

고추의 역병 저항성과 연관된 분자표지의 효용성 검정

이원필^{1†} · 이준대^{1†} · 한정현¹ · 강병철² · 윤재복^{1*}

¹(주)고추와육종 기업부설연구소, ²서울대학교 식물생산과학부

Validity Test for Molecular Markers Associated with Resistance to *Phytophthora* Root Rot in Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Won Phil Lee^{1†}, Jundae Lee^{1†}, Jung-Heon Han¹, Byoung-Cheorl Kang², and Jae Bok Yoon^{1*}

¹R&D Unit, Pepper & Breeding Institute, Business Incubator, Seoul National University, Suwon 441-853, Korea

²Department of Plant Science, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

Abstract. *Phytophthora* root rot has been causing a serious yield loss in pepper production. Since 2004, the year in which commercial cultivars resistant to the disease were firstly commercialized, it has been necessary to introduce the resistance into domestic pepper cultivars for dried red pepper. Therefore, developing molecular markers linked to the resistance is required for an accurate selection of resistant plants and increasing breeding efficiency. Until now, several markers associated with the major dominant gene resistant to *Phytophthora* root rot have been reported but they have some serious limitations for their usage. In this study, we aimed to develop molecular markers linked to the major dominant gene that can be used for almost of all genetic resources resistant to *Phytophthora* root rot. Two segregating F₂ populations derived from a ‘Subicho’ × ‘CM334’ combination and a commercial cultivar ‘Dokyacheongcheong’ were used to develop molecular markers associated with the resistance. After screening 1,024 AFLP primer combinations with bulked segregant analysis, three AFLP (AFLP1, AFLP2, and AFLP3) markers were identified and converted into three CAPS markers (M1-CAPS, M2-CAPS, and M3-CAPS), respectively. Among them, M3-CAPS marker was further studied in ten resistants, fourteen susceptibles, five hybrids and 53 commercial cultivars. As a result, M3-CAPS marker was more fitted to identify *Phytophthora* resistance than previously reported P5-SNAP and Phyto5.2-SCAR markers. The result indicated that the M3-CAPS marker will be useful for resistance breeding to *Phytophthora* root rot in chili pepper.

Additional key words: AFLP, CAPS, M3-CAPS, P5-SNAP, Phyto5.2

서 언

국내는 물론 전세계적으로도 중요한 경제작물로 성장한 고추(*Capsicum annuum* L.)는 전 재배생육 기간 동안 다양한 병해충으로 인하여 수량감소는 물론 품질저하에 따른 피해가 심각한 상황이다. 특히 역병(*Phytophthora capsici*), 탄저병(*Colletotrichum acutatum*) 및 일부 바이러스병(CMV, TMV, PepMoV 및 TSWV 등)은 우리나라와 같은 온순지역에서 심각한 피해를 주는 것으로 알려져 있다(Kim et al.,

2008a, 2010a, 2010b). 이 중에서 역병의 경우 매년 편차가 존재하지만 가장 심각한 병해로 알려져 있다(Kim et al., 2010a). 이를 방제하기 위해서는 역병 저항성 품종의 육성이 가장 효과적인 방법인데, 이를 위해서는 역병 저항성 소재 탐색 및 고추와 역병균의 상호작용 등을 우선 규명해야 한다. 하지만, 육종 과정에서 역병 저항성 개체 선발을 위한 생물검정은 접종환경과 기주 및 병원균의 상태 등에 의해 그 결과가 다양해질 수 있어 저항성 개체를 정확하게 선발하기가 쉽지 않다. 또한, 원하는 형질 외에 원하지 않은 형질

*Corresponding author: yoonjb2@snu.ac.kr

†These authors are contributed equally to this work.

※ Received 19 September 2011; Revised 12 October 2011; Accepted 12 October 2011. 본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원에서 수행하는 작물 육종을 위한 품질분석 지원 사업단(과제번호: 609001-05)과 농촌진흥청 농업 R&D 15대 어젠다사업(과제번호: PJ006581072011)의 지원에 의해 수행되었음.

들의 혼입으로 인해 반복친의 원예적 특성 회복에는 많은 시간이 요구될 수도 있다(Lecomte et al., 2004). 게다가, 복합저항성 계통을 육성하는 과정에서 생물검정만으로는 시간적, 경제적 문제로 인해 그 목적을 달성하기 쉽지 않기 때문에, 다양한 도입 유전자의 집적(gene pyramiding)을 쉽게 확인할 수 있고, 환경적 요인도 배제할 수 있는 역병저항성 유전자 연관 분자표지의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다(Hospital, 2009).

고추 역병 저항성 유전자와 연관된 분자표지는 Phyto5.2-SCAR(OpD04-717-SCAR, Quirin et al., 2005)와 P5-SNAP (Kim et al., 2008b)이 보고되었으나, 일부 저항성 소재에서 단 제한적으로 이를 사용할 수 있어 분자표지의 효용성에 한계가 있다(Lee, 2009). 그러므로, 분자표지를 상업 육종에 활용하기 위해서는 다양한 저항성과 이병성을 구별할 수 있는 범용성과 분리세대에서 분자표지의 유전형과 실제 표현

형이 일치하는 정확성이 요구된다. 또한, 실제 육종과정에서 동형접합형(RR)과 이형접합형(Rr) 저항성을 구별할 수 있는 공우성 분자표지가 반드시 요구된다.

