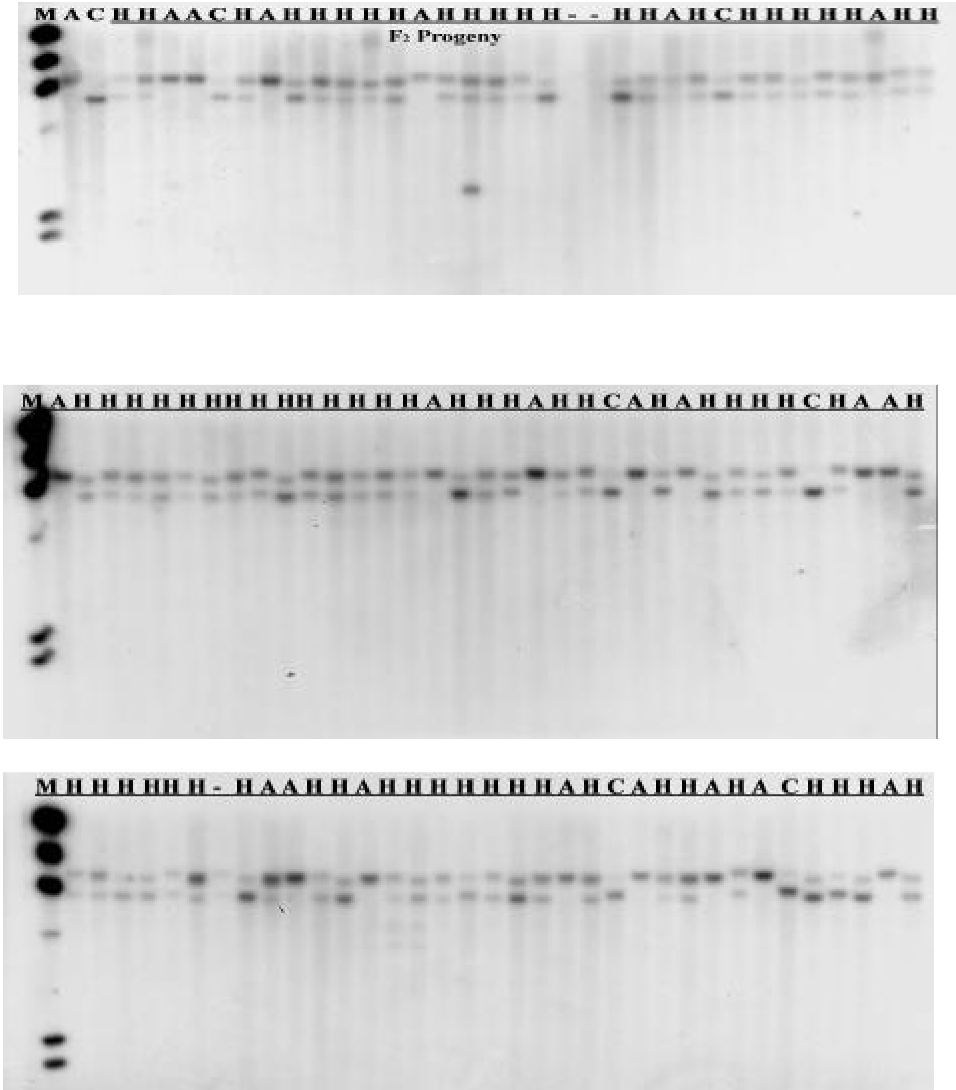


그림3. **교배모본간 선발된** RFLP **표지를** F2 103 **개체에서 유전형 분석**

표3. RFLP 분석에 사용된 DNA probe 종류와 polymorphism 분석 결과

표지의 종류	양친 검정 결과	유전자 지도에 포함된 표지
PCD (pepper cDNA) clone	78/189	34
CD, CT, TG (tomatoDNA) clone	65/170	58
DC (SA induced pepper cDNA) clone	28/69	26
CAN, CLF, CFR (pepper EST) clone	19/62	7
PST (pepper genomic DNA) clone	150/272	67
CDI (pepper PR) clone	83/170	53
Tobacco EST clone	4/21	3
기타	-	19
Total	457/953	267

나) AFLP 분자표지의 개발

AFLP 분석의 경우 *Eco*RI primer 8종류를 *Mse*I primer 8종류와 조합하여 AFLP 반응을 수행하였다. 총 64개의 *EcoR*I과 *Mse*I primer 조합으로부터 3 : 1의 분리비를 보이는 136개의 표지를 선발하였다. Primer의 종류에 따라 visible band의 수, polymorphic band의 수가 다르게 나타났으며, 일반적으로는 visible band의 수가 많을수록 polymorphic band의 수는 많았다. 평균 visible band의 수는 79개, polymorphic band의 수는 14개이었고 평균 polymorphism은 15%이었다. 연관군 지도 작성을 위하여 양친간에 polymorphism을 보이는 표지 중 멘델의 유전법칙에 따라 AFLP 표지의 경우 3 : 1의 분리비를 보이는 표지를 선택하였다(그림5). F_2에서 band의 유무를 AFLP 표지의 경우 A와 C 또는 B와

D로 scoring하여 data matrix를 작성하였고, MAPMAKER version 3.0 program을 이용하여 연관군 지도를 작성하였다.

표4. List of primers and adapters used in the study.

*Eco*RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
*Eco*RI + 1 nucleotide	5'-GACTGCGTACCAATTCA
*Eco*RI + 3 nucleotides	5'-GACTGCGTACCAATTCAAA (E09)
	5'-GACTGCGTACCAATTCAAT (E10)
	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA (E11)
	5'-GACTGCGTACCAATTCAGT (E12)
	5'-GACTGCGTACCAATTCATA (E13)
	5'-GACTGCGTACCAATTCATC (E14)
	5'-GACTGCGTACCAATTCATG (E15)
	5'-GACTGCGTACCAATTCATT (E16)
*Mse*I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
*Mse*I + 1 nucleotide	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC
*Mse*I + 3 nucleotides	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA (M09)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT (M10)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGG (M11)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGC (M12)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA (M13)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT (M14)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCG (M15)
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCC (M16)

MAC ——— F2 ———

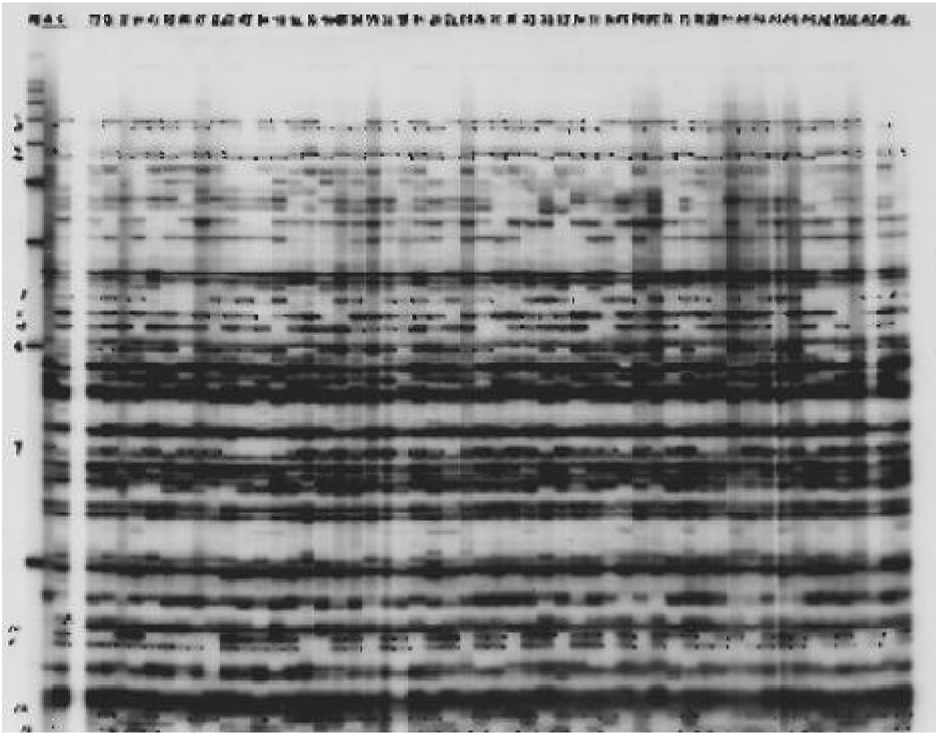


그림4. **교배모본간 선발된** AFLP **표지** (primer combination E13M9)**를 이용한** F2 103 **개체의 유전형 분석**. M, size marker; A, *C. annuum* TF68; C, *C. chinense Habanero*

다) SSLP **분자표지의 개발**

*Hind*III**와** *Mbo* I/*Pst* I **으로 자른** 400-600 bp **정도의 작은 단편의** genomic DNA library**를** microsatellite**가 있는** clone**의 선발에 이용하였다**. *E. coli* transformation**을 하여** colony hybridization **작업을 거쳐** positive clone**을 분리하였고 이용된 탐침으로는** $(AT)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(GT)_{15}$, $(ATT)_{10}$, $(TTG)_{10}$**등 합성된** oligonucleotide**이었다**. **전체** 130**개 가량의** positive clone**을 얻었으며 이** clone **전**

체를 sequencing하여 86개의 microsatellite clone을 얻었다.

Sequencing 결과 (GT)가 25개 (GA)가 23개 (TTG)가 23개 (AT)가 18개 (ATT)가 8개로 확인되었으며, 이 clone의 microsatellite 양쪽 지역의 sequence를 근거로 하여 PCR primer를 작성하였다. Cloning site 근처로 microsatellite가 존재하거나 부정확한 DNA sequence의 정보로 인해 67개에 해당하는 clone에 대해 primer를 작성하여 40개의 polymorphic primer를 얻었다.

좀더 많은 microsatellite primer를 개발하기 위해 미국 NCBI GenBank에 등록된 고추의 DNA sequence 조사하여 microsatellite가 존재하는 sequence를 얻을 수 있었다. 이를 토대로 primer를 재작하여 12개의 polymorphic primer를 얻을 수 있었다. SSLP 표지의 경우, 분자표지로서의 정보력의 척도가 되는 PIC (polymorphic information content) value를 측정한 결과 0.36부터 0.91까지 다양한 값을 나타냈으며 평균 0.75의 높은 값을 나타냈다 (표5, 그림5). Libary와 GenBank에서 얻은 SSR 표지 35개를 본 과제의 mapping population에 적용하여 해당 표지의 게놈상의 위치를 확인한 결과 대부분 고르게 분포되어 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 방법으로 개발된 전체 102개 표지 중에서 유전자지도 작성용 교배모본에서 polymorphism을 보이는 40여개의 SSLP 표지를 이용하여 유전자지도 작성용 집단인 F_2에서 유전자형을 검정하였고 (그림6), 이 중에서 35개를 유전자지도에 포함시킬 수 있었다.

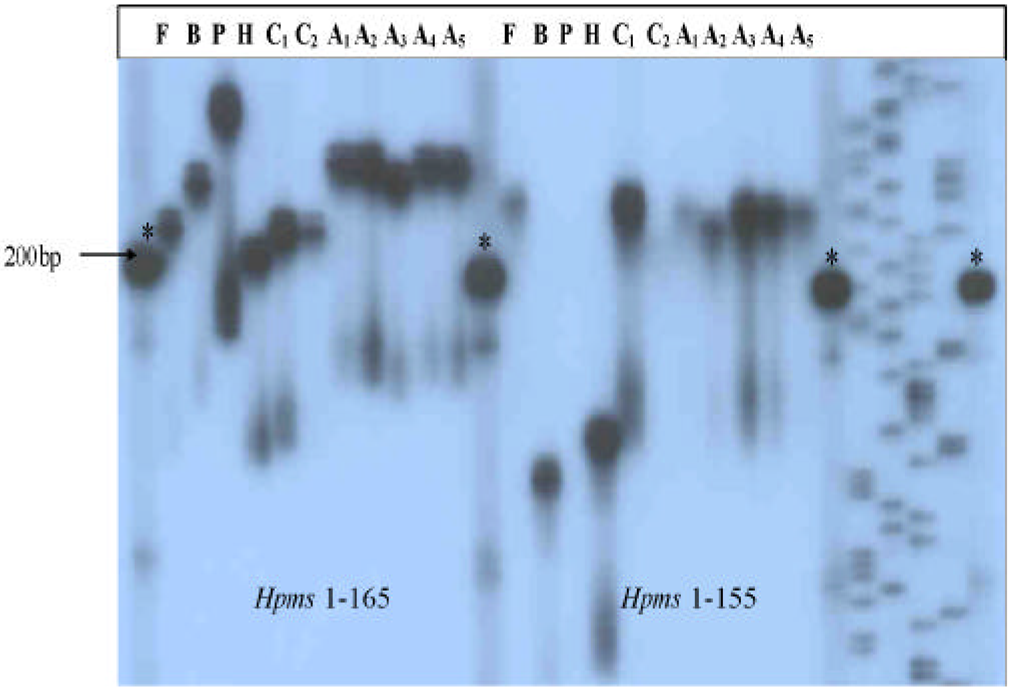


그림 5. **고추** 11**계통에서** *Hpms* 1-165 and *Hpms* 1-155 SSLP **표지를 이용하여** PCR**을 수행한 경우 다양한** allele**를 보여주는 그림**.

F. *C. frutescense* **B**. *C. baccatum* **P**. *C. pubescense*
H.. *C. chacoens* **C1**. *C. Chinense* cv. PI159236 **C2**. *C. chinense* cv Habanero **A1**. *C. annuum* cv. TF68 **A2**. *C. annuum* cv. AC2258
A3. *C. annuum* cv. CM334 **A4**. *C. annuum* cv. Chilsung
A5. *C. annuum* cv. ECW * : 200 bp size marker

표5. 고추 SSLP 분자표지의 종류, 크기, PCR 증폭조건, allele 수 및 PIC value.

LOCUS	REPEAT	SIZE (bp)	Temp. /cyc.	No. of alleles	PIC
Hpms 1-1	(CA)12(TA)4	283	50, 30	10	0.89
Hpms 1-3	(AT)10(GT)12	223	55, 30	6	0.66
Hpms 1-5	(AT)11(GT)17	311	55, 30	8	0.80
Hpms 1-6	(AT)2(GT)4(AT)8(GT)13	197	55, 30		
Hpms 1-41	(AT)6(GT)32IMP	192	55, 30	3	0.66
Hpms 1-43	(GT)9T(TG)7	154	55, 30	3	0.36
Hpms 1-62	(TG)23(AG)9	186	55, 30	7	0.81
Hpms 1-69	(AC)9(AT)4	217	50, 35	5	0.64
Hpms 1-106	(AAAAAT)4	159	55, 35	4	0.55
Hpms 1-111	(AAT)11	159	50, 35	1	0.91
Hpms 1-117	(AT)9(GT)14	189	50, 35	4	0.77
Hpms 1-139	(CT)2(AG)15	299	55, 30	6	0.76
Hpms 1-143	(AG)12	221	55, 30		
Hpms 1-145	(CT)21(AT)13	150	50, 35	9	0.86
Hpms 1-148	(GA)14	197	55, 30	7	0.83
Hpms 1-155	(TA)3CA(GA)2	207	55, 30	6	0.66
Hpms 1-165	(GA)13	213	55, 35	7	0.75
Hpms 1-166	(GA)13AA(AT)2	132	55. 30		
Hpms 1-168	(TA)17(GA)12	208	55, 30		
Hpms 1-172	(GA)15	344	55, 30	9	0.88
Hpms 1-173	(GA)16(TG)2	163	50, 35	6	0.86
Hpms 1-214	(GTTT)2(TTG)9	100	50, 35	6	0.78
Hpms 1-216	(TTG)7···(TTG)8	108	55, 30	5	0.76
Hpms 1-227	(TTG)7	237	55, 30	3	0.58
Hpms 1-274	(GTT)7	174	55, 30	7	0.83
Hpms 1-281	(TTG)6	132	55, 30	6	0.7
Hpms 2-2	(GT)9	146	55, 35		
Hpms 2-13	(AC)12(AT)4	259	50, 35		
Hpms 2-18	(TTG)11	162	55, 35		
Hpms 2-21	(AT)11(AC)9(ATAC)10	295	50, 35	7	0.83
Hpms 2-23	(TTG)7(GT)9	126	50, 35	6	0.75
Hpms 2-24	(CT)17(CA)5A21	205	55, 35	6	0.79
Hpms 2-26	(TTG)7	217	55, 35		
Hpms 2-27	(TTG)7	144	55, 35		
Hpms 2-41	(TTG)7	161	55, 35		
Hpms 2-45	(TTG)9	148	55, 35	4	0.63
Hpms AT2-14	(AAT)16IMP	174	50, 35	6	0.79
Hpms AT2-20	(AAT)18	148	55, 35	6	0.75
Hpms CaSIG19	(CT)6(AT)8(GTAT)5	218	55, 35	7	0.89
Hpms hpMADS3	(AT)17	210	55, 30	3	0.5
CACCEL1	(AT)16IMP	543	50, 35		
AA840689	(GAGGTC)2(GAGGGC)2	267	55, 35		
AA840692	T20	202	55, 35		
AA840749	(AAG)3(AAT)2A(AC)2	181	50, 35		
CAN132623	(TTTG)2(TTG)10	237	60, 35		
AA840721	A13	112	55, 30		
CAN130829	T16	184	55, 30		
AF242731	T18IMP	195	50, 35		
AF242732	(TTG)6IMP	205	50, 35		
AF244121	(TTG)5IMP(AT)6IMP(GT)3IMP	238	50, 35		
CAN010950	(TA)9	254	55, 35		
AF208834	T7A11	201	55, 35		

(A)

(B)

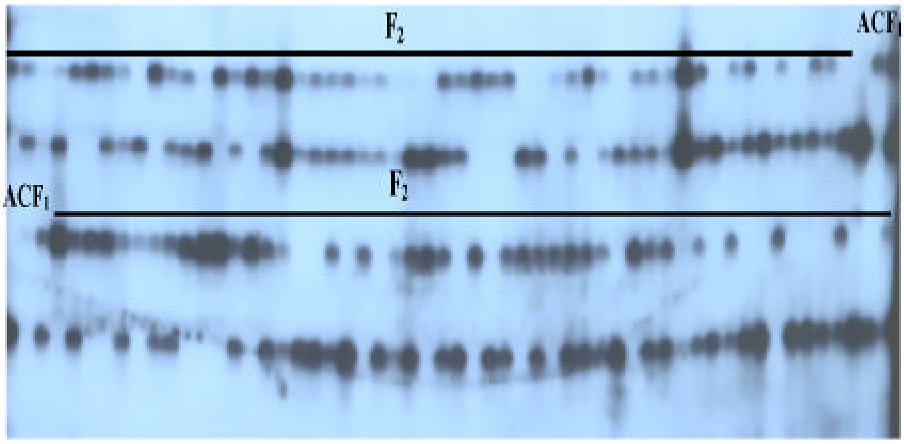
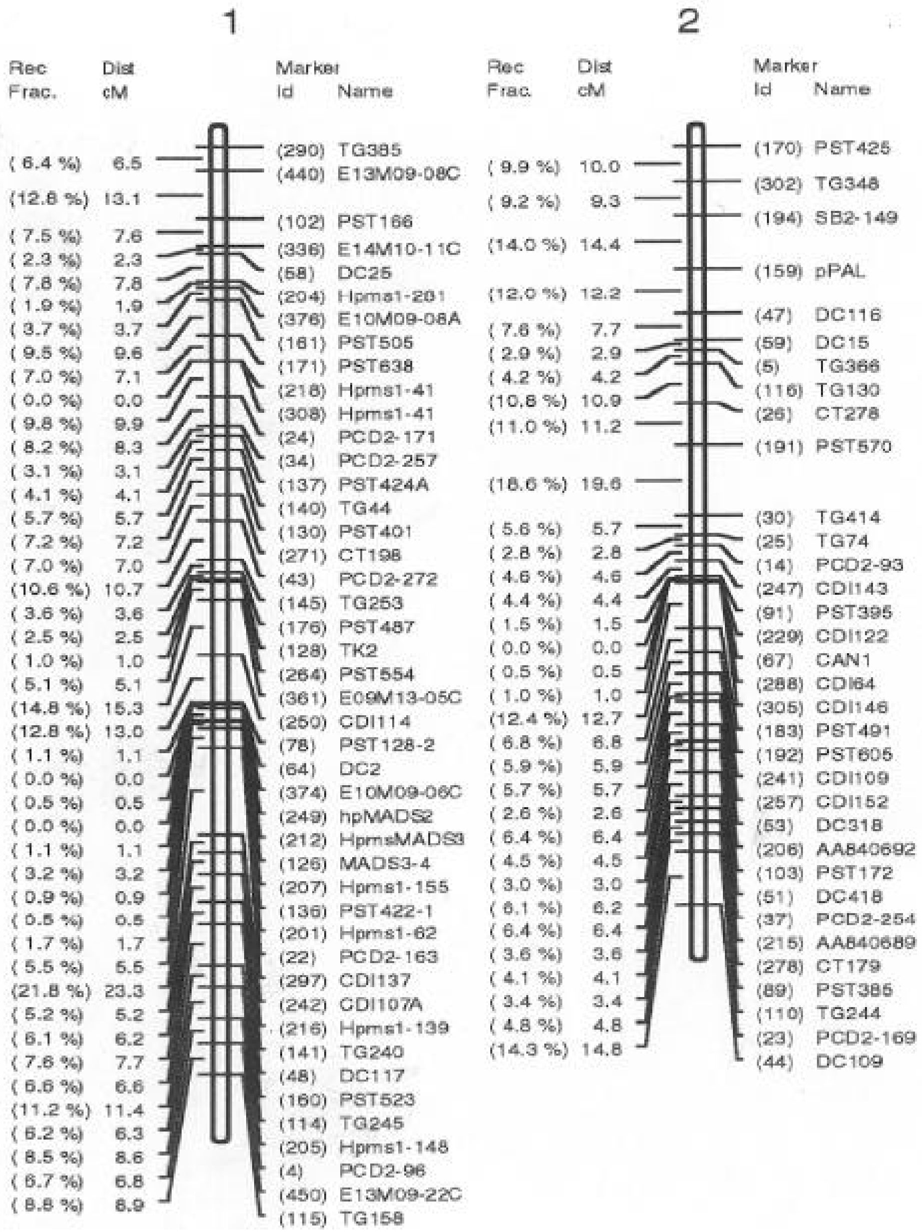
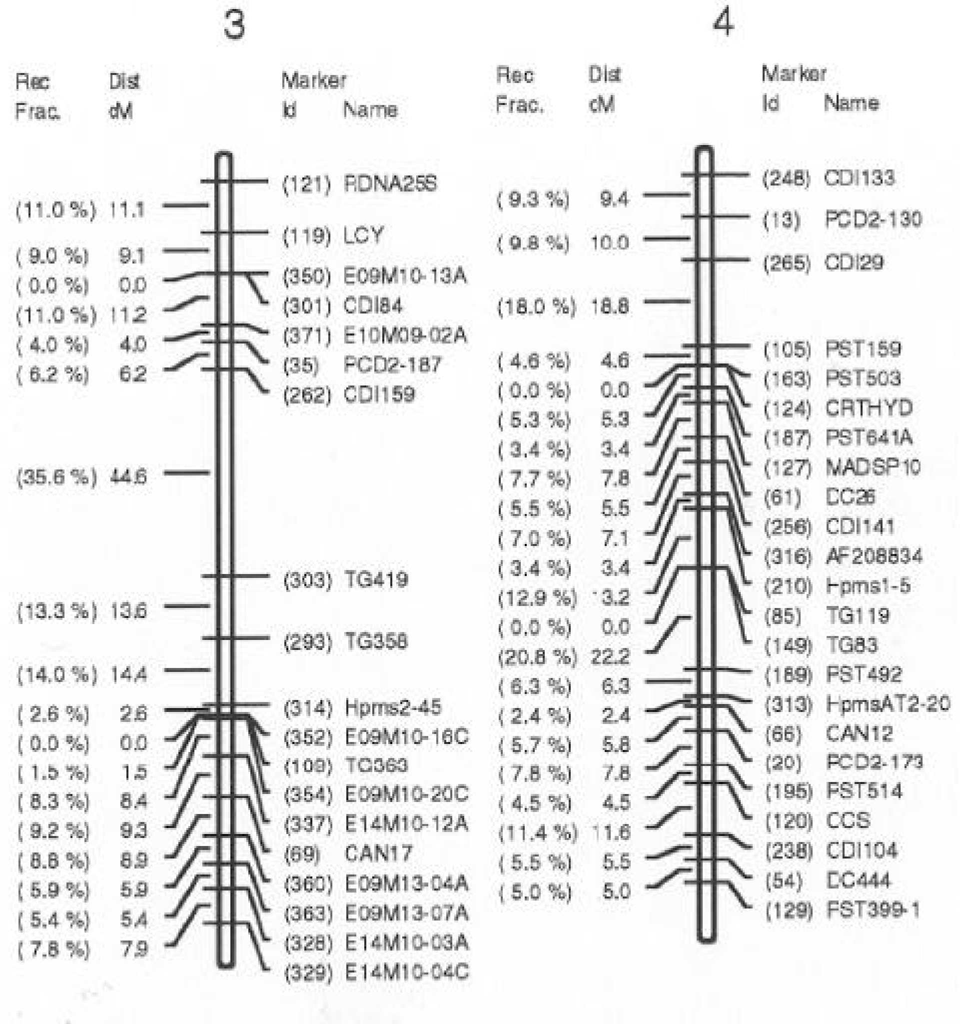
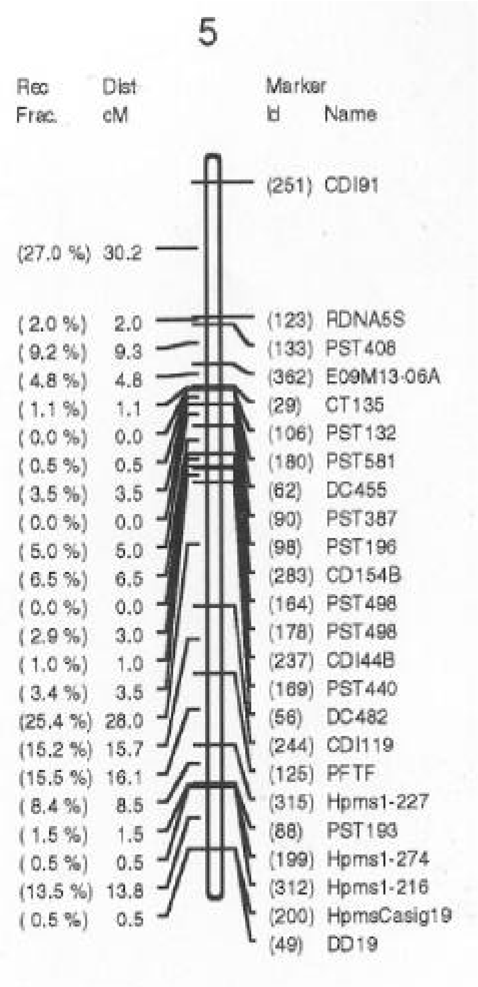


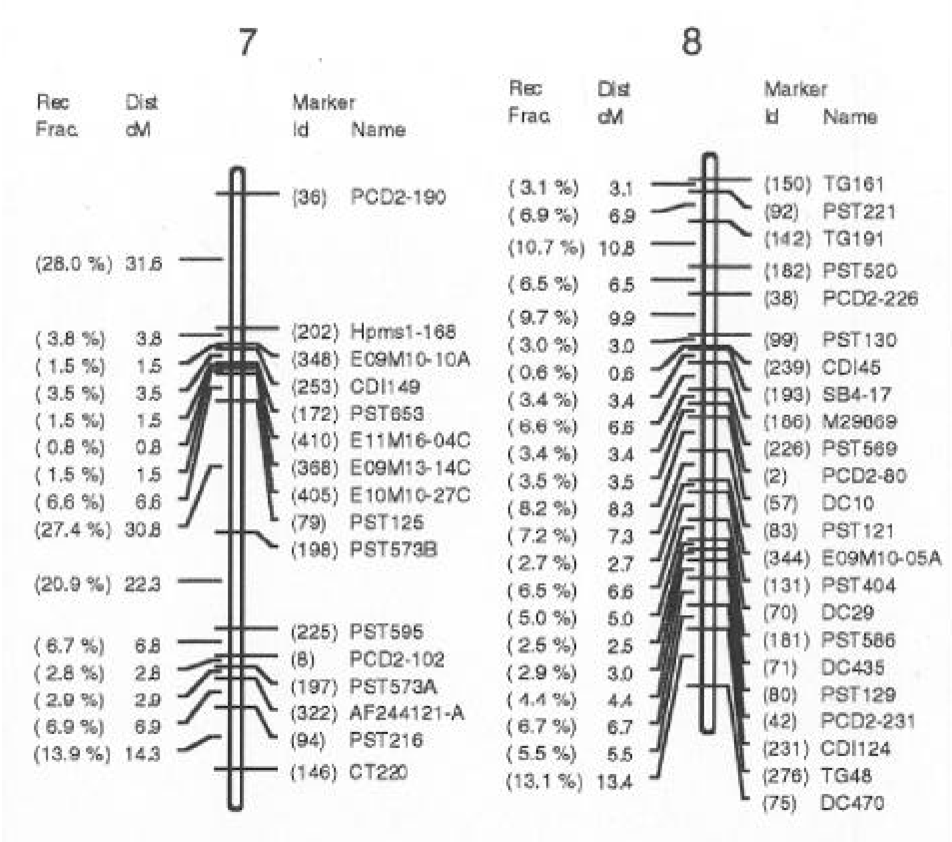
그림 6. **유전자지도 작성용 교배모본에서** SSLP**분석** (A) **및** 103**개체의** F2 **집단에서 유전자형을 검정**(B). **A**: *Capsicum annuum* cv. TF68 **C**. *C. chinense* cv Habanero

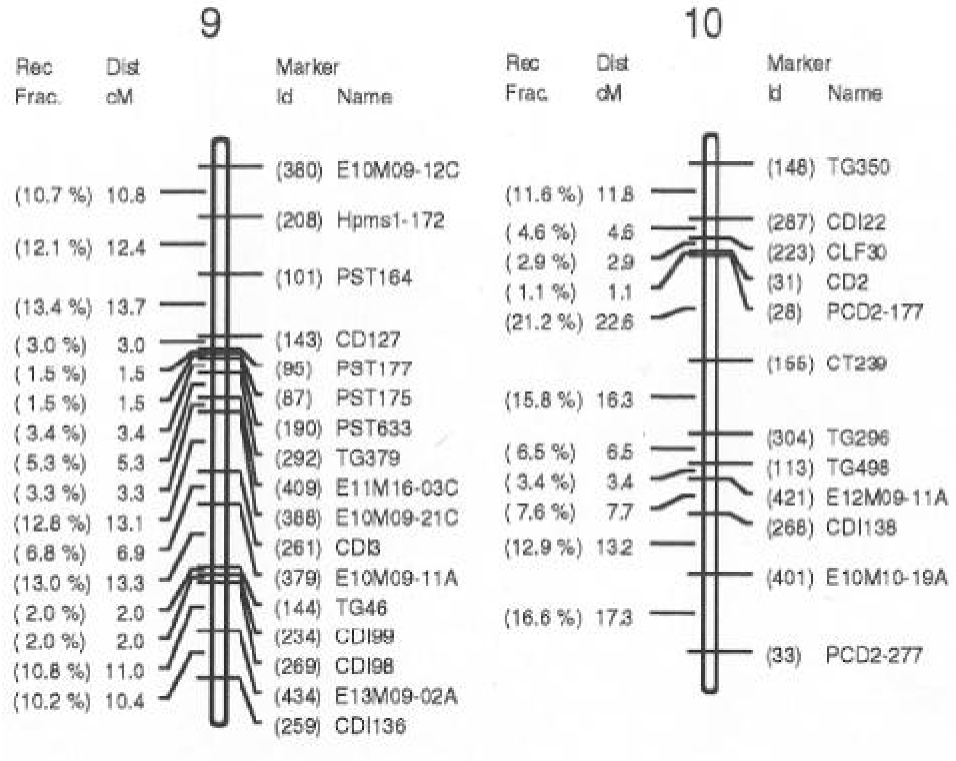

1
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(290) TG385
(440) E13M09-08C
(102) PST166
(336) E14M10-11C
(58) DC25
(204) Hpms1-281
(376) E10M09-08A
(161) PST505
(171) PST638
(218) Hpms1-41
(308) Hpms1-41
(24) PCD2-171
(34) PCD2-257
(137) PST424A
(140) TG44
(130) PST401
(271) CT198
(43) PCD2-272
(145) TG253
(176) PST487
(128) TK2
(264) PST554
(361) E09M13-05C
(250) CDI114
(78) PST128-2
(64) DC2
(374) E10M09-06C
(249) hpMADS2
(212) HpmsMADS3
(126) MADS3-4
(207) Hpms1-155
(136) PST422-1
(201) Hpms1-62
(22) PCD2-163
(297) CDI137
(242) CDI107A
(216) Hpms1-139
(141) TG240
(48) DC117
(160) PST523
(114) TG245
(205) Hpms1-148
(4) PCD2-96
(450) E13M09-22C
(115) TG158
(6.4 %) 6.5
(12.8 %) 13.1
(7.5 %) 7.6
(2.3 %) 2.3
(7.8 %) 7.8
(1.9 %) 1.9
(3.7 %) 3.7
(9.5 %) 9.6
(7.0 %) 7.1
(0.0 %) 0.0
(9.8 %) 9.9
(8.2 %) 8.3
(3.1 %) 3.1
(4.1 %) 4.1
(5.7 %) 5.7
(7.2 %) 7.2
(7.0 %) 7.0
(10.6 %) 10.7
(3.6 %) 3.6
(2.5 %) 2.5
(1.0 %) 1.0
(5.1 %) 5.1
(14.8 %) 15.3
(12.8 %) 13.0
(1.1 %) 1.1
(0.0 %) 0.0
(0.5 %) 0.5
(0.0 %) 0.0
(1.1 %) 1.1
(3.2 %) 3.2
(0.9 %) 0.9
(0.5 %) 0.5
(1.7 %) 1.7
(5.5 %) 5.5
(21.8 %) 23.3
(5.2 %) 5.2
(6.1 %) 6.2
(7.6 %) 7.7
(6.6 %) 6.6
(11.2 %) 11.4
(6.2 %) 6.3
(8.5 %) 8.6
(6.7 %) 6.8
(6.8 %) 6.9
2
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(170) PST425
(302) TG348
(194) SB2-149
(159) pPAL
(47) DC116
(59) DC15
(5) TG366
(116) TG130
(26) CT278
(191) PST570
(30) TG414
(25) TG74
(14) PCD2-93
(247) CDI143
(91) PST395
(229) CDI122
(67) CAN1
(288) CDI64
(305) CDI146
(183) PST491
(192) PST605
(241) CDI109
(257) CDI152
(53) DC318
(206) AA840692
(103) PST172
(51) DC418
(37) PCD2-254
(215) AA840689
(278) CT179
(89) PST385
(110) TG244
(23) PCD2-169
(44) DC109
(9.9 %) 10.0
(9.2 %) 9.3
(14.0 %) 14.4
(12.0 %) 12.2
(7.6 %) 7.7
(2.9 %) 2.9
(4.2 %) 4.2
(10.8 %) 10.9
(11.0 %) 11.2
(18.6 %) 19.6
(5.6 %) 5.7
(2.8 %) 2.8
(4.6 %) 4.6
(4.4 %) 4.4
(1.5 %) 1.5
(0.0 %) 0.0
(0.5 %) 0.5
(1.0 %) 1.0
(12.4 %) 12.7
(6.8 %) 6.8
(5.9 %) 5.9
(5.7 %) 5.7
(2.6 %) 2.6
(6.4 %) 6.4
(4.5 %) 4.5
(3.0 %) 3.0
(6.1 %) 6.2
(6.4 %) 6.4
(3.6 %) 3.6
(4.1 %) 4.1
(3.4 %) 3.4
(4.8 %) 4.8
(14.3 %) 14.8

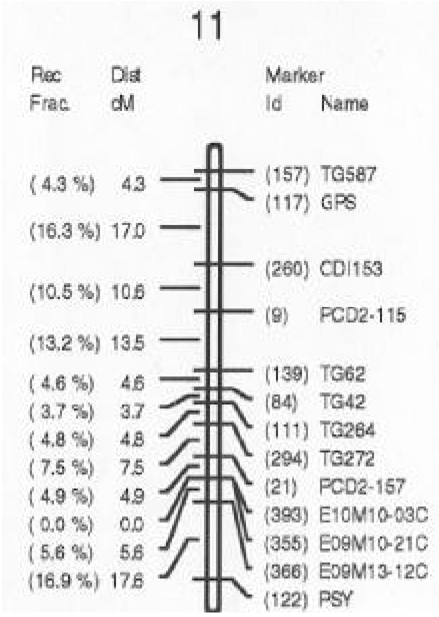


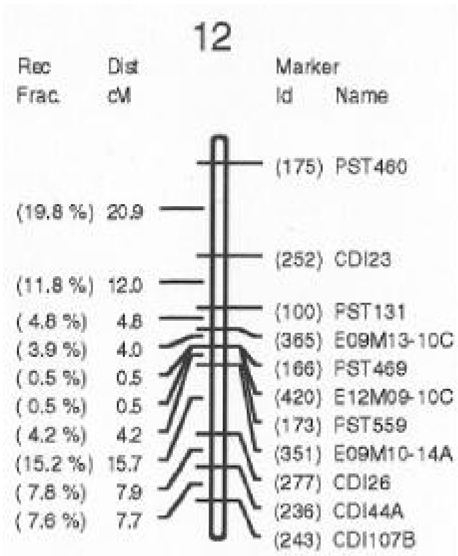
3
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(121) RDNA25S
(11.0 %) 11.1
(119) LCY
(9.0 %) 9.1
(350) E09M10-13A
(0.0 %) 0.0
(301) CDI84
(11.0 %) 11.2
(371) E10M09-02A
(4.0 %) 4.0
(35) PCD2-187
(6.2 %) 6.2
(262) CDI159
(35.6 %) 44.6
(303) TG419
(13.3 %) 13.6
(293) TG358
(14.0 %) 14.4
(314) Hpms2-45
(2.6 %) 2.6
(352) E09M10-16C
(0.0 %) 0.0
(109) TG363
(1.5 %) 1.5
(354) E09M10-20C
(8.3 %) 8.4
(337) E14M10-12A
(9.2 %) 9.3
(69) CAN17
(8.8 %) 8.9
(360) E09M13-04A
(5.9 %) 5.9
(363) E09M13-07A
(5.4 %) 5.4
(328) E14M10-03A
(7.8 %) 7.9
(329) E14M10-04C
4
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(248) CDI133
(9.3 %) 9.4
(13) PCD2-130
(9.8 %) 10.0
(265) CDI29
(18.0 %) 18.8
(105) PST159
(4.6 %) 4.6
(163) PST503
(0.0 %) 0.0
(124) CRTHYD
(5.3 %) 5.3
(187) PST641A
(3.4 %) 3.4
(127) MADSP10
(7.7 %) 7.8
(61) DC26
(5.5 %) 5.5
(256) CDI141
(7.0 %) 7.1
(316) AF208834
(3.4 %) 3.4
(210) Hpms1-5
(12.9 %) 13.2
(85) TG119
(0.0 %) 0.0
(149) TG83
(20.8 %) 22.2
(189) PST492
(6.3 %) 6.3
(313) HpmsAT2-20
(2.4 %) 2.4
(66) CAN12
(5.7 %) 5.8
(20) PCD2-173
(7.8 %) 7.8
(195) PST514
(4.5 %) 4.5
(120) CCS
(11.4 %) 11.6
(238) CDI104
(5.5 %) 5.5
(54) DC444
(5.0 %) 5.0
(129) PST399-1

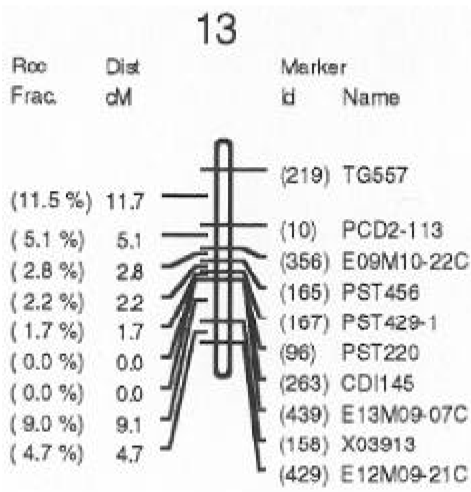

5
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(251) CDI91
(27.0 %) 30.2
(2.0 %) 2.0
(123) RDNA5S
(9.2 %) 9.3
(133) PST406
(4.8 %) 4.8
(362) E09M13-06A
(1.1 %) 1.1
(29) CT135
(0.0 %) 0.0
(106) PST132
(0.5 %) 0.5
(180) PST581
(3.5 %) 3.5
(62) DC455
(0.0 %) 0.0
(90) PST387
(5.0 %) 5.0
(98) PST196
(6.5 %) 6.5
(283) CD154B
(0.0 %) 0.0
(164) PST498
(2.9 %) 3.0
(178) PST498
(1.0 %) 1.0
(237) CDI44B
(3.4 %) 3.5
(169) PST440
(25.4 %) 28.0
(56) DC482
(15.2 %) 15.7
(244) CDI119
(15.5 %) 16.1
(125) PFTF
(8.4 %) 8.5
(315) Hpms1-227
(1.5 %) 1.5
(88) PST193
(0.5 %) 0.5
(199) Hpms1-274
(13.5 %) 13.8
(312) Hpms1-216
(0.5 %) 0.5
(200) HpmsCasig19
(49) DD19
6
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(4.8 %) 4.8
(32) PCD2-276
(8.2 %) 8.3
(63) DC13
(342) E09M10-03A
(22.2 %) 23.8
(151) CD19
(9.8 %) 10.0
(135) PST420
(0.6 %) 0.6
(55) DC472
(5.0 %) 5.0
(107) PST135
(1.9 %) 1.9
(418) E12M09-06A
(0.1 %) 0.1
(60) DC30
(2.6 %) 2.6
(7) PCD2-8
(6.2 %) 6.2
(220) PST537
(8.6 %) 8.7
(400) E10M10-18A
(2.7 %) 2.7
(375) E10M09-07A
(5.0 %) 5.0
(217) Hpms1-3
(3.4 %) 3.4
(213) Hpms1-117
(6.1 %) 6.1
(15) PCD2-78
(1.3 %) 1.3
(17) PCD2-134
(6.3 %) 6.3
(72) DC27
(19.3 %) 20.3
(50) CAN21
(5.6 %) 5.6
(272) CT143
(8.0 %) 8.1
(45) DC110
(14.2 %) 14.6
(300) CDI55

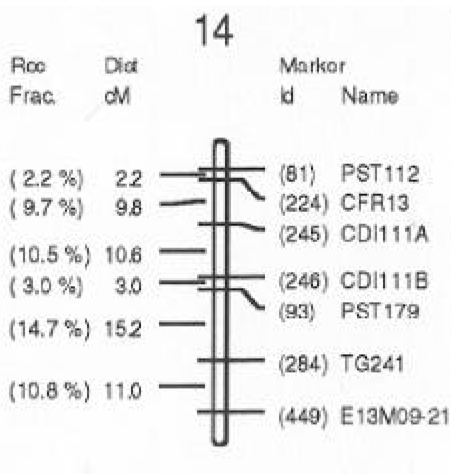

7
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(36) PCD2-190
(28.0 %) 31.6
(3.8 %) 3.8
(1.5 %) 1.5
(3.5 %) 3.5
(1.5 %) 1.5
(0.8 %) 0.8
(1.5 %) 1.5
(6.6 %) 6.6
(27.4 %) 30.8
(20.9 %) 22.3
(6.7 %) 6.8
(2.8 %) 2.8
(2.9 %) 2.9
(6.9 %) 6.9
(13.9 %) 14.3
(202) Hpms1-168
(348) E09M10-10A
(253) CDI149
(172) PST653
(410) E11M16-04C
(368) E09M13-14C
(405) E10M10-27C
(79) PST125
(198) PST573B
(225) PST595
(8) PCD2-102
(197) PST573A
(322) AF244121-A
(94) PST216
(146) CT220
8
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(3.1 %) 3.1
(6.9 %) 6.9
(10.7 %) 10.8
(6.5 %) 6.5
(9.7 %) 9.9
(3.0 %) 3.0
(0.6 %) 0.6
(3.4 %) 3.4
(6.6 %) 6.6
(3.4 %) 3.4
(3.5 %) 3.5
(8.2 %) 8.3
(7.2 %) 7.3
(2.7 %) 2.7
(6.5 %) 6.6
(5.0 %) 5.0
(2.5 %) 2.5
(2.9 %) 3.0
(4.4 %) 4.4
(6.7 %) 6.7
(5.5 %) 5.5
(13.1 %) 13.4
(150) TG161
(92) PST221
(142) TG191
(182) PST520
(38) PCD2-226
(99) PST130
(239) CDI45
(193) SB4-17
(186) M29869
(226) PST569
(2) PCD2-80
(57) DC10
(83) PST121
(344) E09M10-05A
(131) PST404
(70) DC29
(181) PST586
(71) DC435
(80) PST129
(42) PCD2-231
(231) CDI124
(276) TG48
(75) DC470


9
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(380) E10M09-12C
(10.7 %) 10.8
(208) Hpms1-172
(12.1 %) 12.4
(101) PST164
(13.4 %) 13.7
(3.0 %) 3.0
(143) CD127
(1.5 %) 1.5
(95) PST177
(1.5 %) 1.5
(87) PST175
(3.4 %) 3.4
(190) PST633
(5.3 %) 5.3
(292) TG379
(3.3 %) 3.3
(409) E11M16-03C
(12.8 %) 13.1
(368) E10M09-21C
(6.8 %) 6.9
(261) CDI3
(13.0 %) 13.3
(379) E10M09-11A
(2.0 %) 2.0
(144) TG46
(2.0 %) 2.0
(234) CDI99
(10.8 %) 11.0
(269) CDI98
(10.2 %) 10.4
(434) E13M09-02A
(259) CDI136
10
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(148) TG350
(11.6 %) 11.8
(4.6 %) 4.6
(287) CDI22
(2.9 %) 2.9
(223) CLF30
(1.1 %) 1.1
(31) CD2
(21.2 %) 22.6
(28) PCD2-177
(155) CT239
(15.8 %) 16.3
(304) TG296
(6.5 %) 6.5
(113) TG498
(3.4 %) 3.4
(421) E12M09-11A
(7.6 %) 7.7
(268) CDI138
(12.9 %) 13.2
(401) E10M10-19A
(16.6 %) 17.3
(33) PCD2-277


11
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(4.3 %) 4.3
(16.3 %) 17.0
(10.5 %) 10.6
(13.2 %) 13.5
(4.6 %) 4.6
(3.7 %) 3.7
(4.8 %) 4.8
(7.5 %) 7.5
(4.9 %) 4.9
(0.0 %) 0.0
(5.6 %) 5.6
(16.9 %) 17.6
(157) TG587
(117) GPS
(260) CDI153
(9) PCD2-115
(139) TG62
(84) TG42
(111) TG264
(294) TG272
(21) PCD2-157
(393) E10M10-03C
(355) E09M10-21C
(366) E09M13-12C
(122) PSY


12
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(19.8 %) 20.9
(11.8 %) 12.0
(4.8 %) 4.8
(3.9 %) 4.0
(0.5 %) 0.5
(0.5 %) 0.5
(4.2 %) 4.2
(15.2 %) 15.7
(7.8 %) 7.9
(7.6 %) 7.7
(175) PST460
(252) CDI23
(100) PST131
(365) E09M13-10C
(166) PST469
(420) E12M09-10C
(173) PST559
(351) E09M10-14A
(277) CDI26
(236) CDI44A
(243) CDI107B


13
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(11.5 %) 11.7
(5.1 %) 5.1
(2.8 %) 2.8
(2.2 %) 2.2
(1.7 %) 1.7
(0.0 %) 0.0
(0.0 %) 0.0
(9.0 %) 9.1
(4.7 %) 4.7
(219) TG557
(10) PCD2-113
(356) E09M10-22C
(165) PST456
(167) PST429-1
(96) PST220
(263) CDI145
(439) E13M09-07C
(158) X03913
(429) E12M09-21C


14
Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(2.2 %) 2.2
(9.7 %) 9.8
(10.5 %) 10.6
(3.0 %) 3.0
(14.7 %) 15.2
(10.8 %) 11.0
(81) PST112
(224) CFR13
(245) CDI111A
(246) CDI111B
(93) PST179
(284) TG241
(449) E13M09-21

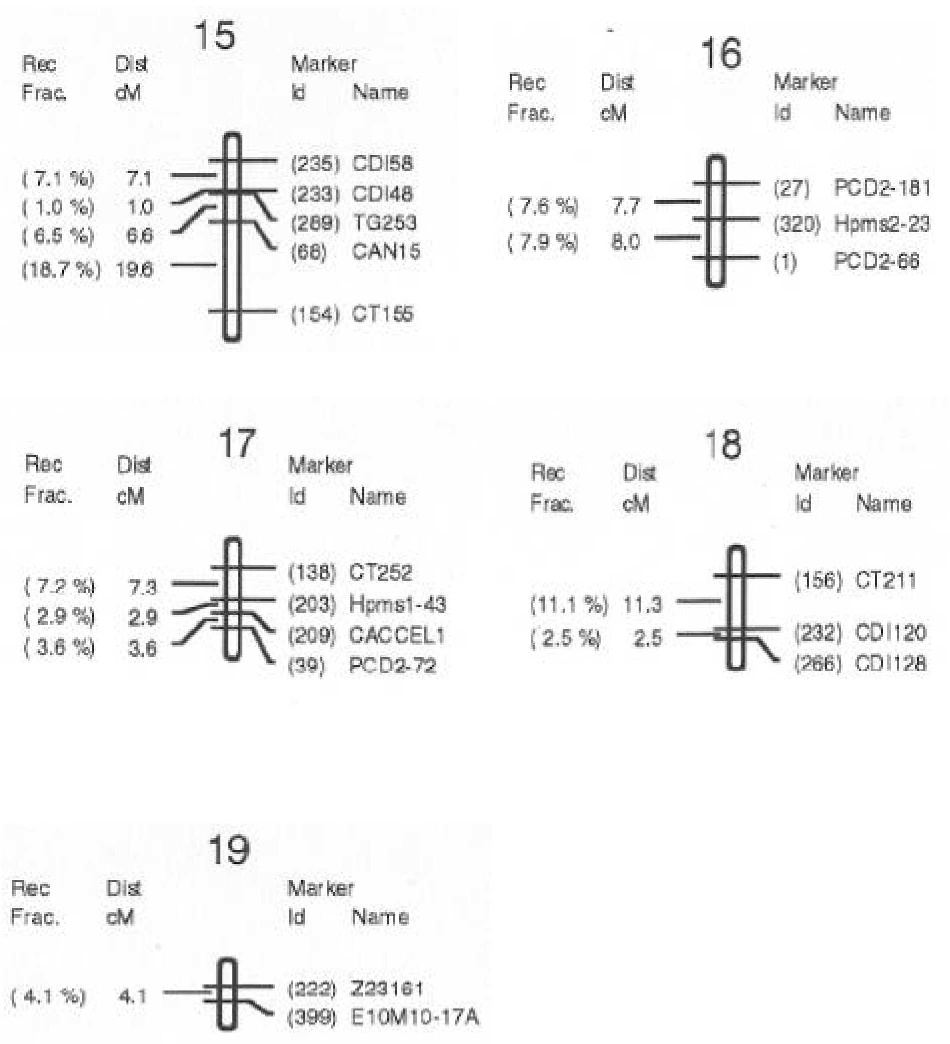


그림7. RFLP, AFLP, SSLP**를 이용하여 작성된 유전자 지도**

표6. 유전자지도의 각 연관군에 포함된 분자표지

연관군	RFLP	AFLP	SSLP	Total	총 길이	평균길이
1	41	30	9	80	263.7	3.29
2	37	4	2	43	215.7	5.01
3	9	9	1	19	165.9	8.73
4	27	4	3	34	160.2	4.71
5	21	8	4	33	154.6	4.68
6	16	5	2	23	146.3	6.36
7	11	10	2	23	138.3	6.01
8	22	4	0	26	123.6	4.75
9	11	16	3	29	114.2	3.93
10	10	2	0	12	108.1	9.00
11	10	11	0	21	94.8	4.51
12	8	3	0	11	78.4	7.12
13	7	4	0	11	58.7	5.33
14	6	1	0	7	52.0	7.42
15	5	0	0	5	34.4	6.88
16	2	0	1	3	15.9	5.30
17	3	0	1	4	13.8	3.45
18	3	0	0	3	13.8	4.60
19	1	1	0	2	4.0	2.0
Total	250	112	28	389	1956.4	5.02

마) 고추 더뎅이병 저항성과 연관된 AFLP 표지 선발

고추 더뎅이병 저항성과 연관된 AFLP 표지 선발하기 위해 F2에 대한 병검정 결과만을 바탕으로 저항성, 이병성을 구분하고 이를 DNA 표지선발을 위한 재료로 이용하였다. 그러나 bulked segregant analysis를 이용한 DNA 표지 선발의 효율성을 높이기 위해서는 후대검정을 통해 동형접합체만을 선발해 분석에 이용해야 한다. 병저항성개체에 대한 후대검정을 실시하기 위해 채종한 F3 종자를 각 계통별로 15 개체씩 파종하고 본엽이 10 매 정도될 때까지 키운 후 전년도와 같은 방법으로 더뎅이병 병균을 접종하였다. 병접종 결과 8 개체가 후대에서 병저항성이 분리되지 않는 동형접합체임을 확인하고 이 개체들의 DNA를 bulked segregant analysis를 위한 재료로 이용하였다. 이병성은 저항성에 대해 열성이므로 이병성 개체는 모두 homozygote이다. 따라서 이병성으로 판정된 8 개체를 임의 선택하고 이들의 DNA를 bulked segregant analysis를 위한 재료로 이용하였다. AFLP 분석을 위해 *Eco*RI primer 32 종류, *Mse*I primer 16 종류를 이용해 총 512조합의 primer combination으로부터 저항성 pool인 BR에서만 나타나는 표지를 찾는 연구를 수행하였다. 최초 BR과 BS간 비교를 통해 총 26 개의 표지를 1차 선발하였고, P1(풍각), P2(PI271322), BR, BS, 비교를 통해 P2와 BR에서 동시에 나타나는 표지를 8개를 2차 선발하였다. 이 8개의 AFLP 표지와 저항성 특성과의 연관 분석결과(그림8) 저항성 유전자와 약 2 cM 정도 연관된 것으로 나타난 표지를 2개 선발하였으며 나머지 6개의 표지는 병저항성을 중심으로 60 cM 근처에 분포하였다. 이러한 AFLP 표지 중 가까이 연관되어있는 4개의 표지(E11M71-300, E11M73-200, E12M52-300, E01M15-300)를 cloning하고 sequencing하였으며, 각각의 염기서열을 바탕으로 primer를 합성하여, STS marker로의 전환을 시도하였다. 그 결과 E11M71-300, E12M52-300, E01M15-300 세 개의 경우 STS 표지로 전환시 저항성과 이병성 개체에서 모두 같은 크기의 밴드가 증폭되어 저항성 특이적인 표지로의 사용은 불가하였다. 그

러나, E21M73-200의 경우 저항성 개체에서만 원하는 크기의 밴드를 증폭시킬 수 있었으며, 이는 실제 육종 선발시 간편하게 이용할 수 있는 표지를 의미한다.

