Journal of RADIATION INDUSTRY
Vol. 19, No. 1, pp. 1-11, 2025
https://doi.org/10.23042/radin.2025.19.1.1

Original article

TILLING을 이용한 고추 개화 조절 유전자 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 및 *FT*-like 유전자들의 변이 탐색

김주영[1] · 김동건[1] · 김상훈[1] · 조영득[2,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소 방사선바이오연구부 방사선육종연구실, [2]충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

Identification of Mutation on *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and *FT*-like Genes using TILLING in Chili plant (*Capsicum annuum*)

Juyoung Kim[1], Dong-Gun Kim[1], Sang Hoon Kim[1], and Yeong Deuk Jo[2,*]

[1]Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, 29 Geumgu-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212, Republic of Korea
[2]Department of Horticultural Science, Chungnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Republic of Korea

ABSTRACT Chili peppers are one of the essential crops world-widely. Mutant populations (M_2) using gamma-ray and carbon ion beam irradiation in pepper seeds (Yuwolcho) were established in 2016. In these populations, 2,880 mutant lines were screened using the Target Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) method. TILLING is a reverse genetics technique that allows the identification of mutants with target-gene mutations using relatively straightforward experiments including PCR, heteroduplex formation, digestion by an endonuclease, and electrophoresis. The target gene chosen for this study was the *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and its homologs (*FT*-like genes), which is associated with flowering regulation. Chili peppers have a total of six *FT* and *FT*-like genes, and mutations in four genes were screened through TILLING. Statistical analysis of the experimental results revealed that the probability of selecting a mutation per a gene was approximately 1.35×10^{-4}. This suggests that a mutant population of 7,419 individuals is required to isolate average one mutant of the desired gene. This result provides useful information to determine the population size in mutation breeding using irradiation.

Key words: TILLING, *FLOWERING LOCUS T*, Gamma-rays, Carbon ion beam, Chili Pepper

1. 서 론

고추는 전 세계적으로 식품과 의약품 생산용으로 재배되고 있는 중요한 작물 중 하나이다. 한국은 전세계 고추 생산량 중 약 2.1%를 생산하며, 주요 생산국 중 7위를 차지하고 있다[1]. 국내에서 고추는 조미 채소 중 마늘, 양파, 파에 이은 중요 품목 중 하나이다[2]. 통계청에 따르면, 2020년도 국내 고추 생산량은 약 60톤으로 대부분은 식품관련 사업장에서 소모되는 것으로 나타났으며, 김치, 찌개 등 다양한 음식의 식재료로 사용되는 채소로 알려져 있다[3]. 고추는 가지과에 속하며, *Capsicum annuum*종이 가장 보편적으로 재배되고 있다. *Capsicum annuum*에 속하는 유월초(Yuwolcho)는 한국 자생종으로서 1970년대 이후 수확량과 과실의 크기가 큰 타 교배종에 밀려 자취를 감췄으나, 영양고추연구소에서 최근 복원된 토종 품종으로 부드러운 매콤한 맛과 색이 고운 특성을 가져 다른 품종으로의 개량에 이용되고 있다[4]. 유월초는 몇 가지 병해충에 대해 감수성을 가지고 있어 재배하기 쉽지 않으나 맵기 및 색의 품질이 뛰어나고 수확시기가 비교적 빠르다는 특징을 가지고 있다[5]. 후자의 특징은 다수확 및 일시수확성을 목표로 하는 품종을 육성하는데 있어 장점이 될 수 있다.

고추 재배는 품종마다 다소 차이는 있으나 초여름에 파종하여 가을철 수확이 여러 번에 걸쳐 진행되며 기간은 약 4달에서 5달 소요된다. 고추는 노화 전까지 지속적으로 개화가 진행되어 여러 차례 과실 수확이 진행되므로 수확 횟수에 따른 노동력의 요구도가 증가된다[5]. 게다가, 수확 후 자연건조 과정을 거쳐 종자를 얻을 경우 추가적으로 4주 정도의 시간이 더 소요된다. 물론,

ISSN 1976-2402 **http://www.ksri.kr/**

Copyright© 2025 by Korean Society of Radiation Industry

***Corresponding author:** Yeong Deuk Jo
Tel: +82-42-821-5731, Fax: +82-42-605-3689, E-mail: ydjo@cnu.ac.kr

Received 26 September 2024 **Revised** 4 December 2024 **Accepted** 15 March 2025

육종을 목적으로 고추를 온실에서 재배하여 1년에 2번의 종자를 수확하는 것이 가능하지만 포장 재배 시 수확량을 조사하기엔 어려움이 따른다. 이러한 특성으로 인해 고추 재배에 소요되는 노동력과 시간을 경감하기 위한 방법으로 일시수확형 특성을 갖는 고추 품종 개발이 요구된다[6,7].

일시수확형 고추 품종 개발을 위해서 개화를 조절하는데 관여하는 유전자에 대한 고찰이 필요하다. 현재까지 알려진 바에 의하면, 개화 조절에 관여하는 대표적인 유전자군에는 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *MOTHER of FT* (*MFT*), *Terminal Flower1* (*TFL1*) 및 이들의 상동유전자들을 포함하는 Phosphatidyl ethanolamine-binding protein (PEBP) 유전자들이 있다[8-11]. 이중에서 *FT*는 개화를 촉진하는 florigen 호르몬이라고 알려져 있으며, 모델 식물인 애기장대에서 그 기능이 잘 알려져 있다[12]. *FT* 단백질은 잎 phloem companion cell에서 만들어져 지상부 정단층으로 이동하여 floral meristem의 형성에 관여하는 유전자들의 발현을 유도한다[13]. 이 유전자는 다른 작물인 토마토, 담배 등에도 비슷한 역할을 한다고 보고되었다[13,14]. 특히, 고추와 같은 가지과 작물인 토마토에서는 4개의 *FT*-like 유전자인, *SP3D/SFT*, *SP5G*, *S5G2*, *SP5G3*의 기능이 알려져 있다[14,15]. Borovsky et al. (2020)에 따르면, 토마토 유전자와 BLAST 검색을 통해 고추의 FT-like 유전자로 추정되는 총 6개의 후보 유전자를 선별하였다[16]. 이 후보 유전자들 중 *CaFT*-like (*capana12g002499*)이 과다발현되는 토마토 형질전환체의 줄기에 늦은 개화형 토마토 *uf sft* 돌연변이의 새순을 접목(grafting)했을 때 이른 개화가 유도되었기에, 이 유전자를 고추의 *FT* 유전자로 지목한 바 있다[16].

전 세계적으로 돌연변이 육종법은 다양한 작물에서 폭 넓게 활용되고 있다[Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA), 17]. 돌연변이를 유도하는 방법은 화학제 처리(Ethyl metanesulfonate, N-Methyl Urea 등), 생명공학기법(T-DNA insertional mutagenesis, 형질전환 등), 그리고 방사선(감마선, X선 등)이 있다. 이중에서 방사선 돌연변이는 방사선에 의한 DNA 절단 후 수선 과정에서 발생되는 염기의 제거 및 삽입, Chromosomal aberration 및 DNA 재배열(Rearrangement) 등에 의해 만들어진다[4,18]. 방사선원의 종류는 현재까지 알려진 바에 의하면 감마선(Gamma ray), X선(X-ray), 탄소이온빔(Carbon ion beam), 중이온 빔(Heavy ion beam), 양성자 빔(Proton beam), 고속중성자(Fast neutron) 등이 있다[19]. 각 방사선원 종류에 따라 어느 정도의 선량이 각 작물들의 돌연변이에 필요한지 여러 연구들에 보고되고 있다[17,20,21]. IAEA 돌연변이 품종 데이터베이스에 등록된 정보에 의하면 방사선 처리에 의해 개발된 돌연변이 품종의 비율이 약 70%에 달한다고 보고되고 있지만, 고추를 대상으로 한 방사선 돌연변이 등록 품종은 0.47% (16개 품종)에 불과한 실정이다 (FAO/IAEA Mutant Variety Database). 하지만, 1940년대 고추를 대상으로 방사선 돌연변이 연구가 시작된 이래 꾸준히 새로운 품종 개발이 진행되고 있다[17,22,23].

