

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 2일 (02.01.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/004718 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6895 (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/011991

(22) 국제출원일: 2018년 10월 11일 (11.10.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0073763 2018년 6월 27일 (27.06.2018) KR

(71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

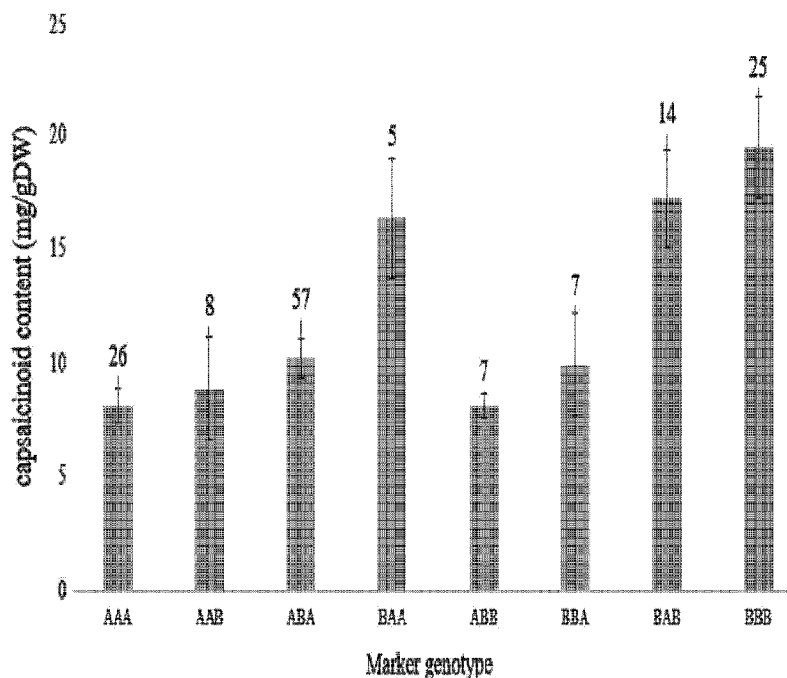
(72) 발명자: 강병철 (KANG, Byoung-Cheorl); 08725 서울시 관악구 성현로 80, 113동 204호, Seoul (KR). 장시영 (JANG, Siyoung); 17780 경기도 평택시 송탄로 170, 105동 801호, Gyeonggi-do (KR). 박민정 (PARK, Minjeong); 08843 서울시 관악구 문성로30길 39, 401호, Seoul (KR). 정지원 (JUNG, Jiwon); 16868 경기도 용인시 수지구 용구대로 2720, 104동 1504호, Gyeonggi-do (KR). 임정현 (LIM, Jeong Hyun); 16513 경기도 수원시 영통구 광교호수로152번길 23, 2301-1702, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로 135 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

(54) Title: MARKER FOR DETERMINING SPICINESS OF PEPPER PERICARP, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a marker for determining the spiciness of a pepper pericarp. When a molecular marker, of the present invention, for determining the spiciness of a pepper pericarp is used, information for overcoming difficulties according to interspecific crossing and limitations, due to placenta volume restrictions, in breeding high capsaicin-containing varieties can be provided, and thus the present invention is effectively usable in fields involved in breeding novel high capsaicin-containing pepper varieties, which attract attention because of anticancer actions and dieting effects.

(57) 요약서: 본 발명은 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커에 관한 것으로, 본 발명의 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 분자마커를 이용하면, 종간 교배에 따른 어려움과 태좌 부피의 한계 때문에 캡사이신 고함유 품종을 육종하는데 한계를 극복하는데 정보를 제공할 수 있어, 항암작용 및 다이어트 효과로 인해 주목받고 있는 캡사이신 고함량의 신규 고추 품종 육종 분야에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/004718 A1

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 캡사이신(capsaicin)은 고추의 매운 맛을 결정하는 성분으로 바닐릴아민(vanillylamine)과 지방산의 축합에 의해 합성되는 알칼로이드(alkaloid) 물질이다. 고추 과실 중 태좌 조직에서 캡사이신 생합성 효소(CS)에 의해 캡사이신(capsaicin)과 다이하이드로캡사이신(dihydrocapsaicin)과 같은 캡사이시노이드(capsaicinoids)가 합성되며, *Pun1* 유전자가 캡사이신 생합성 효소를 암호화하는 것으로 알려져 있다. 단일 우성 유전자인 *Pun1*은 무신미 유전자(*pun1*)에 대해 우성이며 신미 유무를 질적으로 결정하는 유일한 유전자로 동형열성 *Pun1*을 가진 개체는 무신미 특성을 나타낸다. 무신미 유전자는 1.8 kb의 프로모터 부위와 0.7kb의 첫번째 엑손(exon) 부위에 결실이 있다.
- [3] 한편, 세계에서 가장 매운 고추로 알려진 Bhut Jolokia 및 Trinidad Moruga Scorpion은 백만 스코빌 유닛(SHU; Scoville heat units) 이상으로 청양고추의 약 100배의 매운 맛을 지닌다. 최근 연구에서는 이렇게 극도로 매운 고추는 다른 고추들이 태좌에서만 캡사이신을 합성하는 것과는 달리 태좌와 과실의 안쪽 벽인 과피에서도 캡사이신을 합성하는 것으로 밝혀졌다. 또한 캡사이시노이드 생합성에 관여하는 여러 유전자의 발현이 증가함으로써 전체적인 캡사이시노이드 함량을 향상시킬 수 있음을 밝혔다. 극도로 매운 고추인 스콜피온에서는 캡사이시노이드 합성에 중요한 유전자인 *Pun1*과 *pAMT*가 다른 품종에 비해 많이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 과실의 전체 무게와 태좌, 과피의 무게를 계산하여 과피에서의 캡사이시노이드 합성이 전체적인 캡사이시노이드 함량을 크게 증가시킨다는 것을 보였다.
- [4] 캡사이신은 항암작용 및 다이어트 효과로 인해 주목받고 있어 고추 품종 육성에서 주요 목표 형질이다. 그러나 중간 교배에 따른 어려움과 태좌 부피의 한계 때문에 캡사이신 고함유 품종을 육종하는데 한계를 지닌다. 그러나 과피에서 캡사이신을 합성하는 유전자를 동정한다면 과실 부피의 대부분을 차지하는 과피에 캡사이신 합성 유전자좌를 도입함으로써 기존보다 훨씬 매운 고추를 육종하는데 활용할 수 있다.
- [5] 한편, 한국공개특허 제2009-0091629호에서는 '매운 맛을 내는 고추를 생산하는 고추 식물을 분별하기 위한 마커, 그를 포함하는 키트, 및 매운 맛을 내는 고추를 생산하는 고추 식물을 분별하는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허

제1573419에는 '캡시노이드 고 함유 고추 품종의 구별을 위한 프라이머 세트 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 과피에서 신미 표현형이 분리되는 '하바네로'×'부트 졸로키아' 및 'SNU11-001'×'부트 졸로키아'인 2개의 분리집단을 구축한 후 유전자지도를 작성하여 과피에서의 캡사이시노이드 합성 조절 유전자좌를 탐색하였다. 과피에서 매운 고추 품종 '부트 졸로키아'를 과피가 맵지 않은 품종 '하바네로' 및 'SNU11-001'과 각각 교배하여 두 개의 연구집단을 만들었으며, GBS(Genotyping-by-Sequencing) 방법을 이용하여 유전자지도를 작성하였다. 양적형질 유전자좌 분석을 실시한 결과, 공통적으로 염색체 6번에서 양적형질 유전자좌가 발견되었다. '하바네로'×'부트 졸로키아' 집단에서는 염색체 11번에서, 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' 집단에서는 염색체 4번에서 양적형질 유전자가 추가로 발견되었으며, 이 유전자좌를 대상으로 3개로 이루어진 분자마커 2 세트를 개발하여 유전형과 표현형을 비교하여 표현형 예측 가능성을 확인하였고, 또한 *KR* (Ketoacyl-ACP reductase) 유전자의 6193번째에 위치한 SNP; 및 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (ankyrin-repeat containing protein) 유전자의 1770번째에 위치한 SNP를 개발하여 유전형과 표현형을 비교하여 표현형 예측 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 고추 6번 염색체의 223,429,166번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism), 고추 6번 염색체의 226,585,896번째에 위치한 SNP 및 고추 11번 염색체의 38,833,824번째에 위치한 SNP; 고추 4번 염색체의 210,030,398번째에 위치한 SNP, 고추 6번 염색체의 233,547,059번째에 위치한 SNP 및 고추 6번 염색체의 231,953,335번째에 위치한 SNP; 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 *KR* (Ketoacyl-ACP reductase) 유전자의 6193번째에 위치한 SNP; 및 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (ankyrin-repeat containing protein) 유전자의 1770번째에 위치한 SNP;로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트와 구성된 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트와 구성된 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트와 구성된 마커; 또는 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트와 구성된 마커, 서열번호 9 및 10의

프라이머 세트에 구성된 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트에 구성된 마커;를 포함하는 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커를 제공한다.

- [9] 또한, 본 발명은 고추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [10] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 마커를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [11] 상기 증폭 단계의 산물을 분석하는 단계를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하는 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 마커; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명의 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 분자마커를 이용하면, 중간 교배에 따른 어려움과 태좌 부피의 한계 때문에 캡사이신 고함유 품종을 육종하는데 한계를 극복하는데 정보를 제공할 수 있어, 항암작용 및 다이어트 효과로 인해 주목받고 있는 캡사이신 고함량의 신규 고추 품종 육종 분야에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 '하바네로'×'부트 졸로키아' F_{2:3} 분리집단에서의 과피 신미 표현형 조사 결과를 나타낸다.
- [15] 도 2는 '하바네로'×'부트 졸로키아'의 유전자지도를 나타낸다.
- [16] 도 3은 2016년 재배된 '하바네로'×'부트 졸로키아' F₃ 집단에서 실시된 QTL-seq 결과를 나타낸 SNP-index plot을 나타낸다.
- [17] 도 4는 'SNU11-001'×'부트 졸로키아'의 유전자지도를 나타낸다.
- [18] 도 5는 HJ6_53 (A)와 HJ6_47 (B), SJ 6_190 (C) 마커로 분석한 유전형에 따른 과피의 캡사이시노이드 함량(ug/gDW)을 F₂ 분리집단에 대하여 표현한 box plot를 나타낸다.
- [19] 도 6은 6번 염색체에서 발견된 '하바네로'×'부트 졸로키아' 집단의 QTL과 11번 염색체의 QTL 위치 및 마커 개발에 사용한 SNP 위치를 나타낸다.
- [20] 도 7은 HJ16_CAP6.3_qtlseq_caps, HJ16_CAP6.4 _caps, HJ17_CAP11_caps 마커 다형성 확인 실험을 나타낸다. Haba, 하바네로; Jo, 부트 졸로키아
- [21] 도 8은 4번 염색체에서 발견된 'SNU 11-001' X '부트 졸로키아' 집단의 QTL과 6번 염색체의 QTL 위치 및 마커 개발에 사용한 SNP 위치를 나타낸다.
- [22] 도 9는 SJ_TCP4.1_hrm, SJ_TCP6.2_hrm, SJ_TCP6.1_caps 마커 다형성 확인 실험을 나타낸다. SNU, SNU11-001; Jo, 부트 졸로키아
- [23] 도 10은 마커 검정 결과가 같은 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균을 나타낸다. A, '하바네로'; B, '부트 졸로키아'
- [24] 도 11은 마커 검정 결과가 같은 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균을 나타낸다. A, 'SNU11-001'; B, '부트 졸로키아'

- [25] 도 12는 트랜스크립톰 분석에 사용된 스콜피온과 하바네로, ECW의 발달 단계별 과실 사진을 나타낸다.
- [26] 도 13은 과실의 발달 단계별 과피에서의 차등 발현 유전자 분포를 나타내는 벤 다이어그램을 나타낸다.
- [27] 도 14는 신미 생합성 경로와 일부 유전자의 과피에서 발현양상을 표현하는 히트 맵을 나타낸다.
- [28] 도 15는 '하바네로'X'부트 졸로키아' 집단과 'SNU 11-001' X '부트 졸로키아' 집단의 6번 염색체에 위치하는 QTL과 두 후보 유전자의 위치를 나타낸다.
- [29] 도 16은 트랜스크립톰 분석 결과 '하바네로'와 '스콜피온'의 발현이 달라지는 유전자에 대한 RNA-seq 결과(꺾은선 그래프)와 real-time RT-PCR 결과(막대 그래프)를 나타낸다.
- [30] 도 17은 qRT-PCR에 사용한 '부트 졸로키아' 34와 45 DAP 과실 사진을 나타내며(a), ankyrin 유전자의 발현량 조사를 위해 실시한 real-time RT-PCR 결과(막대 그래프)(b)를 나타낸다.
- [31] 도 18은 ankyrin 유전자의 예상되는 4차 구조를 시뮬레이션한 모델을 나타낸다.
- [32] 도 19는 *KR*(Ketoacyl-ACP reductase)과 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (*ankyrin*)의 유전형에 따라 과피 캡사이시노이드 함량 평균값을 계산한 박스 플롯(box plot)을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고추 6번 염색체의 223,429,166번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism), 고추 6번 염색체의 226,585,896번째에 위치한 SNP 및 고추 11번 염색체의 38,833,824번째에 위치한 SNP; 고추 4번 염색체의 210,030,398번째에 위치한 SNP, 고추 6번 염색체의 233,547,059번째에 위치한 SNP 및 고추 6번 염색체의 231,953,335번째에 위치한 SNP; 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 *KR* (Ketoacyl-ACP reductase) 유전자의 6193번째에 위치한 SNP; 및 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (*ankyrin-repeat containing protein*) 유전자의 1770번째에 위치한 SNP;로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.
- [34] 또한, 본 발명은 고추 6번 염색체의 223,429,166번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism), 고추 6번 염색체의 226,585,896번째에 위치한 SNP 및 고추 11번 염색체의 38,833,824번째에 위치한 SNP; 및 고추 4번 염색체의 210,030,398번째에 위치한 SNP, 고추 6번 염색체의 233,547,059번째에 위치한 SNP 및 고추 6번 염색체의 231,953,335번째에 위치한 SNP;를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인

폴리뉴클레오티드를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

- [35] 또한, 본 발명은 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 *KR* (Ketoacyl-ACP reductase) 유전자의 6193번째에 위치한 SNP; 및 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (ankyrin-repeat containing protein) 유전자의 1770번째에 위치한 SNP;를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.
- [36] 상기 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 *KR* (Ketoacyl-ACP reductase) 유전자의 6193번째 염기가 A이면 하바네로 유전형을 나타내고, C이면 스콜피온 유전형을 나타내며, 상기 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (ankyrin-repeat containing protein) 유전자의 1770번째 염기가 C이면 하바네로 유전형을 나타내고, A이면 스콜피온 유전형을 나타내어, 각 유전자의 유전형이 '스콜피온'의 유전형과 일치할 때, 과피에서 캡사이시노이드 함량 평균값이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 따라서 집단의 개체의 두 유전자의 유전형을 '스콜피온' 혹은 '하바네로'와 비교함으로써 과피 신미 표현형을 예측할 수 있다.
- [37] 상기 SNP의 위치 및 서열은 레퍼런스 게놈(reference genome)으로 고추(*C. chinense*) 크로모솜 v.1.2 (<http://peppergenome.snu.ac.kr>)에서 확인할 수 있다.
- [38] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.
- [40] 본 발명의 SNP는 고추 과피의 신미 정도의 판별에 직접적인 영향을 미치는 매우 안정적인 유전자 마커이다.
- [41] 본 발명의 6개의 SNP 마커를 이용한 고추 과피의 신미 정도의 판별은 다음과 같은 방법으로 수행할 수 있다; 고추 집단에서 검정 대상이 되는 개체(과피 캡사이시노이드 함량이 낮은 부모_A : 하바네로 또는 'SNU11-001', 과피 캡사이시노이드 함량이 높은 부모_B : '부트 졸로스키')는 본 발명의 마커 검정 결과 얻는 유전형의 조합을 바탕으로 캡사이시노이드 함량이 높은 편(B : '부트 졸로스키')에 속하는지 예측이 가능하다. 세 개의 마커(고추 6번 염색체의 223,429,166번째에 위치한 SNP, 고추 6번 염색체의 226,585,896 번째에 위치한 SNP 및 고추 11번 염색체의 38,833,824번째에 위치한 SNP; 또는 고추 4번 염색체의 210,030,398번째에 위치한 SNP, 고추 6번 염색체의 233,547,059번째에 위치한 SNP 및 고추 6번 염색체의 231,953,335번째에 위치한 SNP)를 분석하여 집단 내 개체들의 유전형을 조사한 후, 분석 결과 하나의 개체에서 마커 검정 결과 얻어지는 세 개의 유전형의 조합 중, 캡사이시노이드 함량이 높은 품종의

유전형이 많이 나올수록 해당 개체의 과피 캡사이시노이드 함량값은 높은 군에 속하는 것으로 판단할 수 있다. 참고로, 과피 캡사이시노이드 함량이 낮은 부모는 하바네로 또는 SNU11-001이며, 과피 캡사이시노이드 함량이 높은 부모는 부트 졸로키아이다.

