



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월26일
(11) 등록번호 10-2425129
(24) 등록일자 2022년07월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0130105
- (22) 출원일자 2020년10월08일
심사청구일자 2020년10월08일
- (65) 공개번호 10-2022-0046882
- (43) 공개일자 2022년04월15일
- (56) 선행기술조사문헌
Y. MINAMIYAMA ET AL, PLANT BREEDING, 2005,
124(3), PP.288_291
KOEUN HAN ET AL, PLANT BIOTECHNOL J., 2018,
16(9), PP.1546_1558
NCBI REFERENCE SEQUENCE: NM_001325053
KR1020160053459 A
- (73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
- (72) 발명자
이상협
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 104동 201호(대치동, 대치삼성아파트)
- 닐루파 액터
서울특별시 광진구 군자로 108, 군자빌딩 5층 553호 (군자동)
- (74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 10 항

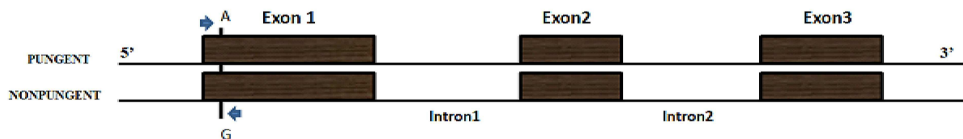
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 안 매운 고추 선별 마커 및 이를 이용한 선별 방법

(57) 요약

본 발명은 안 매운 고추 선별용 마커에 관한 것으로, 본 발명의 안 매운 고추 선별용 마커 및 이를 검출할 수 있는 체제를 포함하는 조성물을 이용하여 고추의 육종 과정에서 안 매운 고추를 보다 정확하게 선별할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062989
과제번호	PJ013296012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	환경스트레스에 안정적인 저신미 풋고추 계통 육성
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 중 141번째 위치에 대응되는 위치의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별용 마커 조성물.

청구항 2

서열번호 1의 염기서열 중 141번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 제제를 포함하는 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별용 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트인 것인, 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별용 조성물.

청구항 4

청구항 2 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별용 키트.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 키트는 제한효소를 더 포함하는 것인, 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별용 키트.

청구항 6

고추로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 141번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계;를 포함하는 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 검출은 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트를 이용해 증폭하는 것인, 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 증폭 산물을 제한효소로 절단하는 단계;를 더 포함하는, 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 제한효소로 절단하여 얻어진 산물을 전기영동하여 크기별로 분리하는 단계;를 더 포함하는,

안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별 방법.

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 고추는 C4H(cinnamate 4-hydroxylase) 유전자가 서열번호 1의 서열을 포함하는 품종의 자손 세대이고, 상기 고추에서 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열에서 서열번호 1의 141번에 대응되는 위치의 염기가 G에 해당되면 상기 고추를 안 매운맛 품종으로 선별하는, 안 매운 고추(Capsicum annum L) 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안 매운 고추 선별 마커 및 이를 이용한 선별 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 고추는 가지과 식물로서, 열대지역에서는 여러해살이로, 온대지방에서는 한해살이풀로 분류되며, 각종 요리의 재료나 조미료로 이용되기도 하고, 위를 튼튼하게 하는 약재로써 이용되기도 하는 등 실생활에 매우 유용한 작물이다. 또한 토마토, 가지, 감자 등과 같이 가지과(Solanaceae)에 속하며 이들 작물과 많은 유전적 공통점을 가지고 있다.

[0004] 고추의 가장 큰 특징인 매운맛은 알칼로이드 화합물인 capsaicinoid의 생합성과 축적에 기인하는 것으로 알려져 있는데, capsaicinoid는 주로 고추 종자가 붙어있는 태좌나 격벽 조직에서 대부분 발현한다. 현재 알려져 있는 capsaicinoid의 주 유도체로는 capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homo-capsaicin, homo-dihydrocapsaicin 등이 있다.

[0005] 매운맛의 유무는 단일 우성 유전자에 의해 결정되는 것으로 알려져 있는데, 매운 형질이 안 매운 형질에 대해 우성이며 이에 관여하는 유전자는 하나 또는 두 개인 것으로 알려져 있다. 이 유전자가 acyltransferase를 코딩하는 Pun1 유전자인 것으로 보고된 바 있고, 맵지 않은 고추에서 이 유전자 염기서열 상의 결실 부위를 이용한 분자표지가 개발되었다. 하지만 Pun1에 기반한 마커로 관별할 수 없는 유전자원이 다수 존재하는 관계로 맵고/안매운 맛을 선별할 수 있는 분자마커를 개발할 필요가 있다.