따라서 본 연구에서는 역병 주동 저항성과 매우 밀접하게 연관되어 있는 분자표지를 탐색하여 다양한 역병 저항성 계통에서 유래된 소재에서 모두 사용 가능한지를 확인하고, 분자표지와 생물검정 결과가 얼마나 일치하는지를 조사하여 육종과정에 실용적으로 사용할 수 있는 분자표지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

실험에 사용된 식물 재료는 역병 저항성 소재로 10개의 계통(R1-R10)을 사용하였고, 이병성 소재로 14개의 계통(S1-S14)을 사용하였다(Table 1). 그리고 역병 주동 저항성

Table 1. Plant materials used in this study.

Code	Name	Generation	Phytophthora resistance
R1	AC2258	Genetic resource	Resistant
R2	CM331	Genetic resource	Resistant
R3	CM334-INRA	Genetic resource	Resistant
R4	CM334-KBU	Genetic resource	Resistant
R5	PBC602	Genetic resource	Resistant
R6	YCM334	Genetic resource	Resistant
R7	PI 201234	Genetic resource	Resistant
R8	PBC280	Genetic resource	Resistant
R9	PBC495	Genetic resource	Resistant
R10	NR1	Inbred	Resistant
S1	Daehwacho	Landrace	Susceptible
S2	Subicho	Landrace	Susceptible
S3	Jaejujaerae	Landrace	Susceptible
S4	Chilsungcho	Landrace	Susceptible
S5	Punggakcho	Landrace	Susceptible
S6	ECW	Inbred	Susceptible
S7	NB1	Inbred	Susceptible
S8	NC1	Inbred	Susceptible
S9	PBC458A	Genetic resource	Susceptible
S10	KarakkimjangC	Inbred	Susceptible
S11	NH2	Inbred	Susceptible
S12	HNCB	Inbred	Susceptible
S13	Matikas	Genetic resource	Susceptible
S14	NH4	Inbred	Susceptible
SF ₁	'Subicho' × 'CM334'	F ₁	Resistant
PF ₁	'Punggakcho' × 'CM334'	F ₁	Resistant
CHF ₁	'Chilsungcho' × 'CM334'	F ₁	Resistant
DF ₁	'Daehwacho' × 'CM334'	F ₁	Resistant
PIF ₁	'PI 201234' × 'CM334'	F ₁	Resistant
CF1-CF52	Commercial cultivars	F ₁	Listed in Table 4
SF ₂	F ₂ of 'Subicho' × 'CM334'	F ₂	Segregant
DCF ₂	F ₂ of 'CF ₁ '	F ₂	Segregant

유전자와 연관된 분자표지를 개발하기 위해서 저항성 소재인 ‘CM334’를 이용한 5개의 교배조합[‘Subicho’ × ‘CM334’(SF₁), ‘Punggakcho’ × ‘CM334’(PF₁), ‘Chilsungcho’ × ‘CM334’(CHF₁), ‘Daehwacho’ × ‘CM334’(DF₁), and ‘PI 201234’ × ‘CM334’(PIF₁)]을 작성하였다(Table 1). 그 중 분자표지 개발에 사용된 재료는 ‘Subicho’ × ‘CM334’ 조합의 F₂ 분리집단(SF₂)과 역병 저항성 품종인 ‘Dokyacheongcheong’(CF₁)의 자가수정 후대(DCF₂) 분리집단이었다(Table 1). 또한 역병 저항성 연관 분자표지의 효용성을 검증하기 위해서 2008년도에 출시한 상용품종 중 53개(CF₁-53)를 사용하여 역병 저항성 표현형과 분자표지 마커형을 비교 분석하였다(Tables 1 and 4).

역병 저항성 검증

분자표지 개발 및 상품품종의 역병 저항성 정도를 확인하기 위해 사용된 역병균의 접종농도는 1×10^6 zoospores·mL⁻¹을 사용하였으며, 유주자의 생산 및 저항성 평가는 Lee(2002)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다.

BSA-AFLP 분석

DNeasy Plant Mini Kit(QIAgene, USA)를 이용하여 SF₂와 DCF₂ 집단의 각 개체들의 total genomic DNA를 추출하였으며, DNA 농도 결정을 위해 micro-spectrophotometer (BioPrinco, China)를 사용하여 100ng·μL⁻¹ 농도로 맞추었다. AFLP 방법은 Vos et al.(1995)의 방법을 약간 변형하여 수행하였으며, 저항성 및 이병성 개체의 pre-selective PCR 산물을 각각 다섯 개체씩 섞어 BSA(bulked segregant analysis; Michelmore et al., 1991)를 수행한 후, 저항성 및 이병성 bulks에 대해 총 1,024개(E_{ANN}/M_{CNN}, E_{TNN}/M_{CNN}, E_{ANN}/M_{GNN}, E_{TNN}/M_{GNN})의 selective 프라이머 조합을 사용하여 연관 분자표지를 탐색하였다.