Target Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)은 돌연변이 집단에서 타겟 유전자 돌연변이체를 선별하기 위한 분자생물학기반의 Reverse genetic 접근법의 하나로 고안되었다[24,25]. 최근 이 기술을 모세관 전기영동(Capillary electrophoresis) 방법과 결합하여 고추 과실 색 돌연변이를 선발한 연구결과가 보고된 바 있다[25]. 이 방법은 돌연변이 집단의 각 개체에서 추출한 gDNA를 일정한 비율로 pooling한 후 이를 주형으로 타겟 유전자에 대한 PCR을 수행한다. 이 후 혼성화(Hybridization)를 통해 Heteroduplex의 형성을 유도하고 상호 결합되지 않은 염기 쌍을 인지하여 절단하는 핵산내부가수분해효소(Endonuclease)를 처리한다. 여기에서, 특정 DNA pool에 타겟 유전자의 돌연변이체가 포함되어 있을 경우 PCR증폭산물의 절단이 이루어져 전기영동을 통해 확인할 수 있다. 이후 추가실험을 통해 해당 pool에서 돌연변이 개체를 최종 선발하게 된다[26-28]. 한편, 돌연변이 집단이 클 경우 민감도가 높은 모세관 전기영동을 이용하면 높은 pooling depth를 지닌 DNA pool을 재료로 분석함으로써 효율을 높일 수 있다[25]. 즉, 모세관 전기영동 기반 TILLING을 이용하면 짧은 기간 내에 타겟 유전자 돌연변이체를 선별할 수 있다. 하지만, 고추에서 TILLING 기법으로 타겟 유전자 돌연변이체를 선별할 때 돌연변이 집단 내 얼마나 많은 개체가 필요한지 명확치 않다.

본 연구에서는 감마선 및 탄소이온빔을 이용하여 육성된 유월초 품종의 돌연변이 집단에서 고추의 개화 조절 유전자 변이들을 탐색하여 개화 시기가 변형된 특징을 갖는 계통을 선별하고자 하였다. 이를 위해 타겟 유전자 돌연변이체 선별 방법인 TILLING을 이용하였다. 또한, 수행된 TILLING 결과를 바탕으로 통계학적분석을 수행하여 타겟 유전자 돌연변이체 1개를 확보하기 위해서는 얼마나 큰 돌연변이 집단을 구축해야 하는지 가늠하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물체와 genomic DNA (gDNA) 준비

TILLING에 사용된 고추(유월초) 돌연변이체 집단군은 Jo et al. (2016)과 Kang et al. (2018)에서 구축된 집단을 사용하였고, 개체수는 2,880개 였다[4,25]. 위 선행연구에서 추출된 gDNA를 96-well 플레이트에 각 개체 별 20 μL씩 한 플레이트 1개 well에 8계통 또는 6계통의 DNA를 분주하여 (1 well은 총 160 μL 또는 120 μL) 8x와 6x gDNA pool을 만들었다(Plate No. 1~4). 4x와 2x gDNA pool도 위와 동일한 방법으로 제작하였다. 분주된 gDNA pool을 TILLING을 이용한 타겟 유전자 돌연변이 선별 실험에 사용하였다. 이후 TILLING으로 선발된 타겟 유전자 돌연변이 개체의 종자(Fig. 3, 4)는 발아 4주 후 DNAeasy 96 Plant

Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 잎에서 gDNA를 추출하였다. 추출된 gDNA는 10 ng/μL의 농도로 희석하여 TILLING에 사용하였다.

2.2. 프라이머 디자인

기존에 알려진 애기장대와 토마토의 *FT* 유전자 염기서열을 이용하여 고추 유전체를 대상으로 Pepper Genome Platform (http://pepergenome.snu.ac.kr/)에서 BLAST를 수행하였다. 그 중에서 가장 염기서열 유사도가 높은 상위 6개의 유전자를 확인하였고, 이것을 *Capsicum annum FT1* (*CaFT1*)에서 *FT6* (*CaFT6*)으로 명명하였다[16]. 선별된 유전자의 엑손(Exon)과 인트론(Intron)이 구분된 gDNA 서열을 위에 서술한 platform에서 내려 받았다. 5'쪽 첫 번째 엑손을 포함하는 서열과 3'쪽 마지막 엑손을 포함하는 서열 부위를 각각 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하였다(S Table 1).

2.3. TILLING 분석

고추 gDNA를 주형으로 하는 *CaFT* 유전자들의 PCR 조건은 다음과 같다[98°C에서 30초 유지 후 35회 반복 사이클(98°C에서 10초, 58°C에서 30초 72°C에서 50초) 그리고 72°C에서 5분 유지]. 혼성화 방법은 Kang et al. (2018)에 묘사된 Condition 1 [95°C에서 10분 유지 후 85°C까지 초당 2°C씩 온도를 낮춤. 85°C에서 1분 유지 후 초당 0.3°C 속도로 10°C를 낮추는 방식으로 최종 25°C까지 수행]의 방법을 따랐다[25]. 혼성화가 끝난 PCR 산물의 4 μL를 핵산내부가수분해효소(Surveyor® Mutation Detection Kit, Integrated DNA Technologies, Inc., USA)와 반응시켜 상호 결합이 이뤄지지 않은 DNA를 분해하도록 하였다. 잘려진 DNA 절편의 확인은 모세관 전기영동 분석기(Agilent Advanced Analytical, USA)를 사용하였다. 이 분석에서 베이스 신호가 들떠 생기는 노이즈에 해당하는 well과 야생형과 동일하게 분석된 well은 후보에서 제외하였다. 잘려진 절편 길이의 합이 PCR 산물의 예상 크기와 맞아떨어지지 않는 경우에도 후보에서 제외하였다.

2.4. 통계학적분석

고추의 유전체 크기 및 전체 유전자 개수, 평균 유전자 암호화 서열 길이는 고추 표준유전체 분석 논문을 참고하였다[29]. Table 1에서 사용된 계산식은[30]의 연구를 참고하였고, 다음과 같다. [Tested length per whole genome in each individuals의 값 = PCR 산물 길이(bp)/고추 전체 유전체 길이(bp)], [bp당 돌연변이 선별 가능성(Probability of mutant selection per bp)의 값 = Putative mutants의 합/(탐색한 염기서열의 길이(bp) × 전체 개체수 (2,880))], [유전자당 돌연변이 선별 가능성(Probability of mutant selection per a gene)= bp당 돌연변이 선별 가능성 × 평균 암호화 서열 길이(bp)].