- [42] 집단 전체 개체들을 대상으로 세 개의 마커로 검정하여 모두 AAA 타입이 나온 개체들을 분류하고, 그들의 과피 캡사이시노이드 함량의 평균을 구할 수 있다. 마찬가지로 AAB, ABA, BBB 등 타입으로 조사된 개체들의 함량 평균을 구한 후 그래프로 가시화시키고, 세 개의 유전형에서 B 타입이 많아질수록 대체적으로 과피 캡사이시노이드 함량값이 높아지는 경향성을 확인할 수 있다(표 14, 표 15, 도 10 및 도 11 참고).
- [43] 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트로 구성된 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트로 구성된 마커; 또는 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트로 구성된 마커, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트로 구성된 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트로 구성된 마커;를 포함하는 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커를 제공한다.
- [44] 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트로 구성된 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트로 구성된 마커; 및 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트로 구성된 마커, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트로 구성된 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트로 구성된 마커;를 포함하는 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커를 제공한다.
- [45] 본 발명의 일 구현 예에 따른 마커는 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트로 구성된 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence) 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커; 또는 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트로 구성된 HRM(high resolution melting) 마커, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트로 구성된 HRM 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커;를 포함하는 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트로 구성된 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence) 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커; 및 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트로 구성된 HRM(high resolution melting) 마커, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트로 구성된 HRM 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커;를 포함하는 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [46] 본 발명의 일 구현 예에 따른 마커에서, 상기 고추는 과피에서 캡사이시노이드(capsaicinoids)를 합성하는 고추일 수 있으며, 바람직하게는 부트 졸로키아(Bhut Jolokia) 또는 스콜피온(Scorpion)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [47] 본 발명의 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트로 구성된 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence) 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커는 '하바네로'×'부트 졸로키아' 집단에서 개발된 3개의 CAPS 마커를 증폭할 수 있는 프라이머 세트로, 상기 프라이머 세트로 증폭된 산물은 표 11에 기재한 바와 같이, *RsaI*, *RsaI* 및 *TaqI*인 제한효소 절단에 의해 분석이 가능하며,
- [48] 본 발명의 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트로 구성된 HRM(high resolution melting) 마커, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트로 구성된 HRM 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트로 구성된 CAPS 마커는 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' 집단에서 개발된 2개의 HRM 마커와 1개의 CAPS 마커를 증폭할 수 있는 프라이머 세트로, 상기 프라이머 세트로 증폭된 산물 중 2개의 HRM 마커는 HRM (high resolution melting) 방법으로 분석하고, 1개 CAPS 마커는 표 12에 기재한 바와 같이, *Sau96I*인 제한효소 절단에 의해 분석이 가능하다.
- [49] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- [50] 또한, 본 발명은
- [51] 고추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [52] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 마커를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [53] 상기 증폭 단계의 산물을 분석하는 단계를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하는 방법을 제공한다.
- [54] 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 3개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 2종을 각각 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

- [55] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 증폭 단계의 산물의 분석은 HRM (high resolution melting) 분석, 염기서열 결정(sequencing) 또는 제한 효소 절단을 통해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 증폭 단계의 산물을 통해 해당 집단의 고추 과피의 신미 정도의 판별은 상기한 바와 같이 수행할 수 있다(표 14, 표 15, 도 10 및 도 11 참고).
- [56] 또한, 본 발명은 상기 마커; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 키트를 제공한다.
- [57] 본 발명의 키트는 프라이머 세트가 CAPS 마커를 포함하는 경우에는 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약 외에 제한효소를 필요로 한다. 즉, CAPS 마커는 증폭 반응을 수행한 후에, 해당하는 제한효소로 절단해야 증폭 산물을 구별할 수 있기 때문이다. 본 발명에서 필요한 제한효소는 상기한 바와 같다.
- [58] 본 발명의 키트에서, 상기 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [60]
- [61] 재료 및 방법
- [62] 식물 재료
- [63] 과피에서 신미를 조절하는 유전자를 동정하기 위하여 태좌에서만 매운맛을 내는 '하바네로' 고추(*Capsicum chinense* 'Habanero')와 태좌 및 과피에서 모두 매운맛을 내는 '부트 졸로키아' 고추(*C. chinense* 'Bhut Jolokia')를 활용하였다. 분리집단에서의 신미 검정을 통해 과피에서의 신미 조절 유전자좌를 탐색하고자 '하바네로'와 '부트 졸로키아'를 교배한 F_{2.3} 집단을 구축하였다. 또한, 맵지 않은 고추 'SNU11-001'(*Capsicum chinense* 'SNU11-001')를 '부트 졸로키아'와 교배한 F₂ 분리집단을 활용하여 신미 조절 유전자좌를 검증하고자 하였다. 과피 신미 조절과 관련된 유전자를 탐색하기 위한 트랜스크립톰 분석에는 태좌에서만 매운맛을 내는 '하바네로' 고추와, 태좌 및 과피에서 모두 매운맛을 내는 '스콜피온' 고추(*C. chinense* 'Scorpion'), 맵지 않은 고추 'ECW'(*C. annuum* 'ECW')를 활용하였다.
- [64]
- [65] **HPLC(High performance liquid chromatography)를 이용한 과피에서의 신미 표현형 조사**
- [66] 과피에서의 신미 조절 유전자를 탐색하기 위해 태좌와 과피를 분리하여 과피에서의 캡사이신 함량을 측정하였다. HPLC는 Han et al., (2013, Molecular

Breeding, 31, 537-548)의 방법을 따라 진행했으며, '하바네로'×'부트 졸로키아' F₂ 89 개체와 F₃ 197 개체를 대상으로 HPLC를 이용해 함량을 측정하였다. 'SNU 11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 114 개체와 트랜스크립톰 분석을 위한 '스콜피온', '하바네로', 'ECW'의 과피에서 HPLC를 통해 캡사이신 함량을 조사하였다.

[67]

[68] **GBS(Genotyping-by-sequencing) 라이브러리 구축**

[69] 변형된 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 사용하여 1.5ml 튜브에 본엽으로부터 DNA를 추출하였다(Hwang et al., 2009 Molecules and cells, 27(3), 329-336). 총 400ng의 DNA가 Illumina 시퀀싱을 위한 라이브러리를 만드는 데 사용되었다. 멀티플렉스 시퀀싱을 위해서 *PstI* 및 *EcoRI* 어댑터와 여섯 개의 염기서열로 구성된 샘플 ID 테크를 포함하여 *PstI* 및 *EcoRI* 프라이머를 디자인하였고, *MesI* 인식 서열과 G, T인 두 개의 염기서열을 추가하여 *MseI* 프라이머를 디자인하였다(Truong et al., 2012 PLoS ONE, 7, e37565). DNA의 절단과 어댑터 연결은 SBG 100-kit version 2.0.2 manual (KeyGene, Wageningen, The Netherlands)에 따라 진행하였다. PCR-증폭 라이브러리 절편의 확인은 BioAnalyzer의 DNA 1000 chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용해 진행되었다. 추가적으로 라이브러리의 양은 Illumina qPCR 정량 가이드 북에 따라 진행되었다.

[70]

[71] **빈 맵(Bin map) 제작과 과피 신미 조절 유전자좌의 탐색**

[72] F₂ 분리집단 87 개체의 유전체 일부를 GBS로 분석하였고, 이를 통해 얻은 다수의 SNP 마커를 슬라이딩 윈도우(sliding window) 방법을 활용하여 빈(bin) 마커로 전환하였다. 슬라이딩 윈도우 방법은 같은 유전형을 가진 인접한 SNP 마커를 빈(bin)으로 결합시키고, 빈(bin)이 재조합 지역을 구분지음으로써 손실된 SNP 자료를 보완할 수 있다. 또한, 빈 맵(bin map)을 사용하여 효과적으로 양적형질 유전자좌를 탐색할 수 있기 때문에 '하바네로'×'부트 졸로키아'의 SNP 마커를 빈(bin) 마커로 전환하여 고밀도 유전자지도를 작성하였다.

[73]

변형된 슬라이딩 윈도우 접근 (Han et al., 2016 DNA Research, 23(2), 81-91)을 사용하여 '하바네로'×'부트 졸로키아' F₂ 집단과 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 집단의 빈 맵(bin map)을 작성하였다. 한 개의 윈도우에는 20개의 SNP가 들어갈 수 있도록 하였으며, 윈도우 내 유전형은 이전과 같은 방법으로 진행되었다(Han et al., 2016 DNA Research, 23(2), 81-91). 이렇게 계산된 각 윈도우의 유전형을 빈(bin)이라 칭하였다. 유전자지도 작성을 위하여 LOD (Logarithm of the odds) threshold 3.0, distance threshold를 50cM의 조건으로 Carthagene 프로그램 (version 1.2)을 수행하였고, 유전자지도 간 거리는 Kosambi mapping function을 이용해 계산하였다. 연관군을 구성한 후에는 MapChart (version 2.2) 프로그램을 사용하여 유전자지도를 도식화하였다. 이후 GBS 브라우저를 사용하여 작성한 유전자지도를 물리적 지도와 비교하여 확인하였다(peppergenome.snu.ac.kr).

WinQTL carthographer (version 2.5) 프로그램의 CIM(composite interval mapping) 기능을 이용하여 과피 신미 조절 유전자좌를 탐색하였다.

[74]

[75] 과피 신미 조절 유전자좌 연관 분자마커 개발

[76] 프라이머는 GBS 분석을 통해 발견한 SNP를 기반으로 고추 염색체 서열 (Chinense.v1.2.Total.fa)을 이용하여 반복 서열 구간을 피해 제작하였다.

[77]

[78] [표1]

HRM 반응 시약 조성

성분	양 (μl)
DNA (20ng/ μl)	2.0
Hipi buffer	5.0
dNTP mixture	0.14
Primer forward/reverse	0.5/0.5
Syto9	0.5
Taq polymerase	0.3
TDW	12.2
Total amount	20

[79]

[80] [표2]

HRM thermal cycling 조건

단계	온도	시간	사이클
Hot-start activation	95°C	5 minutes	1
Denature	94°C	20 seconds	55
Annealing	58°C	20 seconds	
Elongation	72°C	40 seconds	
Extension	60°C	6 minute	1
HRM	65°C to 90°C		

[81] [표3]

CAPS 마커 PCR 시약 조성

성분	양 (μl)
DNA (20ng/ μl)	2.0
Hipi buffer	5.0
dNTP mixture	0.14
Primer forward/reverse	0.5/0.5
Taq polymerase	0.3
TDW	12.7
Total amount	20

[82] [표4]

CAPS thermal cycling 조건

단계	온도	시간	사이클
Hot-start activation	94°C	5 minutes	1
Denature	94°C	30 seconds	30
Annealing	58°C	30 seconds	
Elongation	72°C	1 minute	
Extension	72°C	10 minute	1
Cooling	4°C	10 minute	

[83] [표5]

제한효소 반응 시약 조성

성분	양 (μl)
PCR product	17.5
Cutsmartbuffer	2.0
Restriction enzyme	0.5
Total amount	20

[84] [표6]

제한효소 반응 조건 (*RsaI*, *Sau96I*)

단계	온도	시간
Activation	37°C	3 hours

[85] [표7]

제한효소 반응 조건 (*TaqI*)

단계	온도	시간
Activation	65°C	3 hours
In-activation	80°C	20 minute

[86]

[87] 실시예 1. 과피에서의 캡사이시노이드 함량 조사

[88] '하바네로'와 '부트 졸로키아'를 교배한 F_{2,3} 분리집단에서의 신미 검정을 통해 과피에서의 신미 조절이 단일 유전자에 의해 이루어지는지 혹은 여러 개의 유전자에 의해 이루어지는지 확인하고자 하였다. 과피에서의 신미 조절 유전자를 탐색하기 위해 태좌와 과피를 분리하여 캡사이신을 추출하고, F₂ 89 개체와 F₃ 197 개체를 대상으로 HPLC를 이용해 함량을 측정하였다(도 1). 캡사이시노이드 함량별 개체수를 조사한 결과, 과피에서의 신미 조절은 여러 개의 유전자에 의한 형질임을 알 수 있었고, 따라서 양적형질 유전자좌(quantitative trait locus)를 탐색하고자 하였다.

[89]

[90] 실시예 2. '하바네로'×'부트 졸로키아' F₂ 집단의 유전자지도 작성 및 과피 신미 조절 양적형질 유전자좌 탐색

[91] F₂ 분리집단 87개체의 유전체 일부를 GBS로 분석한 결과, 총 1,718개의 SNP를 발견하였으며, 이를 615개의 빈(bin) 마커로 전환하였다(표 8). 이를 활용하여 1,150 cM, 2,806Mb 길이의 유전자지도를 작성하였으며(도 2), 이후 유전자지도에 F₃ 분리집단에서의 표현형 정보를 적용하여 양적형질 유전자좌를 탐색하였다. F₃ 197 개체를 대상으로 과피 조직의 캡사이시노이드 함량을 HPLC를 활용하여 측정하였다. 캡사이신과 다이하이드로캡사이신, 총 캡사이시노이드 세 형질에 대한 함량을 측정하였고 F₂ 계통별로 각 형질의 평균을 구하였다. 캡사이시노이드 함량을 조절하는 주요 유전자를 탐색하기 위해 중간값보다 높은 캡사이시노이드 함량을 보이면 1, 낮은 캡사이시노이드 함량을 보이면 0을 부여하여 양적형질 유전자좌를 분석하였다.

- [92] 2016년 캡사이신과 총 캡사이시노이드 함량에 대한 양적형질 유전자좌는 동일한 위치로 확인되었고, 4개의 양적형질 유전자좌가 발견되었다(표 10). qHJ16_CAP6.3은 HJ 6_50 빈(bin) 마커에 위치하였고 LOD 값은 4.7로 측정되었다. qHJ16_CAP6.4는 HJ 6_53 빈(bin) 마커에 위치하였고, LOD 값은 6.5로 측정되었다. HJ 6_53 마커를 활용하여 분석한 유전형을 기반으로 캡사이시노이드 함량을 측정했을 때, F_2 와 F_3 분리집단간의 경향성을 확인할 수 있었다(도 4).
- [93] 다이하이드로캡사이신을 조절하는 유전자좌의 경우, HJ16_DHC6.1가 LOD 5.7, HJ16_DHC6.2가 LOD 4.7로 가장 높았다. LOD 값이 높은 양적형질 유전자좌 중에서 qHJ16_CAP6.4는 신미 표현형을 약 27% 설명할 수 있는 주요 양적형질 유전자좌로 예측되었으며, 따라서 qHJ16_CAP6.4에 인접한 HJ 6_53 마커를 이용하여 육종에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.
- [94] 발견된 양적형질 유전자좌들이 표현형을 설명할 수 있는 정도를 확인하기 위하여 주요 양적형질 유전자좌들간의 상호작용을 분석하였다. 캡사이신과 총 캡사이시노이드를 조절하는 주요 양적형질 유전자좌는 6번 염색체에 qHJ16_CAP6.3과 qHJ16_CAP6.4가 존재한다. 이들 간의 상호작용에는 dominant×dominant 및 additivexadditive 효과가 작용했으며, 전체 표현형의 50%를 설명할 수 있는 것으로 측정되었다. 다이하이드로캡사이신을 조절하는 주요 양적형질 유전자좌는 3번 염색체의 qHJ16_DHC3.1과 6번 염색체의 qHJ16_DHC6.1, qHJ16_DHC6.2이며, 주로 dominant×additive 효과가 관찰되었다.
- [95] 이듬해인 2017년도에 '하바네로'×'부트 졸로키아' F_3 의 표현형 조사를 재 실시하였고, 표현형 조사 결과를 기반으로 QTL 분석하였다. 그 결과, 6번 염색체에서 하나의 QTL (qHJ17_CAP6)을 발견하였고, 11번 염색체에서 하나의 QTL (qHJ17_CAP11)을 발견하였다. 이때, qHJ17_CAP11는 신미 표현형을 약 32.5% 설명할 수 있는 주요 양적형질 유전자좌로 예측되었으며, 따라서 11번 염색체에 위치하는 HJ 11_16 빈 마커도 육종에 활용하여야 하는 것으로 예측되었다.

[96]

[97] [표8]

'하바네로'×'부트 졸로키아'의 유전자지도에 사용된 SNP 마커와 빈(bin) 마커 수 및 지도의 길이

Chromosome	Number of SNPs	Number of bins	Average distance between bin markers(cM)	LG length (cM)	Total physical length(Mb)
1	144	54	2.23	118.1	241.2
2	139	46	2.08	93.6	169.9
3	191	71	1.78	128.6	275.2
4	158	43	2.44	102.5	232.2
5	128	40	1.68	65.3	237.2
6	186	70	1.49	102	251.5
7	119	53	1.95	101.3	234.2
8	130	51	2.22	110.7	195.9
9	127	41	1.66	65.9	258.9
10	141	53	1.65	85.1	233.4
11	126	48	1.95	91.4	250.9
12	129	45	1.95	85.8	226.4
Average	143	51.25	1.92	95.8	233.9
Total	1,718	615	-	1150.3	2,806.8

[98]

[99] 발견된 QTL을 검증하기 위해 '하바네로'×'부트 졸로키아' F₃ 집단에 대해 전통적인 QTL 맵핑 방법 이외에 BSA(bulked-segregant analysis) 방법을 활용한 QTL-seq을 시행했다. QTL-seq은 양적형질이 극명한 차이를 보이는 두 벌크를 만들어 전장 유전체 분석을 실시하여 SNP를 찾아내는 방법이다. 가장 높은 캡사이시노이드 함량을 보이는 10 개체와 가장 낮은 캡사이시노이드 함량을 보이는 10 개체를 선발하여 두 개의 벌크로 풀링하였고, 이를 전장 유전체 분석에 사용하였다. QTL-seq 결과, 6번 염색체에서만 QTL이 발견되었고 이는 기존에 발견되었던 QTL 지역들과 겹치는 것으로 나타났다(도 3). 이 결과들을 통해 6번 염색체의 223-226 Mb 위치에 과피 캡사이시노이드 함량에 영향을 미치는 유전 요인이 존재할 것임을 추측할 수 있다.