AFLP 분자표지의 내부 및 외부 염기서열 분석

저항성과 이병성 DNA bulk에서 다형성을 보인 AFLP 단편을 crash-and-soak 방법(Sambrook et al., 1989)으로 정제하였다. 이를 해당 프라이머 조합으로 PCR을 다시 수행하여 증폭산물을 1.5% 아가로스 젤(Biosesang, Korea)에 전기영동하였다. 다형성 DNA 절편과 동일한 길이의 증폭산물을 함유한 아가로스 젤을 QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 다시 한번 정제하였다. 각 증폭산물의 염기서열 결정을 위해 TOPcloner PCR Kit(Enzymomics, Korea)를 이용하여 클로닝한 후, ABI Prism 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 그리고 AFLP 단편 바깥쪽 염기서열(flanking sequence)

을 분석하기 위해서는 GenomeWalker™ Kit(Clontech, USA)와 DNA Walking SpeedUp™ Kit(Seegene, Korea)를 사용하여 PCR walking을 수행하였다(Siebert et al., 1995).

CAPS 분자표지 제작 및 분석

AFLP 증폭산물과 바깥쪽 염기서열을 Codoncode aligner 2.0.6(Codoncode, USA)를 사용해 결합하여 저항성(‘CM334’, ‘PI 201234’) 및 이병성(‘Subicho’, ‘Matikas’) 계통간의 염기서열을 비교하였다. CAPS 분자표지 개발을 위한 제한효소의 결정은 Solanaceae Genomics Network(SGN)의 CAPS designer(http://www.sgn.cornell.edu/tools/caps_designer/caps_input.pl)를 이용하였으며 PCR을 위한 프라이머 결정은 Primer3 프로그램(<http://frodo.wi.mit.edu>)을 이용하였다. PCR 반응조건, 증폭산물의 제한효소 처리, 다형성 밴드의 구별은 Lee(2009)의 방법을 따랐다.

Phyto5.2-SCAR와 P5-SNAP 분자표지의 분석

Phyto5.2(OpD04.717)-SCAR 분자표지는 OpD04.717-F(5'-CCATAAGGGTGTGTAATTTACAAAG-3')와 OpD04.717-R(5'-TCGAGAGATAATTCAGATAGTATAATC-3')을 프라이머 쌍으로 사용하였고, 분석 방법은 Quirin et al.(2005)이 보고한 것과 같이 수행하였다. P5-SNAP 분자표지는 다음과 같이 세 가지 다른 프라이머[P5-SNAP-CM-F (저항성 연관 특이 프라이머, 5'-TCATGAGGTTGCTATTAAGATTGGTCTCTGTTATA TA-3'), P5-SNAP-Chil-F(이병성 연관 특이 프라이머, 5'-GAGGTTGCTATTAAGATTGGTCTCTGTTATCCG-3') 및 P5-SNAP-R(5'-CATAGAAAGGGATATCATCTGGTAC ATGCAGAAA-3')]를 사용하였고, 분석 방법은 Kim et al.(2008)이 보고한 것과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰

역병 저항성과 연관된 AFLP 분자표지의 탐색

총 1,024개의 AFLP 프라이머 조합에 대해 SF₂와 DCF₂ 분리집단에서 유래한 5개체씩을 섞어 만든 저항성 및 이병성 bulks를 사용하여 분석하였다. 그 결과, SF₂와 DCF₂ 집단에서 각각 79개와 43개의 다형성 프라이머 조합을 선발하였다. 이들 중 세 개의 프라이머 조합(AFLP1, AFLP2 및 AFLP3)은 네 개의 DNA bulks(SF₂ resistant bulk, SF₂ susceptible bulk, DCF₂ resistant bulk, DCF₂ susceptible bulk) 중 두 개의 저항성 bulks에서만 증폭됨을 확인하였다(Fig. 1 and Table 2). 저항성 및 이병성 bulks에 사용된 두 집단의 각각의 개체들에 대해 상기의 프라이머 조합을 적용한 결과, SF₂ 집단에서

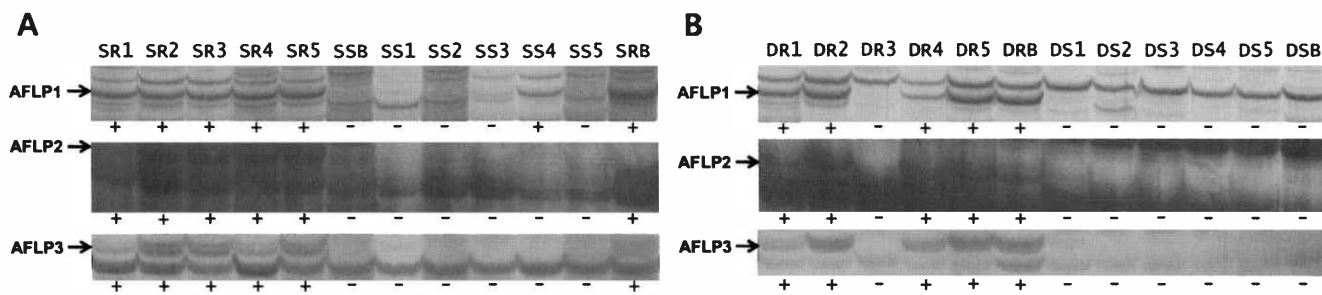


Fig. 1. Three AFLP markers (AFLP1, AFLP2, and AFLP3) associated with *Phytophthora* resistance in two segregating populations, SF₂(A) and DCF₂(B). SR1-SR5, resistant plants in the SF₂ population; SSB, susceptible bulk in the SF₂ population; SS1-SS5, susceptible plants in the SF₂ population; SRB, resistant bulk in the SF₂ population; DR1-DR5, resistant plants in the DCF₂ population, DRB, resistant bulk in the DCF₂ population; DS1-DS5, susceptible plants in the DCF₂ population, DSB, susceptible bulk in the DCF₂ population; +, amplified; -, not amplified; arrow, polymorphic band.