3. 결 과

3.1. 고추 개화 관련 유전자 *CaFT*의 TILLING 결과

기존 연구에서 구축된 고추(유월초) 돌연변이체 집단의

Table 1. Summary of results for *CaFT* genes examined in this study

Genes	PCR product length (bp)	Tested length per whole genome ($\times10^{-6}$ region) in each individuals	Number of mutant candidates screened by TILLING (ea)	Number of mutations confirmed by Sanger seq. (ea)	Probability of mutant selection per bp ($\times10^{-7}$)	Probability of mutant selection per a gene ($\times10^{-4}$)
CaFT1	389	7.87	2	1		
	650	4.71	3	1		
CaFT3	488	6.27	1	0		
	549	5.57	1	0		
CaFT4	1,011	3.03	0	0		
	422	7.25	0	0	1.33	1.35
CaFT6	723	4.23	0	0		
	971	3.15	0	0		
Total	5,203	42.08	7	2		
Average	1,156	5.26	0.9	0.3		
Std deviation	222	1.68	1.1	0.4		
Estimated pepper genome length (bp)*			3.06 Gb	Number of genes in pepper (ea) :		34,903
				Average length of coding sequence (bp) :		1,009.9

*Kim et al. (2014) described the genome length and number of genes in pepper. Gb, Giga base pairs; bp, base pair

gDNA를 이용하여 8x 또는 6x pool을 만들고 이를 주형 가닥으로 *CaFT1*, *3*, *4*, *6* 유전자 특이적 프라이머(Primer)를 이용하여 PCR을 진행하였다(S Table 1)[4,25]. *CaFT2*와 *CaFT5* 유전자는 애기장대에 이종 과다발현시켰을 때 개화 촉진자 또는 억제자로서의 기능을 명확히 결정할 수 없어 본 실험에서 제외하였다[31]. TILLING 방법에 따라[25], 이후 Heteroduplex 형성, Endonuclease 반응을 거쳐 모세관 전기영동 분석기를 통하여 그림들과 같은 결과를 얻었다. 각 유전자의 PCR 산물의 크기와 프라이머 위치는 그림들과 Table 1, S Table 1에서 확인 가능하다. TILLING의 결과로, *CaFT1-1* 유전자 돌연변이로 추정되는 8x DNA pool 2개와 *CaFT1-2* 유전자 돌연변이로 추정되는 3개의 8x DNA pool을 발견하였다(Fig. 1B and 1C). *CaFT3* 유전자도 *CaFT1*과 마찬가지로, gDNA의 두 부위(*CaFT3-1*, *CaFT3-2*)에 대해 TILLING을 수행하였다(S Fig. 1A). *CaFT3-1* 및 *CaFT3-2*의 경우 각각 하나씩의 후보 DNA pool을 확보하였다(S Fig. 1B and 1C). 그러나 *CaFT4*와 *CaFT6* 유전자의 경우 타겟 유전자 돌연변이체의 DNA를 포함할 것으로 여겨지는 DNA pool을 발견할 수 없었다(S Fig. 2 and 3).

후보 돌연변이 pool에서 어떤 돌연변이 고추 개체가 변이가 되었는지 알아보기위해, 4x DNA 와 2x DNA pool을 재료 및 방법에서 언급한 것처럼 제작하고 후보 DNA pool에 대한 TILLING을 수행하였다. 그 결과 *CaFT1-1*의 경우 G9 well의 두번째 4x DNA pool에서 8x DNA pool에서 수행된 TILLING과 동일한 결과를 얻었다(Fig. 2A). 게다가, *CaFT1-2*의 경우 C1 well의 첫번째 4x DNA pool에서 역시 동일한 결과를 얻었다(Fig. 2A). *CaFT3*번에서 발견된 후보 돌연변이체 2개는 이후 4x pool DNA TILLING에서 8x pool DNA에서 수행된 TILLING 결과와 동일한 결과를 찾지 못하였고 모두 야생형 고추와 동일한 패턴의 TILLING 결과를 보여주어 이후 실험은 진행되지 않았다. 이 결과를 바탕으로 2x pool DNA와 M_2 개체 gDNA에서 추가적으로 TILLING을 수행하여 *CaFT1-1*과 *CaFT1-2*에서 각각 하나의 돌연변이 후보 개체를 특정할 수 있었다(Fig. 2B and C).

3.2. M2 세대에서 염기서열 및 아미노산 서열 분석

최종적으로 선별된 *CaFT1-1*과 *CaFT1-2* 돌연변이체 각각 1개체는 감마선 100 Gy 조사한 계통의 1,324번과 143번으로 확인되었다(Fig. 3). *CaFT1* 유전자의 어느 부위에 돌연변이가 생겼는지 알아보기위해, M_2 개체 gDNA를 이용한 TILLING 수행에서 얻어진 PCR 산물을 정제하여 염기서열 분석을 수행하였다(Fig. 3A). 염기서열 크로마토그램 결과에서, *CaFT1-1* 부위에서는 시작 코돈(ATG)으로 부터 170번째 서열 근처에 위치한 ACGAT서열중 172번째 염기인 G가 A와 함께 검출되는 것을 확인하였고, *CaFT1-2*의 경우 시작 코돈으로부터 3,216번째 서열 근처에 위치한 GAGATT 부위와 TAGGTT 부위에서 G 염기가 각각 G와 A 염기가 혼재되어 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 3A and B). 염기 서열의 변화에 따른 아미노산 서열의 변화를 예측한 결과 *CaFT1-1*의 경우 N (Asparagine)이 D (Aspartic acid)로, *CaFT1-2*의 경우 D가 I (Isoleucine)로, R (Arginine)이 K (Lysine)로 변환 될 수 있음을 확인하였다(Fig. 3C).

3.3. M2 세대에서 대표 표현형의 모습

다른 *CaFT1-1*과 *CaFT1-2* M_2 세대의 식물체에서도 앞선 TILLING 결과와 동일한 개체가 있는지 확인하기 위해서 1,324 (*CaFT1-1*)번과 143 (*CaFT1-2*)번 개체의 종자에서 발아된 식물체 각각 14개와 5개의 잎에서 gDNA 추출하여 TILLING을 수행하였다. 그 결과 143번의 자손 1개체에서 동일하게 유전체 추정 돌연변이를 발견하였고, 1,324번의 경우에는 돌연변이체를 찾을 수 없었다(Fig. 4A). 143번의 첫번째 개체의 개화 양상을 볼 때, 유월초 및 타 143번 자손과는 다르게 늦게 개화하는 모습을 볼 수 있었다(Fig. 4B). 그러나, 더 정확한 돌연변이 식물체 고정 및 후세대 검증을 위해서는 M_3 세대의 식물체에서 동일한 TILLING 결과와 생육의 모습이 M_2 세대와 동일하게 반복되는지 확인이 필요하다.

3.4. 통계학적 분석

Kim et al. (2014)에 따르면, 고추 표준유전체의 크기는 약 3.06 Giga base pairs (Gb)이고 유전자의 개수는 34,903개, 유전자를 암호화하고 있는 서열의 평균 길이는 1,009.9 base pair (bp)로 나타났다[29]. 전체 유전체 크기 대비 수행된 PCR 산물의 유전자 크기(Tested length per whole genome)가 어느 정도 깊이를 가졌는지 알아보기 위해 두 값을 나눠주었다. 본 연구에서 TILLING 수행된 *CaFT* 유전자 PCR 산물은 전체 유전체 크기 대비 평균적으로 5.26×10^{-6} 부분으로, 유전체의 특이적 성질을 제외하고 단순히 유전체 전체 크기를 526만개로 절단하였을 때 그 중 한 부분(1.1 kb)을 테스트 해본 결과로 해석된다(Table 1). 본 연구에서 수행된 4개 *CaFT* 유전자의 추정 돌연변이는 2개였으므로 이것에 테스트된 bp의 합(5,203 bp)과 전체 집단 개체수(2,880)를 곱한 값에 나눠주어 bp당 돌연변이 선별 확률을 확인하였을 때, 1.33×10^{-7}으로 나타났다(Table 1). 기존에 알려진 애기장대의 bp당 돌연변이 빈도는 방사선원과 선량에 따라 6.6×10^{-7}에서 3.6×10^{-7}으로 본 연구에서는 애기장대에 비해 낮게 나타났다[30]. 여기에 고추 유전체가 평균적으로 가지고 있는 유전자 암호화 서열(coding sequence, 1,009 bp)를 곱하여 1개 유전자당 돌연변이 선별 확률을 확인하였다. 그 결과 1.35×10^{-4}으로 나타났고, 즉 원하는 특정 유전자 돌연변이체 평균 1개를 확보하려면 7,419개의 집단 개체수가 필요하다는 것을 의미한다(Table 1).