[100]

[101] 실시예 3. 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 집단의 유전자지도 작성 및 과피

신미 조절 양적형질 유전자좌 탐색

- [102] 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 분리집단 114개체의 유전체 일부를 GBS로 분석한 결과, 총 24,844개의 SNP를 발견하였으며, 이를 1,932개의 bin 마커로 전환하였다(표 9). 이를 활용하여 2,595Mb 길이의 유전자지도를 작성하였으며(도 4), 이후 유전자지도에 F₂ 분리집단에서의 표현형 정보를 적용하여 양적형질 유전자좌를 탐색하였다.
- [103] 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 분리집단의 유전형을 분석하여 유전자지도를 작성한 뒤, F₂ 분리집단에서의 표현형 정보를 적용하여 양적형질 유전자좌를 탐색하였다. F₂ 114 개체를 대상으로 과피 조직의 캡사이시노이드 함량을 HPLC를 활용하여 측정하였다.
- [104] 캡사이신과 다이하이드로캡사이신, 총 캡사이시노이드 세 형질에 대한 함량을 측정하여 양적형질 유전자좌를 분석하였다(표 10). qSJ_TCP4.1은 SJ 4_83 bin 마커에 위치하였고 LOD 값은 5.2로 측정되었다. qSJ_TCP6.1은 SJ 6_183 bin 마커에 위치하였고, LOD 값은 5.3으로 측정되었다. qSJ_TCP6.2은 SJ 6_190 bin 마커에 위치하였고, LOD 값은 6.8로 측정되었다. SJ 6_190 마커를 활용하여 분석한 유전형을 기반으로 캡사이시노이드 함량을 측정했을 때, F₂ 분리집단의 캡사이시노이드 함량에 대한 유전형의 영향에 대한 경향성을 확인할 수 있었다(도 4).
- [105] 캡사이신을 조절하는 유전자좌의 경우, qSJ_CAP4.1이 LOD 4.7, qSJ_CAP6.1이 LOD 5.8로 측정되었다. 전체 캡사이시노이드 함량을 조절하는 QTL 간의 상호작용을 고려했을 때, 신미 표현형을 약 49% 설명할 수 있는 것으로 예측되었으며, 따라서 qSJ_TCP4.1, qSJ_TCP6.1, qSJ_TCP6.2인 세 개의 QTL에 대한 마커를 고신미 작물 육종에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.
- [106]

[107] [표9]

'SNU11-001'×'부트 졸로키아'의 유전자지도에 사용된 SNP 마커와 bin 마커 수 및 지도의 길이

Chromosome	Number of SNPs	Number of bins	Average distance between bin markers(cM)	LG length (cM)	Total physical length(Mb)
1	2716	1	212	1.25	264.6
2	1774	2	107	0.96	102
3	2167	3	219	1.20	260.8
4	2060	4	118	0.87	133
5	1650	5	123	0.94	114.7
6	1938	6	218	1.23	266.9
7	4136	7	218	1.04	225.4
8	494	8	53	1.23	64.1
9	2930	9	196	1	193.7
10	1612	10	178	1.22	215.3
11	1390	11	129	1.48	188.9
12	1977	12	154	1.2	182.2
Average	2,070	-	-	0.99	199.65
Total	24,844	-	1,932	-	2,595.5

[108] [표 10]

'하바네로'x'부트 졸로키아' F3 분리집단에서 발견된 과피 신미 조절 양적형질 유전자좌의 위치

population	trait	QTL	Chr.	Bin marker	LOD	R^2 (%)	location (cM)	location (Mb)	Epistatic effect
Habanero x Jolokia F3 -2016	capsaicin/total capsaicin-noids	<i>qHJ16_CAP6.1</i>	6	HJ 6_22	4.3	1.29	29 - 36.1	109.6-172.4	R^2 : 50%
		<i>qHJ16_CAP6.2</i>	6	HJ 6_28	5.2	9.86	36.1 - 42	172.4-196.8	
		<i>qHJ16_CAP6.3</i>	6	HJ 6_50	4.7	16.45	80.3 - 81.6	223.5-225.7	
		<i>qHJ16_CAP6.4</i>	6	HJ 6_53	6.5	27.31	85.7 - 87.4	226.2-226.8	
	Dihydro-capsaicin	<i>qHJ16_DHC3.1</i>	3	HJ 3_6	6.2	6.01	18.9 - 25.9	32.9-37.5	
		<i>qHJ16_DHC6.1</i>	6	HJ 6_56	5.7	10.45	81.6 - 96.1	15.6-100.8	
		<i>qHJ16_DHC6.2</i>	6	HJ 6_53	4.7	13.39	96.1 - 101	225.7-245.2	
Habanero x Jolokia F3 -2017	capsaicin/total capsaicin-noids	<i>qHJ17_CAP6</i>	6	HJ 6_47	5.2	7.9	71.4-88.5	221.1-226.9	R^2 : 36%
		<i>qHJ17_CAP11</i>	11	HJ 11_16	4.3	32.5	15-23.6	29.4-42.2	
Habanero x Jolokia F3 -2016	(QTLseq)	<i>qHJ16_qt1seq</i>	6					216-225.8	
SNU11-001 x Jolokia F2 -2017	capsaicin	<i>qSJ_CAP4.1</i>	4	SJ 4_83	4.7	1.7	82.9-89.9	202.6-210.3	
		<i>qSJ_CAP6.1</i>	6	SJ 6_190	5.8	3.2	170.8-183.5	233.5-237.5	
	Dihydro-capsaicin	<i>qSJ_DHC4.1</i>	4	SJ 4_85	4.8	17.2	85-90.4	209.3-210.3	
		<i>qSJ_DHC6.1</i>	6	SJ 6_183	6.0	4.2	163.9-168.6	229.2-233.5	
		<i>qSJ_DHC6.2</i>	6	SJ 6_190	8.1	4.2	172.3-181.4	233.5-237.4	
	total capsaicin-noids	<i>qSJ_TCP4.1</i>	4	SJ 4_83	5.2	22.9	83-89.2	202.6-210.2	R^2 : 49%
		<i>qSJ_TCP6.1</i>	6	SJ 6_183	5.3	2.5	164.1-170.4	229.2-233.5	
		<i>qSJ_TCP6.2</i>	6	SJ 6_190	6.8	2.3	171.9-181.7	233.5-237.4	

(CAP: Capsaicin, DHC: Dihydrocapsaicin, TCP: Total capsaicinoids)

[109]

[110] 실시예 4. '하바네로'x'부트 졸로키아' 집단에서 과피의 신미 표현형 조절 분자마커 개발

[111] 전체 캡사이시노이드 함량을 약 50% 설명할 수 있을 것으로 예측된 3개의 양적형질 유전자좌 (*qHJ16_CAP6.3*, *qHJ16_CAP6.4*, *qHJ17_CAP11*)를 대상으로 분자마커를 개발하였다. 6번 염색체에서 발견된 *qHJ16_CAP6.3*,

qHJ16_CAP6.4와 연관된 마커를 개발하기 위해 6번 염색체 223.4 Mb와 226.5 Mb에 위치한 SNP를 두 개의 CAPS 마커(HJ16_CAP6.3_qtlseq_caps, HJ16_CAP6.4_caps)로 전환하였고, 11번 염색체에서 발견된 qHJ17_CAP11와 연관된 마커를 개발하기 위해 11번 염색체 38.8 Mb에 위치한 SNP를 CAPS 마커(HJ17_CAP11_caps)로 전환하였다(도 6 및 도 7).

[112]

[113] [표11]

'하바네로'×'부트 졸로키아' 집단에서 개발된 마커의 프라이머 서열과 제한

효소 처리 후 산물 정보

Marker name	Marker type	Primer Sequences (5'→3') (서열번호)	Restriction enzyme	Length (bp)
HJ16_CAP6.3_qtlseq_caps	CAPS	F:GCTGCATCGAGATGCTTCTCTC(1)	<i>RsaI</i>	Haba: 125 & 230 Jolo: 106 & 124 & 125
		R:AAAAAGGTTCTGAATGACAGCAAGGA(2)		
HJ16_CAP6.4_caps	CAPS	F:CAGTGAAATAGCCCCTTACTCTGCAC(3)	<i>RsaI</i>	Haba: 283 & 306 Jolo: 589
		R:CGGGTTTAACATAGAAAGAGACCTGA(4)		
HJ17_CAP11_caps	CAPS	F:CCTGATGCTGAGGTCTAATCAAACCTG(5)	<i>TaqI</i>	Haba: 62& 297 & 635 Jolo: 359 & 635
		R:TTGAGCCAGTAGGATGTGTGAAAGAA(6)		

[114]

[115] 실시예 5. 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' 집단에서 과피의 신미 표현형 조절 분자마커 개발

[116] 전체 캡사이시노이드 함량을 약 49% 설명할 수 있을 것으로 예측된 3개의 양적형질 유전자좌 (qSJ_TCP4.1, qSJ_TCP6.1, qSJ_TCP6.2)를 대상으로 분자마커를 개발하였다. 4번 염색체에서 발견된 qSJ_TCP4.1와 연관된 마커를 개발하기 위해 4번 염색체 210 Mb에 위치한 SNP를 HRM 마커 (SJ_TCP4.1_hrm)로 전환하였다. 6번 염색체에서 발견된 qSJ_TCP6.1와 연관된 마커를 개발하기 위해 6번 염색체 231.9 Mb에 위치한 SNP를 CAPS 마커 (SJ_TCP6.1_caps)로 전환하였다. 또한, 233.5 Mb에 위치한 SNP를 qSJ_TCP6.2와 연관된 HRM 마커 (SJ_TCP6.1_hrm)로 전환하였다(도 8 및 도 9).

[117]

[118] [표12]

SJ_TCP4.1_hrm와 SJ_TCP6.2_hrm, SJ_TCP6.1_caps의 프라이머 서열 및 PCR 산물과 제한효소 처리 후 산물 정보

Marker name	Marker type	Primer Sequences (5'→3') (서열번호)	Restriction enzyme	Length (bp)
SJ_TCP4.1_hrm	HRM	F:AGTTCAGATTTCACAACACCTGAG(7)	-	200
		R:CCTTCAAGACTCATCTGGACT(8)		
SJ_TCP6.2_hrm	HRM	F:GTTAGTCCTGAAGTGCTTGCG(9)	-	161
		R:CGACCTAGTCATCGATTTCGG(10)		
SJ_TCP6.1_caps	CAPS	F:GCTTATAAAAGGACTGGTACCATC(11)	Sau96I	SNU: 530 & 961 Jolo: 1491
		R:GCTGCTTAGTTTATCTGTCAGCT(12)		

[119] [표13]

본 발명에서 분리한 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 SNP 정보

집단명	마커이름	Chr.	SNP 위치(bp)	SNP (Habanero or SNU11-001 / Jolokia)
Habanero x Jolokia	HJ16_CAP6.3_qtlseq_caps	6	223,429,166	C/T
	HJ16_CAP6.4_caps	6	226,585,896	A/G
	HJ17_CAP11_caps	11	38,833,824	A/G
SNU11-001 x Jolokia	SJ_TCP4.1_hrm	4	210,030,398	G/A
	SJ_TCP6.2_hrm	6	233,547,059	A/G
	SJ_TCP6.1_caps	6	231,953,335	A/G

[120]

[121] 실시예 6. 과피의 신미 표현형 조절 분자마커 적용

[122] '하바네로'×'부트 졸로키아' F₃ 149 개체를 대상으로 마커 검정을 진행하였다. 각 마커의 유전형 조사 결과에 따라 F₃ 개체들을 분류한 후, 캡사이시노이드 함량의 평균을 구하였다. 헤테로 타입으로 조사되는 경우, 해당 마커가 위치한 QTL의 additive 및 dominant effect를 확인하여 '하바네로' 혹은 '부트 졸로키아' 유전형으로 전환하였다.

[123] '부트 졸로키아' 타입의 유전형이 많이 나타날수록 캡사이시노이드 함량이 증가하는 경향성을 확인할 수 있었다(도 10). 또한, 모두 '하바네로' 타입으로 조사된 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균값은 8,166 ug/gDW, 모두 '부트 졸로키아' 타입으로 조사된 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균값은 19,588 ug/gDW으로 t-test 결과 유의미한 차이를 보임을 확인하였다(표 14).

[124]

[125] [표14]

AAA와 BBB 유전형을 지닌 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균을 이분산 이변량 t-test 결과(A, '하바네로'; B, '부트 졸로키아')

	Variable 1	Variable 2
Mean	8479.565516	19588.47
Variance	16632405.51	1.3E+08
Observations	26	25
Hypothesized Mean Difference	0	
df	30	
t Stat	-4.59489668	
P(T<=t) one-tail	3.6472E-05	
t Critical one-tail	1.697260887	
P(T<=t) two-tail	7.2944E-05	
t Critical two-tail	2.042272456	

[126]

[127] 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 126 개체를 대상으로 마커 검정을 진행하였다. 각 마커의 유전형 조사 결과에 따라 F₂ 개체들을 분류한 후, 캡사이시노이드 함량의 평균을 구하였다. 헤테로 타입으로 조사되는 경우, 해당 마커가 위치한 QTL의 additive 및 dominant effect를 확인하여 'SNU11-001' 혹은 '부트 졸로키아' 유전형으로 전환하였다.

[128] '부트 졸로키아' 타입의 유전형이 많이 나타날수록 캡사이시노이드 함량이 증가하는 경향성을 확인할 수 있었다(도 11). 또한, 모두 'SNU11-001' 타입으로 조사된 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균값은 3,103 ug/gDW, 모두 '부트 졸로키아' 타입으로 조사된 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균값은 11,034 ug/gDW로 t-test 결과 유의미한 차이를 보임을 확인하였다(표 15).

[129]

[130] [표15]

AAA와 BBB 유전형을 지닌 개체들의 캡사이시노이드 함량 평균을 이분산 이변량 t-test 결과 (A, 'SNU11-001'; B, '부트 졸로키아')

	Variable 1	Variable 2
Mean	3103.272255	11034.34
Variance	4336347.815	57228688
Observations	6	25
Hypothesized Mean Difference	0	
df	28	
t Stat	-4.56997147	
P(T<=t) one-tail	4.48968E-05	
t Critical one-tail	1.701130934	
P(T<=t) two-tail	8.97936E-05	
t Critical two-tail	2.048407142	

[131]

[132] 실시예 7. 과피 신미 조절 후보 유전자 탐색

[133] 신미 조절 유전자와 매우 가깝게 수량성이나 병 저항성 등을 감소시킬 수 있는 유전자가 있는 경우 불필요한 유전자를 제거하는 데 소모되는 시간이 늘어날 수 있다. 따라서 빠른 품종 육성과 정확한 유전형 분석을 위해 과피 신미 조절 유전자만을 동정해야 한다. 이를 위해 과피에서 캡사이신을 합성하는 자원들과 합성하지 않는 자원들의 유전자 발현을 비교하는 실험(transcriptome analysis)을 통해 후보 유전자를 탐색하였다. 트랜스크립톰 분석은 별도의 집단 육성이 없이 극도로 매운 고추인 스콜피온 과피와 일반적으로 매운 고추인 '하바네로' 과피, 그리고 맵지 않은 고추인 Early Calwonder (ECW)에서의 유전자 발현을 비교하였다. 또한, 과실의 발달 단계별 유전자 발현 양상을 비교하기 위해 18 DAP (days after pollination), 34 DAP, 45 DAP에서 각 개체의 과실을 수확하였다(도 12). 각 발달 단계, 개체별로 3개의 과실을 수확하여 풀링하였고, 하나의 반복수를 만들어 RNA를 추출하였다.

[134] RNA-seq을 통해 발현량을 비교한 후 real time PCR (qRT-PCR)을 통해 서열분석 결과를 다시 확인하였다. 또한, 후보로 선정된 유전자에 대해서는 '스콜피온'과 '하바네로'에서의 서열 차이가 있는지 확인하기 위해 RNA-seq 결과를 기반으로 SNP를 탐색하였다. 마지막으로 '하바네로'×'부트 졸로키아' F3와 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F2 집단에서 후보 유전자와 가장 가깝게 위치한 빈

마커를 선발한 후, 해당 마커의 유전형에 따른 과피에서의 캡사이시노이드 함량의 평균값을 계산하여 후보 유전자를 통해 과피 신미 표현형을 예측하는 효과를 확인하였다.