Table 2. Markertypes of three AFLP and three CAPS markers associated with *Phytophthora* resistance in individuals used for the resistant and susceptible bulks of SF₂ and DCF₂ populations.

Plant No.	Phenotype	AFLP markers			CAPS markers		
		AFLP1	AFLP2	AFLP3	M1-CAPS	M2-CAPS	M3-CAPS
SF ₂ population							
SR1 ^z	R	+ ^y	+	+	H ^x	R ^w	H
SR2	R	+	+	+	R	R	R
SR3	R	+	+	+	R	R	R
SR4	R	+	+	+	R	R	R
SR5	R	+	+	+	H	R	H
SSB	S	-	-	-	S	S	S
SS1	S	-	-	-	S	S	S
SS2	S	-	-	-	S	S	S
SS3	S	-	-	-	S	S	S
SS4	S	+	-	-	S	S	S
SS5	S	-	-	-	S	S	S
SRB	R	+	+	+	H	R	H
DCF ₂ population							
DR1	R	+	+	+	H	R	H
DR2	R	+	+	+	R	R	R
DR3	R	-	-	-	S	S	S
DR4	R	+	+	+	H	R	H
DR5	R	+	+	+	R	R	R
DRB	R	+	+	+	H	R	H
DS1	S	-	-	-	S	S	S
DS2	S	-	-	-	S	S	S
DS3	S	-	-	-	S	S	S
DS4	S	-	-	-	S	S	S
DS5	S	-	-	-	S	S	S
DSB	S	-	-	-	S	S	S

^zSR1-SR5, resistant plants in the SF₂ population; SSB, susceptible bulk in the SF₂ population; SS1-SS5, susceptible plants in the SF₂ population; SRB, resistant bulk in the SF₂ population; DR1-DR5, resistant plants in the DCF₂ population, DRB, resistant bulk in the DCF₂ population; DS1-DS5, susceptible plants in the DCF₂ population, DSB, susceptible bulk in the DCF₂ population.
^y+, amplified, -, not amplified.
^xR, H, and S in M1-CAPS and M3-CAPS mean RR, Rr, and rr markertypes, respectively.

^wR and S in M2-CAPS mean resistant (RR or Rr) and susceptible (rr) markertypes, respectively, because M2-CAPS is a dominant marker.

AFLP2와 AFLP3 분자표지에 대해서는 저항성 및 이병성이 모두 일치하였지만, AFLP1 분자표지에 대해서는 이병성에서 재조합체(SS4)가 1개 나타났다(Fig. 1 and Table 2). 하지만 AFLP1 분자표지를 M1-CAPS 분자표지로 전환한 다음 다시 분석한 결과에서 재조합체로 생각되었던 SS4 개체가 이병성으로 나타나 AFLP1 분자표지에서 나타났던 밴드는 false positive였던 것으로 생각된다(Table 2). DCF₂ 집단에서는 세 개의 분자표지에 대해 DR3 개체를 제외하고 모두 일치하는 결과를 얻었다(Fig. 1 and Table 2). 재조합체로 생각되었던 DR3 개체는 결국 위조로 인해 고사한 것을 보면 표현형 조사에서 발생한 escape이 아닌가 생각한다.

탐색된 AFLP 분자표지의 CAPS 분자표지로의 전환

AFLP 분자표지는 대량의 샘플에 적용하기가 어려운 방법으로 보다 간편한 방법인 SCAR나 CAPS 분자표지로 전환할 필요가 있다. 이를 위해 다형성을 보인 증폭산물의 내부 염기서열 정보를 기반으로 PCR walking 방법을 통해 바깥쪽 염기서열 정보를 알아냈으며, 이 염기서열들을 연결하여 다형성을 보인 AFLP 분자표지들은 두 개의 공우성 분자표지(M1-CAPS and M3-CAPS)와 하나의 우성 분자표지(M2-CAPS)로 전환할 수 있었다(Fig. 2).

특히 공우성 분자표지인 M3-CAPS의 염기서열 길이는 저항성('CM334')과 이병성('Subicho') 계통에서 각각 759-bp와 767-bp였으며, 10-bp와 2-bp의 삽입/결실(insertion/deletion)이 관찰되었다. 또한, 이 두 계통 간에 총 12개의 SNPs가 관찰되었고, 그 중 6개는 제한효소의 절단으로 다형성을 예측할 수 있는 부위에 있었다(자료 미제시). 특히, AFLP 단편 끝의 EcoRI 위치에 SNP가 존재하였는데, 저항성 계통('CM334')에서는 GAATTC였지만 이병성 계통('Subicho')에서는 GGATTC로 바뀌어 있었다. 본 연구에서는 이 SNP를 이용하여 PCR로 증폭한 후 EcoRI로 절단하면, 저항성 계통은 614-bp와 155-bp의 두 개 밴드가 나타나고, 이병성 계통은 절단되지 않아 767-bp의 밴드만 나타나도록 CAPS 분자표지를 제작