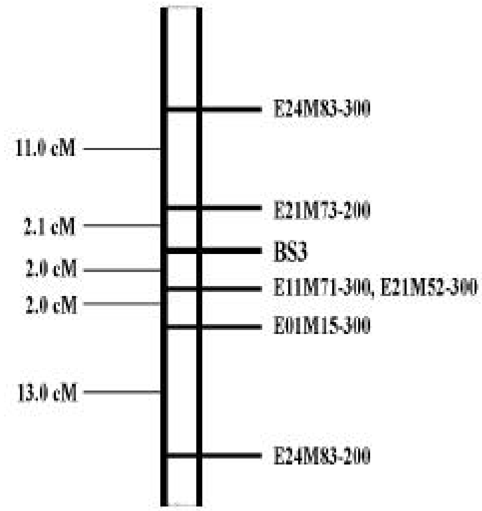


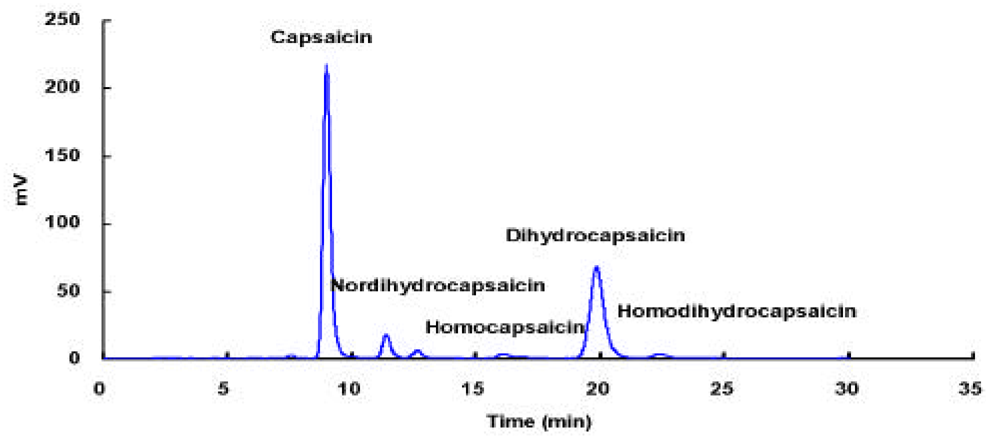
그림8. 고추 더뎅이병 저항성과 연관된 AFLP 표지 선발

바) 고추 과탁분리 형질 연관 표지의 선발

과탁분리 검정결과 과탁분리 형질을 나타낸 것과 과탁비분리 형질을 나타낸 backcross 개체를 각각 5개씩 임의로 선택하여 bulked segregant analysis를 이용하여 AFLP를 수행하였다. *Eco*RI primer 16 종류, *Mse*I primer 16 종류를 이용해 총 256 조합을 이용해 과탁분리 pool에서만 나타나는 10개의 표지를 1차 선발하였고 과탁분리형질과의 연관분석을 실시한 결과 2cM 정도로 연관된 AFLP 표지를 2개 선발하였다. 이러한 AFLP 표지는 cloning과 sequencing과정을 거쳐, 이를 STS marker로 전환하여 실제 육종의 선발효율을 높이기 위한 작업을 수행할 예정이다.

사) 고추 매운맛과 관련된 형질의 유전분석 및 유전자분리

위탁과제를 맡고있는 대전 기초과학 지원연구소에 의뢰한 고추 유전자지도 작성용 분리집단과 교배모본에서의 매운맛 분석을 의뢰한 결과와 현재까지 작성된 유전자지도를 이용하여 매운맛의 양적형질 유전분석을 실시하였다. 고추의 매운맛은 capsaicinoid 계통의 화합물에 의해 결정되는데 이들의 종류는 그림9와 같다. Total capsaicinoid 함량의 경우 LOD score 3.0 이상의 값을 가지는 연관군 4개, capsaicin 함량의 경우 연관군 5개, dihydrocapsaicin 함량의 경우 연관군 11개의 특정 부분에서 유의성이 검정되었다. 이러한 결과로 볼 때 고추의 매운맛과 관련된 유전은 많은 유전자가 관련된 양적형질에 의해 조절되는 것을 알 수 있다 (그림10).



High performance liquid chromatography of capsaicinoids.
Mobil phase: 63% methanol 37% water at 1 ml /min.
Stationary phase: Nova-Pak C_{18} RCM 8 X 150 mm size.

그림9. 고추 과실에서의 capsaicinoid 계통의 화합물의 HPLC 분석

표 7. F2 과실에서의 capsaicinoid 함량

Table. Mean, standard deviation, andskewnessof capsaicinoidsin F_2 family.

Trait	Units	Parents		F_2 Family			
		Habanero	TF68	Mean	s.d.	Skewness	Range
Total Capsaicinoid	mg/ml	13.43 (100%)	0.33 (100%)	7.63	6.41	2.25	0.161 - 39.4
Capsaicin	mg/ml	8.46 (62%)	0.19 (62%)	4.21	3.39	1.82	0.074 - 19.8
Dihydrocapsaicin	mg/ml	3.48 (25%)	0.09 (25%)	2.26	2.03	2.33	0.059 - 11.3
Others	mg/ml	1.47 (13%)	0.01 (13%)	-	-	-	-

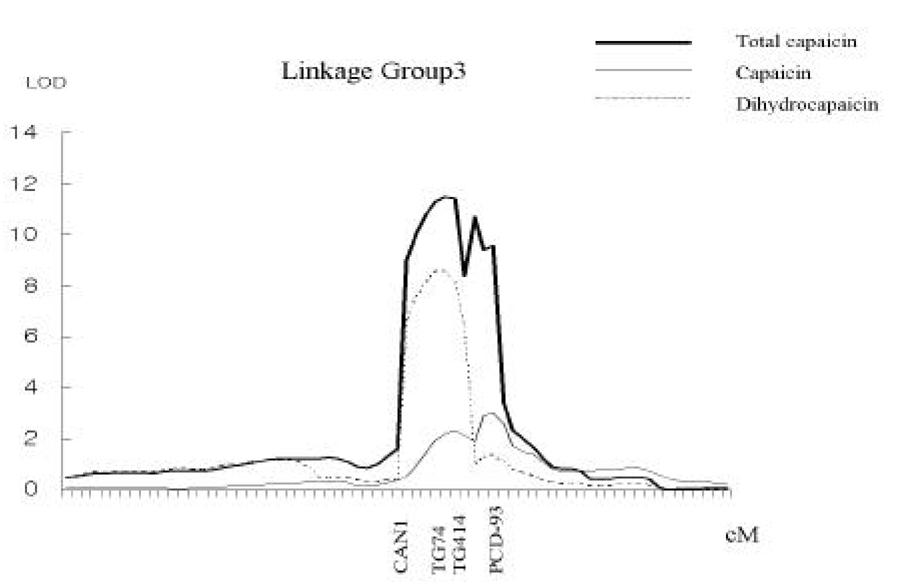


그림10. QTL mapping **결과** Capsaicinoid **함량과 주요하게 연관된** QTL **유전자좌의 동정**

매운맛은 태좌 조직에서만 특이적으로 발현이 되므로 매운맛 고추(Habanero)와 맵지 않은 고추(해화3호, 피망)의 각각의 태좌에서 얻어진 transcript들 중 매운맛 고추의 태좌에서만 특이적으로 발현되는 것들을 동정하고자 하였다. 이를 위해서 매운맛이 어느 시기에 과실에서 발현되는지도 알아야 하므로 수분한 후 10일 간격으로 capsaicinoids를 HPLC로 분석한 결과 수분 후 약 15일 전으로 해서 발현되어 대략 40일 정도까지 급속히 발현하는 것으로 확인되었다. 따라서 수분한 후 약 30일된 각각의 매운맛 고추와 맵지않은 고추의 태좌에서 RNA를 얻은 후 이들 중 poly(A) RNA만을 동정한 후 cDNA로 전환하여 이들을 PCR-based suppression subtractive hybridization의 방법을 통해 매운맛 고추 태좌에서만 특이적으로 존재하는 cDNA clone들을 얻을 수 있었다(subtraction library 제작). 위와 같은 실험은 기본적으로 매운맛 합성에 관여하는 특이적 효소는 매운맛 고추의 태좌에서만 발현되리라는 가정을 가지고 수행한 것이며, 따라서 subtraction을 통해 얻어진 cDNA clone들은 우선적으로 매운맛 고추의 태좌에서만 특이적으로 발현하는지를 확인할 필요가 있다. 이를 위해서 subtraction library를 1차로 dot blot analysis를 통하여 screening 하였고, 이 결과로 전체 약 400개의 clone들 중 53개의 유의성 있는 clone들을 얻을 수 있었다. 이후 이들을 모두 염기서열을 확정한 후, 기존의 데이타베이스(NCBI BLAST)를 통해 조사한 결과 크게 세가지 분류로 나눌 수 있었다. 첫째, 대사과정 관련 유전자 집단(aminotransferase, acetyltransferase, acyl synthase등), 둘째, 세포 구조에 관련된 유전자 집단 (cell wall protein, glycine rich protein...), 그리고 마지막으로 기존의 보고된 유전자와는 유의성 있게 관련이 없는 유전자 집단이다. 이외에도 몇가지 다른 유전자들이 있지만 현재 우선적으로 위의 유전자들의 발현을 분석하였다. 53개의 동정된 유전자들 중 중복된 것들을 제외하고 위의 세번째로 분류된 유전자 집단을 중심으로 Northern blot analysis를 수행한 결과 약 20개정도 특이적으로 매운맛 태좌에서만 발현 되는 것들을 얻을 수 있었다. 위의

실험에서는 기존의 실험한 재료인 맵지않은 고추(해화3호)의 태좌와 매운맛 고추(Habanero)의 태좌에서 각각 동정한 RNA뿐만 아니라 Habanero에서도 맵지 않을 때의 발달단계, 즉 수분한지 약 10일경의 과실의 태좌에서 동일한 방법으로 얻은 RNA도 같이 비교하였으므로 매운맛과 관련된 유전자일 가능성이 더욱 높다고 볼 수 있다. 현재 이들 유전자들을 기존의 매운맛과 관련된 QTL 유전자 지도와의 연관 여부를 알아보고자 실험을 진행중이다. 앞으로의 실험 계획으로는 먼저 cDNA library 제작을 통해 full clone들을 확보하는 것이 가장 중요하며, 이들을 가지고 생화학적인 측면에서 더 접근해나가야 할 필요가 있다.

아) Carotenoid 합성관련 유전자의 분리 및 고추 과색형질의 유전분석

*C. annuum*의 과실은 빨간색을 나타내며, *C. chinense*의 과실은 주황색을 나타낸다. 이의 종간 교잡에서 나온 F2를 이용하여 고추의 과색을 결정하는 유전자를 탐색하고자 하였다. F1에서는 과실이 빨간색으로 나타나며, 이를 통하여 빨간색이 주황색에 대하여 우성으로 작용함을 알 수 있었고, F2 세대에서는 약간의 변이의 정도는 있으나 빨간색과 주황색의 분리비가 약 3 : 1 정도로 단일 유전에 의해 조절되는 형질임을 추정할 수 있었다. 이를 보다 정확히 동정하기 위하여 HPLC를 통하여 각각의 색소에 대한 성분 함량을 조사하고, 이를 QTL 분석 하고자 하였다. 또한 고추의 색깔과 카로티노이드의 함량과는 밀접한 관계가 있으므로, 카로티노이드의 생합성 과정에 관련된 유전자들에 의해 색깔이 결정될 수 있음을 가정하고, 몇가지 유전자들을 클로닝하여 (그림11) 유전자 지도에 위치시킨 후 과색과의 연관 정도를 분석하였다. 그 결과 카로티노이드 생합성 과정의 초기 단계에 관여하는 효소인 phytoene synthase의 유전형이 과색의 표현형과 정확히 일치함을 보였으며(그림12), 이를 통하여 phytoene synthase가 고추의 과색에 매우 중요한 역할을 하는 효소로 기대되어진다. 이를 좀더 면밀히 조사하기 위하여 HPLC 분석 결과 얻어진 카로티노이드의 함량을 QTL 분석하였다(그림

13, 14). 그 결과 phytoene synthase 유전자좌에서만 모든 카로티노이드 성분에 대하여 유의성 있는 LOD 값(> 2.0)을 나타내었으며(Fig. 4), 다른 연관군에서는 이를 관찰할 수 없었다. 현재 이러한 표현형의 차이를 나타내는 원인을 알아내기 위하여 phytoene synthase 유전자의 염기서열과 발현 정도를 비교 분석하고 있으며, 최종적으로는 고추의 형질전환을 통하여 이를 확인하는 것이 필요하리라 본다.

표8. 카로티노이드계 화합물 생합성 관련 유전자를 분리하기 위해 제작한 primer 염기서열

Name[a]	Accession no.[b]	Oligonucleotide sequence[c]
FPS	X84695	5' CTTTCATCTGCCTCTGAAAATGAGTG GAGGAAAACCCTTACTCTACAAAC 5'
GGPS	X80267	5' CTTTCTCCAAGTGAAATTGCACCAC GGTTTACCTTTACTTCCACTAGCT 5'
PSY	X68017	5' ATGTCTGTTGCCTTGTTATGGGTTG CGGAAGATGTTCTTGTACTTTAGTCC 5'
PDS	X68058	5' ATGTCTGTTGCCTTGTTATGGGTTG CGGAAGATGTTCTTGTACTTTAGTCC 5'
LCY	X86221	5' ATGTTGGAATTGGTCTTTGCGCCTG CTTACTTAAGCTGAATAGACCCTAG 5'
CCS	X76165 X77289	5' CCTTTTCCATCTCCTTTACTTTCCATT GACCCGTTAGATCGTTATCTCTCGGAA 5'

[a]FPS: farnesyl pyrophosphate synthase, GGPS: geranylgeranyl pyrophosphate synthase, PSY: phytoene synthase, PDS: phytoene desaturase, LCY: lycopene cyclase, CCS: capsanthin-capsorubin synthase
[b]EMBL Data Library accession number
[c]primer sequence of CCS was designed according to Lefevbre *et al.* (1998)

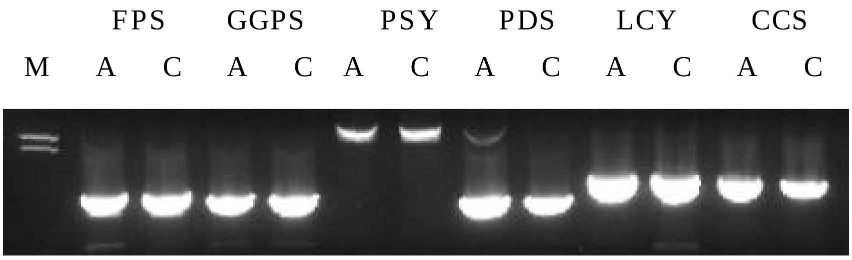


그림11. **고추에서 과색에 관련된 후보유전자들을** PCR**을 통해 증폭한 사진**

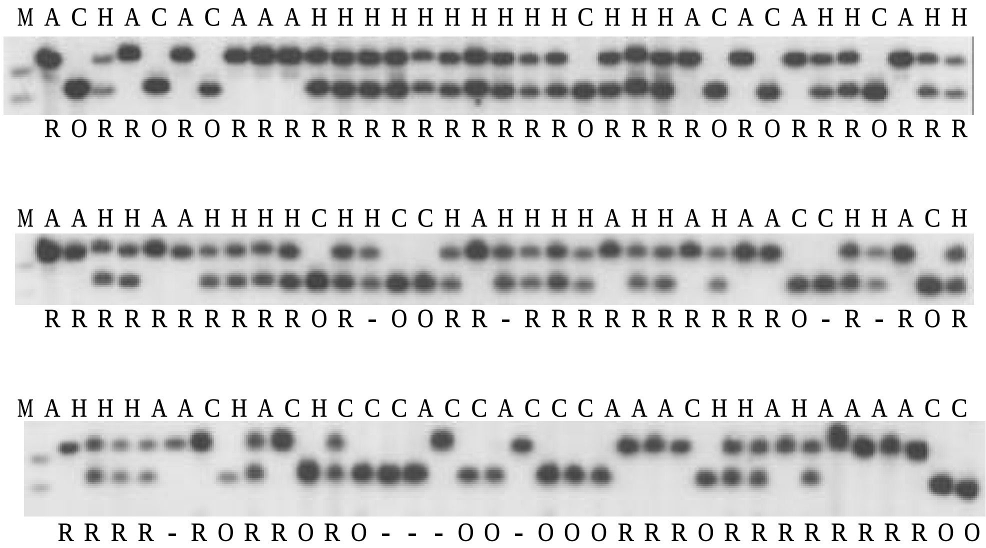


그림 12. Phytoene synthase(PSY)**를** RFLP **표지로 사용한** Southern **분석**.
사진 위는 PSY **유전자의** RFLP genotype, **아래는 과색** (orange or red)

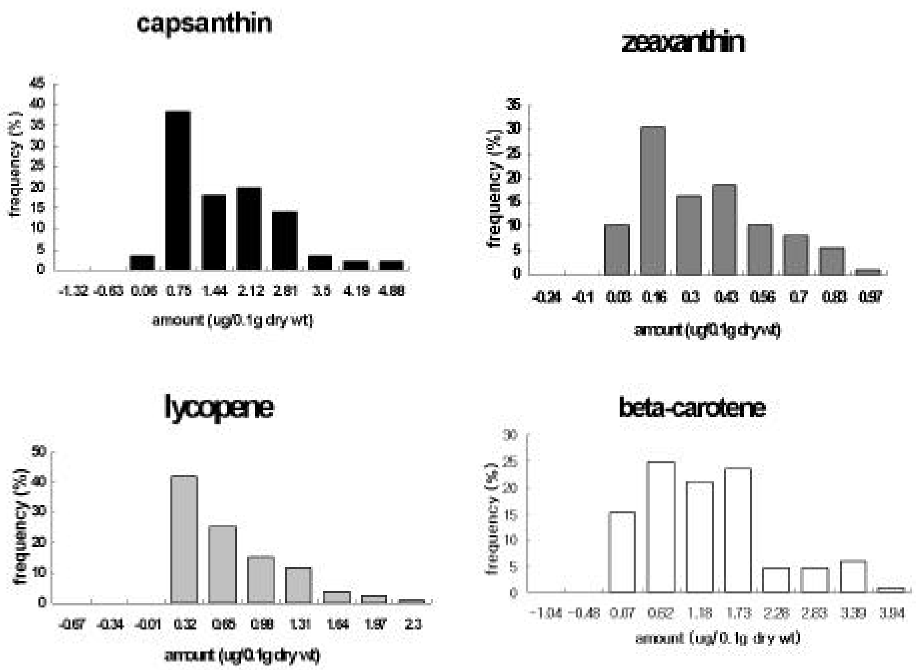


그림13. 유전자지도 작성용 F2 집단의 carotenoid 함량 분포

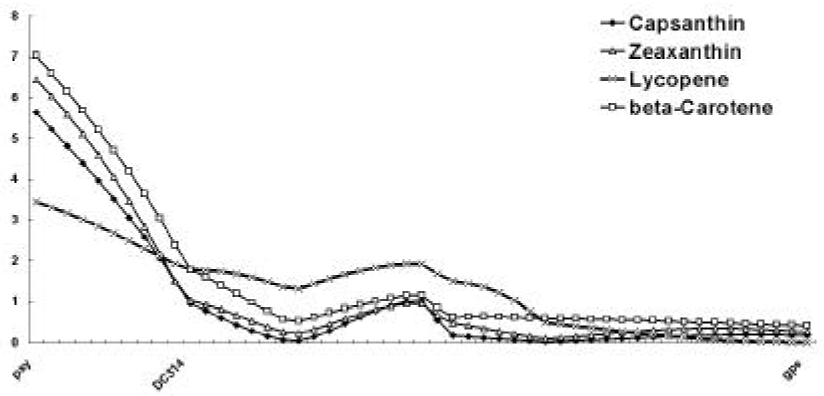


그림14. Carotenoids 함량을 이 용한 interval mapping 분석

Reference

Prince J. P and M. M. Kyle, (1995) A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome. 38(2) 224-231

Lefebvre V and E. Pochard, (1995) Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. Genome. 38(1) 112-121

Lefebvre. V., Palloix. A., Rives. M., (1993) Nuclear RFLP between pepper cultivars (*C. annuum L*). Euphytica. 71(3) 189-199

Tanksley S. D., M. W. Ganal and J. P. Prince (1992) High density linkage map of the Tomato and Potato genomes. Genetics. 132 1141-1160

Van-Ooijen (1994) An RFLP linkage map of *Lycopersicon peryvianum*. Theor. Appl. Genet. 89(7-8) 1007-1013

Ganal. M. W., Broun. P., S. D. Tanksley. (1992) Genetic mapping of tandemly repeated telomeric DNA sequences in Tomato. Genomics. 14(2) 444-448

James P. Prince., S. D. Tanksley. (1992) Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. Genome. 35 726-732

Michaels S. D., M. C. John and R. M. Amassing (1994) Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. Biotechniques. 17(2) 274-276

Beroit Rether (1993) Isolation of polysaccharide-free DNA from plants. Plant Molecular Biology Reporter. 11(4) 333-337

Chung C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989) One step preparation of competent E.coli :Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 2172-2175

Vos, P. (1995) AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research. 23 (21) 4407-4414

Plabhu *et al*, (1994) Inheritance of polymorphic markers generated by DNA amplification fingerprinting and their use as genetic markers in Soybean. Plant Molecular Biology. 26(1) 105-116

Becker J. P, Vos M. Kuifer and M. Heun (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in Barley. Mol. Gen. Genet. 249(1)65-73

Lion. T., Haas. O. A., (1990) Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by PCR. Analytical Biochemistry. 188(2) 335-337

Engler-Brum. G. (1992) Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ^{32}P-based hybridization. Analytical Biochemistry. 210(2) 235-244

Byoung-Cheorl Kang, Seok-Hyeon Nahm, Jin-Kyung Kwon, Jin-Hoe Huh, Hyun-Suk Yoo and Byung-Dong Kim. Construction of Hot Pepper Genetic Linkage Map Using Molecular Markers. Theoretical and Applied Genetics (in press)

Jin-Hoe Huh, Kwon-Soo Ha and Byung-Dong Kim. QTL and Candidate Gene Approaches to Analyze Genes for Secondary Metabolites in Hot Pepper. Theoretical and Applied Genetics (in press)

Hyun-Sook Yoo, Byoung-Cheorl Kang, Jin-Hoe Huh and Byung-Dong Kim. Identifications of AFLP Markers Linked to Bs3 gene for Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Theoretical and Applied Genetics (in press)

제 3 장 고추 역병 및 더뎅이병 저항성 NIL 육성 및 유전분석

제1절 서설

역병과 더뎅이병은 고추의 주요 병이나 약제에 의한 방제효과가 낮아 저항성 품종의 개발이 가장 바람직한 방제방안으로 제시되어 왔다. 따라서 고추 산업이 있는 세계 각국에서는 저항성 재료의 검색과 저항성 유전분석, 그리고 저항성 품종의 육성을 위한 노력을 기울여 왔다. 근래에는 분자유전학의 발전에 따라 저항성의 DNA marking, 저항성 유전자의 cloning과 형질전환에 의한 저항성 유전자의 도입 등의 기술 개발을 시도하기에 이르렀다. 본 연구에서는 역병과 더뎅이병 저항성을 여교잡법으로 품질이 우수한 재래종에 도입하여 저항성 품종 육성을 수행하는 동시에 저항성과 밀접하게 연관된 DNA marker를 찾기 위한 실험재료를 육성하고자 수행하였다.

고추 역병을 일으키는 *Phytophthora capsici* Leonian 균은 토양전염성으로 병든 식물, 특히 뿌리 조직에서 겨울을 넘겨 다음해의 제1차 전염원이 된다. 발병은 토양의 병원균이 식물체의 뿌리 혹은 줄기 밑동의 침입으로 시작된다. 일단 줄기 밑동에 병반을 형성하게 되면 그 위에 유주자낭(zoosporangia)을 형성하게 되며 유주자낭은 물을 만나면 운동성이 있는 유주자(zoospore)를 방출하게 된다. 이 유주자는 물이나 수막(water film)을 따라 다른 식물체로 헤엄쳐 가서 병을 일으키게 된다. 따라서 역병의 발생은 물과 불가분의 관계가 있으며 장마기에 급속히 전파하여 많은 피해를 준다. 대부분의 살균제는 토양에 닿으면 쉽게 분해되게 되어 있으므로 약제의 살포에 의한 역병 방제 효과는 대체로 낮다. 저항성 품종의 개발이 바람직하다.

고추 역병에 대한 저항성은 PI123469, PI201232, PI201234 (Kimble and Grogan, 1960, Barksdale et al, 1984, 김, 1988), CM334 (Bosland and Lindsey, 1991), AC2258(=Mexican pepper line 29)(최 등, 1985; Gil Ortega et al., 1990) 등에서 보고되었으며, 저항성의 유전에 대하여는 1-2개의 우성유전자에 의한다는 보고가 많으나(Gil Ortega et al., 1990, 1991, 1992, 1995; 김과 허, 1990; 김 등, 1991; Reifschneider et al., 1992; Saini and Sharma, 1978; Smith et al., 1967: Walker and Bosland, 1999) 다수의 유전자에 의한 양적형질로 보는 견해(Bartual et al., 1991, 1994, Palloix et al., 1990)도 있다.

본 과제 책임자는 PI201234의 저항성을 '수비초'에 도입하고자 여교잡을 실시해 본 결과 2회이상 여교잡하면 저항성 수준이 너무 낮아져 선발이 곤란해진다고 보고한 바 있으며(김과 손, 1992), BC1에서 선발 고정하여 몇가지 저항성 계통을 육성한 바 있다(김 등, 1996). 그러나 이들 육성계통은 지역 적응성 검정에서 바이러스와 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*)에 너무 약하여 농가에 보급하지는 못하였다.

본 연구에서는 경북 영양지역의 재래종인 '칠성초'를 반복친으로 하고 PI201234보다 역병에 대한 저항성이 더 강한 것으로 알려진 AC2258과 CM334를 일회친으로 하여 여교잡육종법을 수행함으로서 AC2258과 CM334의 역병 저항성을 칠성초에 도입하고, 동시에 역병 저항성 유전자의 DNA marking을 위한 Neal Isogenic Line을 육성하고자 하였으며, 그 결과를 보고하고자 한다.

고추의 더뎅이병은 *Xathomonas campestris* pv. *vesicatoria*라는 세균의 침입으로 일어나는 병으로 주로 잎에 점무늬를 형성하여 잎의 노화를 촉진하여 조기낙엽을 초래하여 피해를 준다. 병원균은 종자전염을 하며 재배기간 중에는 주로 비바람을 타고 전파된다. 따라서 태풍이 지나가는 해에 심하게 발생한다. 그 피해규모는 바이러스, 역병, 탄저병보다는 적으나 많이 발생하는 해에는 무시할 수 없을 정도의 피해를 내어 바이러스, 역병, 탄저병에 이은 주요 병의 하나이다. 방

제를 위하여 동제, 마이신제 등을 살포하기도 하지만 크게 발생하는 것은 4-5년에 한번 정도이기 때문에 농가에서는 대비를 하지 않는 경우가 많아 약제에 의한 방제는 사실상 어려운 실정이다. 따라서 저항성 품종을 개발하는 것이 바람직하다. 더뎅이병에 대한 저항성 품종을 육성하기 위한 노력은 단고추(피만)를 노지에 많이 재배하는 미국 플로리다에서 많이 해 왔다. 노지재배하는 단고추의 경우는 이 병의 발생에 적당한 환경이 계속되면 잎에 대형의 병반을 형성하여 낙엽이 지는 것은 물론 과실에 움푹 들어간 병반을 형성하여 상품성을 없게 하기 때문에 그 피해가 매우 직접적이고 크다.

더뎅이병에 대한 저항성은 PI163192를 비롯한 다수의 미국식물도입국 계통들에서 발견되었으며(Sowell,1960; Sowell and Dempsey, 1977), 이들 저항성 계통들은 대부분 인도에서 도입된 것들이다. 저항성은 크게 과민반응형(hypersensitive reaction type)과 비과민반응형(non-hypersensitive reaction type)으로 나눌 수 있다(Kim, 1983, 1988). 과민반응형은 단일유전자에 지배되며 병원균의 병원형(pathotype), 즉 race에 특이적으로 반응하고, 비과민형은 다수의 유전자에 의한 것으로 보이며 race에 비특이적으로 반응한다. 과민반응형 저항성 유전자는 PI163192, PI260435, PI271322에서 각각 발견되었으며(Cook and Stall, 1963; Cook and Guevara,1984; Kim and Hartmann, 1985) 이들 각 계통이 보유하고 있는 유전자는 서로 독립적인 것으로 확인됨에 따라 각각 Bs1, Bs2, Bs3로 불리고 있다 (Hibberd et al., 1987a, 1987b, Minsavage et al., 1990) 미국 플로리다에서는 이들 과민반응형 저항성 유전자를 단고추 품종인 EarlCal Wonder에 도입하였으나 이들 저항성 유전자를 무력화하는 병원균 race가 출현하였다. 이에 따라 저항성 유전자와 병원균 race와의 특이적 반응에 따라 병원균의 race 분류를 하게 되었고 (Cook and Stall, 1969, 1982) 근년까지는 Bs1, Bs2, Bs3 보유한 품종과의 특이적 반응에 따라 race 6까지 분류하였다 (Kousik and Ritchie, 1995; Sahin and Miller, 1995, 1996). 그러나 *Capsicum pubescens* 계통 중에서 제4의

과민반응형 저항성 유전자 Bs4가 발견됨에 따라 현재는 race 8까지 분류할 수 있게 되었다 (Sahin and Miller, 1998). 국내에는 아직까지 Bs2 유전자를 극복하는 병원형이 발견되지 않고 있으며 race 1과 race 3만 있는 것으로 확인되고 있다 (Kim et al., 1990, Bae and Yoon, 1994). 이와 같이 과민반응형 저항성은 새로운 race에 의하여 쉽게 무력화되므로 race에 비특이적인(pathotype non-specific) 저항성의 활용이 제안되기도 하였다 (Hibberd and Gillespie, 1982; Poulos et al., 1991).

본 연구에서는 국내에 존재하는 race 1과 race 3에 대하여 과민반응형 저항성을 주관하는 Bs2와 Bs3 유전자와 race에 비특이적으로 작용하는 일반저항성을 여교잡법(backcross method)으로 재래종에 도입하여 저항성 품종을 육성하는 동시에 저항성 유전자의 DNA marker를 찾는데 활용할 Near Isogenic Line (NIL)을 육성하기 위하여 수행하였다.

제2절 재료 및 방법

1) 역병저항성 NIL 육성

본 연구에 사용된 식물 재료는 표 1과 같다. KC No. 는 경북대학교 수집번호 (Kyungpook National University Collection No.)를 의미하며, 앞으로 혼동을 피하기 위하여 원명을 쓰기로 한다. 저항성 품종의 육성을 위하여 반복친으로 '수비초'와 '봉화' 가 일부 들어가 있으나 NIL 육성을 위한 반복친은 저온기에 온실에서 착과가 잘 되는 '칠성초'를 사용하였다.

1995년도에 칠성초 x CM334, 칠성초 x PI201234, 봉화 x PI201234 교배조합을 작성하여 BC_1F_1 종자 채종을 완료하였기 때문에 연구가 시작된 1996년도에는 BC1 세대를 검정할 수 있었다. 칠성초 x AC2258 조합은 1980년대에 작성하여 BC_2F_2까지 진행해 놓았던 것을 다시 꺼내 본 연구에 포함시켰다.

Table 1. Parent lines used in breeding Phytophthora blight resistant near isogenic lines (NIL)

KC No.	Origin	Remarks
KC201	Chilsung	A local cultivar of Ilwol, Youngyang, Kyungpook
KC202	Subi	A local cultivar of Subi, Youngyang, Kyungpook
KC217	Bongwha	A local cultivar of Chunyang, Bonghwa, Kyungpook
KCB14	PI201234	Resistant to *P. capsici* (Kimble and Grogan, 1960)
KC263	AC2258	Resistant to *P. capsici* (Cho et al., 1985)

저항성은 파종 후 45-50일의 유묘에 유주자낭 현탁액을 줄기 밑동에 부어주는 방법으로 접종한 다음 25-30일에 발병을 조사하는 방법으로 평가하였다. 접종원은 순수 배양 균사를 호박과실에 접종한 다음 약 5일후에 과실 표면에 형성된 유주자낭을 긁어 물에 타서 만든 유주자낭 현탁액을 사용하였다(Fig. 1). 접종원의 유주자낭 밀도는 현미경 100X 시야당 유주자낭이 5개 이상 되도록 조정하여 한 개체에 5ml씩 관주하였다. 발병은 지상부, 즉 줄기 밑동의 병반 형성과 시들음을 보고 1-4등급으로 메겨 조사하고, 뿌리의 발병도는 뿌리의 갈변 정도에 따라 1-5등급으로 조사하였다. 즉 지상부의 발병도는 1=병징이 없는 것, 2=병반은 있으나 시들지 않고 살아 있는 것, 3=발병하여 시들고 있는 것, 4=말라죽은 것으로 하였으며, 뿌리의 발병도는 1=뿌리갈변이 없는 것, 2=전체 뿌리의 25% 갈변, 3=전체 뿌리의 50% 갈변, 4=전체 뿌리의 75% 갈변, 5=전체 뿌리 100% 갈변으로 조사하였다. 망실에 정식한 후 재배기간 중에도 바이러스 발병정도, 착과성, 생육상태를 고려하여 개체 또는 계통을 도태하였다.

A

B

C

D

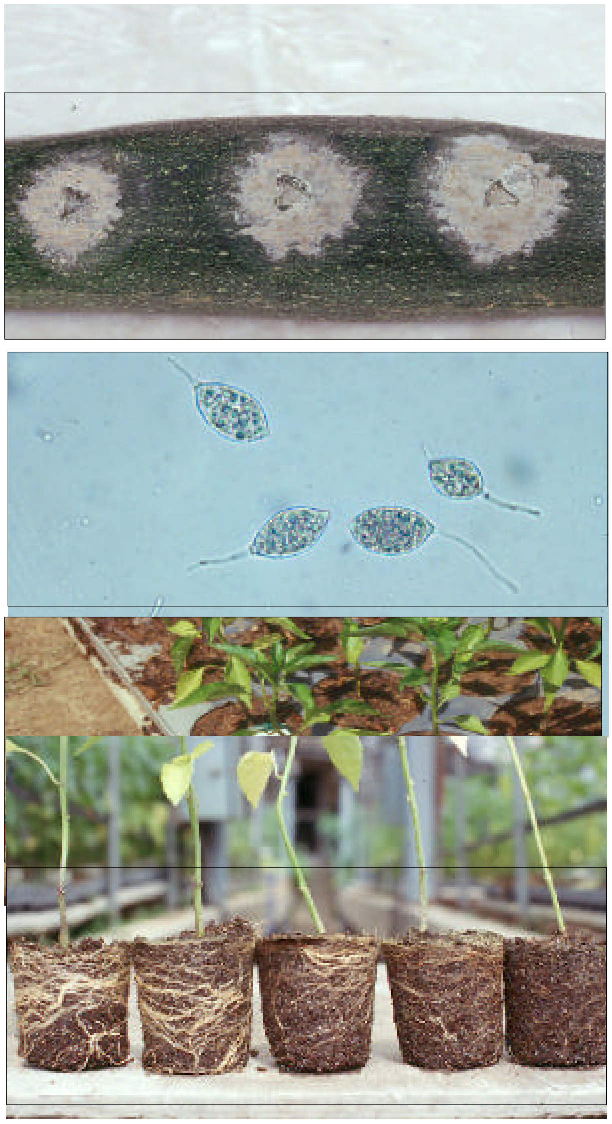


Fig. 1. Preparation and inoculation of zoosporangial suspension of *Phytophthora capsici* and root rot index of pepper seedlings. A. formation of zoosporangia of on the surface of a squash; B. zoosporangia of *Phytophthora capsici*; C. drenching of zoosporangial suspension around the collar of pepper seedlings; D. root rot index(1 5), 1=no root rot observed, 2=about 25% root rot, 3=about 50% root rot, 4=about 75% root rot, 5=complete root rot.

BC_1F_1 BC_5F_1, BC_6F_1까지의 세대진행과 저항성검정, 선발은 아래와 같은 방법으로 실시되었다. 여교배세대 표기는 반복친 옆에 ★표를 붙이고 여교배를 반복한 횟수를 아라비아 숫자로 표시하였다. 그리고 세대 경과에 있어서 계통분리를 하지 않고 집단으로 채종한 경우는 B(Bulk)로 표현하였다.

가) BC_1F_1 세대의 저항성 검정과 선발

1996년 2월 23일 (칠성초★1/SCM334), (KC217★1/PI201234), (칠성초★2/AC2258)-B와 양친을 합하여 총 8계통을 128구 묘종상자에 파종하였다.
4월 11일 관행의 유주자낭 현탁액을 관주법으로 접종한 후, 5월 6일 지상부 발병조사를 실시하였다. (KC217★1/PI201234)은 선발에서 제외하고 (칠성초★1/SCM334) 33주, (칠성초★2×AC2258)-B 30주를 선발하여 5월 18일 망실에 정식하여 재배하였다. 정식 후 활착이 되고 생육이 왕성해지면 '칠성초'를 화분친으로 하여 여교배를 실시하였다.
3월 22일 F_2(수비초×AC2258), F_2(수비택×AC2258), (수비초★1/AC2258)을 128구 묘종상자에 파종하여 육묘한 후 5월 24일 32구 묘종상자에 이식하였다.
6월 1일 관행의 역병 유주자낭 현탁액 관주법으로 접종하였다. 6월 10일부터 5일 간격으로 4회 지상부 발병조사를 하고, 7월 9일 뿌리 발병조사를 실시하였다.
F_2(수비초×AC2258) 26주, F_2(수비택×AC2258) 28주, (수비초★1/AC2258) 12주를 7월 17일 망실에 정식하였다. F_2(수비초×AC2258), F_2(수비택×AC2258)집단은 자식시키고, (수비초★1/AC2258)은 활착 후 생육이 회복되면 '수비초'를 화분친으로 하여 여교배를 실시하였다.

나) BC_2F_1 세대의 저항성 검정과 선발

1996년 11월 12일과 13일 양일간 (칠성초★3/AC2258)-B, (칠성초★2/SCM334), (수비초★2/AC2258) 3계통, 그리고 자식한 계통과 양친 등을 포함하여 총 14개

계통을 TKS-2상토를 담은 288구 묘종상자에 파종하여 육묘하였다. 12월 20일 32구 묘종상자에 이식하였다. 1997년 1월 10일 관행의 유주자낭 현탁액 관주법으로 접종하고 1월 15일부터 5일 간격으로 4회 지상부 발병조사를 실시하였다. 2월 15일 뿌리의 갈변정도를 관찰하면서 선발한 후 2월 18일 부엽상토를 담은 15cm 화분에 이식하였다. 이식 후 생육이 회복되면 여교배 작성을 실시하였다.

다) BC_3F_1 세대의 저항성 검정과 선발

1997년 7월 14일 (칠성초★4/AC2258)-B, (칠성초★3/SCM334), (수비초★3/AC2258) 3계통, 자식계통과 양친, 그리고 추가로 작성한 F_1(수비초-1×SCM334) 조합을 합해서 총 11계통을 TKS-2 상토를 담은 128구 묘종상자에 파종하여 육묘하였다. 7월 30일 32구에 이식한 후 8월 18일 관행의 유주자낭 현탁액 관주법으로 접종하였다. 8월 23일부터 5일 간격으로 4회 지상부를 조사하고 9월 11일, 12일 양일간 뿌리 갈변을 조사하면서 선발하였다. 9월 30일 부엽상토를 담은 15cm 화분에 이식하여 육묘하였다. 이식 후 생육이 회복되면 여교배를 수행하였다.

라) BC_4F_1 세대의 저항성 검정과 선발

1998년 3월 10일 (칠성초★5/AC2258)-B, (칠성초★4/SCM334), (수비초★4/AC2258), (수비초★1/SCM334) 4계통, 자식계통과 양친을 합하여 총 12계통을 128구 묘종상자에 파종하여 육묘하였다. 5월 6일 32구 묘종상자에 이식한 후 5월 25일 관행의 유주자낭 현탁액 관주법으로 접종하였다. 5월 30일부터 5일 간격으로 4회 지상부 발병조사를 하고 6월 18일부터 4일간 뿌리의 갈변정도를 조사하였다. 7월 16일 부엽상토를 담은 15cm 화분에 이식한 후 관리하였다. 이식 후 생육이 회복되면 여교배를 실시하였다.

마) BC_5F_1 세대의 저항성 검정과 선발

1998년 11월 19일 (칠성초★6/AC2258)-B, (칠성초★5/SCM334), (수비초★5/AC2258), (수비초★2/SCM334) 4계통, 자식계통, 양친을 합하여 총 12계통을 TKS-2상토를 담은 128구 묘종상자에 파종하여 육묘하였다. 1999년 1월 4일 32구 묘종상자에 이식한 후 1월 30일 관행의 유주자낭 현탁액 관주법으로 접종하였다. 발병이 충분하지 않아 2회 더 추가 접종을 하였으며 3월 17일부터 6일간 지상부와 뿌리의 갈변정도를 조사하면서 선발하였다. 4월 3일 부엽상토를 담은 15cm 화분에 이식한 후 4월 12일 한번 더 추가접종을 수행하였다. 생육이 회복되면 여교배 작성을 실시하였다. 생육 도중에 역병이 발병하여 죽는 개체는 도태하였다.