[0006] 특히, 풋고추는 매운맛이 발현되지 않는 것이 품질 결정의 중요한 요인 중 하나이며, 이러한 특성을 미리 알 수 있다면 풋고추 품종 육성에 큰 도움을 줄 수 있다. 따라서 고추의 매운맛과 관련된 유전자 서열 변이와 이를 기반으로 한 선별 마커 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0993866호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 안 매운 고추 선별용 마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 안 매운 고추 선별용 마커를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 안 매운 고추 선별용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 안 매운 고추 선별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 1. 서열번호 1의 염기서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 안 매운 고추 선별용 마커 조성물.
- [0015] 2. 서열번호 1의 염기서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 제제를 포함하는 안 매운 고추 선별용 조성물.
- [0016] 3. 위 2에 있어서, 상기 제제는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트인 것인, 안 매운 고추 선별용 조성물.
- [0017] 4. 위 2 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 안 매운 고추 선별용 키트.
- [0018] 5. 위 4에 있어서, 상기 키트는 제한효소를 더 포함하는 것인, 안 매운 고추 선별용 키트.
- [0019] 6. 고추로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계;를 포함하는 안 매운 고추 선별 방법.
- [0020] 7. 위 6에 있어서, 상기 검출은 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트를 이용해 증폭하는 것인, 안 매운 고추 선별 방법.
- [0021] 8. 위 7에 있어서, 증폭 산물을 제한효소로 절단하는 단계;를 더 포함하는, 안 매운 고추 선별 방법.
- [0022] 9. 위 8에 있어서, 제한효소로 절단하여 얻어진 산물을 전기영동하여 크기별로 분리하는 단계;를 더 포함하는, 안 매운 고추 선별 방법.
- [0023] 10. 위 6에 있어서, 상기 고추는 C4H(cinnamate 4-hydroxylase) 유전자가 서열번호 1의 서열을 포함하는 품종의 자손 세대이고, 상기 고추에서 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열에서 서열번호 1의 141번에 대응되는 위치의 염기가 G, 153번에 대응되는 위치의 염기가 C 및 189번에 대응되는 위치의 염기가 A로 이루어진 군에서 적어도 하나 이상에 해당되면 상기 고추를 안 매운맛 품종으로 선별하는, 안 매운 고추 선별 방법.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 안 매운 고추 선별 마커 및 이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 조성물은 고추 육종 단계에서 안 매운 고추를 보다 정확하게 선별할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 캡사이신의 생합성 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 C4H의 유전자 구조를 나타낸 것이다.
- 도 3은 매운맛 유전자형과 안 매운맛 유전자형 사이의 C4H 유전자의 SNP 자리 및 CAPS 마커의 개발을 나타낸 것이다.
- 도 4는 C4H 유전자 기반의 마커를 이용하여 매운맛 및 안 매운맛 유전형의 유전형 분석(genotyping)을 확인한 것으로, 도 4a는 본 발명의 프라이머를 이용한 PCR 증폭 산물, 도 4b는 매운맛과 안 매운맛 품종 자원에서 증폭된 PCR 산물에 대해 제한효소(ApeKI)를 처리한 후 두 계통 간에 다른 밴드 패턴이 나타난 것을 확인한 것이다. 도 4c는 다양한 매운 맛을 내는 고추 자원(10~13)과 안 매운 맛을 내는 고추 자원(1~9)을 대상으로 C4H 유전자 기반의 마커를 적용한 결과를 나타낸 것으로, 밴드 패턴만으로 매운 고추 또는 안 매운 고추를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 안 매운 고추 선별용 마커 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 서열번호 1의 염기 서열은 안 매운 고추인 미인보라 품종의 C4H(cinnamate-4-hydroxylase) 유전자 염기 서열을

나타낸 것이고, 서열번호 2의 염기 서열은 매운 고추인 후끈왕 품종의 C4H 유전자 염기 서열을 나타낸 것이다.