- [135] 과실 발달 단계별로 각 고추 품종의 RNA 염기서열을 비교하였고, 발견된 차등 발현 유전자를 벤 다이어그램으로 표현하였다. 또한, 유의미한 차이를 보이는 차등 발현 유전자를 대상으로 히트 맵(heat map)을 작성하였다. 히트 맵은 차이를 보이는 데이터를 2차원 그래프로 색의 변화를 통해 표현한 그래프로, 위계적 군집 분석 등을 통해 차등 발현 유전자의 양상을 쉽게 확인할 수 있다. 스콜피온과 '하바네로', ECW 간의 차등 발현 유전자를 탐색하여 그 결과를 벤 다이어그램으로 나타내었다(도 13). 또한 '하바네로'와 같이 일반적으로 매운 고추인 카프시쿰 치넨세(*C. chinense*) PI159236의 트랜스크립톰 분석 결과를 후보 유전자 선발에 활용하였다(Kim et al., 2017 *Genome Biol.* 18, 210).
- [136] 과피에서 캡사이시노이드 합성이 조절되는 기작을 조사하기 위해 기존에 알려진 캡사이시노이드 생합성 경로 유전자들을 선발하여 발현량을 비교하였다. 여기에는 생합성 경로 마지막에 작용하는 *Pun1*과 페닐알라닌 경로에 포함된 *PAL*(phenylalanine ammonia-lyase), *C4H*(cinnamate 4-hydroxylase), *4CL*(4-Coumarate: Coenzyme A Ligase), *HCT*(hydroxycinnamoyl transferase), *C3H*(coumarate 3-hydroxylase), *COMT*(caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase), *pAMT*(putative aminotransferase)과 *Acl*(acyl carrier protein), *Fat*(thioesterase) 및 *Kas*(3-keto-acyl-ACP synthase), *BCAT*(branched-chain amino acid transferase), *ACS*(acyl-CoA Synthetase)가 사용되었다. '하바네로' 과피와 비교하여 '스콜피온' 과피에서 *Pun1*과 *BCAT*, *4CL*, *KAS*는 높은 발현량을 보였다(도 14). 이와 같은 발현 패턴은 그동안 매운 태좌에서 밝혀진 바와 유사하다(Aza-Gonzalez et al., 2011 *Plant Cell Rep.* 30, 695-706).
- [137] 이처럼 태좌와 과피에서 캡사이시노이드 합성 유무에 따른 경로의 구조 유전자의 발현패턴이 유사한 점에 따라, 후보 유전자가 조직 종류에 상관없이 매운 조직과 안매운 조직에서 유사한 발현차이가 보일 것이라 가정하여 후보 유전자 범위를 좁혔다. 'PI159236'의 안매운 과피와 비교하여 매운 태좌에서 발현되는 양상이 본 실험에서 분석한 '스콜피온'의 매운 과피가 '하바네로'의 안매운 과피와 비교하여 발현 차이를 보이는 양상과 유사한 유전자들을 탐색하였다. 그 결과, *KR*(Ketoacyl-ACP reductase)과 CC.CCv1.2.scaffold31.147인 두 유전자가 후보 유전자로 선발되었다(도 15). *KR*은 캡사이시노이드 생합성 경로 중 지방산 합성 경로에서 지방산 신장에 관여하는 것으로 알려진 유전자이다. 한편, CC.CCv1.2.scaffold31.147은 ankyrin repeat containing protein(이하 ankyrin)을 암호화하는 유전자로, ankyrin은 전사 인자로 작용하는 C2H2-유형 징크 핑거, bZIP, bHLH 등과 같은 도메인을 포함하는 것으로 밝혀진 바 있다. 두 유전자 서열을 대상으로 '하바네로'와 '스콜피온'을 비교하여 SNP를 탐색하였고, *KR*은 5' UTR에, ankyrin 유전자는 첫 번째 엑손에 SNP이 발생했음을

확인하였다(표 16). 또한, 유전자 발현량은 *KR*이 '스콜피온'에서 '하바네로' 보다 높았으나 *ankyrin* 유전자는 '스콜피온'에서 낮았다.

[138]

[139] [표16]

후보 유전자가 위치한 QTL 정보와 하바네로 및 스콜피온 간의 SNP 위치

Candidate gene	Gene ID*	HJ F ₃ QTL	SJ F ₂ QTL	SNP location	Gene expression pattern***
<i>KR</i>	CC.CCv1.2.scaffold942.14	<i>HJ-dhc6.2</i> , <i>HJ-tcp6.3</i> , <i>HJ-qt1seq</i>	<i>SJ-tcp6.1</i>	5' UTR	Up-regulated in Scorpion
<i>Ankyrin</i>	CC.CCv1.2.scaffold31.147	<i>HJ-dhc6.2</i>	<i>SJ-cap6.1</i> , <i>SJ-dhc6.3</i> , <i>SJ-tcp6.2</i>	1 st exon [#]	Down-regulated in Scorpion

[140] RNA-seq 결과의 신뢰성 확인을 위하여 후보 유전자 및 임의로 선발한 차등 발현 유전자 아홉 개를 대상으로 real time qRT-PCR을 수행하였다. RNA-seq을 통해 얻은 발현량을 RPKM의 꺾은선 그래프로 나타내고, qRT-PCR을 통해 측정된 발현량을 막대 그래프로 나타냈다(도 16). 특히 *ankyrin* 유전자는 '하바네로'와 비교하여 '스콜피온'에서 발현이 감소하는 양상을 보였다. 또한 *ankyrin*은 'PI159236'의 태좌에서도 과피보다 발현량이 낮았다. '부트 졸로키아'의 과피에서 RNA를 추출하여 qRT-PCR을 수행한 결과 마찬가지로 과피에서 *ankyrin*의 발현량이 '스콜피온'의 과피와 유사한 양상을 보임을 확인하였고(도 17), 따라서 *ankyrin*은 매운 조직에서 안매운 조직보다 발현량이 낮아진다는 사실을 밝혔다. 이 결과를 통해 매운 조직에서 *ankyrin* 단백질의 기능이 감소하여 캡사이시노이드 생합성 경로가 작동하는 것임을 추측할 수 있으며, *ankyrin* 단백질의 기능이 캡사이시노이드 생합성 경로에 포함되는 임의의 유전자를 억제하는 것이라고 보여진다.

[141] *Ankyrin*의 입체구조를 PHYRE2 프로그램을 활용하여 예측한 결과, DNA 결합 지역으로 작용할 수 있는 도메인을 찾을 수 있었다(도 18). 또한, 캡사이시노이드 생합성 경로 유전자에서 *ankyrin*이 작용하는 대상을 찾기 위해 프로모터 지역에서 전사인자 결합지역 모티프를 탐색하였다. 이때, 'PI159236'의 태좌에서 *PAL*과 *BCAT*, *ACS*, *Pun1* 이 높은 발현량을 보였으며, 이 중 '스콜피온' 과피에서도 높은 발현량을 보인 *KAS*, *BCAT*과 *pAMT*의 프로모터 지역을 탐색하였다(표 17). *BCAT*에서만 프로모터 및 CDS에서 전사인자 결합 모티프 서열을 찾을 수 있었고, *ankyrin*이 작용하는 유전자가 *BCAT*일 가능성을 확인하였다.

[142]

[143] [표 17]

Gene name	Binding motif family	Start site	Stop site	Strand direction	Matched sequence (서열번호)
<i>BCAT</i>	bZIP	-3741	-3724	+	CAGTGATGACGTGGCGGC(15)
	bZIP	-3740	-3726	+	AGTGATGACGTGGCG(16)
	bZIP	-3740	-3726	+	AGTGATGACGTGGCG(17)
	bZIP	-3740	-3726	+	AGTGATGACGTGGCG(18)
	bZIP	-3740	-3726	-	CGCCACGTCATCACT(19)
	bZIP	-3740	-3726	+	AGTGATGACGTGGCG(20)
	bZIP	-3740	-3726	+	AGTGATGACGTGGCG(21)
	bZIP	-3738	-3727	+	TGATGACGTGGC(22)
	bZIP	-3738	-3721	-	GTGGCCGCCACGTCATCA(23)
	bZIP	-3738	-3727	+	TGATGACGTGGC(24)
	bZIP	-3735	-3726	+	TGACGTGGCG(25)
	C2H2	2469	2487	-	CCTCCTCCTCTTGTTCCTG(26)
	C2H2	2472	2490	-	CTTCCTCCTCCTCTGTTC(27)
	C2H2	2475	2493	-	CTTCTTCCTCCTCCTTG(28)
	C2H2	2478	2496	-	CAACTTCTTCCTCCTCCTC(29)
	C2H2	2481	2499	-	CTTCAACTTCTTCCTCCTC(30)
	bHLH	3075	3095	-	GGTCGAAGACACGTGGGCGA(31)
	C2H2	3351	3369	-	CCCTCTCTTCCTCCGATA(32)
	C2H2	3354	3372	-	ACTCCCTCTCTTCCTCCGC(33)
<i>KAS</i>	-	-	-		-
<i>Pun1</i>	-	-	-		-

[144]

[145] *KR*과 CC.CCv1.2.scaffold31.147 (*ankyrin*) 두 후보 유전자의 과피 신미 표현형과 연관성을 확인하기 위해 양적형질 유전자와 탐색에 사용했던 '하바네로'×'부트 졸로키아' F3와 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F2 집단의 과피 캡사이시노이드 함량값을 활용하였다. *KR* 유전자와 근접한 빈 마커를 통해 분석한 결과, 유전형이 '스콜피온'과 같은 개체들의 과피 캡사이시노이드 함량 평균값이

'하바네로'와 같은 유전형을 가진 개체들의 과피 캡사이시노이드 함량 평균값보다 유의미하게 높았다(도 19). *Ankyrin* 유전자와 근접한 빈 마커를 활용하였을 때에도 '스콜피온'의 유전형을 가진 개체들의 과피 캡사이시노이드 함량 평균값이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[146]

[147] 본 발명의 주요 내용을 요약해 보면, 본 발명에서는 과피가 매운 고추 '부트 졸로키아'와 맵지 않은 고추 '하바네로'와 'SNU11-001'를 교배하여 두 개의 연구집단을 육성하고, 유전자지도를 작성하기 위해서 GBS 방법을 적용하였다. GBS는 NGS 기술을 이용하여 다량의 마커를 탐색하여 유전자지도를 빠르게 작성할 수 있는 효율적인 방법이다. 그러나 GBS 기반의 SNP를 이용한 유전자지도 작성은 염색체 내 특정 위치에서 NGS 오류 등으로 인해 잘못된 유전형이 관찰되기도 한다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 sliding-window approach가 고안되었다. 이를 통해 고밀도 유전자지도를 작성하였고 HPLC를 이용한 신미 표현형 조사를 기반으로 과피 신미 조절 유전자좌를 탐색하였다. 2016년 실시한 표현형 정보를 기반으로 '하바네로'×'부트 졸로키아' F₃ 집단에서는 과피의 총 캡사이시노이드 함량을 조절하는 유전자좌가 염색체 6번에서 3개 발견되었다. 또한 QTL-seq 방법으로 QTL 분석을 진행했을 때, 6번 염색체에서 공통되는 QTL 지역을 발견할 수 있었다. 이렇게 발견된 QTL을 검증하기 위해 2017년에 '하바네로'×'부트 졸로키아' F₃의 표현형 조사를 재반복하였고, QTL 분석 결과 6번 염색체에서 비슷한 지역에 QTL이 발견되었으며 11번에서도 추가로 발견되었다. 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 집단에서는 과피의 총 캡사이시노이드 함량을 조절하는 유전자좌가 염색체 6번에서 2개 발견되었고, 염색체 4번에서도 1개 발견되었다. 두 연구집단에서 발견된 과피 신미 조절 양적형질 유전자좌를 비교했을 때, 공통적으로 염색체 6번에서 유전자좌가 존재했으며 중복되는 지역이 발견되었다.

[148] '하바네로'×'부트 졸로키아' F₃와 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F₂ 집단에서 발견한 양적형질 유전자좌 정보를 기반으로 과피 신미 표현형을 예측할 수 있는 마커를 개발하였다. qHJ16_CAP6.3, qHJ16_CAP6.4, qHJ17_CAP11는 세 개의 유전자좌간의 상호작용을 고려했을 때 2016년 표현형의 경우 50%를, 2017년 표현형의 경우 36%를 설명할 수 있는 것으로 예측되었다. 또한 세 QTL에 위치한 SNP를 대상으로 CAPS 마커를 개발하였다. 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' 집단에서 발견된 qSJ_TCP4.1, qSJ_TCP6.1, qSJ_TCP6.2는 각각 22%, 4.6%, 5.4%의 표현형을 설명할 수 있는 것으로 예측되었으며, 세 개의 유전자좌간의 상호작용을 고려했을 때 49%를 설명할 수 있을 것으로 예측되었다. qSJ_TCP4.1, qSJ_TCP6.1, qSJ_TCP6.2를 각각 HRM, CAPS, HRM으로 전환하였다. 두 집단에서 마커 검정을 실시한 결과, 마커의 유전형이 '부트 졸로키아' 타입으로 나타날수록 과피 캡사이시노이드 함량 평균값이 증가하는 경향성을 확인할 수 있었다. 따라서 각 집단의 세 개 마커 검정을 통한 유전형 조사를 통해 과피 신미

표현형을 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

- [149] 또한, '하바네로'×'부트 졸로키아' F3와 'SNU11-001'×'부트 졸로키아' F2 집단에서 공통적으로 발견된 양적형질 유전자좌에 위치하는 유전자 중에서 트랜스크립톰 분석을 통해 발현량에서 차이가 나는 유전자를 탐색한 결과, KR과 ankyrin-repeat containing protein이 과피 신미 표현형과 유의미한 연관성을 보이는 것으로 나타났다. 각 유전자의 유전형이 '스콜피온'의 유전형과 일치할 때, 과피에서 캡사이시노이드 함량 평균값이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 따라서 집단의 개체의 두 유전자의 유전형을 '스콜피온' 혹은 '하바네로'와 비교함으로써 과피 신미 표현형을 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

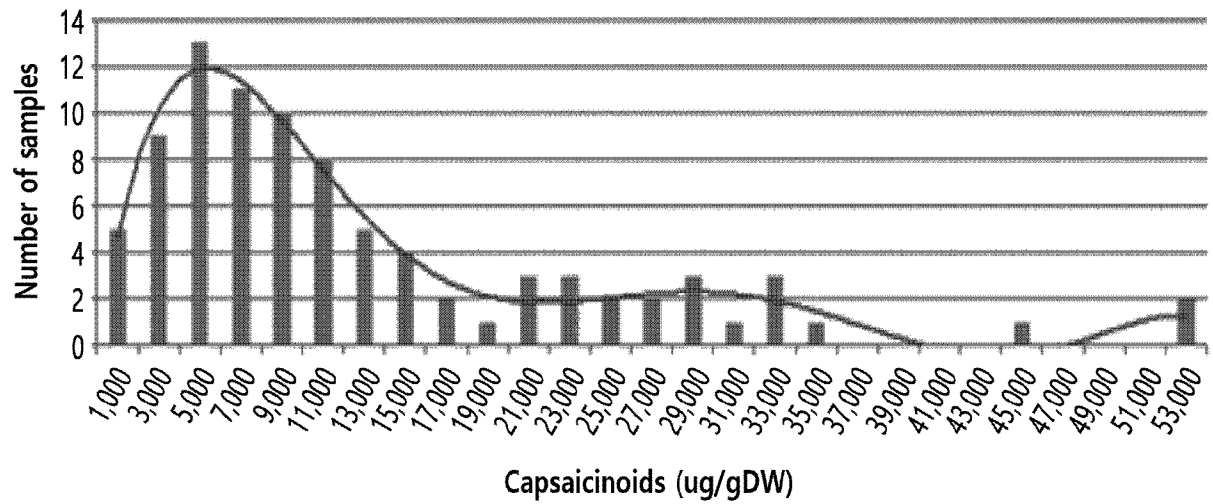
[150]

청구범위

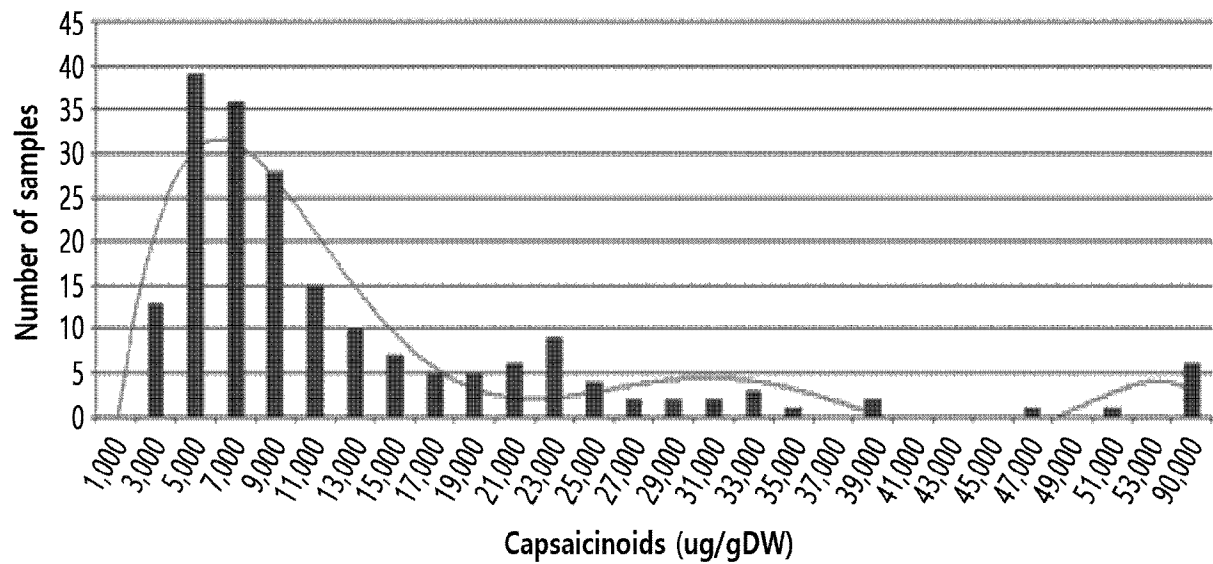
- [청구항 1] 고추 6번 염색체의 223,429,166번째에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism), 고추 6번 염색체의 226,585,896번째에 위치한 SNP 및 고추 11번 염색체의 38,833,824번째에 위치한 SNP; 고추 4번 염색체의 210,030,398번째에 위치한 SNP, 고추 6번 염색체의 233,547,059번째에 위치한 SNP 및 고추 6번 염색체의 231,953,335번째에 위치한 SNP; 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 *KR* (Ketoacyl-ACP reductase) 유전자의 6193번째에 위치한 SNP; 및 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 *CC.CCv1.2.scaffold31.147* (ankyrin-repeat containing protein) 유전자의 1770번째에 위치한 SNP;로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.
- [청구항 2] 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트로 구성된 마커, 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 마커 및 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트로 구성된 마커; 또는 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트로 구성된 마커, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트로 구성된 마커 및 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트로 구성된 마커;를 포함하는 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 마커.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 고추는 과피에서 캡사이시노이드(capsaicinoids)를 합성하는 고추인 것을 특징으로 하는 마커.
- [청구항 4] 고추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제2항 또는 제3항에 따른 마커를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 분석하는 단계를 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하는 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 분석은 HRM (high resolution melting) 분석, 염기서열 결정(sequencing) 또는 제한 효소 절단을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제2항에 따른 마커; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 고추 과피의 신미 정도를 판별하기 위한 키트.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

