GOVP1200722501

최 종
연구보고서

포도 새눈무늬병 저항성 검정 및 marker -assisted selection을 위한 내병성 분자표지 개발

Evaluating varietal resistance to anthracnose and molecular marker selection for resistance in grapevines

연구기관
주관연구기관 원예연구소
협동연구기관 한경대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “포도 새눈무늬병 저항성 검정 및 marker-assisted selection (MAS)를 위한 내병성 분자표지 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5월 24일

주관연구기관명 : 원예연구소
총괄연구책임자 : 윤해근
세부연구책임자 : 윤해근
연 구 원 : 박교선
연 구 원 : 황정환
연 구 원 : 노정호
연 구 원 : 최윤정
연 구 원 : 한승재
협동연구기관명 : 한경대학교
협동연구책임자 : 강권규

요 약 문

Ⅰ. 제 목

포도 새눈무늬병 저항성 검정 및 marker-assisted selection (MAS)을 위한 내병성 분자표지 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

국내시장에서 환경친화적인 과실류의 요구가 증가되는 상황이지만 국내의 내병성 포도 품종 육성은 극히 초기단계로 육종 효율을 증대시키기 위한 효율적이고 체계적인 병저항성 스크리닝 등의 체계구축이 필요하고 포도 육종 연한 단축과 육종효율 증대를 위해 내병충성의 조기 선발 표지를 이용한 marker assisted selection (MAS) 기술의 개발이 시급한 실정이다.

본연구의 목적은 포도 새눈무늬병 병원균 접종 및 2차 대사산물을 이용한 효율적인 내병성 검정 체계 구축하고 이를 이용한 내병성 유전자원을 선발하고자 하였으며 포도 새눈무늬병 내병성 육종을 위한 marker-assisted selection(MAS)의 이용 체계 구축하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 포도 새눈무늬병 저항성 검정 및 marker-assisted selection (MAS)을 위한 내병성 분자표지 개발을 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. 포도 새눈무늬병원균(*Elsinoe ampelina*) 접종에 의한 저항성 검정체계 구축
   가. 병원균 배양 조건 및 포자 형성 유도 조건 구명
   나. 병원균 포자 현탁액 분무접종에 의한 병반 형성 차이 비교
   다. 병원균 접종 후 저항성 품종과 감수성 품종의 병반형성차이 비교
   라. 포장과 실내접종 검정 결과를 비교하여 최적의 접종방법 개발
   마. 병반형성 차이에 따른 F1 포도 계통의 병저항성 계통 분리
2. 배양여액을 이용한 검정체계 개발 및 저항성 검정

가. 배양여액을 이용한 검정
나. 병원균 포자접종을 통한 저항성 검정 및 배양여액 검정결과 비교
다. 배양여액을 이용한 포도 품종의 포도 새눈무늬병 저항성 검정
3. 내병성 계통 선발
가. 배양여액을 이용한 포도 교배 실생의 저항성 검정
나. 포도 새눈무늬병균의 독성 2차대사산물 분석
다. 병원균의 독성물질을 이용한 검정
라. 포장저항성, 포자접종, 독성물질 검정을 통한 종합적인 품종판별
4. 새눈무늬병 저항성의 유전분석
가. 포도 새눈무늬병 저항성 및 감수성 계통 간 교배 후대 분리세대에서 bulked segregant analysis(BSA) 집단 구축
나. 새눈무늬병 저항성계통과 감수성계통 교배의 분리세대(F2세대)
다. 병원균 배양여액 검정을 통한 포도 새눈무늬병 저항성의 유전분석
5. RAPD, AFLP분석을 통해 저항성 특이 DNA marker 선발 및 이용
가. BSA에 의한 저항성 및 감수성을 10개체씩 선정하여 DNA bulk 제작
나. RAPD 및 AFLP 분석
다. 저항성 bulk 집단 특이 DNA marker의 선발 및 염기배열조사
라. Sequencing data을 통한 SCAR marker용 primer 설계 및 합성
마. SCAR marker의 적용 및 새눈무늬병 저항성 평가 및 선발
6. 선발 SCAR marker의 실용성 검증
가. 포도 새눈무늬병 내병성 육종 프로그램에 SCAR marker의 적용
나. 분자 표지인자를 이용한 저항성 계통군 분리

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

가. 포도 새눈무늬병균 및 배양여액을 이용한 저항성 검정체계 확립

포도 새눈무늬병균 포자접종을 위한 효율적인 저항성 검정을 위하여 포자형성 조건을 구명하였고 포자접종에는 10^5 spores/㎖의 포자 농도가 저항성과 감수성인 품종을 구별하는 데에는 가장 효율적이었다. 새눈무늬병에 대한 품종간의 효율적인 저항성 검정에는 병원균 접종 후 28℃ 항온기에서 48시간 또는 72시간 동안의 습실 유지기간이 적합하였으며 식물체의 생육상태는 5~7매의 전엽을 갖는 식물체가 가장 적합하였다. 독성물질을 함유한 배양여액 생산에 최적인 배지로는 독성물질 생산은 Richard solution과 asparagine 배지에서 가장 양호하였다. 주요 포도 품종을 대상으로 병원균의 배양여액과 배양여액을 에칠아세테에이트로 추출한 추출물에 대한 괴저반응을 조사한 결과,

공시품종 중에는 배양여액에 대해 저항성, 중도저항성 및 감수성 품종이 모두 존재하였음을 확인하였다.

나. 포도 새눈무늬병원균 접종 및 배양여액을 이용한 유전자원의 저항성 검정

병원균의 인공 접종 결과 'Rizamat',와 'Kaiji',는 감수성, 'Kyoho',와 'Benifuji',는 중도 감수성, 'Campbell Early',와 'Niagara',는 저항성 품종이었으며 이 결과는 포장 상태에서의 저항성 차이와 일치하는 경향을 나타내었다. 포도 새눈무늬병원균을 접종한 결과 'Black Swan', 'Rizamat', 'Rosario Bianco', 'Kaiji' 등이 감수성, 'Campbell Early', 'Niagara', 'Sheridan', 및 'Izumo Queen' 등은 저항성성 품종으로 판별되었다. 또한 17개의 포도 품종을 대상으로 병원균의 배양여액과 배양여액을 에칠아세테에이트로 추출한 추출물에 대한 괴저반응을 조사한 결과, 'Rosario Bianco', 'Kaiji' 및 'Rizamat' 등은 감수성이었고, 'Campbell Early'와 'Niagara' 등은 병원균인 *E. ampelina*가 생성하는 배양여액에 감수성이었다.

다. 포도 새눈무늬병균 감염에 의한 포도나무의 이화학적 변화 비교

포도 새눈무늬병균을 접종한 후 salicylic acid, resveratrol, H_2O_2의 함량 변화를 알아보고자 HPLC 분석을 통해 함량을 측정한 결과, 'Rizamat'를 제외한 공시재료 모두 병원균 접종 후 salicylic acid, resveratrol, H_2O_2의 함량이 점차 증가하여 6시간 후에 salicylic acid의 함량이 최고치를 나타내었으며 이후에 점점 감소하였다. 포도 새눈무늬병균의 배양여액을 처리한 결과도 유사하였다. 포도 새눈무늬병에 저항성 품종인 'Campbell Early'에서 감수성인 'Rizamat'와 'Kyoho'보다 salicylic acid, resveratrol, H2O2 함량보다 높았으며 'Rizamat'품종은 접종 후 salicylic acid의 뚜렷한 함량 변화가 없었다.

라. 포도 새눈무늬병균 배양여액으로부터 독성불질의 부분정제

포도 새눈무늬병원균인 *E. ampelina*의 배양여액으로부터 독성물질을 순수분리하기 위하여 배양여액을 에칠아세테이트로 추출하고 회전감압농축기로 완전히 건조한 후 이를 다시 소량의 아세톤에 녹였다. 이들을 TLC(chloroform: methyl alcohol, 9:1, v/v)로 전개한 후 각각의 fraction을 회수하여 잎에서의 독성을 검정하였다. 그 결과 4번째, 8번째와 9번째의 fraction에서 감수성 포도잎에 독성이 발휘되었다. 또한 column chromatography (전개용매; methanol : chloroform)를 통해서 6개의 분획을 획득하였다. 이들 분획을 포도나무 잎에 bioassay한 결과 7:3, 6:4, 5:5의 fraction에서 강한 독성이 발현되었다.

마. 새눈무늬병 저항성 관련 DNA 표지인자 선발

포도 새눈무늬병 저항성에 연관된 분자표지를 선발하기 위하여 저항성 11 계통과 감

수성 9 계통을 이용하여 각각의 DNA bulk를 만들어 분석에 이용하였다. 총 209종 primer를 사용한 결과, 저항성 및 감수성 계통을 구별할 수 있는 DNA 표지인자는 10개로 총 band수의 1.95%로 나타났다. 얻어진 10개의 band를 이용하여 재현성이 있는 primer는 URP 6, OPB15, OPB17, OPAB14, OPAB 18 등 5개를 선발하였다. Southern 분석을 실시한 결과, $OPB15_{1300}$, $OPAB18_{800}$을 probe로 사용했을 때 저항성 계통인 'Concord', 'Champion', 'Delaware', 'Niagara', 'Beninanyo', '101.14', '3309', '3306', '5BB', 'SO4', 'Rupestris du Lot' 에서 밴드가 나타난 것으로 보아 이들 두개의 표지에 대한 특이 band만이 SCAR marker의 가능성을 제시하였다.

바. 저항성 계통 특이 SCAR marker 적용

저항성 계통 특이 clone ($OPB15_{1300}$, $OPAB18_{800}$)의 염기배열을 조사한 결과 $OPB15_{1300}$은 1247bp, $OPAB18_{800}$은 843 bp였다. 이들 염기서열 정보를 이용하여 NCBI 분석한 결과 unknown 유전자로 나타났다. 이들 두 clone의 염기서열 정보를 이용하여 SCAR marker용 primer를 디자인하였다. $OPAB18_{800}$ clone의 Fw 5'-CTGGCGTGTCCACATTTTTGGTAG-3' Rv 5'-CTGGCGTGTCTGGAGGAAAATATC-3'을 사용하였을 경우 저항성 계통에서만 증폭되는 단일 band를 얻었다.

사. 새눈무늬병 저항성의 유전분석

포도 새눈무늬병에 관여하는 유전자의 구성분포를 알기위해 저항성 품종 'Tamnara'와 감수성 품종 'Kyoho', 'Muscat Bailey A', 'Kaiji', 'Alden'을 대상으로 F2집단을 육성하여 생물학적 검정을 실시한 결과, 'Tamnara', 'Muscat Bailey A', 'Kaiji', 'Alden' F2집단에서 저항성 및 감수성의 분리는 3:1로 지배하는 single dominant 유전자로 확인 할 수 있었다.

아. SCAR표지의 새눈무늬병 저항성 유전자와 연관

저항성 및 감수성 계통들에서 얻어진 SCAR marker가 새눈무늬병 저항성 유전자와의 연관성을 조사하기 위해 저항성 품종 'Tamnara'를 사용하였다. 'Tamnara' 품종을 자식하여 얻어진 F2 집단에서 생물학적 검정을 통해 저항성을 보이는 10개체 및 감수성을 보이는 10개체를 선발한 후 각각 식물체로부터 DNA를 추출하여 template로 사용하였다. OPAB18800을 사용한 결과 'Campbell Early', F1 및 F2 집단에서 저항성 개체에서만 band가 확인되었다. RAPD에서 얻어진 SCAR marker는 새눈무늬병 저항성 유전자와 아주 밀접하게 연관되어 있을 것으로서 이들 marker를 이용하여 저항성 계통의 선발에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

자. AFLP 표지인자 탐색

RAPD보다 효율이 높은 AFLP 분석을 통하여 새눈무늬병 저항성 연관 AFLP

marker를 탐색하기 위하여, 저항성 친 'Campbell Early' (P1), 감수성 친 'Himrod Seedless' (P2), F1, 저항성 F2 DNA bulk 및 감수성 F2 DNA bulk를 사용하여 AFLP 분석을 실시하였다. 저항성 DNA bulk에만 특이 band를 나타나는 primer조합을 선발하였다. 사용된 primer 조합은 EcoR1 + 2(or 3) primer 9개와 Mse I + 3 primer 8개를 조합하여 총 72개의 조합으로 AFLP를 수행하였으며, 선발한 결과 AFLP 표지인자 가능성이 있는 22종의 primer 조합에서 저항성 bulk 특이적 밴드를 관찰할 수 있었다. 1차적으로 선발된 22개의 primer 조합을 양친인 저항성 'Campbell Early'와 감수성 'Himrod Seedless', 저항성 Tamnara F1, Tamnara F2는 저항성 DNA bulk와 이병성 DNA bulk를 이용하여 새눈무늬병에 저항성과 감수성의 구분이 가능한 분리양상을 나타내는지 확인하였다. E2M2 조합에서 저항성 교배친인 'Campbell Early'와 Tamnara F2 저항성 집단에서 약 200 bp 정도에 특이 밴드가 출현하는 AFLP 표지인자를 선발하였다.

2. 활용에 대한 건의

가. 포도 새눈무늬병균의 배양여액의 이용

본 연구에서 포도 새눈무늬병균은 기주특이성이 있는 독성물질을 생산하는 것으로 밝혀졌으며 이들 독성물질에 대한 순수분리 및 구조분석 연구를 위한 연구비 지원이 요구되며 in vitro에서의 새눈무늬병 저항성 개체 개발을 위한 육종 시스템 개발에도 지원이 요구되며 내병성 포도 육종 효율이 크게 증대될 것으로 여겨진다.

나. 유용형질의 내병성 유전자원의 육종소재 선발

내병성 형질 뿐 만 아니라 고품질 우량형질의 포도 유전자원을 선발하여 향후 내병성 포도 육종 프로그램에 크게 활용할 육종소재를 제공할 것이다.

나. 포도 새눈무늬병 분자 표지 마커의 개발

본 연구에서 개발한 포도 새눈무늬병 저항성 관련 RAPD, AFLP 및 SCAR marker는 내병성 포도 실생을 조기에 선발할 수 있는 효율적인 육종 시스템에 이용될 수 있으며 이를 통해 과수 육종에 크게 기여할 것이다.

SUMMARY
(영문요약문)

Evaluating varietal resistance to anthracnose and molecular marker selection for resistance in grapevines

Anthracnose (*Elsinoe ampelina*) occurs severely in grapevines grown in warm and humid climate regions such as Korea. Hence, resistance of some cultivars to anthracnose is one of the big advantages in grapevine cultivation. The objective of this study is to develop a rapid screening system by using very young seedlings in selecting the resistant cultivars and progenies against anthracnose. Spore suspension of 10^5 spores/mL was optimum for symptom development by spray inoculation of pathogens. After inoculation, incubating the plants in a moisture chamber for 48 to 72 h later resulted in good symptom development. The most effective plant materials for screening were seedlings or cuttings in the five or seven true-leaf stage. This pattern was consistent with that from field screening.

It was also investigated whether culture filtrates produced by *E. ampelina* could be used to determine varietal susceptibility in grape cultivars to anthracnose as a substitute for pathogen inoculation or field screening. Bioassay of grape leaves with culture filtrates showed that their phytotoxicities were active and host-selective. Ethyl acetate extracts from those also showed the toxicities and host selectivity among grape cultivars. The sensitivity range of plants to culture filtrates of pathogen and their ethyl acetate extracts was consistent with the host range to the pathogen. Susceptible cultivars were sensitive to even highly diluted culture filtrates but resistant cultivars were not affected even at original culture filtrates. Susceptible cultivars were sensitive to the undiluted culture filtrates than highly diluted culture filtrates. It suggests that culture filtrates of pathogen can be used as a alternative to pathogen inoculation or field test in evaluating resistance to anthracnose in grapes.

To evaluate the resistance to anthracnose disease in grape germplasm, European grapes, American grapes, and *Vitis* hybrids were tested. In the result of

anthracnose resistance evaluation by pathogen inoculation, some cultivars such as 'Black Swan', 'Rizamat', Rosario Bianco', and 'Kaiji' were susceptible, and others such as 'Campbell Early', 'Niagara', 'Sheridan', and 'Izumo Queen' were found to be resistant to anthracnose. Evaluation in the vineyard showed the consistent results with those obtained from bioassay with culture filtrates of the pathogen, pathogen inoculation, and screening in the vineyard.

To investigate the defense response in grapes against anthracnose, the content changes of salicylic acid, H_2O_2, and resveratrol were evaluated for confirming the biochemical defense changes in responding to pathogen infection. The contents of salicylic acid, H_2O_2, and resveratrol started to be increased sharply on 6 hours after inoculation in the resistant cultivars of 'Campbell Early', however, there were little content changes in susceptible cultivars of 'Rizamat' and 'Kyoho'.

The other aim of this study is to select molecular markers from grapevines for the purpose of efficient early selection of phenotypes resistant to anthracnose in grape breeding program. Through screening 209 primers against the resistant bulk from 11 grapevine varieties versus susceptible bulks of 9 ones, we selected primers, URP6, OPAB14, OPB15, OPB17, and OPAB18. Southern analysis showed that hybridization with fragments from OPB15 and OPAB18 as probes generated specific bands in anthracnose-resistant varieties. Based on the nucleotide sequences of clones, $OPB15_{1300}$ and $OPAB18_{800}$, new primers were designed for the SCAR markers. PCR with SCAR primer, SC-$OPAB18_{800}$, showed a single band in lines resistant to anthracnose which is absent in susceptible lines. This result suggested that SCAR marker designated from RAPD markers is linked closely to the locus determining resistance to anthracnose, and could be used for the early selection of lines resistant to anthracnose. Of the 213 seedlings from 4 varieties, 163 were resistant and 49 were susceptible to anthracnose. The segregation into resistant and susceptible classes was reasonably close to the expected ratio of 3:1 (χ^2 = 0.06-0.32), indicating that anthracnose resistance was controled by a single dominant gene in grapevines. Seventy two combinations of 9 *Eco*RI+NN(N) primers and 8 *Mse*I+NNN primers were used for AFLP analysis in resistant and susceptible bulks. Of 72 combinations, 22 primer sets generated DNA polymorphic amplicons between the two bulks. Further AFLP tests with DNAs from their parents showed that of 22 primer sets selected preliminarily, primer set of E2M2 generated 200 bp long band specific to resistant lines. These markers could be useful in the early selection of seedlings resistant to anthracnose in grape breeding programs, as well as in the identification of anthracnose resistance genes from grapevines.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction ····· 11

Section 1. Objectives of study ····· 11

Section 2. Necessities of study ····· 11

Section 3. Area of study ····· 13

Chapter 2. Status of research in the world ····· 15

Section 1. Status of research in foreign countries ····· 15

Section 2. Status of research in Korea ····· 15

Chapter 3. Strategies for study and results ····· 17

Section 1. Evaluating varietal resistance to anthracnose in grapevines ····· 17

Section 2. Molecular marker selection for resistance to anthracnose in grapevines

····· 55

Chapter 4. Comparison of results with proposals and completion ····· 70

Chapter 5. Plans for use of results from the study ····· 71

Chapter 6. Information of advanced technology introduced from foreign countries · 72

Chapter 7. Literature cited ····· 73

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 11

제1절 연구개발의 목적 11

제2절 연구개발의 필요성 11

제3절 연구개발의 범위 13

제 2 장 국내외 기술개발 현황 15

제1절 국내의 기술개발 현황 15

제2절 국외의 기술개발 현황 15

제 3 장 연구수행내용 및 결과 17

제1절 포도 새눈무늬병 저항성 검정 17

제2절 Marker assisted selection에 의한 포도 새눈무늬병 저항성 계통 검정

..... 55

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 70

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 71

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 72

제 7 장 참고문헌 73

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

- 포도 새눈무늬병 병원균 접종 및 2차 대사산물을 이용한 효율적인 내병성 검정 체계 구축
- 포도 새눈무늬병 저항성 검정체계을 이용한 내병성 유전자원 선발
- 포도 새눈무늬병 내병성 육종을 위한 marker-assisted selection(MAS)의 이용 체계 구축
- 내병성 관련 분자 marker를 이용한 우리나라 기후적합 내병성 포도 계통의 1차선발

제2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

포도 새눈무늬병은 우리나라 포도 재배 시 가장 심한 병해의 하나로서 발아 이후 5~10월까지 계속 발생하며 특히 5월 이후의 우기와 9월에 많이 발생하는 것으로 알려져 있다. 현재 포도농가에서 새눈무늬병에 대한 경제적인 손실은 막대하며, 이를 방제하기 위해 살균제 살포 등의 지속적인 방제를 수행하고 있으나, 완전한 방제는 이루어지지 않고 있다. 현재 농촌진흥청 원예연구소에서는 포도 품종 및 대목의 육종 목표를 고품질과 더불어 내재해 및 내병충성 등의 형질 발현하는 계통을 육성하는데 주력하고 있다. 그러나 생식용 포도 품종육성 체계와 기술은 선진국 수준에 도달되었으나 내병성 품종 육성은 극히 초기단계로 내병성 유전자원의 유전적 특성을 조사하고, 육성 효율을 증대시키기 위한 효율적이고 체계적인 병저항성 스크리닝 등의 체계구축이 선행되어야 한다.

미국, 유럽연합, 일본 등 포도 연구 선진국들은 포도 육종 연한 단축과 육종효율 증대를 위해 내병충성의 조기 선발 표지를 이용한 marker assisted selection (MAS) 기술을 포도육종에 적용하여 많은 성과를 보이고 있으나, 국내의 포도 육종에 이들 첨단 기술의 적용은 전무한 상태이며, 육종현장에서 활용할 수 있는 형질관련 marker의 탐색이 시급한 실정이다. 국내에서도 오래전부터 벼, 배추, 고추 등 주요작물에 육종 연한 단축과 육종효율 증대를 위해 내병충성의 조기 선발 표지를 이용한 marker assisted selection (MAS) 기술을 육종현장에 적용하여 많은 성과를 보이고 있는 실정이다. 따라서 포도 재배 상 문제시되는 포도 새눈무늬병의 내병성 품종의 선발을 위해서는 포도 및 대목 품종 육종에 조기 선발할 수 있는 marker assisted selection (MAS) 기술 도입이 시급히 적용되어야 한다.

2. 경제·산업적 측면

사회구조 변혁과 국민 생활수준의 향상 및 건강과 보건에 관한 관심도가 높아짐에 따라 과실 수급량이 기하급수적으로 증가하여 현재 연간 생산액은 약 6,000억원 규모로 국내 주요 과실 중 하나이다. 80년대 중반까지 국내에서 캠벨얼리(81.5%)가 주종을 이루었으나 최근에는 소비자가 흑색 포도에서 대립, 고당도 등 고급포도를 선호함에 따라 양질의 다양한 유럽종 포도의 재배 면적이 증가하고 있는 실정이다.

이러한 재배 품종의 변화로 인하여 기존의 문제 병해충 이외에도 새눈무늬병 등의 새로운 병해충이 발생하여 포도재배에 많은 어려움을 겪고 있다. 또한 국내에서 포도 육종시스템이 다른 작목에 비해 시스템구축이 늦게 출발한 관계로 최근에 내병성 품종육성을 위한 육종체계 구축이 절실히 필요한 실정이다. 현재 일부이긴 하지만 외국에서 도입된 품종에 대한 내병성 평가가 이루어지고는 있으나, 많은 유전자원에 대한 평가를 통해 내병성 유전자원의 확보가 시급하다. WTO 체제하에서는 포도 품종에 대한 지적재산권보호의 강화 및 최근 개정된 품종등록제등으로 품종권 보호에 따른 로열티 문제가 제기되어 앞으로 농가의 피해가 클 것으로 예상되며 이에 대한 적극적인 대처가 절실히 요구되는 실정이다. 따라서 우리나라의 토양과 생육환경에 알맞은 한국형 품종 선발 및 육종이 이루어져야 안정적이고 지속적 농업이 가능할 것으로 사료된다.

3. 사회·문화적 측면

포도는 소비자의 기호성이 높고 안전식품 및 건강식품이라는 이미지가 높아지고 있으며, 농약살포로 인한 인축의 독성 문제 이외에도 토양, 수질 오염 등 환경 생태계 파괴에 대한 우려가 증가하고 있고, 농약잔류와 관련한 식품 안정성 문제에 대한 소비자의 인식이 증가하여, 농약 살포를 줄이고 고품질 과수 생산이 가능한 내병충성 포도 품종의 개발이 시급하다. 선진국에서는 과수 신품종 육종에서 내병성 증진이 최우선 목표가 되고 있으며, 포도의 경우 흰가루병, 노균병, 줄기혹병 및 뿌리혹벌레에 대한 저항성 품종의 개발로 농약살포로 인한 문제를 최소화하고 친환경 과수산업에 대한 인식을 확대하고 있다. 따라서, 국내외에서 가장 문제가 되는 병해에 대한 저항성을 지닌 포도 품종을 개발하여 소비자의 포도 과실에 대한 건강식품 이미지 유지가 필요하다.

제3절 연구개발의 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	- 병원균접종에 의한 검정체계 개발	- 병원균 접종에 의한 저항성검정 체계 구축 1. 병원균 배양 조건 및 포자 형성 유도 조건 구명 2. 병원균 포자 현탁액 접종에 의한 병반 형성 차이 비교 1) 병원균 농도별 접종 2) 병원균 접종후 습실 유지기간 처리 3) 병원균 접종 후 유지 온도별 처리 3. 병원균 접종 후 저항성 품종과 감수성 품종의 병반형성차이 비교 4. 포장저항성 평가 5. 포장과 실내접종 검정법 결과를 비교하여 최적의 접종방법 개발 및 저항성 판별
	- 내병성관련 DNA marker 선발	- 내병성 관련 DNA marker 개발 1. 포도 새눈무늬병 저항성 유전 분석 2. BSA에 의한 RAPD 1) 저항성과 감수성 개체군의 DNA bulk 제작 2) 500개의 primer 사용 RAPD 분석 3. 저항성 연관 RAPD 표지 선발
2차년도 (2005)	- 배양여액을 이용한 검정체계 개발	- 배양여액을 이용한 검정체계 개발 1. 배양여액을 이용한 검정 1) 병원균 배양 : YEB 배지 진탕배양 2) 배양여액을 이용한 품종간 저항성 검정 3) 배양여액의 에틸 아세테이트 추출물에 의한 품종간 저항성 검정 2. 병원균 포자접종을 통한 포도 품종의 저항성 검정 3. 저항성 검정 결과 비교 4. 포도 교배실생의 포도 새눈무늬병 저항성 검정

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2005)	- BSA에 의한 AFLP 표지 개발	- BSA에 의한 AFLP 표지 개발 1. AFLP 수행 1) 제한효소에 의한 DNA 절단 2) Adapter와 primer 합성 및 결합 3) AFLP 반응 후 저항성 특이 표지인자 선발 2. AFLP 표지 염기서열 분석
3차년도 (2006)	- 내병성 계통 선발	- 내병성 계통 선발 1. 배양여액을 이용한 포도 교배실생의 저항성 검정 2. 포도 새눈무늬병균의 독성 2차대사산물 분석 3. 병원균의 독성물질을 이용한 검정 4. 포장저항성, 포자접종, 독성물질 검정을 통한 종합적인 품종판별 5. 포도 새눈무늬병 저항성 실생의 1차 선발
	- AFLP 표지 클로닝 및 SCAR표지 개발	- SCAR 표지 개발 및 연관분석 1. PCR primer 설계 및 합성 2. SCAR 표지 선발 3. DNA 표지와 형질간의 연관분석
	- 개발된 표지를 이용한 저항성 판별	- 선발표지의 실용성 검증 1. SCAR 표지 인자 이용을 위한 DNA 간이 추출법 개발 2. SCAR 표지인자를 이용한 저항성 판별 3. SCAR 표지인자를 이용한 저항성 계통 선발

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제1절 국외기술의 개발현황

선진국 여러 기관에서 내병성 포도 대목 및 품종 육성을 위한 다양한 프로그램을 가동하여 품종육성에 활용하고 있다. 미국에서는 미국 남부 자생 유전자원인 머스카딘 포도를 이용한 종간, 아속 간 교잡을 통해 새로운 신품종을 육성하였으며, 이들 품종은 대부분의 병충해에 강한 내성을 보였다.

내병성 유전자원 선발을 위한 효율적인 병저항성 스크리닝 체계를 구축하여 가동 중에 있으며, 주요 선진국에서는 내병성의 품종 조기선발을 위하여 내병충성 관련 분자표지 개발과 이를 활용한 연구가 게놈프로젝트로 까지 확대되어 매우 활발하게 추진되고 있다.

포도에서는 유전자 지도 작성이 유럽과 미국 등을 중심으로 진행되고 있으며 품종에는 무핵관련 유전자 표지, 흰가루병 저항성, 노균병 저항성, 잿빛곰팡이병 저항성, 과피관련 유전자표지 등이 개발되어 있고, 대목에 있어서는 뿌리혹벌레 저항성, 뿌리혹병 저항성 및 내충성 관련 분자표지가 개발되어 활용되고 있는 실정이다.