- [0032] 본 발명에서 '단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)'은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 단일염기는 폴리뉴클레오티드 서열에서 치환, 제거 또는 첨가될 수 있다. 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 코딩 영역 내에 존재하는 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고, 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 비-동의적(non-synonymous)이라 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있다. 코딩 영역이 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 C4H 유전자의 특정 SNP를 확인하여, 그 C4H가 캡사이신 생합성에 참여할 수 있는지를 확인하고, 이에 그 고추가 안 매운 고추인지 여부를 선별하는 것으로, C4H 유전자는 도 1에서 매운 고추에서 매운 맛을 나타내는 것으로 알려진 캡사이신 생합성 경로에 관여하는 유전자 중 하나이다. C4H 유전자가 캡사이신 생합성에 참여하지 못한다면 캡사이신이 합성되지 않아 안 매운 고추를 획득할 수 있음은 확인할 수 있으나, C4H 유전자가 캡사이신 생합성에 참여한다고 해도, 캡사이신 합성 경로의 다른 효소들의 작용 여부에 따라 매운 고추 또는 안 매운 고추를 획득할 수 있다.
- [0034] 구체적으로, 안 매운 맛 관련 SNP는 서열번호 1의 141번째 염기가 A 또는 G, 153번째 염기가 T 또는 C, 189번째 염기가 A 또는 G로서, 안 매운 맛 고추는 예를 들면 서열번호 1에 대응되는 서열에서 서열번호 1의 141번째 대응되는 위치의 염기가 G, 153번째 대응되는 위치의 염기가 C 또는 189번째 대응되는 위치의 염기가 A일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 '대응되는 위치'는 서열을 배열(alignment)하였을 때의 대응되는 위치의 서열을 의미한다.
- [0036] 마커 조성물에 포함되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드의 길이는 검출 또는 증폭되어 확인될 수 있는 것이라면 제한되지 않는다.
- [0038] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 제제를 포함하는 안 매운 고추 선별용 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명에서 'SNP를 검출하는 제제'는 시료에 포함된 해당 SNP를 확인하기 위해 사용되는 제제를 의미한다. 예컨대, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 유전자 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 제제일 수 있다.
- [0040] 상기 제제는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0041] 구체적으로, 상기 제제는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트를 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 제제는 전술한 서열번호 1의 염기서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 영역을 증폭할 수 있고, 증폭 산물이 제한효소에 의해 절단되면 안 매운 고추로 선별할 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 상기 제제는 서열번호 1의 염기서열 중 141번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 영역을 증폭하여, 증폭 산물이 제한 효소 ApeKI에 의해 절단되면 안 매운 고추로 선별할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 예를 들어, 상기 제제는 서열번호 1의 염기서열 중 141번째 위치에 대응되는 위치의 SNP를 포함하는 단편을 증폭시킬 수 있고, 그 후 제한효소인 ApeKI를 처리함으로써, ApeKI 절단 부위의 준부를 검출할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 '프라이머'는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxylgroup)를 가지는 핵산서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 15 내지 30개의 염기로 구성된다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할

수 있다.