바) BC_5F_2 세대의 저항성 검정과 선발

1999년 6월 22일 (칠성초★6/AC2258)-B-B 55계통, (칠성초★5/SCM334)-B 51계통, (수비초★5/AC2258)-B 45계통 및 양친을 포함하여 총 155계통을 TKS-2상토를 담은 128구 묘종상자에 파종하여 육묘하였다. 7월 30일 TKS-2 상토를 담은 32구 묘종상자에 이식하였다. 8월 13일 관행의 고추 역병균 유주자낭 현탁액을 관주하는 방법으로 접종하여 8월 28일 1차로 지상부 발병조사를 실시하고 9월 2일부터 4일까지 3일간 지상부의 2차 발병조사와 뿌리의 발병을 조사하면서 선발하였다.

사) BC_6F_1세대의 저항성 검정과 선발

1999년 12월 22일 (칠성초★7/AC2258)-B, (칠성초★6/SCM334), (수비초★6/AC2258), (수비초★3/SCM334) 4계통, 그리고 양친을 합하여 총 8계통을 TKS-2 상토를 담은 128구 묘종상자에 파종하여 육묘 하였다. 2000년 3월 11일 TKS-2 상토를 담은 32구 묘종상자에 이식한 후, 3월 22일 관행의 고추 역병균

유주자낭 현탁액 관주법으로 접종하였다. 접종 후 5일 간격으로 4회 지상부 발병을 조사하였으며, 4월 22일 뿌리발병을 조사하면서 선발하였다. 선발개체는 15cm 화분에 이식하여 관리하였다.

2) 더뎅이병 저항성 NIL 육성

가) 저항성 및 이병성 친, 저항성 검정, 개체선발과 채종

더뎅이병 NIL을 육성에서 저온착과성이 비교적 우수하여 겨울철에 비교적 온도가 낮고 일조가 부족한 온실 조건에서 착과가 잘 되며 더뎅이병에 이병성인 칠성초를 반복친(recurrent parent)으로 하였으며, 더뎅이병 저항성의 공여친(donor parent)으로는 '칼미초'에 PI271322의 과민반응형 저항성 유전자 Bs3 를 도입하여 육성한 25-11-3-2, 25-11-5-1, Bs1과 Bs2 유전자를 가지는 XVR 3-25, 그리고 Bs1, Bs2, Bs3를 모두 가지는 ECW SR을 사용하였다. 그리고 비과민형이면서도 높은 저항성을 나타내는 PI163192(177-7-1)도 포함시켰다 (표 2). 검정용 종자는 일단 바로커상토(서울농자재) 혹은 TKS-2 상토로 채운 128 트레이에 파종하여 계절에 따라 파종 후 25-30일경에 다시 같은 상토를 채운 32구 트레이로 옮겨 심었다. 저항성 검정은 파종후 45일-60일사이의 유묘의 잎에 더뎅이병원 세균 현탁액을 주사기 혹은 페인트분사기로 잎 뒷면에 침투시키는 방법으로 접종한 다음 72시간이후부터 반응을 관찰하여 7-10일 후에 침투부위의 반응을 보고 과민형(hypersensitive reaction, HR) 혹은 비과민형(non-hypersensitive, NHR)으로 최종 분류하였다 (그림 2). 접종원은 순수배양한 병원균을 YDC(Yeast extract Calcium carbonate Agar) 배지에 옮겨 48시간 배양한 다음 배양물을 멸균수로 씻어내어 희석하여 사용하였다. 세균의 밀도는 분광광도계를 사용하여 470 nm에서 optical density 0.5로 조정하여 일단 109 cell/ml로 맞춘 다음 이것을 다시 증류수로 10배 희석하여 108 cells/ml로 하여 접종에 사용하였다. PI163192를 공여친으로 하는 조합에서는 과민형반응이 나타나지 않으므로 접종부위의 건조한 정

도, 위성반점 등에 따라 1-5등급으로 나누어 조사하였다.

나) 교배친의 더뎅이병균 race 1과 race 3에 대한 저항성 검정

교배조합 작성을 위한 더뎅이병 저항성 및 이병성 친은 1996년 2월22일 파종하였으며 4월 8일 더뎅이병균 race 1과 race 3를 접종하였으며 4월 18일에 반응을 최종 조사하였다. 접종은 일회용 주사기를 침이 없는 상태로 잎 뒷면에 대고 압력을 가하여 세균현탁액을 엽육조직의 세포간극으로 밀어 넣는 방법을 사용하였다. 접종후 48-72시간에 과민형반응을 관찰할 수 있었다.

Fig. 2. Hypersensitive (left) and susceptible (right) reactions of pepper to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge)Dye.

발병조사 결과에 따라 가장 저항성이 강한 개체를 골라 여교배 모본으로 하였다. 선발된 개체는 부엽상토를 채운 직경 30cm의 화분에 옮겨심어 일반관리를 하면서 여교배 모본으로 사용하였다.

다) F1세대의 저항성 검정

1996년 11월 12일에 걸처 파종하였으며 97년 1월 28일 접종하여 2월 7일에 조사하였다. 검정방법은 개체당 2개의 신선한 잎에 더뎅이병균 race 1과 race 3를 침투접종한 다음 72시간 후에 접종부위의 반응을 보고 과민형반응과 비과민형반응으로 구분하였다. 과민형 개체 중에서 가장 반응이 선명한 개체를 여교잡 모본으로 선발하였다. 양적유전형의 것은 일단 비과민형으로 분류하였으며 접종부위가 가장 건조한 개체를 선발하여 여교잡 모본으로 하였다.

라) BC1 세대의 저항성 검정

1997년 7월 14일 파종하여 8월 30일 접종하였으며 9월 6일에 조사하였다. 제1차년도에 KC201(칠성초)에 양적유전형의 KC177-7-1(PI163192), Bs2 과민반응형 저항성 유전자을 가진 KC297, Bs2와 Bs3유전자를 가진 KC298, Bs3유전자만을 가진 육성계통 25-11-계통을 교배하여 얻은 F1과 BC1F1집단의 더뎅이병균 race 1과 race 3에 대한 반응을 검정하였다. 검정방법은 개체당 2개의 신선한 잎에 더뎅이병균 race 1과 race 3를 침투접종한 다음 72시간 후에 접종부위의 반응을 보고 과민형반응과 비과민형반응으로 구분하였다. 과민형 개체 중에서 가장 반응이 선명한 개체를 여교잡모본으로 선발하였다. 양적유전형의 것은 일단 비과민형으로 분류하였으며 접종부위가 가장 건조한 개체를 여교잡모본으로 선발하였다.

마) BC2 세대의 저항성 검정

1998년 3월 9일 파종하여 6월 9일 접종하였으며, 6월 17일에 조사하였다. 과민형 반응(HR, hypersensitive reaction)이 기대되는 집단에는 각 개체에 일차로 더뎅이병균 race 1과 race 3을 각각 접종하여 72시간 후부터 1주일간 관찰하면서 과민형 반응과 이병성반응으로 구분하여 조사하였다. 연속변이를 보이는 집단에서는 race 1과 race 3을 등량으로 혼합하여 살포한 다음 48시간 2야를 습실처리

하였다. 접종 2주일 후에 잎에 형성된 병반의 크기와 모양 및 수에 따라 0 3의 기준으로 나누어 조사하였다.

바) BC3 세대의 저항성 검정

1999년 1월 20일 파종하여 3월 25일 접종하였으며, 4월 3일 조사하였다. 과민형 반응(HR, hypersensitive reaction)이 기대되는 집단에는 각 개체에 일차로 더뎅이병균 race 1을 각각 접종하여 72시간 후부터 1주일간 관찰하면서 과민형 반응과 이병성반응으로 구분하여 조사하였다. 이어 race 3에 대한 반응을 조사하였으나 반응이 불분명하여 세대를 진행을 지연시키지 않기 위하여 race 1에 저항성인 개체를 선발하여 화분에 옮겨심은 다음 다시 race 3를 접종하여 이병성을 나타내는 개체는 도태하였다. 따라서 결과에는 race 1에 대한 반응만 제시되었다.

사) BC4 세대의 저항성 검정

2000년 3월 20일 파종하여 4월 27일 전년도와 같은방법으로 접종하였으며, 5월 4일 조사하였다.

3) 국내 더뎅이병균의 race 분화 조사

1997년도까지 전국 각지에서 수집한 더뎅이병 시료로부터 병원균을 분리하여 더뎅이병균race (병원형) 판별품종에 각각 주사기로 엽육조직에 침투 접종한 다음 과민형 반응을 조사하였다. race의 판별은 과민반응형 저항성 유전자 Bs1, Bs2, Bs3 유전자를 가진 육성 계통의 반응에 따라 분류하였다(Kousik and Ritchie, 1995, 1998, Sahin and Miller, 1995, 1996). 병원형 분류 실험에 공시한 품종은 표 2과 같고 race의 판별은 표3를 기준으로 하였다.

판별품종은 1998년 3월 9일 파종하여 4월 20일 수집 균주별로 접종하였다. 각 균주를 각 판별품종의 3개의 잎에 접종한 다음 7일 후 최종 반응을 조사하였다.

Table 2. Differential cultivars used in pathotype identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* collected in Korea and their expected reaction.

Differential cultivar	HR genes	Expected reaction to pathotype
ECW(EarlCal Wonder)	-	Susceptible to all pepper strains
ECW 10R	Bs1	HR to race 2, 5
ECW 20R	Bs2	HR to races 1, 2, 3
ECW 30R	Bs3	HR to races 1, 4
25-11-5	Bs3	HR to races 1, 4
ECW SR (KC298)	Bs1, Bs2, Bs3	HR to races 1, 2, 3, 4, 5
Chilsung (KC201)	-	S to all pepper strains
Subi (KC202)	-	S to all pepper strains

Table 3. Identification of pathotype of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Differential cultivar	Pathotype					
	race 1	race 2	race 3	race 4	race 5	race 6
ECW 10R	S	HR	S	S	HR	S
ECW 20R	HR	HR	HR	S	S	S
ECW 30R	HR	S	S	HR	S	S
25-11-5	HR	S	S	HR	S	S
ECW SR (KC298)	HR	HR	HR	HR	HR	S
ECW	S	S	S	S	S	S
Subi	S	S	S	S	S	S
Chilsung	S	S	S	S	S	S

제3절 연구 결과

1) 역병 저항성 NIL 육성

가) BC_1F_1 세대의 저항성 검정과 선발

(칠성초★1/SCM334), (KC217★1/PI201234), (칠성초★2/AC2258)-B와 양친을 합하여 총 8계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정 결과는 Table 1과 같다. 3계통 모두 전혀 발병하지 않은 개체의 비율이 90% 이상으로 조사되어 저항성 개체의 선발이 가능하였다. 추가로 포함시킨 (수비초★1/AC2258), F_2(수비초×AC2258), F_2(수비택×AC2258)의 고추 역병에 대한 저항성 검정결과는 Table 2와같다. 이 계통들에 대해서는 지상부와 뿌리의 발병도를 모두 조사하였는데, 우선 지상부 발병을 보면 자식으로 진행한 F_2집단이 이병성 품질친인 '수비초'로 1회 여교배한 것보다 더 적게 발병한 것으로 조사되었다. 이러한 경향은 뿌리의 발병도에 있어서도 유사한 경향을 보이고 있었다. (수비초★1/AC2258)의 경우 발병이 심하여, 지상부 조사에서는 발병하지 않은 건전한 개체의 비율이 21% 밖에 되지 않았고, 뿌리 발병도 조사에서는 건전한 개체가 전혀 없을 정도였다. 그러나 선발을 할 때 선발개체수가 적어지더라도 되도록이면 뿌리의 발병이 적은 개체를 선발하였다. 이후 세대에 있어 여교배 효율을 높이기 위해 모본을 '칠성초'와 '수비초'로 단순화하였는데, '칠성초'와 '수비초'는 경북 영양지역 재래종으로 과형과 품질이 우수하며, 개화가 빠르고 저온착과성이 좋아 세대진행을 더 빨리 추진할 수 있는 장점이 있다. 칠성초'와 '수비초'를 반복친으로 하여 여교배를 실시하는 과정에서 착과 후에라도 죽는 개체가 나타나면 도태하면서 여교배를 실시하였다.

나) BC_2F_1 세대의 저항성 검정과 선발

(칠성초★3/AC2258)-B, (칠성초★2/SCM334), (수비초★2/AC2258) 3계통, 그리

고 자식한 계통과 양친 등을 포함하여 총 14계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정결과는 Table 3과 같다. 역병이 전혀 발생하지 않는 건전한 개체의 비율이 BC_2F_1에서는 평균 55%로 나타나, BC_1F_1보다 발병이 좀 더 많아졌는데, 이것은 여교배가 더 진행됨에 따라 저항성 수준이 낮아진 것으로 볼 수 있다. 그러나 모든 계통에서 발병이 되지 않은 건전한 개체의 선발은 가능하였다. 그리고 일회친으로 사용한 고추 역병 저항성 계통의 저항성 수준에 따라 각 조합의 발병도에 차이가 있는 것으로 보인다. 즉 'SCM334'가 저항성 친으로 사용된 경우는 'AC2258'의 경우보다 이병정도가 낮았다. BC_2F_1 세대에서도 여교배 계통의 발병도는 자식된 계통보다 지상부와 뿌리에서 발병도가 더 높은 것으로 조사되었다.

다) BC_3F_1 세대의 저항성 검정과 선발

(칠성초★4/AC2258)-B, (칠성초★3/SCM334), (수비초★3/AC2258) 3계통, 자식계통과 양친, 그리고 추가로 작성한 F_1(수비초-1×SCM334)를 합해서 총 11계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정결과는 Table 4와 같다.

Table 1. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents and backcross populationsfor breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines.

Population	Freq. at stem rot index^z				Mean stem rot index
	1	2	3	4	
(Chilsung★1/SCM334)	49		2		1.08
(KC217★1/PI201234)	87	4	3		1.11
(Chilsung★2/AC2258)-B	61		2	1	1.11
Chilsung-1(KC201-1)				18	4.00
KC217-2-2			12		3.00
PI201234 (B14-2-2-3)	16				1.00
AC2258 (KC263)	13				1.00
SCM334 (KC294)	16				1.00

^{z}1=No disease symptom; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4=dead

Table 2. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents, BC1F1, and F2 populations of the cross Subi×AC2258 for breeding Phytophthora blight resistant near-isogeniclinesin1996.

Population	Freq. at stem rot indexz				Mean stem rot index	Freq. at root rot indexY					Mean root rot index
	1	2	3	4		1	2	3	4	5	
(Subi★1/AC2258)	22	9	4	72	3.18		5	6	16	80	4.60
F2(Subi×AC2258)	42	4	3	7	1.55	13	13	9	10	11	2.88
F2(Subi×AC2258)	51	12	2	25	2.01	31	22	5	4	28	2.73
Subi (KC202)		3	5	4	3.08						
AC2258 (KC263)	13				1.00						

Z 1=No symptom; 2=necrotic lesion on stem but, surviving; 3=wilting; 4=dead.
Y 1=No root rot; 2=about 25% root rot; 3=about 50% ; 4=about 75%; 5=complete root rot.

BC3F1에서는 발병이 전혀 되지 않은 건전한 개체의 비율이 평균 42%로, 앞세대에서보다는 발병이 좀 더 많았지만 건전한 저항성 개체의 선발은 가능하였다. 그리고 여교배계통의 발병이 자식계통의 발병보다 높게 나타나는 경향은 BC2F1에서와 일치하였다.

라) BC4F1 세대의 저항성 검정과 선발

(칠성초★5/AC2258)-B, (칠성초★4/SCM334), (수비초★4/AC2258), (수비초★1/SCM334) 4계통, 자식계통과 양친을 합하여 총 12계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정결과는 Table 5과 같다.
앞세대에서와 같이 지상부와 뿌리의 발병도 경향은 여교배한 계통이 자식한 계통보다 더 높게 조사되었다.

마) BC5F1 세대의 저항성 검정과 선발

(칠성초★6/AC2258)-B, (칠성초★5/SCM334), (수비초★5/AC2258), (수비초★

2/SCM334) 4계통, 자식계통, 그리고 양친을 합한 총 12계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정결과는 Table 6과 같다.

BC_5F_1 세대에서도 지상부와 뿌리의 발병도는 앞세대와 같은 경향을 보였다. 그리고 반복친인 '칠성초'와 '수비초'를 5회 여교배하였기 때문에 96% 이상 반복친의 형질이 회복되어, 과형을 비롯한 원예적 형질이 반복친을 거의 닮은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1, 2).

Table 3. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents and BC_2F_1 population for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines in 1997.

Population	No. of plants tested	Freq. at stem rot index[Z]				Mean stem rot index
		1	2	3	4	
(Chilsung★3/AC2258)-B	135	74	24	23	14	1.83
(Chilsung★2/SCM334)	184	123	10	24	27	1.76
(Subi★2/AC2258)	37	16		4	17	2.59
(Chilsung★2/AC2258)-B-B	163	144	7	4	8	1.24
(Chilsung★1/SCM334)-B	180	150	5	16	9	1.36
(Subi★1/AC2258)-B	101	84	4	5	8	1.38
F_3(Subi×AC2258)	173	159	3	4	7	1.18
F_3(Subitak×AC2258)	174	151	6	5	12	1.30
Chilsung-1 (KC201-1)	8				8	4.00
Subi-1 (KC202-1)	8				8	4.00
KC217-2-1 (Bonghwa)	8				8	4.00
PI201234 (B14-2-2-3)	16	16				1.00
AC2258 (KC263)	32	31			1	1.09
SCM334 (KC294)	31	31				1.00

Z 1=No disease symptom observed; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4=dried and dead.

Table 4. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents and BC3F1 population for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines in 1997.

Population	No. of plants tested	Freq. at stem rot index Z				Mean stem rot index	Freq. at root rot index Y					Mean root rot index
		1	2	3	4		1	2	3	4	5	
(Chilsung★4/AC2258)-B	136	55	7	4	70	2.65	33	21	6	3	73	3.46
(Chilsung★3/SCM334)	149	67	9	7	66	2.48	52	17	5	2	73	3.18
(Subi★3/AC2258)	183	77	4	9	93	2.64	25	35	13	12	98	3.67
(Chilsung★3/AC2258)-B-B	125	94	5	2	24	1.65	65	25	6	4	25	2.19
(Chilsung★2/SCM334)-B	187	148	9	3	27	1.51	112	33	10	5	27	1.94
(Subi★2/AC2258)-B	141	106	11	6	18	1.55	54	42	13	9	23	2.33
F1(Subi-1×SCM334)	16	14	2			1.13	7	8	1			1.63
Chilsung-1 (KC201-1)	8				8	4.00					8	5.00
Subi-1 (KC202-1)	8				8	4.00					8	5.00
KC217-2-1 (Bonghwa)	8				8	4.00					8	5.00
PI201234 (B14-2-2-3)	16	16				1.00	15	1				1.06
AC2258 (KC263)	12	12				1.00	12					1.00
SCM334 (KC294)	16	16				1.00	16					1.00
KC268	13	13				1.00	2	11				1.85
KC358-1	16	16				1.00	6	10				1.63
KC358-2	15	15	1			1.06	13	3				1.19

Z 1=No disease symptom observed; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4=dried and dead.
Y 1=No root rot observed; 2=about 25% root rot; 3=about 50% root rot; 4=about 75% root rot; 5=completely root rot.

Table 5. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents and BC_4F_1 population for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines in 1998.

Population	No. of plants tested	Freq. at stem rot index^Z				Mean stem rot index	Freq. at root rot index^Y					Mean root rot index
		1	2	3	4		1	2	3	4	5	
(Chilsung★5/AC2258)-B	112	59	8	23	22	2.07	25	31	1	5	50	3.21
(Chilsung★4/SCM334)	144	78	19	24	23	1.94	41	32	9	8	54	3.02
(Subi★4/AC2258)	87	46	7	15	19	2.08	12	25	7	3	40	3.39
(Subi★1/SCM334)	75	66	2	7		1.21	25	35	3	5	7	2.12
(Chilsung★4/AC2258)-B-B	168	149	3	12	4	1.23	102	42	6	8	10	1.70
(Chilsung★3/SCM334)-B	141	99	7	22	13	1.64	60	34	11	4	32	2.39
(Subi★3/AC2258)-B	124	109	3	9	3	1.24	53	32	14	4	21	2.26
F_2(Subi-1×SCM334)	151	141	6	1	3	1.11	83	57	4	2	5	1.60
Chilsung-1 (KC201-1)	8			1	7	3.88					8	5.00
Subi-1 (KC202-1)	8		1		7	3.75					8	5.00
AC2258 (KC263)	4	4				1.00	2	1	1			1.75
SCM334 (KC294)	16	16				1.00	16					1.00

Z 1=No disease symptom observed; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4=dried and dead.

Y 1=No root rot observed; 2=about 25% root rot; 3=about 50% root rot; 4=about 75% root rot; 5=complete root rot.

Table 6. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents and BC5F1 population for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines in 1999.

Population	No. of plants tested	Freq. at stem rot index[Z]				Mean stem rot index	Freq. at root rot index[Y]					Mean root rot index
		1	2	3	4		1	2	3	4	5	
(Chilsung★6/AC2258)-B	271	166	98	2	5	1.43	86	144	25	11	5	1.91
(Chilsung★5/SCM334)	253	129	94	13	17	1.68	59	104	45	24	21	2.38
(Subi★5/AC2258)	240	135	64	23	18	1.68	30	121	41	22	26	2.55
(Subi★2/SCM334)	192	118	60	9	5	1.48	37	90	33	19	13	2.14
(Chilsung★5/AC2258)-B-B	143	114	18	3	8	1.34	19	92	20	3	9	2.24
(Chilsung★4/SCM334)-B	159	126	23	7	3	1.29	41	88	15	11	4	2.05
(Subi★4/AC2258)-B	168	82	52	11	23	1.85	12	77	39	15	25	2.79
(Subi-1★1/SCM334)-B	172	104	65		3	1.43	17	121	28	3	3	2.15
Chilsung-1 (KC201-1)	8		1	2	5	3.50		1	2		5	4.13
Subi-1 (KC202-1)	8		6		2	2.50		2	2	2	2	3.50
A2258	3	3				1.00	3					1.00
SCM334	20	20				1.00	10	7	1	2		1.75

Z 1=No disease symptom observed; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4=dried and dead.

Y 1=No root rot observed; 2=about 25% root rot; 3=about 50% root rot; 4=about 75% root rot; 5 = complete root rot.

Fig. 1. Comparison of fruit shape between BC5 for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines and 'Chilsung'. up left. (Chilsung★6/AC2258)-B; up right. (Chilsung★5/SCM334); low.'Chilsung'.

Fig. 2. Comparison of fruit shape between BC5 for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines and 'Subi'. left. (Subi★5/AC2258); right, 'Subi'.

바) BC_5F_2 **세대의 저항성 검정과 선발**

(**칠성초★**6/AC2258)-B-B 55**계통**, (**칠성초★**5/SCM334)-B 51**계통**, (**수비초★**5/AC2258)-B 45**계통 및 양친을 포함하여 총** 155**계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정 결과는** Table 7, 8, 9**와 같다. 지상부와 뿌리의 발병도, 바이러스 감염여부, 그리고 생육상태 등을 고려하여**, (**칠성초★**6/AC2258)-B-B 30**계통**, (**칠성초★**

5/SCM334)-B 30계통, (수비초★5/AC2258)-B 21계통 등 81계통을 선발하고, 선발된 계통에서 총 168개체를 선발하여 자식종자를 채종하였다(BC_5F_3). 이들 선발 계통은 계속 선발과 고정을 진행하여 영양을 중심으로 한 경북지역의 특화품종으로 육성하고자 한다.

사) BC_6F_1세대의 저항성 검정과 선발

(칠성초★7/AC2258)-B, (칠성초★6/SCM334), (수비초★6/AC2258), (수비초★3/SCM334) 4계통, 그리고 양친을 합하여 총 8계통의 고추 역병에 대한 저항성 검정 결과는 Table 10과 같다. 앞 세대인 BC_5F_1보다 발병도가 전반적으로 높게 나왔지만 지상부와 뿌리가 건전한 저항성 개체의 선발이 가능하였다. 이제까지의 실험에서는 병원균을 줄기 밑동에 부어 주는 방법(drenching method)을 사용해 왔다. 그러나 최근에는 뿌리와 잎줄기의 저항성 성분이 다르다는 보고가 있어서(Fernadez and Liddell, 1998; Walker and Bosland, 1999)이에 대한 검토가 필요하다. 1994-95년도에 걸쳐서 PI201234의 저항성을 수비초와 풍각초에 도입하여 육성한 계통을 영양 수비와 청도 풍각 현지에 재배하여 시험한 적이 있는데 본 연구에서와 같이 관주법으로 접종하여 선발한 육성계통은 포장에서도 저항성으로 나타나 관주법으로 접종하여 검정하여도 문제가 없을 것으로 생각된다. 그러나 저항성 계통에서도 과실부분이 병에 걸리는 경우가 관찰되어 이의 정밀 검토가 필요할 것으로 생각된다.

Table 7. Resistance to *Phytophthora capsici* of BCϵF2 of the cross Chilsung × AC2258 for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines in 1999.

Lines	Freq. at stem rot indexZ				Mean stem rot index	Freq. at root rot indexY					Mean root rot index	
	1	2	3	4		1	2	3	4	5		
(Chilsung★6/AC2258)- B- B												
1	11	1		3	1.67	12				3	1.80	S
2	13			3	1.56	9	2	2		3	2.13	
3	12				1.00	11			1		1.25	S
4	9			6	2.20	7	1	1		6	2.80	
5	11			4	1.80	11				4	2.07	S
6	11			5	2.25	11				5	2.25	
7	10	1		5	2.00	10			2	4	2.38	
9	10			2	1.50	9	1			2	1.75	S
12	10			2	1.50	10				2	1.67	S
15	13		1	2	1.50	12	1	1		2	1.69	S
20	6		2	4	2.33	6	1	1		4	2.58	
21	6	1		1	1.50	7			1		1.38	S
23	9			1	1.30	8	1			1	1.50	S
26	6				1.00	6					1.00	S
27	9	1			1.10	9	1				1.10	S
29	14	1		1	1.25	14		1		1	1.38	S
30	11			5	1.94	10	1			5	2.31	
31	10	1		4	1.87	10	1			4	2.13	S
32	8		1	3	1.92	8			1	3	2.25	
33	4			3	2.29	4			1	2	2.57	
34	9	2		1	1.42	9	2			1	1.50	S
35	7			3	1.90	6		1		3	2.40	
36	11			5	1.94	11				5	2.25	
37	7			1	1.38	7				1	1.50	S
39	5			2	1.86	5				2	2.14	S
40	9		1	1	1.45	6	1	3	1		1.91	
42	9		1	1	1.45	9		1		1	1.55	S
45	10			1	1.27	9			1	1	1.64	S
47	2			1	2.00	2				1	2.33	
48	5				1.00	3	1	1			1.60	

(continued)

Lines	Freq. at stem rot indexZ				Mean stem rot index	Freq. at root rot indexY					Mean root rot index	
	1	2	3	4		1	2	3	4	5		
					(Chilsung★6/AC2258)-B-B							
51	8	1		3	1.83	6	3			3	2.25	
52	12	1		3	1.63	12	1			3	1.81	SX
53	10			6	2.13	8	1	1		6	2.69	
55	7			1	1.38	3	2	2		1	2.25	
57	4			2	2.00	2	1	1		2	2.83	
58	2			2	2.50	2				2	3.00	
59	2				1.00	2					1.00	
61	6			2	1.75	6				2	2.00	S
63	8	1		2	1.64	5	4			2	2.09	
67	6			2	1.75	4	1	1		2	2.38	
68	6			2	1.75	4	2			2	2.25	
72	10		2	1	1.54	10		1	1	1	1.69	S
75	12	1		3	1.63	13				3	1.75	S
76	15			1	1.19	15				1	1.25	S
77	14				1.00	11	3				1.21	S
78	14			2	1.38	14				2	1.50	S
79	13			3	1.56	13				3	1.75	S
80	8				1.00	8					1.00	S
83	15			1	1.19	15				1	1.25	S
84	13			3	1.56	13				3	1.75	S
86	12			4	1.75	8	2	1	2	3	2.38	
89	12		1	3	1.69	11	2		2	1	1.75	S
90	14			2	1.38	12		1	2	1	1.75	S
Chilsung-1			1	6	3.86					7	5.00	
Subi-1				9	4.00					9	5.00	
AC2258	7				1.00	7					1.00	
SCM334	4				1.00	4					1.00	

Z 1=No symptom; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4= dead.
Y 1=No root rot; 2=about 25% root rot; 3=about 50% ; 4=about 75%; 5=complete
X S=Selected.

Table 8. Resistance to *Phytophthora capsici* of BC5F2 of the cross Chilsung× SCM334 for breeding Phytophthora blight resistant NILs IN 1999.

Lines	Freq. at stem rot indexZ				Mean stem rot index	Freq. at root rot indexY					Mean root rot index	
	1	2	3	4		1	2	3	4	5		
					(Chilsung★5/SCM334)-B							
1	15	1			1.06	14		2			1.25	SX
3	13			3	1.56	13				3	1.75	S
8	7			1	1.38	7				1	1.50	S
9	10			4	1.86	10				4	2.14	S
11	9	1	1	5	2.13	10		1		5	2.38	
13	10		1	3	1.79	8	1	1	1	3	2.29	
14	7			4	2.09	6	1			4	2.55	
15	12			3	1.60	7	4	1		3	2.20	
16	10			6	2.13	5	2	2	1	6	3.06	
18	14			2	1.38	13	1			2	1.56	S
20	5				1.00	3	1	1			1.60	S
21	6			2	1.75	6			1	1	1.88	S
24	8			4	2.00	7	1			4	2.42	
25	4			3	2.29	2	2			3	3.00	
26	12			2	1.43	12				2	1.57	
30	9			7	2.31	9				7	2.75	
33	14		1	1	1.31	14		1		1	1.38	S
34	15			1	1.19	15				1	1.25	S
36	2	1		13	3.50		1	2		13	4.56	
37	14			2	1.38	12		2		2	1.75	S
38	14			2	1.38	14				2	1.50	S
39	11		1	4	1.88	11			1	4	2.19	
41	5		1	2	2.00	5			1	2	2.38	
42	13			3	1.56	13				3	1.75	S
44	9	1		6	2.19	9	1			6	2.56	
45	5			1	1.50	5				1	1.67	S
46	7				1.00	7					1.00	S
47	11				1.00	10				1	1.36	S
48	3				1.00	3					1.00	S
49	4			2	2.00	4				2	2.33	S
50	8				1.00	7	1				1.13	S

(continued)

Lines	Freq. at stem rot index[Z]				Mean stem rot index	Freq. at root rot index[Y]					Mean root rot index	
	1	2	3	4		1	2	3	4	5		
					(Chilsung★5/SCM334)-B							
51	7			1	1.38	7				1	1.50	S[X]
52	8				1.00	8					1.00	
54	10			1	1.27	10				1	1.36	S
56	6				1.00	6					1.00	S
58	6			2	1.75	5	1			2	2.13	S
59	11			4	1.80	11				4	2.07	S
60	9	1		6	2.19	9	1			6	2.56	
61	4		1	7	2.92		2	2	1	7	4.08	
62	9			1	1.30	6	1	2		1	1.90	
66	6			2	1.75	6				2	2.00	S
67	12			2	1.43	12				2	1.57	S
68	8	1		6	2.27	9				6	2.60	
69	8			4	2.00	8				4	2.33	S
70	15			1	1.19	15				1	1.25	S
71	12			4	1.75	12				4	2.00	S
72	9	1		6	2.19	7	1	1	1	6	2.88	
74	12			4	1.75	10			2	4	2.38	
75	8				1.00	8					1.00	S
77	5			3	2.13	5				3	2.50	
78	14			1	1.20	14				1	1.57	S
Chilsung-1			1	6	3.86					7	5.00	
Subi-1				9	4.00					9	5.00	
AC2258	7				1.00	7					1.00	
SCM334	4				1.00	4					1.00	

Z 1=No symptom; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4= dead.
Y 1=No root rot; 2=about 25% root rot; 3=about 50% ; 4=about 75%; 5=complete
X S=Selected.

Table 9. Resistance to *Phytophthora capsici* of BC_5F_2 of the cross Subi× AC2258 for breeding Phytophthora blight resistant NILs in 1999.

Lines	Freq. at stem rot index[Z]				Mean stem rot index	Freq. at root rot index[Y]					Mean root rot index	
	1	2	3	4		1	2	3	4	5		
					(Subi★5/AC2258)- B							
2	2			1	2.00	1	1			1	2.67	
4	11			1	1.25	10	1			1	1.42	SX
6	11	2		3	1.69	9	2	1	1	3	2.19	
7	11	1		4	1.81	11	1			4	2.06	S
8	11	1		3	1.67	10	2			3	1.93	S
9	11			4	1.80	11				4	2.07	S
10	12			4	1.75	10		1	1	4	2.31	
13	8				1.00	6		1	1		1.63	S
17	11			5	1.94	11				5	2.25	
18	16				1.00	14	1	1			1.19	S
19	8			4	2.00	7	1			4	2.42	
20	10	1		1	1.33	11				1	1.33	S
22	9	1		1	1.36	10				1	1.36	S
23	15		1		1.13	10	2	3	1		1.69	
24	5				1.00	5					1.00	S
25	11	1			1.08	10	1		1		1.33	
26	4				1.00	4					1.00	S
27	11				1.00	11					1.00	S
30	1			1	2.50	1				1	3.00	
31	4			2	2.00	4				2	2.33	S
32	6			1	1.43	5			1	1	2.00	S
36	2			3	2.80	1	1		1	2	3.40	
38	1				1.00	1					1.00	
39	5	1		1	1.57	4		2		1	2.14	
41	7				1.00	6	1				1.14	S
42	13			2	1.40	13				2	1.53	
43	16				1.00	16					1.00	
44	6				1.00	4		1	1		1.83	S
46	3				1.00	3					1.00	
47	4				1.00	3		1			1.50	
50	8				1.00	7	1				1.13	S

(continued)

Lines	Freq. at stem rot indexZ				Mean stem rot index	Freq. at root rot indexY					Mean root rot index	
	1	2	3	4		1	2	3	4	5		
					(Subi★5/AC2258)-B							
52	7			5	2.25	6			1	5	2.92	
53	4	3		1	1.75	6	1			1	1.63	SX
56	9			1	1.30	9				1	1.40	S
57	9				1.00	8	1				1.11	S
59	9			7	2.31	1	2	6		7	3.63	
61	9			3	1.75	4	3	1	2	2	2.58	
62	8	1		3	1.83	5	3	1		3	2.42	
63	7				1.00	7					1.00	S
64	7			4	2.09	3	2	2		4	3.00	
67	6		1	1	1.63	3	1	3		1	2.00	
68	11	1		3	1.67	9	2		3	1	2.00	
70	8	1		2	1.64	8		2	1		1.64	S
71	8			8	2.50	6	2	2		6	2.88	
Chilsung1			1	6	3.86					7	5.00	
Subi-1				9	4.00					9	5.00	
AC2258	7				1.00	7					1.00	
SCM334	4				1.00	4					1.00	

Z 1=No symptom; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4= dead.
Y 1=No root rot observed; 2=about 25% rot; 3=about 50%; 4=about 75% ;5=complete
XS=Selected.

Table 10. Resistance to *Phytophthora capsici* of parents and BCƐF1 population for breeding Phytophthora blight resistant near-isogenic lines in 2000.

Population	No. of plants tested	Freq. at stem rot index[Z]				Mean stem rot index	Freq. at root rot index[Y]					Mean root rot index
		1	2	3	4		1	2	3	4	5	
(Chilsung★7/AC2258)-B	139	58	13	13	55	2.47	31	32	2	1	73	3.38
(Chilsung★6/SCM334)	160	62	28	22	48	2.35	60	17	3	1	79	3.14
(Subi★6/AC2258)	156	57	30	4	65	2.49	33	37	6	3	77	3.35
(Subi★3/SCM334)	160	91	14	6	49	2.08	80	14	5	1	60	2.67
Chilsung-1 (KC201-1)	12			3	9	3.75					12	5.00
Subi-1 (KC202-1)	12				12	4.00					12	5.00
AC2258 (KC263)	16	16				1.00	16					1.00
SCM334 (KC294)	16	16				1.00	12	4				1.25

Z 1=No disease symptom observed; 2=necrotic lesion on stem but still surviving; 3=wilting; 4=dried and dead.

Y 1=No root rot observed; 2=about 25% root rot; 3=about 50% root rot; 4=about 75% root rot;5=complete roo trot .

Reference

Alcantara, T. P. and Bosland, P. W. 1994. An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. HortScience 29(10):1182-1183.

Barksdale, T. H., Papavizas, G. S., and Johnston, S. A. 1984. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Plant

Disease 68(6):506-509.

Bartual, R., Carbonell, E. A., Marsal, J. I., Tello, J. C., and Campos, T. 1991. Gene action in the resistance of peppers (*Capsicum annuum*) to phytophthora stem blight (*Phythphthora capsici* L.). Euphytica 54:195-200.

Bartual, R., Lacasa, A., Marsal, J. I., and Tello, J. C. 1994. Epistasis in the resistance of pepper to phytophthora stem blight(*Phytophthora capsici* L.) and its significance in the prediction of double cross performances. Euphytica 72:149-152.

Bosland, P. W. and Lindsey, D. L. 1991. A seedling screen for phytophthora root rot of pepper, *Capsicum annuum*. Plant Disease 75(10):1048-1050.

Fernández-Pavía, S. P. and Liddell, C. M. 1998. Lack of evidence for translation of resistance factors between roots and foliage of *Capsicum annuum* infected by *Phytophthora capsici*. Capsicum and Eggplant Newsletter, 17:66-68.

Gil Ortega, R., Palazón Español, C., and Cuartero Zueco, J. 1990. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper 'Line 29'. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 20:117-122.

Gil Ortega, R., Palazón Español, C., and Cuartero Zueco, J. 1991. Genetic of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breeding 107:50-55.

Gil Ortega, R., Palazón Español, C., and Cuartero Zueco, J. 1992. Genetic relationships among four pepper genotypes resistant to *Phytophthora capsici*. Plant Breeding 108:118-125.

Gil Ortega, R., Palazón Español, C., and Cuartero Zueco, J. 1995. Inheritance in the pepper-*Phytophthora capsici* system. Plant Breeding 114:74-77.

김병수. 1988. 고추 더뎅이병 저항성 계통과 역병 저항성 계통의 특성. 한원지 29(4):247-252.

김병수, 허종문. 1990. 고추에 있어서 더뎅이병과 역병 저항성의 유전에 관한 연구. 한원지 31(4):350-357.

2) 더뎅이병 저항성 NIL 육성

가) 더뎅이병 저항성 NIL 육성

① 교배친의 저항성 검정

더뎅이병 저항성 NIL 작성을 위한 재료와 이병성 친의 더뎅이병균 race 1과 race 3에 대한 저항성을 검정한 결과는 Table 1과 같다. Race 1에만 과민형반응을 나타내는 Bs3 유전자와 race에 비특이적으로 작용하는 양적저항성을 가지도록 선발육성한 25-11-3-2, 25-11-5-1, 26-7-4-2, 플로리다에서 과민반응형 저항성 유전자 Bs1과 Bs2를 보유한 Fla. XVR 3-25는 race 1과 race 3에 모두 과민형반응을 나타내었다. 이것은 Bs2유전자에 기인한다. Bs1, Bs2, Bs3를 보유하고 있는 것으로 알려진 ECW SR은 race 3에는 전형적인 과민형반응을 나타내지 않아 앞으로 보다 정밀한 검토가 요망된다. 세계적으로는 이미 Bs2유전자를 극복하는 race 4, 5, 6이 보고되어 있기 때문에 이의 검토가 필요하다. 우리 나라에는 race 2가 없기 때문에 Bs1 유전자의 효과는 사실상 조사할 수 없으며 단지 Bs2와 Bs3만 추적할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 과민반응형 저항성 유전자는 육성

계통 혹은 PI271322에 들어있는 Bs3유전자와 ECW SR에 들어있는 Bs2유전자, 그리고 KC177-7-1에 들어있는 비과민반응형이며 양적유전을 하는 저항성을 역병 저항성 NIL 육성에 유전적 배경 품종으로 사용한 '칠성초'에 여교잡법으로 도입하여 더뎅이병 저항성 NIL로 육성하고자 한다.

② F1 및 BC1의 저항성 검정

칠성초를 공통 이병성 친으로 하고 여기에 PI163192, XVR3-25, ECW SR, 저항성 육성계통 25-11- 계통을 교배하여 얻은 F1의 더뎅이병균 race 1과 race 3에 대한 반응을 조사한 결과는 Table 2와 같다. KC177-7-1은 race 1과 race 3에 모두 비과민형이지만 접종부위의 병반의 진전이 없어 일반 저항성으로 확인되었다. XVR 3-25는 Bs2유전자를 동형으로 가지고 있어서 race 1과 race 3에 모두 저항성으로 기대되었으나 이병성 개체가 관찰되어 앞세대의 채종단계에서 자연교잡이 일어난 것으로 추정된다. 그러나 Bs2유전자를 가진 재료이기 때문에 실험에 계속 끌고 가야할 것으로 생각된다. ECW SR은 Bs1, Bs2와 Bs3유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 본 실험에서도 race 1과 race 3에 균일하게 HR(과민형반응)로 나타났다. Bs3유전자를 도입하여 육성한 계통 25-11-계통 및 26-7-4-2은 균일하게 race 1에만 저항성 반응을 나타내었다. F1에서는 KC177조합에서는 모두 비과민형이었으며 XVR 3-25조합에서는 race 1과 race 3에 과민형인 개체와 비과민형인 개체로 분리하였다. 그러나 ECW SR조합은 균일하게 race 1과 3에 모두 과민형으로 나타났다. 25-11-조합은 모두 race 1에는 과민형, race 3에는 비과민형으로 나타났다.

BC1F1과 F2집단의 race 1과 race 3에 대한 반응을 조사한 결과는 Table 3과 같다. XVR 3-25조합의 BC1F1에서는 race 1과 race 3에 공히 과민형과 비과민형이 1:1의 분리비에 맞게 분리하였다. ECW SR조합의 BC1F1에서는 race 1에는 3:1, race 3에는 1:1 기대분리비에 맞게 분리하였다. 25-11-조합의 경우는 race 1에는

1:1, race 3에는 모두 비과민형으로 나타났다. F2에서도 XVR 3-25조합에서는 race 1과 race 3에 공히 3:1, ECW SR조합에서는 race 1에는 15:1로 기대분리비에 맞게 분리하였다. 그러나 race 3에는 반응을 읽기가 매우 힘들었으며 기대되는 3:1의 분리비에 맞지 않았다. 다음 세대에는 보다 정밀한 접종과 관찰이 필요할 것으로 생각되었다.

③ BC2 세대의 저항성 검정

칠성초에 XVR3-25, ECW SR, 25-11-3-2, 25-11-5-1을 교배하여 육성한 BC2F1집단의 더뎅이병균 race 1과 race 3에 대한 반응은 Table 4에 제시하였다. XVR 3-25와 ECW SR에는 Bs1유전자가 있으나 BS1유전자는 우리나라에 없는 race 2에만 HR을 나타내기 때문에 그 존재를 검정할 수 없는 실정이다. BS2유전자는 race 1, 2, 3에 HR을 나타내므로 그 행동을 국내의 race 1과 race 3를 접종하여 추적할 수 있다. 따라서 XVR 3-25이 들어간 조합의 경우는 BC2F1세대에서 race 1과 race 3에 모두 HR과 비과민형, 즉 NHR(non-hypersensitive)가 1:1 비율로 나타날 것으로 기대되며 관찰결과도 맞게 나왔다. ECW SR의 경우는 BS2와 BS3가 작용하므로 race 1에는 HR가 NHR보다 다소 많을 것으로 기대되는데 그렇게 나왔으며, race 3에는 HR과 S가 1:1로 분리할 것으로 기대되며 관찰결과도 그렇게 나왔다. BS3유전자를 가진 25-11-3-2와 25-11-5-1이 저항성 친으로 들어간 조합에서는 race 1에 대하여는 HR과 NHR이 1:1로 분리하고 race 3에는 모두 비과민형(NHR, 즉 이병성)으로 나올 것으로 기대되며 실제 관찰에서도 그렇게 나왔다.

칠성초 × PI163192조합의 더뎅이병 저항성 검정결과는 Table 5과 같다. BC2F1에서 저항성 친과 같은 수준의 저항성 개체는 발견되지 않았으나 건조하고 억제된 병반이 형성되는 개체의 선발이 가능하였다. 더뎅이병 저항성과 바이러스 감염정도 등을 고려하여 우량개체를 골라 교배모본으로 하였다. 과민형 개체 중에

서 반응이 선명하고 바이러스 등에 걸린 징후가 보이지 않는 개체를 골라 채종 모본으로 선발하였다.

④ BC3 세대의 저항성 검정

원래 반복친은 '칠성초'로 하고 저항성 재료는 과민반응형(HR) 저항성 유전자 Bs1과 Bs2를 가진 XVR 3-25, Bs1, Bs2, Bs3를 모두 가진 ECW SR, Bs3만 가진 25-11-3-2와 25-11-5-1를 일회친으로 하여 육성한 BC3F1세대의 유묘에 더뎅이 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) race 1을 접종하여 반응을 조사하였다 (Table 6), 칠성초 x XVR 3-25, 칠성초 x ECW SR, 칠성초 x 25-11-3-2, 칠성소 x 25-11-5-1 조합의 BC3F1에서 모두 과민형과 이병성이 1:1로 나타나 기대비율에 맞았다. XVR 3-25의 경우 Bs2에 더하여 Bs1을 가지고 있으나 Bs1 유전자와 작용하는 race 2가 없기 때문에 그 존재와 행동을 파악할 수 없는 상태이다. XVR 3-25과 이것이 저항성친으로 들어간 조합의 race 3에 대한 반응은 비교적 선명하게 나타났다. ECW SR은 Bs1, Bs2와 Bs3를 공유하고 있기 때문에 race 1 에는 HR이 다소 많을 것으로 예상되었는데 결과도 그렇게 나왔다. Race 3에 대한 반응을 조사하였으나 특히 ECW SR과 이것이 저항성친으로 들어간 조합의 식물들이 접종에 대한 반응이 불분명하여 일단 race 1과민형으로 나타난 개체들을 선발하여 채종재배용 화분에 옮겨 심은 다음 재접종하여 불확실한 개체를 도태하였다. 따라서 결과에는 나타내지 않았다.

⑤ BC4 세대의 저항성 검정

칠성초 x XVR 3-25와 칠성초 x ECW 3-25 조합의 BC4F1집단에서는 race 1과 race 2에 대하여 HR과 NHR이 1:1로 분리하였다(Table 7). 칠성초 x ECW 3-25조합의 경우는 race 1에 대하여는 Bs1과 Bs3가 분리할 수 있으나 여교잡세대를 경과하면서 Bs3유전자는 상실되었을 가능성이 있다. 그래서 1:1에 맞게 분

리하는 것으로 보인다. 칠성초 x 25-11-계통 조합에서는 기대와 같이 race 1에는 HR과 NHR이 1:1, race 3에는 모두 이병성으로 나타났다. 선발개체에 대하여 여교잡을 실시하여 BC_5F_1 종자를 채종하였다. 그 결과는 Table 9와 같다.
칠성초 x PI163192 조합의 BC_3F_2집단을 검정하여 저항성 개체를 선발하였으며 (Table 8), 선발개체에 대하여 여교잡을 실시하여 다음 세대의 종자를 채종하였다(Table 9).