또한 프랑스와 호주의 국제공동연구를 통해 머스카딘 포도로부터 저항성 인자를 크로닝하고 교배육종 프로그램에서는 BC7세대를 통해 흰가루병에 저항성인 유럽종의 포도품종을 개발하고 있다.

이러한 분자 표지는 유전자지도 작성을 통해 복합유전자의 클로닝에 도움을 주는 것은 물론 특이형질을 발현하는 개체의 조기선발을 통한 육종효율 증대에 크게 기여하고 있다.

제2절 국내기술의 개발현황

국내에서는 1960년도 후반부터 농촌진흥청 원예연구소를 중심으로 세계 각지로부터 포도유전자원을 수집하여 거봉을 비롯한 수종의 우량품종을 육성하여 보급하기 시작할 정도로 매우 짧은 포도 육종 역사에도 불구하고 국내의 포도육종기술 및 육종효율은 세계적인 수준에 도달되었다. 우리나라 주요 포도 및 대목에 대해 흰가루병, 노균병 및 잿빛곰팡이병 등의 정확한 저항성 source를 원예연구소를 중심으로 탐색 중에 있다.

그러나 포도 새눈무늬병에 대한 품종 간 검정체계가 확립되어 있지 않아 저항성품종 육성에 많은 어려움이 있다. 다만 오래전부터 저항성품종으로 알려져 있는 콩코드, 델라웨어, 나이아가라 등을 육종소재로 활용하고 있는 실정이다.

또한 국내의 내병성품종을 위해서는 종간 또는 아속 간 교잡을 통해 대목 육성이 시급한 실정이나 육성체계가 확립되지 않아 대부분 도입 대목에 의존하고 있으며, 정확한

병에 대한 저항성 source를 탐색하고 있는 실정이다.

따라서 국내의 포도 내병성 신품종 육성을 위한 교배 육종체계 확립 및 효율증진 체계를 확립하고 있는 실정이며, 몇몇 연구자들에 의해 주요 품종 간 RAPD법으로 유전적 다양성검정을 수행한 바 있으며, 최근 김 등은 거봉 및 대봉 품종 간 유전적 유연관계를 분석하였다. 그러나 이들 연구는 품종 간 genetic diversity만을 규명하였을 뿐, 유용형질에 대한 표지탐색 등과 같은 연구는 매우 미비하여 육종현장에서 활용할 수 있는 data로는 미비한 상태이다.

단순한 RAPD marker를 이용한 주요 품종 간 유전적 다양성 및 품종 특이 분자표지 탐색 연구는 수행하고 있으나, 육종 현장에서 조기선발 할 수 있는 유용형질에 대한 RFLP, SSR 등 공우성 유전자의 분자 marker 탐색 기술이 포도의 경우 매우 초보적인 단계로 활용할 수 있는 marker가 거의 없는 실정이다. 따라서 선진국 여러 기관에서 내병성 포도대목 및 품종육성을 위해 활용되고 있는 유용형질에 대한 분자표지개발 및 MAS 이용체계를 확립하여 조기에 선발할 수 있는 system에 대한 연구가 이루어져 육종현장에서 바로 활용가능 하도록 하여야한다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 포도 새눈무늬병 저항성 검정

1. 서론

최근 우리나라 소비자들의 포도 소비성향은 다양한 문화 접촉과 소득 증가로 고품질 과실에 대한 요구가 증대되고 있으며, 포도 재배방식도 최근의 소비성향에 따라 생산량 증대의 생산방식에서 품질 향상의 생산 방식으로 바뀌고 있어 품질이 우수한 유럽계 또는 구미잡종 품종 재배가 요구되는 추세이다.

포도는 2002년 현재 전 세계적으로 738만 7천 ha를 재배하고 있으며 세계 과수 생산량대비 13.0%인 6천239만 톤이 생산되는 주요 과수 중의 하나이다(FAO, 2002). 국내 과수 산업에서도 포도 재배면적은 26,800 ha로 과수 총 재배면적의 13.1%(MAF, 2002), 년 간 생산량은 42만4천톤으로 16.1%(FAO, 2002)를 차지하고 있으며, 년간 1인당 소비량이 10 kg 정도에 이르는 주요 과종 중의 하나이다.

그러나 국내에서는 'Campbell Early', 'Kyoho', 'Sheridan' 품종들이 전체 포도 재배면적 대비 91.1%를 차지할 정도로 구성 품종이 단순한 특성을 보이고 있으나(MAF, 2002), 다양한 고품질 과실을 요구하는 소비 욕구를 충족시키기 위하여 고급 포도종인 유럽계 포도 품종의 재배면적이 증가하고 있는 추세이다.

유럽종 포도의 재배가 확대됨에 따라 기존의 병해와는 다른 포도 새눈무늬병, 흰가루병, 노균병 등의 새로운 병해의 발생 또한 증가하고 있다.

그 중에 포도 새눈무늬병은 유럽에서 처음 발생하여 삽수 등의 영양번식체를 통하여 다른 지역으로 전파되기 시작하여 현재는 포도를 재배하는 모든 지역에서 발생한다. 특히 품종에 따라 병해의 발생정도가 큰 차이를 보여 강우량이 많은 지역에서는 우수 품종을 선택하지 못할 정도로 피해가 심각한 병해중의 하나이다. 본병해는 *Elsinoe ampelina* 라는 사상균에 의해 발생하며 병반강에서는 무성세대인 *Sphaceloma ampelinum*이 나타난다. 열매는 물론 포도나무의 잎, 줄기, 신초 등의 연한 조직에는 모두 발생한다. 병원균은 작고 어두운 색의 모래알과 같은 균사 덩어리인 균핵으로 월동하여 이듬해 봄에 균핵으로부터 수많은 포자가 형성된다. 봄의 강우에 의해서 포자는 포도나무의 녹색조직으로 이동하여 발아하고 포도나무조직에 감염한다. 포자는 온도 적응성이 매우 뛰어나서 2~32℃ 범위에서는 발아하고 감염할 수 있으나 24~26℃일때 병이 가장 잘 발생하고 전반된다. 한편 균핵 이외에 과원의 토양과 이병잔해에서 월동한 균사도 봄의 신초를 감염할 수 있다. 이병의 발생을 좌우하는 가장 중요한 요인은 온도와 습도이다. 따라서 새눈무늬병은 강우량이 많은 해에 발생이 심하며, 여름철의 우박은 병의 확산에 중요한 역할을 한다. 하지만 병원균은 주로 유조직을 침해하므로 병 발생은 대부분 5월부터 장마철까지 이루어지며 장마철 이후에는 새로운 감염보다는 이미

감염된 병반이 진전된다. 그러나 이병에 감수성 포도 품종인 'Cardinal', 'Delicia' 및 'Italia'등에는 발병이 심하지만, 저항성인 'Concord'와 'Champion' 등의 품종에서는 전혀 발생하지 않기 때문에 저항성인 포도 품종의 재배만으로도 본 병의 발생으로 인한 피해를 방지할 수 있다. 따라서 다양한 포도 유전자원에 대한 저항성 검정을 실시하여 저항성인 품종을 선발하고 이를 이용한 내병성 포도 품종의 육성이 필요하다.

국내에서 수행하는 내병성 품종 육성은 극히 초기단계로 우리나라 환경에 적합형 품종을 육성하기 위해 우리나라 자생 포도 속 유전자원 및 외국 수집 야생 유전자원의 유전적 특성을 조사하고, 육성 효율을 증대시키기 위한 효율적이고 체계적인 병저항성 검정 등의 체계구축이 선행되어야 한다.

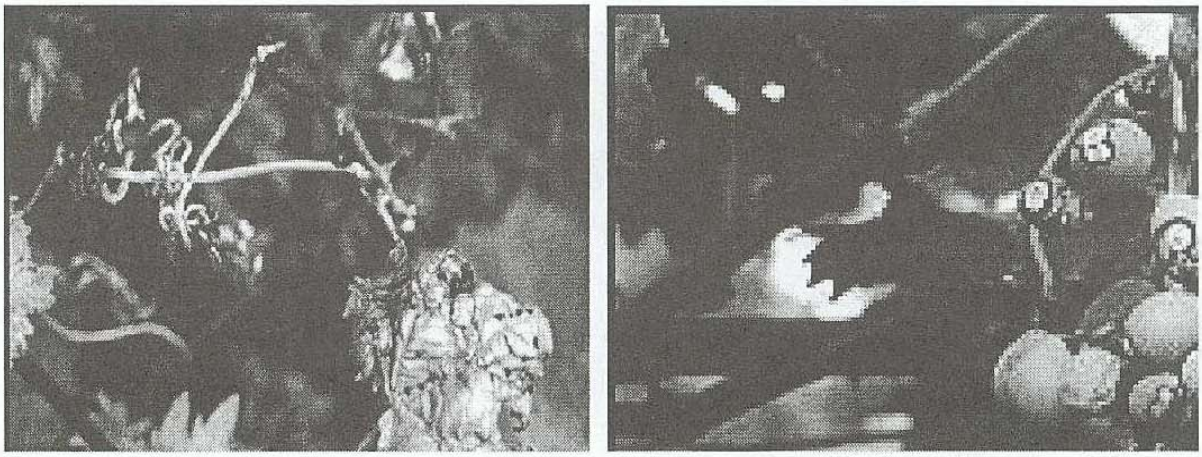

Fig. 1. Symptoms of anthracnose on the leaves (left) and berries (right).

또한 국내에서 포도 육종시스템이 다른 작목에 비해 시스템구축이 늦게 출발한 관계로 최근에 내병성 품종육성을 위한 육종체계 구축이 절실히 필요한 실정이다. 현재 일부이긴 하지만 외국에서 도입된 품종에 대한 내병성 평가가 이루어지고는 있으나, 많은 유전자원에 대한 평가를 통해 내병성 유전자원의 확보가 시급하다.

포도는 소비자의 기호성이 높고 안전식품 및 건강식품이라는 이미지가 높고, 농약살포를 통한 과실 생산에 따른 사람과 동물에 대한 직접적인 독성 문제 이외에도 토양, 수질 오염 등 환경 생태계 파괴에 대한 우려가 증가하고 있고, 농약잔류와 관련한 식품 안정성 문제에 대한 소비자의 인식이 증가하여, 농약 살포를 줄이고 고품질 과수 생산이 가능한 내병충성 포도 품종의 개발이 시급하다.

포도 새눈무늬병에 대한 저항성 검정은 주로 포자에서의 평가를 통해 진행이 되었으나 이 체계는 시간과 경비가 많이 소요되는 단점이 있으므로 이를 대체할 수 있는 효율적인 시스템이 구축되어야한다. 또한 외국에서는 야생유전자원 및 포도 품종에 대한 새눈무늬병 저항성 검정이 이루어져 있으나(Kitajima, 1989; Mortensen, 1971; Olmo, 1971; Vidhyasekara and Charan 1972; Wang et al., 1998) 국내에서는 이에 대

한 보고가 이루어져 있지 않은 실정이다. 그러므로 본 벼에 대한 저항성을 검정할 수 있는 효율적인 검정체계를 구축하고 유전자원에 대한 정확한 평가가 이루어져야한다.

따라서 본 연구에서는 포도 새눈무늬병 병원균 접종 및 2차 대사산물을 이용한 효율적인 내병성 검정 체계를 구축하고 효율적인 저항성 검정 체계를 이용하여 내병성 유전자원 선발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 병원균

병원균은 이병된 포도나무 줄기에서 분리한 병원성 균주 EA-1 (*E. ampelina*)을 농업과학원 식물병리과로부터 분양받아 접종시험에 사용하였다.

나. 식물체

검정체계 개발 실험을 위한 공시재료는 'Campbell Early', 'Kyoho', 'Rizamat' 품종을 이용하였으며 포도 유전자원의 새눈무늬병 저항성 검정 실험 재료로 원예연구소에서 유지되는 포도 유전자원을 이용하였다. 저항성 기작 구명 실험을 위한 공시재료는 6개의 포도 유전자원을 이용하였다. 접종에 이용된 유전자원은 경기도 수원시 소재 원예연구소 과수 유전자원포에서 유지되고 있는 포도 유전자원으로부터 초겨울 건전한 6~7년생 포도나무의 휴면지를 채취하여 4~5℃ 저온저장고에 보관하였다가 이듬해 봄에 접종시험 재료로 이용하였다. 접종을 위한 삽수는 직경 8~10㎜ 굵기의 가지를 선택하여 30㎝ 길이로 조제하였으며 전엽 10매 이상, 초장 20㎝이상 생장시켜 공시재료로 이용하였다.

다. 병원균 배양 및 포자형성 유도

고체배지(PDA)에서 생육한 균총을 액체배지(Fries medium)로 옮겨 28℃ 항온기에서 10일간 진탕배양하였다. 생장한 균체를 원심분리를 통해 회수하여 멸균한 마쇄기를 이용하여 마쇄한 후 고체배지(V-8 juice agar)에 고르게 도말하였다. 포자형성을 유도하기 위하여 근자외선광이 12시간 교호로 조사되는 항온기에서 2일간 배양하였다. 멸균된 붓으로 회수된 포자는 적용 농도로 조절된 포자현탁액으로 조제되어 병원균 접종시험에 사용되었다.

라. 병원균접종 및 저항성 평가

검정체계 구축을 위해 접종에 필요한 병원균 접종농도를 10^4, 10^5과 10^6 spores/ml의 농도로 조절하여 삽목묘에 분무접종하였다. 병원균 접종 후 포화습도는 각각 12, 24, 48, 72, 96시간으로 구분하여 유지하였다. 병원균접종에 적합한 포도나무의 생육단계 구명을 위하여 8~10개의 전엽을 유지한 식물체에 병원균 포자현탁액을 분무접종하여 잎에서의 병반을 조사하였다. 각 품종 당 3개의 식물체에 접종하여 접종 후 2주 뒤에

단위면적당 병반 수를 조사하였다. 포장에서의 저항성 검정을 위하여 3년간 매년 7월에서 9월 사이에 포도나무에 발생하는 병반의 수를 조사하였다.

마. 병원균 배양여액 및 에칠아세테이트 추출물의 생물 검정

액체배지에서 생육한 포도 새눈무늬병원균의 균체를 5분 동안 원심분리(11,000rpm)를 이용하여 완전히 제거한 후 filter(직경 0.2㎛)로 걸러서 멸균을 실시하였다.

다양한 품종의 상위의 신초선단으로부터 3번째와 4번째의 어린잎을 채취하여 연필로 미세한 상처를 가한 후 배양여액을 여러 농도로 희석하여 상처부위에 처리하였다. 대조구로는 신선한 Fries 배지를 식물체 잎의 상처부위에 처리하였다. 배양여액 및 배지를 처리한 잎을 25 ℃에서 3일간 유지한 후 상처부위의 괴저반점을 조사하였다. 배양여액의 에칠아세테이트 추출물을 배양여액과 같은 방법으로 처리하였다.

바. 병원균 배양여액으로부터 독성물질의 부분정제

배양여액의 에칠아세테이트 추출물을 완전히 건조하고 소량의 아세톤에 녹인후 silica gel chromatography plate에 loading하고 chloroform/methyl alcohol (9:1, v/v)용매시스템으로 전개하였다. 에칠아세테이트 추출물이 전개된 silica gel을 각 fractionquf로 분획하여 독성을 알아보고자 포도나무 잎에 생물검정을 실시하였다. 독성활성을 나타내는 fraction을 mini-silica gel column chromatography를 통해 회수한 후 다시 독성을 확인하였다.

사. 포도 새눈무늬병에 대한 생화학적 변화 조사

포도 새눈무늬병균의 접종에 의한 포도나무 식물체의 salicylic acid, H2O2, resveratrol 등의 함량 변화를 알아보고자 공시재료를 온실에서 pot에 1아삽 삽목하여 전엽 7매이상, 초장 40㎝ 이상 생육시켜 병원균을 접종하였다. 병원균 접종 후 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 시간 경과 후 엽을 채취하여 액체 질소에 동결시킨 다음 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 처리 당 5반복으로 하였다.

1) Salicylic acid 분석

포도 새눈무늬병 병원균 접종 후 포도나무의 생화학적 변화에서 salicylic acid의 함량 변화는 Raskin 등(1989)의 분석법을 응용하여 분석하였다. 초저온 냉동고에 보관 중인 시료를 정량한 후 methanol 15㎖을 첨가하여 homogenizer (Ultra Turrax T25, IKA labortechnik, USA)로 13,000 rpm, 4분간 시료를 분쇄하고 원심분리기를 이용하여 22,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상징액을 취하여 100 ball flask에 넣고 rotary evaporator에서 감압 농축시켰다. 농축된 시료에 1 ml methanol을 첨가하여 resolving 시킨 후 N_2 gas로 말렸다. 농축된 시료는 다시 0.25㎖methanol을 첨가하여 resolving 시킨 후 0.45㎛ membrane filter로 filtering한 후 HPLC에 injection하였다.

HPLC에 의한 함량 분석은 degasser, Binary Pump, Autosampler, Column Compartment 및 UV Detector로 구성된 Waters 'Breeze system' (Waters Co., USA)에서 column은 Polarity-C18 (3.9x150 mm, Waters)를 이용하였다. 이동상은 methanol : water : glacial acetic acid (40 : 60 : 1=v/v/v) 비율로 조제하였다. 이동상의 흐름은 1 ml/min, column 온도는 35℃로 설정하였고, salicylic acid를 검출하기 위한 검출 파장은 285nm로 하였으며 검출시간은 11.7분대였다.

Salicylic acid의 standard는 Sigma (USA)에서 제조한 시약을 구입하여 분석하였다. Fig. 2는 salicylic acid standard와 전처리한 시료의 HPLC 분석 크로마토그램을 나타낸 것이다.

2) Resveratrol 함량 분석

추출 방법은 Okuda와 Yokotsuka (1996), 전 (2003)의 분석 방법을 응용하여 분석하였다. 초저온 냉동고에 보관 중인 시료를 정량한 후 methanol 30mL를 첨가하여 homogenizer (Ultra Turrax T25, IKA labortechnik, USA)로 13000rpm, 4분간 시료를 분쇄하고 sonic bath에 넣어 30℃에서 15분간 sonication한 후 감압 glass funnel 에 Whatman No. 2 filter paper로 소량의 methanol을 첨가하면서 여과하였다. 추출용액을 ball flask에 넣어 40℃로 조정된 rotary evaporator에서 감압 농축시키고 농축된 시료에 methanol 1mL를 첨가하여 resolving 시킨 후, 0.45 ㎛ membrane filter로 filtering 한 후 HPLC에 injection하였다.

함량 분석은 Hewlett Packard 1100 series (Agilent Co., USA)에서 column은 Eclipse XDB-C18 (4.6x250mm, Hewlett Packard)를 이용하였다. 이동상으로는 acetonitrile 20과 buffer로 sodium phosphate (NaH_2PO_4) 80비율로 30 mM을 만들어 phosphoric acid로 pH 2.5를 조절한 다음 사용하였다. 이동상의 흐름은 1 ml/min, column 온도 35℃, 검출 파장 306nm, 검출시간은 14.1분대였다. Resveratrol standard는 Sigma(R 5010, USA)에서 제조한 trans-resveratrol (trihydroxy stilbene)을 구입하여 분석하였으며, resveratrol standard와 전처리한 시료의 HPLC 분석 크로마토그램은 Fig. 3과 같다.

3) H_2O_2 함량분석

H_2O_2 함량 측정을 위한 추출 방법은 Wilhelm 등 (2003)의 방법을 응용하였다. 초저온 냉동고에 보관 중인 시료를 0.1 g으로 정량한 다음 cold acetone 500 μL를 첨가하여 homogenizer로 분쇄하였고 증류수 300 μL 첨가하면서 여과하였다. 여과한 시료를 reaction buffer(시료:reaction buffer=4:1)에 반응시킨 후 상온에서 45분간 놓아두었다가 UV spectrophotometry를 이용하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다. Reaction buffer는 1.25 mM ammonium ferrous sulfate (0.036/100 ml), 500 μM xylenol orange (0.038/100 ml), 125 μM H_2SO_4 (1.22/ml), 500 μM sorbitol (9.0/100 ml)로 조성하였다.

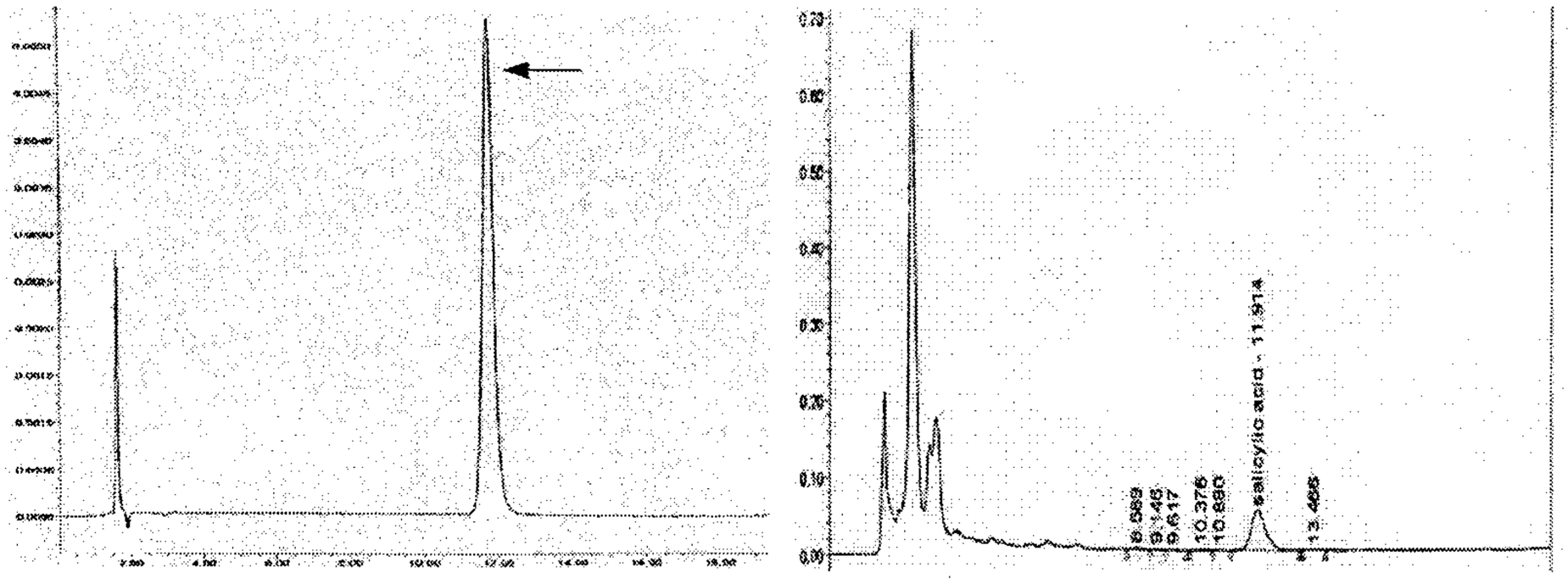

Fig. 2. Peak of salicylic acid standard chromatogram at 285 nm (left). Arrow presents peak of salicylic acid. HPLC chromatogram of leaf of 'Campbell Early' (right).

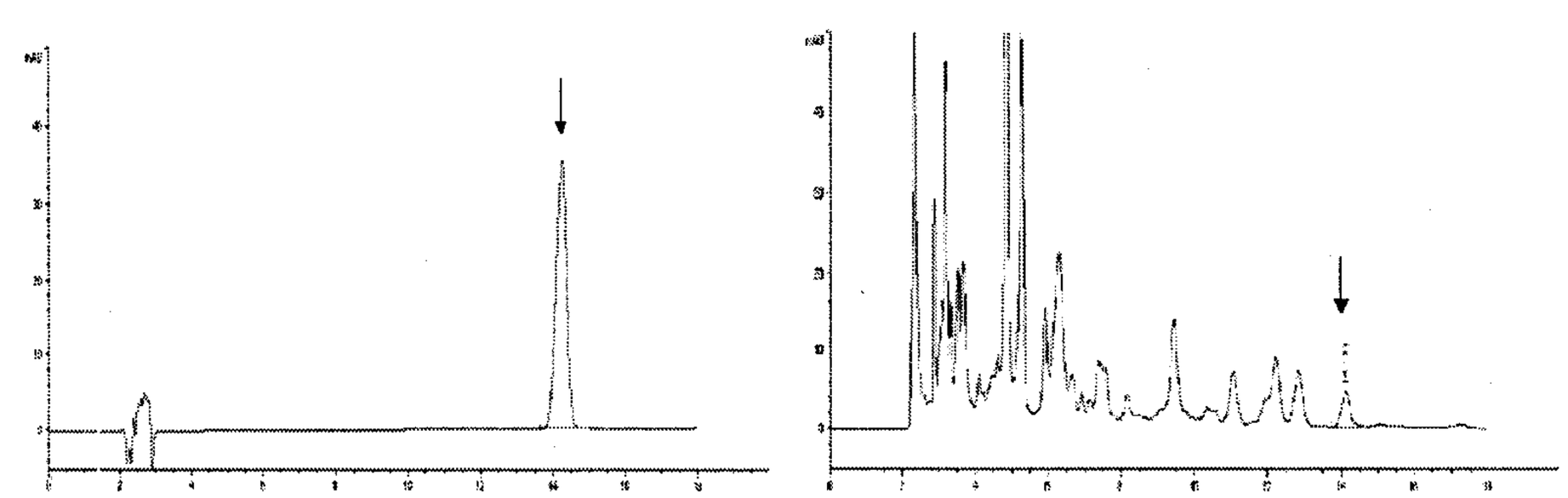

Fig. 3. Peak of resveratrol standard chromatogram at 285 nm (left). Arrow presents peak of restveratrol. Leaf HPLC chromatogram of 'Campbell Early' (right).

3. 결과 및 고찰

가. 병원균접종을 통한 저항성 검정체계 확립

1) 적정 포자 농도 구명

Fries medium에서 배양한 균체를 homogenizer로 완전히 마쇄한 후 V-8 juice agar에 고르게 도말하고 근자외선 광이 조사되는 항온기에서 2일간 배양하여 포자형성을 유도하였다. 형성된 병원균 포자를 멸균된 붓으로 멸균수에 회수하여 10^4 ~ 10^6 /ml의 농도로 조절한 후 포도나무의 신초와 잎에 분무접종한 후 포도 품종간의 새눈무늬병 저항성 검정체계 구축에 적합한 농도를 구명하고자 하였다. 인위적으로 병원균 포자를 접종한 후 2주 뒤에 의해 전형적인 새눈무늬병반이 잎과 신초에 형성되었다. 잎과 신초에 병원균 포자를 접종하였을 경우 저항성과 감수성인 품종을 구별하는 데에는 10^5 spores/ml의 포자 농도가 가장 효율적이었다 (그림 4).

2) 적정 습실 유지기간 구명

병원균 접종 후 포화습도의 유지기간을 알아보기 위하여 10^5 spores/ml의 농도로 조절된 병원균 포자현탁액을 분무접종하고 28℃의 항온항습기에서 24~96시간 동안 유지하였다. 24시간 동안 습실에서 유지된 감수성 품종인 'Rizmat' 에서는 잎과 신초에 전형적인 새눈무늬병반이 형성되었다.

그러나, 48시간 또는 72시간을 유지하였을 경우 저항성과 감수성 품종간의 명확한 병반형성차이를 나타내었다(그림 5). 따라서 포도에 있어서 새눈무늬병에 대한 품종간의 효율적인 저항성 검정에는 병원균 접종 후 포화습도의 유지기간이 48시간 또는 72시간이 적합한 것으로 여겨진다.

3) 포도나무 식물체의 적정 생육단계 구명

병원균 접종에 의한 포도 새눈무늬병 저항성 검정을 위한 포도나무 식물체의 최적 생육 단계를 구명하고자 8~10매의 전엽을 유지한 포도 삽목묘에 병원균 포자현탁액을 분무접종하고 포화습도에서 48시간 동안 유지하였다.

병원균 접종 결과, 어린 잎 일수록 병원균에 감수성이며 오래된 성엽에는 저항성 품종과 감수성 품종 모두에서 전혀 병반이 형성되지 않았다. 따라서 병원균접종 후 신초선단으로부터 3~4번째 잎에 형성된 단위면적당 병반의 수를 조사함으로써 포도 품종 내에서의 저항성과 감수성을 구분할 수 있었으나, 8엽 이상의 성엽에서는 저항성 판별이 곤란하였다(그림 6). 따라서 포도 새눈무늬병에 대한 포도 품종 간 저항성 검정에는 5~7매의 전엽을 갖는 식물체가 가장 적합할 것으로 사료된다.

특히 포도 새눈무늬병에 대해 저항성인 포도 품종을 선발하는 데에는 10^5 spores/ml의 포자현탁액을 5~7매의 전엽을 유지한 포도나무 식물체에 분무 접종하고 48~72시간동안 포화습도를 유지한 후 2주 뒤에 3~4엽에 형성된 단위면적당 병반수를 조사하는 것이 가장 효과적이라 할 수 있다.