- [0046] 본 발명에서 '프로브'는 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있다.
- [0047] 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이러한 핵산서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0048] 본 발명에 이용되는 프라이머 또는 프로브로 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다.
- [0049] 본 발명에서 '상보적'은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0050] 본 발명에서 '실질적으로 상보적인 서열'은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함하는 의미이다.
- [0052] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 포함하는 안 매운 고추 선별용 키트에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명 키트는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로 PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다. dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 중합효소는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라아제, Tth DNA 폴리머라아제 등 시판되는 폴리머라아제일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 키트는 제한효소를 더 포함할 수 있다. 상기 제한효소는 EcoRI, Bsu36I, HindIII, MboII, PstI, SpeI, BamHI, MluI, AluI, DraI, PvuI, XhoI, BclI, TaqI, KpnI, MspI, HinfI 또는 ApeKI에서 선택될 수 있고, 구체적으로 ApeKI일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 또한, 본 발명은 고추로부터 분리된 서열번호 1의 염기 서열 중 141번, 153번 및 189번째 위치 중 적어도 하나에 대응되는 위치의 SNP를 검출하는 단계;를 포함하는 안 매운 고추 선별 방법에 관한 것이다.
- [0058] 상기 검출은 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 실시하여 증폭한 후, 증폭 산물을 제한효소로 절단하여 상기 SNP를 검출하는 것일 수 있고, 예를 들어 상기 증폭은 서열번호 3(ATGGATCTTCTTGCTGGA) 및 서열번호 4(TCAGAAAGATCTTGGTTCA)의 프라이머 세트를 이용하여 증폭하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 안 매운 고추 선별 방법은 증폭 산물을 제한효소로 절단하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0060] 예를 들어, 특정 프라이머 세트를 기반으로 PCR을 수행하여 얻어진 증폭산물을 해당 프라이머와 조합인 제한효소를 이용하여 활성 온도 내에서 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 '제한효소'는 DNA의 특정한 염기배열을 식별하고 이중사슬을 절단하는 엔도뉴클레아제로서 특수한 효소를 의미한다. 상기 제한효소는 상기 SNP에 대응되는 위치를 적어도 하나 이상 절단 사이트로 갖는다면 해당되는 것이며, 구체적으로 EcoRI, Bsu36I, HindIII, MboII, PstI, SpeI, BamHI, MluI, AluI, DraI, PvuI, XhoI, BclI, TaqI, KpnI, MspI, HinfI 또는 ApeKI에서 선택될 수 있고, 더 구체적으로 ApeKI일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0062] 본 발명의 안 매운 고추 선별 방법은 상기 제한효소로 절단하여 얻어진 산물을 전기영동하여 크기별로 분리하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트에 증폭된 산물이 제한효소 ApeKI 처리에 의해 절단되어 크기가 작은 산물이 확인되면 C4H가 특정의 SNP를 가지는 것이므로 C4H가 캡사이신 생합성에 참여하지 못하여 캡사이신이 합성되지 않으므로 안 매운 고추로 선별될 수 있고, 절단되지 않아 크기가 큰 산물이 확인되면 C4H는 캡사이신 생합성에 참여하는 것이고, 캡사이신 생합성 과정에 관여하는 다른 유전자들이 모두 작용한다면 캡사이신이 합성되므로 매운 고추로 선별될 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 안 매운 고추 선별 방법은 상기 고추는 C4H 유전자가 서열번호 1의 서열로 이루어진 품종의 자손 세대이고, 상기 고추에서 서열번호 1의 서열이 제한효소로 절단되면 상기 고추를 안 매운맛 품종으로 선별하는 것일 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 '자손 세대'는 C4H 유전자가 캡사이신 생합성에 참여하지 못하는 품종의 자손 세대를 의미하고, 구체적으로 C4H 유전자는 캡사이신 생합성에 참여하지 못하고, 캡사이신 생합성 과정(도 1 참조)에 관여하는 다른 유전자들은 모두 정상 작용하는 품종의 자손 세대를 의미할 수 있고, 상기 품종끼리 교배하여 얻은 F₁ 집단을, F₁을 자가 수정하여 얻은 F₂ 집단, 또는 F₂ 이후의 자가 수정을 통해 얻은 집단을 의미한다.
- [0066] 상기 자손 세대는 캡사이신 생합성 경로에서 C4H 유전자는 특정 SNP의 유전 여부에 따라 C4H가 캡사이신 생합성에 참여 또는 미참여할 수 있고, C4H 유전자를 제외한 모든 효소들은 정상 작동하므로 C4H의 캡사이신 생합성 참여 여부에 따라 캡사이신의 합성 여부를 결정할 수 있다. 따라서, C4H 유전자가 캡사이신 생합성에 참여한다면 매운 고추로 선별할 수 있고, 그렇지 않다면 안 매운 고추로 선별할 수 있다.
- [0068] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0070] **실시예**
- [0071] **1. 대상 식물 및 재료**
- [0072] 본 실시예에서는 고추 육성 프로그램에서 사용되는 55개의 고추(Capsicum annum L) 육성 계통을 사용했다. 모든 육성 계통은 아시아 중묘(대한민국 이천)로부터 획득하였다.
- [0073] **2. 샘플 수집 및 DNA 추출**
- [0074] 55개의 육성 계통 고추 잎으로부터 gDNA를 Maaty와 Oraby (2019)에 의해 변형된 CTAB 방법(Doyle and Doyle 1990)을 사용하여 추출하였다. DNA 농도 및 순도는 NanoDrop 1000 (ThermoScientific)을 사용하여 260nm에서의 흡광도(A260)를 측정하여 분석하였다.
- [0075] **3. 프라이머 디자인 및 PCR의 증폭**
- [0076] 고추 (Capsicum annum L)의 Cinnamate 4-hydroxylase(C4H) 유전자 (유전자 ID: CA06g25940)는 sol genomics network (https://solgenomics.net/organism/Capsicum_annuum/genome)에서 획득하였다.
- [0077] 프라이머 세트 1은 프라이머 3 소프트웨어를 사용하여 고추 Capsicum annum cv CM334 (Kim et al 2014)의 C4H 유전자 서열을 기반으로 설계하였다(표 1). PCR 증폭은 20 내지 30ng의 게놈 DNA, 10ul 2X PCR master mix solution (i-Taq TM), 1ul의 정방향 프라이머(10 pmol/ul) 및 1ul의 역방향 프라이머(10 pmol/ul)를 포함하는 20ul PCR 반응 부피에서 수행하였다. PCR 증폭은 94℃에서 2분 동안 프로그래밍된 주기로 Agilent Thermo cyclic PCR 기계에서 수행한 다음 94℃에서 35주기 20초 변성, 50 내지 60℃에서 20초 어닐링 (어닐링 온도는 프라이머의 녹는 점), 72℃ 증폭에서 1min / kb. 72℃에서 5 분 동안 최종 증폭을 수행했다. PCR 산물은 140v에서 1 시간 동안 1X TBE buffer를 사용하여 syber green으로 염색한 2% agarose gel에서 분리하고 100bp 분자량 마커를 사용했다. DNA 밴드는 UV transilluminator를 사용하여 시각화하고 사진을 찍었다.