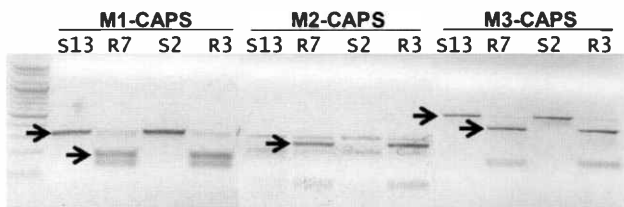


Fig. 2. Three CAPS markers (M1-CAPS, M2-CAPS, and M3-CAPS) derived from three AFLP markers (AFLP1, AFLP2, and AFLP3) associated with the resistance to *Phytophthora* root rot. Arrows indicate polymorphic DNA bands. S13, 'Matikas' (susceptible); R7, 'PI 201234' (resistant); S2, 'Subicho' (susceptible); R3, 'CM334' (resistant).

하였다(Fig. 2).

변환된 분자표지의 DNA bulk에 사용된 각 개체들에 대한 양상과 AFLP 분자표지의 증폭 양상을 비교한 결과, DR3에 대한 CAPS 분자표지의 유전자형이 이병성(S)으로 나타난 것을 제외하고 역병 저항성 표현형과 분자표지의 유전자형이 모두 일치하는 결과를 얻었다(Table 2). 앞에서 언급하였듯이 DR3 개체는 표현형 조사에서 나타난 escape으로 실제로는 이병성인데 저항성으로 잘못 판별한 것으로 생각된다.

역병균을 10⁶ 농도로 접종하였을 때의 disease index가 3 이하는 저항성으로 4 이상은 이병성으로 판별하고, 표현형과 분자표지의 마커형을 비교하였다(Table 3). SF₂ 분리집단(93개체)에서 역병 저항성 표현형과 가장 잘 맞는 분자표지는 M3-CAPS였는데, 세 개체(F₂ plants 58, 59, 90)를 제외하고 모두 일치하는 결과를 얻었다(Table 3).

역병 저항성 연관 분자표지의 효용성 검정

M3-CAPS 분자표지의 범용성을 검정하기 위해 5개의 역병 저항성 계통(R1, R2, R4, R5, R6), 13개의 이병성 계통(S1-S13), 'CM334'를 화분친으로 사용한 5개의 F₁ 조합들(SF₁, PF₁, PIF₁, CF₁, DF₁)에 대하여 M3-CAPS 분자표지를 적용한 결과, 역병 저항성 표현형과 분자표지의 마커형이 완전히 일치하였다(Fig. 3). 이는 위에서 분석된 5개의 저항성 계통 중 어느 것을 저항성 소재로 사용하여도 M3-CAPS 분자표지를 적용할 수 있다는 것을 의미한다.

또한 53개의 상용품종(CF1-CF53)에 대해 M3-CAPS 분자표지 마커형과 10⁶ 농도의 역병균을 접종한 결과를 비교해 본 결과, M3-CAPS 분자표지의 마커형이 H(Rr)로 나타난 19개 상용품종 중 12개(CF1, CF2, CF3, CF4, CF6, CF10, CF11, CF12, CF33, CF37, CF47, CF49)에서 실제 역병 저항성(R, 0-2.0)으로 나타났다(Table 4). 나머지 7개 중 6개(CF16, CF26, CF32, CF40, CF43, CF51)는 저항성 표현형이 중도 저항성(MR, 2.0-4.0)으로 나타났고, 1개 품종(CF42)만이 이병성(S, 4.0-5.0)으로 나타났다(Table 4). 상용품종에서 M3-CAPS 분자표지가 H(Rr) 마커형을 가지고 있음에도 불구하고 중도 저항성(MR)과 이병성(S)이 나타나는 이유는 높은 접종 농도(10⁶ zoospores·mL⁻¹)에서 강한 저항성을 유지하기 위해서는 역병 주동 저항성 유전자 외에 주동 저항성 유전자를 받쳐주는 미동 저항성 유전자들이 함께 있어야 하는데, 저항성 계통 육성 시 이러한 미동 유전자들이 소실되거나 분리되어 상용품종의 역병 저항성이 낮아졌다고 생각된다(Bonnet et al., 2007; Lee, 2009; Lefebvre and Palloix, 1996; Minamiyama et al., 2007; Ogundiwin et al.,

Table 3. Comparison between phenotypes of resistance to *Phytophthora* root rot and markertypes of M3-CAPS in F₂ population of 'Subicho' × 'CM334'.