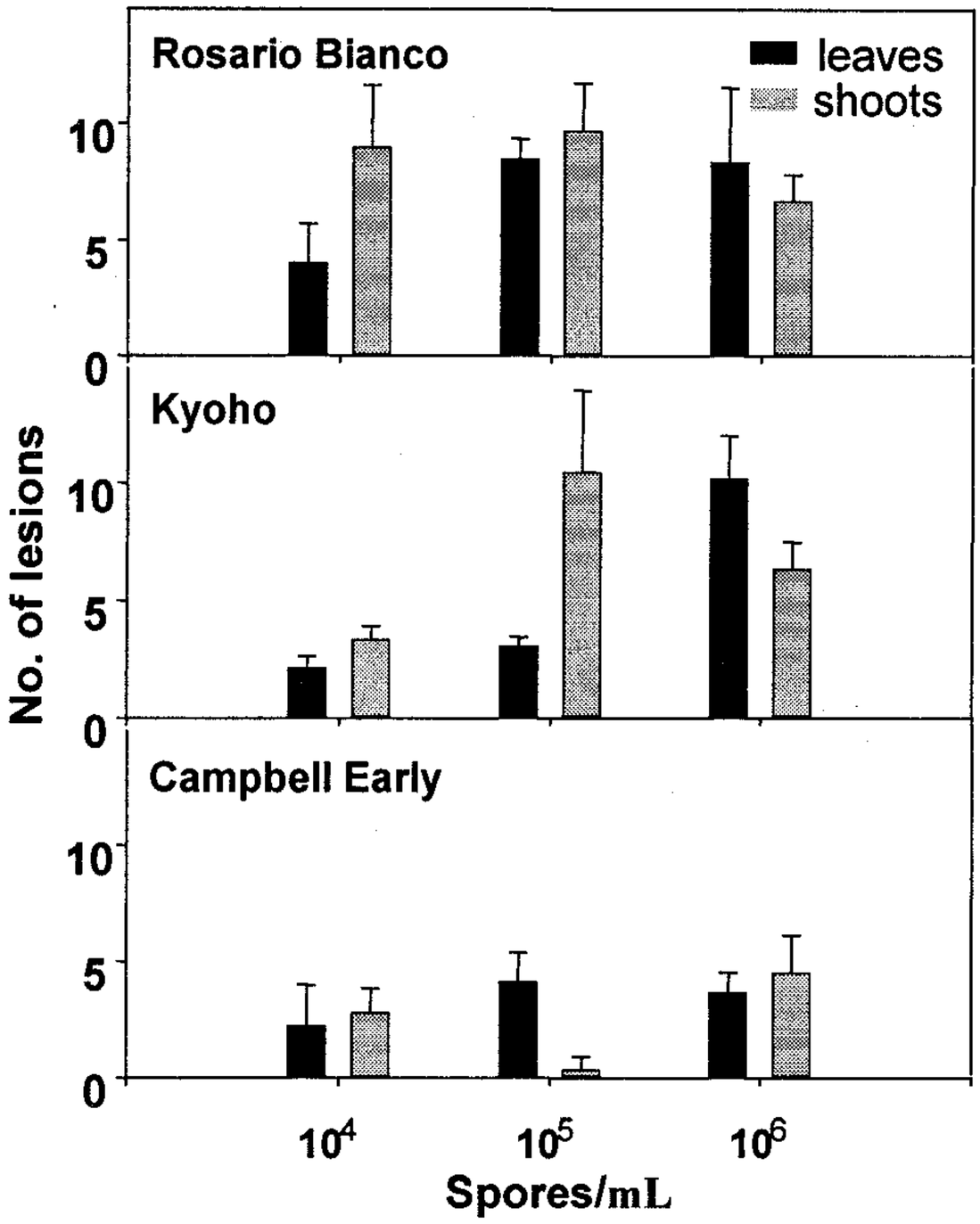

Fig. 4. Development of lesions of anthracnose on grapevine leaves and shoots by different concentrations. The number of lesions in 3 ㎠ per leaf, and in upper 10 ㎝ per shoot was counted 10 days after spore suspension inoculation of *E. ampelina* and incubation for 48 h in a dark moisture room. Vertical bars indicate standard error.

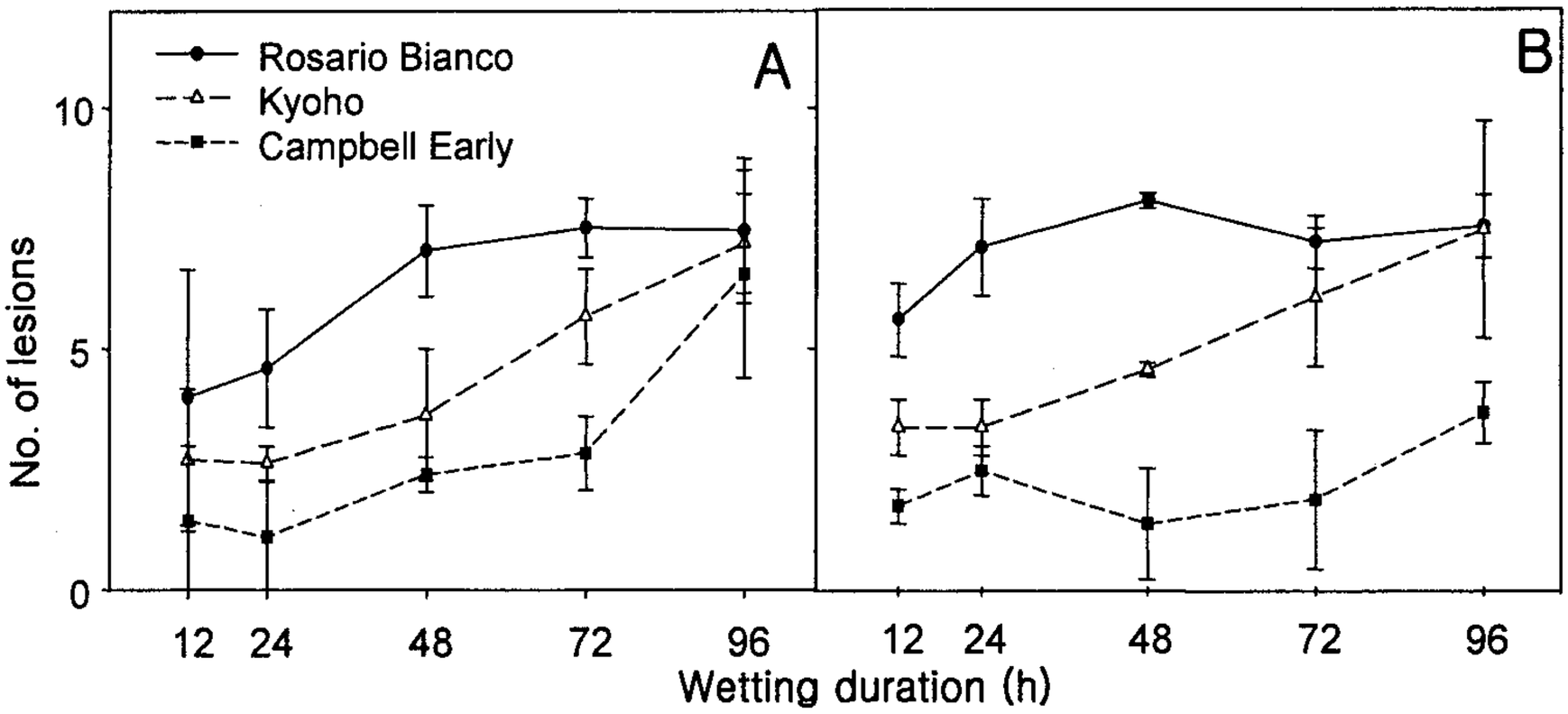

Fig. 5. Number of lesions of anthracnose on grapevine leaves (A) and shoots (B) by humidity durations. Leaves and shoots were inoculated with spore suspension of *E. ampelina* at 10^5 spores/mL and incubated in a moisture room for given periods. Vertical bars indicate standard error.

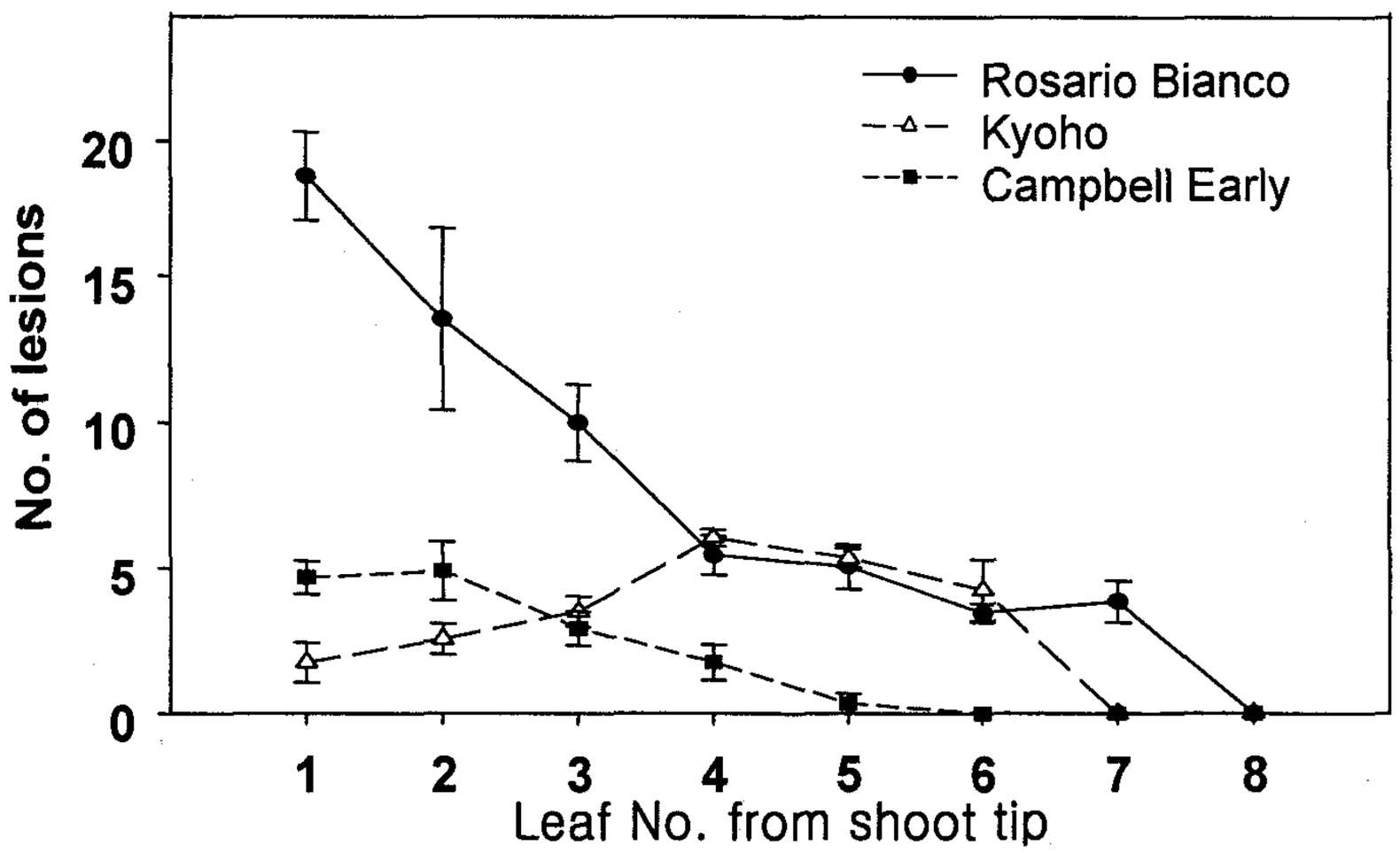

Fig. 6. Pattern of changes with age in susceptibilities of grape leaves to *E. ampelina*. The number of lesions in 3 ㎠ per leaf was counted 10 days after spore suspension inoculation of *E. ampelina* and incubation for 48 h in a dark moisture room. Vertical bars indicate standard error.

4) 병원균 접종에 의한 새눈무늬병 품종 저항성 검정

주요 포도 품종을 대상으로 10^5spores/㎖의 포자현탁액을 접종하고 잎과 신초에 형성된 병반수와 포장에서 나타난 병반수를 비교하여 저항성을 판별하였다. 병원균 접종결과 'Rosario Bianco', 'Kaiji', 'Rizamat' 등의 품종은 감수성이었고, 'Kyoho'와 'Benifuji' 품종은 중도 감수성을 나타내었으며, 'Campbell Early'와 'Niagara'는 저항성이었다(표 1, 3).

5) 인공 접종 검정과 포장저항성 검정 비교

포장에서의 새눈무늬병 저항성은 3년에 걸쳐서 조사하였으며 포장에서의 자연감염에 의해 나타난 잎과 신초의 병반 수를 조사하였다. 포장에서의 포도 새눈무늬병 저항성 조사 결과는 온실내에서의 병원균접종에 의한 검정 결과와 유사하였다.

특히 병원균 접종의 결과와 마찬가지로 'Rosario Bianco', 'Kaiji', 'Rizamat' 등의 품종은 감수성이었고, 'Kyoho'와 'Benifuji' 품종은 중도 감수성을 나타내었으며, 'Campbell Early'와 'Niagara'는 저항성이었다(표 2, 3).

포도 새눈무늬병에 대한 저항성은 포도 품종에 따라 차이가 큰 것으로 알려져 있다. 예를 들어 유럽종인 *V. vinifera* 포도는 매우 감수성이고, 미국종인 *V. labrusca* 와 교잡종은 저항성 또는 중도저항성을 나타내며 또한 *V. rotundifolia* 는 포도 새눈무늬병원균인 *E. ampelina* 에 완전 내성을 보이는 것으로 보고되어 있다(Kitajima, 1989; Mortensen, 1971; Olmo, 1971; Vidhyasekara and Charan 1972; Wang et al., 1998). 본 연구에서도 품종에 따라 새눈무늬병에 대한 저항성에 차이를 나타내었다. 그러나 병원균 접종 결과와 배양여액을 이용한 검정결과가 일치하였으며 향후 저항성 유전자원 선발을 위한 저항성 검정에는 배양여액을 이용한 방법이 가능하리라고 하다고 본다.

포도 새눈무늬병에 대한 저항성 검정은 주로 교배실생 또는 삽목묘를 포장에 직접 재식한 후 포도 생육기간의 자연감염에 의해 나타나는 병반을 조사하여 왔으나 (Mortensen, 1981; Wang et al., 1998), 포장에서의 포도 새눈무늬병 저항성검정은 많은 시간과 노동력 및 경비가 소요되는 단점이 있으므로 본 연구에서 개발한 병원균 접종에 의한 새눈무늬병 저항성 검정법은 노동력과 시감 및 많은 경비를 절약할 수 있을 것으로 기대된다.

Mortensen (1981)은 이미 어린 유묘실생을 대상으로 포도 새눈무늬병균인 *E. ampelina* 을 인공접종을 시도하였으나 결국 접종에 의한 저항성 검정법은 수년동안의 몇 개월에 걸친 포장에서의 저항성 검정법보다 신빙성이 떨어진다고 결론지었었으며, 또한 그러한 결과는 병원균의 포자형성이 균일하지 않기 때문에 적정한 병원균 포자를 획득할 수 없었기 때문이라고 보고하였다. *Elsinoe* 속의 포자형성은 인공배지상에서 유도되기 쉽지 않다(Timmer et al., 1996; Whiteside, 1975). 그러나 본 연구에서는 액체배양, 마쇄, 고체배지에의 도말 및 근자외선광하에서의 배양 등의 방법을 통해 인공배지 상에서의 *E. ampelina*의 양호한 포자형성을 유도하였으며 병원균 분무접종에 필

요한 포자를 충분히 확보할 수 있었다.

본 연구에서 온실 내에서 병원균 접종에 의해 저항성을 검정한 결과에서 저항성으로 판별된 품종은 포장에서의 저항성 검정결과에서도 저항성으로 나타났다.

이러한 온실에서의 저항성 검정 체계는 정확히고 경제적이며 많은 노동력을 절약할 수 있는 내병성 포도 유전자원 선발 및 새로운 포도 품종을 개발 할 수 있는 효율적인 체계라 할 수 있다.

Table 1. Lesions by inoculating spore suspension of *E. ampelina*.

Cultivar	No. of lesions on	
	Leaf	Shoot
Benianyo	2.9 q[a]	1.2 nopqr
Benifuji	5.3 jklmno	1.1 opqrs
Beniizu	3.7 opq	0.8 qrs
Beniyamabico	2.6 de	8.1 c
Beniizuhio	4.1 nopq	1.1 opqrs
Black Eye	12.0 a	11.1 a
Black Olympia	9.2 ef	5.2 efgh
Black Sanjaku	9.0 fg	6.6 d
Campbell Early	5.2 ijkl	0.9 pqrs
Choryo	3.7 klmnopq	1.0 opqrs
Emperatirz	2.5 pq	0.0 s
Fuen	4.7 jklmno	3.8 ijk
Fujiminori	5.1 jklm	2.4 nopq
Guroyu	8.5 ef	6.1 de
Hokkou	12.0 a	8.6 c
Honey Black	7.3 fg	4.4 hij
Honey Red	2.3 q	0.2 rs
Kaiji	10.1 fg	8.5 c
Kitasaki Red	8.1 gh	5.3 def
Koho	5.9 jklm	3.6 jklm
Kokuou	5.4 hij	4.4 ghij
Kokuryou	3.7 mnopq	1.1 opqrs
巨Kyoho	5.9 jklm	3.0 klmn
Mario	11.3 ab	10.1 b
Neo Muscat	6.0 ijk	3.6 jklm
Niagara	2.2 pq	0.9 qrs
Niunai	11.2 ab	8.7 c
Pione	24.2 lmnopq	3.8 ijk
Red Queen	7.2 fg	4.9 ghi
Rhodo Berry	6.6 ghi	5.4 efgh
Rizamat	11.5 abc	8.7 c
Rosario Bianco	8.1 fg	3.5 jklm
Ruby Okuyama	9.1 def	4.8 ghi
Ryouyou	5.5 jklmn	3.7 ijkl
Ryuho	8.2 fg	4.6 ghi
Sekirei	8.0 ef	5.4 efg
Shigyoku	4.0 lmnopq	1.2 opqrs
Takao	9.5 abc	8.4 c
Takasumi	3.7 jklmnop	1.0 pqrs
Tamasizuku	2.9 mnopq	2.7 lmno
Tensyu	4.1 jklmn	3.0 klmn
Venus	3.4 opq	2.6 mnop

[a]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 2. Incidence of anthracnose lesions in vineyard.

Cultivar	No. of lesions on			
	Leaf		Shoot	
Benianyo(紅南陽)	9	q[a]	10.7	nopqr
Benifuji(紅富士)	23	jklmno	9.6	opqrs
Beniizu(紅伊豆)	17	opq	3.4	qrs
Beniyamabico	6	de	80.1	c
Beniyamabico(紅産彦)	82	pq	8.2	opqrs
Benizuiho(紅瑞寶)	21	nopq	6.8	opqrs
Black Eye	100	a	100.0	a
Black Olympia	72	ef	42.2	efgh
Black Sanjaku(三尺)	70	fg	56.7	d
Campbell Early	32	ijkl	5.4	pqrs
Choryu(長龍)	17	klmnopq	6.9	opqrs
Emperatirz	5.5	pq	0.0	s
Fuen(富苑)	27	jklmno	27.5	ijk
Fujiminori(藤念)	31	jklm	13.7	nopq
Guroryu(黑龍)	65	ef	50.2	de
Hokkou(北光)	100	a	75.4	c
Honey Black	53	fg	33.9	hij
Honey Red	3	q	1.6	rs
Kaiji(甲斐路)	80	fg	75.0	c
Kitasaki(北奇) Red	60	gh	48.3	def
Koho(紅峰)	39	jklm	25.6	jklm
Kokuou(黑王)	34	hij	34.4	ghij
Kokuyou(黑曜)	17	mnopq	9.8	opqrs
Kyoho(巨峰)	39	jklm	20.0	klmn
Mario	93	ab	90.1	b
Neo Muscat	40	ijk	25.1	jklm
Niagara	2	pq	5.0	qrs
Niunai	92	ab	77.6	c
Pione	20	lmnopq	28.6	ijk
Red Queen	52	fg	38.4	ghi
Rhodo Berry	46	ghi	42.3	efgh
Rizamat	95	abc	78.0	c
Rosario Bianco	60	fg	24.7	jklm
Ruby Okuyama	71	def	38.3	ghi
Ryogyoku	35	jklmn	26.7	ijkl
Ryuho(龍寶)	62	fg	36.4	ghi
Sekirei(赤嶺)	60	ef	44.4	efg
Shigyoku(紫玉)	20	lmnopq	7.8	opqrs
Takao	75	abc	74.0	c
Takasumi(高墨)	17	jklmnop	6.4	pqrs
Tamasizuku	19	mnopq	17.1	lmno
Tensyu(天秀)	21	jklmn	20.4	klmn
Thompson Sds	90	abc	79.6	c
Venus(金星)	14	opq	15.8	mnop

[a]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 3. Varietal susceptibility in grape leaves and shoots by pathogen ioculation of *E. ampelina* and field test.

Variety	No. of lesions in a greenhouse[z]		Infection rate in a vineyard (%)[y]	
	Leaf	Shoot	Leaf	Shoot
Benifuji	3.5 a[x]	6.7 bcd	24.8 ef	9.6 ef
Campbell Early	1.3 b	1.9 f	3.4 f	5.4 f
Fujiminori	3.1 a	7.1 bc	30.7 def	13.7 de
Kaiji	4.4 a	8.7 ab	54.0 bcd	75.0 a
Kyoho	3.6 a	5.5 cde	32.7 cde	20.0 cd
Niagara	1.2 b	3.9 e	4.0 f	5.0 f
Rizamat	4.9 a	4.9 de	94.3 a	78.0 a
Rosario Bianco	4.4 a	9.8 a	61.0 bc	24.7 c
Ruby Okuyama	4.2 a	7.3 bc	68.8 ab	38.3 b

[z]The number of lesions in 3 ㎠ per leaf was counted 10 days after spore suspension inoculation of *E. ampelina* and incubation for 48 h in a dark moisture room.
[y]Infection rates were evaluated by investigation of lesion incidence on the 10 leaves in upper part of shoots from the shoot tip and on the shoots in the vineyards.
[x]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

나. 병원균 배양여액을 이용한 저항성 검정체계 구축

1) 병원균 배양여액 및 에칠아세테에이트 추출물의 기주특이성

국내의 주요 포도 품종을 대상으로 병원균의 배양여액과 배양여액을 에칠아세테에이트로 추출한 추출물에 대한 괴저반응을 조사하기 위해 포도나무잎에 생물검정을 실시하였다. 검정 결과, 공시품종 중에는 배양여액에 대해 저항성, 중도저항성 및 감수성 품종이 모두 존재하였음을 확인하였다.

검정을 실시한 품종 중에 'Kaiji' 와 'Rizamat' 등은 감수성이었고, 'Campbell Early'와 'Niagara' 등은 병원균인 *E. ampelina*가 생성하는 배양여액에 감수성이었다(표 4, 그림 7). 또한 배양여액에 대한 품종의 저항성 및 감수성 반응은 배양여액을 추출한 에칠아세테이트 추출물에 대한 반응과 일치하는 결과를 보였다.

이러한 병원균의 배양여액 및 배양여액의 에칠아세테이트 추출물에 대한 저항성 차이는 병원균 접종법에 의한 저항성차이는 물론 포장에서의 저항성 차이와 일치하는 것으로 포도 품종간의 포도 새눈무늬병에 대한 저항성을 검정하는 새로운 기술로 활용가능하다 하겠다.

Fig. 7. Necrosis on the grapevine leaves by treatment of culture filtrates from *E. ampelina*.

2) 배양여액의 농도에 따른 반응 차이

포도 새눈무늬병에 감수성인 'Rosario Bianco' 품종의 잎에 병원균의 배양여액을 여러 가지 농도로 희석하여 상처를 가한 후 처리할 경우 1/8의 낮은 농도에서도 잎의 상처부위에서 독성이 나타났다. 따라서 포도 새눈무늬병원균이 생성하는 배양여액은 병해에 감수성인 품종에서는 다양한 농도로 희석하여도 독성을 발현하며 낮은 농도에서도 독성을 발휘하였으며 농도가 높을수록 강한 독성을 발휘한다는 것을 알 수 있었다(표 4). 그와 반대로 저항성인 'Sheridan' 품종의 잎에서는 희석되지 않은 농도에서도 괴저와 같은 증상이 전혀 나타나지 않았다.

Table 4. Toxicities of culure filtrates and their ethyl acetate extracts to several grapevine cultivars.

Cultivars	CFCF				EtoAc extract			
	1	4	16	32	10^{-1}	1	10	100
Campbell Early	+	±	−	−	+	+	−	−
Kaiji	+++	++	++	+	+++	++	++	++
Kyoho Tobu selection	++	++	+	−	++	++	++	+
Kyoho	++	++	+	−	++	++	+	+
Niagara	±	−	−	−	+	+	−	−
Red Queen	+	+	+	+	++	+	+	+
Rizamat	+++	++	++	+	+++	+++	+++	++
Rosario Bianco	+++	++	+	+	+++	+++	++	+
Ruby Okuyama	++	++	+	−	++	++	+	+
Sheridan	−	−	−	−	+	−	−	−

+++: necrosis over 3 mm from wounded spot, ++; necrosis of 2-3 mm over wounded spot, +; necrosis on wounded spot, ±; slight necrosis, −; no necrosis.

3) 배양여액 생산을 위한 병원균 배양 최적 배지 선발

병원균 생육 및 독성물질을 함유한 배양여액 생산에 최적인 배지를 선발하기 위하여 Czapek dox mediumr, potato dextrose broth, asparagine medium, Richard's solution agar, V-8 juice medium 등의 배지에서 병원균을 배양하고 생육을 조사하고 배양여액을 취하여 독성활성을 조사하였다. 그 결과, V-8 juice와 potato dextrose broth에서 병원균의 생육이 가장 양호하였으나 독성물질 생산은 Richard solution과 asparagine 배지에서 가장 양호하였다(표 5). 향후 배양여액으로부터 독성물질의 생산을 유도하거나 독성성분을 분리할 경우 이상의 Richard solution이나 asparagine medium을 사용하는 것이 효과적일 것이다.

Table 5. Toxicties of culture filtrates produced by *E. ampelina* in various media.

Media	Culture filtrates				Ethyl acetate extracts			
	1	2	4	8	10^{-1}	1	10	100
PDB	±	±	−	−	+	+	−	−
Asparagine	++	+	±	−	++	+	±	−
Czapek Dox	++	+	−	−	+	±	−	−
Richard Solution	+++	+++	++	±	+++	+++	++	±
V-8 juice broth	−	−	−	−	±	−	−	−
YEP	+	±	−	−	±	−	−	−

+++: necrosis over 3 mm from wounded spot, ++; necrosis of 2-3 mm over wounded spot, +; necrosis on wounded spot, ±; slight necrosis, −; no necrosis.

4) 독성물질의 부분정제

포도 새눈무늬병원균인 *E. ampelina*의 배양여액으로부터 독성물질을 순수분리하기 위하여 배양여액을 에칠아세테이트로 추출하고 회전감압농축농축기로 완전히 말린후 이를 다시 소량의 아세톤에 녹였다. 이들을 TLC (chloroform: methyl alcohol, 9:1, v/v)로 전개한 후 각각의 fraction을 회수한 후 잎에서의 독성을 검정하였다. 그 결과 4번째, 8번째와 9번째의 fraction에서 감수성 포도잎에 독성이 발휘되었다(표 6, 그림 7). 이들 독성 활성 fraction은 이후 독성물질을 순수분리하는 과정이나 포도 새눈무늬병의 발생양상을 이해하는데 중요한 재료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 Silica gel과 silicic acid로 충진된 mini-column chromatography를 실시하였다. Methanol과 chloroform의 용매 시스템으로 전개하여 6개의 분획을 획득하였다. 이들 분획을 포도나무 잎에 bioassay한 결과 7:3, 6:4, 5:5의 fraction에서 강한 독성이 발현되었다(표 7).

Table 6. Toxicities of each fraction from ethyl acetate extracts.

Fraction	Paper disk	Silica gel
0	+++	++
1	++	+
2	±	++
3	+	−
4	++	+
5	±	−
6	±	−
7	±	−
8	++	±
9	++	+
10	+	−

(Thin Layer Chromatography developing system ; Chloroform:Methanol=9:1,v/v).
+++: severe necrosis, −: no necrosis.

Table 7. Toxicity of fractions eluted by column chromatography.

Fraction Methanol:Chloroform(v/v)	Resin	
	Silicic acid	Silica gel
95:5	-	-
9:1	-	-
8:2	+	+
7:3	++	++
6:4	++	++
5:5	++	++

+++: severe necrosis, -: no necrosis.