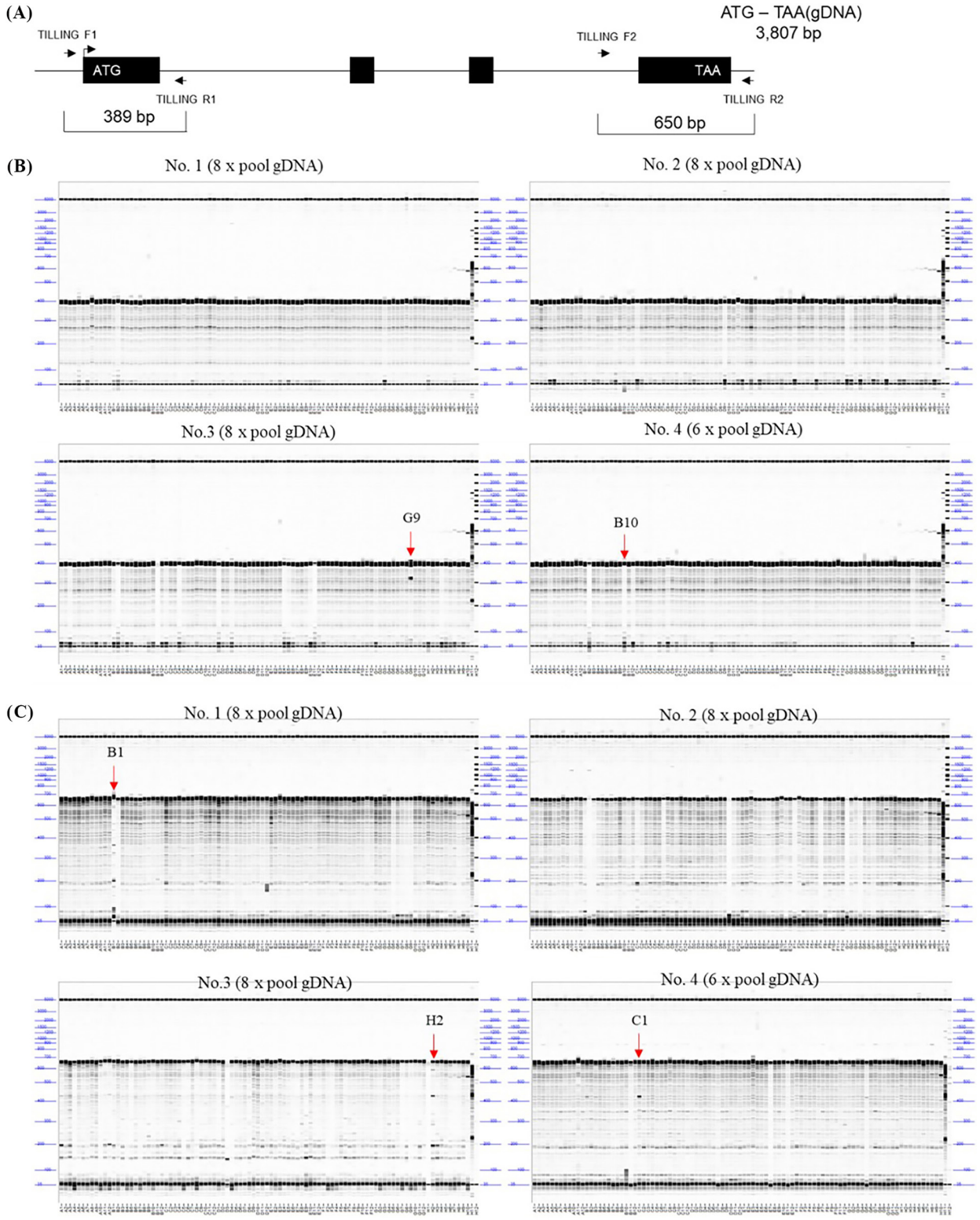

Fig. 1. The result of TILLING with *CaFT1* in 8x or 6x gDNA pool. (A) Scheme of *CaFT1* gDNA structure and primers used. The ATG and TAA indicate start and stop codons. The 5' region containing the first exon was referred to as *CaFT1-1*, and the 3' region containing a last exon was referred as *CaFT1-2*. (B) The result of TILLING with *CaFT1-1* region. (C) The result of TILLING with *CaFT1-2* region. Red arrows indicated the selected wells, which were used for TILLING in 4 x gDNA pool next. Blue letters indicate the size of ladder. H11 and H12 wells in each gDNA pool represented the G/C positive control and ladder running, respectively.