[도1]

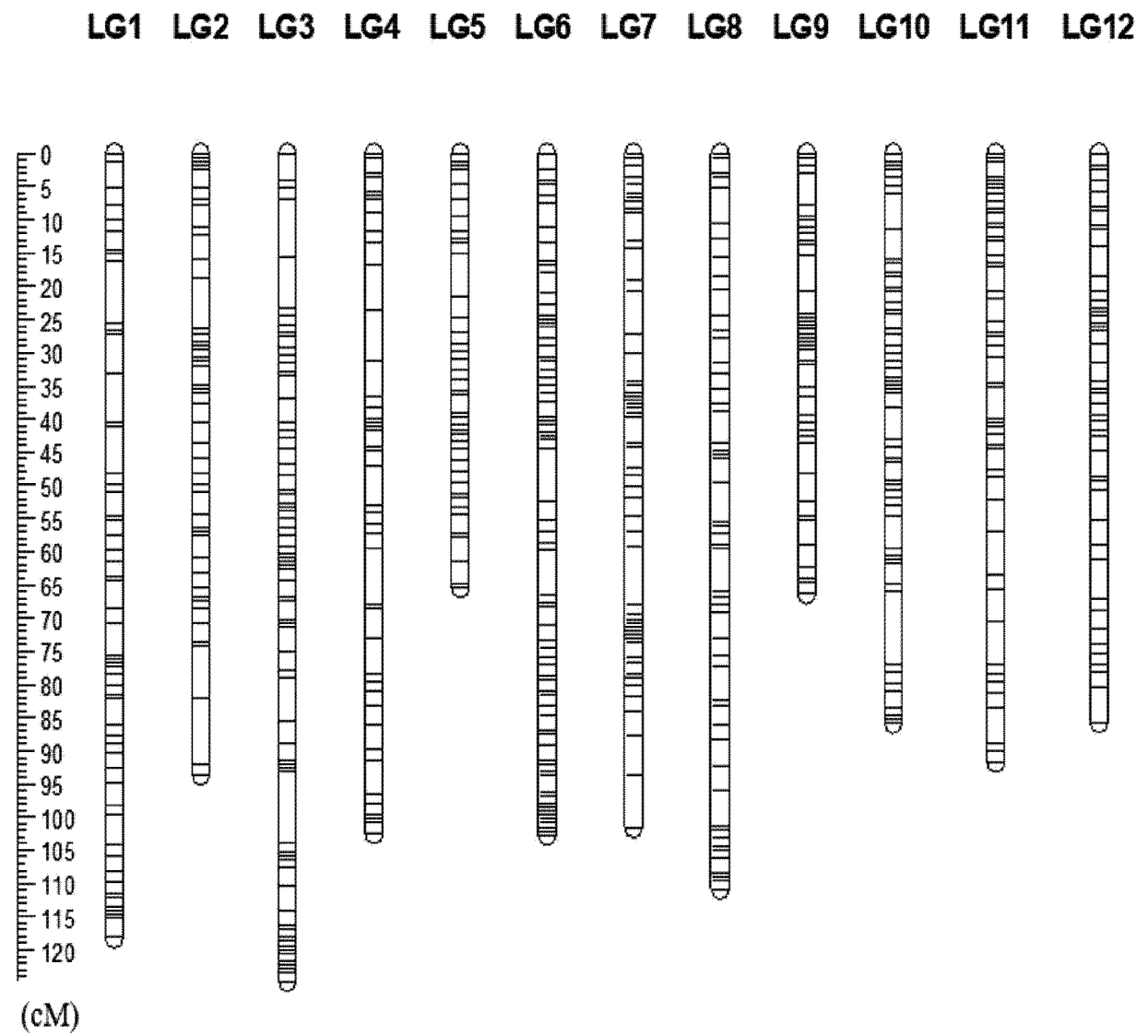
Capsaicinoids content in the pericarp of 89 F2 individuals (ug/gDW)



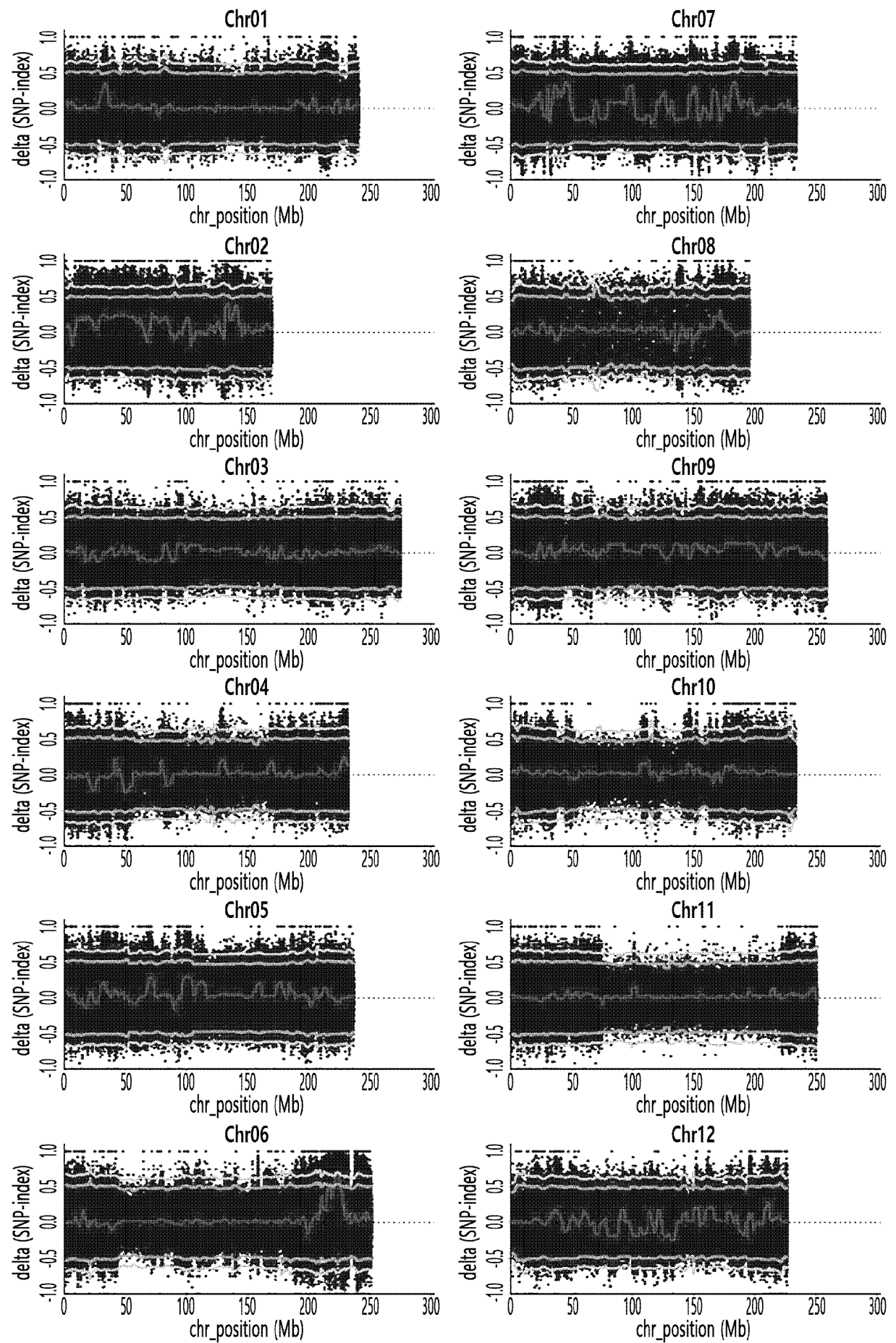
Capsaicinoids content in the pericarp of 197 F3 individuals



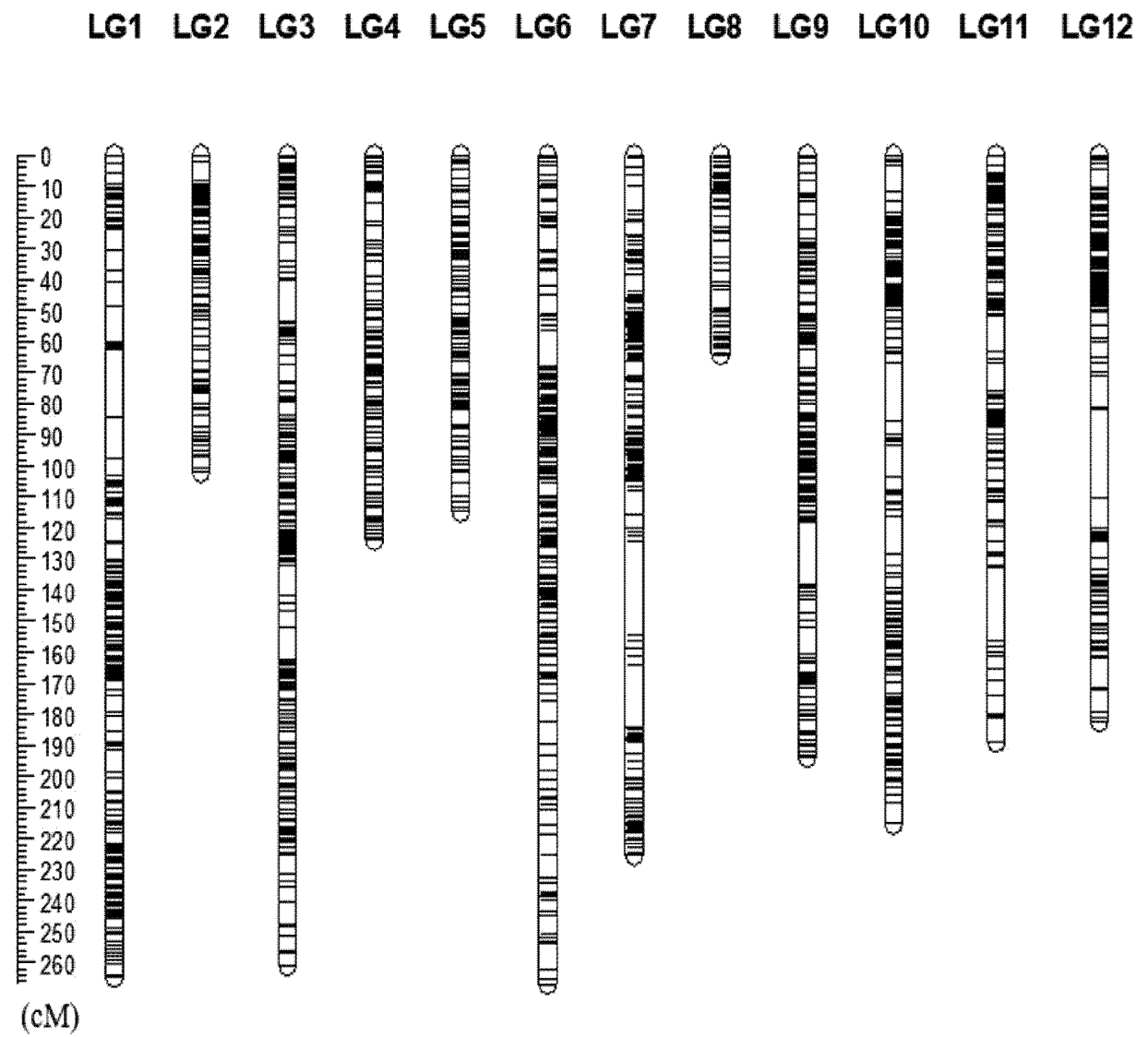
[도2]



[도3]

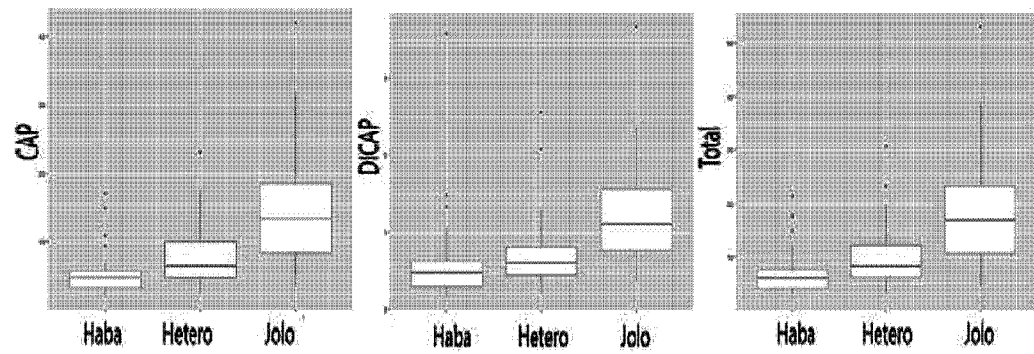


[도4]

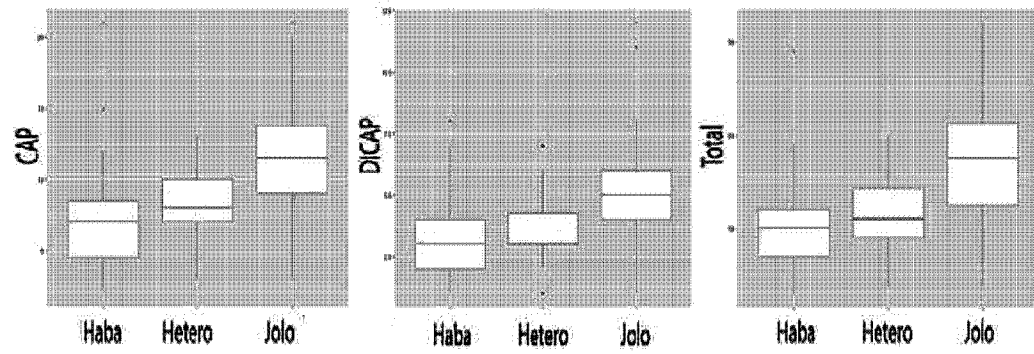


[도5]