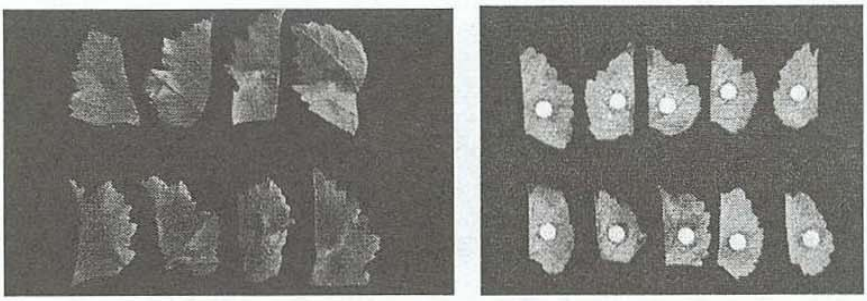

Fig. 4. Toxicity of fractions eluted by column chromatography.

5) 포도 새눈무늬병균 배양여액을 이용한 품종 저항성 검정

포도 육종 프로그램에 있어서 유용한 유전자원, 육종소재의 개발은 매우 중요하면서도 성행되어야 할 과제이다. 최근 국내에서 유럽종 포도 품종의 재배가 증가함에 따라 새눈무늬병의 발생도 점차 증가하고 있으며 이에 다른 저항성 품종의 선발이 요구되고 있다. 병원균 접종과 포장 저항성 평가를 통해 얻은 결과로는 포도 새눈무늬병해에 대한 저항성은 포도 유전자원 중에서 품종에 따라 많은 차이가 있는 것으로 나타났다. 포도 새눈무늬병 저항성은 주로 포장에서의 자연감염에 의한 병징 발현을 조사하여 검정되어 왔으나 시간과 많은 노동력과 경비가 소요되는 단점을 지니고 있다. 본 연구에서는 앞에서 언급한 포도 새눈무늬병균의 배양여액을 이용하여 실험실내에서 간단하고 효율적으로 포도 유전자원의 품종간 저항성을 검정하였다. 원예연구소 유전자원포에 보존 중인 주요 품종과 대목, 원

종 및 원예연구소 육성 계통에 대해 저항성을 검정하였다. 주요 품종에서는 나이아가라와 홍남양 등의 품종이 저항성으로 판별되었고 마리오, 리자마트 등의 유럽종 품종이 감수성으로 판별되었다(표 8). 원예연구소에서 육성중인 실생으로는 A-468, D-2-1 등은 저항성으로, 16호, A-133등의 계통이 감수성이었다(표 9). 대목 품종 중에서는 4010, 5BB, SO4 등은 저항성이고, Harmony, 5C, 188.08 등은 감수성이었다(표 10). *Vitis* 속 원종에 있어서는 종간의 차이보다는 종 내의 계통 간에 저항성 차이를 나타내어 다양한 유전자원의 평가가 수행되어야 할 것으로 사료된다(표 11). 교배 실생 중에서 우량 형질을 보유한 저항성 3계통을 1차선발하였으며 그 과실 및 수체 특성을 표 12와 그림 5에 기술하였다.

또한 원예연구소 유전자원포에 보존 중인 품종별 저항성 정도를 판별하여 저항성(표 13), 중도저항성(표 14), 중도감수성(표 15), 감수성(표 16)으로 구분할 수 있었다. 이러한 유전자원의 판별 결과는 향후 포도 새눈무늬병 저항성 포도 품종 육성에 중요한 자료로 활용되어 육종효율을 극대화하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

포도 새눈무늬병해에 대한 저항성은 포도 유전자원 중에서 품종에 따라 많은 차이가 있는 것으로 보고되어 있다(Kitajima, 1989; Mortensen, 1971; Olmo, 1971; Vidhyasekara and Charan 1972; Wang et al., 1998). 포도 새눈무늬병 저항성은 주로 포장에서의 자연감염에 의한 병징 발현을 조사하여 검정되어 왔으나(Mortensen, 1981; Wang et al., 1998), 이는 많은 수년이라는 긴 시간과 많은 노동력과 경비가 소요되는 단점을 지니고 있다. 또한 Mortensen (1981)은 온실내에서의 병원균접종에 의한 검정법을 시도하였으나 Elsinoe 속 병원균의 인공배지에서의 포자형성 유도가 쉽지 않아 (Timmer et al., 1996; Whiteside, 1975) 결국 실패하였다. 그러나, 앞에서 언급한바와 같이 본 연구에서는 액체배지 및 고체배지를 이용하여 병원균의 포자형성을 유도하는 시스템을 개발하였으며(Yun et al., 2003), Jayasankar 등(2000)은 기내에서 *E. ampelina*의 배양여액을 이용하여 병해에 저항성인 *V. vinifera* 'Chardonay'를 선발하는 체계를 구축하였다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 병원균 접종과 포장에서의 저항성 검정법을 대체할 수 있는 효율적인 검정법의 일환으로 배양여액을 이용한 검정체계를 구축하고자 하였다. 병원균 배양여액을 이용한 bioasssay 결과, 배양여액에는 포도나무 잎에 대한 독성물질이 존재하였으며 그 물질은 기주특이적으로 작용한다는 것을 나타내었다. 배양여액의 에칠아세테이트 추출물 역시 포도나무 잎에 독성을 발현하였으며 기주특이성을 나타내었다. 또한 배양여액에 대한 기주범위는 에칠아세테이트 추출물에 대한 기주범위와 일치하는 결과를 나타내었으며 병해에 감수성인 품종에서는 낮은 농도로 희석되어도 독성이 나타나지만 저항성인 품종에서는 원액의 배양여액에도 독성이 나타나지 않았다. 이러한 양상은 사과에서의 AM-독소 및 배에서의 AK-독소에 대한 반응과 일치하는 경향이었다(Kohmoto et al., 1977, Otani et al., 1985, Park and Yu, 1988, Yu et al. 1987,

Yun and Yu, 1992).

기주특이적독소는 독소를 생성하는 병원균과 같은 기부범위를 나타낸다(Buiatti and Ingram, 1991, Grausgruber et al., 1998, Lemmens et al., 1994). 기주특이적독소는 기주식물체를 가해하는 병원균과 동일한 특이성을 발휘하기 때문에 식물병리학 및 식물육종의 작물의 병해감수성 진단(Gracen et al., 1971, Kohmoto et al., 1977, Schertz and Tai, 1969, Steiner and Byther, 1971, Wheeler and Luke, 1963, Yun and Yu, 1992), 새로운 저항성 계통 선발(Jayasankar et al., 2000, Mayama et al., 1990, Saito et al. 2001) 및 병해저항성 기구의 이해(Durbin, 1988, Johal and Briggs, 1992) 등의 duiusrn에 매우 중요한 위치를 차지하고 있다.

독소에 대한 반응의 양적인 차이는 많은 식물의 품종 간에 나타나며 이러한 차이는 병원균에 대한 저항성과 일치하고 있다(Buiatti and Ingram, 1991). 독소를 이용한 저항성인 계통 선발에 관한 연구는 Wheeler and Luke (1963)에 의해 처음 제안되었는데 그들은 *Helminthosporium victoriae*가 생성하는 기주특이적 독소인 victorin을 이용한 bioassay법을 병원균접종법에 의한 저항성 검정법을 대체하고자 하였다. 그 이후로 독소와 식물체간의 상호작용 및 병해저항성 진단에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Gracen et al., 1971; Kohmoto et al., 1977; Otani et al., 1985; Park and Yu, 1988; Schertz and Tai, 1969; Steiner and Byther, 1971; Yun and Yu, 1992).

본 연구에서는 포도나무 새눈무늬병 병원균의 배양여액을 포도나무잎에 처리하고 품종 간 반응을 조사한 결과, 병원균 접종에 의한 결과나 포장에서의 저항성 검정 결과와 일치하였다. 따라서 병원균의 배양여액을 이용한 포도 새눈무늬병 저항성 검정체계는 품종 또는 계통간의 저항성을 검정할 수 있는 효율적이고 경제적인 체계로 병원균 접종법과 병행하여 기존의 포장에 의존하는 저항성 검정체계를 대체할 수 있는 방법으로 여겨진다.

Table 8. Resistance to culture filtrates of *E. ampelina* in grapevine cultivars.

Cultivars	Culture filtrates				Ethyl acetate extracts			
	1	2	4	8	1	2	4	8
Beninanyo	−	−	−	−	−	−	−	−
Benifuji	++	±	−	−	++	±	−	−
Beniizu	++	±	−	−	++	±	−	−
Beniyamabico	+++	++	±	−	+++	++	−	−
Benizawa	++	+	±	−	++	±	−	−
Black Eye	+++	++	+	−	+++	++	+	−
Black Olympia	++	++	±	−	++	+	±	−
Black Sanjaku	++	++	±	−	++	++	−	−
Campbell Early	−	−	−	−	−	−	−	−
Changyong	++	+	±	−	++	+	+	±
Emperatz	+	+	±	−	±	±	−	−
Fuen	±	−	−	−	±	±	−	−
Fujiminori	++	+	+	±	+	+	+	−
Gururyu	+++	+	±	−	+++	+	±	−
Kokkou	+++	+	+	−	+++	+	±	−
Honey B;lack	++	+	−	−	++	±	−	−
Honey Red	+	+	±	−	+	±	−	−
Kaiji	+++	++	±	−	+++	++	±	−
Kitasaki Red	++	±	−	−	++	±	−	−
Koho	+	±	−	−	±	±	−	−
Kokuou	+	−	−	−	+	−	−	−
Kokuyou	+	±	−	−	+	±	−	−
Kyoho	++	+	+	−	++	+	±	−
Mario	+++	++	+	±	+++	+	±	−
Neo Muscat	+	+	±	±	+	+	+	+
Niagara	−	−	−	−	−	−	−	−
Niunai	+++	+	+	−	++	±	±	−
Picne	+	+	−	−	+	±	−	−
Red Queen	+++	+	−	−	+++	+	±	±
Rhodo Berry	++	+	−	−	+	+	−	−
Rizamat	+++	++	+	±	+++	++	+	±
Rosario Bianco	+++	++	+	±	+++	++	+	±
Ruby Okuyama	+++	+	−	−	+++	±	−	−
Jingyu	±	±	−	−	±	−	−	−
Longbao	++	±	−	−	++	±	−	−
Sekirei	++	+	±	−	++	+	±	−
Shigyoku	++	+	±	−	++	+	±	−
Takai	+++	++	+	−	+++	++	−	−
Takasumi	+	+	−	−	+	+	−	−
Tamasizuku	±	−	−	−	±	−	−	−
Tensu	+	+	±	−	+	±	±	−
Thompson SDS	+++	++	+	±	+++	++	±	−
Venus	±	±	−	−	±	±	−	−

+++: necrosis over 3 mm from wounded spot, ++; necrosis of 2-3 mm over wounded spot +; necrosis on wounded spot, ±; slight necrosis, −; no necrosis.

Table 9. Resistance to culture filtrates of *E. ampelina* in grapevine seedlings.

Lines	Culture filtrates				EtOAc ext(X100)			
	1	1/2	1/4	1/8	5	1	1/2	1/4
A-103	±	±	±	+	−	−	−	+
A-133	++	++	+	+	−	−	−	−
A203	±	±	−	−	+++	−	−	−
A-268	±	−	−	−	−	−	−	?
B-255	−	−	−	−	−	−	−	−
A-536	++	−	−	−	−	−	−	−
14호	+	±	±	−	±	−	−	−
B-296	−	−	−	−	−	−	−	−
92-02-28	++	+++	+	+	+	−	+	−
삼1-14	−	−	−	−	−	−	−	−
S-13-13(22)	+++	+++	++	++	−	−	−	−
S-1-9	+++	−	−	−	−	−	−	−
S-2-9	++	++	+	±	±	−	+	−
SB-1-3	+	±	++	+	+	−	−	−
SB-2-7	+	−	−	−	−	−	−	−
A-450	−	−	−	+	−	++	++	++

+++: necrosis over 3 mm from wounded spot, ++; necrosis of 2-3 mm over wounded spot +; necrosis on wounded spot, ±; slight necrosis, −; no necrosis.

Table 10. Resistance to culture filtrates of *E. ampelina* in grapevine rootstocks.

Varieties	Culture filtrates				EtOAc ext(X100)			
	1	1/2	1/4	1/8	5	1	1/2	1/4
0236	−	−	−	−	−	−	−	−
101-14	−	−	−	−	−	−	−	−
1103P	±	±	±	±	±	±	±	±
110R	−	−	−	−	−	−	−	−
140R(VF)	−	−	−	−	−	−	−	−
188.08	++	++	−	−	±	−	−	−
196-17	−	−	−	−	−	−	−	−
216-3	±	−	−	−	+	−	−	−
225R	±	±	−	−	−	−	−	−
3306	±	±	−	−	−	−	−	−
3309	±	−	−	−	−	−	−	−
333EM	−	−	−	−	−	−	−	−
4010	−	−	−	−	−	−	−	−
410A	+++	+++	++	−	+	+++	+++	+++
41B	−	−	−	−	−	−	−	−
420A(VF)	±	−	−	−	−	−	−	−
44-53M	−	−	−	−	−	−	−	−
5BB(VF)	−	−	−	−	−	−	−	−
5C	++	++	±	±	+	−	−	−
7120C	±	−	−	−	−	−	−	−
779P	−	−	−	−	−	−	−	−
8B	±	−	−	−	−	−	−	−
99R	−	−	−	−	±	−	−	−
Freedom	±	±	±	−	−	−	−	−
Harmony	+++	+++	++	−	+++	−	−	+
SO4	−	−	−	−	−	−	−	−
Cosmo 10	−	−	−	−	−	−	−	−
Golia(VF)	±	−	−	−	±	±	±	±

+++: necrosis over 3 mm from wounded spot, ++; necrosis of 2-3 mm over wounded spot +; necrosis on wounded spot, ±; slight necrosis, −; no necrosis.

Table 11. Resistance to culture filtrates of *E. ampelina* in *Vitis* species.

Species	Culture filtrates				EtOAc ext(X100)			
	1	1/2	1/4	1/8	5	1	1/2	1/4
150-44 (Amurensis GVIT)	±	±	±	−	±	+	±	−
Ⅲ 41 (Cinerea GVIT 0516)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
Ⅲ 45 (Cinerea GVIT 0143)	++	+	+	±	−	−	−	−
Ⅲ 46 (Cinerea GVIT 0234)	+++	+++	++	+	++	+	+++	+++
Ⅲ 49 (Cinerea GVIT 0233)	−	−	−	−	−	−	−	−
Ⅲ 58 (Cinerea GVIT 0219)	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+
Ⅲ 65 (Cinerea GVIT 0259)	+++	+++	−	++	+++	+++	+++	+++
Amurensis GVIT 0689	−	−	−	−	−	−	−	−
Amurensis GVIT 0741	++	+++	+++	+++	+++	−	−	−
Amurensis GVIT 1264	−	−	−	−	−	−	−	−
Amurensis GVIT 1265	+++	−	+	++	++	−	−	−
Amurensis GVIT 1267	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Amurensis GVIT 1269	±	±	−	−	−	−	−	−
Amurensis GVIT 1280	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Amurensis GVIT 1282	++	++	±	−	−	−	−	−
Amurensis GVIT 1286	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Amurensis GVIT 1290	+++	+++	+	−	+	+	+	−
Amurensis GVIT 1293	+++	++	++	±	++	++	+++	++
Amurensis GVIT 1295	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
B 47 (Cinerea GVIT 0270)	+	−	−	−	−	−	−	−
B 49(Cinerea GVIT 0271)	++	+++	+	±	+	−	−	−
B 55 (Cinerea GVIT 0272)	+	±	+	++	++	−	++	±
B 9(Cinerea GVIT 0170)	−	−	−	−	−	−	−	−
GBC 12 (Aestivalis GVIT)	+	++	+	+	+	+	±	±
GBC 17 aestivalis GVIT 0214	+	+	+	+	±	−	−	−
Vitis arizonica	−	−	−	−	−	−	−	−
Vitis cariacea	+	+	−	−	−	−	−	−
Vitis longii	+++	+	−	−	+	+	−	−
Rem 46-77 (Aestivalis)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Rem 48-77 (Aestivalis)	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
Rem NE 19 (Aestivalis)	++	++	++	±	++	++	+	+
Rem NE 4(Aestivalis GVIT 0994)	−	−	−	−	−	−	−	−

+++: necrosis over 3 mm from wounded spot, ++; necrosis of 2-3 mm over wounded spot +; necrosis on wounded spot, ±; slight necrosis, −; no necrosis.

Table 12. Major characteristics of grapevine seedlings preliminarily selected as candidates with resistance to anthracnose.

Cross	Ripen -ing	Cluster Wt. (g)	Berry Wt. (g)	Ckin Color	Seeds	Bloom -ing	TSS (°Bx)	Acidity (%)	Flavor
Tano Red x Super Hamburg 87-2-15(B-255)	9.27	255	5.8	Black	2~3	Midium	18.1	0.52	Muscat
Tano Red x Canada Muscat 87-4-9(B-296)	10.12	606	6.2	White	4	Midium	17.0	0.36	Herb
Tano Red x Rizamat (A-450)	10.4	360	9.0	White	2~3	Midium	22.6	0.38	Foxy

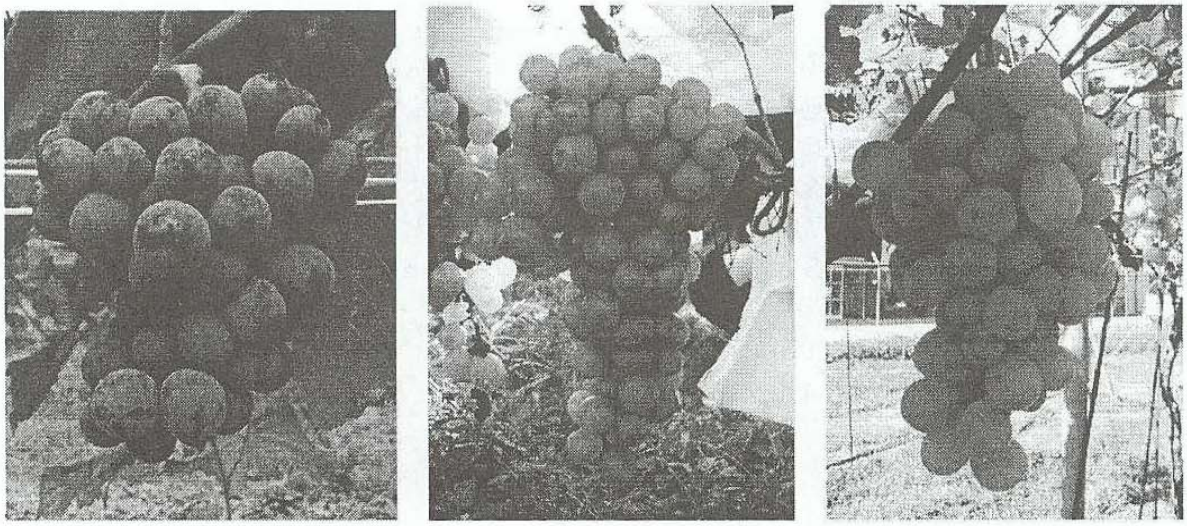

Fig. 5. Clusters and berries of grapevine seedlings preliminarily selected as candidates with resistance to anthracnose. B-255 (left), B-296 (middle), and A-450 (right).

Table 13. Grapevine varieties resistant to anthracnose from bioassay of culture filtrates from *E. ampelina*.

Species	Variety
V.labrusca	Beninanyo, Campbell Early, Concord, Concord Seedless, Early, Early Steuben, Niagara, Ohtsubu Niagara, SO4
V.labruscana	Tamashizuku, 珍珠玫瑰, 紅貴族, 黑露, Beauty Seedless, Beni Pizzutello, Cardinal, Catawba, Darkridge, Dechaunac, Golden Queen, Jai Izjum Belyi, Kyoho sel., Morgen Schon, Naples, North Red, Shien, Sunlight Seedless, Wase Queen
V.vinifera	Alphonse, Ark 1196, Bolgaria, Bronx Seedless, Champion, Chardonnay Decoupee, Chasselas Blanchette, Chasselas Cioutat, Chasselas Musque, Chasselas Rose, Chasselas Rose De Fall, Chasselas Rouge, Ellen Scott, Emilia, Emperatirz, Glaciere, Hicks, Italia, K 194-2, Missori Riesling, Paglieri 5, Red Globe, Riesling Vert, Rkatcetely, Rosa Tardiva, S. Muscat, S.9110, Sabalkanskoi, Sauvignon Vert, Seibel 1000, Seibel 10878, Seibel 4986, Selezione Bruni 183, Seyval, Seyve-Villard 18-315, Seyve-Villard 5247, Shabazenzhu(Pearl of csa), Stark Delicious

Table 14. Grapevine varieties moderately resistant to anthracnose from bioassay of culture filtrates from *E. ampelina*.

Species	Variety
V.labrusca	Fredonia, Itchkimar, Niagara selection-Ishii, Rupestris Du Lot, Delaware
V.labruscana	Aki Queen, Benizawa Seedless, Fuen, Iris Chiubing, Izumo Queen, Kaitome, Kourgan Rose, Kyoho sel.-Izuka, Kyoho sel.-Tobu, N.Y.Muscat, Neo Mat, Ryogyoku, Sunny Rouge, Tamnara, Venus, Yates
V.vinifera	Adiron Dac, Al Zeinel, Alicant, Canner, Chasselas, Clairrete Mazel, Clinton, Diamante, Dutchess, GW 8, Husaine Bianco, Imperiale, Kerner, Liana, Lival, Marechal Foch, Melver, Moscatel Ruso, Muscat De la Republique, Oktyabaskii, Opal, Perla di Csaba, Sauvignon, Sauvignon Blanc, Seibel 5247, Syrah, Urvana, Vivona 182, Zabalkanski

Table 15. Grapevine varieties moderately susceptible to anthracnose from bioassay of culture filtrates from *E. ampelina*.

Species	Variety
V.labrusca	Betulifolia GVIT 0812, Ichikimar, Ohtama Poto, Ohtsubu Campbell, Steuben, Takei Campbell
V.labruscana	Bailey Alicante A, Beniyamabico, Big unicon, Black Pegaru, Black Rose, Brazil, Favorit, Gurosio, Honey Red, Hyuuga, J.S.23-416, J.S.26-627, Jasmine, King Dela, Koho, Kokuyou, Kyoho sel.-Sakura, Kyoho sel.-Sato, NY37312, Neo Muscat, New Niagara, Olympia, pione, Sekirei, Seto Giants, Shinano Smile, Takasumi, Unibala Seven, Wink
V.vinifera	Agawan, Baco, Bicane, Caco, Canadice, Caras Muskatnyia, Chasselas Fredonia, Clairette, Cogneliano 218, Duc D'anjou, Emperor, Fercal, Folle Blanche, Gamay, Gamay Beauiolais Lacenas F, Gewurztraminer, Golden Muscat, Herbert, Hindoni, Kizil uzum Kanibadlamskiy, Linneo Nero, Maddalena Salomon, Malbec, Marchel, Moscatel Negro, Mourverdre, Muscat St.Laurent, Pegaru, Perle De Csaba Rouge, Red Millenium, Royal, Russia 1, Seibel 15051, Seibel 34804, Semillon, Sweet Muscat, Venessa Seedless, Viognier, Zagtera

Table 16. Grapevine varieties susceptible to anthracnose from bioassay of culture filtrates from *E. ampelina*.

Species	Variety
V.labrusca	Col. McCampbell, Sheridan, Tark, Wase Campbell Early, Wase Delaware, Cambell Early mutante, Doaniana GVIT 0165, Moore Early, Niabell
V.labruscana	菓天, 大玉露, 選拔 149號, 紫玉, Alden, Benifuji, Beniizu, Benizuiho, Black Olympia, Black Sanjaku, Buffalo, Carolina Black Rose, Centennial, Chabache, Christmas Rose, High Berry, Himrod 4X, Honey Black, Julski Biser, Kitasaki Red, Manicure Finger, Muscat Koufu, Nehelescol, North Black, Pizzutello Bianco, Rhodo Berry, Ryuho, Schuyler, Summer Black, Taifi, Tano Red, Wase Campbell, White Pegaru, 甲斐路, 동두계거봉, 安藝 Seedless, 黑王, Baby Finger, Black Eye, Black Queen, Blush Seedless, Canada Muscat, Cannon Hall Muscat, Cauga White, Centennial Seedless, Corvina Veroness (ISV-CV7), Dayho, Exotic, Feelis, Flame Seedless, Fujiminori, Gorby, Guroryu, Himrod Seedless, Hokkou, Hongdan, Ikawa8, Jingxiao, Jingya, Jingyou, Jingyu, Jingzaojing, Koushu, Koushu Saniaku, Kyoho, M.B.A, Marquerite, Moris Early, N. Y. 33875, N.Y. 33873, N.Y.14013, N.Y.15302, N.Y.21572, N.Y.21576, N.Y.45950, Nerona, Niunai, Ontario, Perlon, Ruby Okuyama, Seneca, Sin Kyoho, Suntory Blanc, Tabizi, Takao, Taminga, Tensyu, Thompson Seedless, Wardon, Honey Seedless
V.vinifera	Aramon, Athens, Bath, Cabernet Franc, Chenin Blanc N.19, Feher Szagos, Feteasca Alba, Focia, GW10, Katta Kurgan, Kishimish Chyorny, Malenza Early 1258, Maraberuha, Merlot, Meunier, Milton, Molinera Gorda, Muscadet, Muscat Frontiguan, Olivetta Vibonese, Rubel Muscat, Russia 8, Seibel 5279, Selezione Bruni 12, Seyve-Villard 23-51, Suffolk Red, Super Hamburg, Sylvaner, Topas, Vidal 64023, Vidal 9, Vidal Blanc, Villard Blanc, 우즈벡 58, Aligote, Beilino, Besgano Nero, Beta, Bulgaria 5-2, Carbernet Franc(ISV1. vf), Chancellor, Chardonnay(ISV1. vf), Chasselas Blanc, Chasselas Negrepont, Cheongsoo, Cinsaut, Clairette Blanc, Dattier, Diamond, Don Mariano, Duca di Magenta, Edelweiss, Emerald Seedless, Favorita D'Alba, Feteasca Neagra, Glenora, Gloslot Decoupe, Green Hungarian, GW03, Inc Pirovano, Italia Seedless, Jurancon, K 188-2, King Phillip, M. Ottenel, Maldeleine Angev, Malvasia Istriana (ISV1), Marocain Gris, Merbein Seedless, Michele Palieri, Milbaune, Molinara, Monbadon, Monukka, Morrastel, Moscato D'Adda, Moscatuel, Muller Thurgau, Muscat Caillaba, Muscat D'Adda, Muscat De Terracina, Muscat Hamburg Muscat Rose, No.2, Noir Hatif De Marseille, Omit, Ondenc (Semis B.), Othello, Panse Blanche, Panse Precoce, Pepin D'Hispanie, Petit Verdot, Pinot Blanc, Pinot Gris, Pinot Meunier, Pinot Noir, Plante Mercier, Portland, Prosecco (ISV-ESAY 10. vf), Record Sweet, Red Malaga, Reliance, Remail Seedless, Riesling, Riesling Italico (ISV1. vf), Riesling Precoce, Rizamat, Rommel, Rosario Bianco, Rosette, Royal Seedless, Rubi, Ruby Seedless, S.Urbano, Saint Jaques Noir, Sangiovetto, Seibel 10076, Seibel 13053, Seibel 21572, Seibel 5455, Seibel 7053, Servant, Seyve-Villard 20-365, Seyve-Villard 5276, Souvenir du Pulliat, Strashensky, Suitanine Blanc, Suitanine Rose, Ugni Blanc, Van Buren, Veeport, Ventura, Vidal 50151, Vidal 65163, Viola, Zinfandel, Red Queen

다. 포도 새눈무늬병에 대한 생화학적 변화 조사

1) Salicylic acid의 함량 변화

E. ampelina EA-1을 접종한 후 포도나무의 salicylic acid의 함량 변화를 알아보고자 HPLC 분석(그림 2)을 통해 함량을 측정하였다(그림 9). 저항성 검정 시험에서 저항성으로 판별된 품종인 'Campbell Early'에서 병원균 접종 후 72시간에 salicylic acid의 함량이 급격히 증가하였으며 감수성으로 검정된 'Rizamat'와 '거봉'에서는 salicylic acid 함량의 뚜렷한 변화는 나타나지 않았다. 포도 새눈무늬병균의 배양여액을 처리한 경우에도 같은 결과를 얻었다(그림 12).

Nakashita 등(2002)은 담배에 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*를 접종하였던 바 salicylic acid 축적 증가로 저항성이 증가되었다고 보고하였으며, Martinez 등(2000)도 *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Xcm) race 18을 목화에 접종 한 후 salicylic acid의 함량 변화를 조사하였던 바 접종 6시간 후에 최고치를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 얻었다. Yoshioka 등(2001)은 1,2-benzisothiazole-1,1-dioxide가 처리된 *Arabidopsis*에서 salicylic acid 수치가 대조구에 비하여 높았고 salicylic acid 축적을 통해 전신유도저항성이 유도되었다고 보고하였다. 또한 Meuwly 등(1995)도 전신유도저항성이 유도될 때 식물체내에는 salicylic acid가 축적된다고 하였다. Smith-Becker 등(1998)도 오이 잎에 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*를 접종하였을 때 phenylanine ammonia-lyase(PAL) 활성 증가에 따라 salicylic acid의 축적이 증가되었으며 접종 15시간 후에 최고치를 나타내었다고 하였다. Mauch-Mani와 Slusarenko (1996)는 *Arabidopsis*에서 salicylic acid의 축적에 phenylanine ammonia-lyase(PAL) 활성이 필수적이라고 보고하였다.