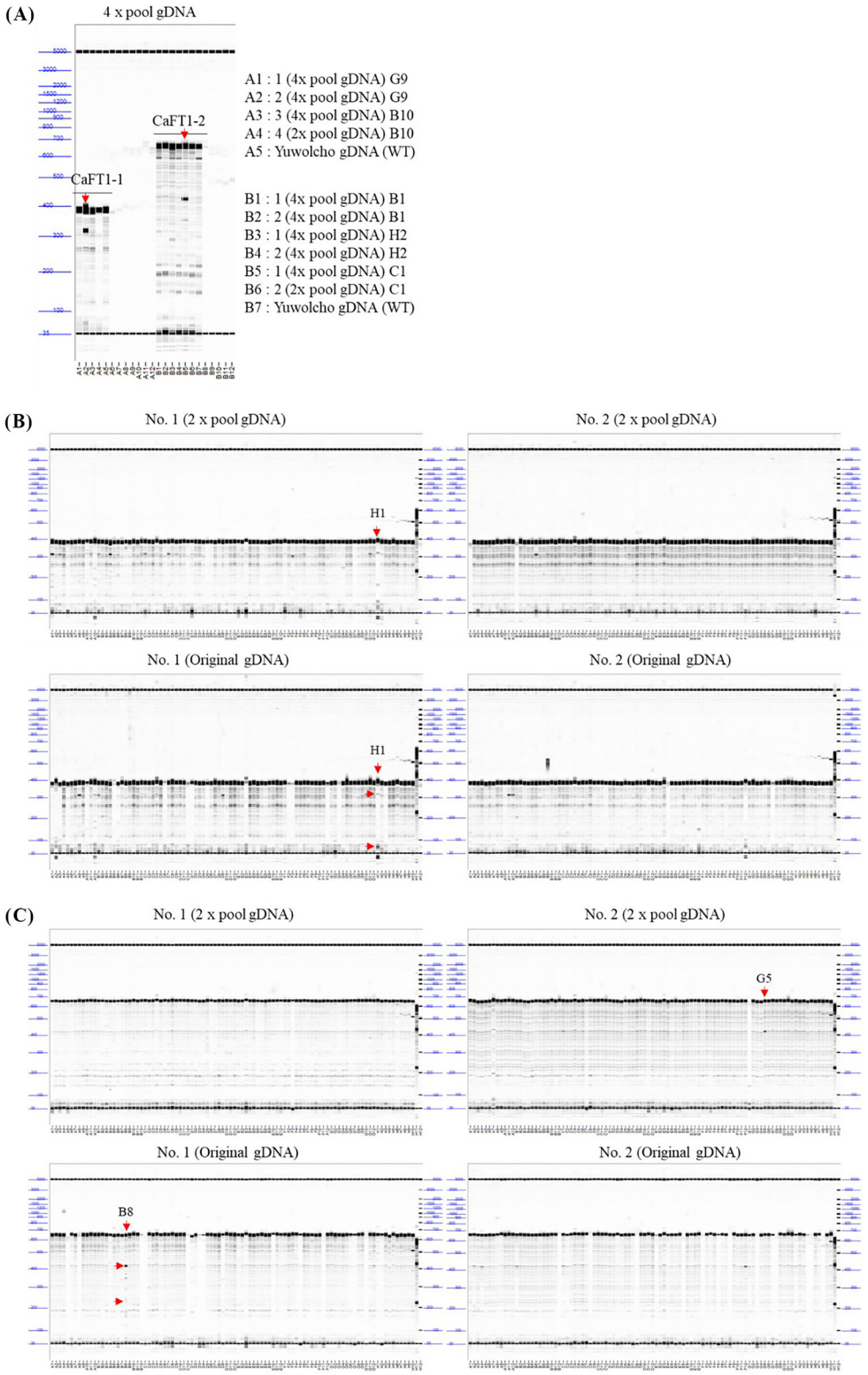

Fig. 2. The result of TILLING with *CaFT1* in 4x and 2x gDNA pool and original gDNA for selecting target mutants. (A) The result of TILLING with the selected wells from 8x pool TILLING for 4x pool gDNA TILLING. (B) Searching for target mutants of *CaFT1-1* in 2x pool and original gDNA. (C) Searching for target mutants of *CaFT1-2* in 2x pool and original gDNA. Red arrows indicate the selected wells or fragment size. Blue letters indicate the size of ladder. H11 and H12 wells in each gDNA pool represented the G/C positive control and ladder running, respectively.

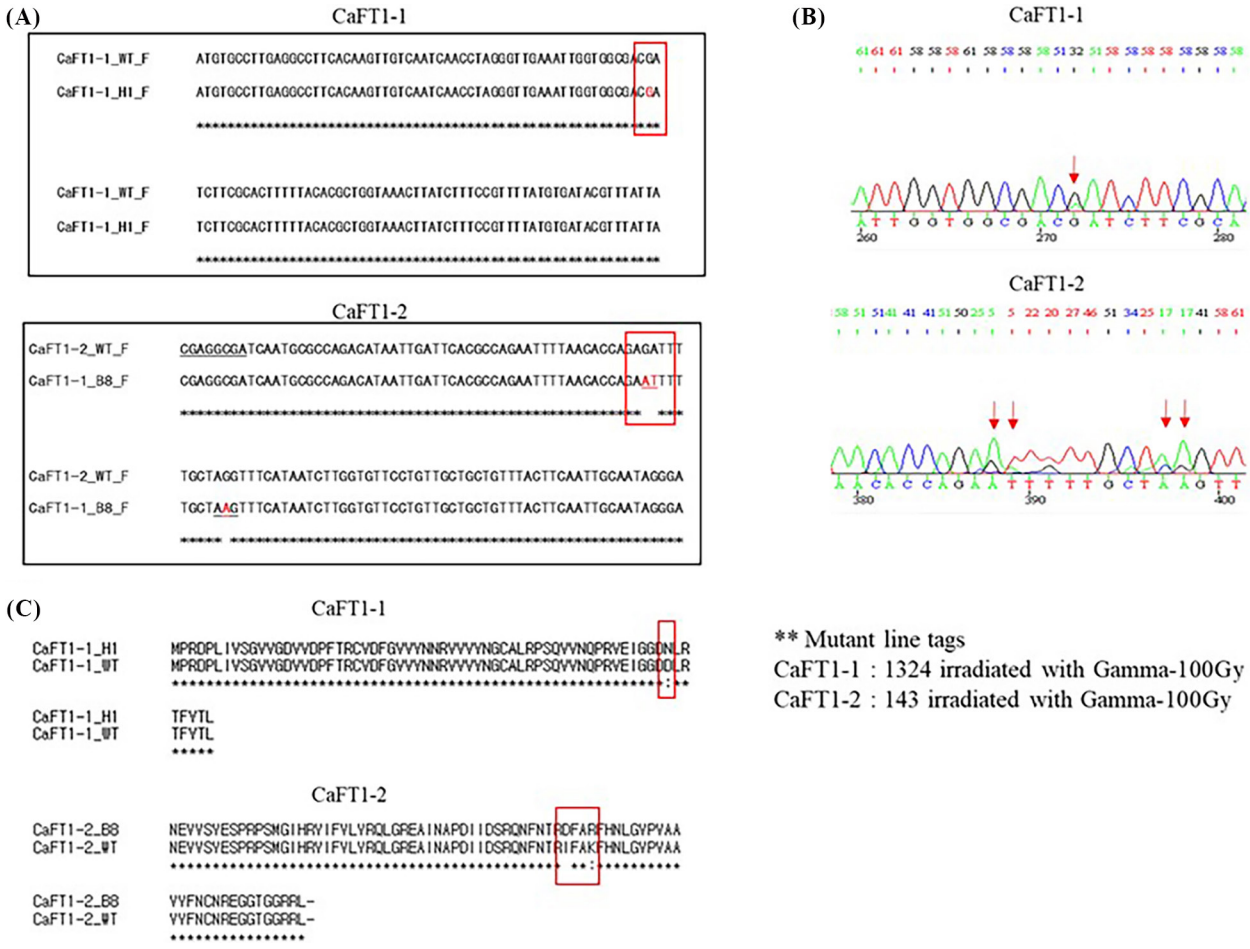

Fig. 3. Comparison of DNA and amino acid sequences in PCR products of 1324 (*CaFT1-1*) and 143 (*CaFT1-2*). (A) DNA sequence comparison between wild type and two mutants (*CaFT1-1*/*CaFT1-2*). Red boxes highlight the region of mutated nucleotide sequences. (B) Chromatograms of Sanger sequencing with PCR products. Red arrows indicate the mixed heterozygous nucleotides in mutant lines. (C) The result of amino acid conversion from wild type and mutant nucleotide sequences. Red boxes are the region of mutated amino acid sequences.