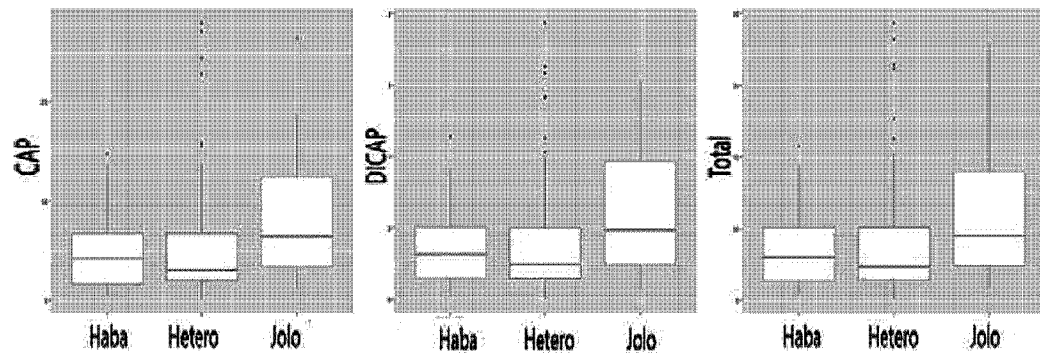
(A)
HJ6_53



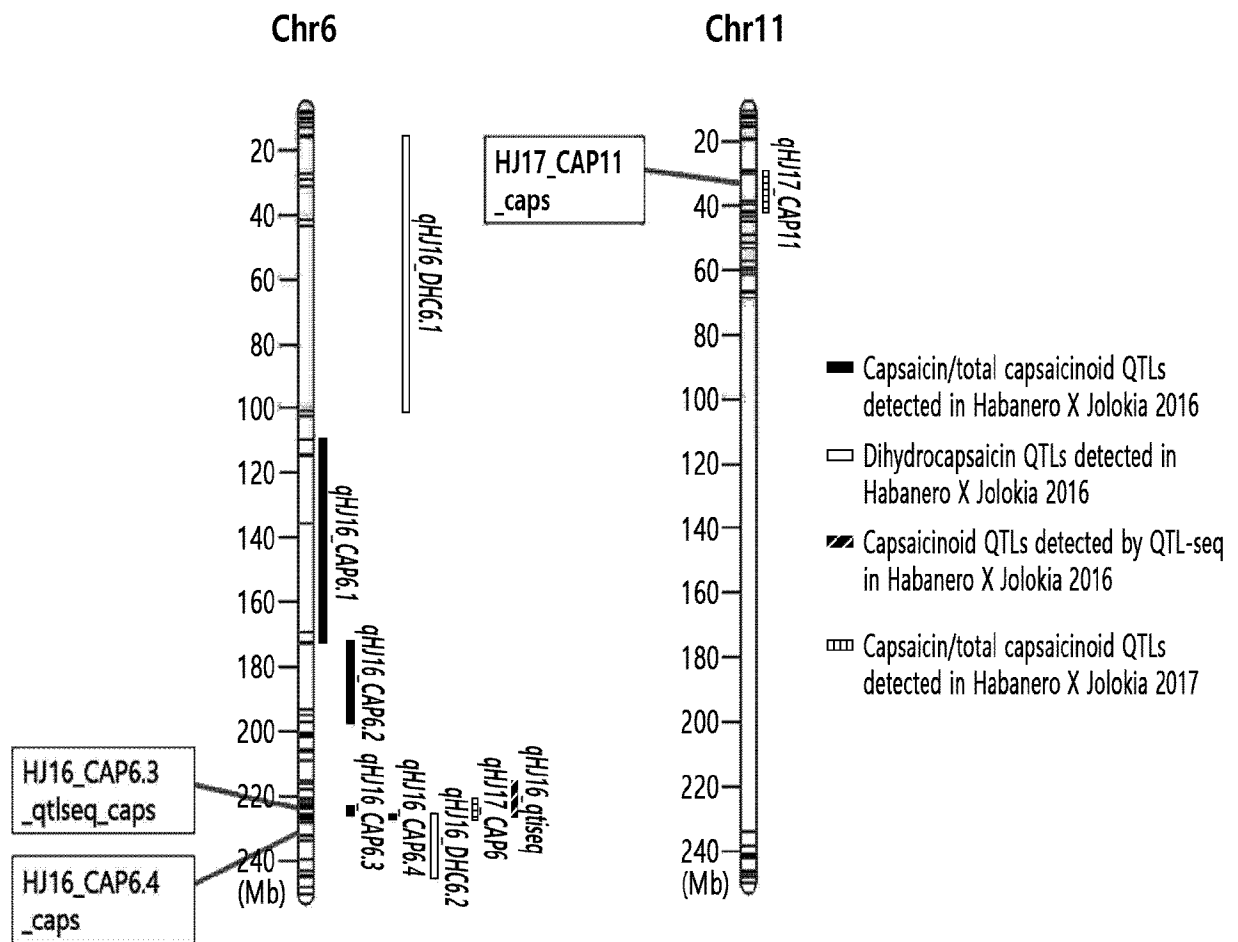
(C)
HJ6_47



(C)
SJ6_190

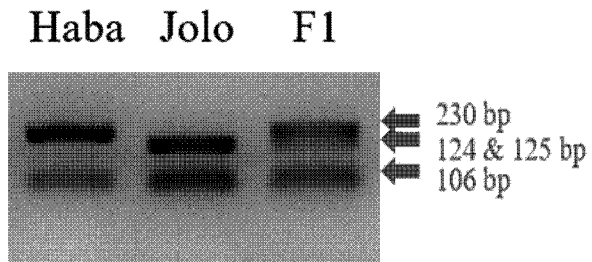


[도6]

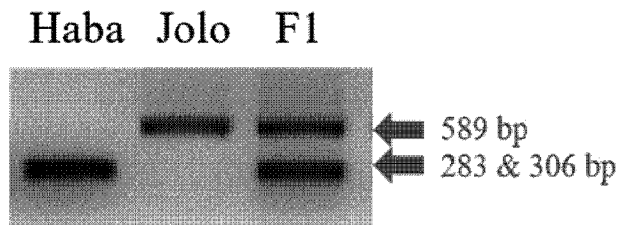


[도7]

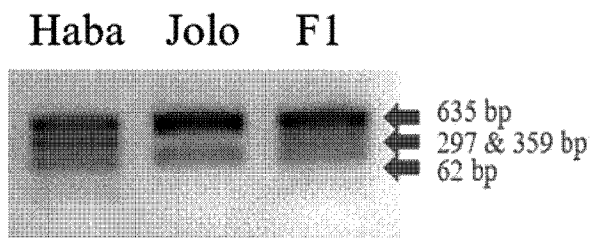
HJ16_CAP6.3
_qtlseq_caps



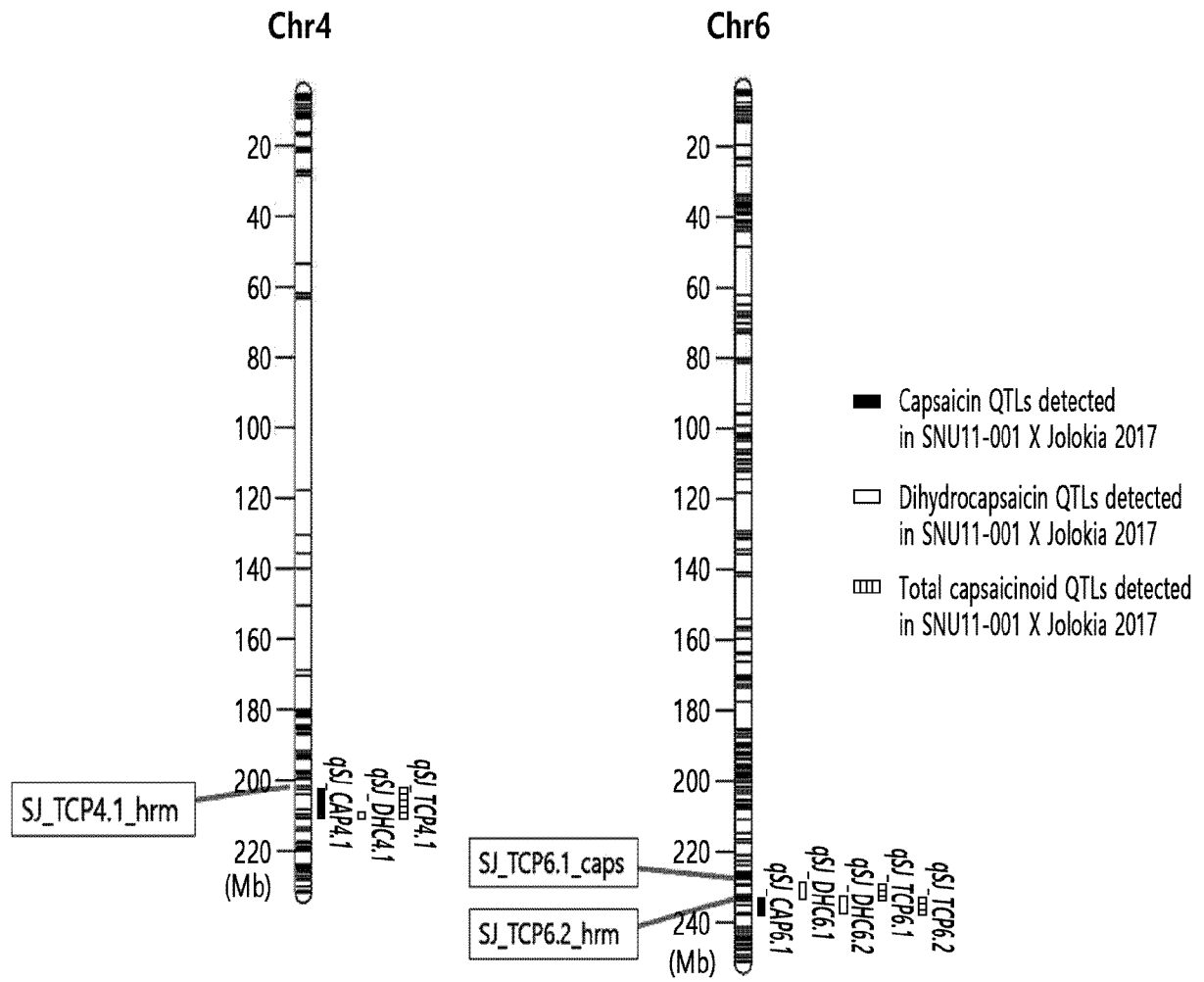
HJ16_CAP6.4
_caps



HJ17_CAP11
_caps

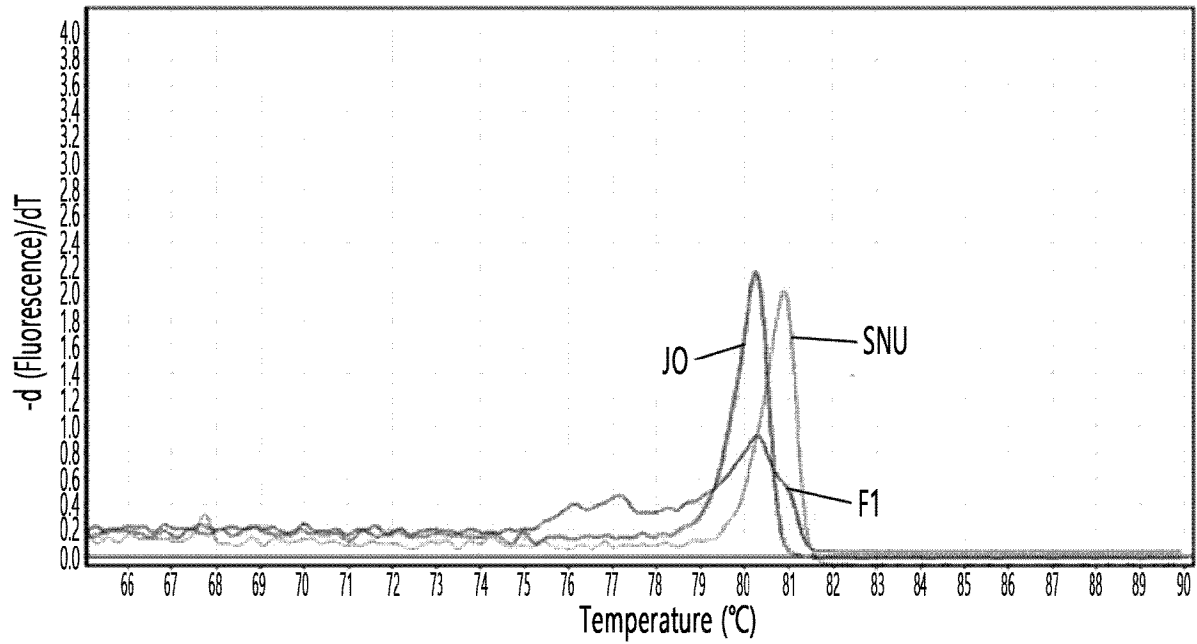


[도8]

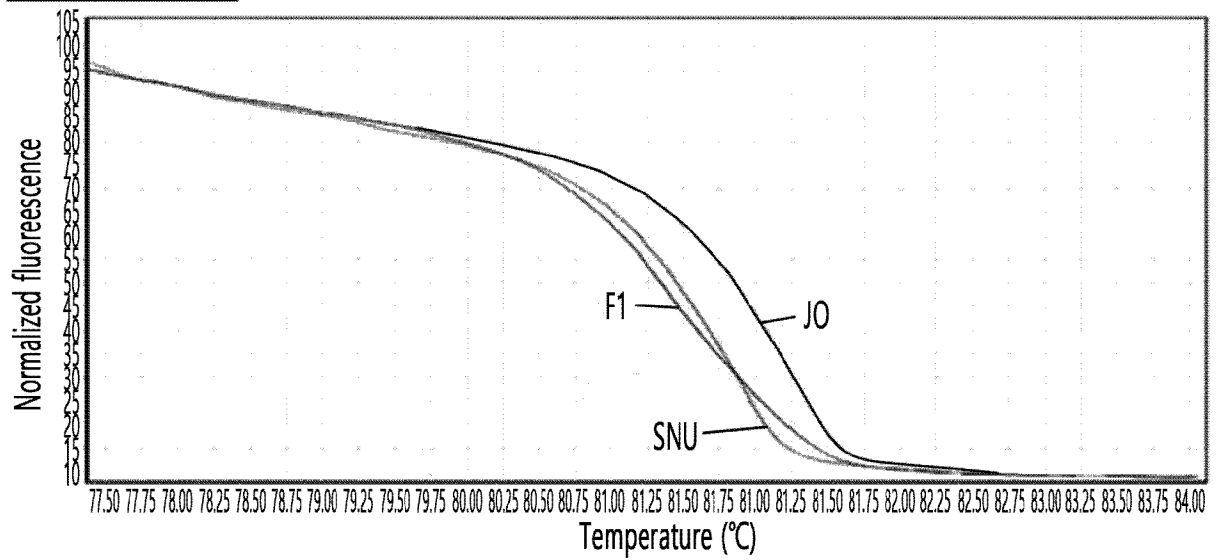


[도9]