이상과 같은 연구 보고와 앞선 연구에서 저항성으로 검정된 'Campbell Early' 품종의 포도 새눈무늬병에 대한 저항성은 병원균 접종 후 salicylic acid의 축적과 연관이 있는 것으로 여겨되며 'Rizamat'의 경우 salicylic acid의 축적을 유도하지 않는 것으로 보아 포도 새눈무늬병해 발생시 저항성 반응체계를 가동하지 못하는 것으로 여겨진다. 포도 새눈무늬병 저항성 기작은 다양한 경로를 통해 발현 될 것으로 여겨지지만 본 연구결과를 비추어 볼 때 식물체내에서 SA합성 및 체내 축적이 새눈무늬병 발생시 저항성 반응을 촉매하는 하나의 기작이라 할 수 있다.

2) Resveratrol의 함량 변화

E. ampelina EA-1을 접종한 후 방어 반응의 생화학적 변화 중 resveratrol의 함량 변화를 알아보기 위해 HPLC를 이용(그림 3)하여 측정하였다(그림 10). 앞선 연구에서 저항성으로 검정된 품종인 'Campbell Early'의 resveratrol의 함량은 병원균 접종 후 72시간 뒤에 54 μg/g으로 대조구에 비해 5배 이상 증가하였다. 그러나 감수성 품종인 'Rizamat'와 'Rosario Bianco'의 resveratrol의 함량이 10 μg/g 변화는 거의 없었다. 포도 새눈무늬병균의 배양여액을 처리한 경우에도 같은 결과를 얻었다(그림 12).

Stilbene 계통의 phytoalexin은 병 저항성과 관련(Aguamah 등, 1981; Hart, 1981)이 있으며 phytoalexin은 곰팡이, 세균, 바이러스 감염 등에 의한 식물의 방어 반응으로서 만들어진다(Hammerschmidt, 1999; Dixon, 2001). Resveratrol은 stilbene에 속하는 phytoalexin이다.

Paul 등(1998)은 resveratrol이 포도의 grey mould를 일으키는 *Botrytis cinerea*에 대해 저항성을 증진시켰다고 보고하였고 Dercks와 Creasy(1989)는 포도의 downy mildew를 일으키는 *Plasmopara viticola*에 대한 저항성 정도를 알아보고자 저항성 품종과 감수성 품종의 resveratrol 함량을 조사하였던 바 *plasmopara viticola*에 저항성인 'Castor' 품종이 감수성인 'Riesling' 품종의 resveratrol 함량 최고치 보다 5배 이상 높았다고 보고하였다. Sarig 등(1997)도 포도 과립에 *Rhizopus stolonifer* 곰팡이를 접종하였던 바 기내에서 resveratrol 처리에 의해 포자 생성과 균사 생장을 억제시키는 것을 관찰하였다. Resveratrol은 인간이나 동물에게도 유익한 작용을 하여 항산화작용과 항증식 작용으로 암이나 심혈관계 질병에 대한 예방화학제로서 연구되고 있는(Jang 등, 1997; Lin과 Tsai, 1999) 가운데 Chan(2002)은 resveratrol 처리에 의해 피부병을 일으키는 *T. mentagrophytes, T.tonsurans, T. rubrum, . floccosum, M. gypseum*과 같은 bacteria 의 생장을 억제시켰다고 보고하였다.

본 연구에서도 저항성으로 검정된 'Campbell Early' 품종은 병원균 접종에 의한 병반 형성이 적었으며 resveratrol의 함량도 감수성으로 검정된 'Kyoho'와 'Rizamat' 품종보다 높게 나타나 위의 연구 보고들과 일치하였다. 따라서 포도 새눈무늬병에 대한 포도의 저항성은 병원균 침입시 phytoalexin의 일종인 resveratrol의 축적과 관련이 있으며 이러한 저항성은 resveratrol의 높은 합성 능력과 관계가 있을 것으로 추측된다.

3) H_2O_2의 함량 변화

E. ampelina EA-1을 접종한 후 식물체의 방어 반응의 생화학적 변화 중 하나인 H_2O_2의 함량 변화를 알아보기 위해 spectrophotometry를 이용하여 측정하였다(그림 11). 저항성으로 품종인 'Campbell Early'의 H_2O_2의 함량은 병원균 접종 후 72시간 뒤에 급격히 증가하였으며 'Rizamat'와 'Kyoho' 품종보다 H_2O_2 함량이 뚜렷이 증가하였다. 그러나 감수성 품종인 'Rizamat'와 'Rosario Bianco'의 H_2O_2 함량 변화는 거의 없었다. Sutherland (1991)의 실험에서 병원균의 감염에 대한 식물의 방어 반응 초기에 oxygen radical(O_2^-, H_2O_2, HO^-)들이 발생하였으며 본 연구에서도 접종 후 'Campbell Early' 포도 품종에서 H_2O_2의 발생이 높았다.

식물은 oxidative burst 중 하나인 H_2O_2의 발생으로도 침입한 병원균에 방어 반응을 나타낸다(Legendre 등, 1993; Levine 등, 1994). 토마토에서 *Cladosporium fulvum*에 대한 방어 반응으로 자엽과 잎 전체에서 활성산소 종들이 발생하며 (May 등, 1996; Lu와 Higgins, 1998) 항산화효소(Catalase-Cat1AS)를 결여시킨 담배 형질전환체에서 H_2O_2의 다량 발생으로 *Pseudomonas putida*에 저항성을 증진시킨다(Chamnongpol, 1998). 따라

서 이러한 연구 결과와 본 연구 결과를 토대로 *E. ampelina* 접종에 의한 포도 새눈무늬병에 대한 저항성이 H_2O_2 축적 경로를 통해 발현된다는 것을 확인할 수 있었다.

Chen 등 (1993)과 Conrath (1995)은 salicylic acid의 catalase의 활성 억제에 의한 H_2O_2를 비롯한 활성산소 종들의 축적이 병 저항성 유도와 관련이 있을 것으로 보고하였고 본 연구의 포도 새눈무늬병균에 대해 감수성 포도 품종에 비해 저항성인 포도 품종의 높은 H_2O_2 함량이 앞선 연구의 저항성 포도 품종의 salicylic acid 함량 증가에 의한 것으로 추측할 수 있었다 또한, H_2O_2처리로 salicylic acid의 축적을 유도할 수 있었다는 보고(Bi et al., 1995; Leon et al., 1995)가 있으므로 H_2O_2 및 SA를 통한 저항성 반응 발현 경로는 매우 복잡하며 차후 이에 관련한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 생각되었다.

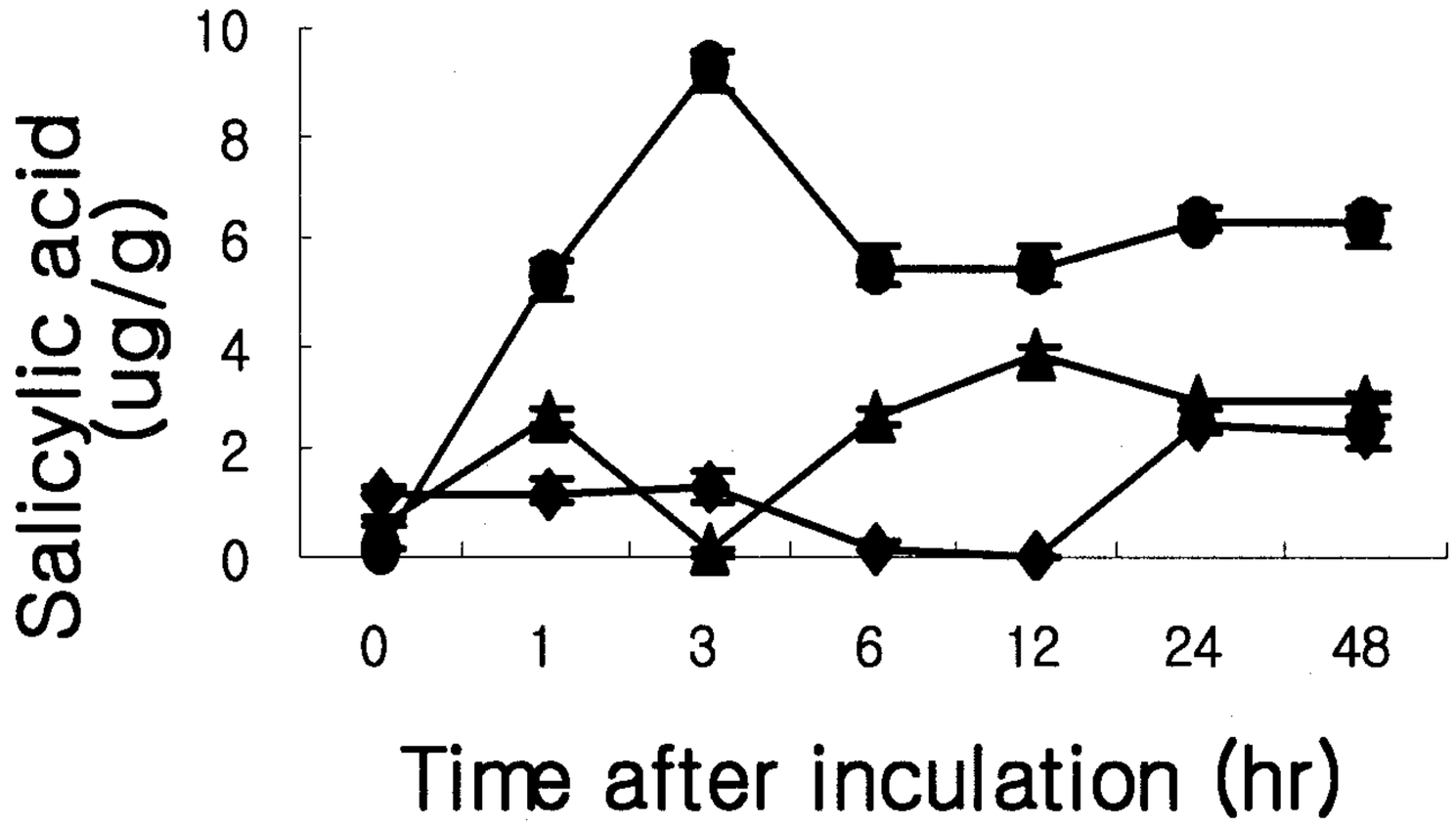

Fig. 9. Changes in salicylic acid content of grapevine leaves by infection with anthracnose pathogens. ●: Campbell Early ◆: Rizamat ▲: Kyoho.

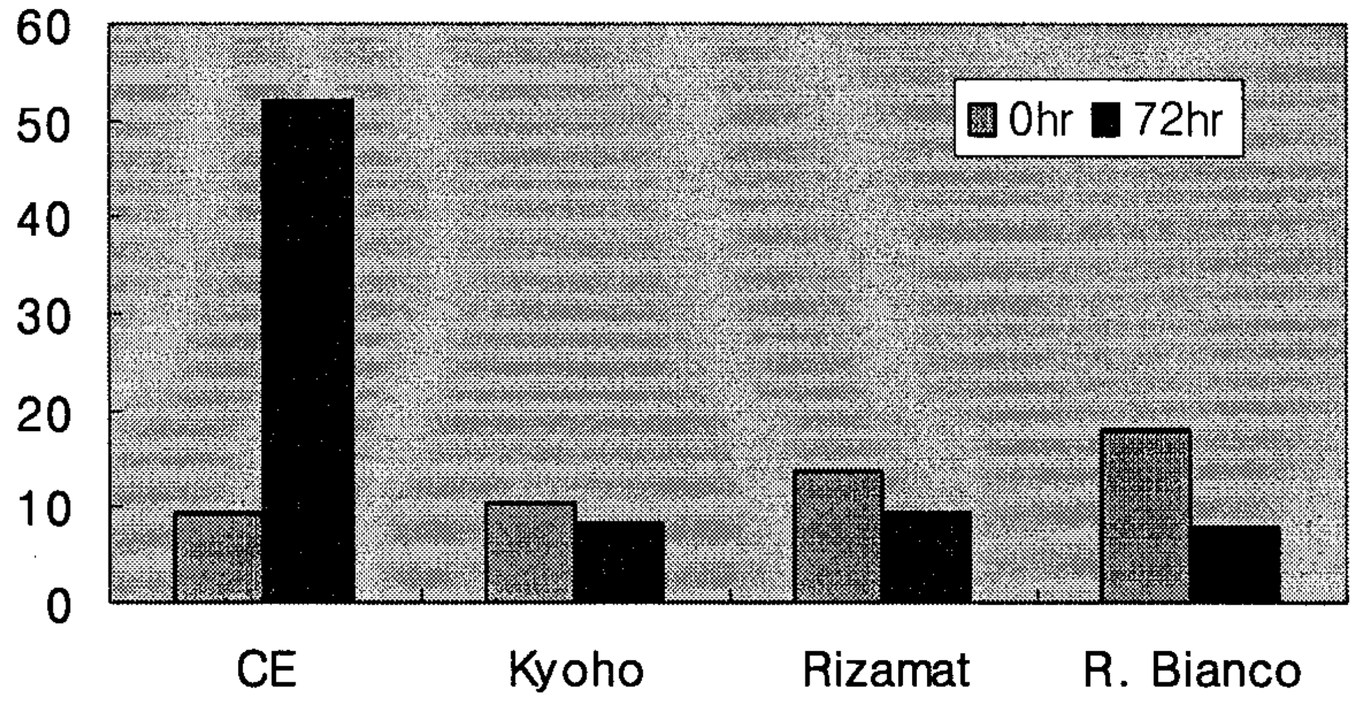

Fig. 10. Changes in resveratrol content of grapevine leaves by infection with anthracnose pathogens.

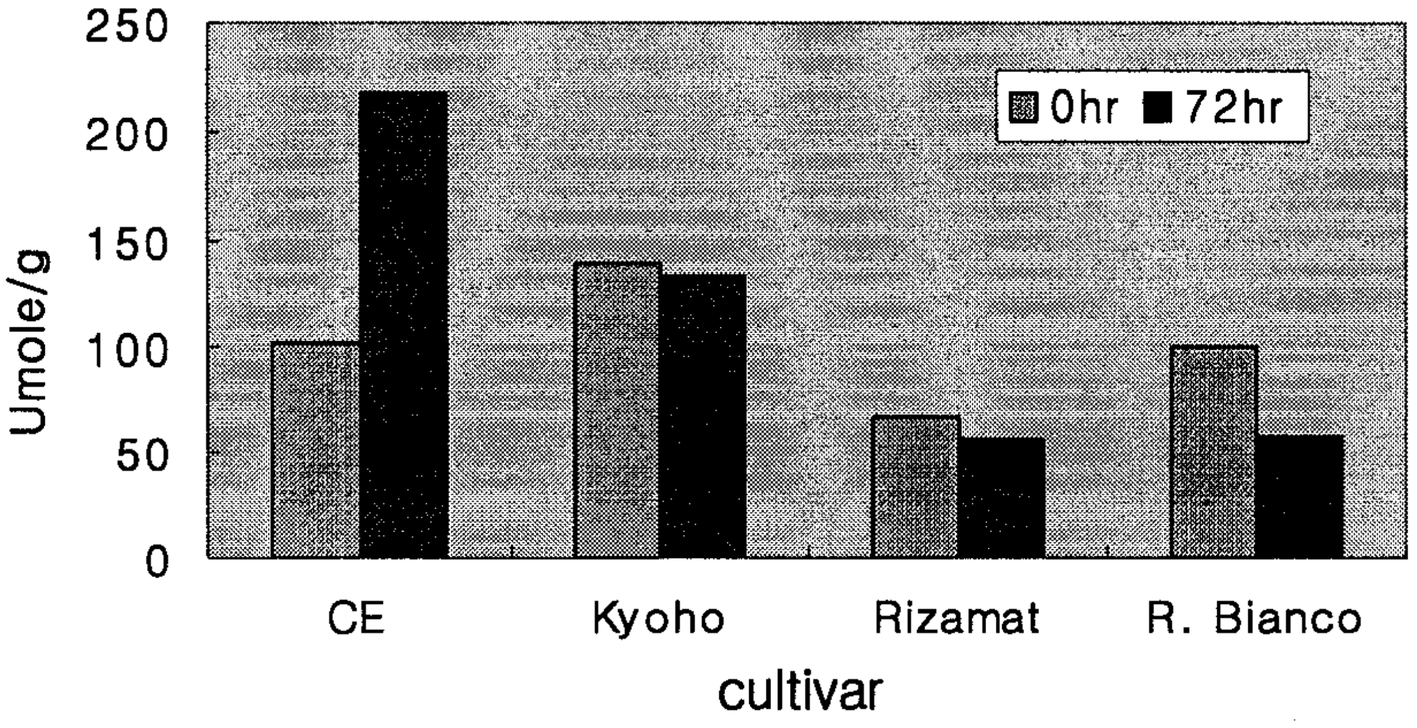

Fig. 11. Changes of H_2O_2 (Umole/g) content by inoculation of *Elsinoe ampelina* in grapes. CE: Campbell Early (resistant), Kyoho (moderate susceptible), Rizamat and Rosario Bianco (susceptible to anthracnose).

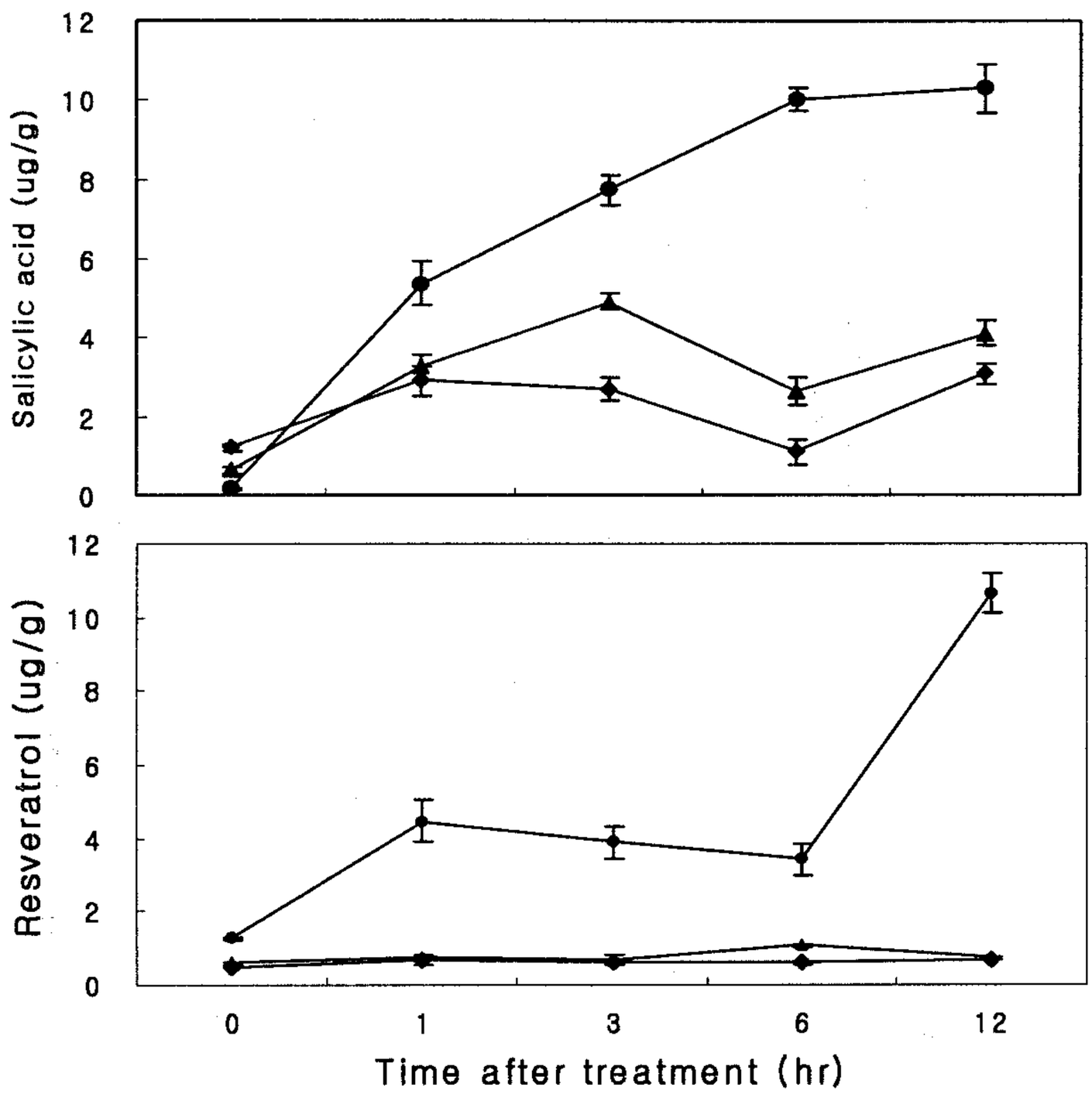

Fig. 12. Changes in salicylic acid (upper) and resveratrol (lower) contents in grapevine leaves by treating with culture filtrates of *E. ampelina*. ●: Campbell Early ◆: Rizamat ▲: Kyoho.

4. 적요

최근 국내에서 포도 재배 시 포도 새눈무늬병의 발생이 증가하면서 주요한 포도 병해 중의 하나로 부각되어 이에 대한 효율적인 포도 품종 간 저항성 검정 시스템을 개발하고자 하였다. 병원균의 인공 접종 결과 'Rizamat'와 'Kaiji'는 감수성, 'Kyoho'와 'Benifuji'는 중도 감수성, 'Campbell Early'와 'Niagara'는 저항성 품종이었으며 이 결과는 포장 상태에서의 저항성 차이와 일치하는 경향을 나타내었다. 본 연구에서 개발한 온실 내에서의 병원균 인공 접종법을 이용하여 포도 새눈무늬병에 대한 품종 간 저항성 검정을 효율적으로 수행할 수 있었다.

포도 새눈무늬병균인 *E. ampelina*가 생성하는 배양여액을 이용하여 포장저항성 검정이나 병원균 접종법보다 효율적인 포도 새눈무늬병 저항성 검정 체계를 구축하고자 하였다. 포도 새눈무늬병원균의 배양여액을 이용한 검정 결과, 배양여액에 독성이 존재하며 기주특이적으로 나타났다. 배양여액의 에칠아세테이트 추출물도 역시 포도 품종간의 기주 특이성을 발휘하였다. 배양여액과 배양여액의 에칠아세테이트 추출물은 병원균의 기주범위와 일치하였다. 병해 감수성인 포도 품종은 저농도로 희석된 배양여액에도 감수성이었으나 저항성 품종인 배양여액 원액에도 반응하지 않았다. 또한 감수성 품종은 희석된 배양여액보다 농도가 높은 여액에 대해 감수성이었다. 또한 thin-layer chromatography와 column chromatography를 통해 독성을 보이는 활성 fraction을 부분정제 할 수 있었고 활성 fraction도 기주특이성을 나타내었다. 이는 병원균이 생성하는 배양여액을 이용하면 병원균 접종이나 포장저항성 검정을 대체할 수 있는 효율적인 검정법으로 활용 가능함을 의미한다.

포도 유전자원의 새눈무늬병에 대한 저항성 검정을 하고자 유럽종, 미국종, 구미 교잡종 등 54품종을 공시하여 병원균 접종에 의한 저항성검정, 포장에서의 저항성 검정과 병원균이 생성하는 배양여액 및 에칠아세테이트 추출물 bioassay에 의한 검정을 실시하였다.

포도 새눈무늬병원균을 접종한 결과 'Black Swan', 'Rizamat', Rosario Bianco', 'Kaiji' 등이 감수성, 'Campbell Early', 'Niagara', 'Sheridan', 및 'Izumo Queen' 등은 저항성성 품종으로 판별되었다. 포장에서의 새눈무늬병의 발생을 조사한 결과, 'Black Eye', 'Mario', 'Niunai', 'Rizamat', 'Rosario Bianco' 등의 품종이 감수성, 'Campbell Early', 'Niagara', 'Honey Red' 등의 품종은 저항성으로 판별되었다. 병원균이 생성하는 배양여액을 이용한 저항성 검정결과, 'Black Eye', 'Mario', 'Niunai', 'Rizamat', 'Rosario Bianco' 등의 품종이 감수성, 'Campbell Early', 'Niagara', 'Honey Red' 등의 품종이 저항성으로 판별되었으며 배양여액의 에칠아세테이트 추출물의 bioassay 결과도 배양여액의 결과와 일치함을 확인하였다. 또한, 병원균 접종법, 포장저항성평가 및 배양여액에 의한 검정 결과는 모두 일치하였다.

포도 새눈무늬병에 대한 생화학적 방어 반응 변화를 알아보고자 병원균을 접종한 접

종 후 salicylic acid, H_2O_2, resveratrol의 함량 변화를 조사하였다. 병원균접종에 의한 salicylic acid, H_2O_2, resveratrol의 함량은 포도 새눈무늬병에 감수성인 'Rizamat'와 'Rosario Bianco' 품종보다 저항성 품종인 'Campbell Early'에서 더 높게 나타났다.

제2절 Marker assisted selection에 의한 포도 새눈무늬병 저항성 계통 검정

1.서론

국내의 포도재배는 고온다습한 기후로 인해 많은 병원균에 대해 경제적 손실을 초래하고 있으며, 이를 방제하기 위해 농약살포가 지속적으로 이루어지고 있다. 오래전부터 국내 포도병에 관한 연구는 주로 생리생태적 연구에 치중하였다(Kim et al., 1980). 그 외에 포도의 성분에 대한 분석(Woo et al., 2005)과 RAPD방법과 같은 분자마커를 이용한 유전적 다양성분석만이 연구되고 있다.

미국, 유럽연합, 일본 등 포도 연구 선진국들은 포도 육종 연한 단축과 육종효율 증대를 위해 분자마커를 이용하였는데, 특히 내병성, 내충성 품종의 조기 선발을 목적으로 표지를 이용한 marker assisted selection (MAS) 기술을 포도육종에 적용하고 있다. 이에 반해, 국내의 포도 육종에 이들 첨단기술의 적용은 전무한 상태로 육종현장에서 활용할 수 있는 형질관련 marker의 탐색이 시급한 실정이다.

이들 분자마커중에 DNA 마커가 벼과나 콩, 감자, 옥수수, 토마토 등의 품종 분류와 식별에 관한 연구(Waugh and Powell, 1992; Weeden et al., 1992)에 주로 이용되고 있으며, 식물의 종 특이적인 분자마커를 이용한 식물의 동정(Perron et al., 1995)(Khasa and Dancik, 1996)이 있다. 하지만 아직 포도를 대상으로 한 분석은 미흡한 실정에 있다.

병 저항성 유전자와 연관된 분자마커는 많은 식물체에서 개발되는데 콩의 역병(Kasuga et al., 1997), 무의 무사마귀병(Voorrips et al., 1997), 보리의 잎 녹병(Qi et al., 1998), 복숭아의 선충(Lu et al., 1998), 벼도열병(Chen et al., 1997), 밀의 흰가루병(Hartl et al., 1999) 그리고 포플러의 잎녹병(Cervera et al., 1996)에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한 AFLP 마커를 이용하여 직접 map-based cloning으로 저항성 유전자를 cloning한 보고의 예는 감자의 선충과 진딧물 저항성(Vos et al., 1998) 등이 있다.

Paran과 Michelmore(1993)는 sequence characterized amplified region (SCAR)라는 새로운 표지인자를 제안하였는데, 이 표지인자는 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 표지인자의 불안정성을 개선하기 위하여 선발된 RAPD밴드의 염기서열을 분석한 후 긴 primer를 제작하여 높은 annealing 온도에서 PCR을 수행하여 표지인자를 선발하는 것으로 단일의 DNA밴드로 나타나며 primer 설계를 바꾸어 공우성 표지인자(co-dominant marker)로 전환할 수도 있기 때문에 이형접합체의 탐색을 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Negi et al., 2000). SCAR 마커에 관한 연구는 동식물의 병원균에 관련된 저항성 유전자의 유전자지도 작성이나, 저항성 유전자의 유무진단에 수행되어져 왔다. RAPD 마커를 이용한 SCAR 마커로의 전환에 관한 연구로는 벼의 도열병 저항성 유전자(Naqvi et al., 2000)와 병원균인 *Clonostachy rosea*의 유무의 진단(Bulat et

al., 2000), PVY 감자 바이러스에 관한 연구(Arnedo-Andres et al., 2002)가 보고되기도 하였다.