표 1

서열번호	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Tm	Purpose	Amplicon size
3	Primer set1_For	ATGGATCTTCTTGCTGGA	54	Sequencing	3063 bp
4	Primer set1_Rev	TCAGAAAGATCTTGGITTCA	52		
5	Primer set2_For	TGCTGGAGAAGACCTTAGTAG	54	Genotyping	265 bp
6	Primer set2_Rev	GTGTGCAAACTTCTTAGCTG	53		

[0078]

[0079]

4. C4H 유전자 기반 CAPS 마커의 개발

[0080]

후끈왕(매운 고추)과 미인보라(안 매운 고추)에서 3063bp의 C4H 유전자 DNA 서열을 유전자 기반 프라이머를 사용하여 증폭하였고, 표적 서열을 RBC TA 클로닝 키트를 사용하여 클로닝해서 시퀀싱했다. 또한, 서열 데이터 분석 소프트웨어(Geneious prime 8)을 사용하여 후끈왕(매운 고추) 및 미인보라(안 매운 고추) DNA 서열을 확인하였다.

[0081]

그 결과, C4H 유전자의 첫 번째 엑손에서 3개의 SNP 부위가 확인되었다. 이를 바탕으로 프라이머 세트 2를 사용하여 CAPS 마커를 개발하였고, 증폭된 크기는 265bp였다(표 1, 도 2 및 도 3). 증폭된 표적 유전자 서열을 제한효소 ApeKI로 절단하여 안 매운맛 유전형에서 140bp, 83bp 및 42bp의 3개 단편과 매운맛 유전형에서 182bp 및 83bp의 단편을 생성했다(도 4).

[0082]

이를 통해, 매운 유전형 및 안 매운 유전형 모두 제한효소 ApeKI의 동일한 절단 사이트를 하나 갖고, 안 매운 유전형의 경우는 추가로 SNP 부위에 제한효소 ApeKI의 절단 사이트가 하나 더 있는 것을 알 수 있다. 따라서, 안 매운 고추의 경우 제한효소 ApeKI로 처리 시, 매운 고추에 비해 단편의 수가 더 많이 생성되는 것으로 선별할 수 있음을 의미한다.