No. ^z	D.I. ^y	M3 ^x	No.	D.I.	M3	No.	D.I.	M3
1	2	H	33	3	H	65	1	R
2	2	R	34	2	H	66	2	H
3	2	H	35	2	H	67	2	H
4	1	H	36	2	H	68	3	H
5	5	S	37	2	H	69	2	H
6	2	H	38	5	S	70	2	H
7	1	R	39	3	H	71	3	H
8	5	S	40	5	S	72	2	H
9	2	H	41	2	R	73	2	H
10	1	H	42	3	H	74	5	S
11	1	H	43	5	S	75	5	S
12	5	S	44	3	H	76	5	S
13	3	H	45	2	R	77	2	H
14	1	H	46	1	R	78	3	H
15	2	R	47	5	S	79	5	S
16	5	S	48	2	R	80	2	H
17	2	R	49	5	S	81	5	S
18	5	S	50	1	R	82	2	R
19	5	S	51	2	R	83	2	H
20	3	H	52	2	R	84	3	H
21	1	R	53	5	S	85	3	H
22	5	S	54	1	H	86	2	R
23	2	R	55	5	S	87	2	H
24	5	S	56	2	H	88	1	R
25	5	S	57	2	R	89	5	S
26	1	R	58	5	R	90	5	H
27	2	H	59	5	H	91	2	H
28	4	S	60	5	S	92	2	H
29	1	H	61	5	S	93	5	S
30	3	H	62	5	S	R3	1.76	R
31	3	H	63	2	R	SF ₁	1.8	H
32	1	R	64	1	R	S2	5	S

^zNo., an individual number of F₂ plant in SF₂ population; R3, 'CM334'; SF₁, F₁ of 'Subicho' × 'CM334'; S2, 'Subicho'.

^yD.I.: disease index in 10⁶ inoculum density (zoospores·mL⁻¹).

^xM3, M3-CAPS marker; R, H, and S mean RR, Rr, and rr markertypes, respectively.

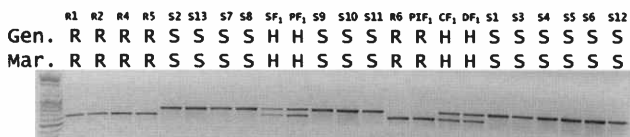


Fig. 3. Analysis of M3-CAPS marker for 5 resistant and 13 susceptible accessions to *Phytophthora* root rot and for five hybrids crossed between 'CM334' and five susceptible accessions. Abbreviations of accessions and hybrids were described in Table 1. Cut (614-bp) and uncut (767-bp) bands were linked to resistant (R) and susceptible (S) genes, respectively. Gen. and Mar. mean genotype and markertype, respectively.

2005; Sugita et al., 2006; Thabuis et al., 2003). 게다가, 역병에 대한 높은 저항성을 보인 품종들의 역병 저항성의 표준편차는 0에 가까운 반면, 비교적 낮은 저항성을 지닌 품종들에서는 0.7에서 1.4까지 분포하여 미동 저항성이 분리하고 있을 것이라는 가정을 뒷받침한다고 볼 수 있다(Table 4). 상용품종 중에는 M3-CAPS 분자표지가 S(rr) 마커형을 보임에도 불구하고 중도 저항성(3.5-3.7)을 보이는 것들(CF25, CF50)이 있는데, 이는 역병 저항성 주동 유전자는 없으나 미동 저항성 유전자에 의해 나타나는 것으로 추측할 수

Table 4. Comparison between phenotypes of resistance to *Phytophthora* root rot and markertypes of M3-CAPS in 52 F₁ pepper cultivars released in 2008.

Code	Name of cultivar	Company	M3-CAPS ^z	Mean disease index ^y	Phenotype ^x
CF1	Dokyacheongcheong	Syngenta	H	1.0 ± 0.0	R
CF2	Kiripbaksu	Syngenta	H	1.0 ± 0.0	R
CF3	Muhanjilju	Syngenta	H	1.0 ± 0.0	R
CF4	Mansahyungtong	Syngenta	H	1.0 ± 0.0	R
CF5	Super-bigarim	Syngenta	S	5.0 ± 0.0	S
CF6	PR-Manita	Nongwoo	H	1.0 ± 0.0	R
CF7	Daechon	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF8	Super-Manita	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF9	Manita	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF10	Taesan	Nongwoo	H	1.0 ± 0.0	R
CF11	PR-daechon	Nongwoo	H	1.0 ± 0.0	R
CF12	Kangryukjosaenggun	Nongwoo	H	1.0 ± 0.0	R
CF13	Hongchowang	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF14	Kanggun	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF15	Dangchan	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF16	Boeungun	Nongwoo	H	2.8 ± 1.2	MR
CF17	Kangryuktaeyang	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF18	Chammani	Nongwoo	S	5.0 ± 0.0	S
CF19	Hongbosuk	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF20	Myungjak	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF21	Cheonhajeil	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF22	Buchon	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF23	Cheonhatongil	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF24	Wangdaebak	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF25	Janggochu	Monsanto	S	3.5 ± 1.6	MR
CF26	Hongiljeom	Monsanto	H	2.5 ± 1.2	MR
CF27	Igudongsung	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF28	Cheonggwang	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF29	Bugang	Monsanto	S	5.0 ± 0.0	S
CF30	Himchan	Nonghyup	S	5.0 ± 0.0	S
CF31	Hanminjok	Nonghyup	S	5.0 ± 0.0	S
CF32	PR mujeok	Nonghyup	H	3.6 ± 0.8	MR
CF33	Balitta	Dongbu Hitec	H	1.7 ± 1.1	R
CF34	Daechong	Dongbu Hitec	S	5.0 ± 0.0	S
CF35	Buhong	Dongbu Hitec	S	5.0 ± 0.0	S
CF36	Cheonhajanggun	Dongbu Hitec	S	5.0 ± 0.0	S
CF37	Dokbulwang	Sakata	H	1.8 ± 0.8	R
CF38	Joara	Sakata	S	5.0 ± 0.0	S
CF39	Jodae	Sakata	S	5.0 ± 0.0	S
CF40	Yeokkanghongjanggun	Koregon	H	2.5 ± 0.7	MR
CF41	Onggolchan	Koregon	S	5.0 ± 0.0	S
CF42	Hot	Koregon	H	4.5 ± 1.1	S
CF43	PR-manjangilchi	Koregon	H	3.0 ± 1.4	MR
CF44	Wanggun	Koregon	S	5.0 ± 0.0	S
CF45	Daedeulbo	Takii	S	5.0 ± 0.0	S
CF46	Taecheon	Daenong	S	5.0 ± 0.0	S
CF47	PR bulsajo	Daenong	H	1.5 ± 0.8	R
CF48	Albuja	Daenong	S	5.0 ± 0.0	S
CF49	Umcheongna	Asia seed	H	1.5 ± 0.6	R
CF50	Dokjuyeokkang	Asia seed	S	3.7 ± 1.0	MR
CF51	Yeokkangsumunjang	Asia seed	H	3.3 ± 1.4	MR
CF52	Ddaddabul	Asia seed	S	5.0 ± 0.0	S
CF53	Dolpung	Asia seed	S	5.0 ± 0.0	S