따라서 본 실험에서는 포도 새눈무늬병에 대한 내병성 품종육성의 일환으로 육종연한단축과 육종효율증대를 위한 내병성표지의 선발 및 이를 이용한 MAS (marker assisted selection) 적용성 등을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험재료

포도 새눈무늬병 관련 DNA 표지인자를 선발하기 저항성 11계통과 감수성 9계통을 각각 사용하였다 (Table 17.).

Table 17. Cultivars of *Vitis* spp. used in this study

No. of line	Cultivars in resistant group	No. of line	Cultivars in susceptible group
1	Concord	12	Niunai
2	Champion	13	Centennial
3	Delaware	14	Muscat Hamburg
4	Niagara	15	Sauvignon
5	Beninanyo	16	Koushu
6	101.14	17	Neo muscat
7	3309	18	Muscat Bailey A
8	3306	19	Kyoho
9	5BB	20	Thompson Seedless
10	SO4		
11	Rupestris Du Lot		

나. 유전분석

새눈무늬병에 대한 유전분석을 위해 저항성 품종 'Tamnara' 및 감수성 품종 'Kyoho', 'Kaiji', 'Muscat Bailey A', 'Alden'을 선발하였다. 선발된 각각의 품종을 자식하여 F2 세대를 육성하였다. F2 개체에 생물학적 검정을 하여 유전분석을 실시하였다.

다. DNA 추출

포도의 잎으로부터 DNA 추출은 Wagnar 등에 의하여 변형된 CTAB법을 이용하여 추출하였다. 500㎎의 시료에 액체질소를 넣어 마쇄 한 후, E-tube에 시료의 10배량의 차가운 추출용액 (Isolation buffer: 10% polyethylene glycol 6,000, 0.35M sorbitol, 0.1M Tris (pH 8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β-mercaptoethanol)을 넣고, 액체질소에 의해 분말로 된 시료를 넣는다. 잘 혼합한 다음 원심분리 (15,000rpm,

10분, 4℃)하여 상층액을 제거한 침전물에 시료의 5배의 LB (Lysis buffer: 0.35M sorbitol, 0.1M Tris (pH 8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β-mercaptoethanol)를 첨가하여 잘 혼합한 후, 액량의 1/10배량의 10% sarcosine을 첨가한 후 실온에서 10분간 처리한다. 동량의 2×CTAB solution (2% CTAB, 0.1M Tris-HCl(pH 9.5), 1.4M NaCl, 20mM EDTA(pH 8.0), 0.5% β-mercaptoethanol)을 첨가한 다음 65℃ 항온기에서 10분 처리하고 동량의 chloroform을 첨가하여 실온에서 15,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 상층액에 냉동고에 보관중인 isopropanol을 동량 넣어 DNA을 침전시킨다. 침전시킨 DNA를 원심분리 (6,000rpm, 5분, 4℃)하여 얻은 genomic DNA를 진공 혹은 자연 건조시켰다. 건조시킨 DNA를 100 ㎕ TE buffer (10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA)에 용해하여 동량의 phenol을 첨가한 후 원심분리 (15,000rpm, 10분)하였다. 상층액을 취한 후 동량의 chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 첨가하고 원심분리하여 상층액을 취한 후 동량의 isopropanol을 넣어 DNA를 침전시키고 원심분리 (6,000rpm, 5분, 4℃)하여 얻은 게놈 DNA를 70% EtOH로 세척하여 진공 혹은 자연 건조시켰다. 건조시킨 DNA를 50㎕ TE buffer(10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA)에 용해하여 1㎎/㎖의 RNase를 첨가하고 37℃ 항온기에서 30분간 처리한 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후, spectrophotometer로 DNA 정량하였다.

라. RAPD 분석

RAPD는 Williams(Whiteside, 1975) 등의 방법에 따라 수행하였다. PCR 조건은 반응액에 20ng의 genomic DNA와 10 X PCR buffer, 1.5mM $MgCl_2$, 200μM dNTPs , 300nM primer, 1U *Taq* polymerase를 혼합하여 총 30㎕로 조성하였다. 실험에 사용된 random primer는 총 209종이 사용되었는데 12종류의 20-mer URP primer (universal rice primer), 97종은 10-mer Operon primer (OP, Operon Technologies Inc., Alameda, CA USA). 그리고 100종은 UBC primer (UBC. Canada)을 이용하여 PCR를 수행하였다. PCR 반응조건은 URP primer 경우는 94℃에서 5분간 predenaturation한 후 94℃에서 1분 denaturation, 58℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 elongation 과정을 35회 반복 후 최종적으로 72℃에서 10분간 반응시켰다. 10-mer Operon primer는 94℃에서 4분간 predenaturation한 후 94℃에서 1분 denaturation, 37℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 elongation 과정을 35회 반복 후 최종적으로 72℃에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각 primer별로 생성된 전체의 크기와 밴드의 있고 없음을 표시하였다.

마. 다형밴드의 cloning 및 Southern 분석

RAPD 분석에 의해 얻어진 다형밴드는 1% Low melting agarose gel (Promega, USA)에 영동하여 분리하였다. Gel로부터 DNA의 추출은 Geneclean Kit (Q-Bio gene)

에 의해 수행하였다. 분리된 특이 band는 pGEM T-easy vector System I (Promega, USA)을 cloning하였고 plasmid miniprep kit (Promega, USA)을 이용하여 DNA를 분리하였다. Cloning의 확인 여부는 SP6 (reverse)와 T7 (forward) primer를 이용하여 PCR하여 1.5% agarose gel에서 확인하였다. Southern은 저항성 line에서 특이적인 band를 나타내는 primer의 PCR product를 1.5% gel에 전기영동한 다음 denaturation 과정을 거친 후 nylon membrane (Schleicher & Schuell co.)으로 전이하였다. 전이된 DNA 단편들을 고정시키기 위하여 UV crosslink를 2회 실시하였다. Pre-hybridization은 2 × SSC, 10% Blocking Reagent (DIG DNA labelling and Detection kit Roche사), 1% SDS용액에서 68℃에서 1시간 동안 수행하였다. 또한 hybridization 용액에 Dig으로 labelling한 probe를 넣고 overnight 하였다. Membrane을 2 × SSC, 0.1% SDS의 washing buffer에서 세척한 다음, Dig detection kit (Roche co. Germany)에서 제공된 방법으로 NBT/BCIP에 의한 발색을 관찰하였다. Probe는 DIG Probe Labeling Kit (Roche)를 이용하여 회사에서 제공하는 방법에 따라 제작하였다. Probe 제작은 RPAD 분석시 저항성 계통에만 나타나는 특이 band를 이용하였다.

바. AFLP 분석

1) DNA double digestion과 ligation

Genomic DNA 200ng에 EcoR I 과 Mse I (Invitrogen)를 각각 10unit를 첨가하여 반응액을 30㎕로 조정하여 37℃에서 4시간 반응시켰다. 제한효소로 처리된 반응액 8㎕, 1.5㎕의 EcoR I -adapter (50uM), 1.5㎕의 Mse I -adapter (100uM), 6U의 T4 DNA ligase (Promega, USA)를 첨가하여 20℃에서 16시간 ligation시켰다 (Table 18).

Table 18. List of primers and adapters used for AFLP analysis

Primer/Adapters	Sequence	
*Eco*R I adapter		
EA-1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	17mer
EA-2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	18mer
PA primer-E0	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	19mer
SA primer	5'-GACTGCGTACCAATTC+NN (or NNN)	
	-AT, -AC, -AA, -TA, -TG,	21mer
	-ACA, -AAG, -AGC, -ACT	22mer
Mse I adapter		
MA-1	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'	16mer
MA-2	5'-TACTCAGGACTCAT-3'	14mer
PA primer-M1	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'	17mer
SA primer	5'-GATGAGTCCTGAGTAA+NNN	
	-CTG, -CTT, -CAA, -CAC, -CAG, -CAT	20mer
	, -CTA, -CTC	

2) Pre-amplification

위에서 ligation 된 DNA 용액을 5배 희석한 다음 2㎕를 취하여 8㎕의 100μM E0 primer, 8㎕의 100μM M1 primer, 2㎕의 2.5mM dNTPs, 2.5㎕의 10 × PCR buffer, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase를 넣어 반응액을 25㎕로 조정하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분간 30회 반복하였다.

3) Selective-amplification

Preamplification 반응액을 10희석한 다음 2㎕를 취하여 1.5㎕의 10ng/㎕ EcoR I + NN(N) primer, 2.5㎕의 100ng/㎕ Mse I + NNN primer , 2㎕의 2.5mM dNTPs, 2.5㎕의 10 × PCR buffer, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase를 넣어 반응액을 25㎕로 조정하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응에서 처음에는 94℃에서 30초, 65℃에서 30초, 72℃에서 1분간 12회 반복하였으며 annealing 온도를 65℃에서 매회 0.7℃씩 낮추면서 12회 반복하였다. 이후에는 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분간 20회 반복하여 반응을 종료하였다.

4) Gel electrophoresis 및 silver-staining

PCR 증폭산물 25㎕에 염색용액 (94% formamide, 10mM EDTA, 0.5 ㎎/㎖ Xylene cyanol FF, 0.5㎎/㎖ Bromophenol blue) 10㎕을 첨가한 후 95℃에서 5분간 denature 반응을 시키고 바로 얼음에 넣었다. 이 용액 중 3㎕를 취하여 5% denaturing

polyacrylamide gel 에 넣고 1,500V에서 3시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 완료된 후 Promega 사의 SILVER SEQUENCE^{TM} Staining Reagent Kit로 염색하였다.

5) Bulk 집단에서의 AFLP 분석

Tamnara F2에 생물학적 검정을 실시하여 완전 저항성 개체 16개와 완전 감수성 개체 15개를 선발하여 이들로부터 DNA를 각각 추출하여 저항성 및 감수성 DNA bulk를 만든 다음 RAPD 및 AFLP 반응에 의하여 저항성에 대한 특이양상을 보이는 표지인자를 선발하였다. RAPD에는 209개의 primer를 이용하여 수행하였다. AFLP 반응은 위에서 기술한 방법에 의해 EcoR I +NN(N) primer 9개와 Mse I +NNN primer 8개를 이용하여 모두 72개 조합에 대해 실험을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 새눈무늬병 저항성 관련 DNA 표지인자 선발

1) RAPD를 이용한 계통별 다형화

포도 새눈무늬병 저항성에 연관된 분자표지를 선발하기 위하여 저항성 11 계통과 감수성 9 계통을 이용하여 각각의 DNA bulk를 만들어 분석에 이용하였다. 실험에 사용한 primer는 12종류의 20-mer URP priemr (universal rice primer), 10-mer Operon primer (Operon Technologies Inc.(OP, Alameda, CA USA.)) 97종과 UBC primer (UBC. Canada) 100종으로 총 209종을 사용하여 RAPD 분석한 결과 총 513개의 band을 얻어 primer 당 증폭된 band는 약 4.7개였다.

저항성 및 감수성 계통을 구별할 수 있는 DNA 표지인자는 10개로 총 band수의 1.95%로 나타났다 (Table 19). 얻어진 10개의 band를 이용하여 재현성이 있는 primer는 URP 6, OPB15, OPB17, OPAB14, OPAB 18 등 5개를 선발하였다 (Fig. 13).

Table 19. RAPD primer, sequence and DNA marker showed to resistant lines.

Primer	Sequence (5′-3′)	No. of total bands	No. of polymorphic bands	DNA marker of resistant lines
URP06	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG	15	7	$URP06_{1200}$
OPB15	GGAGGGTGTT	11	7	$OPB15_{1300}$
OPB17	AGGGAACGAG	4	4	$OPB17_{1800}$
OPAB14	AAGTGCGACC	14	10	$OPAB14_{1300}$
OPAB18	CTGGCGTGTC	8	5	$OPAB18_{800}$

나. 저항성 계통 특이 DNA 표지인자 선발

새눈무늬병 저항성 및 감수성 계통을 구별할 수 있는 DNA 표지인자를 plasmid vector에 cloning하여, 이를 이용해 Southern 분석을 실시하였다. 각 계통의 DNA로부터 선발한 5개의 primer (URP06, OPB15, OPB17, OPAB14, OPAB18)로 증폭하여 얻어진 DNA 표지인자가 SCAR 마커의 여부를 확인하기 위해 실시한 결과 Fig. 14와 같다. $OPB15_{1300}$, $OPAB18_{800}$을 probe로 사용하여 Southern 분석을 실시하였을 경우, 저항성 계통인 'Concord', 'Champion', 'Delaware', 'Niagara', 'Beninanyo', 101.14, 3309, 3306, 5BB, SO4, 'Rupestris Du Lot' 에서 밴드가 나타난 것으로 보아 이들 두개의 마커에 대한 특이 band만이 SCAR marker의 가능성을 제시하였다 (Fig. 14). 따라서 이들 두 표지를 이용하여 SCAR 표지 개발을 위한 다음 단계의 연구를 실시하였다.

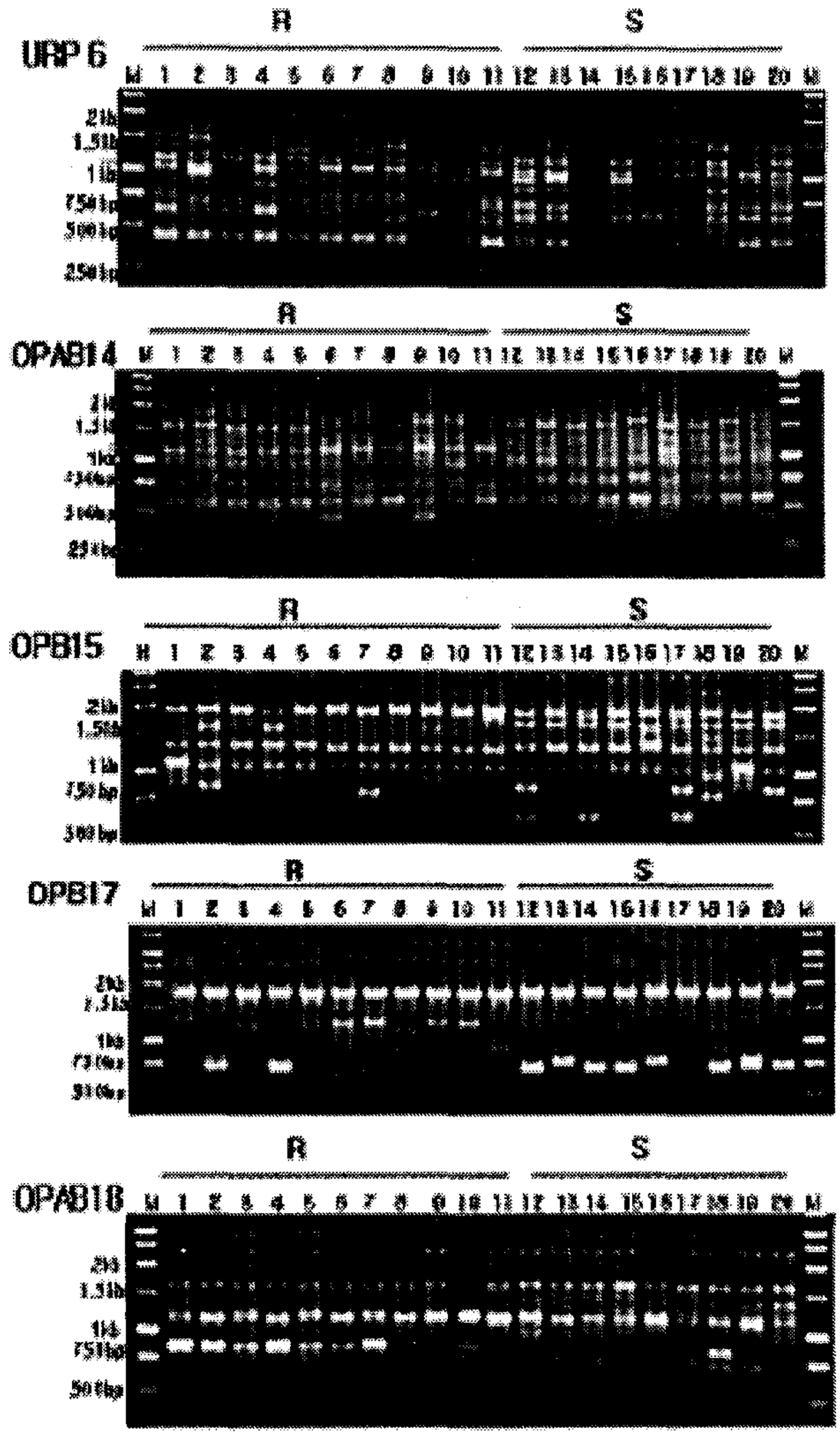

Fig. 13. RAPD banding pattern between resistant and susceptible lines. M: 100bp DNA ladder, R: resistant lines, S: susceptible lines described in Table 17. Arrows represent polymorphic bands.

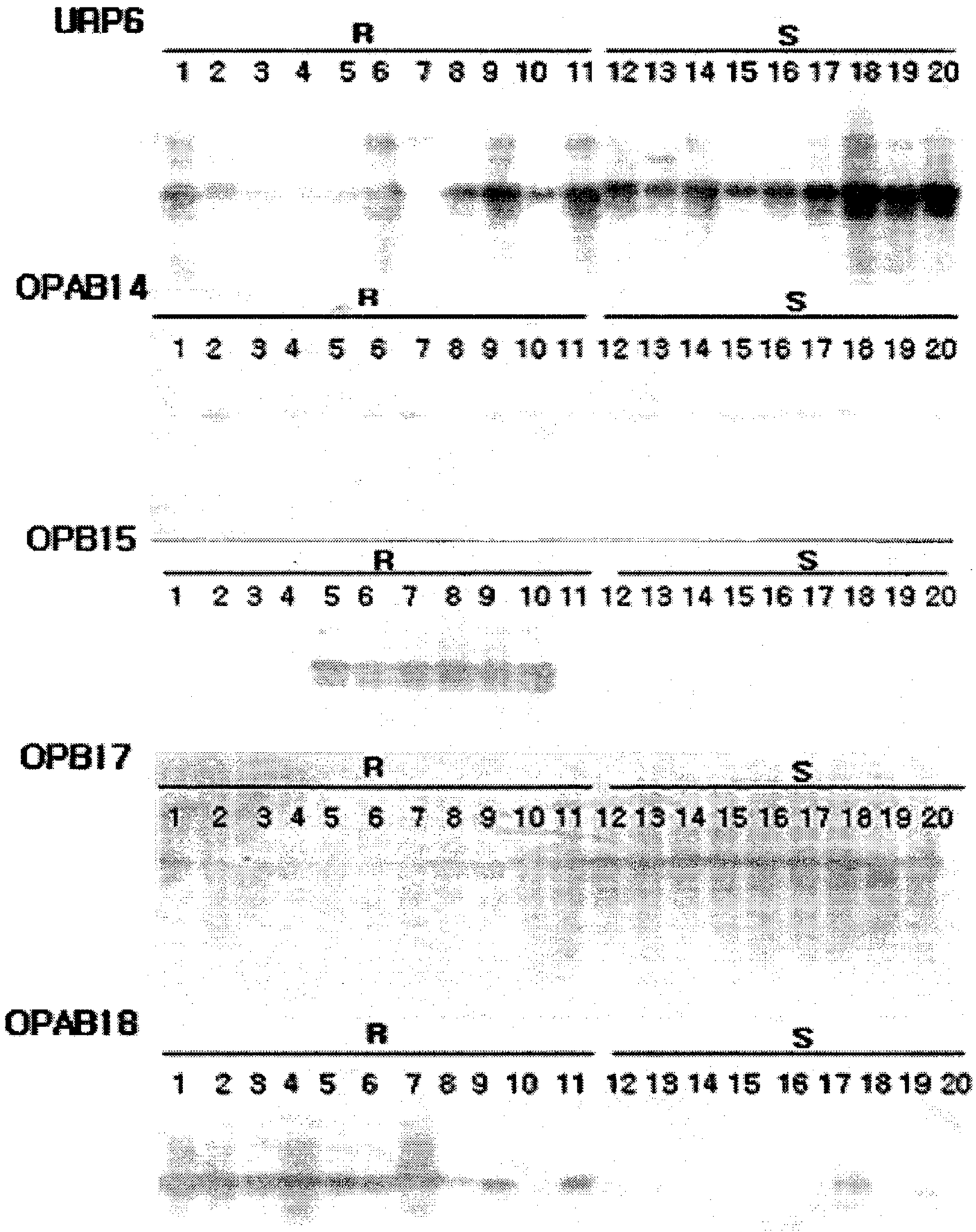

Fig. 14. Southern blot analysis of amplified products using URP6, OPB15, OPB17 OPAB14, and OPAB18 primer as probes. R: resistant lines, S susceptible lines. Number of lanes represents lines described in Table 1.

다. 저항성 계통 특이 SCAR marker 적용

Southern blot 분석에 의해 저항성 계통 특이 clone ($OPB15_{1300}$, $OPAB18_{800}$)의 염기배열을 조사한 결과 $OPB15_{1300}$은 1247bp, $OPAB18_{800}$ 843bp였다(그림 15).

이들 염기서열 정보를 이용하여 NCBI 분석한 결과 unknown 유전자로 나타났다. 이들 두 clone의 염기서열 정보를 이용하여 SCAR marker용 primer를 디자인하였다 (Table 20). $OPB15_{1300}$ clone 유래 Fw 5′-GGAGGGTGTTGGATCAACAGCTAT-3′, Rv 5′-GGAGGGTGTTGTAAGCCATGCCAT-3′에서는 PCR 결과 저항성과 감수성 개체 간에 차이가 없는 monomorphic한 양상을 보였다 (Fig. 16A). 여러 가지 annealing 온도에서 PCR을 수행하였지만 이러한 증상은 달라지지 않았다. 10mer를 이용한 반응에서는 차별화를 보이던 밴드가 반응의 안정성이 높은 24mer 반응에서는 나타나지 않았다. 이는 염기배열 정보에서 저항성 및 감수성 영역을 잘못 설정한 것으로 사료된다. $OPAB18_{800}$ clone의 Fw 5′-CTGGCGTGTCCACATTTTTGGTAG-3′, Rv 5′-CTGGCGTGTCTGGAGGAAAATATC-3′을 사용하였을 경우 저항성 계통에서만 증폭되는 단일 band를 얻었다. 그러나 사용한 primer는 온도 조건에 따라 증폭양에서 차이를 보이는데 43℃로 증폭할 경우 약간의 미세 band가 출현하였으며 최적 온도조건은 52℃로 나타났다.

SCAR 표지인자를 제안한 Paran과 Michelmore (Otani et al., 1985)도 언급하였듯이 저항성과 감수성을 구별할 수 없는 monomorphsim을 보이는 표지인자는 SCAR로 부적당하다고 하였다. 이러한 현상은 RAPD 표지인자를 SCAR 표지인자로 전환하는 과정에서 흔히 나타나는 것으로서 monomorphism을 보이는 DNA 밴드를 회수하여 다양한 제한효소로 절단함으로 polymorphism을 얻을 수 있다는 보고도 있다(Kang, 1999). 그러나 이 과정에 많은 노력이 필요한데 반하여 다형성을 얻지 못하는 경우가 있다.

OPB15$_{1300}$ clone

5′-GGAGGGTGTTGGATCAACAGCTATAGGAATTATTCTGGATCAATCTGACTTAT
ACTATCTGAGGAATGTGGTTAGAAGTTTCGTTGTAATATTTCTCCATTGTCTATT
ACTGCATGGTTCTCATGACCGCCCGGCAGACCTTACTGAAAGGATGAGTTTGGCAT
AATGCTTAAAGAATTCTAGAGGTAACTTCACCTGGAAGTGGCGATTAGAGAATTT
AATTTCGTGATTTTTTTTTTACCCTAAGGACACTGTAATGCCGCTACCAAACTTC
AAATGAAAGAAACATTTTAGTACACTGGTGGGGTTACGCTCTTTTATAATGGATT
AATGAAATATTAGAACATGAAGGCATCTTTGAAAAATGGTTTTGTTTGATTAAA
TGCGGATAATGGAGATAAAATCGACAGCAAGTTATGACAACGAAGGGGTTAGAGT
TTAGATGTGGACTGCCGCTGATAGATGAGACATTGACTTGCAAAATTGTTTAGAG
CCTACAAGATTATAAAGTACCAAAATGGTTGAAGAATTTTCCAGTACCCGAGCCC
AGATCGCTCAATTGGCCCAGATAACTTATTCACAACGGAAATTGGTGGGGGAAAA
GTGCCTGTTTCCTCCGATCTGGATGGTTCCGTACCAGTACTTTTTGAGGATCGAAC
CATTCAAGGTTCTTCAAGAGATGGCGGTTTTCTGCCTACAGGCTATAAACACAAT
ATTCATTCATCTAAGGATGAAATCAACATCATTATTGGCCTATACAACCTTTATG
TTGTGGACGATAAAATAACCCAAAGGAACTGATTACTGGCTCAACACCCAACTGA
GAGAAGGAATTAAAAAACCAGACAACGACAATCACATCAATGGAGTATGATTCAC
AGGATGGTGCATATGGGATTTCTTCAATACTCAAGAATTCACAGCGGCGACCGCA
GCTTCTGTTACACCGACACCCAGAAGCCCAGCCATCATTGGATGGTGGTTGACGCG
GAATCCCACAGCCATGGTGGCATGGTCCACCACAATGCCCTTCATGGCATGGCTTA
CAACACCCTCC-3′

OPAB18$_{800}$ clone

5′-CTGGCGTGTCCACATTTTTGGTAGCTAAGCCATTGAAAGCACGTAATAAAATC
TGGGTATATGATAAAATCTTGATTATTAGATCAATAAGGTATATGATAAAATCT
AAATTGTTGTACAAATATACGGCATAAAGATACATAAGATGAGACTAAGGAATG
ATTGGACTGAGTTGCACAGGCATGAGTTGCACACGTGGAGTCAGCTCATTAACAG
TATCTTTTCCATATTTATAGTCGAGTCATTTTAAAAATAGCTTTACATGTTTTCA
AAAATAAAATTCCATTTGATAATTCAAATATTAAATTCGTTTTTAATAATTTCT
CAAAACAATTTTTAAAAACTAAAAAACACTTCATATTTATTTTAAAAAACTTGA
AAAACTGCTTTCAATTGAGAATTTATTAAATATATTTTTGAAATTAATAAACAG
TTTTAACAACAGCATTCAAAACAGGTTCACAGGATCCAATCCATTCAGGATAGAT
TAAAAATAGAAGTAGAACTAACTATACTGTTCTTGATATTTTGATTAAAATAAT
ATAGAAACAAAAGGAGTTTCTAGATTTACGGCAATGGACGGCTGCATTTTCACTG
GAGTGACATCCACTTAACCTCATCGCGATCCTATGTCCGTGATCCGTAGACTGAGG
TGCTCTCTCACTCTCGTGCCTTGAGCTTTTAATTAAATACGTCCACGTGTCGTCCG
CCTCAGAAATATCAAAGCATGGCTTCCGAATACCAAAAAGCGCCATACTCTCTCTT
CCTCTCCCATGCTCTCTGATTACTACTCTTCCGTCTTCTTCTTCTTCACTCTCCGA
TATTTTCCTCCAGACACGCCAG-3ACAGAAAATTGGATGCTTATTCATTTAAAAGA
GAATAAAAAGATCATCAAAAGCACATTTTGTTAGGGCCCTTTTGAAAATTGACTT
GCAGAAGGCAACTTAGGAAAGTAAAAGAAAGTGAGATACGTACAGTTATGGAAAG
GAAGTGGCTATAGAAAGACATTTAATTTTTCACTTGATGAATGTGAGA-3′

Fig. 15. Nucleotide sequences of clones used for the design of SCAR markers (SC-OPB15$_{1300}$ and SC-OPAB18$_{800}$). The underlined indicate sequences of the 10 bp-long primer which were used for RAPD analysis.

Table 20. Primers designated for SCAR marker by using nucleotide sequence information of OPB15$_{1300}$ and OPAB18$_{800}$ clones.

SCAR marker	Orientation	Length	Oligonucleotide
SC-OPB15$_{1300}$-F	Forward	24 bp	5′-GGAGGGTGTTGGATCAACAGCTAT-3′
SC-OPB15$_{1300}$-R	Reverse	24 bp	5′-GGAGGGTGTTGTAAGCCATGCCAT-3′
SC-OPAB18$_{800}$-F	Forward	24 bp	5′-CTGGCGTGTCCACATTTTTGGTAG-3′
SC-OPAB18$_{800}$-F	Reverse	24 bp	5′-CTGGCGTGTCTGGAGGAAAATATC-3′

The underlined indicate sequences of the original RAPD primers.