Table 1. Reaction to race 1 and race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* of breeding lines and resistance gene sources

Line	HR gene contained	Reaction, frequency to				Remarks
		Race 1		Race 3		
		HR	NHR	HR	NHR	
25-11-3-2	Bs3	16			16	Bred for Bs3 gene, quantitative resistance
25-11-5-1	Bs3	16			16	"
XVR 3-25	Bs1, Bs2	12		12		"
ECW SR	Bs1,Bs2,Bs3	16		16		HR to both race 1 & 3
PI163192 (177-7-1)			16		16	Quantitatively resistant to race 1, 3
Chilsung						Susceptible to race 1, 3

Table 2. Reaction of parents and F1 hybrids between Chilsung and bacterial spot resistant lines

Population	No. of plants tested	Reaction frequency to			
		Race 1		Race 3	
		HR	NHR	HR	NHR
F1 Generation					
F1(Chilsung-1×PI163192)	16		16		16
F1(Chilsung-1×XVR 3-25)	15	5	10	5	10
F1(Chilsung-1×ECW SR)	16	16		16	
F1(Chilsung-1×25-11-3-2)	16	16			16
F1(Chilsung-1×25-11-5-1)	12	12			12
F1(Chilsung-2×PI163192)	16		16		16
F1(Chilsung-2×XVR 3-25)	4	2	2	2	2
F1(Chilsung-2×25-11-5-1)	16	16			16
Parent					
Chilsung-1(KC201-1)	16		16		16
Chilsung-2(KC201-2)	16		16		16
PI163192 (KC177-7-1)	16		16		16
XVR 3-25 (KC297), (Bs1,2)	8	7	1	7	1
ECW SR (KC298), (Bs1,2,3)	16	16		16	
25-11-3-2 (Bs3)	16	16			14
25-11-5-1 (Bs3)	16	16			16
26-7-4-2 (Bs3)	16	13			15

Table 3. Reaction to race 1, 3 of parents, BC1F1, and F2 between Chilsung and bacterial spot resistant lines

Population	No. of plants tested	Reaction frequency to			
		Race 1		Race 3	
		HR	NHR	HR	NHR
Backcross					
Chilsung★1 × XVR 3-25	88	39	49	39	49
Chilsung★1 × ECW SR	88	63	25	49	39
Chilsung★1 × 25-11-3-2	89/90	46	43		90
Chilsung★1 × 25-11-5-1	87/88	53	34		88
F2 Generation					
F2(Chilsung×XVR 3-25)	80	65	15	65	15
F2(Chilsung×ECW SR)	122/119	102	20	53	66
F2(Chilsung×25-11-3-2)	119	91	28		119
F2(Chilsung×25-11-5-1)	85	58	27		85
Parent					
Chilsung-1			8		8
XVR 3-25 (KC297), (Bs1,2)	13	8	5	8	5
ECW SR (KC298), (Bs1,2,3)	16	16		16	
25-11-3-2 (Bs3)	16	16			16
25-11-5-1 (Bs3)	16	16			16

Table 4. Reaction to race 1 and 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* of BC_2F_1 of crosses between Chilsung and hypersensitively resistant lines

Population(HR genes)	No. of plants tested	Reaction frequancy to			
		Race 1		Race 3	
		HR	NHR	HR	NHR
Backcross					
Chilsung★2×XVR 3-25	160	70	90	70	90
Chilsung★2×ECW SR	125	71	54	59	66
Chilsung★2×25-11-3-2	128	72	56		128
Chilsung★2×25-11-5-1	136	63	73		136
Parent					
Chilsung(KC201-1)	16		16		16
XVR 3-25(KC297)(Bs1,2)	9	6	3		9
ECW SR (KC298)(Bs1,2,3)	8	8			8
25-11-3-2(Bs3)	16	16			16
25-11-5-1(Bs3)	16	16			16

Table 5. Disease reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* of BC_2F_1 of a cross between Chilsung and polygenically resistant KC177-71(PI163192)

Population	No. of plants tested	Freq. at disease index[z]				Mean disease index
		0	1	2	3	
Chilsung★2 × PI163192	149	10	61	78		1.46
Chilsung (KC201-1)	8			8		2.00
PI163192 (KC177-7-1)	12	12				0.00

z 0 = no visible spots; 1 = dry, arrested spots; 2 = water-soaked spots occupying 1/4 of maximum diseased leaf; 3 = water-soaked spots occupying more than 1/4 of max. diseased leaf.

Table 6. Resistance to race 1 of *X. campestris* pv. *vesicatoria* of BC3 generations

교배조합	조사 개체수	Race 1에 대한 반응	
		R	S
Backcross			
Chilsung★3 × XVR 3-25)	189	93	96
Chilsung★3 × ECW SR	187	97	90
Chilsung★3 × 25-11-3-2	172	81	91
Chilsung★3 × 25-11-5-1	192	105	87
Parent			
Chilsung-1 (칠성초)	19		19
KC177-7-1(PI163192, quantitative)	12		12
KC297 (XVR 3-25, Bs2)	16	8	8
KC298 (ECW SR, Bs1, Bs2, Bs3)	16	16	
25-11-3-2 (Bs3)	16	16	
25-11-5-1 (Bs3)	15	14	1

Table 7. Resistance to race 1 and 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* of BC_4F_1 populations of the crosses for NIL

Generation	No. of plants tested	Reaction to Race 1		Reaction to Race 3	
		HR	S	HR	S
Backcross					
Chilsung★4 × XVR 3-25	140	70	70	70	70
Chilsung★4 × ECW SR	128	70	58	68	60
Chilsung★4 × 25-11-3-2	52	23	29		52
Chilsung★4 × 25-11-5-1	174	78	96		174
Parent					
Chilsung-1-3 (칠성초)	12		12		12
-4	12		12		12
-5	12		12		12
-6	12		12		12
KC297-1 (XVR 3-25, Bs_2)	16	14	2	13	3
-4	16	14	2	11	5
KC298 (ECW SR, $Bs_{1,2,3}$)	16	16		16	
25-11-3-2 (BS_3)	16	16			16
25-11-5-1 (BS_3)	16	16		16	

Table 8. Segregation for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race 1 of BC_3F_2 population of the cross Chilsung x PI163192

Population	No. of plants tested	Freq. at stem rot index^Z					Mean stem rot index
		1	2	3	4	5	
F_2(Chilsung★3 × PI163192)	169	1	34	55	75	4	3.28
PI163192	16	2	14				1.88

Table 9. Seeds for next generation in year 2000 for near-isogenic lines

Generation	Approximate amount of seed(grain)
Chilsung★5 × XVR 3-25) ①	100
③	50
④	50
⑤	100
Chilsung★5 × ECW SR ①	100
②	50
③	30
④	30
Chilsung★5 × 25-11-3-2 ①	50
⑤	50
Chilsung★5 × 25-11-5-1 ①	50
②	30
③	50
④	30
⑤	20
F_2(Chilsung★4 × XVR 3-25) ①	30
②	30
③	30
④	30
⑤	30
F_2(Chilsung★4 × ECW SR) ①	20
②	50
③	50
④	50
⑤	30
F_2(Chilsung★4 × 25-11-3-2) ①	100
②	50
③	50
④	100
⑤	50
F_2(Chilsung★4 × 25-11-5-1) ①	20
②	30
③	30
④	30

(continued)

Generation	Amount of seed
F2(Chilsung★4 × PI163192)- 1	10
- 3	50
- 4	100
- 6	30
- 7	30
- 9	100
- 11	50
- 13	50
- 14	30
- 15	50
- 16	30
- 18	50
- 19	30
F3(Chilsung★3 × PI163192) - 1	30
- 2	30
- 3	100
- 4	150
- 5	30
- 6	30
- 7	30
- 8	30
- 9	30
- 10	20
- 11	50
- 12	50
- 14	30
- 15	50
- 16	30
- 17	20
- 18	50
- 19	50

(continued)

Generation	Amount of seed
XVR 3-25-1-1	30
-2	30
-5	50
-4-1	50
-2	100
-3	50
-4	50
-5	30
25-11-5-1-1	30
-2	50
-3	50
-4	50
25-11-3-2-1	50
-3	20
-4	50
PI163192-1	20
-2	20
Chilsung-1-4-1	100
-2	50
-3	50
-4	50
Chilsung-1-5-1	50
-2	50
-3	30
-4	100
Chilsung-1-6-1	50
-2	20
-3	50
-4	50

나) 국내 더뎅이병균의 race 분화조사

고추을 침해하는 더뎅이병균에는 세계적으로 race 1부터 race 6까지 분류가 가능한 것으로 알려져 있다(Bouzar et al., 1994; Buonaurio, 1994; Cook and Stall, 1969, 1982; Kousik and Ritchie, 1995; Minsavage et al., 1990; Sahin and Miller, 1995, 1996). 국내에는 아직까지 race 1과 race 3만 있는 것으로 보고된 바(Kim et al., 1990, Pae et al., 1994) 있으나 최근의 조사자료가 없어서 경기, 충북, 강원, 경북 지역에서 수집한 33개균주(Table 10)에 대하여 race판별을 한 결과 아직까지 race 1과 race 3외에 다른 race는 분포되지 않은 것으로 나타났다(Table 11). Sahin and Miller (1998)는 *Capsicum pubescens*인 PI235047에 과민형반응 유발 유무에 따라 race 1에서 race 7을, 그리고 race 3에서 race 8을 분리할 수 있다고 하였다. 따라서 국내에 race 7, 8의 분화유무를 검정하고 KC298의 race 3에 분분명한 반응을 구명하는 것이 필요하게 되었다.

Table 10. Isolates of bacterial spot pathogen used for pathotype identification

Isolate	Location of collection
1	Myungho Bonghwa,, Kyungpook
2	Youngwol, Kanwon
4	Sami Chungju, Chungbuk
5	Socheon Bonghwa. Kyungpook
6	Kakum Chungju, Chungbuk
7	Socheon Bonghwa, Kyungpook
8	Siji Taegu
9	Yongcheon, Kyungpook
10	Kuryopo, Kyungpook
11	Youngyang Pepper Exp. Sta., Youngyang, Kyungpook
12	Ansan 2 Ri, Punggak, Cheongdo, Kyungpook
13	Hwabuk Youngcheon, Kyungpook
14	Omseong, Chungbuk
16	Ipseok Andong,Kyungpook
17	Bonghwa, Kyungpook
18	Ds 1 received from B. K. Hwang
19	Daeseong 1 Ri Ubo Kunwi, Kyungpook
20	Kumseong Ueseong, Kyungpook
21	Kumgok Hamchang Sangju, Kyungpook
22	Exp. Farm, KNU, Sankyuk Buk-Ku Taegu ④
23	Exp. Farm, KNU, Sankyuk Buk-Ku Taegu ③
24	Exp. Farm, KNU, Sankyuk Buk-Ku Taegu ②
26	Ky 1 (received from B. K. Hwang)
27	Yd 1 (received from B. K. Hwang)
28	Kc 2 (received from B. K. Hwang)
29	Youngyang Pepper Exp. Sta., Youngyang, Kyungpook
30	Keil Kumseong Ueseong, Kyungpook
31	Exp. Farm, KNU, Sankyuk Buk-Ku Taegu
32	Kwandeok 2Ri Danchon Ueseong, Kyungpook ①
33	Kwandeok 2Ri Danchon Ueseong, Kyungpook ②
34	Kwandeok 2Ri Danchon Ueseong, Kyungpook ⑤
35	Garden of Jangwon Mansion, Manchon, Taegu
36	Pyungtaek, Kyungki

Table 11. Reaction to differential cultivars of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* isolates collected in Korea

Isolate No.	Reaction[z] to differential cultivars							Race identification
	ECW	10R	20R	30R	25-11-5	26-7-4	KC298	
1	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3
2	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3
4	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3
5	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
6	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
7	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
8	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
9	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
10	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
11	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
12	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
13	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
15	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
16	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
17	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
18	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
19	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
20	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
21	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3
22	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
23	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
24	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
26	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3
27	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3
29	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
30	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
32	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
33	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
34	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
35	S	S	HR	HR	HR	HR	HR	race 1
36	S	S	HR	S	S	S	HR	race 3

[z]HR = hypersensitive reaction; S = susceptible.

Reference

Bouzar, H., J.B. Jones, R.E. Stall, N.C. Hodge, G.V. Minsavage, A.A. Denedict, and A.M. Alvarez. 1994. Physiological chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. Phytopathology 84:663-671.

Buonaurio, R., V.M Stravato, and M. Scortichini. 1994. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L. in Italy. Plant Dis. 78:296-299.

Cook, A.A. and Y.G. Guevara. 1984. Hypersensitivity in *Capsicum chacoense* to race 1 of the bacterial spot pathogen of pepper. Plant Dis. 68:329-330.

Cook, A.A. and R.E. Stall. 1963. Inheritance of resistance in peppers to bacterial spot. Phytopathology 53:1060-1062.

Cook, A.A. and R.E. Stall. 1969. Differentiation of pathotypes among isolates of *Xanthomonas vesicatoria* pathogenic on pepper. Plant Dis. Rep. 53(8):617-619.

Cook, A.A. and R.E. Stall. 1982. Distribution of races of *Xanthomonas vesicatoria* pathogenic on pepper. Plant Dis. 66:388-389.

Hibberd, A.M., M.J. Bassett, and R.E. Stall. 1987a. Allelism test for three dominant genes for hypersensitive resistance to bacterial spot of pepper. *Phytopathology* 77:1304-1307.

Hibberd, A.M., R.E. Stall, and M.J. Bassett. 1987b. Different pathotypes associated with incompatible races and resistance genes in bacterial spot disease of pepper. *Plant Dis.* 71:1075-1078.

Hibberd, A.M. and D. Gillespie. 1982. Heritability of field resistance to bacterial leaf spot disease in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Hortic*. 17:201-309.

Kim, B.S. 1983. Inheritance of resistance to bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge)Dye) in pepper. Ph. D. dissertation, University of Hawaii.

Kim, B-S. and R.W. Hartmann. 1985. Inheritance of a gene(*Bs3*) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge)Dye in pepper (*Capsicum annuum*). Plant Dis. 68:233-235.

Kim, B.S. 1988. Characteristics of Phytophthora blight and bacterial spot resistant lines of pepper. J. Korean Soc. Hort. Sci. 29(4):247-252.

Kim, B.S., Y.S. Kwon, and J.M. Hur. 1990. Differentiation and distribution of pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pathogenic on pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 6(2):245-249.

Kousik, C.S. and D.F. Ritchie. 1995. Isolation of pepper races 4 and 5 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from diseased peppers in southeastern U.S. fields. *Plant Dis*.79:540.

Minsavage, G.V., D. Dahlback, M.C. Whalen, B. Kearney, U. Bonas, B.J. Staskawicz, and R.E. Stall. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:41-47.

Pae, D.H., J.Y, Yoon, J.M. Lee. 1994. Pathotype districution of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper (*Capsicum annuum*) in Korea and cross protection between the pathotypes. J. Korean Soc. Hort. Sci. 35:126-130.

Poulos, J.M., F.J.B. Reifschneider, and W.R. Coffmann, 1991. Heritability and gain from selection for quantitative resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum* L. Euphytica 56:161-167.

Sahin, F. and S.A. Miller. 1995. First report of pepper race 6 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Dis. 79:1188.

Sahin, F. and S.A. Miller. 1996. Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Dis. 80(7):773-778.

Sahin, F. and S.A. Miller. 1998. Resistance in Capsicum pubescens to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. Plant Dis. 82:794-799..

Sowell, G. Jr. 1960. Bacterial spot resistance in introduced peppers. *Plant Dis. Rep*. 44(7):587-590.

Sowell, G. Jr. and A.H. Dempsey. 1977. Additional sources of resistance to bacterial spot of pepper. *Plant Dis. Rep*. 61(8):684-686.

제 4 장 고추의 이수체 생성 및 핵형 분석

본 연구는 4차년도 까지 강원대 김남수 교수에 의해 수행되었고 마지막 5차년도에는 서울대 김병동 교수에 의해 수행되었음,. 고추에서 FISH 방법개발, 핵형분석 및 이수체 생성에 관한 연구는 강원대 김남수 교수에 의해 수행되었고, 이수체를 이용한 연관지도 동정은 김병동 교수에 의해 수행되었음.

제1절 서설

고추의 염색체는 남서부 아메리카 산인 *Capsicum. ciliatum*이나 남부 브라질의 야생종에서는 염색체의 수가 x=13인 경우도 있지만, 다른 Solanaceae 종들과 같이 대부분 2n=2x=24를 기본이며 모두 diploid이다. *C. annuum*은 1쌍의 acrocentric 염색체와 11쌍의 metacentric 또는 submetacentric 염색체도 되었다. 이 중 secondary constriction을 가지는 염색체가 있으며 따라서 가장 큰 염색체와 acrocentric 염색체, 3개의 염색체는 쉽게 눈으로 식별이 가능하다. 그러나 나머지 염색체는 크기, 모양, arm ratios 등으로 구별하기 어렵다. 최근 김남수 교수는 염색체의 크기와 rDNA의 loci 수에 따라 고추의 종들에 대해 karyotyping을 하였으나 c-banding의 어려움 등 여전히 비슷한 크기의 염색체를 쉽게 구별하기는 어렵다. 또한 각 염색체와 유전적 지도와의 상관관계는 rDNA가 있는 염색체를 제외하고 전혀 상호 관계가 이뤄지지 않고 있다. 식물에서 linkage group이나 유용 유전자들 위치 및 염색체와의 상호관계를 알아보기 위한 방법으로 이상 염색체 수를 가지는 primary trisomics, secondary trisomics, monosomics 등을 이용하고 있다. Monosomic의 경우 하나의 염색체를 잃어버림으로써 더 치명적이기 때문에 쉽게 죽지만 하나의 염색체가 추가로 존재하는 trisomics은 monosomics보다는 더 생육을 잘 하고 약간의

phenotype이 변형되므로 더 많이 이용되고 있다.

Triploid는 autotetraploid (♀)와 dilpoid (♂) 식물체를 교배하면 형성될 수 있으며 이것은 대부분 불임이다. 이 triploid를 selfing하거나 diploid와 backcrossing하여 나온 개체를 선발하여 trisomic을 만든다. Trisomics을 이용하여 linkage group을 만들 수도 있고 유전자를 특정 염색체에 지정할 수 있으며 형태학적 효과를 나타내는 각 염색체를 연구할 수도 있다. 또한 secondary trisomic을 이용하여 chromosome과 연관군과의 orientration (Singh, K. et al., 1996)을 알 수 있다. Trisomics은 후대에서 분리가 Mendelian ratio 형태로 이뤄지지 않기 때문에 후대를 조사하여 원하는 유전자의 염색체 상의 존재 여부를 알 수 있다. 또한 trisomics의 경우 같은 염색체가 3개 존재하므로 발현되는 유전자의 양이 더 많아진다. 이러한 heterozygous한 trisomics을 이용하여 isozyme loci (Hedges, B.R. et al., 1991, Oleo, M. et al., 1993, Sativic, Z.et al., 1996 and Torres, A.M. et al., 1995)나 DNA probe를 이용하여 mapping (Young, ND. et al., 1987)이 가능하다. Pochard(1970, 1977)는 3500개의 F2 개체로부터 phenotype, frequency, fertility, 염색체 형태등을 조사하여 65개의 primary trisomics을 동정하였다. Extra 염색체는 화분에 의해서 transmission 되지 않고 egg에 의해서 5-50% transmission 되는 것으로 보고하였다. Phenotypic 효과를 이용하여 조사한 결과 쉽게 눈으로 구별할 수 있는 오직 3개의 염색체만이 구별 가능하였다. 우리 나라에서 고추는 벼 다음으로 중요한 작물로 고품질의 고추품종의 개발을 위한 유용유전자를 찾기 위해 RFLP, AFLP등을 이용한 유전적 지도 작성 사업이 진행되고 있다. 본 연구실에서 진행중인 고추의 유전적 지도에서 15개의 연관군을 작성하였고 또한 BAC library도 작성 중에 있다. 그러나 염색체와 linkage group관의 상호 관계가 연구가 미흡하다. 본 연구에서는 최근 김남수 교수가 개발한 trisomics을 식물체를 이용하여 각 linkage group과 염색체와의 numbering뿐 아니라 15개의

linkage group 사이의 상호 관계를 규명하고자 한다.

제2절 재료 및 방법

1) 식물체 재료

식물체 재료는 강원대학교 김남수 교수로부터 분양받았다. 그림 1에서와 같이 김남수 교수는 *C. annuum* acc. *Bongwhcjare*의 사배체 식물을 성공적으로 육성하였으며 사배체와 이배체를 교배하여 삼배체의 종자를 획득하였다. 사배체 식물들을 가지고 동계교배를 실시하여 15개의 종자를 획득하였으며, 그중 2개의 종자가 발아에 성공하여 염색체를 검경한 결과 한 개체는 $3x$=36이었으며 이 3배체 식물체를 자식(selfng)시키거나 이배체와의 교배로 이수체 식물을 만들었다. 이 식물체들의 염색체를 검경한 결과 이수체(2n+1)가 18개체, 복이수체(2n+2 또는 2n+1+1)가 18개체임이 밝혀졌다. 본 실험에 이용된 이 이수체 식물과 복이수체 식물은 Table 1와 같다.

diploid (2n)
↓ Colchicine
autotetraploid (4n) × diploid (2n)
↓
triploid (3n:♀) × diploid (2n:♂)
↓
trisomics (2n +1) or double trisomics (2n+2 or 2n+1+1)

Fig. 1. Scheme for production of primary trisomics in hot pepper (*Capsicum annuum*)

2) 연구방법

Souther hybridization을 위한 이수체 및 복이수체의 genomic DNA는 기존의 (1999) 방법에 의하여 잎으로부터 추출하였으며 이 genomic DNA를 정량한 후 제한효소 *Eco*RⅠ으로 잘랐다. 이 잘려진 DNA를 다시 정량한 후 nylon membrane (Amersham Life Science, Inc.)에 전이하였다. Southern hybridization을 위한 probe는 각 연관군에 하나의 유전자로 표현되는 marker를 선발하였으며 본 실험에 이용된 marker는 Table2에 명시되어 있다.

Table 1. 이수체 및 복이수체 식물 재료

염색체 수	이수체 번호	+1 염색체	염색체 수	복이수체 번호
2n+1	2	1	2n+1+1 or 2n+2	8
	3	4		9
	10			12
	18	12		14
	20			24
	23	1		25
	26			27
	29			30
	31			34
	32			35
	36	1		48
	40			50
	47			54
	51			60
	55			64
	61	11		65
	68			67
	73			70

RFLP marker는 각 linkage group 별로 하나씩 선발하여 하나의 membrane에

3개의 probe로 Southern hybridization을 수행하였다. Pst clone series는 고추의 genomic DNA library로부터 유도되었으며 PCD와 DC series는 cDNA library로 유도되었다. 또한 TG series는 토마토의 연관군의 marker로 본 실험에 이용하였다.

Table 2. List of RFLP markers for Southern hybridization

Linkage group	RFLP markers
1	PST493, PST638, PCD2-96
2	PST172, PST425, PST395, PST570
3	PST121, PST469, PST520
4	PST135, PCD2-134, DC27
5	PST503, PST220, PST456, PCD2-177
6	PST173, PST641, PST159
7	PST581, PST193, DC114
8	PST113, PCD2-187, TG363
9	PCD115, TG62, TG42
10	PST177, TG46
11	CAN15
12	PCD2-190, PST653, PST125
13	PST179, PST112
14	PCD2-72, CT252
15	PCD66

참고: 본 연구에 이용한 고추의 linkage group은 제 1세부 과제의 1999년 12월 map을 기준으로 하였으며 위 1세부 과제에서 2000년 12월의 linkage group과 약간의 차이가 있음.

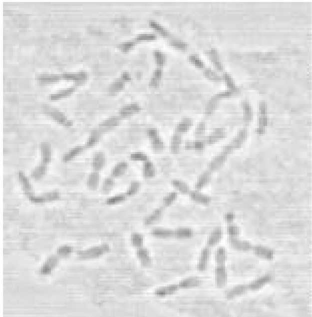
정량분석을 위하여 Southern hybridization을 통해 얻은 X-ray film은 KS400 (Carl Zeiss) 프로그램을 이용하여 이미지화하였다. 또한 TINA 2.0 software 프로그램을 이용하여 각 band의 optical densities를 정량화하였다. 정량화된 각 band의 intensity를 각 마커별의 비율을 환산하여 통계 처리하였다. 각 연관군 마커별로 3회 반복 실험하였다.

제3절 연구결과

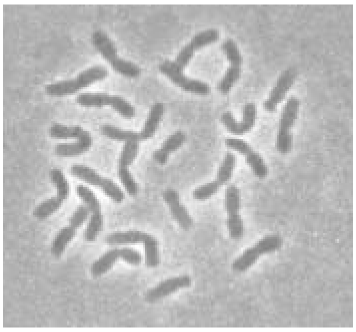
1) 이수체 (Trisomics) 개발

고추의 이수체 및 복이수체 식물을 유도하기 위해서 삼배체(Fig. 3A) 식물을 selfing하거나 이배체 식물과 교배하였다. 이수체와 복이수체의 판별을 위해서 뿌리의 염색체 수를 확인하였다. 그중 18개의 식물체에서 정상 염색체 수보다 1개가 더 많은 이수체를 확인하였으며 또한 18개의 식물체는 복이수체로 정상보다 2개의 염색체가 많은 것을 확인하였다(Fig. 3). 또한 FISH를 이용한 핵형 분석을 수행하였다. FISH 기술을 이용한 경우 18S+26S rDNA와 5S rDNA를 이용하여 multicolor FISH 수행하여 18S+26S rRNA는 NOR 염색체의 2차 협착에 존재하는 것이 관찰되었고 5S rRNA는 NOR, telo, tallest 염색체가 아닌 metacentric 염색체의 단완의 끝부근에 존재하는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

(A)



(B)



(C)

Fig. 3. Somatic metaphase chromosomes of triploid (A: 2n=36), trisomic (B :2n=24+1) and double trisomic (C :2n=24+2).

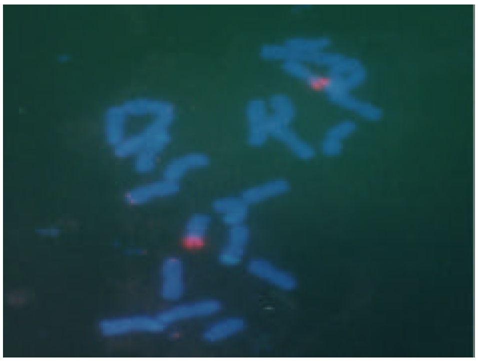


Fig. 4. Multi-color FISH of trisomic (36-2). Ribosomal DNA was labelled with biotin or digoxygenin and hybridized on the metaphase chromosomes. Three pairs of two-dot 5S rDNA loci were clearly visualized by FITC (green signal). And the 25S rDNA gene was visualized with Rhodamine and texas red, which shows red signal. The 25S rDNA was localized on the nucleolus organizing region (NOR), which is known to have multiple copies of rRNA genes.

2) Southern hybridization

염색체의 핵형분석 및 연관군과의 상호관계를 규명하고자 gene dosage 방법을 이용하였다. 즉 염색체가 하나가 다른 정상 식물보다 많게 되면 유전자의 발현 비율이 정상 식물보다 1.5배 증가하게 된다. 이러한 차이를 이용하여 이수체 염색체와 연관군의 marker사이의 관계를 규명하고자 한다. 각 linkage group 별로 2개 또는 3개 이상의 single copy gene 또는 2 copy gene으로 추정되는 probe를 선발하여 본 연구에 이용하였다(Table 2). 이 RFLP marker는 1999년 12월 제 1 세부인 서울대 김병동 교수의 연구실에서 완성된 linkage group을 이용하였다. Fig. 5는 서로 다른 세 개의 RFLP marker (pst456-linkage group 5, DC27-linkage group 4, pst159-linkage group 6)를 하나의 membrane에 Southern hybridization을 한 결과이다. 부분별 band의 intensity가 다른 것을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 각 linkage group의 서로 다른 marker 뿐만 아니라 각 연관군의 서로 다른 조합으로 실험이 이뤄졌다. X-ray film으로부터 image를 영상화하기 위하여 Carl Zeiss의 KS400을 이용하여 CCD 카메라로 이미지화하였다.

3) Densitometry를 이용한 이수체 동정

각 band의 intensity는 TINA 2.0 software program을 통하여 얻었다. 각 band의 intensity의 계산은 자동으로 이뤄지며 Table 3과 같이 나타났다. 각 band의 영역을 결정하고 이 band의 intensity는 background를 제거한 값을 면적으로 나눈 값으로 표현하였다.

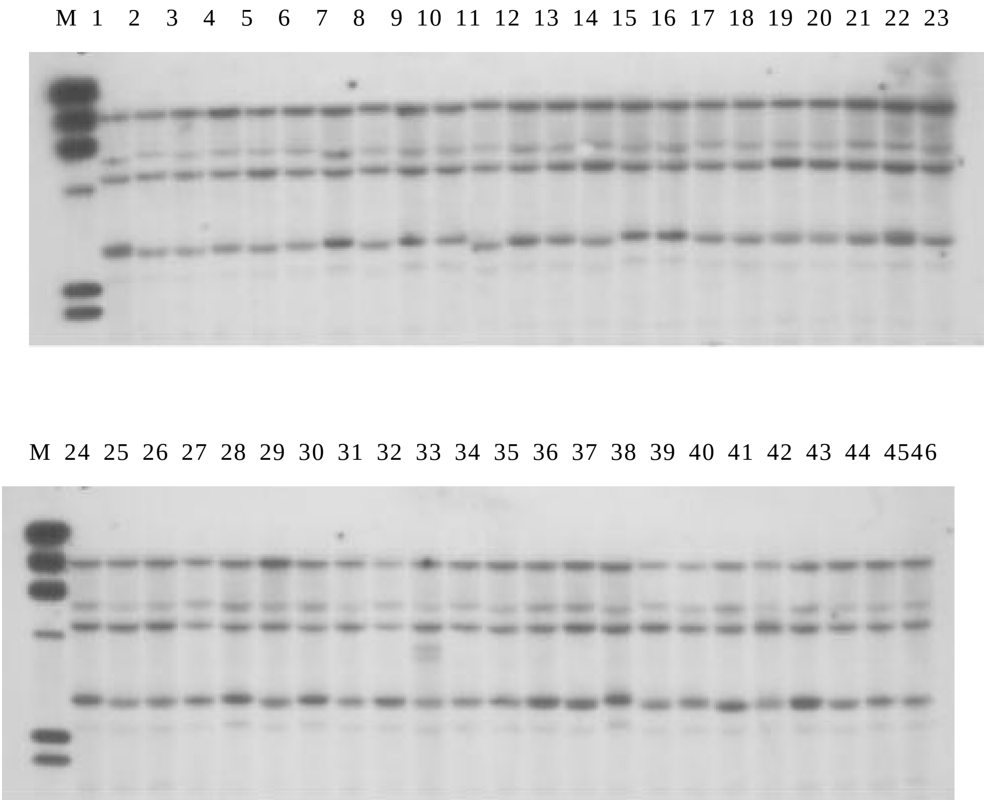
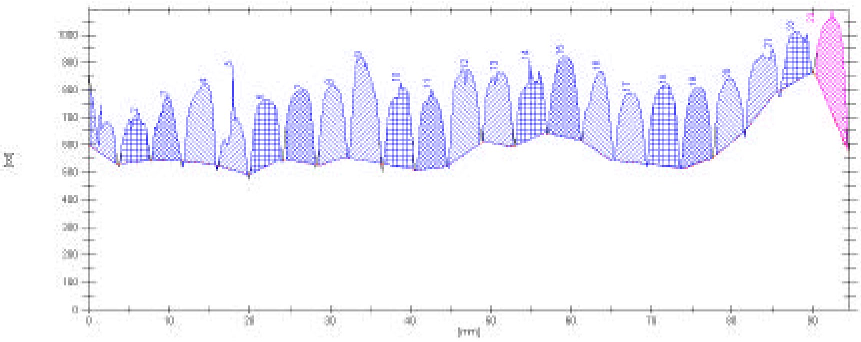


Fig. 5. Autoradiogram of Southern hybridization with RFLP marker probes; pst456(linkage group 5, upper lane), DC27(linkage group 4, middle lane), and pst159(linkage group 6, lower lane). M is λHindIII size marker.

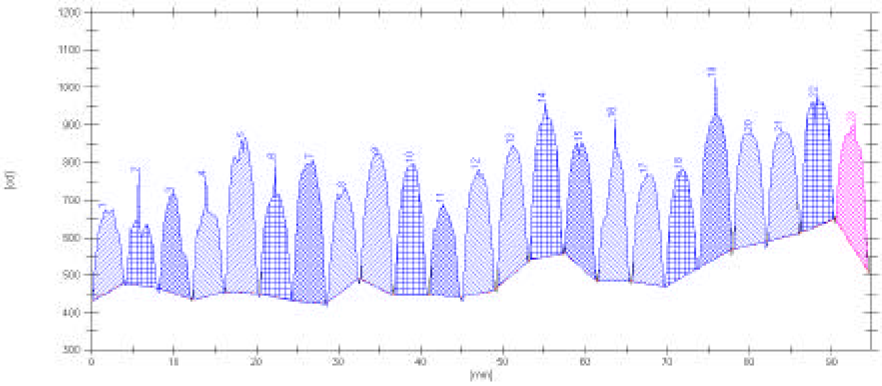
Table 3. Intensity of each band.

(A) RFLP marker PST 456: linkage group5



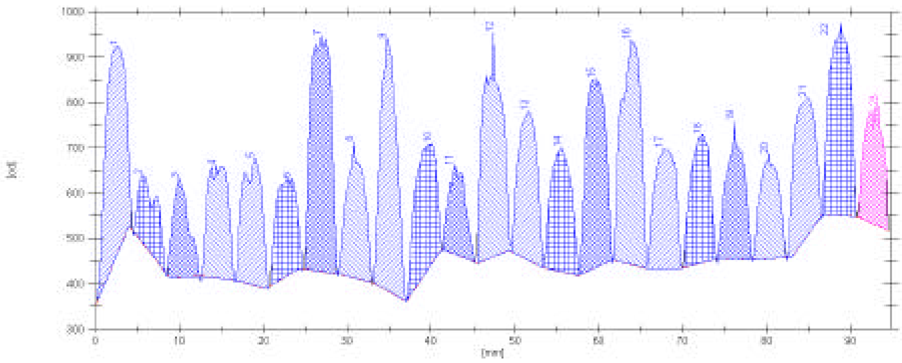
No of lane	Name of plant	Width [mm]	Pos [mm]	OD	OD/mm	OD-Bkg	(OD-Bkg)/mm
1	4n	3.05	1.69	12218.54	4008.71	2084.15	683.78
2	2n	3.39	5.76	13381.89	3951.35	2691.44	794.72
3	2	3.56	9.65	14508.92	4080.12	3170.6	891.62
4	3	4.23	14.05	18387.64	4343.54	5089.51	1202.25
5	10	3.56	18.12	13486.66	3792.65	2855.96	803.14
6	18	3.89	22.01	16322.05	4190.87	4399.23	1129.55
7	20	3.56	26.25	15954.83	4486.74	4688.64	1318.51
8	23	3.56	30.31	15864.53	4461.34	4555.17	1280.98
9	26	3.89	34.37	18748.9	4813.99	6306	1619.14
10	29	3.56	38.61	15563.03	4376.56	4650.11	1307.68
11	31	3.89	42.67	16138.06	4143.63	4362.44	1120.11
12	32	3.89	46.74	18346.63	4710.7	5481.76	1407.51
13	36	3.56	50.97	17139.38	4819.85	4510.46	1268.41
14	40	3.73	55.03	17626.91	4731.63	4018.72	1078.76
15	47	3.89	59.27	19467.21	4998.43	5017.17	1288.22
16	51	3.89	63.5	17722.68	4550.5	4518.43	1160.16
17	55	4.06	67.39	17134.74	4216.22	4301.48	1058.43
18	61	4.23	71.63	18307.62	4324.63	5267.67	1244.33
19	68	3.89	75.69	16889.3	4336.52	4722.77	1212.63
20	73	3.39	79.59	15910.68	4698.04	3889.47	1148.47
21	52	4.4	83.82	22493.86	5109.14	3625.31	823.43
22	71	3.73	88.05	21181.01	5685.67	2936.11	788.15
23	21	3.73	92.63	22215.06	5963.24	6344.71	1703.13

(continued, B) RFLP marker DC27: linkage group 4



No of lane	Name of plant	Width [mm]	Pos [mm]	OD	OD/mm	OD-Bkg	(OD-Bkg)/mm
1	4n	3.73	2.03	13604.81	3651.97	3639.84	977.05
2	2n	4.23	5.93	14769.3	3488.81	2993.2	707.06
3	2	3.73	9.99	13651.67	3664.55	3728.56	1000.87
4	3	3.73	14.22	13750.85	3691.17	3993.95	1072.1
5	10	4.06	18.29	17674.54	4349.05	6810.69	1675.86
6	18	3.73	22.35	14367.67	3856.75	4679.72	1256.19
7	20	4.06	26.42	16768.37	4126.08	6520.82	1604.53
8	23	3.89	30.65	14669.05	3766.45	4166.76	1069.86
9	26	3.73	34.71	16243.25	4360.21	5949.17	1596.95
10	29	3.89	38.78	15988.58	4105.25	5704.44	1464.68
11	31	3.56	42.84	13048.64	3669.47	3715.69	1044.91
12	32	3.89	47.07	15702.78	4031.87	5348.18	1373.21
13	36	3.56	51.14	15829.35	4451.45	5329.78	1498.81
14	40	3.89	55.2	19234.67	4938.72	6615.55	1698.62
15	47	3.73	59.44	16917.12	4541.1	5397.85	1448.96
16	51	3.73	63.67	15706.12	4216.03	5094.09	1367.42
17	55	3.73	67.73	15303.95	4108.08	4835.23	1297.93
18	61	4.06	71.63	16376.35	4029.61	4616.46	1135.94
19	68	4.06	75.86	19693.18	4845.76	6718.1	1653.07
20	73	3.89	79.93	18498.43	4749.68	5180.99	1330.28
21	52	3.56	84.16	17333.23	4874.36	4737.53	1332.26
22	71	3.89	88.22	20665.96	5306.22	6157.36	1580.97
23	21	3.73	92.63	18119.07	4863.74	5286.44	1419.05

(continued, C) RFLP marker PST159: linkage group 6



No of lane	Name of plant	Width [mm]	Pos [mm]	OD	OD/mm	OD-Bkg	(OD-Bkg)/mm
1	4n	3.89	2.37	17796.16	4569.37	7547.62	1937.94
2	2n	3.89	6.43	13128.08	3370.78	2322.62	596.36
3	2	3.89	10.33	12275.08	3151.77	2745.79	705.01
4	3	3.89	14.56	13596.46	3491.05	4122.96	1058.62
5	10	4.06	18.63	13836.04	3404.54	4271.66	1051.1
6	18	3.73	22.69	12730.69	3417.33	3574.51	959.52
7	20	3.73	26.92	17994.29	4830.25	8600.73	2308.71
8	23	3.89	30.99	13620.19	3497.14	4123.79	1058.83
9	26	4.06	35.05	16471.73	4053.08	7323.48	1802.04
10	29	4.06	39.29	14825.1	3647.91	4788.87	1178.36
11	31	3.73	43.18	12756.51	3424.26	2620.75	703.49
12	32	4.06	47.41	18229.45	4485.59	7220.34	1776.66
13	36	3.73	51.48	14937.11	4009.6	4976.76	1335.92
14	40	4.06	55.54	14738.44	3626.58	4493.72	1105.74
15	47	3.89	59.61	16583.79	4258.08	6579.83	1689.45
16	51	4.23	63.84	18841.4	4450.72	7773.93	1836.36
17	55	4.06	67.9	14900.04	3666.35	4492.1	1105.34
18	61	3.73	72.14	14160.8	3801.22	4393.03	1179.23
19	68	4.06	76.37	15031.87	3698.79	4158.77	1023.32
20	73	3.73	80.26	13375.33	3590.37	3388.24	909.51
21	52	4.23	84.5	17591.06	4155.37	5258.76	1242.23
22	71	3.89	88.73	19632.69	5040.92	6981.79	1792.65
23	21	3.22	92.79	13892.51	4318.02	3779.54	1174.74

Trisomics과 linkage group과의 상호 관계를 규명하기 위한 방법으로 gene dosage 방법을 선택하였다. 각 band의 intensity의 비율을 측정하기 위해서 band의 OD 값의 상대 비율을 구하였다. Table 4에서는 각 linkage group 4(DC27:b), 5(PST456:a), 6(PST159:c)번의 band OD 값과 그의 비율을 보여주고 있다. 전체 비율비에서 상위 5% 또는 하위 5% 정도의 값들이 1.5배의 비율과 유사하였으며 이 값의 trisomic을 선발하였다.

Table 4. Ratio of band intensity

A: Trisomics

No of lane	Name of Plant	PST456(a)	DC27(b)	PST159(c)	a/b	a/c	b/c
23	21	1703.13	1419.05	1174.74	1.20	1.45	1.21
8	23	1280.98	1069.86	1058.83	1.20	1.21	1.01
2	2n	794.72	707.06	596.36	1.12	1.33	1.19
4	3	1202.25	1072.10	1058.62	1.12	1.14	1.01
18	61	1244.33	1135.94	1179.23	1.10	1.06	0.96
11	31	1120.11	1044.91	703.49	1.07	1.59	1.49
12	32	1407.51	1373.21	1776.66	1.02	0.79	0.77
9	26	1619.14	1596.95	1802.04	1.01	0.90	0.89
6	18	1129.55	1256.19	959.52	0.90	1.18	1.31
10	29	1307.68	1464.68	1178.36	0.89	1.11	1.24
3	2	891.62	1000.87	705.01	0.89	1.26	1.42
15	47	1288.22	1448.96	1689.45	0.89	0.76	0.86
20	73	1148.47	1330.28	909.51	0.86	1.26	1.46
16	51	1160.16	1367.42	1836.36	0.85	0.63	0.74
13	36	1268.41	1498.81	1335.92	0.85	0.95	1.12
7	20	1318.51	1604.53	2308.71	0.82	0.57	0.69
17	55	1058.43	1297.93	1105.34	0.82	0.96	1.17
19	68	1212.63	1653.07	1023.32	0.73	1.18	1.62
1	4n	683.78	977.05	1937.94	0.70	0.35	0.50
14	40	1078.76	1698.62	1105.74	0.64	0.98	1.54
21	52	823.43	1332.26	1242.23	0.62	0.66	1.07
22	71	788.15	1580.97	1792.65	0.50	0.44	0.88
5	10	803.14	1675.86	1051.10	0.48	0.76	1.59

B: Double trisomics

No of lane	Name of Plant	PST 456(a)	DC27(b)	PST 159(c)	a/b	a/c	b/c
12	50	1406.57	1176.52	1108.78	1.20	1.27	1.06
11	48	934.72	870.57	1055.59	1.07	0.89	0.82
21	22	1166.88	1098.47	1167.99	1.06	1.00	0.94
10	35	1674.92	1579.43	1085.75	1.06	1.54	1.45
6	25	1657.31	1602.36	1485.10	1.03	1.12	1.08
14	60	1415.02	1424.38	1572.52	0.99	0.90	0.91
7	27	1109.01	1140.51	2060.59	0.97	0.54	0.55
4	14	931.31	993.93	1399.04	0.94	0.67	0.71
18	70	1145.18	1231.28	1905.64	0.93	0.60	0.65
3	12	1417.46	1569.68	1378.59	0.90	1.03	1.14
20	6	1295.36	1445.84	2114.56	0.90	0.61	0.68
9	34	706.46	826.06	1735.46	0.86	0.41	0.48
13	54	1043.96	1260.80	2070.29	0.83	0.50	0.61
5	24	1317.37	1635.63	2013.93	0.81	0.65	0.81
8	30	1130.12	1431.76	1244.51	0.79	0.91	1.15
23	69	1167.02	1509.91	1200.36	0.77	0.97	1.26
1	8	1419.58	1948.24	2078.83	0.73	0.68	0.94
17	67	789.81	1140.39	1365.04	0.69	0.58	0.84
2	9	969.95	1402.96	910.17	0.69	1.07	1.54
15	64	1082.41	1617.66	2040.14	0.67	0.53	0.79
19	5	912.63	1462.61	952.69	0.62	0.96	1.54
22	59	865.43	1401.09	1350.15	0.62	0.64	1.04
16	65	742.03	1544.05	1157.53	0.48	0.64	1.33

각 gene의 비율비가 1.5 수준의 값을 선택하였으며 3반복의 실험을 수행하였다. Table 5는 위의 비율의 차이와 통계를 이용하여 각 trisomic 또는 double trisomics과 linkage group과의 상호 관계를 보여준다. Linkage 3번과 6번, 8번과 10번의 경우 trisomic 식물체 2번과 18번에서 동일하게 나타났다. 그러나 김남수 교수가 연구한 extra 염색체와는 상호 동일하지 않았다. Linkage 1번의 경우 trisomic 23, 29, 40, 47번을 각각에서 보여 주었다. 그러나 32, 55, 68, 73번의 경우는 어느 특정한 linkage group과도 상호 연결되지 않았다.

Double trisomics은 trisomic에 비해 연관군과의 상호 연관성이 더 적었다. 이것은 이 doulbe trisomic의 경우 각 extra 염색체가 두 개의 동일한 염색체인지 아니면 서로 다른 염색체인지에 대한 정확한 정보가 미흡하기 때문이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 고추의 염색체의 banding 기술을 개발하여야 할 것이다. 본 연구에서 각 염색체의 numbering을 하기 위해 C-banding을 시도하여 보았으나 고추는 C-banding이 어려워 쉽게 구별하지 못하였다(data not shown).

Table 5. Relation of linkage gruoup and trisomics.

염색체 수	번호	+1 염색체 번 호	Linkage group	비고
2n+1	2	1	8, 10	
	3	4	10	
	10		**4**	
	18	12	8, 10	
	20		3, 6	
	23	1	5, 14	
	26		1, 12	
	29		1	
	31		5, 14	
	32		?	
	36	1	7, 12	
	40		1, 4	
	47		1	
	51		3, 6	
	55		?	
	61	11	2, 5	
	68		?	
	73		?	

(continued)

(continued)

염색체 수	번호	염색체 번호	Linkage group	비고
2n+2	8		1,2,4	
	9		1,4	
	12		1	
	14		8	
	24		3,6	
	25		1,5	
	27		3,6	
	30		1,5	
	34		1,6	
	35		4,5	
	48		5,8	
	50		5,8	
	54			
	60		7,3	
	64			
	65		3	
	67		4,7	
	70		5,9	

4) 고추 염색체의 핵형분석

고추의 핵형 분석을 실시하고자 근단의 체세포 검경을 실시하였다. *C. annuum* **의 경우** 12**개의 염색체중** 3**개는 확연히 구분되었으나 나머지는 육안으로 구분이 쉽지 않았다**.
그러나 정상적인 핵형 분석은 완료하였으며 FISH**를 이용한 핵형분석도 완료하여 현재 논문 준비중이다**.

Table 6. Chromosome index(CI) and relative length(LL) of individual chromosome in *C. annuum*

Chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cl (S/L)	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.7	0.2
LL	11.0	10.4	9.0	8.5	8.0	8.0	7.7	7.7	7.5	7.7	7.5	7.0

References

Ferrer, E. Y. Loarce, and G. Hueros. 1995. Molecular characterization and chromosome location of repeated DNA sequences in *Hordeum* species and in the amphiploid tritordeun (×*Tritordeum* Ascherson at Graebner). Genome 38:850- 857.

Franze P.F., M. Stam, B.,Montijn, R.ten Hoopen, J. Weigant, J. M. Kooter, O. Oud , N. Nanninga. 1996. Detection of single- copy genes and chromosome rearrangements in Petunia lrybrida by fluorescence in situ hybrization. Plant J. 9: 767- 774.

Imanywoha, J., K. B. Jensen and D. Hole 1994. Production and identification of primary trisomics in diploid *Agropyron cristatum* (crested wheatgrass). Genome 469- 476.

Kamisugi, Y., S. Nakayama, R. Nakajima, H. Ohtsubo, E. Ohtsubo, and K.

Fukui. 1994. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes on rice chromosome 11. Mol. Gen. Genet.. 245:13-138.

Kang, B. C., J. W. Yu, M.H. Lee, and B.-D. Kim. 1997. Applicability of AFLP on Hot Pepper Genetic Analysis. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(6):698-703.

Khush, D.S., R. J. Singh, S. C. Sur and A.L. Librojo. Primary trisomics of rice: Origin, Morphology, cytology and use in linkage mapping. Genetics 107:141-163.

Kim, N.S. and J. Kuspira. 1993. Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum*. IX. Cytological behavior, phenotypic characteristics, breeding behaviour, and fertility of primary, doulble, and triple trisomics. Genome 36:565-579.

Lander E. S., P. Green, J. Abrahamson A. Barlow. M. J. Daly, S.E. loncoln, and N. L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

Maluszynska, J. and J.S. Heslop-Harrison. 1993. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. Genome 36:774-781.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY

Murata, M. J.S. Heslop-Harrison and F. Motoyoshi. 1997. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. Plant J. 12:31-37.