[0083]

5. 육종 계통 대상의 유전형 분석

[0084]

CAPS 마커를 사용하여 총 55개의 고추 육종 계통에 대한 유전형 분석을 실시하였다. 후끈왕과 미인보라를 각각 대조군(매운 고추)과 안 매운 고추의 표준 유전형으로 사용했다. 매운맛과 안 매운맛은 고추 열매 수확 후 시식 패널에 의해 수행되었다. 이들의 유전형을 분석한 결과, 13 계통을 제외하고 표현형(매운맛 혹은 안 매운맛) 결과와 일치했다(표 2).

표 2

[0085]

고추 계통	계통 번호	세대	매운맛 여부	유전형
건청양 (그린하트)	106N_P6	F5	P	P
건청양 (그린하트)	107N_P2	F5	P	P
건청양 (그린하트)	109N_P4	F5	N_P	P
건청양 (그린하트)	105N_P2	F5	N_P	P
건청양 (그린하트)	108N_P3	F5	N_P	N_P
길상	43877	F6세대이상	N_P	N_P
길상	43945	F6세대이상	N_P	N_P
길상 (F1) selfing	43975	F6세대이상	N_P	N_P
길상 (F1) selfing	43845	F6세대이상	N_P	N_P
길상 (F1) selfing	43966	F6세대이상	N_P	N_P
길상 X 금오각 (중국계통)	15858	F6세대이상	N_P	N_P
길상 X 금오각 (중국계통)	16254	F6세대이상	N_P	N_P
길상 X 룡그린	14611	F6세대이상	N_P	N_P
길상 X 룡그린	14246	F6세대이상	N_P	N_P
길상 X 룡그린	14336	F6세대이상	N_P	N_P
길상 X 룡그린	14671	F6세대이상	N_P	N_P
룡그린	19541	F6세대이상	N_P	N_P
룡그린	20911	F6세대이상	N_P	N_P
룡그린	21916	F6세대이상	N_P	N_P
룡그린	22798	F6세대이상	N_P	N_P
룡그린	23102	F6세대이상	N_P	N_P

룽그린	24139	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린	24990	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린	25355	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린	29221	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린	29252	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린	30133	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린	22647	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린 X DMC X 장각초	16619	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린 X DMC X 장각초	17199	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린 X DMC X 장각초	17349	F6세대이상	N_P	N_P
룽그린 X DMC X 장각초	29707	F6세대이상	N_P	N_P
명산 풋고추	116N_P6	F6세대이상	N_P	NA
명산 풋고추	116N_P3	F6세대이상	N_P	P
미남 부계	28307	F6세대이상	N_P	N_P
미남 부계	28672	F6세대이상	N_P	N_P
스위티 (홍농)	44172	F3	N_P	P
스위티 (홍농)	31959	F3	N_P	P
스위티 (홍농)	32021	F3	N_P	P
스위티 (홍농)	32721	F3	N_P	P
오이고추 [스위티 (농우)]	33817	F3	P	N_P
오이맛 고추 계열 F1 (다끼)	134N_P3	F2	N_P	N_P
우각초 F1 (중국산)	124N_P1	F6세대이상	P	N_P
장수맛 (농우)	117N_P3	F6세대이상	N_P	P
장수맛 (농우)	118N_P5	F6세대이상	N_P	P
청양계	115N_P1	F6세대이상	P	P
청탑	113N_P2	F6세대이상	P	P
청탑	114N_P4	F6세대이상	P	P
혈조 마일드 (F1)	126N_P5	F4	N_P	N_P
혈조 마일드 (헝가리안왁스 타입)	125N_P7	F4	N_P	N_P
혈조 마일드 (헝가리안왁스 타입)	126N_P7	F4	N_P	N_P
혈조 마일드 (헝가리안왁스 타입)	129N_P2	F4	N_P	N_P
혈조 마일드 (헝가리안왁스 타입)	129N_P5	F4	N_P	N_P
후끈왕	-	F1	P	P
미인보라	-	F1	N_P	N_P