4. 고 찰

방사선을 이용한 육종 기술은 GMO (Genetically Modified Organism) 관련 규제로 인한 법적 제한성 없이 신규 유전자원을 개발할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 반면, 다른 기술들과 비교해서 돌연변이 집단 구축에 요구되는 기간이 길고 큰 규모의 집단을 구축하여야 한다는 단점이 있다. 본 논문에서는 방사선을 이용하여 고추(유월초)의 특정 유전자의 돌연변이체를 얻기 위해서 얼마나 큰 집단을 구축할 필요가 있는가와 비교적 빠른 시간 내에 타겟 유전자 돌연변이체 선별이 가능한 지 알아보기 위해 TILLING 분석을 수행하였다. 수행된 결과에 의하면, 온실에서 재배 시 방사선 처리 후 M_2 세대에서 TILLING을 이용하여 목표 된 돌연변이를 찾는 데 소요되는 시간은 12~15개월으로 추정된다(Fig. 5). 여기에, 타겟 유전자 돌연변이체 평균 1개를 확보하기 위해 필요한 집단의 개체 수는 7,419개 정도이다. 이 결과들은 방사선 돌연변이 육종에서 집단 구축의 규모를 선택하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

유월초 고추 종자에 감마선과 탄소이온빔 이용해 돌연변이 집단군을 만드는 실험에서 LD_{50} (Lethal dose 50% in plant death by radiation)과 RD_{50} (Reduction dose 50% in growth rate)의 방사선량을 특정하고 M_2 세대에서 다양한 표현형을 가진 돌연변이 집단군을 분류하였으나 표현형에 따른 유전자내 변이 확인은 진행되지 않았다[4,32]. 이외에 다른 작물 또는 식물을 이용해 대부분 LD와 RD를 구하고 그에 따른 표현형이 어떻게 변화하는가 조사를 해왔다[33-37]. 이러한 연구들은 목표 표현형에 따른 돌연변이를 얻을 효율을 계산할 수 있다. 예를 들면, 방사선 처리 고추 돌연변이 집단군의 크기에 연구자가 원하는 형질(크기, 색, 등)을 가진 돌연변이 개체수를 나눠주어 빈도수를 구하는 방식이다. 이러한 돌연변이율은 자신이 정한 목표 형질 또는 조사한 선량에 따라 달라지므로 그 확률의 범위가 다양할 수

Fig. 4. Comparison of phenotype between wild type (WT) and two mutant lines, 1324 (*CaFT1-1*) and 143 (*CaFT1-2*). (A) The result of TILLING with M_2 mutant lines. gDNA from wild type and mutants were mixed with in a 1 : 1 ratio (50 ng each). (B) Phenotype comparison between wild type and 143.

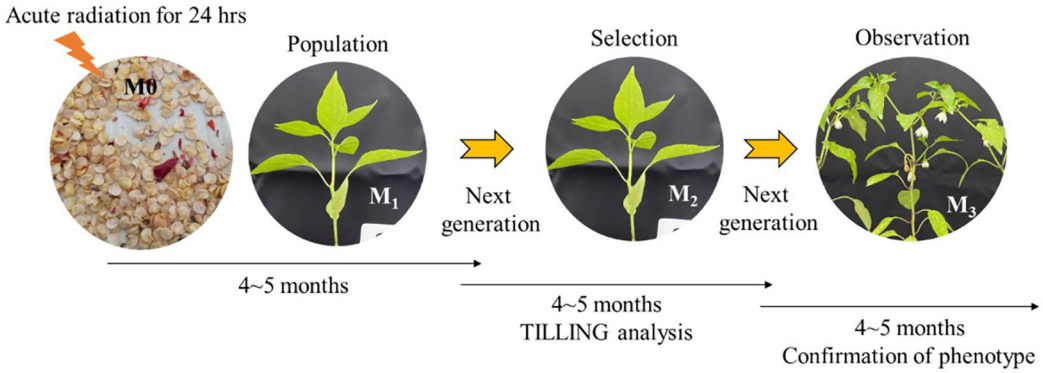

Fig. 5. Scheme of mutant-irradiated screening using TILLING. Mutant populations (M_1) were established after irradiation. The next generation (M_2) was used to screen for the desired target mutants using TILLING. The selected mutant lines were grown and observed at next generation (M_3). The total time theoretically ranges from 12 to 15 months. Since the gene causing the mutation is already known, fixation is faster than traditional breeding.

있다. 그러나 본 연구와 같이 타겟 유전자의 돌연변이율을 조사하는데 시간적 한계가 있다. 기존 연구에서 고추 과실 색과 관련된 *Capsanthin/capsorubin synthase* (*CCS*) 유전자의 TILLING을 이용한 돌연변이 선별을 시도했을 때 약 2,600여 개체를 가진 돌연변이 집단에서 하나의 변이 개체를 발견할 수 있었다[25]. 고추의 *FT* 및 *FT*-like 유전자를 대상으로 한 이번 연구에서도 결과적으로 *CaFT1* 유전자의 변이를 두 개를 확인하였고, 유전자당 평균1개의 돌연변이체를 선별하기 위한 돌연변이 집단군의 크기는 7,419개로 나타났다(Table 1). Henikoff et al. (2004)에 따르면 TILLING을 이용한 돌연변이체 탐색 시 집단의 적절한 크기를 만개 미만으로 예상하고 있어서 이번 연구와 비교하면 돌연변이율은 다소 낮지만 효율적인 집단 크기의 예상치는 비슷한 것으로 보인다[38]. 다만, 작물의 품종 별로 돌연변이효율이 다를 수 있으며[39], 타겟 유전자 수 및 타겟 유전자의 PCR 범위를 확장한 연구가 진행된다면 돌연변이율 및 집단의 크기를 좀 더 정확하게 계산할 수 있을 것으로 생각된다.

모세관 전기영동-TILLING 방법은 Reverse genetics의 한 방법으로 빠르고 손 쉽게 특정 유전자의 돌연변이를 찾아내는 장점을 가지고 있다[25,27,38]. 또한 열성 돌연변이 대립유전자에 대한 이형접합체도 판별이 가능하므로 표현형을 보고 선별하는 Forward genetics보다 빠르게 한 세대 내에서 선별이 가능하다. 특히, 감마선에 의해 유도되는 돌연변이는 염기서열의 치환(Substitution)이나 삽입-삭제(InDel, Insertion and deletion)가 주를 이루기 때문에 원리적인 측면에서 TILLING의 사용이 효과적이다[40]. 반대로, TILLING은 PCR에 의해서 유도되는 잘못된 DNA합성에 의해서 False-positive 결과를 얻을 수 있는 단점을 가지고 있어 결과를 해석하는데 신중해야한다. DNA polymerase는 교정 기능이 있기는 하나 10^{-7}에서 10^{-8}의 확률로 염기합성의 에러가 나타난다고 알려져 있어 False-positive한 결과를 얻을 수 있다[41]. 본 연구에서도 모세관 전기영동 분석기의 결과에서 돌연변이체를 선택할 때 Fig. 1과 2의 결과에서처럼 돌연변이일 것으로 예상되었으나 추가적인 실험을 했을 때 1차로 보았던 결과가 나오지 않는 경우가 있었다. 이런 점들을 고려하여 세대를 거듭하여도 1차적인 TILLING 선별 과정의 결과가 동일

하게 유지되는지 검증해야 할 필요가 있다.

이번 연구에서 사용된 gDNA pool은 탄소이온빔 20 Gy를 처리하여 얻은 190개체와 감마선 100 Gy를 처리하여 얻는 나머지 개체를 합하여 2,880개였다. 탐색된 변이 개체는 모두 감마선을 처리하여 얻는 돌연변이 집단에서 나왔다(Fig. 3). 감마선을 이용한 돌연변이 집단이 대부분을 차지하여 나온 결과로 해석되며, 탄소이온빔을 이용하여 구축된 돌연변이 개체수가 적어 두 방사선원간의 차이에 의해 발생되는 돌연변이 확률을 논하기에는 다소 어려움이 따른다. 다만, 탄소이온빔이 상대적으로 감마선에 비해 높은 LET (Linear energy transfer) 능력을 갖기에 보다 효과적인 돌연변이 발생이 일어날 수 있다[42]. 따라서 고추에서 방사선원간 차이에 따른 돌연변이율의 차이는 추후 연구에서 밝혀야 할 것이다.