Nam, S. H., J.W. Yu, B. C. Kang and B.-D. Kim. 1997. Election of Parental

Lines for Hot Pepper Mapping population using RFLP and AFLP Analyses. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(6):693-697.

Pederson, C., J. Zimmy, D. Becker, A. Jahne-Gartner and H. Lorz. 1997. Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridizaiton. Theor. Appl. Genet. 94:749-757.

Schmidt, T. and J.S. Heslop-Harrison. 1996. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8761-8765.

Schondelmaier, J., T. Schmidt, J.S. Heslop-Harrison and C. Jung. 1997. Genetic and chromosomal localization of the 5S rDNA locus in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Genome 40:171-175.

Singh K. D.S. Multani and G. S. Khush. 1996. Secondary trisomics and telotrisomics of rice: origin, characterization, and use in the determining the orientation of chromosome map. Genetics 143:517-529.

Singh, K. T. Ishii, A. Parco, N. Huang, D. S. Brar, and G. S. Khush. 1996. Centromere mapping and orientation of the molecular linkage map of rice (Oryza sativa L) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:6163-6168.

Singh, R.J. and T. Tsuchiya 1992. Cytogenetics of an unstable trisomic in barley (*Hordeum vulgare*). Geome 36:350-355.

Young, ND., J. C. Miller and S. D. Tanksley. 1987. Rapid chromosomal assignment of multifle genome clones in tomato using primary trisomics. Nucl. Acids Res. 15(22): 9339-9348.

제 5 장 고추 기계화 적합성 NIL 육성 및 유전자 지도 작성용 RIL 육성

제1절 서설

고추는 연간 시장 규모가 1조원에 이르며 농가 소득원으로 벼 다음 가는 중요한 작물이다. 그러나 2004년 시장 개방을 앞두고 경쟁력을 갖추기 위해서는 우수한 품종의 보급과 재배관리의 생력화로 단위 면적당 생산성을 향상하기 위한 노력을 수행하여야 한다. 이에 본 연구에서는 생력화 방안으로 수확작업의 기계화와 관련된 형질을 새로이 개발될 품종의 육종소재로 이용하고 육종의 효율화를 위해 관련형질들과 연관된 분자표지를 찾고자 이들의 NIL을 육성하고자 한다. 1996년 고추 기계화 적합성 형질을 갖는 NIL육성을 위해 흥농종묘에서 유지, 관리해 오던 유전자원중 유전적으로 안정된 26개의 Inbred line의 원예적 형질을 조사하여 고추 기계화 수확과 관련된 초형과 착과 습성, 착과 방향 및 낙과형질에 대한 유전자원을 확보하였다.

유전자 지도는 분자유전 유전 육종을 위한 기초 자료로서 분자표지 개발과 연관지도 작성, 목적 유전자를 클로닝하는데 필수적이다. 이에 흥농종묘에서는 본 연구과제에 필요한 고추 유전자 지도 작성용 RIL집단 육성을 위해 *C.annuum* 과 원연관계에 있는 *C.chinense*, *C frutesense*, *C.chacoence* 의 원예적 형질과 교배 친화성, 후대의 가임능력등을 비교하여 유전자 지도 작성을 위한 집단의 크기를 유지하고 유전적 다양성을 확보하기에 유리한 *C. annuum* x *C. chinense*조합을 유전자 지도 작성용 RIL 육성 소재로 선발하였다.

제2절 재료 및 방법

1) 고추 기계화 적합성 NIL 육성

표1. 고추 기계화 수확 관련 형질조사표

Plant type: D-Determinate, ID-Indeterminate, **Fruit setting orientation:** P-Pendent, E-Errect, **Fruit bearing habit:** S-Single, C-Cluster, **Calyx type:** D-Deciduous, ND-Nondeciduous

No.	Variety	Source	Plant height (cm)	Plant type	Fruit weight (g)	Fruit setting orientation	Fruit bearing habit	Calyx type
1	HN-1	Korea	102	D	10	P	C	ND
2	HN-2	"	40	D	11	P	C	ND
3	HN-3	"	70	D	9	P	C	ND
4	HN-4	"	65	D	7	E	C	ND
5	HN-5	"	50	D	13	P	C	ND
6	HN-6	"	98	D	7	P	C	ND
7	HN-7	"	60	D	11	P	C	ND
8	HN-8	"	64	D	9	E	C	ND
9	HN-9	"	82	D	8	E	C	ND
10	HN-10	"	90	D	10	P	C	D
11	HN-11	"	110	ID	9	P	S	D
12	HN-12	"	105	ID	8	P	S	D
13	HN-13	"	50	D	7	P	C	D
14	HN-14	"	85	ID	5	P	S	D
15	HN-15	"	105	ID	6	P	S	D
16	HN-16	"	65	D	12	P	C	ND
17	HN-17	"	60	D	4	P	C	ND
18	HN-18	"	100	ID	7	P	S	ND
19	HN-19	"	110	ID	12	P	S	ND
20	HN-20	"	110	ID	11	P	S	ND
21	HN-21	"	115	ID	11	P	S	ND
22	HN-22	"	90	ID	10	P	S	ND
23	HN-23	"	105	ID	12	P	S	ND

1996년 조사자료를 기초로 원예학적 유용형질을 갖으며 유한생장형이며 하향으로 2개이상의 과실이 착과되는 HN-3과 유한생장형이며 상향으로 2개이상의 과실이 착과되는 HN-9를 선발, 이들을 교배친으로 하여 초형과 착과습성, 착과방향과 관련된 NIL육성을 위한 2조합(HN-3xHN-22, HN-9xHN-23)을 작성하였으며 낙과형질을 갖는 HN-10, HN-11을 선발하여 낙과형질과 관련된 NIL 육성을 위해 2조합(HN-10xHN-6, HN-11xHN-23)을 작성하였다.

표2. 고추 기계화 적합성 NIL육성을 위한 경과도표

연구내용	1996		1997		1998		1999		2000	
	봄	가을	봄	가을	봄	가을	봄	가을	봄	가을
유전자원수집 및 특성조사 조합작성	----	----								
유전분석 및 BC2F1-BC3F1			----	----						
BC4F1-BC5F1					----	----				
BC5F2-BC6F1							----	---		
BC5F4-GC7F2									----	----

표3-1. 초형, 착과습성, 착과방향 NIL의 조합현황

품종명	계통명	교배번호	비고
HN-9 x HN-23	BC6F3	4912-1	착과방향-homo, 착과습성,초형-hetero
"	BC7F3	4914-1	착과방향,착과습성,초형-hetero
"	"	" -2	
HN-3 x HN-22	BC6F4	4922-1	착과습성,초형-hetero
"	BC7F3	4923-1	
"	"	" -2	

표3-2. 낙과형질 NIL의 조합현황

품종명	계통명	교배번호	비고
HN-10 x HN-6	BC5F5	4925-1	낙과형질-homo
"	"	" -2	
"	"	" -3	
"	"	" -4	
"	BC7F3	4931-1	낙과형질-hetero
"	"	" -2	
HN-11 x HN-23	BC5F5	4934-1	낙과형질-homo
"	"	" -2	

고추 기계화 관련형질들의 유전양상을 F1, BC2F1집단에서 조사한 결과 무한생장형과 하향으로 한 개의 과실이 착과되는 것이 단인자 우성으로 작용하는 것으로 조사되었으며, 낙과형질 또한 단인자 우성으로 작용하는 것으로 조사되어 이를 근거로 NIL 육성을 위해 HN-3, HN-9, HN-6, HN-23을 교배친으로 하여 Backcross를 BC5F1 - BC7F1을 실시하였다.

2) 유전자 지도 작성용 RIL 육성

1997년 110여개의 F2집단을 얻었으나 각 line별 가임능력의 차이에 따라 유기된 F3집단의 크기가 80여개 line으로 감소하였으나 F3 - F4 세대에서 표현형적 형질을 고려하여 계통을 분화하여 140 - 150여 계통으로 집단의 크기를 증가시켰다.

표4. 유전자지도 작성용 RIL 집단 육성 경과도표

내용	1996		1997		1998		1999	2000
	봄	가을	봄	가을	봄	가을		
유전자원 수집 및 특성조사 조합작성	-----	-----						
F2집단 유기 F3집단 유기			-----	-----				
F4집단 유기 F5집단 유기					-----	-----		
F6집단 유기							-----	
F7집단 유기								-----

표5. 유전자 지도 작성용 RIL 집단 목록

S N	品 種 名	系 統 名	交 配 番 號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7001	*c.annuum* x *chinence*	2065- 96- 2- 1- 1- 1- 2- 1	8001- 1	5립				
7002	“	“ - 2- 1- 1- 1- 1	8004- 1	9립				
7003	“	“ - 2- 1- 2- 3- 3	8005- 3	5립				
7004	“	“ - 2- 2- 1- 1- 3	8006- 3	88립				
7005	“	“ - 6- 1- 1- 1- 1- 2	8007- 2	44립				
7006	“	“ - 1- 1- 2- 1- 1	8008- 1	52립				
7007	“	“ - 1- 1- 2- 1- 3	8008- 3	7립				
7008	“	“ - 7- 1- 2- 1- 1- 2	8012- 2	21립				
7009	“	“ - 1- 2- 2- 1- 2	8013- 2	21립				
7010	“	“- 12- 1- 1- 1- 2- 2	8016- 2	10립				
7011	“	“ - 1- 1- 1- 2- 1	8017- 1	14립				
7012	“	“ - 1- 2- 1- 1- 1	8019- 1	79립				
7013	“	“ - 1- 2- 1- 1- 3	8019- 3	67립				
7014	“	“ - 1- 2- 2- 1- 1	8020- 1	125립				
7015	“	“ - 1- 2- 2- 2- 1	8021- 1	132립				

(continued 1)

B N	品 種 名	系 統 名	交配番號	調製番號	파종립수	발아율	기식주수	정식주수
7016	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-2-1-1-1-1	8022-1	3ml				
7017	"	" -2-1-1-2-1	8023-1	2ml				
7018	"	" -2-1-1-2-2	8023-2	109립				
7019	"	" -2-1-2-1-3	8024-3	1ml				
7020	"	" -2-1-2-2-2	8025-2	11립				
7021	"	" -15-1-1-1-1-3	8027-3	7립				
7022	"	" -1-1-2-2-3	8029-3	24립				
7023	"	" -2-2-2-1-1	8031-1	9립				
7024	"	" -2-2-2-1-2	8031-2	36립				
7025	"	" -17-1-2-1-1-1	8032-1	88립				
7026	"	" -2-1-1-1-1	8034-1	2ml				
7027	"	" -2-1-2-1-1	8035-1	46립				
7028	"	" -2-2-1-1-1	8036-1	3ml				
7029	"	" -2-2-2-1-2	8037-2	77립				
7030	"	" -2-2-2-1-2	8038-2	74립				

(continued 2)

B N	品 種 名	系 統 名	交 配 番 號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수	
7031	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-2-2-2-4-2	8041-2	38립					
7032	"	" -23-1-1-1-2-2	8042-2	7립					
7033	"	" -33-2-2-1-1-3	8047-3	51립					
7034	"	" -2-2-1-2-2	8048-2	3립					
7035	"	" -2-2-2-1-1	8049-1	4립					
7036	"	" -2-2-2-2-2	8050-2	10립					
7037	"	" -34-1-2-1-1-1	8051-1	9립					
7038	"	" -1-2-1-1-3	8051-3	10립					
7039	"	" -36-2-3-1-1-1	8054-1	3ml					
7040	"	" -39-1-1-2-1-2	8056-2	23립					
7041	"	" -1-2-1-1-2	8058-2	86립					
7042	"	" -1-2-1-2-1	8059-1	17립					
7043	"	" -40-1-1-1-1-1	8061-1	18립					
7044	"	" -1-1-2-2-2	8063-2	16립					
7045	"	" -43-1-2-1-1-1	8064-1	196립					

(continued 3)

B N	品 種 名	系 統 名	交 配 番 號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7046	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-1-2-1-1-2	8064-2	23립				
7047	"	" -2-2-1-1-2	8065-2	17립				
7048	"	" -44-1-1-2-1-1	8068-1	4립				
7049	"	" -49-1-2-1-1-1	8069-1	61립				
7050	"	" -1-2-1-2-2	8070-2	17립				
7051	"	" -1-2-2-1-1	8071-1	2ml				
7052	"	" -50-2-1-2-2-2	8076-2	53립				
7053	"	" -2-1-2-1-2	8078-2	40립				
7054	"	" -56-1-1-1-1-1	8079-1	27립				
7055	"	" -1-2-2-1-1	8082-1	8립				
7056	"	" -2-1-1-1-2	8083-2	54립				
7057	"	" -2-1-2-2-1	8084-1	2ml				
7058	"	" -2-2-1-1-2	8085-2	104립				
7059	"	" -2-1-2-2-2	8086-2	136립				
7060	"	" -58-1-1-1-1-2	8087-2	17립				

(continued 4)

BN	品 種 名	系 統 名	交 配 番 號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7061	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-58-1-1-1-2-2	8088-2	80립				
7062	“	“ -1-1-1-4-1	8090-1	1ml				
7063	"	" -1-1-2-4-1	8091-1	3립				
7064	“	“ -78-2-2-1-2-2	8092-2	29립				
7065	“	“ -2-2-2-2-1	8093-1	83립				
7066	"	“ -65-1-1-1-2-1-	8094-1	139립				
7067	“	“ -1-1-2-1-2	8095-2	47립				
7068	“	“ -2-1-1-3-2	8096-2	114				
7069	“	“ -2-1-2-2-1	8097-1	4ml				
7070	“	“ -2-2-1-2-2	8098-2	169립				
7071	"	" -2-2-2-3-1	8099-1	2ml				
7072	“	“ -74-1-4-1-1-1	8104-1	33립				
7073	“	“ -1-4-2-1-1	8105-1	20립				
7074	“	“ -1-4-2-2-2	8106-2	49립				
7075	"	“ -76-1-1-2-1-1	8108-1	49립				

(continued 5)

B N	品 種 名	系 統 名	交配番號	調製番號	파종립수	발아율	기식주수	정식주수	
7076	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-1-2-1-1-1	8109-1	75립					
7077	"	" -1-2-1-3-2	8110-2	12립					
7078	"	" -1-2-2-1-2	8111-2	14립					
7079	"	" -1-2-2-3-1	8112-1	3립					
7080	"	" -78-1-1-1-1-1	8115-1	27립					
7081	"	" -1-1-2-1-1	8116-1	33립					
7082	"	" -1-1-2-3-2	8117-2	27립					
7083	"	" -2-1-1-1-3	8118-3	8립					
7084	"	" -82-1-2-1-1-1	8121-1	5립					
7085	"	" -1-2-1-3-1	8122-1	5립					
7086	"	" -2-2-1-1-1	8123-1	20립					
7087	"	" -2-2-1-1-2	8123-2	10립					
7088	"	" -89-1-3-1-1-2	8125-2	22립					
7089	"	" -1-5-1-3-1	8126-1	1ml					
7090	"	" -1-5-2-3-1	8127-1	139립					

(continued 6)

B N	品 種 名	系 統 名	交配 番號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7091	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-101-1-2-1-3-1	8129-1	45립				
7092	“	“ -2-2-1-1-2	8130-2	3립				
7093	“	“ -103-1-1-1-1-1	8131-1	21립				
7094	“	“ -1-1-1-1-2	8131-2	39립				
7095	“	“ -1-1-1-1-3	8131-3	32립				
7096	“	“ -1-1-2-1-1	8133-1	29립				
7097	“	“ -1-4-2-1-2	8134-2	128립				
7098	“	“ -1-4-2-3-1	8135-1	51립				
7099	“	“ -105-1-4-2-3-2	8136-2	6립				
7100	“	“ -106-1-2-2-1-2	8137-2	6립				
7101	“	“ -1-2-2-3-1	8138-1	54립				
7102	“	“ -114-1-1-2-2-1	8140-1	39립				
7103	“	“ -2-2-1-1-1	8141-1	23립				
7104	“	“ -117-1-2-2-1-2	8143-2	17립				
7105	“	“ -1-2-2-2-1	8144-1	7립				

(continued 7)

B N	品 種 名	系 統 名	交配 番號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7106	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-117-1-2-2-2-2	8144-2	20립				
7107	“	“ -119-2-1-1-1-2	8145-2	2ml				
7108	“	“ -2-1-2-1-1	8146-1	76립	“		"	"
7109	“	“ -121-2-2-1-1-2	8147-2	38립				
7110	“	“ -125-1-1-1-1-2	8148-2	27립				
7111	“	“ -130-1-1-1-3-2	8154-2	8립				
7112	“	“ -1-2-1-1-2	8155-2	1ml				
7113	"	" -1-2-2-1-1	8156-1	33립				
7114	“	“ -2-1-1-1-2	8157-2	168립				
7115	“	“ -2-1-1-2-1	8158-1	6립				
7116	“	“ -2-1-2-1-1	8159-1	8립				
7117	“	“ -2-2-2-2-3	8161-3	5립				
7118	“	“ -134-2-2-2-1-2	8164-2	13립				
7119	“	“ -135-1-1-1-1-1	8165-1	49립				
7120	“	“ -1-1-1-2-1	8166-1	134립				

(continued 8)

B N	品 種 名	系 統 名	交 配 番 號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7121	*c.annuum* x *chinence*	2065- 96- 135- 1- 1- 2- 1- 2	8167- 2	47립				
7122	"	" - 1- 1- 2- 2- 3	8168- 3	7립				
7123	"	" - 1- 2- 1- 1- 1	8169- 1	102립	"		"	"
7124	"	" - 1- 2- 1- 2- 1	8170- 1	51립				
7125	"	" - 1- 2- 1- 3- 3	8171- 3	1ml				
7126	"	" - 2- 1- 1- 1- 2	8172- 2	39립				
7127	"	" - 2- 1- 2- 1- 3	8173- 3	65립				
7128	"	" - 140- 2- 1- 1- 2- 1	8174- 1	31립				
7129	"	" - 143- 1- 1- 1- 1- 1	8175- 1	49립				
7130	"	" - 1- 1- 2- 1- 2	8176- 2	2ml				
7131	"	" - 2- 1- 1- 2- 2	8177- 2	2ml				
7132	"	" - 2- 1- 2- 2- 1	8178- 1	113립				
7133	"	" - 144- 1- 2- 1- 1- 3	8179- 3	1ml				
7134	"	" - 1- 2- 2- 1- 1	8180- 1	80립				
7135	"	" - 1- 2- 2- 1- 2	8180- 2	71립				

(continued 9)

B N	品 種 名	系 統 名	交 配 番 號	調製 番號	파종 립수	발아 율	기식 주수	정식 주수
7136	*c.annuum* x *chinence*	2065-96-145-1-1-1-1-2	8181-2	2ml				
7137	"	" -2-1-1-1-3	8183-3	2ml				
7138	"	" -2-1-2-1-2	8184-2	2ml				
7139	"	" -146-1-2-1-2-1	8185-1	50립				
7140	"	" -15-2-1-2-1	8186-1	20립				
7141	"	" -15-2-1-2-3	8186-3	47립				
7142	"	" -24-1-2-1-1	8187-1	101립				
7143	"	" -58-1-2-1-2	8188-2	27립				
7144	"	" -90-1-1-1-1	8190-1	2립				
7145	"	" -1-2-1-2	8191-2	27립				
7146	"	" -92-1-2-1-2	8192-2	2립				
7147	"	" -99-2-1-1-2	8193-2	53립				
7148	"	" -141-1-1-3-3	8194-3	64립				
7149	"	" -2-2-2-2-1	8195-1	125립				

제 6 장 고품질 고추 육성을 위한 Chemical Fingerprinting 방법 개발

제1절 서론

우리 나라의 고추는 이제까지 주로 김치용으로 이용되어 왔으나 최근 고추 자체를 식품으로서 하는 것 이외에도 고추의 추출물 등은 의약품, 화장품 등의 여러 분야에서 다양하게 이용되고 있다. 따라서 고추의 특성을 이용한 다양한 고품질 고추의 개발은 학술적인 발전은 물론, 국제 경쟁력 있는 작물의 개발로 인하여 농가소득 증대에 획기적으로 기여할 수 있을 것이며, 고추의 차별화를 통해 김치의 매운맛 정도를 달리함으로서 김치를 보편화시킬 수도 있을 것이다. 예를 들어, 김치를 싫어하는 어린이나 매운맛을 참지 못하는 외국인을 위해 매운맛 적은 고추를 생산해 김치에 대한 친밀감을 줄 수 있을 것이다.

고추의 품종 개량을 위해서는 유전자에 의해 발현된 형질의 정량적 분석이 필요하다. 고추의 품질 결정은 크게 맛과 색소에 의해 결정되는데 이를 결정하는 이차산물의 종류는 다양하다. 다양한 종류의 이차산물을 정량적으로 분석하기 위해서는 분석방법의 표준화가 요구되나 아직 그 방법이 확립되어 있지 않다. 지금까지 고추의 이차대사산물 분석과 이와 연관된 유전학적 연구는 국내에서 거의 전무하며, 농작물로서 고추의 품질을 개선하기 위한 노력은 많이 있었으나 체계적이고 과학적인 개선은 큰 진전이 없었다. 이차대사산물중 하나인 색소의 분석도 일부 식물이나 세균 등에서 이루어지고 있으나 농작물의 품질 개선을 위한 기초 근거가 마련이 되지 않고 있다. 최근 본 연구팀에 의해서 HPLC에 의한 엽록소 및 일부 카로티노이드에 대한 분석법이 개발되어 있다. 국제적으로는 1970년 이래 다양한 종류의 이차 대사산물 및 카로티노이드가 밝혀지고 있으며, 고추에서 유래한 이차 대사산물인 캡사이신등의 의학적 기능이 밝혀져 그 이용에 관

한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그리고 고추의 이차 대사산물의 생합성 조절기능에 관한 연구가 최근에 진행되기 시작하였다. 이차 대사산물은 특성상 표준물질의 구입이 어려우며, 대사산물 각각을 분리할 수 있는 분석방법이 보편화되어 있지 않다. 또한 이차대사 산물의 유전자에 대한 정보가 거의 없다. 앞으로 전망 분석 방법이 표준화되면 다른 식물체의 이차대사 산물 분석에도 널리 이용되어 연구를 활성화시킬 수 있을 것이다.

본 연구개발의 목표는 다양한 이차 대사 산물중 품질에 직접적으로 기여하는 카로티노이드, 캡사이시노이드, 아스코르빈산, 그리고 유리 아미노산의 추출 및 전처리, 정량 분석법 (chemical finger printing)을 개발, 표준화하고 이를 이용하여 다양한 고추 품종 및 교배, 육종되는 F1들을 분석함으로서 품질 개선 근거를 마련함과 동시에 고품질 고추품종 육종을 위한 소재개발에 기여하고자 하는 것이다.

2절 재료 및 방법

1)실험재료

분석을 위한 재료는 흥농종묘 중부연구소로부터 기증된, 露地에서 재배한 붉은 고추, "부강 (Capsicum annuum L.)"을 이용했다. 고추로부터 이차대사산물을 추출하기 위한 acetone, acetonitrile등은 Fisher 사 (Fair lawn, NJ., USA)로부터, high-performance liquid chromatography (HPLC)를 위한 ethyl acetate, methanol, 등은 Burdick & Jackson 사 (Muskegon, MI., USA)로부터 구입하였다. 기타, silver nitrate, butylated hydroxyquinone, β-carotene, chlorophyll a, amino acids, capsaicin, dihydrocapsaicin, sodium acetate, ascorbic acid, 6 N HCl등은 Sigma 사 (St. Louis, MO., USA)에서 구입하였다. HPLC용 컬럼은

Nova-Pak C18 (3.9 × 150 ㎜) stainless steel과 radial compression module (8 × 100 ㎜), 그리고 amino acids 분석용인 Pico-tag (3.9 × 300 ㎜)은 Waters 사 (Milford, MA, USA)의 제품을 사용하였다.

2) 캡사이시노이드의 추출 및 동정

가) 캡사이시노이드의 추출과 고상 추출

Attuquayefio와 Buckle (1987)의 방법에 따라 1.5-㎖ microfuge tube에 건조된 분말 고추 0.1 g과 acetonitrile 1 ㎖을 넣어 5분간 vortex mixing하였다. 1 분간 원심분리기에서 15,000 × g로 원심분리하여 상등액을 깨끗한 튜브에 옮긴 다음 한번 더 반복하였다. 간섭물질이 많은 경우, 1 ㎖을 증류수 9 ㎖이 들어 있는 유리 시험관에 옮겨 Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Milford, MA., USA)를 이용, 고상 추출을 실시하였다. 먼저 acetonitrile 5 ㎖과 증류수 5 ㎖로 Sep-Pak C18 cartridge를 활성화시킨 다음, 추출액을 cartride에 loading하고 4 ㎖의 acetonitrile과 1 ㎖의 0.1 % acetic acid가 포함된 acetonitrile로 캡사이시노이드를 추출하였다. 추출된 캡사이시노이드는 Speed-Vac concentrater (Sarvant instruments Inc., NY, USA)로 말린 다음, 분석이 있을 때까지 -80 ℃에 보관하였다.

나) HPLC에 의한 캡사이시노이드의 분리

보관중인 캡사이시노이드를 Johnson등 (1982)의 방법을 약간 수정하여 다음과 같은 방법으로 분리하였다. System은 Waters사의 2대의 M510 pump, M470 fluorescence detector, M717 automatic sample injector를 사용하였다. 컬럼은 Nova-Pak C18 RCM (8 × 100 ㎜)을 사용하였고, 유속은 1.5 ㎖/min으로 하였다. 용매는 50 mM의 silver nitrate가 들어 있는 60 % methanol, pH 2.5를 사용하였다. pH는 glacial acetic acid를 이용하여 맞추었다. 형광 detector의

excitation 파장은 280 ㎚, emission 파장은 316 ㎚로 고정하였고, bandwidth는 18 ㎚로 하였다. 한편, 컴퓨터로 읽혀 들여진 chromatography 데이터는 on-line chromatography software인 Millenium (Waters, Milford, MA, USA)으로 분석하였다.

다) 캡사이시노이드의 동정과 정량

HPLC를 하여 분리된 캡사이시노이드는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 방법 및 Johnson등 (1982)의 보고에서 보인 크로마토그램과 비교하여 동정하였다. ESI-MS (VG Quattro, Manchester, UK)는 HP-1050 HPLC와 함께 사용하였다. 수확된 각 peak은 Speed-Vac으로 건조하여 20 ㎕의 50 % methanol에 녹였다. 분석 조건은, capillary tip voltage는 3.5 ㎸, cone voltage는 20 V, mass scan range는 100 1,000/3 s scan, source temperature는 70 ℃, 용매는 0.1 % formic acid가 들어있는 50 % methanol로, 그리고 유속은 20 ㎕/min으로 하였다. Capsaicin과 dihydrocapsaicin은 표준물질과 비교하여 정량하였고, 나머지 캡사이시노이드는 capsaicin과의 peak 면적비교로 정량하였다.

3) 카로티노이드의 추출 및 동정

카로티노이드의 추출과 saponification 고추의 수확후에는 모든 실험을 어두운 곳에서 실시하였다. Minguez-Mosquera 등 (1995)의 방법과 Weissenberg 등 (1997)의 두 가지 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 고추분말 10 ㎎을 1 ㎖의 acetone으로 두 번 추출하고, 1 ㎖의 diethyl ether로 한번 더 추출하여 상등액을 합하였다. 추출액에 10% NaCl용액을 2.5 ㎖ 넣어 색소층을 분리한 다음, 1 ㎖의 20% KOH/methanol을 넣고 가끔씩 섞어주면서 상온에서 한시간 동안 saponification을 실시하였다. 여기에 물 1 ㎖를 넣어 색소층을 분리하고

Waters 사의 M717 automatic injector가 장착된 HPLC system을 이용해 분석하였다. 검출기를 통해 얻은 데이터는 Waters 사의 Millenium을 이용해 분석하였다.

가) 질량분석기에 의한 카로티노이드의 동정

카로티노이드의 동정은 두 개의 질량분석기로 구성되고 JMS-9000 data system이 장착된 JMS-HX110/110A 탄뎀질량분석기 (Jeol, Tokyo, Japan)의 첫 번째 질량분석기 (MS-1)를 사용하여 수행했다. 수확된 각 peak을 Speed-Vac으로 건조하여 20 ㎕의 methylene chloride에 녹인 뒤, 1 ㎕를 matrix인 3-nitrobenzoyl alcohol 1 ㎕와 함께 probe tip에 놓고 섞은 다음, 고속원자충격법으로 시료를 이온화시켰다. 이온 원의 가속전압은 10 kV, Cs+ 이온총의 가속 전압은 22 kV로 하였고, 질량분석기의 분해 능은 1,000 (10% 골짜기 정의)에서 주사영역은 100-2000, 주사속도는 13.5초로 하였다. 한편, 시료 분석 전에 검정물질 CsI를 사용하여 첫 번째 질량분석관 (MS-I)을 검정하였다.

나) 총 엽록소 양과 카로티노이드 양의 계산

각 색소의 총량은 Lichtenthaler (1987) 의 방법에 따랐다. 보관하고 있는 색소를 acetone에 녹인 다음, DU 7500 Spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA., USA)에서 350-750 ㎚까지 scanning하여 각 파장에서의 흡광도 값을 구하고 아래식에 따라 각 색소의 총량을 구하였다.

엽록소 a (㎍/㎖) = $11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$

엽록소 b (㎍/㎖) = $20.13A_{644.8} - 4.19A_{661.6}$

엽록소 a + b (㎍/㎖) = $7.05A_{661.6} + 18.09A_{644.8}$

총 카로티노이드 (㎍/㎖) = $\frac{1000A_{470} - 1.90 \times \text{엽록소 a} - 63.14 \times \text{엽록소 b}}{214}$

다) HPLC에 의한 색소의 분리

보관중인 색소를 몇 가지 용매조건을 달리하여 분리하고 확인하였다. 시스템은 아미노산 분리할 때와 동일한 것을 사용하였고, 컬럼으로는 Nova-Pak C18 RCM (8 × 100 ㎜)을 사용하였다. 첫 번째 용매조건은, A용매는 90 % methanol, B용매는 ethyl acetate로 초기 A용매 100 %에서 20분에 50 %로 linear하게 감소시켰다 (Eskins과 Dutton, 1979). 위와 같은 조건에서 분리된 peak중에서 peak area가 5 % 이상되는 peak을 선택하여, 다시 농도구배법을 사용하여, 51 % tetrahydrofuran에서 18분에 90 %로 tetrahydrofuran로 linear하게 증가시키는 조건에서 chromatography (Mejia등, 1988)를 하여서 하나의 component가 하나의 peak임을 확인하였다. 유속은 1.0 ㎖/min으로 하였으며, 470 ㎚에서 검출하였다. 분리된 각 색소는 light petroleum에서의 최대 흡수파장 (Davis, 1976)과 specific extinction efficient로 동정, 정량하였다.

4) 유리 아미노산의 추출 및 동정

가) 유리 아미노산의 추출

1.5-㎖ microfuge tube에 건조된 분말 고추 20 ㎎을 넣고, 0.1 N HCl 혹은 30 %의 methanol이 들어있는 0.1 N HCl 1 ㎖을 넣고 1 분간 vortex mixing하였다. 5 분간 15,000 × g로 원심분리하여 상등액을 새로운 microfuge tube에 옮긴 다음, 이중 200 ㎕와 acetonitrile 600 ㎕를 혼합하였다. 다시 1분간 원심분리한 후, 상등액을 cut-off MW 10,000의 ultrafiltration filter unit로 여과하였다. 여과액중 20 ㎕를 Speed-Vac concentrater (Sarvant instruments Inc., NY, USA)로 말린 다음, 분석이 있을 때까지 -20 ℃에 보관하였다.

나) 아미노산의 유도체화

유도체화는 Pico-Tag system의 instruction manual을 따라서 실시하였다. 아미노산 표준품은 Sigma에서 구입하여, asparagine과 glutamine을 다른 아미노산과 동일한 농도가 되게끔 첨가한 후 사용하였다.

다) 아미노산의 분리, 동정 및 정량

시스템은 M470 형광 검출기 대신 M996 photodiode array detector를 사용한 것을 제외하고는 캡사이시노이드를 분리할 때와 동일한 것을 사용하였다. 컬럼은 Pico-Tag (3.9 × 300 ㎜, Waters, Milford, MA., USA)을 사용하였다. 용매조건은 Pico-Tag system의 instruction manual을 따라서 실시하였다. 유속은 1 ㎖/min으로 하였으며, 254 ㎚에서 detection하였다. 각 아미노산의 동정 및 정량은 표준물질과 비교하여 확인 및 계산하였다.

5) 비타민의 추출 및 정량

비타민 B_1, B_2, 그리고 C는 건조된 고추분말 0.2 g을 사용하여 Kim 등 (1986)의 방법대로 하여 추출 및 정량하였다.

제3절 연구결과

시료는 수확한 다음 꼭지를 떼고 바로 얼음에 담아 가져와 무게를 잿고, 이 무게를 fresh weight로 하였다. Fresh weight는 20.1 g/ea 이었으며 10개의 과실을 가지고 실험을 실시하였다. 이들을 -80 ℃에서 얼린 다음, 동결건조기에서 1주일 이상 건조하였다. 다시 무게를 재서 건조중량으로 하였으며, 이때 3.0 g/ea으로 되었다. 따라서 fresh weight/dry weight = 6.7이 되고, 전체 무게의 약 85 %가 수분으로 증발되었음을 알 수 있었다. 건조된 고추를 막자사발에서 갈아 다

음 실험을 실시할 때까지 - 80 ℃에 보관하였다.

1) 이차대사산물 추출, 동정

고추의 품질에 직접적으로 관련되는 이차대사 산물중, 매운맛의 캡사이시노이드, 영양과 맛에 관련되는 유리 아미노산, 색을 내는 카로티노이드, 그리고 영양과 식품의 신선도를 측정하는 기준이 될 수 있는 아스코르빈산, 이렇게 4가지를 분석대상으로 설정하였다. 이들 4가지를 완벽하게 추출해낼 수 있는 방법, 다른 이물질로부터 분리하여 각각을 동정하는 방법, 그리고 동정된 각 component를 정량하는 조건을 찾아내었다.

가) 캡사이시노이드의 추출및 동정

캡사이시노이드 추출을 하기 위해서 사용하는 용매는 여러 가지가 있을 수 있으나, Attuquayefio와 Buckle (1987)은 acetonitrile이, HPLC를 이용하여 캡사이시노이드를 분석할 때 간섭이 되는 색소추출은 최소화하면서, 캡사이시노이드는 거의 완벽하게 추출한다고 보고한 바 있다. 본 연구팀에서도 그들의 방법을 이용하여 추출을 하였는 데, Attuquayefio와 Buckle (1987)의 보고에서 나타난 결과보다 1/100정도로 적게 나와 Lifshitz 등 (1970)의 방법대로 ethyl acetate를 사용하여 환류냉각추출하였으나 결과는 비슷하였다. 추출한 캡사이시노이드는 5 5 67 % methanol 각각의 농도로 isocratic하게 하면서 280 ㎚에서 detection을 실시하였으나, 몇가지의 문제점이 있었다. 낮은 농도의 methanol에서 분리를 할 경우 분리능은 좋아졌으나 뒤쪽에서 용출되어 나오는 homodihydrocapsaicin (HDHC) peak은 너무 넓어지면서 감지할 수가 없을 뿐 아니라 run time이 너무 오래 걸렸다. 반대로 methanol농도를 올리면 뒤쪽의 peak 모양은 좋아졌으나 capsaicin (C)과 nordihydrocapsaicin (NDHC)이 분리가 되지 않았다. 또한, 전체적으로 감도가 낮았다.

그래서 Johnson등 (1982)의 방법을 이용하여 pH를 낮추고 silver nitrate로 ion supressing을 하면서 형광 검출기를 사용하자 빠른 시간내에 좋은 분리능으로 5가지의 천연 캡사이시노이드를 분리할 수 있었다 (Fig. 5-1). 캡사이시노이드 중 C과 dihydrocapsaicin(DHC)는 상품으로 나오는 표준물질이 있어 비교, 정량할 수 있었으나 나머지 NDHC, homocapsaicin (HC), HDHC는 할 수 없기때문에, HPLC로 분리한 각 peak을 받아 농축한 다음, 질량분석기로 분석하고 (Fig. 5-2), Johnson등 (1982)의 크로마토그램과 비교하여 동정하였다. 캡사이시노이드는 모두 구조가 비슷하므로 같은 양은 같은 정도의 흡광도를 가지는 것으로 예측되기 때문에 정량은 크로마토그램의 C peak과 면적 비교하여 실시하였다. Table 5-1에서 보이는 바와 같이, 총량은 100 g의 fresh weight에서 0.35 ㎎정도였으며, 이중 C가 54 %, DHC가 32 %로 전체의 86 %를 차지하고 있었다. Fig. 5-3은 Table 5-1을 도식화한 것이다.

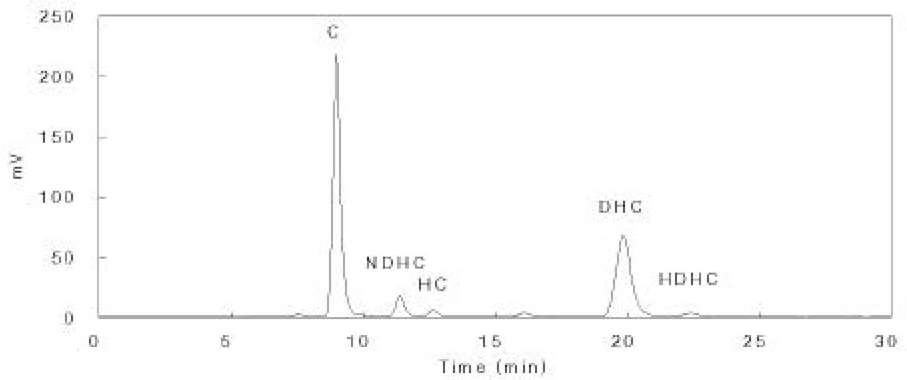


Fig. 5-1. High-performance liquid chromatography of capsaicinoids from red pepper, Bookang. Key: C, capsaicin; NDHC, nordihydrocapsaicin; HC, homocapsaicin; DHC, dihydrocapsaicin; HDHC, homodihydrocapsaicin.

Table 5-1. Summary of amounts of several capsaicinoids found in a Red pepper, Bookang. The results presented represent the mean ± S.D. of three different experiments.

Capsaicinoids	㎎/100 g fresh weight	%a
Capsaicin	0.190 ± 0.017	54.0
Nordihydrocapsaicin	0.029 ± 0.004	8.2
Homocapsaicin	0.008 ± 0.002	2.3
Dihydrocapsaicin	0.112 ± 0.008	31.8
Homodihydrocapsaicin	0.013 ± 0.001	3.7
Sum	0.352 ± 0.020	100.0

a represents ratio to a total amount.

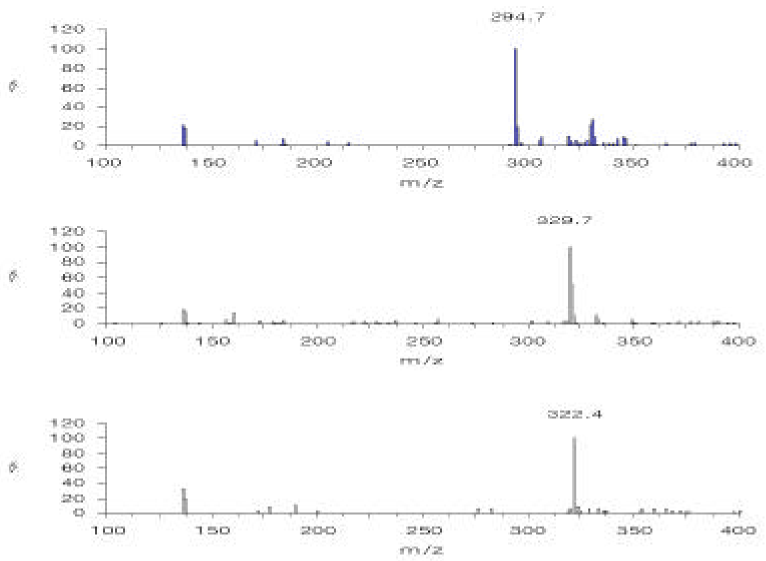


Fig. 5-2. Electrospray ionization mass spectrum of each capsaicinoids obtained from Red pepper, Bookang. Top, Nordihydrocapsaicin; middle, homocapsaicin; under, homodihydrocapsaicin

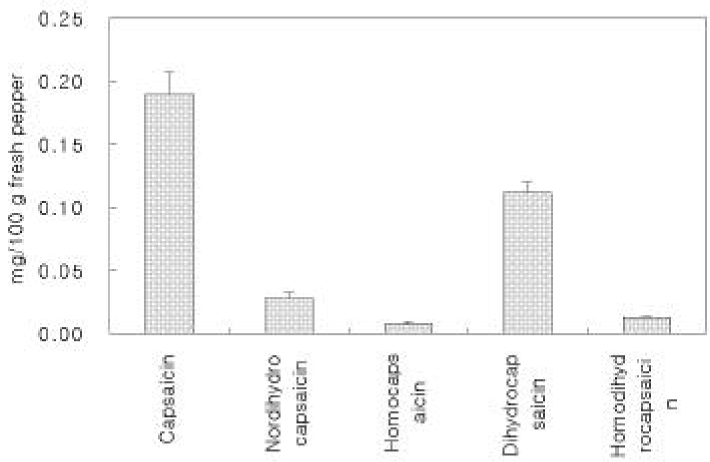


Fig. 5-3. HPLC assay of natural capsaicinoids preparation. Results are the mean ± S.D. from three different experiments.

나) 유리 아미노산의 추출및 동정

아미노산의 추출에는 0.1 N HCl과 30 % methanol이 들어 있는 0.1 N HCl을 사용하였다. 두 방법의 차이는 없었으며, homogenization을 1분이상 하여도 추출은 더 이상 이루어지지 않았다. 분석은 physiological sample 전용 30 ㎝ column을 사용하였다. Fig. 5-4에서 보는 바와 같이 20 가지의 아미노산 모두 하나의 크로마토그램상에서 분리가 이루어졌다. 총 아미노산양은 100 g의 fresh weight에서 1.0 g정도로, 이중에서 아스파라긴과 글루타민이 전체의 40 %이상을 차지하고 있었다 (Table 5-2 and Fig. 5-5).

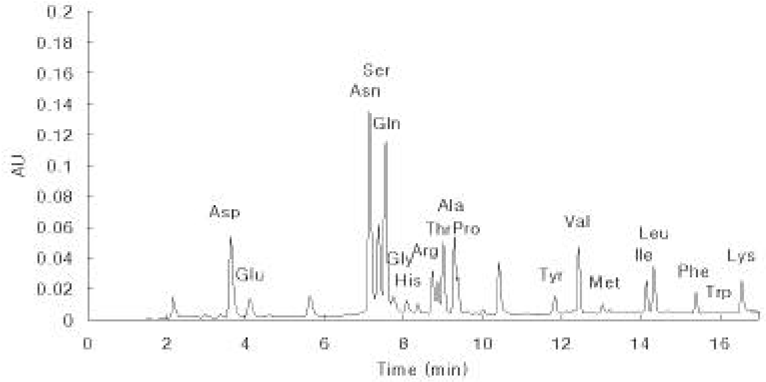


Fig. 5-4. High-performance liquid chromatogram of free amino acids extracted from red pepper, Bookang.

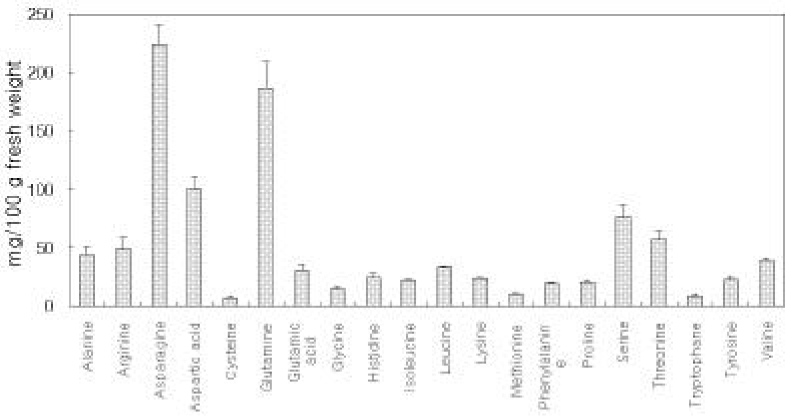


Fig. 5-5. Free amino acids found from red pepper, Bookang. Results are the mean ± S.D. from three different experiments.

다) 색소의 추출및 동정

일반고추와 동결건조하여 분말로 만든 고추, 두가지 모두에서 색소를 추출하여 보았다. Acetone이나 70% 혹은 100% methanol 모두가 일반고추로부터는 색소를 완벽하게 추출하지 못하였다. 계속하여 10회 이상 용매를 갈아주면서, 혹은 밤새 0℃에서 추출하여 보았으나 결과는 유사하였다. 색소는 산화에 매우 약하기 때문에 가능한한 빨리 추출을 해야되므로, 결과적으로 일반 고추로부터 색소추출하는 것은 합리적이지 못하였다. 건조된 분말고추로부터는 3회만에 거의 모든 색소를 추출할 수 있었다. 추출된 색소를 가지고 350 750 ㎚에서 scanning하였다. 여기에는 보이지 않았지만 엽록소에서 특징적으로 나타나는 670 ㎚부근에서의 peak은 나타나지 않았다. 이를 가지고 Lichtenthaler (1987)의 방법에 따라 총 색소량을 계산한 결과, 엽록소는 50 ㎍/100 g fresh weight정도 있는 것으로, 또 카로티노이드는 약 21 ㎎정도인 것으로 나타났다 (Table 5-3). 이를 HPLC를 이용하여 분석하자 약 50여개의 카로티노이드 peak이 나타났고, 이 중 peak 면적이 5 %이상되는 major peak이 7개, 1 5 %가 15개, 그리고 1 %이하가 20여개로 나타났다 (Fig. 5-6). Major peak중 β-carotene은 표준물질을 이용하여 동정하고 정량하였다. β-carotene은 약 0.4 ㎎/100 g fresh weight로 나타났다.

라) 비타민의 추출및 동정

아스코르빈산은 일반적인 식품분석시 사용하는 화학적인 방법 (Kim 등, 1986)을 사용하여 추출하고 정량하였다. Table 5-4에서 보는 바와 같이 B_1과 B_2는 수 ㎍/100g fresh weight였으나, 식품의 신선도나 항산화제로 사용되는 아스코르빈산은 225 ㎎정도 검출되었다.

Table 5-2. Summary of results of free amino acids extracted from a red pepper, Bookang. The results presented represent the mean ± S.D. of three different experiment.

Amino acids	mg/100 g fresh weight	%a
Alanine	44.0 ± 6.2	4.3
Arginine	49.0 ± 9.6	4.8
Asparagine	224.2 ± 16.3	22.1
Aspartic acid	100.3 ± 10.2	9.9
Cysteine	6.7 ± 1.7	0.7
Glutamine	186.6 ± 22.7	18.4
Glutamic acid	30.3 ± 4.8	3.0
Glycine	14.8 ± 1.5	1.5
Histidine	24.5 ± 3.4	2.4
Isoleucine	22.2 ± 0.3	2.2
Leucine	33.4 ± 0.4	3.3
Lysine	23.4 ± 1.2	2.3
Methionine	10.0 ± 1.4	1.0
Phenylalanine	19.2 ± 1.0	1.9
Proline	20.3 ± 1.8	2.0
Serine	76.0 ± 10.5	7.5
Threonine	57.1 ± 7.3	5.6
Tryptophan	8.1 ± 1.8	0.8
Tyrosine	22.9 ± 2.5	2.3
Valine	39.4 ± 1.8	3.9
Sum	1,012.3 ± 91.2	100.0

a represents ratio to a total amount.

Table 5-3. Total amount of several pigments measured from a red pepper, Bookang. Results are the mean ± S.D. from three different experiments.