^zR, H, and S indicate RR, Rr, and rr markertypes, respectively.

^yInoculum density was 10⁶ zoospores·mL⁻¹.

^xR, resistant (disease index ≤ 2.0); S, susceptible (disease index ≥ 4.0); MR, medium resistant (2.0 < disease index < 4.0).

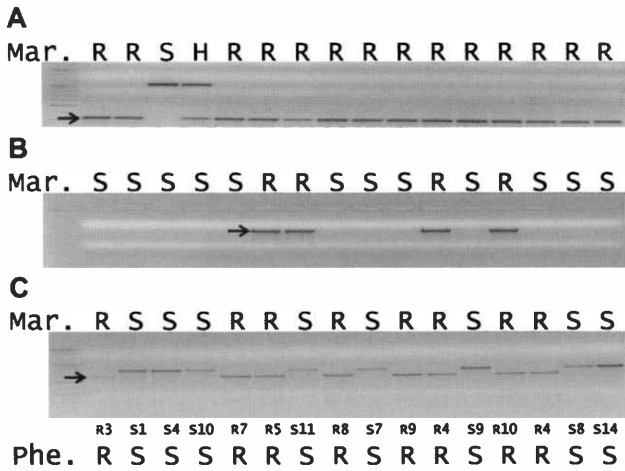


Fig. 4. Analysis of P5-SNAP (A), Phyto5.2-SCAR (B, OpD04-717-SCAR), and M3-CAPS (C) markers linked to resistance to *Phytophthora* root rot for 8 resistant and 8 susceptible accessions. Abbreviations of accessions were described in Table 1. Phe. and Mar. mean phenotype and markertype, respectively.

있다(Table 4).

기존에 보고된 역병 저항성과 연관된 분자표지인 P5-SNAP (Kim et al., 2008)과 Phyto5.2-SCAR(Quirin et al., 2005)를 M3-CAPS 분자표지와 실용성 정도를 비교해 본 결과, P5-SNAP (Fig. 4A)과 Phyto5.2-SCAR(Fig. 4B) 분자표지는 아주 제한된 조건에서만 사용할 수 있었고, M3-CAPS(Fig. 4C) 분자표지는 분석된 모든 소재에 대해 적용 가능하였다(Fig. 4). 이는 M3-CAPS 분자표지가 다른 두 분자표지에 비해 역병 저항성 주동 유전자와 가까이 연관되어 있어 아직 다양한 유전자원에 역병 저항성 주동 유전자와 M3-CAPS 분자표지의 연관 관계가 잘 보존되고 있다는 것을 의미한다.

본 연구에서 M3-CAPS 분자표지가 역병 저항성 주동 유전자와 가까이 연관되어 있고 다양한 저항성 유전자원에 모두 적용 가능하다는 것을 알았다(Figs. 3, 4, Tables 3, and 4). 따라서 M3-CAPS 분자표지는 실제 역병 저항성 품종 육성에 아주 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 상용품종에 적용한 결과(Table 4)에서 보았듯이 고추 역병 저항성은 하나의 주동 유전자만 있는 것이 아니라 다양한 미동 유전자도 관여하고 있기 때문에 이들에 대한 유전 분석 및 연관 분자표지 개발도 앞으로 필요할 것으로 생각한다. 또한 고추 포장에서 연작으로 인한 역병균의 농도 증가 및 역병 저항성 품종의 정식으로 인한 기존 저항성 품종을 넘는 역병균의 출현 등을 대비하기 위해서 고병원성 균주의 수집 및 새로운 저항성 유전자원의 탐색 등도 필요하다고 생각한다.