라. 새눈무늬병 저항성의 유전분석

포도 새눈무늬병에 관여하는 유전자의 구성분포를 알기위해 저항성 품종 'Tamnara'와 감수성 품종 'Kyoho', 'M.B.A.', 'Kaiji', 'Alden'을 대상으로 F2집단을 육성하여 생물학적 검정을 실시한 결과 Table 8과 같다. 'Tamnara', 'M.B.A.', 'Kaiji', 'Alden' F2집단에서 저항성 및 감수성의 분리는 3 : 1로 핵 지배하는 single dominant 유전자로 확인 할 수 있었다. 이는 이들 품종의 교배조합이 저항성친 및 감수성친으로 구성되어 있는 것으로 생각되어진다. 그러나 F2 집단에서 1 : 1로 분리되는 'Kyoho'의 경우는 'Kyoho'을 육성한 조합친 중에 중도저항성을 보이거나 또는 F1을 사용하여 조합한 것으로 생각되어진다. 따라서 DNA 마커 탐색을 위해 'Tamnara' 품종을 이용한다면 정확한 연관 마커를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Table 5. Segregation analysis of anthracnose resistance in grape seedlings.

Varieties	No. of plants in F2 population		χ^2-test
	Resistant	Susceptible	
Tamnara	48	15	0.0476 (3:1)
Muscat Bailey A	45	13	0.2069 (3:1)
Kaiji	30	8	0.3157 (3:1)
Alden	40	13	0.0063 (3:1)
Kycho	28	26	0.0700 (1:1)

[NS]Nonsignificant at *P=0.05*.

바. SCAR표지의 새눈무늬병 저항성 유전자와 연관

저항성 및 감수성 계통들에서 얻어진 SCAR marker가 새눈무늬병 저항성 유전자와의 연관성을 조사하기 위해 저항성 품종 'Tamnara'를 사용하였다. 사용한 'Tamnara' 품종은 새눈무늬병 저항성친 'Campbell Early'와 감수성친 'Himrod Seedless'의 F1으로 자식하여 얻어진 F2 집단에서 생물학적 검정을 통해 저항성을 보이는 10개체 및 감수성을 보이는 10개체를 선발한 후 각각 식물체로부터 DNA를 추출하여 template로 사용하였다. $OPAB18_{800}$ Fw 5'-CTGGCGTGTCCACATTTTTGGTAG-3' Rv 5'-CTGGCGTGTCTGGAGGAAAATATC-3'을 사용한 결과 'Campbell Early', F1 및 F2 집단에서 저항성 개체에서만 band가 확인되었다(Fig 16). 이들 결과로 미루어 볼 때, RAPD에서 얻어진 SCAR marker는 새눈무늬병 저항성 유전자와 아주 밀접하게 연관되어 있을 것으로서 이들 marker를 이용하여 저항성 계통의 선발에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

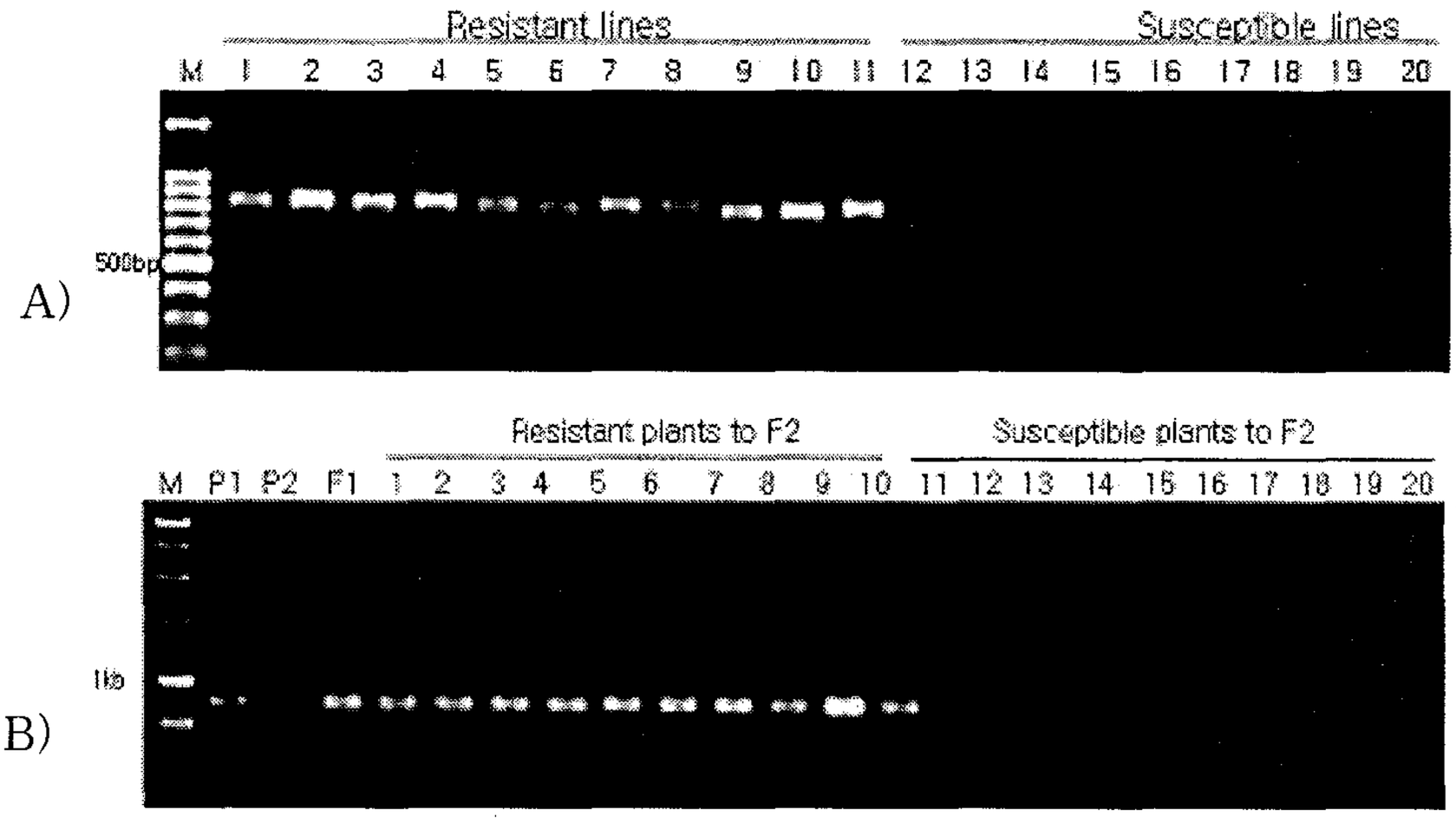

Fig. 4. Profiles of PCR products using SCAR marker 'SC-OPAB18$_{800}$' in resistant and susceptible lines. PCRs were carried out with OPAB18$_{800}$ primer set at 52°C annealing temperature. M: DNA size marker. A) 1-11: resistant lines, 12-20: susceptible ones described in Table 1. B) P1: 'Campbell Early', P2: 'Himrod Seedless', F1: 'Tamnara', and 20 seedlings from the self-crossing of 'Tamnara'.

2. AFLP 표지인자 탐색

병저항성 유전분석을 통해 핵 지배 single dominant 유전자에 의해 새눈무늬병이 관여하고 있고 'Tamnara' 품종의 F2 집단에서 16개의 완전저항성 개체 및 15개의 완전감수성 개체를 선택하여 genomic DNA를 추출하여 각 개체로부터 동일 양의 DNA를 모아 각각의 저항성과 감수성 DNA bulk를 조제하였다. RAPD보다 효율이 높은 AFLP 분석을 통하여 새눈무늬병 저항성 연관 AFLP marker를 탐색하기 위하여, 저항성 친 'Campbell Early' (P1), 감수성 친 'Himrod Seedless' (P2), F1, 저항성 F2 DNA bulk 및 감수성 F2 DNA bulk를 사용하여 AFLP 분석을 실시하였다.

AFLP 반응을 수행하여 저항성 DNA bulk에만 특이 band를 나타나는 primer조합을 선발하였다 (Fig. 17A). 사용된 primer 조합은 EcoR1 + 2(or 3) primer 9개와 Mse I + 3 primer 8개를 조합하여 총 72개의 조합으로 AFLP를 수행하였으며, 선발한 결과 AFLP 표지인자 가능성이 있는 22종의 primer 조합에서 저항성 bulk 특이적 밴드를 관찰할 수 있었다. 1차적으로 선발된 22개의 primer 조합을 양친인 저항성 'Campbell

Early'와 감수성 'Himrod Seedless', 저항성 Tamnara F1, Tamnara F2는 저항성 DNA bulk와 이병성 DNA bulk를 이용하여 새눈무늬병에 저항성과 감수성의 구분이 가능한 분리양상을 나타내는지 확인하였다. E2M2 조합에서 저항성 교배친인 'Campbell Early'와 Tamnara F2 저항성 집단에서 약 200bp 정도에 특이 밴드가 출현하는 AFLP 표지인자를 선발하였다(Fig. 17B).

AFLP 방법은 RAPD 반응과 비교하였을 때 표지인자의 선발효율은 높은 것으로 판단되며 이는 기본적으로 AFLP가 탐지하는 genomic loci가 RAPD에 비해 10여배 이상 높기 때문인 것으로 판단된다. 또한 AFLP 반응은 두 primer의 조합에 의해 표지인자를 선발하기 때문에 적은 수의 primer로도 많은 정보를 얻을 수 있는 장점이 있었다. 더욱이 AFLP 반응은 DNA 농도 등을 포함한 반응조건에 큰 영향을 받지 않아 선발된 표지인자의 재현성이 매우 높아 신뢰성이 있었다.

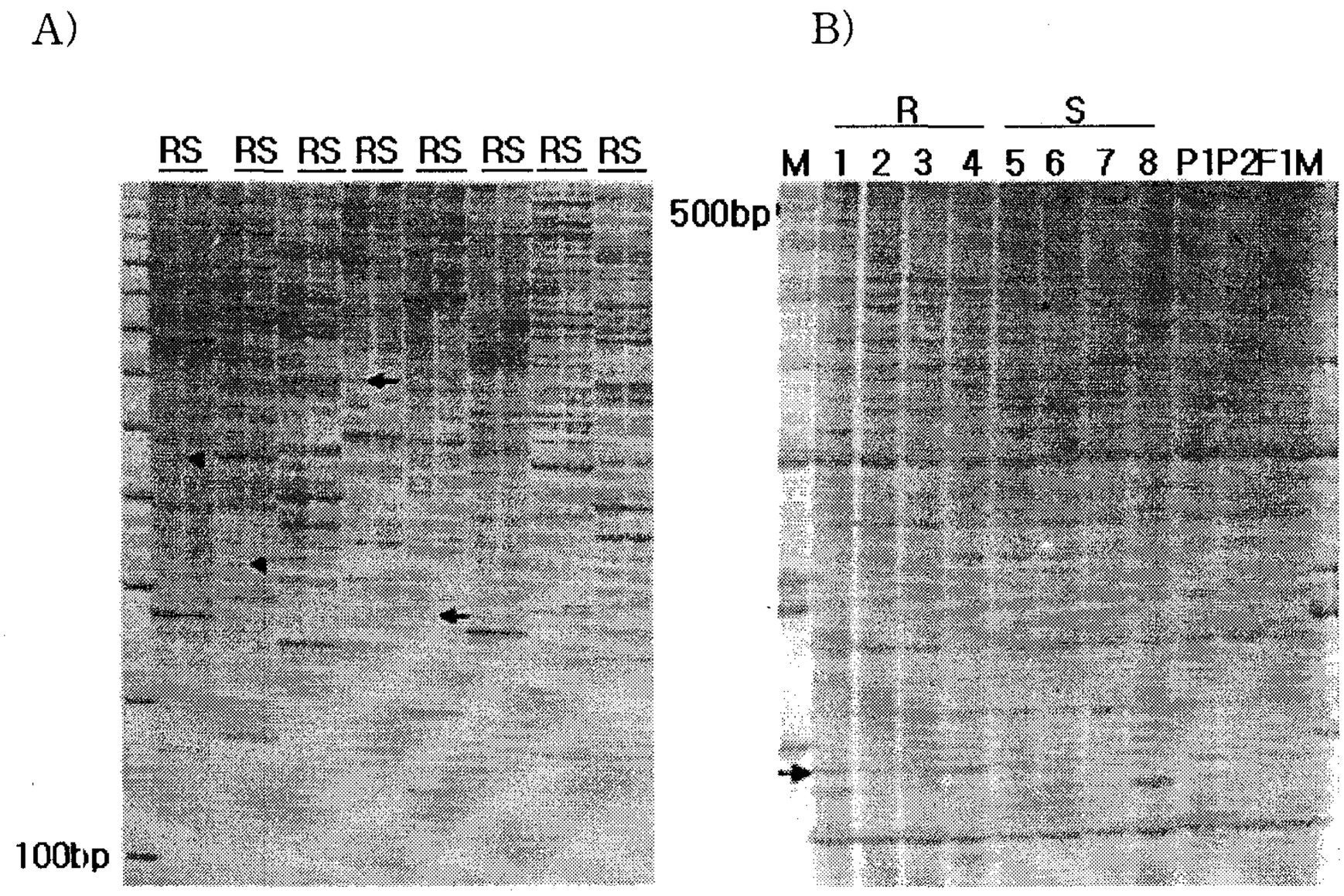

Fig. 5. AFLP profiles amplified by *Eco*RI + NN(N) primer in combination with *Mse*I + NNN primers on two DNA bulks (A), and four different bulks including the 'Campbell Early' (P1), 'Himrod Seedless'(P2), and 'Tamnara' (F1) (B). Arrowheads indicate bands specific to resistant DNA bulks.

4. 적요

포도 내병성 품종육성의 일환으로 국내 환경에 적합한 품종의 선발을 위한 체계적이고 효율적인 병저항성 검정 체계구축, 육종연한단축과 육종효율증대를 위한 내병성표지의 선발, MAS (marker assisted selection) 적용성, 병원균이 식물 조직에 감염되었을 때 반응하는 식물 유전자군의 해석을 통해 분자육종체계를 확립하고자 실시하였다.
포도 새눈무늬병 저항성과 연관된 분자마커의 선발을 위하여 209개의 RAPD primer를 저항성 11계통과 감수성 9계통에 적용한 결과 저항성 계통 특이 DNA 표지인자를 나타내는 OPB15와 OPAB18 primer 선발하여 특이 band를 clone화 하였다. 또한 이들 clone 염기배열을 분석하여 SCAR marker '$OPB15_{1300}$' 및 '$OPAB18_{800}$'을 개발하였다. 또한 F2세대를 이용한 유전분석 결과 저항성과 감수성의 후대비율이 3:1(χ^2=0.06~0.32) 포도 새눈무늬병 저항성은 단일우성유전자에 의해 지배된다는 것을 확인하였다.
AFLP 분석한 결과 E2M2 조합에서 저항성 교배친인 'Campbell Early'와 Tamnara F2 저항성 집단 약 200bp 정도에 특이 밴드가 출현하는 AFLP 표지인자를 선발하였다

이상의 결과로 본 실험에서 개발한 SCAR marker들을 포도 새눈무늬병 저항성 육종 program에 이용한다면 육종기한을 단축할 뿐만 아니라 저항성 유전자의 동정에 필요한 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연 구 목 표	평가의 착안점 및 척도	목표달성도 (%)
- **병원균접종에 의한 검정체계 개발**	1. 병원균 배양 조건 및 포자 형성 유도 2. 병원균 포자 현탁액 접종에 의한 병반 형성 차이 비교 3. 병원균 포자접종을 통한 포도 품종의 저항성 검정 4. 포장저항성 평가	97
- **배양여액을 이용한 검정체계 개발**	5. 배양여액 획득 배양배지선발 6. 배양여액을 이용한 검정 7. 독성물질의 부분정제	95
- **유전자원의 포도 새눈무늬병 저항성 검정**	8. 저항성 반응 분석 9. 포도 새눈무늬병 저항성 육종소재 선발	95
- **내병성관련 DNA marker 선발**	1. 포도 새눈무늬병 저항성 유전 분석 2. BSA에 의한 RAPD 3. 저항성 연관 RAPD 표지 선발	98
- **AFLP 표지 클로닝 및 SCAR표지 개발**	4. AFLP 반응 후 저항성 특이 표지인자 선발 5. AFLP 표지 염기서열 분석 6. PCR primer 설계 및 합성 7. SCAR 표지 선발	97
- **개발 표지를 이용한 저항성 판별 적용**	8. DNA 표지와 형질간의 연관분석 9. SCAR 표지인자를 이용한 저항성 판별	95

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

본 연구결과 포도의 새눈무늬병 저항성의 조기 검정 체계가 구축되었으며 포도 새눈무늬병 저항성 유전자원 및 육종소재를 선발하여 이러한 기술과 육종소재를 내병성 포도 육종 시스템에 접목하여 포도 육종효율을 증진시킬 수 있다. 또한 포도 새눈무늬병 저항성 형질의 유전양식을 구명하고 저항성 반응의 부분적인 기작을 밝힘으로써 향후 내병성 육종소재와 교배실생의 저항성 발현 양상을 예측할 수 있다. 그러나 병원균이 생성하는 독성물질에 대한 연구가 부분적으로 이루어져 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 저항성 발현 기작에 대한 연구도 수행하여 포도 육종 및 생리 연구에 도움을 줄 수 있으리라 여겨진다.

2. 타연구에의 응용

포도 새눈무늬병균이 생성하는 독성물질이 기주특이성으로 발현된다는 연구를 통해 배양기내에서 배양여액을 이용한 저항성 개체의 선발에 대한 연구를 추진할 수 있을 것이다. 또한 독성물질에 대한 식물체의 반응 연구를 통해 병원균을 직접 접종하여 반응을 밝히는 연구보다 효과적이고 체계적으로 식물의 병저항성 기작연구를 수행할 수 있을 것이다. 또한 분자표지의 개발로 인해 병저항성 유전자 및 방어반응 유전자에 대한 연구에 전환점이 되리라 본다.

3. 기업화 추진방안

본 연구의 결과를 농약개발기업이나 새로운 품종을 취급하는 각도 기술원 및 기술센터에 보급하여 효율적인 저항성 검정과 신농약 개발에 기여할 것으로 본다.

제 6 장　연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 해외 포도 유전자원 도입

- 중국, 이태리, 미국으로부터 유럽종 포도 및 머스카딘 포도 품종 도입

2. 유전육종정보 수집

가. 유럽식물병리학회 참가

- 포도 새눈무늬병 저항성 검정기술 개발 주제 발표
- 식물 병원균이 생성하는 독소를 이용한 육종 기술 도입

나. 미국원예학회 참가

- 배양여액을 이용한 저항성 검정기술 개발 연구 발표
- 미국의 포도학자 및 병리학자들과의 교류활성화
- 병저항성 유전자 및 분자표지 개발에 관한 최신 기술 습득
- 저항성인 머스카딘 포도의 육종활용방법 습득

다. 이태리 국제 포도유전육종학회 참가

- 저항성 포도 유전자원의 활용 방안
- 머스카다인 포도를 이용한 저항성 유전자 클로닝 및 분자육종 기술

제 7 장 참고문헌

Adam-Blondon, A., F. Lahogue-Esnault, A. Bouquet, J.M. Boursiquot, and P. This. 2001. Usefulness of two SCAR markers for-marker assisted selection of seedless grapevine cultivars. Vitis 40:147-155.

Adrian, M., H. Rajaei, P. Jeandet, J. Veneau, and R. Bessis. 1998. Resverastrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. Phytopath. 88:472-476.

Adrian, M., P. Jeandet, J. Veneau, L.A. Weston, and R. Bessis. 1997. Biological activity of resverastrol, a stilbene compound from grapevines, against Botrytis cinerea, the causal agent for gray mold. J. Chem. Ecol. 23:1689-1702.

Akkurt, M., L. Welter, E. Maul, R. Topfer, and E. Zypran. 2006. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinular nector*) resistance in grapevine (*V. vinifera* L. and *Vitis* sp.). Mol. Breeding 19:103-111

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J.H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database seartch programs. Nucleic Acid Research 25:3389-3402.

Arnedo-Andres, M., R. Gil-Ortega, M. Luis-Arteaga, and J. Hormaza. 2002. Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Pvr4* locus for resistance to PVY in peper (*Capsicum annuum*). Theor Appl Genet. 105:1067-1074.

Asnaghi, C., D. Roques, S. Ruffel, C. Kaye, J.Y. Hoarau, H. Telismart, J.C. Girard, L.M. Raboin, A.M. Risterucci, L. Grivet, and A. D'Hont. 2004. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Brul*) using bulked segregant analysis and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 108:759-64.

Bi, Y.M., P. Kenton, L. Mur, R. Darby, and J. Draper. 1995. Hydrogen peroxide functions upstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. Plant J. 8:245-252.

Bradshaw, J.E., C.A. Hackett, R.C. Meyer, D. Milbourne, J.W. McNicol, M.S. Phillips, and R. Waugh. 1998. Identification of AFLP and SSR Markers associated with quantitative resistance to *Globodera palliad* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-associated selection. Theor. Appl Genet. 97:202-210.

Buiatti, M., and D.S. Ingram. 1991. Phytotoxins as tools in breeding and selection of disease-resistant plants. Experientia 47:811-819.

Bulat, S.A., M. Lubeck, I.A. Alekhina, D.F. Jensen, I.M. Knudsen, and P.S. Lubeck.

2000. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. Appl. Environ. Microbiol. 66:4758-4763.

Cerva, M.T., J. Gusmao, M. Steenackers, J. Perterman, V. Storme, A.V. Broeck, M.V. Montagu, and W.Boerjan. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in Populua. 쏘댁. Appl. Genet. 93:733-737.

Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, and S.R. McCouch. 1997. Development of microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa*). Theor. Appl. genet. 95:553-567.

Dai, G.H., C. Andray, L. Mondolot-Cosson, and D. Boubals. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, Vitis vinifera, V. rupestris and *V. rotundifolia* and downy mildew fungus, Plasmopara viticola. Physiol. Mol. Plant Pathol. 46:177-188.

Dalbo, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, H. Steinkellner, K.M. Sefc, and B.I. Reisch. 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. Genome 43:333-340.

Darvill, A.G. and P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35:243-275.

Delany, T.P., S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich, K. Weymann, D. Negrotto, T. Gaffney, M. Gut-Rella, H. Kessmann, E. Ward, and J. Ryals. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266:1247-1250.

Dixon, R.A., M.J. Harrison, and C. Lamb. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. Ann. Rev. Phytopathol. 32:479-501.

Dixon, R. A., and M. G. Harrison. 1992. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. Adv. Genet. 28:165-234.

Doligez, A., A. Bouquet, Y. Danglot, F. Lahogue, S. Riaz, P. Meredith, J. Edwards, and P. This. 2001. Genetic mapping of grapevine (*V. vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedless and berry weight. Ther. Appl. Genet. 105:780-795.

Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Current Opinion Plant Biol. 1:316-323.

Durbin, R. D. 1988. The mechanism for self-protection against bacterial phytotoxins. Ann. Rev. Phytopathol. 26:313-329.

Elad, Y. 1997. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. Biol. Rev. 72:381-422.

Enyedi, A.J., N. Yalphani, P. Silverman, and I. Raskin. 1992. Localisation, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2480-2484.

Feys, B.J. and J.E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends Genet.16:446-455.

Fisher, B.M., I. Salakhutdinov, M. Akkurt, R. Eibach, K.J. Edwards, R. Topfer, and E.M. Zyprian. 2003. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. Theor. Appl. Genet. 108:501-515.

FAO. 2002. http://apps.fao.org/.

Gaffney, T., L. Friedrich, B. Vernooij, D. Negrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmann, and J. Ryals. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science 261:754-756.

Gracen, V.E., M.J. Forster, K.D. Sayr, and C.O. Grogan. 1971. Rapid method for screening resistance plants for control of southern corn leaf blight. Plant Dis. Reptr. 55:469-470.

Grausgruber, H., M. Lemmens, H. Burstmayr, and P. Ruckenbauer. 1998. Chromosomal location of *Fusarium head blight resistance and in vitro toxin tolerance in wheat using the Hobbit 'sib' (Triticum macha) chromosome substitution lines. J. Gen. Breeding 52:173-180.*

Hajjeh, H., M. Miazzi, M.A. De Guido, and F. Fareta. 2005. Specific SCAR primers for the flag shoot and ascospore biotypes of the grape powdery mildew fungus *Erysiphe nectar*. J. Plant Pathol. 87:71-74.

Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexin: what have we learned after 60 years? Annu. Rev. Phytopathol. 37:285-306.

Hartl, L., V. Mohler, F.J. Zeller, S.L.K. Hsam, and G. Schweizer. 1999. Identification of AFLP markers closely linked to the podery mildew resistance genes *Pmlc* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum*). Genome 42:322-329.

Hoos, G. and R.J. Blaich. 1990. Influence of resverastrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. J. Phytopathol. 129:102-110.

Iriti, M., M. Rossoni, M. Borgo, and F. Faoro. 2004. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to B. cinerea. J. Agri. Food. Chem. 52:4406-4413.

Jayasankar, S., Z. Li, and D.J. Gray. 2000. In vitro selection of *V. vinifera* 'Chardonay' with *E. ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. Planta 211:200-208.

Jeandet, P., R. Bessis, M. Sbaghi, and P. Meunier. 1995. Production of the phytoalexin resverastrol by grapes as response to *Botrytis* attack under natural conditions. J. Phytopathol. 143:135-139.

Johal, G.S. and S.P. Briggs. 1992. Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. Science 258:985-987.

Kang, B.C. 1999. Molecular linkage map construction and mapping genes for capscicinoids content and Bs3 in hot pepper. Ph.D. thesis. Seoul Natianl University, Seoul, Korea.

Kasuga, T., S.S. Salimath, J.R. Shi, M. Gijzen, R.I. Buzzell, and M.K. Bhattacharyya. 1997. High resolution genetic and physical mapping of molecular markers linked to the phytophthora resistance gene *rps1-k* in soybean. Mol. Plant-Microbe Interactions 10:1035-1044.

Kim, M.Y., K.J. Song, J.H. Hwang, Y.U. Shin, and H.J. Lee. 2003. Development of RAPD and SCAR markers linked to the Co gene conferring columnar growth habitat in apple (*Malus pumila* Mill). J. Hort. Sci. Biotechnol. 78:512-517.

Kim, S.C., C.H. Kim, and W.D. Cho. 1980. Incidence of major diseases and control in grapes. Ann. Rept. Agr. Technol. Inst. p. 369-371.

Kitajima, H. 1989. Diseases in grapes, p. 396-453. In: H. Kitajima (ed.). Diseases in fruit trees. Youkendo Press, Tokyo, Japan.

Kohmoto, K., T. Taniguchi,and S. Nishimura. 1977. Correlation between the susceptibility of apple cultivars to *Alternaria mali* and their sensitivity to AM-toxin I. Ann. Phytopatho. Soc. Japan 43:65-68.

Langcake, P. 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resverastrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin, and pterostilbene.

Physiol. Plant Pathol. 18:213-226.

Langcake, P. and R.J. Price. 1976. The production of resverastrol by *Vitis vinifera* and other members of the Viticeae as response to infection or injury. Physiol. Plant Pathol. 12:201-204.

Lemmens, M., Reisinger, A., Burstmayr, H. and Ruckenbaur, P. 1994. Breeding for head blight (*Fusarium* spp.) resistance in wheat: Development of a mycotoxin-based selection method of seedlings. Acta Horticulturae 355:223-232.

Lu, Z.X., K. Sossey-Alaoui, G.L. Reighard, W.V. Baird, and A.G. Abbott. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. Theor. Appl. Genet. 99:115-122.

Magarey, R.D., B.E. Coffey, and R.W. Emmett. 1933. Anthracnose of grapevines. Plant Prot. Quart. 8:106-110.

Ministry of Agriculture and Forestry. 2002. Status of fruit industry.

Malamy, J. and D. Klessig. 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. Plant J. 2:643-654.

Malamy, J., J.P. Carr, D. Klessig, and I. Raskin. 1990. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science 250:1002-1004.

Mayama, S., A.P.A. Bordin, Y. Sasabe, Y. Oishi, and T. Tani. 1990. Selection of somaclonal variants of oats resistant to Helminthosporium victoriaewhich produces a host specific toxin, victorin. Plant Tissue Culture Letters 7:64-68.

Metraux, J.P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdoorf, E. Schmid, W. Blum, and B. Inverardi. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science 250:1004-1006.

Mirica, I.I. 1994. Anthracnose, p. 18-19. In: R.C. Pearson and A.C. Gohen (eds.). Compendium of grape diseases. Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, MN, USA.

Mortensen, J.A. 1971. Breeding grapes for central Florida. HortScience 6:149-153.

Mortensen, J.A. 1981. Sources and inheritance of resistance to anthracnose in Vitis. J. Hered. 72:423-426.

Naqvi, N.I. and B.B. Chattoo. 1996. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. Genome 39:26-30.

Negi, M.S., M. Devic, M. Delseny, and M. Lakshmikumaran. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. Theor. Appl. Genet. 101:146-152.

Olmo, H.P. 1971. *Vinifera rotundifolia* hybrids as wine grapes. Amer. J. Vit. Enol. 22:87-91.

Otani, H., K. Kohmoto, S. Nishimura, T. Nakashima, T. Ueno, and H. Fukami. 1985. Biological activities of AK-toxins I and II, Host-specific toxins from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51:285-293.

Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.