식물의 *FT* 유전자들은 개화 유도에서 중요하고 대립되는 역할을 한다. 특히 고추의 6개 *FT*-like 유전자를 모델 식물인 애기장대에 각각 과다발현시켰을 때 *CaFT1*과 *CaFT3*은 개화를 지연시키는 동시에 영양생장을 증대시켰고, *CaFT4*와 *CaFT6*은 애기장대 개화를 촉진시켰다[31]. 이에 따라 *CaFT1* 유전자가 개화 억제자로서의 기능을 상실한다면 개화가 빨리 진행됨을 예측할 수 있으나, 본 연구에서 *CaFT1*의 돌연변이체로 추정되는 143번의 자손에서 보여지는 표현형은 야생형과 비슷하거나 발달이 늦은 형태를 보여주었다(Fig. 4). 또한, 143번 돌연변이 개체에서 나타나는 *CaFT1-2* DNA 서열의 아미노산 서열 분석결과 D가 I (Isoleucine)로, R (Arginine)이 K (Lysine)로 변환 될 수 있음을 확인하였다(Fig. 3C). 식물에서 FT는 다른 단백질과 결합하여 개화 및 성장에 관련된 발달에 관여한다. CaFT1의 단백질 결합 파트너로 개화 억제자인 CaSP/FA 단백질이 알려져 있으나, *CaFT1* 유전자의 3' 근처의 DNA 변이로 인해 발생되는 단백질 구조의 변화는 개화에 영향을 미칠 수 있어 오히려 개화가 늦어지는 상반된 결과를 가져올 수 있다. 예를 들어, 밀의 *FT1-D1*는 Frameshift로 3' 쪽에 변이가 일어나 개화 촉진 복합체 형성을 더 잘하게 되어 오히려 밀의 출수를 앞당기는 결과를 가져왔다[43]. 게다가, 비트의 BvFT1과 BvFT2는 몇 가지 아미노산 변화에 따라 개화의 억제자나 촉진자로서의 기능이 상반되게 수행될 수 있음을 보여주었다[44]. 개화 조절 기능뿐만 아니라, 애기장대에서 *ft* 돌연변이는 장일조건에서 생장 지연과 생장율 감소의 결과를 가져왔고[45], 본 연구에서의 나타난 표현형과 비슷하였다. 다만, 예측했던 *CaFT1* 돌연변이 개화 표현형이 상이한 부분에 대해서는 추가적인 분자적 수준에서의 연구가 필요하다.

5. 결 론

방사선 유도 돌연변이는 무작위 특징을 가지고 있어 특정 유전자의 돌연변이를 유도하는데 많은 개체수의 돌연변이 계통을 육성하는 과정이 필요하다. 많은 수의 돌연변이 계통을 지속적으로 유지하기 어려우므로 초기 단계에서 TILLING을 이용하여 원하는 계통을 빠르게 선별하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 모세관 전기영동-TILLING 방법으로 고추의 방사선 돌연변이 집단에서 *FT* 및 *FT*-like유전자의 돌연변이 선별을 시도하였다. 그 결과, 목표로 하는 유전자의 돌연변이체 평균 1개체를 확보 하려면 돌연변이 집단의 크기가 7,419개 정도가 필요하다는 결론을 얻었다. 이러한 결과는 고추 방사선 돌연변이 집단의 크기를 결정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국원자력연구원 주요사업(523410-24)에 의해 수행되었으며, 그 지원에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Kim S. 2014. World Agriculture. Global Dried Chili Pepper Industry Trends. pp. 73-92. KREI Repository.
2. Major Statistics of Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2022. www.nihhs.go.kr/farmer/statistics/statistics.do?t_cd=0201.
3. Kim SH, Lee GI, Hur SY and Lee YJ. 2019. Changes in the fresh-cut fruit and vegetable market and response strategies. R880. KREI Repository.
4. Jo YD, Kim SH, Hwang JE, Kim YS, Kang HS, Kim SW, Kwon SJ, Ryu J, Kim JB and Kang SY. 2016. Construction of Mutation Populations by Gamma-ray and Carbon Beam Irradiation in Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Hortic. Environ. Biotechnol*. **57**(6):606-614. https://doi.org/10.1007/s13580-016-1132-3.
5. Yeongyang Pepper Research Institute. 2022. Yeongyang Pepper Cultivation Manual. Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension Service.
6. Hwang JM, Oh SM and Shim JH. 2001. Determination of the optimum harvest date for once-over harvest of red pepper by the direct sowing in the field. The Conference Articles of *J. Bio-Env. Con*. **10**(2):129-135.
7. Ju JI and Choi HG. 2018. Experimental Research Report. Development of Labor-saving Rain Shelter Technology for Pepper Cultivation. Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services.
8. Xu F, Rong X, Huang X and Cheng S. 2012. Recent Advances of Flowering Locus T Gene in Higher Plants. *Int. J. Mol. Sci*. **13**:3773-3781. https://doi.org/10.3390/ijms13033773.
9. Hedman H, Källman T and Lagercrantz U. 2009. Early evolution of the MFT-like gene family in plants. *Plant Mol Biol*. **70**:359-369. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9478-x.
10. Goretti D, Silvestre M, Collani S, Langenecker T, Mendez C, Madueno F and Schmid M. 2020. TERMINAL FLOWER1 Functions as a Mobile Transcriptional Cofactor in the Shoot Apical Meristem. *Plant Physiology*. Vol. 182. pp. 2081-2095. https://doi.org/10.1104/pp.19.00867.
11. Liu Y. Y, Yang K, Wei X and Wang X. 2016. Revisiting the phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) gene family reveals cryptic FLOWERING LOCUS T gene homologs in gymnosperms