SJ_TCP4.1_hrm

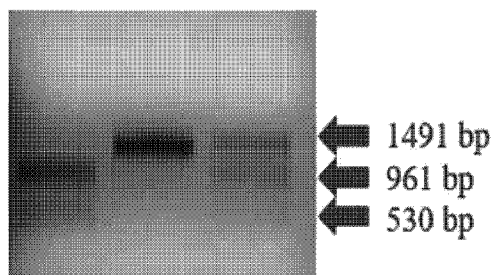


SJ_TCP6.2_hrm

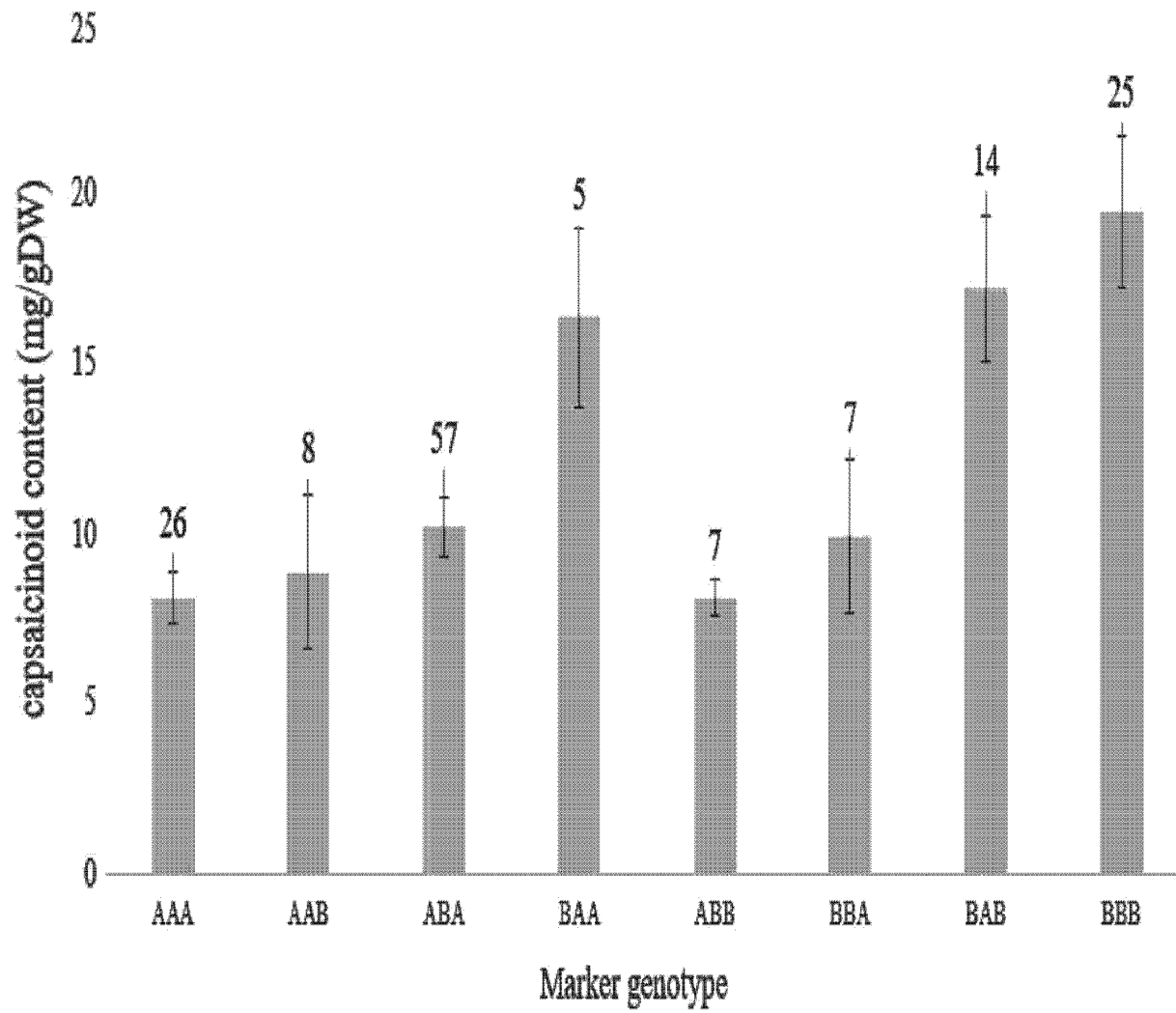


SJ_TCP6.1_caps

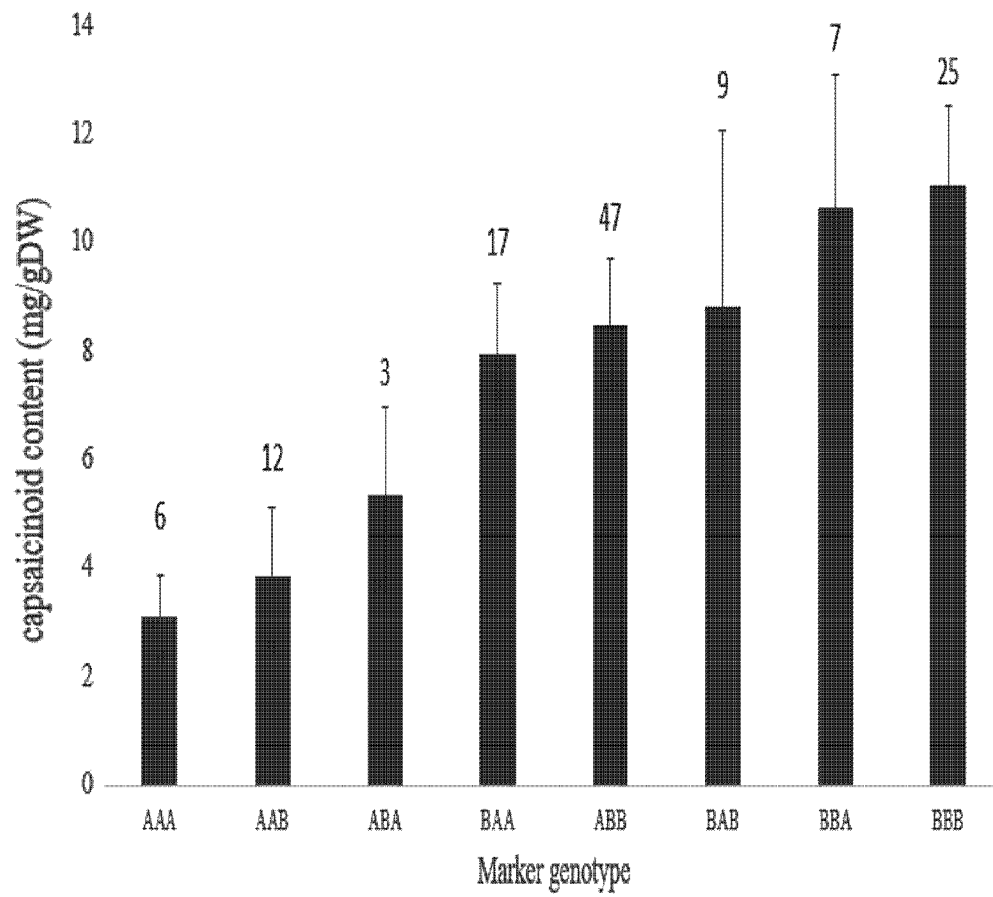
SNU Jolo F1



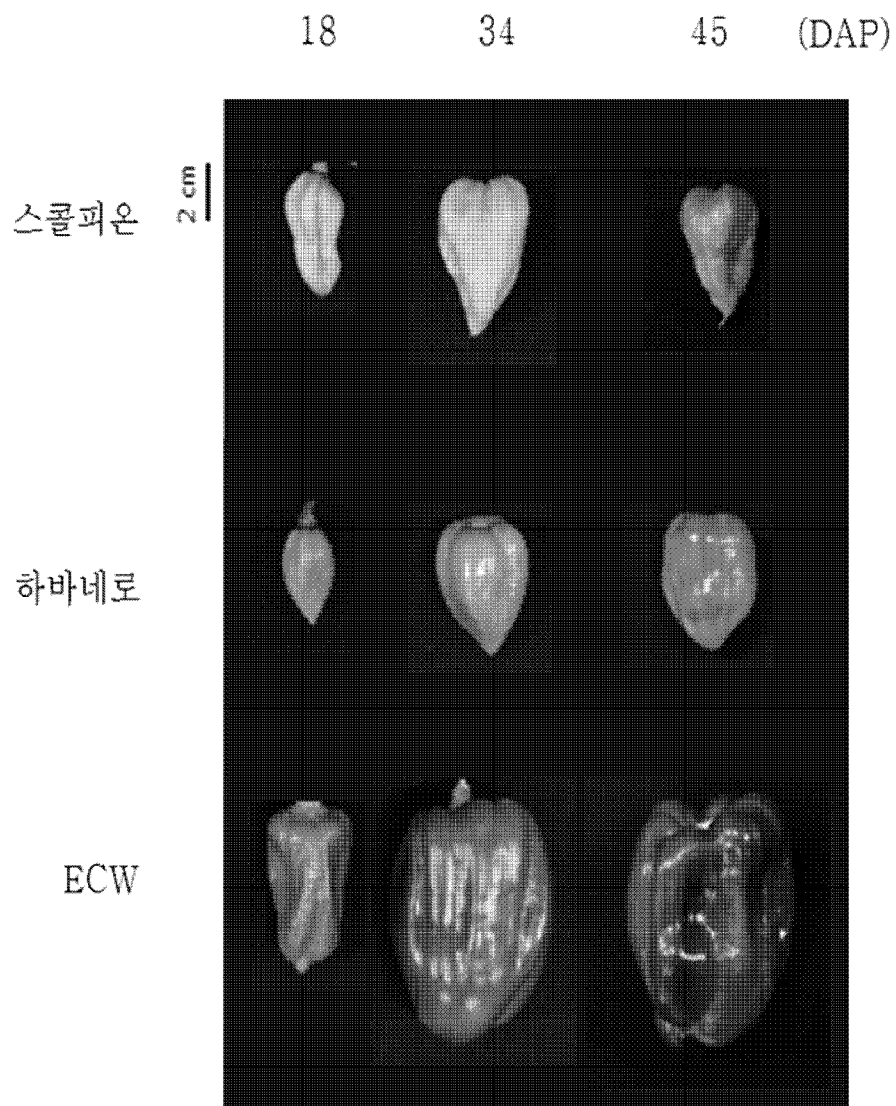
[도 10]



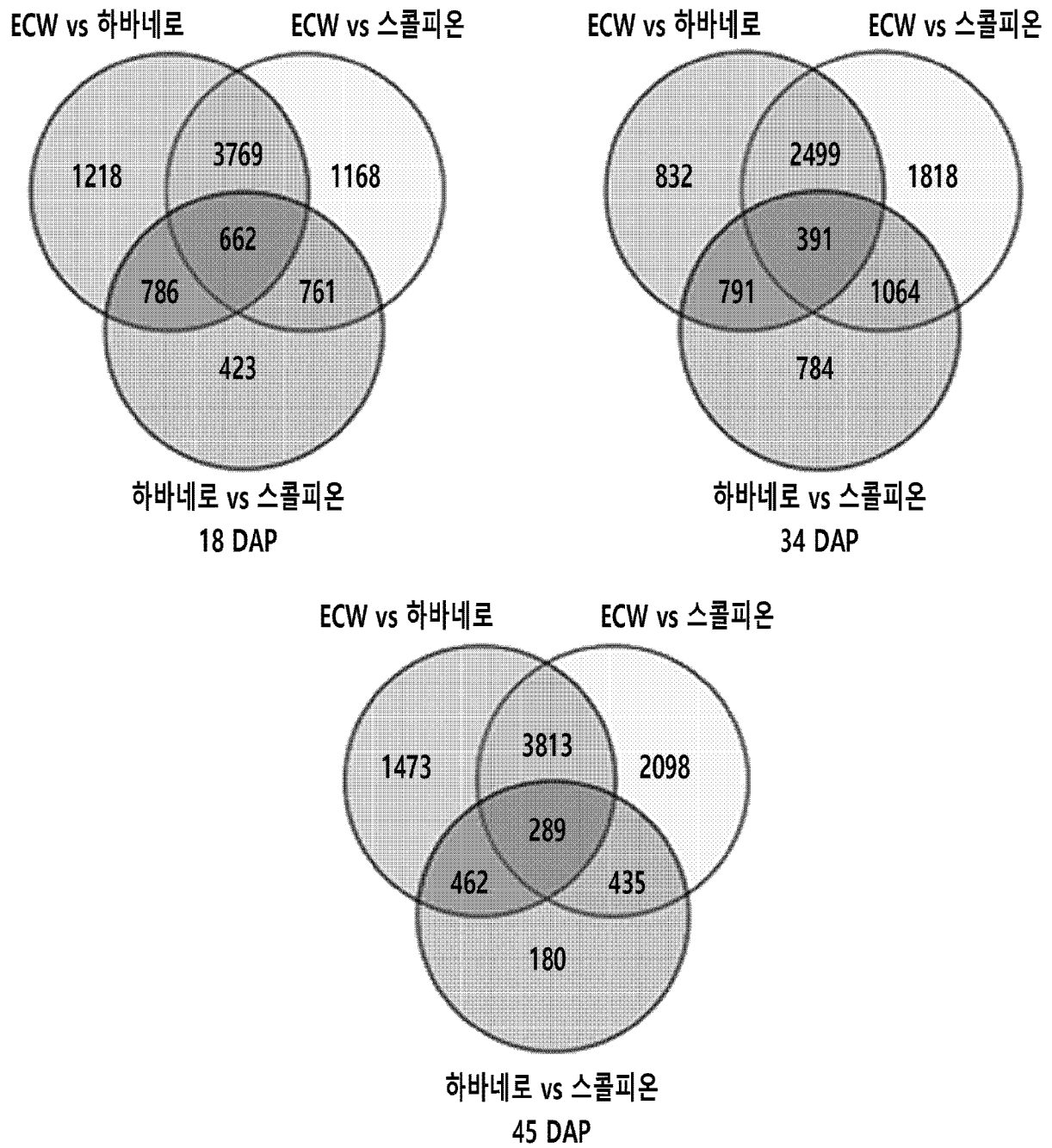
[도 11]



[도12]

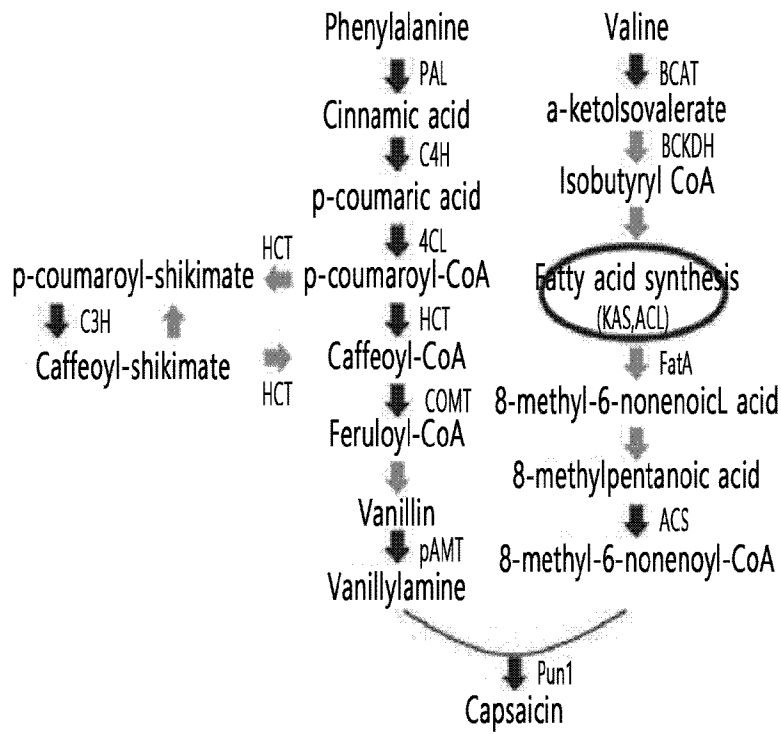


[도 13]



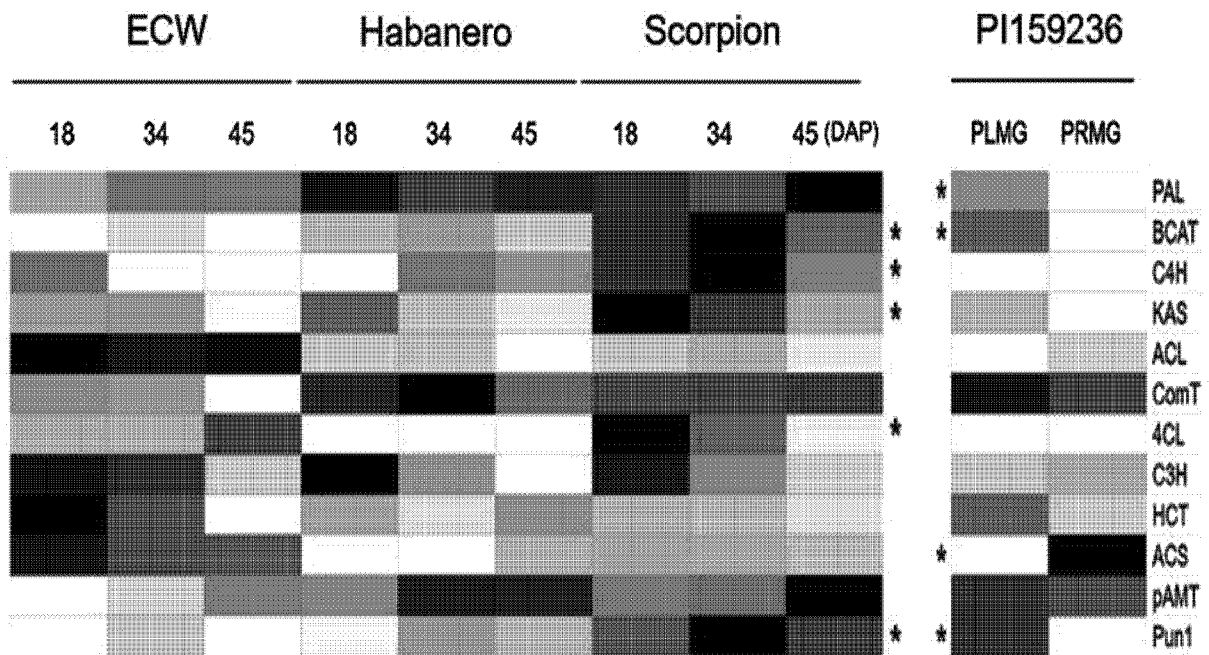
[도 14]

(a)

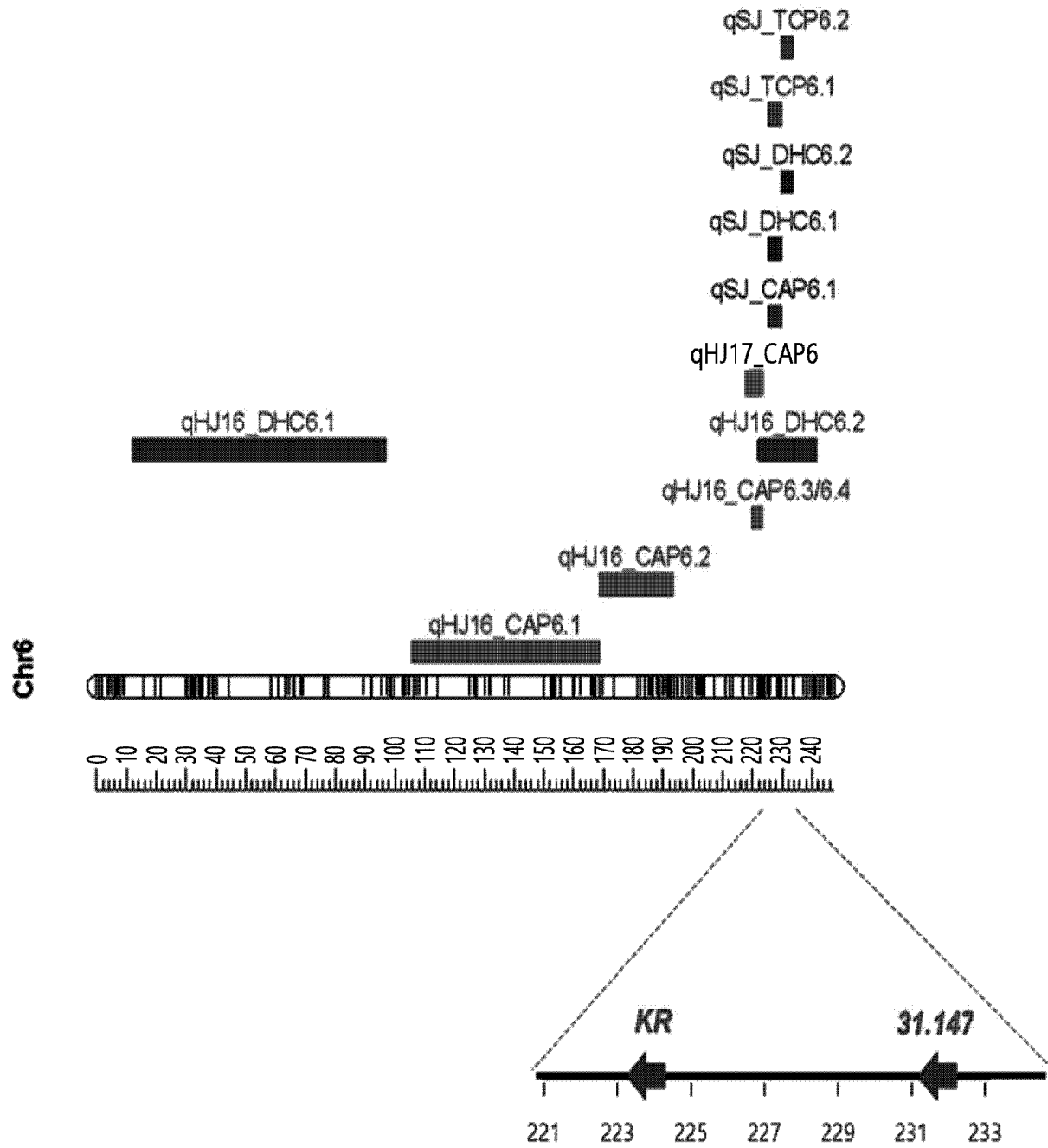


(b)