고추 역병은 그 동안 우리나라 고추 생산에 있어서 심각한 수량감소의 피해를 주어 왔으며, 2004년 처음으로 고추 역병 저항성 품종이 보급되기 시작하면서, 국내 건고추 육종에 있어서 역병 저항성의 도입은 필수불가결한 것으로 되었다. 그러므로 저항성 식물체 선발의 정확성 제고 및 육종의 효율 향상을 위하여 역병 저항성과 연관된 분자표지의 개발이 요구된다. 지금까지 고추 역병 저항성 주동 유전자에 연관된 분자표지가 일부 개발되어 있지만, 부분적으로밖에 사용할 수 없다는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 역병 저항성 소재에 상관없이 저항성을 구별해 낼 수 있는 분자표지를 개발하고자 하였다. 이를 위해 ‘수비초’ × ‘CM334’ 조합의 F₂ 분리집단(SF₂)과 역병 저항성 시판 F₁ 품종(‘독야청청’)을 자가수정한 F₂ 분리집단(DCF₂)을 만들었다. BSA-AFLP 방법으로 총 1,024 프라이머 조합을 사용하여 역병 저항성과 연관된 세 개의 AFLP 분자표지(AFLP1, AFLP2 및 AFLP3)를 선발하였으며, 이를 CAPS 분자표지(M1-CAPS, M2-CAPS 및 M3-CAPS)로 전환하였다. 이 중 M3-CAPS 분자표지를 10개의 역병 저항성 계통, 14개의 이병성 계통, ‘CM334’를 화분친으로 사용한 5개의 F₁ 조합, 그리고 53개의 시판 F₁ 품종에 적용해 본 결과, 역병 저항성 표현형과 M3-CAPS 분자표지의 마커형이 잘 일치하였고, P5-SNAP과 Phyto5.2-SCAR 분자표지보다 높은 실용성을 보이는 결과를 얻었다. 따라서, M3-CAPS 분자표지는 역병 저항성 고추 계통 육성에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

추가 주요어 : AFLP, CAPS, M3-CAPS, P5-SNAP, Phyto5.2

인용문헌

Bonnet, J., S. Danan, C. Boudet, L. Barchi, A.M. Sage-Paloux, B. Caromel, A. Paloux, and V. Lefebvre. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theor. Appl. Genet.* 115:253-264.

Hospital, F. 2009. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* 136:303-310.

Kim, H.J., H.B. Yang, B.N. Chung, and B.C. Kang. 2008a. Survey and application of DNA makers linked to TSWV resistance. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:464-470.

Kim, H.J., S.H. Nahm, H.R. Lee, G.B. Lee, K.T. Yoon, B.C. Kang, D. Choi, O.Y. Kweon, M.C. Cho, J.K. Kwon, J.H. Han, J.H. Kim, M. Park, J.H. Ahn, S.H. Choi, N.H. Her, J.H. Sung, and B.D. Kim. 2008b. BAC-derived markers converted from RFLP linked to *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118:15-27.

- Kim, J.S., W.I. Kim, H.J. Jee, J.G. Gwang, C.K. Kim, and C.K. Shim. 2010a. Evaluation of resistance in hot pepper germplasm to *Phytophthora* blight on biological assay. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:802-809.
- Kim, S., K.T. Kim, D.H. Kim, E.Y. Yang, M.C. Cho, A. Jamal, Y. Chae, D.H. Pae, D.G. Oh, and J.K. Hwang. 2010b. Identification of quantitative trait loci associated with anthracnose resistance in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:1014-1024.
- Lecomte, L., P. Duffé, M. Buret, B. Servin, F. Hospital, and M. Causse. 2004. Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theor. Appl. Genet.* 109:658-668.
- Lee, M.Y. 2002. Screening system for resistance to *Phytophthora* blight in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and inheritance of the resistance. Dissertation (MS), Seoul Natl. Univ., Korea.
- Lee, W.P. 2009. Genetic analysis and marker-assisted breeding for *Phytophthora* root rot resistance in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Dissertation (Ph.D.), Seoul Natl. Univ., Korea.
- Lefebvre, V. and A. Palloix. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theor. Appl. Genet.* 93:503-511.
- Michelmore, R.W., I. Paran, and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9828-9832.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, T. Kubo, and M. Hirai. 2007. QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breed. Sci.* 57:129-134.
- Ogundiwin, E.A., M. Berke, T.F. Massoudi, L.L. Black, G. Huestis, D. Choi, S. Lee, and J.P. Prince. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 48:698-711.
- Quirin, E.A., E.A. Ogundiwin, J.P. Prince, M. Mazourek, M.O. Briggs, T.S. Chlanda, K.T. Kim, M. Falise, B.C. Kang, and M.M. Jahn. 2005. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of *Phyto.5.2*, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 110:605-612.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NY p. 11.23-11.28.
- Siebert, P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov, and S.A. Lukyanov. 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 23:1087-1088.
- Sugita, T., K. Yamaguchi, T. Kinoshita, K. Yuji, Y. Sugimura, R. Nagata, S. Kawasaki, and A. Todoroki. 2006. QTL analysis for resistance to *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leon.) using an intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. *Breed. Sci.* 56:137-145.
- Thabuis, A., A. Palloix, S. Pflieger, A.M. Daubèze, C. Caranta, and V. Lefebvre. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: Evidence for conserved resistance loci across *Solanaceae* and for a large genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 106:1473-1485.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.