Park, J.S., and Yu, S.H. 1988. Evaluation of pear cultivar susceptibility to AK-toxin produced by *Alternaria kikuchiana*. Res. Rep. Agri. Sci. Tech. CNU, Korea 15:1-8.

Paxton, J.D. 1981. Phytoalexins - A working definition. Phytopath. Z. 101:106-109.

Penner, G.A., A. Bush, R. Wise, W. Kim, L. Domier, K. Kasha, A. Laroche, G. Scoles, S.J. Molnar, and G. Fedak. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methodol. Appl. 2:341-345.

Perron, M., A.G. Goedon, and J. Bousquet. 1995. Species-specific RAPD fingerprints for the closely related with *Picea marana* and *P. rubens*. Theor. Appl. Genet. 91:142-149.

Raskin, I., I.M. Turner, and W.R. Melander. 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:2214-2218.

Saito, A., N. Nakazawa, and M. Suzuki. 2001. Selection of mutants resistant to Alternaria blotch from *in vitro*-cultured apple shoots irradiated with X- and -rays. J. Plant Physiol. 158:391-400.

Sarig, P., Y. Zutkhi, A. Monjauze, N. Lisker, and R. Ben-Arie. 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*.

Physiol. Mol. Plant Pathol. 50:337-347.

Schertz, K.F. and Tai, Y.P. 1969. Inheritance of reaction of Sorghum bicolor to toxin produced by *Periconia circinata*. Crop Sci. 9:621-624.

Steiner, G.W. and R.S. Byther. 1971.P artial characterization and use of a host-specific toxin from *Helminthosporium sacchari* on sugarcane. Phytopath. 61:691-695.

Timmer, L.W., M. Priest, P. Broadbent, and M.K. Tan. 1996. Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoe* causing scab diseases of citrus. Phytopathology 86:1032-1038.

Qi, X., R.E. Niks, P. Sta, and P. Lindhout. 1998. Identification of QTLs for partial reistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. Theor. Appl. Genet. 96:1205-1215.

Vernooij, B., L. Friedrich, A. Morse, R. Reist, R. Kolditz-Jawhar, E. Ward, S. Uknes, H. Kessmann, and J. Ryals. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. Plant Cell 6:959-965.

Voorrips, R.E., M.C. Jongerius, and H.J. Kanne. 1997. Mapping of two genes for resistance to culbroot (*Plasmodiphora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassicae oleracea* by means of RFLP and AFLP makers. Theor. Appl. Genet. 94:75-82.

Vidhyasekaran, P. and A. Charan. 1972. Osmotic pressure of grapevine leaves in relation to anthracnose disease incidence. Ind. J. Exp. Biol. 10:398-399.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.

Wang, Y., Y. Liu, P. He, O. Lamikanra, and J. Lu. 1998. Resistance of Chinese Vitis species to E. ampelina Shear. HortScience 33:123-126.

Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotechnol. 10:186-191.

Weeden, N.F., G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen, and M.A. Lodhi. 1992. Identification and reliability of RAPD markers. In applications of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposium. Minnesota. 12-17.

Wheeler, H. and H.H. Luke. 1955. Mass screening for disease resistant mutant in oats. Science 122:1229.

Whiteside, J.O. 1975. Biological characteristics of *E. fawcetti* pertaining to the epidemiology of sour orange scab. Phytopathology 65:1170-1176.

Williams, J.G.K., M.K. Hanfey, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymology 218:704-740.

Woo, M.J., J.W. Seo, and S.Y. Byun. 2005. Extraction of resveratrol containing grape seed oil with spercritical carbon dioxide. Kor. J. Biotech. Bioeng. 20:383-386.

Yoshioka, K., H. Nakashita, D. F. Klessig, and I. Yamaguchi. 2001. Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. Plant J. 25:149-157.

Yu, S.H., H.K. Shim, and J.S. Park. 1987. Production of host specific toxin by *Alternaria mali* and its biological activity. Kor. J. Plant Protection 26:171-178.

Yun, H.K., and S.H. Yu. 1992. Use of host-specific toxins from *Alternaria* pathogens for determining disease susceptibility of crops. I. Evaluation of apple cultivar to Alternaria blotch. Kor. J. Plant Pathology 8:185-189.

Yun, H.K., K.S. Park, J.H. Rho, B.O. Kwon, and S.B. Jeong. 2003. Development of an efficient screening system for anthracnose resistance in grapes. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44:809-812.

Yun, H.K., K.S. Park, J.H. Rho, Y.J. Choi, and S.B. Jeong. 2004. Developing screening system for resistance to anthracnose in grapes by using culture filtrates from *E. ampelina*. Proceeding of 7th Conference of the European Foundation for Plant Pathol. 58.

J. Kor. Soc. Hort. Sci. 46(1):59~63. 2005.

Salicylic Acid and Resveratrol Content Changes as Affected by Downy Mildew and Anthracnose in Grapevines

Jeong Ho Roh, Hae Keun Yun*, Kyo Sun Park, Youn Jung Choi, Seong Sig Hong, and Seong Ho Jeon

National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon 440-706, Korea
(*Corresponding author)

Abstract. Grapevines have been known to express their own defense systems to protect themselves against foreign pathogen attacks. To investigate the defense responses in grapevines against downy mildew and anthracnose, the change patterns of salicylic acid and resveratrol contents were evaluated by high performance liquid chromatography in grapevine leaves after pathogen inoculation or culture filtrate treatment of *Elsinoe ampelina*. The contents of salicylic acid and resveratrol started to increase sharply within 1 h after inoculation of resistant cultivar 'Campbell Early', but there were little content changes in the cultivars, 'Rizamat' and 'Kyoho', susceptible to downy mildew and anthracnose. Similar change patterns in salicylic acid and resveratrol contents were observed in cell free culture filtrate treated with anthracnose pathogen. Therefore, it is considered that the differences in resistance to downy mildew and anthracnose among grapevine cultivars are closely related to the production of salicylic acid and resveratrol in their stems.

Additional key words: *Elsinoe ampelina*, pathogen inoculation, pathogenesis-related proteins, phenolics, phytoalexins

Introduction

Plants have evolved sophisticated systems of detection and responded to decipher the pathogen signals and induce appropriate defense responses to pathogen attacks. These systems include specific networks that operate through the action of signaling molecules such as salicylic acid (SA), jasmonic acid, and ethylene, and cause the accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins, phytoalexins, and other phenolic compounds that are toxic to the pathogens (Dong, 1998; Elad, 1997; Feys and Parker, 2000).

The importance of chemical diversity is linked to defense traits against both biotic and abiotic stresses. Phytoalexins are low molecular weight, and antimicrobial compounds that are both synthesized by plants in response to microorganisms or pathogen attacks (Paxton, 1981). Phytoalexins accumulate at the site of infection in sufficient amount to successfully inhibit the growth of both fungi and bacteria (Darvill and Albersheim, 1984).

Trans-resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene), one of the phenylpropanoid compounds produced by the shikimic acid pathway through SA (Iriti et al., 2004), is an antioxidant compound naturally produced in many plants including grapevine, and it is the major source of the phytoalexin response of plants. It accumulates in vine leaves and grape skin in response to various fungal infections, UV-irradiation, and other chemicals (Adrian et al., 1997; Jeandet et al., 1995; Langcake, 1981). The synthesis of trans-resveratrol plays a pivotal role in resistance mechanisms of certain plants against fungal infection. It has been shown that the rapidity and amount of resveratrol synthesis are positively correlated with resistance of grapevine cultivars to gray molds, which is caused by *Botrytis cinerea* (Langcake and Price, 1976). Trans-resveratrol has also been proven to enhance the resistance of vine plants to other pathogens, such as *Plasmopara viticola* (Dai et al., 1995), *Phomopsis viticola* (Hoos and Blaich, 1990), and *Rhizopus stonifer* (Sarig et al., 1997).

SA has been shown to induce various defense responses in plants against pathogen attacks (Malamy and Klessig, 1992). SA has merged as an important component of the signal transduction chain leading to the expression of PR proteins and exhibition of acquired resistance. SA accumulates to high levels surrounding developing lesions prior to the transcription activation of PR genes with a subsequent, much smaller, systemic rise in SA concentration. This is accompanied by induction of PR gene expression which is concomitant with the onset of acquired resistance (Enyedi et al., 1992; Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990). Exogenous application of SA also induces acquired immunity and expression of many PR genes (Enyedi et al., 1992; Malamy et al., 1990). Transgenic plants expressing NahG, failed to exhibit systemic acquired immunity, displayed reduced PR protein accumulation and exhibited severer disease symptoms in infected leaves (Bi et al., 1995; Delaney et al., 1994; Gaffney et al., 1993; Vernooji et al., 1994).

Grapevines also show various resistances to major

Received December 27, 2004; accepted February 14, 2005.

2. Journal of American Pomological Society 2006 게재

Evaluating the Resistance of Grapevines Against Anthracnose by Pathogen Inocu...
Hae Keun Yun; Kyo Sun Park; Jeong Ho Rho; Youn Jeong Choi; Kwon Kyu Kang
Journal of the American Pomological Society; Apr 2006; 60, 2; ProQuest Agriculture Journals
pg. 97

Journal of the American Pomological Society 60(2):97-103 2006

Evaluating the Resistance of Grapevines Against Anthracnose by Pathogen Inoculation, Vineyard Inspection, and Bioassay with Culture Filtrate from *Elsinoe ampelina*

Hae Keun Yun,[1] Kyo Sun Park[1], Jeong Ho Rho[1], Youn Jeong Choi[1], and Kwon Kyu Kang[2]

Abstract

Breeding of grape cultivars resistant to anthracnose is one of the most important breeding goals in Korea. In this study, evaluation of resistance using bioassay of grape leaves with culture filtrates from *E. ampelina* and their ethyl acetate extracts was compared with pathogen inoculation and field screening. To evaluate the resistance to anthracnose disease in grape germplasm, European grapes, American grapes, and *Vitis* hybrids were tested. Bioassay with culture filtrates produced by the pathogen showed that 'Black Eye', 'Mario', 'Niunai', 'Rizamat', and 'Rosario Bianco' were sensitive, while 'Campbell Early', 'Niagara', and 'Honey Red' were tolerant to anthracnose. In the evaluation by pathogen inoculation, some cultivars such as 'Black Swan', 'Rizamat', 'Rosario Bianco', and 'Kaiji' were susceptible, while others such as 'Campbell Early', 'Niagara', 'Sheridan', and 'Izumo Queen' were found to be resistant to anthracnose. Vineyard evaluation showed the same results. The results of bioassay with culture filtrates of the pathogen were consistent with those from pathogen inoculation and screening in the vineyard.

Introduction

Grape (*Vitis* spp.), one of the world's most important fruit crops, is subject to a number of bacterial, fungal, and viral diseases (6). Grape anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina* Shear, specially damages European grape (*V. vinifera*) and its hybrids grown in warm and humid climates (6). The pathogenic fungus attacks all aerial parts of the vine and overwinters in dead canes and fruits, making its control very difficult (3, 5). Developing resistant grape cultivars against anthracnose is needed to reduce the labor and cost of chemical spraying and to produce marketable grapes. In the development of grape cultivars resistant to the disease, the selection of resistant genetic resources is initially required in the grape breeding programs.

Screening of disease resistance in plants has been conducted through a survey of natural infection in the vineyards and pathogen inoculation in greenhouses. However, this process takes time, is very costly and inefficient in screening of perennial crops like grapevine especially for large scale management. Resistance to grape anthracnose has been evaluated in native grapes as well as other grape cultivars (3, 7, 9, 13, 14). In previous studies, there were reports on the development of an efficient screening system for resistance against anthracnose among grape cultivars by pathogen inoculation (17) and by the use of culture filtrates from *E. ampelina* (18). Hence, it is necessary to examine the degree of resistance in grape cultivars growing in the country using an efficient screening system.

Screening of grapes' resistance or tolerance to anthracnose is one of the most important steps in developing disease resistant plants. It is usually done by visual inspection

[1] National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Korea, hekeun@rda.go.kr
[2] Department of Horticultural Science, Hankyung National University, Anseong 456-749, Korea.
This research was financially supported by Agricultural R&D Promotion Center, Seoul, Korea.

3. J. Hort. Sci. Biotech. 2007. 5월 게제

Journal of Horticultural Science & Biotechnology (2007) 82 (3) 380–384

Developing a screening system for resistance to anthracnose in grapevines using culture filtrates from *Elsinoe ampelina*

By H. K. YUN*, K. S. PARK, J. H. ROH, Y. J. CHOI and S. B. JEONG
National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Republic of Korea
(e-mail: bekeun@rda.go.kr) *(Accepted 4 January 2007)*

SUMMARY
This study aimed to determine whether culture filtrates produced by *Elsinoe ampelina* Shear could be used as a substitute for pathogen inoculation or field screening of grape cultivars for resistance to anthracnose. Bioassays of grape leaves using culture filtrates showed that their phytotoxicities were host-selective. Ethyl acetate extracts of culture filtrates showed the same toxicities and host selectivity among grapevine cultivars. The range of plants sensitive to culture filtrates of the pathogen and their ethyl acetate extracts was consistent with the host range of the pathogen. Susceptible cultivars were sensitive even to highly-diluted culture filtrates. However, resistant cultivars were not affected even by the original culture filtrates. Susceptible cultivars were more sensitive to undiluted culture filtrates than to highly-diluted culture filtrates. This suggests that culture filtrates of the pathogen can be used as an alternative to pathogen inoculation, or to field tests to evaluate resistance to anthracnose in grapevines.

Grapes (*Vitis* spp.), one of the World's most important fruit crops, is subject to a number of bacterial, fungal, and viral diseases (Mirica, 1994). Grape anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina* Shear, affects European grapes (*V. vinifera*), in particular, and *V. vinifera* hybrids growing in warm and humid climates (Mirica, 1994). This pathogenic fungus attacks all aerial parts of the vine and overwinters in dead canes and fruits, making control difficult (Kitajima, 1989; Magarey *et al.*, 1993). It is necessary to develop grape cultivars that are resistant to anthracnose in order to reduce labour and chemical spraying costs, and to produce marketable grapes. To date, limited information exists on resistance to anthracnose among grape cultivars grown in Korea (Mortensen, 1981; Yun *et al.*, 2003). Hence, there is a need to develop an efficient screening system to test the degree of resistance among existing and new grape cultivars.

Screening for the resistance or tolerance of grape cultivars to anthracnose is one of the most important steps in the development of disease-resistant plants. It is usually conducted by visual inspection of natural infections in vineyards, or by pathogen inoculation in the greenhouse. Resistance to anthracnose has been evaluated in native grapes as well as in grape cultivars (Kitajima, 1989; Mortensen, 1971; Olmo, 1971; Vidhyasekaran and Charan, 1972; Wang *et al.*, 1995). However, any evaluation system that relies on natural infection or pathogen inoculation is time-consuming, costly and inefficient for perennial crops such as grapevines. It also requires large-scale field management. Furthermore, it is difficult to distinguish degrees of intermediate resistance by visual inspection.

Variations in resistance or tolerance to anthracnose among grape cultivars have been reported. For instance, *V. vinifera* was highly susceptible, while *V. labrusca* and hybrids were resistant, or moderately resistant, and *V. rotundifolia* was immune to *E. ampelina* (Kitajima, 1989; Mortensen, 1971; Olmo, 1971; Vidhyasekaran and Charan, 1972; Wang *et al.*, 1995). Mortensen (1981) tested a method for artificial inoculation of young grape seedlings with *E. ampelina* and found that inoculation was less reliable than several years of vineyard observations during the warm, humid Summer months. Mortensen (1981) reported that, because of failure in the sporulation of the pathogen during yeast dextrose agar (YDA) culture, it was not possible to develop a reliable source of spores for artificial screening of young seedlings. It has been difficult to induce sporulation of *Elsinoe* species on artificial media (Timmer *et al.*, 1996; Whiteside, 1975). In a previous report, however, we described an efficient system for sporulation of *E. ampelina* by culturing in liquid media, grinding, and inoculating the pathogen onto V-8 juice (Campbell Co., Camden, NJ, USA) agar at 25°C under near-ultraviolet light (Yun *et al.*, 2003). In addition, Jayasankar *et al.* (2000) selected disease-resistant *V. vinifera* 'Chardonay' plants in vitro using a culture filtrate of *E. ampelina*.

It is hard to diagnose anthracnose or to determine disease resistance by simple visual inspection of symptom expression in vines. It is also confusing, as the symptoms may be influenced by many environmental factors. Hence, there is a need for a more detailed, quantitative and systematic screening method to determine resistance to anthracnose in grapevines, and to select resistant cultivars more efficiently.

This study aimed to develop an efficient screening system for resistance to anthracnose in grapevines using young leaves and the secondary metabolites of the pathogen as the physiologic agents.

*Author for correspondence.

4. Plant Breeding 2007 게재 예정(accepted)

Identification of SCAR and AFLP Markers Linked to Resistance Against Anthracnose in Grapes

Ki Hoon Kim[1], Hae Keun Yun[2], Kyo Sun Park[2], and Kwon Kyoo Kang[1*]

[1]*Department of Horticulture, Hankyong National University, Anseong, 456-749, Korea*
[2]*Fruit Research Division, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Korea*
*Correspodence: kykang@hknu.ac.kr

Abstract

The aim of this study is to select molecular markers from grapevines for the purpose of efficient early selection of phenotypes resistant to anthracnose in grape breeding program. Through screening 209 primers against the resistant bulk from 11 grapevine varieties versus susceptible bulks of 9 ones, we selected primers, URP6, OPAB14, OPB15, OPB17, and OPAB18. Southern analysis showed that hybridization with fragments from OPB15 and OPAB18 as probes generated specific bands in anthracnose-resistant varieties. Based on the nucleotide sequences of clones, $OPB15_{1300}$ and $OPAB18_{800}$, new primers were designed for the SCAR markers. PCR with SCAR primer, $SC\text{-}OPAB18_{800}$, showed a single band in lines resistant to anthracnose which is absent in susceptible lines. This result suggested that SCAR marker designated from RAPD markers is linked closely to the locus determining resistance to anthracnose, and could be used for the early selection of lines resistant to anthracnose. Of the 213 seedlings from 4 varieties, 163 were resistant and 49 were susceptible to anthracnose. The segregation into resistant and susceptible classes was reasonably close to the expected ratio of 3:1 (χ^2 = 0.06-0.32), indicating that anthracnose resistance was controled by a single dominant gene in grapevines. Seventy two combinations of 9 *Eco*RI+NN(N) primers and 8 *Mse*I+NNN primers were used for AFLP analysis in resistant and susceptible bulks. Of 72 combinations, 22 primer sets generated DNA polymorphic amplicons between the two bulks. Further AFLP tests with DNAs from their parents showed that of 22 primer sets selected preliminarily, primer set of E2M2 generated 200 bp long band specific to resistant lines. These markers could be useful in the early selection of seedlings resistant to anthracnose in grape breeding programs, as well as in the identification of anthracnose resistance genes from grapevines.

Additionalkeywords: phenotypes, breeding, bulked segregant selection

5. Intl J. of Plant Breeding 2007 게제(인쇄중)

International Journal of Plant Breeding ©2007 Global Science Books

Grape and Grapevine Rootstock Breeding Program in Korea

Hae Keun Yun* • Kyo Sun Park

Fruit Research Division, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, South Korea

Corresponding author: * haeksun@rda.go.kr

ABSTRACT

Several Korean wild *Vitis* species have been collected mainly from mountain areas all over the country, maintained in the vineyard, and used for improving grape cultivars at National Horticultural Research Institute (NHRI), Rural Development Administration (RDA). During the early 1960's, NHRI had developed and released eight table grape cultivars, namely: 'Cheongsoo', 'Hongdan', 'Hongisul', 'Tamnara', 'Jinok', 'Heukgoosul', 'Heukboseok', and 'Sinok'. An additional 4 grape cultivars, namely: 'Jamang', 'Sujeong', 'Heukjinjoo', and 'Topas' were developed by the Provincial Grape Experimental Stations and the Gangwon National University. Evaluation and screening procedures for major disease resistance had also been developed for grape seedlings and germplasms. The genetic analysis of seedlessness in berries and application of molecular biology techniques for disease resistance screening provided a viable tool in ensuring a highly efficient grape breeding program. The demand for grafted scions on resistant rootstocks increased with the growing popularity of growing grapes under vinyl houses as well as minimizing vine damage from crown gall and phylloxera infection. Yet, there had been no serious breeding program for grapevine rootstocks being implemented. It was only until the late 1990s that interests and efforts were undertaken by NHRI to develop rootstocks from the native wild grape germplasm suitable to Korean growing conditions.

Keywords: biotechnology, disease resistance, genetics, grape breeding, grape rootstock, wild grape germplasms

CONTENTS

INTRODUCTION 1
WILD GRAPE GERMPLASM CONSERVATION AND UTILIZATION 1
GRAPE BREEDING PROGRAMS 2
GRAPE GENETICS AND BIOTECHNOLOGY 3
EVALUATING RESISTANCE AGAINST MAJOR DISEASES 3
GRAPEVINE ROOTSTOCKS IN KOREA 4
OTHER ADVANCES AND DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY 4
CONCLUSION 5
ACKNOWLEDGEMENTS 5
REFERENCES 5

INTRODUCTION

The grape industry in Korea shows a positive trend in terms of increased area and production volume. These increasing trends can be attributed to the ease of its cultivation, higher market price compared to other fruit crops and increasing consumption, it being considered as a healthy food.

Unlike the major producing countries, Korean grapes are produced mainly for table use and only a small portion is used for processing though it had been grown for more than 1,500 years in the country. Different grape cultivars are grown nationwide depending on the prevailing climate. The European cultivars can grow well in the northern areas under over-wintering system like 'hilling' under the ground. However, most American cultivars and their hybrids with European cultivars are more adapted to Korean climatic conditions and can grow without treatment for over-wintering. For instance, the cold-hard cultivar, 'Campbell Early' occupies 74.3% of the total production area while 'Kyoho' occupies 13.1%, and 'Muscat Bailey A', 5.9% or an aggregate 93.3% of the total area cultivated for grape production (MAF 2003).

With the growing demand for the fruit, availability of good quality varieties is necessary to compete with the imported grapes. The cultivation of tetraploid grape cultivars in vinyl greenhouses such as 'Pione', 'Fujiminori', and 'Honey Black' which are noted for their large-sized berries and excellent taste becomes popular as well as the European grapes, namely 'Rizamat', 'Italia', and 'Rosario Bianco' for their high fruit quality. Despite these developments, it was deemed important to further develop new grape cultivars that are well adapted to the Korean climate and growing conditions with emphasis on consumers' quality preferences.

This study deals on developing new grape cultivars with resistance to major diseases as well as the updates on the germplasm collection of wild grapevines, and rootstock breeding program in Korea.

WILD GRAPE GERMPLASM CONSERVATION AND UTILIZATION

Among the 30 Asiatic grape species in eastern Asia, the *Vitis amurensis* Rupr., *V. flexuosa* Thumb, *V. coignetia* Pulliat, and *V. thunbergii* are known to be native to Korea. Although commonly known *V. amurensis* Rupr. has not been cultivated, the edible fruits from this species are collected and used as fresh fruit, juice, and wine in mountain areas. Korean wild grapes were collected mainly from mountain areas all over the country and maintained as grapevine germplasm for breeding particularly those possessing unique charac-

Received: 28 February, 2007. Accepted: 13 April, 2007.

Invited Mini-Review

5. 논문발표

1) Yun, H.K., Park, K.S. Rho, J.H., Choi, Y.J., and Jeong, S.B. 2005. Evaluating the resistance against anthracnose by bioassay using culture filtrates from E. ampelina. HortScience 40(4):1070

2) Yun, H.K., Park, K.S. Rho, J.H., Choi, Y.J., and Jeong, S.B. 2004. Developing screening system for resistance to anthracnose in grapes by using culture filtrates from E. ampelina. Proceeding of 7th conference of European Foundation for Plant Pathology p.58.

7. 기술이전(2004) : 포도 새눈무늬병 품종 저항성 검정 체계

【 산업체 기술이전】

건의제목명	포도 새눈무늬병 품종 저항성 검정 체계					
구 분	분 야	과수	작 목	포도	색 인 어	새눈무늬병
연구개발자	소속기관		성 명	전화 및 e-mail주소		
	원예연구소		윤해근			
공동개발자	원예연구소		박교선			
	원예연구소		조현모			
	원예연구소		송기철			
	원예연구소		박서준			
	원예연구소		류명상			

1. 목 적

- 포도 새눈무늬병 저항성 품종 판별 체계를 보급하여 새눈무늬병 저항성 포도 품종의 재배를 유도

2. 기대효과

- 포도 새눈무늬병 품종 저항성 검정의 효율 극대화
- 포도 새눈무늬병 저항성 품종의 보급 촉진 및 재배 면적 확대
- 저항성 품종 재배를 통한 생산비 절감 및 포도과실의 소비 촉진

3. 기술이전내역

가. 포도 새눈무늬병균 접종 최적 포자농도 및 온도 : 10^5 spores/ml, 24~28℃

나. 포도 새눈무늬병균 접종 최적 식물체 생육단계 : 신초정단 3~4엽

다. 포도 새눈무늬병균 접종 후 적정 포화습도 유지기간 : 48시간

라. 포도 새눈무늬병균 배양여액을 이용한 저항성 검정 :

액체배양, 배양여액 회수, 잎상처 부위에 처리- 저항성 검정

8. 영농활용(2005) : 포도 주요 품종의 새눈무늬병 저항성 판별

【 영 농 활 용 】

활용제목명	포도 주요 품종의 새눈무늬병 저항성 판별					
활용분야	과수					
활용내용요약	○ 품종간 판별을 통해 새눈무늬병저항성 품종의 재배 촉진 ○ 새눈무늬병 저항성 품종 - 유럽종 포도(*Vitis vinifera*) : 블랙로즈, 출운퀸, 크리스마스로즈, 쿠르간로즈, 허니레드 - 교잡종(*Vitis* hybrids) : 캠벨얼리, 나이아가라, 대립나이아가라, 새단, 탐나라, 홍남양, 홍산언					
연구과제명	포도 새눈무늬병 저항성 검정 및 MAS를 위한 내병성 분자표지 개발					
세부과제명	포도 새눈무늬병 저항성 검정(과제구분: 외부수탁)					
구 분	분 야	원예	작 목	포도	색인어	새눈무늬병, 저항성, 품종
연구개발자	소속기관		성명	전화 및 e-mail주소		
	원예연 과수과		윤해근			
공동개발자	원예연 과수과		박교선			
	원예연 과수과		노정호			
	원예연 과수과		김기홍			
	원예연 과수과		정성민			

Ⅰ. 요 약

1. 활용

가. 포도 주요 품종의 새눈무늬병 저항성 판별

나. 시군 농업기술센터 및 과수묘목업체를 통한 저항성 품종 선택 권장

2. 유사 영농활용 기술과의 차이점

- 해당사항 없음

3. 현황 및 문제점

가. 고품질 포도 품종 재배 증가 추세

나. 거봉, M.B.A 등 유럽종 및 교잡종 품종의 재배로 인한 새눈무늬병 발생 증가

다. 친환경농업을 위한 농약 살포 기피

라. 대농민 유전자원 및 주요 재배 품종의 새눈무늬병해 저항성 정보 제공 필요

4. 주요연구결과

○ 포도 (*Vitis* spp.)의 품종별 새눈무늬병 저항성 정도('03~'05, 원예연구소)

구 분	품 종
저항성품종	나이아가라, 대립나이아가라, 블랙로즈, 새단, 출운퀸, 크리스마스로즈, 쿠르간로즈, 허니레드, 홍남양, 홍산언
중도저항성품종	금성, 네오마스캇, 네오마트, 몰간숀, 부원, 양옥, 왕사, 유니발라세븐, 자옥, 장룡, 천수, 캠벨얼리, 탐나라, 피오네, 홍봉, 흑왕, 흑요
중도감수성품종	거봉, 고묵, 등임(후지미노리), 레드퀸, 로도베리, 북기레드, 용보, 이두금, 적령, 청수, 허니블랙, 홍부사, 홍이두, 흑룡
감수성품종	갑비로, 고미, 매니큐어핑거, 로자리오비안코, 루비오쿠야마, 리자마트, 마리오, 백봉, 북광, 블랙삼척, 블랙스완, 블랙올림피아, 블랙아이, 세토자이언트, 센테니얼시들레스, 올림피아, 우내, 자나, 톰슨씨들레스, 피오네, 71068,

5. 기대효과

가. 고품질 포도 새눈무늬병 저항성 품종 재배 촉진

나. 친환경 포도 생산 환경 조성

- 환경오염 예방 및 인체 독성 감소

다. 포도 생산비 절감을 통한 경쟁력 강화

6. 적 요

가. 유럽종 포도(*V. vinifera*) 중 새눈무늬병 저항성 품종

○ 블랙로즈, 출운퀸, 크리스마스로즈, 쿠르간로즈, 허니레드

나. 구미교잡종(*Vitis* hybrids) 중 새눈무늬병 저항성 품종

○ 캠벨얼리, 나이아가라, 대립나이아가라, 새단, 탐나라, 홍남양, 홍산언