[0086] P: 매운 맛 고추, N_P: 안 매운맛 고추

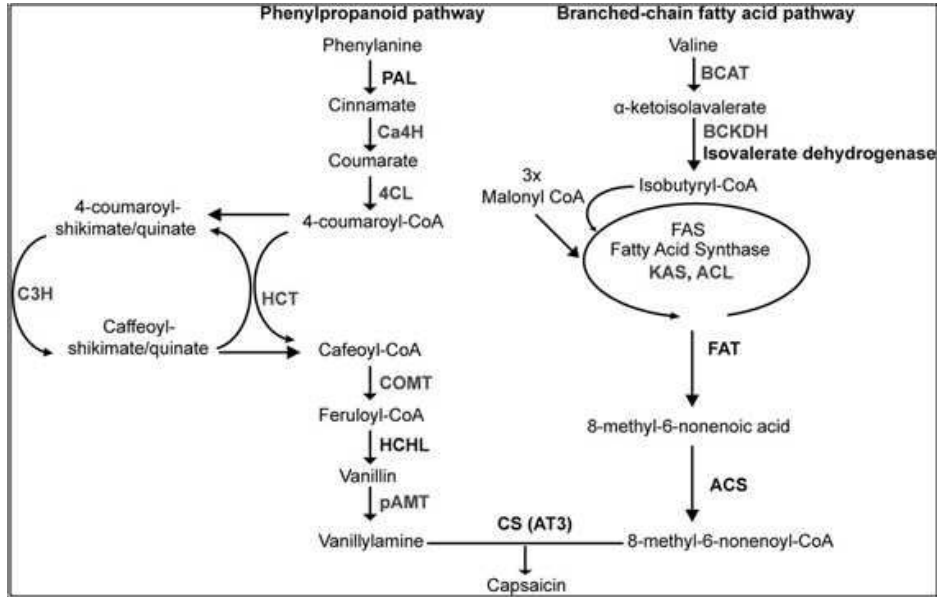
[0088] 상기 표 2에 따르면, 육성에 사용된 고추 계통이 건청양, 명산, 스위티, 우각초, 장수맛일 경우 마커에 의한 유전형과 매운맛 여부가 불일치 하는 결과를 보였다. 반면, 육성에 사용된 계통이 길상, 금오각, 룽그린, DMC, 장각초, 미남, 청양계, 청탑, 혈조 마일드일 경우 마커에 의한 유전형과 매운맛 여부가 일치 하는 결과를 보였다.

[0089] 전술한 바와 같이, 55개의 육성 계통 중 13 계통은 표현형과 일치하지 않는 결과를 보였는데, 이는 캡사이신 생합성 경로에 관여하는 C4H 이외의 다른 유전자의 발현 또는 작동 여부에 의한 것으로 판단된다.

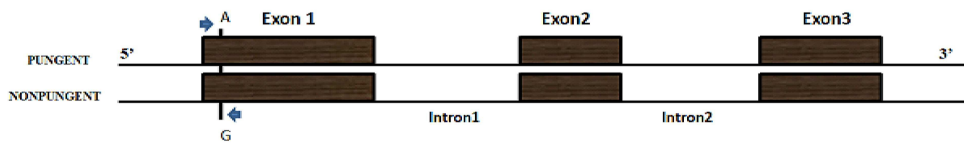
[0090] 따라서, 55개의 육성 계통 중 마커 결과와 표현형 결과가 일치하는 44개의 육성 계통(길상, 금오각, 룽그린, DMC, 장각초, 미남, 청양계, 청탑, 혈조 마일드)들에 대해서는 본 발명의 마커에 의해 안 매운 고추를 선별할 수 있음을 의미한다.