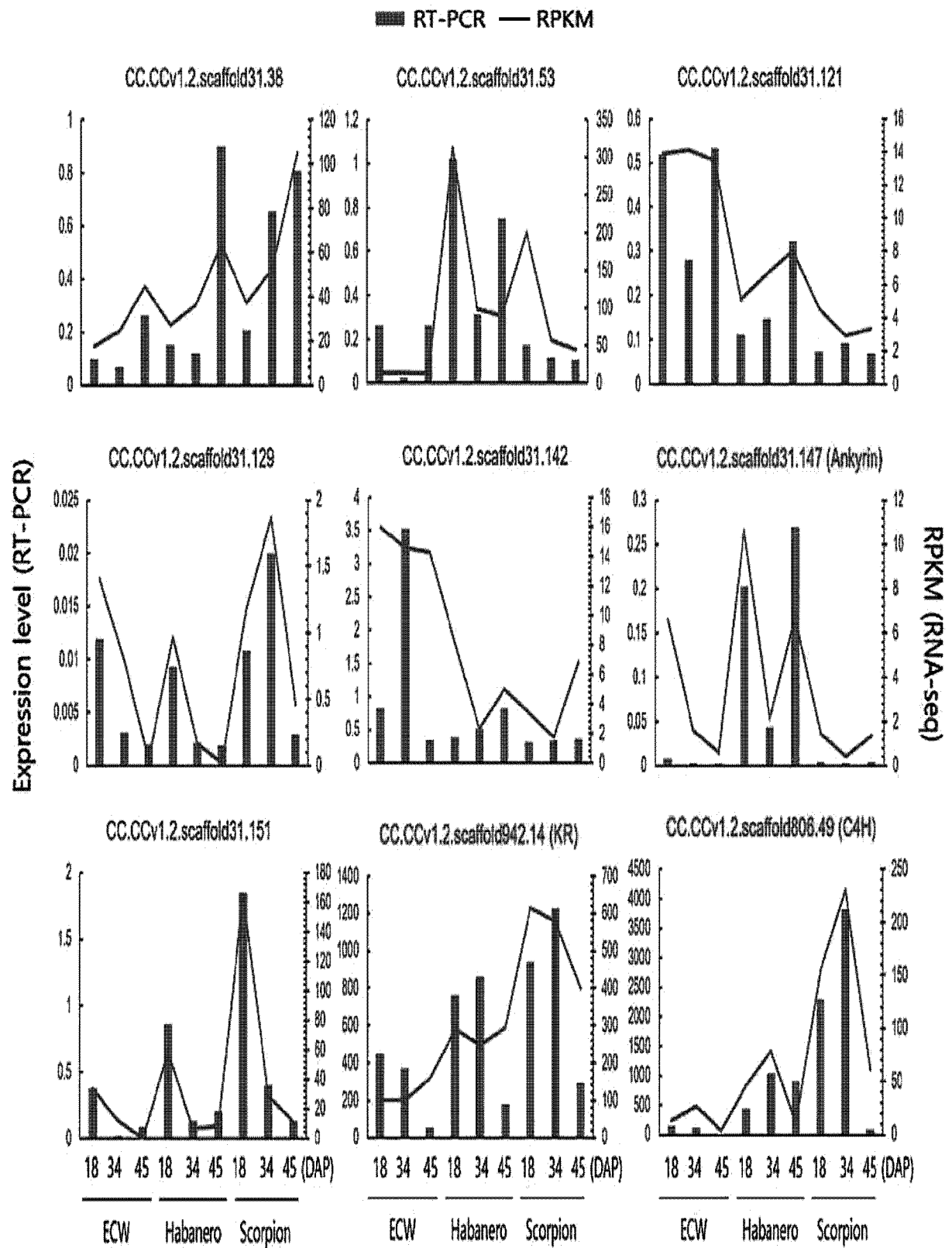
0 $\log_2(1272.1)$



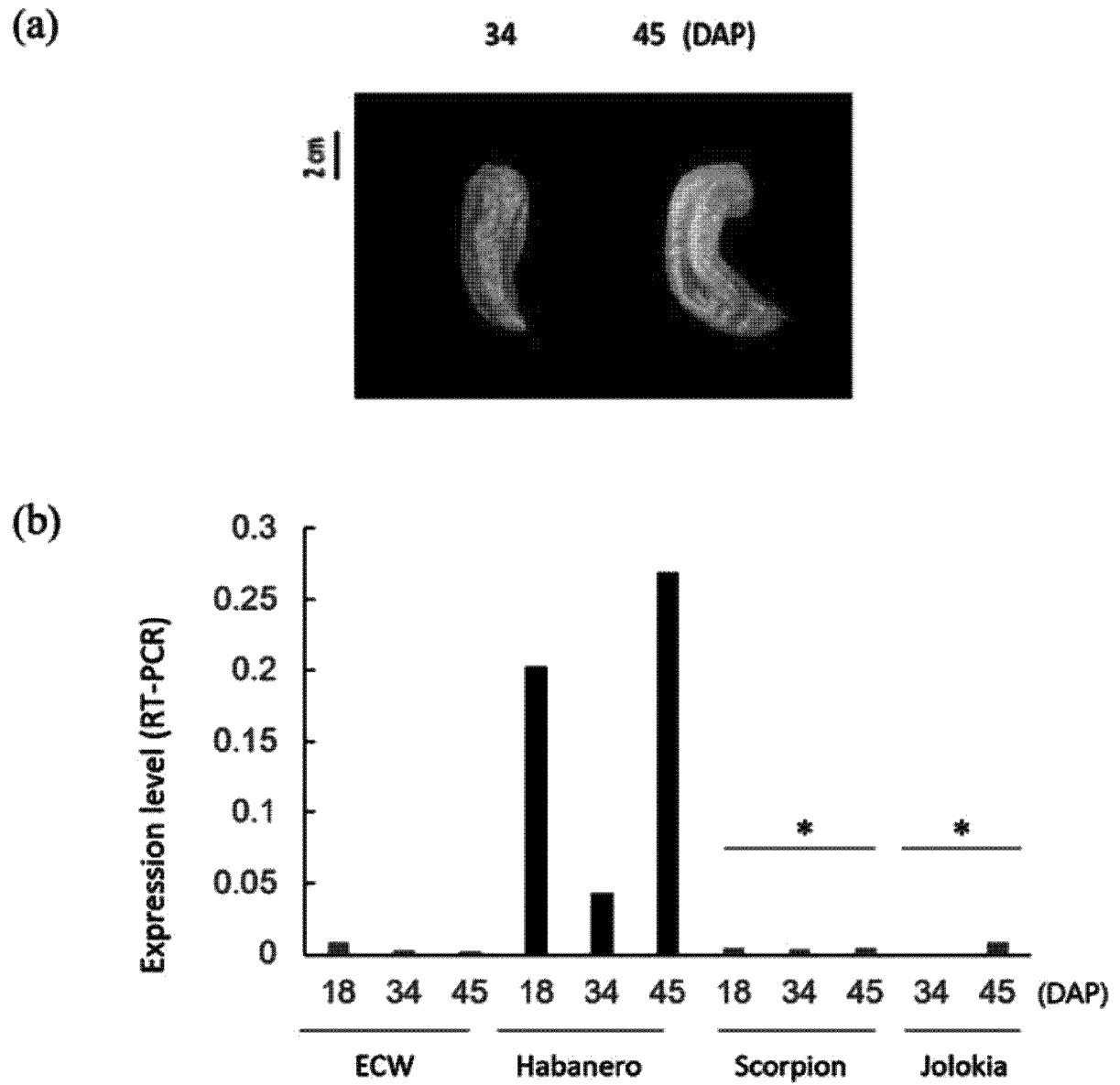
[도15]



[도16]

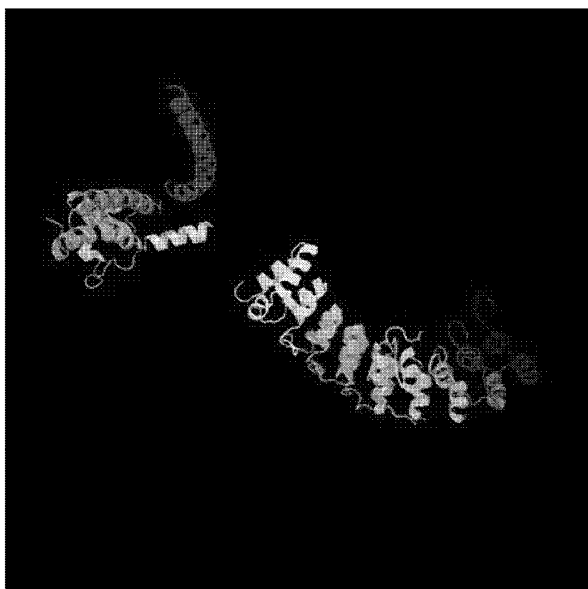


[도17]

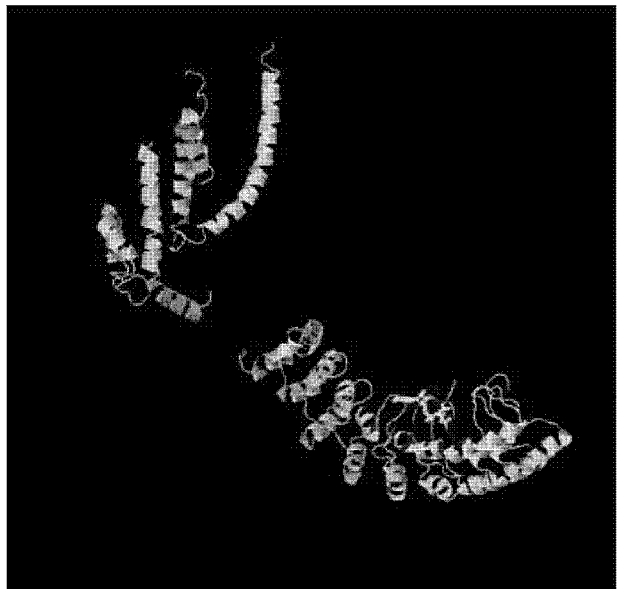


[도18]

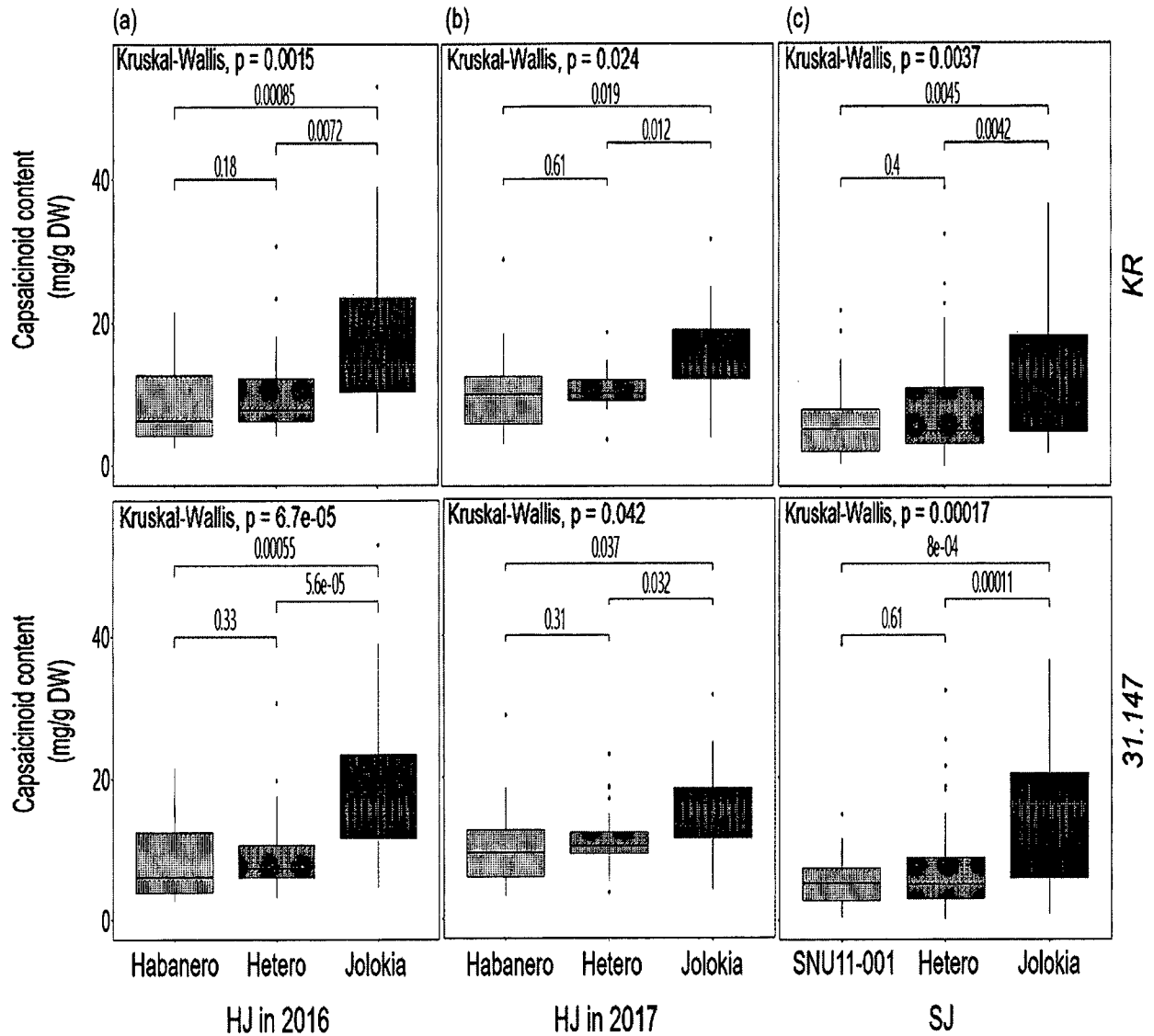
(a)



(b)



[도 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/011991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6895(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6895; C12N 15/10; C12N 15/11; C12N 15/29; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: red pepper, taste, spicy, spicy taste, capsaicin, capsinoid, marker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0053459 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)) 13 May 2016 See abstract and claim 1.	1-7
A	KR 10-2016-0053000 A (PEPPER & BREEDING INSTITUTE) 13 May 2016 See abstract and claim 1.	1-7
A	KR 10-1573419 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 01 December 2015 See abstract and claim 1.	1-7
A	KR 10-0993866 B1 (KOREA SEED & VARIETY SERVICE) 15 November 2010 See abstract and claim 1.	1-7
A	KR 10-2014-0051740 A (KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION) 02 May 2014 See abstract and claim 1.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 MAY 2019 (27.05.2019)

Date of mailing of the international search report

27 MAY 2019 (27.05.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/011991

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0053459 A	13/05/2016	None	
KR 10-2016-0053000 A	13/05/2016	None	
KR 10-1573419 B1	01/12/2015	None	
KR 10-0993866 B1	15/11/2010	KR 10-2009-0091629 A	28/08/2009
KR 10-2014-0051740 A	02/05/2014	KR 10-1435443 B1	28/08/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6895(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6895; C12N 15/10; C12N 15/11; C12N 15/29; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 고추, 맛, 매운, 신미, 캡사이신, 캡사노사이드, 마커

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2016-0053459 A (대한민국(농촌진흥청장)) 2016.05.13 요약 및 청구항 1 참조.	1-7
A	KR 10-2016-0053000 A ((주)고추와 육종) 2016.05.13 요약 및 청구항 1 참조.	1-7
A	KR 10-1573419 B1 (서울대학교산학협력단) 2015.12.01 요약 및 청구항 1 참조.	1-7
A	KR 10-0993866 B1 (대한민국(국립종자원장)) 2010.11.15 요약 및 청구항 1 참조.	1-7
A	KR 10-2014-0051740 A (강원대학교산학협력단) 2014.05.02 요약 및 청구항 1 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 05월 27일 (27.05.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 05월 27일 (27.05.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



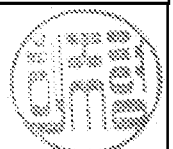
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0053459 A	2016/05/13	없음	
KR 10-2016-0053000 A	2016/05/13	없음	
KR 10-1573419 B1	2015/12/01	없음	
KR 10-0993866 B1	2010/11/15	KR 10-2009-0091629 A	2009/08/28
KR 10-2014-0051740 A	2014/05/02	KR 10-1435443 B1	2014/08/28