Pigments	㎎/100 g fresh weight
Chlorophyll *a*	0.014 ± 0.001
Chlorophyll *b*	0.035 ± 0.003
Carotenoids	21.33 ± 1.210

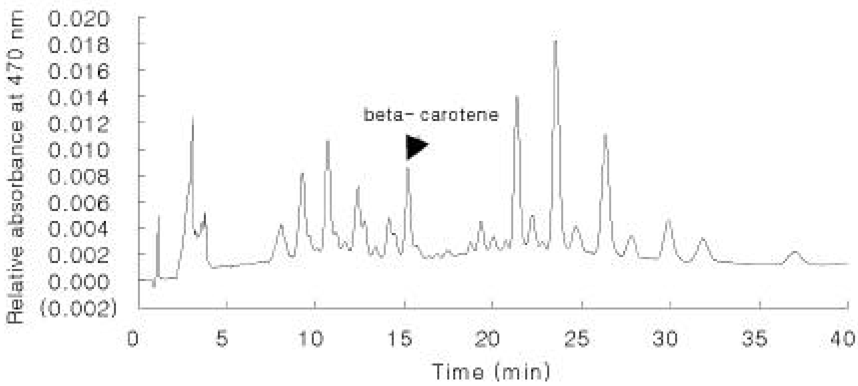


Fig. 5-6. HPLC chromatogram of pigment extract of pepper. β-carotene was identified through comparison with standard.

Table 5-4. Summary of several vitamins extracted from red pepper, Bookang. Results are the mean ± S.D. from three different experiments.

Vitamins	㎎/100 g fresh weight
B1	0.007 ± 0.000
B2	0.008 ± 0.000
C	224.8 ± 17.42

2) 캡사이시노이드와 유리 아미노산의 자동화 분석법 개발

고추의 품질에 직접적으로 관련되는 이차대사산물중, 매운맛의 캡사이시노이드, 영양과 맛에 관련되는 유리 아미노산의 2가지를 자동화 분석 개발 대상으로 설정하였다. 또한 미량 캡사이시노이드의 동정과, 동정된 각 component를 정량하였다. 개발된 방법으로 본 연구과제의 양친형인 C. annuum TF68과 C. chinens Habanero, 그리고 이들의 교배로부터 나온 F2 75 strains에서 추출한 두 가지의 고추 주요성분에 관한 자동화 분석을 실시하였다. 시료는 수확한 다음 꼭지를 떼고 -80 ℃에서 얼린 다음, 동결건조기에서 1주일 이상 건조하였다. 무게를 재서 건조중으로 하였으며, 건조된 고추를 막자사발에서 갈아 다음 실험을 실시할 때까지 -80 ℃에 보관하였다.

가) 미량 캡사이시노이드의 동정

추출한 캡사이시노이드는 질량분석을 위해서 63% methanol로 흘려주면서 분리하였다. 크로마토그램은 Attuquayefio와 Buckle (1987)의 그것과 유사하게 나

타나, 일차년도에 확인된 peaks를 제외하고 모든 peaks를 수확하여 질량을 분석하여 보았다. Fig. 5-7은 질량 분석 결과, 미량 캡사이시노이드로 감지된 peak의 스펙트럼이다. 모든 캡사이시노이드는 FAB 질량 스펙트럼 상에서 특징적으로 vanillyl amine group이 이온화되어 나오는 m/z 137이 나타났다 (Bennett과 Kirby, 1968). 따라서 m/z 137이 나오지 않은 peak은 캡사이시노이드라고 볼 수 없는 것이다. C와 DHC를 제외한 5개의 peaks에서 m/z 137을 볼 수 있었다. 질량 스펙트럼 상에서 질량은 proton이 붙은 ion의 형태, 즉 $[M+H]^+$로 나타나게 된다. 캡사이시노이드 역시 $[M+H]^+$값으로 나타났으나, 또한 전자만 떨어져 나간 $[M]^{+\cdot}$도 $[M+H]^+$의 60% 정도로 높은 값을 보여주었다. 그리고 각 캡사이시노이드에 sodium이 붙어 질량이 22가 늘어난 peak도 확인할 수 있었다. 그러나 각 스펙트럼에서 공통적으로 나타나는 m/z 154의 경우, HPLC로 peak을 분리할 때 들어간 오염물질때문인지, 질소와 산소 원자 사이의 사슬이 깨진 다음 modification이 일어나 나오는 값인지는 확인할 수 없었다. 각 질량을 확인하여 본 결과는 크로마토그램과 대부분 일치하였으나, 크로마토그램 상에서 Attuquayefio와 Buckle (1987)이 호모캡사이신 (homocapsaicin, HC)이라고 보고했던 peak에서는 HC의 $[M+H]^+$값인 320이 나오지 않았다 (결과 생략). Collins 등(1995)도 C. annuum뿐 아니라 C. chinense 등 기타 다른 종에서도 HC를 발견하지 못한 바 있다. 이는 HC가 없거나 1 ppm 이하의 극미량으로 존재하고 있다는 사실을 말해주고 있다. 캡사이시노이드는 vanillyl amine의 core structure와 탄화수소 사슬의 유사한 구조로 되어 있기 때문에 분자량이 같은 경우가 발생된다. DHC는 표준품과 비교하기 때문에 같은 분자량을 가지는 vanillyl decanamide (VD)와 구별하는 데 있어서 혼동이 없으나, 호모디히드로캡사이신 (Homodihydrocapsaicin, HDHC) I은 HDHC II은 같은 분자량을 가지면서 표준품이 없기 때문에 MS-MS 스펙트럼을 보았다 (Fig. 5-7). 질량분석을 위해 에너지를 가해 분자가 깨어지면서 나타나는 각 이온 peak은 전체 분자의 구조적인 특

성을 보여준다. Sodium iodide로 포화시킨 각 분자의 두 스펙트럼을 비교하여 보면 Fig. 5-8의 A는 m/z 286이, B는 m/z 300이 다른 이온 peak에 비하여 매우 작게 나타난 것을 볼 수 있다. 이는 해당되는 부위가 다른 group이 부가되어 해당 이온 peak이 작게 발생됨으로서 나타나는 현상으로 두 분자의 차이점은 methyl group의 위치라는 것을 알 수 있었다. 따라서 HPLC 크로마토그람상에서 나타난 캡사이시노이드는 최종적으로 모두 7가지를 보여주었으며 각각의 위치는 Fig. 5-9와 같다.

나) 자동화 분석에 따른 캡사이시노이드의 정량

자동화분석을 위해서는 한번에 많은 시료의 처리가 필수적이나, 이 경우 각각의 시료로부터 해당 산물을 추출하는 것보다는 수율이 감소하게 된다. Vortex mixer를 사용하여 추출한 캡사이시노이드는 Waring blender에서 추출한 것에 비해 약 80%의 수율을 보였다 (결과 생략). C. chinense는 C가 단연 주요 캡사이시노이드로 높게 나타났으나, C. annuum는 C못지 않게 DHC도 많은 양을 보여주었다. 정량해 보았을 때, C. chinense에서 C가 전체 캡사이시노이드의 70% 이상을 차지하였으나 C. annuum에서는 약 45%로 나타났다. C는 DHC에 비해서는 약 2배, 다른 캡사이시노이드에 비하여 10배이상의 매운 맛을 보이는 것으로 보고되어 있다 (Todd Jr. 등, 1977). 또한, 건조중에서의 전체 캡사이시노이드양도 C. chinense가 C. annuum의 30배 이상을 가지고 있었다 (Table 5-5). 이를 계산하여 볼 때, *C. chinense*는 *C. annuum*보다 100배정도 매운 맛을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 이 결과가 약 80%정도 추출된 상태에서 나온 결과임을 미루어 볼 때, 실제로는 더 큰 차이가 있을 수 있음을 예측할 수 있었다.

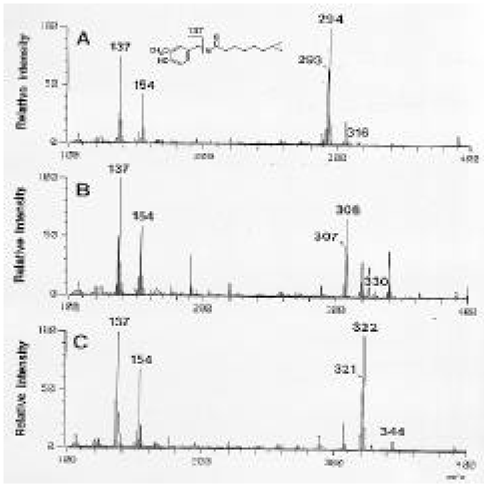


Fig. 5-7. Structure of some capsaicinoids. A) shows *m/z* 137 of vanillyl amine group of capsaicin when subjected fast-atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS), specifically. B) is HDHC to compare C) isomer of HDHC. Methyl group of HDHC tail moves to the left only one step.

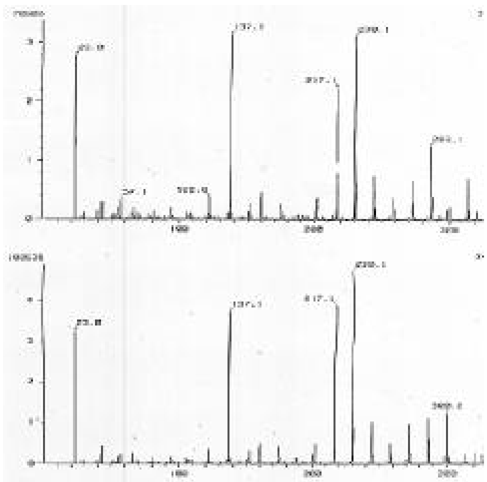


Fig. 5-8. Positive ion FAB tandem mass spectra of the sodium adduct molecular ions at *m/z* 344 of A) HDHC I and B) HDHC II.

Table 5-5에서 보이는 바와 같이, F2의 건조중 1 g당 평균 캡사이시노이드 총량은 약 3.5 ㎎이었고 최저 0.01 ㎎에서 최고 9.5 ㎎까지 나타났다. 이중 F32 (0.01)와 F55 (0.07)는 *C. annuum* (0.22)이하로, F58 (7.03)과 F80 (9.54)은 *C. chinense* 이상으로 나타났을 뿐, 캡사이시노이드 총량으로 정규분포곡선 (Bin size = 1.0)을 그려보았을 때, 거의 대부분의 F2 캡사이시노이드 총량은 정상적인 분포를 나타내었다 (Fig. 5-10). 같은 시료를 추출하고 분석하는 과정을 반복하여 실시하였을 때, 약간의 정량적인 차이는 있었으나 전체적으로 유사한 pattern을 보여주는 것으로 보아 (결과 생략) 캡사이시노이드의 자동화 분석은 성공적인 것으로 사료된다.

다) 자동화 분석에 따른 유리 아미노산의 정량

총 아미노산 량은 *C. annuum*이 건조중 1 g당 20 ㎎ 정도로, 이중에서 아스파라긴과 글루타민이 전체의 반을 차지하고 있었다 (Table 5-6). 그외 아스파르트테이트, 아르기닌 그리고 프롤린등이 기타 아미노산에 비하여 많이 나타났다. 이에 비하여 *C. chinense*는 전체 아미노산 양이 건조중 1 g당 5 ㎎ 정도로, 아스파르테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민 그리고 세린이 전체의 ⅔를 차지하고 있었다. 이같은 양은 유리 아미노산이 채소 중에서 가장 많은 콩과의 반정도이었으며, 역시 β-카로틴이 많은 당근과 유사한 양이었다 (농촌진흥청, 1991). 마늘과 같이 아르기닌이 많은 특별한 경우를 제외하고는 일반적으로 채소에서는 위의 네 가지 아미노산이 30 40%를 차지하고 있다. 이같은 결과는 이제까지 알려진 결과로 볼 때, 다른 식물종류에 비하여 매우 높은 비율로 아스파라긴, 아스파르테이트, 글루타민, 그리고 글루타메이트가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이상과 같이 매우 다량으로 존재하고 있는 것으로 나타난 네 가지 유리 아미노산은 생체 내에서 단백질합성을 비롯한 여러 대사경로의 전구물질로 사용된다. 따라서 고추는 아미노산에 관한 한 매우 고영양식물인 것을 알 수 있었다. 그러나

아미노산은 합성되는 것뿐 아니라 기존 단백질의 분해산물로도 나오기 때문에 유전적인 분석에 이 결과를 활용하기는 어려울 것이라 사료된다. 유리 아미노산 역시 같은 과정으로 추출하고 분석하였을 때, 유사한 결과를 보여줌으로서, 개발된 자동화 분석 방법은 성공적인 것으로 사료된다.

라) 성장에 따른 캡사이시노이드와 유리 아미노산의 변화

자동화된 분석방법으로 고추의 성장단계별 캡사이시노이드와 유리 아미노산의 변화를 살펴보았다. *C. annuum*을 다섯 단계중 초기와 완전 성숙단계에서 캡사이시노이드함량이 가장 높게 나타났고, 성숙 진행 단계에서는 십분의 일정도까지 감소되어 나타났다. 반복실험을 하여도 pattern은 같이 나타났다. 그러나 *C. chinense*는 일곱단계로 나누어 본 결과에서 약간의 변동은 있으나 전반적으로 성숙이 진행됨에 따라 초기의 50 70%로 감소하는 것으로 나타났다 (Table 5-7). 이러한 결과가 고추의 품종에 따른 것인지, 외부 환경, 혹은 실험상의 오차인지는 좀 더 자세한 조사가 필요한 것으로 보인다. 한편, 성숙 진행단계에 따른 캡사이시노이드의 비율은 큰 차이가 보이지 않았다. 유리 아미노산의 변화를 성장 단계별로 보았을 때는 *C. annuum*의 경우, 총량은 계속 증가하다가 완전 성숙되었을 때는 약간 감소하는 경향을 보였으며, 각각의 아미노산들도 대부분 같은 경향을 보였다 (Table 5-8). 그러나 각 아미노산들의 비율을 보았을 때, 글루타민은 초기에 많다가 계속 감소하였으며, 프롤린은 완전 성숙단계에서 초기의 10배 이상으로 증가하였다.

그외 아스파르테이트, 아르기닌등의 아미노산은 성숙 중간 단계까지 증가하다가 감소하기 시작하였다. *C. chinense*에서는 성장에 따라 변동은 있었으나 전체적으로는 성숙해 갈수록 완만한 감소를 보였다. 각각의 아미노산들의 함량과 비율도 전체적인 경향과 유사하였다.

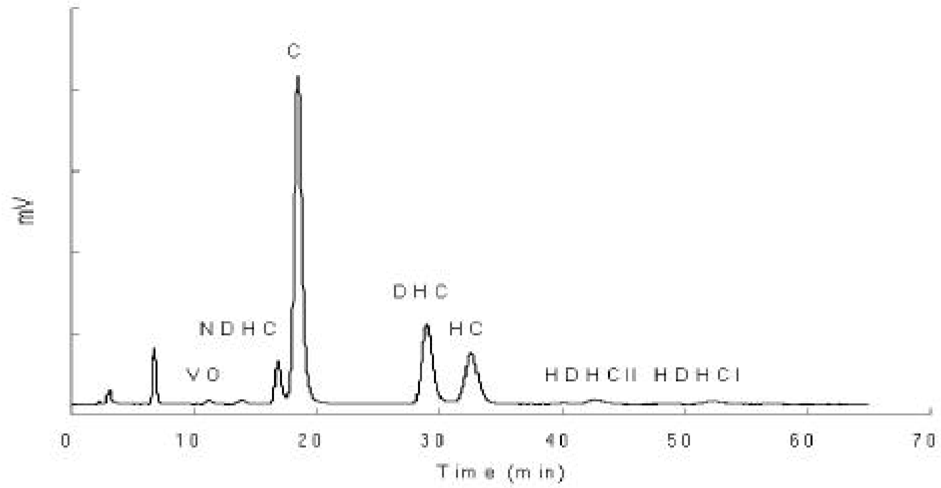


Fig. 5-9. HPLC chromatogram of capsaicinoids in the red ripe fruit of pepper cv. Bugang. Mobile phase: 63% methanol/37% water at 1 ㎖/min. Stationary phase: Nova-Pak C18 RCM 8 × 150 ㎜ size. Key: VO, vanillyl octanamide; NDHC, nordihydrocapsaicin; C, capsaicin; DHC, dihydrocapsaicin; VD, vanillyl decanamide; HC, homocapsaicin; HDHC, homodihydrocapsaicin. Peaks were identified by comparing retention times to those of standard compounds (capsaicin and dihydrocapsaicin) and by fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS).

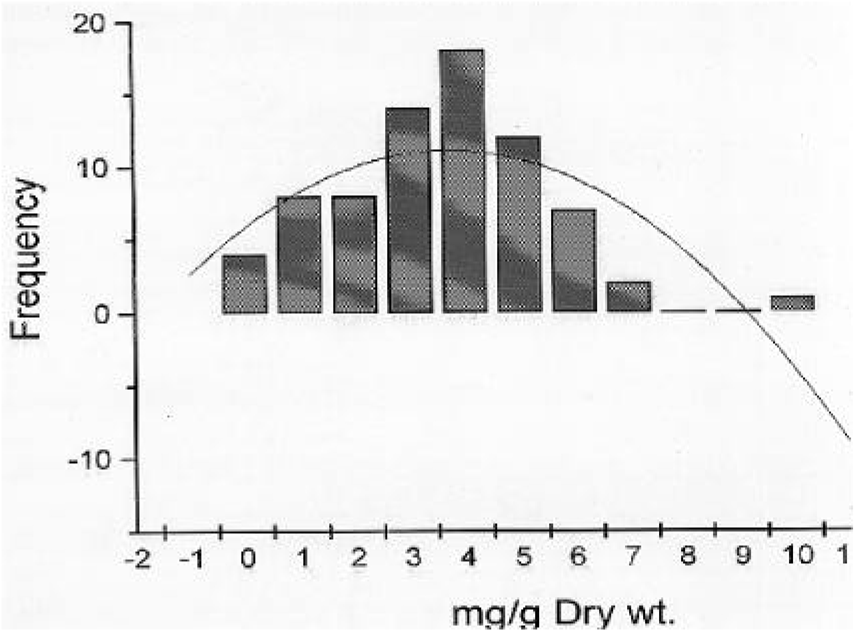


Fig. 5-10. Gaussian fit of total capsaicinoids from F2 between *C. annuum* TF68 and *C. chinens* Habanero. The fit was plotted from -0.5 to 10.5 by frequency with 1 of Bin (x).

Table 5-5. Summary of results of each capsaicinoids found in the red ripe fruit of *C. annuum* TF68, *C. chinens* Habanero and their F2. The amounts (mg/g dry wt) were measured by HPLC.

Sample name	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
C. annuum	0.00	0.03	0.10	0.07	0.01	0.00	0.01	0.22
C. chinens	0.02	0.26	4.93	1.51	0.16	0.01	0.08	6.97
F2								
1	0.00	0.05	0.63	0.24	0.02	0.00	0.02	0.96
3	0.02	0.07	3.43	1.23	0.16	0.01	0.03	4.96
4	0.02	0.16	2.00	0.72	0.20	0.00	0.05	3.16
5	0.01	0.34	1.63	1.12	0.10	0.01	0.11	3.33
6	0.05	0.24	1.48	1.78	0.35	0.01	0.05	3.96
7	0.02	0.45	1.44	0.80	0.15	0.00	0.10	2.96
8	0.13	1.16	2.01	2.06	0.63	0.04	0.19	6.20
9	0.06	0.59	1.98	1.24	0.65	0.00	0.15	4.67
10	0.01	0.04	0.23	0.17	0.08	0.00	0.01	0.53
11	0.02	0.12	3.33	1.17	0.13	0.00	0.03	4.78
12	0.01	0.32	1.89	1.23	0.07	0.00	0.08	3.60
13	0.02	0.19	1.12	0.64	0.10	0.00	0.04	2.12
15	0.00	0.11	1.63	0.53	0.05	0.00	0.03	2.35
16	0.01	0.07	0.66	0.32	0.04	0.00	0.02	1.12
17	0.01	0.15	1.65	1.14	0.05	0.00	0.03	3.04
18	0.02	0.27	2.08	0.81	0.13	0.00	0.07	3.37
20	0.02	0.24	0.98	1.03	0.20	0.01	0.08	2.55
21	0.03	0.07	1.73	0.69	0.21	0.00	0.01	2.73
22	0.01	0.07	0.70	0.51	0.12	0.01	0.03	1.45
23	0.01	0.07	1.61	0.81	0.11	0.00	0.01	2.62

Table 5-5. continued

Sample name	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
24	0.03	0.53	2.04	1.28	0.32	0.01	0.15	4.36
25	0.01	0.07	1.23	0.72	0.08	0.00	0.02	2.14
26	0.03	0.14	2.76	1.24	0.25	0.01	0.04	4.46
27	0.01	0.13	0.81	0.33	0.08	0.00	0.04	1.39
28	0.01	0.16	0.64	0.42	0.09	0.00	0.04	1.36
29	0.01	0.11	2.76	1.39	0.06	0.00	0.03	4.36
30	0.02	0.26	2.00	1.65	0.13	0.01	0.06	4.12
31	0.01	0.19	1.39	1.49	0.13	0.00	0.06	3.26
32	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01
33	0.02	0.30	2.37	1.55	0.07	0.01	0.09	4.41
34	0.01	0.05	2.39	1.45	0.06	0.00	0.02	3.99
35	0.01	0.17	1.36	1.50	0.05	0.00	0.06	3.15
37	0.01	0.24	2.28	2.30	0.13	0.01	0.10	5.06
38	0.02	0.19	0.52	0.48	0.23	0.00	0.07	1.52
39	0.03	0.31	2.51	1.62	0.29	0.00	0.12	4.88
40	0.01	0.03	0.73	0.39	0.05	0.00	0.00	1.22
41	0.04	0.08	2.16	0.95	0.26	0.01	0.02	3.51
42	0.04	0.47	2.88	1.57	0.22	0.01	0.12	5.31
43	0.01	0.04	2.01	1.24	0.07	0.00	0.02	3.39
44	0.00	0.03	2.80	1.42	0.02	0.00	0.01	4.29
45	0.02	0.27	3.44	2.63	0.12	0.02	0.10	6.60
46	0.04	0.55	2.28	2.19	0.29	0.01	0.17	5.52
47	0.01	0.18	2.06	1.66	0.06	0.00	0.07	4.03
48	0.02	0.11	1.73	0.94	0.12	0.01	0.04	2.96
49	0.01	0.05	0.18	0.14	0.03	0.00	0.02	0.43
50	0.01	0.13	2.35	0.97	0.05	0.00	0.04	3.56

Table 5-5. continued

Sample name	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
51	0.03	0.19	2.17	1.41	0.13	0.00	0.05	3.99
52	0.02	0.32	2.93	2.54	0.17	0.01	0.12	6.10
53	0.05	0.37	2.58	1.50	0.45	0.01	0.14	5.10
54	0.03	0.47	2.48	1.77	0.14	0.00	0.16	5.05
55	0.00	0.01	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.07
56	0.01	0.06	1.25	0.70	0.06	0.00	0.02	2.10
57	0.02	0.16	1.99	1.27	0.13	0.01	0.06	3.63
58	0.02	0.23	3.91	2.71	0.08	0.01	0.07	7.03
59	0.04	0.37	1.57	1.64	0.25	0.00	0.13	4.00
60	0.01	0.04	1.32	0.58	0.04	0.00	0.01	2.00
62	0.02	0.22	1.37	0.72	0.11	0.00	0.08	2.52
63	0.07	0.84	2.10	2.04	0.31	0.06	0.22	5.63
64	0.04	0.11	1.17	1.08	0.15	0.01	0.04	2.60
65	0.01	0.03	3.17	1.33	0.03	0.00	0.01	4.59
66	0.01	0.20	2.08	1.96	0.05	0.01	0.06	4.37
68	0.02	0.10	2.98	2.28	0.15	0.01	0.04	5.59
69	0.00	0.06	0.33	0.24	0.01	0.00	0.02	0.67
70	0.02	0.25	3.30	2.27	0.15	0.01	0.10	6.10
71	0.02	0.33	3.04	1.44	0.12	0.01	0.12	5.07
72	0.01	0.15	2.89	1.50	0.05	0.00	0.06	4.67
74	0.01	0.28	0.67	1.23	0.05	0.00	0.09	2.33
75	0.02	0.34	1.64	1.80	0.20	0.01	0.15	4.15
76	0.01	0.03	2.48	1.16	0.02	0.00	0.01	3.70
77	0.00	0.02	0.14	0.08	0.01	0.00	0.01	0.26
78	0.03	0.46	2.38	2.23	0.26	0.01	0.18	5.52
80	0.05	0.98	5.23	2.70	0.29	0.01	0.29	9.54
95	0.03	0.15	3.56	1.49	0.15	0.01	0.05	5.44
96	0.01	0.14	1.35	0.77	0.06	0.00	0.06	2.39
max	0.13	1.16	5.23	2.71	0.65	0.06	0.29	9.54
mean	0.02	0.22	1.91	1.21	0.14	0.01	0.07	3.57
min	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01

Table 5-6. Amounts of each free amino acid found in the red ripe fruit of *C. annuum* TF68, *C. chinens* Habanero and their F2. The amounts (mg /g dry wt) were measured by Pico-Tag method.

Name	C	D	E	N	S	Q	G	H	R	T	A	P	Y	V	M	C2	I	L	F	W	K	Total
C. annuum	0.2	1.8	1.0	7.5	0.8	2.5	0.0	0.4	1.8	1.0	0.4	1.7	0.2	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.2	0.3	20.8
C. chinens	0.0	0.7	0.7	0.5	0.7	0.4	0.0	0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	4.7
F2																						
1	0.2	2.1	0.5	3.2	1.0	1.3	0.0	0.2	0.4	0.9	0.5	0.4	0.2	0.5	0.4	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.1	13.4
3	0.4	5.6	0.9	5.0	2.1	2.0	0.2	1.0	1.1	2.2	1.5	0.6	0.5	1.0	0.5	0.2	0.4	0.7	0.9	0.3	0.3	27.3
4	0.2	1.7	0.7	6.1	1.4	1.5	0.2	0.6	1.1	1.3	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	17.9
5	0.0	0.5	0.4	2.4	0.3	0.3	0.0	0.3	0.2	0.3	0.1	0.4	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	6.5
6	0.2	1.5	0.4	5.2	0.7	2.5	0.0	0.5	1.6	1.1	0.3	0.7	0.2	0.3	0.4	0.1	0.1	0.4	0.4	0.1	0.1	16.9
7	0.2	2.3	0.7	6.0	1.6	2.2	0.0	1.0	1.0	1.7	0.6	0.6	0.5	0.7	0.5	0.2	0.3	0.7	0.7	0.2	0.2	22.0
8	0.1	2.0	1.8	8.4	1.8	1.3	0.2	0.9	1.9	1.8	0.8	1.7	0.3	0.7	0.4	0.2	0.4	0.8	1.0	0.2	0.3	27.2
9	0.2	1.8	0.6	5.3	0.7	2.4	0.0	0.2	0.3	0.6	0.2	0.8	0.3	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0.8	0.2	0.1	15.9
10	0.1	0.8	0.4	1.0	0.6	0.5	0.1	0.1	1.1	0.6	0.3	0.6	0.2	0.4	0.4	0.1	0.2	0.6	0.3	0.1	0.2	8.6
11	0.1	0.9	1.0	4.4	0.4	0.5	0.2	0.4	1.1	0.9	0.3	0.7	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	13.2
12	0.1	1.9	0.7	5.8	1.1	1.3	0.1	0.3	0.3	0.9	0.5	0.3	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	15.1
13	0.1	0.5	0.3	1.7	0.4	0.8	0.0	0.1	0.3	0.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.3	0.1	0.0	5.8
15	0.1	1.9	1.0	5.3	1.1	0.8	0.2	0.9	0.7	1.6	0.6	0.6	0.3	0.5	0.3	0.1	0.2	0.4	0.4	0.1	0.1	17.1
16	0.2	1.7	0.2	4.4	1.0	2.2	0.0	1.0	0.8	1.4	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3	0.1	0.3	0.4	0.4	0.1	0.2	16.4
17	0.1	0.7	1.5	3.2	0.7	0.7	0.2	0.8	0.7	0.5	0.7	1.0	0.2	0.3	0.2	0.0	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	12.2
18	0.1	1.5	0.8	1.9	0.6	0.6	0.2	0.9	0.7	0.9	0.3	0.7	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.6	0.1	0.1	11.4
20	0.2	1.7	1.1	7.8	1.5	2.7	0.2	0.6	2.2	1.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.7	0.1	0.3	22.9
21	0.1	1.1	1.0	3.3	0.4	0.6	0.1	0.2	0.6	0.6	0.2	0.7	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	0.3	0.4	0.1	0.1	10.8
22	0.2	2.4	0.9	6.5	1.7	1.9	0.3	1.2	1.5	2.0	0.7	0.7	0.4	0.7	0.5	0.2	0.4	0.9	0.6	0.2	0.4	24.3
23	0.1	2.4	0.6	3.1	1.1	1.7	0.0	0.6	1.0	1.2	0.6	0.3	0.3	0.5	0.4	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	15.1
24	0.2	3.9	1.2	8.5	1.2	2.8	0.2	1.0	0.9	1.6	0.5	0.4	0.4	0.7	0.4	0.3	0.3	0.8	0.5	0.1	0.2	26.1
25	0.3	2.0	0.9	6.5	1.5	4.1	0.0	1.0	1.8	1.5	0.5	0.7	0.4	0.6	0.4	0.3	0.3	0.7	0.8	0.2	0.3	24.8
26	0.3	1.5	1.4	2.6	0.8	0.5	0.1	0.2	0.8	1.0	0.8	2.6	0.4	0.9	0.6	0.2	0.6	1.4	0.9	0.2	0.5	18.5
27	0.1	1.6	0.7	3.7	1.3	1.5	0.0	0.8	1.1	1.2	0.6	0.6	0.3	0.5	0.4	0.2	0.2	0.5	0.5	0.2	0.2	16.3
28	0.2	2.2	1.7	7.5	1.5	3.4	0.0	0.8	1.5	1.5	1.0	0.7	0.3	0.7	0.3	0.1	0.3	0.5	0.9	0.2	0.2	25.4
29	0.2	2.3	0.4	2.5	1.1	1.2	0.0	0.5	0.6	1.2	0.9	1.2	0.3	0.6	0.4	0.2	0.3	0.5	0.6	0.2	0.1	15.0
30	0.1	1.4	0.5	3.2	0.5	1.4	0.0	0.1	0.2	0.5	0.2	0.7	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.7	0.1	0.1	11.4
31	0.2	2.1	0.2	5.3	1.2	2.1	0.0	1.1	1.4	1.7	0.5	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1	0.2	0.4	0.8	0.1	0.2	19.1
32	0.2	1.1	0.5	4.7	0.3	2.0	0.0	0.7	0.4	0.7	0.1	0.7	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	1.0	0.1	0.0	13.6
33	0.2	1.3	1.9	7.0	1.1	2.0	0.0	0.7	1.6	1.3	0.8	0.8	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	21.0
34	0.1	2.2	0.5	5.6	1.5	0.7	0.2	0.9	0.9	1.8	0.8	0.5	0.2	0.5	0.3	0.2	0.3	0.4	0.6	0.2	0.2	18.5
35	0.1	1.5	0.2	5.3	0.8	0.6	0.1	0.4	0.8	1.7	0.3	0.6	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	14.3
37	0.2	1.1	1.3	5.4	1.1	3.2	0.0	0.6	0.8	1.3	0.6	0.2	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	18.0
38	0.7	7.0	1.7	14.0	3.5	4.4	0.6	1.7	1.9	4.8	2.4	1.4	0.9	1.7	0.7	0.3	1.2	2.3	1.2	0.4	1.0	53.5
39	0.2	1.2	1.1	6.1	0.5	1.6	0.0	0.2	0.3	0.6	0.3	1.3	0.1	0.3	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	15.2
40	0.4	2.4	0.9	3.4	0.8	1.4	0.3	0.8	1.3	2.1	1.1	1.3	0.6	1.3	0.8	0.2	0.8	1.7	1.0	0.3	0.5	23.6

Table 5-6. continued

Name	C	D	E	N	S	Q	G	H	R	T	A	P	Y	V	M	C2	I	L	F	W	K	Total
41	0.3	4.3	1.6	12.1	1.3	4.0	0.0	1.2	2.5	1.5	0.7	0.7	0.3	0.6	0.4	0.3	0.3	0.6	0.6	0.4	0.3	34.2
42	0.2	3.2	2.2	9.7	1.2	3.0	0.2	1.0	2.2	1.7	1.0	0.6	0.2	0.8	0.3	0.3	0.4	0.5	0.6	0.2	0.4	30.1
43	0.3	1.7	1.1	4.0	0.8	1.9	0.0	0.7	1.0	2.0	0.7	0.8	0.3	1.0	0.6	0.1	0.3	0.6	0.7	0.2	0.2	19.1
44	0.1	1.1	0.5	0.8	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.5	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.2	0.1	6.6
45	0.3	6.5	1.4	18.2	2.1	6.3	0.0	1.0	2.2	2.4	1.0	0.5	0.4	0.7	0.4	0.4	0.2	0.6	0.8	0.4	0.4	46.2
46	0.3	4.5	1.0	10.0	1.1	3.1	0.0	1.0	0.9	2.3	0.8	0.6	0.4	0.7	0.4	0.1	0.3	0.6	0.9	0.2	0.2	29.6
47	0.1	2.5	0.6	4.0	0.8	1.7	0.0	0.5	0.9	1.3	0.8	1.3	0.1	0.3	0.4	0.2	0.2	0.5	0.4	0.1	0.1	16.9
48	0.4	2.6	1.4	8.6	1.7	4.2	0.0	1.0	1.3	1.7	1.2	0.8	0.2	0.5	0.3	0.2	0.2	0.4	0.5	0.2	0.2	27.6
49	0.2	3.2	0.8	8.3	0.6	2.7	0.0	0.9	1.7	1.2	0.4	1.5	0.3	0.4	0.3	0.1	0.2	0.5	0.9	0.2	0.2	24.5
50	0.2	1.8	0.9	4.4	0.6	1.2	0.0	0.6	1.4	1.1	0.4	0.7	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.6	0.4	0.1	0.1	15.7
51	0.0	0.9	0.4	1.6	0.3	0.4	0.1	0.6	0.5	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	6.3
52	0.4	2.8	1.2	6.2	1.6	3.0	0.0	0.9	1.6	1.4	0.8	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1	0.2	0.6	0.4	0.2	0.2	23.4
53	0.2	2.0	0.5	2.9	0.9	2.0	0.0	0.2	0.2	0.7	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	11.2
54	0.3	3.6	1.9	7.5	0.8	2.2	0.0	0.6	0.7	1.3	0.4	1.2	0.2	0.4	0.5	0.1	0.1	0.4	0.5	0.0	0.0	22.6
55	0.2	2.2	0.5	4.8	0.9	1.8	0.3	0.9	0.8	1.6	1.0	0.8	0.5	1.1	0.3	0.1	0.8	1.4	0.8	0.1	0.5	21.3
56	0.3	2.5	1.2	4.8	1.2	1.9	0.0	1.0	1.0	2.3	1.0	0.5	0.2	0.5	0.3	0.1	0.2	0.4	0.2	0.1	0.0	19.7
57	0.1	0.9	0.6	3.5	0.5	0.8	0.0	0.2	0.8	0.7	0.2	0.3	0.1	0.3	0.2	0.0	0.1	0.1	0.5	0.1	0.0	10.1
58	0.1	1.7	0.8	1.6	0.3	0.4	0.0	0.1	0.1	0.4	0.2	0.9	0.1	0.2	0.2	0.0	0.1	0.1	0.3	0.1	0.0	7.6
59	0.4	4.2	2.2	13.5	0.9	2.8	0.0	0.6	1.0	1.8	1.2	0.6	0.2	0.6	0.5	0.1	0.2	0.5	0.4	0.1	0.0	31.9
60	0.5	4.9	1.9	11.9	1.6	5.6	0.0	0.9	2.5	2.7	1.3	0.6	0.3	0.7	0.7	0.1	0.3	0.4	0.3	0.1	0.0	37.1
62	0.2	1.9	0.5	4.9	0.9	1.4	0.0	0.3	0.2	1.3	0.5	1.3	0.1	0.5	0.3	0.1	0.2	0.4	0.5	0.1	0.0	15.7
63	0.5	7.1	2.3	11.3	1.8	4.9	0.0	0.6	0.7	2.0	0.6	0.3	0.2	0.5	0.5	0.1	0.2	0.4	0.4	0.0	0.0	34.6
64	0.4	2.4	1.4	6.1	1.0	2.0	0.0	0.5	1.2	1.4	0.8	1.0	0.5	0.7	0.9	0.2	0.4	0.9	1.1	0.0	0.1	22.8
64-1	0.1	0.9	0.8	2.2	1.0	0.5	0.1	0.1	0.3	1.2	0.6	0.4	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	0.0	0.1	10.1
65	0.0	1.3	0.5	2.8	1.1	0.8	0.1	0.6	0.4	0.7	0.6	0.2	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	10.4
68	0.1	2.2	1.4	4.2	1.1	0.7	0.1	0.3	0.2	1.3	0.9	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	13.9
69	0.2	1.7	0.2	4.7	0.5	1.6	0.1	0.3	0.6	1.2	0.3	0.2	0.1	0.4	0.2	0.0	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2	13.4
70	0.3	1.5	1.1	3.3	0.9	1.5	0.0	0.2	0.6	1.4	0.3	0.2	0.1	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	13.2
71	0.1	1.3	1.8	2.3	0.6	0.7	0.2	0.8	0.6	1.2	0.6	0.6	0.3	0.6	0.3	0.1	0.3	0.7	0.3	0.1	0.1	13.8
72	0.2	2.9	1.2	5.9	1.4	1.6	0.0	0.8	0.8	1.5	0.9	2.0	0.2	0.7	0.3	0.1	0.3	0.6	0.7	0.3	0.2	22.7
74	0.1	1.0	0.8	3.8	0.7	0.5	0.2	0.8	0.6	1.1	0.5	0.7	0.3	0.6	0.3	0.1	0.4	0.8	0.9	0.1	0.1	14.4
75	0.1	3.2	1.8	7.8	1.0	1.2	0.1	0.4	0.4	1.3	0.6	2.1	0.3	0.5	0.3	0.1	0.3	0.6	0.8	0.1	0.2	23.3
76	0.2	2.0	1.1	3.0	1.2	0.3	0.0	0.3	0.6	1.2	0.8	0.5	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.4	0.6	0.1	0.1	13.8
77	0.2	4.0	1.2	9.3	0.8	1.3	0.2	1.1	1.3	1.6	0.7	0.5	0.3	0.5	0.3	0.1	0.3	0.7	0.5	0.3	0.0	25.2
78	0.2	2.4	0.8	8.7	1.3	1.8	0.0	0.9	0.9	1.2	0.6	1.0	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.7	0.2	0.1	22.4
80	0.1	1.1	1.1	4.4	0.5	1.5	0.0	0.8	0.7	0.9	0.4	0.7	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.6	0.1	0.0	14.4
95	0.2	3.6	1.9	4.9	1.3	1.4	0.0	0.5	0.7	1.7	0.8	0.4	0.1	0.6	0.5	0.1	0.2	0.5	0.5	0.1	0.0	20.2
96	0.1	0.9	1.0	1.8	0.6	0.5	0.8	0.3	0.7	1.1	0.6	0.8	0.2	0.6	0.7	0.1	0.3	0.7	0.3	0.0	0.0	12.2
mean	0.2	2.3	1.0	5.6	1.0	1.8	0.1	0.6	0.9	1.3	0.6	0.7	0.3	0.5	0.4	0.1	0.3	0.5	0.5	0.1	0.2	19.1
max	0.7	7.1	2.3	18.2	3.5	6.3	0.8	1.7	2.5	4.8	2.4	2.6	0.9	1.7	0.9	0.4	1.2	2.3	1.2	0.4	1.0	53.5
min	0.0	0.5	0.2	0.8	0.3	0.3	0.0	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	5.8

Table 5-7. The occurrence of each capsaicinoids of *C. annuum* TF68, *C. chinens* Habanero and their F2 according to growth stage. The amounts (㎎/g dry wt) were measured by HPLC.

Sample and Growth stage	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
C. annuum								
1	0.00	0.00	0.16	0.07	0.01	0.00	0.00	0.24
2	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02
3	0.00	0.00	0.07	0.05	0.00	0.00	0.00	0.12
4	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04
5	0.00	0.00	0.20	0.08	0.00	0.00	0.00	0.28
C. chinens								
1	0.02	0.16	10.72	3.89	0.14	0.01	0.01	14.95
2	0.05	0.17	9.67	4.09	0.15	0.00	0.05	14.18
3	0.02	0.12	9.96	4.00	0.14	0.01	0.01	14.26
4	0.04	0.11	7.60	3.01	0.16	0.04	0.04	11.00
5	0.01	0.28	7.60	2.94	0.33	0.01	0.05	11.22
6	0.02	0.13	5.45	2.00	0.11	0.18	0.05	7.94
7	0.03	0.18	6.96	2.65	0.20	0.00	0.02	10.04

Table 5-8. Amounts of each free amino acid of *C. annuum* TF68, *C. chinens* Habanero and their F2 according to growth stage. The amounts (㎎/g dry wt) were measured by Pico-Tag method.

Sample and Growth stage	C	D	E	N	S	Q	G	H	R	T	A	P	Y	V	M	C2	I	L	F	W	K	Total
C. annuum																						
1	0.0	0.3	0.2	1.5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	5.2
2	0.0	0.5	0.5	2.8	0.5	0.5	0.1	0.5	0.6	0.3	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	8.8
3	0.0	1.2	0.8	3.8	0.8	0.8	0.1	0.4	1.5	0.4	0.3	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	12.1
4	0.0	1.2	1.1	4.8	0.9	0.9	0.1	0.6	1.7	0.6	0.4	0.2	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	14.9
5	0.0	0.8	0.6	3.8	0.4	0.4	0.1	0.5	0.8	0.6	0.3	1.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	10.8
C. chinens																						
1	0.0	1.2	0.9	2.2	0.7	1.7	0.1	0.2	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	9.1
2	0.1	2.7	2.0	6.3	1.5	5.2	0.1	0.5	0.7	0.9	0.8	0.2	0.4	0.7	0.1	0.0	0.2	0.4	0.1	0.6	0.3	23.6
3	0.0	1.5	0.9	3.2	1.6	2.1	0.1	0.6	0.5	0.6	0.6	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.6	0.2	13.6
4	0.1	2.2	1.1	3.3	3.0	1.8	0.1	0.4	0.8	1.9	0.8	0.3	0.3	0.6	0.2	0.1	0.5	0.0	0.0	0.6	0.3	18.1
5	0.0	0.6	0.3	0.6	0.7	0.4	0.0	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.4	0.1	4.4
6	0.0	1.6	0.9	2.4	2.1	1.5	0.1	0.6	0.6	1.0	0.4	0.3	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.0	0.0	0.5	0.1	13.7
7	0.0	2.2	0.9	3.0	2.3	0.7	0.2	0.4	0.6	1.6	0.6	0.1	0.3	0.1	0.2	0.1	0.4	0.0	0.0	0.5	0.1	14.5

3) 아스코르브산과 카로티노이드의 자동화 분석법

고추시료가 여름에 수확되기 때문에 아스코르브산의 분석법 개발을 위한 고추 시료는 제 2 차년도 분석법 개발에 이용됫던 것(총 76 개 시료)을 이용했으며 카로티노이드 분석법은 제 3 차년도(1998년도) 여름에 수확된 고추시료(총 91 개 시료)를 이용했다. 또한 제 2 차년도(1997년도)에서 개발된 분석법을 이용해 대량 시료의 캡사이시노이드를 분석했다.

가) 아스코르브산 분석

추출된 아스코르브산은 역상 크로마토그래피에 의하여 신속하게 분리되었다. 개발된 자동화 분석법에 의해 분석한 결과는 Table 5-9에서 보는 바와 같다. F1으로 이용된 *C annuum*과 *C. chinens*의 아스코르브산 함량은 각각 6.4 8.6이었으며 이것은 5.55로 나타난 평균치보다 높은 함량을 보였다. 하지만 F2 중에서 가장 높은 함량은 보인 것은 21번 시료로서 10.28를 보였고 반면에 35번 시료의 경우 본 분석법에 의해 분석할 수 없는 아주 낮은 함량을 나타내기도 했다. 또한 F1인 *C. annuum*와 *C. chinens*의 생장에 따른 아스코르브산 함량의 변화를 분석했다. Table 5-10에서 보는 바와 같이 *C. annuum*은 고추의 생장에 따라 함량의 변화를 보였는데 생장의 중간시점에서 가장 많은 함량을 나타냈다. *C. chinens*의 경우 고추의 생장에 따라 아스코르브산 함량에는 변화가 없었지만 모든 시기에서 *C. annuum*보다 아주 높은 함량을 나타냈다.

나) 카로티노이드 분석

카로티노이드 분석을 위해 이용된 고추 시료는 당해 연도인 3 차년도 여름에 수확된 것으로 F1인 *C. annuum*, *C. chinens* 및 89 개의 F2 시료를 이용했다. 카로티노이드는 식물에서 수백여 종류가 알려져 있으나 고추의 경우 Fig 5-11에서

Table 5-9. Ascorbic acid composition of F2 hybrids of *C. annuum*, and *C. chinens*. (unit : mg/g dry weight)

sample	ascorbic acid	sample	ascorbic acid
C. annuum	6.4	41	3.5
C. chinens	8.6	42	5.1
1	5.5	43	5.7
3	6.8	44	9.4
4	1.6	45	4.1
5	7.1	46	1.3
6	5.9	47	3.0
7	3.0	48	3.9
8	7.1	49	7.8
9	6.3	50	8.4
10	7.4	51	7.4
11	9.5	52	6.8
12	2.8	53	7.1
13	5.3	54	6.0
15	5.1	55	2.6
16	0.7	56	3.3
17	7.2	57	6.4
18	8.8	58	6.9
20	7.0	59	8.3
21	10.3	60	6.8
22	7.2	62	2.1
23	5.7	63	3.9
24	6.5	64	8.5
25	5.9	65	6.1
26	4.1	66	3.1
27	6.1	68	5.2
28	8.8	69	3.8
29	2.8	70	1.9
30	7.9	71	7.0
31	0.1	72	7.6
32	9.4	74	7.1
33	6.6	75	5.4
34	1.6	76	5.5
35	0.0	77	6.6
37	8.2	78	6.4
38	0.8	80	5.8
39	4.1	95	5.3
40	5.2	96	7.2
maximum		**10.28**	
minimum		**0.00**	
average		**5.55**	

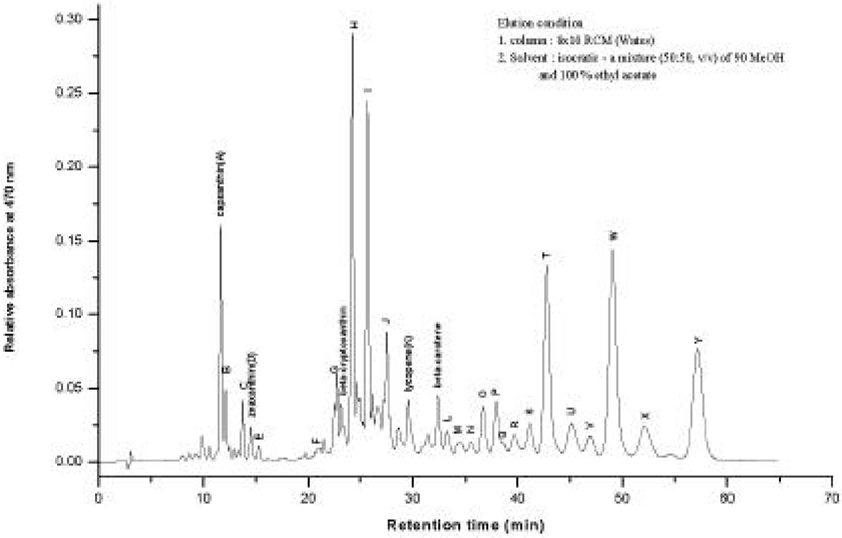


Fig. 1. Elution profile of carotinoids isolated from red pepper.

Fig. 5-11. Elution profile of carotenoids extracted from red pepper fruits.

보는 바와 같이 약 50 여 종류가 있는 것으로나타났다. 하지만 상업적으로 구입할 수 있는 카로티노이드의 표준 물질은 β-carotene, lycopene 등 2 종류만 가능하기 때문에 F2 에서 함량변화가 있는 26개의 카로티노이드를 선택해 분석했다. Table 5-11에서 보는 바와 같이 26 개 카로티노이드의 함량은 표준물질이 없어 HPLC에서 분석된 integration area로 표시 했다.

최근 스위스에 있는 Roche라는 회사에서 4 개의 표준물질을 공급받아 현재 본 연구그룹에서 보유하고 있는 표준물질은 capsorubin, capsanthin, zeaxanthin, β-carytoxanthin, lycopene, β-carotene 등 6 개로서 이들을 HPLC를 이용해 분석해 본 결과 총 91 개 시료 중 capsorubin, β-carytoxanthin은 발견할 수 없었다.