도면

도면1



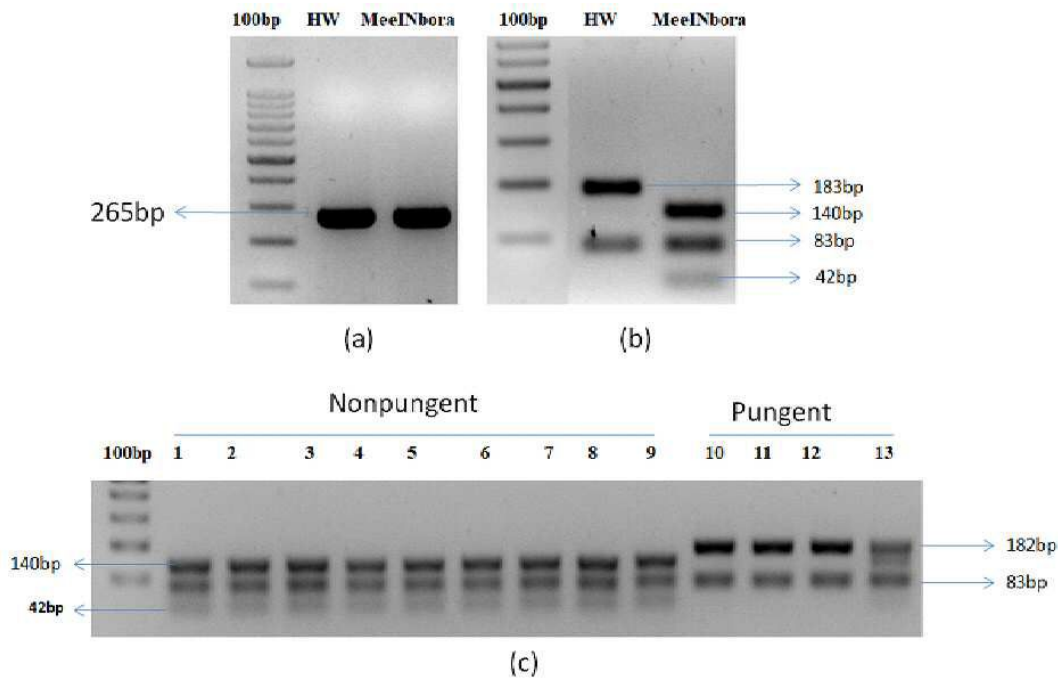
도면2



도면3

후끈왕	ATGGATCTTCTCTTTGCTGGAGAAGACCTTAGTAGGCCCTTTCTTTTGGCCATTGTTAGTAGCT	60
미인보라	ATGGATCTTCTCTTTGCTGGAGAAGACCTTAGTAGGCCCTTTCTTTTGGCCATTGTTAGTAGCT	60
후끈왕	ATTATTGTGTCTAAATTGCCGTAGCAAGCGTTTTTAAGCTGCCCCCGAGGTCCAATTCCAGTC	120
미인보라	ATTATTGTGTCTAAATTGCCGTAGCAAGCGTTTTTAAGCTGCCCCCGAGGTCCAATTCCAGTC	120
후끈왕	CCAGTTTTTGGTAACTGGCTCAAGTTGGCGATGATTTGAATCATCGTAAACCTCACTGAT	180
미인보라	CCAGTTTTTGGTAACTGGCTCAAGTTGGCGAGGATTTGAATCATCGTAAACCTCACTGAT	180
후끈왕	TACCGGAAGAAAGTTTGGTGCACATTTTCTTGCTTAGAATGGGTCAAGAAACTTGGTCGTT	240
미인보라	TACCGGAAGAAAGTTTGGTGCACATTTTCTTGCTTAGAATGGGTCAAGAAACTTGGTCGTT	240

도면4



서열 목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
 - <120> Marker for selecting unpungent pepper and selection method using the same
 - <130> 20P08038
 - <160> 6
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 240
 - <212> DNA
 - <213> Capsicum annuum
 - <400> 1
- ```

atggatcttc tcttgctgga gaagacctta gtaggccttt tctttgcat tgtagtagct 60
attattgtgt ctaaattgcg tagcaagcgt ttaagetgce cccaggtcc aattccagtc 120
ccagtttttg gtaactggct gcaagttggc gacgatttga atcatcgtaa cctcactgat 180

tacgcgaaaa agtttggaga cattttcttg cttagaatgg gtcaaagaaa cttggtcggt 240

```
- <210> 2
  - <211> 240
  - <212> DNA

<213> Capsicum annuum  
 <400> 2  
 atggatcttc tcttgctgga gaagacctta gtaggccttt tctttgcat tgtagtagct 60  
 attattgtgt ctaaattgcg tagcaagcgt ttaagctgc ccccaggtcc aattccagtc 120  
 ccagtttttg gtaactggct acaagttggc gatgatttga atcatcgtaa cctcactgat 180  
 tacgcaaga agtttggatga cattttcttg cttagaatgg gtcaaagaaa ctiggctcgtt 240  
 240  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer set 1  
 <400> 3  
 atggatcttc tcttgctgga 20  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer set 1  
 <400> 4  
 tcagaaagat ctgggttca 20  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212>  
 > DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer set 2  
 <400> 5  
 tgctggagaa gaccttagta g 21  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer set 2

<400> 6

gtgtgcaaaa cttcttagc tg

22