and sheds new light on functional evolution. *New Phytologist.* Vol. 212(3), pp. 730-744. https://doi.org/10.1111/nph.14066.
12. Turck F, Fornara F and Coupland G. 2008. Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annu. Rev. Plant Biol*. **59**:573-594. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755.
13. Chen Q, Payyavula RS, Chen L and Turgeon R. 2018. FLOWERING LOCUS T mRNA in synthesized in specialized companion cells in Arabidopsis and Maryland Mammoth tobacco leaf veins. *PNAS*. **115**(11):2830-2835. https://doi.org/10.1073/pnas.1719455115.
14. Cao K, Cui L, Zhou X, Ye L, Zou Z and Deng S. 2016. Four Tomato FLOWERING LOCUS T-like Proteins Act Antagonistically to Regulate Floral Initiation. *Front. Plant Sci*. **6**:1213. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01213.
15. Schmidt FJ, Zimmermann MM, Wiedmann DR, Lichtenauer S, Grundmann L, Muth J, Twyman RM, Prüfer D and Noll GA. 2020. The Major Floral Promoter NtFT5 in Tobacco (Nicotiana tabacum) Is a Promising Target for Crop Improvement. *Front. Plant Sci*. **10**:1666. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01666.
16. Borovsky Y, Mohan V, Shabtai S and Paran I. 2020. CaFT-LIKE is a flowering promoter in pepper and functions as florigen. *Plant Science*. **301**:110678. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110678.
17. Daskalov S. 1986. MUTATION BREEDING IN PEPPER. International Atomic Energy Agency. INIS-XA-390.
18. Shikazono N, Suzuki C, Kitamura S, Watanabe H, Tano S and Tanaka A. 2005. Analysis of mutations induced by carbon ions in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*. **56**:412. pp. 587-596. https://doi.org/10.1093/jxb/eri047.
19. Ma L, Kong F, Sun K, Wang T and Guo T. 2021. From Classical Radiation to Modern Radiation: Past, Present, and Future of Radiation Mutation Breeding. *Front. Public Health*. **9**:768071. https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.768071.
20. Goh EJ, Kim JB, Kim WJ, Ha BK, Kim SH, Kang SY, Seo YW and Kim DS. 2014. Physiological changes and anti-oxidative responses of Arabidopsis plants after acute and chronic γ-irradiation. *Radiat Environ Biophys*. **53**:677-693. https://doi.org/10.1007/s00411-014-0562-5.
21. Kim SM, Jo YD, Chun JI, Kim JB and Kang JH. 2021. Chronic Gamma Irradiation Changes Phenotype and Gene Expression Partially Transmitted to Next-Generation Tomato Seedlings. *Agronomy*. **11**:1638. https://doi.org/10.3390/agronomy11081638.
22. Kayode Samuel O, Funsho O, Charity A, Stephen A and Sunday I. 2021. Determination of morphological changes using gamma irradiation technology on capsicum specie varieties. *Open Agriculture*. **6**:135-142. https://doi.org/10.1515/opag-2020-0177.
23. Jo YD, Kang HS, Choi HI and Kim JB. 2021. Genotype-by-Sequencing Analysis of Mutations and Recombination in Pepper Progeny of Gamma-Irradiated Gametophytes. *Plants*. **10**:144. https://doi.org/10.3390/plants10010144.
24. Minoia S, Petrozza A, D'Onofrio O, Piron F, Mosca G, Sozio G, Cellini F, Bendahmane A and Carriero F. 2010. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes*. **3**:69.
25. Kang HS, Kim SH, Lee SW, Kim SW, Ryu J, Kim JB, Yeom SI, Kang SY and Jo YD. 2018. Optimization of TILLING system based on capillary electrophoresis for targeted selection of pepper gene mutants. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. **59**:447-460. https://doi.org/110.1007/s13580-018-0049-4.
26. Tadzunu S, Mitsugu E, Toshihiro K, Hikaru S, Hiroaki M, Kazuki M, Yasuo N and Nori K. 2008. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol GenetGenomics*. **279**:213-223. https://doi.org/10.1007/s00438-007-0293-2.
27. Gady ALF, Hermans FW, Marion HBJ, de Wal Ban, van Loo Eibertus N, Visser RGF and Bachem CWB. 2009. Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant population. *Plant Methods*. **5**:1-14. https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-13.
28. Jiang GQ, Yao XF and Liu CM. 2013. A simple CELI endonuclease-based protocol for genotyping both SNPs and InDels. *Plant Mol Biol Rep*. **31**:1325-1335. https://doi.org/10.1007/s11105-013-0606-z.
29. Kim S, Park M, Yeom S, Kim YM, Lee JM, Lee HA, Seo E, Choi J, Cheong K, Kim KT, Jung K, Lee GW, Oh SK, Bae C, Kim SB, Lee HY, Kim SY, Kim MS, Kang BC, Jo YD, Yang HB, Jeong HJ, Kang WH, Kwon JK, Shin C, Lim JY, Park JH, Huh JH, Kim JS, Kim BD, Cohen O, Paran I, Suh MC, Lee SB, Kim YK, Shin Y, Noh SJ, Park J, Seo YS, Kwon SY, Kim HA, Park JM, Kim HJ, Choi HS, Lee MS, Yu Y, Choi YD, Park BS, van Deynze A, Ashrafi H, Hill Th, Kim WT, Pai HS, Ahn HK, Yeam I, Giovannoni JJ, C Rose JK, Sørensen I, Lee SJ, Kim RW, Choi IY, Choi BS, Lim JS, Lee YH and Choi D. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in Capsicum species. *Nature genetics*. **46**(3): 270-279. https://doi.org/10.1038/ng.2877.
30. Jo YD and Kim J-B. 2019. Frequency and Spectrum of Radiation-induced Mutations Revealed by Whole-Genome Sequencing Analyses of Plants. *Quantum Beam Sci.* **3**(2):7. https://doi.org/10.3390/qubs3020007.
31. Kwon Y-J, Hong MJ, Park M, Jeon D, Lim G-H, Chang S, Kim D-W, Kim J-B, Lee J and Jo YD. 2024. Conserved and unique features of pepper *FLOWERING LOCUS T*-like genes revealed by comparative analysis among solanaceous crops. *Scientia Horticulturae*. **326**:112710. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112710.
32. Arumingtyas EL and Ahyar AN. 2022. Genetic diversity of chili pepper mutant (Capsicum frutescens L.) resulted from gamma-ray radiation. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. 1097. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1097/1/012059.
33. Kim SH, Chung SJ, Lee GJ, Kim DS, Kim JB and Kang SY. 2009. Mutation Breeding of Various Spray Chrysanthemum Cultivars by Gamma-ray Irradiation. *Journal of Radiation Industry*. **3**(3):227-232.
34. Kim SH, Kim SY, Ryu J, Jo YD, Choi HI, Kim JB and Kang SY. 2021. Suggested doses of proton ions and gamma-rays for mutation induction in 20 plant species. *International Journal of Radiation Biology*. **97**(11):1624-1629. https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1969053.
35. Kim Sh, Jo YD, Ryu J, Hong MJ, Kang BC and Kim JB. 2020. Effects of the total dose and duration of γ-irradiation on the growth responses and induced SNPs of a Cymbidium hybrid. *International Journal of Radiation Biology*. **96**(4):545-551. https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1704303.
36. Hase Y, Satoh K, Seito H and Oono Y. 2020. Genetic Consequences of Acute/Chronic Gamma and Carbon Ion Irradiation of Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci*. **11**:336. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00336.
37. Kim JB, Kim SH, Ha BK, Kang SY, Jang CS, Seo YW and Kim DS. 2014. Differentially expressed genes in response to gamma-irradiation during the vegetative stage in Arabidopsis thaliana. *Mol Biol Rep*. **41**:2229-2241. https://doi.org/10.1007/s11033-014-3074-0.
38. Henikoff S, Till BJ and Comai L. 2004. TILLING. Traditional Muta-

genesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiol*. **135**(2):630-636. https://doi.org/10.1104/pp.104.041061.
39. Henikoff S and Comai L. 2003. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **54**:375-401. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135009.
40. McCallum CM, Comai L, Greene EA and Henikoff S. 2000. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol*. **123**(2):439-42. https://doi.org/10.1104/pp.123.2.439.
41. Bulock CR, Xing X and Shcherbakova PV. 2020. DNA polymerase δ proofreads errors made by DNA polymerase ε. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**(11):6035-6041. https://doi.org/10.1073/pnas.1917624117.
42. Yoshihara R, Saito H, Yamamoto YY, Hayashi Y, Ichida H, Ryuto H and Fukunishi N. 2008. LET-dependent effects of heavey-ion beam irradiation in Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnol*. **117**:113-117. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.25.113.
43. Li Y, Xiong H, Guo H, Xie Y, Zhao L, Gu J, Li H, Zhao S, Ding Y, Zhou C, Fang Z and Liu L. 2024. A gain-of-function mutation at the C-terminus of FT-D1 promotes heading by interaction with 14-3-3A and FDL6 in wheat. *Plant Biotechnol*. https://doi.org/10.1111/pbi.14474.
44. Pin PA, Benlloch R, Bonnet D, Wremerth-Weich E, Kraft T, Gielen JJ and Nilsson O. 2010. An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science*. **330**:1397-1400. https://doi.org/10.1126/science.1197004.
45. Hiraoka K, Yamaguchi A, Abe M and Araki T. 2013. The Florigen Genes *FT* and *TSF* Modulate Lateral Shoot Outgrowth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiol*. **54**(3):352-368. https://doi.org/10.1093/pcp/pcs168.