Table 5-10. Changes of total ascorbic acid amount according to growth stages in *C. annuum* and *C. chinens*. (unit : mg/g dry weight)

stage	***C. annuum***	***C. chinens***
1	2.3	9.7
2	2.8	10.4
3	6.0	9.6
4	5.2	10.6
5	4.0	9.4
6		10.5
7		9.7

따라서 나머지 4 개의 카로티노이드 표준물질을 HPLC를 통해 분석한 26 개 카로티노이드와 비교 분석한 결과 A는 capsanthin, D는 zeaxanthin, 그리고 K는 lycopene으로 판명되었다. 하지만 아직까지 26 개 카로티노이드 중 22 개가 규명되지 않았기 때문에 편의상 β-carotene을 제외한 모든 카로티노이드를 alphabet으로 표기했다.

26 개 카로티노이드를 상대적 integration area로 표시해본 결과 Table 5-12에서와 같이 대부분 3,000이하의 integration area의 그룹에 해당했다. 3,000 - 6,000 그룹의 카로티노이드에는 G, J, N, O, Q, S, T, K 등 8 개가 포함되었으며 12,000 - 15,000 그룹에도 H, R 등 2 개의 카로티노이드가 포함됐다. 이러한 결과는 아직까지 규명되지 못하고 있으나 고추의 주요 카로티노이드 성분을 차지하는 I, U, H, R 등의 규명이 필요한 것으로 생각된다. 또한 F1인 *C. annuum*와 *C. chinens*의 생장 단계에 따라 카로티노이드의 성분 변화를 분석했다. Table 5-13에서 보는 바와 같이 *C. annuum*의 경우 대부분의 카로티노이드는 생장이 진행됨에 따라 함량이 증가했으나 B만이 감소하는 현상을 보였다. 흥미롭게도 *C. chinens*는 생장이 진행됨에 따라 대부분의 카로티노이드가 감소하는 경향을 보였다.

다) 캡사이시노이드 분석

제 3 단계에서의 캡사이시노이드 분석은 제 2 차년도 개발한 분석법을 이용해 대량의 시료를 분석하는 단계다. Table 5-14에서 보는 바와 같이 총 91 개의 시료를 VO, NDHC, C, DHC, VD, HDHC II, HDHC I 등 7 가지로 나누어 분석했다. 흥미로운 것은 F1에 해당하는 *C. annuum*, *C. chinens*가 각각 0.33, 13.43의 총 캡사이시노이드 함량을 보였는데 F2 에서는 최고 39.4 까지 증가한 개체가 나타났다. 이것은 F1의 교잡을 통해 맵지 않은 것부터 아주 매운 고추까지 다양한 F2를 만들 수 있음을 보여주고 있다. 또한 고추의 생장 단계에 따른 총량을 비교하면 Table 5-15에서 보는 바와 같다. *C. annuum*은 초기에 캡사이시노이드가 거의 존재하지 않지만 제 2 단계에서 급격히 증가하고 이어서 단계적으로 감소하는 현상을 보였다. 하지만 *C. chinens*는 전 단계에서 비슷한 함량을 보였다.

Table 5-11. Composition of carotinoids isolated from F2 hybrids of *C. annuum*, and *C. chinens*. A, D and K represent capsanthin, zeaxanthin and lycopene, respectively. Area for 10 μg of A, D, K and β-carotene is 55896, 50742, 38160, and 53693, respectively. (unit : relative area/ 0.1 g dry wt)

sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I
C. annuum	1051	199	257	458	17	124	852	2563	3266
C. chinens	165	233	266	266	106	572	942	1616	1132
3	6336	867	2082	1344	278	500	8316	19067	13784
4	489	33	150	123	130	254	1635	2089	654
5	11851	345	2819	1285	856	1267	7296	18124	13758
8	1761	103	415	290	135	612	1728	6265	1828
9	6213	613	1387	1161	408	373	2501	5993	3236
10	24299	504	4397	4881	1018	2669	15178	34988	9184
11	11689	1591	1767	2885	379	1102	3790	13766	4866
12	4863	157	2049	182	69	735	5317	9961	8306
13	7220	2289	971	680	95	1090	6036	14737	6231
15	4785	137	1100	274	47	448	1045	5977	4211
16	869	116	1050	278	69	2224	2215	11715	18047
23	30418	804	3892	1531	307	717	13317	29823	15454
24	1147	228	204	262	66	50	593	2049	1279
25	5162	93	1663	303	126	951	4890	10366	5580
26	0	4407	0	2203	243	174	6562	24262	16252
27	16152	475	3656	2393	897	1428	9080	20686	2736
28	20122	708	6037	3674	1524	459	13668	26999	8798
30	14745	304	2304		518	562	5412	11281	7291
33	24853	591	4673	3105	1075	2033	14588	31218	19293
34	13331	605	4695	0	603	674	1716	8234	4802
35	2225	121	482	416	426	500	870	3389	1804
37	8982	254	2560	1736	721	1446	7583	20736	12008
38	14440	2806	2125	3652	421	792	3649	8971	1592
40	15122	1000	514	3037	559	682	10382	21110	14904
41	8555	76	983	3011	289	2017	8095	7023	5074
42	11417	276	2253	1842	531	1226	6806	15778	9245
43	17478	406	2551	2961	666	1415	7800	21227	15527
44	11736		1509	2299	358	776	4774	9513	6477

Table 5-11. continued

sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I
45	35502	870	4695	7678	1585	760	7201	16827	13941
46	8519	241	2559	1019	588	1062	9321	19735	11116
47	10512	302	2735	1626	688	2082	1208	26117	16434
48	5426	0	661	1274	180	589	2420	578	1088
49	12808	409	3903	2515	925	1275	9567	23732	1969
50	686	31	156	355	100	251	694	1635	677
51	6742	0	1141	944	272	807	3686	10223	8840
52	18887	141	2393	2221	492	617	6013	12194	9033
53	1131	60	180	212	131	271	594	1586	992
54	1956	0	515	297	258	281	2257	4053	1535
55	1609	534	4126	2223	1084	741	9993	18144	5845
56	21962	586	5246	1740	1110	2113	14978	33110	15968
57	11452	550	974	5269	262	330	982	4695	5172
58	3827	294	393	3099	101	484	1717	4057	4074
59	9088	0	1830	2052	435	1020	6225	17216	10581
60	36486	1243	8701	3658	1939	1269	19776	34264	13198
62	12496	2149	3295	1952	433	3040	15968	32159	21563
63	1727	201	208	750	41	561	870	3794	1224
64	8304	194	1782	1807	478	1203	7013	14740	8251
65	1467	0	283	622	100	246	753	3916	3422
66	4868	0	571	2120	147	536	2690	6879	5259
68	14634	941	4201	2389	1016	704	10107	18941	7314
69	12761	0	2477	2243	640	945	6462	14905	10327
70	714	23	184	146	146	153	276	1806	1152
71	1877	0	219	472	113	196	1248	2315	1107
72	5110	0	1121	1088	285	767	4126	9484	6181
73	12455	355	2036	2070	496	836	5974	12579	2074
74	5074	1376	1767	876	341	447	8193	20340	14939
75	3806	2215	1565	798	228	1472	9255	20635	10095
76	11789	381	2893	3536	711	1581	9575	21603	12075
77	8141	77	1173	1847	232	694	3100	6935	6231
78	13209	467	2806	2242	590	1063	5974	17330	12502
80	11018	395	2347	1796	487	1809	9316	44203	42119
81	1165	1569	922	570	73	6302	8039	35288	15118

Table 5-11. continued

sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I
82	11298	810	3432	2973	359	850	8496	19311	14498
83	3120	580	409	346	79	590	661	4572	1956
85	2806	0	691	899	245	359	1984	5177	3888
86	1176	0	500	235	478	224	698	3335	1806
87	12093	2224	3705	2169	481	1243	9706	20808	10766
88	502	30	177	152	99	289	1272	2278	1255
89	905	102	375	224	198	496	3202	5928	2483
90	268	26	89	71	94	300	2214	3460	1242
91	8761	1294	3095	1131	491	1229	11580	31038	18560
92	641	63	191	102	114	169	1407	2782	732
93	277	51	157	109	133	256	1118	1612	1069
94	2558	478	1292	1581	101	613	3631	9963	9432
95	188	19	84	147	58	572	1310	1480	1048
96	803	71	230	156	108	399	3633	4323	822
98	5382	1535	2032	1058	341	1383	5996	19073	17492
100	2940	765	1079	690	165	1154	6092	14296	15218
101	485	87	142	66	30	184	1228	1580	406
102	4314	459	1639	1030	362	776	5799	12128	4888
103	2978	940	1716	1138	262	976	5624	14480	7139
104	3017	575	1456	740	373	872	7322	17616	9746
105	7368	688	3499	2212	313	467	1479	11387	5491
106	5672	1835	2378	1565	549	932	6427	14136	9974
107	8565	1814	3201	1855	446	2450	12145	31209	22027
108	8053	782	2270	1470	322	848	5385	11893	18591
109	2369	570	1184	783	189	519	5557	12918	8904
110	690	147	318	192	184	184	1441	2341	985
111	485	58	254	205	207	356	1891	3071	811
avg.	7990	578	1842	1490	407	925	5592	13636	8144

Table 5-11. continued

sample	J	K	beta	L	M	N	O	P	Q
C. annuum	1827	1489	1160	198	233	317	969	519	573
C. chinens	341	133	297	118	112	121	291	178	33
3	6379	4259	12228	3670	1619	3195	11195	3376	2242
4	921	40	345	2982	176	213	337	210	14
5	6164	1313	1602	3195	1737	3995	8297	3605	3012
8	696	2692	313	370	225	344	446	11	59
9	1524	349	1390	70	132	567	1365	480	286
10	8161	7664	29540	8229	3398	7878	20990	6724	6230
11	5280	11787	16252	1659	2543	7337	2290	1738	15947
12	9730	1380	3808	1529	2720	9102	3623	3713	26319
13	2629	866	4382	1269	3069	4223	2272	1308	9650
15	2583	831	2987	668	1248	2789	1255	809	7276
16	6400	4498	8357	2227	5325	9180	4661	4459	30049
23	7054	1230	9177	1359	4403	7622	3241	2434	16709
24	670	246	397	106	253	492	223	194	1293
25	3044	867	8399	1324	2586	7954	2654	1574	17611
26	1780	2185	13253	1300	2219	6460	2438	2218	14377
27	2196	1058	8148	1774	3930	10313	3568	2166	25875
28	8979	2272	5178	1582	2658	6790	3005	1100	13765
30	669	2261	4021	689	1202	4599	1379	7764	10060
33	12368	1872	15497	1926	5219	14786	4543	2866	33129
34	3161	312	7912	1131	1080	3285	1524	997	7373
35	1236	245	1243	512	742	1120	721	489	2799
37	6365	2871	8417	1322	4690	6449	2930	2607	16225
38	4741	2314	5241	1446	1194	3412	2272	1194	9711
40	8392	1154	11656	2521	2935	9152	4305	1905	22428
41	2825	10836	1310	1992	4355	2051	1721	13526	2749
42	8019	6981	8160	1711	3494	8210	2951	1767	22731
43	11457	1952	1628	3579	1661	3884	9757	3367	2971
44	4340	9012	8060	1642	1223	1575	4702	1776	1032
45	1319	4480	15942	3297	1553	2594	3516	2303	1897

Table 5-11. continued

sample	J	K	beta	L	M	N	O	P	Q
46	6453	2882	7132	1806	1532	4849	10264	3511	2324
47	10602	2198	16951	5887	2397	6204	15514	4849	2812
48	4049	4780	5653	1402	863	1355	3813	1482	1102
49	7413	951	7445	3115	1265	3079	8449	3010	1609
50	58	1216	267	137	28	185	585	134	50
51	4422	2181	6640	1584	1041	2754	4041	2015	2211
52	4981	2076	8028	1603	1010	2072	4308	1636	1379
53	752	974	878	313	379	315	600	501	180
54	608	213	236	68	400	0	792	221	0
55	2313	749	2078	816	846	2250	3930	1678	644
56	8530	1806	5575	5313	1900	7303	14400	4474	2578
57	2163	1756	4662	646	636	657	1540	997	779
58	3240	6850	6098	1060	1184	976	2919	1517	1480
59	10249	5044	12875	3653	1228	3194	10760	3447	2281
60	6154	3705	4293	4172	1857	4106	9891	3538	1652
62	14001	2959	24045	6789	2777	7455	18115	5700	4061
64	5172	1470	4273	2751	1315	2968	7771	2574	1088
65	3420	1940	2056	972	825	1090	2664	1421	883
66	5094	2691	7503	2029	966	1838	6270	1849	1501
68	2857	450	2395	1036	691	2194	4517	1523	357
69	6214	584	7730	1851	845	1983	5480	1818	1038
70	818	159	322	81	111	252	395	228	117
71	314	61	1423	306	137	327	1089	307	121
72	4380	1000	5047	2772	1227	2641	6579	2655	1652
73	5946	825	7510	2319	1194	2387	6922	2086	1582
74	8386	3768	2717	3254	1471	4261	11653	3393	2381
75	7903	4483	2619	2798	1651	3894	10212	3141	2136
76	6911	4435	11274	3855	1441	3591	12028	3585	2201
77	4281	5746	7189	1769	981	1322	4144	1750	1313
78	7474	3707	5952	2161	956	2185	6124	2276	1554
80	25498	4479	22788	8088	3356	10444	22158	8248	7475
81	12417	4104	20803	3923	2709	7383	10650	4283	4553
82	1452	3079	13232	2651	1311	2176	7821	2874	1764

Table 5-11. continued

sample	J	K	beta	L	M	N	O	P	Q
83	1027	2268	1224	383	436	763	290	178	2093
85	2667	1361	1939	1039	425	1032	2567	884	817
86	544	524	202	298	519	268	511	191	2300
87	5459	637	5659	2099	1225	3162	6379	2319	1370
88	1094	188	739	227	117	217	508	253	50
89	659	158	602	76	112	671	589	328	203
90	483	178	213	69	48	362	791	351	89
91	10677	3522	8224	4426	1636	5352	12127	4130	2803
92	252	98	152	116	0	242	379	132	60
93	388	299	480	240	240	313	527	344	99
94	6111	2557	12311	2485	1547	2652	8194	2993	3234
95	481	164	348	137	211	172	353	251	8
96	659	836	127	145	3	462	346	278	131
98	10040	5443	11181	2347	1743	4383	6218	3118	4309
100	8743	2894	8717	3545	1945	3709	11403	3549	2432
101	214	76	193	176	78	353	272	199	84
102	2301	1244	2304	659	678	1906	1957	1367	485
103	4326	392	3253	2000	1168	2941	5116	2231	1138
104	5577	11538	4674	3616	0	6079	10071	4235	1929
105	1604	925	4999	961	709	1384	2133	1055	661
106	6118	2743	7905	2273	1715	2539	5853	2618	1939
107	13112	4361	15911	4730	3114	7236	13309	5523	4260
108	4233	2764	5871	3055	919	1514	4212	1394	934
109	7414	2072	6522	3216	1305	2412	8980	2726	1787
110	586	293	235	349	365	269	546	762	388
111	637	184	372	142	155	442	340	287	107
avg	4838	2487	6313	1979	1459	3366	5118	2284	4672

Table 5-11. continued

sample	R	S	T	U	V	W	X	Y	sum
C. annuum	3596	817	705	5679	1159	212	4902	1290	34432
C.chinens	969	309	31	827	211	18	77	0	9364
3	28483	5548	2030	19535	4485	767	4649	4376	69873
4	656	218	0	1319	79	0	73	0	2345
5	22377	6690	2538	21809	6165	1031	9662	2510	72782
8	949	1904	785	178	0	79	94	0	3989
9	3637	988	267	3470	801	0	1028	237	10428
10	52811	10898	7611	48609	10126	5359	20002	10049	165465
11	9653	1883	11551	2916	682	2699	1823	1570	32777
12	6121	4061	25612	6188	1813	9028	5611	542	58976
13	3499	830	7729	2486	57	1747	457	0	16805
15	2022	562	5921	1525	77	1581	524	0	12212
16	8900	3604	35086	9544	1540	14427	4368	377	77846
23	4975	1340	12806	3100	239	2822	695	0	25977
24	314	46	1160	209	0	472	109	0	2310
25	4014	1273	11509	3259	534	2786	2695	0	26070
26	3757	1606	10782	2821	404	3322	2033	0	24725
27	6019	1631	17118	4576	759	3463	3563	0	37129
28	4749	879	6778	2571	246	1041	555	0	16819
30	2374	619	6347	1524	109	200	139	63	11375
33	7903	2159	23051	4765	940	6948	0	2072	47838
34	1791	726	4581	1369	325	1214	1260	491	11757
35	888	203	2057	699	71	497	455	21	4891
37	5070	1812	17339	5081	796	7083	2235	0	39416
38	3157	848	8043	2535	307	2463	1060	34	18447
40	6127	1535	15490	4012	493	3254	1310	0	32221
41	1904	13731	3206	966	3675	4113	0	0	27595
42	4969	1620	15821	3560	774	4055	2043	0	32842
43	30085	6775	3250	27333	5788	1503	9261	3776	87771
44	12558	4996	1015	8939	2023	307	2423	728	32989
45	9808	3470	1599	11797	2853	492	6104	1465	37588
46	23393	6757	1762	18222	4582	500	4386	994	60596
47	32652	7598	2781	23150	5268	1062	4623	2041	79175

Table 5-11. continued

sample	R	S	T	U	V	W	X	Y	sum
48	10428	3132	1080	9752	1960	368	3460	728	30908
49	21339	6249	1603	15710	4170	504	3545	1160	54280
50	1340	761	16	699	204	4	147	28	3199
51	10945	3152	1701	13467	3206	570	7848	1586	42475
52	10137	2627	1023	9557	1762	188	3867	635	29796
53	1445	674	169	1628	434	75	609	209	5243
54	1796	608	0	989	176	0	118	0	3687
55	7406	2636	405	4433	1399	0	679	0	16958
56	31764	6855	1947	19559	3627	630	3719	1009	69110
57	4586	1665	1078	6284	1521	570	4090	1399	21193
58	8318	3516	1741	8956	2575	899	3552	3123	32680
59	32315	8944	2577	24985	5940	1528	7220	3326	86835
60	17233	6987	1209	9175	2688	268	1385	447	39392
62	38708	8116	3059	28110	5219	1209	8032	2270	94723
63	9807	3659	1973	12867	2889	1362	6306	2679	41542
64	16678	5335	1043	10330	2554	299	1524	755	38518
65	10203	2927	749	12360	2415	222	4806	1181	34863
66	17484	3709	1973	16981	3251	966	5703	2501	52568
68	7113	1868	0	3497	984	0	510	222	14194
69	14375	3146	684	6500	1238	106	3789	832	30670
70	1384	271	0	1530	182	0	584	153	4104
71	2664	378	51	1845	338	0	367	249	5892
72	14418	4545	1220	11278	3171	324	3782	752	39490
73	15678	3200	1161	11122	2174	344	3380	978	38037
74	32288	6164	1858	23605	4610	670	6262	2101	77558
75	28554	5956	1730	21011	4218	694	5660	1614	69437
76	28559	6556	1810	18816	4875	686	4528	2716	68546
77	9447	3530	1358	9299	2358	479	4782	820	32073
78	18880	5781	1716	20062	5542	760	7419	2008	62168
80	66936	18964	7148	63114	16901	4674	26155	8935	212827
81	47525	13776	2946	27748	8126	1601	7918	7334	116974
82	18495	5477	1799	15151	3691	536	4996	1795	51940
83	18	78	1896	310	0	988	180	351	3821
85	7105	1719	646	6598	1506	156	2432	526	20688

Table 5-11. continued

sample	R	S	T	U	V	W	X	Y	sum
86	634	41	2794	694	0	610	0	148	4921
87	14653	3727	884	11512	2558	53	2789	867	37043
88	1476	340	17	1528	210	8	336	0	3915
89	2353	763	0	1865	528	0	407	0	5916
90	1666	584	13	875	253	3	95	0	3489
91	34891	6708	3007	27628	5069	1739	7869	0	86911
92	1143	356	11	623	196	3	70	7	2409
93	1227	383	130	1049	274	46	138	85	3332
94	26717	5392	4045	27205	6209	2521	9621	7031	88741
95	922	212	10	708	100	0	65	24	2041
96	821	315	27	438	98	0	78	0	1777
98	19737	5163	3721	25511	5891	1486	16176	3531	81216
100	27589	5742	3749	19746	4344	1459	4447	2604	69680
101	553	228	27	266	113	5	51	24	1267
102	4707	1814	406	2842	1138	35	511	174	11627
103	12472	4049	923	8991	2929	271	1444	725	31804
104	23231	7145	1390	13317	4779	532	1962	977	53333
105	4736	1435	654	3705	1130	145	964	212	12981
106	14128	3862	1687	12073	3598	590	3270	1759	40967
107	36175	8227	3583	31005	6740	1405	10068	3347	100550
108	8524	2063	723	5992	810	201	2019	492	20824
109	21909	4679	1726	18979	4010	709	5455	1958	59425
110	197	1982	678	84	1621	449	81	432	5524
111	806	375	51	583	239	0	65	8	2127
avg	12722	3543	3879	10254	2413	1328	3489	1237	38868

Table 5-12. Distribution of carotenoids by relative integration area.

average integration area	Carotenoids	frequency
0 - 3,000	B, C, D, E, F, K, L, M, P, V, W, Y	12
3,000 - 6,000	G, J, N, O, Q, S, T, X	8
6,000 - 9,000	A, I, beta	3
9,000 - 12,000	U	1
12,000 - 15,000	H, R	2
	total	**26**

Table 5-13. Changes of carotinoid composition according to growth stages in *C. annuum* and *C. chinens*. A, D and K represent capsanthin, zeaxanthin and lycopene, respectively. Area for 10 μg of A, D, K and β-carotene is 55896, 50742, 38160, and 53693, respectively.

(unit : realative area/ 0.1 g dry wt)

sample	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**
C. annuum 1	0	94	0	0	8437	13544	0	286	18
C. annuum 2	1456	0	0	3770	140	7800	168	477	495
C. annuum 3	3323	1033	1739	4597	230	13868	268	1005	1132
C. annuum 4	3706	995	1941	4901	195	8718	323	1046	1569
C. annuum 5	3498	0	2642	4573	193	9345	430	1384	2306
C. chinens 2	483	0	1132	3962	106	10341	340	731	730
C. chinens 3	355	101	408	1947	111	6425	358	565	390
C. chinens 4	652	74	223	532	109	1826	770	1406	902
C. chinens 5	348	67	108	309	86	808	750	1168	656
C. chinens 6	155	19	48	31	11	68	516	879	294

sample	**J**	**K**	**beta**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**
C. annuum 1	287	3263	2886	471	1415	0	0	0	0
C. annuum 2	284	149	273	139	0	24	6	55	77
C. annuum 3	427	720	3575	174	0	129	0	78	210
C. annuum 4	637	1305	4020	207	0	108	143	306	175
C. annuum 5	1168	1580	3572	204	125	120	234	367	354
C. chinens 2	586	90	1782	0	60	64	166	121	0
C. chinens 3	340	74	930	25	79	16	117	197	6
C. chinens 4	506	204	542	170	186	157	320	211	48
C. chinens 5	353	147	358	187	157	141	216	165	27
C. chinens 6	164	64	102	103	105	108	94	50	24

Table 5-13. continued

sample	R	S	T	U	V	W	X	Y	sum
C. annuum 1	0	0	0	665	0	0	0	0	**665**
C. annuum 2	0	0	198	0	0	263	0	216	**677**
C. annuum 3	69	322	161	161	849	170	39	1212	**2983**
C. annuum 4	591	205	226	1333	0	208	259	2170	**4992**
C. annuum 5	997	428	549	3225	594	334	3899	395	**10421**
C. chinens 2	464	112	0	0	485	0	0	138	**22527**
C. chinens 3	374	186	7	381	51	3	133	0	**1135**
C. chinens 4	1118	315	55	1038	229	21	283	0	**3059**
C. chinens 5	718	243	9	670	169	2	116	0	**1927**
C. chinens 6	239	96	6	261	68	10	41	0	**721**

Table 5-14. Capsicinoid composition of F2 hybrids of *C. annuum*, and *C. chinens*. (units : mg/g dry weight)

Sample #	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
C. annuum	0.000	0.028	0.196	0.097	0.004	0.000	0.000	0.33
C. chinens	0.040	0.802	8.464	3.479	0.433	0.021	0.189	13.43
3	0.015	0.028	8.261	3.033	0.167	0.000	0.096	11.600
4	0.199	5.219	19.784	11.356	1.697	0.141	1.011	39.407
5	0.083	4.401	17.308	9.941	0.772	0.152	1.205	33.862
8	0.387	2.823	4.657	4.612	2.418	0.110	0.490	15.497
9	0.210	2.191	7.063	3.059	1.040	0.000	0.401	13.964
10	0.082	0.311	1.302	0.951	0.404	0.000	0.053	3.103
11	0.024	0.349	3.154	1.685	0.173	0.000	0.077	5.462
12	0.000	0.523	7.471	2.775	0.109	0.000	0.128	11.006
13	0.004	0.142	0.504	0.287	0.046	0.000	0.039	1.022
15	0.000	0.195	2.056	0.606	0.054	0.000	0.038	2.949
16	0.017	0.543	2.479	1.427	0.119	0.000	0.131	4.716
23	0.106	1.721	7.054	3.699	0.484	0.000	0.252	13.316
24	0.021	1.212	4.999	2.366	0.294	0.014	0.315	9.221
25	0.001	0.089	0.984	0.463	0.028	0.000	0.013	1.578
26	0.034	0.503	12.724	4.267	0.297	0.019	0.093	17.937
27	0.004	0.250	2.257	0.804	0.062	0.000	0.055	3.432
28	0.047	1.658	4.063	5.340	0.286	0.022	0.352	11.768
30	0.083	1.500	4.495	4.333	0.230	0.018	0.262	10.921

Table 5-14. continued

Sample #	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
33	0.007	0.384	4.256	1.788	0.072	0.005	0.093	6.605
34	0.024	1.499	6.927	3.633	0.262	0.016	0.336	12.697
35	0.003	0.294	3.009	1.959	0.053	0.000	0.061	5.379
37	0.009	0.499	1.942	1.417	0.093	0.000	0.137	4.097
38	0.148	1.830	2.698	1.937	0.973	0.000	0.373	7.959
40	0.030	0.622	8.001	2.777	0.183	0.007	0.102	11.722
41	0.016	0.169	5.779	1.614	0.104	0.006	0.034	7.722
42	0.011	0.411	3.228	1.438	0.073	0.002	0.071	5.234
43	0.007	0.184	4.791	1.367	0.088	0.009	0.050	6.496
44	0.010	0.241	6.014	2.384	0.099	0.000	0.051	8.799
45	0.033	0.782	7.238	2.780	0.299	0.000	0.208	11.340
46	0.009	0.180	0.800	0.456	0.051	0.004	0.041	1.541
47	0.000	0.620	7.194	2.848	0.136	0.006	0.120	10.924
48	0.014	0.224	4.797	1.602	0.131	0.006	0.048	6.822
49	0.012	0.224	0.624	0.475	0.053	0.004	0.050	1.442
50	0.009	0.411	2.621	1.169	0.069	0.000	0.075	4.354
51	0.012	0.595	3.751	2.060	0.097	0.000	0.106	6.621
52	0.003	0.082	0.625	0.313	0.015	0.000	0.012	1.050
53	0.021	0.396	2.974	1.224	0.209	0.010	0.102	4.936
54	0.084	1.284	4.237	3.013	0.354	0.019	0.286	9.277
55	0.000	0.085	0.240	0.241	0.013	0.000	0.024	0.603
56	0.012	0.201	2.495	1.011	0.064	0.000	0.042	3.825
57	0.053	0.861	8.829	3.431	0.218	0.004	0.156	13.552
58	0.002	0.066	0.638	0.231	0.010	0.000	0.007	0.954
59	0.047	1.419	4.136	2.911	0.338	0.000	0.306	9.157
60	0.008	0.164	3.994	1.583	0.087	0.000	0.016	5.852
62	0.000	0.038	0.173	0.094	0.017	0.000	0.007	0.329
63	0.069	1.277	3.012	1.978	0.314	0.057	0.256	6.963
64	0.031	1.010	4.447	3.713	0.130	0.039	0.204	9.574
65	0.000	0.234	3.310	1.334	0.053	0.002	0.047	4.980
66	0.020	0.549	2.291	1.532	0.103	0.022	0.121	4.638
68	0.060	0.997	7.125	4.070	0.330	0.029	0.197	12.808
69	0.061	2.067	3.825	3.637	0.283	0.020	0.419	10.312
70	0.007	0.450	1.958	0.821	0.087	0.000	0.086	3.409
71	0.012	0.472	3.264	1.526	0.119	0.010	0.126	5.529
72	0.000	0.013	0.137	0.063	0.000	0.000	0.000	0.213
73	0.000	0.021	0.129	0.067	0.000	0.000	0.000	0.217
74	0.005	0.196	0.479	0.498	0.035	0.000	0.036	1.249

Sample #	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
75	0.048	0.724	1.468	1.616	0.255	0.000	0.131	4.242
76	0.008	0.188	2.493	0.953	0.062	0.000	0.037	3.741
77	0.000	0.014	0.124	0.058	0.000	0.000	0.000	0.196
78	0.064	1.336	4.683	2.903	0.446	0.017	0.348	9.797
80	0.053	1.399	6.523	3.189	0.305	0.027	0.308	11.804
81	0.032	0.408	3.388	1.749	0.219	0.000	0.080	5.876
82	0.076	0.564	4.605	2.899	0.435	0.010	0.112	8.701
83	0.077	0.614	9.273	9.064	0.454	0.057	0.110	19.649
85	0.005	0.314	2.824	1.381	0.057	0.000	0.061	4.642
86	0.012	0.411	3.477	1.736	0.112	0.008	0.101	5.857
87	0.013	0.293	2.288	1.084	0.074	0.002	0.069	3.823
88	0.082	1.467	5.335	2.947	0.384	0.024	0.310	10.549
89	0.042	0.809	3.732	2.569	0.270	0.015	0.202	7.639
90	0.014	0.455	3.193	1.561	0.130	0.032	0.128	5.513
91	0.020	0.663	2.653	2.603	0.131	0.000	0.115	6.185
92	0.041	1.372	3.312	3.194	0.216	0.008	0.266	8.409
93	0.035	0.657	7.008	2.327	0.240	0.028	0.153	10.448
94	0.028	0.989	3.980	2.154	0.310	0.023	0.229	7.713
95	0.036	0.935	6.435	2.580	0.396	0.031	0.223	10.636
96	0.004	0.137	1.254	0.651	0.038	0.000	0.025	2.109
98	0.008	0.355	10.530	2.062	0.160	0.011	0.079	13.205
100	0.004	0.209	1.874	0.743	0.094	0.002	0.060	2.986
101	0.006	0.079	2.327	1.161	0.026	0.000	0.007	3.606
102	0.008	0.145	5.236	2.042	0.088	0.005	0.023	7.547
103	0.000	0.020	0.074	0.059	0.006	0.000	0.002	0.161
104	0.022	0.468	1.768	0.984	0.232	0.006	0.145	3.625
105	0.028	1.129	2.378	3.792	0.226	0.018	0.236	7.807
106	0.014	0.291	10.179	2.704	0.120	0.010	0.063	13.381
107	0.028	0.445	6.251	2.810	0.232	0.014	0.082	9.862
108	0.014	0.295	1.216	0.919	0.078	0.011	0.063	2.596
109	0.000	0.025	0.241	0.089	0.011	0.000	0.004	0.370
110	0.009	0.286	2.008	1.356	0.041	0.016	0.066	3.782
111	0.168	2.099	9.937	9.417	0.805	0.052	0.424	22.902
max	0.387	5.219	19.784	11.356	2.418	0.152	1.205	39.407
mean	0.036	0.723	4.210	2.262	0.235	0.013	0.154	7.633
min	0.000	0.013	0.074	0.058	0.000	0.000	0.000	0.213

Table 5-15. Changes of capsaicinoids composition according to growth stages in *C. annuum* and *C. chinens*.

(unit : mg/g dry weight)

Sample #	VO	NDHC	C	DHC	VD	HDHC II	HDHC I	TOTAL
C.annuum 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C.annuum 2	0.002	0.081	0.663	0.319	0.025	0.003	0.019	1.112
C.annuum 3	0.000	0.049	0.445	0.210	0.010	0.000	0.008	0.722
C.annuum 4	0.003	0.108	0.732	0.328	0.036	0.000	0.020	1.227
C.annuum 5	0.000	0.006	0.025	0.015	0.000	0.000	0.000	0.046
C. chinens 2	0.070	0.863	8.909	5.634	0.509	0.032	0.167	16.184
C. chinens 3	0.060	0.954	9.686	6.200	0.624	0.027	0.194	17.745
C. chinens 4	0.049	0.806	9.293	4.909	0.440	0.048	0.178	15.723
C. chinens 5	0.056	0.624	8.096	4.749	0.353	0.040	0.150	14.068
C. chinens 6	0.175	2.716	21.478	9.635	1.036	0.070	0.727	35.837

4) 카로티노이드 동정과 분석

지방산등에 결합되어 있는 카로티노이드를 유리화시키기 위하여 모든 시료를 saponification하고, 분리된 peak을 표준물질과 비교 (retention time과 스펙트럼) 하여 HPLC 크로마토그램에서 주요 peak이 어떤 카로티노이드인지를 밝혔다. 제 2 단계에서 개발한 카로티노이드의 자동화 분석법으로 *C. annuum*과 *C. chinens*, F2 (총 32 개)를 정량 분석하였다. 또한 카로티노이드를 질량분석법으로 동정하기 위하여 표준물질을 가지고 전자이온화 혹은 고속원자충격법의 조건을 조사하였다. 고추에 포함되어 있는 카로티노이드 종류를 규명하기 위하여 신선한 홍고추를 시료로 구입하여 사용하였다. 카로티노이드를 건조할 때의 방법에 따라 카로티노이드 추출량에 변화가 있는지를 조사하기 위하여, 3가지 다른 건조방법을 건조하지 않은 고추에서의 카로티노이드와 비교하였다 (Table 5-16). 모든 시료는 씨를 빼고 0.1 ㎤ 이하로 작게 잘라 homogenizer로 분말 (non-dry인 경우, 분말이 아님.)을 만든 다음, Minguez-Mosquera 등 (1995)의 방법에 따라 카로티노이드를 추출하였다. Non-dry의 경우에 가장 많이 카로티노이드가 추출되었으나 일반건조나 동결건조에서도 Non-dry 대비 90% 이상의 카로티노이드가 추출되었다.

Table 5-16. Total amounts of carotenoids according to different drying.

Drying methods	㎎/g wet weight	% Non-dry
Non-dry	0.69	100
Dry	0.63	91
Freeze dry	0.62	90
Heat Dry	0.47	68

45℃에서 72시간 건조한 Heat-dry에서는 상대적으로 적은 약 70%정도의 카로티노이드가 추출되었다. 그러나 모든 건조 방법에서 Non-dry에서와 같은 크로마토그램이 나와 건조 방법에 따른 카로티노이드 조성의 차이는 없는 것으로 나타났다 (data not shown).

모두 같은 형태의 크로마토그램이 나타났기 때문에 이 중 한가지, 시료 취급이 비교적 간편한 방법인 동결 건조된 고추로부터 나온 카로티노이드 추출액을 Minguez-Mosquera 등 (1995)의 방법으로 saponification을 실시하였다. Saponification은 지질에서 주로 발견되는 ester등의 base-unstable 결합을 끊어준 다음, 유기용매 등으로 분획해 나가는 과정을 말한다. Saponification을 하자 실시하기전의 30여개의 peaks 대신, 1개의 주 peak과 10개 이내의 작은 peaks로 단순화되어, 카로티노이드의 약 80%가 지방산등과 ester결합으로 존재하고 나머지 20%정도가 유리된 형태로 존재한다는 Weissenberg 등 (1997)의 결과와 일치함을 보여 주었다 (Fig. 5-12). 홍고추에서는 saponification과정을 거침으로서 크로마토그램을 단순화시킬 수 있어 모친형에 카로티노이드의 돌연변이가 있는 F2의 유전적인 분석도 HPLC분석을 통해서 가능할 것으로 사료된다.

Hoffman-La Roche (Nutley, NJ, USA)에서 제공한 몇 가지의 표준물질과 비교하여 보았을 때, retention time과 스펙트럼이 일치한 peaks를 발견할 수 있었으며, 이중 가장 큰 주 peak (11.4 min)는 예상대로 capsanthin이었다 (Fig. 5-12).

이외에도 capsorubin (8.4 min), zeaxanthin (14.3 min), β-cryptoxanthin (22.6 min), β-carotene (31.0 min) **에 해당되는** peaks**가 나왔다**. Lutein**은** zeaxanthin **의 바로 앞에 붙어 나왔으나 스펙트럼을 조사해본 결과 고추 시료에는 거의 존재하지 않는 것으로 나타났다**.

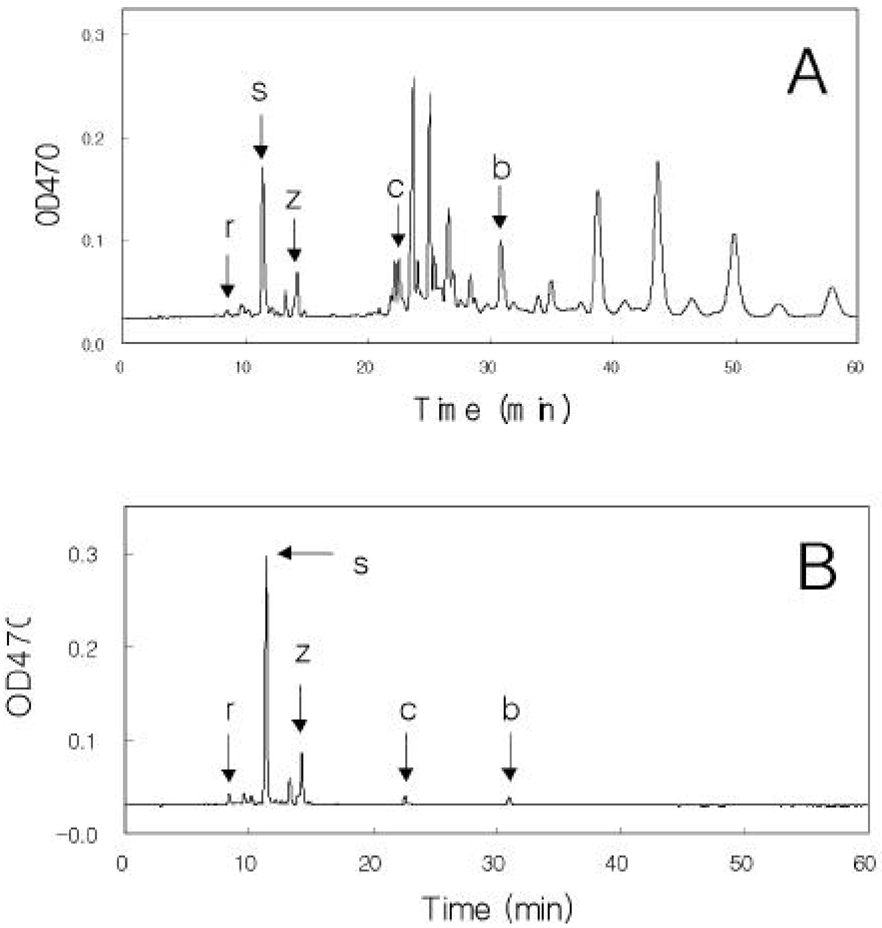


Fig. 5-12. Reversed-phased HPLC of carotenoids extracts from the fruits of red pepper. A portion of of the extracts was run either before (Panel A) or after saponification (Panel B). r, capsorubin; s, capsanthin; z, Zeaxanthin; c, β-cryptoxanthin, and b, β-carotene.

또한 lycopene도 β-carotene앞에서 나왔으나 성숙한 고추과실의 추출 또한 lycopene도 β-carotene앞에서 나왔으나 성숙한 고추과실의 추출물에서 찾아볼 수는 없었다. 표준물질이 없는 peaks의 경우, 발견된 peak의 종류와 역상 chromatography에서 극성이 높은 물질부터 나온다는 점을 감안할 때, 산소원자가 많은 순서대로 neoxanthin과 violaxanthin이 capsorubin과 capsanthin사이에, antheraxanthin이 capsanthin과 zeaxanthin사이에, cryptocapsin이 zeaxanthin과 β-cryptoxanthin사이에 나올 것으로 예상된다. 따라서 고추에서 카로티노이드 생합성상 나타나는 카로티노이드가 모두 검출이 된다면 현재 HPLC조건에서 capsorubin> neoxanthin> violaxanthin> capsanthin> antheraxanthin> zeaxanthin> lutein> cryptocapsin> β-cryptoxanthin> lycopene> β-carotene의 순으로 용출될 것으로 예상된다. Saponification은 크로마토그램을 단순화시키는 잇점도 있으나 심하게 하였을 경우, artifacts를 만들 수도 있기 때문에 KOH를 ¼로 낮추어 순한 saponification (Weissenberg 등, 1997)도 하여 보 았다. 그러나 같은 결과를 보여 주어 (data not shown), artifacts가 있다 할지라도 결과의 해석에 영향을 줄 정도는 아닌 것으로 사료되었다.

HPLC에서의 retention time과 스펙트럼이 일치하였으나, 보다 확실한 결과가 필요하여 각 peak의 질량 분석이 필요하였다. 일, 이차년도에 고속원자충격법, electrospray 이온화법등 여러 가지 방법을 사용하여 보았으나, 질량 spectrum은 모두 깨어진 분자들의 질량이 크게 나타나거나 artifact가 있어 실제 질량을 측정하기 어려웠다. Lusby 등 (1992)의 방법을 이용하여 40 eV에서 electron 이온화법을 사용하여 β-carotene과 capsanthin 표준물질의 질량을 측정하여 보았다 현재의 조건으로는 효율적인 분리가 이루어지지 않았고, 카로티노이드를 characterization하기 위한 양으로도 부족하였다. Preparative reversed-phase HPLC를 이용한 시료준비와 좀 더 효율적인 분리를 위해서 변형된 HPLC 조건이 필요할 것으로 사료된다.

(Fig. 5-13). β-carotene은 정확하게 536 *m/z* 가 나왔으며 (Panel A), capsanthin도 약하기는 하였으나 584 *m/z*를 볼 수 있었다 (Panel B). 이와 함께 소량으로 존재하는 카로티노이드를 정성분석하기 위하여 saponification된 시료로부터 HPLC를 이용하여 10회 이상 모아서 각 카로티노이드를 분리하여 보았으나

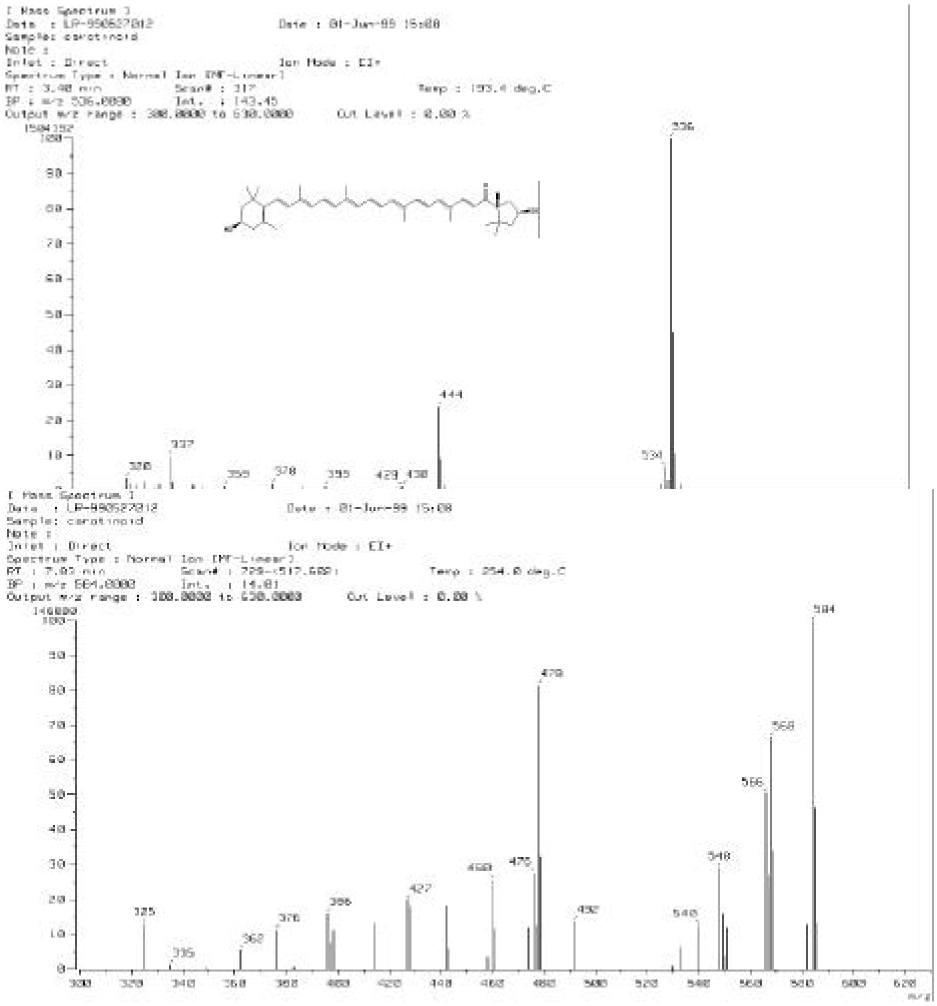


Fig. 5-13. Electron ionization mass spectrum of carotenoids. Carotenoids were directly exposed with 40 eV. Panel A shows 536 *m/z* of β-carotene. Panel B, 584 *m/z* of capsanthin.

Table 5-17. The amount of major carotenoids determined from *C. annuum* and *C. chinens* and their F2 hybrids. (unit, mg/g dry wt)

psy genotype[a]	Strains	Total amount[b]	color[c]	capsorubin	capsanthin	zeaxanthin	β-crypto-xanthin	β-carotene
A	*C. annuum*	2.3	R	0.10	1.08	0.14	0.03	0.05
B	*C. chinens*	0.2	O	0.01	0.11	0.03	-[d]	-
A	3	2.4	R	-	0.85	0.11	0.05	0.13
	5	1.6	R	-	0.41	0.05	0.02	0.03
	9	1.6	R	-	0.24	0.04	0.01	0.02
	11	2.1	R	-	0.64	0.09	0.05	0.13
	30	1.6	R	0.06	0.89	0.27	0.04	0.08
	37	2.2	R	0.13	1.06	0.13	0.01	0.04
	40	1.3	R	0.07	0.68	0.11	0.01	0.05
	44	1.4	R	0.21	1.84	0.20	0.04	0.08
	68	1.9	R	0.16	1.35	0.19	0.02	0.06
	69	2.3	R	0.08	1.16	0.16	0.03	0.01
B	24	0.3	O	0.02	0.16	0.02	-	-
	35	0.4	O	0.03	0.21	0.05	0.01	-
	53	0.4	O	0.02	0.12	0.02	-	-
	86	0.3	O	0.04	0.22	0.07	-	-
	88	0.2	O	0.01	0.10	0.01	-	-
	92	0.5	O	0.01	0.12	0.01	-	-
	93	0.3	O	0.02	0.09	0.02	-	-
	95	0.3	O	0.02	0.10	0.02	-	-
	110	0.4	O	0.02	0.17	0.03	-	-
	111	0.3	O	0.00	0.10	0.01	-	-
H	13	1.2	R	0.05	0.62	0.13	0.03	0.11
	25	2.4	R	0.10	1.00	0.56	0.06	0.18
	33	2.3	R	0.12	1.56	0.48	0.05	0.11
	38	3.5	R	0.26	2.79	0.20	0.03	0.07
	42	2.3	R	0.05	0.63	0.64	0.05	0.04
	59	2.6	R	0.08	1.22	0.59	0.04	0.08
	66	1.7	R	0.04	0.86	0.33	0.04	0.05
	78	1.9	R	0.05	0.66	0.15	0.02	0.08
	80	3.2	R	0.21	2.18	0.54	0.08	0.13
	103	1.4	R	0.11	0.85	0.11	0.02	0.02

a A, homozygous for the normal phytoene synthase; B, homozygous for the abnormal phytoene synthase; H, Heterozygous.
b The amount was calculated by absorbance at 470 ㎚ not the sum of each carotenoids.
c R, red; O, orange.
d -, not determined.

모친형 *C. annuum*과 *C. chinens*, 그리고 그들의 F2로부터 카로티노이드를 추출하여 양을 비교하고, 주요 카로티노이드를 HPLC로 정량분석하였다 (Table 5-17). *C. chinens*에서 상대적으로 zeaxanthin이 많은 것으로 나타났으나, 예상대로 크로마토그램은 큰 차이가 나지 않았으며 단지 양적인 차이만 존재하였다. 그러나 카로티노이드 총량의 평균과 표준편차를 비교하였을 때 정상 혹은 비정상의 homozygous phytoene synthase를 가지고 있는 고추에서는 약 20%의 편차가 나타난 반면, heterozygous phytoene synthase를 가지고 있는 고추에서는 총량은 정상유전자를 가지고 있는 strains과 유사한 양이었으나 그 오차는 두배정도인 38%로 나타나 F2에서 heterozygous유전자를 가지고 있는 strains는 상대적으로 변이가 심한 것으로 나타났다. 한편, 정량적으로 capsanthin이 전체에서 70% 이상을 차지하고 있기 때문에 *C. annuum*과 *C. chinens*, 그리고 그들의 F2에서 전체적인 고추의 색을 결정하는 데 있어서는 capsanthin의 양이 절대적인 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

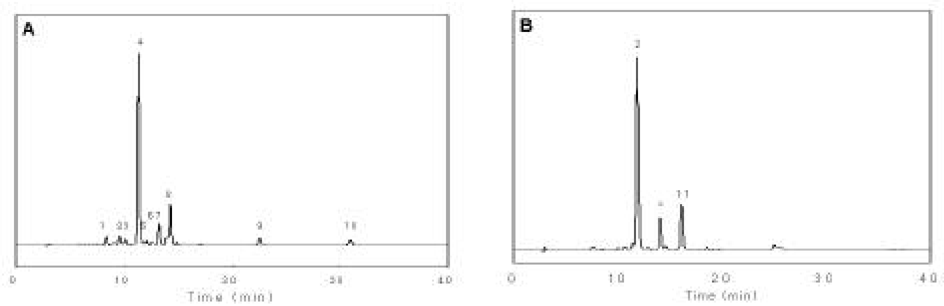


Fig. 5-14. Reversed-phase HPLC of saponified extract from (A) red peppers and (B) sweet banana. Peaks: (1) capsorubin; (2) violaxanthin; (3) capsanthin 5,6-epoxide; (4) capsanthin; (5) antheraxanthin; (6) *cis*-capsanthin; (7) mutatoxanthin; (8) capsolutein+zeaxanthin; (9) β-cryptoxanthin; (10) β-carotene, (11) lutein; (x) unidentified.

5) 미량 카로티노이드 정성분석과 캡사이시노이드 대량 분석

가) 카로티노이드 정성 분석

*C. annuum*과 *C. chinens*에서 발견되는 카로티노이드는 일반 홍고추나 붉은 파프리카에서 분리되는 HPLC 크로마토그램과 같아 이들 시료를 이용하여 카로티노이드를 확인하였다. 4년차 보고서에서 밝힌 바와 같이 주요 카로티노이드인 capsanthin과 zcapsorubin을 비롯하여 몇 가지는 표준 물질을 이용하여 밝힌 바 있다. 이번에는 각 카로티노이드의 polarity특성과 용출 용매상에서의 스펙트럼을 분석하고, Mnguez-Mosquera와 Hornero-Mendez (1993)이 밝힌 HPLC 크로마토그램과 비교하여 기타 카로티노이드를 확인하였다 (Fig. 5-14A).

나) 유전자형에 따른 카로티노이드 정량 분석

Phytoene synthase genotype에 따른 F2를 분류하고 이들이 가지고 있는 카로티노이드를 분석하였다 (Table 5-18). 4차년도 말에 20여개의 시료를 분석하였으나 좀 더 통계적으로 유의성 있는 결과를 도출하기 위하여 a type, 31개/b type, 22개/h type, 36개등 총 89 시료의 카로티노이드를 분석하였으며, 그 결과는 4차년도 결과와 유사하였다.

또한 색상이 다양한 17종의 고추의 카로티노이드를 분석하였을 때, 681, Ancho, *C. baccatum*, CALORO, DY47Y, Mutato isleno, SFS등은 총량에서 차이가 있을 뿐 카로티노이드 pattern은 일반 홍고추와 같이 나타났다. 이에 반하여 DLM, E34501, GS840, Indalo, MGY, MUT, NK4, pasilla, SMT, sweet banana등은 3개의 주요 카로티노이드가 나타나는 형태가 보였다. 이중 가장 많은 카로티노이드를 가지고 있는 sweet banana에서 추출한 카로티노이드를 분석하여 보았다 (Fig. 5-14B). 1개의 주요 peak과 2개의 작은 peaks이 나타났으며 이중 peak 1은 질량 분석 결과 MW=600으로 나타나, 용출되는 위치상 violaxanthin인 것으로 사

료된다. Peak 2는 소량으로 확인하기 어려웠으며, peak 3은 lutein과 같은 용출 시간과 스펙트럼을 가지고 있었다.

Habanero의 카로티노이드를 성장단계별로 분석하였을 때는 생합성 단계의 초기 단계에 있는 zeaxanthin과 β-carotene은 점점 감소하는 경향이었으며, 후기 단계에 속하는 capsanthin과 capsorubin은 증가하였다 (Fig. 5-15). β-cryptoxanthin은 너무 양이 작아 분석할 수 없었다.

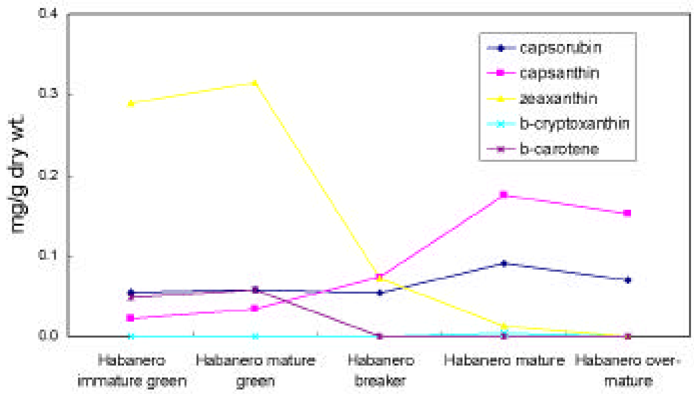


Fig. 15. Carotenoids changesaccording to growing stages. Carotenoids were extracted and saponified from habanero pepper.

Table 5-18. Average values of total and each carotenoid determined by HPLC according to *psy* genotype. (unit: ㎎/g dry wt.)

	phytoene synthase genotypea		
	A	B	H
totalb	2.05 ± 0.91	0.32 ± 0.13	1.90 ± 0.63
capsorubin	0.21 ± 0.13	0.04 ± 0.02	0.21 ± 0.13
capsanthin	1.12 ± 0.52	0.18 ± 0.07	1.03 ± 0.36
zeaxanthin	0.08 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.06
β-cryptoxanthin	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
β-carotene	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01

a A, homozygous for the normal phytoene synthase; B, homozygous for the abnormal phytoene synthase; H, Heterozygous.
b The amount was calculated by absorbance at 470 ㎚ not the sum of each carotenoid.

다) 캡사이시노이드 분석

160개의 F2 시료로부터 캡사이시노이드를 분석하였다. 이중 42.5%가 1 g 건조 중당 0.1 ㎍ 미만으로 캡사이시노이드를 함유하고 있기 때문에 정량분석이 어려웠으나, 나머지는 0.1-2,900 ㎍/g dry wt를 포함하고 있었다 (Table 5-19). 수분후 성장기별로 각 조직에서 보았을 때, 캡사이시노이드는 대부분 placenta에 집중되어 있었다 (Fig. 5-16). 수분후 TF68과 낭성, 해화에서 성장기별로 나타나는 캡사이시노이드는 일단 최대로 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 5-17). TF68의 경우, 다른 조직에 비하여 20-100배 많은 양을 포함하고 있었으며, 낭성은 100-300배 정도의 고농도로 집적되어 있었다 (Table 5-20). 낭성에서 캡사이시노이드가 초기에 발현되는 반면에 TF68은 후기에 갈수록 발현 양이 많아져 남방으로부터 온 품종임을 확인할 수 있었다. 또한 두 품종의 캡사이시노이드 조성은 약간 차이가 있었는 데, 낭성은 C와 DHC가 전체의 90% 이상을 차지하는 데 비하여 TF68은 NDHC이나 VD등이 상당한 비율로 나타나고 있음을 알 수 있었다 (Fig 5-18). 다른 몇 가지의 고추 품종에서도 캡사이시노이드를 분석한 바 sweet 품종에서는 거의 나타나지 않았지만 hot에서는 상당한 양을 가지고 있었으며, 흥미롭게 Paprika hot은 hot 품종임에도 불구하고 전혀 캡사이시노이드가 나타나지 않아 매운 맛이나 향기를 유발하는 또 다른 물질이 있음을 시사하여 주었다 (Table 5-21).

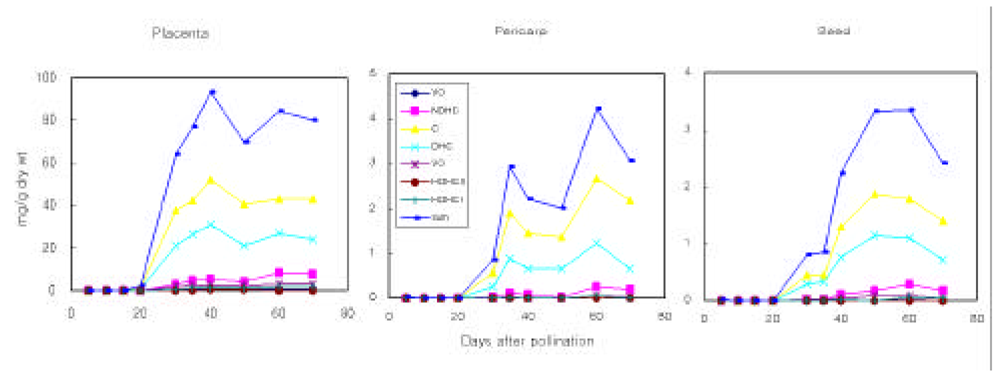


Fig. 5-16. Changes of each capsaicinoid amounts according to growing stages. Capsaicinoids were extracted from each placenta, pericarp and seed harvested at each stages and analyzed by reversed-phase HPLC.

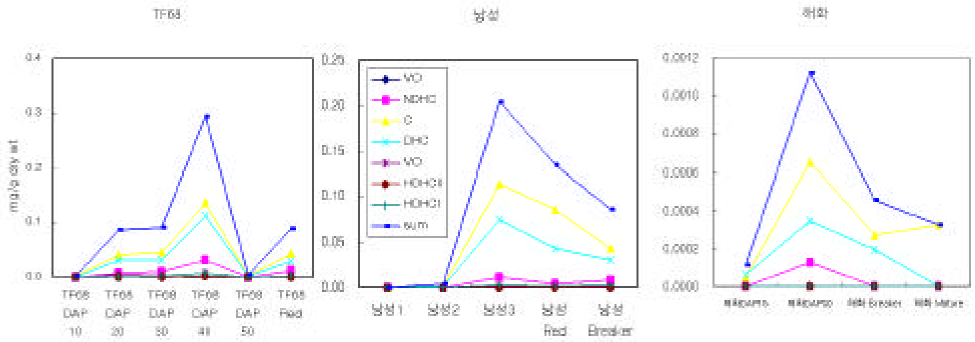


Fig. 5-17. Changes of each capsaicinoid amounts according to growing stages. Capsaicinoids were extracted from Haehwa, Nangsung, and TF68 harvested at each stages and analyzed by reversed-phase HPLC.

Table 5-19. Capsaicinoids composition of F1. (unit, μg/g dry wt.)

Sample #	VO	C	NDHC	DHC	VD	HDHCII	HDHCI	Total
1	-	-	-	-	-	-	-	0.0
4	-	4.8	1.3	3.6	-	0.6	-	10.4
6	-	-	-	-	-	-	-	0.0
8	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	0.3
9	-	-	-	-	-	-	-	0.0
11	-	-	-	-	-	-	-	0.0
14	-	-	-	-	-	-	-	0.0
15	0.1	3.0	0.7	1.0	0.0	0.0	0.0	4.7
18	-	-	-	-	-	-	-	0.0
19	0.2	0.1	0.1	0.0	-	-	-	0.3
20	0.1	0.0	0.1	-	-	-	-	0.2
22	-	-	-	-	-	-	-	0.0
26	0.3	29.4	3.8	19.1	2.1	0.2	1.5	56.4
28	0.0	2.7	0.8	2.6	0.8	0.0	0.0	7.0
29	1.8	434.4	37.6	277.0	9.4	2.3	12.7	775.3
30	-	-	-	-	-	-	-	0.0
31-1	2.9	294.2	25.7	128.1	0.0	1.9	14.6	467.5
31-2	3.5	361.7	32.7	144.0	13.8	3.5	10.0	569.1
32	2.2	10.4	1.2	5.9	2.1	-	-	21.8
33	-	-	-	-	-	-	-	0.0
34	-	-	-	-	-	-	-	0.0
35-1	-	-	-	-	-	-	-	0.0
35-2	6.5	1,266.5	342.9	1,167.2	26.6	6.8	95.9	2,912.4
37	-	33.7	6.1	23.1	1.5	-	2.5	66.9
39	-	-	-	-	-	-	-	0.0
41	-	-	-	-	-	-	-	0.0
43	-	31.1	8.3	17.9	2.0	-	4.8	64.1
46	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
47	-	-	-	-	-	-	-	0.0
52	-	33.7	9.8	22.7	0.6	-	4.3	71.1
55	0.1	0.1	-	-	-	-	-	0.2
56	-	5.2	-	1.0	-	-	-	6.2
57	-	-	-	-	-	-	-	0.0
59	-	-	-	-	-	-	-	0.0
60	0.2	26.5	3.8	10.6	1.0	0.1	0.7	43.0
64	0.2	-	-	-	-	-	-	0.2
66	0.1	0.1	-	-	-	-	-	0.2
67	0.5	20.4	9.6	17.5	2.6	-	3.4	53.9
68	-	-	-	-	-	-	-	0.0
69	0.0	3.2	1.2	1.3	0.0	0.0	0.4	6.1
70	0.0	10.9	1.6	8.1	0.6	0.1	0.4	21.7
72	-	-	-	-	-	-	-	0.0
73	-	-	-	-	-	-	-	0.0
76-1	-	-	-	-	-	-	-	-
76-2	-	-	-	-	-	-	-	-
77	0.2	32.7	4.5	17.5	2.6	0.6	1.9	60.1
81	-	-	-	-	-	-	-	0.0
82	0.1	0.2	0.0	0.2	-	-	-	0.5
83	0.0	-	-	-	-	-	-	0.0
85	-	-	-	-	-	-	-	0.0
88	-	-	-	-	-	-	-	0.0
89	1.3	191.0	44.3	146.2	9.8	0.9	11.6	405.0
92	-	-	-	-	-	-	-	0.0
95	-	-	-	-	-	-	-	0.0
96	0.1	4.1	2.1	3.9	0.4	-	-	10.5
98	0.1	0.1	0.0	-	-	-	-	0.3
99	0.1	-	0.1	-	-	-	-	0.2
100	-	-	-	-	-	-	-	0.0

Table 5-19. continued.

Sample #	VO	C	NDHC	DHC	VD	HDHCII	HDHCI	Total
102	-	-	-	-	-	-	-	0.0
103	0.5	163.9	18.5	76.4	5.4	0.3	7.1	272.0
105	3.0	520.3	111.4	395.3	14.1	5.0	38.0	1,077.2
106	-	-	-	-	-	-	-	0.0
108	-	-	-	-	-	-	-	0.0
109	-	-	-	-	-	-	-	0.0
110	-	-	-	-	-	-	-	0.0
111	0.5	14.6	3.0	7.4	0.7	0.1	1.4	27.7
116	-	-	-	-	-	-	-	0.0
117	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9
118	1.8	79.4	9.7	38.3	7.1	0.0	0.0	136.2
119	-	-	-	-	-	-	-	0.0
120	-	-	-	-	-	-	-	0.0
122	0.1	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
123	-	-	-	-	-	-	-	0.0
126	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
129	0.1	-	0.1	-	-	-	-	0.2
130	0.0	2.9	0.7	2.2	0.2	0.0	0.0	6.1
132	0.1	37.6	5.5	24.6	1.2	0.7	2.5	72.2
134	-	-	-	-	-	-	-	0.0
135	0.6	71.2	5.6	31.6	1.9	-	2.9	113.9
137	3.3	156.1	84.8	178.8	20.0	2.8	14.1	460.0
138	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
139	-	-	-	-	-	-	-	0.0
141	0.0	0.2	0.1	0.2	-	-	-	0.5
142	-	-	-	-	-	-	-	0.0
144	-	-	-	-	-	-	-	0.0
145	2.2	110.3	18.6	74.0	3.6	0.0	2.1	210.8
148	1.4	231.1	24.2	113.9	5.9	0.0	15.5	391.9
150	-	-	-	-	-	-	-	0.0
151	-	-	-	-	-	-	-	0.0
152	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
154	-	-	-	-	-	-	-	0.0
157	-	-	-	-	-	-	-	0.0
159	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1
162	-	-	-	-	-	-	-	0.0
165	-	-	-	-	-	-	-	0.0
166	-	-	-	-	-	-	-	0.0
168	1.0	145.6	19.7	86.1	4.7	-	5.6	262.8
170	-	-	-	-	-	-	-	0.0
173	0.1	-	0.1	-	-	-	-	0.2
174	-	-	-	-	-	-	-	0.0
175	2.4	231.2	42.6	191.1	8.2	0.0	13.7	489.2
178	0.0	13.0	2.8	8.4	0.5	0.0	0.4	25.1
184	0.4	60.9	7.8	29.6	2.7	-	3.1	104.5
185	-	-	-	-	-	-	-	0.0
188	-	-	-	-	-	-	-	0.0
191	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1
195	2.4	336.8	42.6	250.0	15.9	3.2	17.0	668.0
203	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
209	0.0	0.0	-	-	-	-	-	0.1
210	0.1	7.3	1.2	5.7	0.3	0.0	0.2	14.7
212	-	-	-	-	-	-	-	0.0

Table 5-20. Capsaicinoids changes in placenta, pericarp and seed of TF68 and nangsung according to growth after pollination.

(unit, μg/g dry wt.)

	Samples	VO	C	NDHC	DHC	VD	HDHCII	HDHCI	Total
TF68	DAP10pl	-	-	-	-	-	-	-	-
	DAP20pl	1.1	64.9	22.3	79.0	24.1	0.6	1.9	194.1
	DAP30pl	7.2	257.5	123.6	271.5	73.5	6.5	30.6	770.4
	DAP40pl	0.8	30.5	17.3	47.3	21.7	1.7	9.0	128.3
	DAP50pl	6.4	509.8	102.8	365.9	117.3	10.9	42.3	1,155.3
	DAP60pl	6.2	754.1	101.4	493.6	118.6	13.1	53.6	1,540.6
낭성	DAP10pl	1.5	227.7	12.2	110.8	6.2	1.6	4.4	364.4
	DAP20pl	36.2	9,573.8	360.4	4,695.3	83.0	136.0	592.5	15,477.1
	DAP30pl	71.0	16,069.0	1,204.7	11,702.8	89.1	235.8	380.4	29,742.9
	DAP33pl	36.5	10,783.5	966.7	8,621.1	83.0	145.6	402.0	21,038.3
	DAP40pl	23.7	5,761.4	425.8	4,624.8	137.5	77.9	213.2	11,264.3
	DAP50pl	25.9	7,524.7	530.4	6,004.5	105.4	85.0	239.0	14,515.0
	DAP60pl	25.2	6,635.3	427.0	4,904.9	112.7	42.4	211.0	12,358.5
TF68	DAP10pc	-	0.6	-	-	-	-	-	0.6
	DAP20pc	0.0	0.1	-	-	-	-	-	0.2
	DAP30pc	0.1	1.7	0.8	1.8	0.7	0.3	0.3	5.7
	DAP40pc	-	1.0	0.7	1.0	1.2	0.3	0.5	4.7
	DAP50pc	0.2	9.5	2.3	5.5	2.4	0.2	0.7	20.8
	DAP60pc	0.3	39.5	5.3	23.1	4.9	0.5	1.9	75.4
낭성	DAP10pc	0.1	2.4	0.1	0.8	-	0.1	0.3	3.8
	DAP20pc	0.1	14.4	0.6	6.2	-	0.2	0.5	22.0
	DAP30pc	0.1	16.6	1.3	16.1	-	0.2	0.5	34.8
	DAP33pc	0.0	17.5	1.5	18.1	0.2	0.3	0.7	38.3
	DAP40pc	-	5.5	0.5	2.5	-	0.1	0.2	8.8
	DAP50pc	0.4	60.8	4.1	52.5	0.8	0.8	2.7	122.0
	DAP60pc	0.1	58.9	3.8	45.5	1.1	1.1	2.3	112.9
TF68	DAP10sd	-	-	-	-	-	-	-	-
	DAP20sd	-	0.2	-	-	-	-	-	0.2
	DAP30sd	-	0.6	0.7	1.1	0.6	0.1	0.3	3.5
	DAP40sd	0.0	1.4	0.7	2.9	0.5	0.1	0.3	5.9
	DAP50sd	0.1	5.7	1.2	3.8	1.8	0.2	0.5	13.3
	DAP60sd	0.0	8.4	1.0	5.1	1.8	0.2	0.6	17.0
낭성	DAP10sd	-	0.4	-	-	-	-	-	0.4
	DAP20sd	0.1	13.1	0.4	7.7	0.1	0.2	0.3	21.8
	DAP30sd	0.2	33.3	2.2	32.9	0.3	0.3	0.7	69.9
	DAP33sd	0.3	96.2	7.8	91.2	2.1	2.1	2.7	202.5
	DAP40sd	0.1	15.6	1.4	9.5	0.3	0.2	0.5	27.5
	DAP50sd	0.7	143.8	13.1	134.9	2.0	1.6	3.6	299.7
	DAP60sd	0.1	18.9	1.2	16.8	0.4	0.2	0.5	38.1

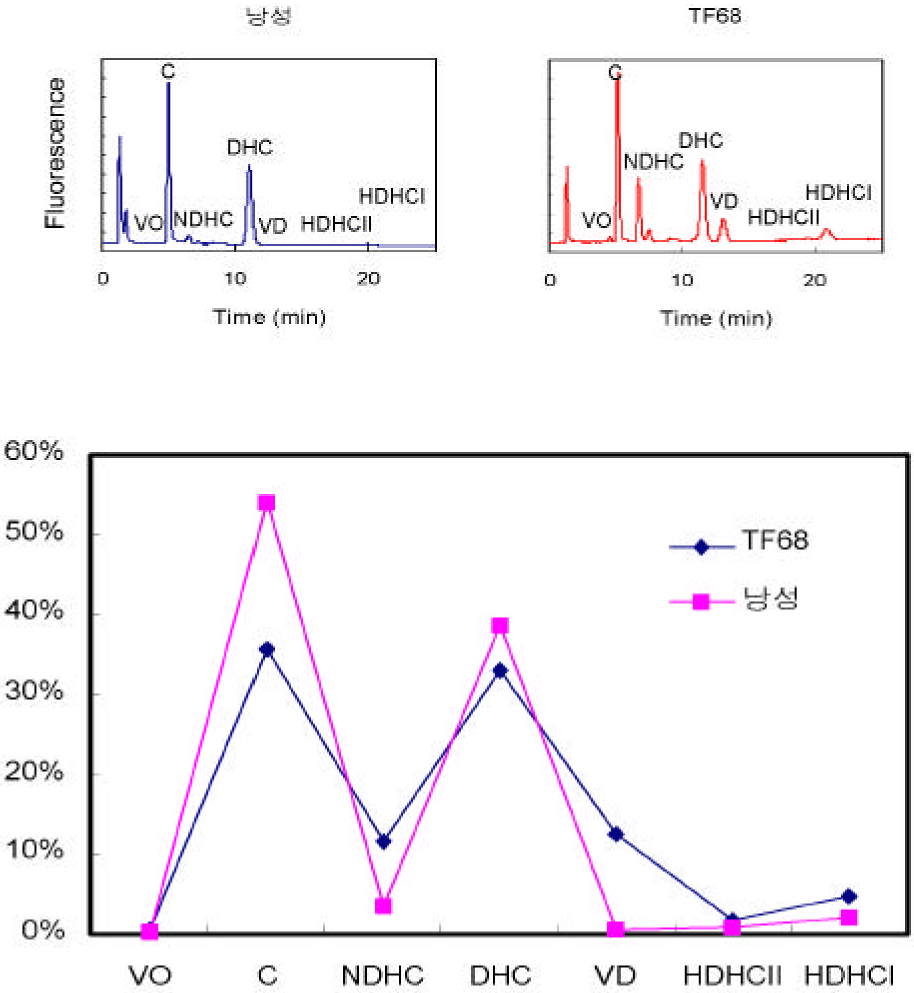


Fig. 5-18. Capsaicinoid profiles of TF68 and nangsung.

Table 5-21. Capsaicinoids composition of several pepper strains.

(unit, μg/g dry wt.)

Samples	VO	C	NDHC	DHC	VD	HDHCII	HDHCI	Total
J.sweet.M	-	-	-	-	-	-	-	-
J.sweet.B	-	0.1	-	-	-	-	-	0.1
H.sweet	-	-	-	-	-	-	-	-
H.hot-1	0.9	226.8	19.3	293.3	8.7	3.4	5.7	558.0
H.hot-2	0.3	35.1	3.4	43.0	1.9	0.3	0.8	84.8
P.sweet	-	0.1	-	-	-	-	-	0.1
P.hot	-	-	-	-	-	-	-	-

Reference

S Kim, YW Kim, Z-W Lee, BD Kim, and KS Ha, (1997) *J Kor Soc Hort Sci* 38, 384-390.

BH Davies, (1964) *In* Chemistry and Biochemistry of plant pigments. (eds. TW Goodwin) vol. 2. p.38-165.

MI Minguez-Mosquera, D Hornero-Mendez and J Garrido-Fernandez, (1995) *J. AOAC. Int.* 78, 491-496.

M Weissenberg, I Schaeffler, E Menagem, M Barzilai, and A Levy. (1997) *J. Chrom. A*, 757, 89-95.

WR Lusby, F Khachik, GR Beecher and J Lau, (1992) *In* Meth. Enz. (eds. L.Packer) vol.213, p.111-128.

E Lesellier, A Tchapla, C Marty, and A Lebert. (1993) *J. Chrom.* **633,** 9-23.

H Lichtenthaler. (1987) *in* Methods in Enzymology (Packer, L., and Douce, R., eds.), Vol. 148, p. 350-382. Academic Press, Sandiego.

V Attuquayefio, and KA Buckle. (1987) *J. Agric. Food Chem.* **35,** 777-779.

EK Johnson, HC Thompson, Jr, and MC Bowman. (1982) *J. Agric. Food Chem.* **30,** 324-329.

RK Juhler, and RP Cox. (1990) *J. Chrom.* **508,** 232-235.

LA Mejia, E Hudson, E Gonzalez de Mejia, and F VAzquez. (1988) *J. Food Sci.* **53, 1448**-779.

DH Kim, *et al.* (1986) *in* Silhumsaenghwahak (KB Lee *et al.* eds.), p 409-419. Tamgoodang, Seoul.

A Lifshitz, WL Stanley, and Y Stepak. (1970) *J. Food Sci.* **35,** 543-547.

S Kim. (1995) Ph.D. thesis. Chonnam national Univ. Korea.

DJ Bennett, and GW Kirby. (1968) *J. Chem. Soc. (C)* 442-446.

PH Todd Jr., MG Bensinger, and T Biftu. (1977) *J. Food Sci.* **42,** 660-665.

MD Collins, LM Wasmund, and PW Bosland. (1995) *HortScience* **30,** 137-139.

농촌진흥청. 1991. **식품성분표** (4**판**). **상록사**.

제 7 장 결 론

1. 고추 유전자지도 작성 및 주요 형질과 연관된 분자 표지 선발

총 287개의 RFLP marker와 35개의 SSLP 및 136개의 AFLP를 이용하여 MAPMAKER 3.0b 프로그램을 이용하여 고추의 분자유전자 지도를 작성하였다. 이 중에서 389개의 표지들이 이 분자유전자지도에 포함되는 것으로 나타났다. 분자유전자 지도를 작성하기 위해서 우선 F2 개체에서 유전형이 분석된 456개의 표지를 LOD 5.0, Maximum recombination value 0.20에서 Group 명령어를 이용하여 각각의 연관군에 나누어준다. 그런 다음 정보력이 높은 표지들을 따로 선발해내기 위해서 SUGGEST SUBSET 명령어를 이용하여 정보력이 높은 마커들을 선발해낸다. 그런 다음, RFLP marker를 이용하여 frame map을 작성한다. AFLP의 경우, dominant marker이기 때문에 이를 RFLP와 같이 분석하였을 경우, 표지들이 한곳을 쏠리는 현상이 발생하기 때문에 연관군 분석이 제대로 이루어지지 않는다. 따라서, 먼저 정보력이 높은 RFLP와 SSLP를 이용하여 먼저 골격지도를 만들고 여기에 AFLP 표지들을 추가하는 방법을 사용하였다. 이렇게 해서 19개의 연관군으로 나뉜 표지들 중에서 정보력이 높은 RFLP 및 SSLP를 이용하여 골격지도를 그릴 때, 먼저 각각의 연관군에 있는 표지들을 THREE POINT 방법을 이용하여 계산을 해준 다음 ORDER 명령어를 이용하여 표지들의 순서를 정해준다. 그런 다음 BUILD 명령어를 이용하여 남은 RFLP 및 SSLP 표지들을 연관군에 포함시킨다. 그런 다음, TRY 명령어를 이용하여 AFLP 표지들을 각각의 연관군에 포함시킨다. 골격 지도는 모두 293개의 표지들을 사용하여 완성되었고,

다시 여기 102개의 AFLP 표지들이 지도에 포함되었다. 여기에서 본 유전자지도에서도 작년의 Cornell 대학의 보고와 마찬가지로 많은 수의 표지들이 하나의 덩어리를 이루는 것이 관찰되었으며, 총 102개의 표지들이 이러한 현상을 보였다. 이러한 유전자 지도의 총 길이는 1956.4cM 이었으며, 표지간의 거리는 골격 지도의 경우 6.67cM이었고, combine map의 경우 4.95 cM이었다(그림7, 표6). 유전자 지도가 좀더 실용적이고 또한 많은 정보력을 갖기 위해서는 분자마커가 고추의 유전체에서 차지하는 비율이 약100kbp정도가 되어야 한다. 알려진 바에 의하면 고추 유전체의 길이는 약 2700Mbp이다. 현재 frame map에 올려진 마커가 293개이므로 대략적으로 한 개의 표지가 유전체를 차지하는 비율이 약 9.2Mbp이다. 따라서, 앞으로 많은 마커가 필요하다. 산술적인 계산을 해보았을 경우, 27000개의 표지가 필요하다. 하지만, 유전체 상에서 유전자가 고르게 분포하는 것은 아니며, hot spot이라고 하여서 유전자들이 하나의 그룹을 형성하는 것을 볼 수가 있다. 하지만, 약 450Mbp의 유전체를 가지고 있는 벼의 경우, chromosome walking을 하기 위해서 2275개의 표지를 갖는 유전자 지도를 필요로 했던 것을 생각해보아야 한다. 이를 참고 할 경우, 적어도 5000개 정도의 표지가 있어야 할 것이다. 더구나, 마커들간의 정보력을 생각해 볼 때, 공우성 표지인 RFLP와 SSLP가 많이 필요하다. RFLP의 경우, 유전체 상에서 해상도의 문제로서 RFLP 표지만을 가지고서는 전체 유전체를 분석 할 수가 없다. 따라서, SSLP 표지가 필요하다. 이 밖에 SSLP의 경우, 유전체 상에서 단 하나만의 유전자좌를 갖고 있기 때문에 chromosome walking시에 STS (Sequence Tagged Site)와 함께 Land marker로 각광 받고 있다. 현재 토마토의 경우, 1000여개의 마커를 갖는 골격지도가 보고 되어져 있다 (Solgene). 고추가 국내 시장에서 차지하는 비중이 미국에서 토마토와 갖거나 아니면 더 크다는 점을 생각 해 볼 때, 더 많은 연구가 필요함은 자명하다. 따라서, 우리도 많은 수의 마커를 갖는 골격지도를 만들어야 함 또한 자명하다. 하지만, 토마토 지도의 경우 다수의 AFLP

마커가 사용되었다. 따라서, 우리가 세계에서 경쟁력을 갖기 위해서는 RFLP와 SSLP등의 공우성 마커를 중심으로 많은 표지들을 갖는 유전자지도를 작성해야 할 것이다. 하지만, RFLP와 SSLP의 경우, 개발을 위해 너무 많은 시간과 노동력을 요구한다는 단점이 있다. 하지만, RFLP의 경우, 대규모의 EST 사업과 같이 병행한다면, DNA 탐침 개발에 들어가는 노동력을 상당부분 줄일 수 있다. SSLP의 경우, 보다 발달된 염개 해독 장치를 이용한다면 역시 노동력의 절감을 가지고 올 수도 있다. 이런 점과 집단의 유지 및 관리 등을 종합하여 생각해보면, 앞으로 우리가 해야 할 일들은 다음과 같을 것이다. 먼저, 유전자 지도 집단을 RIL (Recombinant Inbred Line) 집단으로 옮겨야 할 것이다. 그리고, 다른 연구 그룹과 공동연구로서 대규모의 EST를 작성하면서 이를 RFLP를 위한 탐침으로 사용하는 것이다. 보다 대규모의 연구 그룹을 조직해서 보다 광범위한 접근을 해야 할 것이다. 지금까지 본 연구는 이러한 연구를 위한 기초를 제공할 수 있는 결과로 약400개의 분자 표지를 포함하는 유전자 지도를 작성할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로해서 계속적인 연구를 진행한다면, 몇 년 후에는 세계적으로 경쟁력을 갖는 유전자 지도를 갖을 수 있게 되며, 이를 이용해서 고추 유전체에 보다 체계적이고 과학적인 접근을 할 수가 있을 것이다.

고추 기계화 수확에 적합한 과탁 분리 형질과 연관된 분자표지를 선발하기 위해 bulked segregant analysis를 이용하여 AFLP를 수행하였다. EcoRI primer 16 종류, MseI primer 16 종류를 이용해 총 256 조합을 이용해 과탁분리 pool에서만 나타나는 10개의 표지를 1차 선발하였고 과탁분리 형질과의 연관분석을 실시한 결과 2cM 정도로 연관된 AFLP 표지를 2개 선발하였다. 이러한 AFLP 표지는 cloning과 sequencing과정을 거쳐, 이를 STS marker로 전환하여 실제 육종의 선발효율을 높이기 위한 작업을 수행할 예정이다.

고추 더뎅이병 저항성 형질연관 DNA 표지 선발하기 위해 bulked segregant analysis를 위한 재료로 이용하였다. 이병성은 저항성에 대해 열성이므로 이병성 개체는 모두 homozygote이다. 따라서 전년도에 이병성으로 판정된 8 개체를 임의 선택하고 이들의 DNA를 bulked segregant analysis를 이용하여 AFLP를 수행하였다. *Eco*RI primer 32 종류, *Mse*I primer 16 종류를 이용해 총 512조합의 primer combination으로부터 저항성 pool인 BR에서만 나타나는 표지를 찾는 연구를 수행하였다. 최초 BR과 BS간 비교를 통해 총 26 개의 표지를 1차 선발하였고, P1(풍각), P2(PI271322), BR, BS, 비교를 통해 P2와 BR에서 동시에 나타나는 표지를 8개를 2차 선발하였다. 이 8개의 AFLP 표지와 저항성 특성과의 연관 분석 결과 저항성 유전자와 약 2 cM 정도 연관된 것으로 나타난 표지를 2개 선발하였으며 나머지 6개의 표지는 저항성 유전자를 중심으로 60 cM 근처에 분포하였다. 이러한 AFLP 표지 중 가까이 연관되어있는 4개의 표지를 cloning하고 sequencing하였으며, 각각의 염기서열을 바탕으로 primer를 합성하여, STS marker로의 전환을 시도하였다. 그 결과 E11M71-300, E12M52-300, E01M15-300 세 개의 경우 STS 표지로 전환시 저항성과 이병성 개체에서 모두 같은 크기의 밴드가 증폭되어 저항성 특이적인 표지로의 사용은 불가하였다. 그러나, E21M73-200의 경우 저항성 개체에서만 원하는 크기의 밴드를 증폭시킬 수 있었으며, 이는 실제 육종 선발시 분자표지로서 간편하게 이용할 수 있을 것이다.

고추의 과색과 관련된 Carotenoid 합성관련 유전자를 분리하고 및 고추 과색형질의 유전분석을 실시하였다. *C. annuum*의 과실은 빨간색을 나타내며, *C. chinense*의 과실은 주황색을 나타낸다. F1에서는 과실이 빨간색으로 나타나며, 이를 통하여 빨간색이 주황색에 대하여 우성으로 작용함을 알 수 있었고, F2 세대에서는 약간의 변이의 정도는 있으나 빨간색과 주황색의 분리비가 약 3 : 1 정도로 단일

유전자에 의해 조절되는 형질임을 추정할 수 있었다. 이를 보다 정확히 동정하기 위하여 HPLC를 통하여 각각의 색소에 대한 성분 함량을 조사하고, 이를 QTL 분석 하고자 하였다. 또한 고추의 색깔과 카로티노이드의 함량과는 밀접한 관계가 있으므로, 카로티노이드의 생합성 과정에 관련된 유전자들에 의해 색깔이 결정될 수 있음을 가정하고, 몇가지 유전자들을 클로닝하여 유전자 지도에 위치시킨 후 과색과의 연관 정도를 분석하였다. 그 결과 카로티노이드 생합성 과정의 초기 단계에 관여하는 효소인 phytoene synthase의 유전형이 과색의 표현형과 정확히 일치함을 보였으며, 이를 통하여 phytoene synthase가 고추의 과색에 매우 중요한 역할을 하는 효소로 기대되어진다. 현재 이러한 표현형의 차이를 나타내는 원인을 알아내기 위하여 phytoene synthase 유전자의 염기서열과 발현 정도를 비교 분석하고 있으며, 최종적으로는 고추의 형질전환을 통하여 이를 확인하는 것이 요구된다.

고추의 매운맛의 유전양상을 분석하기 위해 위탁과제를 맡고있는 대전 기초과학지원연구소에 고추 유전자지도 작성용 분리집단과 교배 모본에서의 매운맛 분석을 의뢰한 결과와 현재까지 작성된 유전자지도를 이용하여 매운맛의 양적형질 유전분석을 실시하였다. Total capsaicinoid 함량의 경우 LOD score 3.0 이상의 값을 가지는 연관군 4개, capsaicin 함량의 경우 연관군 5개, dihydrocapsaicin 함량의 경우 연관군 11개의 특정 부분에서 유의성이 검정되었다. 이러한 결과로 볼 때 고추의 매운맛과 관련된 유전은 많은 유전자가 관련된 양적형질에 의해 조절되는 것을 알 수 있다. 또한 고추의 매운맛에 관여하는 유전자를 분리하기 위해 수분한 후 약 30일된 각각의 매운맛 고추와 맵지않은 고추의 태좌에서 RNA를 얻은후 이들 중 poly(A) RNA만을 동정한후 cDNA로 전환하여 이들을 PCR-based suppression subtractive hybridization의 방법을 통해 매운맛 고추 태좌에서만 특이적으로 존재하는 cDNA clone들을 얻을 수 있었다. Subtraction

을 통해 얻어진 cDNA clone들은 우선적으로 매운맛 고추의 태좌에서만 특이적으로 발현하는지를 확인한 결과 약 400개의 clone들 중 53개의 유의성 있는 clone들을 얻을 수 있었다. 이후 이들을 모두 염기서열을 확정한 후, 기존의 데이타베이스(NCBI BLAST)를 통해 조사한 결과 크게 세가지 분류로 나뉠 수 있었다. 첫째, 대사과정 관련 유전자 집단(aminotransferase, acetyltransferase, acyl synthase..), 둘째, 세포 구조에 관련된 유전자 집단 (cell wall protein, glycine rich protein...), 그리고 마지막으로 기존의 보고된 유전자와는 유의성있게 관련이 없는 유전자 집단이다. 현재 이들 유전자들을 기존의 매운맛과 관련된 QTL 유전자 지도와의 연관 여부를 알아보는 실험과 cDNA library 제작을 통해 full clone들을 확보하는 것이 요구되며, 이들을 가지고 생화학적인 측면에서 더 접근해나가야 할 필요가 있다.

2. 고추 역병 및 더뎅이병 저항성 NIL 육성 및 유전분석

경북지방 재래종에 역병과 더뎅이병 저항성을 도입하여 지역 특화품종으로 육성하는 동시에 저항성 유전자의 DNA marking을 위한 Near Isogenic Line (NIL)을 육성하기 위하여 본 연구를 실시하였다. 역병 저항성 NIL은 '칠성초'와 '수비초'를 반복친으로 하고, 'AC2258' 과 'SCM334' 를 공여친으로 하는 여교잡 육종과정을 수행하였다. Chilsung×SCM334와 Subi×AC2258 조합은 BC6까지, Chilsung×AC2258은 BC7까지 여교잡 세대를 진행하였다. 더뎅이병 저항성 NIL은 칠성초를 반복친, 과민반응형 저항성 유전자 Bs1, Bs2를 가진 XVR 3-25, Bs1, Bs2, Bs3를 가지는 ECW SR, Bs3를 '칼미초'에 도입하여 육성한 25-11-계통, 그리고 비과민형의 일반저항성을 보유한 PI163192를 공여친으로 하는 교배조합을

작성하여 BC4까지 검정과 선발을 실시하였다. 이들 저항성 계통들은 지역적응성을 거친 후 새로운 품종으로 등록될 수 있을 것으로 사료된다.

국내 각지에서 수집 분리한 33개의 더뎅이병원 균주에 대하여 병원형 분류를 실시한 결과 국내에는 아직 race 1과 race 3만 발견되었다.

3. 고추의 이수체 생성 및 핵형 분석

Trisomic은 염색체가 정상보다 하나 더 많은 것으로 핵형분석에 많이 이용되고 있는 식물재료이다. 고추는 염색체의 크기와 모양이 비슷하여 핵형분석이 어려웠는데 이러한 trisomic을 개발함으로써 핵형 분석 뿐만 아니라 연관군과의 상호 관계를 알 수 있다.

본 연구에서는 trisomic의 핵형분석을 위해 뿌리의 염색체를 확인하였다. 또한 trisomics 18 개체와 double trisomics 18개체로부터 genomic DNA를 추출하였고 Southern hybridization을 위해 각 linkage group에 속해 있는 RFLP marker를 선발하였다. Southern hybridization 결과 RFLP marker에 따라서 각각 trisomics의 band intensity가 현저한 차이를 보였다. Band intensity를 정량화 하기 위해 KS400, TINA 2.0 software program을 이용였으며 각 band의 marker 별 ratio를 측정하였다. Table 5에서 보는 봐야 같이 trisomic 2번과 18번의 경우 linkage group 8번과 10번으로 일치하였고 trisomic 23번과 31번의 경우는 linkage group 5번과 14번과 일치하였다. Trisomic 20, 51번은 linkage group 3번과 6번에서 일치하였으며 trisomic 10번은 linkage group 4번과 동일하였다. 그러나 linkage group 9, 11, 13, 15의 경우에는 연관된 trisomic을 찾을 수 없었다. Double trisomic에서는 trisomic과는 달리 이러한 일치성이 적었다. 이것은 추가된 염색체가 두 개가 상호 같은 것이지 아니면 서로 다른 염색체가 추가된 것인지에 대한 자료가 미흡하기 때문이며 추후에 관련 연구가 계속 진행되어야 할 것이다.

현재 위 제 1세부과제에서 작성한 유전자 지도와 비교해 보면 본 연구에서 이용되었던 linkage group은 15개 group이었으나 현재 19개의 linkage group으로 되어있다. Linkage 1번과 2번은 동일하나 나머지 linkage group은 다르다. 본 세부과제에서 기초로 한 linkage group 3번, 4번의 경우 8번, 6번으로 번호만 변동 된 것도 있으며 linkage 5번의 경우 4번과 13번, 10번 등으로 분화되었다. 현재 linkage group은 계속해서 RFLP marker등에 의해 좀 더 고밀도화 된다면 염색체 숫자와 같게 되는 12개의 linkage group으로 나눠질 수 있으리라 기대된다. 또한 본 연구를 이용하여 분화되어 가고 있는 group을 하나의 group으로 연결시킬 수 있으리라 사려된다. 또한 염색체와 연관군과의 상호관계를 규명함으로서 다른 linkage group과 상호 map을 보안할 수 있을 것으로 기대한다.

4. 고추 기계화 적합성 NIL 육성 및 유전자지도 작성용 RIL 육성

고추 기계화 적합성 NIL육성을 위해 Backcross를 BC5F1 - BC7F1을 실시한 후 표현형을 조사하여 고추 기계화 적합성 관련된 각형질들의 유전적 안정성을 확보하기 위해 세대를 진전하였다.

이들 기계화 수확에 적합한 계통들은 연관된 분자표지 또는 유전자를 찾거나 새로운 품종 육성을 위한 재료로 이용될 수 있을것이다.

고추 유전자 지도 작성용 RIL 집단을 위해 현재 140여개의 F8 집단을 유지, 고정중에 있으며 전 계통중 30 - 40% 정도의 계통은 유전적으로 안정화되고 있음을 관찰 할 수 있었고 지도 작성에 필요한 유전적 다양성을 갖고 있는 것으로 조사되었다. 이들 계통은 2 3세대 더 진전시킨다면 영구적인 유전자지도 작성용 분리집단으로 이용될 수 있을 것이다. 또한 이들 계통중 원예적으로 유용한

형질이 고정된 개체들은 실제 육종재료로서 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

5. 고품질 고추 육성을 위한 Chemical Fingerprinting 방법 개발

본 연구 Capsaicinoids, carotenoids, 그리고 유리 아미노산에 대한 chemical finger printing 기법을 개발하고 이에 근거하여 대량 분석법을 확립하였다. 본 연구에서 사용한 고추에서 분리되는 캡사이시노이드는 7가지로 capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin I, homodihydrocapsaicin II, vanillin octanamide, vanillin decanamide로 구성되어 있었다. 캡사이시노이드는0.1 ㎍/g dry wt까지 검출되었다. 본 연구에서 사용된 모친형인 *C. chinens*는 *C. annuum*에 비해 약 40배 정도 많은 캡사이시노이드를 함유하고 있었으며 *C. chinens*는 capsaicin이 대부분을 차지한 반면, *C. annuum*은 기타 캡사이시노이드가 상당량을 차지하고 있었다.

Chemical finger printing 기법으로 본 연구에서 사용한 고추에서 분리되는 카로티노이드는 약 10가지 정도였으나 그중 주요 카로티노이드인 capsorubin, capsanthin, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene등이 전체의 70%를 차지하였다. 본 연구에서 사용된 모친형인 *C. annuum*은 *C. chinens*에 비해 약 10배 정도 많은 카로티노이드를 함유하고 있었으나 전체적인 크로마토그램 형태나 조성은 차이가 없었다. 카로티노이드는 phytoene synthase 유전자형에 따라 F2에서 표현형과 일치하게 나누어졌으며 heterologous 유전자형은 정상처럼 많은 카로티노이드가 발현되기는 하였으나 오차가 매우 심하게 나타났다.

두 모친형에서 나타나는 아스코르브산은 5-10 ㎎/g dry wt로 타 작물에 비해 매우 높은 농도로 함유되어 있었다. 유리 아미노산도 5-20 ㎎/g dry wt로 타 작물

에 비교할 때, **매우 높은 농도로 포함되어 있었다**. **고추의 다양한 이차 대사 산물중 품질에 직접적으로 기여하는 카로티노이드**, **캡사이시노이드**, **아스코르빈산**, **그리고 유리 아미노산의 추출 및 전처리**, **정량 분석법** (chemical finger printing) **을 개발**, **표준화하였고 이를 이용하여 다양한 고추 품종 및 교배**, **육종되는** F1**들을 분석함으로서 품질 개선 근거를 마련함과 동시에 고품질 고추 품종 육종에 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다**.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.